



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111372588 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 201880076725.5

S.兰德雷特 S.盖尔 J.格罗茨克

(22)申请日 2018.09.27

M.赫尔南德斯 P.R.杨

J.M.罗思伯格

(30)优先权数据

62/563,991 2017.09.27 US

62/587,886 2017.11.17 US

62/688,079 2018.06.21 US

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 梅黎

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.05.27

(51)Int.Cl.

A61K 31/52(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/435(2006.01)

A61K 31/4709(2006.01)

A61K 31/496(2006.01)

A61K 31/704(2006.01)

A61K 31/7068(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/053025 2018.09.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/067666 EN 2019.04.04

(71)申请人 人工智能治疗公司

地址 美国康涅狄格州

(72)发明人 H.利钦斯坦 N.比哈里

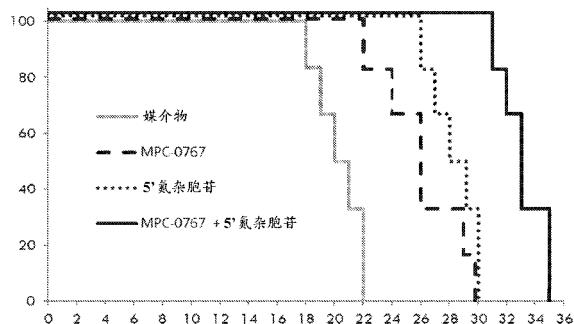
权利要求书5页 说明书42页 附图26页

(54)发明名称

与HSP90抑制剂相关的治疗方法

(57)摘要

本公开提供使用HSP90抑制剂MPC-0767作为单一疗法以及与另外的活性剂(包括但不限于)Bcl-2的抑制剂、EZH2抑制剂、Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂、检查点抑制剂、DNMT抑制剂、ATO和化学治疗剂)的组合疗法来治疗癌症(包括但不限于)造血癌症和肺癌)的方法。本公开还提供相关的组合物和使用方法。



1. 一种用于在需要它的受试者中治疗癌症的方法,其包括给予所述受试者药用组合物,所述组合物包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂。

2. 权利要求1的方法,其中所述癌症对用至少一种治疗剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。

3. 权利要求1或2的方法,其中所述药用组合物包含MPC-0767的甲磺酸盐。

4. 权利要求2或3的方法,其中所述至少一种治疗剂选自厄洛替尼、阿法替尼、拉帕替尼、达可替尼、吉非替尼、AP32788、泊齐替尼、奥西替尼和EGF816。

5. 权利要求2或3的方法,其中所述至少一种治疗剂选自吉特替尼、克莱拉尼、坦度替尼、索拉非尼、米哌妥林和奎扎替尼。

6. 权利要求1-5中任何一项的方法,其中所述癌症的特征为在选自表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)和fms样酪氨酸激酶3(FLT3)的至少一种蛋白激酶中具有一种或多种激活突变。

7. 权利要求6的方法,其中所述一种或多种激活突变为EGFR或HER2外显子20插入突变(ins20)。

8. 权利要求6的方法,其中所述一种或多种激活突变为FLT3内部串联重复(ITD)。

9. 权利要求1-8中任何一项的方法,其中所述癌症选自胃癌、结肠癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、淋巴瘤、急性髓细胞性白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、胃肠道间质瘤、慢性髓细胞性白血病、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌和胰腺癌。

10. 权利要求7的方法,其中所述癌症为NSCLC。

11. 权利要求8的方法,其中所述癌症为AML。

12. 权利要求9的方法,其中所述癌症为CLL。

13. 权利要求1-12中任何一项的方法,其中所述受试者为人类。

14. 权利要求1-13中任何一项的方法,其中所述药用组合物适合于口服、含服或胃肠外给予。

15. 权利要求1-14中任何一项的方法,其中所述方法进一步包括给予所述受试者一种或多种另外的活性药用成分(API)。

16. 权利要求15的方法,其中所述一种或多种另外的API为蛋白激酶抑制剂(PKI)、化学治疗剂、FLT3抑制剂、PD-1/PD-L1抑制剂、Bcl-2途径抑制剂、Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂、检查点抑制剂、增强抗肿瘤免疫力的治疗剂或EZH2抑制剂。

17. 权利要求16的方法,其中所述PKI为EGFR或HER2靶向的PKI。

18. 权利要求17的方法,其中所述PKI选自厄洛替尼、阿法替尼、拉帕替尼、达可替尼、吉非替尼、AP32788、泊齐替尼、奥西替尼和EGF816。

19. 权利要求16的方法,其中所述化学治疗剂选自多西他赛、卡铂、顺铂和培美曲塞。

20. 权利要求16的方法,其中所述FLT3抑制剂选自克莱拉尼、坦度替尼、吉特替尼、米哌妥林、奎扎替尼和索拉非尼。

21. 权利要求16的方法,其中所述PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BGB-A317、BMS936559、德瓦鲁单抗、JTX-4014、纳武单抗、派

姆单抗和SHR- 1210。

22. 权利要求16的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101 (棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746、WEHI-539、AMG-176、MIK665和S641315。

23. 权利要求16的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。

24. 权利要求22或23的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。

25. 权利要求15的方法,其中所述一种或多种另外的API选自柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷。

26. 权利要求15的方法,其中所述一种或多种另外的API选自克莱拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。

27. 权利要求15的方法,其中所述一种或多种另外的API为维特克拉。

28. 权利要求17-19中任何一项的方法,其中所述癌症为NSCLC。

29. 权利要求20-27中任何一项的方法,其中所述癌症为AML。

30. 权利要求24或27的方法,其中所述癌症为CLL。

31. 一种用于在需要它的受试者中治疗急性髓性白血病(AML)的方法,所述方法包括给予所述受试者包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物。

32. 权利要求31的方法,其中所述药用组合物包含MPC-0767的甲磺酸盐。

33. 权利要求31或32的方法,其中所述AML对用至少一种蛋白激酶抑制剂(PKI)进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。

34. 权利要求33的方法,其中所述AML对用米哌妥林、奎扎替尼、坦度替尼和索拉非尼中的一种或多种进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。

35. 权利要求31或32的方法,其中所述AML对用吉特替尼、克莱拉尼、索拉非尼、米哌妥林、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷中的一种或多种进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。

36. 权利要求31-35中任何一项的方法,其中所述AML的特征为在FLT3中具有一种或多种激活突变。

37. 权利要求36的方法,其中所述在FLT3中的一种或多种激活突变选自FLT3 ITD突变、FLT3 D835处的点突变、FLT3 I836处的点突变、点突变FLT3 N676K和点突变F691L。

38. 权利要求37的方法,其中所述在FLT3中的一种或多种激活突变为FLT3 ITD突变。

39. 权利要求31-38中任何一项的方法,其进一步包括给予所述受试者一种或多种另外的活性药剂(API)的步骤。

40. 权利要求39的方法,其中所述一种或多种另外的API为蛋白激酶抑制剂(PKI)、化学治疗剂、FLT3抑制剂、PD-1/PD-L1抑制剂、Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂、Bcl-2途径抑制剂、检查点抑制剂、增强抗肿瘤免疫力的治疗剂或EZH2抑制剂。

41. 权利要求40的方法,其中所述FLT3抑制剂选自克莱拉尼、吉特替尼、米哌妥林、奎扎替尼和索拉非尼。

42. 权利要求40的方法,其中所述PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-

0680、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BGB-A317、BMS936559、德瓦鲁单抗、JTX-4014、纳武单抗、派姆单抗和SHR-1210。

43. 权利要求40的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101(棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746、WEHI-539、AMG-176、MIK665和S641315。

44. 权利要求40的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。

45. 权利要求40的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。

46. 权利要求39的方法,其中所述一种或多种另外的API选自柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷。

47. 权利要求39的方法,其中所述一种或多种另外的API选自克莱拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。

48. 权利要求39的方法,其中所述一种或多种另外的API为维特克拉。

49. 一种药用组合物,其包含MPC-0767或其药学上可接受的盐以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂。

50. 权利要求49的药用组合物,其用于根据权利要求31-48中任何一项的方法治疗AML。

51. 一种包含MPC-0767和一种或多种另外的API的药用组合物。

52. 权利要求51的药用组合物,其中所述一种或多种另外的API选自克莱拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。

53. 权利要求51的药用组合物,其中所述一种或多种另外的API选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。

54. 权利要求53的药用组合物,其中所述一种或多种另外的API为维特克拉。

55. 权利要求31或32的方法,其中所述AML对用Bcl-2途径抑制剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。

56. 权利要求55的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂为维特克拉。

57. 权利要求55或56的方法,其进一步包括给予所述受试者一种或多种另外的活性药剂(API)。

58. 权利要求57的方法,其中所述一种或多种另外的API为蛋白激酶抑制剂(PKI)、化学治疗剂、FLT3抑制剂、PD-1/PD-L1抑制剂或Bcl-2途径抑制剂。

59. 权利要求58的方法,其中所述FLT3抑制剂选自克莱拉尼、吉特替尼、米哌妥林、奎扎替尼和索拉非尼。

60. 权利要求58的方法,其中所述PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BGB-A317、BMS936559、德瓦鲁单抗、JTX-4014、纳武单抗、派姆单抗和SHR-1210。

61. 权利要求58的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101(棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746、WEHI-539、AMG-176、MIK665和S641315。

62. 权利要求58的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。

63. 权利要求58的方法,其中所述Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克

拉。

64. 权利要求57的方法,其中所述一种或多种另外的API选自柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷。

65. 权利要求57的方法,其中所述一种或多种另外的API选自克莱拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。

66. 权利要求57的方法,其中所述一种或多种另外的API为维特克拉。

67. 权利要求31或32的方法,其进一步包括给予Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂。

68. 权利要求67的方法,其中所述RAS途径抑制剂选自Raf抑制剂比如维罗非尼、索拉非尼或达拉非尼,MEK抑制剂比如AZD6244 (司美替尼)、PD0325901、GSK1120212 (曲美替尼)、U0126-EtOH、PD184352、RDEA119 (瑞法替尼)、PD98059、BIX 02189、MEK162 (贝美替尼)、AS-703026 (匹马司替)、SL-327、BIX02188、AZD8330、TAK-733、考比替尼或PD318088,以及ERK抑制剂比如LY3214996、BVD-523或GDC-0994。

69. 权利要求49的药用组合物,其用于根据权利要求55-68中任何一项的方法治疗AML。

70. 一种用于在需要治疗AML的受试者中预测对MPC-0767的治疗反应的方法,所述方法包括确定从所述受试者获得的AML癌细胞的样品中的FLT3和RAS状态,其中FLT3正常/非FLT3-ITD和RAS突变体的状态表明所述癌细胞被预测对MPC-0767单一疗法具有抗性并且对具有MPC-0767和Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂的组合疗法有反应;和FLT3-ITD的状态表明所述癌细胞被预测对MPC-0767单一疗法有反应。

71. 一种用于在需要这种治疗的受试者中治疗AML的方法,所述方法包括确定来自所述受试者的AML癌细胞的样品中的FLT3和RAS突变体状态,并用包含MPC-0767和Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂的组合疗法治疗所述受试者,其中所述状态为FLT3正常或非FLT3-ITD和RAS突变体。

72. 权利要求69或70的方法,其中RAS突变体的状态通过NRAS或KRAS中一种或多种激活突变的存在来定义。

73. 权利要求71的方法,其中NRAS或KRAS中的所述一种或多种激活突变为编码RAS蛋白的多核苷酸序列中的突变,该突变导致选自KRAS的A146T和G13D或NRAS的Q61L、Q61H和G12D的氨基酸变化。

74. 权利要求31或32的方法,其进一步包括给予EZH2抑制剂。

75. 一种用于在需要治疗AML的受试者中预测对MPC-0767的治疗反应的方法,所述方法包括确定或接受来自所述受试者的AML癌细胞样品中的EZH2状态,其中EZH2功能丧失突变表明所述癌细胞被预测对MPC-0767疗法有反应,而EZH2功能获得突变则表明所述癌细胞被预测对MPC-0767疗法具有抗性。

76. 一种用于在需要这种治疗的受试者中治疗AML的方法,所述方法包括确定或接收来自所述受试者的AML生物样品中的AML的EZH2状态,并在所述状态为EZH2功能丧失突变的情况下用MPC-0767疗法治疗所述受试者,或在所述EZH2状态为正常或功能获得EZH2突变的情况下用包含MPC-0767和EZH2抑制剂的组合疗法治疗所述受试者。

77. 一种用于在需要治疗AML的受试者中预测对MPC-0767的治疗反应的方法,所述方法包括确定或接受从所述受试者获得的AML癌细胞样品中的KDM6A状态,其中KDM6A功能丧失突变表明所述癌细胞被预测对MPC-0767疗法具有抗性。

78. 权利要求31或32的方法,其进一步包括给予EZH2抑制剂。

79. 权利要求78的方法,其中所述EZH2抑制剂选自GSK343、EPZ6438 (他折司他)、CPI-1205、GSK2816126和PF-06821497。

80. 一种用于治疗癌症的包含MPC-0767或其药学上可接受的盐以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物。

81. 权利要求80 的药用组合物,其中所述癌症为血液恶性肿瘤或实体肿瘤。

82. 权利要求80 或81的药用组合物,其与选自化学治疗剂、增强抗肿瘤免疫力的试剂、检查点抑制剂、Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂的另外的治疗剂组合使用。

83. 权利要求82的药用组合物,其中所述化学治疗剂选自三氧化二砷或氮杂胞苷。

84. 权利要求82的药用组合物,其中所述Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂为曲美替尼。

85. 权利要求82的药用组合物,其中所述检查点抑制剂为PD-1/PD-L1信号传导的抑制剂或CTLA-4抑制剂。

## 与HSP90抑制剂相关的治疗方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及HSP90抑制剂用于治疗癌症的用途。

### [0002] 发明背景

热休克蛋白 (HSP) 为一类伴侣蛋白,其参与多种细胞过程,比如温度升高、外部应激和营养剥夺。其作为伴侣蛋白的基本作用为在这种应激下稳定蛋白质,而且还促进客户蛋白的正确折叠。

[0003] HSP90为高度保守,广泛表达的分子伴侣,在调控细胞蛋白(通常称为“客户蛋白”)的翻译后折叠、稳定性和功能,特别是对应激的反应中起重要作用(Whitesell和Lindquist, *Nature Rev. Cancer* 2005 5:761)。客户蛋白的折叠取决于HSP90的ATP酶活性,而与ATP位点结合的HSP90抑制剂可导致客户蛋白通过遍在蛋白-蛋白酶体途径降解。

[0004] HSP90由于其包括各种癌基因的客户蛋白而显著参与癌症(参见例如Shrestha等人, 2016)。一些客户蛋白对HSP90抑制剂特别有反应,并经受快速降解(Biamonte等人 *J. Med. Chem* 2010 53, 3-17)。最敏感的客户蛋白包括HER2、野生型EGFR和突变体EGFR、RAF-1、AKT、突变体BRAF、FLT3和突变体FLT3。

[0005] HSP90的表达通常在肿瘤中升高(Valbuena等人, *Mod. Pathology* 2005 18: 1343; Guo等人, 2017),并与预后不良相关(Pick等人, *Cancer Res.* 2007; Wang, J.等人, *PLoS One* 2013 8: e62876)。许多肿瘤细胞还表达已知会驱动肿瘤生长的突变或改变的蛋白形式,并且这些蛋白通过与HSP90缔合而稳定和依赖于这种缔合而发挥功能。这种缔合导致细胞内形成大型蛋白复合物,其对HSP90抑制剂具有增强的亲和力(Goldstein等人, *J. Clin. Invest.* 2015 125(12): 4559-71; Rodina等人, *Nature* 2016 538: 397)。因此,肿瘤细胞保留较高水平的HSP90抑制剂,并且给予HSP90抑制剂会导致有效的客户蛋白降解以及增殖和存活降低,而对正常细胞的活性更有限(Barrott和Haystead, *FEBS J.* 2013 280:1381)。

[0006] HSP90抑制剂已在与各种癌症(包括乳腺癌、结直肠癌、胃肠癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和肾癌)相关的临床前和早期临床研究中进行了测试。在临床试验中已经研究了至少18种HSP90抑制剂,包括BIIB021、IPI-493、MPC-3100、Debio0932、DS-2248、HSP990、XL888、SNX5422、TAS-116、BIIB028、IPI-504、KW-2478、阿螺旋霉素(alvespimycin)、坦螺旋霉素(tanespimycin)、AT13387、AUY922、PU-H71和格尼特皮(ganetespib)(参见综述Bhat等人, *J. Med. Chem* 2014 57:8718-8728; Neckers和Workman *Clin. Cancer Res.* 2012, 18, 64)。迄今为止,这些化合物均未获准用于人类,并且没有HSP90抑制剂在遗传限定的人群进行过测试。

[0007] 新出现的证据表明HSP90还可影响肿瘤免疫。一些非临床研究表明,高HSP90抑制剂剂量可抑制可能对肿瘤清除重要的免疫系统的各种组分(Bae等人, *J. Immunol.* 2007 178: 7730; Bae等人, *J. Immunol.* 2013 190:1360; Tukaj等人, *J. Inflammation* 2014 11:10)。另外,许多肿瘤细胞在其表面表达检查点抑制剂蛋白死亡配体1 (PD-L1),其可抑制局部细胞毒性T细胞活性。例如,在患者AML细胞上发现PD-L1表达,其随着疾病进展

和在复发期间增加(Salih等人, Exp. Hematol. 2006 34:888; Chen等人, Cancer Biol. Ther. 2008 7:622; Berthon等人, Cancer Immunol. Immunother 2010 59:1839),并且与总体存活较差相关(Brodzka等人, Blood 2016 128:5229)。IFN- $\gamma$ 可诱导AML肿瘤细胞上的PD-L1细胞表面表达,已知IFN- $\gamma$ 在免疫活性肿瘤微环境中表达(Berthon等人, Cancer Immunol. Immunother. 2010 59:1839; Kronig等人, Eur. J. Hematol. 2013 92:195)。

[0008] 持续需要用于治疗癌症的改进的治疗和药物组合,特别是在治疗对当前疗法为难治性的癌症或在治疗之后复发的那些方面,比如基于蛋白酪氨酸激酶抑制剂的那些。本发明使用HSP90抑制剂解决这种需要。

#### [0009] 发明概述

本公开提供与HSP90抑制剂用于在需要这种治疗的受试者,优选人类受试者中治疗癌症的用途相关的组合物和方法。所述方法通常涉及MPC-0767在治疗癌症,并且更特别地在治疗其细胞生长和/或存活特征为由激活的蛋白激酶信号传导途径驱动或依赖于激活的蛋白激酶信号传导途径的癌症,和/或对用治疗剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发的癌症中的用途。如下文更详细描述, MPC-0767当单独使用时对某些癌症显示出有效的抗癌活性,并且与其他治疗剂组合时,也显示出惊人的功效。

[0010] 本公开提供用于在需要它的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括给予受试者包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物。在实施方案中,药用组合物包含MPC-0767的甲磺酸盐。在实施方案中,药用组合物包含MPC-0767的选自以下的盐:盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐或马来酸盐。在实施方案中,需要治疗的受试者为其癌症对用至少一种治疗剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发的受试者。在实施方案中,癌症对用至少一种治疗剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中,治疗剂为蛋白激酶抑制剂。在实施方案中,治疗剂为Bcl-2抑制剂或Bcl-2途径抑制剂。在实施方案中,治疗剂选自厄洛替尼(erlotinib)、阿法替尼(afatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、达可替尼(dacomitinib)、吉非替尼(gefitinib)、AP32788、泊齐替尼(pozotinib)、奥西替尼(osimertinib)和EGF816。在其他实施方案中,治疗剂选自吉特替尼(gilteritinib)、坦度替尼(tandutinib)、克莱拉尼(crenolanib)、索拉非尼(sorafenib)、米哌妥林(midostaurin)和奎扎替尼(quizartinib)。在实施方案中,治疗剂为吉特替尼。在实施方案中,治疗剂为米哌妥林。在实施方案中,治疗剂为索拉非尼。在实施方案中,治疗剂为坦度替尼。

[0011] 在实施方案中,癌症的特征为在选自表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)和fms样酪氨酸激酶3(FLT3)的至少一种蛋白激酶中具有一种或多种激活突变。在实施方案中,一种或多种激活突变为EGFR或HER2外显子20插入突变(ins20)。在实施方案中,一种或多种激活突变为FLT3内部串联重复(ITD)。

[0012] 在实施方案中,癌症为血液恶性肿瘤或实体肿瘤。

[0013] 在实施方案中,癌症选自胃癌、结肠癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、淋巴瘤、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、胃肠道间质瘤、慢性髓细胞性白血病、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞

瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌和胰腺癌。在实施方案中，癌症为NSCLC。在实施方案中，癌症为AML。在实施方案中，癌症为CLL。在实施方案中，癌症的特征为在选自EGFR和HER的至少一种蛋白激酶中具有一种或多种激活突变，并且癌症为NSCLC。在实施方案中，癌症的特征为在FLT3中具有一种或多种激活突变，并且癌症为AML。

[0014] 根据任何前述实施方案，受试者为人类。

[0015] 根据任何前述实施方案，药用组合物适合于口服、含服或胃肠外给予。

[0016] 根据任何前述实施方案，所述方法进一步包括给予受试者一种或多种另外的活性药用成分(API)。

[0017] 在实施方案中，一种或多种另外的API为蛋白激酶抑制剂(PKI)、FLT3抑制剂、PD-1/PD-L1抑制剂、CTLA-4抑制剂、Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂、Bcl-2途径抑制剂或EZH2抑制剂。

[0018] 在实施方案中，一种或多种另外的API为PKI。在实施方案中，PKI为EGFR或HER2靶向的PKI。在实施方案中，PKI选自厄洛替尼、阿法替尼、拉帕替尼、达可替尼、吉非替尼、AP32788、泊齐替尼、奥西替尼和EGF816。根据其中API为PKI的任何实施方案，在另一个实施方案中，癌症为NSCLC。

[0019] 在实施方案中，一种或多种另外的API为FLT3抑制剂。在实施方案中，FLT3抑制剂选自坦度替尼、克莱拉尼、吉特替尼、米噪妥林、奎扎替尼和索拉非尼。根据其中API为FLT3抑制剂的任何实施方案，在另一个实施方案中，癌症为AML。

[0020] 在实施方案中，一种或多种另外的API为PD-1/PD-L1抑制剂。在实施方案中，PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、BGB-A317、BMS936559、德瓦鲁单抗(durvalumab)、JTX-4014、纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和SHR-1210。根据其中API为PD-1/PD-L1抑制剂的任何实施方案，在另一个实施方案中，癌症为AML。

[0021] 在实施方案中，Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂为曲美替尼(trametinib)。

[0022] 在实施方案中，一种或多种另外的API为Bcl-2途径抑制剂。在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101(棉酚(Gossypol))、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉(navitoclax)、奥巴克拉(obatoclax)、塞布妥克(sabutoclax)、维特克拉(venetoclax)、S 55746、WEHI-539、AMG-176、MIK665和S641315。在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉，优选地为维特克拉。根据其中API为Bcl-2途径抑制剂的任何实施方案，在另一个实施方案中，癌症为AML或CLL。

[0023] 在实施方案中，一种或多种另外的API为EZH2抑制剂。在实施方案中，EZH2抑制剂选自EPZ6438、CPI-1205、GSK343、GSK2816126、MAK-683和PF-06821497。

[0024] 在实施方案中，一种或多种另外的API为化学治疗剂。在实施方案中，化学治疗剂选自三氧化二砷或氮杂胞苷。

[0025] 在实施方案中，化学治疗剂选自多西他赛、卡铂、顺铂和培美曲塞。在其中API为化学治疗剂的实施方案中，癌症为NSCLC。

[0026] 在实施方案中，一种或多种另外的API选自柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、伊达比星

(idarubicin) 和阿糖胞苷 (cytarabine)。在其中一种或多种另外的API选自柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷的实施方案中,癌症为AML。

[0027] 在实施方案中,一种或多种另外的API选自克萊拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。在其中一种或多种另外的API选自克萊拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉的实施方案中,癌症为AML。

[0028] 本公开还提供用于在需要它的受试者中治疗急性髓性白血病 (AML) 的方法,所述方法包括给予受试者包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐和任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物。在实施方案中,药用组合物包含MPC-0767的甲磺酸盐。在实施方案中,药用组合物包含MPC-0767的选自以下的盐:盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐或马来酸盐。在实施方案中,AML对用至少一种蛋白激酶抑制剂 (PKI) 进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中,AML对用米哌妥林、奎扎替尼和索拉非尼中的一种或多种进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中,AML对用吉特替尼、克萊拉尼、索拉非尼、米哌妥林、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷中的一种或多种进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中,AML的特征为在FLT3中具有一种或多种激活突变。在实施方案中,FLT3中的一种或多种激活突变选自FLT3 ITD突变、FLT3 D835处的点突变、FLT3 I836处的点突变、点突变FLT3 N676K和点突变F691L。在实施方案中,FLT3中的一种或多种激活突变为FLT3 ITD突变。

[0029] 在一个实施方案中,AML的特征为FLT3的野生型并且没有激活Ras突变。

[0030] 在实施方案中,用于治疗AML的方法进一步包括给予受试者一种或多种另外的活性药剂 (API) 的步骤。在实施方案中,一种或多种另外的API为蛋白激酶抑制剂 (PKI)、化学治疗剂、FLT3抑制剂、PD-1/PD-L1抑制剂、Bcl-2途径抑制剂或EZH2抑制剂。在实施方案中,FLT3抑制剂选自坦度替尼、克萊拉尼、吉特替尼、米哌妥林、奎扎替尼和索拉非尼。在实施方案中,PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、BGB-A317、BMS936559、德瓦鲁单抗、JTX-4014、纳武单抗、派姆单抗和SHR-1210。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101 (棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746、WEHI-539、AMG-176、MIK665和S641315。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。在实施方案中,EZH2抑制剂选自EPZ6438、CPI-1205、GSK343、GSK2816126、MAK-683或PF-06821497。

[0031] 在实施方案中,一种或多种另外的API选自柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷。

[0032] 在实施方案中,一种或多种另外的API选自克萊拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。

[0033] 在实施方案中,一种或多种另外的API为维特克拉。

[0034] 在实施方案中,一种或多种另外的API为Raf/Ras/MAPK途径抑制剂。

[0035] 在实施方案中,一种或多种另外的API为选自三氧化二砷 (ATO)、氮杂胞苷和地西他滨的化学治疗剂。

[0036] 本公开还提供一种药用组合物,其包含MPC-0767或其药学上可接受的盐以及任选

地药学上可接受的载体或赋形剂。

[0037] 本公开还提供用于根据本文所述的方法治疗AML的包含MPC-0767或其药学上可接受的盐以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物。

[0038] 本公开还提供包含MPC-0767和一种或多种另外的API的药用组合物。在实施方案中,一种或多种另外的API选自克莱拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。在实施方案中,一种或多种另外的API选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。在实施方案中,一种或多种另外的API为维特克拉。

[0039] 在实施方案中,本公开提供用于在需要它的受试者中治疗急性髓性白血病(AML)的方法,所述方法包括给予受试者包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物,其中AML对用Bcl-2途径抑制剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中,AML在用维特克拉治疗之后已复发。在实施方案中,所述方法进一步包括给予受试者一种或多种另外的活性药剂(API)。在实施方案中,一种或多种另外的API选自蛋白激酶抑制剂(PKI)、化学治疗剂、FLT3抑制剂、PD-1/PD-L1抑制剂和Bcl-2途径抑制剂。在实施方案中,FLT3抑制剂选自克莱拉尼、吉特替尼、米哌妥林、奎扎替尼和索拉非尼。在实施方案中,PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、BGB-A317、BMS936559、德瓦鲁单抗、JTX-4014、纳武单抗、派姆单抗和SHR-1210。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101(棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746、WEHI-539、AMG-176、MIK665和S641315。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。在实施方案中,一种或多种另外的API选自柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷。在实施方案中,一种或多种另外的API选自克莱拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。在实施方案中,一种或多种另外的API为维特克拉。

[0040] 在实施方案中,本公开提供用于在需要它的受试者中治疗急性髓性白血病(AML)的方法,所述方法包括以组合治疗方案给予受试者包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物,所述组合治疗方案进一步包括给予Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂。在实施方案中,Ras途径抑制剂选自Raf抑制剂(比如维罗非尼(vemurafenib)、索拉非尼或达拉非尼(dabrafenib))、MEK抑制剂(比如AZD6244(司美替尼(Selumetinib))、PD0325901、GSK1120212(曲美替尼)、U0126-EtOH、PD184352、RDEA119(瑞法替尼(Rafametinib))、PD98059、BIX 02189、MEK162(贝美替尼(Binimetinib))、AS-703026(匹马司替(Pimasertib))、SL-327、BIX02188、AZD8330、TAK-733、考比替尼(cobimetinib)或PD318088)以及ERK抑制剂(比如LY3214996、BVD-523或GDC-0994)。

[0041] 在实施方案中,本公开提供用于在需要它的受试者中治疗急性髓性白血病(AML)的方法,所述方法包括以组合治疗方案给予受试者包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物,所述组合治疗方案进一步包括给予EZH2抑制剂(比如EPZ6438、CPI-1205、GSK343、GSK2816126、MAK-683或PF-06821497)。

[0042] 在实施方案中,本公开提供用于在需要它的受试者中治疗急性髓性白血病(AML)的方法,所述方法包括以组合治疗方案给予受试者包含治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物,所述组合治疗方案进一步包括给予选自三氧化二砷(ATO)、氮杂胞苷和地西他滨的化学治疗剂。

[0043] 在实施方案中,本公开提供用于根据本文所述的MPC-0767单一疗法或组合疗法中的任何一种方法治疗AML的包含MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物。

[0044] 本公开还提供用于在需要治疗AML的受试者中预测对MPC-0767的治疗反应的方法,所述方法包括确定从受试者获得的AML癌细胞样品中的FLT3和RAS状态,其中FLT3正常/非FLT3-ITD和RAS突变体的状态表明癌细胞被预测对MPC-0767单一疗法具有抗性并且对具有MPC-0767和Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂的组合疗法有反应;和FLT3-ITD的状态表明癌细胞被预测对MPC-0767单一疗法有反应。

[0045] 本公开还提供用于在需要这种治疗的受试者中治疗AML的方法,所述方法包括确定来自受试者的AML癌细胞样品中的FLT3和RAS突变体的状态,并用包含MPC-0767和Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂的组合疗法治疗受试者,其中状态为FLT3正常或非FLT3-ITD和RAS突变体。

[0046] 根据前述方法,Ras突变体的状态可通过NRAS或KRAS中一种或多种激活突变的存在来定义。在实施方案中,NRAS或KRAS中的一种或多种激活突变为编码RAS蛋白的多核苷酸序列中的突变,该突变导致选自KRAS的A146T和G13D或选自NRAS的Q61L、Q61H和G12D的氨基酸变化。

[0047] 本公开还提供用于在需要治疗AML的受试者中预测对MPC-0767的治疗反应的方法,所述方法包括确定或接收来自受试者的AML癌细胞样品中的EZH2状态,其中EZH2功能丧失突变表明癌细胞被预测对MPC-0767疗法有反应,而EZH2功能获得突变则表明癌细胞被预测对MPC-0767疗法具有抗性。在实施方案中,MPC-0767疗法为单一疗法或组合疗法。

