



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119233819 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 31

(21) 申请号 202380026367.8

(22) 申请日 2023.03.09

(30) 优先权数据

2022900578 2022.03.09 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2023/050163 2023.03.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/168491 EN 2023.09.14

(71) 申请人 种族肿瘤学公司

地址 澳大利亚新南威尔士

(72) 发明人 丹尼尔·蒂利特

妮可·玛格丽特·维瑞斯

希瑟·康斯坦斯·默里

约书亚·斯蒂芬·西德尼·布尔佐
佐夫斯基

(74) 专利代理机构 北京汉智嘉成知识产权代理
有限公司 11682

专利代理师 方珉 鲁山

(51) Int.Cl.

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

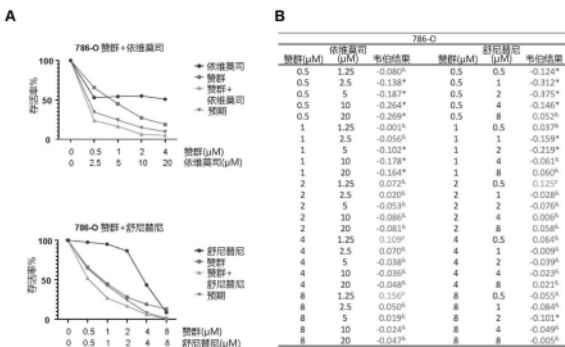
权利要求书4页 说明书25页 附图9页

(54) 发明名称

透明细胞肾细胞癌的治疗

(57) 摘要

本发明提供了治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症患者的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的至少第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。本发明还提供了用于治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的药物组合物和药剂盒,以及此类组合物用于制备治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的药物的用途。



1. 一种治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症患者的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的至少第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述蛋白激酶抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、DDR1、DDR2、RET和RIPK2中的一种或多于一种。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自:

- (a) 帕唑帕尼;
- (b) 乐伐替尼;
- (c) 卡博替尼;
- (d) 依维莫司;
- (e) 索拉非尼;
- (f) 舒尼替尼;
- (g) 替西罗莫司;
- (h) 丝裂霉素C;
- (i) 阿西替尼;
- (j) 替沃扎尼;和
- (k) 贝组替凡。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自:

- (a) 帕唑帕尼;
- (b) 乐伐替尼;和
- (c) 卡博替尼。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第二药剂是比生群或其药学上可接受的盐。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的一种蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的比生群或其药学上可接受的盐。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其包括治疗ccRCC,任选为蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其进一步包括施用至少一种用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的额外治疗剂。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述额外治疗剂是检查点抑制剂药物或免疫调节剂。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述至少一种额外治疗剂选自:

- (a) 阿特珠单抗;
- (b) 阿维单抗;
- (c) 贝伐单抗;
- (d) 西米普利单抗;
- (e) 多塔利单抗;
- (f) 德瓦鲁单抗;

- (g) 白介素-2;
- (h) 伊匹单抗;
- (i) 纳武单抗;
- (j) 派姆单抗;和
- (k) 阿地白介素。

12. 根据权利要求1所述的方法,其包括在向所述患者施用所述第二药剂之前、同时或之后,向所述患者施用所述至少一种蛋白激酶抑制剂。

13. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述至少一种蛋白激酶抑制剂和所述第二药剂被同时,任选地在单一组合中,施用到所述患者。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中与单独施用所述至少一种蛋白激酶或所述第二药剂的方法相比,所述治疗对ccRCC和其他VHL(-)癌症具有协同结果。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述至少一种蛋白激酶抑制剂的剂量比所述至少一种蛋白激酶抑制剂药剂在不与所述第二药剂一起施用时实现相同目标结果所需的剂量低至少25%。

16. 一种用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的药物组合物,其包含至少一种蛋白激酶抑制剂和第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述蛋白激酶抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、DDR1、DDR2、RET和RIPK2中的一种或多于一种。

19. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自:

- (a) 帕唑帕尼;
- (b) 乐伐替尼;
- (c) 卡博替尼;
- (d) 依维莫司;
- (e) 索拉非尼;
- (f) 舒尼替尼;
- (g) 替西罗莫司;
- (h) 丝裂霉素C;
- (i) 阿西替尼;
- (j) 替沃扎尼;和
- (k) 贝组替凡。

20. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自:

- (a) 帕唑帕尼;
- (b) 乐伐替尼;和
- (c) 卡博替尼。

21. 根据权利要求16至20中任一项所述的组合物,其还包含至少一种用于治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的额外治疗剂。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述额外治疗剂是检查点抑制剂药物或免疫

调节剂。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述至少一种额外治疗剂选自:

- (a) 阿特珠单抗;
- (b) 阿维单抗;
- (c) 贝伐单抗;
- (d) 西米普利单抗;
- (e) 多塔利单抗;
- (f) 德瓦鲁单抗;
- (g) 白介素-2;
- (h) 伊匹单抗;
- (i) 纳武单抗;
- (j) 派姆单抗;和
- (k) 阿地白介素。

24. 根据权利要求16至23中任一项所述的组合物,其中所述第二药剂是比生群或其药学上可接受的盐。

25. 根据权利要求16至24中任一项所述的组合物,其包含治疗有效量的一种蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的比生群或其药学上可接受的盐。

26. 根据权利要求16至25中任一项所述的组合物,其用于治疗ccRCC,任选为蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC。

27. 根据权利要求16中任一项所述的组合物,其与单独施用的所述至少一种蛋白激酶或所述第二药剂相比对ccRCC或其他VHL(-)癌症具有协同活性。

28. 根据权利要求16至26中任一项所述的组合物的用途,其用于制备用于在患者中治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的药物。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中所述药物用于治疗ccRCC,任选为蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC。

30. 根据权利要求28或权利要求29所述的用途,其中所述药物包含一种蛋白激酶抑制剂和比生群或其药学上可接受的盐。

31. 一种用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的药剂盒,所述药剂盒包含至少一种蛋白激酶抑制剂和至少第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。

32. 根据权利要求31所述的药剂盒,其中所述蛋白激酶抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂。

33. 根据权利要求31或权利要求32所述的药剂盒,其中所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、DDR1、DDR2、RET和RIPK2中的一种或多于一种。

34. 根据权利要求31所述的药剂盒,其中所述至少一种额外治疗剂选自:

- (a) 帕唑帕尼;
- (b) 乐伐替尼;
- (c) 卡博替尼;
- (d) 依维莫司;
- (e) 索拉非尼;

- (f) 舒尼替尼;
- (g) 替西罗莫司;
- (h) 丝裂霉素C;
- (i) 阿西替尼;
- (j) 替沃扎尼;和
- (k) 贝组替凡。

35. 根据权利要求31所述的药剂盒,其中所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自:

- (a) 帕唑帕尼;
- (b) 乐伐替尼;和
- (c) 卡博替尼。

36. 根据权利要求31至35中任一项所述的药剂盒,其中所述第二药剂是比生群或其药学上可接受的盐。

37. 根据权利要求31至36中任一项所述的药剂盒,其包含一种蛋白激酶抑制剂和比生群或其药学上可接受的盐。

38. 根据权利要求31至37中任一项所述的药剂盒,其进一步包含至少一种用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的额外治疗剂。

39. 根据权利要求38所述的药剂盒,其中所述额外治疗剂是检查点抑制剂药物或免疫调节剂。

40. 根据权利要求39所述的药剂盒,其中所述至少一种额外治疗剂选自:

- (a) 阿特珠单抗;
- (b) 阿维单抗;
- (c) 贝伐单抗;
- (d) 西米普利单抗;
- (e) 多塔利单抗;
- (f) 德瓦鲁单抗;
- (g) 白介素-2;
- (h) 伊匹单抗;
- (i) 纳武单抗;
- (j) 派姆单抗;和
- (k) 阿地白介素。

41. 根据权利要求31至40中任一项所述的药剂盒,其用于治疗ccRCC,任选为蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC。

44. 根据权利要求31至41中任一项所述的药剂盒,其包含在向所述患者施用所述第二药剂之前、同时或之后向所述患者施用所述至少一种蛋白激酶抑制剂的说明书。

43. 根据权利要求31至42中任一项所述的药剂盒,其包含向所述患者同时施用所述至少一种蛋白激酶抑制剂和所述第二药剂的说明书。

透明细胞肾细胞癌的治疗

技术领域

[0001] 本发明涉及比生群(bisantrene)与蛋白激酶抑制剂的联合用于治疗透明细胞肾细胞癌(ccRCC)和具有无活性希佩尔-林道综合征(von Hippel-Lindau,VHL)肿瘤抑制基因的其他癌症的用途。本发明还设想了用于此类治疗的药物组合物和药剂盒,以及此类组合物用于制造此类治疗的药物的用途。

背景技术

[0002] 肾癌是十大最常见的癌症之一。肾细胞癌(RCC)占有所有新发癌症的3.8%。大约80-85%的肾细胞癌(RCC)是透明细胞肾细胞癌(ccRCC)。另外15%至20%是非透明细胞RCC,其包含一组多样的组织学亚型,每种亚型都有不同的分子特征。根据美国癌症协会的数据,男性发生肾癌的终生风险为1/47,女性为1/82。

[0003] 吸烟和肥胖是RCC发展的既定危险因素。还存在几种遗传类型的RCC,其中希佩尔-林道综合征(VHL)病最为常见。VHL病由VHL基因中的常染色体显性突变引起,所述突变使个体易患ccRCC和一系列其他癌症。VHL功能丧失也被证明在散发性ccRCC中是重要的。大量研究报告了在超过90%的散发性ccRCC中由等位基因丧失、突变和启动子甲基化引起的VHL功能丧失变化VHL(-)。

[0004] 在美国,2019年肾癌新增病例约65000例,死亡15000例。晚期疾病患者通常是无症状的,20%左右的患者在诊断时患有转移性疾病。5年生存率最重要的预后决定因素是肿瘤分期、分级、肿瘤的局部范围、区域淋巴结转移的存在以及出现时转移性疾病的证据。RCC主要转移到肺、淋巴结、骨、肝、肾上腺和脑。转移性ccRCC的5年生存率低至12%。

[0005] 手术是I至III期ccRCC的第一线治疗,首先进行细胞减瘤性肾切除术,然后进行通常用于治疗转移性疾病的系统性疗法。RCC对细胞毒性化疗或放疗没有高响应性。靶向疗法使越来越多的RCC患者受益。近年来,靶向药剂例如血管内皮生长因子(VEGF)结合单克隆抗体(贝伐单抗(bevacizumab))、对VEGF受体具有强效活性的口服酪氨酸激酶抑制剂(例如阿西替尼(axitinib)、卡博替尼(cabozantinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)和替沃扎尼(tivozanib))以及对雷帕霉素(rapamycin)抑制剂的哺乳动物靶点具有强效活性的口服酪氨酸激酶抑制剂(依维莫司(everolimus)和替西罗莫司(temsirolimus)),提供了新的治疗选择。

[0006] 大多数ccRCC肿瘤细胞在细胞膜上表达PD-L1,帮助它们逃避免疫攻击。免疫检查点抑制剂PD-1抑制或PD-L1抑制阻断了这一途径,释放了免疫系统的“关闭开关”,提高了细胞毒性T细胞杀死肿瘤细胞的能力。CTLA-4抑制在免疫致敏阶段中阻止自身反应性T细胞,从而支持效应T细胞的激活和增殖。FDA已批准两种PD-1抑制剂(纳武单抗(nivolumab)和派姆单抗(pembrolizumab))、一种PD-L1抑制剂(阿维单抗(avelumab))和一种CTLA-4抑制剂(伊匹单抗(ipilimumab))用于ccRCC。其他可能考虑的PD-1/PD-L1免疫检查点抑制剂包括阿特珠单抗(atezolizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、多塔利单抗(dostarlimab)和德瓦鲁单抗(durvalumab)。

[0007] 尽管存在这些新的治疗选项,但许多患者由于耐药性或旁路途径的发展而出现疾病进展。因此,需要新的药物、新的药物组合或新的联合药物治疗来治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种通过比生群与蛋白激酶抑制剂的联合给药来治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的新方式。这满足了对改善ccRCC和其他VHL(-)癌症患者、特别是蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC患者的临床结果的新疗法的需求。

[0009] 比生群是一种具有多种作用机制的抗肿瘤药物,所述作用机制包括DNA嵌入,拓扑异构酶和脂肪量及肥胖相关蛋白(FTO)的抑制,以及免疫系统的激活。

[0010] 令人惊讶的是,在这些研究的过程中发现,比生群及其药学上可接受的盐与蛋白激酶抑制剂协同作用,对抗透明细胞肾癌细胞。

[0011] 因此,本发明的一个方面提供了一种治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症患者的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的至少第二药剂,所述蛋白激酶抑制剂可以是酪氨酸激酶抑制剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。

[0012] 根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、DDR1、DDR2、RET和RIPK2中的一种或多于一种。根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂抑制mTOR。

[0013] 根据某些实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自:

[0014] (a) 帕唑帕尼(pazopanib);

[0015] (b) 乐伐替尼(lenvatinib);

[0016] (c) 卡博替尼(cabozantinib);

[0017] (d) 依维莫司(everolimus);

[0018] (e) 索拉非尼(sorafenib);

[0019] (f) 舒尼替尼(sunitinib);

[0020] (g) 替西罗莫司(temsirolimus);

[0021] (h) 丝裂霉素C(mitomycin C);

[0022] (i) 阿西替尼(axitinib);

[0023] (j) 替沃扎尼(tivozanib);和

[0024] (k) 贝组替凡(belzutifan)。

[0025] 根据某些实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自:

[0026] (a) 帕唑帕尼;

[0027] (b) 乐伐替尼;和

[0028] (c) 卡博替尼。

[0029] 根据某些实施方案,所述第二药剂是比生群或其药学上可接受的盐。

[0030] 根据某些实施方案,所述方法包括向患者施用治疗有效量的一种蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的比生群或其药学上可接受的盐。

[0031] 根据某些实施方案,所述方法包括治疗蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC。

[0032] 所述方法可以进一步包括确定患者癌症的VHL突变和表观遗传状态的步骤。VHL突变或表观遗传状态可以在治疗开始之前或在治疗期间确定,作为治疗进展的标志物。癌症的VHL突变或表观遗传状态可以通过下一代测序、通过RT-PCR、通过使用针对VHL的适合抗体的ELISA测定、通过RNA杂交测定或本领域已知的任何其他方法来确定。

[0033] 根据某些实施方案,所述方法可以进一步包括施用至少一种用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的额外治疗剂,任选为检查点抑制剂药物或免疫调节剂。所述至少一种额外治疗剂选自阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维单抗(avelumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、多塔利单抗(dostarlimab)、德瓦鲁单抗(durvaluma)、白介素-2(interleukin-2)、伊匹单抗(ipilimumab)、纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和阿地白介素(proleukin)。

[0034] 根据某些实施方案,所述方法可以包括在向所述患者施用所述第二药剂之前、同时或之后,向所述患者施用所述至少一种蛋白激酶抑制剂。

[0035] 根据其他实施方案,所述方法可以包括向所述患者同时,任选地在单一组合中,施用所述至少一种蛋白激酶抑制剂和所述第二药剂。

[0036] 根据某些实施方案,与单独地施用所述至少一种蛋白激酶或所述第二药剂的方法相比,所述治疗对ccRCC和其他VHL(-)癌症具有协同结果。在某些实施方案中,所述至少一种蛋白激酶抑制剂的剂量比所述至少一种蛋白激酶抑制剂药剂在不与所述第二药剂一起施用时实现相同目标结果所需的剂量低至少20%。

[0037] 本发明的另一方面提供了一种药物组合物,其用于通过如上所述的治疗方法的实施方案治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症,所述组合物包含至少一种如上所述的蛋白激酶抑制剂和如上所述的第二药剂,所述蛋白激酶抑制剂可以是酪氨酸激酶抑制剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。所述组合物可以包含如上所述的其他活性药剂。

[0038] 本发明的另一方面提供了如上所述根据本发明的组合物的用途,其用于制备用于在患者中治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症、任选为蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC的药物。

[0039] 本发明的又一方面提供了一种药剂盒,其用于通过如上所述的本发明的方法的实施方案治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症,任选为蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC,所述药剂盒包含至少一种如上所述的蛋白激酶抑制剂(任选为酪氨酸激酶抑制剂)和至少一种如上所述的第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。根据本发明的药剂盒可以包含在向所述患者施用所述第二药剂之前、同时或之后向所述患者施用所述至少一种蛋白激酶抑制剂的说明书。或者,根据本发明的药剂盒可以包含向所述患者同时施用所述至少一种蛋白激酶抑制剂和所述第二药剂的说明书。

附图说明

[0040] 参考说明书、随附的权利要求书和附图,将更好地理解下述发明,其中术语“Zan”或“赞群(Zantrene)”是比生群的替代术语。

[0041] 图1示出了在786-0细胞中比生群-依维莫司或-舒尼替尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的依维莫司和舒尼替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所

述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B) 所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0042] 图2示出了在786-0细胞中比生群-索拉非尼或-帕唑帕尼药物组合的韦伯分析。A) 对所指示的不同剂量范围的索拉非尼和帕唑帕尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B) 所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(红色),在-0.1至0.1之间为累加(绿色),并且>0.1为拮抗(黄色)。

