



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109562176 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780037696.7

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

(22)申请日 2017.04.14

有限公司 11280

(30)优先权数据

代理人 郭广迅

62/323537 2016.04.15 US

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/506(2006.01)

2018.12.17

A61K 31/517(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/519(2006.01)

PCT/US2017/027719 2017.04.14

A61P 35/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/181075 EN 2017.10.19

(71)申请人 费利克斯疗法公司

权利要求书6页 说明书19页 附图26页

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 M·维连奇克 M·弗里德

A·库兹涅佐娃 Y·甘金

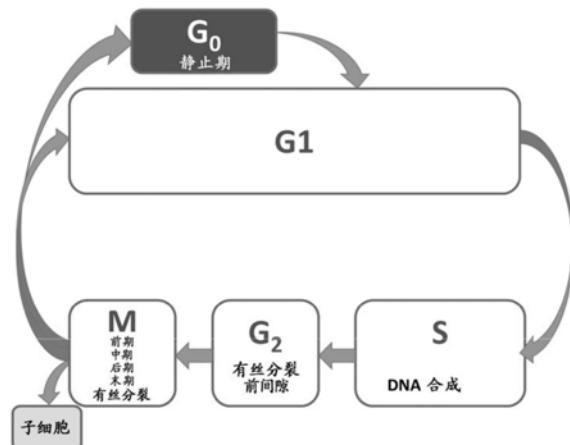
M·杜伊

(54)发明名称

使用静止细胞靶向和EGFR抑制剂的用于治疗肿瘤的组合

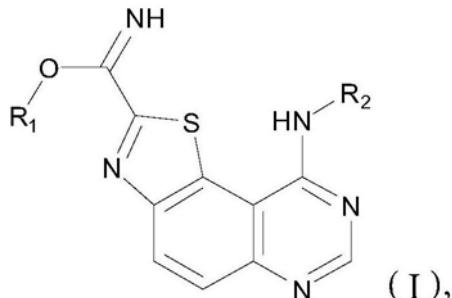
(57)摘要

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



1. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予DYRK1抑制剂和向受试者给予EGFR TKI,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

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

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

2. 权利要求1所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

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

4. 权利要求1所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性非小细胞肺癌。

5. 权利要求1所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性胰腺癌。

6. 权利要求1所述的方法,其中所述EGFR TKI选自布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼、泰西伐替尼、酪氨酸磷酸化抑制剂AG1478、凡德他尼和伐利替尼。

7. 权利要求1所述的方法,其中所述EGFR TKI是选自AZD3759和MTKi-327(JNJ-26483327)的EGFR TKI。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述EGFR TKI选自阿法替尼、卡奈替尼、CL-387785(EKI-785)、CNX-2006、达克替尼、那库替尼(ASP8273)、来那替尼、奥姆替尼(HM61713)、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、TAK285、诺司替尼和WZ4002。

9. 权利要求1所述的方法,其中所述EGFR TKI选自艾力替尼(ALS-1306;AST-1306)、AV-412(MP-412)、纳扎替尼(EGF816)和吡咯替尼。

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

11. 权利要求10所述的方法,其中所述EGFR TKI选自布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼、泰西伐替尼、酪氨酸磷酸化抑制剂AG1478、凡德他尼和伐利替尼。

12. 权利要求10所述的方法,其中所述EGFR TKI是选自AZD3759和MTKi-327(JNJ-26483327)的EGFR TKI。

13. 权利要求10所述的方法,其中所述EGFR TKI选自阿法替尼、卡奈替尼、CL-387785 (EKI-785)、CNX-2006、达克替尼、那库替尼(ASP8273)、来那替尼、奥姆替尼(HM61713)、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、TAK285、诺司替尼和WZ4002。

14. 权利要求10所述的方法,其中所述EGFR TKI选自艾力替尼(ALS-1306;AST-1306)、AV-412(MP-412)、纳扎替尼(EGF816)和吡咯替尼。

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

16. 权利要求10所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性非小细胞肺癌。

17. 权利要求10所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性胰腺癌。

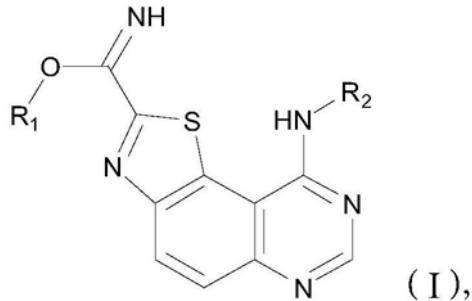
18. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予:

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

(b) EGFR TKI。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

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

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

20. 权利要求18所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

21. 权利要求18所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、小细胞肺癌、卵巢癌和前列腺癌。

22. 权利要求18所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性非小细胞肺癌。

23. 权利要求18所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性胰腺癌。

24. 权利要求18所述的方法,其中所述EGFR TKI是选自以下的可逆抑制剂:布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼、泰西伐替尼、酪氨酸磷酸化

抑制剂AG1478、凡德他尼和伐利替尼。

25. 权利要求18所述的方法,其中所述EGFR TKI是选自AZD3759和MTKi-327 (JNJ-26483327) 的EGFR TKI。

26. 权利要求18所述的方法,其中所述EGFR TKI是选自以下的不可逆抑制剂:阿法替尼、卡奈替尼、CL-387785 (EKI-785) 、CNX-2006、达克替尼、那库替尼 (ASP8273) 、来那替尼、奥姆替尼 (HM61713) 、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、TAK285、诺司替尼和WZ4002。

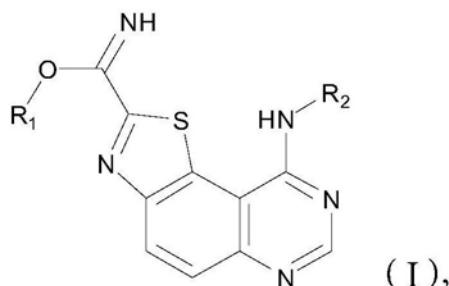
27. 权利要求18所述的方法,其中所述EGFR TKI选自艾力替尼 (ALS-1306; AST-1306) 、AV-412 (MP-412) 、纳扎替尼 (EGF816) 和吡咯替尼。

28. 权利要求18所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂选自 I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6 和 I-7。

29. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予DYRK1抑制剂和向受试者给予EGFR TKI,其中如在基于细胞的分析中确定的,当与单独使用EGFR TKI的相同治疗相比时,在组合治疗中EGFR TKI的EC₅₀值低至少20%。

30. 权利要求29所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

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

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

31. 权利要求29所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

32. 权利要求29所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、卵巢癌和前列腺癌。

33. 权利要求29所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性非小细胞肺癌。

34. 权利要求29所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性胰腺癌。

35. 权利要求29所述的方法,其中所述EGFR TKI选自布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼、泰西伐替尼、酪氨酸磷酸化抑制剂AG1478、凡德他尼和伐利替尼。

36. 权利要求29所述的方法,其中所述EGFR TKI是选自AZD3759和MTKi-327 (JNJ-26483327) 的EGFR TKI。

37. 权利要求29所述的方法,其中所述EGFR TKI选自阿法替尼、卡奈替尼、CL-387785 (EKI-785)、CNX-2006、达克替尼、那库替尼(ASP8273)、来那替尼、奥姆替尼(HM61713)、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、TAK285、诺司替尼和WZ4002。

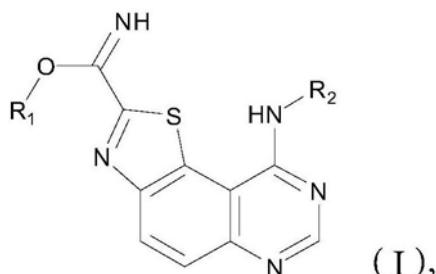
38. 权利要求29所述的方法,其中所述EGFR TKI选自艾力替尼(ALS-1306;AST-1306)、AV-412(MP-412)、纳扎替尼(EGF816)和吡咯替尼。

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

40. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

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

41. 权利要求40所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

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

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

42. 权利要求40所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

43. 权利要求40所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、卵巢癌和前列腺癌。

44. 权利要求40所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性非小细胞肺癌。

45. 权利要求40所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性胰腺癌。

46. 权利要求40所述的方法,其中所述EGFR TKI选自布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼、泰西伐替尼、酪氨酸磷酸化抑制剂AG1478、凡德他尼和伐利替尼。

47. 权利要求40所述的方法,其中所述EGFR TKI选自AZD3759和MTKi-327(JNJ-26483327)。

48. 权利要求40所述的方法,其中所述EGFR TKI选自阿法替尼、卡奈替尼、CL-387785 (EKI-785)、CNX-2006、达克替尼、那库替尼(ASP8273)、来那替尼、奥姆替尼(HM61713)、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、TAK285、诺司替尼和WZ4002。

49. 权利要求40所述的方法,其中所述EGFR TKI选自艾力替尼(ALS-1306;AST-1306)、

AV-412 (MP-412)、纳扎替尼 (EGF816) 和吡咯替尼。

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

51. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予:

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

(b) EGFR TKI,如通过FACS分析确定的,使用所述EGFR TKI治疗细胞群(体外或体内)使静止细胞(处于细胞周期的G₀期的细胞)的分数相对于未处理的相同细胞群增加至少20%。

52. 权利要求51所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中,

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

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

53. 权利要求51所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

54. 权利要求51所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、小细胞肺癌、卵巢癌和前列腺癌。

55. 权利要求51所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性非小细胞肺癌。

56. 权利要求51所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性胰腺癌。

57. 权利要求51所述的方法,其中所述EGFR TKI选自布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼、泰西伐替尼、酪氨酸磷酸化抑制剂AG1478、凡德他尼和伐利替尼。

58. 权利要求51所述的方法,其中所述EGFR TKI选自AZD3759并且是MTKi-327 (JNJ-26483327)。

59. 权利要求51所述的方法,其中所述EGFR TKI选自阿法替尼、卡奈替尼、CL-387785 (EKI-785)、CNX-2006、达克替尼、那库替尼 (ASP8273)、来那替尼、奥姆替尼 (HM61713)、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、TAK285、诺司替尼和WZ4002。

60. 权利要求51所述的方法,其中所述EGFR TKI选自艾力替尼 (ALS-1306; AST-1306)、

AV-412 (MP-412)、纳扎替尼 (EGF816) 和吡咯替尼。

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

使用静止细胞靶向和EGFR抑制剂的用于治疗肿瘤的组合

[0001] 背景

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

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

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

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

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

[0007] 然而,尽管越来越认识到癌细胞静止的重要性,但这个问题在临幊上仍未得到解决。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了用于治疗肿瘤的组合物和方法,特别是通过使用治疗剂靶向静止癌细胞与其他针对特定肿瘤病症有效的治疗,特别是使用EGFR抑制剂的抗癌治疗的组合用于治疗肿瘤的组合物和方法。

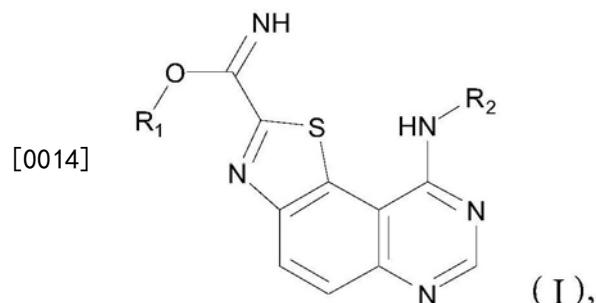
[0010] 通常,本发明的特征在于一种治疗肿瘤的方法,其包括:向有其需要的受试者给予

治疗有效量的(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂;和(b)第二药剂,其为EGFR抑制剂,其中这两种药剂可以顺序或同时给予。在一些实施方案中,肿瘤是癌症或体外或体内的癌细胞群。在一些实施方案中,接受治疗的受试者被诊断患有癌症(例如,转移性的或转移前的)。在一些实施方案中,受试者先前已经用针对癌症的一线疗法治疗。在一些实施方案中,顺序或同时使用两种或更多种EGFR抑制剂治疗受试者,或已经顺序或同时使用两种或更多种EGFR抑制剂治疗受试者。

[0011] 在一些实施方案中,组合治疗可以导致改善的结果,如存活延长、严重性降低、复发延迟或消除或主要治疗(即EGFR抑制剂)的副作用减少。在一些实施方案中,与单独使用药剂的治疗相比,当作为组合的部分给予时,第二药剂以更低的剂量和/或更短的持续时间给予。例如,在一些实施方案中,如例如在基于细胞的分析中确定的,当与使用作为单一药剂的EGFR抑制剂的相同治疗相比时,在组合治疗中EGFR抑制剂的EC₅₀值低至少20%。在一些实施方案中,如例如在FACS分析中通过亚G₀细胞的分数所确定的,与单独的任一种药剂相比,组合治疗使处理的细胞群中凋亡细胞的分数增加至少2倍。

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

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

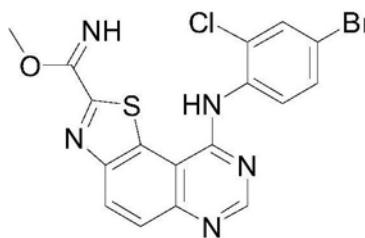


[0015] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中,

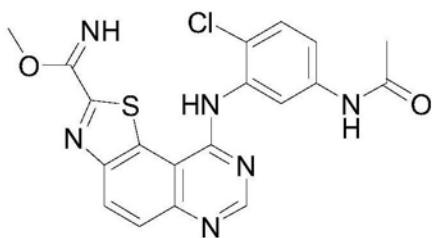
[0016] R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;

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

[0018] 在一个实施方案中,式I的化合物选自:

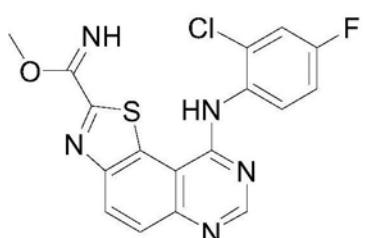


(I-1)、

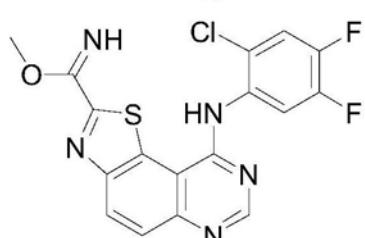


(I-2)、

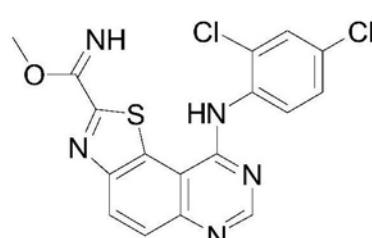
[0019]



(I-3)、

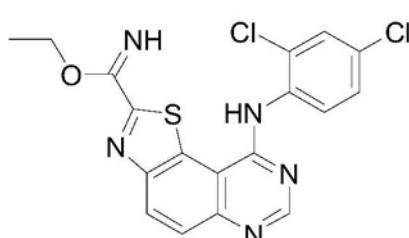


(I-4)、

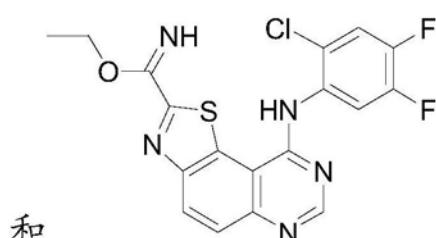


(I-5)、

[0020]



(I-6)



和 (I-7)。

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

[0022] 在一个实施方案中,本发明的方法包括:向有其需要的受试者给予治疗有效量的(a)式I的治疗剂;(b)EGFR抑制剂;和(c)放射治疗;每种治疗顺序或同时给予。例如,在一些实施方案中,首先用放射疗法治疗受试者,然后单独或与EGFR抑制剂组合向受试者给予式I的治疗剂。在一些实施方案中,向受试者共同给予(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂,(b)EGFR抑制剂,和任选的(c)放射治疗。在一些实施方案中,EGFR抑制剂是抑制野生型或突变的或截短的EGFR酪氨酸激酶的活性(体外或体内)的化合物,例如,在生化分析中IC₅₀为100nM或更低。在一些实施方案中,EGFR抑制剂是有效治疗或预防肿瘤的EGFR抑制剂,包括但不限于批准用于治疗癌症的所有这样的化合物,和另外在治疗哺乳动物受试者(例如,小鼠、大鼠、狗、猴、人类)的癌症中显示功效的化合物,和在体外针对肿瘤细胞显示功效的化

合物。许多这样的化合物是已知的。

[0023] EGFR抑制剂可以是例如,小分子或抗-EGFR抗体。

[0024] 在一个实施方案中,EGFR抑制剂是可逆EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR TKI)。在另一个实施方案中,可逆EGFR TKI是例如,布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼(sapitinib)、凡德他尼、伐利替尼、泰西伐替尼和酪氨酸磷酸化抑制剂AG 1478。在又一个实施方案中,可逆EGFR TKI是AZD3759或MTK1-327(JNJ-26483327)。在一些实施方案中,EGFR TKI的可逆抑制剂不是厄洛替尼或拉帕替尼。

[0025] 在另一个实施方案中,EGFR抑制剂是不可逆EGFR TKI。在另一个实施方案中,不可逆EGFR抑制剂是例如,阿法替尼、奥姆替尼(HM61713)、卡奈替尼、CL-387785(EKI-785)、CNX-2006、达克替尼、那库替尼(naquotinib)(ASP8273)、来那替尼、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、诺司替尼、TAK285和WZ4002。在又一个实施方案中,不可逆EGFR TKI是例如,艾力替尼(ALS-1306;AST-1306)、AV-412(MP-412)、纳扎替尼(EGF816)和吡咯替尼。

[0026] 在又一个实施方案中,EGFR抑制剂是针对EGFR的抗体,例如,西妥昔单抗(Erbitux[®])和帕尼单抗(Vectibix[®])。

[0027] 在另一个实施方案中,被治疗的肿瘤为癌症,例如,胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌或子宫癌。在另一个实施方案中,癌症为非小细胞肺癌。在另一个实施方案中,癌症是原发性或转移性的。在又一个实施方案中,癌症是由实施例中所示的细胞系类型代表的类型。在一些实施方案中,患有癌症的受试者具有EGFR基因突变,其与癌症风险增加和/或对某些EGFR TKI的抗性相关。