[0048] 本公开还提供用于在需要这种治疗的受试者中治疗AML的方法,所述方法包括确定或接收来自受试者的AML生物样品中的AML的EZH2状态,并在状态为EZH2功能丧失突变的情况下用MPC-0767疗法治疗受试者,或在EZH2状态为正常或功能获得EZH2突变的情况下用包含MPC-0767和EZH2抑制剂的组合疗法治疗受试者。在实施方案中,MPC-0767疗法为单一疗法或组合疗法。

[0049] 本公开还提供用于在需要治疗AML的受试者中预测对MPC-0767的治疗反应的方法,所述方法包括确定或接受从受试者获得的AML癌细胞样品中的KDM6A状态,其中KDM6A功能丧失突变表明癌细胞被预测对MPC-0767疗法具有抗性。在实施方案中,MPC-0767疗法为单一疗法或组合疗法。

[0050] 附图简述

图1A-D:MPC-0767抑制EGFR或HER2中具有突变的非小细胞肺癌细胞系的生存力。图1A:HCC-827;图1B:H1975;图1C:PC-9;图1D:H1781。

[0051] 图2:MPC-0767诱导H1975细胞的细胞死亡。

[0052] 图3A-B:MPC-0767降低H1975细胞(A)和PC-9细胞(B)中的细胞表面EGFR表达。收获

之前,将细胞用MPC-0767 (1  $\mu$ M) 处理24小时,并通过流式细胞术确定EGFR的细胞表达。

[0053] 图4A-B:MPC-0767剂量依赖性地降低(A) 处理24小时之后BaF3细胞中EGFR WT和EGFR外显子20突变体(V769\_D770insASV)的细胞表面表达和(B) 处理72小时之后亲代BaF3或表达EGFR外显子20突变体(V769\_D770insASV)的BaF3的细胞生存力。

[0054] 图5A-C:MPC-0767在具有FLT3-ITD的AML细胞中具有细胞毒活性。(A) FLT3野生型细胞ME-1,和(B) 具有FLT3-ITD的MV-4-11细胞的细胞生存力,(C) 显示处理72小时的AML细胞系和原代AML细胞的EC<sub>50</sub>值的汇总数据。

[0055] 图6:处理72小时之后,MPC-0767在具有FLT3-ITD的原代AML细胞中诱导剂量依赖性细胞死亡。样品Y1265获自用吉特替尼治疗之后其AML已复发的患者。

[0056] 图7A-B:MPC-0767在AML FLT3-ITD (MV-4-11细胞)的小鼠异种移植模型中证实抗肿瘤活性。肿瘤接种后7天,小鼠(每组n=10)口服给予单独的媒介物或MPC-0767 200 mg/kg QD x 2天然后减至150 mg/kg QD x 15天。显示肿瘤大小(mm<sup>3</sup>) (A)和体重变化(B)。在MPC-0767治疗组发现5只肿瘤消退,并且用治疗发现了显著性,P <0.0001 (学生t检验)。

[0057] 图8A-C:产生对米哌妥林细胞毒性具有抗性的AML FLT3-ITD细胞(MOLM-13-R-PKC412,每幅图中的黑线)对米哌妥林(2-100 nM) (A)和克莱拉尼(0.2-100 nM) (B)具有抗性,但对MPC-0767 (20-10000 nM) (C)则没有抗性。每幅图中的灰线为MOLM-13-LUC。在评价生存力之前,将细胞处理72小时。

[0058] 图9A-C:MPC-0767在基质条件(stromal condition)下保持细胞毒活性,这赋予对FLT3抑制剂的抗性。在非基质培养基(每幅图中的黑线)或基质培养基(每幅图中的灰线)中,用吉特替尼(A)、克莱拉尼(B)或MPC-0767 (C)处理MOLM-14细胞。在评价生存力之前,将细胞处理72小时。

[0059] 图10A-D:MPC-0767降低FLT3的细胞表面表达(A, B),并随后降低下游靶标S6的磷酸化(10C, 10D)。将MV-4-11细胞(A, C)或MOLM-13细胞(B, D)用媒介物或MPC-0767处理24小时。

[0060] 图11A-C:MPC-0767消除BaF3细胞中转染的野生型和突变体FLT3的细胞表面表达(A)。在细胞毒性测定中,表达FLT3-ITD(每幅图中的灰线)和具有F691L突变(每幅图中的黑线)的工程化BaF3细胞系对克莱拉尼具有抗性(B),但对MPC-0767保持敏感(C)。

[0061] 图12:MPC-0767降低6种原代AML患者样品中干扰素- $\gamma$ 诱导的PD-L1细胞表面表达。将细胞用人类IFN- $\gamma$  (50 ng/ml)和/或MPC-0767 (1  $\mu$ M)处理24小时。

[0062] 图13A-E:MPC-0767与柔红霉素(A)、阿糖胞苷(B)、克莱拉尼(C)、索拉非尼(D)和维特克拉(E)的组合在MV-4-11细胞中显示出协同的细胞毒活性。

[0063] 图14:MPC-0767与维特克拉的组合显示出有效的抗肿瘤活性。使用MOLM-13具有FLT3-ITD的AML细胞系进行系统性存活异种移植研究。显示的是用媒介物(灰线)、MPC-0767(虚线) 100-60 mg/kg QD、维特克拉(点线) 45-33.84 mg/kg QD或MPC-0767和维特克拉的组合(实线)治疗的小鼠的存活曲线。组合相对于单独的MPC-0767、单独的维特克拉或相对于单独的媒介物P <0.001,时序(Mantel Cox)检验。

[0064] 图15:亲代和耐维特克拉(Ven-R)的MOLM-13和MV-4-11细胞中MPC-0767(左四条)或维特克拉(右四条)的EC<sub>50</sub>值。将细胞用MPC-0767或维特克拉处理72小时,并使用CTG测定法确定细胞生存力。一式两份地进行最少2个独立次数的实验,并显示平均数据 $\pm$ SD。

[0065] 图16A-B: (A) 用MPC-0767 (580 nM)、维特克拉 (2500 nM) 或组合处理24小时的MV-4-11耐维特克拉细胞的Western印迹分析。用针对PARP的抗体探测裂解物,并且组蛋白用作上样对照。上下箭头分别表示全长PARP和裂解的PARP。来自2个独立实验的所示代表性数据。(B) 在使用CellTiter-Glo® 进行生存力测定之前,用MPC-0767和维特克拉的组合处理72小时的两种耐维特克拉细胞系在ED75处的归一化等效线图。每个数据点为每个细胞系一式两份进行的2个独立实验的平均值。

[0066] 图17A-B: (A) 用MPC-0767 (1 μM)、维特克拉 (20 nM) 或组合处理24小时的MOLM-14细胞的Western印迹分析。用所示抗体探测裂解物。组蛋白用作上样对照。来自2个独立实验的所示代表性印迹。(B) 用MPC-0767 (580 nM)、维特克拉 (2500 nM) 或组合处理24小时的MV-4-11耐维特克拉细胞的Western印迹分析。用针对AKT和MCL-1的抗体探测裂解物。组蛋白用作上样对照。来自2个独立实验的所示代表性数据。

[0067] 图18:具有野生型FLT3的AML细胞的MPC-0767敏感性。用MPC-0767处理72h,然后使用CellTiter-Glo® 进行生存力确定的AML细胞系和原代AML样品的EC<sub>50</sub>值的点状图。使用细胞系进行的实验进行2个独立次数,每次一式两份,而原代AML母细胞测定一次,一式两份。几何平均值用水平线显示。

[0068] 图19A-B:CRISPR将表观遗传调控确定为MPC-0767敏感性的关键决定因素。(A) 前20种sgRNA的基因本体分析。(B) 显示来自合并的A和B GeCKO子库的媒介物和MPC-0767处理的CRISPR池中KDM6A的归一化sgRNA读取计数的富集的散点图。用于靶向KDM6A的6种单个sgRNA以黑色圆圈显示。

[0069] 图20A-B:MOLM-14和MV-4-11细胞系中用3种独立sgRNA进行的KDM6A的CRISPR介导的靶向赋予对MPC-0767的抗性。用MPC-0767 (1 μM) 处理的含有所示非靶向sgRNA或KDM6A sgRNA的MOLM-14 (A) 或MV-4-11 (B) 细胞的生存力。处理72小时之后,使用CTG评价细胞生存力。呈现的数据为一式两份进行两次的每种细胞系的单个sgRNA的平均值±SD。

[0070] 图21:用EZH2抑制剂EPZ6438或CPI-1205处理4天,然后用EZH2抑制剂和MPC-0767的组合再处理72小时,之后使用CellTiter-Glo® 测定生存力的具有FLT3-ITD的细胞系(MV-4-11)在EC<sub>75</sub>处的归一化等效线图。每个数据点为每种细胞系的3个独立实验的平均值,每个实验一式两份进行。

[0071] 图22:显示用MPC-0767 (527 nM)、三氧化二砷(ATO) (1250 nM) 或组合处理72小时的MOLM-14细胞的生存力的条形图。CI值的确定证实该组合具有协同作用(即<1)。

[0072] 图23:用MPC-0767 (800 nM)、ATO (625 nM) 或组合处理24小时的MOLM-13细胞中FLT3、pERK、pS6水平的量化。

[0073] 图24:进一步补充或不补充IL-3,并用FLT3抑制剂克萊拉尼和吉特替尼或用MPC-0767处理72小时的表达FLT3-ITD的BaF3细胞的EC<sub>50</sub>值。此时后,使用CTG确定细胞生存力并确定EC<sub>50</sub>值。图表为2个独立研究的平均值±SD,每个研究一式两份进行。

[0074] 图25:MPC-0767与5' 氮杂胞苷的组合呈现出增强的抗肿瘤活性。使用MOLM-13具有FLT3-ITD的AML细胞系进行系统性存活异种移植研究。显示的是用媒介物(灰线)、MPC-0767 (虚线) 75 mg/kg (QDx5;1天休息;QDx26)、5' 氮杂胞苷(点线) 2 mg/kg (QDx4) 或MPC-0767和5' 氮杂胞苷的组合(实线) 治疗的小鼠的存活曲线。组合相对于单独的MPC-0767、单独的5' 氮杂胞苷或相对于单独的媒介物的P < 0.001,时序(Mantel Cox) 检验。

[0075] 图26:用MPC-0767预处理的OCI-AML2细胞对T细胞介导的杀伤更为敏感。DMSO用作媒介物对照。条形代表2个独立实验的平均值 $\pm$  SD。

[0076] 图27A-D:MPC-0767在小鼠同基因模型(MC38细胞)中显示出抗肿瘤活性。肿瘤接种后11天,对小鼠(每组n = 6)口服给予单独的媒介物或150 mg/kg MPC-0767 QD x 17。显示肿瘤大小( $\text{mm}^3$ ) (P = 0.01 (学生t检验)) (A)和体重变化百分比(B)。(C) 150 mg/kg MPC-0767给药7天之后,在MC38肿瘤浸润白细胞(CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>)中测量的PD-L1水平,P < 0.05 (学生t检验)。(D) MC38肿瘤中CD4:TREG (左)和CD8:TREG (右)的比率,\* P < 0.05,\*\* P < 0.01 (学生t检验)。定义为CD45<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>的CD4 T细胞;定义为CD45<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>-</sup>的CD8 T细胞以及定义为CD45<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、FOXP3<sup>+</sup>的TREG。

[0077] 图28:显示用MPC-0767 (351 nM)、曲美替尼(25 nM)或组合处理72小时的MOLM-13细胞的生存力的条形图。CI值的确定证实该组合具有协同作用(即<1)。

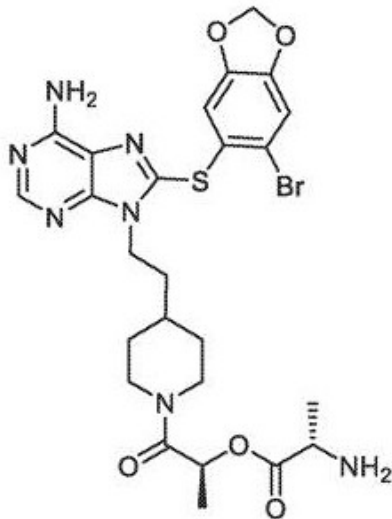
[0078] 图29A-D:PD-L1表达的MPC-0767抑制增加T细胞活化。条形图显示Jurkat报告细胞被抗CD3活化(A)和在IFN  $\gamma$  处理之后T细胞活化的PD-L1依赖性抑制(B)。A&B中的条形代表一式三份孔的平均值 $\pm$  SD,并且代表3个独立实验。C&D中的条形图表明MPC-0767降低PD-L1的细胞表面表达(C,与单独的IFN  $\gamma$  相比较,在1  $\mu\text{M}$ 下 p=0.0113和在2  $\mu\text{M}$ 下 p< 0.0001),并且还降低对T细胞活化的抑制作用(D,与单独的IFN  $\gamma$  相比较,在1  $\mu\text{M}$ 下 p = 0.0198和在2  $\mu\text{M}$ 下 p=0.0323)。C&D中的条形代表3个独立实验的平均值 $\pm$  SD。

[0079] 图30:MPC-0767在系统性体内AML模型中显示出抗肿瘤活性。MOLM-13系统性模型的Kaplan-Meier生存分析,其中小鼠口服给予媒介物或MPC-0767 (每天75或150 mg/kg)。使用时序(Mantel-Cox)检验计算统计显著性。与媒介物相比较,MPC-0767 75 mg/kg和150 mg/kg的P < 0.01。

[0080] 详述

本公开提供与MPC-0767或其药学上可接受的盐用于在需要这种治疗的受试者(优选地为人类受试者)中治疗癌症的用途相关的组合物和方法。

[0081] WO 2011/060253描述MPC-0767的母体化合物MPC-3100,包括其在人类中的口服生物利用度。MPC-3100可被确定为(2S)-1-[4-(2-{6-氨基-8-[(6-溴-1,3-苯并二氧杂环戊二烯-5-基)硫烷基]-9H-嘌呤-9-基}乙基)哌啶-1-基]-2-羟基丙-1-酮,并描述于Kim等人, *J. Med. Chem.* 2012 55, 7480-7501中。如一篇2014年的综述所述,MPC-3100不再处于积极开发(Bhat等人 *J. Med. Chem.* 2014 57:8718- 8724)。尽管MPC-3100成功地完成了I期临床研究,但溶解性差阻碍了其进一步的临床开发(Kim等人 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25:5254-5257) (2015)。MPC-0767为MPC-3100的前药,开发其以解决母体化合物的这一问题。MPC-0767显示出改善的水溶性、足够的化学稳定性和快速的生物转化(同上)。MPC-0767和相关化合物公开于WO 2012/148550中,其通过参考以其全部结合至本文中。MPC-0767主要通过酶介导的裂解过程转化为其母体化合物。以2%羧甲基纤维素配制时,其口服生物利用度与母体化合物(40% Captisol<sup>™</sup>)相似。MPC-0767在N-87异种移植肿瘤模型中也显示出与母体化合物相似的功效。N-87细胞为人类HER2阳性胃癌细胞。MPC-0767的结构如下所示。



[0082] 在此处所述的组合物和方法的实施方案中, MPC-0767的药学上可接受的盐为甲磺酸盐。因此, 在实施方案中, 本公开提供在需要这种治疗的受试者, 优选人类受试者中治疗癌症的方法, 所述方法包括给予受试者有效量的MPC-0767的甲磺酸盐。在实施方案中, MPC-0767的甲磺酸盐呈药用组合物的形式。在实施方案中, 药用组合物不包含环糊精。包含MPC-0767及其盐的药用组合物和制剂在下文进行更详细地描述。

[0083] 本公开考虑用MPC-0767治疗癌症的单一疗法和组合疗法两种方法。组合疗法在下文讨论。在MPC-0767单一疗法的情况下, 在一些(但非全部)实施方案中, 需要治疗的受试者为患有对用“护理标准”或一线治疗剂进行的治疗无反应或为难治性的或在所述治疗之后已复发的癌症的受试者。在这种情况下, 术语“无反应的”和“难治性的”本文可互换使用, 并且将受试者对疗法的反应称为临床上不足的, 例如以稳定或减小一种或多种实体肿瘤的大小, 减慢肿瘤进展, 预防、降低或减少新肿瘤转移的发生率, 或者减轻与癌症相关的一种或多种症状。对特定药物疗法为难治性的癌症也可描述为耐药性癌症。在针对癌症的标准疗法中, 难治性癌症包括尽管进行了积极治疗但仍在进展的疾病, 而“复发性”癌症则包括没有任何当前疗法但在成功的初始疗法后进展的癌症。

[0084] 因此, 在实施方案中, 受试者为已经历用一种或多种“护理标准”治疗剂进行的一种或多种先前疗法方案的受试者。在这种情况下, 受试者的癌症可被认为是难治性或复发性的。在实施方案中, 癌症对用蛋白酶抑制剂 (PKI) 进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中, 癌症对用靶向一种或多种以下激酶的PKI进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发: 断裂点簇集区-Abelson (breakpoint cluster region-Abelson) (BCR-ABL)、B型快速加速纤维肉瘤 (B-rapidly accelerated fibrosarcoma) (B-RAF)、表皮生长因子受体 (EGFR)、人表皮生长因子受体2 (HER2)、fms样酪氨酸激酶3 (FLT3)、Janus激酶2 (JAK2)、间质-表皮转化因子 (MET) 和间变性淋巴瘤激酶 (ALK)。在实施方案中, 癌症对用靶向EGFR、HER2和FLT3中的一种或多种的PKI进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中, 癌症对用靶向BCR-ABL、B-RAF、JAK2、MET和ALK中的一种或多种的PKI进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。

[0085] 在实施方案中, 癌症对用靶向FLT3的PKI进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中, 癌症对用靶向EGFR或HER2的PKI进行的治疗为难治性的或在所述

治疗之后已复发。在实施方案中，癌症对用选自厄洛替尼、阿法替尼、拉帕替尼、达可替尼、吉非替尼、AP32788、泊齐替尼、奥西替尼和EGF816的治疗剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中，癌症对用选自吉特替尼、坦度替尼、克莱拉尼、索拉非尼、米哌妥林和奎扎替尼的治疗剂进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中，癌症为特征在于FLT3中的一种或多种激活突变的急性髓细胞性白血病(AML)。在实施方案中，FLT3中的一种或多种激活突变选自外显子14或外显子15中的FLT3内部串联重复(ITD)突变、FLT3 D835处的点突变、I836处的点突变、点突变FLT3 N676K和看门人残基中的点突变F691L。在实施方案中，FLT3中的一种或多种激活突变为FLT3 ITD突变。在实施方案中，AML对用阿糖胞苷、柔红霉素和米哌妥林中的一种或多种进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。与AML相关的另外实施方案在下文描述。

[0086] 在实施方案中，癌症对用5' 氮杂胞苷或地西他滨进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。在实施方案中，癌症对用单独的阿糖胞苷或阿糖胞苷与蒽环类药物的组合进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发。

[0087] 在实施方案中，需要治疗的受试者为其癌症特征为在选自EGFR和HER2的蛋白激酶中具有一种或多种激活突变的受试者。在实施方案中，通过本文描述的方法治疗的癌症特征在于EGFR或HER2的过表达。在实施方案中，癌症为特征在于一种或多种EGFR ins20突变或者一种或多种HER2 ins20突变或者两者的非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0088] 在实施方案中，EGFR中的一种或多种激活突变选自L858R，其可以包含或不包含看门人突变T790M。在实施方案中，EGFR突变选自外显子20插入突变(ins20)。在实施方案中，EGFR ins20突变选自以下中的一种或多种：E746\_A750del、D761\_E762insEAFQ、A763\_Y764insFQEA、Y764\_V765insHH、M766\_A767insAI、A767\_V769dupASV、A767\_S768insTLA、S768\_D770dupSVD、S768\_V769insVAS、S768\_V769insAWT、V769\_D770insASV、V769\_D770insGV、V769\_D770insCV、V769\_D770insDNV、V769\_D770insGSV、V769\_D770insGVV、V769\_D770insMASVD、D770\_N771insSVD、D770\_N771insNPG、D770\_N771insAPW、D770\_N771insD、D770\_N771insDG、D770\_N771insG、D770\_N771insGL、D770\_N771insN、D770\_N771insDPH、D770\_N771insSVP、D770\_N771insSVG、D770\_N771insMATP、delN770insGY、N771\_PinsH、N771\_P772insN、A771\_H773dupNPH、delN771insGW、delN771insGF、P772\_H773insPR、P772\_H773insYNP、P772\_H773insX、P772\_H773insDPH、P772\_H773insDNP、P772\_H773insGV、P772\_H773insN、P772\_H773insV、H773\_V774insNPH、H773\_V774insH、H773\_V774insPH、H773\_V774insGNPH、H773\_V774insdupHV、H773\_V774insG、H773\_V774insGH和V774\_C775insHV。

[0089] 在实施方案中，HER2中的一种或多种激活突变选自ins20突变。在实施方案中，HER2 ins20突变选自A775\_G776insYVMA、G776>VC、G776\_V777insCG和P781\_Y782insGSP。

[0090] 在实施方案中，受试者为患有选自以下的难治性或复发性癌症的受试者：胃癌、结肠癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、淋巴瘤、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、胃肠道间质瘤、慢性髓细胞性白血病、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌和胰腺癌。

[0091] 在实施方案中，受试者为患有选自以下的难治性或复发性癌症的受试者：急性粒细胞白血病(acute granulocytic leukemia)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic

leukemia)、急性髓性白血病(acute myelogenous leukemia)(AML)、肾上腺皮质癌(adrenal cortex carcinoma)、肾上腺肿瘤(adrenal tumor)、阑尾癌(appendiceal cancer)、B细胞淋巴瘤(B-cell lymphoma)、膀胱癌(bladder carcinoma)、脑癌(brain cancer)、乳腺癌(breast carcinoma)、子宫颈癌(cervical carcinoma)、子宫颈增生(cervical hyperplasia)、绒毛膜癌(choriocarcinoma)、慢性粒细胞白血病(chronic granulocytic leukemia)、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia)(CLL)、慢性髓性白血病(chronic myelogenous leukemia)(CML)、结直肠癌(colorectal carcinoma)、子宫内膜癌(endometrial carcinoma)、食管癌(esophageal carcinoma)、原发性血小板增多症(essential thrombocytosis)、胆囊癌(gallbladder cancer)、胃癌(gastric cancer)、胃肠癌(gastrointestinal cancer)、泌尿生殖系统癌(genitourinary carcinoma)、胶质瘤(glioma)、毛细胞白血病(hairy cell leukemia)、头或颈癌(head or neck carcinoma)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、卡波济肉瘤(Kaposi's sarcoma)、白血病(leukemia)、肺癌(lung carcinoma)、恶性类癌(malignant carcinoid carcinoma)、恶性高钙血症(malignant hypercalcemia)、恶性黑素瘤(malignant melanoma)、恶性胰腺胰岛素瘤(malignant pancreatic insulinoma)、套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma)、间皮瘤(mesothelioma)、多发性骨髓瘤(multiple myeloma)、蕈样真菌病(mycosis fungoides)、骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms)、神经母细胞瘤(neuroblastoma)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumors)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma)(NSCLC)、成骨肉瘤(osteogenic sarcoma)、卵巢癌(ovarian cancer)、卵巢癌(ovarian carcinoma)、胰腺癌(pancreatic carcinoma)、阴茎癌(penile cancer)、垂体瘤(pituitary tumor)、真性红细胞增多症(polycythemia vera)、原发性巨球蛋白血症(primary macroglobulinemia)、原发性骨髓纤维化(primary myelofibrosis)、前列腺癌(prostatic carcinoma)、肾细胞癌(renal cell carcinoma)、横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)、肉瘤(sarcoma)、皮肤癌(skin cancer)、小细胞肺癌(small-cell lung carcinoma)、软组织肉瘤(soft-tissue sarcoma)、胃癌(stomach carcinoma)、T细胞淋巴瘤(T-cell lymphoma)、睾丸癌(testicular cancer)、睾丸癌(testicular carcinoma)、甲状腺癌(thyroid carcinoma)、甲状腺肿瘤(thyroid tumor)和Wilms肿瘤(Wilms' tumor)。

[0092] 根据本文所述的方法,“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物可为例如任何哺乳动物,例如人类、灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、牛、马、山羊、骆驼、绵羊或猪。优选地,受试者为人。术语“患者”是指人类受试者。

#### [0093] 组合疗法

本公开还提供包括组合疗法的方法。本文使用的“组合疗法”或“协同疗法”包括将治疗有效量的MPC-0767或其药学上可接受的盐与至少一种另外的活性剂(本文也称为“活性药用成分”(“API”))一起,作为治疗方案的一部分给予,所述治疗方案旨在通过MPC-0767和另外的活性剂的共同作用提供有益作用。根据以下所述的实施方案,“另外的API”应理解为是指与MPC-0767的组合治疗方案给予的至少一种另外的API。另外,应该理解,在方案中可使用以下描述的多于一种另外的API。术语“组合疗法”或“组合治疗方案”并不旨在包括作

为单独的单一疗法方案的一部分给予两种或更多种治疗化合物,所述方案偶然和任意地导致无意或预测不到的有益作用。

[0094] 优选地,给予包含MPC-0767与一种或多种另外的本文所述的API的组合物在治疗的受试者中提供协同反应。在这种情况下,术语“协同的”是指组合的功效比任一单独的单一疗法的加性效应更加有效。

[0095] 通过MPC-0767和维特克拉两者的组合在体外以及系统性存活异种移植研究中针对肿瘤细胞系举例说明协同作用,如下更详细讨论的。其他实例包括MPC-0767与以下组合的协同活性:5' 氮杂胞苷、三氧化二砷(ATO)、阿糖胞苷、葱环类药物(例如柔红霉素)、FLT3酪氨酸激酶抑制剂(例如克萊拉尼和吉特替尼)、EZH2抑制剂和Ras/RAF/MEK/ERK途径抑制剂(例如曲美替尼),例如如下实施例10的表1(柔红霉素、阿糖胞苷、克萊拉尼、索拉非尼、吉特替尼和维特克拉)、实施例15(三氧化二砷),实施例17(5' 氮杂胞苷)和实施例20(曲美替尼)所示。

[0096] 除组合之外与其剂量和/或频率相比较,本公开组合疗法的协同作用可允许使用更低剂量和/或更低频率给予组合中的至少一种试剂。组合的另外有益作用可表现在避免或减少与单独使用组合中的任一疗法(也称为单一疗法)相关的不良或不希望的副作用。

[0097] 在组合疗法的情况下,MPC-0767组合物的给予可与一种或多种另外的活性剂或API的给予同时或依序进行。在另一个实施方案中,组合疗法的不同组分可以不同的频率给予。

[0098] 在一些方面,组合疗法包括将MPC-0767组合物与增强患者内源性免疫系统的抗肿瘤细胞毒活性的治疗剂组合给予。这种试剂可例如通过增强自然杀伤细胞和/或细胞毒性T细胞的抗肿瘤活性而起作用。不受任何特定理论的束缚,下文呈现的数据表明MPC-0767降低癌细胞系和原代癌细胞两者中的细胞表面PD-L1表达,从而导致针对癌细胞的T细胞活化增加。另外,MPC-0767处理可使癌细胞对T细胞介导的细胞毒性敏感。因此,在实施方案中,本公开提供通过给予MPC-0767组合物与治疗剂的组合来治疗癌症的方法,所述治疗剂增强抗肿瘤免疫力(例如涉及程序性死亡1(PD-1)受体和/或其配体(PD-L1/2)的检查点信号传导途径的抑制剂)并且可包括具有接合T细胞或自然杀伤细胞的多种特异性的治疗性抗体或其片段。在实施方案中,这些可包括双特异性抗体BiTE(双特异性T细胞接合器(bispecific T cell engager))、scBsTaFv(单链双特异性串联片段可变区(single-chain bispecific tandem fragment variable))、bsscFv(双特异性单链Fv)、BiKE(双特异性杀伤细胞接合器(bispecific killer-cell engager))、DART(双重亲和力重新靶向(Dual-Affinity Re-Targeting))、TandAb(串联双抗体(Tandem Diabodies))、sctb(单链Fv三抗体(Single-chain Fv Triplebody))、BIf(双特异性scFv免疫融合(bispecific scFv Immunofusion))和DVD-Ig(双重可变结构域免疫球蛋白(DualVariable-Domain Immunoglobulin))。

[0099] 在实施方案中,本公开提供通过给予MPC-0767组合物与增强抗肿瘤免疫力的治疗剂(例如抗CD3和CD19(Blinicyto, MGD011)、CD3和BCMA(EM801)或CD3和CD20(REGN1979)的双特异性治疗性抗体或其片段)的组合来治疗血液癌症的方法。在其中癌症为AML的实施方案中,双特异性治疗性抗体或其片段可包括靶向CD3和CD33(AMG-330、AMG-673、AMV-654)、CD3和CD123(MGD006/S80880、JNJ-63709178)、CD3和CLL-1或CD3和WT1的抗体或其片

段。在包括非小细胞肺癌 (NSCLC) 和乳腺癌在内的实体肿瘤的情况下,双特异性治疗性抗体或其片段可包括靶向CD3和EGFR (EGFRBi-aATC)、CD3和HER2 (厄妥索单抗 (ertumaxomab)) 或 CD3和EpCAM (卡妥索单抗 (Catumaxomab)、MT110/AMG 110/苏力图单抗 (Solitomab)) 的抗体或其片段。

[0100] 在实施方案中,可将另外的API配制用于与MPC-0767组合物一起以单一剂型共同给予。另外的API也可与包含MPC-0767的剂型分开给予。当另外的活性剂与MPC-0767分开给予时,其可通过相同或不同的给予途径,和/或在相同或不同的时间给予。

[0101] 在实施方案中,用于与MPC-0767的组合疗法的另外的API选自化学治疗剂、蛋白激酶抑制剂 (PKI)、FLT3抑制剂、PD-1/PD-L1抑制剂、CTLA-4抑制剂、Bcl-2途径抑制剂、Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂、EZH2抑制剂、三氧化二砷 (ATO) 和DNA甲基转移酶抑制剂 (DNMT)。

[0102] 在实施方案中,化学治疗剂为铂基抗肿瘤剂、拓扑异构酶抑制剂、核苷代谢抑制剂、烷化剂、嵌入剂、微管蛋白结合剂、DNA修复抑制剂及其组合。在实施方案中,化学治疗剂选自多西他赛、卡铂、顺铂和培美曲塞。

[0103] 在实施方案中,PKI为EGFR或HER2靶向的PKI。在实施方案中,PKI选自厄洛替尼、阿法替尼、拉帕替尼、达可替尼、吉非替尼、AP32788、泊齐替尼、奥西替尼和EGF816及其组合。

