



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105899223 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201480071520.X

(22)申请日 2014.10.27

(30)优先权数据

61/896,250 2013.10.28 US

61/914,389 2013.12.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/062455 2014.10.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/065919 EN 2015.05.07

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 川·A·高 刘承飞 罗微

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 崔佳佳 马莉华

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

A61K 31/40(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

C07K 14/54(2006.01)

A61K 31/165(2006.01)

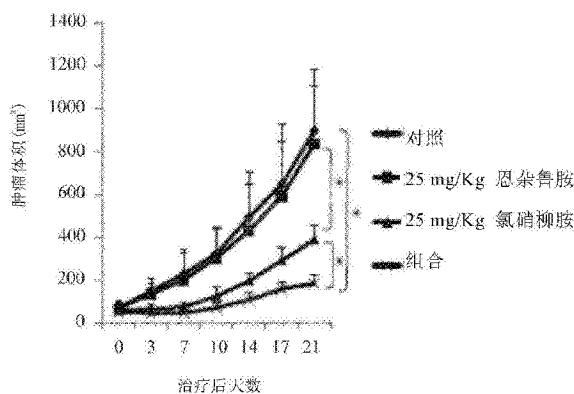
权利要求书4页 说明书55页 附图49页

(54)发明名称

转移性前列腺癌的治疗

(57)摘要

本发明提供了新的用于治疗前列腺癌的组合和方法,例如,耐药前列腺癌,如抗雄激素药物(如恩杂鲁胺)耐受的和/或去势抵抗性前列腺癌(CRPC)。这些新的组合物包括但不限于:含AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)的药物组合物。或者,这些新的组合物包括但不限于:含AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)的药物组合物。这些新的方法包括但不限于:施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和/或AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)以治疗前列腺癌患者的方法。本发明还提供抑制雄激素受体变异体表达(如AR-V7)的方法,以及杀伤表达AR-V7的细胞的方法。本发明还提供了抑制AKR1C3表达或活性的方法,以及杀伤表达AKR1C3的细胞的方法。



1. 一种组合物, 其特征在于, 包含AR-V7抑制剂和选自下组的化合物: 恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、多西紫杉醇、及其组合。

2. 如权利要求1所述的组合物, 其中, AR-V7抑制剂是以有效提高所述化合物治疗效果的量存在。

3. 如权利要求1或2所述的组合物, 其中, 所述组合物还包括AKR1C3抑制剂。

4. 一种组合物, 其特征在于, 包含AKR1C3抑制剂和选自下组的化合物: 恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、多西紫杉醇、及其组合。

5. 如权利要求4所述的组合物, 其中, AKR1C3抑制剂是以有效提高所述化合物的治疗效果的量存在。

6. 如权利要求4或5所述的权利要求, 其中, 所述组合物还包括AR-V7抑制剂。

7. 一种组合物, 其特征在于, 包含AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂。

8. 如权利要求7所述的组合物, 其中, 所述组合物还包含选自下组的化合物: 恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、多西紫杉醇、及其组合。

9. 如权利要求8所述的组合物, 其中, AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂是以有效提高所述化合物的治疗效果的量存在。

10. 如权利要求1-3和6-9中任一项所述的组合物, 其中, AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。

11. 如权利要求3-9中任一项所述的组合物, 其中, AKR1C3抑制剂是吡哌美辛。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的组合物, 其特征在于, 还包含药学上可接受的赋形剂或稀释剂。

13. 一种治疗有需要的患者的前列腺癌的方法, 所述方法包括对所述患者施用有效量的AR-V7抑制剂和/或有效量的AKR1C3抑制剂。

14. 如权利要求13所述的方法, 其中, 所述方法包括对所述患者施用有效量的AR-V7抑制剂。

15. 如权利要求13所述的方法, 其中, 所述方法包括对所述患者施用有效量的AKR1C3抑制剂。

16. 如权利要求13所述的方法, 其中, 所述方法包括对所述患者施用有效量的AR-V7抑制剂和有效量的AKR1C3抑制剂。

17. 如权利要求13-16中任一项所述的方法, 其中, 所述前列腺癌选自下组: 去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、晚期前列腺癌、耐药的前列腺癌、抗雄激素耐受的前列腺癌、恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌、多西紫杉醇耐受的前列腺癌、AR-V7诱导的耐药的前列腺癌、AKR1C3诱导的耐药的前列腺癌、及其组合。

18. 如权利要求13-17中任一项所述的方法, 其中, 所述治疗包括逆转或减少前列腺癌细胞对于抗雄激素药物的耐受和/或使得前列腺癌细胞对于抗雄激素药再致敏。

19. 如权利要求18所述的方法, 其中, 所述抗雄激素药物为选自下组的化合物: 恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。

20. 如权利要求13-17中任一项所述的方法, 其中, 所述治疗包含逆转或减少前列腺癌对多西紫杉醇的耐受和/或使得前列腺癌细胞对多西紫杉醇再致敏。

21. 如权利要求13-20中任一项所述的方法, 其中, 所述施用包括: 联合施用AR-V7抑制

剂和选自下组的化合物：恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、多西紫杉醇、及其组合。

22. 如权利要求13-21中任一项所述的方法，其中，所述施用包括：联合施用AKR1C3抑制剂和选自下组的化合物：恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、多西紫杉醇、及其组合。

23. 如权利要求13-22中任一项所述的方法，其中，AR-V7抑制剂为氯硝柳胺。

24. 如权利要求13-23中任一项所述的方法，其中，AKR1C3抑制剂为吡喹美辛。

25. 如权利要求13-24中任一项所述的方法，其中，所述方法包括：

口服给予有效量的AR-V7抑制剂；和/或

口服给予有效量的AKR1C3抑制剂。

26. 如权利要求21-25中任一项所述的方法，其中，所述方法还包括对所述患者口服施用化合物。

27. 一种减少或逆转前列腺癌对前列腺癌药物耐受的方法，所述方法包括：将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂和/或AKR1C3抑制剂进行接触。

28. 如权利要求27所述的方法，其中，所述方法包括：将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂进行接触。

29. 如权利要求27所述的方法，其中，所述方法包括：将前列腺癌细胞与AKR1C3抑制剂进行接触。

30. 如权利要求27所述的方法，其中，所述方法包括：将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂进行接触。