[0043] 图3示出了在786-0细胞中比生群-乐伐替尼或-卡博替尼药物组合的韦伯分析。A) 对所指示的不同剂量范围的乐伐替尼和卡博替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B) 所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0044] 图4示出了在Caki-1细胞中比生群-依维莫司或-舒尼替尼药物组合的韦伯分析。A) 对所指示的不同剂量范围的依维莫司和舒尼替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B) 所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0045] 图5示出了在Caki-1细胞中比生群-索拉非尼或-帕唑帕尼药物组合的韦伯分析。A) 对所指示的不同剂量范围的索拉非尼和帕唑帕尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B) 所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0046] 图6示出了在Caki-1细胞中比生群-乐伐替尼或-卡博替尼药物组合的韦伯分析。A) 对所指示的不同剂量范围的乐伐替尼和卡博替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B) 所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0047] 图7示出了在Caki-2细胞中比生群-依维莫司或-舒尼替尼药物组合的韦伯分析。A) 对所指示的不同剂量范围的依维莫司和舒尼替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B) 所有测试的药物组合剂量的韦伯

分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0048] 图8示出了在Caki-2细胞中比生群-索拉非尼或-帕唑帕尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的索拉非尼和帕唑帕尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0049] 图9示出了在Caki-2细胞中比生群-乐伐替尼或-卡博替尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的乐伐替尼和卡博替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0050] 图10示出了在RCC4 EV细胞中比生群-依维莫司或-舒尼替尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的依维莫司和舒尼替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0051] 图11示出了在RCC4 EV细胞中比生群-索拉非尼或-帕唑帕尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的索拉非尼和帕唑帕尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0052] 图12示出了在RCC4 EV细胞中比生群-乐伐替尼或-卡博替尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的乐伐替尼和卡博替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0053] 图13示出了在RCC4 VHL细胞中比生群-依维莫司或-舒尼替尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的依维莫司和舒尼替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0054] 图14示出了在RCC4 VHL细胞中比生群-索拉非尼或-帕唑帕尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的索拉非尼和帕唑帕尼与赞群的组合做出响应的细胞存活

率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0055] 图15示出了在RCC4 VHL细胞中比生群-乐伐替尼或-卡博替尼药物组合的韦伯分析。A)对所指示的不同剂量范围的乐伐替尼和卡博替尼与赞群的组合做出响应的细胞存活率。示出了单独的每种药物和所述组合的实验数据。“预期值”使用韦伯方法计算,并示出了在所述药物组合是累加的情况下的预期值。因此,低于这条线的任何实验值均被认为是协同的。等于或接近所述线是累加的;高于所述线是拮抗的。B)所有测试的药物组合剂量的韦伯分析,其中<-0.1的结果表示协同(*),在-0.1至0.1之间为累加(&),并且>0.1为拮抗(#)。

[0056] 图16示出了比生群加上靶向或化学治疗剂,以克服ccRCC和其他VHL(-)癌症的治疗抗性。

[0057] 图17示出了比生群加上检查点抑制剂组合试验设计,以克服ccRCC和其他VHL(-)癌症的免疫疗法抗性。

[0058] 图18示出了等基因肾癌细胞系RCC4 EV(VHL(-)突变体)和RCC4VHL(VHL挽救系)的比生群敏感性与VHL状态之间的关联。(A)基于VHL状态的IC₅₀值,使用t-检验进行比较。(B)RCC4等基因细胞系对赞群敏感性的直接比较。平均值±SEM,n=3。

[0059] 图19示出了使用克隆源性测定法所评估的比生群敏感性与VHL状态之间的关联。(A)比较了VHL突变体与野生型细胞系之间的IC₅₀值。NS,不显著,未配对t-检验。(B)对RCC4 EV和RCC4 VHL挽救细胞系观察到的集落。n=4,*p<0.05,配对t-检验。

具体实施方式

[0060] 定义

[0061] 本文所使用的“治疗”意指影响受试者/患者、组织或细胞以获得所需药理学和/或生理学效果,并包括抑制病症,即减缓或阻止其发展;或缓解或改善所述病症的效应,即引起所述病症效应的逆转或消退。

[0062] 本文所使用的“预防”意指在可能有病症风险的细胞、组织或受试者中阻止所述病症的出现,但不一定意味着病症最终不会发生或受试者最终不会发生病症。预防包括在细胞、组织或受试者中延缓病症的发作。

[0063] 本文所使用的术语“受试者”或“患者”是指哺乳动物。所述哺乳动物可以是人类或非人类。非人类的实例包括灵长类动物、家畜(例如绵羊、奶牛、马、驴、猪)、伴侣动物(例如狗、猫)、实验室试验动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠)、圈养野生动物(例如狐狸、鹿)。通常,所述哺乳动物是人或非人灵长类动物。更典型情况下,所述哺乳动物是人。

[0064] 术语“组合物”涵盖包含活性药物成分(例如“蛋白激酶抑制剂”和“包含比生群或比生群衍生物,或比生群或比生群的心脏保护衍生物的药学上可接受的盐的第二药剂”)和赋形剂或载体的组合物和制剂,以及含有载体的组合物或制剂。在药物组合物中,所述赋形剂或载体是“药学上可接受的”,这意味着它在生物学上或其他方面并不是不理想的,即将所述材料并入到给患者施用的药物组合物中而不会引起任何不理想的生物效应,也不会以有害的方式与包含它的组合物的任何其他组分相互作用。补充活性成分也可以并入到

所述组合物中。

[0065] 例如在“药学上可以接受的盐”或“药学上可接受的赋形剂或载体”的叙述中的“药学上可接受的”，在本文中意指在生物学上或其他方面并不是不理想的材料，即可以将所述材料并入到给患者施用的药物组合物中而不会引起任何不理想的生物效应，也不会以有害的方式与包含它的组合物的任何其他组分相互作用。

[0066] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以产生所需治疗响应的活性药物成分的量。具体的有效量或治疗有效量将随着诸如所治疗的特定病症、受试者的年龄、体重、一般健康状况、身体状况、性别和饮食、治疗持续时间、同时疗法（如果有的话）的性质以及特定病症的严重程度等因素而变化。

[0067] 本文所使用的“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、溶媒、包衣、稀释剂、增量剂、载体溶液、悬液、胶体以及成型剂和结合剂，其任何和所有可能包括本领域已知的其他药物赋形剂，包括润滑剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、抗氧化剂、其他稳定剂（包括物理稳定剂例如增稠剂和黏度增强剂）、着色剂、调味剂和甜味剂等。此类介质和试剂用于药物活性物质在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容，否则设想了将其用于治疗组合物中。

[0068] 本文所使用的“施用”或“给药”是指向受试者分配、应用或提供一种或多种药剂。施用可以使用本领域中已知的多种方法中的任一种来进行。例如，本文所使用的“施用”意指通过输注（静脉内给药（i.v.））、肠胃外给药。“肠胃外”意指静脉内、皮下和肌肉内给药。

[0069] 发明详述

[0070] 本公开涉及一种治疗ccRCC或其他VHL(-) 癌症、特别是蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC的方法，所述方法包括施用治疗活性量的比生群与蛋白激酶抑制剂、特别是酪氨酸激酶抑制剂（“TKI”）的组合。

[0071] 蛋白激酶抑制剂

[0072] 蛋白激酶是将靶蛋白上带有羟基的氨基酸侧链（即丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸）以及其他靶点（通常在信号传导途径中）磷酸化的蛋白质酶类。事实上，许多信号传导途径包含蛋白激酶的级联。在许多情况下，这种磷酸化导致靶蛋白的构象变化，这反过来可能导致靶蛋白活性的激活或抑制，或改变其物理性质（从而调节其相互作用）。因此，蛋白质磷酸化和去磷酸化事件可能激活或抑制特定生理途径。这种信号传导的失调，例如通过导致特定蛋白质或途径的组成性表达或不受调节的活性的突变，可能与癌症有关和/或允许其存活。已将各种蛋白激酶例如EGFR、VEGFR、HER、ALK、RAS和RAF（仅举几例）的表达和/或活性的失调与包括ccRCC细胞在内的各种肿瘤细胞的生长增加、增殖、运动和存活相关联。

[0073] 本领域中已知的蛋白激酶范围非常广泛。事实上，已知人类基因组包括518个蛋白激酶基因。已知大量蛋白激酶与包括ccRCC在内的癌症有关，这并不令人吃惊，因为它们与信号传导途径和与生长相关的途径（特别是血管生成）的激活或抑制以及跨膜信号传导有关。

[0074] 与癌症、特别是肾癌例如ccRCC相关的蛋白激酶包括例如酪氨酸激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶、细胞周期蛋白依赖性激酶、极光激酶、mTOR和丝裂原活化蛋白激酶等，这些可能包括例如激酶如AATK、ABL1、AKT2、ALK、AURKA、AXL、CHK2、DDR1、DDR2、EML4-ALK、EPHA2、EPHA5、ERBB2、EGFR、FIP1L1-PDGFR、FTL3、HER、HIF、KIT、MET、p21Cip1、p27Kip1、PDGFR、

PKD1、RET、视网膜母细胞瘤蛋白(RB)、RIPK2、SCH1、VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3。

[0075] 重要的是要注意,如上所述的激酶可能具有主要靶点,但也可能磷酸化其他靶点/部分。例如,酪氨酸激酶还可以磷酸化丝氨酸和/或苏氨酸羟基部分。类似地,丝氨酸/苏氨酸激酶也可以磷酸化酪氨酸羟基部分。同样,尽管激酶可能主要靶向一种蛋白质,但它也可能磷酸化其他蛋白质。因此,酪氨酸激酶可能主要靶向或已知靶向特定蛋白质(通常为受体)上的酪氨酸羟基,但也可以能够磷酸化丝氨酸和/或苏氨酸和/或其他蛋白质上的羟基部分。正如本领域中已知的,靶特异性的这种可变性在蛋白激酶的背景下并入本文。

[0076] 已经开发出多种蛋白激酶抑制剂用于治疗各种癌症,包括伊马替尼(imatinib),它是2001年获得FDA批准的第一种合理设计的蛋白激酶抑制剂。从那时起,开发出大量蛋白激酶抑制剂,例如吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、达沙替尼(dasatinib)、尼罗替尼(nilotinib)、拉帕替尼(lapatinib)、奥希替尼(osimertinib)、奥莫替尼(olmutinib)、劳拉替尼(lorlatinib)、卡马替尼(capmatinib)、特泊替尼(tepotinib)、塞尔帕替尼(selpercatinib)、普拉替尼(pralsetinib)、司美替尼(selumetinib)、曲美替尼(trametinib)、阿法替尼(afatinib)、依鲁替尼(ibrutinib)、达拉菲尼(dabrafenib)、帕纳替尼(ponatinib)、博舒替尼(bosutinib)、拉多替尼(radotinib)、艾代拉里斯(idelalisib)、克唑替尼(crizotinib)、维莫非尼(vemurafenib)、xolitinib、奥莫替尼(olmutinib)、丝裂霉素C(Mitomycin C)、替西罗莫司(temsirolimus)、依维莫司(everolimus)、阿西替尼(axitinib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、卡博替尼(cabozantinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、帕唑帕尼(pazopanib)和替沃扎尼(tivozanib),仅举几例。

[0077] 目前批准用于治疗ccRCC的蛋白激酶抑制剂包括例如替西罗莫司、阿西替尼、贝组替凡(belzutifan)、卡博替尼、依维莫司、乐伐替尼、丝裂霉素C、帕唑帕尼、索拉非尼、舒尼替尼和替沃扎尼。

[0078] 阿西替尼、卡博替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、舒尼替尼是小分子酪氨酸激酶抑制剂,包括诸如VEGFR家族的靶点。贝组替凡是低氧诱导因子(HIF)-2 α (HIF-2a)的抑制剂。依维莫司和替西罗莫司是雷帕霉素哺乳动物靶点(mTOR)复合物的抑制剂。乐伐替尼是一种多激酶抑制剂,作用于VEGFR1、2和3,以及成纤维细胞生长因子受体(FGFR)1、2、3和4、血小板衍生生长因子受体(PDGFR) α 、c-Kit和RET原癌基因。丝裂霉素C是一种强效DNA交联化学治疗剂。替沃扎尼是一种作用于VEGFR1、2和3的多激酶抑制剂。

[0079] 除了VEGFR蛋白激酶家族之外,乐伐替尼、卡博替尼和帕唑帕尼的常见靶点包括DDR1和DDR2(盘状结构域受体1和2)、RET(“转染期间重排”)和RIPK2(受体相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶2)。RET也已被鉴定为舒尼替尼和阿西替尼的靶点,AXL和MET被鉴定为卡博替尼的额外靶点。

[0080] 尽管在使用蛋白激酶抑制剂治疗包括ccRCC和其他VHL(-)癌症在内的各种癌症中取得了成功,但许多患者由于耐药性或旁路途径的发生而出现疾病进展。

[0081] 目前的研究显示,在用于治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的比生群和蛋白激酶抑制剂之间存在令人惊讶的协同作用。这种协同作用有望至少有助于逆转或减轻耐药性的发生(如果不是消除的话),还有望具有允许降低蛋白激酶抑制剂和/或比生群的剂量,从而减少任何不良副作用的附加益处。

[0082] 比生群及其衍生物或类似物和药学上可接受的盐

[0083] 比生群具有免疫特性,这可能是其某些活性的原因,并可能使这种药剂成为组合超螺旋中的有用工具,并引发与DNA结合蛋白相关的链断裂。这是由于在复制过程中松弛DNA卷曲的拓扑异构酶II的抑制。已发现,尽管在口服、静脉内(i.v.)、腹膜内(i.p.)或皮下(s.c.)给药时无活性,但所述药物在使用结肠26、Lewis肺、Ridgway骨肉瘤、B16、Lieberman浆细胞、P388或L1210癌细胞的癌症模型中有效。在684位患者的克隆源性测定中,在乳腺癌、小细胞肺癌、大细胞肺癌、鳞状细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、肾上腺癌、头颈癌、肉瘤、胃癌、淋巴瘤和黑色素瘤肿瘤细胞中观察到活性,但在结肠直肠癌中未观察到。重要的是,发现缺乏与阿霉素(adriamycin)和米托蒽醌(mitoxantrone)的交叉耐药性。在用比生群治疗后以及在此后4周,可以从腹膜渗出液中分离出巨噬细胞,其在P815(肥大细胞瘤)肿瘤细胞培养物中具有细胞抑制抗增殖活性。此外,来自比生群活化的巨噬细胞的上清液在所述肿瘤细胞培养物中也具有保护性细胞抑制作用。进一步的工作揭示,用比生群激活并过继转移到具有EL-4淋巴瘤的小鼠的巨噬细胞使它们的中位存活时间增加一倍以上,所述组的10只小鼠中有7只被治愈。多次给药活化的巨噬细胞比单次给药更加有效。比生群是一种不寻常的药剂,具有直接细胞毒性作用以及基因组和免疫作用方法,包括作为脂肪量和肥胖相关蛋白(FTO)这种RNA N6-甲基腺苷(m6A)去甲基化酶的高效抑制剂(IC₅₀为142nM)(Su,R.,Dong,L.,Li,Y.,Gao,M.,Han,L.,Wunderlich,M.等,(2020),“靶向FTO抑制癌症干细胞的维持和免疫逃避”(Targeting FTO Suppresses Cancer Stem Cell Maintenance and Immune Evasion),Cancer Cell,38(1):79-96.e11)。

[0084] 比生群的化学名称是9,10-蒽二甲醛双[(4,5-二氢-1H-咪唑-2-基)胍]二盐酸盐,最初被归类为蒽环类化学治疗剂。本文所使用的术语“比生群”是指比生群或任何药理学上相容的盐形式,而不仅仅是比生群二盐酸盐,除非具体指明了所述二盐酸盐或另一种特定的药理学上相容的盐形式。通常,对于大多数药理学应用而言,比生群的药理学上相容的盐是比生群二盐酸盐。这些药物具有基于共振芳香环结构周围的平面结构,所述结构嵌入DNA的螺旋内并破坏各种功能,包括复制,这可能是由于对拓扑异构酶II的强烈抑制作用。已发现,与其他蒽环类药物一样,它可以在克隆源性测定中杀死肿瘤细胞,并嵌入DNA,在那里它抑制DNA和RNA的合成。比生群的主要化疗机制是它优先结合富含A-T的区域,在那里它影响改变。

[0085] 最近的研究表明,比生群通过FTO RNA去甲基化酶的酶抑制来抑制免疫检查点基因表达和免疫逃避,正如在R.Su.等,(2020),“靶向FTO抑制癌症干细胞的维持和免疫逃避”(Targeting FTO Suppresses Cancer Stem Cell Maintenance and Immune Evasion),Cancer Cell,38(1):79-96.e11中所述。