[0028] 本文描述的实施方案是说明性的,并不意味着对另外的组合组分、给予途径和顺序、患者类型(先前未治疗或先前治疗的、存在或不存在合并病症、年龄等)、或患者的疾病阶段、EGFR抑制剂的类型等的限制。

[0029] 附图简述

[0030] 图1显示真核细胞的有丝分裂周期的示意图。

[0031] 图2显示真核癌细胞的有丝分裂周期的示意图,对其注释以表示所认为的可用抗癌治疗剂作用的细胞周期的阶段。

[0032] 图3显示厄洛替尼和化合物I-5(0、2.5和5μM)的组合对HCC827细胞的生长的影响。

[0033] 图4显示厄洛替尼和化合物I-5(0、2.5和5μM)的组合对PC9细胞的生长的影响。

[0034] 图5显示厄洛替尼和化合物I-7(0、3和6μM)的组合对A549细胞的生长的影响。

[0035] 图6显示厄洛替尼和化合物I-5(0、2.5和5μM)的组合对PANC1细胞的生长的影响。

[0036] 图7显示厄洛替尼和化合物I-5(0、2.5和5μM)的组合对MiaPaCa-2细胞的生长的影响。

[0037] 图8显示阿法替尼和化合物I-7(0、2和4μM)的组合对H1975细胞的生长的影响。

[0038] 图9显示阿法替尼和化合物I-7(0、3和6μM)的组合对HCC827细胞的生长的影响。

[0039] 图10显示阿法替尼和化合物I-7(0、3和6μM)的组合对PC9细胞的生长的影响。

[0040] 图11显示阿法替尼和化合物I-7(0、3和6μM)的组合对A549细胞的生长的影响。

[0041] 图12显示阿法替尼和化合物I-7(0、3和6μM)的组合对PANC1细胞的生长的影响。

[0042] 图13显示奥希替尼和化合物I-7(0、2和4μM)的组合对H1975细胞的生长的影响。

[0043] 图14显示奥希替尼和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对PANC1细胞的生长的影响。

[0044] 图15显示在以下中孵育24小时的H1975细胞的细胞周期分布的FACS分析:图A: FBS-培养基;图B:FBS+培养基;图C:具有5 μ M化合物I-7的FBS+培养基;图D:具有18nM奥希替尼的FBS+培养基;图E:具有5 μ M化合物I-7和18nM奥希替尼的FBS+培养基。

[0045] 图16显示在以下中孵育的H1975细胞的细胞周期分布的FACS分析:图A:在FBS-培养基中48小时;图B:在FBS-培养基中24小时,接着在常规FBS+培养基中释放24小时;图C:在FBS-培养基中24小时,然后在具有5 μ M化合物I-7的FBS-培养基中释放24小时;图D:在FBS-培养基中24小时,然后在具有18nM奥希替尼的FBS-培养基中释放24小时;图E:在FBS-培养基中24小时,然后在具有18nM奥希替尼和5 μ M化合物I-7的FBS-培养基中释放24小时。

[0046] 图17显示诺司替尼和化合物I-5 (0、2.5和5 μ M) 的组合对H1975细胞的生长的影响。

[0047] 图18显示诺司替尼和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对PANC1细胞的生长的影响。

[0048] 图19显示在以下中孵育的H1975细胞的细胞周期分布的FACS分析:图A:在FBS-培养基中24小时,然后在FBS+培养基中释放24小时;图B:在FBS-培养基中24小时,然后在具有5 μ M化合物I-7的FBS+培养基中释放24小时;图C:在FBS-培养基中24小时,然后在具有80nM诺司替尼的FBS+培养基中释放24小时;图D:在FBS-培养基中24小时,然后在具有80nM诺司替尼和5 μ M化合物I-7的FBS+培养基中释放24小时。

[0049] 图20显示Western印迹分析,其显示在使用诺司替尼、奥希替尼、达克替尼和阿法替尼处理24小时之后,H1975细胞中DYRK1B、磷酸化Y1068-EGFR、总EGFR和 β -肌动蛋白的表达水平。

[0050] 图21显示达克替尼和化合物I-5 (0、2.5和5 μ M) 的组合对H1975细胞的生长的影响。

[0051] 图22显示达克替尼和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对PANC1细胞的生长的影响。

[0052] 图23显示通过SW620细胞的细胞周期分布的DNA含量进行的FACS分析。细胞在以下中孵育:图A:在FBS-培养基中24小时;图B:在具有2.5 μ M AZ191的FBS-培养基中24小时;图C:在具有5 μ M AZ191的FBS-培养基中24小时;图D:在具有10 μ M AZ191的FBS-培养基中24小时。

[0053] 图24显示通过SW620细胞的细胞周期分布的DNA含量进行的FACS分析。细胞在以下中孵育:图A:在具有DMSO对照的FBS-培养基中24小时;图B:在具有1.25 μ M化合物I-7的FBS-培养基中24小时;图C:在具有2.5 μ M化合物I-7的FBS-培养基中24小时;图D:在具有5 μ M化合物I-7的FBS-培养基中24小时。

[0054] 图25显示阿法替尼和化合物I-7 (0和2.5 μ M) 的组合对H1975细胞的3D细胞培养物(球状体)的影响。

[0055] 图26显示奥希替尼和化合物I-7 (0和2.5 μ M) 的组合对H1975细胞的3D细胞培养物(球状体)的影响。用不同浓度的奥希替尼在以下中处理球状体:图A:在FBS+培养基中;图B:在FBS-培养基中。

[0056] 发明详述

[0057] 术语表

[0058] 在本发明中,除非另有说明,“烷基”是包含1至8个碳原子(C₁₋₈烷基),特别是1至6个,或1至4个碳原子的饱和的直链或支链烃基。所包括的具有1至6个碳原子的烷基的实例为甲基、乙基、丙基(例如,正丙基、异丙基)、丁基(例如,叔丁基、仲丁基、正丁基)、戊基(例

如,新戊基)、己基(例如,正己基)、2-甲基丁基、2-甲基戊基以及其他异构形式。烷基可以是未取代的或被至少一个选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。

[0059] 在本发明中,“烯基”是包含至少一个碳-碳双键,包含2-8个碳原子的直链或支链烃基(除非另有说明)。包含2至6个碳原子的烯基的实例为乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基及其异构形式。烯基可以是未取代的或被至少一个选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。

[0060] 在本发明中,“炔基”是包含至少一个碳-碳三键,包含2至8个碳原子的直链或支链烃基。炔基可以被至少一个选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。

[0061] 在本发明中,“芳基”是包含5至14个碳原子的芳烃环。最优选的芳基是单环或双环的,并且包含6至14个碳原子,如苯基、 α -萘基、3-萘基、蒽基,优选苯基。“芳基”还包括双环或三环,其包含稠合到至少另一个芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基的芳环,如苯并二氧杂环戊烷、苯并二氧六环、二氢苯并呋喃或苯并咪唑。芳基可以是未取代的或被至少一个(例如,1、2或3个)选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外,芳基可以被相邻的取代基取代,所述取代基可以与它们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环,其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0062] 在本发明中,“卤素原子”或“卤素”是Cl、Br、F或I原子。

[0063] 在本发明中,“烷氧基”是具有式 $O-$ 烷基的通过氧原子与分子的其余部分连接的烷基。

[0064] 在本发明中,“氨基”是 NH_2 、 $NH-$ 烷基或 $N(\text{烷基})_2$ 。

[0065] 在本发明中,“杂芳基”是其环被至少一个杂原子,例如N、O或S原子中断的芳基,如噻吩或吡啶。杂芳基可以是未取代的或被至少一个(例如,1、2或3个)选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外,杂芳基可以被相邻的取代基取代,所述取代基可以与它们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环,其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0066] 在本发明中,“环烷基”表示形成一个具有优选3至14个碳原子,更优选3至8个碳原子的环的饱和烷基,如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。环烷基可以是未取代的或被至少一个(例如,1、2或3个)选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外,环烷基可以被相邻的取代基取代,所述相邻的取代基可以与它们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环,其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0067] 在本发明中,“杂环烷基”是包含至少一个杂原子的环烷基,如吡咯烷、四氢噻吩、四氢呋喃、哌啶、吡喃、二恶英、吗啉或哌嗪。杂环烷基可以特别地包含4至14个碳原子,如吗啉基、哌啶基、吡咯烷基、四氢吡喃基、二硫杂环戊基。杂环烷基可以是未取代的或被至少一个选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外,杂环烷基可以被相邻的取代基取代,所述相邻的取代基可以与它

们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环,其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0068] 如本文所使用的,“肿瘤”是指由瘤形成导致的异常组织块。“瘤形成”是指细胞异常增殖的过程。在本发明的一些实施方案中,肿瘤是实体癌,或者为造血系统癌。瘤形成可以是良性的、癌变前的或恶性的。术语肿瘤包括哺乳动物癌症,在一些实施方案中,人癌症和癌(carcinoma),肉瘤,任何组织的母细胞瘤(例如腺癌、鳞状细胞癌、骨肉瘤等),生殖细胞肿瘤,神经胶质细胞瘤,淋巴瘤,白血病,包括实体癌和淋巴癌,肾癌,乳腺癌,肺癌,头颈癌,膀胱癌,结肠癌,卵巢癌,前列腺癌,直肠癌,胰腺癌,胃癌,脑癌,头颈癌,皮肤癌,子宫癌,宫颈癌,睾丸癌,食道癌,甲状腺癌,肝癌,胆管癌,和骨和软骨组织的癌症,包括非霍奇金淋巴瘤(例如,伯基特淋巴瘤、小细胞淋巴瘤和大细胞淋巴瘤)和霍奇金淋巴瘤,白血病,多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征。

[0069] 如本文所使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指对抗医学病症(例如,癌症)至医学病症根据临床可接受的标准改善的程度。癌症的改善可以包括:1)肿瘤生长速度降低(肿瘤生长抑制),2)肿瘤缩小(消退),3)部分或全部缓解,4)转移减少,5)无进展生存延长,和6)复发延迟或消除。在本发明的某些实施方案中,治疗包括部分或基本上实现以下结果中的一种或多种:部分或完全减少癌症质量、体积或恶性细胞计数;减轻或改善与实体癌或造血系统癌相关的临床症状或指标;延迟、抑制或防止实体癌或造血系统癌的进展;或部分或完全延迟、抑制或防止实体癌或造血系统癌的发生或发展。“治疗”还可以意味着与未经治疗的预期生存相比或与护理治疗的标准相比,生存延长。

[0070] 治疗包括预防性(prophylactic)或预防(preventative)治疗。“预防性治疗”是指在出现或重新出现目标疾病的临床症状之前,用以防止、抑制或减少其发生、严重性或进展的治疗。

[0071] 如本文所使用的,“有效量”是指治疗剂或治疗剂组合的量,其在治疗上或预防上足以实现对目标疾病的期望改善。有效量的实例通常为每单次给予剂量约0.0001mg/kg体重至约500mg/kg体重,这些剂量一次或在一段时间内给予。示例性范围为每剂量约0.0001mg/kg体重至约5mg/kg。在其他实例中,范围可以为每单次给予剂量约0.0001mg/kg至约5mg/kg。在再其他实例中,有效量的范围为每单次给予剂量约0.01mg/kg体重至50mg/kg体重,或每单次给予剂量0.01mg/kg体重至0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg或40mg/kg体重。对于具有已知临床用途的药剂,有效剂量的实例是管理机构批准用于治疗适应症的量。

[0072] 如本文所使用的,术语“受试者”是指哺乳动物,例如人,但也可以指需要兽医学治疗的动物,例如陪伴动物(例如,狗、猫等),农场动物(例如,牛、绵羊、猪、马等)和实验室动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠等)。

[0073] 如本文所用的,术语“治疗剂”是指用于或考虑用于或研究用于癌症治疗的任何化学分子,包括细胞毒性剂、细胞抑制剂或靶向剂,无论是小分子、肽、抗体还是寡核苷酸,也不论作用机制如何。如本文所使用的,术语“治疗的”或“治疗剂”是指活性药物成分(API)或其药学上可接受的盐或水合物(溶剂化物),或包含治疗剂的药物产品,无论如何配制,以及无论API是无定形的还是结晶的,也不论是何种多晶型。制剂是指活性药物成分(API,药物物质)或成分(API)与赋形剂和/或递送载体组合以制备可给予的剂型(药物产品)的组合。

[0074] 对生物药物,例如西妥昔单抗的提及是指任何含有该生物药物或其生物仿制药的药物产品,所述生物仿制药由本领域技术人员和管理机构制备、表征和定义为生物仿制药。

[0075] 就标准药学实践而言(如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版,Lippincott Williams&Wilkins中所述的),本发明的治疗剂通常与药学上可接受的载体一起给予。因此,本发明的另一个目的涉及本文定义的药物组合物和药学上可接受的载体。

[0076] 如本文所使用的,术语“抑制剂”是指降低酶活性的任何组合物。抑制剂的实例是化学分子。抑制剂效力的量度是其“50%抑制浓度”(IC_{50})。 IC_{50} 浓度或 IC_{50} 值是抑制剂抑制50%的酶活性时的抑制剂浓度。用于确定例如激酶抑制剂的 IC_{50} 值的方法是本领域普通技术人员已知的,并且包括直接和间接功能分析,如HotSpotTM激酶分析技术(Reaction Biology Corporation, Malvern, PA, www.reactionbiology.com)或竞争结合分析,如KINOMEscan[®](DiscoverX Corporation, Freemont, CA, www.discoverx.com)。

[0077] 治疗剂针对细胞系的效力的量度是其“50%有效浓度”(EC_{50})。 EC_{50} 值是产生半数最大反应,例如50%的细胞生长抑制或50%的细胞活力降低的药物浓度。用于确定例如激酶抑制剂的 EC_{50} 值的方法是本领域普通技术人员已知的。

[0078] 如本文所使用的,术语“静止”或“静止状态”是指细胞周期的G₀状态,如本领域从业人员所理解的。

[0079] 如本文所使用的,术语“针对静止癌细胞有效的治疗剂”是指降低细胞群中静止癌细胞的分数,或在否则会导致细胞群中静止癌细胞的分数增加的条件下完全或基本上防止这样的增加的分子。

[0080] “静止的肿瘤细胞”,或称为“静止癌细胞”,是指处于细胞周期的静止状态或G₀状态的癌细胞。如本文所使用的,“静止的肿瘤细胞的分数”或“静止的癌细胞的分数”是指处于细胞周期的G₀状态的癌细胞群的部分。确定静止的肿瘤细胞的分数包括通过在细胞周期的阶段内细胞群的组成细胞的分布来表征细胞群。将处于G₀状态的细胞部分(即静止的肿瘤细胞)相对于总细胞群定量。该分数可以表示为总细胞群的百分比(即(静止细胞数除以细胞群中总细胞数)乘以100)。通过在细胞周期阶段内细胞群的组成细胞的分布来表征细胞群可以通过本领域普通技术人员已知的技术实现,并且可以包括使用流式细胞术方法,例如荧光激活细胞分选术(FACS),通过细胞周期内的DNA和/或RNA含量分布进行的分析。

[0081] 如本文所使用的,术语“EGFR抑制剂”和“EGFR酪氨酸激酶抑制剂”和“EGFR TK抑制剂”是等同的并且可以互换使用。示例性EGFR抑制剂包括可逆和不可逆小分子抑制剂。例如,可逆EGFR抑制剂包括布加替尼、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、MTK1-327(JNJ-26483327)、沙普替尼、凡德他尼和伐利替尼,并且不可逆EGFR抑制剂包括阿法替尼、卡奈替尼、达克替尼、来那替尼、奥希替尼、培利替尼、TAK285、诺司替尼、WZ4002。

[0082] 详述

[0083] 本发明提供了用于治疗肿瘤的组合物和方法,特别是通过使用治疗剂靶向静止癌细胞与其他针对特定肿瘤病症有效的治疗,特别是使用EGFR抑制剂的抗癌治疗的组合用于治疗肿瘤的组合物和方法。

[0084] 通常,本发明的特征在于治疗肿瘤的方法,其包括:向有其需要的受试者给予治疗有效量的(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂;(b)第二药剂,其为EGFR抑制剂,其中所述两种

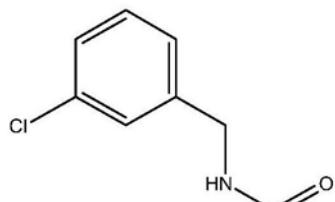
药剂可以顺序或同时给予。在一些实施方案中，肿瘤是癌症或体外或体内的癌细胞群。在一些实施方案中，接受治疗的受试者被诊断患有癌症(例如，转移性或转移前的)。在一些实施方案中，受试者先前已经用针对癌症的一线疗法治疗。在一些实施方案中，受试者先前已经用二线和/或其他疗法治疗。在一些实施方案中，受试者使用放射疗法治疗或已经使用放射疗法治疗。在一些实施方案中，受试者使用手术治疗，例如，切除或摧毁肿瘤。在其他实施方案中，受试者的肿瘤已经复发。在一些实施方案中，受试者顺序或同时使用两种或更多种EGFR抑制剂治疗，或已经顺序或同时使用两种或更多种EGFR抑制剂治疗。

[0085] 在一些实施方案中，组合治疗可以导致改善的结果，如存活延长、严重性降低、复发延迟或消除或主要治疗(即EGFR抑制剂)的副作用减少。在一些实施方案中，与单独使用药剂的治疗相比，当作为组合的部分给予时，第二药剂以更低的剂量和/或更短的持续时间给予。例如，在一些实施方案中，如例如在基于细胞的分析中确定的，当与使用作为单一药剂的EGFR抑制剂的相同治疗相比时，在组合治疗中EGFR抑制剂的EC₅₀值低至少20%、25%、30%、40%、50%。在一些实施方案中，如例如在FACS分析中通过亚G₀期细胞的分数所确定的，与单独的任一种药剂相比，组合治疗使处理的细胞群中凋亡细胞的分数增加至少2倍、3倍、4倍、5倍。在一些实施方案中，如例如在基于细胞的分析中确定的，当与使用作为单一药剂的EGFR抑制剂的相同治疗相比时，在组合治疗中的静止癌细胞的分数降低至少20%、25%、30%、40%、50%或更多。