[0104] 在实施方案中,FLT3抑制剂选自克萊拉尼、坦度替尼、吉特替尼、米噪妥林、奎扎替尼和索拉非尼。

[0105] 在实施方案中,PD-1/PD-L1抑制剂为抑制PD-1及其配体PD-L1/2的信号传导的药物,并且选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特殊单抗 (Tenectriq<sup>®</sup>, MPDL3280A)、阿维鲁单抗 (MSB0010718C)、BGB-A317、BMS936559、赛米单抗 (cemiplimab) (REGN2810)、德瓦鲁单抗 (MEDI-4736)、JTX-4014、纳武单抗 (Opdivo<sup>®</sup>, BMS-936558)、派姆单抗 (Keytruda<sup>®</sup>, MK-3475) 和SHR-1210。

[0106] 在实施方案中,CTLA-4抑制剂为伊匹木单抗 (ipilimumab) (Yervoy<sup>®</sup>)。

[0107] 在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101 (棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746和WEHI-539。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自AMG-176、MIK665和S641315。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂为纳维克拉。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自TW-37 (Wang等人, *J Med Chem.* 2006 Oct 19; 49 (21):6139-42) 和HA14-1 (Wang等人, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20; 97 (13):7124-9)。

[0108] 在实施方案中,Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂选自Raf抑制剂 (比如维罗非尼、索拉非尼或达拉非尼)、MEK抑制剂 (比如AZD6244 (司美替尼)、PD0325901、GSK1120212 (曲美替尼)、U0126-EtOH、PD184352、RDEA119 (瑞法替尼)、PD98059、BIX 02189、MEK162 (贝美替尼)、AS-703026 (匹马司替)、SL-327、BIX02188、AZD8330、TAK-733、考比替尼或PD318088) 以及ERK抑制剂 (比如LY3214996、BVD-523或GDC-0994)。

[0109] 在实施方案中,EZH2抑制剂选自EPZ6438、CPI-1205、GSK343、GSK2816126、MAK-683和PF-06821497。

[0110] 在实施方案中,用于与MPC-0767的组合疗法的另外的API为三氧化二砷 (ATO)。

[0111] 在实施方案中,DNA甲基转移酶抑制剂 (DNMT) 为5' 氮杂胞苷。

[0112] 在实施方案中,用于与MPC-0767的组合疗法的另外的API选自CTLA-4抑制剂、HDAC抑制剂、ImiD、VEGF抑制剂(比如抗VEGFR抗体)、mTOR抑制剂(比如依维莫司(everolimus)或替西罗莫司(temsirolimus))、DNA甲基化抑制剂、类固醇激素激动剂或拮抗剂、代谢酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、抗CD20抗体、腺苷受体2A拮抗剂、toll受体激动剂或拮抗剂以及免疫刺激性细胞因子。

[0113] 在实施方案中,用于与MPC-0767的组合疗法的另外的API选自柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、伊达比星和阿糖胞苷及其组合。在实施方案中,另外的API选自克萊拉尼、阿糖胞苷、柔红霉素、吉特替尼、索拉非尼和维特克拉。在实施方案中,另外的API为维特克拉。

[0114] 在实施方案中,用于与MPC-0767的组合疗法的另外的API选自mTOR途径的抑制剂、PI3K抑制剂、双重PI3K/mTOR抑制剂(dual PI3K/mTOR inhibitor)、SRC抑制剂、VEGF抑制剂、Janus激酶(JAK)抑制剂、Raf抑制剂、Erk抑制剂、Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂、Akt抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、c-MET抑制剂、组蛋白调节抑制剂、抗有丝分裂剂、酪氨酸激酶抑制剂(TKI)、聚醚抗生素、CTLA-4抑制剂、多重耐药外排抑制剂、多重耐药外排抑制剂和治疗性细胞因子(比如白细胞介素2(IL-2))。

[0115] 在实施方案中,mTOR抑制剂选自雷帕霉素(也称为西罗莫司(sirolimus))、依维莫司、替西罗莫司、地磷莫司(ridaforolimus)、乌米莫司(umirolimus)、唑他莫司(zotarolimus)、AZD8055、INK128、WYE-132、Torin-1、吡唑并嘧啶类似物PP242、PP30、PP487、PP121、KU0063794、KU-BMCL-200908069-1、Wyeth-BMCL-200910075-9b、INK-128、XL388、AZD8055、P2281和P529。参见例如Liu等人 *Drug Disc. Today Ther. Strateg.*, 6(2): 47-55 (2009)。

[0116] 在实施方案中,mTOR抑制剂为反式-4-[4-氨基-5-(7-甲氧基-1H-吡啶-2-基)咪唑并[5,1-f][1,2,4]三嗪-7-基]环己烷甲酸(也称为OSI-027)及其任何盐、溶剂合物、水合物和其他物理形式(结晶或无定形的)。参见US 2007/0112005。OSI-027可根据通过参考结合至本文中的US 2007/0112005制备。在一个实施方案中,mTOR抑制剂为OXA-01。参见例如WO 2013152342 A1。

[0117] 在实施方案中,PI3K抑制剂选自GS-1101(艾代拉里斯(Idelalisib))、GDC0941(匹替利司(Pictilisib))、LY294002、BKM120(布帕利司(Buparlisib))、PI-103、TGX-221、IC-87114、XL 147、ZSTK474、BYL719、AS-605240、PIK-75、3-甲基腺嘌呤、A66、PIK-93、PIK-90、AZD6482、IPI-145(杜氟利昔(Duvelisib))、TG100-115、AS-252424、PIK294、AS-604850、GSK2636771、BAY 80-6946(库潘尼西(Copanlisib))、CH5132799、CAY10505、PIK-293、TG100713、CZC24832和HS-173。

[0118] 在实施方案中,双重PI3K/mTOR抑制剂选自GDC-094、WAY-001、WYE-354、WAY-600、WYE-687、Wyeth-BMCL-200910075-16b、Wyeth-BMCL-200910096 -27、KU0063794和KUBMCL-200908069-5、NVP-BE2235、XL-765、PF-04691502、GDC-0980(Apitolisib)、GSK1059615、PF-05212384、BGT226、PKI-402、VS-558和GSK2126458。参见例如Liu等人 *Drug Disc. Today Ther. Strateg.*, 6(2): 47-55 (2009),通过参考结合至本文中。

[0119] 在实施方案中,mTOR途径抑制剂为结合mTOR途径中的蛋白(或编码蛋白的核酸)并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹

RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、锁核酸或适体)。例如,多肽或核酸抑制mTOR复合物1(mTORC1)、mTOR的调控相关蛋白(Raptor)、带有SEC13的哺乳动物致死蛋白8(mammalian lethal with SEC13 protein 8)(MLST8)、富含脯氨酸的40 kDa Akt底物(PRAS40)、含有DEP结构域的mTOR相互作用蛋白(DEPTOR)、mTOR复合物2(mTORC2)、mTOR的雷帕霉素不敏感伴侣(RICTOR)、G蛋白β亚基样(GβL)、哺乳动物应激激活的蛋白激酶相互作用蛋白1(mSIN1)、桩蛋白(paxillin)、RhoA、Ras相关的C3肉毒毒素底物1(Rac1)、细胞分裂控制蛋白42同源物(Cdc42)、蛋白激酶Cα(PKCα)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Akt、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)、p70S6K、Ras和/或真核翻译起始因子4E(eIF4E)结合蛋白(4EBP)或编码其中这些蛋白之一的核酸。

[0120] 在实施方案中, SRC抑制剂选自博舒替尼(bosutinib)、塞卡替尼(saracatinib)、达沙替尼(dasatinib)、帕纳替尼(ponatinib)、KX2-391、XL-228、TG100435/TG100855和DCC2036。参见例如Puls等人 *Oncologist*. 2011年5月; 16(5): 566-578。在一个实施方案中, SRC抑制剂为结合SRC蛋白或编码SRC蛋白的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、锁核酸或适体)。

[0121] 在实施方案中, VEGF抑制剂选自阿昔替尼(axitinib)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、卡博替尼(cabozantinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、莫特塞尼(motesanib)、帕唑帕尼(pazopanib)、瑞格菲尼(regorafenib)、索拉非尼和舒尼替尼(sunitinib)。在实施方案中, VEGF抑制剂为结合VEGF蛋白、VEGF受体蛋白或编码这些蛋白之一的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体)。例如, VEGF抑制剂为可溶性VEGF受体(例如可溶性VEGF-C/D受体(sVEGFR-3))。

[0122] 在实施方案中, JAK抑制剂选自托法替尼(tofacitinib)、鲁索替尼(ruxolitinib)、巴瑞克替尼(baricitinib)、CYT387(CAS号1056634-68-4)、来他替尼(lestaurtinib)、帕克替尼(pacritinib)和TG101348(CAS号936091-26-8)。在一个实施方案中, JAK抑制剂为结合JAK(例如JAK1、JAK2、JAK3或TYK2)或编码JAK蛋白的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体)。

[0123] 在实施方案中, Raf抑制剂选自PLX4032(维罗非尼)、索拉非尼、PLX-4720、GSK2118436(达拉非尼)、GDC-0879、RAF265、AZ 628、NVP-BHG712、SB90885、ZM 336372、GW5074、TAK-632、CEP-32496和LGX818(康奈非尼(Encorafenib))。在实施方案中, Raf抑制剂为结合Raf(例如A-Raf、B-Raf、C-Raf)或编码Raf蛋白的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体)。

[0124] 在实施方案中, ERK抑制剂选自LY3214996、BVD-523和GDC-0994。

[0125] 在实施方案中, Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂为如上所述的Raf抑制剂或Erk抑制剂。在实施方案中, Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂为选自AZD6244(司美替尼)、PD0325901、GSK1120212(曲美替尼)、U0126-EtOH、PD184352、RDEA119(瑞法替尼)、PD98059、BIX 02189、MEK162(贝美替尼)、AS-703026(匹马司替)、SL-327、BIX02188、AZD8330、TAK-733、

考比替尼和PD318088的MEK抑制剂。在实施方案中,MEK抑制剂为结合MEK (例如MEK-1、MEK-2)或编码MEK蛋白的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体)。

[0126] 在实施方案中,Akt抑制剂选自MK-2206、KRX-0401 (哌立福新(perifosine))、GSK690693、GDC-0068 (帕他色替(Ipatasertib))、AZD5363、CCT128930、A-674563、PHT-427。在实施方案中,Akt抑制剂为结合Akt (例如Akt-1、Akt-2、Akt-3)或编码Akt蛋白的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体)。

[0127] 在实施方案中,法尼基转移酶抑制剂选自LB42708或替吡法尼(tipifarnib)。在一个实施方案中,法尼基转移酶抑制剂为结合法尼基转移酶或编码法尼基转移酶蛋白的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体)。

[0128] 在实施方案中,c-MET抑制剂选自克唑替尼(crizotinib)、替万替尼(tivantinib)、卡博替尼(cabozantinib)、福雷替尼(foretinib)。在一个实施方案中,c-MET抑制剂为结合c-MET或编码c-MET蛋白或HGF配体的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段,通过奥纳妥珠单抗(onartuzumab)例示)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体),比如费希腊妥单抗(ficlatuzumab)或利妥木单抗(rilotumumab)。

[0129] 在实施方案中,组蛋白调节抑制剂选自漆树酸、C646、MG149 (组蛋白乙酰转移酶)、GSK J4 Hcl (组蛋白去甲基化酶)、MAK-683 (PRC2抑制剂)、BIX 01294 (组蛋白甲基转移酶)、MK0683 (伏立诺他(Vorinostat))、MS275 (恩替司他(Entinostat))、LBH589 (帕比司他(Panobinostat))、曲古抑菌素A (Trichostatin A)、MGCD0103 (莫替司他(Mocetinostat))、他喹莫德(Tasquinimod)、TMP269、Nexturastat A、RG2833和PDX101 (贝利司他(Belinostat))。在实施方案中,组蛋白调节抑制剂为选自GSK343、EPZ6438 (他折司他(Tazemetostat))、CPI-1205、GSK2816126和PF-06821497的EZH2抑制剂。

[0130] 在实施方案中,抗有丝分裂剂选自灰黄霉素(Griseofulvin)、酒石酸长春瑞滨(vinorelbine tartrate)、紫杉醇、多西他赛、长春新碱、长春碱、埃坡霉素A (Epothilone A)、埃坡霉素B (Epothilone B)、ABT-751、CYT997 (Lexibulin)、酒石酸长春氟宁(vinflunine tartrate)、福他布林(Fosbretabulin)、GSK461364、ON-01910 (瑞格色替(Rigosertib))、Ro3280、BI2536、NMS-P937、BI 6727 (伏拉色替(Volasertib))、HMN-214和MLN0905。

[0131] 在实施方案中,酪氨酸激酶抑制剂(TKI)选自帕唑帕尼(Votrient)、阿昔替尼、硼替佐米(Bortezomib)、博舒替尼(Bosutinib)、卡非佐米(Carfilzomib)、克唑替尼、达拉非尼、达沙替尼、厄洛替尼、吉非替尼、依鲁替尼(Ibrutinib)、伊马替尼(Imatinib)、拉帕替尼、尼洛替尼(Nilotinib)、哌加他尼(Pegaptanib)、普纳替尼(Ponatinib)、瑞格菲尼(Regorafenib)、鲁索替尼(Ruxolitinib)、索拉非尼、舒尼替尼、曲美替尼、凡德他尼(Vandetanib)、维罗非尼和维莫德吉(Vismodegib)。

[0132] 在一个实施方案中,聚醚抗生素选自莫能菌素钠(sodium monensin)、尼日利亚菌素(nigericin)、缬氨霉素(valinomycin)、沙利霉素(salinomycin)。

[0133] 在实施方案中,CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗(tremlimumab)和伊匹木单抗。

[0134] 在实施方案中,至少一种另外的API为检查点抑制剂。用这些化合物进行的治疗通过用作免疫反应的检查和平衡的靶向分子来起作用。通过阻断这些抑制性分子或者激活刺激性分子,这些治疗旨在释放或增强预先存在的抗癌免疫反应。在实施方案中,检查点抑制剂可选自抗体,比如抗CD27抗体、抗B7-H3抗体、抗KIR抗体、抗LAG-3抗体、抗4-1BB/CD137抗体、抗GITR抗体(例如TRX518、MK-4166)、派姆单抗(Keytruda™, PD-1抗体)、MPDL3280A(PD-L1抗体)、瓦利鲁单抗(varlilumab)(CDX-1127, 抗CD27抗体)、MGA217(靶向B7-H3的抗体)、利丽单抗(lirilumab)(KIR抗体)、BMS-986016(LAG-3抗体)、乌瑞芦单抗(urelumab)(4-1BB/CD137抗体)、抗TIM3抗体、MEDI-0562(OX40抗体)、SEA-CD40(抗CD40抗体)、替西木单抗(抗CTLA4抗体)、抗OX40抗体和抗CD73抗体。在实施方案中,检查点抑制剂选自CD73的小分子抑制剂(如例如*Cancer Immunol Res* 2016; 4 (11 Suppl): 摘要 nr PR10所述)。在实施方案中,检查点抑制剂选自瓦利鲁单抗、MGA217、利丽单抗、BMS-986016、乌瑞芦单抗、MEDI-0562、SEA-CD40、TRX518或MK-4166。

[0135] 在实施方案中,另外的API为选自奥拉帕尼(olaparib)、瑞卡帕布(rucaparib)、尼拉帕尼(niraparib)、他拉唑帕尼(talazoparib)、维利帕尼(veliparib)、CEP-9722和CEP-8983的DNA修复抑制剂。

[0136] 在实施方案中,另外的API选自ddAC、帕比司他(panobinostat)、依西美坦(exemestane)、来曲唑(letrozole)、恩沙替尼(ensartinib)、美雷替尼(merestinib)、莫西司他(mocetinostat)、恩替诺特(etinostat)、莫托莫德(motolimod)、依鲁替尼、来那度胺(lenalidomide)、艾代拉里斯、恩杂鲁胺(enzalutamide)、泼尼松(prednisone)、地塞米松(dexamethasone)、长春氟宁(vinflunine)、伏立诺他、galunisertib、苯达莫司汀(bendamustine)、奥沙利铂(oxaliplatin)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、瓜德希他滨(guadecitabine)、曲美替尼、维罗非尼、达卡巴嗪(dacarbazine)、阿帕替尼(apatinib)、泊马度胺(pomalidomide)、卡非佐米、索拉非尼、5-氟尿嘧啶、CB-839、CB-1158、GDC-0919、LXH254、AZD4635、AZD9150、PLX3397、LCL161、PBF-509、Sym004、曲妥珠单抗(trastuzumab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、B-701、乌托米单抗(utomilumab)、利妥昔单抗(rituximab)、NKTR-214、聚乙二醇化干扰素2A(PEG Interferon 2A)、R07009789、MEDI9447、MK-1248、LY2510924、ARRY-382、MEDI0562、LAG525、NIS793、GWN323、JTX-2011、TSR-022和REGN3767。

[0137] 在实施方案中,另外的API针对靶向疗法,其中治疗靶向癌症的特定基因、蛋白或有助于癌症生长和存活的组织环境。这种类型的治疗阻止癌细胞的生长和扩散,同时限制对健康细胞的损害。在实施方案中,至少一种另外的API针对抗血管生成疗法,其中治疗集中于停止血管生成,后者为制造新血管的过程。由于肿瘤需要通过血管递送的营养物来生长和扩散,抗血管生成疗法的目标为“饿死”肿瘤。已显示一种抗血管生成药物贝伐珠单抗(bevacizumab)(安维汀(Avastin))减缓患有转移性肾癌的人的肿瘤生长。贝伐珠单抗与干扰素的组合减缓肿瘤生长和扩散。

[0138] 在实施方案中,另外的API针对免疫疗法,也称为生物疗法,其旨在增强身体抵抗癌症的自然防御。其使用由身体或实验室中制造的材料来改善、靶向或恢复免疫系统功能。例如,白细胞介素-2(IL-2)以及AM0010和白细胞介素-15为已用于治疗肾癌的药物。其为

由白细胞产生的称为细胞因子的细胞激素,并且在免疫系统功能(包括肿瘤细胞的破坏)方面很重要。 $\alpha$ -干扰素为另一种类型的用于治疗已经扩散的肾癌的免疫疗法。干扰素似乎改变癌细胞表面的蛋白并减缓其生长。与化学疗法组合的用于晚期肾癌患者的IL-2和 $\alpha$ -干扰素的许多组合疗法比单独的IL-2或干扰素更加有效。

[0139] 在实施方案中,另外的API为癌症疫苗,其旨在引发针对肿瘤特异性或肿瘤相关抗原的免疫反应,鼓动免疫系统攻击携带这些抗原的癌细胞。在实施方案中,癌症疫苗为AGS-003、DCVax、NY-ESO-1或源自患者癌细胞的个性化疫苗。

[0140] 在实施方案中,另外的API为免疫刺激剂(比如重组蛋白),其用于激活免疫系统以攻击癌细胞。在实施方案中,免疫刺激剂为得尼考新(denenicokin)(重组IL-21)。

[0141] 在实施方案中,另外的API为调节免疫系统以促进癌细胞消除的小分子。在实施方案中,小分子为艾卡噪司他(epacadostat)或那伏莫德(navoximod)(两者为IDO抑制剂)或PLX3397(CSF-1R的抑制剂)。

[0142] 在实施方案中,另外的API可为患者自身的免疫细胞,其已从患者体内取出,经基因修饰或用化学品处理以增强其活性,并然后以提高免疫系统的抗癌反应为目标重新引入到患者体内。

[0143] “组合疗法”还包括给予与非药物治疗(例如手术或放射治疗)进一步组合的MPC-0767。当组合疗法进一步包括非药物治疗时,非药物治疗可在任何合适的时间进行,只要实现来自治疗性化合物和非药物治疗的组合的共同作用的有益作用即可。例如,在适当情况下,当非药物治疗暂时从治疗性化合物的给予中去除(可能数天或者甚至数周)时仍获得有益作用。

[0144] 非药物治疗可选自化学疗法、放射疗法、激素疗法、抗雌激素疗法、基因疗法、手术(例如根治性肾切除术、部分肾切除术、腹腔镜和机器人手术)、射频消融和冷冻消融。例如,非药物治疗为去除卵巢(例如以降低体内雌激素水平)、胸腔穿刺(例如以从胸腔移除液体)、腹腔穿刺(例如以从腹部移除液体)、手术以移除或缩小血管平滑肌脂肪瘤、肺移植(并且任选地用抗生素以防止由于移植引起的感染)、或氧气疗法(例如通过含有置于两个鼻孔中的两个小塑料管或叉的鼻插管、通过适合鼻子和口的面罩、或通过经由颈部前面插入气管的小管,也称为经气管氧气疗法)。

[0145] 用于诊断和治疗的生物标志物测定

在实施方案中,本公开提供可用于预测癌症对用HSP90抑制剂治疗的敏感性,并且特别是对MPC-0767的敏感性的生物标志物。在这种情况下,“敏感性”是指对疗法的反应或与治疗癌症(例如以下标题为“治疗癌症”的部分所述)相关的治疗反应性。在对抗癌疗法比如MPC-0767的反应的上下文中的术语“反应性”和在对抗癌疗法比如MPC-0767治疗的敏感性的上下文中的“敏感性”本文可互换使用。

[0146] 在实施方案中,本公开提供用于治疗癌症或预测癌症对用HSP90抑制剂治疗的反应性,并且特别是对MPC-0767的敏感性的方法,所述方法包括确定或接收MPC-0767抗性或敏感性的一种或多种生物标志物的状态。例如,如本文所公开的,在FLT3中具有激活突变,并且特别是FLT3-ITD突变的AML癌细胞对MPC-0767的细胞毒活性高度敏感。因此,本公开提供用于治疗AML的方法和用于预测对用HSP90抑制剂治疗的反应性,并且特别是对MPC-0767的敏感性的方法,所述方法包括确定或接收AML的FLT3状态。

[0147] 在进一步的实施方案中, MPC-0767抗性或敏感性的一种或多种生物标志物为具有正常或野生型FLT3状态的AML细胞中NRAS或KRAS中的激活突变。在这种情况下, 术语“正常”和“野生型”可互换使用, 是指产生具有正常活性的蛋白的基因的野生型等位基因。如本文所述, 具有正常FLT3状态的AML细胞中NRAS或KRAS中的激活突变表明, 癌细胞可能对用MPC-0767治疗具有抗性, 但可能对用包含MPC-0767和Ras/Raf/MEK/ERK途径抑制剂的组合疗法治疗有反应。

[0148] 在进一步的实施方案中, MPC-0767抗性或敏感性的一种或多种生物标志物为FLT3-ITD突变或FLT3酪氨酸激酶结构域 (FLT3-TKD) 突变。

[0149] 在进一步的实施方案中, MPC-0767抗性或敏感性的一种或多种生物标志物为KDM6A或EZH2。如本文所述, KDM6A中的功能丧失突变表明癌细胞可能对用MPC-0767治疗具有抗性, 但可能对用包含MPC-0767和EZH2抑制剂的组合疗法治疗有反应。在实施方案中, 预计EZH2功能丧失突变导致对MPC-0767单一疗法有反应的癌症, 和预计EZH2功能获得突变导致对MPC-0767单一疗法具有抗性的癌症。

[0150] 本公开提供指示癌细胞对MPC-0767的细胞毒性作用具有高度敏感性的生物标志物。在实施方案中, 本公开提供在编码基因 (例如FLT3、NRAS、KRAS、KDM6A和EZH2) 的多核苷酸序列中呈一种或多种变体形式的遗传生物标志物。在实施方案中, 多核苷酸变体可导致所编码蛋白中的氨基酸变化。在实施方案中, 生物标志物为基因表达例如mRNA或蛋白质丰度例如KRAS或NRAS的表达水平的标志物。

[0151] 在实施方案中, NRAS或KRAS中的一种或多种激活突变为编码Ras蛋白的多核苷酸序列中的突变, 该突变导致选自KRAS的A146T和G13D或NRAS的Q61L、Q61H和G12D的氨基酸变化。在实施方案中, KRAS中的一种或多种激活突变选自KRAS G12 (V, C, S, R, D, N, A)、G13 (D, C)、Q22K、Q61 (H, L, R) 和K117NA146 (T/V), 其中字母命名是指IUPAC-IUB生化命名委员会 (IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission) 推荐的单字母氨基酸符号。

[0152] 在实施方案中, 一种或多种变体为基因的多核苷酸序列中的变体, 所述基因为分子信号传导或合成途径例如Ras/Raf/MEK/ERK途径、Bcl-2途径或组蛋白甲基转移酶/去甲基化酶途径的一部分。

[0153] 在实施方案中, 此处所述的方法可包括确定来自受试者的癌细胞生物样品中此处所公开的一种或多种生物标志物的存在。如上所述, 生物标志物可为多核苷酸序列中呈一种或多种变体形式的遗传生物标志物, 其可导致所编码蛋白中的氨基酸变化。因此, 此处所述的方法可包括检测多核苷酸序列中的一种或多种变体的步骤。当变体处于编码蛋白的基因的外显子中时, 可在癌细胞的基因组DNA或RNA中检测到变体。

[0154] 在实施方案中, 所述方法可包括确定受试者的基因型以检测一种或多种遗传生物标志物的存在。基因型可通过本领域已知的技术确定, 例如基于PCR的方法、DNA测序、5' 核酸外切酶荧光测定、通过探针杂交的测序、斑点印迹和寡核苷酸阵列杂交分析 (例如高通量或低密度阵列技术 (也称为微阵列和基因芯片)) 及其组合。其他特定技术可包括动态等位基因特异性杂交、分子信标、基于限制性片段长度多态性 (RFLP) 的方法、基于瓣状核酸内切酶的方法、引物延伸、基于5' 核酸酶的方法、寡核苷酸连接酶测定、单链构象多态性测定 (SSCP)、温度梯度凝胶电泳、变性高效液相色谱 (HPLC)、高分辨率熔解分析、DNA错配-结合

方法、毛细管电泳和下一代测序(NGS)方法。可用于检测SNP的实时PCR方法包括例如基于Taqman或分子信标的测定(美国专利号5210015、5487972和PCT WO 95/13399)。基因分型技术也可例如从公司比如Applied Biosystems, Inc (Foster City, CA)市售获得。

[0155] 在实施方案中,基因型可通过选自以下的方法确定:直接手动测序、自动荧光测序、单链构象多态性测定(SSCP)、钳位变性凝胶电泳(clamped denaturing gel electrophoresis) (CDGE)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、迁移率变动分析(mobility shift analysis)、限制性酶切分析、异源双链分析(heteroduplex analysis)、化学错配切割(CMC)和RNA酶保护测定。

[0156] 在实施方案中,检测生物标志物的存在的方法可包括以下步骤:使一组SNP特异性引物与从来自受试者的癌细胞样品中提取的DNA接触,允许引物与DNA结合,并使用聚合酶链反应扩增DNA的含有SNP的区域。

[0157] 在实施方案中,此处所述的方法可包括以计算机系统接收患者的此处所述一种或多种生物标志物的基因型。在一个实施方案中,用户在计算机系统中输入患者的基因型。在一个实施方案中,直接从用于确定患者基因型的设备接收患者的基因型。

[0158] 在进一步的实施方案中,生物标志物可为基因表达的标志物,例如mRNA或蛋白质丰度。用于检测此处所述生物标志物的基因表达的合适方法包括包含以下的方法:微阵列表达分析的方法、基于PCR的方法、原位杂交、Northern免疫印迹和相关探针杂交技术、单分子成像技术(比如nCounter®)或下一代测序方法(比如RNA-seq™ (Life Technologies)和SAGE technologies™)及前述的组合。在实施方案中,所述方法可包括使用合适的包括以下中的一种或多种的方法检测蛋白表达:免疫组织化学、质谱分光光度法、流式细胞术、酶联免疫吸附测定、Western免疫印迹和相关探针杂交技术、多重免疫测定(例如Luminex®、MesoScale™ Discovery、SIMOA™)、单分子成像技术(比如nCounter®)和基于适体的多重蛋白质组学技术(比如SOMAscan®)。

[0159] 在实施方案中,所述方法可进一步包括例如通过活检程序从需要治疗的受试者获得癌细胞的生物样品。在这种情况下,活检程序包括从受试者提取癌细胞样品或包含癌细胞的组织。活检可例如作为切开式活检、组织芯活检或抽吸活检(例如细针抽吸)进行。

[0160] 在实施方案中,所述方法可进一步包括从全血获得癌细胞的生物样品。

[0161] 急性髓性白血病(AML)

AML为一种造血癌症,其医疗需求严重未得到满足并且治疗选择有限。已鉴定出多种遗传病灶,其导致AML中的疾病异质性,并可能解释开发新的靶向疗法的历史性难题。参见例如Cancer Genome Atlas Research Network, NEJM 2013 368: 2059; Grimwade等人, Blood 2016 129:29; Papaemmanuil等人, NEJM 2016; 374: 2209; Breitenbuecher等人, Blood 2009 113:4074; Kindler等人, Blood 2005 105:335。在~30%的AML患者中发现细胞表面受体fms样酪氨酸激酶(FLT3)的突变,并且其与明显预后不良相关(Papaemmanuil等人, NEJM 2016; 374: 2209)。FLT3突变分为两大类。第一类是导致组成性激活的在酪氨酸激酶结构域的激活环内发生的点突变,例如在D835处的。导致组成性活性FLT3的特定点突变包括残基F691、D835、N676、I836和Y842处的突变(Kindler等人 Blood 2005)。第二类是在受体的近膜结构域中或附近发生的内部串联重复(FLT3 ITD)。这些突变的大小可在3-超过400对碱基对的范围内变化。由于其始终以3的倍数发生,因此保持阅读

框。这些重复通常包含在FLT3的外显子14内,残基590-600附近。在激酶结构域内也观察到ITD (Breitenbuecher等人, Blood 2009)。携带FLT3 ITD突变的受体为组成性自磷酸化的,并且因此为组成性活性的。FLT3途径激活参与细胞存活和细胞增殖的下游激酶,包括JAK2、STAT3、STAT5、PI3-K和AKT。PKI米哌妥林经FDA批准用于治疗AML。FLT3为HSP90的客户蛋白,并且HSP90稳定FLT3 ITD突变蛋白。诱导疗法之后较高的HSP90水平与AML患者存活较差相关。

[0162] AML的护理标准治疗为以下的组合:先用阿糖胞苷和蒽环类药物(比如柔红霉素)进行初始诱导疗法,然后再用另外的细胞毒剂(比如阿糖胞苷、米托蒽醌和/或依托泊苷)进行巩固疗法。参见Ramos等人 *J. Clin. Med.* 2015 6: 665; Pratz和Levis, *Blood* 2017 129:565。最近,米哌妥林已被美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration)批准为与“护理标准”阿糖胞苷和蒽环类药物诱导组合的一线疗法。另外的FLT3抑制剂处于临床开发中(Stone等人 *NEJM* 2017 377: 454),但是与通常的蛋白酪氨酸激酶抑制剂一样,形成对FLT3抑制剂的抗性仍然是个问题。参见例如Weisberg等人, *Oncogene* 2010 19: 5120。耐药性的一个关键机制为减少抑制剂结合的FLT3中的获得性突变。例如,用米哌妥林治疗的FLT3 ITD患者由于激酶结构域内N676K位的突变而形成抗性(Heidel等人, *Blood*. 2006),而FLT3 D835和看门人F691L突变赋予对奎扎替尼和索拉非尼的抗性。另外,来自对克莱拉尼难治性的患者的AML母细胞含有F691L突变,并且这些母细胞的离体测定证实了对克莱拉尼和吉特替尼的抗性(Lee等人, *Blood* 2017)。这些发现支持F691L突变降低克莱拉尼和吉特替尼效力的观点。形成耐药性的另一机制为通过激活其他信号传导途径,比如响应细胞微环境中的基质因子。