31. 如权利要求27-30中任一项所述的方法，其中，所述前列腺癌药物是抗雄激素药物、多西紫杉醇、或其组合。

32. 如权利要求31所述的方法，其中，所述的抗雄激素药物选自下组：恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。

33. 如权利要求27-32中任一项所述的方法，其中，AR-V7抑制剂为氯硝柳胺。

34. 如权利要求27-33中任一项所述的方法，其中，AKR1C3抑制剂为吡喹美辛。

35. 如权利要求27-34中任一项所述的方法，其中，所述减少或逆转前列腺癌药物耐受的前列腺癌是在前列腺癌患者中。

36. 如权利要求27-35中任一项所述的方法，其中，所述减少或逆转前列腺癌药物耐受的前列腺癌包括：使前列腺癌药物耐受的前列腺癌细胞再致敏。

37. 如权利要求27-36中任一项所述的方法，其中，所述前列腺癌选自下组：去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、晚期前列腺癌、耐药前列腺癌、抗雄激素耐受前列腺癌、恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌、多西紫杉醇耐受的前列腺癌、AR-V7诱导的耐药的前列腺癌、AKR1C3诱导的耐药的前列腺癌、及其组合。

38. 一种提高前列腺癌患者中前列腺癌药物的治疗效果的方法，其特征在于，所述方法包括：给有需要前列腺癌治疗的患者施用有效量的AR-V7抑制剂和/或有效量的AKR1C3抑制剂。

39. 如权利要求38所述的方法，其中，所述方法包括：给有需要前列腺癌治疗的患者施用有效量的AR-V7抑制剂。

40. 如权利要求38所述的方法，其中，所述方法包括：给有需要前列腺癌治疗的患者施

用有效量的AKR1C3抑制剂。

41. 如权利要求38所述的方法, 其中, 所述方法包括: 给有需要前列腺癌治疗的患者施用有效量的AR-V7抑制剂和有效量的AKR1C3抑制剂。

42. 如权利要求38-41中任一项所述的方法, 其中, 被提高的前列腺癌药物是抗雄激素药物、多西紫杉醇、或其组合。

43. 如权利要求42所述的方法, 其中, 所述的抗雄激素药物选自下组: 恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。

44. 如权利要求38-43中任一项所述的方法, 其中, AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。

45. 如权利要求38-44中任一项所述的方法, 其中, AKR1C3抑制剂是吡喹美辛。

46. 如权利要求38-45中任一项所述的方法, 其中, 所述方法通过再致敏前列腺癌药物耐受的前列腺癌细胞, 提高前列腺癌的治疗效果。

47. 如权利要求38-46中任一项所述的方法, 其中, 前列腺癌选自下组: 去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、晚期前列腺癌、耐药前列腺癌、抗雄激素耐受的前列腺癌、恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌、多西紫杉醇耐受的前列腺癌、AR-V7诱导的耐药的前列腺癌、AKR1C3-诱导的耐药的前列腺癌、及其组合。

48. 如权利要求38-47中任一项所述的方法, 其中, 所述方法包括:

口服给予有效量的AR-V7抑制剂; 和/或

口服给予有效量的AKR1C3抑制剂。

49. 如权利要求38-48中任一项所述的方法, 其中, AR-V7抑制剂和/或AKR1C3抑制剂与所述前列腺癌药物联合施用。

50. 一种抑制细胞中雄激素受体(AR)变异体的方法, 其特征在于, 包括将细胞与有效量的氯硝柳胺进行接触。

51. 如权利要求50所述的方法, 其中, 所述AR变异体为AR-V7。

52. 如权利要求50或51所述的方法, 其中, 所述抑制包括: 抑制AR变异体的反式激活, 抑制AR变异体的表达, 抑制AR变异体诱导的细胞迁移, 抑制AR变异体诱导的前列腺癌的侵袭, 抑制前列腺癌细胞的克隆形成, 抑制AR变异体被募集到前列腺特异性抗原(PSA)启动子, 及其组合。

53. 一种抑制细胞中醛酮还原酶1C3(AKR1C3)的方法, 其特征在于, 包括将细胞和吡喹美辛进行接触。

54. 如权利要求53所述的方法, 其中, 所述抑制包括: 抑制AKR1C3表达, 抑制AKR1C3活性, 或其组合。

55. 如权利要求50-54中任一项所述的方法, 其中, 所述细胞为前列腺癌细胞。

56. 一种试剂盒, 其特征在于, 包含(a)AR-V7抑制剂和/或AKR1C3抑制剂; 以及(b)选自下组的化合物: 恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、多西紫杉醇、及其组合。

57. 如权利要求56所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括: 提供AR-V7抑制剂施用说明的标签。

58. 如权利要求56或57所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括: 提供AKR1C3抑制剂施用说明的标签。

59. 如权利要求56-58中任一项所述的试剂盒,其中,AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。
60. 如权利要求56-59中任一项所述的试剂盒,其中,AKR1C3抑制剂是吡哌美辛。

转移性前列腺癌的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月28日提交的美国临时专利申请号61/896,250,和2013年12月11日提交的美国临时专利申请号61/914,389的优先权,其内容通过引用全部纳入本文用于全部目的。

[0003] 对联邦政府资助的研究和发展下所作发明的权利的声明

[0004] 本发明是在政府支持下,基于由美国国家卫生研究院授予的基金号CA140468所作的。政府对本发明具有一定权利。

[0005] 发明背景

[0006] 治疗前列腺癌的现有方法包括:通过对前列腺癌患者施用抗雄性激素药物和雄激素拮抗剂进行靶向雄性激素信号疗法和雄激素剥夺疗法。虽然这些方法最初可能是有效的,一旦病人出现去势抵抗性前列腺癌(CRPC),它们往往变得无效。到目前为止,CRPC是不可治愈的。

[0007] CRPC患者和用多西紫杉醇治疗不能改善健康状况的患者,通常用如恩杂鲁胺(enzalutamide)和阿比特龙的药物进行治疗。然而,前列腺癌患者通常发展为对恩杂鲁胺和阿比特龙耐药。