[0086] 还已发现比生群具有非免疫性端粒效应。比生群在一个被称为G-四链体的位点处与DNA结合,在所述G-四链体中4个鸟嘌呤通过折叠结合。G-四链体的稳定化可以干扰端粒-端粒酶相互作用,从而以各种方式抑制端粒酶的活性,包括置换端粒酶结合蛋白。由于拓扑异构酶II的抑制水平并不总是与细胞毒性疗效相关,因此替代机制可能在比生群的作用中发挥作用。已经制备了比生群的类似物,以试图提高所述抗端粒酶活性;这些类似物将在下文进一步描述。观察到人黑色素瘤(SK-Mel5)和结肠癌(LoVo)肿瘤细胞在这些药剂存在下失去其增殖能力。未观察到细胞凋亡;然而,观察到永生性的丧失,经过处理的细胞重新获

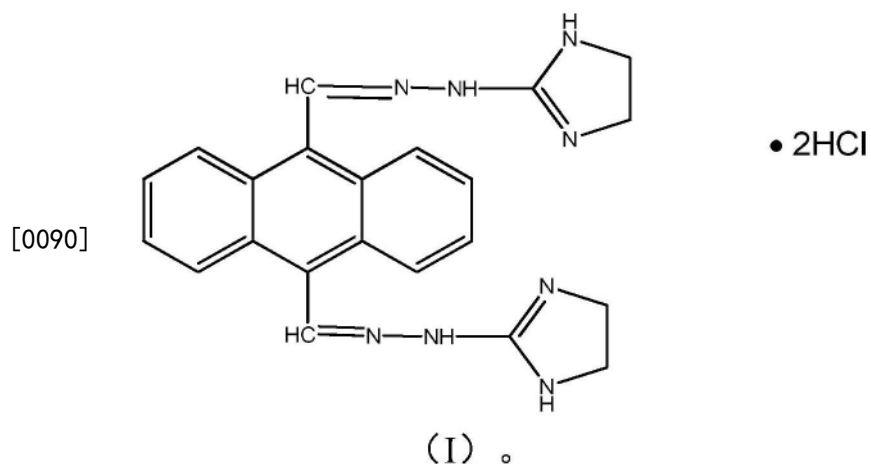
得了变得衰老、老化和死亡的能力。

[0087] 如上所详述的,除了与比生群作为DNA嵌入剂的活性相关的直接抗肿瘤作用之外,比生群还具有其他作用机制,包括免疫增强。这些机制被描述在下述文献中:(i) N.R.West等,(2011),“肿瘤浸润性淋巴细胞预测在雌激素抗性乳腺癌中对基于蒽环类药物的化疗的响应”(Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predict Response to Anthracycline-Based Chemotherapy in Estrogen-Resistant Breast Cancer),Breast Canc.Res.13:R126,其结论是肿瘤浸润性淋巴细胞的水平与对基于蒽环的药剂给药的响应相关;与肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)相关的标志物包括CD19、CD3D、CD48、GZMB、LCK、MS4A1、PRF1和SELL;(ii) L.Zitvogel等,(2008),“癌症化学疗法的免疫学方面”(Immunological Aspects of Cancer Chemotherapy),Nature Rev.Immunol.8:59-73,其指出DNA损伤例如由诸如比生群的嵌入剂产生的损伤,以ATM依赖性和CHK1依赖性(但p53非依赖性)方式诱导肿瘤细胞上NKG2D配体的表达;NKG2D是一种活化受体,参与NK细胞、NK T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和静息(在小鼠中)和/或活化(在人中)CD8+T细胞的肿瘤免疫监视,并且还指出基于蒽环的药剂可以充当免疫刺激剂,特别是与IL-12联用时;此类药剂还促进HMGB1释放并激活T细胞;(iii) D.V.Krysko等,(2011),“在多柔比星诱导的急性炎症小鼠模型中TLR2和TLR9是细胞凋亡的传感器”(TLR2 and TLR9 Are Sensors of Apoptosis in a Mouse Model of Doxorubicin-Induced Acute Inflammation),Cell Death Different.18:1316-1325,其指出基于蒽环的抗生素诱导免疫原性形式的凋亡,所述凋亡具有由MyD88、TLR2和TLR9介导的免疫刺激特性;(iv) C.Ferraro等,(2000),“蒽环类药物触发G0-G1和循环外周血淋巴细胞的凋亡并诱导成熟T和B细胞的大量缺失”(Anthracyclines Trigger Apoptosis of Both G0-G1 and Cycling Peripheral Blood Lymphocytes and Induce Massive Deletion of Mature T and B Cells),Cancer Res.60:1901-1907,其指出蒽环类药物诱导细胞凋亡和神经酰胺产生,并激活静息和循环细胞中的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3;诱导的细胞凋亡不依赖于CD95-L/CD95和TNF/TNF-R;(v) K.Lee等,(2009),“蒽环类药物化疗抑制HIF-1转录活性和肿瘤诱导的循环血管生成细胞动员”(Anthracycline Chemotherapy Inhibits HIF-1Transcriptional Activity and Tumor-Induced Mobilization of Circulating Angiogenic Cells),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:2353-2358,其为蒽环类抗生素提供了另一种抗肿瘤机制,即抑制HIF-1介导的基因转录,其进而抑制血管生成所需的VEGF的转录;HIF-1还激活编码葡萄糖转运蛋白GLUT1和己糖激酶HK1和HK2(其为在转移性癌细胞中观察到的高水平的葡萄糖摄取和磷酸化所需)以及丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)(其将丙酮酸从线粒体中分流,从而增加乳酸的产生)的基因的转录;基于免疫组织化学结果,HIF-1 α 过表达的患者被认为是使用基于蒽环的抗生素治疗的良好候选者。

[0088] 几项临床试验研究了比生群在人体内的药代动力学。在一项试验中,以260mg/m²对患者进行90min输注,发生双相消除,初始半衰期为65 $\pm$ 15min,终末半衰期为1142 $\pm$ 226min,稳态分布体积(V_{dss})为1845L/m²。在该试验中血浆清除率为735mL/min/m²,在24h内11.3%的给药剂量不变地通过尿液排出。在另一项试验中,评估了80-250mg/m²的剂量,初始和终末半衰期分别为0.6h和24.7h,清除率为1045.5 $\pm$ 51.0mL/kg/h,计算分布体积为42.1 $\pm$ 5.9L/kg。在这项研究中,在96h内在尿液中仅发现3.4 $\pm$ 1.1%的给药剂量。在其他三项单剂量研究中报告了三相消除,其中一项研究的t^{1/2} α 、 β 和 γ 分别为3.44min、1.33h和

26.13h,另一项分别为3min、1h和8h,最后一项揭示出清除期分别为0.1h、1.9h和43.9h。在一份报告中,大的分布体积($687\text{L}/\text{m}^3$)被解释为药物的组织隔离,随后产生储存效应。在72h的输注研究中,观察到在 $56\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量下血浆浓度为 $12 \pm 6\text{ng}/\text{mL}$,而 $260\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量产生 $55 \pm 8\text{ng}/\text{mL}$ 的血浆浓度。在这项试验中,血浆清除率为 $1306 \pm 179\text{mL}/\text{min}/\text{m}^2$,24h内尿排泄量为剂量的4.6%。最后,在另一项研究中,为期5天的60分钟输注计划表明出 $t^{1/2}_{\alpha}$ 和 β 分别为0.9h和9.7h,并且7.1%的剂量通过尿液排泄。

[0089] 比生群二盐酸盐的结构示出在式(I)中



[0091] 比生群二盐酸盐是一种三环芳香族化合物,化学名为9,10-蒽二甲醛双[(4,5-二氢-1H-咪唑-2-基)肼]二盐酸盐。比生群二盐酸盐的分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_8 \cdot 2\text{HCl}$,分子量为471.4。烷基咪唑侧链非常基础,并在生理pH下带正电荷。这被认为有助于静电吸引DNA中带负电荷的核糖磷酸基团。

[0092] 比生群通常静脉内给药,无论是中枢还是外周。

[0093] 本领域中已知适用于比生群或其衍生物或类似物给药的各种制剂。Desai等人的美国专利第4,784,845号公开了一种用于递送疏水性药物(即比生群或其衍生物或类似物)的物质组合物,其包含:(i)所述疏水性药物;(ii)基本上不含丁基羟基茴香醚(BHA)或丁基羟基甲苯(BHT)的油性载体或油相;(iii)共表面活性剂或乳化剂;(iv)共表面活性剂或辅助乳化剂;和(v)作为共溶剂的苯甲醇。Desai等人的美国专利第4,816,247号公开了一种用于通过静脉内、肌肉内或关节内途径递送疏水性药物(例如比生群或其衍生物或类似物)的物质组合物,其包含:(i)所述疏水性药物;(ii)药学上可接受的油性溶媒或油,其选自:(a)天然存在的植物油和(b)半合成的甘油单酯、二酯和三酯,其中所述油性溶媒和油不含BHT或BHA;(iii)表面活性剂或乳化剂;(iv)共表面活性剂或乳化剂;(v)当所述疏水性药物为碱性时选自 C_6 - C_{20} 饱和或不饱和脂族酸,和当所述疏水性药物为酸性时选自药学上可接受的芳香胺的离子对形成剂;以及(vi)水。Lawter等人的美国专利第5,000,886号和Lawter等人的美国专利第5,143,661号公开了用于递送药剂例如比生群或其衍生物或类似物的包含微胶囊的组合物,其中所述微胶囊包括硬化剂,其是挥发性硅酮流体。Murdock等人的美国专利第5,070,082号、Murdock等人的美国专利第5,077,282号和Murdock等人的美国专利第5,077,283号公开了包括比生群及其衍生物和类似物在内的难溶性疏水性药物的前药形式,它们是磷酸胺酸的盐。Murdock等人的美国专利第5,116,827号和Murdock等人的美国专利第5,212,291号公开了包括比生群及其衍生物和类似物在内的难溶性疏水性药物的前药

形式,它们是喹啉甲酸衍生物。Tsou的美国专利第5,378,456号包括含有蒽类抗肿瘤药剂例如比生群或其衍生物或类似物的组合物,其中所述比生群或及其衍生物或类似物与二乙烯基醚-马来酸(MVE)共聚物偶联或混合。Tsou的美国专利第5,609,867号公开了比生群的聚合1,4-双衍生物以及比生群和另一种单体(例如二酐)的共聚物。

[0094] 本文描述的方法和组合物可以使用比生群的衍生物或类似物代替比生群本身。比生群的衍生物和类似物被描述在Garner等人的美国专利第10,500,19号和第10,548,876号中。

[0095] 治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的方法

[0096] 令人惊讶的是,本研究显示,蛋白激酶抑制剂和比生群(或其药学上可接受的盐)对ccRCC细胞系具有协同作用。设想了在根据本发明的方法和组合物中,具有基本上相同活性的比生群衍生物也将与蛋白激酶协同作用。

[0097] 因此,本发明的一个方面提供了一种治疗患有ccRCC或其他VHL(-)癌症、特别是蛋白激酶抑制剂抗性ccRCC的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的蛋白激酶抑制剂(例如酪氨酸激酶抑制剂)和治疗有效量的至少一种第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。

[0098] 所述蛋白激酶抑制剂可以抑制与ccRCC和其他VHL(-)癌症相关的一个或多个潜在的蛋白激酶靶点。根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂抑制。根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、DDR1、DDR2、RET和RIPK2中的至少一种或多种。根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3中的至少一种或多种。

[0099] 根据某些实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自帕唑帕尼、乐伐替尼、卡博替尼、依维莫司、索拉非尼、舒尼替尼、替西罗莫司、丝裂霉素C、阿西替尼、替沃扎尼和贝组替凡。

[0100] 根据特定实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自帕唑帕尼、乐伐替尼、卡博替尼、索拉非尼、舒尼替尼、丝裂霉素C、阿西替尼、替沃扎尼和贝组替凡。

[0101] 根据本发明的更特定实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自帕唑帕尼、乐伐替尼、卡博替尼、索拉非尼、舒尼替尼、阿西替尼和替沃扎尼。

[0102] 根据本发明的甚至更特定实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自帕唑帕尼、乐伐替尼和卡博替尼。

[0103] 根据可选实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂是mTOR的抑制剂,任选地选自替西罗莫司和依维莫司。

[0104] 根据本发明的特定实施方案,所述第二药剂是比生群或其药学上可接受的盐。

[0105] 根据某些实施方案,所述比生群可以作为药物化合物或作为药物组合物的组分施用,正如下文进一步讨论的。

[0106] 根据某些特定实施方案,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的一种蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的比生群或其药学上可接受的盐。

[0107] 本发明的药物组合物和药物可以通过标准的肠内或肠胃外途径给药到受试者,所述途径包括但不限于注射(例如静脉内、皮下、肌肉内、推注等),或通过例如局部、口服、舌下、鼻、肺、耳、直肠或阴道给药途径。在一些实施方案中,本发明的药物组合物可以自身或

与其他药物组合物联合给药到受试者。在后一种情况下,给药可以是同时或顺序的,或者药物组合物的给药可以彼此独立。

[0108] 在某些实施方案中,比生群(或衍生物,或任一者的药学上可接受的盐)通过静脉内中心或外周地给药,包括通过肌肉内、皮下和/或真皮内注射。

[0109] 一般来说,本发明的药物组合物和药物可以以与给药途径和受试者的身体特征(包括健康状况)相容的方式给药,并以诱导所需效果(即治疗有效和/或预防性)的方式给药。例如,适合的剂量可能取决于多种因素,包括但不限于受试者的身体特征(例如年龄、体重、性别)、组合物或药物是否作为单一药剂使用、所治疗的疾病或病症的进展(即病理状态),以及本领域普通技术人员显而易见的其他因素。

[0110] 化学治疗剂的适合剂量、剂量频率、剂量持续时间和给药途径在本领域中是已知的。正如图16所建议的,比生群、比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐可以与蛋白激酶抑制剂在同一药物组合物中给药,也可以在单独的组合物中但与蛋白酶抑制剂同时给药,或者在不同的时间给药。如果所述比生群、比生群衍生物、或比生群或比生群衍生物的药学上可接受的盐在与所述蛋白激酶抑制剂不同的时间给药,则它可以在所述蛋白激酶抑制剂之前或之后给药,和/或在不同的时间根据不同的时间和/或频率方案给药。本领域普通技术人员可以基于诸如受试者的年龄、体重和性别、受试者对活性药剂副作用的敏感性、遗传标志物、活性药剂的剂量、受试者既往使用活性药剂的病史以及其他药代动力学参数(例如心脏、肝或肾功能)的变量来确定适合的给药方案。

[0111] 本文提供的方法和组合物使受试者能够更频繁地接受疗法,而不会因副作用(例如心脏毒性)的风险而显著改变剂量方案。蛋白激酶抑制剂和比生群、比生群衍生物、或比生群或比生群衍生物的药学上可接受的盐的药剂可以每天一剂或多剂给药到受试者。在某些情况下,化学治疗剂的每日药剂可以与比生群、比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐一起,在单剂中给药。

[0112] 本文描述的药物组合物可以每天一次或多次施用到患者。在某些情况下,所述药物组合物可以每天一次施用到患者。在某些情况下,所述药物组合物可以每天至少2次、3次、4次、5次或6次施用到患者。例如,药物组合物可以每天3次施用到患者。

[0113] 在本文描述的方法中,本领域普通技术人员可以确定比生群(或比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐)的适合剂量。所选剂量水平取决于各种药代动力学因素,包括给药的活性药剂的量、给药途径、给药时间、所使用的特定化合物的排泄率、病症严重程度、影响受试者的其他健康因素以及受试者肝肾功能的状态。它还取决于治疗的持续时间、与所使用的特定治疗剂联合使用的其他药物、化合物和/或材料,以及所治疗的受试者的年龄、体重、状况、总体健康和既往病史等因素。本领域中描述了确定最佳剂量的方法,例如 Remington: 药学科学与实践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy), Mack Publishing Co., 第20版, 2000, 以及 Gilman 等主编, (1990), Goodman 和 Gilman: 治疗剂的药理学基础 (Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics), Pergamon Press。本领域技术人员可以使用常规剂量确定试验, 根据药剂的实验数据来确定一组给定条件下的最佳剂量。

[0114] 根据某些实施方案,比生群的给药以约 $0.1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $400\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$, 例如约 $0.2\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $0.5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $0.5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $100\text{mg}/$

$\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $0.5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $0.5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $0.5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $1.0\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $1.0\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 至约 $8\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $1\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $2\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $3\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $4\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $6\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $7\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量进行。在一些实施方案中,比生群在例如1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、21天、28天、35天、42天、49天、56天或63天的时间段内,每天一次或每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次给药。在某些实施方案中,比生群在28天的时间段内给药一次或多次,任选地每天或每周一次或多次、每两周一次、每三周一次、每四周一次,以约 $20\text{--}50\text{mg}/\text{m}^2/28\text{天}$ 的剂量。比生群的药学上可接受的盐或其衍生物或其药学上可接受的盐的给药可以以相似的剂量率进行,并针对摩尔当量进行调整。

[0115] 蛋白激酶抑制剂的给药方案将取决于具体的蛋白激酶抑制剂,并且对于已知的蛋白激酶抑制剂而言已经发表,包括用于治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症。此外,本领域普通技术人员可以使用上文关于比生群讨论的已知方法和技术,容易地确定给定蛋白激酶抑制剂的适合剂量。