[0163] 如以下实施例中更详细描述,具有FLT3 ITD突变的AML细胞在体外和体内对用MPC-0767治疗均出乎意料地敏感。引人注目地,经多种不同机制(例如获得FLT3中的突变和经基质信号传导)对其他蛋白酪氨酸激酶抑制剂形成抗性的AML细胞也对MPC-0767保持敏感。另外,MPC-0767消除原代AML细胞中干扰素 $\gamma$ 诱导的PD-L1表达。进一步地,MPC-0767与用于治疗AML的许多其他活性剂(包括柔红霉素、维特克拉、阿糖胞苷、克莱拉尼、吉特替尼和索拉非尼)协同起作用。MPC-0767还在使用FLT3-ITD AML细胞的系统性异种移植研究中,显示出惊人的与维特克拉协同增效的能力,并显著改善动物存活。总之,此处呈现的结果支持MPC-0767作为治疗AML和其他癌症的有吸引力的新疗法,既可作为单一疗法,也可与其他API组合使用。

[0164] 因此,本公开提供通过给予受试者治疗有效量的MPC-0767来在需要它的受试者中治疗AML的方法。在实施方案中,有需要的受试者为其AML的特征在于在FLT3中具有一种或多种选自以下的激活突变的受试者:FLT3 ITD突变、FLT3 D835、FLT3 I836和FLT3 N676K,或在看门人残基F691处。在实施方案中,AML对用蛋白激酶抑制剂治疗为复发性/难治性的。在实施方案中,AML对用FLT3蛋白激酶抑制剂治疗为复发性/难治性的。在实施方案中,AML对用吉特替尼、克莱拉尼、坦度替尼、米哌妥林、奎扎替尼和索拉非尼中的一种或多种治疗为复发性/难治性的。

[0165] 在实施方案中,本公开还提供包含MPC-0767与AML的护理标准治疗组合的组合疗法的方法。在实施方案中,在用阿糖胞苷和蒽环类药物进行初始诱导疗法后给予MPC-0767。在实施方案中,MPC-0767在初始诱导疗法后单独或与米哌妥林、奎扎替尼、吉特替尼、克莱

拉尼、坦度替尼、维特克拉和索拉非尼中的一种或多种组合给予。在实施方案中，MPC-0767与维特克拉一起给予。

[0166] 在实施方案中，MPC-0767在包含DNA甲基转移酶抑制剂(比如5' 氮杂胞苷或地西他滨)的初始疗法后给予。在实施方案中，MPC-0767单独或与DNA甲基转移酶抑制剂组合给予。

[0167] 在实施方案中，本公开还提供包含MPC-0767与一种或多种选自以下的另外的API组合的组合疗法的方法：蒽环类药物(比如柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌和伊达比星)、阿糖胞苷、酪氨酸激酶抑制剂(TKI)(比如米喹妥林、索拉非尼、克萊拉尼、奎扎替尼、坦度替尼、吉特替尼、来他替尼、多韦替尼(dovitinib)、帕克替尼和XL999)、依托泊苷、氟达拉滨、G-CSF、氮杂胞苷、地西他滨、维特克拉、ABT-737、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、S 55746、AT-101(棉酚)和APG-1252以及任何前述的组合。

[0168] 在实施方案中，用于与MPC-0767的组合疗法给予的一种或多种另外的API选自三氧化二砷、司比定(cerubidine)(盐酸柔红霉素)、克拉芬(clafen)(环磷酰胺)、环磷酰胺、阿糖胞苷(tarabine PFS)、赛德萨-U(cytosar-U)(阿糖胞苷)、癌得星(cytoxan)(环磷酰胺)、盐酸柔红霉素(红比霉素)、盐酸多柔比星、恩西地平甲磺酸盐(enasidenib mesylate)、idamycin(盐酸伊达比星)、盐酸伊达比星idhifa(恩西地平甲磺酸盐)、米喹妥林(Rydapt)、盐酸米托蒽醌、neosar(环磷酰胺)、硫鸟嘌呤(Tabloid)、硫酸长春新碱(vincasar PFS)、氮杂胞苷和地西他滨以及任何前述的组合。

[0169] 在实施方案中，另外的API为PD-1/PD-L1抑制剂或Bcl-2途径抑制剂。在实施方案中，PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特殊单抗(MPDL3280A)、阿维鲁单抗(MSB0010718C)、BGB-A317、BMS936559、赛米单抗(REGN2810)、德瓦鲁单抗(MEDI-4736)、JTX-4014、纳武单抗(BMS-936558)、派姆单抗(Keytruda, MK-3475)和SHR-1210。

[0170] 在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101(棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746和WEHI-539。在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂选自AMG-176、MIK665和S641315。在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。在实施方案中，Bcl-2途径抑制剂为维特克拉。

[0171] 在实施方案中，Raf抑制剂选自PLX4032(维罗非尼)、索拉非尼、PLX-4720、GSK2118436(达拉非尼)、GDC-0879、RAF265、AZ 628、NVP-BHG712、SB90885、ZM 336372、GW5074、TAK-632、CEP-32496和LGX818(康奈非尼)。在实施方案中，Raf抑制剂为结合Raf(例如A-Raf、B-Raf、C-Raf)或编码Raf蛋白的核酸并抑制其表达水平或活性的多肽(例如抗体或其片段)或核酸(例如双链小干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、反义寡核苷酸、吗啉代、锁核酸或适体)。

[0172] 在实施方案中，EZH2抑制剂选自GSK343、EPZ6438(他折司他)、CPI-1205、GSK2816126和PF-06821497。

[0173] 在实施方案中，AML特征在于FLT3-ITD突变，并且所述方法包括维特克拉作为另外的API。

[0174] 在实施方案中，需要治疗的受试者为其癌症对用吉特替尼、米喹妥林或索拉非尼进行的治疗为难治性的或在所述治疗之后已复发的受试者。

[0175] 慢性淋巴细胞白血病(CLL)

CLL为成人最常见的白血病类型之一。其特征在于异常淋巴细胞的进行性积累。约10%未经治疗的CLL患者携带17p染色体缺失,其去除了肿瘤抑制活性。这种突变发生在约20%的CLL复发患者中。口服维特克拉已被美国食品药品监督管理局批准用于在患有复发性或难治性癌症并携带17p突变的患者中治疗CLL。

[0176] 如以上讨论和下文更详细显示的,MPC-0767与维特克拉的组合显示出显著的协同活性。这些结果表明,当与Bcl-2抑制剂组合给予时,MPC-0767可特别有效。如上所述和在实施例中进一步描述的,MPC-0767还消除原代AML细胞中干扰素 $\gamma$ 诱导的PD-L1表达,表明MPC-0767与PD-1/PD-L1抑制剂的组合也可特别有效。因此,本公开还提供通过给予受试者治疗有效量的MPC-0767与一种或多种另外的API的组合来在需要它的受试者中治疗CLL的方法。在实施方案中,另外的API为PD-1/PD-L1抑制剂或Bcl-2途径抑制剂。在实施方案中,PD-1/PD-L1抑制剂选自AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、阿特殊单抗(MPDL3280A)、阿维鲁单抗(MSB0010718C)、BGB-A317、BMS936559、赛米单抗(REGN2810)、德瓦鲁单抗(MEDI-4736)、JTX-4014、纳武单抗(BMS-936558)、派姆单抗(Keytruda, MK-3475)和SHR-1210。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、AT-101(棉酚)、APG-1252、A1155463、A1210477、纳维克拉、奥巴克拉、塞布妥克、维特克拉、S 55746和WEHI-539。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂为BCL2、BCLXL或MCL1的抑制剂。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自AMG-176、MIK665和S641315。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂选自ABT-737、纳维克拉和维特克拉。在实施方案中,Bcl-2途径抑制剂为维特克拉。

[0177] 非小细胞肺癌(NSCLC)

EGFR和HER2为跨膜蛋白激酶受体,其启动调控细胞分化、增殖、运动和存活的细胞内信号转导途径。这些受体的异常激活可通过导致经由受体的组成性信号传导和伴随途径的激活的点突变、缺失或插入产生。这些受体的异常激活与包括NSCLC在内的各种类型癌症的肿瘤发生直接相关。

[0178] EGFR和HER2两者也是HSP90的客户蛋白。已经显示,在用HSP90抑制剂治疗后,EGFR和HER2各自以蛋白酶体依赖性方式降解。

[0179] 约4-20%的NSCLC特征在于EGFR ins20突变。具有这些突变的癌症通常对靶向EGFR的疗法也为难治性的,或在这种疗法后复发,包括靶向EGFR的PKI。

[0180] 因此,本公开提供通过使用HSP90的药理学抑制来寻求利用某些NSCLC癌症对HSP90的依赖性以稳定突变体EGFR和HER的方法。特别是,这些方法利用在EGFR和/或HER2的外显子20中具有突变的NSCLC肿瘤的易感性。

[0181] 在实施方案中,本公开提供在需要这种治疗的受试者中治疗NSCLC的方法,所述方法包括给予受试者MPC-0767或其药学上可接受的盐。在实施方案中,受试者为患有对用针对“NSCLC”的“护理标准”或一线治疗剂进行的治疗无反应或为难治性的或在所述治疗之后已复发的癌症的受试者。

[0182] 在实施方案中,本公开还提供基于如上所述的具有MPC-0767和一种或多种另外的API的组合疗法来治疗NSCLC的方法。在实施方案中,另外的API选自阿法替尼、AP32788、泊齐替尼、奥西替尼、厄洛替尼、吉非替尼、bragatinib、达可替尼、拉帕替尼、AP32788、克唑替尼、布加替尼(brigatinib)、赛立替尼(ceritinib)、阿来替尼(alectinib)、AP26113、PF-06463922、X-396、RXDX-101、达拉非尼、曲美替尼(tremetinib)、尼达尼布(nintedanib)、玻

玛西尼(abemaciclib)、ABP 215、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗(ramucirumab)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)、伊匹木单抗、地诺单抗(denosumab)、替西木单抗(tremelimumab)、巴维昔单抗(bavituximab)、纳武单抗、阿特珠单抗、派姆单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、卡铂、顺铂、多西他赛、吉西他滨、纳米白蛋白结合型紫杉醇(Nab-paclitaxel)、紫杉醇(泰素(Taxol))、培美曲塞(pemetrexed)、长春瑞滨、依托泊苷、阿多柔比星(aldoxorubicin)、托泊替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)以及任何前述的组合。

[0183] MPC-0767的治疗有效量

在本文所述方法的上下文中,给予受试者的MPC-0767的量为治疗有效量。术语“治疗有效量”是指足以治疗所治疗的疾病或障碍、改善其症状、降低其严重性或减少其持续时间的量,或者在组合疗法的情况下,其还可包括能够改善另一疗法或活性药用成分的治疗作用的量。在本公开的上下文中,治疗有效量为足以在需要这种治疗的受试者中治疗癌症的量,如此处所述的。

[0184] 在实施方案中,MPC-0767或其药学上可接受的盐的治疗有效量为以单剂量或分剂量的基于人类受试者的总体重的每天0.01 mg/kg-100 mg/kg的范围内。在实施方案中,范围为每天递送一次、两次或三次的10-1000 mg或50-500 mg。

[0185] 在实施方案中,治疗有效量为每天递送一次、两次或三次的约10 mg、约50 mg、约75 mg、约100 mg、约250 mg、约500 mg、约750 mg或约1000 mg。

[0186] 在实施方案中,治疗有效量为每天递送一次、两次或三次的约50 mg、约75 mg、约100 mg、约200 mg、约300 mg、约400 mg或约500 mg。

[0187] 在实施方案中,MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)的治疗有效量为足以用每天给药在受试者中实现血浆 $C_{max}$ 的量,所述 $C_{max}$ 在1500 ng/ml-30000 ng/ml,优选地在6000 ng/ml-30000 ng/ml或6000 ng/ml-15000 ng/ml的范围内。

[0188] 治疗癌症

本文使用的“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”或“治疗(treat)”描述用于对抗疾病、病症或障碍的目的的患者的管理和护理,并且包括给予MPC-0767以减轻疾病、病症或障碍的症状或并发症,或者消除疾病、病症或障碍。

[0189] 在此处描述的任何方法(包括用MPC-0767的单一疗法和与一种或多种另外的API的组合疗法两者)的实施方案中,MPC-0767或其组合的给予导致消除所治疗癌症的症状或并发症,然而不需要消除癌症。在一个实施方案中,症状的严重性降低。在癌症的情况下,这种症状可包括严重性或进展的临床标志物,包括肿瘤分泌生长因子、降解细胞外基质、变得血管化、失去与并置组织的粘连或转移的程度,以及转移的数量和肿瘤大小和/或体积的减小。

[0190] 根据本文所述的方法治疗癌症可导致肿瘤大小的减小。肿瘤大小的减小也可称为“肿瘤消退”。优选地,在治疗之后,肿瘤大小相对于其治疗之前的大小减小5%或更多;更优选地,肿瘤大小减小10%或更多;更优选地,减小20%或更多;更优选地,减小30%或更多;更优选地,减小40%或更多;甚至更优选地,减小50%或更多;和最优选地,减小大于75%或更多。肿瘤的大小可通过任何可重现的测量方法进行测量。肿瘤大小可测量为肿瘤的直径。

[0191] 根据本文所述的方法治疗癌症可导致肿瘤体积的减小。优选地,在治疗之后,肿瘤体积相对于其治疗之前的大小减小5%或更多;更优选地,肿瘤体积减小10%或更多;更优选

地,减小20%或更多;更优选地,减小30%或更多;更优选地,减小40%或更多;甚至更优选地,减小50%或更多;和最优选地,减小大于75%或更多。肿瘤体积可通过任何可重现的测量方法进行测量。

[0192] 根据本文所述的方法治疗癌症可导致肿瘤数量的减少。优选地,在治疗之后,肿瘤数量相对于治疗之前的数量减少5%或更多;更优选地,肿瘤数量减少10%或更多;更优选地,减少20%或更多;更优选地,减少30%或更多;更优选地,减少40%或更多;甚至更优选地,减少50%或更多;和最优选地,减少大于75%。肿瘤数量可通过任何可重现的测量方法进行测量。肿瘤的数量可通过计数肉眼或以指定的放大倍数可见的肿瘤进行测量。优选地,指定的放大倍数为2x、3x、4x、5x、10x或50x。对于血液癌症,计数可为血液样品中与癌症(例如淋巴瘤或白血病细胞)相关的细胞数量。

[0193] 根据本文所述的方法治疗癌症可导致远离原发性肿瘤部位的其他组织或器官中转移病灶的数量减少。优选地,在治疗之后,转移病灶的数量相对于治疗之前的数量减少5%或更多;更优选地,转移病灶的数量减少10%或更多;更优选地,减少20%或更多;更优选地,减少30%或更多;更优选地,减少40%或更多;甚至更优选地,减少50%或更多;和最优选地,减少大于75%。转移病灶的数量可通过任何可重现的测量方法进行测量。转移病灶的数量可通过计数肉眼或以指定的放大倍数可见的转移病灶进行测量。优选地,指定的放大倍数为2x、3x、4x、5x、10x或50x。

[0194] 与仅接受载体的群体相比较,根据本文所述的方法治疗癌症可导致所治疗的受试者群体的平均存活时间增加。优选地,平均存活时间增加超过30天;更优选地,超过60天;更优选地,超过90天;和最优选地,超过120天。群体的平均存活时间的增加可通过任何可重现的方法进行测量。例如,群体的平均存活时间的增加可通过计算群体开始治疗后的平均存活长度进行测量。群体的平均存活时间的增加也可例如通过计算群体完成第一轮治疗后的平均存活长度进行测量。

[0195] 与未经治疗的受试者群体相比较,根据本文所述的方法治疗癌症可导致所治疗的受试者群体的平均存活时间增加。优选地,平均存活时间增加超过30天;更优选地,超过60天;更优选地,超过90天;和最优选地,超过120天。群体的平均存活时间的增加可通过任何可重现方法进行测量。例如,群体的平均存活时间的增加可通过计算群体开始治疗后的平均存活长度进行测量。群体的平均存活时间的增加也可例如通过计算群体完成第一轮治疗后的平均存活长度进行测量。

[0196] 与接受用不是MPC-0767的药物进行的单一疗法的群体相比较,根据本文所述的方法治疗癌症可导致所治疗的受试者群体的平均存活时间增加。优选地,平均存活时间增加超过30天;更优选地,超过60天;更优选地,超过90天;和最优选地,超过120天。群体的平均存活时间的增加可通过任何可重现方法进行测量。例如,群体的平均存活时间的增加可通过计算群体开始治疗后的平均存活长度进行测量。群体的平均存活时间的增加也可例如通过计算群体完成第一轮治疗后的平均存活长度进行测量。

[0197] 与仅接受载体的群体相比较,根据本文所述的方法治疗癌症可导致所治疗的受试者群体的死亡率降低。与未经治疗的群体相比较,根据本文所述的方法治疗障碍、疾病或病症可导致所治疗的受试者群体的死亡率降低。与接受用不是MPC-0767的药物进行的单一疗法的群体相比较,根据本文所述的方法治疗障碍、疾病或病症可导致所治疗的受试者群体

的死亡率降低。优选地,死亡率降低超过2%;更优选地,超过5%;更优选地,超过10%;和最优选地,超过25%。所治疗的受试者群体的死亡率降低可通过任何可重现的方法进行测量。例如,群体的死亡率降低可通过计算群体开始治疗后每单位时间疾病相关死亡的平均数量进行测量。群体的死亡率降低也可例如通过计算群体完成第一轮治疗后每单位时间疾病相关死亡的平均数量进行测量。

[0198] 根据本文所述的方法治疗癌症可导致肿瘤生长速率降低。优选地,在治疗之后,肿瘤生长速率相对于治疗之前的数量减少至少5%;更优选地,肿瘤生长速率减少至少10%;更优选地,减少至少20%;更优选地,减少至少30%;更优选地,减少至少40%;更优选地,减少至少50%;甚至更优选地,减少至少50%;和最优选地,减少至少75%。肿瘤生长速率可通过任何可重现的测量方法进行测量。肿瘤生长速率可根据每单位时间肿瘤直径的变化进行测量。在一个实施方案中,在治疗之后,肿瘤生长速率可为约零并且经确定保持相同的大小,例如肿瘤已经停止生长。

[0199] 根据本文所述的方法治疗癌症可导致肿瘤再生长的减少。优选地,在治疗之后,肿瘤再生长小于5%;更优选地,肿瘤再生长小于10%;更优选地,小于20%;更优选地,小于30%;更优选地,小于40%;更优选地,小于50%;甚至更优选地,小于50%;和最优选地,小于75%。肿瘤再生长可通过任何可重现的测量方法进行测量。例如,肿瘤再生长通过测量在治疗后的先前肿瘤缩小之后肿瘤直径的增加进行测量。肿瘤再生长的减少由肿瘤在治疗已经停止之后无法复发来表明。

#### [0200] 药用组合物和制剂

本公开提供包含单独或与另外的API组合的一定量的MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)的药用组合物。根据此处所述的任何实施方案,药用组合物可适合于口服、含服或胃肠外给予。在实施方案中,药用组合物可适合于肺部给予,例如通过吸入。在实施方案中,药用组合物适合于口服给予。在实施方案中,药用组合物适合于胃肠外给予。

[0201] 在实施方案中,MPC-0767或其药学上可接受的盐(优选地为甲磺酸盐)以单一剂型与至少一种另外的API组合。在实施方案中,至少一种另外的API选自上文结合使用组合疗法的治疗方法所述的试剂。

[0202] “药用组合物”为呈适合于给予受试者的药学上可接受的形式含有本文所述化合物的制剂。本文使用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物、载体和/或剂型。

[0203] “药学上可接受的赋形剂”意指可用于制备药用组合物的赋形剂,其通常为安全的、非毒性的且既非生物学上也非在其他方面不期望的,并且包括兽医用途以及人类药用用途可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的实例包括但不限于无菌液体、水、缓冲盐水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、油类、洗涤剂、助悬剂、碳水化合物(例如葡萄糖、乳糖、蔗糖或葡聚糖)、抗氧化剂(例如抗坏血酸或谷胱甘肽)、螯合剂、低分子量蛋白或其合适的混合物。

[0204] 药用组合物可以散装或以剂量单位形式提供。为了易于给予和剂量的均匀性,尤其有利的是以剂量单位形式配制药用组合物。本文使用的术语“剂量单位形式”是指适合作为用于待治疗的受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有经计算产生期望的治疗

效果的预定量的活性化合物以及所需的药用载体。本公开的剂量单位形式的规格由活性化合物的独特特性和待实现的特定治疗效果决定并直接取决于此。剂量单位形式可为安瓿、小瓶、栓剂、糖衣丸、片剂、胶囊剂、IV袋或在气雾剂吸入器上的单一泵。

[0205] 在治疗应用中,在影响所选剂量的其他因素中,剂量根据试剂、受体患者的年龄、体重和临床状况、以及给予疗法的临床医师或从业者的经验和判断而变化。通常,剂量应为治疗有效量。剂量可以mg/kg/天的度量单位来提供(所述剂量可针对患者的体重(以kg计)、体表面积(以m<sup>2</sup>计)和年龄(以岁计)来进行调整)。药用组合物的有效量为提供如临床医师或其他符合资格观察者所注意到的客观可识别的改善的量。例如,减轻障碍、疾病或病症的症状。本文使用的术语“剂量有效方式”是指在受试者或细胞中产生期望的生物效应的药用组合物的量。

[0206] 例如,剂量单位形式可包含1 ng-2 mg、或0.1 mg-2 g、或10 mg-1 g、或50 mg-500 mg、或1 μg-20 mg、或1 μg-10 mg、或0.1 mg-2 mg。

[0207] 药用组合物可采取任何合适的形式(例如液体、气雾剂、溶液剂、吸入剂、雾剂、喷雾剂;或固体、粉剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、贴剂等)用于通过任何期望的途径(例如经肺、吸入、鼻内、口服、含服、舌下、胃肠外、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、胸膜内、鞘内、透皮、透粘膜、直肠等)给予。例如,本公开的药用组合物可呈用于通过吸入或吹入(经口或鼻)的气雾剂给予的水溶液剂或粉剂的形式、呈用于口服给予的片剂或胶囊剂的形式、呈适合于通过直接注射或通过添加到用于静脉内输注的无菌输注液体中给予的无菌水溶液剂或分散体的形式、或呈用于透皮或透粘膜给予的洗剂、霜剂、泡沫剂、贴剂、混悬剂、溶液剂或栓剂的形式。

[0208] 药用组合物可呈口服可接受的剂型的形式,包括(但不限于)胶囊剂、片剂、含服形式、糖锭剂、锭剂和呈乳剂、水性混悬剂、分散体或溶液剂形式的口服液体。胶囊剂可含有本公开的化合物与惰性填充剂和/或稀释剂比如药学上可接受的淀粉(例如玉米、马铃薯或木薯淀粉)、糖类、人造甜味剂、粉末状纤维素(比如结晶纤维素和微晶纤维素)、面粉、明胶、树胶等的混合物。在用于口服使用的片剂的情况下,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。也可加入润滑剂比如硬脂酸镁。对于呈胶囊剂形式的口服给予,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服给予水性混悬剂和/或乳剂时,本公开的化合物可悬浮或溶解于油相中,其与乳化剂和/或助悬剂结合。如果期望的话,可加入某些甜味剂和/或矫味剂和/或着色剂。

[0209] 药用组合物可呈片剂的形式。片剂可包含与惰性稀释剂或载体(比如糖或糖醇,例如乳糖、蔗糖、山梨醇或甘露醇)一起的单位剂量的本公开的化合物。片剂可进一步包含非糖衍生的稀释剂,比如碳酸钠、磷酸钙、碳酸钙或者纤维素或其衍生物(比如甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素)以及淀粉(比如玉米淀粉)。片剂可进一步包含粘合剂和制粒剂(比如聚乙烯吡咯烷酮)、崩解剂(例如可溶胀的交联聚合物,比如交联羧甲基纤维素)、润滑剂(例如硬脂酸盐)、防腐剂(例如对羟基苯甲酸酯类)、抗氧化剂(例如BHT)、缓冲剂(例如磷酸盐或枸橼酸盐缓冲剂)和泡腾剂(比如枸橼酸盐/碳酸氢盐混合物)。

[0210] 片剂可为包衣片剂。包衣可为保护膜包衣(例如蜡或涂膜)或旨在控制活性剂释放的包衣,例如延迟释放(在摄取后的预定滞后时间之后释放活性物)或在胃肠道中的特定位置处释放。后者可例如使用肠溶膜包衣(比如以商品名Eudragit®出售的那些)来实现。

[0211] 片剂制剂可通过常规压制、湿法制粒或干法制粒方法,并使用药理学上可接受的稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、表面改性剂(包括表面活性剂)、助悬剂或稳定剂来制造,所述试剂包括(但不限于)硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、月桂基硫酸钠、微晶纤维素、羧甲基纤维素钙、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、海藻酸、阿拉伯胶、黄原胶、枸橼酸钠、复合硅酸盐、碳酸钙、甘氨酸、糊精、蔗糖、山梨醇、磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、高岭土、甘露醇、氯化钠、滑石、干燥淀粉和糖粉。优选的表面改性剂包括非离子和阴离子表面改性剂。表面改性剂的代表性实例包括(但不限于)泊洛沙姆188、苯扎氯铵、硬脂酸钙、鲸蜡硬脂醇、聚西托醇(cetomacrogol)乳化蜡、失水山梨醇酯、胶体二氧化硅、磷酸盐、十二烷基硫酸钠、硅酸镁铝和三乙醇胺。

[0212] 药用组合物可呈硬或软明胶胶囊剂的形式。根据该制剂,本公开的化合物可呈固体、半固体或液体形式。

[0213] 药用组合物可呈适合于胃肠外给予的无菌水溶液剂或分散体的形式。本文使用的术语胃肠外包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0214] 药用组合物可呈适合于通过直接注射或通过添加到用于静脉内输注的无菌输注液体中给予的无菌水溶液剂或分散体的形式,并且包含溶剂或分散介质,溶剂或分散介质含有水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其合适的混合物或者一种或多种植物油。作为游离碱或药理学上可接受的盐的本公开化合物的溶液剂或混悬剂可在适当地混有表面活性剂的水中制备。以下给出合适的表面活性剂的实例。分散体还可例如在甘油、液体聚乙二醇及其在油中的混合物中制备。

[0215] 除了存在于制剂中的任何载体或稀释剂(比如乳糖或甘露醇)之外,用于本公开方法的药用组合物可进一步包含一种或多种添加剂。一种或多种添加剂可包含一种或多种表面活性剂或者由其组成。表面活性剂一般地具有一个或多个长脂肪族链(比如脂肪酸),这使其能够直接插入到细胞的脂质结构中以增强药物渗透和吸收。通常用于表征表面活性剂的相对亲水性和疏水性的经验参数为亲水亲油平衡值("HLB"值)。具有较低HLB值的表面活性剂更加疏水,且在油中具有更高的溶解性,而具有较高HLB值的表面活性剂更加亲水,且在水溶液中具有更高的溶解性。由此,亲水性表面活性剂通常被认为是具有大于约10的HLB值的那些化合物,和疏水性表面活性剂通常为具有小于约10的HLB值的那些。然而,这些HLB值仅为指导,因为对于许多表面活性剂来说,根据选择用于测定HLB值的经验方法,HLB值可相差多达约8个HLB单位。

[0216] 在用于本公开组合物的表面活性剂中有聚乙二醇(PEG)-脂肪酸和PEG-脂肪酸单酯和二酯、PEG甘油酯、醇-油酯交换产物、聚甘油脂肪酸、丙二醇脂肪酸酯、甾醇和甾醇衍生物、聚乙二醇失水山梨醇脂肪酸酯、聚乙二醇烷基醚、糖及其衍生物、聚乙二醇烷基酚、聚氧乙烯-聚氧丙烯(POE-POP)嵌段共聚物、失水山梨醇脂肪酸酯、离子表面活性剂、脂溶性维生素及其盐、水溶性维生素及其两亲性衍生物、氨基酸及其盐、以及有机酸及其酯和酐。

[0217] 本公开还提供包含用于本公开方法的药用组合物的包装和试剂盒。试剂盒可包含一个或多个选自瓶、小瓶、安瓿、泡罩包装和注射器的容器。试剂盒可进一步包括一个或多个用于治疗 and/或预防本公开的疾病、病症或障碍的用法说明、一个或多个注射器、一个或多个涂药器或者适合于重构本公开药用组合物的无菌溶液。

[0218] 除非另外说明,本文使用的所有百分比和比率为按重量计。本公开的其他特征和

优点从不同实施例显而易见。所提供的实施例说明可用于实践本公开的不同组分和方法学。实施例不限制要求保护的公开。基于本公开,技术人员可鉴定和采用可用于实践本公开的其他组分和方法学。

## 实施例

[0219] 如以下所述的实施例所示,用MPC-0767处理AML细胞或肺癌细胞导致细胞生存力降低和关键致癌受体的不稳定。在体外和小鼠异种移植模型两者中,与不具有激活突变的细胞相比较,MPC-0767对在FLT3中表达激活突变的AML细胞系和原代细胞显示出优先的细胞毒性。另外,以下实验表明,尽管用来自基质细胞的条件培养基培养的AML细胞对各种FLT3抑制剂变得具有抗性,但其对MPC-0767仍然敏感。由于耐药性的形成通常是蛋白激酶抑制剂疗法并且特别是FLT3抑制剂疗法的关键限制,因此抗性AML细胞对MPC-0767的敏感性表明MPC-0767为治疗AML的令人兴奋的新选择。此处提供的数据表明,HSP90抑制剂(比如MPC-0767)可在FLT3中具有激活突变的AML患者中具有临床功效。此外,在由于FLT3自身的二次突变或不同信号传导途径的激活而对FLT3抑制剂具有抗性的AML细胞中,MPC-0767保持细胞毒活性。这表明HSP90抑制剂(比如MPC-0767)可在患有在用FLT3抑制剂治疗之后已复发或对FLT3抑制剂为难治性的AML的患者中具有临床功效。MPC-0767还显示出与已经建立或仍在研究用于AML治疗的疗法具有协同作用。MPC-0767还显示出惊人的与维特克拉在体外跨多种细胞系的高度协同活性以及在使用FLT3-ITD AML细胞进行的系统性存活异种移植研究中有效的组合活性。总之,这些结果支持MPC-0767作为治疗AML和其他癌症的有吸引力的新疗法,既可作为单一疗法,也可与其他API组合使用。

[0220] 实施例1: MPC-0767抑制携带EGFR和HER2突变的NSCLC细胞系的细胞生存力

将NSCLC细胞系HCC-827 (EGFR L858R)、H1975 (EGFR L858R/T790M) PC-9 (EGFR De1 E746\_A750)和H1781 (HER2 G7776insV G/C)用MPC-0767,以浓度范围为98 - 50000 nM处理3天,此时之后使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>试剂确定细胞生存力。图1显示HCC-827 (图1A)、H1975 (图1B)、PC-9 (图1C)和H1781 (图1D)细胞系的剂量反应曲线。所有EC<sub>50</sub>值均在临床可达到的浓度范围内。