[0008] 雄激素受体(AR)剪接变异体往往普遍存在于晚期前列腺癌组织,例如,来自CRPC患者的组织,和晚期前列腺癌的细胞系中。这些AR变异体因异常剪接而生成,例如改变的mRNA剪接和翻译提前终止。截断型AR变异体驱使不依赖于雄激素的生长。AR也介导基因表达。AR-V7,一种缺乏恩杂鲁胺和阿比特龙所靶向的配体结合域(LBD)的AR变异体,在一些前列腺癌细胞中组成型活跃。由于AR-V7缺乏LBD,因此其对靶向LBD的治疗(如恩杂鲁胺和阿比特龙)具有耐受性。

[0009] 与雄激素敏感的患者样本相比,在CRPC患者样本中还观察到AR变异体被上调。因此,AR变异体与前列腺癌进展以及对AR靶向治疗的耐受性有关。已观察到,在不存在雄性激素时,某些AR变异体诱导ARE-驱动的报道基因发生配体非依赖型激活,这表明,与全长AR相比,那些变异体可能具有不同的转录程序。某些AR变异体可能与全长AR相互作用,使得全长AR可以介导AR变异体的活性。

[0010] 白细胞介素-6(IL-6)是一种多效性细胞因子,其在宿主防御机制中发挥中心作用。IL-6的生物活性由IL6受体介导,IL6受体由IL6特异性受体亚基和信号转导蛋白gp130组成。IL-6和其受体的结合导致几种细胞内信号级联的激活,包括JAK-STAT和MAPK通路。IL-6的产生与某些人类癌症中的肿瘤发展相关,例如,卵巢癌和前列腺癌。IL-6的血清水平,在许多患有晚期的激素抵抗的前列腺癌的男子中是上升的,并且与疾病进展和预后不良相关。IL-6还调节许多参与雄激素合成的类固醇生成酶的编码基因的表达。自分泌IL-6促进在前列腺癌细胞中发生不依赖于雄激素的生长。组成型激活的STAT3是正向的自分泌IL-6循环的一部分,而在与免疫细胞相邻的肿瘤侵袭前沿,可观察到人类肿瘤中STAT3的激活,这可能意味着STAT3依赖性肿瘤发生是由IL-6介导的。

[0011] 一些报告提示,氯硝柳胺对癌细胞是有效的,但对正常细胞的活力的影响甚微

(Pan JX等,Chin J Cancer,31(4):178-184;Lu W等,PLoS One;6(12):e29290;Park SJ等,BMB Rep;44(8):517-522;Osada T等,Cancer Res;71(12):4172-4182.36;Jin Y等,Cancer Res;10(6):2516-2527;Guo Z等,Cancer Research 2009;69(6):2305-2313)。其他报告提示,氯硝柳胺靶向多种信号通路,如STAT3、核转录因子- κ B(NF- κ B),Wnt/ β -连环蛋白和Notch通路(Yo YT等,Mol Cancer Ther;11(8):1703-1712)。氯硝柳胺也被报道,可在体内和体外抑制肿瘤细胞转移和迁移(Helfman DM.J Natl Cancer Inst;103(13):991-992;Sack U等,J Natl Cancer Inst;103(13):1018-1036)。

[0012] 目前需要新的治疗CRPC患者和抗雄激素药物耐受的前列腺癌患者的组合物和方法。出人意料的是,本发明(部分)提供了新的用于治疗这些患者以及抑制前列腺癌细胞生长的组合物和方法。本发明还提供了用于解决本领域其它问题的几个其它方案。

[0013] 发明概述

[0014] 在一个方面,本发明提供了一种组合物,它包含AR-V7抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。所述的组合物可以是药物组合物,且包括药学上可接受的赋形剂或稀释剂。在一些实施例中,AR-V7抑制剂的量是有效提高选自下组的化合物治疗效果的量:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、及其组合。在一些实施例中,所述组合物还包括AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,所述组合物用于给需要治疗前列腺癌的患者口服给药。在一些实施例中,AR-V7抑制剂为氯硝柳胺。

[0015] 在第二方面,本发明提供了一种组合物,它包含AKR1C3抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。所述组合物可以是药物组合物,其包括药学上可接受的赋形剂或稀释剂。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂的量是有效提高选自下组的化合物的治疗效果的量:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、及其组合。在一些实施例中,所述组合物进一步包括AR-V7抑制剂。在一些实施例中,所述组合物用于给需要治疗前列腺癌的患者口服给药。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂是吡啶美辛。

[0016] 在第三方面,本发明提供了一种治疗患者的前列腺癌的方法,所述方法包括对患者施用有效量的AR-V7抑制剂,如氯硝柳胺。在一些实施例中,AR-V7抑制剂的施用包括口服给药。

[0017] 在第四方面,本发明提供了一种减少,逆转,或再致敏对于抗雄性激素药物或多西紫杉醇耐受的前列腺癌细胞的方法,它包括将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂,如氯硝柳胺,进行接触。

[0018] 在第五方面,本文提供了一种提高抗雄激素药物或多西紫杉醇在前列腺癌患者中的治疗效果的方法,它包括:对需要抗雄激素药物的患者施用有效量的AR-V7抑制剂或AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,所述方法包括给患者联合施用有效量的AR-V7抑制剂和有效量的AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,所述前列腺癌选自下组:去势抵抗性前列腺癌,转移性去势抵抗性前列腺癌,晚期前列腺癌,耐药前列腺癌如抗雄激素耐受的前列腺癌(例如,恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌),多西紫杉醇耐受的前列腺癌,AR-V7诱导的耐药的前列腺癌(如AR-V7诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),AKR1C3诱导的耐药的前列腺癌(如AKR1C3-诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),及其组合。在一些实施例中,AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),或AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛),是口服给药的。在一些实施例中,AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛),是

联合口服给药的。

[0019] 在一些实施例中,所述治疗包括:逆转或减少前列腺癌细胞对于抗雄激素药物的耐受和/或使得前列腺癌细胞对于抗雄激素药物再致敏。在一些实施例中,所述抗雄激素药物为选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述治疗包括逆转或减少前列腺癌细胞对多西紫杉醇的耐受和/或使得前列腺癌细胞对于多西紫杉醇再致敏。

[0020] 在一些实施例中,所述施用包括联合施用AR-V7抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述施用包括联合施用AKR1C3抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述施用包括联合施用AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,AR-V7抑制剂为氯硝柳胺。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂为吡啶美辛。

