



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039330 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280058094. 7

A61K 45/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 09. 26

A61K 38/15 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/574 (2006. 01)

61/539, 452 2011. 09. 26 US

A61K 31/53 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/057175 2012. 09. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/049093 EN 2013. 04. 04

(71) 申请人 细胞基因公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 约翰·A·科普兰三世

汉·温·图恩 西蒙·詹姆士·库珀

劳拉·安·马洛

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 31/706 (2006. 01)

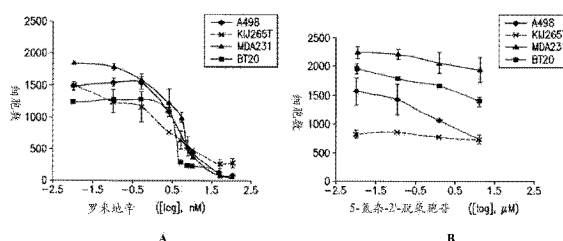
权利要求书1页 说明书30页 附图17页

(54) 发明名称

化疗耐药性的癌症的联合治疗

(57) 摘要

本发明公开了治疗、预防或控制三阴性乳腺癌 (TNBC) 或透明细胞肾细胞癌 (ccRCC) 的方法。该方法包括了 HDAC 抑制剂罗米地辛联合胞苷类似物的给药。还公开了适于在此提供的方法中使用的药物组合物和单一单位剂型。



1. 一种治疗化疗耐药性的癌症的方法,所述方法包括对所述治疗有需要的患者给药治疗有效量的 HDAC 抑制剂和治疗有效量的 DNA 脱甲基剂。

2. 权利要求 1 的方法,其中化疗耐药性的癌症为三阴性乳腺癌 (TNBC)。

3. 权利要求 1 的方法,其中化疗耐药性的癌症为透明细胞肾细胞癌 (ccRCC)。

4. 权利要求 1-3 任一项的方法,其中 HDAC 抑制剂为罗米地辛。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中 DNA 脱甲基剂为胞苷类似物。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法,其中胞苷类似物为阿扎胞苷或地西他滨。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法,其中 HDAC 抑制剂为罗米地辛,数量约 0.5 至约 28mg/m² 每天, DNA 脱甲基剂为胞苷类似物,数量约 10-150mg/m² 每天。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法,其中胞苷类似物和罗米地辛静脉给药。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中,胞苷类似物的数量为约 15、25、50、75 或 100mg/m² 每天。

10. 权利要求 1-9 任一项的方法,其中罗米地辛的数量为约 8、10、12 或 14mg/m² 每天。

11. 权利要求 1-10 之一的方法,其中 HDAC 抑制剂为罗米地辛,数量约 10 至约 300mg/m² 每天, DNA 脱甲基剂为胞苷类似物,数量约 10-150mg/m² 每天。

12. 权利要求 11 的方法,其中胞苷类似物静脉给药,罗米地辛口服给药。

13. 权利要求 11 的方法,其中胞苷类似物皮下给药,罗米地辛口服给药。

14. 权利要求 11 的方法,其中胞苷类似物口服给药,罗米地辛静脉给药。

15. 权利要求 11 的方法,其中胞苷类似物和罗米地辛口服给药。

16. 权利要求 11-15 任一项的方法,其中罗米地辛的数量为约 25 至约 200mg/m² 每天。

17. 权利要求 11-16 任一项的方法,其中给药的罗米地辛的数量为约 50、75 或 100mg/m² 每天。

18. 权利要求 11-17 任一项的方法,其中,胞苷类似物的数量为约 15、25、50、75 或 100mg/m² 每天。

19. 权利要求 1-17 任一项的方法,其中脱甲基剂为胞苷类似物,在一个 28 天的周期内给药,数量约 15、25、50、75 或 100mg/m² 每天,给药约 3 至约 14 天,然后是约 21 至约 25 天的停药期,且其中 HDAC 抑制剂为罗米地辛,在 28 天周期的第 1、8 和 15 天给药,数量约 10 或 12mg/m² 每天。

20. 权利要求 5-19 任一项的方法,其中胞苷类似物为地西他滨。

21. 权利要求 5-19 任一项的方法,其中胞苷类似物为阿扎胞苷。

22. 一种包含罗米地辛和胞苷类似物的药物组合物。

23. 权利要求 22 的药物组合物,其中胞苷类似物为地西他滨。

24. 权利要求 22 的药物组合物,其中胞苷类似物为阿扎胞苷。

25. 一种鉴定经诊断患有 TNBC 或 ccRCC 的患者在用罗米地辛和胞苷类似物联合治疗后具有增加的几率获得改善的总生存率的方法。

26. 权利要求 25 的方法,其中胞苷类似物为地西他滨。

27. 权利要求 25 的方法,其中胞苷类似物为阿扎胞苷。

化疗耐药性的癌症的联合治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 9 月 26 日提交的美国临时专利申请系列号 61/539,452 的优先权,其公开内容在此全文引入作为参考。

[0003] 领域

[0004] 提供了使用组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂和 DNA 甲基转移酶抑制剂联合治疗化疗耐药性的癌症的方法。在一个实施方式中,HDAC 抑制剂为罗米地辛 (Romidepsin)。在另一个实施方式中,DNA 甲基转移酶抑制剂为阿扎胞苷或地西他滨。在又一个实施方式中,化疗耐药性的癌症为三阴性乳腺癌 (TNBC) 或透明细胞肾细胞癌 (ccRCC)。

[0005] 背景

[0006] 肾细胞癌 (RCC) 是第三大流行的泌尿道癌症和男性第 10 大常见癌症死亡原因以及女性第 9 大原因 (van Spronsen 等人, Crit Rev Oncol Hematol 55 :177-91, 2005)。透明细胞肾细胞癌 (ccRCC) 是 RCC 的最大亚型, 占所有肾脏癌症的大约 80%。

[0007] 乳腺癌是女性最常见的癌症, 其中三阴性乳腺癌 (TNBC) 占新诊断乳腺癌的大约 15%。TNBC 与不良预后、较高的有丝分裂指数和较低的年龄有关 (Kreike 等人, Breast Cancer Res. ;9 :R65, 2007)。

[0008] 在 ccRCC 和乳腺癌中, 早期诊断和治疗显著增加中数生存率。这两种疾病在转移时大多是侵袭和耐药的。转移性疾病的发展在 ccRCC 患者中将 5 年存活率减少至低于 10% (Pantuck 等人, J Urol 166 :1611-23, 2001), 在 TNBC 中将大多数病人的存活率减少至约 18 个月 (Berrada 等人, Ann Oncol 21 Suppl 7 :vii30-vii5, 2010)。

[0009] 癌症是一种由遗传异常的累积促进的多步骤过程, 其产生遗传不稳定和肿瘤抑制子及原癌基因的突变。此外, 癌症中的表观遗传变异通过 DNA 甲基化和组蛋白脱乙酰化导致对基因表达的调控。在富 CpG 岛区域的胞嘧啶高甲基化和促进核染色质更紧构型的组蛋白脱乙酰化都对基因表达的不恰当沉默做出贡献。HDAC 抑制剂例如曲古抑菌素 A (TSA) 和罗米地辛和脱甲基转移酶抑制剂例如地西他滨 (DAC ;5- 氮杂 -2' - 脱氧胞苷) 和 5- 阿扎胞苷 (VIDAZA[®]) 能够逆转这些表观事件并抑制癌症表型。

[0010] 组蛋白脱乙酰酶抑制剂罗米地辛在体外和体内的人细胞系中均表现出抗肿瘤性质 (Ueda 等人, Biosci Biotechnol Biochem 58 :1579-83, 1994)。很多研究确认对肿瘤细胞的罗米地辛治疗导致对血管生成和细胞生长的抑制, 同时诱导细胞凋亡、细胞坏死和细胞分化 (Jung M., Curr Med Chem 8 :1505-11, 2001 ;Zhu 等人, Cancer Res 61 :1327-33, 2001 ;Sandor 等人, Clin Cancer Res 8 :718-28, 2002 ;Konstantinopoulos 等人, Cancer Chemother Pharmacol 58 :711-5, 2006 ;Liu 等人, Mol Cancer Ther 7 :1751-61, 2008)。在 2009 年, 罗米地辛被 FDA 批准用于皮肤 T 细胞淋巴瘤和周围 T 细胞淋巴瘤的治疗。

[0011] DNA 甲基转移酶抑制剂是胞嘧啶的类似物, 其在用 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 共价连接之前的复制过程中被引入 DNA, 从而导致基因甲基化的整体性缺失 (Christman J. K., Oncogene 21 :5483-95, 2002)。用地西他滨进行癌细胞模型的治疗通过沉默基因的再表达 (Bender 等人, Cancer Res 58 :95-101, 1998 ;Herman 等人, N Engl J Med 349 :2042-54, 2003)

和 p53 及 p21^{Waf1/Cip1} 的活化 (Zhu 等人, J Biol Chem 279 :15161-6, 2004) 导致抑制生长和凋亡。近期研究确认地西他滨在导致 DNA 片段化和激活 ATM 和 ATR DNA 修复途径 (Palii 等人, Mol Cell Biol 28 :752-71, 2008) 的同时导致 G2 俘获、降低无性系存活并抑制细胞中的生长。在 2006 年,地西他滨被 FDA 批准用于骨髓增生异常综合征的治疗。

[0012] 作为癌症发展机理的 Wnt 信号途径的组成型活化首先在结肠癌中获得确认 (Korinek 等人, Science 275 :1784-7, 1997)。分泌的 Wnt 家族成员与细胞表面卷曲受体复合物的结合通过经典 / β -连环蛋白途径或一种非经典 / β -连环蛋白独立途径导致下游基因靶标的活化 (Widelitz R., Growth Factors ;23 :111-6, 2005)。这些途径中的哪一个被活化是由 Wnt/Frizzled 复合物的组成控制的。典型 Wnt 信号途径影响与细胞增殖、存活和侵入有关的基因 (Gumz 等人, Clin Cancer Res 13 :4740-9, 2007), 而非典型途径则激活那些涉及细胞粘附、迁移和细胞骨架重组的基因 (Komiya 等人, Organogenesis 4 :68-75, 2008)。sFRP1, 分泌的卷曲相关蛋白 1, 通过隔离 Wnt 蛋白和与卷曲蛋白异二聚化形成非功能性受体复合物起到 Wnt 负调节子的作用。然而, 在结直肠癌 (Suzuki 等人, Nat Genet 36 :417-22, 2004); 卵巢癌 (Takada 等人, Cancer Sci 95 :741-4, 2004); 肺癌 (Fukui 等人, Oncogene 24 :6323-7, 2005); 肝细胞癌 (Shih 等人, Int J Cancer 121 :1028-35, 2007); 肾癌 (Gumz 等人, 同上) 和乳腺癌 (Lo 等人, Cancer Biol Ther 5 :281-6, 2006) 中, 已确认 sFRP1 启动子的高甲基化和随后的表达缺失通过典型和非典型途径允许异常的 Wnt 信号。

[0013] 在耐药性 TNBC 和 ccRCC 中, 再表达后生 (epigenetically) 沉默基因的策略是一种有吸引力的化疗选择。在很少存在替代治疗的癌症种类中, 有效和安全的联合治疗将会是很有价值的。

[0014] 概述

[0015] 在一个实施方式中, 本文提供了用于诊断、治疗或控制患者中化疗耐药性的癌症的方法, 包括对所述患者给药有效量的 HDAC 抑制剂组合 DNA 甲基转移酶抑制剂。

[0016] 可用于本文提供的方法的 HDAC 抑制剂包括但不限于曲古抑菌素 A (TSA)、伏立诺他 (SAHA)、丙戊酸 (VPA)、罗米地辛和 MS-275。在一个实施方式中, HDAC 抑制剂为罗米地辛。

[0017] 在一个实施方式中, 可用于本文提供的方法的 DNA 甲基转移酶抑制剂为胞苷类似物。可用于本文提供的方法的胞苷类似物包括但不限于 5-氮杂胞苷 (阿扎胞苷)、5-氮杂脱氧胞苷 (地西他滨)、阿糖胞苷、假异胞苷、吉西他滨、zebularine、FCdR、恩曲他滨、5,6-二氢-5-氮杂胞苷和普鲁卡因。在一个实施方式中, 胞苷类似物为地西他滨或阿扎胞苷。

[0018] 可通过本文提供的方法治疗的化疗耐药性的癌症包括但不限于皮肤; 淋巴结; 乳房; 宫颈; 子宫; 胃肠道; 胰腺, 肺; 卵巢; 前列腺; 结肠; 直肠; 口; 脑; 头部和颈部; 喉; 睾丸; 肾; 胰腺; 骨; 脾; 肝; 膀胱; 喉; 或鼻腔的癌症和复发或难治性癌症。在一个实施方式中, 化疗耐药性的癌症为乳腺癌、肝癌、肾癌或胰腺癌。在一个具体实施方式中, 癌症为三阴性乳腺癌 (TNBC) 或透明细胞肾细胞癌 (ccRCC)。

[0019] 在另一个实施方式中, 本文提供了一种用于诊断, 治疗或控制患者中的化疗耐药性的癌症的药物组合物, 其包含 HDAC 抑制剂、DNA 甲基转移酶抑制剂和药学上可接受的载体。在一个实施方式中, HDAC 抑制剂为罗米地辛。在一个实施方式中, DNA 甲基转移酶抑制

剂为胞苷类似物。在一个实施方式中,胞苷类似物为地西他滨或阿扎胞苷。

[0020] 在又一个实施方式中,本文提供了单一单位剂量形式、给药方案和试剂盒,其包括 HDAC 抑制剂和 DNA 甲基转移酶抑制剂。在一个实施方式中,HDAC 抑制剂为罗米地辛。在一个实施方式中,DNA 甲基转移酶抑制剂为胞苷类似物。在一个实施方式中,胞苷类似物为地西他滨或阿扎胞苷。

[0021] 在一个实施方式中,本文提供了用于癌症的诊断、治疗或控制的生物标记物。在一个实施方式中,癌症为 TNBC 或 cRCC。在一个实施方式中,可用于本文提供的方法的生物标记物包括但不限于 RhoB、p21、p15、p16、T β RIII、GATA3、sFRP1、sFRP2、sFRP4、sFRP5、DKK1 和 DKK3。

[0022] 在一个实施方式中,本文提供了用于预测或监控对有需要的病人进行的治疗处理的效果或临床益处的生物标记物,例如,在用 HDAC 抑制剂和 DNA 甲基转移酶抑制剂组合治疗的 TNBC 或 cRCC 患者中。在一个实施方式中,HDAC 抑制剂为罗米地辛。在一个实施方式中,DNA 甲基转移酶抑制剂为胞苷类似物。在一个实施方式中,胞苷类似物为地西他滨或阿扎胞苷。在一个实施方式中,可用于本文提供的方法的生物标记物包括但不限于 RhoB、p21、p15、p16、T β RIII、GATA3、sFRP1、sFRP2、sFRP4、sFRP5、DKK1 和 DKK3。

[0023] 在一个实施方式中,本文提供了一种预测或监控治疗处理的效果或临床益处的方法,包括在治疗前和治疗中检测从患有某种疾病的患者获得的细胞的一种或多种特定生物标记物的水平。在一个实施方式中,所述疾病为癌症。在一个实施方式中,癌症为化疗耐药性的癌症。在一个实施方式中,化疗耐药性的癌症为 TNBC 或 cRCC。在一个实施方式中,所述治疗是给药 HDAC 抑制剂和 DNA 甲基转移酶抑制剂的组合。在一个实施方式中,HDAC 抑制剂为罗米地辛。在一个实施方式中,DNA 甲基转移酶抑制剂为胞苷类似物。在一个实施方式中,胞苷类似物为地西他滨或阿扎胞苷。

[0024] 在一个实施方式中,本文提供了一种预测或监控罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷的组合在 TNBC 或 cRCC 患者中的效果的方法,包括在该组合治疗前和治疗中检测从患者获得的细胞的一种或多种特定生物标记物的水平。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1A 显示了在 ccRCC 和 TNBC 细胞系中对罗米地辛 (0.01nM 至 100nM) 的响应。图 1B 显示了在 ccRCC 和 TNBC 细胞系中对地西他滨 (0.01 μ M 至 10 μ M) 的响应。细胞系 A498、KIJ265T、MDA-231 和 BT-20 以 1×10^5 细胞 / 孔接种,每剂量三份。收集前对细胞进行 72 小时的处理。

[0027] 图 2A、2B、2C 和 2D 显示了在 ccRCC 和 TNBC 细胞系中对罗米地辛和地西他滨的组合药物剂量响应。(A) A498、(B) KIJ265T、(C) MDA-231 和 (D) BT-20 细胞系以 1×10^5 细胞 / 孔接种,每个测试的药物剂量三份。在用剂量范围为 0.5–7.5nM 的罗米地辛处理额外的 24 小时前,将细胞与 0.1、1 或 10 μ M 剂量的地西他滨一起孵育 48 小时。数据显示为增殖曲线,包括单治疗对照。

[0028] 图 3A、3B、3C 和 3D 显示了在用罗米地辛和地西他滨的组合治疗的 ccRCC 和 TNBC 细胞系中对细胞死亡的协同诱导。分析了用单治疗剂量的地西他滨或罗米地辛处理的 (A) A498、(B) KIJ265T、(C) MDA-231 和 (D) BT-20 细胞系相对于组合治疗导致细胞死亡的药物效果。用溶媒 (DMSO) 对照处理的细胞被用于设定用于分析的群参数。对处理的细胞进行碘

化丙啶染色并通过流式细胞术分析。

[0029] 图 4A-4B 显示了在用 $1\ \mu\text{M}$ 地西他滨和 5nM 罗米地辛处理的 ccRCC 和 TNBC 细胞系中对 sFRP1 表达和凋亡标记物的分析。图 4A 显示了处理的 A498、KIJ265T、MDA-231 和 BT-20 细胞产生的蛋白裂解物的免疫印迹,其中探测了 PARP 和半胱氨酸蛋白酶 -3 裂解。图 4C 显示了通过使用用于扩增甲基化的 (M) 或未甲基化的 (U) sFRP1 序列的定义的引物的甲基化特异性 PCR 对 sFRP1 启动子的甲基化状态和单一及组合药物治疗调节这些甲基化事件的能力的分析。

[0030] 图 5A-5G 显示了 sFRP1 表达水平在用地西他滨和罗米地辛处理的 ccRCC 和 TNBC 细胞系中对细胞存活的影响。图 5A 是用 sFRP1shRNA 感染的 MDA-231 和 KIJ265T 细胞的实时 PCR。图 5B 和 5C 显示了在被组合剂量范围的地西他滨和罗米地辛处理时 KIJ265T 和 MDA-231 细胞的增加的细胞存活。图 5D 显示了当用组合的地西他滨和罗米地辛处理时,在 sFRP1 下调 (knockdown) 的 KIJ265T 和 MDA-231 细胞中的凋亡减弱是通过相对非靶向对照降低 PARP 和半胱氨酸蛋白酶 -3 裂解实现的。图 5E 显示了当用重组人 sFRP1 处理时, KIJ265T 和 MDA-231 亲代细胞系以剂量依赖方式降低的增殖。图 5F 显示了当使用组合剂量的 1M 5A2D 和 5nM 罗米地辛处理时,得到的 sFRP1 再表达的损失产生了 KIJ265T 和 MDA-231 细胞的细胞存活增加。图 5G 显示了在单一剂量的 1.4nM sFRP1 后,用重组人 sFRP1 处理并以剂量依赖的方式观察到且由 PARP 裂解所示验证其为通过诱导凋亡时, KIJ265T 和 MDA-231 亲代细胞系的降低的增殖。

[0031] 图 6A 和 6B 显示了对 VHL 突变体 (外显子 2c. $407\text{T}>\text{C}$) KIJ265T 透明细胞肾细胞癌细胞系的鉴别。图 6A 显示了 KIJ265T 患者 RCC 组织中 12 种肾脏特异性标记物的 STR 分析。图 6B 通过使用 IHC 染色肾脏细胞标记物,包括 RCC-Ma、水通道蛋白、podocin、PAX2 和 GGT, 显示 KIJ265T ccRCC 细胞系来自肾脏组织。

[0032] 图 7A-7D 显示了在用溶媒对照或 72 小时组合治疗的 (A) A498、(B) KIJ265T、(C) MDA231 和 (D) BT20 细胞系中, sFRP1 启动子区域 (起始位点前 -299bp 至 -70bp) 的甲基化模式测序分析。在组合治疗后的全部细胞系中观察到启动子甲基化的整体降低 ($n = 10$ 个克隆)。

[0033] 详细描述

[0034] 定义

[0035] 应理解上述一般性描述和之后的详细描述仅为示例性和解释性的,不限制所要求的任何主题。在本申请中,除非另有说明,否则单数的使用包括了复数。必需注意,如说明书和随后的权利要求中使用的单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数的指示物,除非上下文清楚地另有陈述。还应注意,除非另有说明,否则“或”的使用表示“和 / 或”。此外,术语“包括”及其它形式例如“包括”、“包括”和“包括的”的使用是非限制性的。

[0036] 如本文使用的术语“治疗”是指全部或部分缓解与失调或疾病相关的症状 (例如癌症或肿瘤综合征),或缓解或根除那些症状的进一步发展或恶化。

[0037] 如本文使用的术语“预防”表示全部或部分预防疾病或失调 (例如,癌症) 或其症状的发生、复发或扩散。

[0038] 与 HDAC 抑制剂连用的术语“有效量”表示能够全部或部分减轻与疾病例如癌症相关的症状、或减缓或停止这些症状进一步发展或恶化、或在具有患癌风险的主体中预防癌

症或对癌症提供预防治疗的数量。有效量的 HDAC 抑制剂,例如在药物组合物中,可以是能够实现期望效果的水平;例如,口服和肠胃外给药的单位剂量为约 0.005mg/kg 主体体重至约 100mg/kg 主体体重。如对本领域技术人员是显而易见的,可以预期本文公开的有效量的 HDAC 抑制剂可随着待治疗的迹象的严重程度发生变化。

[0039] 如本文使用的术语“药学上可接受的载体”指在将主体化合物从身体的一个器官或部分的给药位点携带或运送至身体的另一器官或部分时、或在体外分析系统中所涉及的药学上可接受的材料、组合物或溶媒,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂、或封装材料。在与制剂的其它成分相容且不伤害施用其的主体的意义上,每种载体必须为“可接受的”。可接受的载体也不应改变主体化合物的特定活性。