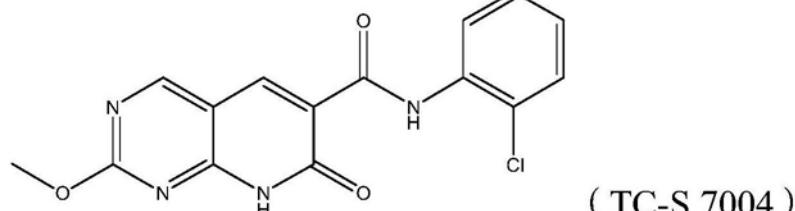
[0086] 在一个实施方案中，针对静止癌细胞有效的治疗剂是DYRK1抑制剂。在一些实施方案中，DYRK1抑制剂是抑制DYRK1激酶DYRK1A或DYRK1B的活性(体外或体内)的化合物，例如，在生化分析中IC₅₀值为<100nM、<90nM、<80nM、<70nM、<60nM、<50nM、<40nM、<30nM、<20nM、<10nM、<5nM或更低。在一些实施方案中，DYRK1抑制剂使在不存在这样的抑制剂的情况下另外会发现的细胞群或肿瘤中的静止癌细胞(体外或体内)的分数降低例如至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%或更多。

[0087] 在一些实施方案中，DYRK1抑制剂抑制DYRK1A和DYRK1B二者。在一些实施方案中，DYRK1抑制剂对DYRK1A具有选择性，其中DYRK1B IC₅₀与DYRK1A IC₅₀的比值为1000、100、50、25、10比1。在一些实施方案中，DYRK1抑制剂对DYRK1B具有选择性，其中DYRK1A IC₅₀与DYRK1B IC₅₀的比值为1000、100、50、25、10比1。在一些实施方案中，如通过IC₅₀值的比值所确定的，DYRK1抑制剂对DYRK1的选择性与DYRK2和/或DYRK3和/或DYRK4相比为至少4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍。在一些实施方案中，如通过IC₅₀值的比值所确定的，DYRK1抑制剂对DYRK1的选择性与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)例如CDK2相比为至少4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍。

[0088] 已知的DYRK1抑制剂的实例包括AZ191、DYRK1、去氢骆驼蓬碱(harmine)、ID-8、leucettine L41、NCGC00185981、INDY、ProINDY、TC-S 7004和TG003。据报道，至少一种已知的DYRK1抑制剂TC-S 7004 (US20120184562) 在体外针对静止癌细胞有效 (Ewton DZ, Hu J, Vilenchik M, Deng X, Luk KC, Polonskaia A, Hoffman AF, Zipf K, Boylan JF and Friedman EA. (2011) Inactivation of MIRK/DYRK1B kinase targets quiescent pancreatic cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics 10:2104-2114)。

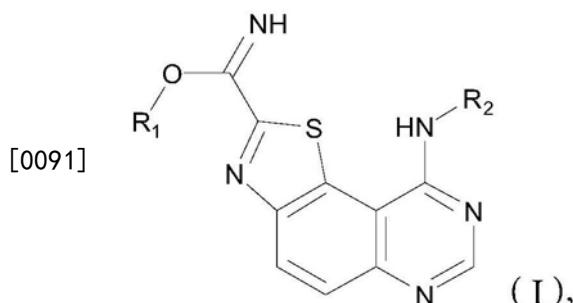


[0089]



(TC-S 7004)

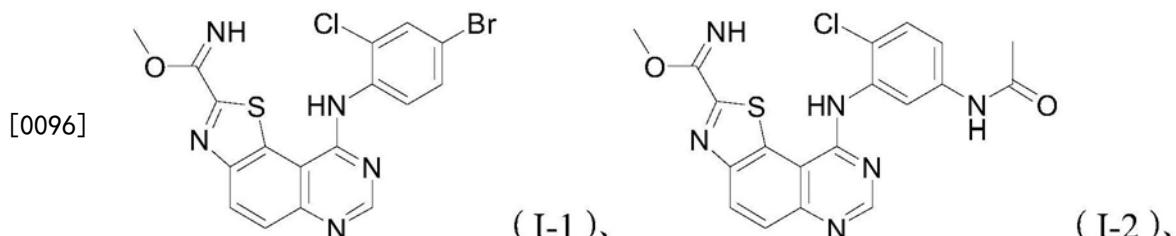
[0090] 在一个实施方案中,DYRK1抑制剂是式I的化合物:

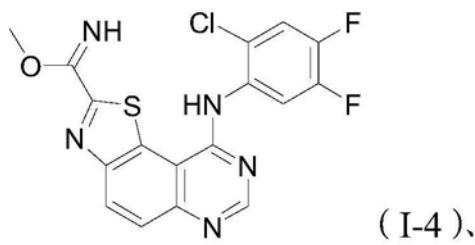
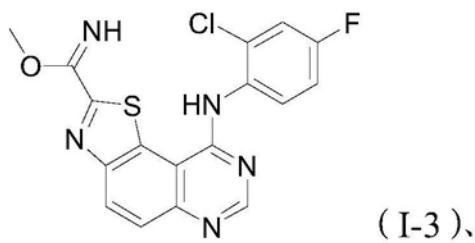


[0092] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中,

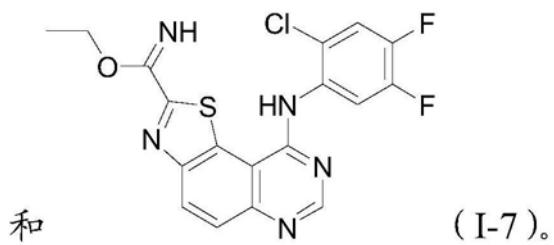
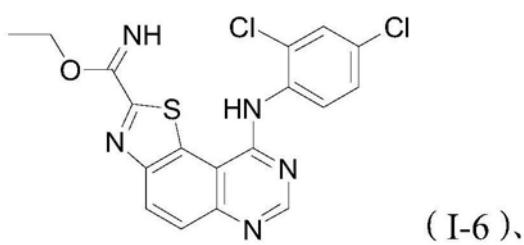
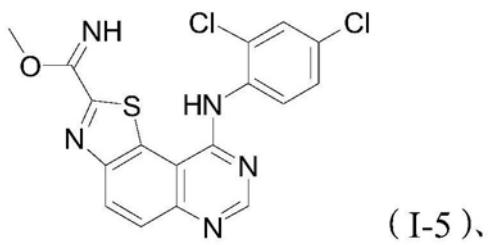
[0093] R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;[0094] R₂为苯基,任选地被至多四个独立地选自卤素、CN、NO₂、NHC(O)C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基、OH、OC₁₋₄烷基的基团取代,其中两个相邻基团及介于其间的碳原子可以形成包含一个或多个选自N、O或S的杂原子的5-至6-元环。

[0095] 在一个实施方案中,式I的化合物选自:





[0097]



[0098] 在另一个实施方案中,本发明的方法还提供了(c)向受试者给予另一种癌症治疗,例如,放射治疗或其他癌症治疗。

[0099] 在一个实施方案中,本发明的方法包括:向有其需要的受试者给予治疗有效量的(a)式I的治疗剂;(b)EGFR抑制剂;和(c)放射治疗;每种治疗顺序或同时给予。例如,在一些实施方案中,首先用放射疗法治疗受试者,然后单独或与EGFR抑制剂组合向受试者给予式I的治疗剂。在一些实施方案中,向受试者共同给予(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂,(b)EGFR抑制剂,和任选的(c)放射治疗。在一些实施方案中,EGFR抑制剂是抑制野生型或突变的或截短的EGFR酪氨酸激酶活性(体外或体内)的化合物,例如,在生化分析中IC₅₀为<100nM、<90nM、<80nM、<70nM、<60nM、<50nM、<40nM、<30nM、<20nM、<10nM、<5nM或更低。在一些实施方案中,与HER2/c-neu(ErbB-2)、Her 3(ErbB-3)和Her 4(ErbB-4)相比,EGFR抑制剂对EGFR的选择性为4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、1000倍。在一些实施方案中,EGFR抑制剂还抑制HER2/c-neu(ErbB-2)、Her 3(ErbB-3)和Her 4(ErbB-4)中的一种或多种,在生化分析中IC₅₀值为<100nM、<90nM、<80nM、<70nM、<60nM、<50nM、<40nM、<30nM、<20nM、<10nM、<5nM或更低。在一些实施方案中,EGFR抑制剂还抑制组蛋白脱乙酰酶(HDAC),如I类、II类、III类和/或IV类的HDAC中的一种或多种,在生化分析中IC₅₀值为<100nM、<90nM、<80nM、<70nM、<60nM、<50nM、<40nM、<30nM、<20nM、<10nM、<5nM或更低。在一些实施方案中,与野生型EGFR相

比,EGFR抑制剂对突变EGFR,例如携带T790M突变的EGFR具有选择性。在一些实施方案中,EGFR抑制剂是有效治疗或防止肿瘤的EGFR抑制剂,包括但不限于所有批准用于治疗癌症的这样的化合物,在临床试验中用于治疗癌症的化合物,另外在治疗哺乳动物受试者(例如,小鼠、大鼠、狗、猴、人)的癌症中显示功效的化合物,和在体外针对肿瘤细胞显示功效的化合物。许多这样的化合物是已知的。

[0100] EGFR抑制剂可以是例如,小分子或抗-EGFR抗体。

[0101] 在一个实施方案中,EGFR抑制剂是可逆EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR TKI)。在另一个实施方案中,可逆EGFR TKI是例如,布加替尼、CUDC-101、厄洛替尼、吉非替尼、埃克替尼、拉帕替尼、沙普替尼、凡德他尼、伐利替尼、泰西伐替尼和酪氨酸磷酸化抑制剂AG 1478。在又一个实施方案中,可逆EGFR TKI是AZD3759或MTKi-327(JNJ-26483327)。在一些实施方案中,可逆EGFR TKI不是厄洛替尼或拉帕替尼。

[0102] 在另一个实施方案中,EGFR抑制剂是不可逆EGFR TKI。在另一个实施方案中,不可逆EGFR抑制剂是例如,阿法替尼、奥姆替尼(HM61713)、卡奈替尼、CL-387785(EKI-785)、CNX-2006、达克替尼、那库替尼(ASP8273)、来那替尼、奥希替尼、PD168393、培利替尼、波齐替尼、诺司替尼、TAK285和WZ4002。在又一个实施方案中,不可逆EGFR TKI是例如,艾力替尼(ALS-1306;AST-1306)、AV-412(MP-412)、纳扎替尼(EGF816)和吡咯替尼。

[0103] 在又一个实施方案中,EGFR抑制剂是针对EGFR的抗体,例如,西妥昔单抗(Erbitux[®])和帕尼单抗(Vectibix[®])。

[0104] 在另一个实施方案中,被治疗的肿瘤为癌症,例如,胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌(例如黑色素瘤)、睾丸癌、甲状腺癌或子宫癌。在另一个实施方案中,癌症为非小细胞肺癌、胰腺癌和头颈癌。在另一个实施方案中,癌症是原发性或转移性的。在又一个实施方案中,癌症是由实施例中所示的细胞系类型代表的类型。在一些实施方案中,患有癌症的受试者具有EGFR基因突变,其与癌症风险增加和/或对某些EGFR TKI的抗性相关。

[0105] 本文描述的实施方案是说明性的,并不意味着对另外的组合组分、给予途径和顺序、患者类型(先前未治疗或先前治疗的、存在或不存在合并病症、年龄、性别等)、或患者的疾病阶段、EGFR抑制剂的类型等的限制。

[0106] EGFR抑制剂是本领域已知的(Lee CC等人(2014)Small-molecule EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of cancer, Expert Opinion on Investigational Drugs 23, 1333–1348)。这些药物用于治疗携带EGFR激活突变或其他EGFR异常(过度表达等)的癌症,最重要的是非小细胞肺癌(NSCLC)以及胰腺癌、乳腺癌和头颈癌的患者。临床使用的EGFR抑制剂为患者提供显著的益处,尤其是在无进展存活方面。然而,大多数其癌症对EGFR抑制剂初始治疗有反应的患者确实在短时间段,1-2年内经历复发。此外,他们的癌症对最初有效的治疗产生抗性。EGFR蛋白的突变解释了一些这种抗性,并且新的靶向突变的EGFR,尤其是T790M突变的EGFR抑制剂已经可用。

[0107] 最近,发现PC9人非小细胞肺癌细胞暴露于可逆EGFR抑制剂厄洛替尼或拉帕替尼导致药理学静止,即处在G₀的细胞的分数显著增加(Tyson DR, Garbett SP, Frick PL等人(2012)Fractional proliferation:a method to deconvolve cell population

dynamics from single-cell data, Nature Methods 9, 923–928)。在体外, 对EGFR TK抑制剂高度敏感的PC9细胞对厄洛替尼治疗的抗增殖反应主要是由于细胞进入静止状态而不是由于细胞凋亡。

[0108] 发现不同癌细胞系暴露于第2代和第3代EGFR TKI, 包括不可逆抑制剂, 无论是基于苯胺-喹唑啉还是苯胺基-嘧啶骨架, 均导致G₀分数大幅增加。因此, 处于G₀的细胞(静止细胞)的增加是EGFR酪氨酸激酶抑制剂的一般性质, 并且不限于先前报道的未预料到的和意外的少数特定实例。暴露于EGFR TKI后处于G₀的细胞群的增加比血清饥饿诱导的处于G₀的细胞群的增加更为明显, 这是意外的观察结果。因此, EGFR TKI诱导药理学静止。这种细胞抑制作用可以至少部分解释采用EGFR抑制剂时癌症暂时缓解, 随后复发的临床观察结果。

[0109] G₀状态由特定的基因表达程序维持。有证据表明DYRK1激酶如DYRK1A和DYRK1B可能对将癌细胞维持在癌细胞中的G₀状态(静止状态)很重要。

[0110] DYRK1B/Mirk是Minibrain/DYRK激酶家族的成员, 其在某些正常组织中介导存活和分化。(Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes A, Schurmann A, Huppertz C, Kainulainen H和Joost HG (1996) Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII, Journal of Biological Chemistry 271, 3488–3495; Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirrmter K, Tejedor FJ和Joost HG (1998) Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases, Journal of Biological Chemistry 273, 25893–25902)。DYRK1B在骨骼肌细胞和睾丸中以可检测的水平表达。即使在发育中的肌肉中, DYRK1B的敲除也未在小鼠中导致明显异常的表型, 表明DYRK1B不是正常发育的必需基因。支持这种解释的是, 正常的纤维母细胞在DYRK1B激酶水平消耗20倍后没有表现出存活的改变。因此, DYRK1B似乎不是正常细胞存活的必需基因, 但有证据表明它在某些恶性癌细胞中上调, 其中DYRK1B被认为通过保持癌细胞处于静止状态来介导存活。这些不寻常的特征表明, DYRK1B可能是治疗性干预, 特别是直接针对静止癌细胞的抗癌治疗的有吸引力的靶标。

[0111] 公开的组合和方法可以提供关于每种单一组分或现有的单一和组合治疗的使用的如在术语表中定义的一种或多种改善。此外, 所公开的组合和方法可允许减少治疗剂和放射的给予剂量和/或频率, 以相对于使用单一组分或现有的单一和组合治疗的可能性实现由治疗引起的相同改善。

[0112] 所公开的组合不需要是协同的或甚至导致EC₅₀值的显著降低, 以相对于使用EGFR抑制剂的单一治疗产生治疗有效性的显著改善。如上所述, 静止癌细胞本身对包括EGFR抑制剂在内的抗癌治疗剂不太敏感, 甚至在治疗后存活的一小部分静止细胞可以导致复发。因此, 根除肿瘤中的抗性静止细胞群可能或可能不产生EC₅₀值的协同降低, 但可以使癌症复发和转移性肿瘤的出现显著改善。

[0113] 所公开的组合的给予途径和方案可以根据所治疗的肿瘤病症、肿瘤的进展程度、受试者的年龄和身体状况、所选择的精确组合和其他因素而充分变化。给予方案可以包括每个时间段多个剂量, 同时或顺序给予治疗等。例如, 针对静止癌细胞有效的治疗剂可以在EGFR抑制剂之前给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂可以在EGFR抑制剂之前6小时、12小

时、24小时、48小时、72小时、96小时给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂可以与EGFR抑制剂在相同的时间(同时)给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂可以在EGFR抑制剂之后6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂和/或EGFR抑制剂可以在放射或其他治疗之前、之后或与其同时给予。

[0114] 针对静止癌细胞有效的治疗剂可以每天、每两天、每三天、每四天、每两周(每周两次)、每周一次、每两周一次、每月一次通过口服(P0)、静脉内(IV)、腹膜内(IP)、皮下(SC)、肿瘤内(IT)、鞘内或其他给予途径给予。

[0115] 所述组合可以给予未治疗(未经治疗)的受试者,或经历采用一线、二线、三线或其他治疗、放射治疗的先前治疗或经过手术切除或摧毁实体瘤的受试者,或癌症复发的受试者,或其癌症是非转移性或转移性的受试者。

实施例

[0116] 以下实施例并不要作为限制性的。根据本发明的内容,本领域技术人员将理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对特定材料进行许多改变并且这些改变被公开并且仍然获得相同或相似的结果。

[0117] 实施例1.细胞群内静止癌细胞分数的确定

[0118] 从ATCC获得以下细胞系并根据ATCC的建议培养:H1975-携带L858R和T790M突变的非小细胞肺癌细胞系;HCC827-在EGFR TK中具有E746-A750缺失的非小细胞肺癌细胞系;PC9-在EGFR TK中具有E746-A750缺失的非小细胞肺癌细胞系;A549-具有野生型EGFR的非小细胞肺癌细胞系;PANC1-胰腺癌细胞系;MiaPaCa-2-胰腺癌细胞系和SW620-结肠癌细胞系。