[0021] 在第六方面,本发明提供了一种抑制雄激素受体(AR)变异体的方法,它包括:使AR变异体与一定量的AR变异体抑制剂进行接触。在一些实施例中,AR变异体抑制剂是AR-V7抑制剂,如氯硝柳胺。在某些实施例中,本发明提供了一种抑制细胞中AR变异体的方法,它包括:将细胞与有效量的氯硝柳胺进行接触。在一些实施例中,AR变异体为AR-V7。在一些实施例中,所述抑制包括抑制AR变异体的反式激活,抑制AR变异体的表达,抑制AR变异体诱导的细胞迁移,抑制AR变异体诱导的前列腺癌的侵袭,抑制前列腺癌细胞克隆形成,抑制AR变异体被募集到前列腺特异性抗原(PSA)启动子,及其组合。在一些实施例中,所述细胞为前列腺癌细胞。

[0022] 在第七方面,本发明提供了一种试剂盒,它包含AR变异体抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述AR变异体抑制剂为AR-V7抑制剂。在一些实施例中,所述AR-V7抑制剂为氯硝柳胺。

[0023] 在第八方面,本发明提供了一种抑制STAT3的方法,它包括:将AR-V7抑制剂如氯硝柳胺与STAT3进行接触。

[0024] 在第九方面,本发明提供了一种治疗患者的前列腺癌的方法,它包括:给患者施用有效量的AR-V7抑制剂或有效量的AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,所述方法包括给患者联合施用有效量的AR-V7抑制剂和有效量的AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,所述前列腺癌选自下组:去势抵抗性前列腺癌,转移性去势抵抗性前列腺癌,晚期前列腺癌,耐药前列腺癌如抗雄性激素耐受的前列腺癌(例如,恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌),多西紫杉醇耐受的前列腺癌,AR-V7诱导的耐药的前列腺癌(如AR-V7诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),AKR1C3诱导的耐药的前列腺癌(如AKR1C3诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),及其组合。

[0025] 在一些实施例中,所述治疗包括:逆转或减少前列腺癌细胞对于抗雄激素药物的耐受和/或使得前列腺癌细胞对于抗雄激素药物再致敏。在一些实施例中,所述抗雄激素药物为选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述治疗包括:逆转或减少前列腺癌细胞对多西紫杉醇的耐受和/或使得前列腺癌细胞对于多西紫杉醇再致敏。

[0026] 在一些实施例中,所述施用包括:联合施用AR-V7抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述施用包括:联合

施用AKR1C3抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂为呋喹美辛。在一些实施例中,AR-V7抑制剂为氯硝柳胺。在一些实施例中,AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如呋喹美辛),是口服给药的。在一些实施例中,AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如呋喹美辛),是联合口服给药的。

[0027] 在第十方面,本发明提供了一种减少或逆转前列腺癌对前列腺癌药物的耐受性的方法,它包括:将前列腺细胞与AR-V7抑制剂或AKR1C3抑制剂进行接触。在一些实施例中,所述方法包括:将前列腺细胞与AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂进行接触。在一些实施例中,所述前列腺癌药物是抗雄激素药物。在一些实施例中,所述抗雄激素药物为选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述前列腺癌药物是多西紫杉醇。在一些实施例中,所述AKR1C3抑制剂是呋喹美辛。在一些实施例中,所述AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。在一些实施例中,所述减少或逆转前列腺癌细胞对前列腺癌药物的耐受,包括使前列腺癌细胞对于前列腺癌药物变得再次敏感(再致敏)。

[0028] 在一些实施例中,所述减少或逆转前列腺癌细胞对前列腺癌药物的耐受,是减少或逆转前列腺癌患者中前列腺癌细胞对前列腺癌药物的耐受。在一些实施例中,通过给患者口服施用AR-V7或AKR1C3抑制剂,使得AR-V7抑制剂或AKR1C3抑制剂与前列腺癌细胞接触。在一些实施例中,AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂是联合口服给药的。在一些实施例中,前列腺癌选自下组:去势抵抗性前列腺癌,转移性去势抵抗性前列腺癌,晚期前列腺癌,耐药前列腺癌如抗雄激素耐受的前列腺癌(例如,恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌),多西紫杉醇耐受的前列腺癌、AR-V7诱导的耐药的前列腺癌(如AR-V7诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),AKR1C3-诱导的耐药的前列腺癌(如AKR1C3-诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),及其组合。

[0029] 在第十一方面,本发明提供了一种在前列腺癌患者中增强前列腺癌药物的治疗效果的方法,它包括:给需要前列腺癌治疗的患者施用有效量的AR-V7抑制剂或有效量的AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,该方法包括:给需要前列腺癌治疗的患者联合施用有效量的AR-V7抑制剂和有效量的AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,被增效的前列腺癌药物选自下组:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。

[0030] 在一些实施例中,被增效的前列腺癌药物是抗雄激素药物。在一些实施例中,抗雄激素药物选自下组:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂是呋喹美辛。在一些实施例中,AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。在一些实施例中,前列腺癌选自下组:去势抵抗性前列腺癌,转移性去势抵抗性前列腺癌,晚期前列腺癌,耐药前列腺癌如抗雄激素耐受的前列腺癌(例如,恩杂鲁胺耐受的前列腺癌,阿比特龙耐受的前列腺癌,比卡鲁胺耐受的前列腺癌),多西紫杉醇耐受的前列腺癌,AR-V7诱导的耐药前列腺癌(如AR-V7诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),AKR1C3-诱导的耐药前列腺癌(如AKR1C3诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),及其组合。在一些实施例中,AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),或AKR1C3抑制剂(如呋喹美辛),是口服给药的。在一些实施例中,AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如呋喹美辛),是联合口服给药的。

[0031] 在第十二方面,本发明提供了一种试剂盒,它包括AR-V7抑制剂或AKR1C3抑制剂,和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺,及其组合。在一些实施

例中,所述试剂盒包括描述施用AR-V7抑制剂的方法的标签。例如,所述标签可以描述AR-V7抑制剂的口服给药。在一些实施例中,所述试剂盒包括描述施用AKR1C3抑制剂的方法的标签。例如,所述标签可以描述AKR1C3抑制剂的口服给药。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂是吡咯美辛。在一些实施例中,AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。在一些实施例中,AR-V7抑制剂或AKR1C3抑制剂用于对需要前列腺癌治疗的患者口服给药。在一些实施例中,AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂用于对需要前列腺癌治疗的患者口服给药。