[0040] 术语“药学上可接受的”指生理可耐受的和当对人给药时一般不产生过敏或类似不良反应(例如胃部不适、眩晕等等)的分子实体和组合物。

[0041] 术语“药学上可接受的盐”涵盖了该术语所涉及的化合物的无毒酸和碱加成盐。可接受的无毒酸加成盐包括衍生自本领域已知的有机和无机酸或碱的那些盐,包括如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸、甲磺酸、乙酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸、山梨酸、乌头酸、水杨酸、邻苯二甲酸、栓塞酸、庚酸等。

[0042] 天然呈酸性的化合物能够与各种药学上可接受的碱形成盐。可用来制备这种酸性化合物的药学上可接受的碱加成盐的碱是那些形成无毒碱加成盐(即含有药学上可接受的阳离子的盐,例如但不限于碱金属或碱土金属的盐,尤其是钙盐、镁盐、钠盐或钾盐)的碱。合适的有机碱包括但不限于,N,N-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、meglumine(N-甲基葡萄糖胺)、赖氨酸和普鲁卡因。

[0043] 术语“前药”是指化合物的衍生物,其在生物学条件下(体外或体内)能够发生水解、氧化或发生其他反应而提供该化合物。前药的实例包括但不限于包含可生物水解的部分的本发明的免疫调节化合物的衍生物,该可生物水解的部分例如可生物水解的酰胺、可生物水解的酯、可生物水解的氨基甲酸盐、可生物水解的碳酸盐、可生物水解的脲和可生物水解的磷酸盐类似物。前药的其他实例包括含有-NO、-NO₂、-ONO 或 -ONO₂ 部分的本发明的免疫调节化合物的衍生物。前药通常可利用公知的方法来制备,如在 Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff 编辑,第5版,1995) 和 Design of Prodrugs (H. Bundgaard 编辑,Elsevier, New York 1985) 中描述的方法。

[0044] 当用于治疗组合物时,术语“单位剂量”指本领域已知的作为适于人类的单一剂量的物理性分散单元,各个单位剂量包含足够产生期望治疗效果的预定量活性成分以及需要的稀释剂,即,载体或溶媒。

[0045] 术语“单位剂量形式”指本领域已知的适于施用于人类和动物个体并分别包装的物理性分散单元。各个单位剂量包含足够产生期望治疗效果的预定量活性成分以及需要的药物载体或赋形剂。单位剂量形式可以部分施用或多份施用。单位剂量形式的实例包括安瓿、注射器,以及单独包装的片剂和胶囊。

[0046] 术语“多剂量形式”是包装在一个容器中的多个相同的单位剂量形式,以分离的单位剂量形式施用。多剂量形式的实例包括小瓶、片剂或胶囊的瓶、或品脱或加仑的瓶。

[0047] 术语“肿瘤”指所有新生细胞生长和增殖,不论是恶性或良性的,以及所有前癌性和癌性细胞和组织。如本文使用的术语“新生的”指任何形式的异调节或未调节的细胞生

长,不论是恶性或良性的,其导致不正常的组织生长。从而,“新生细胞”包括具有异调节或未调节的细胞生长的恶性和良性细胞。

[0048] 术语“癌症”包括但不限于实体瘤和血液出现的肿瘤。术语“癌症”指皮肤组织、器官、血液和血管的疾病,包括但不限于膀胱、骨骼或血液、脑、乳腺、宫颈、胸、结肠、子宫内膜(endometrium)、食道、眼、头、肾、肝、淋巴结、肺、口腔、颈、卵巢、胰腺、前列腺、直肠、胃、睾丸、咽和子宫的癌症。

[0049] 术语“增生性”失调或疾病指在多细胞生物中对该多细胞生物产生伤害(即,不舒服或降低预期寿命)的一个或多个细胞团的不需要的细胞增殖。例如,如本文使用的增生性失调或疾病包括新生性失调和其它增生性失调。

[0050] 术语“复发”指曾在治疗后获得癌症缓解的主体具有癌细胞的回复。

[0051] 术语“难治性”或“抵抗性”指即使在强化治疗后,主体在身体内仍具有残余癌细胞的情况。

[0052] 术语“化疗耐药性的癌症”表示一类癌症,当所述癌症已经响应治疗后其突然开始生长,因为癌细胞不响应化疗效果。

[0053] 术语“活性成分”和“活性物质”指单独或组合一种或多种药学上可接受的赋形剂对主体给药用于治疗、预防或减轻病况、失调或疾病的一种或多种症状的化合物。如本文使用的“活性成分”和“活性物质”可以是本文描述的化合物的光活性异构体或同位素变体。

[0054] 术语“药物”、“治疗剂”和“化疗剂”指对主体给药用于治疗、预防或减轻病况、失调或疾病的一种或多种症状的化合物或其药物组合物。

[0055] 除非另有说明,术语“一起给药”和“与……组合”包括在非特定时间限制内同时、共同或连续给药两种或多种治疗剂。在一个实施方式中,所述试剂在相同的时间存在于细胞或主体体内,或在相同的时间发挥其生物或治疗效果。在一个实施方式中,治疗剂在同一组合物或单位剂型中。在其它实施方式中,治疗剂在分离的组合物或单位剂型中。在某些实施方式中,第一试剂可以在第二治疗剂给药前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周前)给药、基本上伴随着第二治疗剂给药、或在其之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之后)给药。

[0056] 如本文使用的,除非另有说明,术语“组合物”、“制剂”和“剂型”意为涵盖了包含规定成分(如果有说明,以规定数量)的产品,以及直接或间接地来自规定数量的规定成分的任何产品。

[0057] 术语“DNA 甲基转移酶抑制剂”指抑制甲基转移至 DNA 的试剂。在一个实施方式中,DNA 甲基转移酶抑制剂为胞苷类似物。

[0058] 本文所指的胞苷类似物意为涵盖了胞苷类似物的游离碱或其盐、溶剂化物、水合物、共晶物、复合物、前药、前体、代谢物和/或衍生物。在某些实施方式中,本文所指的胞苷类似物涵盖了胞苷类似物的游离碱或其盐、溶剂化物、水合物,共晶物或复合物。在某些实施方式中,本文所指的胞苷类似物涵盖了胞苷类似物的游离碱或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0059] 术语“水合物”表示本文提供的化合物或其盐,其进一步包括通过非共价分子间力

结合的化学计量或非化学计量数量的水。

[0060] 术语“溶剂化物”表示由一种或多种溶剂分子联合本文提供的化合物形成的溶剂化物。术语“溶剂化物”包括水合物（例如，半水合物、单水合物、二水合物、三水合物、四水合物等等）。

[0061] 如本文使用的，除非另有说明，本文描述的化合物意为涵盖了所有可能的立体异构体，除非指定了一个特别的立体化学。如果化合物的结构异构体可通过低能量壁垒互相转换，该化合物可作为单一互变异构体或互变异构体混合物存在。其可采取质子互变异构的形式；或在例如含有芳香基团的化合物中采用所谓的价互变异构的形式。

[0062] 在一个实施方式中，本文描述的化合物意为涵盖了同位素富集类似物。例如，化合物中的一个或多个氢位点可富集氘和/或氚。可在化合物特定位点富集其它合适的同位素包括，但不限于，C-13、C-14、N-15、O-17 和/或 O-18。在一个实施方式中，本文描述的化合物可在多于一个位点富集相同或不同的同位素。

[0063] 术语“约”或“大约”表示由本领域普通技术人员确定的对于一个特定值的可接受的误差，其部分取决于该值是如何检测或确定的。在某些实施方式中，术语“约”或“大约”表示在 1、2、3 或 4 个标准差之内。在某些实施方式中，术语“约”或“大约”表示在给定值或范围的 50%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5% 或 0.05% 之内。

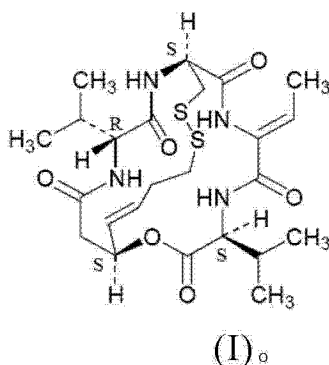
[0064] 罗米地辛

[0065] 罗米地辛是由 Fujisawa Pharmaceuticals 从青紫色素杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) 中分离的天然产物（公开的日本专利申请号 64872, 1990 年 12 月 11 日授权的美国专利 4,977,138, Ueda 等人, *J. Antibiot* (Tokyo) 47:301-310, 1994; Nakajima 等人, *Exp Cell Res* 241:126-133, 1998; 和 W002/20817; 其均在此引入作为参考）。它是由四个氨基酸残基 (D-缬氨酸、D-半胱氨酸、脱氢酪氨酸和 L-缬氨酸) 和一种同时含有酰胺和酯键的新型酸 (3-羟基-7-巯基-4-庚烯酸) 组成的二环肽。除了使用发酵从 *C. violaceum* 中获得外，罗米地辛也可通过合成或半合成方式制备。由 Kahn 等人报道的罗米地辛全合成涉及 14 个步骤，产生 18% 总产率的罗米地辛 (Kahn 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 118:7237-7238, 1996)。

[0066] 罗米地辛的化学名称是 (1S, 4S, 7Z, 10S, 16E, 21R)-7-亚乙基-4, 21-双(1-甲基乙基)-2-氧杂-12, 13-二硫-5, 8, 20, 23-四氮杂二环 [8.7.6] 二十三碳-16-烯-3, 6, 9, 19, 22-戊酮。经验式为 $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$ 。分子量为 540.71。在室温下，罗米地辛是白色粉末。

[0067] 其结构如下所示 (式 I)：

[0068]



[0069] 已显示罗米地辛具有抗微生物、免疫抑制和抗肿瘤活性。其被测试用于例如治疗恶性血液病（例如，皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、周围 T 细胞淋巴瘤 (PTCL)，多发性骨髓瘤等）和实体瘤（例如，前列腺癌、胰腺癌等）患者，被认为是通过选择性抑制脱乙酰酶（例如，组蛋白脱乙酰酶、微管蛋白脱乙酰酶）发挥作用，从而有望成为发展新系列抗癌治疗的新目标 (Nakajima 等人, Exp Cell Res 241 :126-133, 1998)。罗米地辛作用的一种模式涉及抑制一种或多种类别的组蛋白脱乙酰酶 (HDAC)。罗米地辛的制备和纯化描述于，例如，美国专利 4,977,138 和国际 PCT 申请公开 W002/20817，其均在此引入作为参考。

[0070] 罗米地辛的示例性形式包括但不限于具有期望活性（例如，脱乙酰酶抑制活性、侵入抑制、细胞毒性）的盐、酯、前药、同分异构体、立体异构体（例如，对映异构体、非对映体）、互变异构体、受保护形式、还原形式、氧化形式、衍生物及其组合。在某些实施方式中，罗米地辛是一种制药等级的材料，符合美国药典、日本药典或欧洲药典的标准。在某些实施方式中，罗米地辛是至少 95%、至少 98%、至少 99%、至少 99.9% 或至少 99.95% 纯的。在某些实施方式中，罗米地辛是至少 95%、至少 98%、至少 99%、至少 99.9% 或至少 99.95% 单体的。在某些实施方式中，在罗米地辛材料中不能检出杂质（例如，氧化材料、还原材料、二聚化或寡聚化材料、副产物等）。罗米地辛一般包括少于 1.0%、少于 0.5%、少于 0.2% 或少于 0.1% 的总的其它未知物。罗米地辛的纯度可通过外观、HPLC、旋光率、NMR 光谱、IR 光谱、UV/ 可见光谱、x- 射线粉末衍射 (XRPD) 分析、元素分析，LC- 质谱或质谱进行评价。

[0071] 罗米地辛以商品名 **Istodax®** 出售，被批准用于治疗至少接受过一次预先全身性治疗的患者的皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)，和用于治疗至少接受过一次预先治疗的患者的周围 T 细胞淋巴瘤 (PTCL)。

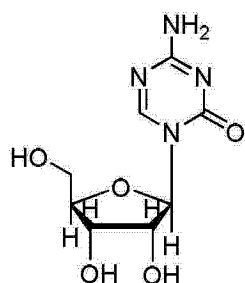
[0072] DNA 脱甲基剂

[0073] 在一个实施方式中，本文提供的方法包括给药或共同给药一种或多种 DNA 脱甲基剂。在一个实施方式中，DNA 脱甲基剂为胞苷类似物。在某些实施方式中，胞苷类似物为 5- 氮杂胞苷（阿扎胞苷）或 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷（地西他滨）。在某些实施方式中，胞苷类似物为 5- 氮杂胞苷（阿扎胞苷）。在某些实施方式中，胞苷类似物为 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷（地西他滨）。在某些实施方式中，胞苷类似物为，例如：1-β-D- 阿糖呋喃胞苷（阿糖胞苷或 ara-C）；假异-胞苷 (psi ICR)；5- 氟 -2'- 脱氧胞苷 (FCdR)；2'- 脱氧 -2', 2'- 二氟胞苷（吉西他滨）；5- 氮杂 -2'- 脱氧 -2', 2'- 二氟胞苷；5- 氮杂 -2'- 脱氧 -2'- 氟胞苷；1-β-D- 呋核亚硝脲 -2(1H)- 嘧啶酮 (Zebularine)；2', 3'- 二脱氧 -5- 氟 -3'- 硫代胞苷（恩曲他滨）；2'- 环胞苷（安西他滨）；1-β-D- 阿糖呋喃 -5- 氮杂胞苷（法扎拉滨或 ara-AC）；6- 氮杂胞苷 (6- 氮杂 -CR)；5, 6- 二氢 -5- 氮杂胞苷 (dH- 氮杂 -CR)；N⁴- 戊氧

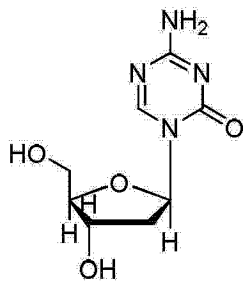
基-羰基-5'-脱氧-5-氟胞苷(卡培他滨);N⁴-十八烷基-阿糖胞苷;或反油酸阿糖胞苷。在某些实施方式中,本文提供的胞苷类似物包括结构上与胞苷或脱氧胞苷相关以及功能上模拟和/或拮抗胞苷或脱氧胞苷的作用的任何化合物。

[0074] 在某些实施方式中,示例性的胞苷类似物具有如下提供的结构:

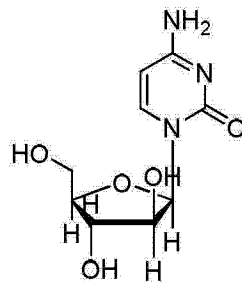
[0075]



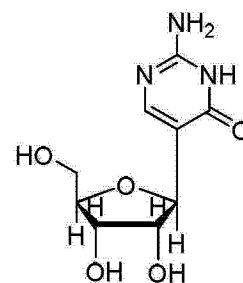
阿扎胞苷



地西他滨

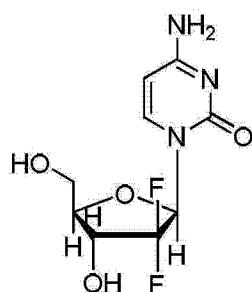


阿糖胞苷(Ara-C)

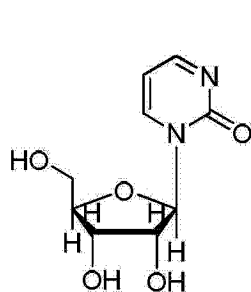


假异胞苷(psi ICR)

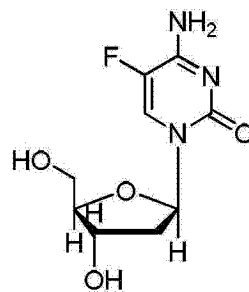
[0076]



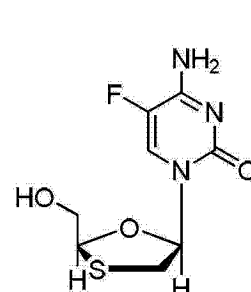
吉西他滨



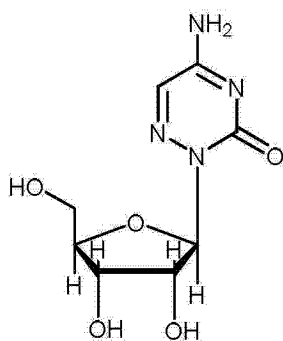
Zebularine



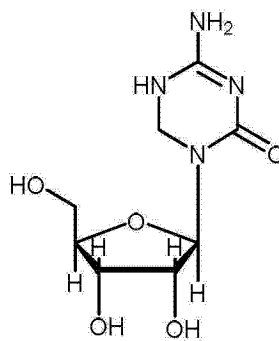
FCdR



Emtriva



6-氮杂胞苷



5,6-二氢-5-氮杂胞苷

[0077] 本文的某些实施方式提供了本文提供的胞苷类似物的盐、共晶物、溶剂化物(例如,水合物)、复合物、前药、前体、代谢物和/或其它衍生物。例如,特定实施方式提供了5-氮杂胞苷的盐、共结晶物、溶剂化物(例如,水合物)、复合物、前体、代谢物和/或其它衍生物。本文的某些实施方式提供了本文提供的胞苷类似物的盐、共结晶物和/或溶剂化物(例如,水合物)。本文的某些实施方式提供了本文提供的胞苷类似物的盐和/或溶剂化物(例如,水合物)。某些实施方式提供了并非本文提供的胞苷类似物的盐、共结晶物、溶剂化物(例如,水合物)或复合物的胞苷类似物。例如,特定实施方式提供了非电离、非溶剂化(例如,无水的)、非复合形式的5-氮杂胞苷。本文的某些实施方式提供了两种或多种本文

提供的胞苷类似物的混合物。

[0078] 本文提供的胞苷类似物可使用在此引用的或另外可从文献获得的合成方法和流程进行制备。例如,合成 5- 氮杂胞苷和地西他滨的具体方法公开于例如,美国专利号 7, 038, 038 和在此讨论的引用,其均在此引入作为参考。本文提供的其它胞苷类似物可使用例如本领域已知的或可从商业渠道购买的流程进行制备。在一个实施方式中,本文提供的胞苷类似物可以特定的固体形式制备(例如,无定形的或晶体形式的)。参见,例如,2005 年 5 月 8 日授权的美国专利 6, 887, 855 和 2005 年 9 月 13 日授权的美国专利 6, 943, 249, 二者均在此全文引入作为参考。

[0079] 在一个实施方式中,用于本文提供的方法的化合物是游离碱或其药学上可接受的盐或溶剂化物。在一个实施方式中,游离碱或药学上可接受的盐或溶剂化物是固体。在另一个实施方式中,游离碱或药学上可接受的盐或溶剂化物是无定形的固体。在又一个实施方式中,游离碱或药学上可接受的盐或溶剂化物是晶体形式的固体。例如,特定实施方式提供了固体形式的 5- 氮杂胞苷和地西他滨,其可根据,例如,描述于美国专利号 6, 943, 249, 6, 887, 855, 7, 078, 518, 7, 772, 199 和美国专利申请公开号 2005/027675 的方法进行制备,其均在此全文引入作为参考。在其它实施方式中,固体形式的 5- 氮杂胞苷和地西他滨可以使用本领域已知的其它方法进行制备。

[0080] 在一个实施方式中,用于本文提供的方法的化合物是胞苷类似物的药学上可接受的盐,其包括但不限于醋酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐(苯磺酸盐)、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、1, 2- 乙烷二磺酸(乙二磺酸盐)、乙磺酸盐(乙磺酸盐)、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖、甘油磷酸盐、羟乙酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2- 羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐(甲磺酸盐)、2- 萘磺酸盐(萘磺酸盐)、烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3- 苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐或十一烷酸盐。

[0081] 胞苷类似物可通过本领域已知的方法合成。在一个实施方式中,合成方法包括公开于美国专利号 7, 038, 038 ;美国专利号 6, 887, 855 ;美国专利号 7, 078, 518 ;美国专利号 6, 943, 249 ;和美国专利号 7, 192, 781 中的方法,其在此全部整体引入作为参考。

[0082] 阿扎胞苷是 4- 氨基 -1- β -D- 核糖呋喃 -s- 三嗪 -2(1H) - 酮,也称为 **VIDAZA®**。其经验式为 $C_8H_{12}N_4O_5$, 分子量为 244。阿扎胞苷是不溶于丙酮、乙醇和甲基酮的白色至灰白色固体;微溶于乙醇/水 (50/50)、丙二醇和聚乙二醇;难溶于水、水饱和辛醇、5% 葡萄糖水溶液、N- 甲基 -2- 吡咯烷酮、生理盐水和 5% 吐温 80 水溶液;和可溶于二甲亚砜 (DMSO)。

[0083] **VIDAZA®** 被批准用于治疗更高风险的 MDS 患者。其以无菌形式提供,以重构为悬液用于皮下注射,或重构为溶液进行进一步稀释用于静脉输液。**VIDAZA®** 的药瓶含有作为无菌冻干粉的 100mg 的阿扎胞苷和 100mg 的甘露醇。

[0084] 地西他滨是 4- 氨基 -1- (2- 脱氧 - β -D- 赤 - 五呋喃糖) -1, 3, 5- 三嗪 -2(1H) 酮,也被称为 **DACOGEN®**。其经验式为 $C_8H_{12}N_4O_4$, 分子量为 228. 21。地西他滨是精细的白色至几乎白色粉末,其微溶于乙醇/水 (50/50)、甲醇/水 (50/50) 和甲醇;难溶于水和可

溶于二甲亚砜 (DMSO)。

[0085] DACOGEN™ 被批准用于治疗骨髓增生异常综合征患者。其在清澈无色玻璃瓶中提供为白色无菌冻干粉用于注射。作为单剂量的每 20mL 玻璃小瓶含有 50mg 地西他滨、68mg 磷酸二氢钾 (磷酸二氢钾) 和 11.6mg 盐酸钠。

[0086] 使用方法

[0087] 在一个实施方式中,提供了一种用于治疗、预防或控制患者的 TNBC 或 ccRCC 的方法,包括对所述患者给药有效量的 HDAC 抑制剂组合 DNA 脱甲基剂或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、立体异构体、包合物或前药。