[0119] 将这些细胞系的细胞培养物以 3×10^5 - 6×10^5 个细胞/孔接种到6孔板中;细胞的铺板数取决于细胞大小和增殖速率,目标是约50%融合。接种后,使细胞贴壁24小时,同时在37°C下在湿润的5%CO₂气氛中孵育,然后用化合物处理期望的时长(通常24小时),在相同条件下孵育。然后通过胰蛋白酶消化收获细胞,与漂浮细胞合并,在PBS中洗涤,并在70%的冰冷乙醇中固定过夜。为了吖啶橙(AO)染色,将固定的细胞用冰冷的PBS洗涤一次,重悬于100μL PBS中,然后加入200μL透化溶液和600μL AO染色溶液。使用Guava easyCyte HT流式细胞仪(EMD Millipore)进行测量,使用蓝色激光在488nm处激发,监测526nm处的AO-DNA复合物和650nm处的AO-RNA复合物的发射。缓冲液的完整方案和组成描述于文献中(Darzynkiewicz Z, Juan G and Srouji EF (2004) Differential Staining of DNA and RNA (2004). Current Protocols in Cytometry, Chapter 7:Unit 7.3)。

[0120] 实施例2.2D细胞培养物中细胞活力分析的一般程序

[0121] 为了进行活力分析,将细胞以 2×10^3 - 6×10^3 个细胞/孔接种到96孔板中;根据细胞大小和增殖速率,目标是约50%融合。使细胞贴壁24小时,在37°C下在潮湿的5%CO₂气氛中孵育。使用至少6种不同浓度的化合物以1:3连续稀释进行处理。在读取结果之前,将细胞在5%CO₂培养箱中在37°C下孵育96小时。每次处理一式三份进行。使用SpectraMAX Gemini分光光度计(Molecular Devices),根据制造商的说明,通过CellTiter-GloTM发光细胞活力分析(Promega,目录号G7571)分析结果。

[0122] 实施例3.针对静止癌细胞有效的分子与厄洛替尼的组合

[0123] 如实施例1和2中所描述的培养和处理HCC827细胞。在该分析中使用的厄洛替尼的最高浓度为40nM,化合物I-5的浓度为2 μ M和4 μ M。当化合物I-5不存在时,观察到的厄洛替尼的EC₅₀值为12.15nM,当化合物I-5以2 μ M的浓度存在时为2.95nM,当化合物I-5以4 μ M的浓度存在时<0.1nM。参见图3。

[0124] 如实施例1和2中所描述的培养和处理PC9细胞。在该分析中使用的厄洛替尼的最高浓度为40nM,化合物I-5的浓度分别为2 μ M和4 μ M。当化合物I-5不存在时,观察到的厄洛替尼的EC₅₀值为17.3nM,当化合物I-5以2 μ M的浓度存在时为9.3nM,当化合物I-5以4 μ M的浓度存在时为3.7nM。参见图4。

[0125] 如实施例1和2中所描述的培养和处理A549细胞。该分析中使用的厄洛替尼的最高浓度为10 μ M,化合物I-7的浓度分别为3 μ M和6 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的厄洛替尼的EC₅₀值为10.4 μ M,当化合物I-7以3 μ M的浓度存在时为5.9 μ M,当化合物I-7以6 μ M的浓度存在时为0.4 μ M。参见图5。

[0126] 如实施例1和2中所描述的培养和处理PANC1细胞。该分析中使用的厄洛替尼的最高浓度为30 μ M,化合物I-5的浓度分别为2.5 μ M和5 μ M。当化合物I-5不存在时,观察到的厄洛替尼的EC₅₀值>30 μ M,当化合物I-5以2.5 μ M的浓度存在时>30 μ M,当化合物I-5以5 μ M的浓度存在时为14 μ M。参见图6。

[0127] 如实施例1和2中所描述的培养和处理MiaPaCa-2细胞。该分析中使用的厄洛替尼的最高浓度为30 μ M,化合物I-5的浓度分别为2.5 μ M和5 μ M。当化合物I-5不存在时,观察到的厄洛替尼的EC₅₀值>30 μ M,当化合物I-5以2.5 μ M的浓度存在时为6.4 μ M,当化合物I-5以5 μ M的浓度存在时为3.5 μ M。参见图7。

[0128] 在这些实验中,证明了将可逆EGFR抑制剂厄洛替尼与化合物I-5组合使得厄洛替尼针对HCC827、PC9和A549非小细胞肺癌细胞系的细胞毒性显著增加(EC₅₀值降低)。此外,观察到针对PANC1和MiaPaCa-2胰腺癌细胞系的细胞毒性显著增加(较低的EC₅₀值)。对于具有相对低的EGFR表达的MiaPaCa-2细胞系,该结果尤其出乎意料。

[0129] 实施例4.针对静止癌细胞有效的分子与阿法替尼的组合

[0130] 如实施例1和2中所描述的培养和处理H1975细胞。在该分析中使用的阿法替尼的最高浓度为500nM,化合物I-7的浓度为2 μ M和4 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的阿法替尼的EC₅₀值为89.4nM,当化合物I-7以2 μ M的浓度存在时为25.2nM,当化合物I-7以4 μ M的浓度存在时为8.2nM。参见图8。

[0131] 如实施例1和2中所描述的培养和处理HCC827细胞。在该分析中使用的阿法替尼的最高浓度为50nM,化合物I-7的浓度为3 μ M和6 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的阿法替尼的EC₅₀值为3.8nM,当化合物I-7以3 μ M的浓度存在时为1.6nM,当化合物I-7以6 μ M的浓度存在时为0.2nM。参见图9。

[0132] 如实施例1和2中所描述的培养和处理PC9细胞。在该分析中使用的阿法替尼的最高浓度为5nM,化合物I-7的浓度为4 μ M和8 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的阿法替尼的EC₅₀值为2.1nM,当化合物I-7以3 μ M的浓度存在时为1.3nM,当化合物I-7以6 μ M的浓度存在时为0.4nM。参见图10。

[0133] 如实施例1和2中所描述的培养和处理A549细胞。在该分析中使用的阿法替尼的最高浓度为10 μ M,化合物I-7的浓度为4 μ M和8 μ M。当化合物I-7不存在时观察到的阿法替尼的

EC₅₀值为4.7μM,当化合物I-7以3μM的浓度存在时为2.6μM,当化合物I-7以6μM的浓度存在时为1.0μM。参见图11。

[0134] 如实施例1和2中所描述的培养和处理PANC1细胞。在该分析中使用的阿法替尼的最高浓度为10μM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时观察到的阿法替尼的EC₅₀值为1.9μM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为1.8μM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为1.5μM。参见图12。

[0135] 在该实验中,证明了将不可逆EGFR抑制剂阿法替尼与化合物I-7组合使得阿法替尼针对H1975细胞和其他非小细胞肺癌细胞HCC827、PC9和A549的细胞毒性显著增加(较低的EC₅₀值)。此外,证明了将阿法替尼与化合物I-7组合使得针对PANC1胰腺癌细胞的细胞毒性增加。虽然最后的这个组合可能不具有协同作用或不导致EC₅₀值急剧降低,但是其通过根除否则在单一疗法治疗中存活的肿瘤中的抗性静止细胞群,可以充分地使治疗效果相对于使用EGFR抑制剂的单一治疗显著改善。

[0136] 实施例5.针对静止癌细胞有效的分子与奥希替尼的组合

[0137] 如实施例1和2中所描述的培养和处理H1975细胞。在该分析中使用的奥希替尼的最高浓度为50nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的EC₅₀值为8.7nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为7.9nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为4.2nM。参见图13。

[0138] 如实施例1和2中所描述的培养和处理PANC1细胞。在该分析中使用的奥希替尼的最高浓度为20μM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的EC₅₀值为5.3μM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为4.6μM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为4.5μM。参见图14。

[0139] 在该实验中,证明了将不可逆EGFR抑制剂奥希替尼与化合物I-7组合使得奥希替尼针对H1975细胞的细胞毒性显著增加(较低的EC₅₀值)。此外,证明了将奥希替尼与化合物I-7组合使得针对PANC1胰腺癌细胞的细胞毒性增加。虽然最后的这种组合可能不具有协同作用或不导致EC₅₀值急剧降低,但是通过根除否则在单一疗法治疗中存活的肿瘤中的抗性静止细胞群,可以充分地使治疗效果相对于使用EGFR抑制剂的单一治疗显著改善。

[0140] 实施例6.奥希替尼和针对静止癌细胞有效的分子与奥希替尼的组合的细胞周期影响和细胞毒性

[0141] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析H1975细胞。当存在不同浓度的奥希替尼、化合物I-7或奥希替尼和化合物I-7二者时的结果显示于图15和16中。

[0142] 在这些实验中,证明了将H1975细胞暴露于奥希替尼导致细胞周期分布的变化,以致于奥希替尼在诱导大部分细胞进入静止(G₀)状态时甚至比血清饥饿(FBS-)更有效。显示正常增殖的H1975细胞、在无血清培养基(FBS-)和常规生长培养基(FBS+)中培养的H1975细胞的细胞周期分布用于比较。无论细胞是否在正常生长培养基(FBS+)中预先孵育或在无血清(FBS-)培养基中预先饥饿以在用奥希替尼处理之前增加处于G₀的细胞的比例,奥希替尼均引起细胞周期分布的变化。此外,如通过证明为亚G₀细胞群的凋亡细胞的显著增加所记录的和通过活力分析所证明的,化合物I-7与奥希替尼的组合减少了处于G₀的细胞的分数并且强烈增强了得到的细胞毒性。无论细胞是否在生长培养基中或在血清饥饿条件下预孵育,都观察到这种影响。

[0143] 实施例7.针对静止癌细胞有效的分子与诺司替尼的组合

[0144] 如实施例1和2中所描述的培养和处理H1975细胞。在该分析中使用的诺司替尼的最高浓度为500nM,化合物I-7的浓度为2 μ M和4 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的诺司替尼抑制的EC₅₀值为351nM,当化合物I-7以2 μ M的浓度存在时为22.5nM,当化合物I-7以4 μ M的浓度存在时为14.9nM。参见图17。

[0145] 如实施例1和2中所描述的培养和处理PANC1细胞。在该分析中使用的诺司替尼的最高浓度为20 μ M,化合物I-7的浓度为2 μ M和4 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的EC₅₀值为11.4 μ M,当化合物I-7以2 μ M的浓度存在时为9.9 μ M,当化合物I-7以4 μ M的浓度存在时为7.1 μ M。参见图18。

[0146] 在该实验中,证明了将不可逆EGFR抑制剂诺司替尼与化合物I-7组合使得诺司替尼针对H1975细胞的细胞毒性显著增加(较低的EC₅₀值)。此外,证明了将奥希替尼与化合物I-7组合使得针对PANC1胰腺癌细胞的细胞毒性增加(较低的EC₅₀值)。虽然最后的这个组合可能不具有协同作用或不导致EC₅₀值急剧降低,但是其通过根除否则在单一疗法治疗中存活的肿瘤中的抗性静止细胞群,可以充分地使治疗效果相对于使用EGFR抑制剂的单一治疗显著改善。

[0147] 实施例8.诺司替尼和针对静止癌细胞有效的分子与诺司替尼的组合的细胞周期影响和细胞毒性

[0148] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析H1975细胞。当存在不同浓度的诺司替尼、化合物I-7或诺司替尼和化合物I-7二者时的结果显示于图19中。

[0149] 在该实施例中,H1975细胞在血清饥饿(FBS-)条件下孵育24小时,然后在经处理或不经处理的情况下“释放”到正常生长培养基(FBS+)中。在这些条件下,暴露于诺司替尼导致处于静止状态(G₀)的细胞分数显著增加。如通过由亚G₀分数所确定的凋亡细胞的大量增加所判断的,当用诺司替尼和化合物I-7的组合共同处理细胞时,没有观察到这种静止细胞比例的增加,并且观察到诺司替尼的细胞毒性的大幅增加。

[0150] 实施例9.用EGFR抑制剂处理H1975细胞后诱导DYRK1B

[0151] 如实施例1和2中所描述的培养和处理H1975细胞。为了Western印迹分析,将细胞以 5×10^5 - 9×10^5 个细胞/孔(根据细胞大小和增殖速率)接种到6孔板中,使其贴壁24小时,然后用化合物处理24小时并收获。如细胞信号传导技术Western印迹方案(Cell Signaling Technologies Western Blotting protocol) (www.cellsignal.com) 中所述,使用常规技术进行免疫印迹。

[0152] 用于印迹的抗体来自Cell Signaling Technology (CST) :DYRK1B (D40D1) 兔mAb# 5672;EGF受体 (D38B1) XP[®]兔mAb#4267;磷酸-EGF受体 (Tyr1068) (D7A5) XP[®]兔mAb#3777; β -肌动蛋白 (13E5) 兔mAb#4970;抗兔IgG、HRP-连接的抗体#7074。使用含有5%BSA的第一抗体稀释缓冲液1X TBST (CST#9998)。为了检测,使用SignalFireTMECL Reagent (CST#6883)。

[0153] 如通过Western印迹分析观察到的,使用诺司替尼、奥希替尼、达克替尼和阿法替尼处理24小时之后,H1975细胞中DYRK1B、ph-Y1068EGFR、总EGFR和 β -肌动蛋白的表达水平显示于图20中。将DYRK1B蛋白的表达与在含有FBS (FBS+) 的常规生长培养基或无血清培养基(FBS-) 中孵育的未处理的细胞中的DYRK1B蛋白的表达进行比较。证明用每种EGFR抑制剂处理抑制EGFR磷酸化并且还诱导DYRK1B蛋白的表达,其类似于或高于血清饥饿产生的

DYRK1B蛋白的表达。

[0154] 实施例10.针对静止癌细胞有效的分子与达克替尼的组合

[0155] 如实施例1和2中所描述培养和处理H1975细胞。在该分析中使用的达克替尼的最高浓度为500nM,化合物I-7的浓度为2 μ M和4 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的达克替尼抑制的EC₅₀值为110.3nM,当化合物I-7以2 μ M的浓度存在时为88.6nM,当化合物I-7以4 μ M的浓度存在时为34.8nM。参见图21。

[0156] 如实施例1和2中所描述的培养和处理PANC1细胞。在该分析中使用的达克替尼的最高浓度为10 μ M,化合物I-7的浓度为2 μ M和4 μ M。当化合物I-7不存在时,观察到的EC₅₀值为11.4 μ M,当化合物I-7以2 μ M的浓度存在时为9.9 μ M,当化合物I-7以4 μ M的浓度存在时为7.1 μ M。参见图22。

[0157] 在该实验中,证明了将不可逆EGFR抑制剂达克替尼与化合物I-7组合使得达克替尼针对H1975细胞的细胞毒性显著增加(较低的EC₅₀值)。此外,证明了将奥希替尼与化合物I-7组合使得针对PANC1胰腺癌细胞的细胞毒性增加。虽然最后的这个组合可能不具有协同作用或不导致EC₅₀值急剧降低,但是其通过根除否则在单一疗法治疗中存活的肿瘤中的抗性静止细胞群,可以充分地使治疗效果相对于使用EGFR抑制剂的单一治疗显著改善。

[0158] 实施例11.AZ191的细胞周期影响和与化合物I-7的比较

[0159] 如实施例1中所描述的培养和处理SW620细胞。对于碘化丙啶(PI)染色,遵循与用于流式细胞术的Guava细胞周期试剂(EMD Millipore)一起提供的制造商的方案。使用Guava PCA-96流式细胞仪(EMD Millipore)进行测量,使用绿色激光在535nm处激发并监测617nm处的发射。

[0160] 不同浓度的AZ191存在时的结果显示在图23中。数据是两次重复的平均值。

[0161] 如实施例1中所描述的培养、处理和分析SW620细胞。对于碘化丙啶(PI)染色,遵循与用于流式细胞术的Guava细胞周期试剂(EMD Millipore)一起提供的制造商的方案。使用Guava PCA-96流式细胞仪(EMD Millipore)进行测量,使用绿色激光在535nm处激发并监测617nm处的发射。

[0162] 不同浓度的化合物I-7存在时的结果显示在图24中。数据是两次重复的平均值。

[0163] 在这些实验中,SW620细胞在FBS培养基中培养24小时,所述培养基含有不同浓度的AZ191或化合物I-7。在这些条件下,基于没有观察到细胞G₀+G₁期分数的变化,暴露于AZ191没有导致处于静止状态(G₀)的细胞分数降低。在相同条件下,基于细胞G₀+G₁期分数的显著降低,暴露于相同或更低浓度的化合物I-7导致处于静止状态(G₀)的细胞分数显著降低。

[0164] AZ191在17nM下抑制DYRK1B (Ashford AL, Oxley D, Kettle J, Hudson K, Guichard S, Cook SJ, Lochhead PA (2014) A novel DYRK1B inhibitor AZ191 demonstrates that DYRK1B acts independently of GSK3beta to phosphorylate cyclin D1 at Thr (286), not Thr (288). Biochemical Journal 457, 43–56)。

[0165] 在该实验中,证明并非所有DYRK1抑制剂都针对静止癌细胞有效。

[0166] 实施例12.3D细胞培养物(球状体)中细胞活力分析的一般程序

[0167] 对于3D培养物中的活力分析,根据细胞大小和增殖速率将细胞以5×10³–6×10³个细胞/孔接种到96孔ULA(超低附着)板(Corning#4515)中,目的在于在处理开始时形成直径

为400–600 μ M球状体。将细胞在37°C下在潮湿的5%CO₂气氛中孵育2–3天(根据细胞系),使之形成紧密的球状体。为了处理,从每个孔取出50 μ L培养基,并用含有化合物的新鲜培养基替换。使用至少6种不同浓度的化合物以1:3连续稀释进行处理。在读取结果之前,将细胞在5%CO₂培养箱中在37°C下孵育4–10天的时间段。如果处理时间超过4天,则每四天用含有测试化合物的新鲜培养基替换每个孔中的70 μ L培养基。每次处理一式两份进行。使用SpectraMAX Gemini分光光度计(Molecular Devices),根据制造商的说明,通过CellTiter-GloTM3D发光细胞活力分析(Promega,cat.#G9682)分析结果。在分析之前,以50×放大倍率拍摄球状体。

[0168] 实施例13.在3D细胞培养物中针对静止癌细胞有效的分子与阿法替尼的组合。

[0169] 如实施例1和12中所描述的培养和处理H1975球状体。该分析中使用的阿法替尼浓度为100nM,化合物I-7的浓度为2.5 μ M。处理的持续时间为7天。参见图25。