[0032] 在第十三方面,本发明提供了一种包含AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂的组合物。在一些实施例中,所述组合物进一步包含抗雄激素药物。例如,所述抗雄激素药物可以是选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述组合物进一步包含选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺,及其组合。在一些实施例中,AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂以有效提高一个或多个上述其他化合物的治疗效果的量存在。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂是吡咯美辛。在一些实施例中,AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。在一些实施例中,所述组合物用于口服给药。在某些情况下,所述组合物还包括药学上可接受的赋形剂。

[0033] 在第十四方面,本发明提供了一种治疗前列腺癌的方法,所述方法包括对前列腺癌患者施用AR-V7抑制剂,以及给所述患者依次或同时施用AKR1C3抑制剂。在一些实施例中,前列腺癌选自下组:去势抵抗性前列腺癌,转移性去势抵抗性前列腺癌,晚期前列腺癌,耐药前列腺癌如抗雄激素耐受的前列腺癌(例如,恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌),多西紫杉醇耐受的前列腺癌、AR-V7诱导的耐药前列腺癌(如AR-V7诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),AKR1C3诱导的耐药前列腺癌(如AKR1C3诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌),及其组合。在一些实施例中,AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂在同一组合物中。在一些实施例中,AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂在不同的组合物中。在一些实施例中,所述方法还包括施用抗雄激素药物。例如,所述抗雄激素药物可以是选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述方法还包括对患者施用选自下组的药物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,AR-V7抑制剂或AKR1C3抑制剂是口服给药的。在一些实施例中,AR-V7抑制剂和AKR1C3抑制剂是联合口服给药的。在一些实施例中,AR-V7抑制剂是氯硝柳胺。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂是吡咯美辛。

[0034] 在第十五方面,本发明提供了一种抑制细胞中醛酮还原酶1C3(AKR1C3)的方法,它包括:将细胞与有效量的吡咯美辛进行接触。在一些实施例中,所述抑制包括:抑制AKR1C3的表达,抑制AKR1C3的活性,或其组合。在一些实施例中,所述细胞是前列腺癌细胞。

[0035] 本发明的其他目的、特征和优点是本领域的技术人员从如下详细描述和附图中可以明显得出的。

[0036] 附图简述

[0037] 图1显示了在前列腺癌细胞中AR-V7是组成型激活。图1A显示了LNCaP、C4-2、CWR22rv1,和VCaP细胞在CS-FBS条件下培养3天的结果。通过qRT-PCR分析AR-V7mRNA水平。结果以重复进行的3个实验的平均值±SD呈现。图1B显示了LNCaP、C4-2、CWR22rv1,和VCaP细胞在CS-FBS条件下培养3天的结果。提取全细胞蛋白并通过所示抗体进行免疫印迹。图1C显示了C4-2细胞在CS-FBS条件下培养并通过EGFP-AR-V7质粒瞬时转染3天的结果。显微镜

下观察单个细胞的荧光强度。图1D显示了PC3细胞在CS-FBS条件下培养并通过WT-AR或AR-V7质粒瞬时转染3天后,再用10nM DHT处理24小时的结果。对全细胞裂解液进行荧光素酶检测。图1E显示了LNCaP细胞在CS-FBS条件下培养并通过载体或AR-V7质粒瞬时转染3天后,再用10nM DHT处理24小时的结果。对全细胞裂解液进行荧光素酶检测。图1F显示了C4-2neo和C4-2AR-V7稳定克隆在CS-FBS条件下培养的结果。通过qRT-PCR确定AR-V7 mRNA水平,采用免疫印迹试验(板内)检测AR-V7表达。图1G显示了C4-2neo和C4-2AR-V7稳定克隆在CS-FBS条件下培养3天的结果。通过qRT-PCR确定PSA mRNA水平。图1H显示了在CS-FBS中培养3天后通过PSA ELISA测定的PSA蛋白水平。结果以重复进行的3个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。 $*P<0.05$ 。

[0038] 图2显示了氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞的生长和诱导细胞凋亡。图2A:C4-2neo、C4-2AR-V7、CWR22rv1和PZ-HPV7细胞在含FBS的培养基中经0.5 μ M氯硝柳胺处理。48小时后计数细胞数和计算细胞存活率。图2B:C4-2neo、C4-2AR-V7、CWR22rv1和PZ-HPV7细胞在含FBS的培养基中经0.5 μ M氯硝柳胺处理。48小时后通过细胞死亡ELISA来检测细胞凋亡。图2C:CWR22rv1细胞经0、0.5 μ M或1.0 μ M氯硝柳胺处理,然后进行克隆形成测试。图2D:计数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。氯硝柳胺以剂量依赖方式抑制克隆形成。 $*P<0.05$ 。

[0039] 图3显示了氯硝柳胺通过提高蛋白降解来抑制AR-V7蛋白表达。图3A:CWR22rv1细胞在含10%FBS条件的RPMI 1640培养基中经0 μ M、0.5 μ M或1.0 μ M氯硝柳胺处理过夜,然后对全细胞裂解物通过所示抗体进行免疫印迹。图3B:CWR22rv1细胞在含10%FBS条件的RPMI 1640培养基中经1.0 μ M氯硝柳胺处理,在不同时间点提取全细胞裂解物并通过所示抗体进行免疫印迹。图3C:CWR22rv1细胞在含10%FBS条件的RPMI 1640培养基中经0 μ M、0.5 μ M或1.0 μ M氯硝柳胺处理过夜,提取总RNAs并通过qRT-PCR分析AR或AR-V7的mRNA水平。图3D:在0小时加入蛋白合成抑制剂50 μ g/ml放线菌酮(CHX)以及添加或不添加2 μ M氯硝柳胺(Nic)。在特定的时间点收获细胞,并通过免疫印迹试验使用AR-V7特异性抗体来测定AR-V7蛋白水平。图3E显示了MG132对氯硝柳胺诱导的AR蛋白降解的影响。在存在和不存在2 μ M氯硝柳胺下,将MG132(5 μ mol/L)和放线菌酮(50 μ g/ml)加到CWR22rv1细胞。在8小时制备细胞裂解液。通过免疫印迹分析,使用AR-V7特异性抗体并使用微管蛋白作为对照来测定AR-V7蛋白水平。