[0116] 根据某些实施方案,并且作为当比生群(或比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐)与蛋白激酶抑制剂一起给药时观察到的协同生物活性的结果,对于该蛋白激酶抑制剂的给定剂量率而言,可以更有效地实现治疗结果。比生群(或比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐)的这种生物活性也可以允许使用或扩展使用在正常剂量下可能具有有害副作用(例如心脏毒性)的蛋白激酶抑制剂。

[0117] 或者,当与比生群(或比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐)联合给药时,所述蛋白激酶抑制剂可以以比通常给药时更低的剂量在更长的时间段内给药到患者,同时保持可比较的持续治疗结果。这对于具有有害副作用(例如心脏毒性)的活性药剂尤为重要。因此,在根据本发明的方法的某些实施方案中,当与比生群(或比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐)联合给药时,所述蛋白激酶抑制剂可以以显著低于该蛋白激酶抑制剂在单独给药时推荐的剂量率的速率给药,例如以比该蛋白激酶抑制剂在单独给药时的剂量率低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%或70%的速率。

[0118] 额外的活性药剂

[0119] 程序性细胞死亡1配体1(PDL1)及其受体程序性细胞死亡1(PD1)调节免疫细胞的激活。检查点抑制剂可以帮助抑制这种调节,允许免疫细胞破坏肿瘤。一种新兴的策略是将检查点抑制剂与蛋白激酶抑制剂、特别是靶向VEGFR和其他参与血管生成的激酶的蛋白激酶抑制剂联合,其基本原理是血管生成在建立免疫抑制环境中很重要。已知的检查点抑制剂包括靶向PD1或PDL1的抗体。

[0120] FDA已批准两种PD-1抑制剂(纳武单抗和派姆单抗)、一种PD-L1抑制剂(阿维单抗)和一种CTLA-4抑制剂(伊匹单抗)用于ccRCC。可能考虑的其他PD-1/PD-L1免疫检查点抑制剂包括阿特珠单抗、贝伐单抗、西米普利单抗、多塔利单抗和德瓦鲁单抗。

[0121] 此外,一些研究显示,蛋白激酶抑制剂本身可以刺激针对肿瘤的免疫应答,这反过来可以在与检查点抑制剂联合时产生协同响应。

[0122] 同样,免疫调节剂例如调节免疫细胞成熟、生长和活化的细胞因子,包括白介素-2(阿地白介素(Aldesleukin)/Proleukin®)、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b(和聚乙二醇化干扰

素 α -2b)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),也已被批准用于通过免疫刺激治疗各种癌症。白介素-2(或重组人类版本阿地白介素/**Proleukin®**)已被批准用于治疗RCC。

[0123] 因此,根据本发明的方法可以进一步包括施用至少一种用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的额外治疗剂。

[0124] 根据某些实施方案,所述额外治疗剂是检查点抑制剂或免疫调节剂,例如上文讨论的那些。根据某些实施方案,所述至少一种额外治疗剂包括选自纳武单抗、派姆单抗、阿维单抗、伊匹单抗、阿特珠单抗、贝伐单抗、西米普利单抗、多塔利单抗和德瓦鲁单抗的检查点抑制剂,或选自白介素-2(阿地白介素/**Proleukin®**)、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b(和聚乙二醇化干扰素 α -2b)和GM-CSF的免疫调节剂。根据某些实施方案,所述至少一种额外治疗剂包括选自纳武单抗、派姆单抗、阿维单抗和伊匹单抗的检查点抑制剂。根据某些实施方案,所述至少一种额外治疗剂包括白介素-2(阿地白介素/**Proleukin®**)。

[0125] 这些额外药剂的适合剂量、剂量频率、剂量持续时间和给药途径在本领域中是已知的。正如图17所建议的,这些额外药剂可以与比生群或比生群的衍生物或类似物同时给药,也可以在与比生群、比生群的衍生物或类似物不同的时间给药。如果所述额外药剂在与比生群或比生群的衍生物或类似物不同的时间给药,则它可以在比生群或比生群的衍生物或类似物之前或之后给药,和/或在不同的时间根据不同的时间和/或频率方案给药。类似地并且不依赖于比生群的考虑因素,这些额外药剂可以与所述蛋白激酶抑制剂同时给药,也可以在与所述蛋白激酶抑制剂不同的时间给药。如果所述额外药剂在与所述蛋白激酶抑制剂不同的时间给药,则它可以在所述蛋白激酶抑制剂之前或之后给药,和/或在不同的时间根据不同的时间和/或频率方案给药。本领域普通技术人员可以基于诸如患者的年龄、体重和性别、癌症的严重程度、诸如下文进一步描述的遗传标志物以及药代动力学参数例如肝和肾功能的变量来确定适合的给药方案。

[0126] 图16示出了比生群和靶向药剂组合试验设计的预言性实例,以克服ccRCC和其他VHL(-)癌症中的疗法抗性。

[0127] 图17示出了比生群和检查点抑制剂组合试验设计的预言性实例,以克服ccRCC和其他VHL(-)癌症中的免疫疗法抗性。

[0128] 用于治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的药物组合物

[0129] 本发明还提供了用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的药物组合物,其包含至少一种如上所述的蛋白激酶抑制剂和第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药理学上可接受的盐。如上所述,本发明的组合物可以包含选自检查点抑制剂和免疫调节剂的额外药剂。

[0130] 根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂。根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、DDR1、DDR2、RET和RIPK2中的至少一种或多种。根据某些实施方案,所述蛋白激酶抑制剂抑制VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3中的至少一种或多种。

[0131] 根据某些实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自帕唑帕尼、乐伐替尼、卡博替尼、依维莫司、索拉非尼、舒尼替尼、替西罗莫司、丝裂霉素C、阿西替尼、替沃扎尼和贝组替凡。

[0132] 根据本发明的特定实施方案,所述至少一种蛋白激酶抑制剂选自帕唑帕尼、乐伐

替尼和卡博替尼。

[0133] 根据本发明的特定实施方案,所述第二药剂是比生群或其药学上可接受的盐。

[0134] 根据本发明的特定实施方案,所述组合物可以包含治疗有效量的一种蛋白激酶抑制剂和治疗有效量的比生群或其药学上可接受的盐。

[0135] 根据本发明的组合物可以进一步包括施用至少一种用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症的额外治疗剂。

[0136] 根据某些实施方案,所述额外治疗剂是检查点抑制剂或免疫调节剂,例如上文讨论的那些。根据某些实施方案,所述至少一种额外治疗剂包括选自纳武单抗、派姆单抗、阿维单抗、伊匹单抗、阿特珠单抗、贝伐单抗、西米普利单抗、多塔利单抗和德瓦鲁单抗的检查点抑制剂,或选自白介素-2(阿地白介素/**Proleukin®**)、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b(和聚乙二醇化干扰素 α -2b)和GM-CSF的免疫调节剂。根据某些实施方案,所述至少一种额外治疗剂包括选自纳武单抗、派姆单抗、阿维单抗和伊匹单抗的检查点抑制剂。根据某些实施方案,所述至少一种额外治疗剂包括白介素-2(阿地白介素/**Proleukin®**)。

[0137] 根据本发明的组合物可以通过本领域中已知的任何途径并以适合该途径的形式给药。因此,根据本发明的组合物可以适应于通过肠内或肠胃外途径给药,包括通过注射(例如静脉内、皮下、肌肉内、推注等)或通过例如局部、口服、舌下、鼻、肺、耳、直肠或阴道给药途径。

[0138] 通常,本文描述的药物组合物包括至少一种药学上可接受的载体或赋形剂和/或稀释剂。为了制备药物组合物和药物,惰性、药学上可接受的载体可以是固体或液体。液体形式的制剂包括溶液、悬液和乳液,例如用于肠胃外注射的水或水-丙二醇溶液。还包括固体形式的制剂,例如片剂或无定形或结晶粉剂,包括冻干制剂,其目的是在即将使用前转化为液体形式的制剂,用于口服或注射给药。此类液体形式包括溶液、悬液和乳液。药学上可接受的载体和各种组合物的制备方法的实例可以在例如Remington:药学科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),Mack Publishing Co.,第20版,2000,以及Gilman等主编,(1990),Goodman和Gilman:治疗剂的药理学基础(Goodman And Gilman's:The Pharmacological Bases of Therapeutics),Pergamon Press中找到。

[0139] 药学上可接受的载体和赋形剂包括:

[0140] (i) 液体载体;

[0141] (ii) 等渗剂;

[0142] (iii) 润湿剂或乳化剂;

[0143] (iv) 防腐剂;

[0144] (v) 缓冲剂;

[0145] (vi) 酸化剂;

[0146] (vii) 抗氧化剂;

[0147] (viii) 碱化剂;

[0148] (ix) 运载剂;

[0149] (x) 螯合剂;

[0150] (xi) 着色剂;

[0151] (xii) 络合剂;

- [0152] (xiii) 溶剂;
- [0153] (xiv) 悬浮剂和/或增黏剂;
- [0154] (xv) 油类;
- [0155] (xvi) 渗透增强剂;
- [0156] (xvii) 聚合物;
- [0157] (xviii) 硬化剂;
- [0158] (xix) 蛋白质;
- [0159] (xx) 碳水化合物;
- [0160] (xxi) 增量剂;和
- [0161] (xxii) 润滑剂。

[0162] 可以使用本领域中已知的其他药学上可接受的载体和赋形剂。

[0163] 所述载体、稀释剂、赋形剂和佐剂在与所述组合物或药物的其他成分相容方面必须是“可接受的”,并且通常对其受试者无害。药学上可接受的载体或稀释剂的非限制性实例是脱盐水或蒸馏水;盐水溶液;基于植物的油,例如花生油、红花油、橄榄油、棉籽油、玉米油;芝麻油,例如花生油、红花油、橄榄油、棉籽油、玉米油、芝麻油、花生油或椰子油;硅油,包括聚硅氧烷,例如甲基聚硅氧烷、苯基聚硅氧烷和甲基苯基聚硅氧烷;挥发性硅酮;矿物油,例如液体石蜡、软石蜡或角鲨烷;纤维素衍生物,例如甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或羟丙基甲基纤维素;低级烷醇,例如乙醇或异丙醇;低级芳烷醇;低级聚亚烷基二醇或低级亚烷基二醇,例如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇、丙二醇、1,3-丁二醇或甘油;脂肪酸酯,例如棕榈酸异丙酯、肉豆蔻酸异丙酯或油酸乙酯;聚乙烯吡咯烷酮;琼脂;黄蓍胶或阿拉伯胶和凡士林。通常,一种或多种载体将形成组合物、疫苗或药物的约10重量%至约99.9重量%。

[0164] 对于作为注射溶液或悬液给药,无毒的肠胃外可接受的稀释剂或载体可以包括林格氏溶液、等渗盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇和1,2-丙二醇。制备可肠胃外给药的药物组合物和药物的方法对本领域普通技术人员来说是显而易见的,并且被更详细描述在例如, Remington: 药学科学与实践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy), Mack Publishing Co., 第20版, 2000, 以及 Gilman 等主编, (1990), Goodman 和 Gilman: 治疗剂的药理学基础 (Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics), Pergamon Press 中。

[0165] 对于口服给药,适合的载体、稀释剂、赋形剂和佐剂的一些实例包括花生油、液体石蜡、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、藻酸钠、阿拉伯胶、黄蓍胶、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、明胶和卵磷脂。此外,这些口服制剂可以含有适合的调味剂和着色剂。当以胶囊形式使用时,所述胶囊可以用延迟崩解的化合物例如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯包被。

[0166] 用于口服给药的固体形式可以含有在人类和兽医药学实践中可接受的黏合剂、甜味剂、崩解剂、稀释剂、调味剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂和/或延时剂。适合的黏合剂包括阿拉伯胶、明胶、玉米淀粉、黄蓍胶、藻酸钠、羧甲基纤维素或聚乙二醇。适合的甜味剂包括蔗糖、乳糖、葡萄糖、阿斯巴甜或糖精。适合的崩解剂包括玉米淀粉、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、瓜尔胶、黄原胶、膨润土、海藻酸或琼脂。适合的稀释剂包括乳糖、山梨糖醇、甘露糖醇、葡萄糖、高岭土、纤维素、碳酸钙、硅酸钙或磷酸二钙。适合的调味剂包括胡椒薄荷油、冬

青油、樱桃、橙子或覆盆子调味剂。适合的包衣剂包括丙烯酸和/或甲基丙烯酸和/或其酯的聚合物或共聚物、蜡、脂肪醇、玉米醇溶蛋白、虫胶或面筋。适合的防腐剂包括苯甲酸钠、维生素E、 α -生育酚、抗坏血酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯或亚硫酸氢钠。适合的润滑剂包括硬脂酸镁、硬脂酸、油酸钠、氯化钠或滑石。适合的延时剂包括单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0167] 用于口服给药的液体形式除了上述试剂之外,还可以含有液体载体。适合的液体载体包括水、油类例如橄榄油、花生油、芝麻油、葵花油、红花油、花生油、椰子油、液体石蜡、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、乙醇、丙醇、异丙醇、甘油、脂肪醇、甘油三酯或其混合物。

[0168] 用于口服给药的悬液可以进一步包含分散剂和/或悬浮剂。适合的悬浮剂包括羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸钠或乙酰醇。适合的分散剂包括卵磷脂、脂肪酸例如硬脂酸的聚氧乙烯酯、聚氧乙烯山梨糖醇的单油酸酯或二油酸酯、硬脂酸酯或月桂酸酯、聚氧乙烯醇失水山梨糖醇的单油酸酯或二油酸酯、硬脂酸酯或月桂酸酯等。

[0169] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含脂质体。适用于比生群或其心脏保护性衍生物的脂质体制剂包含在水溶液中的尺寸范围在0.01至100 μ m之间、脂质体包埋的比生群在约50-95%之间的小型单层或多层脂质体,所述脂质体由氢化大豆磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油和天然或合成来源脂质的胆固醇组成,其可以从冻干形式重构为可注射的脂质体悬液。所述组合物是通过将冻干的比生群/脂质体组合物重构为脂质体浓缩物,然后稀释所述浓缩物用于肠胃外给药以治疗黑色素瘤。

[0170] 在又一个实施方案中,所述药物组合物可以包含与 β -环糊精的复合物。适用于比生群、比生群的治疗活性衍生物或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐的脂质体制剂包含在水溶液中形成的复合物,其可以从冻干形式重构为可注射悬液。一种这样的组合物通过将冻干的比生群/ β -环糊精组合物重构为浓缩物,然后稀释所述浓缩物用于肠胃外给药来制备。 β -环糊精复合物和制备此类复合物的方法在本领域中是已知的,并描述在例如Rothman的WO 2019/073296中。

[0171] 适用于比生群、比生群的治疗活性衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐的给药的各种制剂在本领域中是已知的。Desai等人的美国专利第4,784,845号公开了一种用于递送疏水性药物(即比生群或其心脏保护性衍生物)的组合物,其包含:(i)所述疏水性药物;(ii)基本上不含丁基羟基茴香醚(BHA)或丁基羟基甲苯(BHT)的油性溶媒或油相;(iii)共表面活性剂或乳化剂;(iv)共表面活性剂或辅助乳化剂;和(v)作为共溶剂的苯甲醇。Desai等人的美国专利第4,816,247号公开了一种用于通过静脉内、肌肉内或关节内途径递送疏水性药物(例如比生群或其心脏保护性衍生物或类似物)的组合物,其包含:(i)所述疏水性药物;(ii)药学上可接受的油性溶媒或油,其选自:(a)天然存在的植物油和(b)半合成的甘油单酯、二酯和三酯,其中所述油性溶媒或油不含BHT或BHA;(iii)表面活性剂或乳化剂;(iv)共表面活性剂或乳化剂;(v)当所述疏水性药物为碱性时选自C₆-C₂₀饱和或不饱和脂肪酸并且当所述疏水性药物为酸性时选自药学上可接受的芳香胺的离子对形成剂;以及(vi)水。

[0172] 根据某些实施方案,根据本发明的组合物可以适应于以约0.1mg/m²/天至约100mg/m²/天,例如约0.2mg/m²/天至约50mg/m²/天、约0.5mg/m²/天至约20mg/m²/天、约

1.0mg/m²/天至约10mg/m²/天、约1.0mg/m²/天至约8mg/m²/天、约1mg/m²/天、约2mg/m²/天、约3mg/m²/天、约4mg/m²/天、约5mg/m²/天、约6mg/m²/天、约7mg/m²/天或约10mg/m²/天的剂量给药比生群。在一些实施方案中,根据本发明的组合物可以适应于在例如1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、21天、28天、35天、42天、49天、56天或63天的时间段内,每天或每周一次或多次、每两周一次、每三周一次、每四周一次给药比生群。在某些实施方案中,根据本发明的组合物可以适应于在28天的时间段内给药比生群,任选地每天或每周一次或多次、每两周一次、每三周一次、每四周一次,以约20-50mg/m²/28天的剂量。根据本发明的包含比生群的药学上可接受的盐或其治疗活性衍生物或其药学上可接受的盐的组合物可以适应于递送相似的剂量率,并针对摩尔当量进行调整。