[0170] 在该实验中,证明了不可逆EGFR抑制剂阿法替尼与化合物I-7的组合治疗导致阿法替尼针对H1975细胞的3D培养物(球状体)的细胞毒性显著增加(较低的EC₅₀值);该组合完全根除了球状体,而在单独使用阿法替尼的治疗时一部分球状体存活。

[0171] 实施例14.在3D细胞培养物中针对静止癌细胞有效的分子与奥希替尼的组合

[0172] 如实施例1、2和12中所描述的培养和处理H1975球状体。该分析中使用的奥希替尼的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为2.5 μ M。在常规生长培养基(FBS+)中,当化合物I-7不存在时,确定的奥希替尼的EC₅₀值为0.68nM,当化合物I-7以2.5 μ M的浓度存在时为0.28nM。在血清饥饿(FBS-)的条件下,当化合物I-7不存在时,确定的奥希替尼的EC₅₀值为3.3nM,当化合物I-7以2.5 μ M的浓度存在时为1.0nM。参见图26。

[0173] 在该实验中,证明了无论是在常规培养基(FBS+)中或是在耗竭的培养基(FBS-)中培养球状体,不可逆EGFR抑制剂奥希替尼与化合物I-7的组合均导致奥希替尼针对H1975细胞的3D培养物(球状体)的细胞毒性显著增加(EC₅₀降低)。出乎意料的是,在FBS-中EC₅₀下降的百分比大于在FBS+3D培养物中下降的百分比。

[0174] 虽然已经参考本发明的示例性实施方案具体显示和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,在不脱离由所附权利要求包含的本发明范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