[0088] 用于本文提供的方法的 HDAC 抑制剂包括但不限于曲古抑菌素 A (TSA)、伏立诺他 (SAHA)、丙戊酸 (VPA)、罗米地辛和 MS-275。在一个实施方式中,HDAC 抑制剂为罗米地辛。

[0089] 可用于本文提供的方法的 DNA 脱甲基剂是胞苷类似物。在一个实施方式中,胞苷类似物包括但不限于 5- 氮杂胞苷 (阿扎胞苷)、5- 氮杂脱氧胞苷 (地西他滨)、阿糖胞苷、假异胞苷、吉西他滨、zebularine、FCdR、恩曲他滨、5,6- 二氢 -5- 氮杂胞苷和普鲁卡因。在一个实施方式中,胞苷类似物为地西他滨或阿扎胞苷。

[0090] 可通过本文提供的方法治疗的化疗耐药性的癌症包括但不限于皮肤;淋巴结;乳房;宫颈;子宫;胃肠道;胰腺,肺;卵巢;前列腺;结肠;直肠;口;脑;头部和颈部;喉;睾丸;肾;胰腺;骨;脾;肝;膀胱;喉;或鼻腔的癌症和复发或难治性癌症。在一个实施方式中,化疗耐药性的癌症为乳腺癌、肝癌、肾癌或胰腺癌。在一个具体实施方式中,癌症为三阴性乳腺癌 (TNBC) 或透明细胞肾细胞癌 (ccRCC)。

[0091] 罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷的给药可通过相同或不同给药途径同时发生或相继发生。用于特定活性试剂的特定给药途径的适用性取决于该活性试剂自身 (例如,其是否能口服给药,而不会在进入血液前分解) 和待治疗的疾病。

[0092] 合适的给药途径包括但不限于:口服、粘膜 (例如,经鼻、舌下、阴道、颊或直肠)、非肠道 (例如,皮下、静脉内、快速浓注、肌肉内或动脉内)、局部 (如,滴眼剂或其他眼用制剂)、透皮或经皮给药至患者。

[0093] 在一个实施方式中,待使用的有效量的罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷是治疗有效量的。在一个实施方式中,本文提供的方法中使用的罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷的数量包括足以导致至少一部分 (subset) 患者的症状、全部病程或本领域已知的其它参数发生改善的数量。在药物组合中治疗有效量的罗米地辛或阿扎胞苷的精确数量会随着患者的年龄、体重、疾病和病况发生变化。

[0094] 在一个实施方式中,罗米地辛静脉给药。在一个实施方式中,罗米地辛在 1-6 小时的时间内静脉给药。在一个实施方式中,罗米地辛在 3-4 小时的时间内静脉给药。在一个实施方式中,罗米地辛在 5-6 小时的时间内静脉给药。在一个实施方式中,罗米地辛在 4 小时的时间内静脉给药。

[0095] 在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $0.5\text{mg}/\text{m}^2$ - $28\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $0.5\text{mg}/\text{m}^2$ - $5\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $1\text{mg}/\text{m}^2$ - $25\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $1\text{mg}/\text{m}^2$ - $20\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $1\text{mg}/\text{m}^2$ - $15\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $2\text{mg}/\text{m}^2$ - $15\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围

为 $2\text{mg}/\text{m}^2$ – $12\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $4\text{mg}/\text{m}^2$ – $12\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $6\text{mg}/\text{m}^2$ – $12\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $8\text{mg}/\text{m}^2$ – $12\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $8\text{mg}/\text{m}^2$ – $10\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $8\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $9\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $11\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $12\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $13\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $14\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为约 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0096] 在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量为 4 小时静脉输液 $14\text{mg}/\text{m}^2$,在 28 天的周期的第 1、8 和 15 天给药。在一个实施方式中,该周期每 28 天重复。

[0097] 在一个实施方式中,在一个周期的进程内给药渐增剂量的罗米地辛。在一个实施方式中,在一个周期内,(先)给药约 $8\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量,然后是约 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量,接下来是约 $12\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量。

[0098] 在一个实施方式中,罗米地辛口服给药。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $10\text{mg}/\text{m}^2$ – $300\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $15\text{mg}/\text{m}^2$ – $250\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $20\text{mg}/\text{m}^2$ – $200\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $25\text{mg}/\text{m}^2$ – $150\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $25\text{mg}/\text{m}^2$ – $100\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个实施方式中,罗米地辛的给药剂量范围为 $25\text{mg}/\text{m}^2$ – $75\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0099] 在一个实施方式中,罗米地辛每天口服给药。在一个实施方式中,罗米地辛每隔一天口服给药。在一个实施方式中,罗米地辛每隔两天、三天、四天、或五天口服给药。在一个实施方式中,罗米地辛每周口服给药。在一个实施方式中,罗米地辛每隔一周口服给药。

[0100] 在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷通过例如静脉 (IV)、皮下 (SC) 或口服途径给药。本文的某些实施方式提供了地西他滨或阿扎胞苷与一种或多种额外的活性剂的共同给药,以对有需要的主体提供协同治疗效果。共同给药的试剂可以是如本文描述的癌症治疗剂。在某些实施方式中,共同给药的试剂可以,例如,口服或注射(例如,IV 或 SC) 给药。

[0101] 在某些实施方式中,治疗周期包含在多天(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或多于 14 天)中对有需要的主体给药多剂量,任选的然后是治疗剂量假期(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 或多于 28 天)。用于本文提供的方法的合适的剂量数量包括,例如,治疗有效量和预防有效量。例如,在某些实施方式中,在本文提供的方法中给药的地西他滨或阿扎胞苷的数量范围可以为,例如,约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $2,000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $1,000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $75\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或约 $120\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $250\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在某些实施方式中,特定的剂量为,例如,约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $75\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $120\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $140\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $180\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $220\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $240\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $250\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约

260mg/m²/天、约 280mg/m²/天、约 300mg/m²/天、约 320mg/m²/天、约 350mg/m²/天、约 380mg/m²/天、约 400mg/m²/天、约 450mg/m²/天或约 500mg/m²/天。在某些实施方式中,特定的剂量为,例如,多达约 100mg/m²/天、多达约 120mg/m²/天、多达约 140mg/m²/天、多达约 150mg/m²/天、多达约 180mg/m²/天、多达约 200mg/m²/天、多达约 220mg/m²/天、多达约 240mg/m²/天、多达约 250mg/m²/天、多达约 260mg/m²/天、多达约 280mg/m²/天、多达约 300mg/m²/天、多达约 320mg/m²/天、多达约 350mg/m²/天、多达约 380mg/m²/天、多达约 400mg/m²/天、多达约 450mg/m²/天、多达约 500mg/m²/天、多达约 750mg/m²/天或多达约 1000mg/m²/天。

[0102] 在一个实施方式中,在本文提供的方法中给药的地西他滨或阿扎胞苷的数量范围可以为,例如,约 5mg/天至约 2,000mg/天、约 10mg/天至约 2,000mg/天、约 20mg/天至约 2,000mg/天、约 50mg/天至约 1,000mg/天、约 100mg/天至约 1,000mg/天、约 100mg/天至约 500mg/天、约 150mg/天至约 500mg/天或约 150mg/天至约 250mg/天。在某些实施方式中,特定的剂量为,例如,约 10mg/天、约 20mg/天、约 50mg/天、约 75mg/天、约 100mg/天、约 120mg/天、约 150mg/天、约 200mg/天、约 250mg/天、约 300mg/天、约 350mg/天、约 400mg/天、约 450mg/天、约 500mg/天、约 600mg/天、约 700mg/天、约 800mg/天、约 900mg/天、约 1,000mg/天、约 1,200mg/天或约 1,500mg/天。在某些实施方式中,特定的剂量为,例如,多达约 10mg/天、多达约 20mg/天、多达约 50mg/天、多达约 75mg/天、多达约 100mg/天、多达约 120mg/天、多达约 150mg/天、多达约 200mg/天、多达约 250mg/天、多达约 300mg/天、多达约 350mg/天、多达约 400mg/天、多达约 450mg/天、多达约 500mg/天、多达约 600mg/天、多达约 700mg/天、多达约 800mg/天、多达约 900mg/天、多达约 1,000mg/天、多达约 1,200mg/天或多达约 1,500mg/天。

[0103] 在一个实施方式中,本文提供的药物组合物或剂型中地西他滨或阿扎胞苷的数量范围可以为,例如,约 5mg 至约 2,000mg、约 10mg 至约 2,000mg、约 20mg 至约 2,000mg、约 50mg 至约 1,000mg、约 50mg 至约 500mg、约 50mg 至约 250mg、约 100mg 至约 500mg、约 150mg 至约 500mg 或约 150mg 至约 250mg。在某些实施方式中,特别的数量为,例如,约 10mg、约 20mg、约 50mg、约 75mg、约 100mg、约 120mg、约 150mg、约 200mg、约 250mg、约 300mg、约 350mg、约 400mg、约 450mg、约 500mg、约 600mg、约 700mg、约 800mg、约 900mg、约 1,000mg、约 1,200mg 或约 1,500mg。在某些实施方式中,特别的数量为,例如,多达约 10mg、多达约 20mg、多达约 50mg、多达约 75mg、多达约 100mg、多达约 120mg、多达约 150mg、多达约 200mg、多达约 250mg、多达约 300mg、多达约 350mg、多达约 400mg、多达约 450mg、多达约 500mg、多达约 600mg、多达约 700mg、多达约 800mg、多达约 900mg、多达约 1,000mg、多达约 1,200mg 或多达约 1,500mg。

[0104] 在一个实施方式中,根据待治疗的疾病和主体的情况,地西他滨或阿扎胞苷可以由口服、静脉(例如,肌肉注射、静脉注射、腹腔、CIV、脑内注射或输液、皮下注射、或植入)、吸入、鼻、直肠、阴道、舌下含服、或外用(例如,透皮或局部)途径给药。地西他滨或阿扎胞苷可以适当的剂量单位单独或与一种或多种活性剂一起与适合各给药途径的药学上可接受的辅料、载体、佐剂和溶媒进行制剂。在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷口服给药。在另一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷不经肠道给药。在另一个实施例中,地西他滨或阿扎胞苷静脉注射给药。

[0105] 在一个实施方式中,5 地西他滨或阿扎胞苷可作为单一剂量递送,例如,例如,单

一快速浓注或口服片剂或丸剂；或随时间递送例如，例如，随时间连续输液或随时间的分开单次剂量。在一个实施方式中，如果有必要，地西他滨或阿扎胞苷可重复给药，例如直至患者经历稳定的病情或退化或直至患者经历疾病恶化或不可接受的毒性。例如，实体瘤的稳定病情通常表示可测量病灶的正交直径自上次测量起没有增加 25% 或更多。参见，例如，Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) Guidelines, Journal of the National Cancer Institute 92(3):205-216 (2000)。通过本领域已知的方法例如患者症状评价、身体检查、使用 X-射线、CAT、PET 或 MRI 扫描造影的肿瘤可视化和其它常规接收的评估方式确定稳定的病情或其缺失。

[0106] 在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷可每天给药一次或分为多个日剂量例如每天两次、每天三次和每天四次。在一个实施方式中，给药可以是连续的（即，连续的天数的每一天或每天），间断的，例如，周期性的（即，包括天、周或月的停药期，期间不给药）。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每天给药，例如，在一段时间内每天一次或多于一次。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷在至少 7 天的不间断周期内每天给药，在一些实施方式中，其多达 52 周。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷间歇给药，即，以规律的或不规律的间隔停止和开始。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每周给药 1-6 天。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷周期性给药（例如，连续 2-8 周的每天给药、然后多达一周不给药的停药期；或例如，一周的每天给药、然后多达三周不给药的停药期）。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷在交替的天数给药。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷周期性给药（例如，每天或连续给药一段时间，期间以停药期中断）。

[0107] 在一个实施方式中，给药频率范围从约每天至约每月。在某些实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷一天一次、一天两次、一天三次、一天四次、隔天一次、一周两次、隔周一次、隔两周一次、隔三周一次或隔四周一次给药。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷一天一次给药。在另一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷一天两次给药。在又一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷一天三次给药。在又一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷一天四次给药。

[0108] 在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷从一天至六个月、从一周至三个月、从一周至四周、从一周至三周或从一周至两周每天给药一次。在某些实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每天给药一次，持续一周、两周、三周或四周。在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每天给药一次，持续一周。在另一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每天给药一次，持续两周。在又一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每天给药一次，持续三周。在又一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每天给药一次，持续四周。

[0109] 在一个实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷每天给药一次，持续约 1 周、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 9 周、约 12 周、约 15 周、约 18 周、约 21 周或约 26 周。在某些实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷间歇给药。在某些实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷间歇给药，数量约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $2,000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在某些实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷连续给药。在某些实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷连续给药，数量约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $1,000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。

[0110] 在某些实施方式中，地西他滨或阿扎胞苷被周期性地给药至患者（例如，一周每天给药、然后多达三周不给药的停药期）。周期治疗涉及活性剂给药一段时间，然后停药一

段时间,并重复该顺序给药。周期治疗可降低耐受性发展、避免或降低副作用和 / 或改进治疗效果。

[0111] 在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷被周期性地给药至患者。在一个实施方式中,本文提供的方法包括在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 或多于 40 个周期中给药地西他滨或阿扎胞苷。在一个实施方式中,一组患者给药的周期中值为约 1、约 2、约 3、约 4、约 5、约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 11、约 12、约 13、约 14、约 15、约 16、约 17、约 18、约 19、约 20、约 21、约 22、约 23、约 24、约 25、约 26、约 27、约 28、约 29、约 30 或多于约 30 个周期。

[0112] 在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷在由 7 天的治疗期和 21 天的停药期组成的 28 天周期中以本文提供的剂量给药至患者。在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷在第 1 天至第 7 天的每天以本文提供的剂量给药至患者,随后在第 8 天至第 28 天的停药期不给药地西他滨或阿扎胞苷。在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷被周期性地给药至患者,每个周期包含 7 天的治疗期伴随着 21 天的停药期。在特别的实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷以约 50、约 60、约 70、约 75、约 80、约 90 或约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ / 天的剂量被给药至患者,共给药 7 天,随后是 21 天的停药期。在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷静脉给药。在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药。

[0113] 在其它实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷周期性地口服给药。

[0114] 因此,在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷每天以单一或分次的剂量给药约一周、约两周、约三周、约四周、约五周、约六周、约八周、约十周、约十五周或约二十周,然后是约 1 天至约十周的停药期。在一个实施方式中,本文提供的方法计划约一周、约两周、约三周、约四周、约五周、约六周、约八周、约十周、约十五周或约二十周的周期性治疗。在一些实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷每天以单一或分次的剂量给药约一周、约两周、约三周、约四周、约五周或约六周,伴随着 1、3、5、7、9、12、14、16、18、20、22、24、26、28、29 或 30 天的停药期。在一些实施方式中,停药期为 1 天。在一些实施方式中,停药期为 3 天。在一些实施方式中,停药期为 7 天。在一些实施方式中,停药期为 14 天。在一些实施方式中,停药期为 28 天。给药周期的频率、数量和长度可以增加或减少。

[0115] 在一个实施方式中,本文提供的方法包括:i) 对主体给药第一日剂量的地西他滨或阿扎胞苷;ii) 任选的停药期至少一天,其中不对主体给药地西他滨或阿扎胞苷;iii) 对主体给药第二剂量的地西他滨或阿扎胞苷;和 iv) 重复步骤 ii) 至 iii) 多次。在某些实施方式中,第一日剂量为约 $50\text{mg}/\text{m}^2$ / 天至约 $2,000\text{mg}/\text{m}^2$ / 天。在某些实施方式中,第二日剂量为约 $50\text{mg}/\text{m}^2$ / 天至约 $2,000\text{mg}/\text{m}^2$ / 天。在某些实施方式中,第一日剂量高于第二日剂量。在某些实施方式中,第二日剂量高于第一日剂量。在一个实施方式中,停药期为 2 天、3 天、5 天、7 天、10 天、12 天、13 天、14 天、15 天、17 天、21 天或 28 天。在一个实施方式中,停药期为至少 2 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少三次。在一个实施方式中,停药期为至少 2 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少五次。在一个实施方式中,停药期为至少 3 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少三次。在一个实施方式中,停药期为至少 3 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少五次。在一个实施方式中,停药期为至少 7 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少三次。在一个实施方式中,停药期为至少 7 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少五次。在一个实施方

式中,停药期为至少 14 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少三次。在一个实施方式中,停药期为至少 14 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少五次。在一个实施方式中,停药期为至少 21 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少三次。在一个实施方式中,停药期为至少 21 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少五次。在一个实施方式中,停药期为至少 28 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少三次。在一个实施方式中,停药期为至少 28 天且步骤 ii) 到 iii) 被重复至少五次。在一个实施方式中,本文提供的方法包括:i) 对主体给药第一日剂量的地西他滨或阿扎胞苷 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天;ii) 停药期 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天;iii) 对主体给药第二日剂量的地西他滨或阿扎胞苷 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天;和 iv) 重复步骤 ii) 至 iii) 多次。在一个实施方式中,本文提供的方法包括:i) 对主体给药一种日剂量的地西他滨或阿扎胞苷 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天;ii) 停药期 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天;和 iii) 重复步骤 i) 至 ii) 多次。在一个实施方式中,本文提供的方法包括:i) 对主体给药一种日剂量的地西他滨或阿扎胞苷 7 天;ii) 停药期 21 天;和 iii) 重复步骤 i) 至 ii) 多次。在一个实施方式中,日剂量为约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $2,000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在一个实施方式中,日剂量为约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $1,000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在一个实施方式中,日剂量为约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在一个实施方式中,日剂量为约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在一个实施方式中,日剂量为约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。

[0116] 在某些实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷连续给药约 1 至约 52 周。在某些实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷连续给药约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月。在某些实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷连续给药约 14、约 28、约 42、约 84 或约 112 天。可理解治疗周期可随着待治疗主体的年龄、体重和病况发生变化,且其可以使用已知的测试方案或根据提供或监督该治疗的人的职业判断进行确定。熟练的临床医师有能力很容易地判断用于治疗患有特定种类癌症的个人主体的有效药物剂量和治疗周期,而无需过度实验。

[0117] 在一个实施方式中,药物组合物可含有足够量的地西他滨或阿扎胞苷以提供每天约 $10\text{--}150\text{mg}/\text{m}^2$ (基于患者体表面积) 或约 $0.1\text{--}4\text{mg}/\text{kg}$ (基于患者体重) 的剂量作为单一或分次的 (2 - 3) 日剂量。在一个实施方式中,通过 7 天的 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 皮下给药提供剂量,每二十八天一次,时间根据临床需要。在一个实施方式中,通过 7 天的 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 皮下给药提供剂量,每二十八天一次,时间根据临床需要。在一个实施方式中,给药多达 4、多达 5、多达 6、多达 7、多达 8、多达 9 或更多的 28 天周期。用于提供有效量的地西他滨或阿扎胞苷的其它方法描述于,例如,“Colon-Targeted Oral Formulations of Cytidine Analogs”,美国系列号 11/849,958 和“Oral Formulations of Cytidine Analogs and Methods of Use Thereof”,美国系列号 12/466,213,二者在此全文引入作为参考。

[0118] 在特别的实施方式中,给药周期的数量为,例如,至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 22、至少 24、至少 26、至少 28、至少 30、至少 32、至少 34、至少 36、至少 38、至少 40、至少 42、至少 44、至少 46、至少 48 或至少 50 个周期的地西他滨或阿扎胞苷治疗。在特别的实施方式中,该治疗在 28 天期间的例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天被施用。在特别的实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷的剂量为,例如,至少 $10\text{mg}/\text{天}$ 、

至少 20mg/ 天、至少 30mg/ 天、至少 40mg/ 天、至少 50mg/ 天、至少 55mg/ 天、至少 60mg/ 天、至少 65mg/ 天、至少 70mg/ 天、至少 75mg/ 天、至少 80mg/ 天、至少 85mg/ 天、至少 90mg/ 天、至少 95mg/ 天或至少 100mg/ 天。

[0119] 在特别的实施方式中,通过例如皮下或静脉进行给药。在特别的实施方式中,计划的具体地西他滨或阿扎胞苷剂量为,例如,至少 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $15\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $70\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $75\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、至少 $90\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或至少 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。本文的一个具体实施方式提供了在每个 28 天周期中的 3 天实施治疗。本文的一个具体实施方式提供了在每个 28 天周期中的 7 天实施治疗。本文的一个具体实施方式提供了(连续)73 天每 8 小时 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉给药的给药方案。本文的一个具体实施方式提供了(连续)7 天每天 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 皮下或静脉给药的给药方案。本文的一个具体实施方式提供了(连续)7 天每天 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 皮下或静脉给药的给药方案。

[0120] 在一个实施方式中,罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷静脉给药。在一个实施方式中,该组合以 1-6 小时的时间静脉给药。在一个实施方式中,该组合以 3-4 小时的时间静脉给药。在一个实施方式中,该组合以 5-6 小时的时间静脉给药。在一个实施方式中,该组合以 4 小时的时间静脉给药。

[0121] 在一个实施方式中,在一个周期的进程内给药具有渐增剂量的罗米地辛的该组合。在一个实施方式中,在一个周期内给药约 $8\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量、然后是约 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量、继而是约 $12\text{mg}/\text{m}^2$ 的罗米地辛。

[0122] 在一个实施方式中,罗米地辛静脉给药,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药。在一个实施方式中,罗米地辛静脉给药,地西他滨或阿扎胞苷口服给药。在一个实施方式中,罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷口服给药。

[0123] 在一个实施方式中,在停药期约一周或两周的四到四十周内,按照每 28 天的周期中给药 3-14 天,每天以单一或分次剂量给药地西他滨或阿扎胞苷。在一个实施方式中,在停药期约一周或两周的四到四十周内,按照每 28 天的周期中给药 7-14 天,每天以单一或分次剂量给药地西他滨或阿扎胞苷。

[0124] 在一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷每天给药,且连续四到四十周的剂量为从约 10 至约 $150\text{mg}/\text{m}^2$,然后是停药期一或两周。在一个特定实施方式中,给药地西他滨或阿扎胞苷的数量为从约 0.1 至约 $4.0\text{mg}/\text{天}$,共四到四十周,其中在四或六周的周期中有一周或两周的停药期。