[0221] 为了验证细胞生存力丧失的机制,将H1975细胞用MPC-0767 (0.7 μM)处理72小时。此时之后,将细胞分别用7-氨基放线菌素D (7-AAD)和膜联蛋白V(细胞膜完整性和凋亡的标志物)染色。如图2所示,用MPC-0767 (0.7 μM)处理H1975细胞导致活细胞(7-AAD阴性和膜联蛋白V阴性)百分比降低,和显示细胞死亡(具体地讲死亡(仅7-AAD阳性)、早期凋亡(仅膜联蛋白V阳性)或晚期凋亡/坏死(7-ADD和膜联蛋白V阳性))标志物的细胞百分比增加。

[0222] 图3显示,当处理24小时时,MPC-0767 (1 μM)降低H1975 (A)和PC-9 (B)细胞的细胞表面上的突变体EGFR。这些发现证实MPC-0767靶向并降解肺癌细胞系中的EGFR。

[0223] 为了确定MPC-0767是否也可促进EGFR exon20ins突变体的降解,使用了BaF3鼠细胞系(Warmuth等人, Curr Opin Oncol., 200719: 55-60)。该细胞系依赖于外源性IL-3进行存活/生长,但在引入癌基因后,细胞不再依赖于外源性IL-3,而是存活由引入的癌基因驱动。因此,靶向所引入的癌基因的药物将降低BaF3细胞的生存力,从而提供一种机制来筛选对抗临床中出现的相关致癌突变的小分子。

[0224] 具有EGFR野生型(WT)或EGFR外显子20 V769\_D770insASV突变体的BaF3细胞用浓度渐增的MPC-0767处理24小时。此时之后,收获细胞用于流式细胞术以评价细胞表面EGFR表达(用于检测的抗体识别WT和突变蛋白两者)。如图4A所示,MPC-0767能够降低EGFR WT ( $EC_{50} = 1 \mu\text{M}$ ),但对EGFR外显子20 V769\_D770insASV突变体更有效( $EC_{50} = 0.2 \mu\text{M}$ )。我们进一步测试了该发现是否转化为表达EGFR突变体的BaF3细胞存活降低。将亲代BaF3细胞(无突变体)或具有EGFR外显子20 V769\_D770insASV的细胞用浓度渐增的MPC-0767处理72小时,之后使用CellTiter-Glo<sup>®</sup> 确定细胞生存力。图4B显示,具有EGFR外显子20 V769\_D770insASV突变体的BaF3细胞更加依赖于HSP90,因为其对MPC-0767的敏感性为亲代细胞的约3倍(亲代 $EC_{50} = 753 \text{ nM}$ , EGFR外显子20 V769\_D770insASV突变体 $EC_{50} = 236 \text{ nM}$ )。

[0225] 总的来说,数据表明,MPC-0767通过关键致癌驱动因子的降解而对由EGFR或HER2的异常激活驱动的NSCLC有效。此外,考虑到突变蛋白对HSP90的依赖性增加,MPC-0767对突变体EGFR的活性更高,导致降解和抗肿瘤活性增强。

[0226] 实施例2:MPC-0767在具有FLT3-ITD的AML细胞中显示出有效的抗白血病活性

对指数生长的细胞系进行计数,并以最终体积为每孔90  $\mu\text{L}$ 接种到96孔透明的平底聚苯乙烯微量滴定板中。对于原代AML样品,将细胞以 $2 \times 10^4$ 个细胞的密度接种到384孔板中,最终体积为每孔27  $\mu\text{L}$ 。为了处理细胞系或原代样品,然后分别将10  $\mu\text{L}$ 或3  $\mu\text{L}$ 的10X浓度的MPC-0767添加到细胞中,使其最终浓度为10000 nM、5000 nM、2500 nM、1250 nM、625 nM、313 nM、156 nM、78 nM、39和20 nM。为了比较,用FLT3抑制剂吉特替尼(100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.3 nM、3.1 nM、1.6 nM、0.8 nM、0.4和0.2 nM)处理细胞。接种细胞并一式两份处理。温育3天之后,通过向96孔板的每孔添加100  $\mu\text{L}$ 或384孔板的每孔添加30  $\mu\text{L}$ ,经使用CellTiter-Glo<sup>®</sup> 测定系统测量细胞内ATP水平来确定细胞生存力。使用读板器检测发光。

[0227] 通过比较暴露于测试化合物的细胞与仅暴露于媒介物(DMSO)的细胞的ATP水平(每秒的发光计数)来计算药物对细胞生存力的影响。使用R DRC包(R Core Team, 2017)确定每种细胞系的半数最大有效浓度( $EC_{50}$ )。简而言之,根据(Eq-1)将剂量反应曲线用四参数逻辑回归模型(LL.4)拟合,并使用0.95的置信区间估计绝对 $EC_{50}$ 。

[0228] 图5A显示来自细胞系(ME1)的代表性剂量反应曲线,该细胞系表达野生型(WT)FMS样酪氨酸激酶3(FLT3)蛋白,而图5B显示来自细胞系(MV-4-11)的代表性剂量反应曲线,该细胞系具有FLT3内部串联重复(FLT3 ITD)。为了进一步说明MPC-0767在具有FLT3-ITD的AML细胞中比在FLT3 WT中具有更大功效,测定源于细胞系( $n=10$ )和原代样品( $n=9$ )的MPC-0767的抗白血病活性( $EC_{50}$ 值)。图5C显示该分析的输出,其中与FLT3-ITD细胞( $n=8$ )的576 nM相比,FLT3 WT细胞( $n = 11$ )的几何平均 $EC_{50}$ 值为1525 nM。这些数据表明,MPC-0767对具有FLT3-ITD的AML细胞和带有WT FLT3的AML细胞的子集显示出增强的活性。

[0229] 实施例3:MPC-0767在具有FLT3-ITD的原代AML细胞中具有细胞毒性

为了测试MPC-0767的抗白血病作用是否归因于细胞死亡的诱导,将4种原代AML样品(均具有FLT3-ITD)用浓度渐增的MPC-0767处理72小时。然后处理样品以通过流式细胞术量化对膜联蛋白V和7AAD呈阳性的细胞。这些标志物允许检测细胞死亡,具体地讲,将死亡(仅7-AAD阳性)、早期凋亡(仅膜联蛋白V阳性)或晚期凋亡/坏死(7-ADD和膜联蛋白V阳性)群体组合,以给出细胞死亡读出。

[0230] 如图6所示,用MPC-0767处理的原代AML样品显示细胞死亡呈剂量依赖性增加。值得注意的是,其中一个样品(Y1265)获自对吉特替尼复发的患者。

[0231] 这些发现表明,MPC-0767通过诱导凋亡,在具有FLT3-ITD的原代AML样品中诱导细胞死亡。此外,MPC-0767在其中患者的肿瘤在吉特替尼治疗之后已复发的情况下有效。

[0232] 实施例4:MPC-0767体内证明功效

为了在体内证明MPC-0767功效,使用MV-4-11细胞系进行了异种移植研究。每只小鼠的右肋皮下接种0.1 ml PBS/Matrigel (1:1)中的 $5 \times 10^6$ 个肿瘤细胞。当平均肿瘤体积达到 $91 \text{ mm}^3$ 大小时,将小鼠随机分为2组,每组10只。然后小鼠口服给药媒介物或MPC-0767 200 mg/kg QD x 2天,然后减至150 mg/kg QD x 15天。在指定日期进行肿瘤测量(卡尺)。如图7所示,MPC-0767诱导84%的肿瘤消退(图7A),在5/10只动物中肿瘤完全消退,对体重没有显著影响(图7B)。学生t检验用于评估这些组之间差异的统计显著性 $P < 0.0001$ 。

[0233] 该数据证实MPC-0767在体内显示出有效的抗肿瘤活性。

[0234] 实施例5:MPC-0767在耐FLT3抑制剂(米哚妥林)的细胞系中有效

在临床中,靶向FLT3的酪氨酸激酶抑制剂起初显示阳性反应,但如上所讨论的,由于通过多种机制形成耐药性,患者不可避免地会复发。为了解决MPC-0767在这种耐药性的情况下是否可能有效,我们使用以下细胞系(MOLM-13),其已经持续用米哚妥林处理以产生耐米哚妥林的细胞系,命名为MOLM-13-R-PKC412,如先前所述(Weisberg等人, PLoS One, 2011)。将用对照质粒转染的亲代MOLM-13细胞(MOLM-13-LUC)和MOLM-13-R-PKC412细胞用米哚妥林(2-100 nM) (用于验证抗性)、克萊拉尼(0.2-100 nM) (另一种FLT3抑制剂)或MPC-0767 (20-10000 nM)处理72小时。使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>评价细胞生存力,并使用公式1(如上所述),通过比较在存在不同浓度药物的情况下的细胞生存力与存在媒介物(DMSO)的情况下的生存力(设定为100%)来确定米哚妥林、克萊拉尼和MPC-0767的 $EC_{50}$ 值。如图8A所示,与对照细胞系相比较,耐米哚妥林的细胞显示出对米哚妥林的抗性增加(~2.5倍:MOLM-13-LUC  $EC_{50} = 44 \text{ nM}$ 相对于MOLM-13-R-PKC412  $EC_{50} = 112 \text{ nM}$ )。此外,如图8B所示,耐米哚妥林的细胞还对另一FLT3抑制剂克萊拉尼显示出交叉抗性(约3倍:MOLM-13-LUC  $EC_{50} = 9 \text{ nM}$ 相对于MOLM-13-R-PKC412  $EC_{50} = 25 \text{ nM}$ )。相比之下,如图8C所示,在对照细胞和耐米哚妥林的细胞之间MPC-0767的 $EC_{50}$ 值小于1.5倍(MOLM-13-LUC  $EC_{50} = 496 \text{ nM}$ 相对于MOLM-13-R-PKC412  $EC_{50} = 727 \text{ nM}$ )。

[0235] 综上所述,这些数据表明,MPC-0767在获得对FLT3抑制剂的抗性的细胞中保持抗白血病活性。

[0236] 实施例6:MPC-0767在赋予对FLT3抑制剂的抗性的条件下有效

为了确定MPC-0767是否对经其他机制(非突变的) (比如基质诱导的信号传导)获得抗性的AML细胞显示出功效,将MOLM-14细胞系(具有FLT3-ITD)接种于常规培养基(RPMI;非基质的)或HS-5细胞系条件培养基中。HS-5为人类骨髓基质细胞系,其分泌足以支持造血祖细胞生长的多种生长因子(Roecklein等人, Blood, 1995),从而模拟基质条件。然后将细胞用FLT3抑制剂吉特替尼(0.2-100 nM)或克萊拉尼(0.2-100 nM)或用MPC-0767 (20-10000 nM)处理72小时。使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>评价细胞生存力,并使用公式1(如上所述),通过比较在存在不同浓度药物的情况下的细胞生存力与存在媒介物(DMSO)的情况下的生存力(设定为100%)来确定吉特替尼、克萊拉尼和MPC-0767在非基质培养基或基质条件培养基中的

EC<sub>50</sub>值。

[0237] 如图9所示,与非基质培养基相比较,当在基质培养基中生长时MOLM-14细胞对FLT3抑制剂吉特替尼(图9A)和克莱拉尼(图9B)具有抗性(吉特替尼:基质培养基EC<sub>50</sub>> 100 nM相对于非基质培养基EC<sub>50</sub> = 6 nM。克莱拉尼:基质培养基EC<sub>50</sub>> 100 nM相对于非基质培养基EC<sub>50</sub> = 3 nM)。相比之下,如图9C所示,MPC-0767在基质和非基质两种条件下均保持抗增殖活性(基质培养基EC<sub>50</sub> = 627 nM相对于非基质培养基EC<sub>50</sub> = 423 nM)。

[0238] 这些数据表明,AML FLT3-ITD细胞在使FLT3抑制剂无效的基质条件下生长时保持对MPC-0767的敏感性。

[0239] 实施例7:MPC-0767降解AML细胞系中的FLT3-ITD

为了确定MPC-0767是否可促进FLT3-ITD的降解并消除下游信号传导,将MV-4-11和MOLM-13细胞用媒介物或MPC-0767 (1 μM)处理24小时。收获细胞用于流式细胞术以评价细胞表面FLT3蛋白的丰度。另外,S6的关键磷酸化位点(磷酸化-S6)的测量用作致癌FLT3-ITD信号传导的标志物(Zimmerman等人, Blood. 2013 122 (22): 3607-3615)。实际上,在用MPC-0767处理的MV-4-11和MOLM-13细胞两者中,细胞表面FLT3降低> 65% (分别为图10A和10B),和磷酸化-S6降低>70% (分别为图10C和10D)。

[0240] 这些发现证实,MPC-0767降解FLT3-ITD,随后减弱致癌信号传导,如磷酸化-S6信号降低所证明的。

[0241] 实施例8:MPC-0767诱导FLT3突变体降解

接下来,我们试图确定MPC-0767是否还可促进其他FLT3突变体的降解,据报道,这些突变体赋予对FLT3抑制剂的抗性。为此,我们再次利用转染了以下FLT3突变体的BaF3鼠细胞系:FLT3野生型、FLT3-ITD、D835V、FLT3-ITD D835V、D835Y、FLT3-ITD D835Y、D835H、FLT3-ITD D835H、F691L或FLT3-ITD F691L。

[0242] 嘌呤霉素选择之后,将细胞用浓度渐增的MPC-0767 (20-10000 nM)处理24小时,并然后对FLT3 (和突变体)的细胞表面表达进行染色,并通过流式细胞术对中值信号表达进行量化。

[0243] 如图11A所示,MPC-0767降低FLT3 WT的细胞表面表达。此外,MPC-0767对FLT3突变体的效力更高(与FLT3 WT相比较为约5x),表明这些突变体蛋白对HSP90的依赖性更大。

[0244] 下一步为确定MPC-0767诱导的BaF3细胞中各种突变体FLT3蛋白的降解是否具有任何功能相关性。先前已经显示,克莱拉尼有效抑制FLT3-ITD,但看门人残基F691L的突变降低克莱拉尼的功效(Zimmerman等人, Blood, 2013 122 (22): 3607-3615)。因此,测试了MPC-0767对耐TKI的FLT3-ITD F691L突变体的功效。接种具有FLT3-ITD和FLT3-ITD F691L的BaF3细胞,并用克莱拉尼(0.2-100 nM)或用MPC-0767 (20-10000 nM)处理72小时,之后使用CellTiter-Glo®评价细胞生存力。使用公式1计算EC<sub>50</sub>值(如上所述)。图11B显示,与具有FLT3-ITD的细胞相比较,具有FLT3-ITD-F691L突变体的细胞赋予对克莱拉尼约23倍的抗性(FLT3-ITD EC<sub>50</sub> = 4 nM相对于FLT3-ITD-F691L EC<sub>50</sub> = 90 nM)。相比之下,图11C显示,MPC-0767对两种FLT3-ITD突变体细胞系具有相似的抗白血病活性(FLT3-ITD EC<sub>50</sub> = 497 nM相对于FLT3-ITD-F691L EC<sub>50</sub> = 391 nM)。

[0245] 综上所述,这些数据表明,MPC-0767有效靶向FLT3的激酶抗性突变体。

[0246] 实施例9:MPC-0767阻断IFN-γ诱导的原代AML样品中PD-L1的表达

干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 已显示出在多种癌细胞类型中诱导程序性死亡配体1 (PD-L1) 的蛋白表达, 从而提供肿瘤细胞可逃避免疫系统的另一种机制。

[0247] 为了研究MPC-0767是否阻断IFN- $\gamma$  诱导的PD-L1表达, 用单独的人类IFN- $\gamma$  (50 ng/ml)、单独的MPC-0767 (1  $\mu$ M) 或两者的组合将6种具有FLT3 WT (n=2) 或FLT3-ITD (n=4) 的AML患者样品处理24小时。然后收获细胞以通过流式细胞术评价PD-L1的细胞表面表达。细胞还用AML母细胞标志物CD34或CD45染色 (以对母细胞群进行门控) 和用生存力染色进行染色以对活细胞进行门控。如图12所示, 所有患者样品均通过增加其细胞表面上PD-L1的量 (5-25倍) 对IFN- $\gamma$  处理作出反应。尽管单独的MPC-0767不会显著降低基础PD-L1细胞表面表达, 但与IFN- $\gamma$  组合时, MPC-0767显著降低IFN- $\gamma$  诱导的PD-L1细胞表面表达 (P=0.04)。

[0248] 该数据表明, 除了MPC-0767具有针对FLT3-ITD AML的细胞毒活性 (见上文) 之外, MPC-0767还通过消除IFN- $\gamma$  诱导的原代AML样品中的PD-L1表达而具有免疫调节活性。

[0249] 实施例10: MPC-0767呈现出协同的细胞毒活性

为了确定MPC-0767是否与另外的药物呈现出协同的抗增殖活性, 我们将其与经批准或正在临床评估用于AML治疗的药物组合进行测试。

[0250] 3种具有FLT3-ITD的细胞系用于药物组合研究 (MV-4-11、MOLM-13和MOLM-14)。用8种浓度的单独MPC-0767 (78-10000 nM)、8种浓度的单独AML药物 (以下浓度范围) 或两者的组合 (8x8) 处理细胞。测试的AML组合药物为: 柔红霉素 (0.8-100 nM)、阿糖胞苷 (78-10000 nM)、吉特替尼 (0.8-100 nM)、克莱拉尼 (0.8-100 nM)、索拉非尼 (0.8-100 nM)、米哌妥林 (0.8-100 nM) 或维特克拉 (0.8-100 nM)。

[0251] 将细胞用药物 (单一试剂或组合) 处理72小时。通过首先用CellTiter-Glo<sup>®</sup> 测量细胞生存力, 然后使用R<sub>1</sub> DRC包 (R Core Team, 2017) 计算与单一试剂活性相对应的EC<sub>50</sub>来确定药物组合活性。使用Chou-Talalay方法 (Chou T, Cancer Research., 2010 70(2): 440-6.), 基于单独和组合的每种药物在所有测试浓度下的生存力, 计算组合指数 (CI) 值。简而言之, CI定义为:

$$CI = \frac{D1}{\text{单独的 } D1} + \frac{D2}{\text{单独的 } D2} \quad (\text{Eq-2})$$

其中:

- D1和D2 (分别) 为产生生存力V的组合处理中药物1和药物2的剂量。

[0252] - 单独的D1和单独的D2 (分别) 为作为单一试剂产生与组合相同的生存力V的药物1和药物2的剂量。

[0253] 单独的D1和单独的D2根据Hill公式估算:

$$\text{单独的 } D = EC50 * \left( \frac{1-V}{V} \right)^{\frac{1}{Hill}} \quad (\text{Eq-3})$$

其中EC<sub>50</sub>和Hill为与药物1或药物2拟合的生存力曲线对应的EC<sub>50</sub>和Hill斜率。

[0254] CI值 > 1 的药物组合被认为具有拮抗作用, CI值 = 1 被认为具有加性作用, 而CI值 < 0.9 被认为具有协同作用。作为附加标准, 仅考虑生存力为0.25或更低的CI值。然后基于预期生存力相对于观察到的生存力的最大差异和最低CI值, 选择呈现出协同作用的最佳组合

处理。

[0255] 图13显示在用MPC-0767与柔红霉素(图13A)、阿糖胞苷(图13B)、克莱拉尼(图13C)、索拉非尼(图13D)和维特克拉(图13E)组合处理的MV-4-11细胞系的代表性协同作用数据。每个图表显示用媒介物(DMSO, 设定为100%)、单独MPC-0767、单独AML药物以及MPC-0767 + AML药物的组合处理的细胞的生存力。

[0256] 表1显示MV-4-11、MOLM-13和MOLM-14细胞系中MPC-0767的协同活性(平均CI值)(对于每种细胞系n = 2个独立实验, 除非当用星号表示n = 1时)。在MV-4-11细胞中, MPC-0767与柔红霉素(CI = 0.6)和维特克拉(CI = 0.7)高度协同, 和与阿糖胞苷、克莱拉尼和索拉非尼具有协同作用。在MOLM-13细胞中, MPC-0767与维特克拉高度协同(CI = 0.3), 和与柔红霉素、克莱拉尼和吉特替尼协同作用较小。MPC-0767在MOLM-14细胞中与维特克拉、柔红霉素和阿糖胞苷具有协同作用。

[0257] 表1: MPC-0767与AML药物组合在AML FLT3-ITD细胞系中的协同活性

	MV-4-11	MOLM-13	MOLM-14
柔红霉素	CI = 0.6	CI = 0.9	CI = 0.8*
阿糖胞苷	CI = 0.8		CI = 0.9*
克莱拉尼	CI = 0.7	CI = 0.9	
索拉非尼	CI = 0.8		
吉特替尼		CI = 0.9	
维特克拉	CI = 0.7	CI = 0.3	CI = 0.6

综上所述, 这些数据表明, HSP90抑制剂MPC-0767在具有FLT3 ITD突变的AML细胞中呈现出细胞毒活性。此外, MPC-0767在具有FLT3 ITD突变的AML细胞中显示与FLT3抑制剂的协同活性。因此, HSP90抑制剂(比如单独或组合的MPC-0767)可在FLT3中具有激活突变的AML患者中具有临床功效。

[0258] 实施例11: MPC-0767与维特克拉组合呈现出有效的抗肿瘤活性

为了在体内测试MPC-0767与维特克拉组合的活性, 使用MOLM-13具有FLT3-ITD的AML细胞系进行系统性存活异种移植研究。在肿瘤细胞接种之前, 每天腹膜内注射100 mg/kg环磷酰胺将NOD/SCID小鼠预处理2天, 以促进人类MOLM-13肿瘤细胞的植入。注射环磷酰胺之后, 允许动物恢复24小时, 之后接种人类MOLM-13肿瘤细胞。然后经静脉内尾静脉注射以100  $\mu$ L PBS将每只小鼠接种 $1 \times 10^7$  MOLM-13细胞。接下来将小鼠随机分为4组, 每组6只。肿瘤接种之后3天, 将小鼠给药媒介物、MPC-0767 100-60 mg/kg QD x 24 (100 mg/kg QD x 6, 87.5 mg/kg QD x 4, 75 mg/kg QD x 3, 67.5 mg/kg QD x 1, 60 mg/kg QD x 10)、维特克拉 45-33.8 mg/kg QD x 24 (45 mg/kg QD x 6, 39.4 mg/kg QD x 4, 33.8 mg/kg QD x 14) 或MPC-0767和维特克拉的组合并监测存活。每天监测生存力和体重减轻。在研究过程期间, 组合组的平均体重减轻不超过11%。如图14所示, MPC-0767作为单一试剂使中位生存期显著延长3.5天(P < 0.01, 时序(Mantel-Cox)检验)。重要的是, MPC-0767和维特克拉的组合导致100%存活, 因此与媒介物和两个单一试剂支臂相比较, 提供中位生存期显著延长(P < 0.001, 时序(Mantel-Cox)检验)。这些数据一起表明, MPC-0767与维特克拉在体内有效组合。

[0259] 实施例12: 在FLT3-ITD AML细胞中获得的对维特克拉的抗性不会降低对MPC-0767

的敏感性

由于MCL-1蛋白表达增加,可出现对Bcl-2特异性抑制剂维特克拉的抗性(Pan等人, 2017 *Cancer Cell* 32(6): p. 748-760 e6),从而限制其临床功效。为了测试获得的对维特克拉的抗性对MPC-0767敏感性的影响,我们如Pan等人, 2017所述测试了由两种亲代FLT3-ITD AML细胞系产生的耐维特克拉细胞系。亲代细胞系为MOLM-13和MV-4-11细胞。耐维特克拉的细胞系在图15中分别命名为MOLM-13 Ven-R和MV-4-11 Ven-R。如图所示,与亲代细胞相比较,MOLM-13 Ven-R和MV-4-11 Ven-R细胞对维特克拉具有高度抗性,如处理72小时后进行的生存力测定中其EC<sub>50</sub>值增加所证明的。相比之下,亲代和耐维特克拉的细胞两者对MPC-0767具有相似的敏感性。这些结果表明,赋予对维特克拉抗性的因素不会降低细胞对MPC-0767的细胞毒活性的敏感性。

[0260] 接下来,我们考虑了MV-4-11 Ven-R细胞中凋亡的分子标志物(PARP裂解)。将细胞用MPC-0767、维特克拉或MPC-0767和维特克拉的组合处理24小时,并然后通过Western分析检查裂解物的全长PARP和裂解的PARP(凋亡的标志物)。如图16A所示,Western印迹分析仅在用MPC-0767和维特克拉的组合处理的细胞中检测到完全的PARP裂解。这些数据表明,该组合有效诱导这些耐维特克拉的细胞凋亡。

[0261] 使用等效线图分析证实了该组合的协同作用(Tallarida, 2006 *J Pharmacol Exp Ther*, 319(1):1-7)。将抗性细胞系MOLM-13 Ven-R和MV-4-11 Ven-R用MPC-0767、维特克拉或MPC-0767和维特克拉的组合处理72小时,并使用CellTiter- Glo<sup>®</sup>测定来评价生存力。归一化等效线图用于在75%剂量效应(EC75)下描绘药物在不同细胞系和条件下的相互作用。简而言之,使用R包DRC计算每种单一试剂和药物组合的绝对EC75(Ritz, C.,等人 2015 *PLoS One* 10(12):e0146021; 和Team R. C. 2017 *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017)。药物组合的EC75相对于相应的单一试剂的EC75值进行归一化。在单一试剂处理未达到EC75的情况下,基于拟合的药物反应曲线的预计值使用相对EC75。当相对EC75高于测试的最大浓度时,我们将测试的最大浓度用作默认值,以允许对所有药物和条件进行分析。如图16B所示,两种耐维特克拉的细胞系的数据点均在加性线(对角线)以下,表明组合指数值<1,并证实组合处理具有协同作用。

[0262] 为了探索MPC-0767和维特克拉协同作用的潜在机制,我们集中于MCL-1上,因为其增加的丰度赋予对维特克拉的抗性。AKT通过对称为丝氨酸9(S9)的残基进行磷酸化来调控GSK3 $\beta$ 的活性。当该位点被AKT磷酸化时,GSK3 $\beta$ 活性被抑制。然而,抑制AKT阻止S9磷酸化,从而导致GSK3 $\beta$ 激活和随后的MCL-1降解(Lu等人, 2015 *Med Oncol*, 2015. 32(7): p. 206)。在用MPC-0767、维特克拉或MPC-0767和维特克拉的组合处理的MOLM-14和MV-4-11细胞系中检查了这些蛋白及其磷酸化状态。图17A显示用MPC-0767(1  $\mu$ M)、维特克拉(20 nM)或组合处理24小时的MOLM-14细胞。仅有组合处理导致pAKT<sup>(S473)</sup>丧失、AKT降解和随后的GSK3 $\beta$ <sup>(Ser 9)</sup>磷酸化丧失。这些发现与我们的建议一致,即靶向BCL-2(例如用维特克拉)并同时靶向MCL-1(用MPC-0767)导致FLT3-ITD AML细胞的协同细胞死亡。另外,在用单独的MPC-0767、单独的维特克拉或组合处理的MV-4-11耐维特克拉细胞系中,通过MPC-0767和维特克拉的组合也降低AKT和MCL-1的表达(图17B),证实用MPC-0767和维特克拉观察到的协同作用的一致作用机理。

## [0263] 实施例13:MPC-0767在AML中的功效的生物标志物

为了确定MPC-0767是否对非FLT3-ITD AML细胞有效,我们测试了一组FLT3-野生型(FLT3-WT) AML细胞系和原代AML母细胞对MPC-0767的敏感性。在使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>测定确定细胞生存力之前,将细胞用MPC-0767处理72小时。确定所有样品的EC50值,并如图18所示。我们以1  $\mu$ M定义了敏感性的截断值,其中EC<sub>50</sub>值低于1  $\mu$ M的细胞系被认为是敏感的,和EC<sub>50</sub>值高于1  $\mu$ M的细胞系被认为具有抗性。实际上,有6/12种细胞系和2/4种原代细胞系显示出敏感性(EC<sub>50</sub>值小于1  $\mu$ M)。

[0264] 为了探索是否有任何突变与MPC-0767敏感性相关,我们基于Fisher精确检验跨越FLT3-WT AML细胞系中的所有突变基因进行了统计分析。从COSMIC Cell Line Project数据库中提取经处理的外显子组测序数据,并包括在至少一种细胞系中突变的基因。将Fisher精确检验应用于在敏感和抗性FLT3-WT AML细胞系中观察到的突变和野生型等位基因的频率。基于含有特定基因的突变或野生型等位基因的敏感或抗性品系的数量计算频率。这提供一个4x4列联表,其用于检验FLT3-WT AML细胞系中的突变基因是否与MPC-0767敏感性相关的假设。

[0265] 该分析的结果表明,RAS突变与抗性FLT3-WT AML细胞系以统计学显著的方式相关(Fisher检验p值= 0.0019)。FLT3-WT AML细胞系在NRAS和KRAS两者中均携带激活突变(表2),其中先前报道特定突变刺激MAPK信号传导。

[0266] 表2:处理72h之后针对MPC-0767敏感性测试的AML细胞系以及使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>测定的细胞生存力的概述。显示所测试细胞系中NRAS或KRAS突变的详细信息

细胞系	EC50 (nM)	MPC-0767敏感性	NRAS突变?	KRAS突变?
MOLM16	367	敏感	-	-
TUR	550	敏感	-	-
OCIAML2	633	敏感	-	-
ML2	1031	抗性	-	p.A146T
NOM01	1449	抗性	-	p.G13D
OCIAML3	1809	抗性	p.Q61L	-
HL60	1957	抗性	p.Q61L	-
ME1	3425	抗性	p.Q61H	-
THP1	10000	抗性	p.G12D	-

这些发现表明,关键蛋白(比如RAS)的突变影响对MPC-0767的敏感性,并进一步表明MPC-0767和RAS信号传导抑制剂(例如Raf抑制剂、MEK抑制剂和ERK抑制剂)的组合可克服AML细胞中另外的抗性途径。这些发现表明,合理的药物组合可以克服抗性途径并恢复对MPC-0767的敏感性。

[0267] 实施例14:全基因组CRISPR筛查确定表观遗传调控为MPC-0767敏感性的决定因素

为了鉴定缺失时赋予对MPC-0767的抗性的基因,我们在存在1  $\mu$ M MPC-0767的情况下生长的MOLM-14细胞系中进行了CRISPR介导的全基因组功能丧失筛查。我们使用GeCKO V2文库(Shalem, O.,等人 2014 *Science* 343 (6166):84-87)进行该遗传筛查。分析从存活细胞中收获的基因组DNA,以鉴定两个GeCKO子库中富集的单向导RNA (sgRNA)。对两个GeCKO子库中前20个富集命中的基因本体分析,将表观遗传调控、染色质组织和染色质修饰