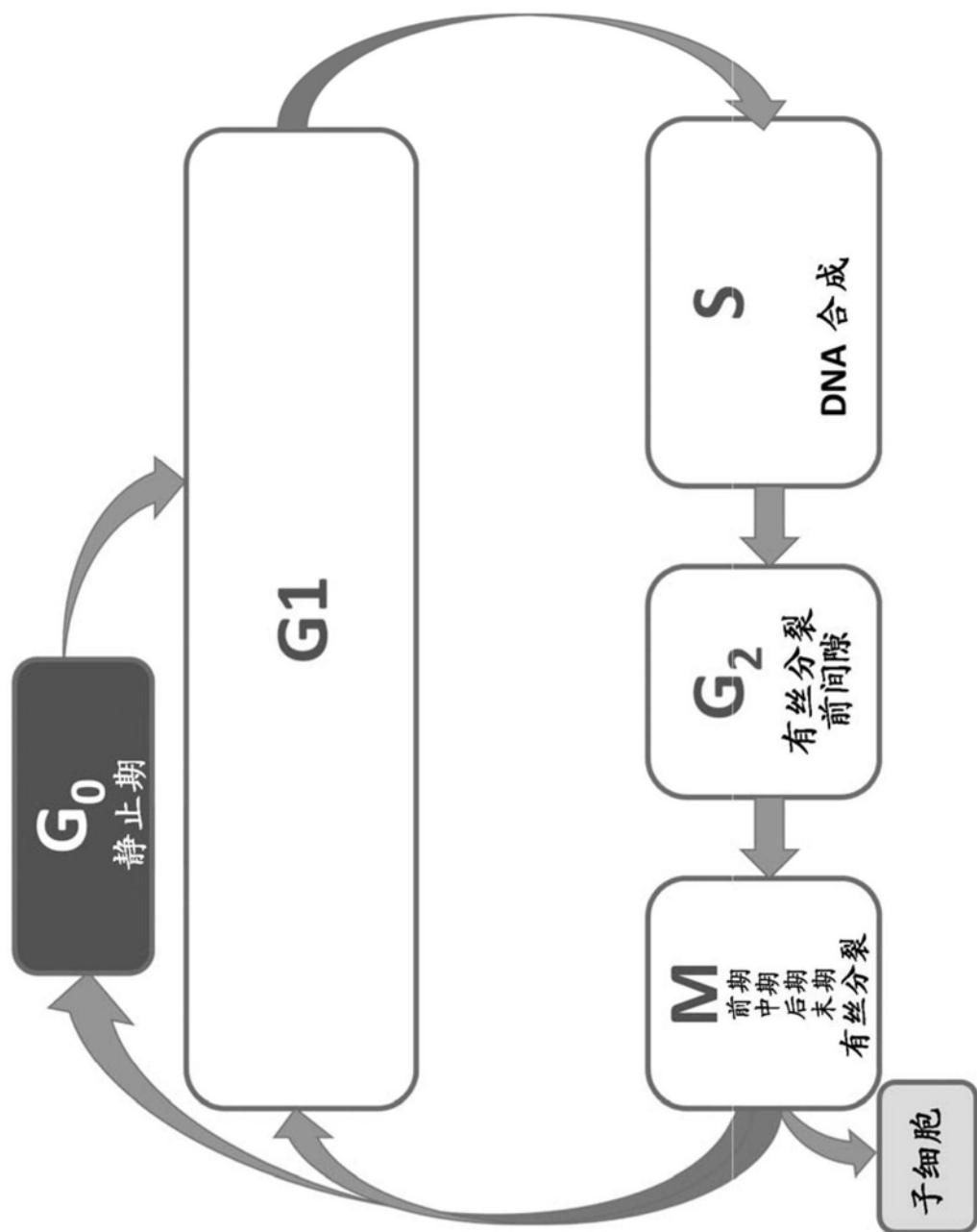


图1

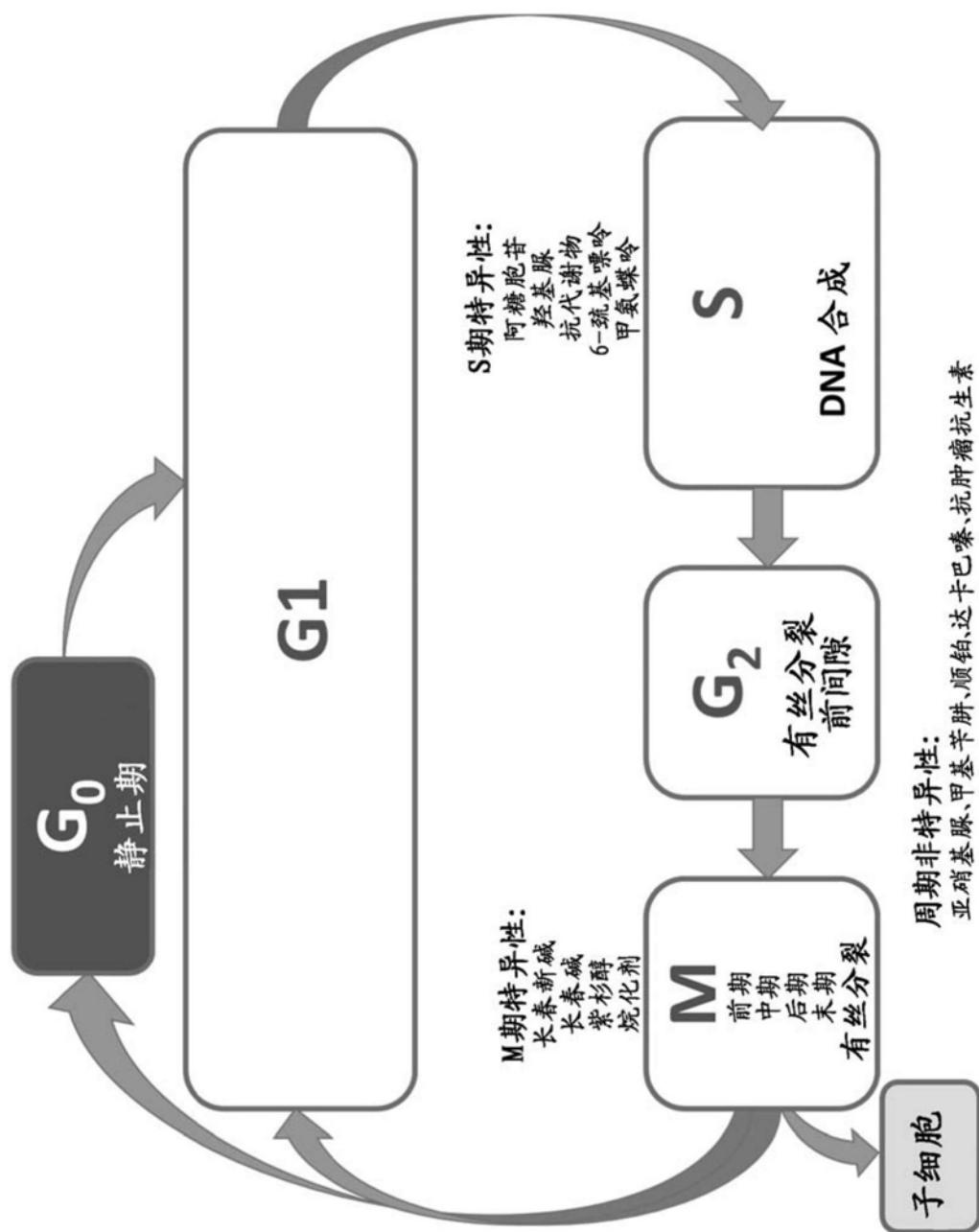


图2

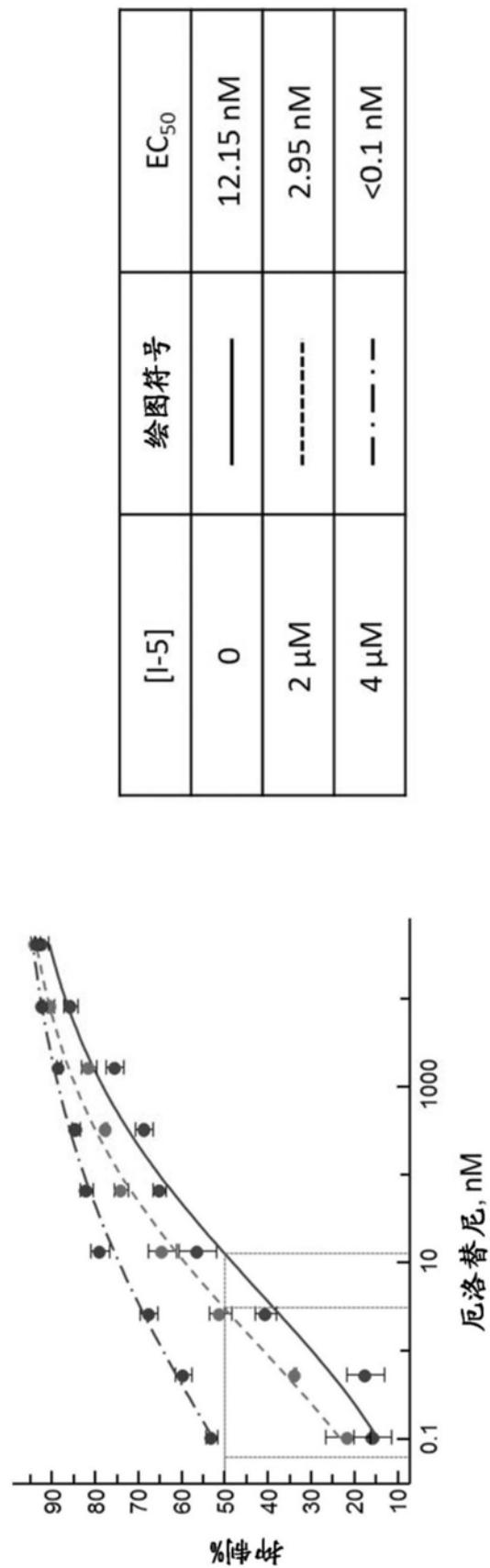


图3

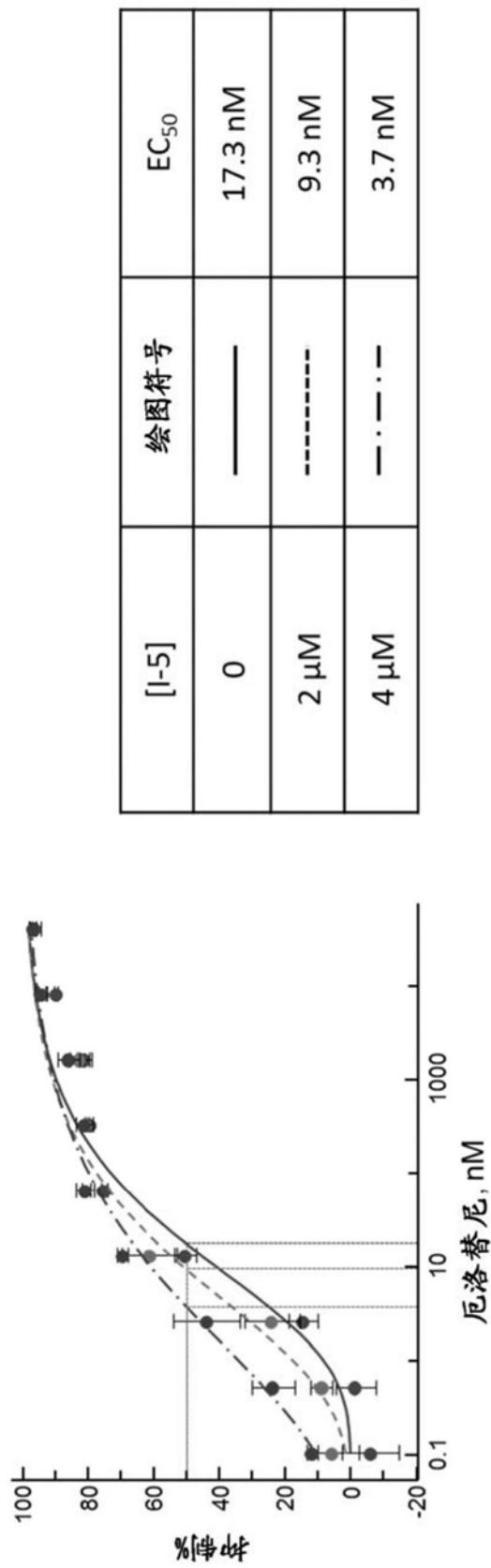


图4

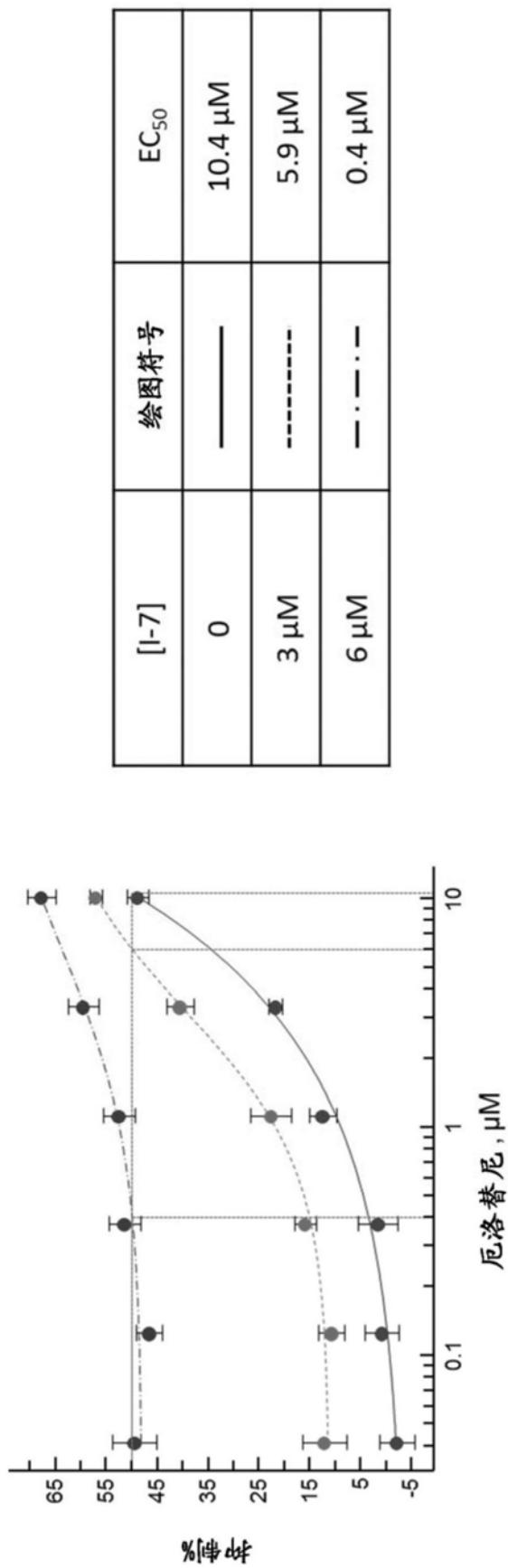


图5

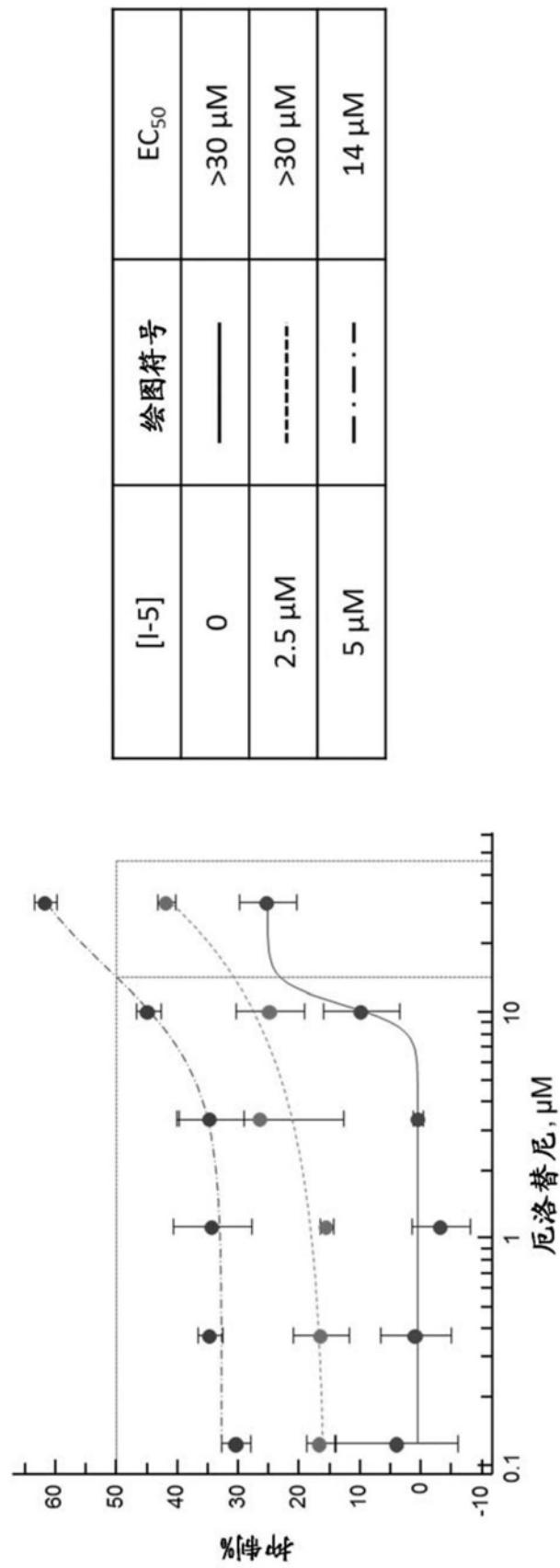


图6

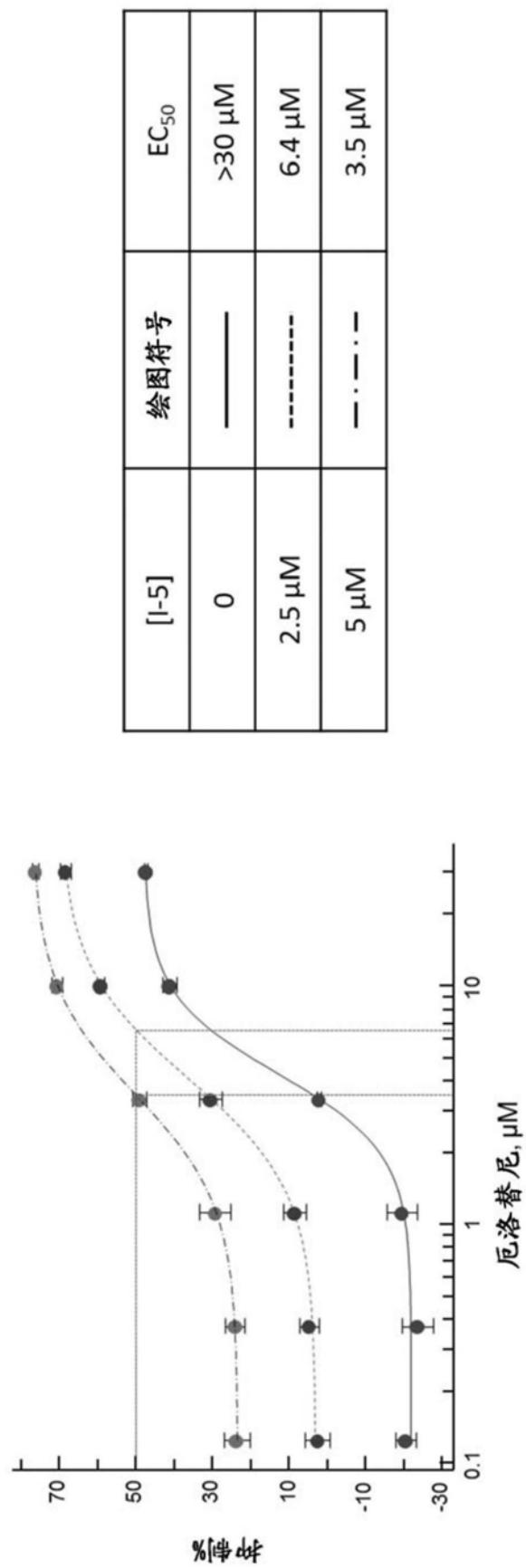


图7

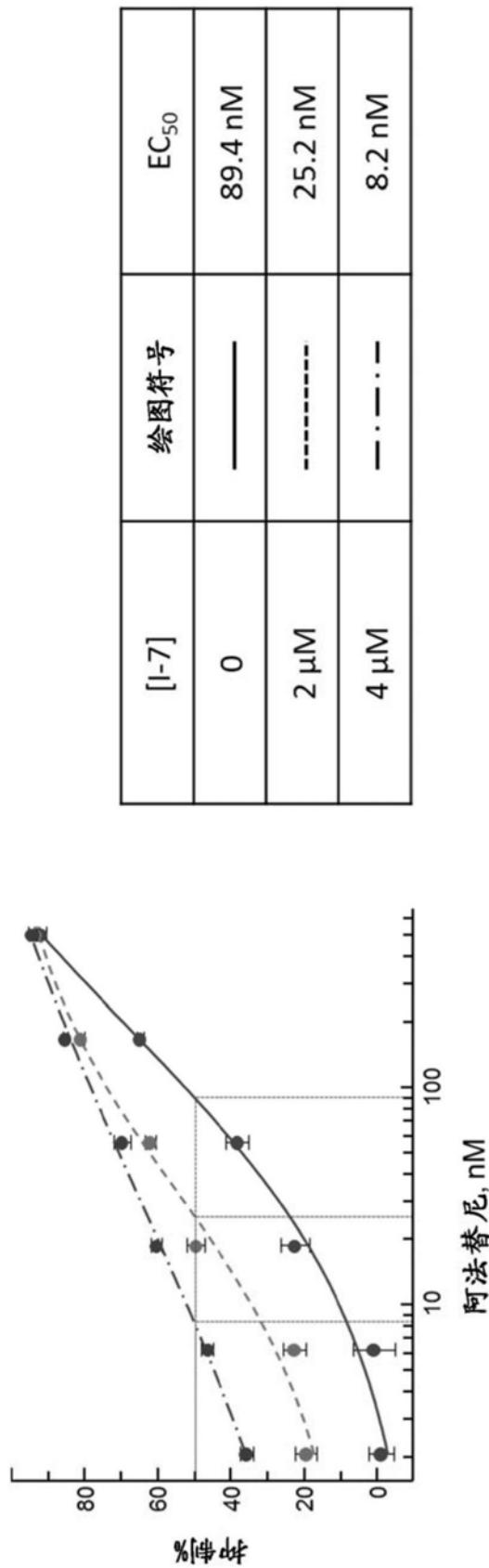


图8

[I-7]	绘图符号	EC_{50}
0	——	3.8 nM
$3 \mu M$	- - -	1.6 nM
$6 \mu M$	- · - -	0.2 nM

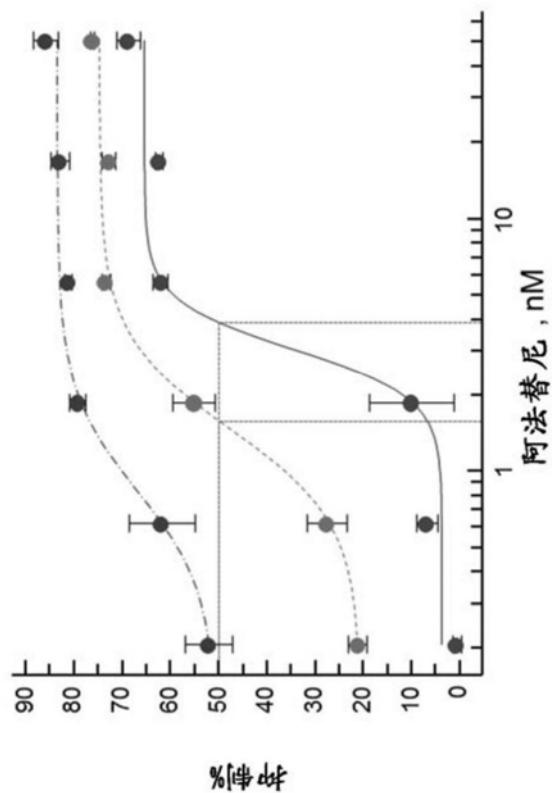