[0173] 蛋白激酶抑制剂的给药方案将取决于具体的蛋白激酶抑制剂,并且对于已知的蛋白激酶抑制剂而言已经发表,包括用于治疗ccRCC。此外,本领域普通技术人员可以使用上文关于比生群讨论的已知方法和技术,容易地确定给定蛋白激酶抑制剂的适合剂量。根据本发明的组合物可以被配制成以推荐的剂量率或如下文所讨论的不同剂量率包含所述蛋白激酶。

[0174] 根据某些实施方案,并且作为当比生群(或比生群衍生物或任一者的药学上可接受的盐)与蛋白激酶抑制剂一起给药时观察到的协同生物活性的结果,根据本发明的组合物中蛋白激酶的剂量可以低于当其被单独给药到患者时的剂量。这对于具有有害副作用(例如心脏毒性)的活性药剂尤为重要。因此,在根据本发明的组合物的某些实施方案中,所述蛋白激酶抑制剂可以以明显低于该蛋白激酶抑制剂在单独给药时的推荐剂量率的剂量,例如以比该蛋白激酶抑制剂在单独给药时的剂量率低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%或70%的剂量率包含在所述组合物中。

[0175] 类似地,当本发明的组合物包含额外治疗剂(其是检查点抑制剂和/或免疫调节剂)时,该额外治疗剂可以以其用于治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的已知推荐剂量率包含在所述组合物中,或者如果所述组分之间的协同作用被确定,则可以以甚至更低的剂量率包含在所述组合物中。

[0176] 组合物用于制备治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的药物的用途

[0177] 本发明还提供了根据本发明的组合物用于制备在患者中治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症、特别是蛋白激酶抗性ccRCC的药物的用途。

[0178] 上文描述了此类制备的参数,包括蛋白激酶抑制剂、比生群、比生群衍生物及其盐,以及作为任选的额外治疗剂的检查点抑制剂和免疫调节剂,以及所有活性物质、剂型和其他组分的剂量/给药。

[0179] 用于治疗ccRCC和其他VHL(-)癌症的药剂盒

[0180] 本发明还提供了用于治疗ccRCC或其他VHL(-)癌症、特别是蛋白激酶抗性ccRCC的药剂盒,所述药剂盒包含至少一种蛋白激酶抑制剂和至少一种第二药剂,所述第二药剂包含比生群或其衍生物,或比生群或其衍生物的药学上可接受的盐。

[0181] 上文描述了此类药剂盒的参数,包括蛋白激酶抑制剂、比生群、比生群衍生物及其盐,以及作为任选的额外治疗剂的检查点抑制剂和免疫调节剂,以及所有活性物质、剂型和其他组分的剂量/给药。

[0182] 在某些情况下,所述药剂盒还可能包含小瓶、试管、针头、包装或其他材料。

[0183] 提供了含有本文描述的一种或多种活性药剂的单位剂量的药剂盒,通常为注射剂量。此类药剂盒可能包括含有单位剂量的容器、描述药物在治疗疾病中的用途和附带益处的信息性包装插页,以及任选的用于递送所述组合物的器具或装置。

[0184] 所述药剂盒可以进一步包含适合施用所述组合物的任何装置。例如,药剂盒可以包含适合静脉内给药的针头。

[0185] 在某些情况下,药剂盒可能提供有说明书。所述说明书可以被提供在所述药剂盒中,也可以通过电子方式访问。所述说明书可能提供关于如何使用本公开的组合物的信息。所述说明书还可能提供关于如何使用本公开的装置的信息。所述说明书可能提供关于如何执行本公开的方法的信息。在某些情况下,所述说明书可能提供剂量信息。所述说明书可能提供药物信息,例如作用机制、药物配方、不良风险、禁忌症等。在某些情况下,所述药剂盒由医生或医疗保健提供者购买,用于在诊所或医院给药。在某些情况下,所述药剂盒由实验室购买,并用于筛选候选化合物。

[0186] 现在将仅通过示例的方式,参考包括比较数据在内的下述实施例来描述本发明的优选形式,并且所述实施例不应被视为以任何方式限制本发明的范围或精神。

[0187] 实施例

[0188] 实施例1:细胞存活率测定和分析

[0189] 使用刃天青代谢活性测定法测定细胞存活率。将细胞以 1×10^3 个细胞/孔(786-O、RCC4 EV、RCC4 VHL)或 3×10^3 个细胞/孔(Caki-1、Caki-2)的密度一式两份接种在96孔微量滴定板的孔中,并培养24h。

[0190] 将赞群(比生群二盐酸盐)以20mM在二甲基亚砜(DMSO)中重构或以15mM在5% Captisol溶液中重构。将依维莫司(RAD001)、舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、乐伐替尼(甲磺酸盐)、卡博替尼(BMS-907351)以17.2mM(乐伐替尼)或100mM(所有其他)在DMSO中重构。

[0191] 然后将药物在培养基中稀释并添加到孔中,并将细胞继续培养72h。

[0192] 将人肾细胞系在加湿培养箱中,在37°C和5% CO₂下,在下面的表1中列出的培养基中培养:

[0193] 表1-用于肾细胞系的细胞培养基和补充剂

	细胞系	基本培养基	补充剂
[0194]	786-O	RPMI-1640 (含有 GlutaMAX)	10%胎牛血清(FBS), 20 mM HEPES, 1 mM 丙酮酸钠
	Caki-1, Caki-2	McCoy's 5A	10% FBS, 2 mM L-谷氨酰胺
	RCC4 EV,	DMEM (高葡萄糖)	10% FBS, 2 mM L-谷氨酰胺, 20 mM HEPES
	RCC4 VHL		

[0196] 使用产荧光活性染料刃天青(Ex 544nm, Em 590nm; 0.6mM刃天青, 78μM亚甲基蓝, 1mM六氰基高铁(III)酸钾, 1mM六氰基亚铁(II)酸钾三水合物(Sigma Aldrich), 溶解在PBS中[3])测定存活率。刃天青被代谢活跃细胞代谢成红色荧光的试卤灵(resorufin)。在添加刃天青溶液(1:10, v/v)后5h, 在FLUOstar OPTIMA读板器(BMG LabTechnologies)上, 在544nm激发/590nm发射下测量荧光。使用Graphpad Prism 9软件生成图形。使用Prism 9通

过三次样条-lowess回归分析确定药物 IC_{50} 值。对每种细胞系和每种药物组合进行至少三次独立的重复实验,数据被表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)。每种细胞系的培养条件如下所述。

[0197] 克隆源性测定法-使用克隆源性测定法确定用赞群处理的细胞的集落形成能力。将RCC4 EV和RCC4 VHL细胞以1000个细胞/孔的密度接种在6孔板中,并允许其黏附24h。将比生群在培养基中稀释并添加到孔中,将细胞培养96h。除去含有药物的培养基,用新鲜培养基(不含药物)替换,并继续培养96h,以允许细胞集落形成。在终点时,从孔中除去培养基,并将细胞用冷PBS洗涤两次。将细胞用冰冷的甲醇在冰上固定10分钟,然后立即在室温下用结晶紫溶液(0.5%结晶紫、25%甲醇的PBS溶液)染色。洗掉过量的结晶紫溶液,并在ChemiDoc MP成像系统(Bio-Rad)上捕获板的照片。使用ImageJ[Schneider C.A.等,(2012),“NIH图像到ImageJ:图像分析的25年”(NIH Image to ImageJ:25years of image analysis),Nat Methods 9(7):671-675]的ColonyArea插件[Guzman C.等,(2014),“ColonyArea:一个用于在克隆源性测定法中自动量化集落形成的ImageJ插件”(ColonyArea:an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays),PLoS One,9(3):e92444]对图像进行分析,使用Prism 9确定孔被集落填充的面积百分数,并以未处理细胞的%表示。每种细胞系进行四个独立的平行实验,数据被表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0198] 协同分析-对于联合药物治疗而言,已进行了三种不同的协同分析,包括韦伯的分数乘法(韦伯J(1963),“一种以上抑制剂的作用”(Effect of more than one inhibitor),在Hochster E.R.,Quastel J.主编,酶和代谢抑制剂(Enzymes and metabolic inhibitors),Academic Press:New York中),Chou-Talalay(组合指数;CI)(Chou T-C,(2020),“药物组合研究中协同作用和拮抗作用的理论基础、实验设计和计算机模拟”(Theoretical Basis,Experimental Design,and Computerized Simulation of Synergism and Antagonismin Drug Combination Studies),Pharmacological Reviews,58(3):621-681),以及使用SynergyFinder 2.0软件(Ianevski A,Giri AK,Aittokallio T,(2020),“SynergyFinder 2.0:多药物组合协同作用的视觉分析”(SynergyFinder 2.0:visual analytics of multi-drug combination synergies),Nucleic Acids Res.,48(W1):W488-W493)的BLISS协同方法(BLISS,(1939),“CI:联合使用的毒药的毒性”(CI:The toxicity of poisons applied jointly),Ann App Biol,26:585-615)。每种方法的详情在下文提供。

[0199] 韦伯的分数乘法:韦伯在1963年(韦伯J(1963),“一种以上抑制剂的作用”(Effect of more than one inhibitor),在Hochster E.R.,Quastel J.主编,《酶和代谢抑制剂》(Enzymes and metabolic inhibitors),Academic Press:New York中)介绍了一种后来被称为“分数乘积”法的方法(Chou T-C,(2020),“药物组合研究中协同作用和拮抗作用的理论基础、实验设计和计算机模拟”(Theoretical Basis,Experimental Design,and Computerized Simulation of Synergism and Antagonismin Drug Combination Studies),Pharmacological Reviews,58(3):621-681)。它使用每种药物单独的作用的分数乘积来估算两种药物的预期累加作用,即:

[0200] $1-Fa(\text{药物1}+\text{药物2}) = (1-Fa\text{药物1}) * (1-Fa\text{药物2})$

[0201] 其中Fa=受影响的细胞的分數,用小数表示。

[0202] 观察到的Fa (药物1+药物2) 值大于预期的Fa (药物1+药物2) 值结果表明协同,而观察到的Fa (药物1+药物2) 低于所述预期值表明拮抗。因此,韦伯的方法考虑了每种药物在特定剂量下的效力,然而没有考虑整个剂量响应曲线的形状[10]。结果被认为是:

[0203] • 结果值<-0.1表示协同

[0204] • 结果值在-0.1与0.1之间表示累加性

[0205] • 结果值>0.1表示拮抗

[0206] Chou-Talalay方法:1984年,Chou和Talalay提出了迄今为止使用最广泛的协同评估方法(Chou TC和Talalay P, (1984),“剂量-效应关系的定量分析:多种药物或酶抑制剂的联合作用”(Quantitative analysis of dose-effect relationships:the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors),Advances in enzyme regulation, 1984,22:27-55)。使用Henderson-Hasselbalch、Michaelis-Menten、Scatchard和Hill方程,Chou和Talalay推导出了“中值效应”方程,利用输入的剂量和相应的剂量效应,对剂量响应曲线的中值效应剂量和S形性进行建模。Chou和Talalay还创造了“组合指数(CI)”一词来评估两种化合物之间的协同作用程度,其被定义为:

$$[0207] \quad CI = \frac{1}{DRI_{\text{药物A}}} + \frac{1}{DRI_{\text{药物B}}}$$

[0208] 其中:

[0209] • DRI=药物减少指数,或因药物B的存在影响药物A剂量的减少倍数;

[0210] • CI小于0.9表示协同;

[0211] • CI在0.9至1.1之间表示累加相互作用;并且

[0212] • CI大于1.1表示拮抗。

[0213] 任何Fa下的CI都可以使用中值效应方程来估算。

[0214] Chou Talalay和韦伯两种方法都是广泛使用的稳健的协同性测定方法。尽管Chou Talalay方法被认为是一种更复杂的模型,但建议在组合中的两种药物之间使用恒定的剂量比。因此,当不满足这一假设时,建议使用韦伯方法。

[0215] Bliss方法:SynergyFinder(2.0版)是一个独立的网络应用程序,用于多药物(2种或更多种药物)组合分析数据的交互式分析和可视化(Ianevski A,Giri AK,Aittokallio T, (2020),“SynergyFinder 2.0:多药物组合协同作用的可视化分析”(SynergyFinder 2.0:visual analytics of multi-drug combination synergies),Nucleic Acids Res., 48(W1):W488-W493)。通过将观察到的药物组合响应与预期响应进行比较来量化组合协同或拮抗的程度,所述预期响应使用假设药物之间没有相互作用的参考模型来计算。在SynergyFinder中使用Bliss模型。该模型将协同作用的程度量化为单一药物的乘法效应,就像它们独立作用一样。这种独立性模型假设了一个随机过程,其中两种药物独立地发挥作用,并且可以基于独立事件的概率计算预期的组合效应。当协同性评分:

[0216] • 小于-10时:两种药物之间的相互作用可能是拮抗性的;

[0217] • 为-10至10时:两种药物之间的相互作用可能是累加的;并且

[0218] • 大于10时:两种药物之间的相互作用可能是协同性的。

[0219] 实施例2:赞群与当前使用的蛋白激酶抑制剂的联合

[0220] 为了确定联合药物治疗的效果,使用了三种不同的方法。韦伯分析方法揭示了在786-O细胞系中赞群和蛋白激酶抑制剂在多种药物剂量下的协同作用(图1-3)。对于赞群与乐伐替尼、卡博替尼和帕唑帕尼的联合,观察到最强的协同作用。还观察到舒尼替尼、索拉非尼和依维莫司剂量的协同作用,最通常是在较低剂量下。在其他4种细胞系中也观察到类似的结果,其中乐伐替尼和卡博替尼,其次是帕唑帕尼,一致地表现出与赞群的最强协同作用(图4-15)。

[0221] 使用Bliss方法的分析同样揭示出在所有5种细胞系中,赞群与乐伐替尼和帕唑帕尼的总体协同作用(表2)。这种方法进一步揭示了依维莫司在所有5种细胞系中是协同的,卡博替尼在所有细胞系中是协同的(尽管这对Caki-2细胞来说是边际的)。对舒尼替尼和索拉非尼观察到轻微的协同作用(表2)。Bliss分析还可以为药物剂量中协同作用最强的区域提供评分,这建议了在所有细胞系中所测试的药物的协同作用区域(表3)。每种剂量组合的个体Bliss评分进一步揭示了在大多数细胞系中具有协同作用的多个剂量。

[0222] 表2-通过Bliss协同分析确定的比生群-药物组合的总体协同评分

药物组合	786-0	Caki-1	Caki-2	RCC4-EV	RCC4-VHL
依维莫司+赞群	18.15*	19.88*	15.45*	17.58*	17.74*
舒尼替尼+赞群	12.26*	6.42 ^{&}	5.26 ^{&}	8.01 ^{&}	5.21 ^{&}
[0223] 索拉非尼+赞群	10.40*	7.86 ^{&}	5.07 ^{&}	5.09 ^{&}	4.41 ^{&}
帕唑帕尼+赞群	21.86*	16.24*	13.95*	22.34*	17.84*
乐伐替尼+赞群	24.49*	20.68*	17.93*	36.42*	29.32*
卡博替尼+赞群	18.07*	15.08*	8.64 ^{&}	19.15*	15.21*

[0224] >10的值被认为是协同的(*);-10至10之间的值是累加的([&]);低于-10的值被认为是拮抗的([Ⓢ])。

[0225] 表3-通过Bliss协同分析确定的比生群-药物组合的最大协同区域评分

药物组合	786-0	Caki-1	Caki-2	RCC4-EV	RCC4-VHL
依维莫司+赞群	27.12*	28.81*	23.00*	22.31*	27.52*
舒尼替尼+赞群	24.37*	14.24*	15.73*	14.79*	12.97*
[0226] 索拉非尼+赞群	23.69*	18.66*	11.54*	10.41*	12.14*
帕唑帕尼+赞群	30.44*	22.50*	16.90*	26.02*	22.96*
乐伐替尼+赞群	35.02*	30.28*	21.24*	44.15*	36.05*
卡博替尼+赞群	30.13*	26.66*	18.54*	26.86*	24.50*

[0227] >10的值被认为是协同的(*);-10至10之间的值是累加的([&]);低于-10的值被认为是拮抗的([Ⓢ])。

[0228] 最后,使用Chou-Talalay分析来量化赞群和每种抗RCC药物的联合作用。该分析的严格程度低于韦伯方法或Bliss分析方法,并鉴定到几乎所有组合在大多数剂量下的协同作用。在考虑两种药物在IC₅₀下协同评分时,预测了赞群与舒尼替尼、帕唑帕尼、乐伐替尼和卡博替尼的协同作用(表4)。

[0229] 表4-通过Chou Talalay分析确定的比生群-药物组合的组合指数ED₅₀

	药物组合	786-O	Caki-1	Caki-2	RCC-EV	RCC-VHL
	依维莫司 - 赞群	0.35*	NA	0.27*	6.28E+11 [#]	6.17E+57 [#]
	舒尼替尼 - 赞群	0.76*	0.61*	0.67*	0.69*	0.69*
[0230]	索拉非尼 - 赞群	0.75*	0.69*	0.92 ^{&}	0.83*	0.9*
	帕唑帕尼 - 赞群	0.51*	0.71*	0.56*	0.42*	0.44*
	乐伐替尼 - 赞群	0.37*	0.61*	0.28*	0.3*	0.28*
	卡博替尼 - 赞群	0.53*	0.5*	0.56*	0.52*	0.58*