酶确定为在存活于MPC-0767处理的池中最高度富集的途径(图19A)。

[0268] 来自筛查的最富集的基因为KDM6A,即一种组蛋白H3K27去甲基化酶(Lee等人, 2007 *Science* 318 (5849): 447-50)(图19B)。在FLT3-ITD AML中观察到KDM6A的功能丧失突变(Garg等人, 2015 *Blood* 126 (22):2491-501)。用3个独立sgRNA进行的CRISPR介导的KDM6A靶向在MOLM-14和MV-4-11细胞系中赋予对MPC-0767的抗性(图20A-B)。为了在治疗上利用这一发现,我们假设抑制EZH2(功能上与KDM6A相对的组蛋白H3K27甲基转移酶)会增强对MPC-0767的敏感性。为了检验这一假设,使用FLT3-ITD细胞系(MV-4-11),并用两种临床阶段的EZH2抑制剂EPZ-6438和CPI-1205中的任一种以8种不同浓度处理4天。此时之后,对细胞进行计数、重新接种和用8种浓度的单独EZH2抑制剂、8种浓度的单独MPC-0767或二者的组合(总共64种组合)进行处理。组合处理3天之后,使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>确定细胞生存力。进行了等效线图分析,EPZ-6438和MPC-0767的组合以及CPI-1205和MPC-0767的组合的数据点均在加性线(对角线)以下,表明组合指数值 $<1$ ,并证实组合处理具有协同作用(图21)。这些发现表明表观遗传调控因子可影响MPC-0767的敏感性,这类基因中的功能丧失突变可能可用作MPC-0767活性的生物标志物,并且靶向表观遗传调控因子的临床阶段化合物可与MPC-0767组合用于治疗用途。

[0269] 实施例15:MPC-0767与三氧化二砷在AML细胞系中具有协同作用

急性早幼粒细胞白血病(APL)为具有特征性染色体易位 $t(15;17)$ 的急性髓细胞性白血病的亚型,所述染色体易位 $t(15;17)$ 产生早幼粒细胞白血病(PML)和视黄酸受体 $\alpha$ (RAR $\alpha$ )的融合(PML-RAR $\alpha$ )。所得的融合蛋白具有改变的转录谱,导致细胞分化受阻。已证明包括全反式视黄酸和三氧化二砷(ATO)在内的降解异常融合蛋白的试剂对APL有效(在McCulloch等人, 2017中综述)。有趣的是,ATO在不具有PML-RAR $\alpha$ 的细胞中呈现出抗增殖活性,表明ATO可能发挥另外的活性,其导致癌细胞死亡(Miller等人, 2002)。因此,已在许多不具有PML-RAR $\alpha$ 的血红素适应症中评估了ATO(Bonati等人, 2006)。最近的研究表明,ATO和索拉非尼的组合在FLT3-ITD AML细胞系中具有协同作用(Wang等人, 2018)。对观察到的一种机制解释是,ATO降低FLT3-ITD与HSP90之间的相互作用。结果,FLT3-ITD经降解,这消除FLT3-ITD致癌信号传导并且肿瘤细胞死亡(Wang等人, 2018)。因此,与索拉非尼(FLT3抑制剂)的组合应直接抑制(索拉非尼)和降解(ATO)导致更完全地消除FLT3信号传导。另外,Wetzler及同事(Wetzler等人, 2007)使用半机制性药效学模型(其探索ATO和第一代HSP90抑制剂之间的浓度关系)证明在具有组成型STAT3的AML细胞系中具有协同作用。

[0270] 为了测试MPC-0767的组合是否与ATO具有协同作用,我们测试了一组AML细胞系。细胞系包括具有FLT3-ITD(MOLM-13、MOLM-14和MV-4-11)或FLT3 WT(ME-1、THP-1、OCI-AML-2、HL60、NOMO-1、TUR和 ML-2)的那些细胞系。用8种浓度的单独MPC-0767(234-4000 nM;1.5倍稀释)、8种浓度的单独ATO(78-10000 nM;2倍稀释)或二者的组合(64个数据点)处理细胞系。

[0271] 在组合处理3天之后,使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>确定细胞生存力。使用Chou-Talalay公式计算每种细胞系的组合指数(CI)值,其中CI值 $<1$ 表示协同作用,CI = 1表示加性和CI $>1$ 表示拮抗作用。图22显示一个实例,其中MOLM-14细胞用MPC-0767(527 nM)、ATO(1250 nM)或组合(combo)处理。重要的是,该组合比单独任一种试剂的加性作用更大地降低生存

力,并且取回0.56的CI值,从而证实具有协同作用。表3显示所有测试细胞系的CI值以及MPC-0767和ATO的具体浓度。在所有测试的细胞系中均观察到协同作用。这些发现建立了MPC-0767的组合在AML细胞中与ATO具有协同作用。此外,在临床上相关浓度的MPC-0767下,在具有FLT3-ITD突变的细胞系和没有FLT3-ITD突变的细胞系中均观察到协同作用。

[0272] 接下来,我们探讨了MPC-0767和ATO的协同活性是否归因于FLT3-ITD致癌信号传导的更完全消除。将MOLM-13细胞用MPC-0767 (800 nM)、ATO (625 nM)或组合处理24小时。此时之后,收获细胞以通过流式细胞术评价细胞表面的FLT3表达。为了另外测量消除FLT3的效果,我们评价了磷酸化ERK (pERK)和磷酸化S6 (pS6),因为这些是两种已知的下游效应子。如图23所示,作为单一试剂的MPC-0767和ATO降低FLT3, pS6并轻微降低pERK。然而,与任一种单独试剂相比较,该组合导致每种蛋白或磷蛋白的减少更多。这些发现表明,在FLT3-ITD AML细胞系中观察到的协同抗增殖作用至少部分通过更完全抑制FLT3致癌信号传导来体现。

[0273] 表3. 在所有测试的AML细胞系中针对MPC-0767和ATO的组合获得的组合指数(CI)值的概述。CI值<1表示协同作用。

细胞系	FLT3-ITD?	组合		
		MPC-0767 浓度(nM)	ATO 浓度(nM)	CI 值
<b>MOLM-13</b>	是	<b>790</b>	<b>625</b>	<b>0.65</b>
<b>MOLM-14</b>	是	<b>527</b>	<b>1250</b>	<b>0.56</b>
<b>MV-4-11</b>	是	<b>790</b>	<b>625</b>	<b>0.71</b>
<b>OCI-AML-2</b>	否	<b>790</b>	<b>1250</b>	<b>0.67</b>
<b>NOMO-1</b>	否	<b>1185</b>	<b>2500</b>	<b>0.69</b>
<b>ML2</b>	否	<b>790</b>	<b>1250</b>	<b>0.54</b>
<b>TUR</b>	否	<b>527</b>	<b>5000</b>	<b>0.66</b>
<b>HL-60</b>	否	<b>790</b>	<b>5000</b>	<b>0.85</b>
<b>ME-1</b>	否	<b>1185</b>	<b>10000</b>	<b>0.21</b>
<b>THP-1</b>	否	<b>2667</b>	<b>10000</b>	<b>0.12</b>

[0274] 实施例16: MPC-0767克服赋予对FLT3抑制剂的抗性的替代途径激活

模仿骨髓中基质信号传导的条件可通过激活替代细胞表面受体而赋予对FLT3抑制剂的抗性(Karjalainen等人, 2017)。BaF3细胞系统用于在赋予对FLT3抑制剂的抗性的条件下测试MPC-0767的功效。BaF3细胞需要补充IL-3来激活IL-3受体以使其生长。然而,在用FLT3-ITD转染的BaF3细胞中,细胞不再需要IL3,因为存活仅由致癌性FLT3信号传导驱动。因此,在没有IL-3的情况下表达FLT3-ITD的细胞对FLT3抑制剂吉特替尼或克莱拉尼抑制FLT3敏感(图24)。然而,添加IL3激活替代的非FLT3依赖性促存活途径,使得细胞对FLT3抑制剂具有抗性(Sung等人, 2017)。相比之下,表达FLT3-ITD并用或不用外源性IL3处理的BaF3对MPC-0767同等敏感(图24)。这些发现表明,MPC-0767可抑制多种促存活途径。

[0275] 实施例17: MPC-0767与5' 氮杂胞苷组合呈现出增强的抗肿瘤活性

为了在体内测试MPC-0767与5' 氮杂胞苷的组合,使用MOLM-13具有FLT3-ITD的AML细胞系进行系统性存活异种移植研究。在肿瘤细胞接种之前,每天腹膜内注射100 mg/kg环磷酰

胺将NOD/SCID小鼠预处理2天,以促进人类MOLM-13肿瘤细胞的植入。注射环磷酰胺之后,允许动物恢复24小时,之后接种人类MOLM-13肿瘤细胞。然后每只小鼠经静脉内尾静脉注射接种100  $\mu$ L PBS中的 $1 \times 10^7$  MOLM-13细胞。接下来将小鼠随机分为4组,每组6只小鼠。肿瘤接种之后3天,将小鼠给药媒介物、MPC-0767 75 mg/kg (QD x 5;1天休息;QD x 26 p.o.)、5' 氮杂胞苷2 mg/kg (QD x 4 i.p.)或MPC-0767和5' 氮杂胞苷的组合(如对单一试剂那样治疗)并监测存活。每天监测生存力和体重减轻。在研究过程期间,组合组的平均体重减轻不超过11%。如图25所示,作为单一试剂的MPC-0767和5' 氮杂胞苷分别使小鼠的中位生存期显著延长5.5天和8天(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ ,时序(Mantel-Cox)检验)。重要的是,与媒介物和两种单一试剂支臂相比较,MPC-0767和5' 氮杂胞苷的组合导致中位生存期显著延长( $P < 0.001$ ,时序(Mantel-Cox)检验)。这些发现表明,MPC-0767和5' 氮杂胞苷的组合具有抗白血病活性,并且可能是FLT3-ITD AML患者的有效疗法。

#### [0276] 实施例18:MPC-0767增强T细胞介导的AML细胞杀伤

以体外T细胞介导的杀伤测定确定MPC-0767增加T细胞杀伤的能力。OCI-AML2 AML细胞系用细胞染色染料CFSE标记,并用MPC-0767 (2  $\mu$ M)和人类巨细胞病毒pp65<sub>495-503</sub>肽处理过夜。洗涤OCI-AML2细胞以去除MPC-0767和肽,并随后与针对pp65特异性CD8<sup>+</sup> T细胞富集的T细胞系以约2.5:1的比率(T细胞:OCI-AML2)共培养。共培养4小时之后,收获细胞,对其进行固定、透化,并针对胱天蛋白酶-3的活性形式进行染色作为凋亡细胞死亡的直接读出。所有CFSE<sup>+</sup>细胞(仅OCI-AML-2细胞)中的活性胱天蛋白酶-3<sup>+</sup>百分比如图26所示。对MPC-0767和pp65富集的CD8<sup>+</sup> T细胞的组合,观察到凋亡细胞的协同增加(组合指数(CI)为0.53)。这些发现表明,MPC-0767可改变肿瘤细胞,使其更易受T细胞介导的杀伤攻击。

[0277] CI为一种定量量度,用于确定药物对的组合作用是协同、加性还是拮抗的。CI计算为 $CI = (E1 + E2) / E12$ ,其中E12为针对药物A和药物B的组的归一化生物反应(例如% 胱天蛋白酶-3<sup>+</sup>细胞),而E1和E2分别为针对每种单一药物处理测得的反应。CI值小于1表示协同作用,作用的大小由协同作用得分比1小多少来表示。对该关系的更详细数学处理描述于Shin等人 2018中。

#### [0278] 实施例19:MPC-0767在免疫活性的MC38同基因模型中证明具有体内功效

为了证明MPC-0767在具有完整免疫系统的体内模型中的功效,使用鼠MC38结肠癌细胞系进行同基因研究。每只C57BL/6小鼠的右肋皮下接种0.1 ml PBS中的 $2.5 \times 10^5$ 个肿瘤细胞。当平均肿瘤体积达到大小73 mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机分为2组,每组6只。然后小鼠口服给药媒介物或150 mg/kg MPC-0767 QD x 17。在指定日期进行肿瘤测量(卡尺)。如图27所示,MPC-0767诱导69.5%的肿瘤生长抑制(图27A),对体重没有显著影响(图27B)。学生t检验用于评估这些组之间差异的统计显著性, $P = 0.01$ 。该数据证实MPC-0767在体内同基因模型中显示出抗肿瘤活性。

[0279] 为了测试MPC-0767除直接的细胞毒活性之外是否还可诱导抗肿瘤免疫反应,在同一MC38同基因模型中测量了PD-L1的下调和效应子/调节性T细胞比率。在第21天,当平均肿瘤体积大小为372 mm<sup>3</sup>时,用150 mg/kg MPC-0767 QD x 7治疗第二组小鼠(n=6)。在最后一次剂量后一天(接种后第28天)从媒介物和150 mg/kg MPC-0767 QD x 7组收获肿瘤。通过流式细胞术分析所分离肿瘤内肿瘤浸润白细胞(CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>)的PD-L1表达。观察到PD-L1显著降低,表明MPC-0767可在体内抑制这种免疫抑制配体(图27C)。为了测定这种抑制对MC38肿

瘤内免疫细胞群的影响,还通过流式细胞术评价了CD4<sup>+</sup>(CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>)和CD8<sup>+</sup> T细胞(CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>)与调节性T细胞(CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup>)的比率。在MPC-0767治疗组中观察到CD4:TREG和CD8:TREG比率的显著增加(图27D),这表明抗肿瘤免疫反应。总之,这些数据支持MPC-0767的抗肿瘤活性涉及诱导抗肿瘤免疫反应。

[0280] 实施例20:MPC-0767与MAPK途径抑制剂在AML细胞系中具有协同作用

丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)途径为一个关键整合点,将其细胞存活时的外部刺激连接起来,并将其转导为介导分化、存活和增殖的细胞内信号。确实,选择性MAPK抑制剂靶向的AML细胞导致细胞存活降低(Milella等人, 2001)。在一组AML细胞系中测试了MPC-0767和曲美替尼的组合,曲美替尼为一种临床阶段的MEK抑制剂,已被批准用于治疗其肿瘤具有BRAF V600E的黑素瘤患者。细胞系包括那些具有FLT3-ITD(MOLM-13、MOLM-14和MV-4-11)或FLT3 WT + RAS WT(OCI-AML-2)或FLT3 WT + RAS突变体(ML-2)的细胞系。用8种浓度的单独MPC-0767(234-4000 nM;1.5倍稀释)、8种浓度的单独ATO(0.8-100 nM;2倍稀释)或二者的组合(64个数据点)处理细胞系。

[0281] 组合处理3天之后,使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>确定细胞生存力。使用Chou-Talalay公式计算每种细胞系的组合指数(CI)值,其中CI值<1表示协同作用,CI = 1表示加性和CI> 1表示拮抗作用。图28显示一个实例,其中MOLM-13细胞用MPC-0767(351 nM)、曲美替尼(25 nM)或组合(combo)处理。重要的是,该组合比单独任一种试剂的加性作用更大地降低生存力,并且取回0.55的CI值,从而证实具有协同作用。表4显示所有测试细胞系的CI值以及MPC-0767和曲美替尼的具体浓度。此外,在临床上相关浓度的MPC-0767下,在具有或没有FLT3-ITD的细胞系中或在具有RAS突变的细胞系中均观察到协同作用。

[0282] 表4. 在所有测试的AML细胞系中针对MPC-0767和曲美替尼的组合获得的组合指数(CI)值的概述。CI值<1表示协同作用。

细胞系	FLT3 & RAS 状态	组合		
		MPC-0767 浓度 (nM)	曲美替尼浓度(nM)	CI 值
MOLM-13	FLT3-ITD; RAS WT	351	25	0.55
MOLM-14	FLT3-ITD; RAS WT	790	6.3	0.62
MV-4-11	FLT3-ITD; RAS WT	527	6.3	0.67
OCI-AML-2	FLT3 WT; RAS WT	790	0.78	0.64
ML2	FLT3 WT; RAS 突变体	790	100	0.32

实施例21:PD-L1表达的MPC-0767抑制增加T细胞活化

在体外、在临床前动物模型中和在癌症患者中,添加阻断PD-1/PD-L1途径的抗体刺激T细胞反应增加。这可导致患者的肿瘤消退或肿瘤清除。为了检查MPC-0767对PD-L1和T细胞活化的影响,我们使用一种模型系统,其中PD-1+ Jurkat T细胞在NFAT启动子的控制下表达萤光素酶(Promega,下文称为Jurkat报告细胞)。当通过T细胞受体(TCR)刺激T细胞时,

NFAT途径的激活驱动萤光素酶的表达。因此,在该模型系统中,萤光素酶为T细胞活化的替代标志物。

[0283] 如图29A所示,THP-1 AML细胞与Jurkat报告细胞和低剂量抗CD3 (10 ng/ml)一起温育6小时导致萤光素酶表达,这是由于TCR驱动的Jurkat报告细胞活化所致。图29B显示用IFN  $\gamma$  (50 ng/ml)处理24小时的THP-1细胞具有降低的活化T细胞的能力(萤光素酶减少)。这可归因于IFN  $\gamma$  介导的PD-L1上调,因为添加PD-L1阻断抗体(阿特殊单抗,5  $\mu$ g/ml)将T细胞活化恢复至未经处理的水平。

[0284] 接下来,我们确定了MPC-0767减少PD-L1是否可增加T细胞刺激,类似于抗PD-L1阻断抗体。在存在或不存在MPC-0767 (1  $\mu$ M或2  $\mu$ M)的情况下将THP-1细胞用IFN  $\gamma$  处理过夜。洗涤THP-1细胞,并保存一部分用于PD-L1表达的流式细胞术分析。将剩余的细胞与Jurkat报告细胞和抗CD3 (10 ng/ml)一起温育6小时。MPC-0767剂量依赖性地降低THP-1细胞上的PD-L1表达(图29C)。MPC-0767还能够剂量依赖性地减少对T细胞活化的抑制(图29D),表明MPC-0767对PD-L1表达的调节对T细胞活性具有功能性后果。

[0285] 实施例22:MPC-0767在系统性体内AML模型中显示出抗肿瘤活性。

为了进一步在体内测试MPC-0767的活性,使用MOLM-13具有FLT3-ITD的AML细胞系进行系统性存活异种移植研究。在肿瘤细胞接种之前,每天腹膜内注射100 mg/kg环磷酰胺将NOD/SCID小鼠预处理2天,以促进人类MOLM-13肿瘤细胞的植入。注射环磷酰胺之后,允许动物恢复24小时,之后接种人类MOLM-13肿瘤细胞。然后每只小鼠经静脉内尾静脉注射接种100  $\mu$ L PBS中的 $1 \times 10^7$  MOLM-13细胞。接下来将小鼠随机分为3组,每组6只小鼠。肿瘤接种之后3天,将小鼠每天一次给药媒介物、75 mg/kg MPC-0767或150 mg/kg MPC-0767并监测存活。每天监测生存力和体重减轻。在所有3组中,仅在发病之前才观察到明显的体重减轻和/或临床症状(麻痹、体温过低或呼吸急促)。如图30所示,MPC-0767在75 mg/kg下使中位生存期显著延长1.5天,在150 mg/kg下则显著延长10天( $P < 0.01$ ,时序(Mantel-Cox)检验)。总之,MPC-0767显示出显著的剂量依赖性抗肿瘤活性。