[0125] 在一个实施方式中,在一个 28 天的周期内,对 TNBC 或 ccRCC 患者静脉给药地西他滨或阿扎胞苷,数量为从约 0.1 至约 4.0mg 每天,持续约 3 至约 14 天,然后是约 14 至约 25 天的停药期,其中联合罗米地辛静脉给药,剂量为约 $0.5\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $28\text{mg}/\text{m}^2$,其在 28 天的周期中的第 1、8 和 15 天给药。

[0126] 在一个实施方式中,在一个 28 天的周期内对 TNBC 或 ccRCC 患者静脉给药地西他滨或阿扎胞苷,数量为从约 0.10 至约 4.0mg 每天,持续约 3 至约 14 天,然后是约 14 至约 25 天的停药期,其中联合罗米地辛口服给药,剂量为约 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 至约 $300\text{mg}/\text{m}^2$,其在 28 天的周期中的第 1、8 和 15 天给药。

[0127] 在一个实施方式中,在一个 28 天的周期内对 TNBC 或 ccRCC 患者皮下给药地西他

滨或阿扎胞苷,数量为从约 0.10 至约 4.0mg 每天,持续约 3 至约 14 天,然后是约 14 至约 25 天的停药期,其中联合罗米地辛静脉给药,剂量为约 10mg/m² 至约 300mg/m²,其在 28 天的周期中的第 1、8 和 15 天给药。

[0128] 在一个实施方式中,在一个 28 天的周期内对 TNBC 或 ccRCC 患者皮下给药地西他滨或阿扎胞苷,数量为从约 0.10 至约 4.0mg 每天,持续约 3 至约 14 天,然后是约 14 至约 25 天的停药期,其中联合罗米地辛口服给药,剂量为约 10mg/m² 至约 300mg/m²,其在 28 天的周期中的第 1、8 和 15 天给药。

[0129] 在一个实施方式中,在一个 28 天的周期内对 TNBC 或 ccRCC 患者口服给药地西他滨或阿扎胞苷,数量为从约 0.10 至约 4.0mg 每天,持续约 3 至约 14 天,然后是约 14 至约 25 天的停药期,其中联合罗米地辛口服给药,剂量为约 10mg/m² 至约 300mg/m²,其在 28 天的周期中的第 1、8 和 15 天给药。

[0130] 在一个实施方式中,在四到四十周的周期内,静脉给药地西他滨或阿扎胞苷和罗米地辛,其中罗米地辛的给药发生于地西他滨或阿扎胞苷前 30-60 分钟。在另一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药,罗米地辛静脉输液给药。在另一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药,罗米地辛口服给药。在又一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷和罗米地辛口服给药。

[0131] 在一个实施方式中,在四到四十周的周期内,地西他滨或阿扎胞苷和罗米地辛静脉给药,其中地西他滨或阿扎胞苷的给药发生于罗米地辛前 30-60 分钟。在另一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药,罗米地辛静脉输液给药。在另一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药,罗米地辛口服给药。在又一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷和罗米地辛口服给药。

[0132] 在一个实施方式中,在四到四十周的周期内,地西他滨或阿扎胞苷和罗米地辛同时静脉给药。在另一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药,罗米地辛静脉输液给药。在另一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷皮下给药,罗米地辛口服给药。在又一个实施方式中,地西他滨或阿扎胞苷和罗米地辛口服给药。

[0133] 在一个实施方式中,一个周期包含每天给药约 0.1 至约 4.0mg 地西他滨或阿扎胞苷和每天给药约 25 至约 150mg/m² 罗米地辛,共 3-4 周,然后是一或两周的停药期。在一个实施方式中,其中组合治疗被施用于患者的周期的数量为从约 1 至约 40 个周期或从约 1 至约 24 个周期或从约 2 至约 16 个周期或从约 4 至约 3 个周期。

[0134] 在一个实施方式中,预测使用罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷的最大临床获益的生物标记物的开发将允许鉴定对于罗米地辛和地西他滨或阿扎胞联合治疗特别适合的那些患者。从而,在一个实施方式中,本文提供了可被用于例如 TNBC 或 ccRCC 患者的治疗选择管理的生物标记物。在其它实施方式中,本文提供了一种使用在此提供的生物标记物选择癌症患者具体治疗的方法,例如,罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷组合治疗一种特定癌症,以从该治疗获得最大临床获益。

[0135] 在一个实施方式中,本文提供了用于评价癌症治疗剂潜在的临床获益的预测性生物标记物。在一个实施方式中,本文提供了用于评价罗米地辛和地西他滨或阿扎胞联合治疗的临床获益的预测性生物标记物。在一个实施方式中,本文提供了使用在此提供的预测性生物标记物(例如,核染色质生物标记物的表达水平)评价罗米地辛和地西他滨或阿

扎胞苷联合治疗效果的方法。在一个实施方式中,本文提供的核染色质生物标记物包括但不限于 RhoB、p21、p15、p16、T β RIII、GATA3、sFRP1、sFRP2、sFRP4、sFRP5、DKK1 和 DKK3。在一个特定实施方式中,核染色质生物标记物为 sFRP1。在一个实施方式中,在此提供的生物标记物可被用于评价或预测响应速度、整体存活或其它临床益处。在一个实施方式中,临床益处包括但不限于延长生存期、延迟发展为转移和 / 或其它有益临床响应。

[0136] 在一个实施方式中,本文提供了生物标记物,其用于在罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷联合治疗开始后评价临床益处或预测长期临床响应(例如,评价患者在用罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷联合治疗后或期间的临床益处或预测长期临床响应)。在一个实施方式中,本文提供了通过检测核染色质生物标记物表达水平使用在此提供的生物标记物的方法。例如,可以将治疗后的样品中的核染色质标记物的表达水平与基线样品对比(例如,在约 1、约 2、约 3、约 4、约 5、约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 11、约 12 或多于约 12 个月的治疗周期后;或在约 1、约 2、约 3、约 4、约 5、约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 12、约 14、约 16、约 18、约 20、约 22、约 24、约 26、约 28、约 30、约 32、约 34、约 36、约 38、约 40、约 42、约 44、约 46、约 48、约 50、约 52、约 54、约 56 或多于约 56 周的治疗周期后)。在一个实施方式中,在罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷联合治疗开始后对特定核染色质标记物的表达水平进行周期性监控。在一个实施方式中,临床益处包括但不限于延长生存期、延迟发展为转移和 / 或其它有益临床响应。

[0137] 在一个实施方式中,本文提供了可被用于预测何种癌症患者会从特定癌症治疗中得到最大或最小的临床益处的生物标记物。在一个实施方式中,在此提供的方法或生物标记物可用于癌症,例如,实体癌或本文其它部分描述的癌症种类。参见,例如,国际专利申请号 PCT/US2010/000361,2010 年 2 月 9 日提交,公开号为 W02010/093435,其在此全文引入作为参考。在一个实施方式中,在此提供的方法或生物标记物可用于 TNBC 或 ccRCC。在一个实施方式中,本文提供的生物标记物为选自由 RhoB、p21、p15、p16、T β RIII、GATA3、sFRP1、sFRP2、sFRP4、sFRP5、DKK1 和 DKK3 组成的组的核染色质生物标记物。在一个特定实施方式中,核染色质生物标记物 sFRP1。在其它实施方式中,核染色质生物标记物的表达水平可被用作本文描述的方法的生物标记物。

[0138] 例如,可以从患有某种癌症的患者中获得生物样品(例如,血液或组织样品可被用于本文提供的方法)。在一个实施方式中,检测特定患者的一种或多种核染色质标记物的表达水平并与参比值进行对照。在一个实施方式中,基于一种或多种核染色质标记物的表达水平对患者分组或选择。在一个实施方式中,对选定的患者用特定治疗剂进一步治疗以获得最大响应或临床益处。在一个实施方式中,特定治疗为罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷联合治疗。在一个实施方式中,患者患有 TNBC 或 ccRCC。

[0139] 在一个实施方式中,从治疗前的患者(例如,来自接受某种治疗前的 TNBC 或 ccRCC 患者)获得生物样品(例如,血液或组织样品)。在一个实施方式中,检测了本文提供的一种或多种核染色质标记物的表达水平。在一个实施方式中,将患者的一种或多种核染色质标记物的表达水平与参比值进行对照。在一个实施方式中,使用一种或多种核染色质标记物的表达水平来区分对于特定治疗(例如,罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷联合治疗)具有潜在的更大或更小响应或总生存率率益处的患者。在一个实施方式中,对基于本文提供的方法选择的特定组的 TNBC 或 ccRCC 患者进行罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷联合治疗。

[0140] 组合物

[0141] 当组合可接受的载体或赋形剂时,罗米地辛和地西他滨或阿扎胞苷可被用作组合物。该组合物可用于本文提供的方法。

[0142] 本文提供了包含罗米地辛作为活性成分的药物组合物,包括其对映体、对映体混合物、两种或多种非对映体的混合物、互变异构体、两种或多种互变异构体的混合物或同位素变体;或药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药组合药学上可接受的溶媒、载体、稀释剂或赋形剂或其混合物。

[0143] 本文提供了药物组合物,其包含地西他滨或阿扎胞苷或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药作为活性成分,并组合药学上可接受的溶媒,载体,稀释剂或赋形剂或混合物。

[0144] 合适的赋形剂是药学领域技术人员已知的,本文提供了合适赋形剂的非限制性实例。特定的赋形剂是否适于掺入药物组合物或剂型中取决于本领域众所周知的多种因素,其包括但不限于给药方法。例如,口服剂型如片剂可包含不适用于在胃肠外剂型中使用的赋形剂。特定赋形剂的适合性也可取决于剂型中的具体活性成分。例如,某些活性成分的分解可通过某些赋形剂,例如乳糖,或当暴露于水时来加速。包括伯胺或仲胺的活性成分特别易于发生这种加速分解。因此,本文提供了含有很少(如果有的话)乳糖和其他单糖或二糖的药物组合物和剂型。如本文使用的术语“无乳糖”是指乳糖存在的量(如果有的话)不足以实质上增加活性成分的降解速率。在一个实施方式中,无乳糖组合物含有本文提供的活性试剂、粘合剂/填料和润滑剂。在另一个实施方式中,无乳糖剂型含有活性试剂、微晶纤维素、预胶凝淀粉和硬脂酸镁。

[0145] 如同赋形剂的数量和种类一样,剂型中活性成分的数量和特定种类可根据多种因素发生变化,例如,但不限于,其被给药至患者的途径。在一个实施方式中,本文提供的剂型包含罗米地辛或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、立体异构体、包合物或前药,数量为从约 $0.5\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $28\text{mg}/\text{m}^2$ 。在另一个实施方式中,本文提供的剂型包含罗米地辛或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、立体异构体、包合物或前药,数量约 $8\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $12\text{mg}/\text{m}^2$ 或 $14\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0146] 在一个实施方式中,本文提供的剂型包含地西他滨或阿扎胞苷或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、立体异构体、包合物或前药,数量为从约 10 至约 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 。在另一个实施方式中,本文提供的剂型包含地西他滨或阿扎胞苷或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、立体异构体、包合物或前药,数量约 10、15、25、50、75、100、125 或 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 。在一个具体实施方式中,剂型包含地西他滨或阿扎胞苷,数量约 15, 25, 50, 75 或 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0147] 本文提供的药物组合物可用于制备单独的单一单位剂量形式。单一单位剂量形式适于通过口服、粘膜(例如鼻、舌下、阴道、颊或直肠)、或肠胃外(例如皮下、静脉内、快速浓注、肌肉内或动脉内)、局部(滴眼剂或其它眼科制剂)、透皮或经皮向患者给药。剂型的实例包括但不限于:片剂;囊片;胶囊,如弹性软明胶胶囊;扁囊剂;锭剂;含片;分散剂;栓剂;粉末剂;气雾剂(例如鼻喷雾剂或吸入剂);凝胶剂;适于对患者口服或经粘膜给药的液体剂型,包括悬浮液(例如水性或非水性液体悬浮液、水包油乳剂或油包水液体乳剂)、溶液和酏剂;适于对患者肠胃外给药的液体剂型;适于局部给药的滴眼剂或其它眼科制剂;和可以重新配制以提供适于肠胃外给药给患者的液体剂型的无菌固体(例如结晶形

或无定形固体)。

[0148] 在一个实施方式中,本文提供的药物组合物配制为多种用于口服给药的剂型。

[0149] 在一个实施方式中,本文提供的药物组合物配制为多种用于肠胃外给药的剂型。在一个具体实施方式中,本文提供的药物组合物配制为多种用于静脉给药的剂型。在一个具体实施方式中,本文提供的药物组合物配制为多种用于皮下给药的剂型。

[0150] 在一个实施方式中,药物组合物以用于口服给药的剂型提供,其包含罗米地辛或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;和一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。在一个实施方式中,剂型为包含罗米地辛的胶囊或片剂,数量约 10mg/m²、25mg/m²、50mg/m²、100mg/m²、200mg/m² 或 300mg/m²。在另一个实施方式中,胶囊或片剂剂型包含罗米地辛,数量约 50mg/m² 或 75mg/m²。

[0151] 在一个实施方式中,药物组合物以用于肠胃外给药的剂型提供,其包含罗米地辛或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;和一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。在一个实施方式中,剂型为包含罗米地辛的注射器或小瓶,数量约 0, 5mg/m²、2, 5mg/m²、7, 5mg/m²、15mg/m²、20mg/m² 或 28mg/m²。在另一个实施方式中,注射器或小瓶剂型包含罗米地辛,数量约 8mg/m²、10mg/m²、12mg/m² 或 14mg/m²。

[0152] 在一个实施方式中,药物组合物以用于肠胃外给药的剂型提供,其包含地西他滨或阿扎胞苷或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;和一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。在一个实施方式中,剂型为包含地西他滨或阿扎胞苷的注射器或小瓶,数量为 10、15、25、50、75、100、125 或 150mg/m²。在另一个实施方式中,注射器或小瓶剂型包含地西他滨或阿扎胞苷,数量约 10, 15, 25, 50, 75 或 100mg/m²。

[0153] 本发明提供的药物组合物可以单位剂量形式或多剂量形式提供。单位剂量形式的实例包括安瓿、注射器,以及单独包装的片剂和胶囊。例如,100mg 单位剂量含有在包装的片剂或胶囊中的约 100mg 的活性成分。单位剂量形式可以部分施用或多份施用。多剂量形式是包装在一个容器中的多个相同的单位剂量形式,以分离的单位剂量形式施用。多剂量形式的实例包括小瓶、片剂或胶囊的瓶、或品脱或加仑的瓶。

[0154] 本文提供的药物组合物可以一次性施用或以时间间隔多次施用。应当理解治疗的精确剂量和持续时间可以随着待治疗患者的年龄、体重和病症而变化,并且可以使用已知的试验设计凭经验确定或者通过体内或体外试验或诊断数据推测确定。应当进一步理解对于任何特定的个体,具体的剂量方案应当根据个人需要和施用制剂或监督施用制剂的人员的专业判断随时间调节。

[0155] A. 口服给药

[0156] 本文提供的口服给药的药物组合物可以以用于口服施用的固体、半固体或液体剂型提供。如本文使用的,口服施用也包括含服、舌头和舌下施用。合适的口服剂型包括但不限于:片剂、速溶剂(fastmelts)、咀嚼片、胶囊、丸剂、条剂、锭剂、含片、糖锭剂、扁囊剂、丸粒剂、加药口香糖、颗粒剂、散装粉剂、泡腾或非泡腾粉剂或颗粒剂、口服喷雾剂、溶液、乳剂、混悬剂、薄片剂、散剂、酏剂和糖浆剂。除了活性成分之外,所述药物组合物可以包含一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂,包括但不限于粘合剂、填充剂、稀释剂、崩解剂、润湿剂、润滑剂、助流剂、着色剂、染料迁移阻止剂、甜味剂、增香剂、乳化剂、悬浮和分散剂、防腐剂、溶剂、非水液体、有机酸和二氧化碳源。

[0157] 粘合剂或颗粒剂赋予片剂粘着性以确保片剂受压后保持完整。合适的粘合剂或颗粒剂包括但不限于,淀粉,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、和预胶凝淀粉(例如 STARCH1500);明胶;糖,例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糖浆、和乳糖;天然和合成树胶,例如阿拉伯胶、藻酸、藻酸盐、爱尔兰藓提取物、潘瓦尔胶、印度胶、车前皮粘胶、羧甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、硅酸镁铝、落叶松阿拉伯半乳聚糖、黄蓍胶粉、和瓜耳胶;纤维素,例如乙基纤维素、纤维素乙酸酯、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟乙基纤维素(HEC)、羟丙基纤维素(HPC)、羟丙基甲基纤维素(HPMC);微晶纤维素,例如 AVICEL-PH-101、AVICEL-PH-103、AVICELRC-581、AVICEL-PH-105(FMC Corp., Marcus Hook, PA);及其混合物。合适的填充剂包括,但不限于,滑石粉、碳酸钙、微晶纤维素、纤维素粉、葡萄糖结合剂、高岭土、甘露醇、硅酸、山梨糖醇、淀粉、预胶凝淀粉及其混合物。所述粘合剂或填充剂在本发明提供的药物组合物中的含量根据制剂类型变化,其对本领域普通技术人员而言是容易辨识的。所述粘合剂或填充剂在本发明提供的药物组合物中的含量以重量计可约为 50-99%。

[0158] 合适的稀释剂包括但不限于,磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、山梨糖醇、蔗糖、肌醇、纤维素、高岭土、甘露醇、氯化钠、干淀粉、和糖粉。某些稀释剂,例如甘露醇、乳糖、山梨糖醇、蔗糖、和肌醇,当含量足够时,可赋予某些压制片剂可在口中通过咀嚼分解的特性。此类压制片剂可用作咀嚼片剂。所述稀释剂在本发明提供的药物组合物中的含量根据制剂类型变化,其对本领域普通技术人员而言是容易辨识的。

[0159] 合适的崩解剂包括但不限于琼脂;膨润土;纤维素,例如甲基纤维素和羧甲基纤维素;木制品;天然海绵;阳离子交换树脂;海藻酸;树胶,例如瓜尔胶和硅酸镁铝 HV;柑橘渣;交联纤维素,例如交联羧甲基纤维素;交联聚合物,例如交联维酮;交联淀粉;碳酸钙;微晶纤维素,例如淀粉羟乙酸钠;聚克立林钾;淀粉,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉和预胶化淀粉;粘土;aligns;及其混合物。崩解剂在本发明提供的药物组合物中的含量根据制剂的类型变化,其对本领域普通技术人员而言是容易辨识的。本发明提供的药物组合物可以包含约 0.5 至约 15%或约 1 至约 5%重量的崩解剂。

[0160] 合适的润滑剂包括但不限于包括但不限于硬脂酸钙;硬脂酸镁;矿物油;轻矿物油;甘油;山梨糖醇;甘露醇;二醇,例如山嵛酸甘油和聚乙二醇(PEG);硬脂酸;月桂基硫酸钠;滑石;氢化植物油,包括花生油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;硬脂酸锌;油酸乙酯;月桂酸乙酯;琼脂;淀粉;石松粉;二氧化硅或硅胶,例如 AEROSIL[®] 200(W. R. Grace 公司,Baltimore,MD) 和 CAB-O-SIL[®] (Boston, Ma 的 Cabot 公司);及其混合物。本文提供的药物组合物可以含有约 0.1 至约 5%重量比的润滑剂。

[0161] 合适的助流剂包括但不限于胶状二氧化硅、CAB-O-SIL[®] (Boston, MA 的 Cabot 公司) 和不含石棉的滑石。合适的着色剂包括任一种混悬在氧化铝水合物中的经批准认证的水溶性 FD&C 染料和非水溶性 FD&C 染料,以及色淀及其混合物。色淀为水溶性染料吸附在重金属水合氧化物的组合,形成不溶形式的染料。合适的增香剂包括但不限于从植物例如果实中提取的天然增香剂,以及产生令人愉快的味觉的合成化合物的混合物,例如薄荷和水杨酸甲酯。合适的甜味剂包括但不限于蔗糖、乳糖、甘露醇、糖浆、甘油、和人工甜味剂例如糖精和阿司帕坦。合适的乳化剂包括但不限于明胶、阿拉伯胶、西黄蓍胶、膨润土和表面活性剂,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(例如 TWEEN[®] 20)、聚氧乙烯脱水山梨

糖醇单油酸酯 80 (例如 TWEEN[®] 80) 和油酸三乙醇胺酯。合适的悬浮和分散剂包括但不限于羧甲基纤维素钠、果胶、西黄蓍胶、硅酸镁铝、阿拉伯胶、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。

[0162] 合适的防腐剂包括但不限于甘油、尼泊金甲酯和尼泊金丙酯、苯甲酸、苯甲酸钠和醇。合适的润湿剂包括但不限于单硬脂酸丙二醇酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、单月桂酸二甘醇酯和聚氧乙烯月桂醚。合适的溶剂包括但不限于甘油、山梨醇、乙醇和糖浆。在乳剂中使用的合适的非水性液体的实例包括但不限于矿物油和棉籽油。合适的有机酸包括但不限于柠檬酸和酒石酸。合适的二氧化碳源包括但不限于碳酸氢钠和碳酸钠。

[0163] 应了解很多载体和赋形剂即使在同一制剂中,也可发挥多种功能。

[0164] 本发明提供的药物组合物可以下列剂型提供:压制片剂、片剂研制剂、咀嚼糖锭、速溶片剂、复压片剂、或肠溶片剂、糖衣或薄膜衣片剂。肠溶片剂为包衣的压制片剂,包衣物质抗胃酸作用但在肠内溶解或崩解,如此防止胃的酸性环境破坏活性成分。肠溶包衣包括,但不限于,脂肪酸、脂肪、水杨酸苯酯、蜡、虫胶、氯化虫胶、和邻苯二甲酸乙酸纤维素。糖衣片剂为糖衣包裹的压制片剂,糖衣可能有助于掩盖令人反感的味道或气味,以及保护片剂免于氧化。薄膜衣片剂为包被一薄层或薄膜水溶性材料的压制片剂。薄膜衣包括,但不限于,羟乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙二醇 4000、和邻苯二甲酸乙酸纤维素。薄膜衣提供与糖衣相同的常规特性。复压片剂为通过一次以上压制循环制备的压制片剂,包括多层片和压制包衣片或干燥包衣片。

[0165] 所述片剂剂型可由粉末、结晶、或颗粒形式的活性成分单独或与一种或多种本文所述的载体或赋形剂共同制备,所述载体或赋形剂包括粘合剂、崩解剂、控释聚合物、润滑剂、稀释剂、和 / 或着色剂。芳香剂和甜味剂在咀嚼片剂和糖锭制剂中特别有用。