[0231] 使用Chou-Talalay分析从ED₅₀计算组合指数;拮抗作用([#]);累加的(&);适度协同作用(*)。

[0232] 在所测试的ccRCC细胞中,乐伐替尼、卡博替尼和帕唑帕尼与赞群表现出最强的协同作用。这可能表明这些药物具有共同的细胞靶点,其与赞群具有协同致死作用。这些药物都是抑制血管生成的VEGFR抑制剂。除了抑制内皮细胞上的VEGFR之外,由于肿瘤细胞对其他激酶的固有抑制,这些多激酶抑制剂还抑制肿瘤生长。鉴于我们的测定体系仅由肿瘤细胞组成,使用赞群观察到的协同细胞毒性一定是由肿瘤细胞内的激酶抑制造成的。乐伐替尼、卡博替尼和帕唑帕尼的常见靶点包括DDR2、DDR1、RET和RIPK2。RET也被鉴定为舒尼替尼的靶点。进一步将Caki-1细胞系添加到4种细胞系的合并物中,用于分析包括卡博替尼在内的一些药物,这进一步揭示了AXL和MET是卡博替尼的靶点。

[0233] 实施例3:赞群杀死透明细胞肾细胞癌细胞并且对VHL(-)细胞毒性更大

[0234] 实施例2中示出的结果表明,与VHL挽救系(RCC4 VHL)相比,当用比生群和蛋白激酶抑制剂的组合处理突变体VHL(-)细胞(RCC4 EV细胞)时,它们之间的协同作用更大。这些结果与早期的观察结果一致,在所述早期观察中,比生群显示出不仅对所有肾脏癌细胞系有毒(数据未显示),而且与等基因挽救(VHL(+))RCC4 VHL细胞相比令人吃惊地对作为VHL(-)突变体细胞的RCC4 EV细胞的毒性更大,如表5中所示和图18中所示。

[0235] 表5-比生群在肾癌RCC4 EV(VHL(-);突变体/Mut)和VHL挽救RCC4VHL(野生型/WT)细胞系中的细胞毒性IC₅₀值

	细胞系	肾细胞类型	VHL 状态	比生群 IC ₅₀ (nM)
[0236]	RCC4 EV	ccRCC	Mut	907
	RCC4 VHL	ccRCC	Mut+WT	1170

[0237] 使用如实施例1中所述的长期克隆源性细胞生长测定法(细胞集落形成),还观察到RCC4 EV细胞与RCC4 VHL细胞相比在VHL丧失和比生群之间更大的致死性,所述测定法更好地测量药物对癌细胞生长的影响,而不是细胞杀伤。

[0238] 与野生型VHL挽救细胞相比,RCC-4EV(VHL突变体)细胞对比生群明显更加敏感(2.9x)(表6和图19)。

[0239] 表6-赞群在肾RCC4 EV(VHL(-);突变体/Mut)和VHL挽救RCC4 VHL(野生型/WT)细胞系中的克隆源性IC₅₀

	细胞系	肾细胞类型	VHL 状态	比生群 IC ₅₀ (nM)
[0240]	RCC4 EV	ccRCC	Mut	167
	RCC4 VHL	ccRCC	Mut+WT	483

[0241] 本发明的优点

[0242] 本发明提供了一种通过施用比生群来治疗ccRCC和其他VHL (-) 癌症的新方式,比生群是一种抗肿瘤药物,其具有多种作用机制,包括DNA嵌入、拓扑异构酶抑制、脂肪和肥胖相关蛋白 (FTO) 的抑制以及免疫系统的激活。比生群具有良好的耐受性,特别是缺乏一些其他蒽衍生物所特有的心脏毒性。比生群可以与用于治疗ccRCC和其他VHL (-) 癌症的其他治疗剂一起使用。

[0243] 本文说明性描述的发明可以在不存在本文中未具体公开的任一个或多个要素、限制的情况下适当地实践。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被广泛且不受限制地理解。如本文中所使用的,在权利要求中使用术语“包含”作为过渡性短语意在包括在其中使用过渡性短语“基本上由……组成”或“由……组成”,如果没有明确排除较窄的过渡性短语的话。尽管本发明已通过优选实施方案和任选的特点具体公开,但本领域技术人员可以对本文公开的发明进行修改和改变,并且这些修改和改变被认为在本文公开的本发明的范围之内。本发明已在本文中进行了广泛和一般性描述。落于类属公开内容的范围之内的每个较窄的种和亚属分组也构成这些发明的一部分。这包括对每项发明的类属描述,但有一个附带条件或负面限制,即从所述类属中删除任何主题内容,无论所述删除的材料是否具体存在于其中。

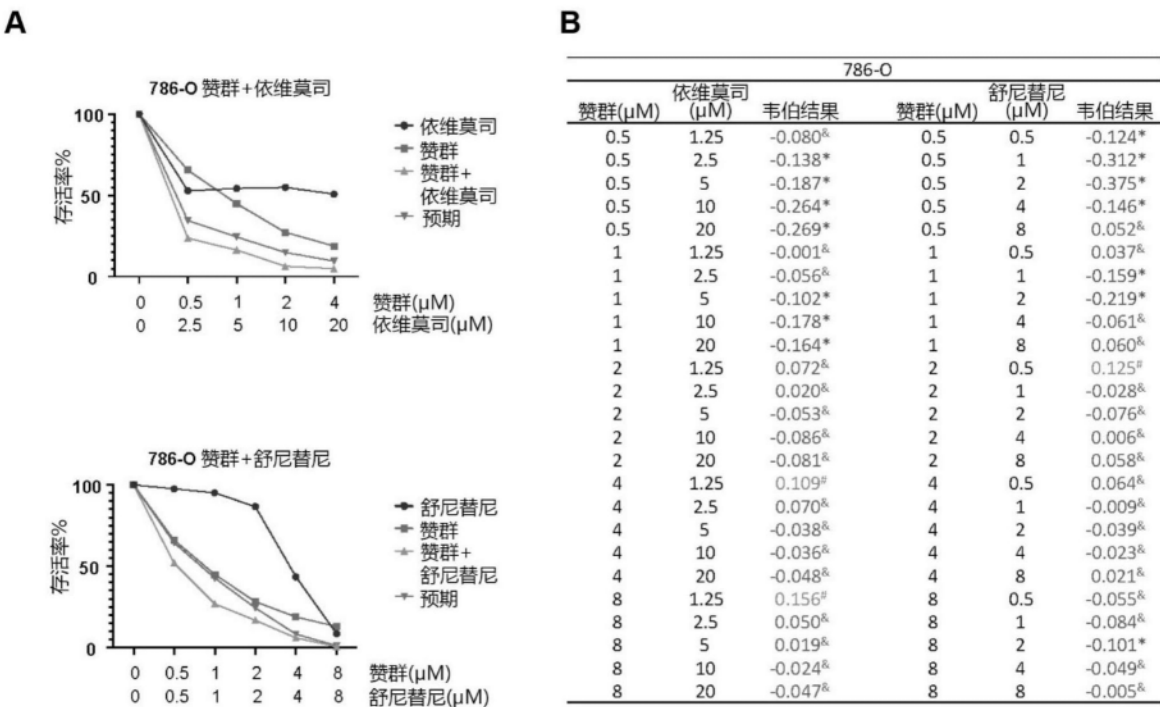


图1

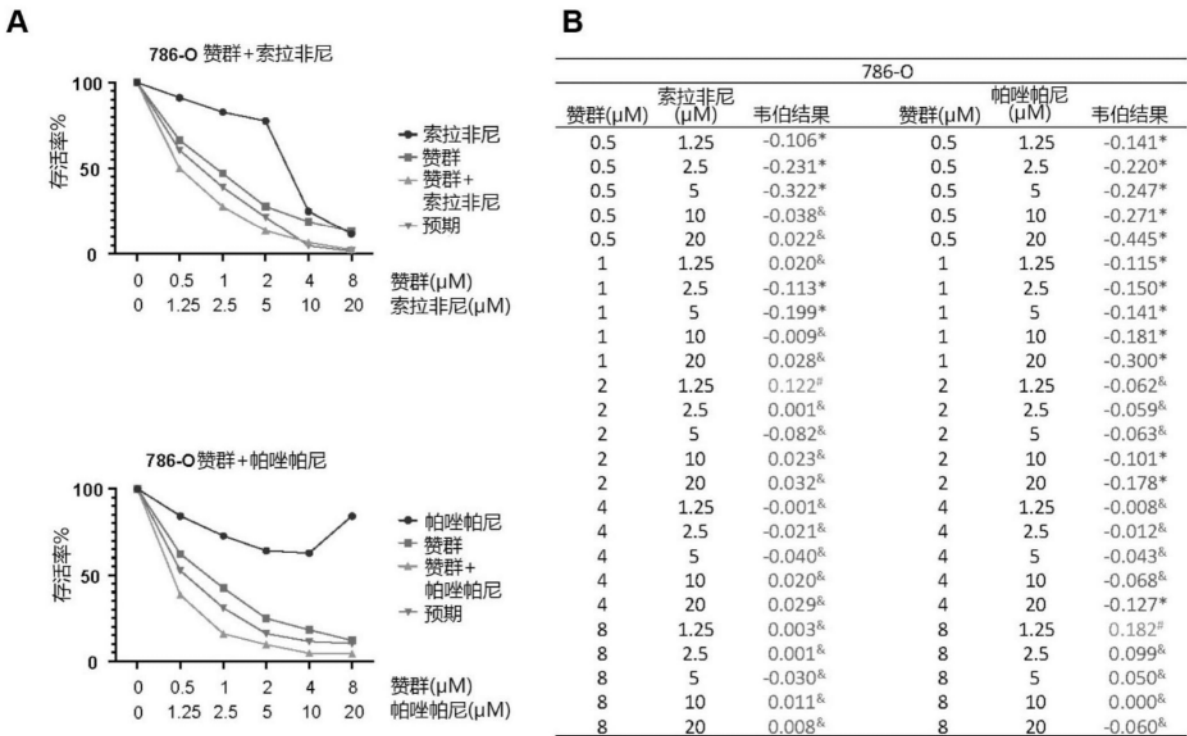
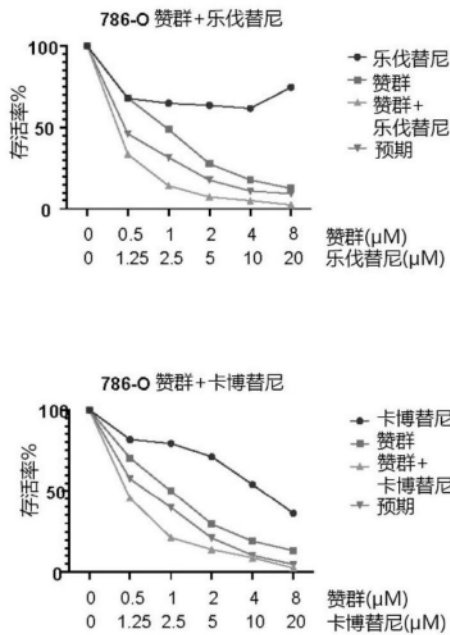


图2

A

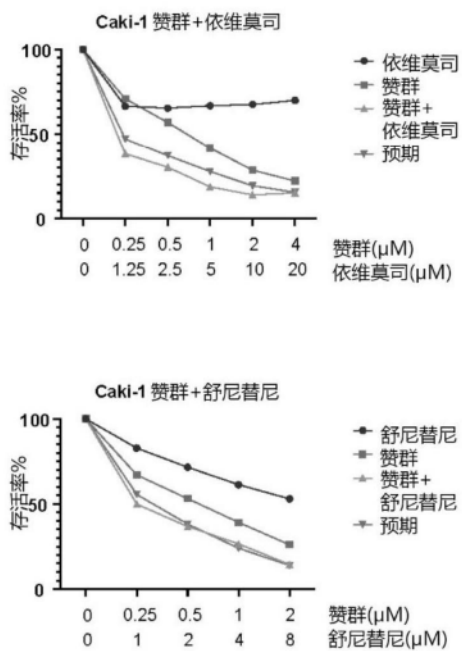


B

786-O					
赞群(μM)	乐伐替尼(μM)	韦伯结果	赞群(μM)	卡博替尼(μM)	韦伯结果
0.5	1.25	-0.125*	0.5	1.25	-0.120*
0.5	2.5	-0.274*	0.5	2.5	-0.254*
0.5	5	-0.333*	0.5	5	-0.314*
0.5	10	-0.348*	0.5	10	-0.237*
0.5	20	-0.470*	0.5	20	-0.156*
1	1.25	-0.067 [§]	1	1.25	-0.078 [§]
1	2.5	-0.173*	1	2.5	-0.185*
1	5	-0.223*	1	5	-0.202*
1	10	-0.235*	1	10	-0.142*
1	20	-0.330*	1	20	-0.093 [§]
2	1.25	0.030 [§]	2	1.25	-0.042 [§]
2	2.5	-0.048 [§]	2	2.5	-0.081 [§]
2	5	-0.103*	2	5	-0.072 [§]
2	10	-0.111*	2	10	-0.065 [§]
2	20	-0.173*	2	20	-0.046 [§]
4	1.25	0.064 [§]	4	1.25	-0.007 [§]
4	2.5	0.007 [§]	4	2.5	0.001 [§]
4	5	-0.044 [§]	4	5	-0.015 [§]
4	10	-0.059 [§]	4	10	-0.015 [§]
4	20	-0.102*	4	20	-0.024 [§]
8	1.25	0.140 [§]	8	1.25	0.028 [§]
8	2.5	0.071 [§]	8	2.5	0.041 [§]
8	5	0.006 [§]	8	5	-0.020 [§]
8	10	-0.030 [§]	8	10	-0.012 [§]
8	20	-0.068 [§]	8	20	-0.021 [§]

图3

A



B

Caki-1					
赞群(μM)	依维莫司(μM)	韦伯结果	赞群(μM)	舒尼替尼(μM)	韦伯结果
0.25	1.25	-0.089 [§]	0.25	0.5	-0.036 [§]
0.25	2.5	-0.138*	0.25	1	-0.101*
0.25	5	-0.235*	0.25	2	-0.131*
0.25	10	-0.313*	0.25	4	-0.163*
0.25	20	-0.339*	0.25	8	-0.156*
0.5	1.25	-0.014 [§]	0.5	0.5	0.020 [§]
0.5	2.5	-0.070 [§]	0.5	1	-0.035 [§]
0.5	5	-0.157*	0.5	2	-0.076 [§]
0.5	10	-0.242*	0.5	4	-0.108*
0.5	20	-0.244*	0.5	8	-0.085 [§]
1	1.25	0.055 [§]	1	0.5	0.104 [§]
1	2.5	0.002 [§]	1	1	0.043 [§]
1	5	-0.091 [§]	1	2	-0.004 [§]
1	10	-0.150*	1	4	-0.037 [§]
1	20	-0.134*	1	8	-0.031 [§]
2	1.25	0.168 [§]	2	0.5	0.194 [§]
2	2.5	0.096 [§]	2	1	0.143 [§]
2	5	0.004 [§]	2	2	0.078 [§]
2	10	-0.052 [§]	2	4	0.038 [§]
2	20	-0.043 [§]	2	8	0.023 [§]
4	1.25	0.225 [§]	4	0.5	0.258 [§]
4	2.5	0.152 [§]	4	1	0.218 [§]
4	5	0.043 [§]	4	2	0.118 [§]
4	10	0.022 [§]	4	4	0.022 [§]
4	20	-0.004 [§]	4	8	-0.036 [§]