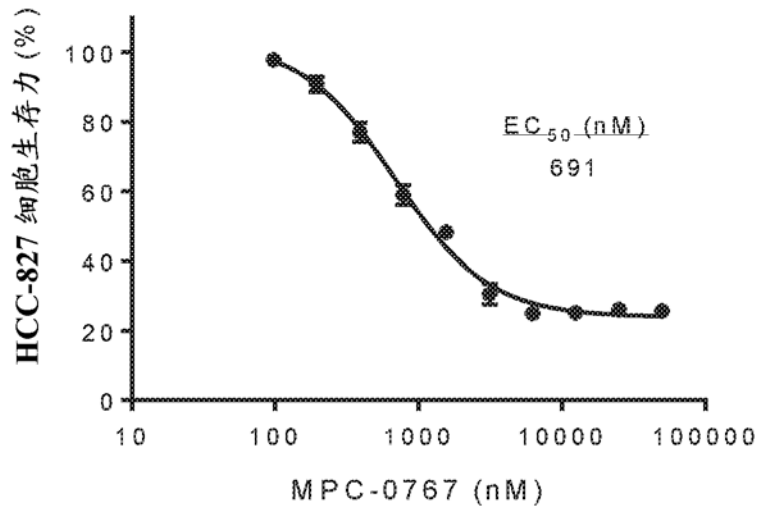


图 1A

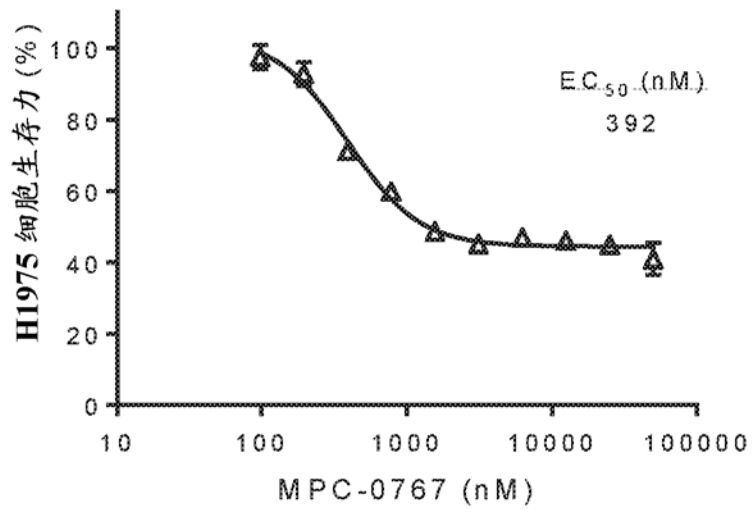


图 1B

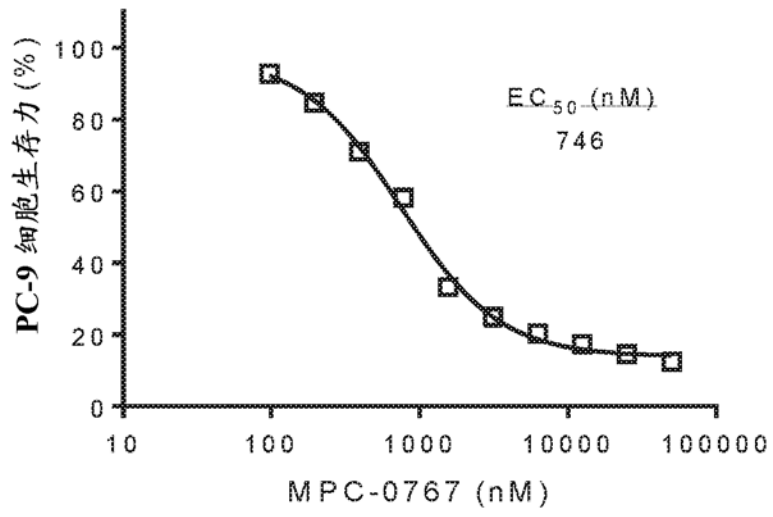


图 1C

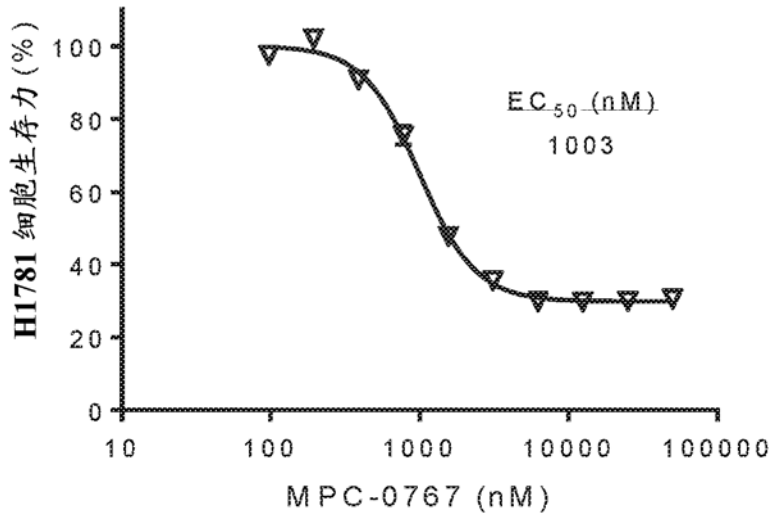


图 1D

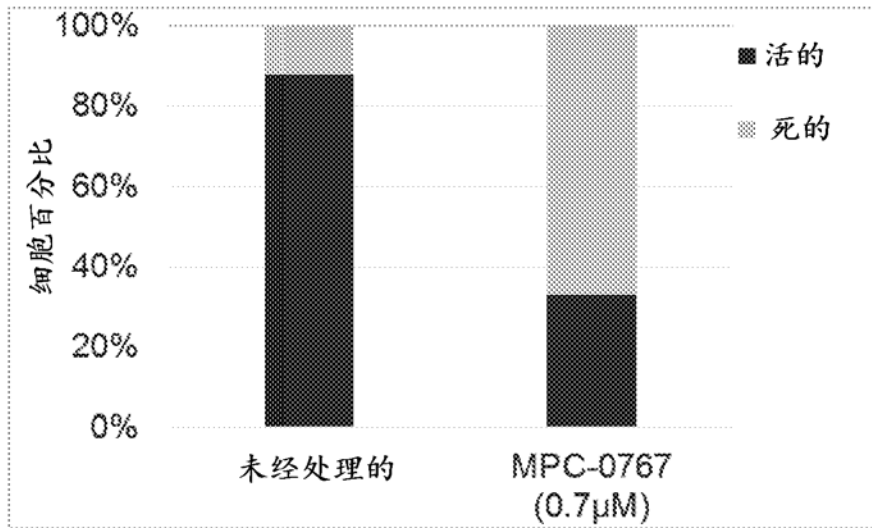


图 2

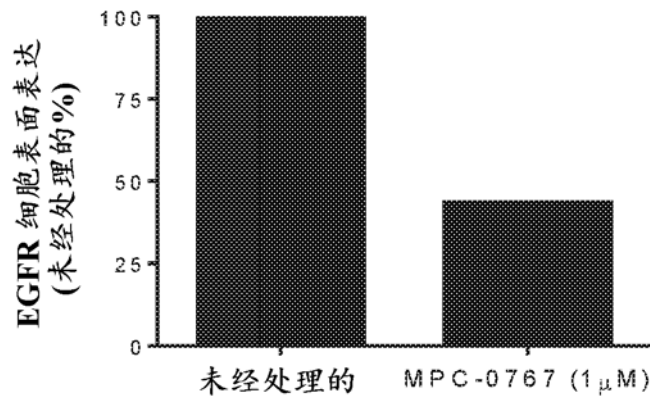


图 3A

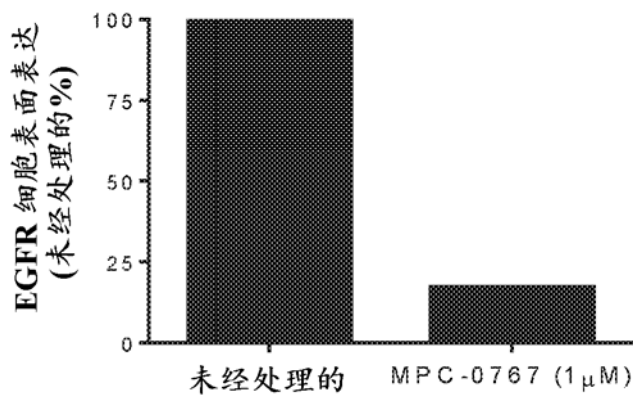


图 3B

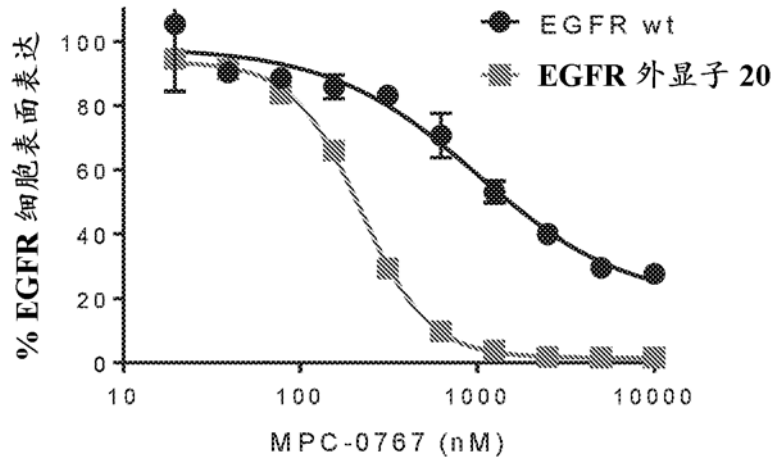


图 4A

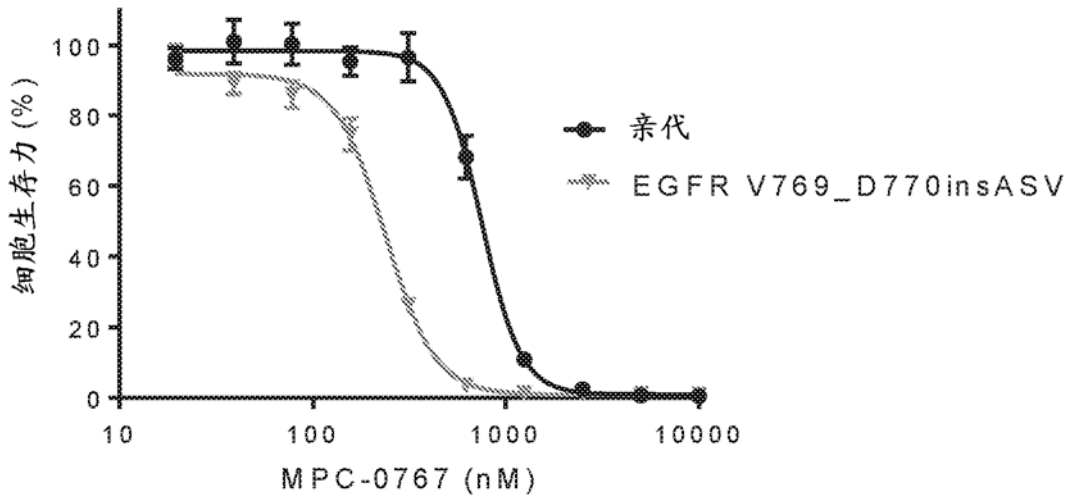


图 4B

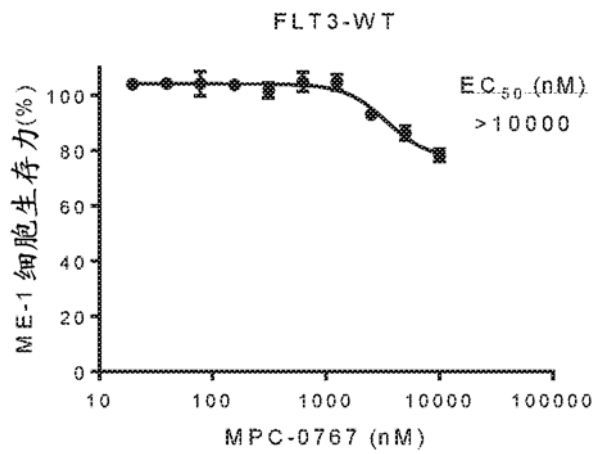


图 5A

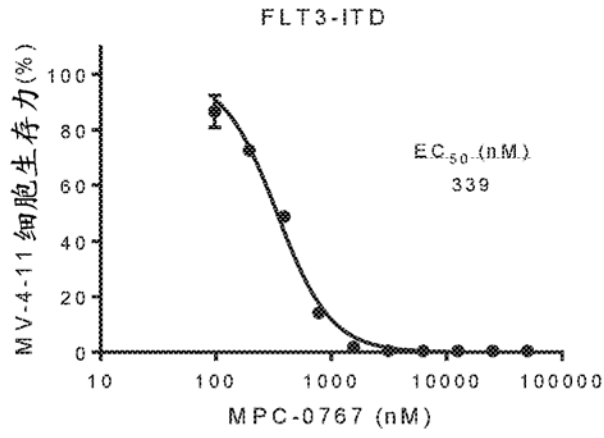


图 5B

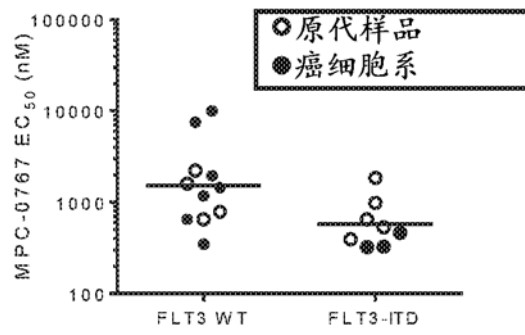


图 5C

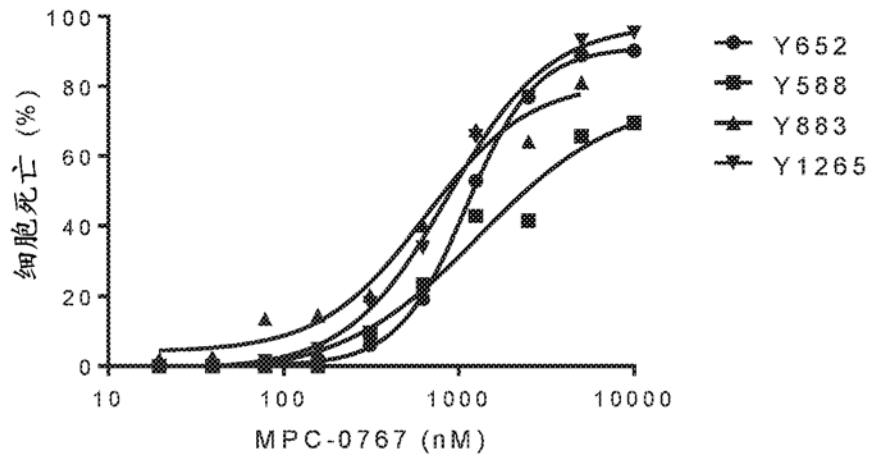


图 6

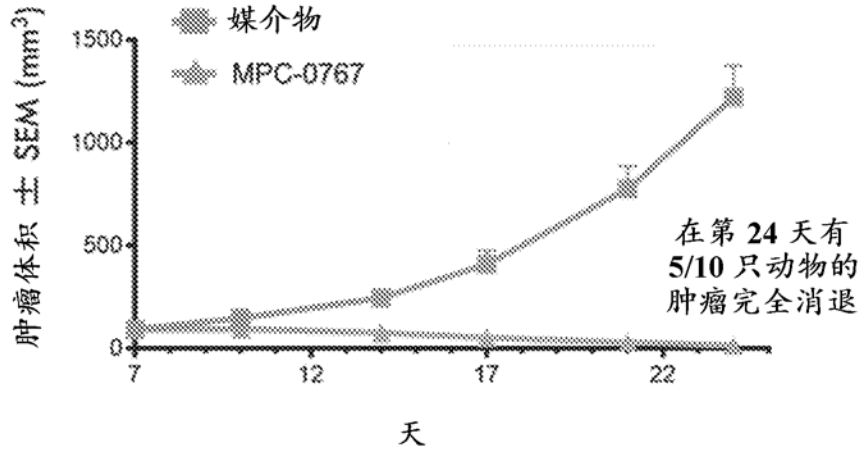


图 7A

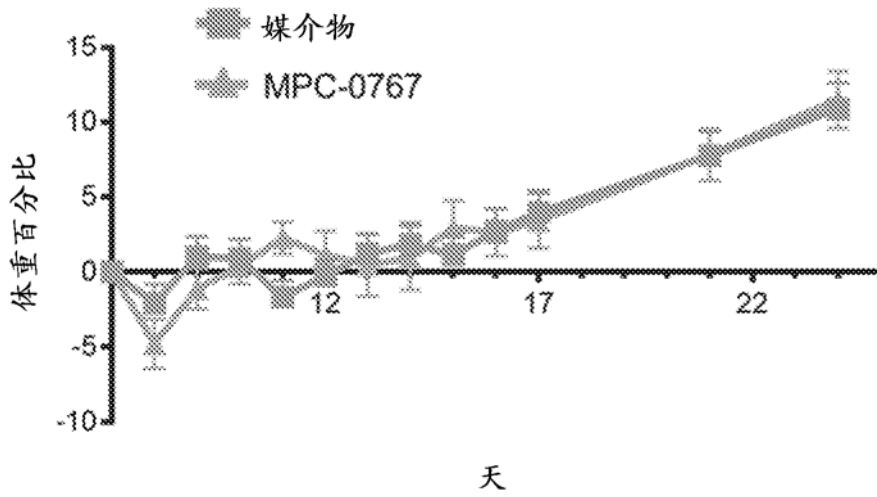


图 7B

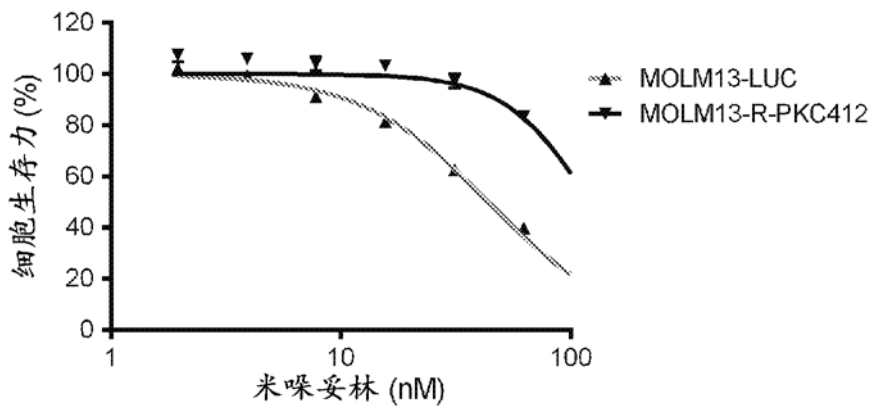


图 8A



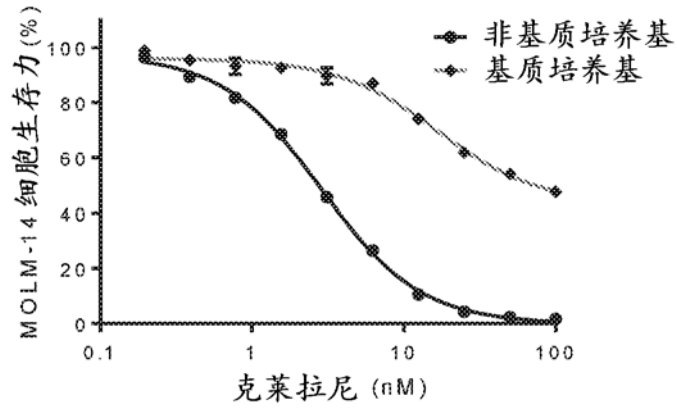


图 9B

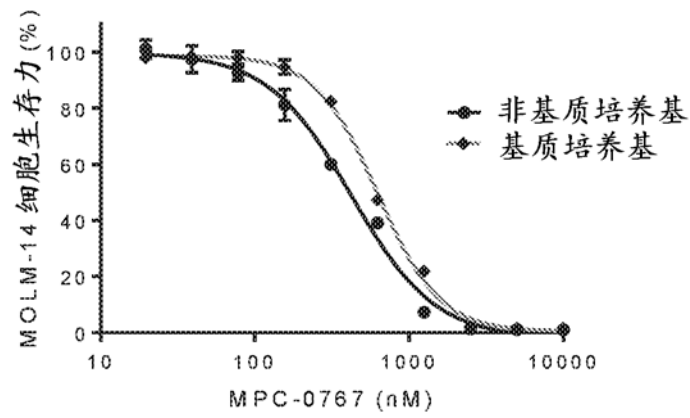


图 9C

MV-4-11 细胞

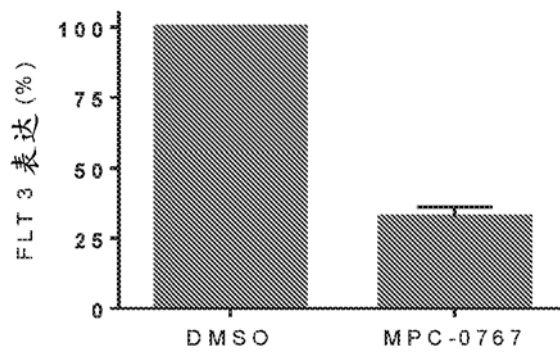


图 10A

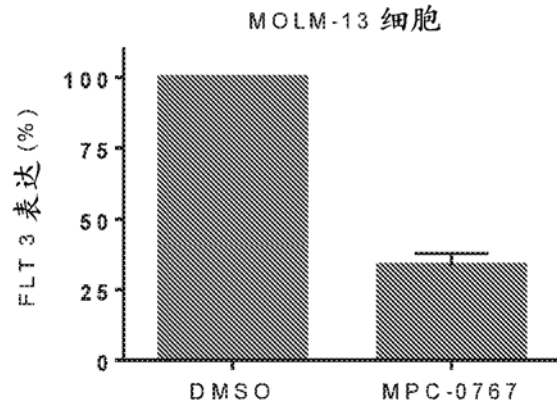


图 10B

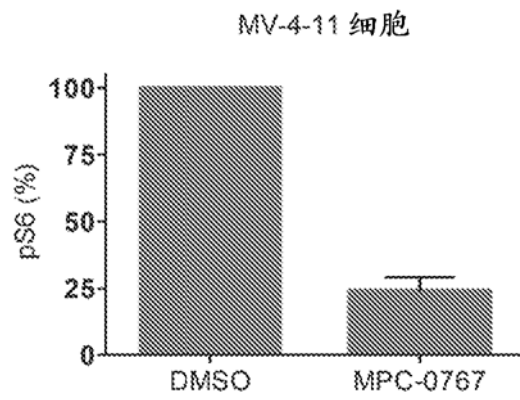


图 10C

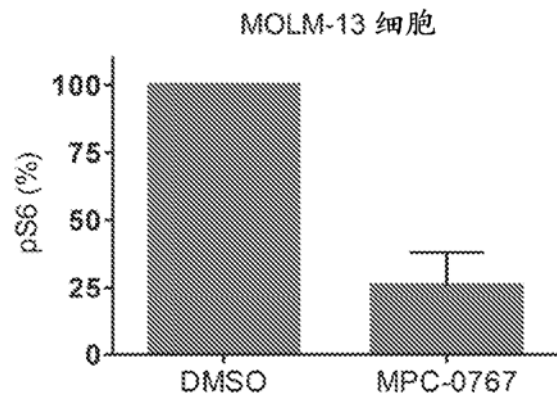


图 10D

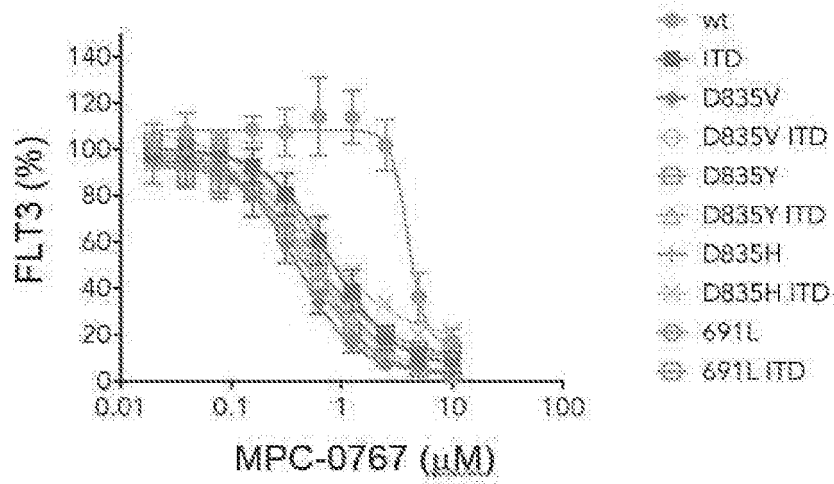


图 11A

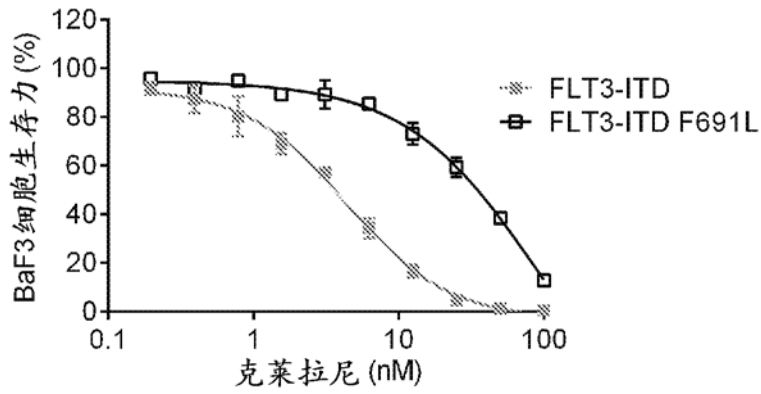


图 11B

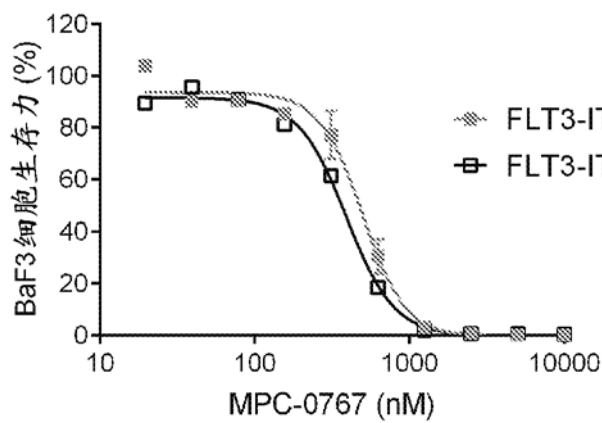


图 11C

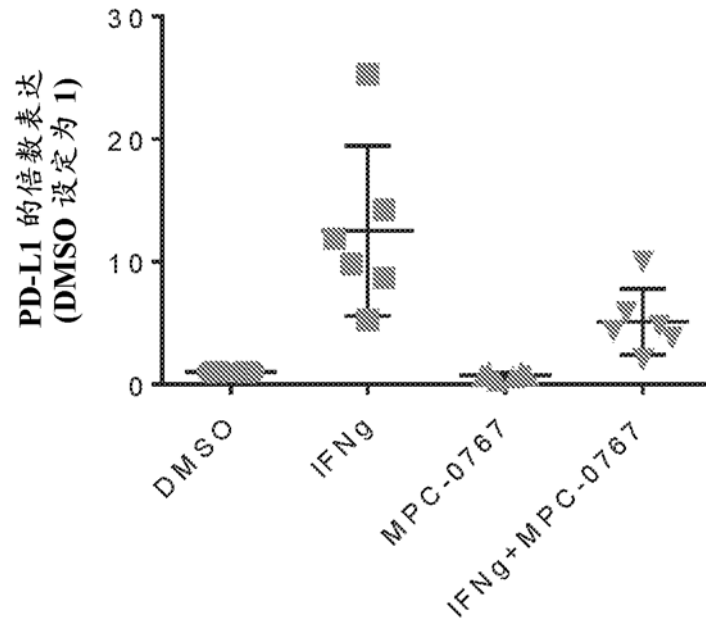


图 12

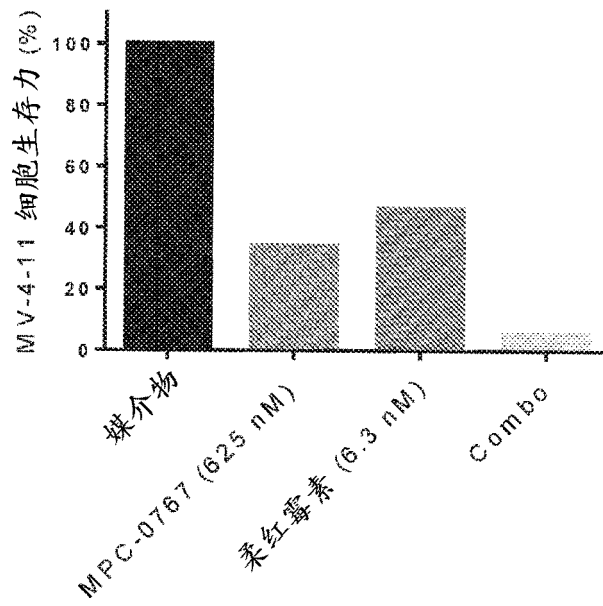


图 13A

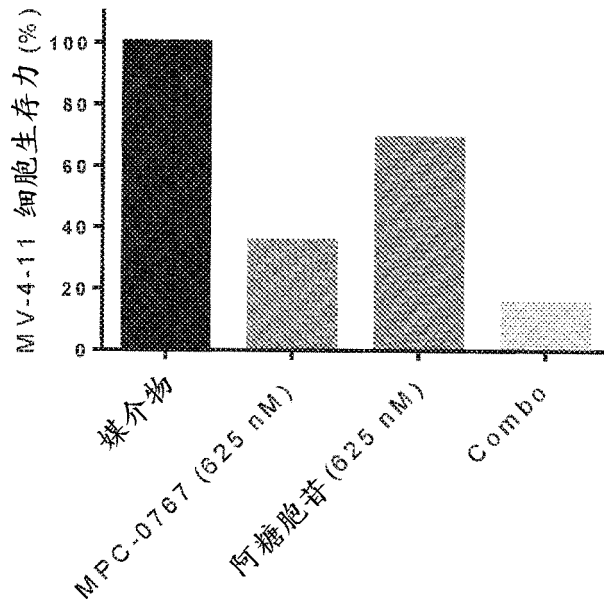


图 13B

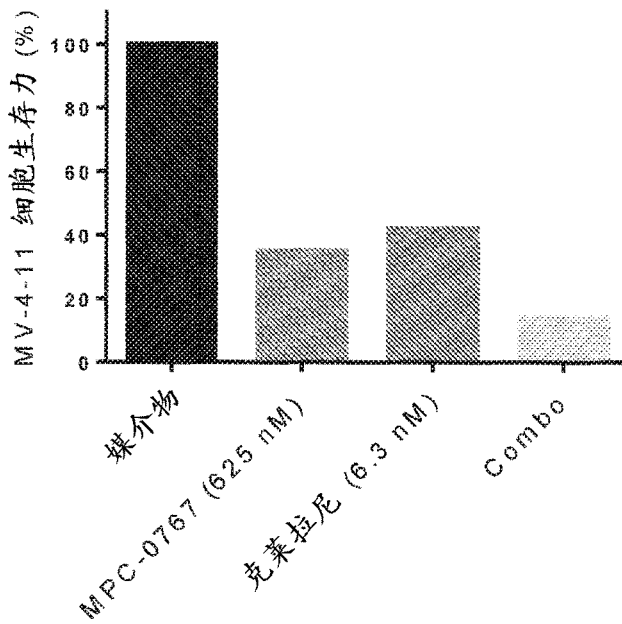


图 13C