[0166] 本文提供的用于口服给药的药物组合物可以以软胶囊或硬胶囊提供,所述胶囊可由明胶、甲基纤维素、淀粉、或藻酸钙制备。所述硬明胶胶囊,也称为干填充胶囊 (DFC),由两部分组成,一部分与另一部分互相重叠,由此完全包装所述活性成分。所述软弹性胶囊 (SEC) 为软的球状外壳,例如明胶外壳,可通过添加甘油、山梨糖醇、或类似的多羟基化合物塑化。所述软明胶外壳可包含防腐剂以防止微生物滋生。合适的防腐剂如本文所述,包括对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、以及山梨酸。本发明提供的液体、半固体、和固体剂型可装入胶囊。合适的液体和半固体剂型包括在碳酸丙二酯、植物油、或甘油三酸酯中的溶液和悬浮液。包含此类溶液的胶囊可如美国专利 4,328,245 ;4,409,239 ;和 4,410,545 所述制备。所述胶囊还可如本领域技术人员熟知被包衣,以改变或保持所述活性成分的溶解。

[0167] 本发明提供的药物组合物可以以液体和半固体剂型提供,包括乳剂、溶液、悬浮液、酏剂、和糖浆剂。乳剂为二相系统,其中一种液体以小球形式分散在另一种液体中,所述乳剂可为油包水或水包油。乳剂可包括药学上可接受的非水性液体或溶剂、乳化剂、和防腐剂。悬浮液可包括药学上可接受的悬浮剂和防腐剂。含水醇溶液可包括药学上可接受的缩醛,例如低烷基醛的二(低烷基)缩醛,例如乙醛二乙缩醛;以及具有一个或多个羟基的水混溶性溶剂,例如丙二醇和乙醇。酏剂为澄清、甜味的水醇溶液。糖浆剂为糖例如蔗糖的浓缩水溶液,并还可包含防腐剂。对于液体剂型,例如聚乙二醇中的溶液,可用足够量的药学上可接受的液体载体例如水稀释,以便施用称量。

[0168] 其它可用的液体和半固体剂型包括,但不限于,包含本发明提供的活性成分、以及二烷基单或多烯乙二醇的剂型,所述二烷基单或多烯乙二醇包括,1,2-二甲氧基甲烷、二甘醇二甲醚、三甘醇二甲醚、四甘醇二甲醚、聚乙二醇-350-二甲醚、聚乙二醇-550-二甲醚、聚乙二醇-750-二甲醚,其中350、550、750系指所述聚乙二醇的大约平均分子量。这些制剂可进一步包含一种或多种抗氧化剂,例如丁基羟基甲苯(BHT)、丁基羟基苯甲醚(BHA)、没食子酸丙酯、维生素E、对苯二酚、羟基香豆素、乙醇胺、卵磷脂、脑磷脂、抗坏血酸、苹果酸、山梨糖醇、磷酸、亚硫酸氢盐、焦亚硫酸钠、硫二丙酸及其酯、和二硫代氨基甲酸盐。

[0169] 本发明提供的用于口服的药物组合物还可以以脂质体、微团、微球、或纳米系统形式提供。微团剂型可如美国专利6,350,458所述制备。

[0170] 本发明提供的药物组合物可以以非起泡或起泡颗粒或粉末提供,以复原为液体剂型。用于所述非起泡颗粒或粉末的药学上可接受的载体和赋形剂可包括稀释剂、甜味剂、和湿润剂。用于所述起泡颗粒或粉末的药学上可接受的载体和赋形剂可包括有机酸和二氧化碳源。

[0171] 着色剂和芳香剂可用于所有上述剂型。

[0172] 本文提供的口服给药药物组合物可配制为立即释放的剂型或改变释放的剂型,包括延缓释放形式、持续释放形式、脉冲释放形式、控制的释放形式、靶向释放形式、和程序化释放形式。

[0173] B. 肠胃外给药

[0174] 本发明提供的药物组合物可不经消化道而通过注射、输液、或植入施用,用于局部或全身施用。当用于本发明时,胃肠外施用包括静脉内、动脉内、腹膜内、囊内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌肉内、滑膜内、膀胱内和皮下施用。

[0175] 本发明提供的肠胃外给药药物组合物可配制为任何适合胃肠外施用的剂型,包括溶液、悬浮液、乳剂、微团、脂质体、微球、纳米系统、和适合注射前在液体中配成溶液或悬浮液的固体形式。此类剂型可根据药学领域技术人员熟知的常规方法制备(参见,Remington: The Science and Practice of Pharmacy,如上)。

[0176] 预期用于胃肠外施用的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的载体和赋形剂,包括但不限于,含水载体、水溶性载体、无水载体、抗微生物生长的抗微生物剂或防腐剂、稳定剂、助溶剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮与分散剂、湿润或乳化剂、络合剂、掩蔽或螯合剂、冷冻保护剂、冻干保护剂、增稠剂、pH调节剂和惰性气体。

[0177] 合适的含水载体包括,但不限于,水、盐水、生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、氯化钠注射液、林格注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖和乳酸盐林格注射液。合适的无水载体包括,但不限于,植物来源的不挥发油、蓖麻油、玉米油、棉籽油、橄榄油、花生油、薄荷油、红花油、芝麻油、大豆油、氢化植物油、氢化大豆油、和椰子油的中链甘油三酯、以及棕榈籽油。合适的水混溶性载体包括,但不限于,乙醇、1,3-丁二醇、液体聚乙二醇(例如聚乙二醇300和聚乙二醇400)、丙二醇、甘油、N-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基乙酰胺、和二甲亚砜。

[0178] 合适的抗微生物剂或防腐剂包括,但不限于,苯酚、甲酚、汞制剂、苯甲醇、氯丁醇、甲基和丙基对羟基苯、硫柳汞、苯扎氯胺(例如,苄索氯铵)、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、和山梨酸。合适的等渗剂包括,但不限于,氯化钠、甘油、和葡萄糖。合适的缓冲

剂包括,但不限于,磷酸盐和柠檬酸盐。合适的抗氧化剂如本发明所述,包括亚硫酸氢盐和焦亚硫酸钠。合适的局部麻醉剂包括,但不限于盐酸普鲁卡因。合适的悬浮与分散剂如本发明所述,包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、和聚乙烯吡咯烷酮。合适的乳化剂包括本发明所述的乳化剂,包括聚氧乙烯去水山梨糖醇月桂酸酯、聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯 80、和三乙醇胺油酸酯。合适的掩蔽或螯合剂包括,但不限于 EDTA。合适的 pH 调节剂包括,但不限于,氢氧化钠、盐酸、柠檬酸、和乳酸。合适的络合剂包括,但不限于,环糊精,包括 α 环糊精、 β 环糊精、羟丙基 β 环糊精、磺丁醚 β 环糊精、和磺丁醚 7- β -环糊精 (CAPTISOL[®], CyDex, Lenexa, KS)。

[0179] 当本文提供的药物组合物被配制用于多剂量给药时,所述多剂量胃肠外制剂必须包含抑制细菌或抑制真菌浓度的抗微生物剂。如本领域熟知并实践的,所有胃肠外制剂必须无菌。

[0180] 在一个实施方案中,所述肠胃外给药的药物组合物可以以随时可用的无菌溶液提供。在另一个实施方案中,所述药物组合物以无菌可溶干产品提供,可在使用之前用溶媒复原,所述产品包括冻干粉和皮下注射片。在另一个实施方案中,所述药物组合物以随时可用的无菌悬浮液提供。在另一个实施方案中,所述药物组合物以无菌不可溶干产品提供,可在使用之前用溶媒复原。在另一个实施方案中,所述药物组合物可以以随时可用的无菌乳剂提供。

[0181] 本发明提供的肠胃外给药的药物组合物可配制为立即释放的或改变释放的剂型,包括延缓释放形式、持续释放形式、脉冲释放形式、控制释放形式、靶向释放形式、和程序性释放形式。

[0182] 本发明提供的肠胃外给药的药物组合物可配制为悬浮液、固体、半固体、或触变性液体,用于作为植入药库施用。在一个实施方案中,本发明提供的药物组合物分散在固体内部基质中,所述内部基质被外部高分子膜包围,所述高分子膜不溶于体液,但是允许所述药物组合物中的活性成分扩散通过。

[0183] 合适的内部基质包括但不限于聚甲基丙烯酸甲酯、聚丁基丙烯酸甲酯、增塑或未增塑的聚氯乙烯、增塑尼龙、增塑聚对苯二甲酸乙二醇酯、天然橡胶、聚异戊二烯、聚异丁烯、聚丁二烯、聚乙烯、乙烯-乙烯乙酸酯共聚物、硅酮橡胶、聚二甲硅氧烷、硅酮碳酸酯共聚物、亲水聚合物例如丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的水凝胶、胶原蛋白、交联聚乙烯醇、和交联部分水解的聚乙烯乙酸酯。

[0184] 合适的外部高分子膜包括但不限于聚乙烯、聚丙烯、乙烯/丙烯共聚物、乙烯/丙烯酸乙酯共聚物、乙烯/乙烯乙酸酯共聚物、硅酮橡胶、聚二甲硅氧烷、氯丁橡胶、氯化聚乙烯、聚氯乙烯、氯乙烯与乙酸乙烯酯、乙烯叉二氯、乙烯和丙烯共聚物、聚对苯二甲酸乙二醇酯离子交联聚合物、丁基橡胶氯醚橡胶、乙烯/乙烯醇共聚物、乙烯/乙烯乙酸酯/乙烯醇三元共聚物、和乙烯/乙烯氧基乙醇共聚物。

[0185] C. 延迟释放剂型

[0186] 包含罗米地辛和 3-(4-氨基-1-氧-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的药物组合物可通过控制释放装置或通过本领域的普通技术人员熟知的输递装置给药。其例子包括但不限于下列美国专利号中描述的那些:3,845,770;3,916,899;3,536,809;3,598,123;和 4,008,719;5,674,533;5,059,595;5,591,767;5,120,548;5,073,543,

5, 639, 476, 5, 354, 556 和 5, 733, 566, 它们分别本文纳入本文作为参考。这种剂型可用来提供一种或多种活性成分的缓慢或控制释放, 其使用例如羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统、多层包衣、微颗粒、脂质体、微球体或它们的组合来提供可变比例的所需释放曲线。本领域的普通技术人员已知的合适的控释制剂包括本文所述的那些, 并可方便地选择以用于本发明的活性成分。因此, 本发明涵盖了适合口服给药的单一单位剂型, 例如但不限于适合用于控制释放的片剂、胶囊、凝胶胶囊和囊片。

[0187] 所有控制释放药物产品的一个共同目的是使其药物疗效优于其非受控的对应物所获得的疗效。理想情况下, 在药物治疗中使用最佳设计的控制释放制品的特征为在最短时间内用最少的药物来治愈或控制症状。控释制剂的优点包括药物活性延长、给药频率降低以及患者顺应性提高。此外, 控释制剂可用来影响起效时间或其它特性, 例如药物的血液水平, 因此可影响副作用(例如不良作用)的发生。

[0188] 大多数控释制剂被设计成最初释放能迅速产生所需治疗效果的药物(活性成分)量, 并逐步并连续释放其它药物量以在较长时间内保持这种治疗或预防效果的水平。为在体内维持这种恒定的药物水平, 药物必须以替换被代谢了的并排出体外的药物的量的速度从剂型中释放。可通过各种条件刺激活性成分的受控释放, 其中包括但不限于 pH、温度、酶、水, 或其它生理条件或化合物。

[0189] 罗米地辛制剂

[0190] 在一个实施方式中, 罗米地辛被配制为无菌白色冻干粉用于注射, 并在单独使用的小瓶中提供, 其中含有 10mg 罗米地辛和 20mg 聚维酮(USP)。稀释剂为无菌清液, 并在单独使用的小瓶中提供, 其中含有 2ml 可递送体积。罗米地辛的稀释剂含有 80% (v/v) 丙二醇(USP) 和 20% (v/v) 无水乙醇(USP)。罗米地辛作为含有两个药瓶的试剂盒提供。

[0191] 预设用于注射的罗米地辛在用所提供的稀释剂重构和进一步用 0.9% 氯化钠(USP) 稀释后用于静脉输液。

[0192] 阿扎胞苷制剂

[0193] 在一个实施方式中, 阿扎胞苷被配制为无菌冻干粉用于注射, 并在单独使用的小瓶中提供, 其中含有 100mg 的阿扎胞苷和 100mg 的甘露醇。

[0194] 预设用于注射的阿扎胞苷在重构为溶液和进一步稀释后用于静脉输液。预设用于注射的阿扎胞苷在重构为悬液后用于皮下注射。

[0195] 地西他滨制剂

[0196] 在一个实施方式中, 地西他滨被配制为白色至几乎白色的无菌冻干粉用于注射, 并在清澈无色的玻璃小瓶中提供。每个小瓶(20mL 单一剂量)含有 50mg 的地西他滨、68mg 磷酸二氢钾(磷酸二氢钾)和 11.6mg 氢氧化钠。

[0197] 试剂盒

[0198] 在一个实施方式中, 本文提供了试剂盒, 其包含填充罗米地辛或其药物组合物的一种或多种容器和填充阿扎胞苷或地西他滨或其药物组合物的一种或多种容器。

实施例

[0199] 以下实施例仅通过描述方式提供, 不作为限制。

[0200] 实施例 1. 细胞系确认

[0201] 对 KIJ265T 样品通过 Mayo Clinic Rochester 磁芯器件进行 STR 分析。使用 Purelink™ 基因组 DNA mini 试剂盒 (Invitrogen) 从初生组织和匹配细胞系分离基因组 DNA。使用来自 ABI (Applied Biosystems) 的荧光标记引物在 PCR 反应中扩增 12 种肾脏特异性 STR 标记物。使用 ABI3130 (Applied Biosystems) 分析结果。标记物包括 :D7S484、D13S158、D10S197、D14S70、mycL、D21S1252、D8S262、D17S250、D15S1002、D16S520、D2S2368 和 D6S441。使用基因标记 (Soft Genetics, State College, PA) 计算相对于共同注射的尺寸标准的峰值尺寸。使用免疫组织化学验证 KIJ265T 细胞的肾脏来源 (图 6A 和 6B)。将细胞铺展在玻片上,使用 2% 多聚甲醛 (Sigma) 固定,使用 1% Triton X-100 (Sigma) 通透,然后在用第一抗体染色前用含有背景还原成分的稀释剂 (Dakocytomation, Denmark) 封闭。通过在染色过程中排除第一抗体来制备对照玻片。第一抗体包括 RCC-Ma (Cell Marque Corporation, Rocklin, CA)、podocin (ABCAM, Cambridge, MA)、 γ -谷氨酰转肽酶 (Lifespan Biosciences, Seattle, WA)、PAX2 (Lifespan) 和水通道蛋白 2 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA)。经 DNA 测序鉴定 KIJ265T 细胞系是 VHL 变体 (外显子 2c. 407T>C ;p. F136S 的蛋白质修饰)。

[0202] 实施例 2. 细胞培养

[0203] 将人肾细胞癌细胞系 A498 (ATCC, Manassas, VA) 和 KIJ265T (来自 Copland 实验室建立的 4 级人肾细胞癌患者组织初生肿瘤位点)、以及三阴性乳腺癌细胞系 BT-20 (ATCC) 和 MDA-231 (ATCC) 在 37℃、5% CO₂ 的潮湿条件下保持于补充 10% FBS (Hyclone, Logan, UT) 和青霉素-链霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的无酚红 DMEM 培养基 (Cellgro, Herndon, VA) 中。

[0204] 实施例 3. 药物治疗和增殖分析

[0205] 所有药物储存液以 1000x 浓度配制于 DMSO 中。将细胞涂布 (1×10^5 每孔) 每 ml 培养基于 12 孔板 (Midwest Scientific, St. Louis, MO), 每个处理进行一式三份。对于单治疗剂处理,用剂量范围 0.01 μ M-10 μ M 的地西他滨 (购自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 或剂量范围 0.01nM-100nM 的罗米地辛 (由 Gloucester Pharmaceuticals 公司提供) 处理细胞。使用 DMSO 作为溶媒对照。处理 72 小时后将细胞胰蛋白酶化,使用 Coulter Particle Counter (Beckman, Brea, CA) 计数。对于组合剂量输出 (dose-outs),用剂量范围 0.1、1 或 10 μ M 的地西他滨处理细胞。48 小时后用剂量范围 0.5nM-7.5nM 的罗米地辛处理细胞 24 小时。24 小时后将细胞胰蛋白酶化并计数。合适的单治疗和 DMSO 处理被引入作为对照组并根据组合的时间点给药。在进一步治疗中采用最优组合剂量的 72 小时 1 μ M 地西他滨加剩余 24 小时 5nM 罗米地辛。

[0206] 对于具有重组人 sFRP1 的细胞的治疗,将 MDA231 和 KIJ265T 细胞在 100 μ l 补充 PSA 和 10% FBS 的 DMEM 中 5000 细胞每孔接种于 96 孔培养板。过夜孵育后,在 PBS 中洗涤细胞,并加入含终浓度的 sFRP1 的 100 μ l 无血清 DMEM。将细胞孵育 6 小时。在这些孔中重新加入血清至终浓度 2% FBS。在将细胞胰蛋白酶化并计数前将板孵育 72 小时。

[0207] 实施例 4. RNA 分离、RT-PCR 和定量 PCR

[0208] 使用 RNAqueous Midi Kit (Ambion, Austin, TX) 从各样品组中分离和纯化 RNA。所有样品的 0. D. 260/280mRNA 比都为 1.8 至 2.0,在 1% 琼脂糖凝胶上鉴定 18S/28S 条带纯度。按照生产商的说明使用 High Capacity cDNA 反转录酶试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 逆转录 RNA。将 cDNA 样品混合 TaqMan® Fast Universal PCR Master

Mix (Applied Biosystems) 和 TaqMan® FAM™ 染料标记探针, 其包括 sFRP1 (Hs00610060_m1)、RhoB (Hs00269660_s1)、p21 (Hs00355782_m1)、T β RIII (Hs00234257_m1)、GATA3 (Hs00231122_m1) 和 GAPDH (Hs99999905_m1)。使用定量实时 PCR (QPCR) 分析基因表达。使用 GAPDH 作为阳性对照。通过比较性 C(T) 方法 (Schmittgen 等人, Nat Protocol 3: 1101-1108, 2008) 对药物处理的样品之间的倍数变化值与 DMSO 对照样品的倍数变化值进行对比。

[0209] 实施例 5. 蛋白质表达分析

[0210] 在 100mm 板 (Midwest Scientific) 上接种细胞 (1×10^7), 用治疗方案中确定的最优组合剂量处理。收集细胞并使用含有蛋白酶抑制剂混合物 (Roche, Mannheim, Germany) 和磷酸酶抑制剂 (Pierce) 的 M-PER 试剂 (Pierce, Rockford, IL.) 裂解细胞。按照 Copland 等人, Oncogene 25:2304-2317, 2006 中的描述进行定量并转移至 0.2 μ M Immobilon Psq 膜。使用 5% 牛奶的 Tris- 缓冲盐水溶液加吐温 -20 (TBS-T) (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) 封闭膜, 并与第一抗体 [PARP (Cell Signaling, Boston, MA)、半胱氨酸蛋白酶 -3 (Cell Signaling)、sFRP1 (Cell Signaling) 或 β -actin (Sigma-Aldrich)] 4℃ 孵育过夜。在 5% 牛奶 TBS-T 稀释的第二种特异性辣根过氧化物酶标记的抗体 (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) 中将膜在室温下孵育 1 小时。使用 Supersignal 化学发光试剂盒 (Pierce) 进行检测。

[0211] 实施例 6. 通过流式细胞术进行细胞死亡分析

[0212] 将细胞用最优组合治疗处理并制备合适的对照组。在 72 小时处理后, 收集粘附和悬浮细胞, 4℃ 下离心, 用 DPBS 洗涤。将细胞离心并重悬于 1x 冷结合缓冲液 (BD Pharmingen, San Jose, CA), 浓度 1×10^6 细胞每 ml。将细胞用碘化丙啶 (BD Pharmingen) 染色 10 分钟, 使用 Accuri C6 流式细胞仪 (Accuri, Ann Arbor, MI) 进行 FACS 分析。使用未染色细胞作为对照用于设定细胞群参数。

[0213] 实施例 7. 慢病毒和感染

[0214] 使用 MISSION shRNA pLKO.1 构建物 (Sigma-Aldrich) 制备自灭活 shRNA 慢病毒用于 sFRP1 [靶序列 5' -CGAGATGCTTAAGTGTGACAA-3' (克隆 NM_003012.3-758s1c1) (Sigma-Aldrich)] 和用作对照的非靶向随机重组 (scrambled) 的序列 (SHC002)。通过使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 配对 ViraPower (Invitrogen) 的瞬时转染用 HEK293FT (ATCC®, Manassas, VA) 细胞包装慢病毒。转染后 72 小时收集含病毒上清液, 用 0.45 μ m PVDF 注射器过滤器 (Millipore) 过滤。为了进行病毒转导, 将 MDA-231 或 KIJ265T 细胞以 2×10^7 细胞每 100mm 板接种在 5mL 生长培养基中, 并与慢病毒加 5 μ g/ml 聚凝胺 (American Bioanalytical, Natick, MA) 一起孵育 24 小时。通过嘌呤霉素 (Fisher Scientific) 选择鉴定克隆。

[0215] 实施例 8. 统计分析

[0216] 数据以均值 ± SD 表示, 通过 2 - 尾配对 t 检验分析治疗组的对比。多组对比的数据以均值 ± SD 表示, 并用 ANOVA 进行分析。p < 0.05 被认为是统计学显著的。

[0217] 实施例 9. 单一药物治疗对细胞增殖的效果

[0218] 在两个 ccRCC4 级细胞系 (A498 和 KIJ265T) 和两个 TNBC 细胞系 (MDA231 和 BT20) 中评价了罗米地辛和地西他滨个体药物治疗在药物暴露 72 小时后抑制细胞增殖的能力