[0040] 图4显示了氯硝柳胺抑制AR-V7的转录活性。图4A:293-AR-V7-PSA荧光素酶启动子稳定克隆,在含10%FBS或10%CS-FBS的培养基中经1.0 μ M氯硝柳胺或20 μ M恩杂鲁胺处理过夜,对全细胞裂解液进行荧光素酶检测。图4B:LNCaP细胞通过PSA荧光素酶启动子和AR-V7质粒在CS-FBS条件下共转染24小时,接着用1.0 μ M氯硝柳胺或20 μ M恩杂鲁胺处理过夜,对全细胞裂解液进行荧光素酶检测。图4C:C4-2AR-V7稳定细胞,通过细胞PSA荧光素酶启动子在CS-FBS条件下转染24小时,接着用0.5 μ M、1.0 μ M氯硝柳胺或20 μ M恩杂鲁胺并在有或无1nM DHT存在下处理过夜,对全细胞裂解液进行荧光素酶检测。图4D:C4-2neo和C4-2AR-V7细胞在CS-FBS条件下培养3天,然后经1.0 μ M氯硝柳胺或20 μ M恩杂鲁胺处理过夜,收集上清液并进行PSA ELISA。结果以重复进行的3个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。 $*P<0.05$ 。

[0041] 图5显示了经恩杂鲁胺长期处理的C4-2B细胞表达AR变体并对氯硝柳胺敏感。图5A:C4-2B亲本细胞在含10%FBS条件的RPMI 1640培养基中经20 μ M恩杂鲁胺处理,在指定的不同天数计算总细胞数。图5B:C4-2B MR细胞在含10%FBS条件的RPMI 1640培养基中经

20 μ M恩杂鲁胺处理,在指定的不同天数计算总细胞数。图5C:C4-2B亲本细胞和C4-2B MR细胞在含10%FBS的RPMI 1640培养基中培养3天,提取总RNAs,经qRT-PCR分析AR-V1、AR-V7、AR1/2/2b、AR1/2/3/2b或AR全长mRNA的水平。图5D:C4-2B亲本细胞和C4-2B MR细胞在含10%FBS的RPMI1640培养基中培养3天,通过所示抗体对全细胞裂解液进行免疫印迹。图5E:C4-2B亲本细胞和C4-2B MR细胞在含10%CS-FBS的培养基中培养3天,收获细胞,制备胞浆和核组分,并通过免疫印迹试验使用针对AR-V7、AR、聚合酶I I或微管蛋白的抗体对细胞进行分析。聚合酶II和微管蛋白的表达被分别用作核和胞浆组分完整性的标记。图5F:C4-2B MR细胞在含10%FBS的培养基中培养,并经指定的不同浓度的恩杂鲁胺或氯硝柳胺处理,48小时后,计数总细胞数。图5G:C4-2B MR细胞经0、0.5 μ M或1.0 μ M氯硝柳胺处理并进行克隆形成测试。图5H:计算克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现,氯硝柳胺以剂量依赖方式抑制克隆形成。 $*P<0.05$ 。

[0042] 图6显示了氯硝柳胺提高了恩杂鲁胺和阿比特龙在前列腺癌细胞中的效果。图6A:CWR22rv1细胞在含FBS的培养基中,用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺的条件下进行处理,3天和5天后计数细胞数。图6B:CWR22rv1细胞在含FBS的培养基中,用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M阿比特龙条件下进行处理,3天和5天后计数细胞数。结果以重复进行的3个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。图6C:CWR22rv1细胞在含FBS的培养基中用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺或20 μ M阿比特龙的条件下进行处理,并进行克隆形成测试。图6D:计数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。图6E:C4-2B MR细胞在含FBS的培养基中用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺的条件下进行处理,3天和5天后计数细胞数。图6F:C4-2B MR细胞在含FBS的培养基中用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺条件下进行处理,并进行克隆形成测试。图6G:计数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。 $*P<0.05$ 。

[0043] 图7显示了氯硝柳胺通过对AR-V7的抑制提高了恩杂鲁胺和阿比特龙的效果。图7A:CWR22rv1细胞在含FBS的培养基中用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺或20 μ M阿比特龙的条件下进行处理,48小时后提取全细胞裂解液,并进行免疫印迹。图7B:C4-B MR细胞在含FBS的培养基中用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺的条件下进行处理,48小时后提取全细胞裂解液,并进行免疫印迹。

[0044] 图8显示了用AR-V7-PSA启动子荧光素酶构建物稳定转染的293细胞,从Prestwick化学库中筛选候选的针对AR-V7的化合物。图8A:CWR22rv1,293和293GFP AR-V7-PSA启动子荧光素酶稳定克隆,在含10%FBS的培养基中培养2天。制备全细胞裂解液并使用指定抗体进行免疫印迹分析。图8B:293GFP AR-V7-PSA启动子荧光素酶稳定克隆,在含10%FBS的培养基中培养2天,在显微镜下观察单个细胞的荧光强度,箭头显示了AR-V7蛋白表达的一个例子。图8C:293neo和293GFP AR-V7-PSA启动子荧光素酶稳定克隆,在含10%FBS的培养基中培养2天,分离总RNA,通过qRT-PCR确定AR全长和AR-V7mRNA的水平。图8D:不同的细胞数的293neo和293GFP AR-V7-PSA启动子荧光素酶稳定克隆,在含10%FBS的培养基中培养2天,对全细胞裂解液进行荧光素酶测试。结果以重复进行的3个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。图8E显示了化合物筛选过程的示意图。 $*P<0.05$ 。

[0045] 图9显示了将AR-V7募集到PSA启动子不能被恩杂鲁胺中断。图9A:LNCaP细胞通过AR-V7质粒与PSA-E/P-luc或AREI/II-luc,在CS-FBS条件下共转染3天,接着用10nM DHT并

在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺条件下处理过夜,对全细胞裂解液进行荧光素酶测试。图9B:C4-2neo和C4-2AR-V7细胞在CS-FBS条件下培养3天,接着经10nMDHT并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺条件下处理过夜,对全细胞裂解液进行ChIP测试。结果以重复进行的3个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。

[0046] 图10显示了AR-V7介导CWR22rv1细胞的细胞生长。图10A:用对照siRNA、AR外显子7(exon7)siRNA或AR-V7siRNA,在CS-FBS条件下瞬时转染CWR22rv1细胞,在不同天数计数细胞数量。图10B:用对照siRNA、AR外显子7siRNA或AR-V7siRNA,在CS-FBS条件下瞬时转染CWR22rv1细胞3天,通过免疫印迹试验检测基因表达减少(knock-down)的效果。结果以重复进行的3个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。 $*P<0.05$ 。