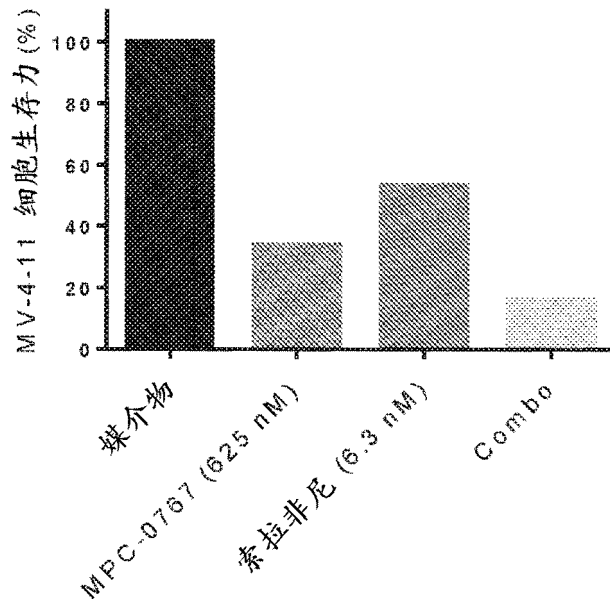


图 13D

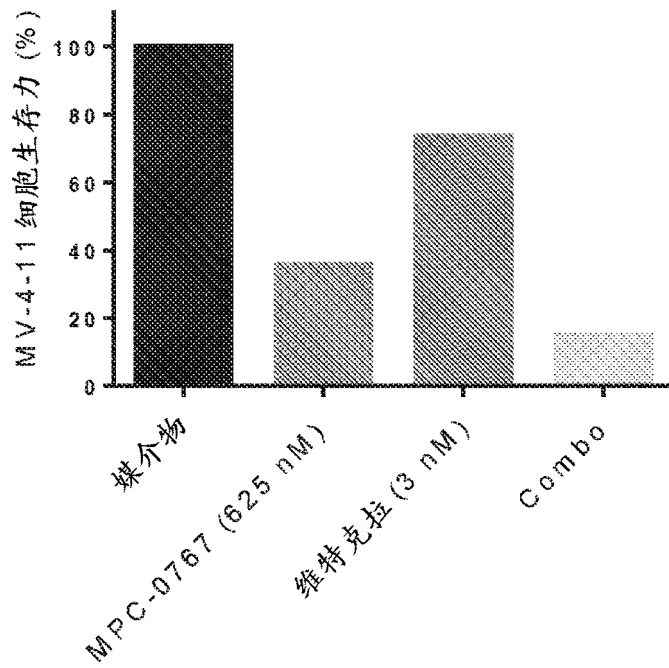


图 13E

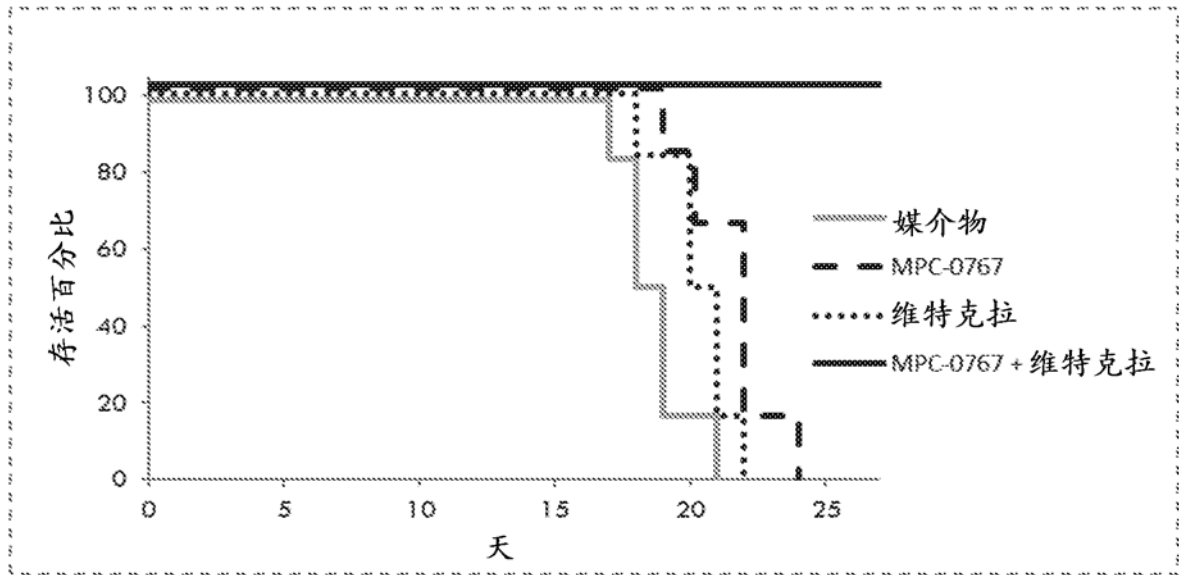


图 14

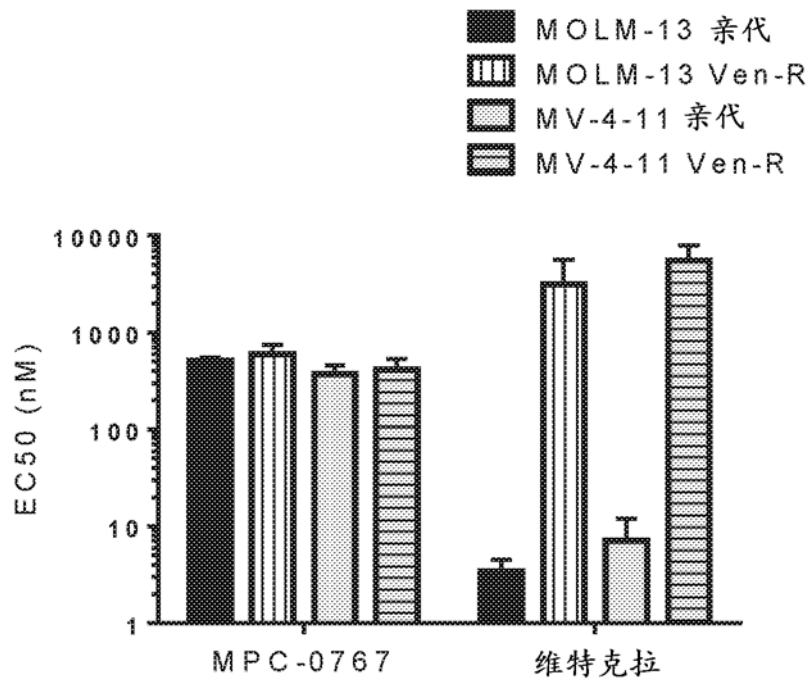


图 15

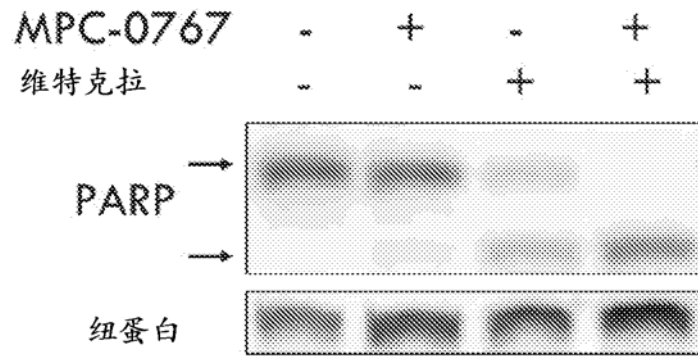


图 16A

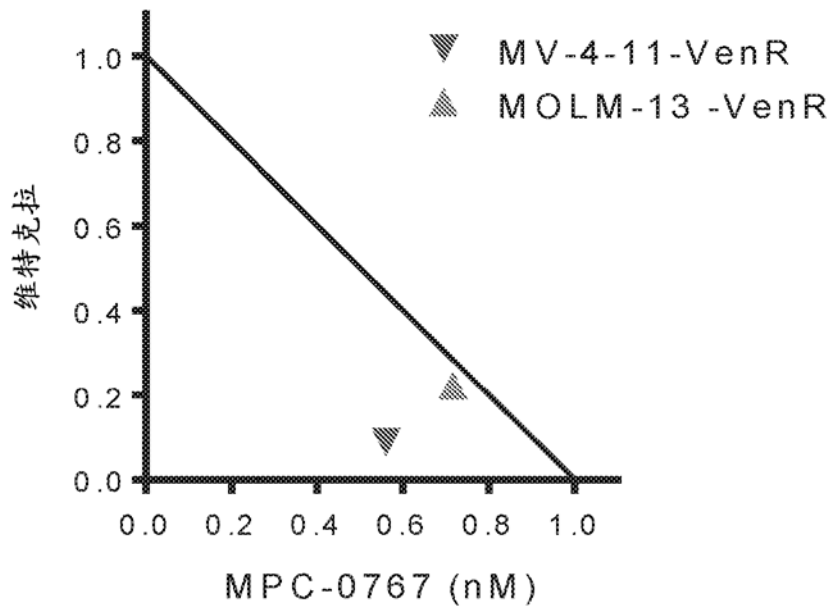


图 16B

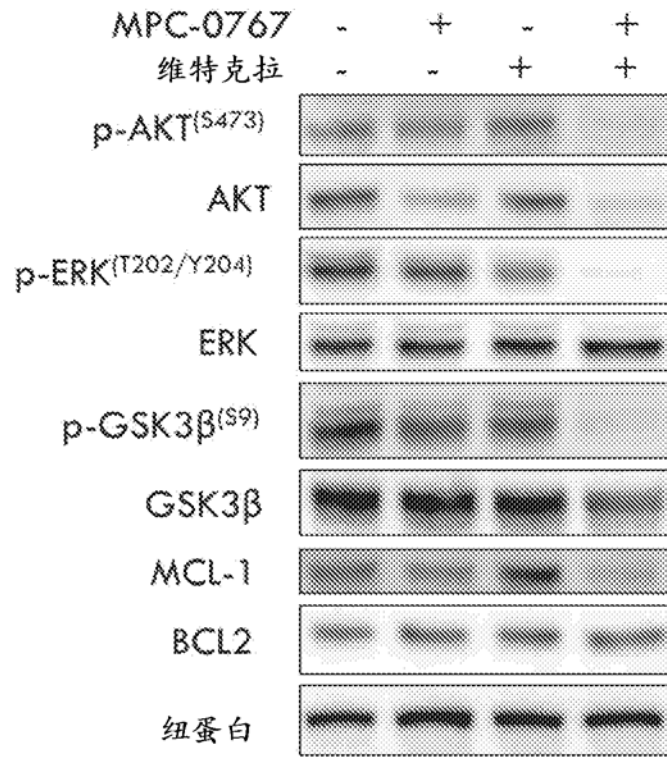


图 17A

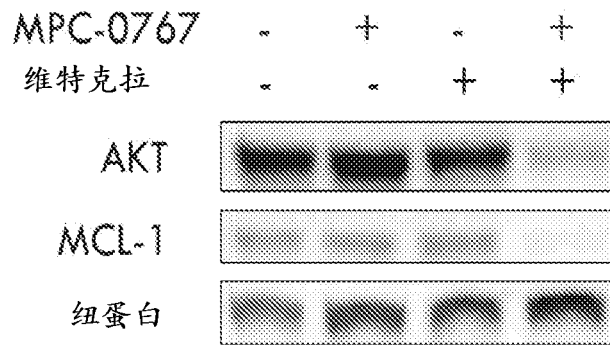


图 17B

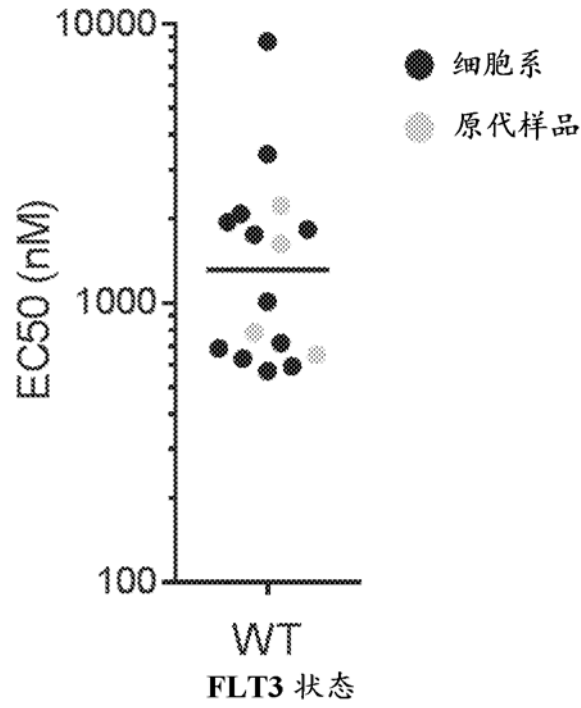


图 18

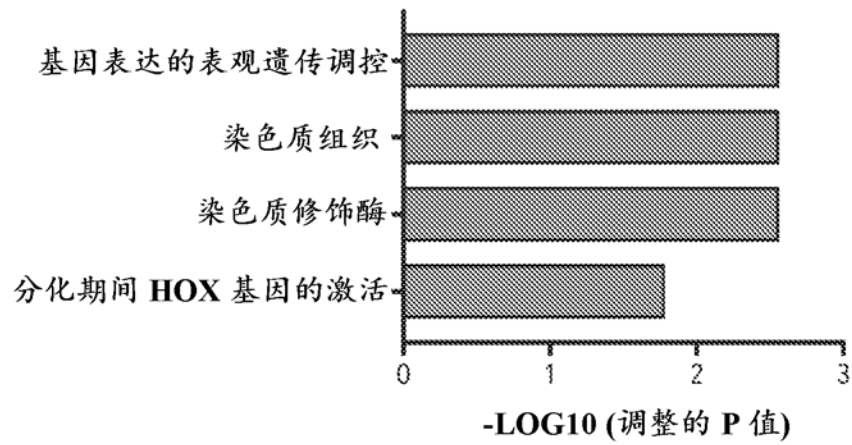


图 19A

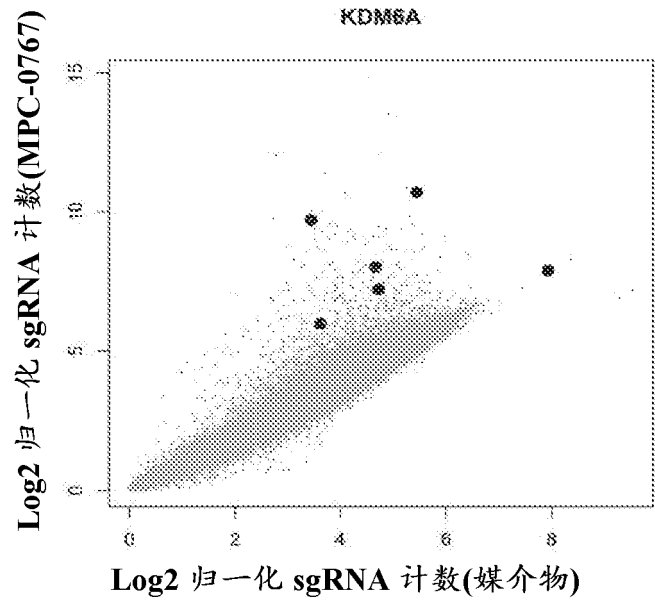


图 19B

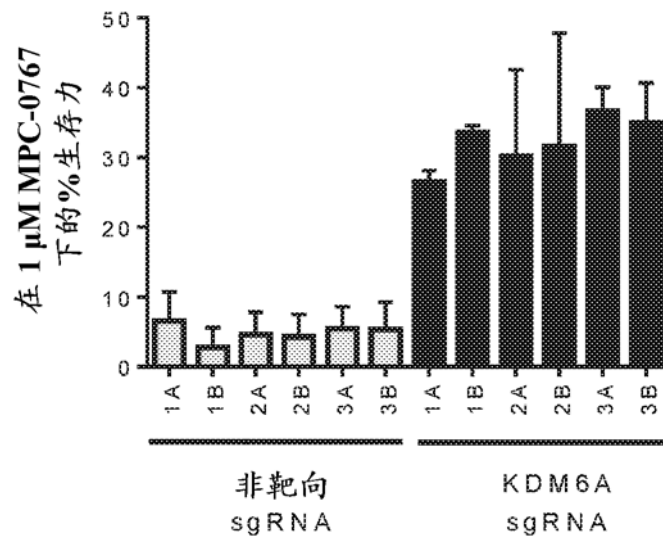


图 20A

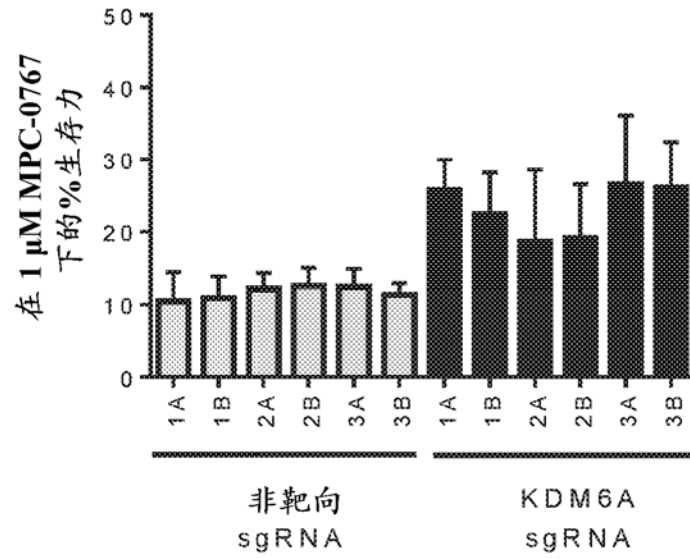


图 20B

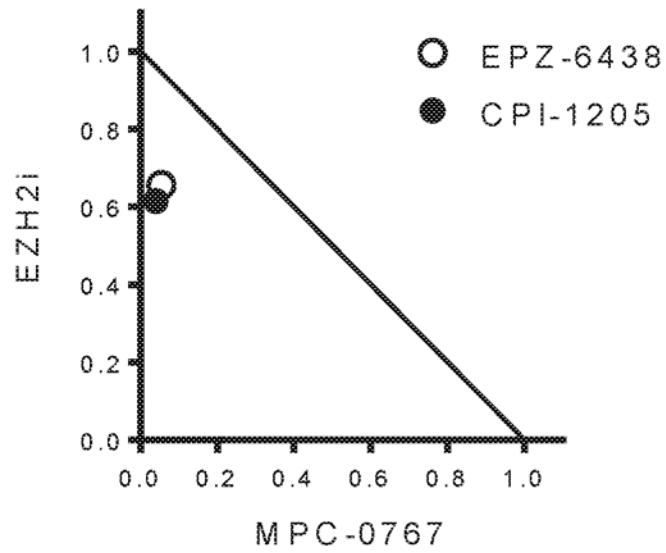


图 21

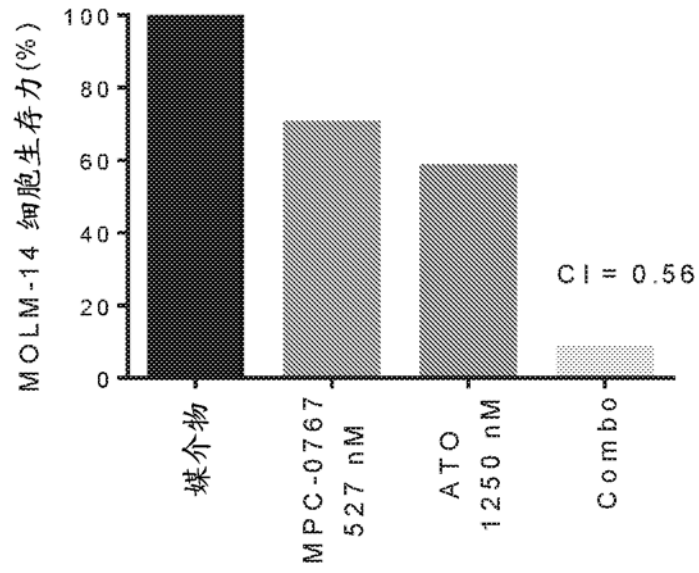


图 22

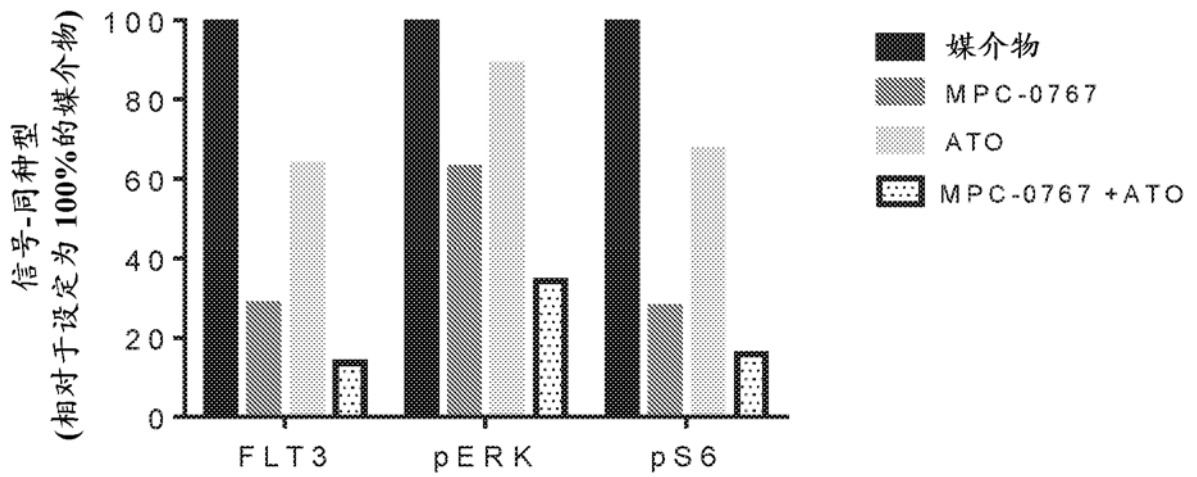


图 23

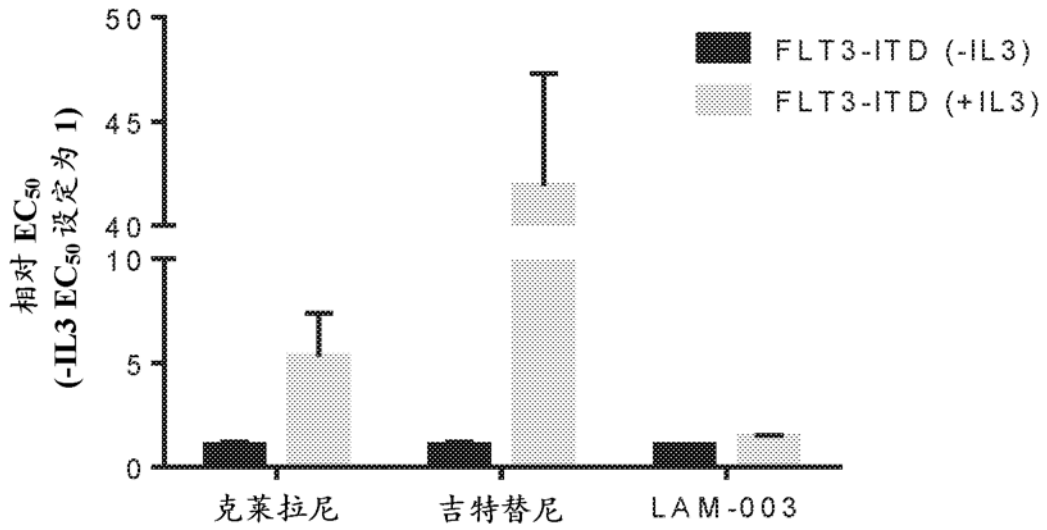


图 24

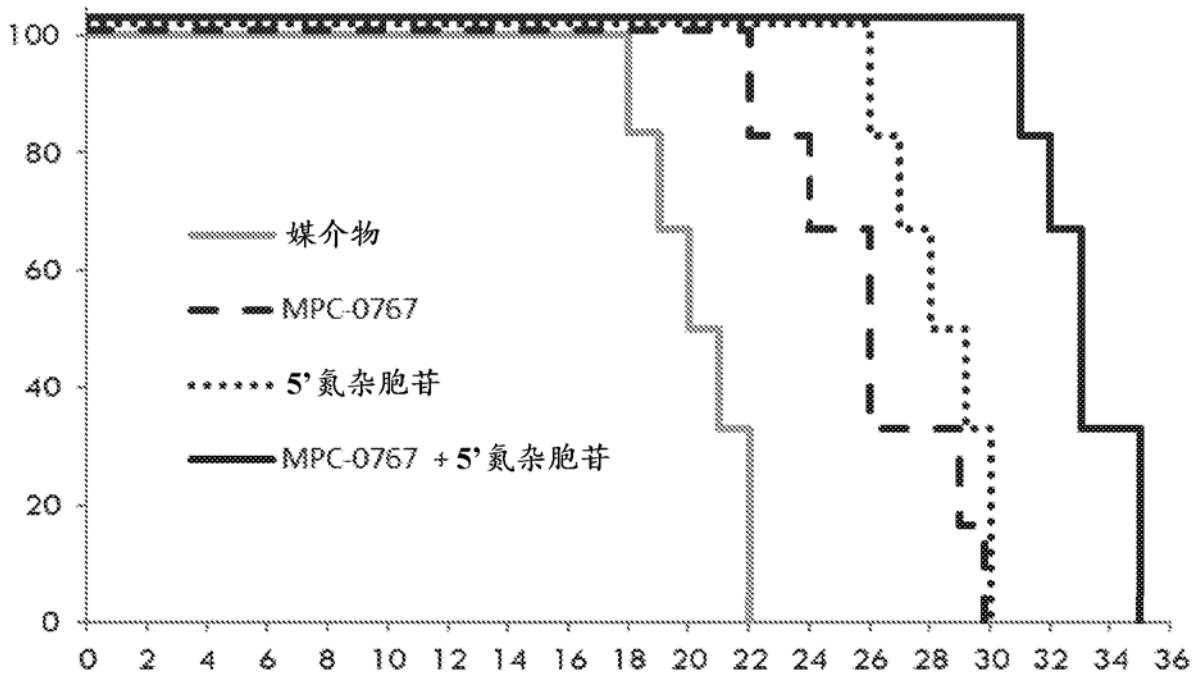


图 25

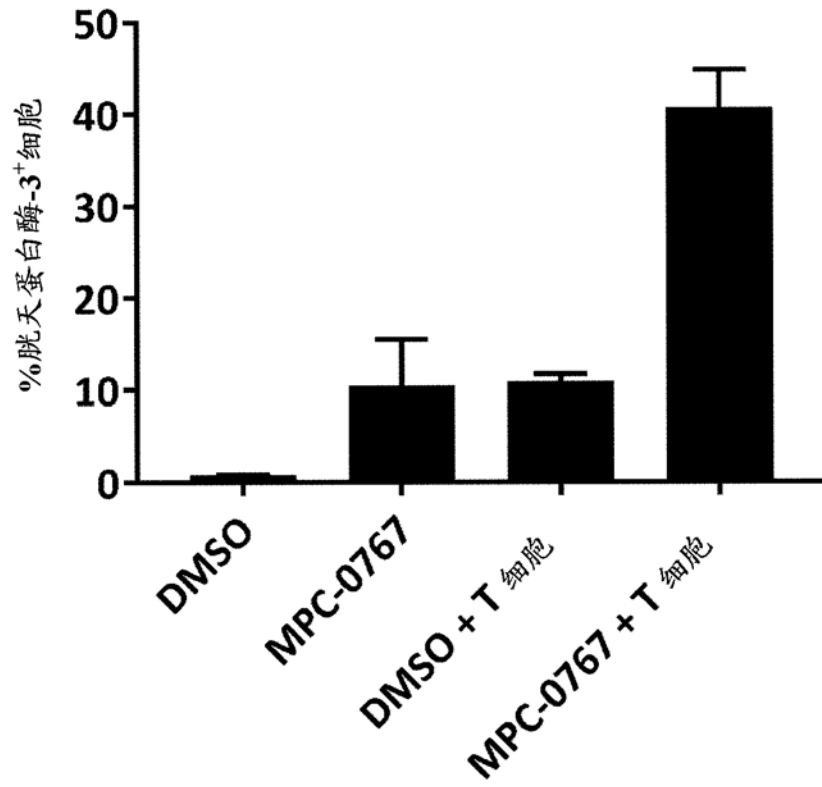


图 26

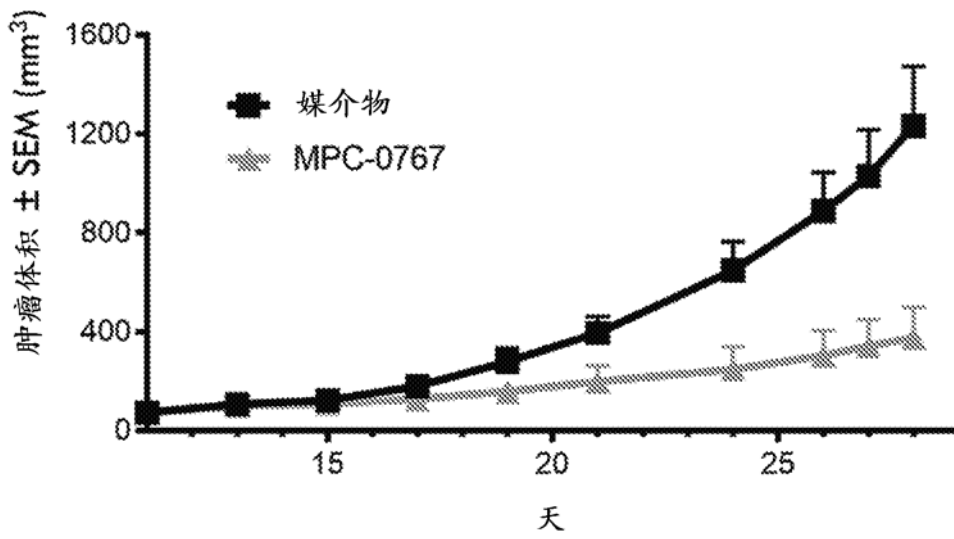


图 27A

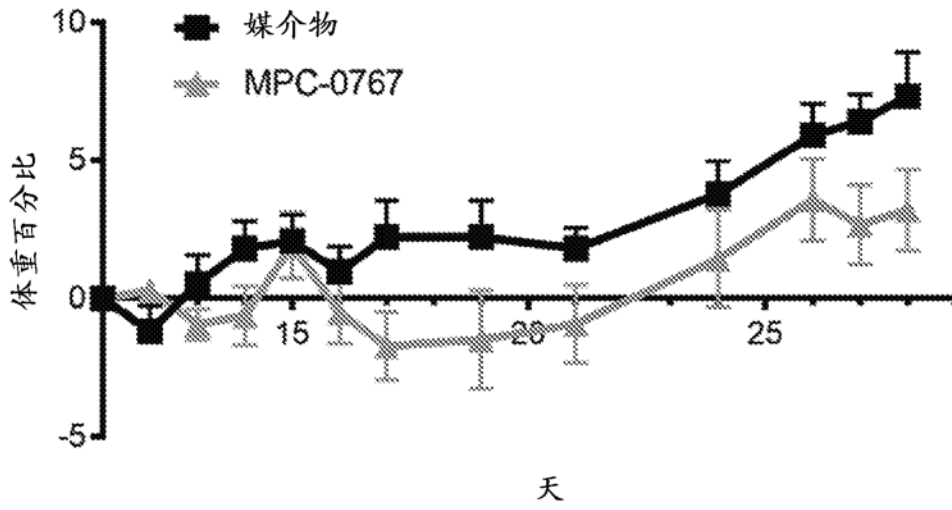


图 27B

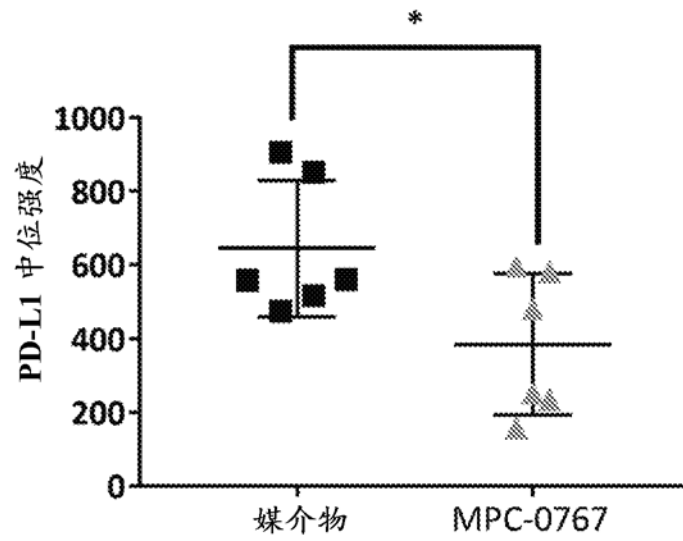


图 27C

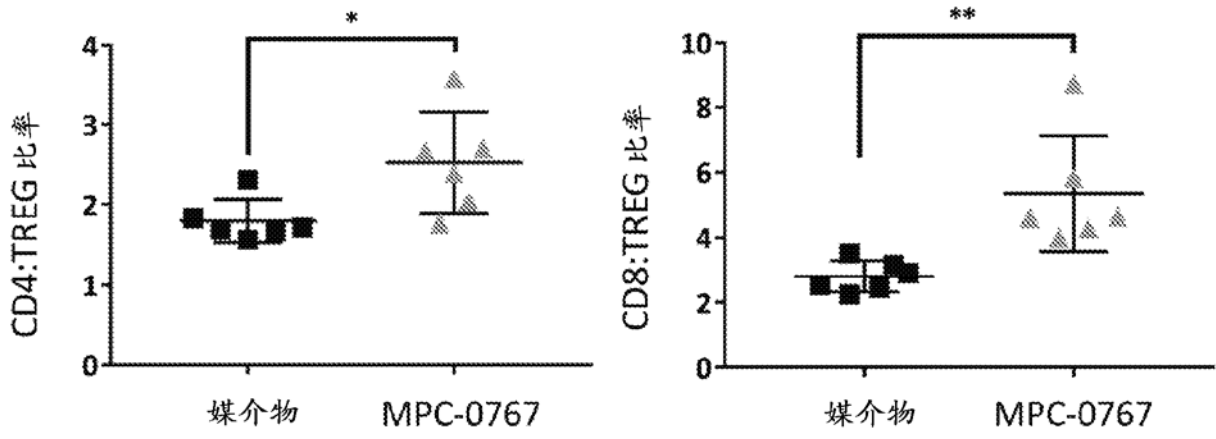


图 27D

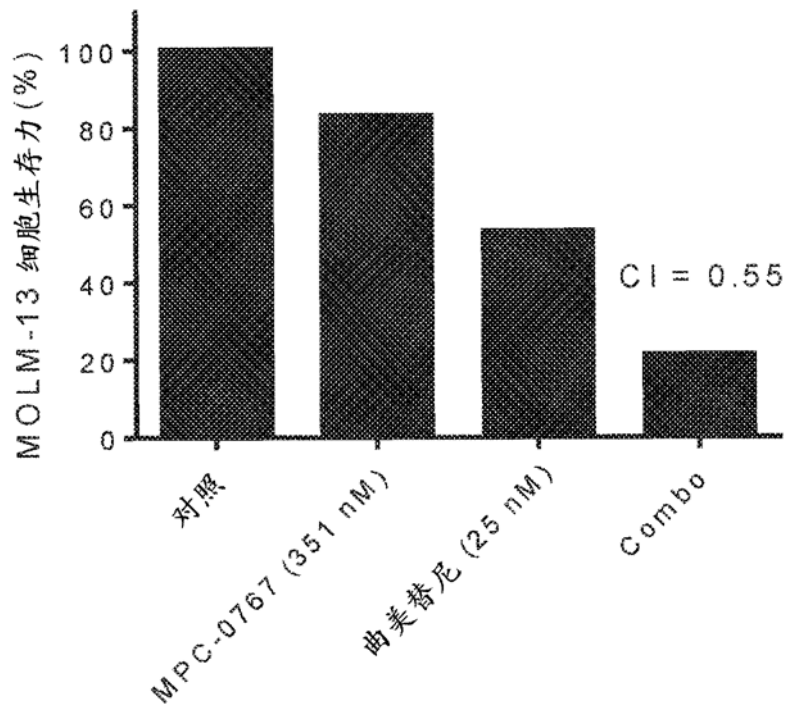


图 28

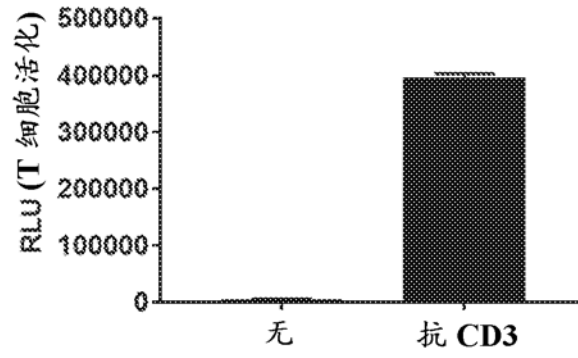


图 29A

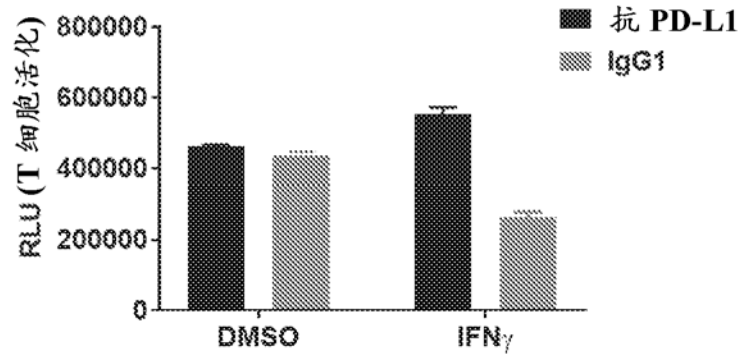


图 29B

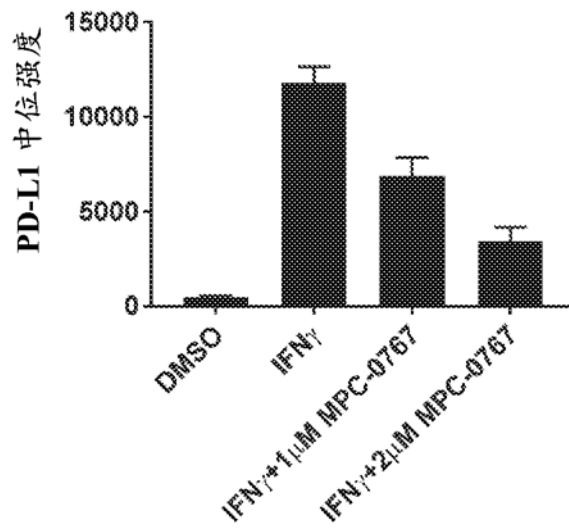


图 29C

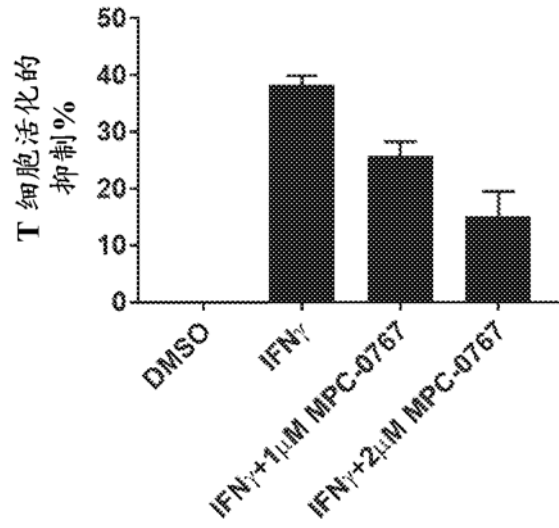


图 29D

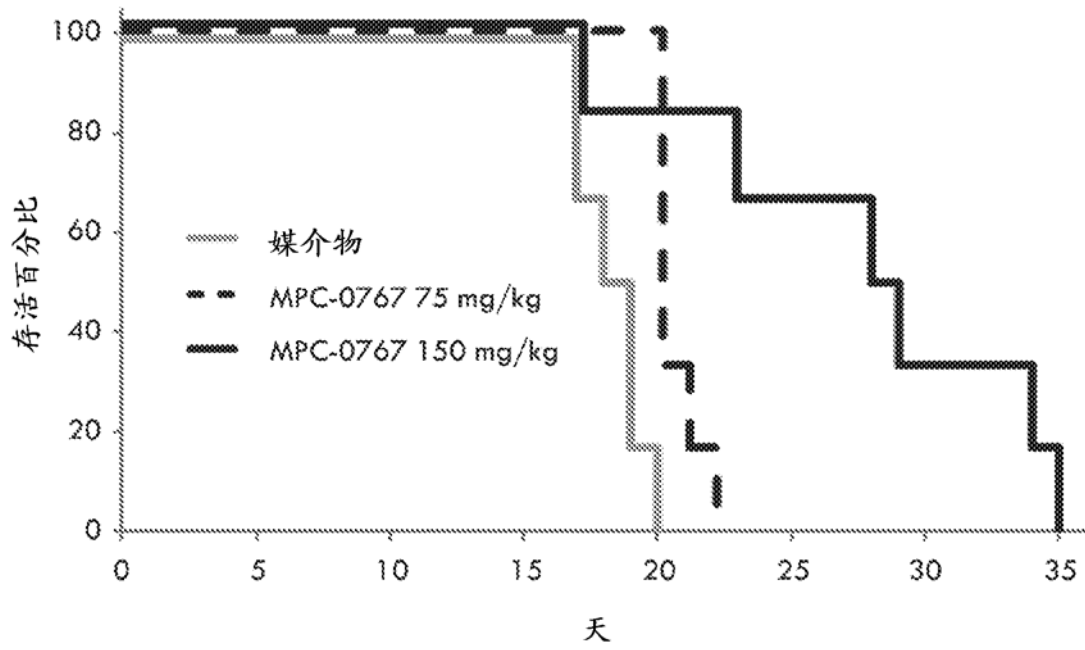


图 30