(图 1A 和 1B)。罗米地辛在 2.5-100nM 剂量范围内产生了显著的细胞增殖抑制(图 1A)。用地西他滨的治疗在所有测试的剂量下对细胞增殖具有最小的效果,如图 1B 所示。这些数据确定罗米地辛为 ccRCC 和 TNBC 细胞系中一种潜在的细胞增殖抑制剂。

[0219] 实施例 10. 组合药物治疗对细胞增殖的效果

[0220] 在 ccRCC 和 TNBC 细胞系中评价了罗米地辛和地西他滨的组合治疗抑制细胞增殖的能力(图 2A-2D)。罗米地辛剂量被标准化为 0.1、0.5、2.5 和 5nM,其中 5nM 是在单一处理样品中经 3 天暴露后诱导~50%细胞死亡的剂量。以 0.1、1 和 10 μ M 剂量的地西他滨处理细胞。这些研究的治疗方案评价了细胞对 24 小时单独的罗米地辛处理、72 小时单独的地西他滨处理或 72 小时的地西他滨与最后 24 小时组合罗米地辛处理的响应。在 ccRCC 和 TNBC 细胞系中,罗米地辛和地西他滨的组合药物治疗较之单独的单一药物治疗而言诱导了更高的细胞增殖抑制。

[0221] 还对细胞系分析了药物诱导的细胞死亡。用单独的 5nM 罗米地辛或 1 μ M 地西他滨或组合治疗的细胞系的碘化丙啶染色确认了在组合药物处理组中的协同诱导细胞死亡(图 3A 和 3B)。在 ccRCC 细胞系 KIJ265T 观察到组合治疗的最大细胞死亡诱导,其中死亡诱导比 DMSO 处理的对照高 21.1%(图 3B)。对于细胞系 A498、MDA231 和 BT20,相对于 DMSO 对照,组合治疗组中的细胞死亡分别被诱导了 13.6%、10.7%和 10.8%。单一药物暴露不能在测试细胞系中一致诱导细胞死亡,虽然单独的地西他滨在 KIJ265T 中以及罗米地辛在 BT20 中在统计学上增加了死亡数(分别高于对照 6.3%和 5.8%)。

[0222] 实施例 11. 组合药物治疗对凋亡的效果

[0223] 为了考察单一和组合药物处理的细胞中细胞死亡的机理,分析了全细胞蛋白的凋亡标记物。收集了来自在上述最优给药方案处理的细胞的全蛋白,通过蛋白质印迹技术进行了研究。在所有试验细胞系中,半胱氨酸蛋白酶-3 和 PARP 的裂解在对照或单一药物治疗组中都是不存在的。然而,用 5nM 罗米地辛和 1 μ M 地西他滨组合处理细胞导致所有细胞系中半胱氨酸蛋白酶-3 和 PARP 的裂解(图 4A),表明这些药物在组合状态下是凋亡的有效诱导剂。

[0224] 实施例 12. 组合药物治疗对 sFRP1 表达的效果

[0225] 为了说明 ccRCC 和 TNBC 细胞暴露在组合的罗米地辛和地西他滨中发生的分子事件,我们分析了之前确认的在癌症中直接或间接受到后生(epigenetic)沉默影响的分子靶标。对来自所有试验细胞系研究了 RhoB(Marlow 等人, J Clin Endocrinol Metab 95:5337-5347, 2010; Marlow 等人, Cancer Res 69:1536-1544, 2009)、p21(Marlow, 同上)、T β RIII(Cooper 等人, Oncogene 29:2905-2915, 2010)、GATA3(Cooper, 同上)和 sFRP1(Gumz, 同上)在单一或组合治疗后的蛋白表达水平和 RNA。在考察的分子靶标中, sFRP1 在所有用组合治疗处理的细胞系中表现出一致的 RNA 表达上调,且在蛋白质水平确认了上调(图 4A 和 4B)。从而,对组合治疗在蛋白水平和 RNA 水平均观察到 sFRP1 表达的累积,如实时 PCR 所示。对每个细胞系将处理样品中的 sFRP1 的倍数变化表达值对 DMSO 对照进行标准化,确认了组合治疗中的协同性凋亡增加。sFRP1 已显示起肿瘤抑制基因作用。双重治疗处理的癌细胞中 sFRP1 的再表达足以调控细胞存活。

[0226] 实施例 13. 双重治疗的诱导的 sFRP1 的沉默导致获得细胞存活

[0227] 在 TNBC(MDA231) 和 ccRCC(KIJ265T) 细胞系中使用 shRNA 技术沉默了 sFRP1 的

内生水平。sFRP1 沉默的细胞被暴露于 5nM 罗米地辛和 1 μ M 地西他滨的组合,评价了 sFRP1RNA 信使的表达(图 5A)。在 MDA231 和 KIJ265T 非目标细胞系中,组合治疗分别诱导了相对于非治疗、非靶向的对照而言~1300 和~600 倍的 sFRP1 表达。随着 sFRP1 的 shRNA 沉默,在 MDA231 和 KIJ265T 细胞中组合治疗对 RNA 信使的诱导将该表达降低了 6 倍或更多。可诱导 sFRP1 的损失被观察到在 KIJ265T 和 MDA231 细胞中均降低了组合治疗的效果。在用罗米地辛和地西他滨处理后,与处理的 shRNA 非靶向对照相比,sFRP1shRNA 沉默的细胞的生长受到最低限度的影响。在罗米地辛 5nM 和地西他滨 1 μ M 的剂量下,对于 KIJ265T 和 MDA231 细胞而言,sFRP1shRNA 沉默的细胞对该组合的响应比非靶向处理的对照分别低 1.7 倍和 1.8 倍(图 5B 和 5C)。对全细胞蛋白的分析确定 sFRP1shRNA 沉默的细胞具有降低水平的 PARP 和半胱氨酸蛋白酶 -3 裂解产物,确定了在这些细胞中组合治疗后的细胞存活是由于受抑制的凋亡响应(图 5D)。这些数据确定了 sFRP1 是罗米地辛/地西他滨处理的一个靶标,且其再表达在抑制细胞生长和诱导细胞死亡中起作用。

[0228] 实施例 14. 重组 sFRP1 对细胞增殖的影响

[0229] 为了验证 sFRP1 的后生沉默对于 TNBC 和 ccRCC 细胞存活而言是至关重要的,我们对细胞培养基重引入了重组人 sFRP1,并研究了其对于细胞增殖的效果。培养基中增加剂量的重组 sFRP1 导致了 MDA231 和 KIJ265T 剂量依赖的细胞增殖下降(图 5E),表明 sFRP1 的再表达能够抑制癌细胞生长。因此,组合的罗米地辛和地西他滨通过由这些药物的组合导致的协同的 sFRP1 再表达对于 ccRCC 和 TNBC 的治疗是一种潜在的药物治疗。

[0230] 用罗米地辛和地西他滨联合治疗处理初生位点、转移性 ccRCC 和 TNBC 细胞系表现出协同抑制细胞增殖和通过凋亡诱导细胞死亡。该药物组合导致肿瘤抑制基因 sFRP1 的再表达,该基因的沉默在 ccRCC 和 TNBC 细胞的存活中发挥重要作用。这些数据一起表明组合的罗米地辛和地西他滨对于 ccRCC 和 TNBC 的治疗是一种有前途的治疗药物方案。

[0231] 在本说明书中所提到的所有出版物、专利或专利申请均引为参考,如同各个出版物、专利或专利申请特定地、单独地引为参考一样。

[0232] 参考上述示例性的实施方式对本公开进行了描述。然而,本领域技术人员在阅读了此公开后会认可,可以对该示例性实施方式进行改变和修饰而不偏离本公开的范围。所述改变和修饰包括在本公开的范围,如下述权利要求所表达的那样。

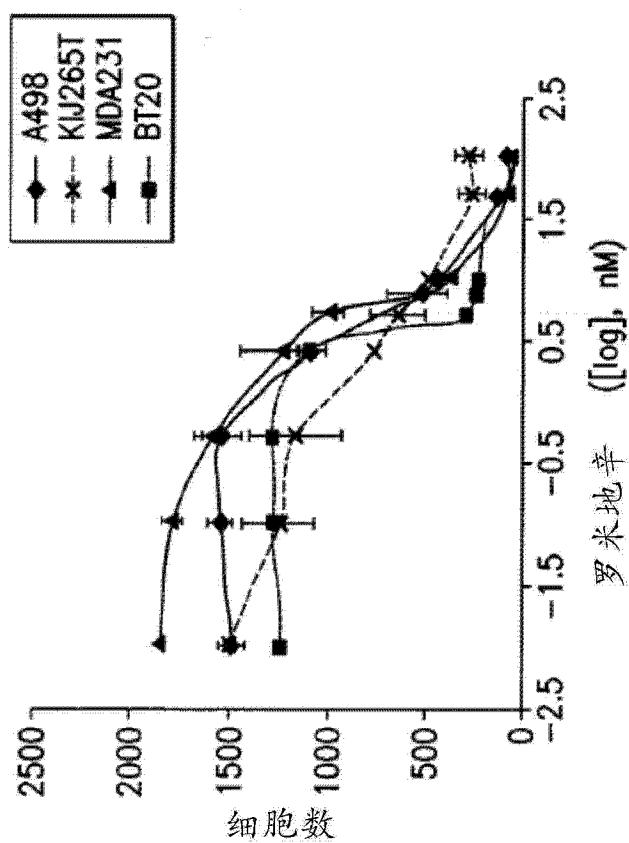


图 1A

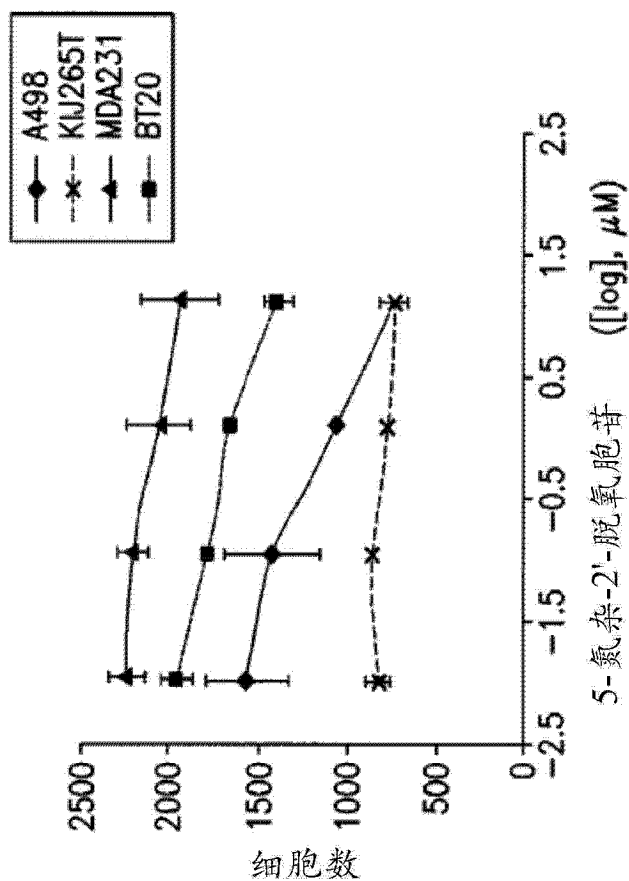


图 1B

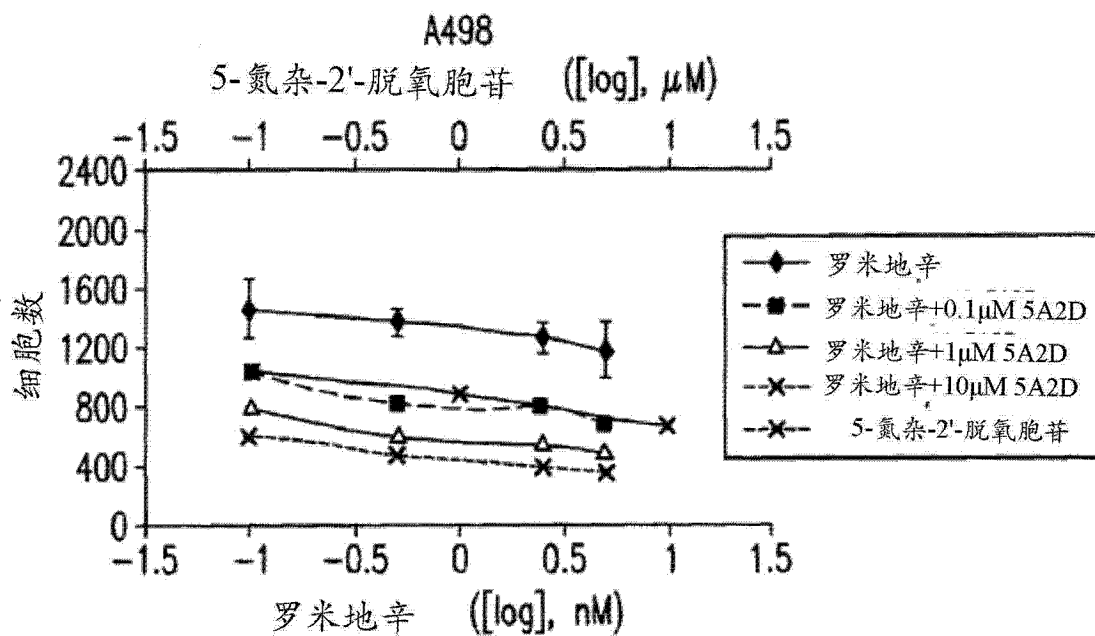


图 2A

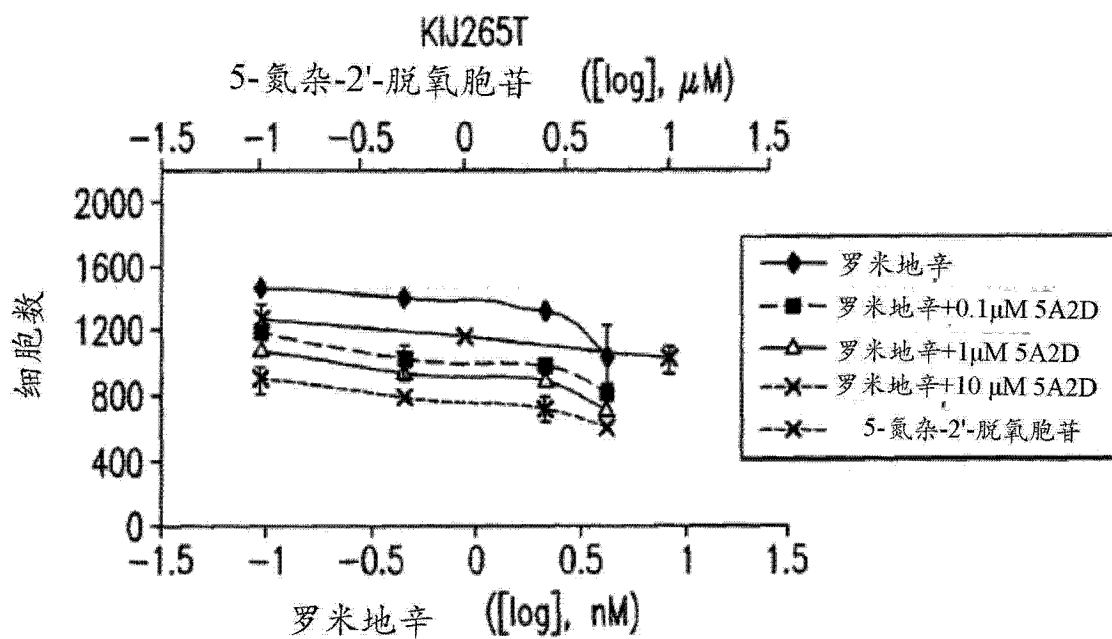


图 2B

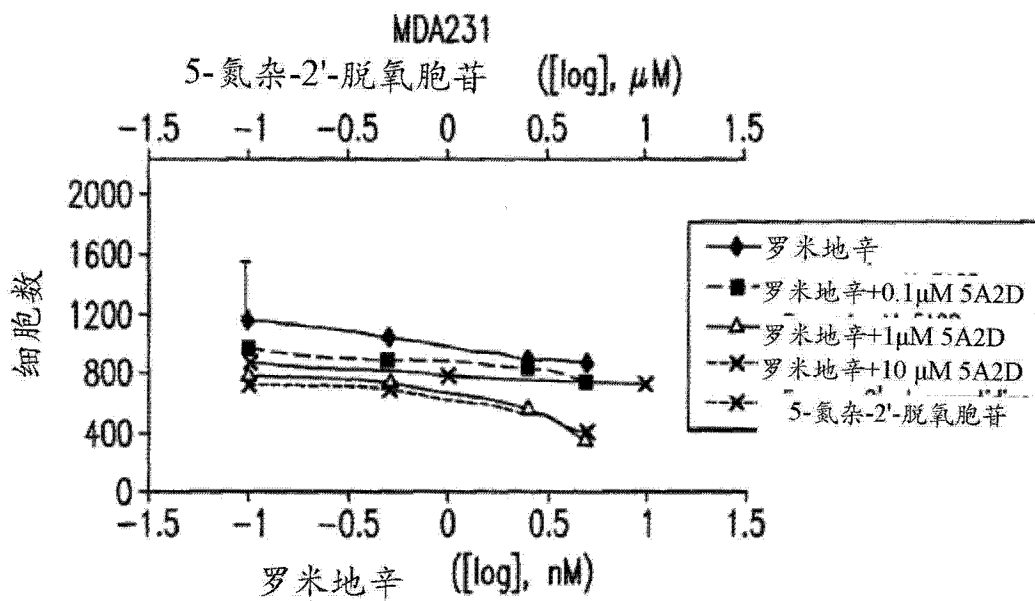


图 2C

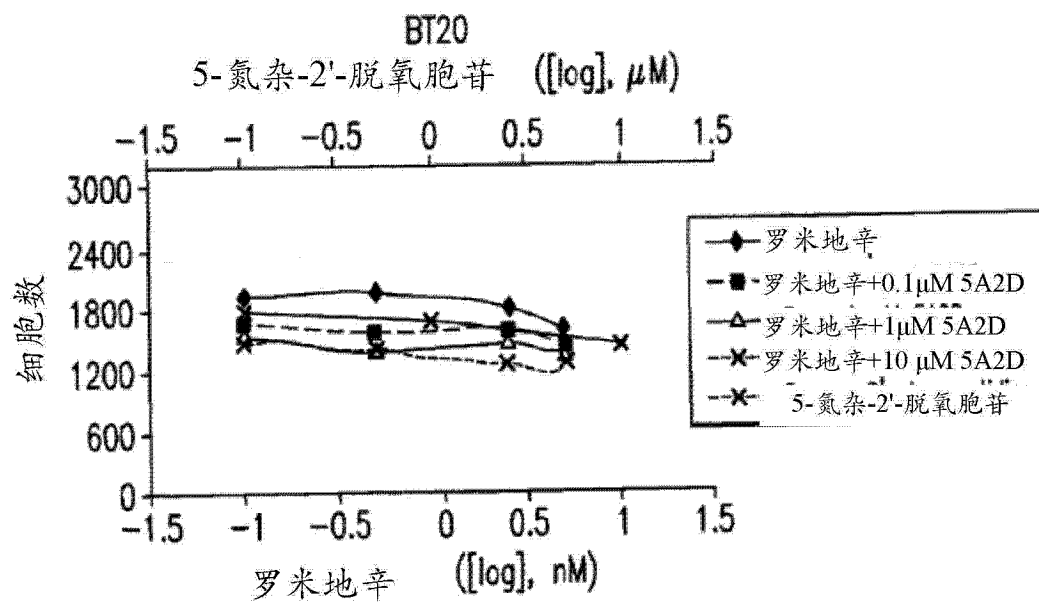
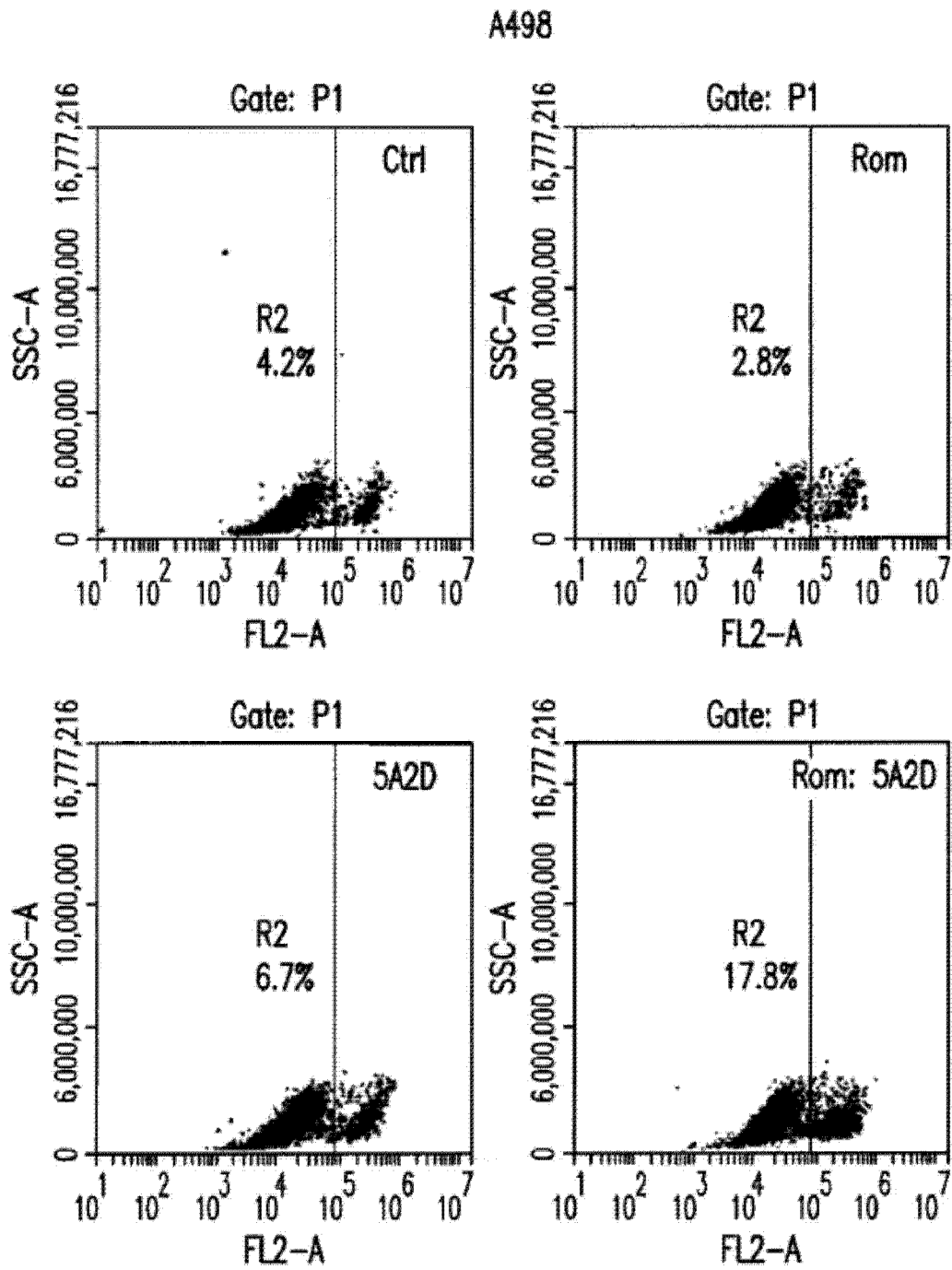