图4

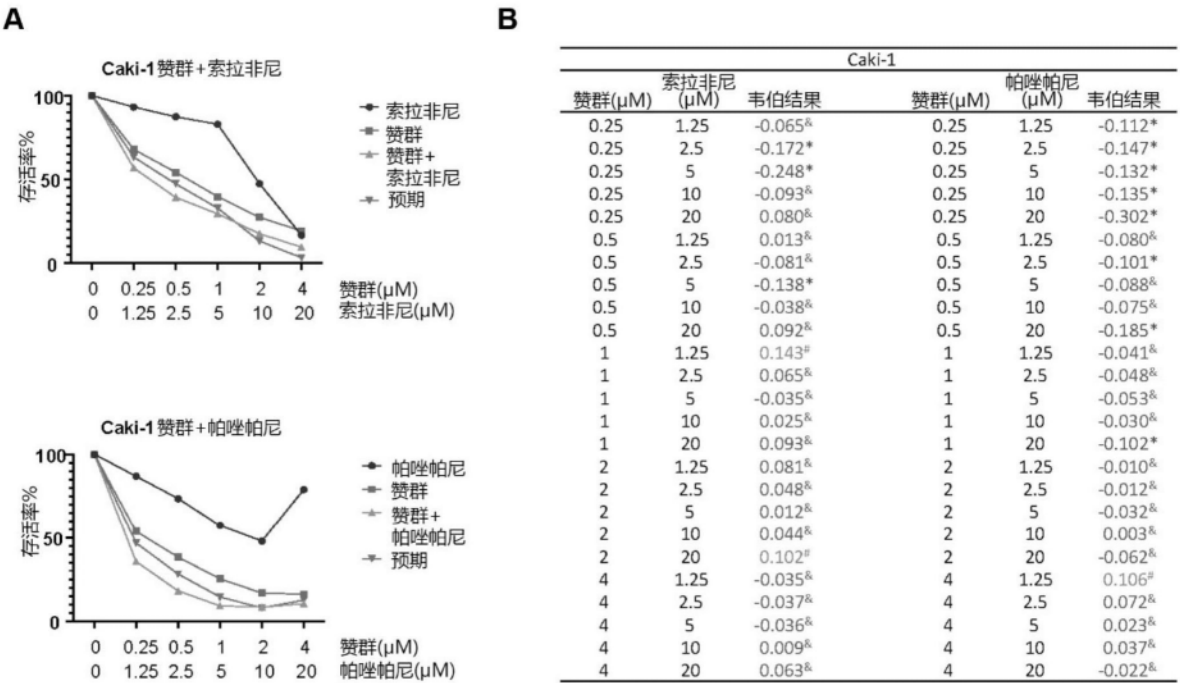


图5

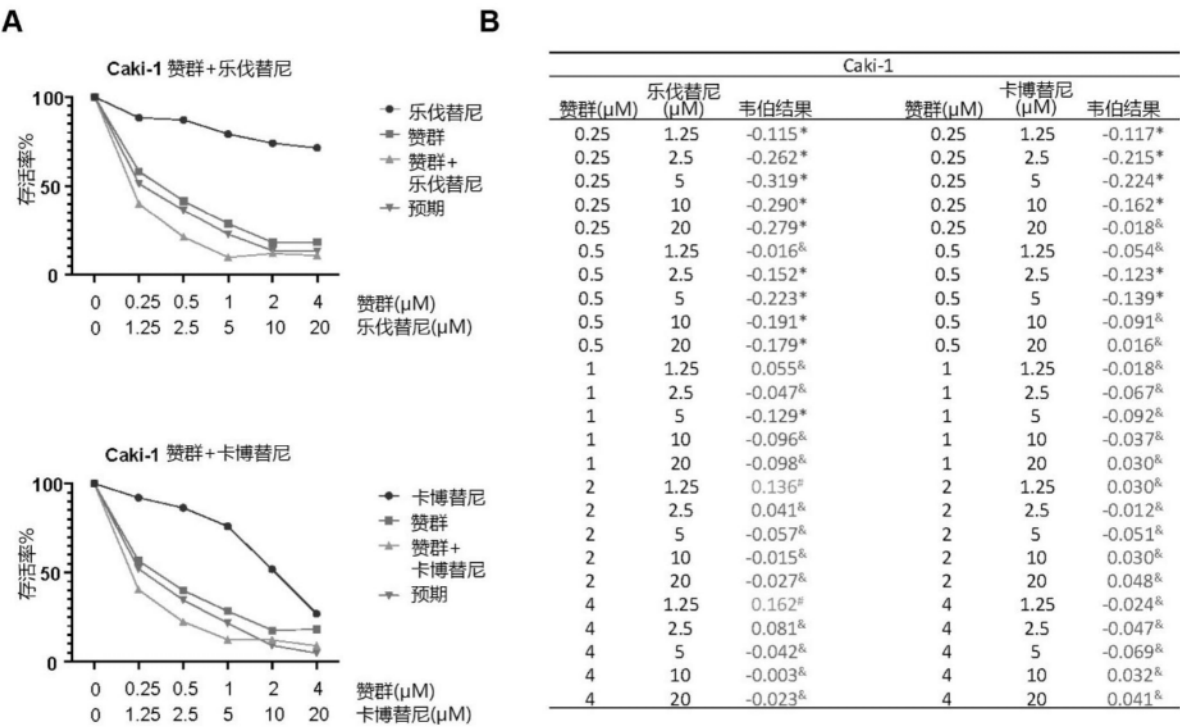


图6

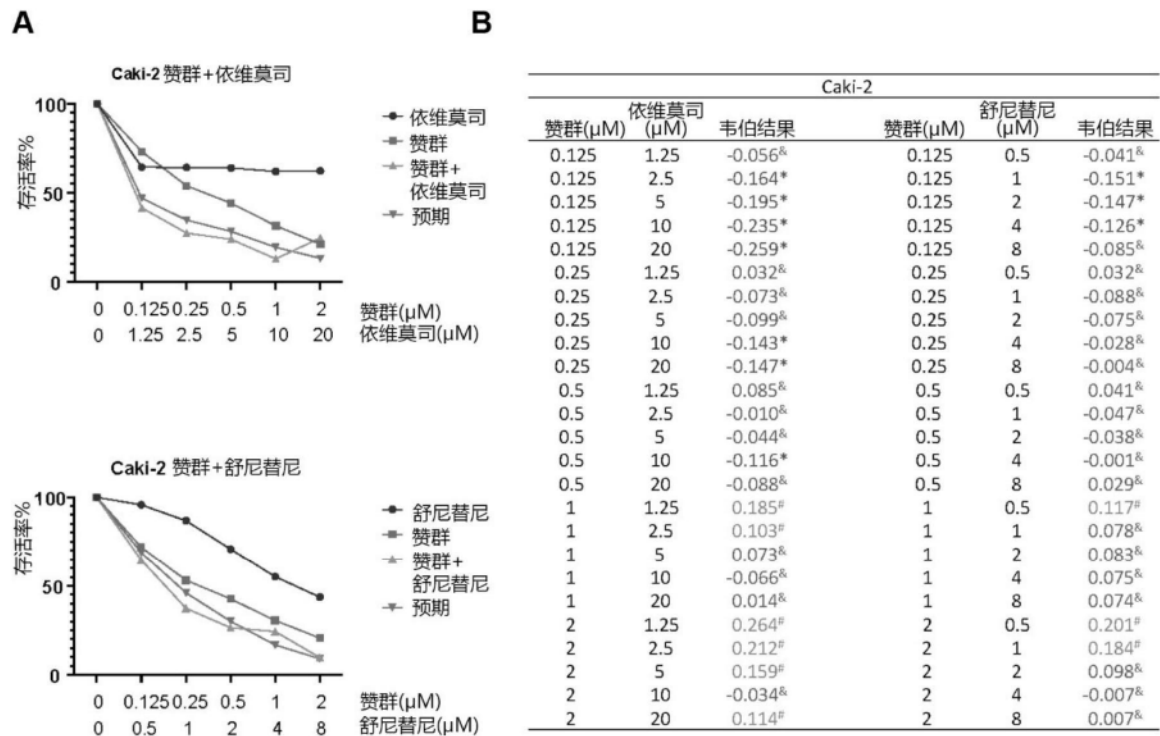


图7

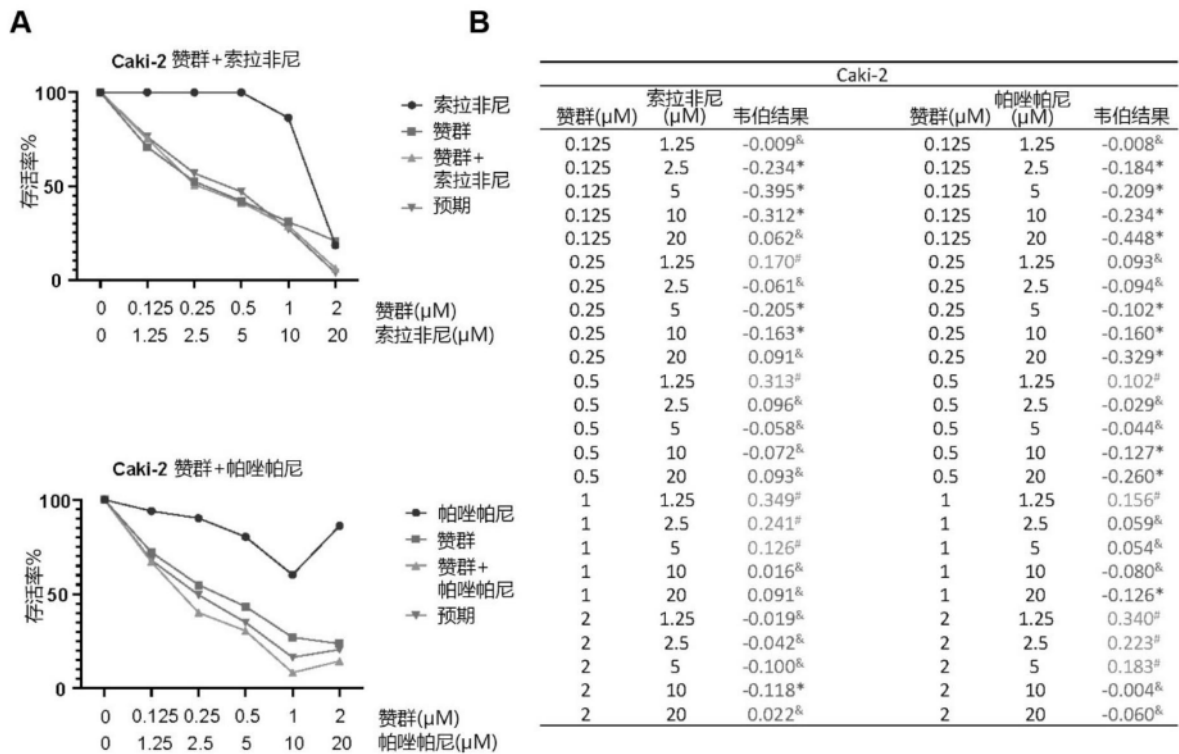


图8

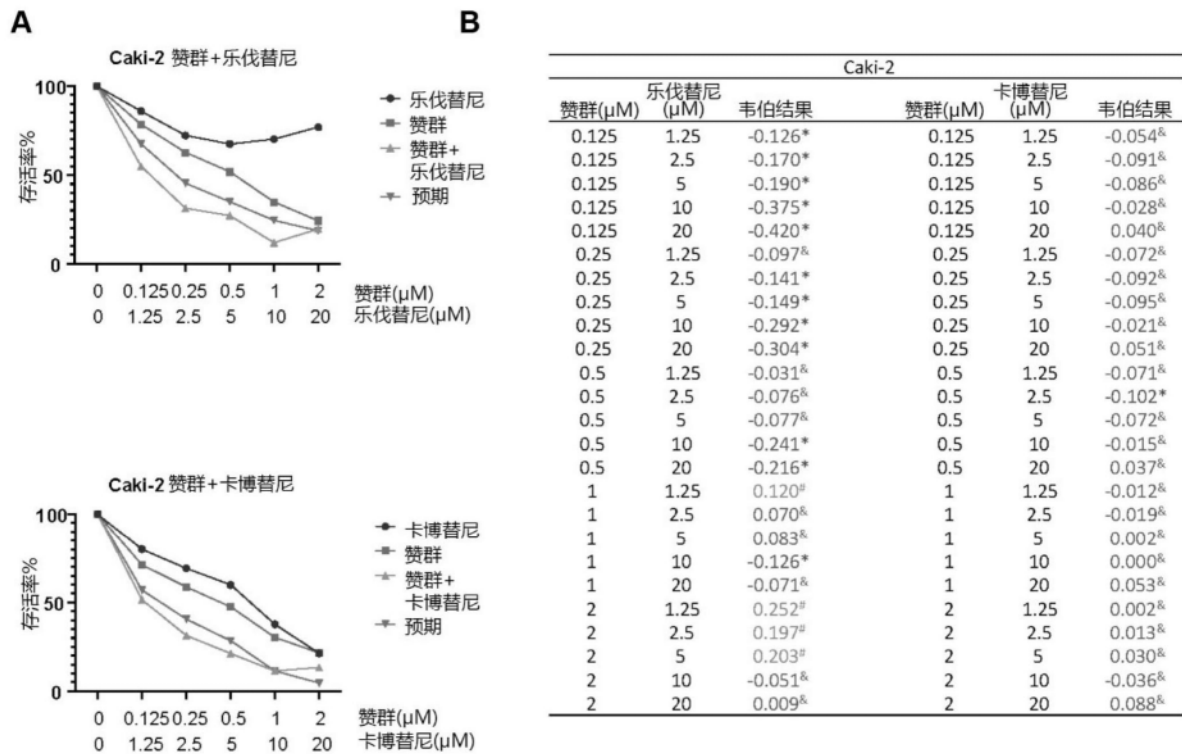


图9

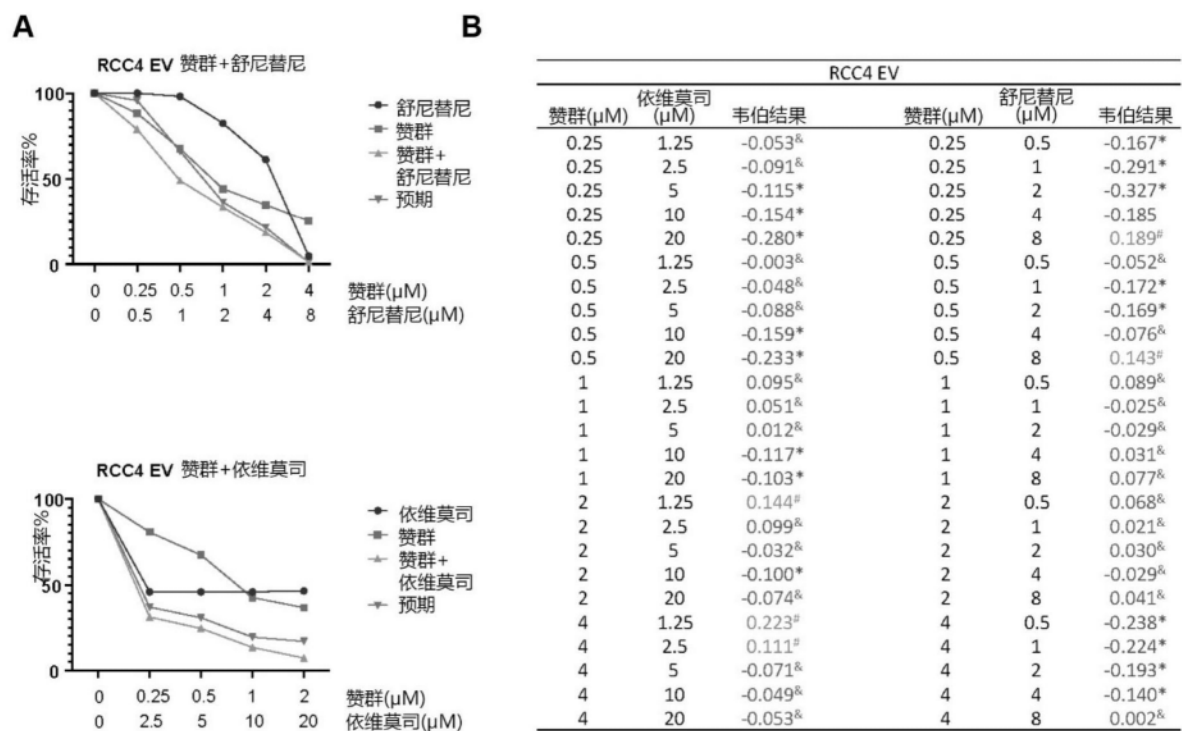


图10

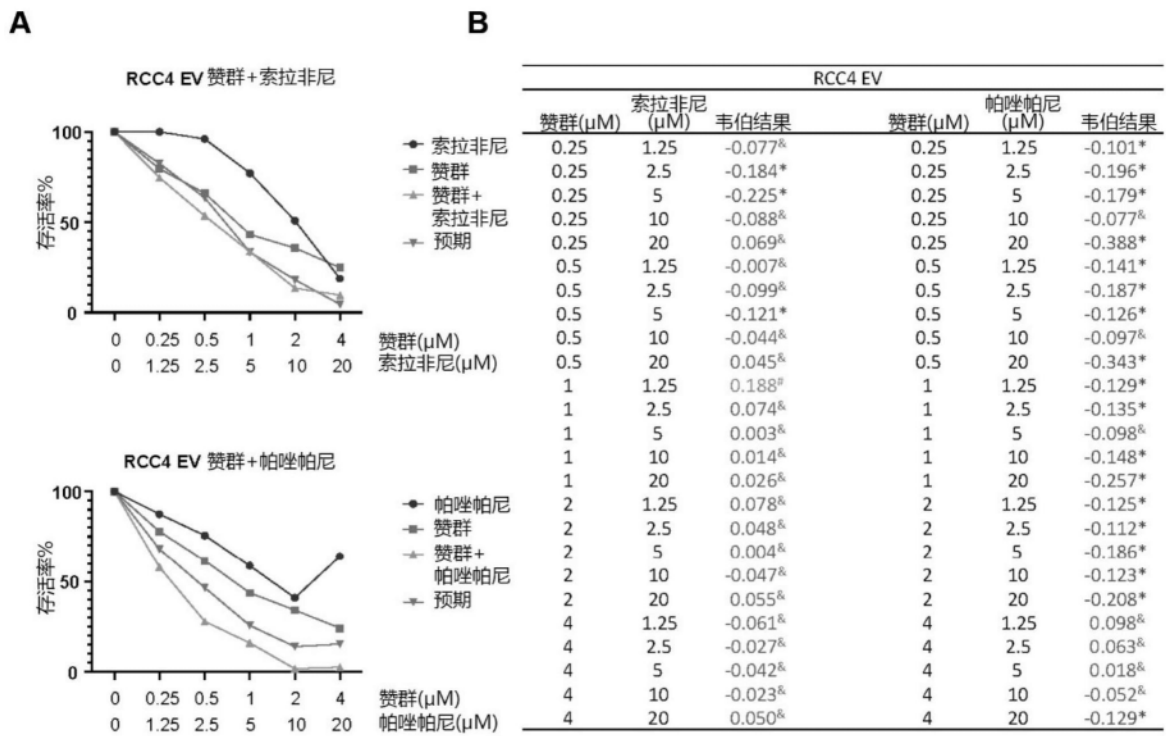


图11

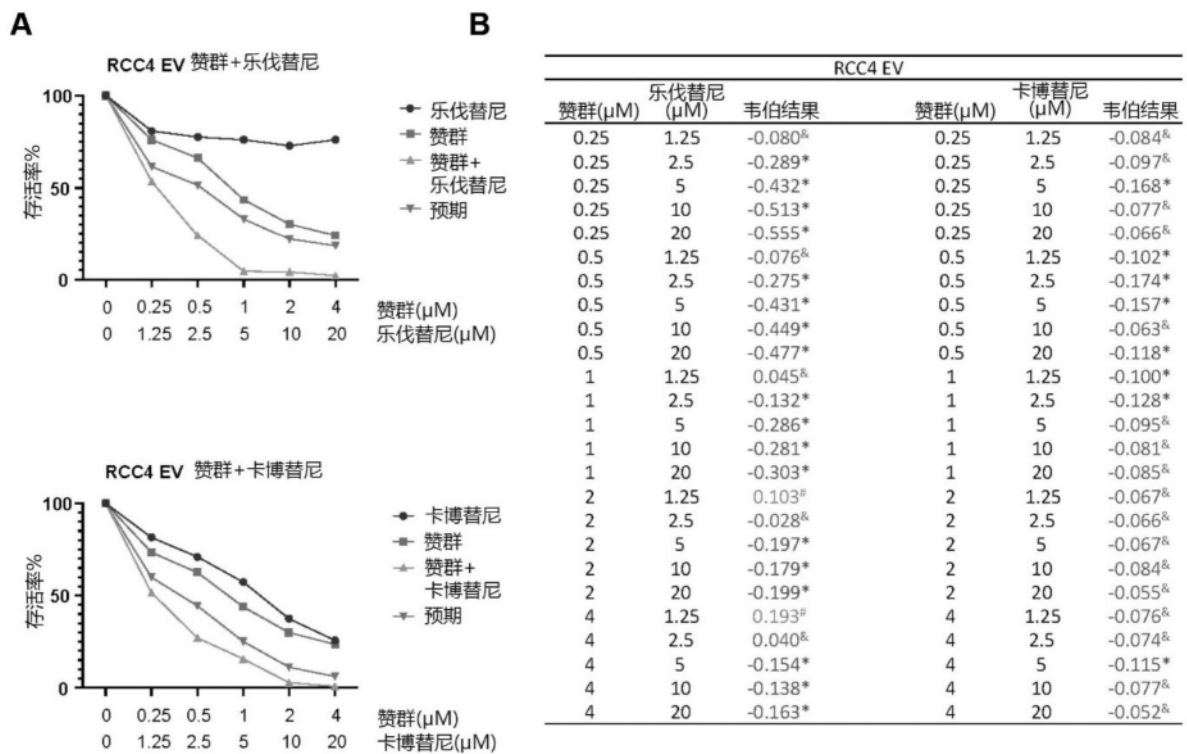