图9

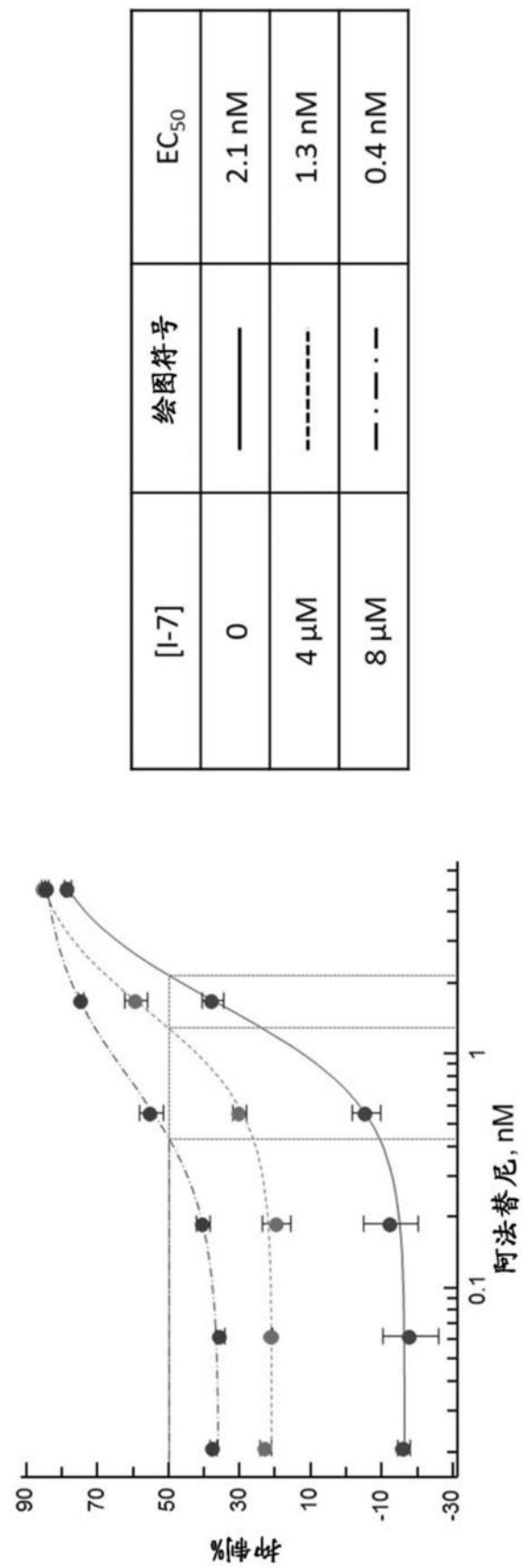


图10

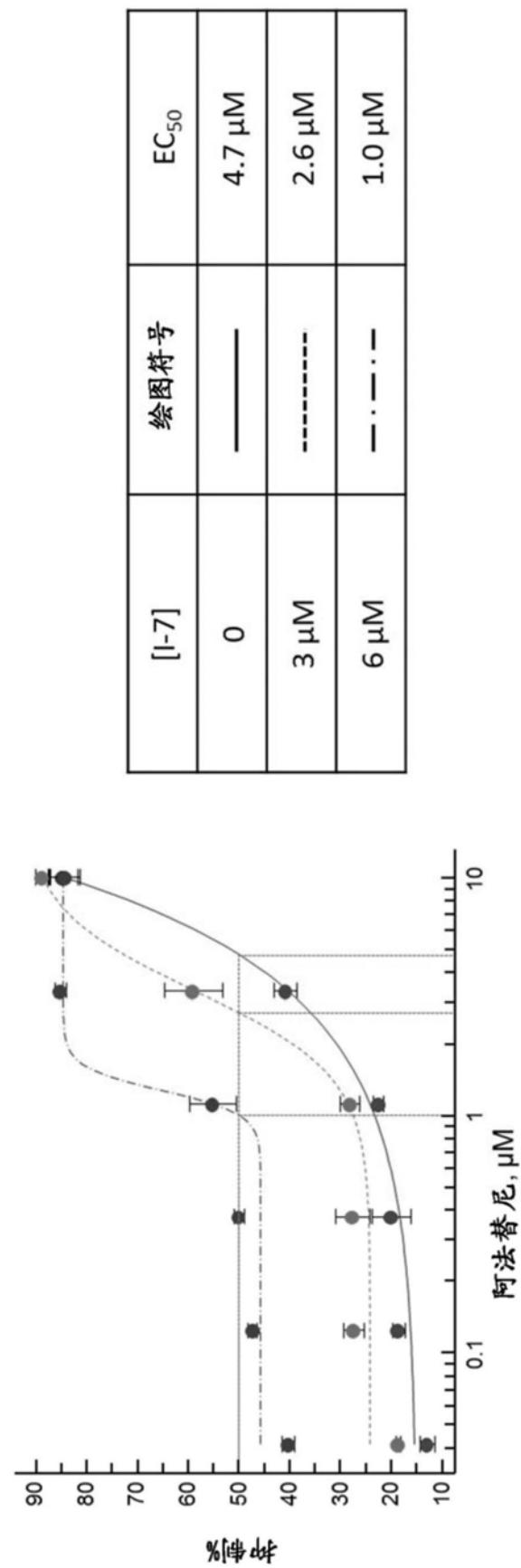


图11

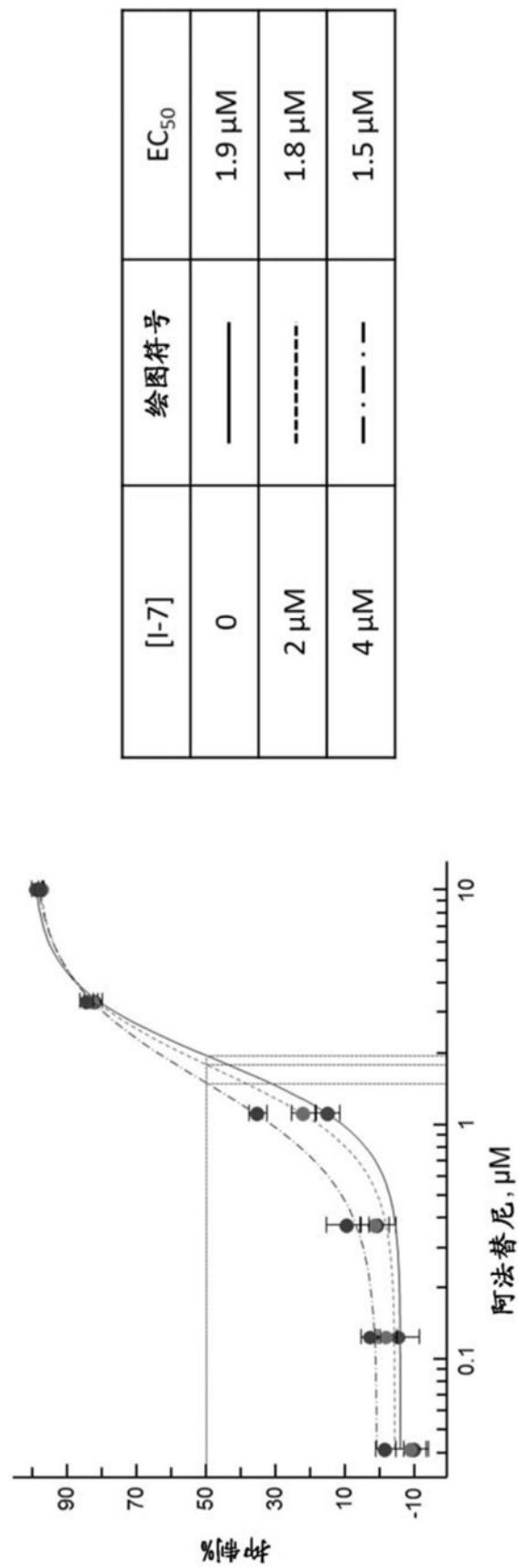


图12

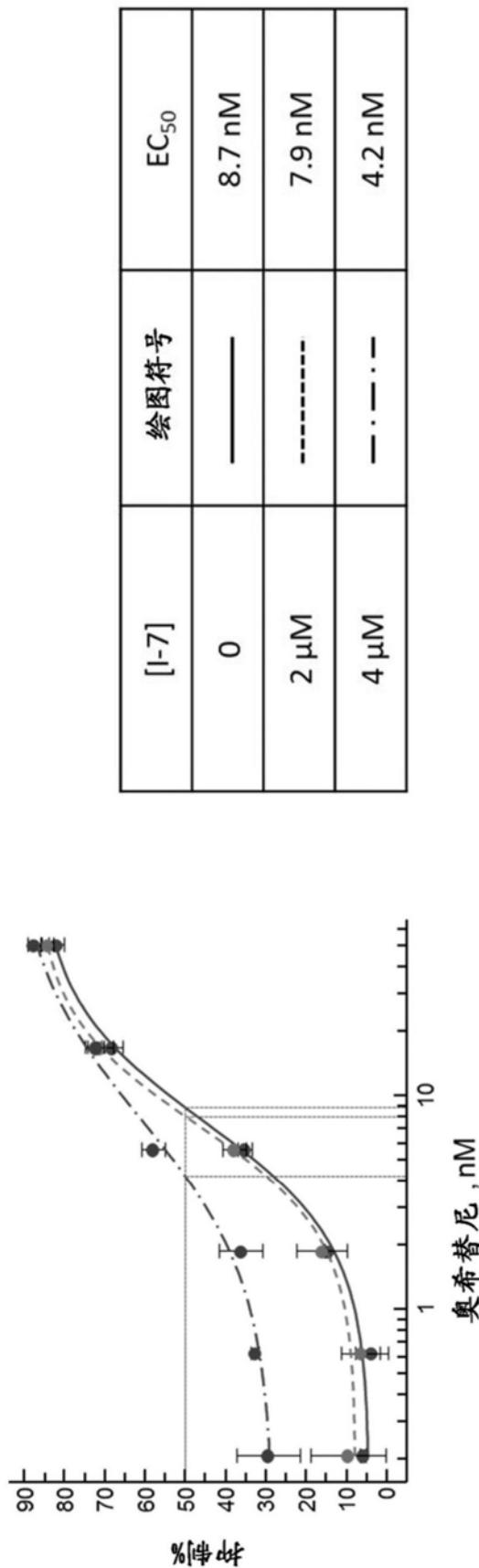


图13

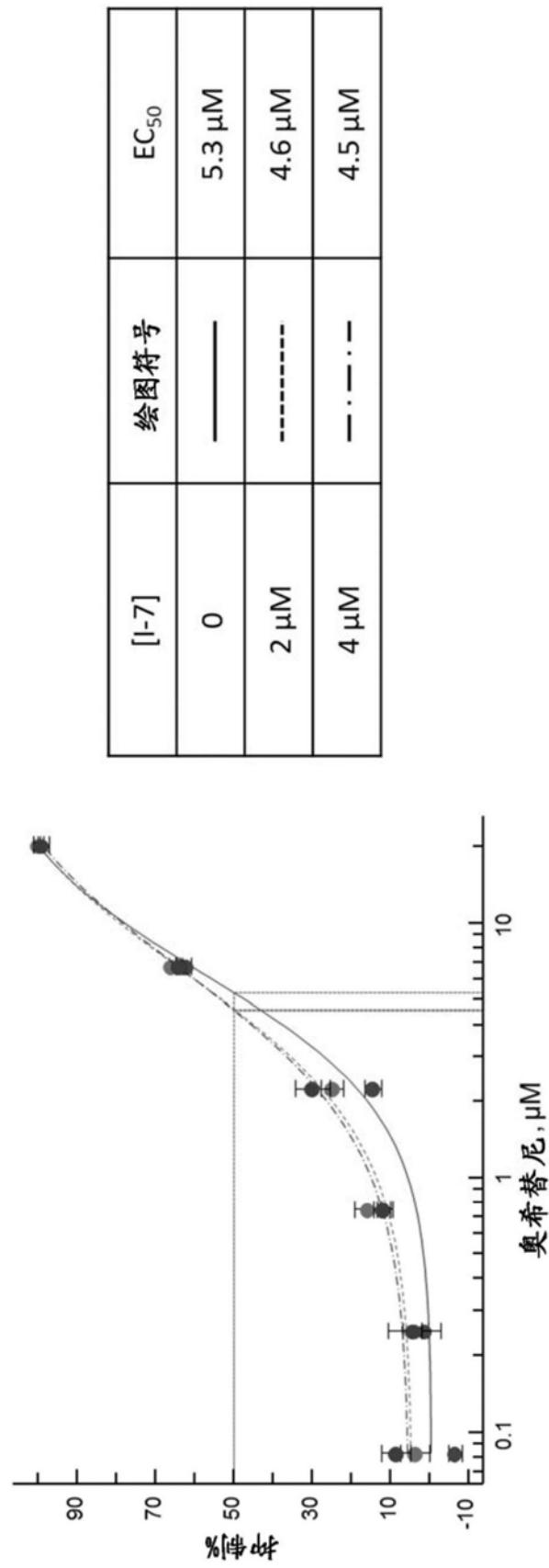


图14

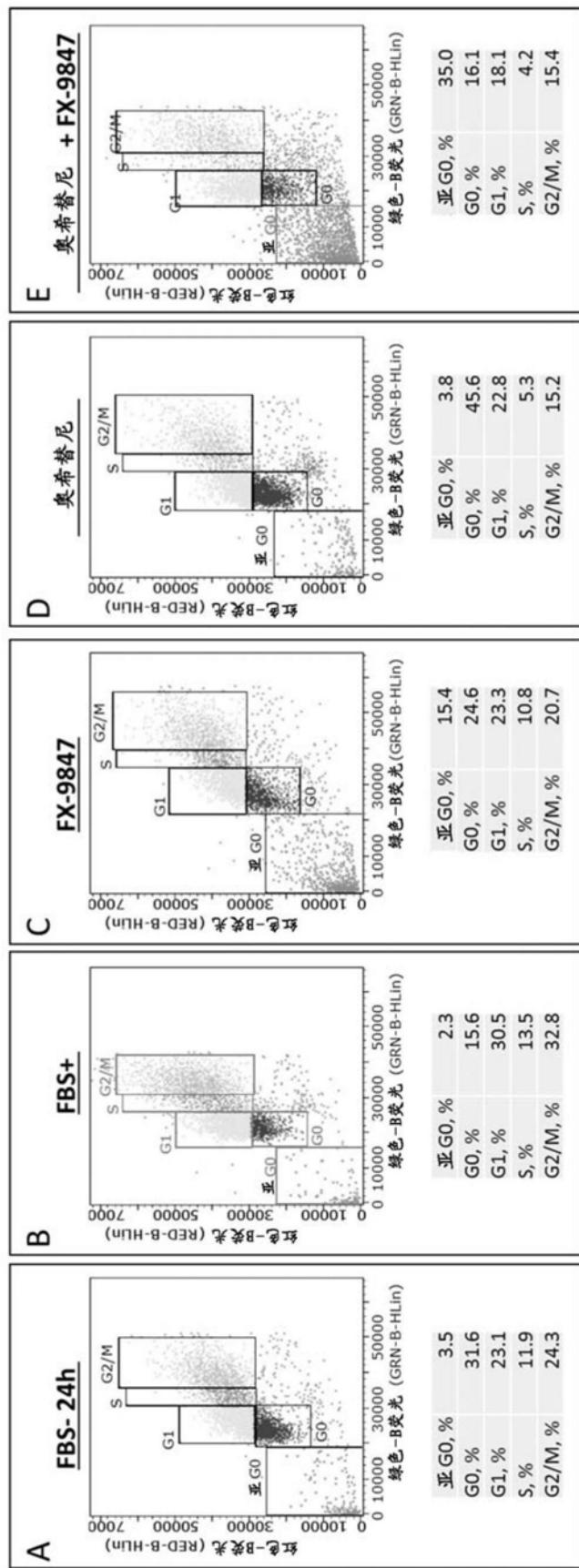


图15

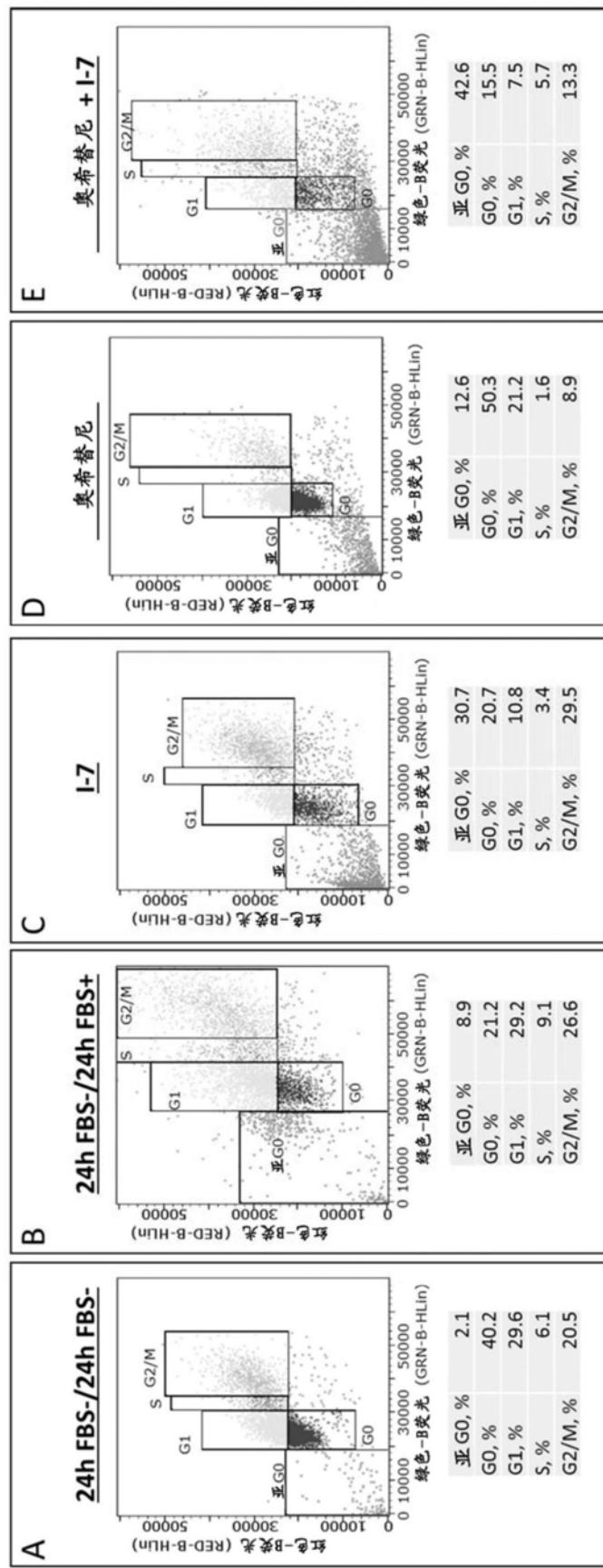


图16

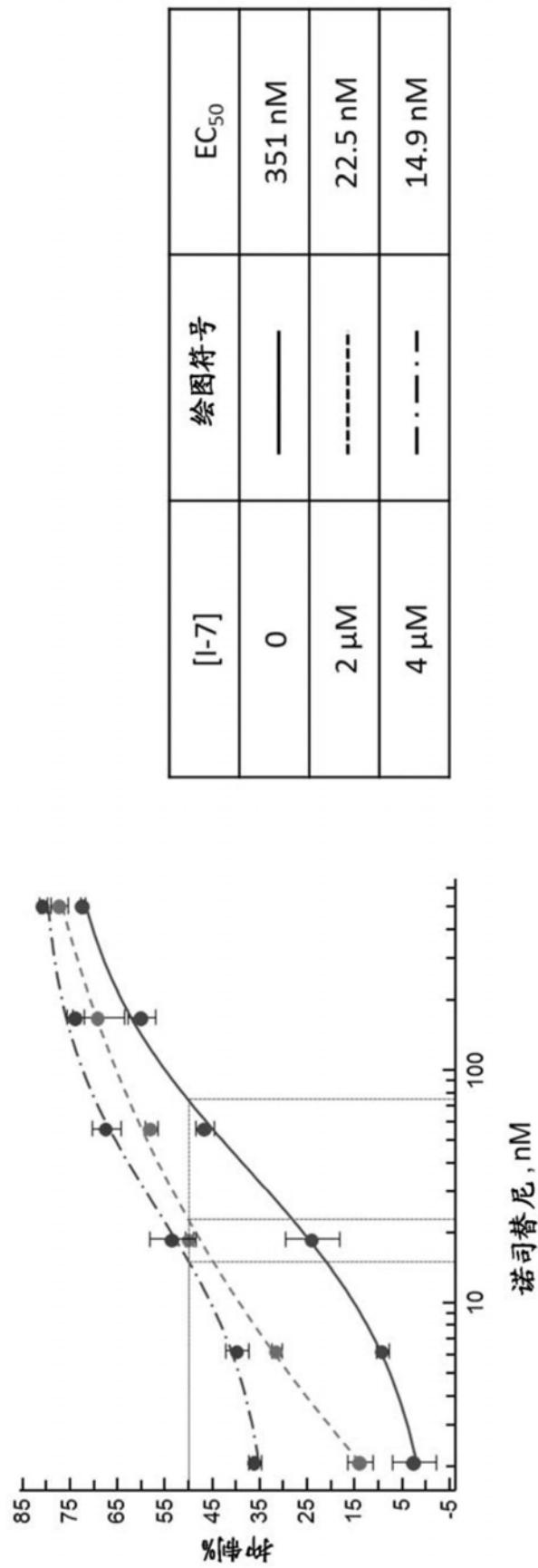


图17

[I-7]	绘图符号	EC_{50}
0	——	11.4 μM
2 μM	- - -	9.9 μM
4 μM	- - - - -	7.1 μM

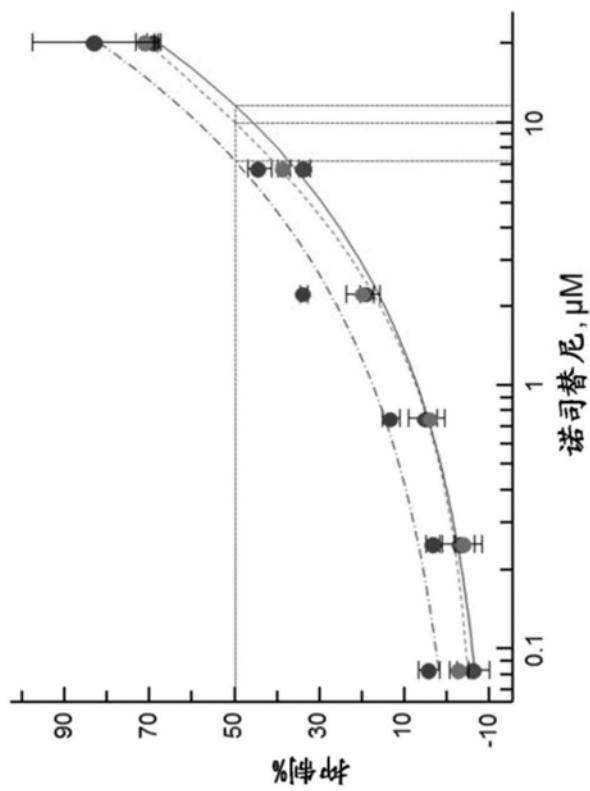