图 2D



% 细胞死亡	
Ctrl	4.2
Rom	2.9
5A2D	6.7
Rom:5A2D	17.8

图 3A

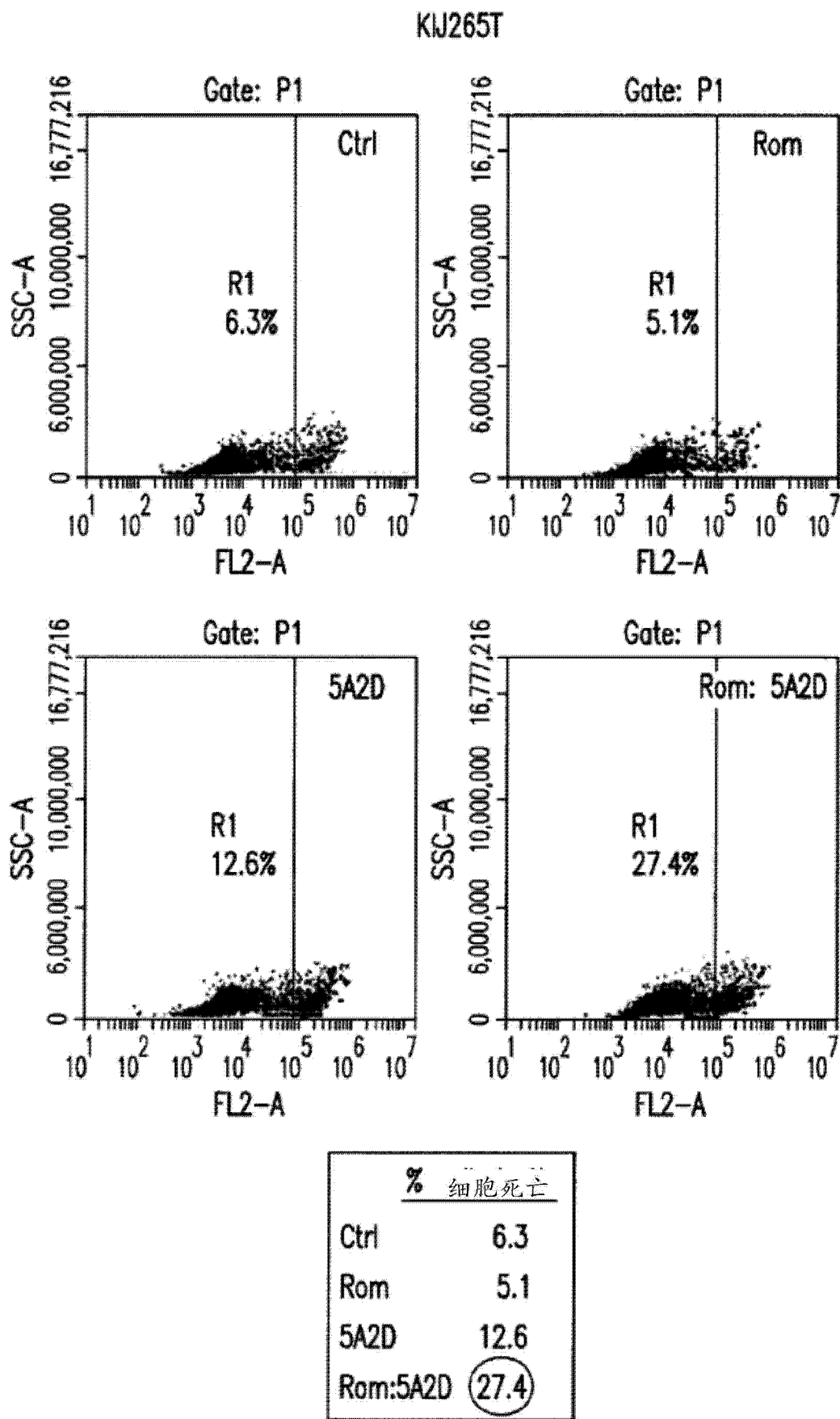


图 3B

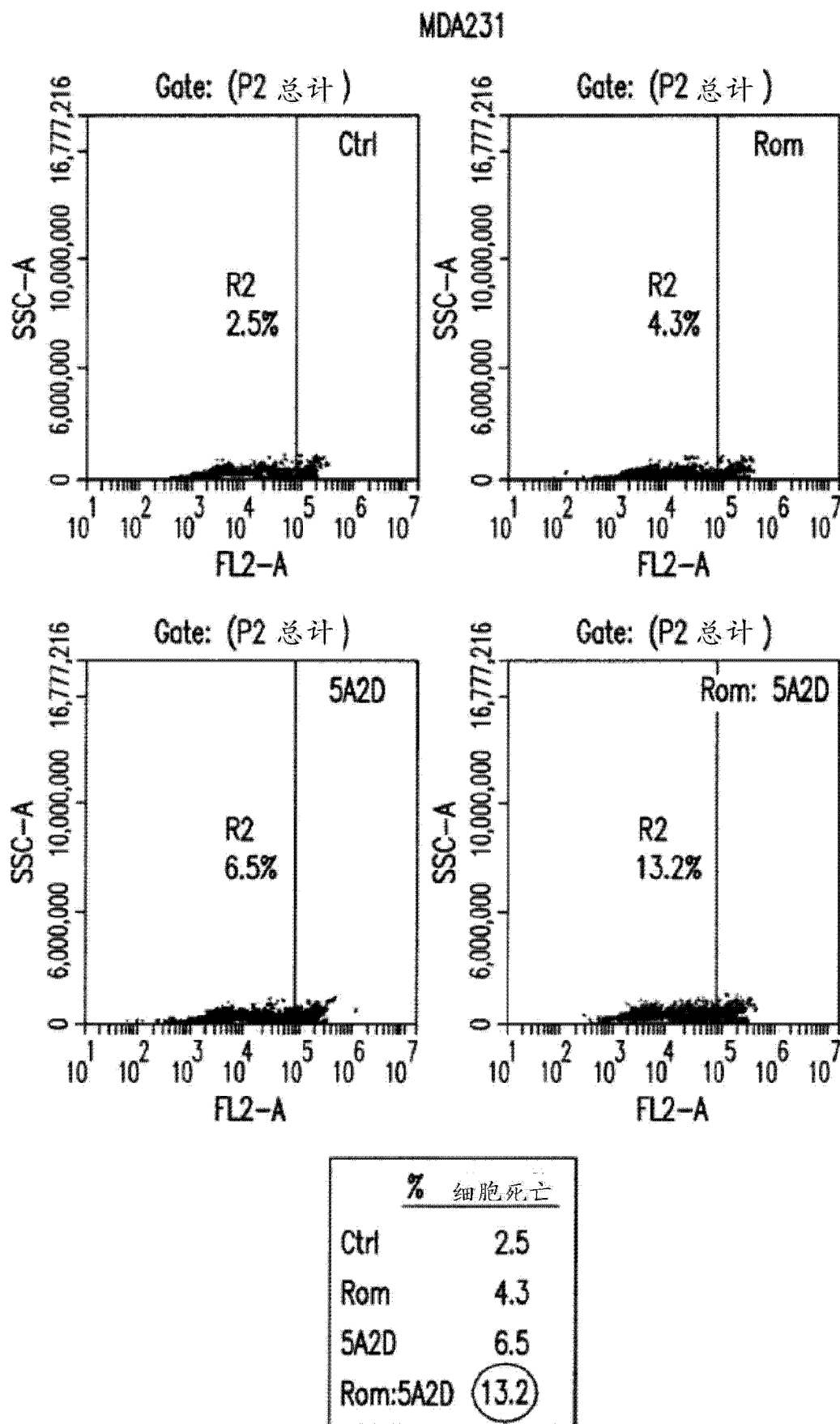


图 3C

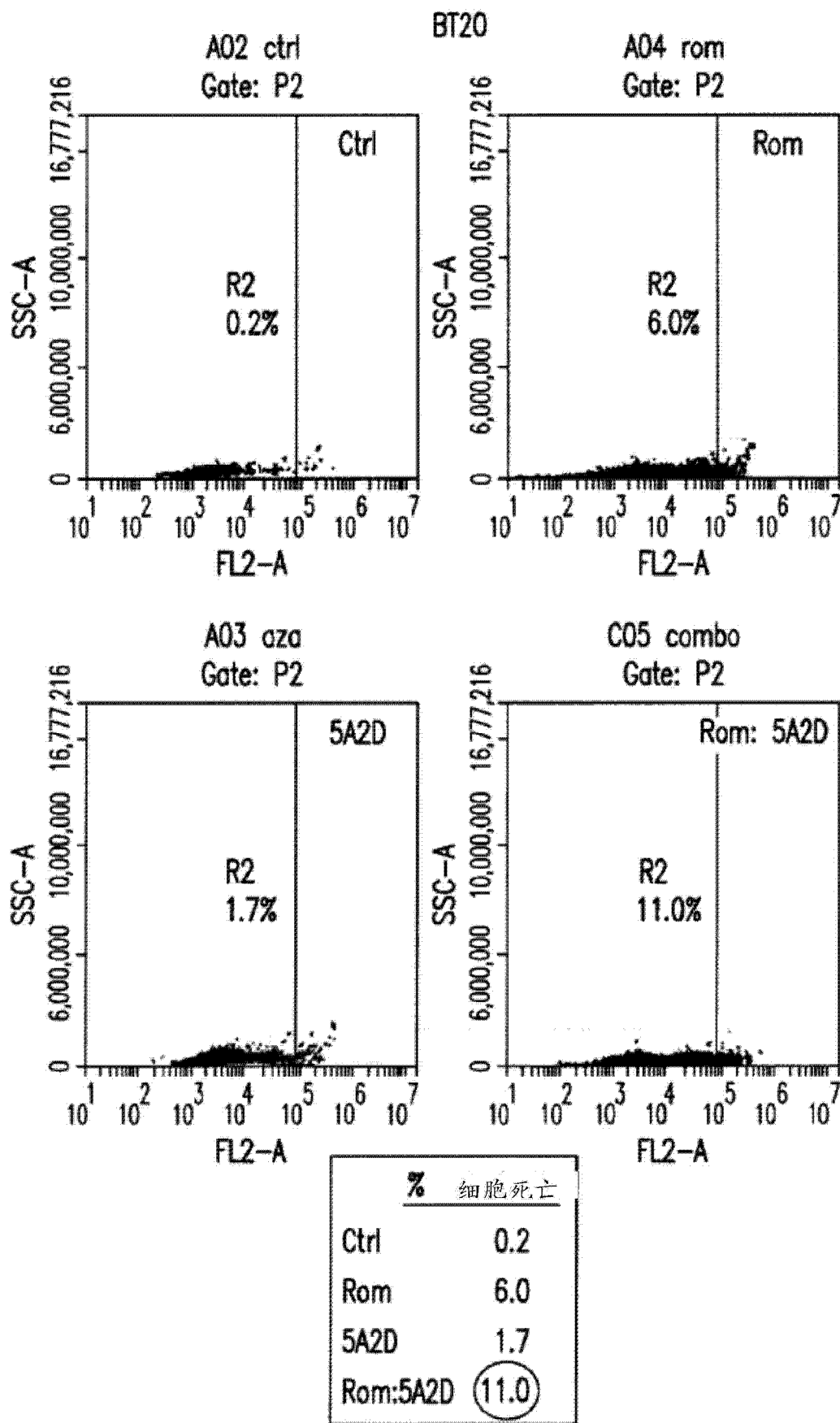


图 3D

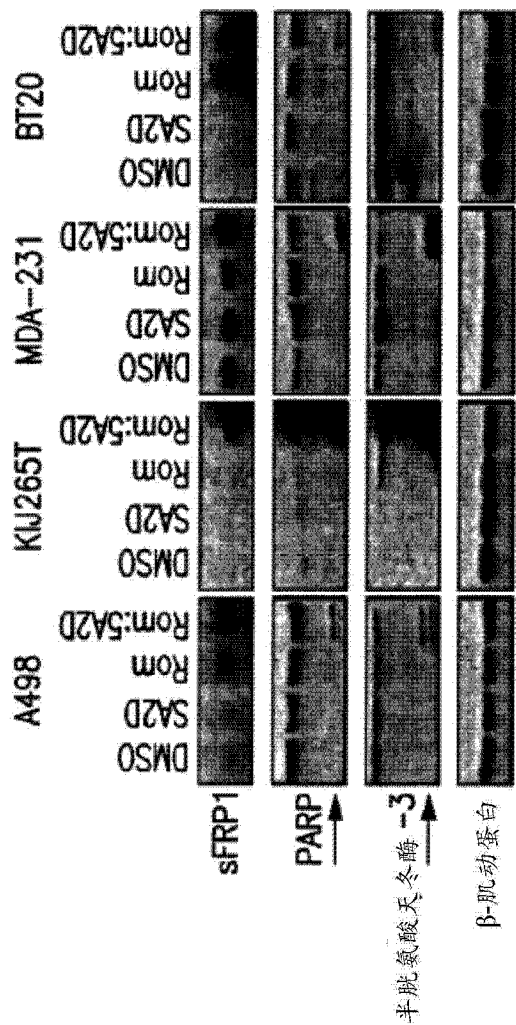


图 4A

sFRP1	Ctrl CT 值	Ctrl 倍数变化	5A2D 倍数变化	Rom 倍数变化	Rom:5A2D 倍数变化
A498	38.5	1.0±0.1	11.1±2.9	1.4±0.9	35.3±2.5*
KJ265T	34.3	1.1±0.5	2.5±0.7	20.6±1.1	62.4±6.6*
MDA231	39.2	1.0±0.2	95.4±15.9	4.8±3.4	1302.6±49.5*
BT20	27.7	1.0±0.1	2.6±0.1	1.4±0.1	3.6±0.4*