图12

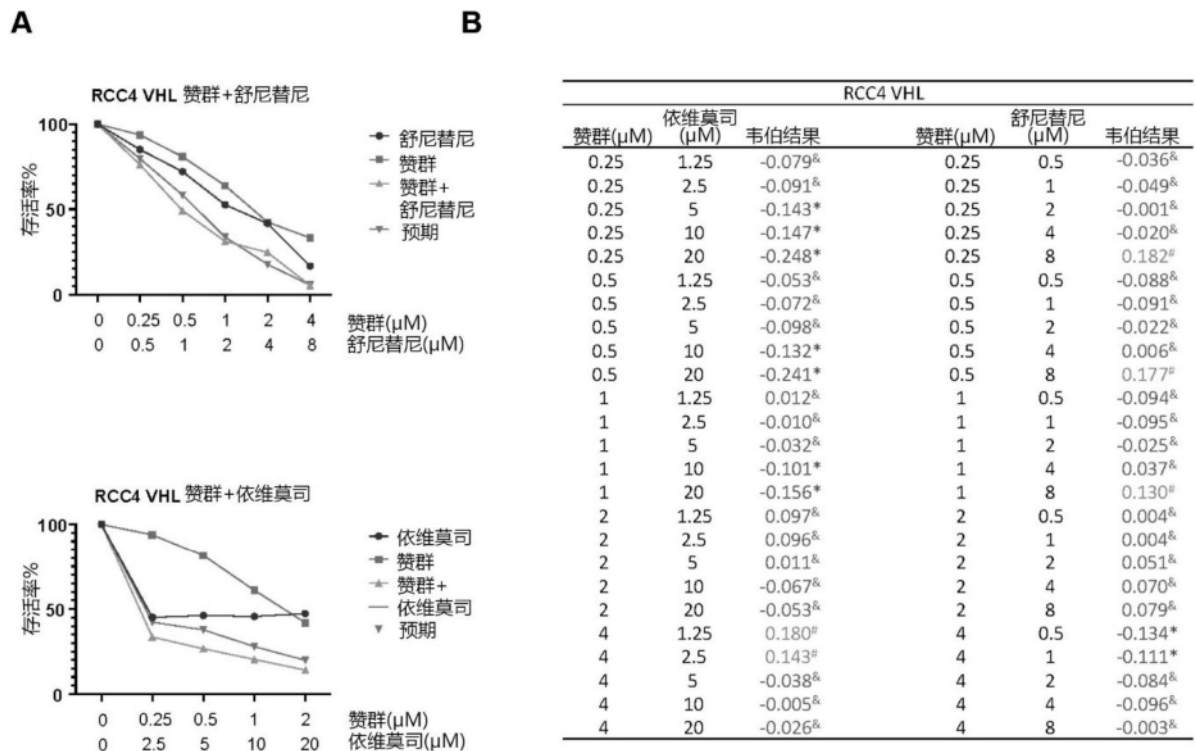


图13

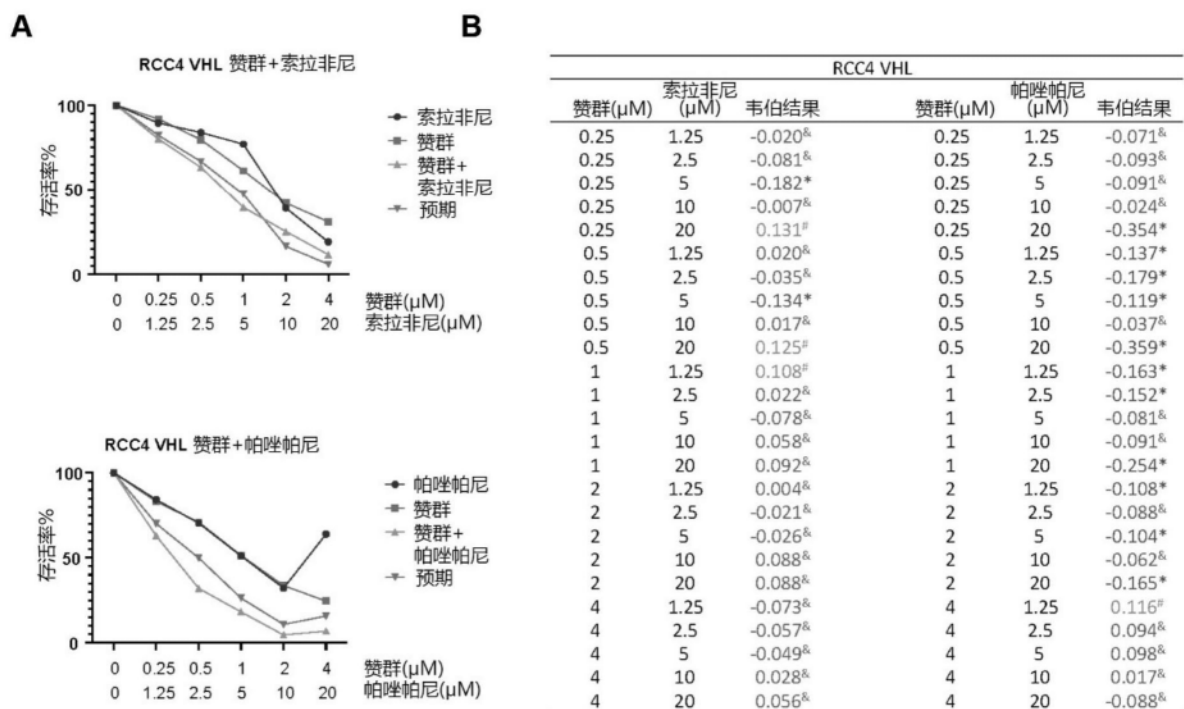


图14

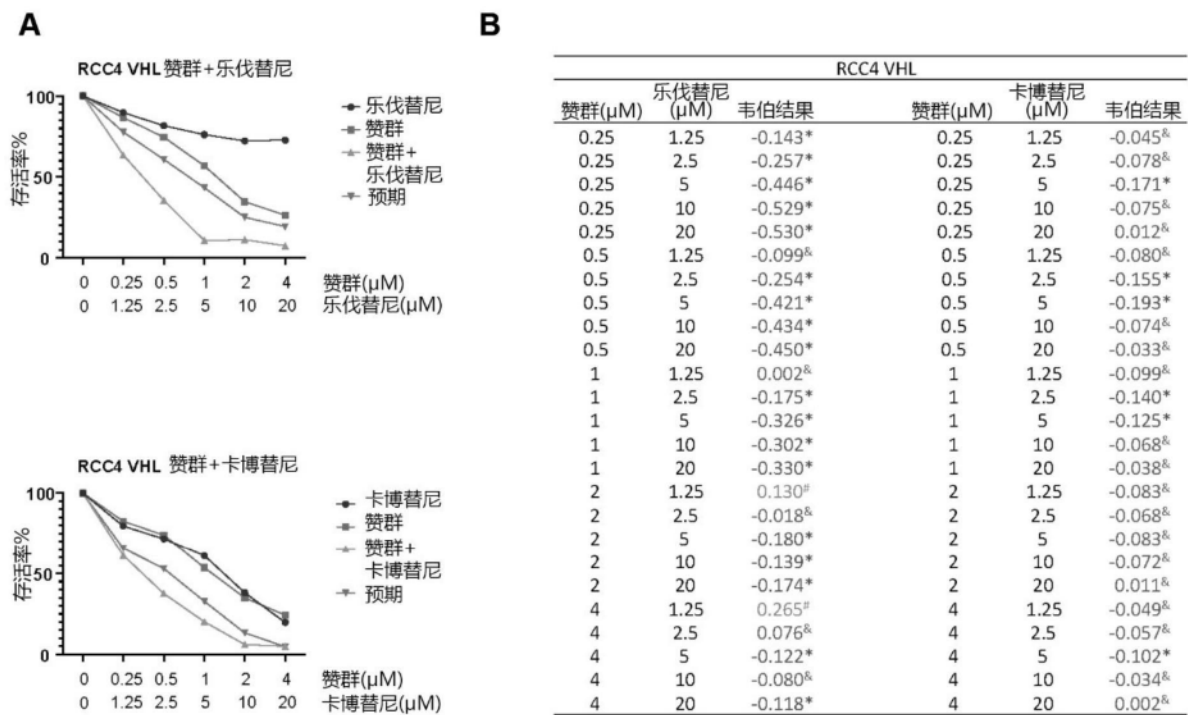


图15

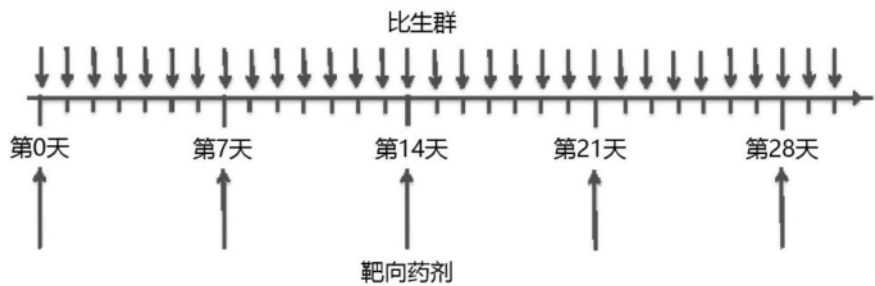


图16

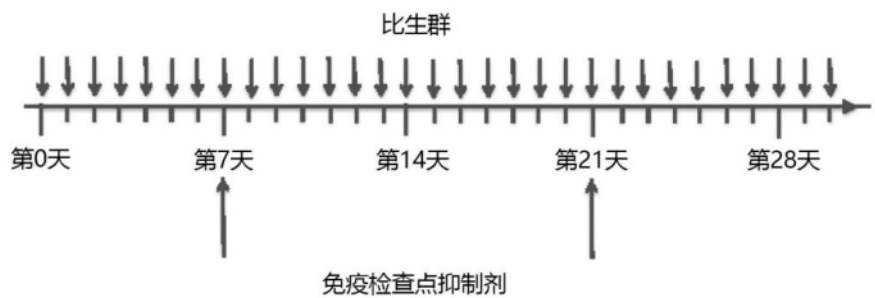


图17

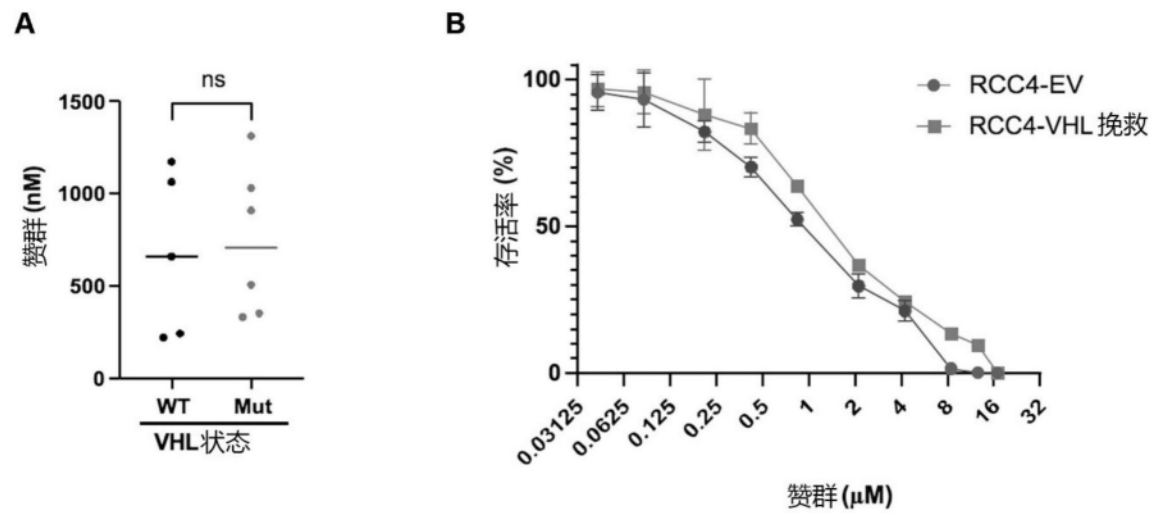


图18

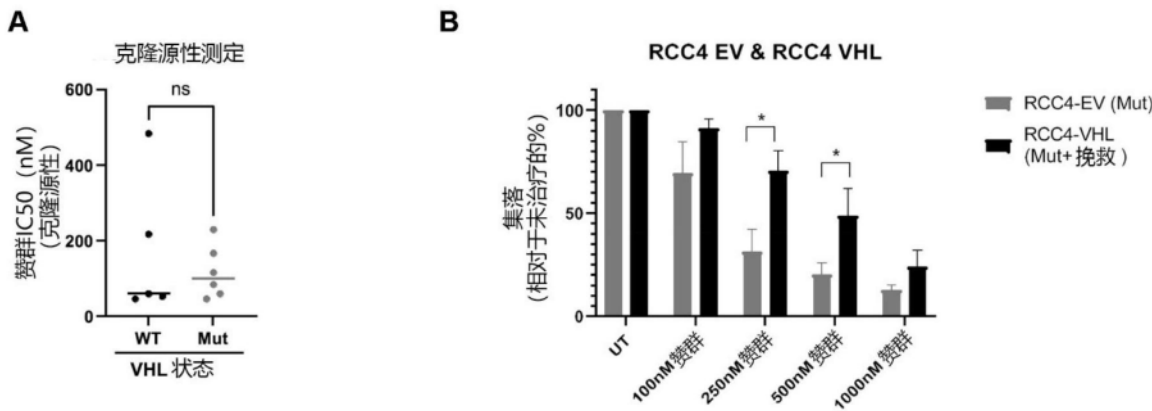


图19