[0047] 图11显示了AR-V7在CWR22rv1细胞中诱导阿比特龙耐药。图11A:CWR22rv1、C4-2B和LNCaP细胞在含10%FBS条件的RPMI 1640培养基中培养,然后经不同剂量的阿比特龙处理,48小时后计数总细胞数并计算细胞存活率。图11B:CWR22rv1细胞在FBS中用对照siRNA、AR外显子7siRNA、AR-V7siRNA或AR外显子7siRNA加AR-V7siRNA进行瞬态转染,然后经10 μ M阿比特龙处理,48小时后计数总细胞数并计算细胞存活率。结果以重复进行的3个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。 $*P<0.05$ 。

[0048] 图12显示了用于确定氯硝柳胺作为AR-V7抑制剂的药物筛选过程的示意图。

[0049] 图13显示了表明氯硝柳胺抑制AR-V7的反式激活的图表。

[0050] 图14显示了氯硝柳胺抑制AR-V7的反式激活但比卡鲁胺不抑制AR-V7的反式激活的图表。

[0051] 图15显示了表明氯硝柳胺抑制AR和AR-V7表达的图表。

[0052] 图16说明了氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞的细胞迁移和侵袭。

[0053] 图17说明了氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞的细胞侵袭。

[0054] 图18说明了氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞的克隆形成。

[0055] 图19显示了氯硝柳胺按剂量依赖方式抑制C4-2B MR细胞生长。

[0056] 图20显示了联合处理抑制了将AR募集到PSA启动子。

[0057] 图21显示了联合处理抑制了C4-2B、C4-2BTAXR、C4-2BTAXR+MR和C4-2B AbiR的细胞生长。

[0058] 图22显示了氯硝柳胺增强了恩杂鲁胺在C4-2B MR细胞中的效果。

[0059] 图23显示了氯硝柳胺增强了阿比特龙在C4-2B AbiR细胞中的效果。

[0060] 图24显示了LNCaP-s17细胞与DMSO、恩杂鲁胺、氯硝柳胺、以及恩杂鲁胺和氯硝柳胺的组合一起孵育的结果。

[0061] 图25显示了LNCaP-STAT3C细胞用DMSO、恩杂鲁胺、氯硝柳胺、恩杂鲁胺和氯硝柳胺的组合一起孵育的结果。

[0062] 图26显示了IL-6的过表达增加了LNCaP细胞对恩杂鲁胺的耐受。图26A:稳定表达IL6的LNCaP细胞(LNCaP-S17)和对照LNCaP细胞(LNCaP-neo),在含完全FBS的培养基中采用不同剂量的恩杂鲁胺进行处理,并在48小时后计数细胞数。结果以重复进行的三个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。图26B:LNCaP-neo和LNCaP-S17细胞,用0或20 μ M恩杂鲁胺进行处理,并进行克隆生成试验。图26C:计数克隆并以重复进行的2个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。当用恩杂鲁胺处理时,与LNCaP-neo相比,LNCaP-S17细胞形成更高的克隆数。图26D:LNCaP-IL6+细胞

(在含10%FBS和5ng/mL IL-6的培养基中连续培养)和对照LNCaP细胞,在含完全FBS的培养基中用0、10或20 μ M恩杂鲁胺处理,并在48小时后计数细胞数。结果以重复进行的3个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。 $*P<0.05$ 。

[0063] 图27显示了自分泌IL-6组成型激活STAT3通路,并在前列腺癌细胞中提高雄激素受体的反式激活。图27A:带有自分泌IL-6的前列腺癌细胞组成型激活STAT3。LNCaP细胞和LNCaP-s17细胞在FBS条件下培养24小时,并且裂解物用所示的抗体进行免疫印迹。与LNCaP-neo细胞相比,LNCaP-s17细胞表达高水平的c-Myc(图27B)、生存素(图27C)、IL-6mRNA(图27D)和蛋白质(图27E)。通过qRT-PCR分析了LNCaP-neo和LNCaP-S17细胞的总RNA。结果以重复进行的3个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。图27F:通过ChIP试验分析了AR被募集到PSA启动子中的AREs情况。与LNCaP-neo细胞相比,LNCaP-S17和LNCaP-STAT3C细胞增强了将AR募集到PSA启动子的募集情况。

[0064] 图28显示了,下调STAT3的表达恢复了LNCaP-s17细胞对恩杂鲁胺处理的敏感性。图28A:下调STAT3的表达增加了LNCaP-S17细胞对恩杂鲁胺的敏感性。LNCaP-s17细胞用STAT3特异性siRNA或对照siRNA转染并经0或20 μ M恩杂鲁胺处理。3天后计数细胞数。图28B:收集全细胞裂解物并进行蛋白印迹。结果以重复进行的3个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。图28C:LNCaP-neo和LNCaP-STAT3C细胞,用DMSO、10或20 μ M恩杂鲁胺在含FBS的培养基中处理48小时,并计数细胞数。结果以重复进行的3个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。图28D:通过ChIP试验分析了将AR募集到PSA启动子中的AREs的募集情况。LNCaP-neo、LNCaP-S17和LNCaP-STAT3C细胞在FBS条件下并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺条件下培养过夜,与1%的甲醛进行交联,并对得到的DNA-蛋白质复合物进行ChIP试验。 $*P<0.05$ 。

[0065] 图29显示了一种新型的STAT3抑制剂-氯硝柳胺,其在前列腺癌细胞中逆转恩杂鲁胺耐受。图29A给出了氯硝柳胺的化学结构。图29B:氯硝柳胺在LNCaP-s17细胞中以剂量依赖方式抑制组成型激活的STAT3。图29C:LNCaP-s17细胞用0.25 μ M、0.5 μ M氯硝柳胺或10 μ MAG490并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺的条件下在含FBS的培养基中进行处理,48小时后计数细胞数。图29D:通过细胞死亡ELISA分析细胞凋亡。结果以重复进行的3个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。图29E:LNCaP-s17细胞经0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺条件下在含FBS的培养基中进行处理,在2、4和7天后计数细胞数量。结果以重复进行的3个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。图29F:通过克隆形成测试检测克隆形成能力,LNCaP-s17细胞经0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺条件下进行处理,在10cm板中铺板同等数量的细胞,3周后用0.5%结晶紫染色克隆,并计数克隆数。