图18

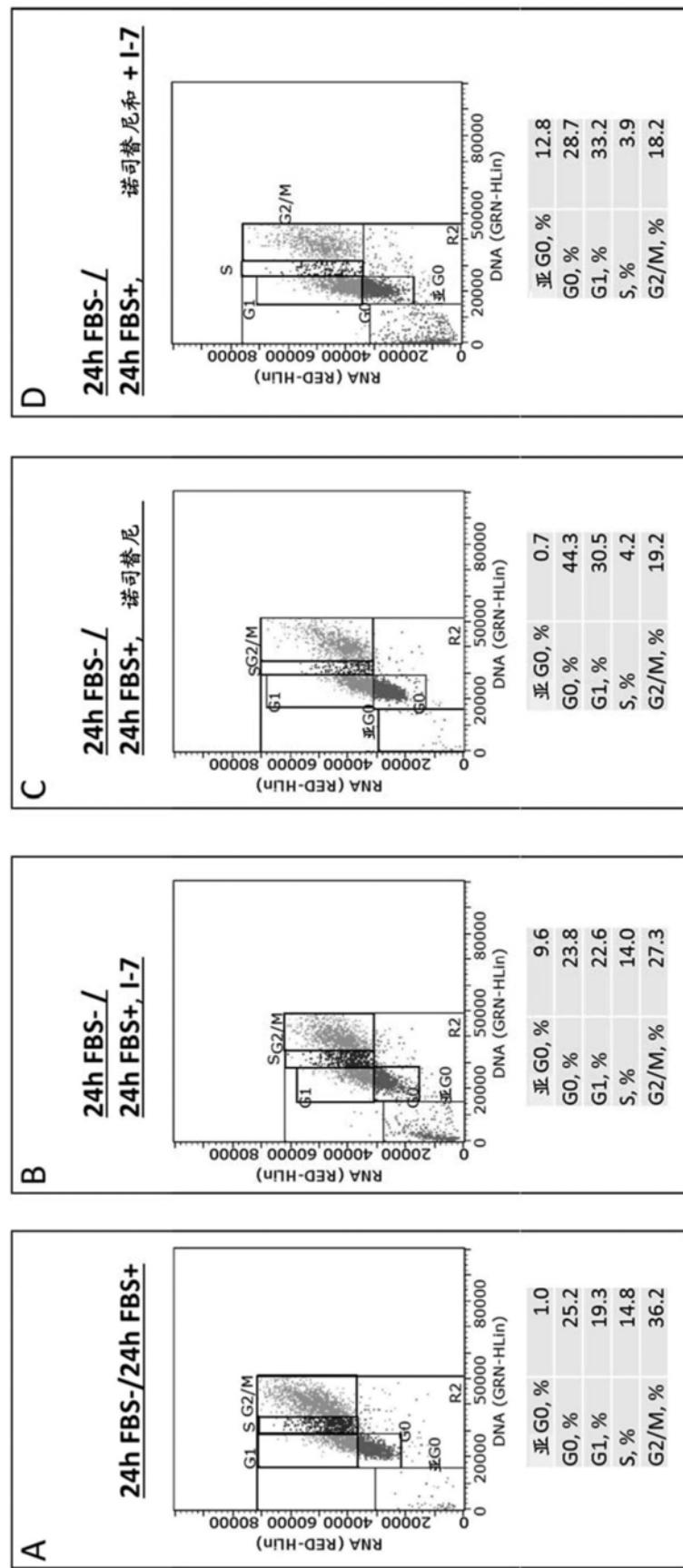


图19

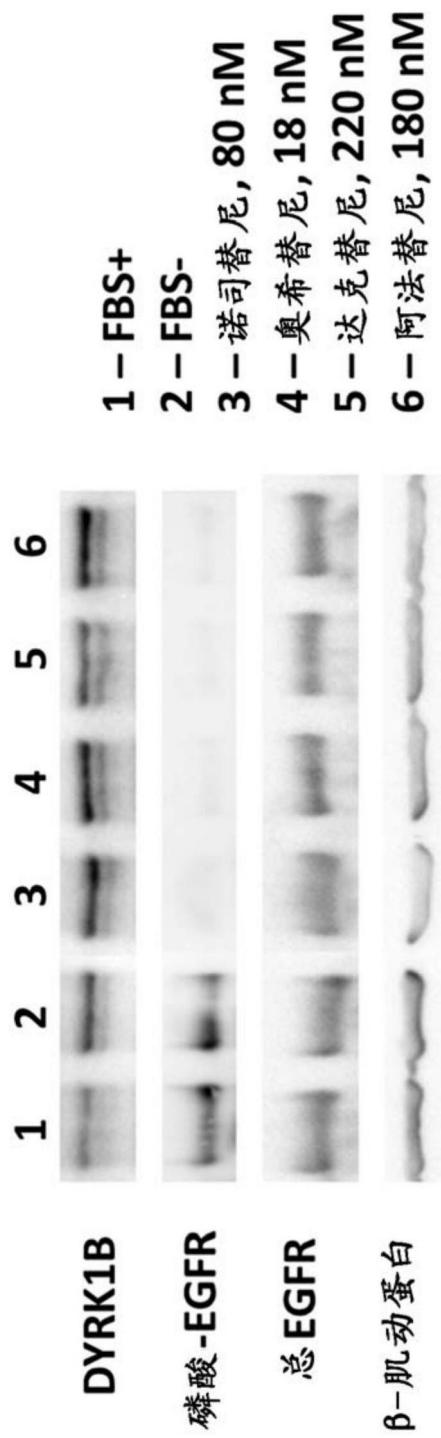


图20

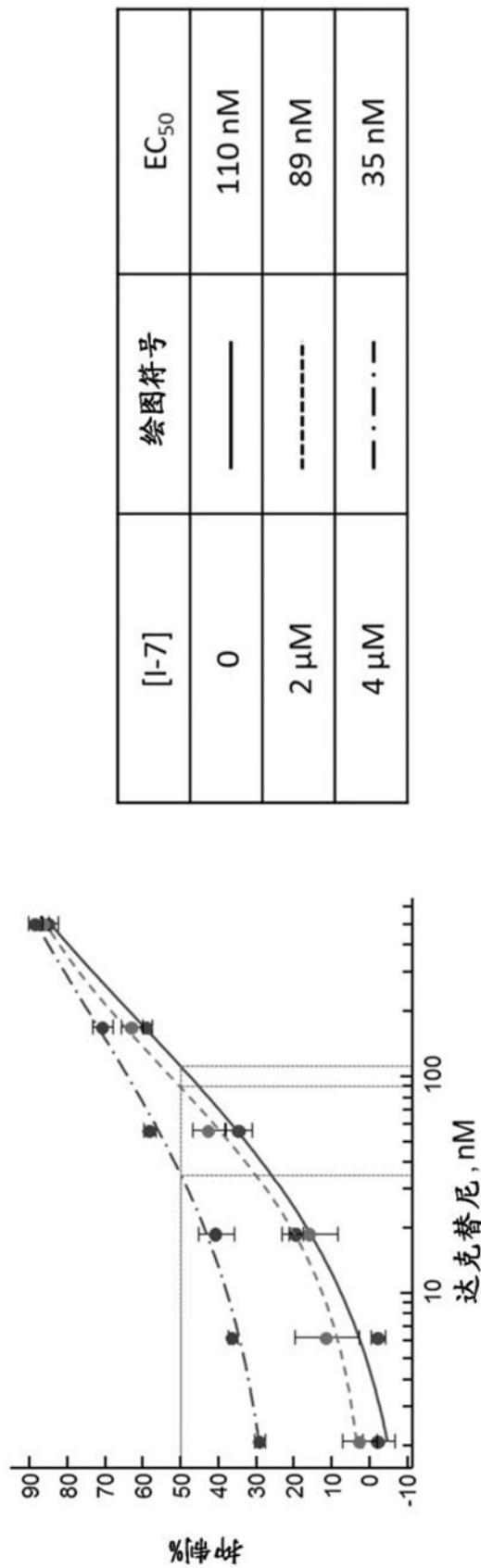


图21

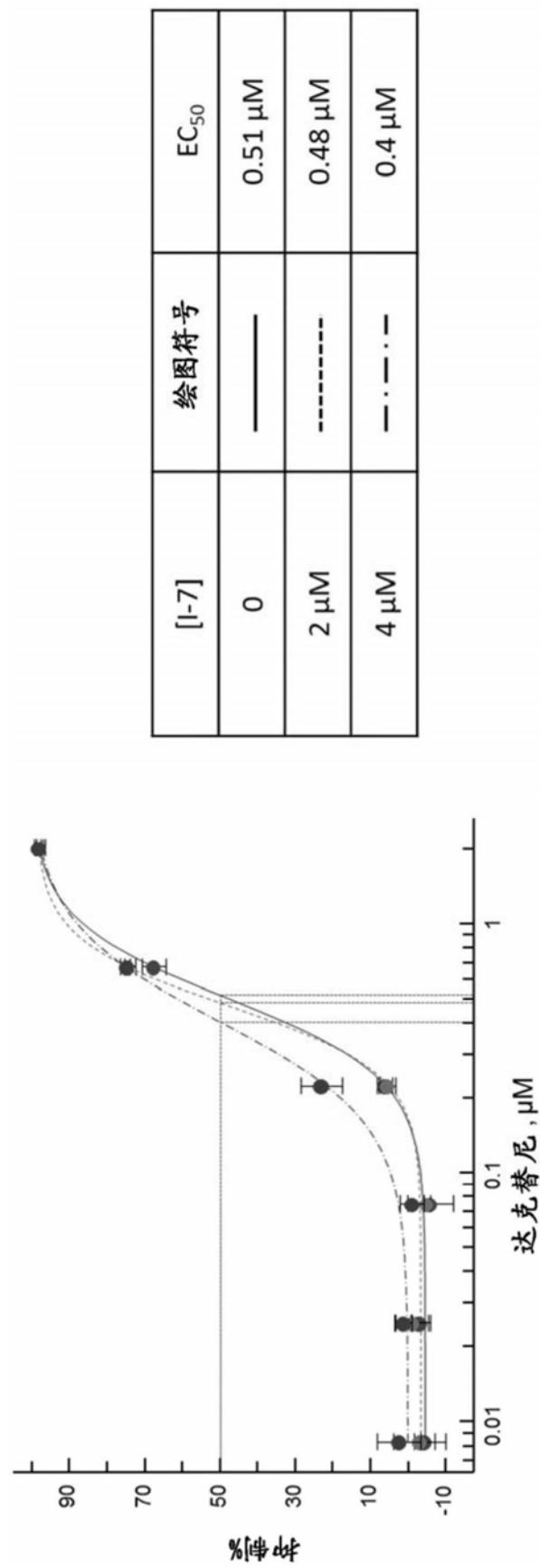


图22

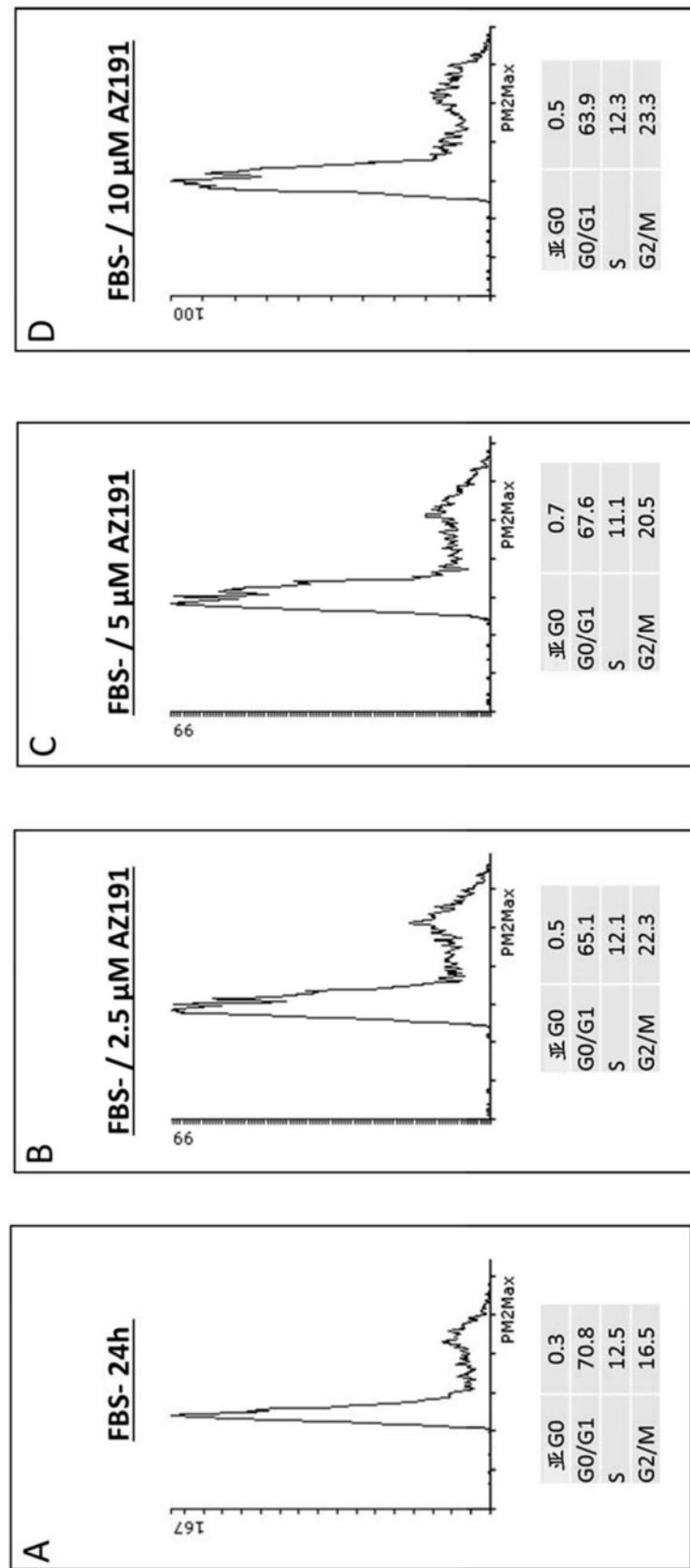


图23

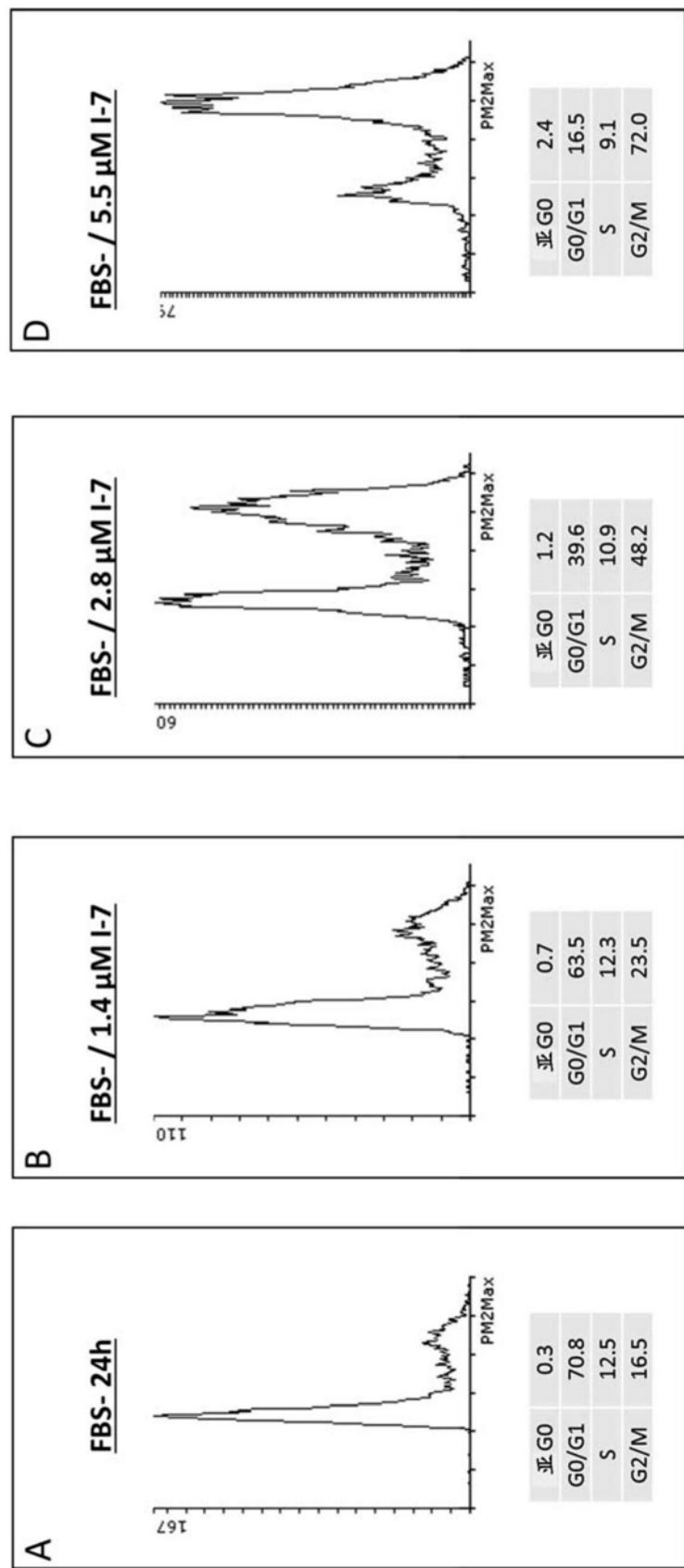
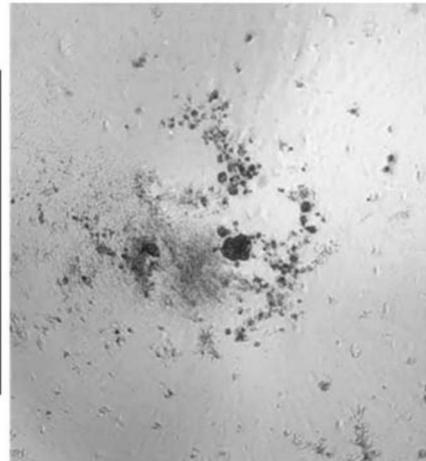
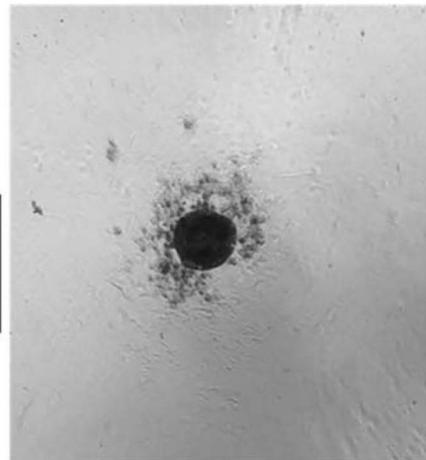


图24

阿法替尼 + FX-9847



阿法替尼



NT

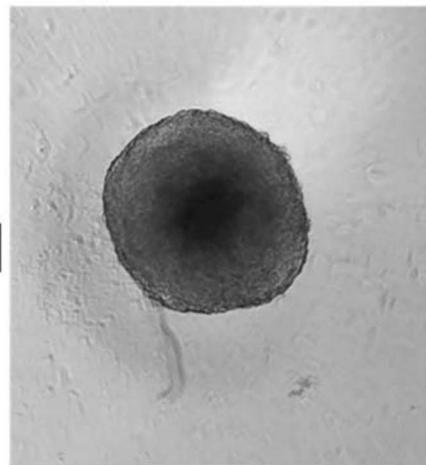


图25

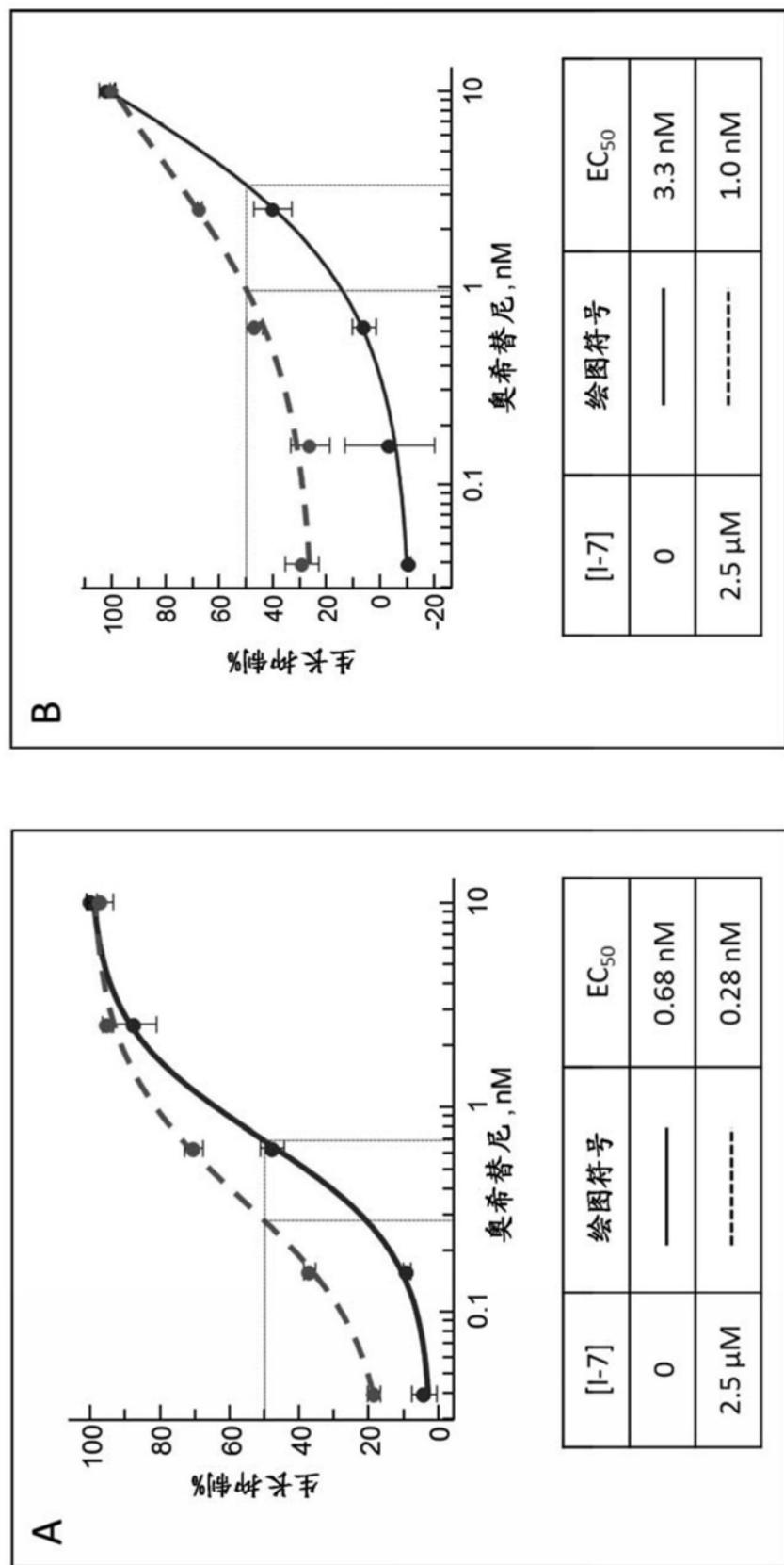


图26