图 4B

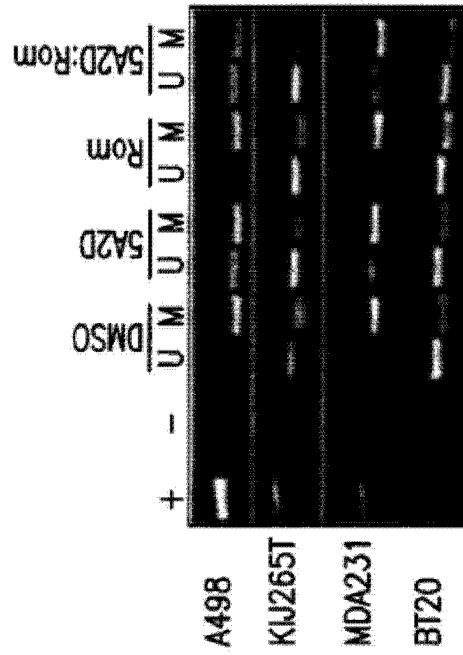


图 4C

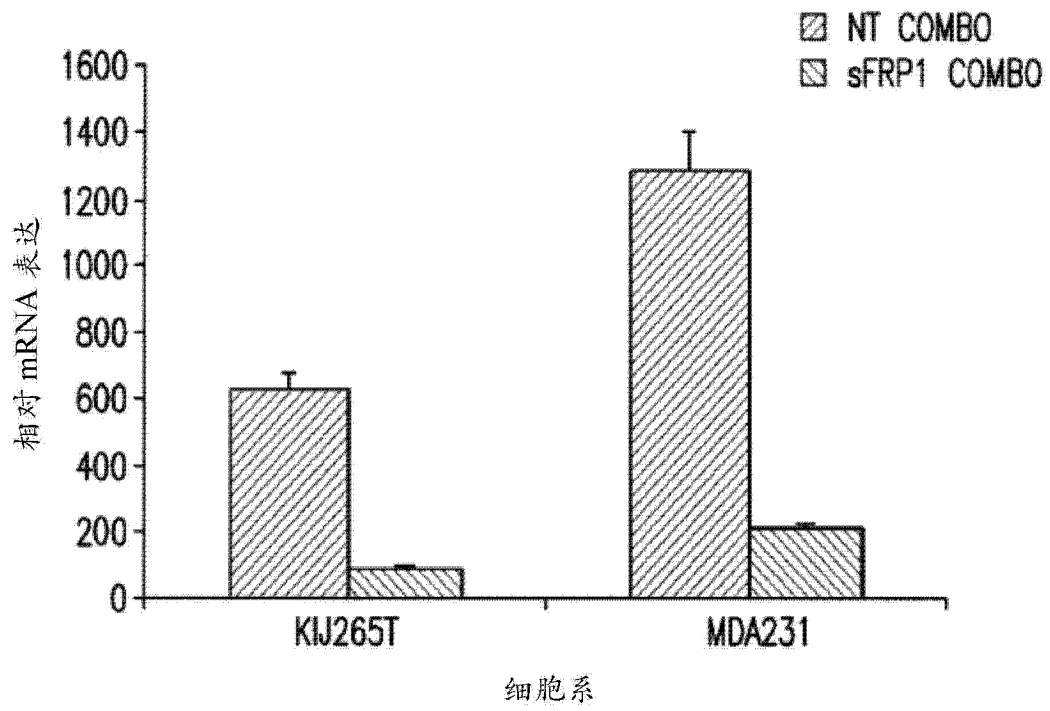


图 5A

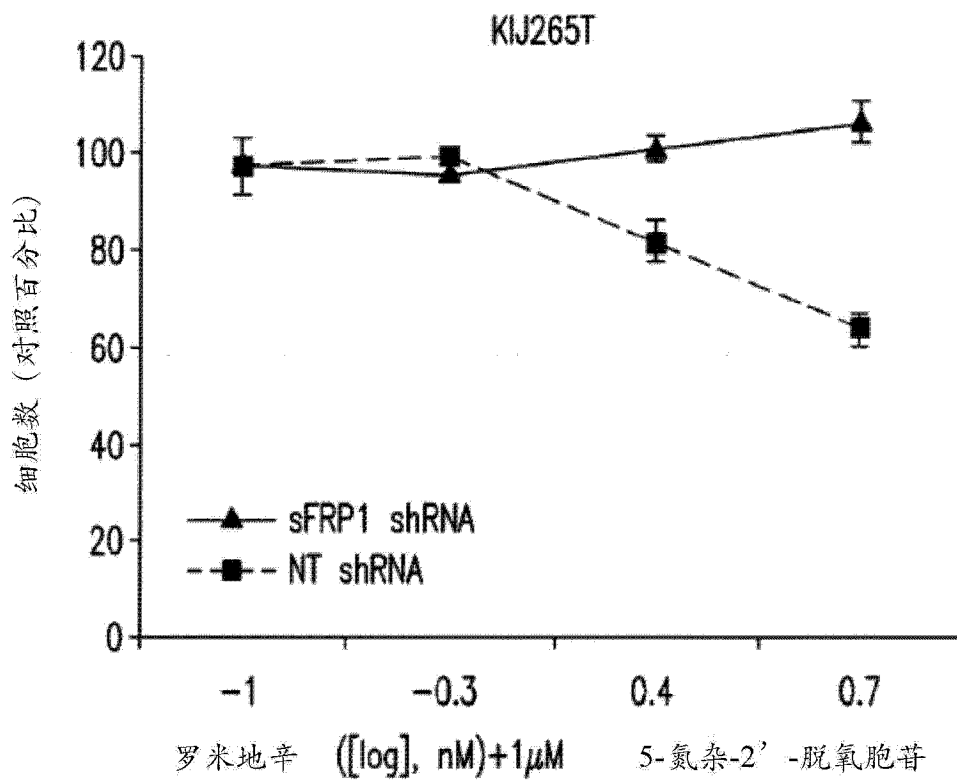


图 5B

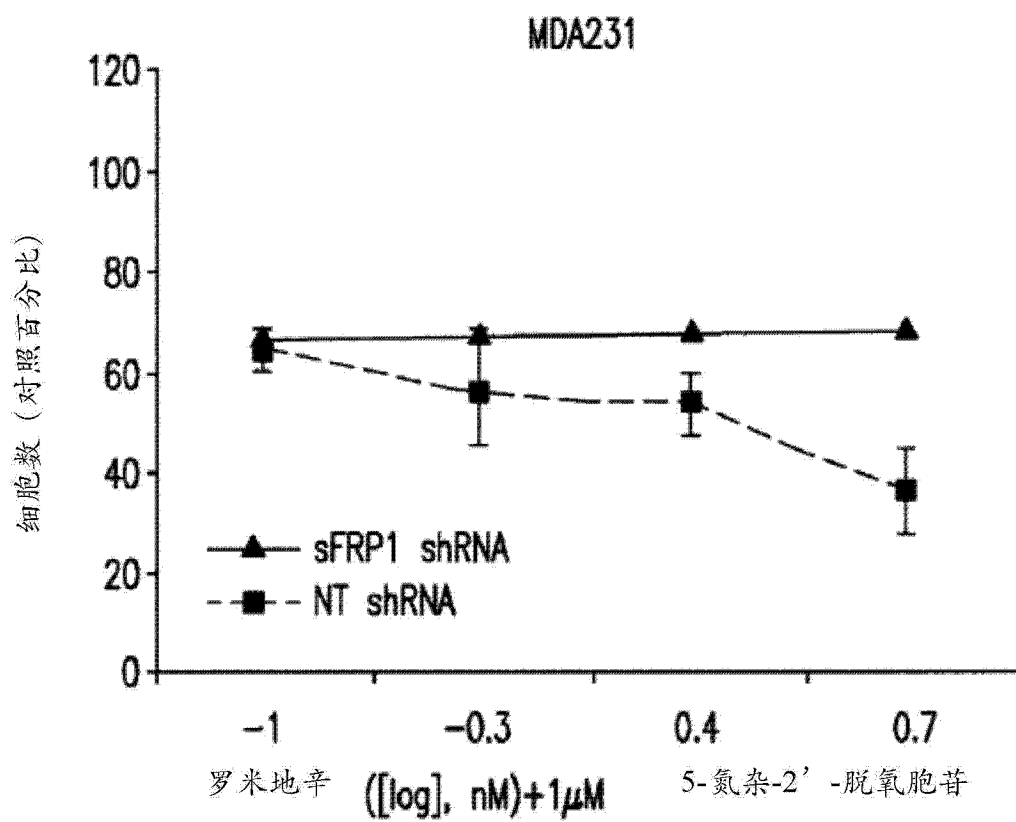


图 5C

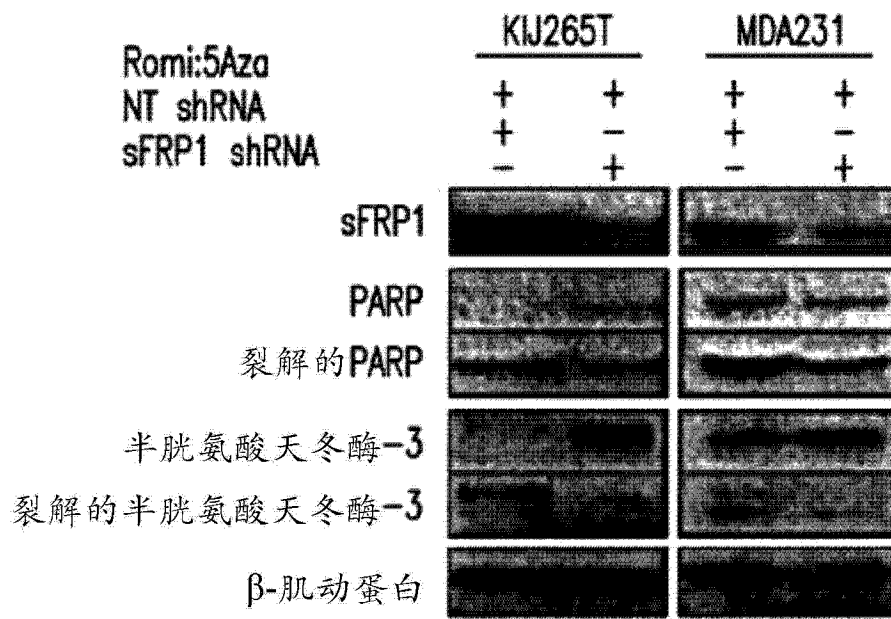


图 5D

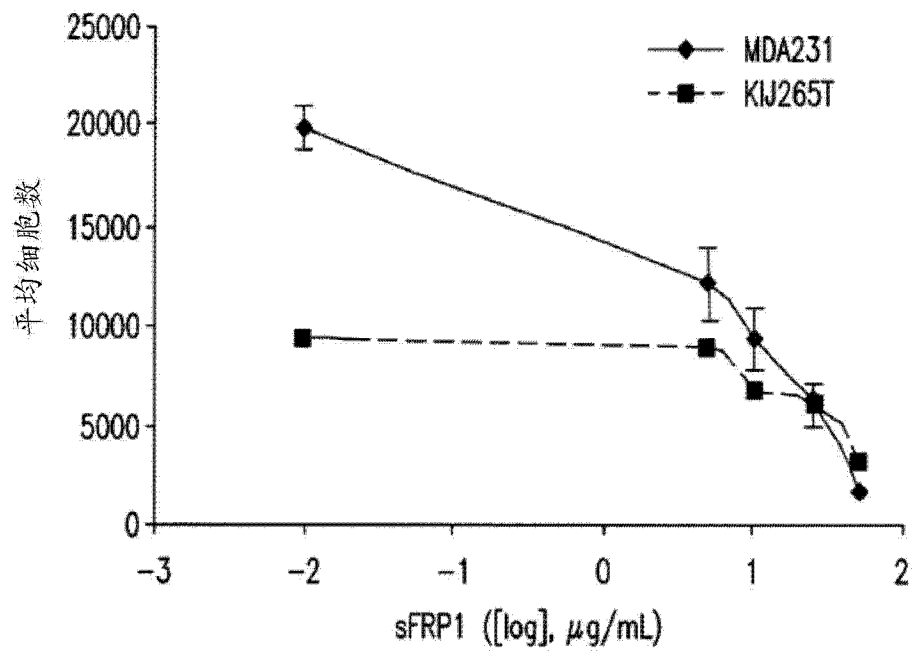


图 5E

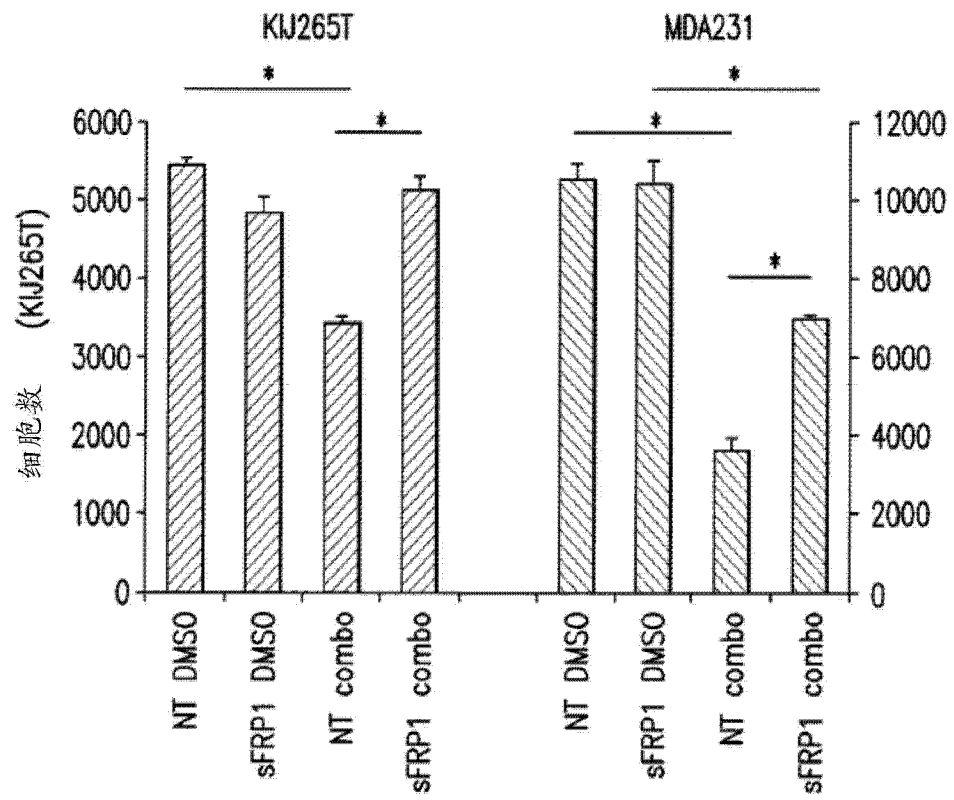


图 5F

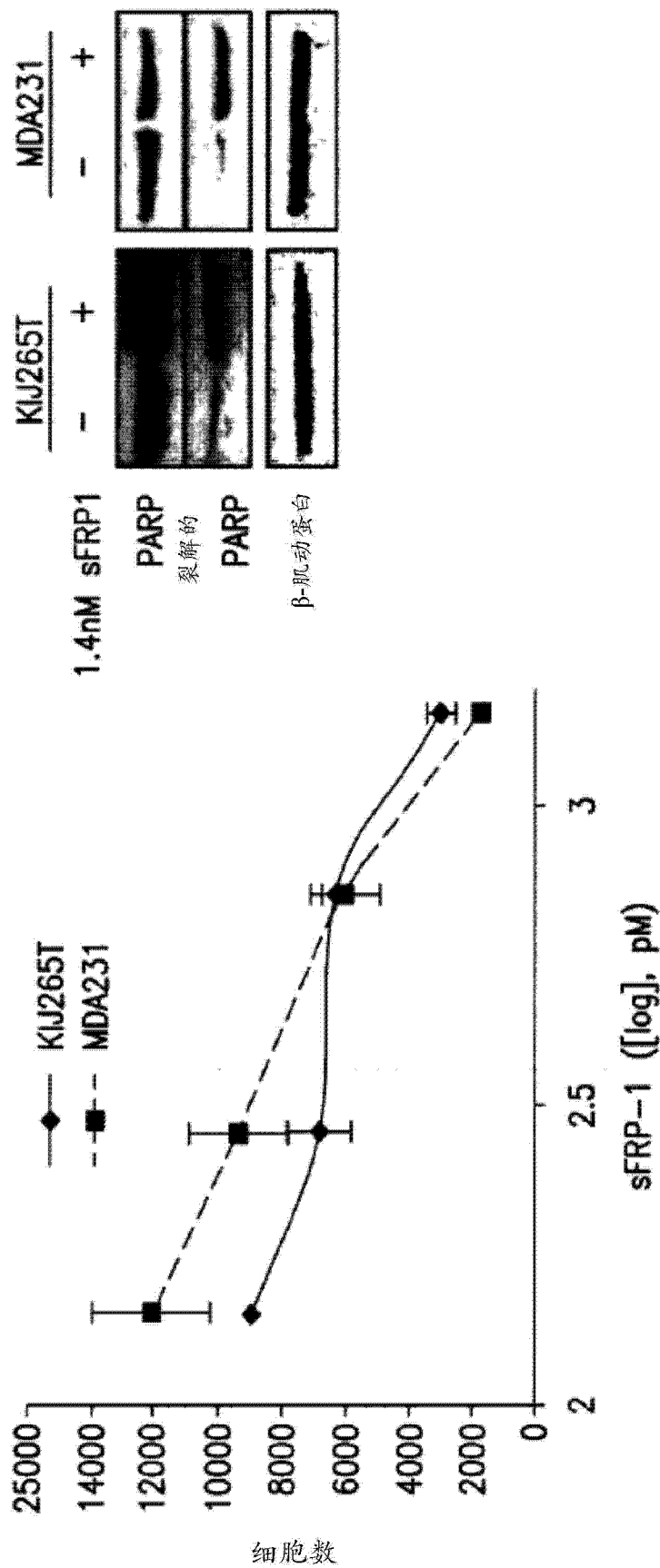


图 5G

患者 细胞系	D7S484	D13S158	D10S197	D14S70	mycL	D21S1252	D8S262	D17S250	D15S1002	D16S520	D2S2368	D6S441
Patient 265	104,109	124,128	173,177	103,108	176,181	153,155	121,126	155,159	109,121	155,157	94,108	170,184
KIJ265T p40	104,109	124,128	173,177	103,103	176,181	153,155	121,126	155,159	109,121	155,157	94,108	170,184

图 6A

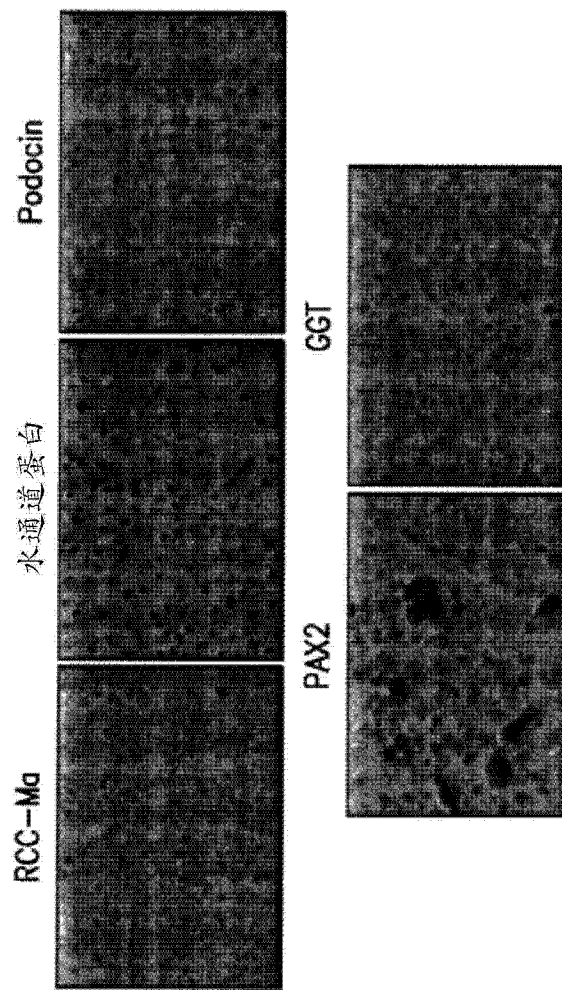


图 6B

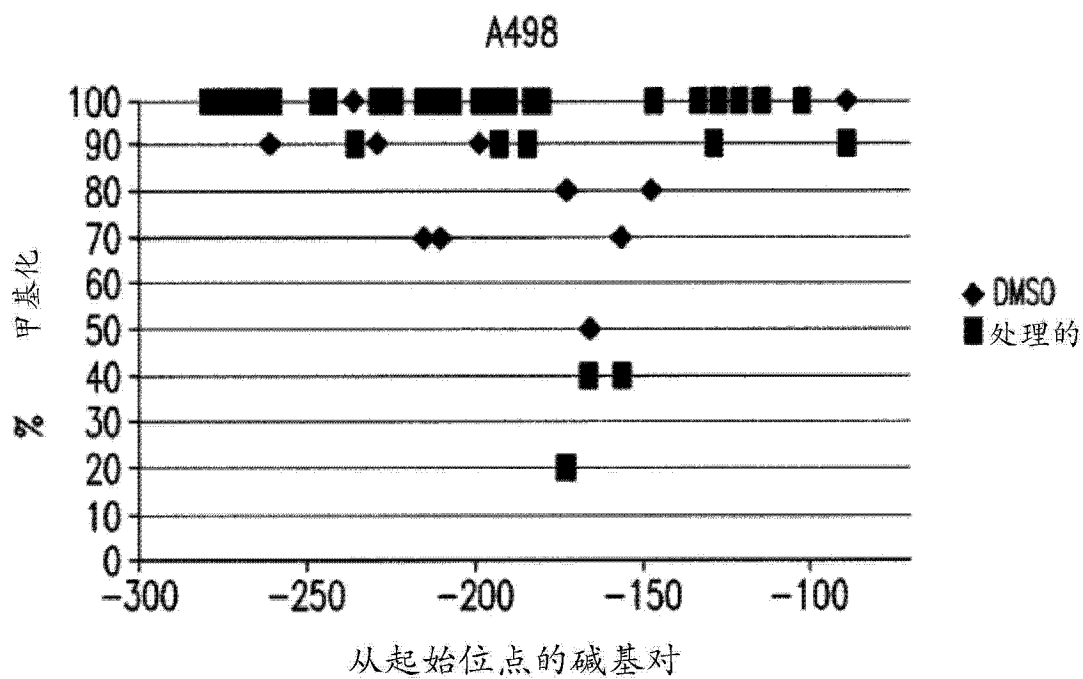


图 7A

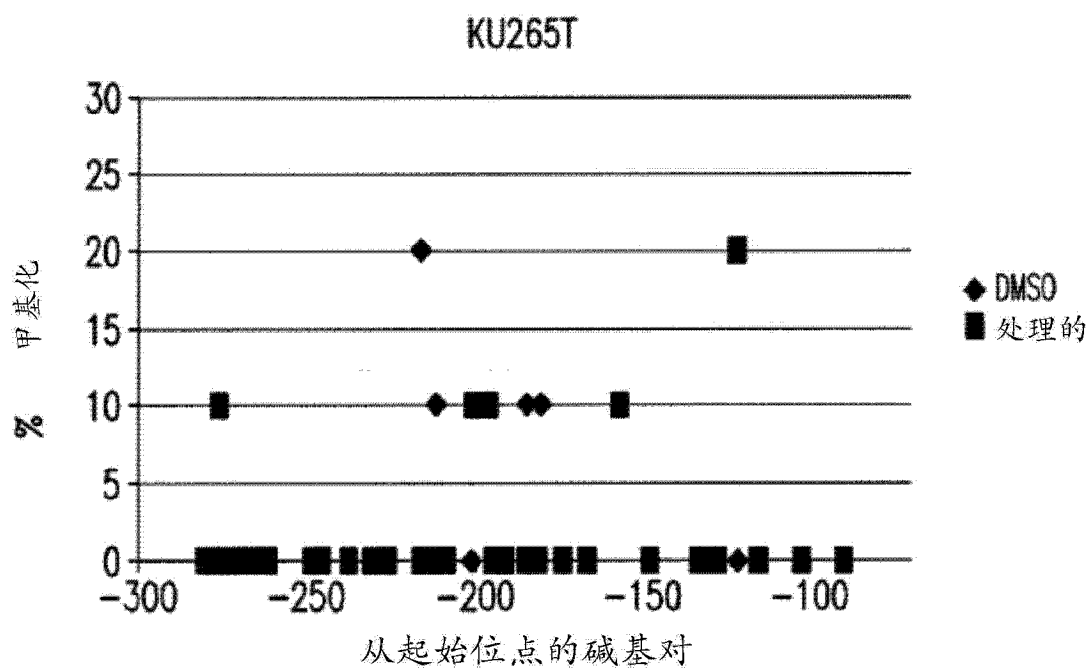


图 7B

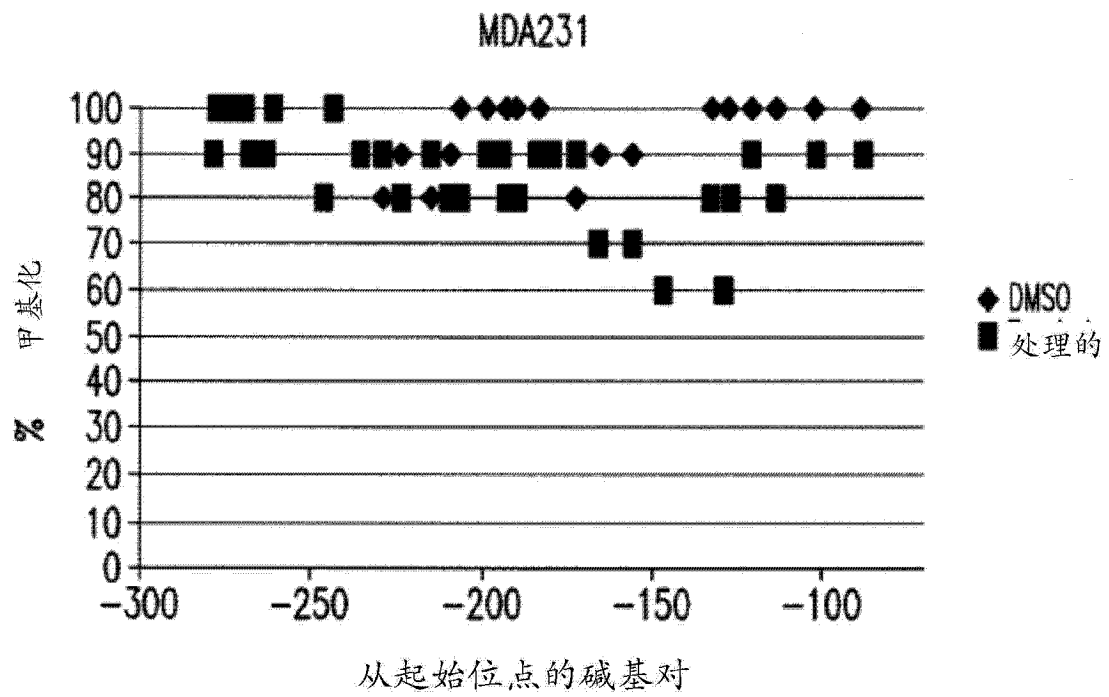


图 7C

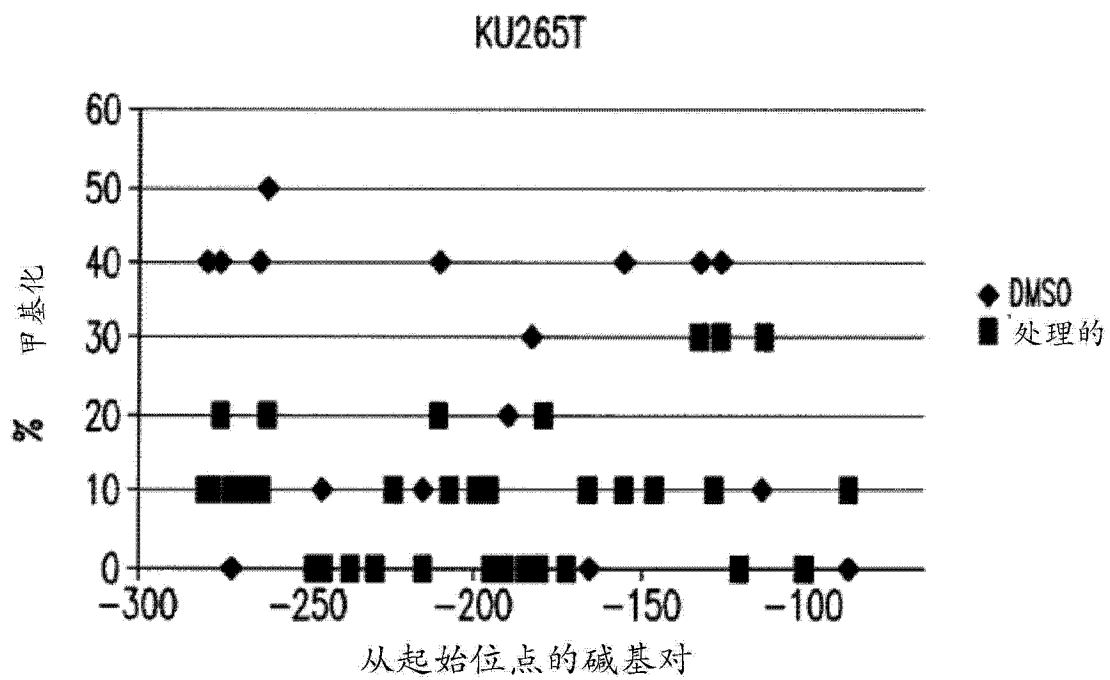


图 7D