[0066] 图30显示了C4-2neo和C4-2AR-V7细胞在CS-FBS条件下培养3天,接着经1.0 μ M氯硝柳胺或20 μ M恩杂鲁胺处理过夜。用指定的抗体对全细胞裂解液进行免疫印迹。

[0067] 图31显示了C4-2AR-V7细胞在CS-FBS条件下培养3天,接着经0.5 μ M、1.0 μ M氯硝柳胺或20 μ M恩杂鲁胺处理过夜。对全细胞裂解液进行ChIP试验。结果以重复进行的3个试验的平均值 $\pm$ SD呈现。 $*P<0.05$ 。

[0068] 图32显示了与未处理的对照细胞比较,氯硝柳胺增加了AR-V7蛋白的降解。在半对数表上绘制AR-V7蛋白的相对数量。在0时间,AR-V7蛋白数量被标准化至100%,虚线表示50%半衰期。

[0069] 图33显示了与0、0.5和1.0 μ M氯硝柳胺一起培养的CWR22rv1、C4-2R-V7和C4-2neo

细胞。氯硝柳胺在此图中显示出以剂量依赖方式显著抑制前列腺癌细胞的克隆形成能力。

[0070] 图34显示了与0、0.5和1.0 μ M氯硝柳胺一起培养的CWR22rv1、C4-2R-V7和C4-2neo细胞的克隆数对氯硝柳胺浓度的图。计数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。

[0071] 图35显示了氯硝柳胺而非恩杂鲁胺抑制C4-2B MR细胞中的克隆形成以及克隆大小。C4-2B MR细胞用DMSO、10 μ M或20 μ M恩杂鲁胺、0.5 μ M或1.0 μ M氯硝柳胺处理,并进行克隆形成测试。

[0072] 图36显示了克隆数对恩杂鲁胺浓度、氯硝柳胺浓度和对照DMSO的图,该图显示氯硝柳胺而非恩杂鲁胺抑制了C4-2B MR细胞中的克隆形成和克隆大小。计数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。氯硝柳胺以剂量依赖方式抑制克隆形成。 $*P<0.05$ 。

[0073] 图37显示了经氯硝柳胺或经氯硝柳胺和恩杂鲁胺处理48小时的CWR22rv1细胞的克隆形成测试的结果。CWR22rv1细胞或C4-2B MR细胞在含FBS的培养基中用0.25 μ M氯硝柳胺并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺条件下进行处理,并进行克隆形成测试。

[0074] 图38显示了经DMSO、恩杂鲁胺、氯硝柳胺、或氯硝柳胺和恩杂鲁胺联合处理的CWR22rv1细胞的克隆形成测试结果的克隆数图。计数CWR22rv1和C4-2BMR克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。

[0075] 图39显示了一个体内研究中的肿瘤体积对时间(天数)的图,其中用载体、恩杂鲁胺、氯硝柳胺、或其组合处理由CWR22rv1细胞产生的异种移植物。带有CWR22rv1异种移植物的鼠用载体对照、恩杂鲁胺、氯硝柳胺或其组合处理3周,每周两次测量肿瘤体积并采集肿瘤。 $*P<0.05$ 。

[0076] 图40显示了氯硝柳胺(通过口服氯硝柳胺给药)对CWR22rv1异种移植物模型的肿瘤生长的影响。CWR22rv1细胞(400万)与基质胶(1:1)混合,皮下注射到雄性SCID小鼠的侧部。荷瘤小鼠(肿瘤体积约50-75 mm^3)按以下方式每周处理5天:对照(含5%PGE8000的水,口服,每天二次),氯硝柳胺(200mg/kg,口服,每天二次)。一周两次用卡尺测量肿瘤,使用长度 $\times$ 宽度 $^2/2$ 计算肿瘤体积。处理后3周收集肿瘤组织。 $*P<0.05$ 。

[0077] 图41显示了比卡鲁胺与氯硝柳胺的联用对CWR22rv1细胞的体外作用。图41A:氯硝柳胺与比卡鲁胺的联用以剂量依赖的方式在体外抑制肿瘤生长。图41B:氯硝柳胺与比卡鲁胺的联用以时间依赖方式在体外抑制肿瘤生长。 $*P<0.05$ 。

[0078] 图42显示了氯硝柳胺与比卡鲁胺联用下的CWR22rv1异种移植模型。CWR22rv1细胞(400万)与基质胶(1:1)混合,皮下注射到雄性SCID小鼠的侧部。荷瘤小鼠(肿瘤体积约50-75 mm^3)按以下方式每周处理5天:对照:(0.5%重量/体积(w/v)Methocel A4M,口服;和含5%吐温80和5%乙醇的PBS,腹腔内给药),比卡鲁胺(25mg/kg,口服)、氯硝柳胺(25mg/kg,腹腔内给药)和组合给药(25mg/kg比卡鲁胺,口服+25mg/kg氯硝柳胺,腹腔给药)。一周两次用卡尺测量肿瘤,使用长度 $\times$ 宽度 $^2/2$ 计算肿瘤体积。处理后3周收集肿瘤组织。 $*P<0.05$ 。

[0079] 图43显示了C4-2B MDVR细胞在体外和体内对恩杂鲁胺是耐药的。图43A:C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞用不同浓度的恩杂鲁胺处理48小时,计数总细胞数并计算细胞存活率。图43B:分析了用10 μ M或20 μ M恩杂鲁胺处理的C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞的克隆形成能力。恩杂鲁胺显著抑制C4-2B亲本细胞的克隆形成能力。图43C:C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞被原位注射到SCID小鼠的前列腺内并用25mg/Kg恩杂鲁胺或载体对照进行处理。3周时

收集肿瘤并称重。图43D:LNCaP、LN-95和CWR22Rv1细胞经不同浓度恩杂鲁胺处理2天,计数总细胞数并计算细胞存活率(%)。* $p < 0.05$ 。

[0080] 图44显示了在恩杂鲁胺耐药的前列腺癌细胞中,胞内分泌雄激素合成途径是激活的。图44A:通过基因集富集分析了与类固醇激素生物合成相关的转录本编码基因的表达情况。在C4-2B亲本细胞和C4-2B MDVR细胞之间被调控达1.3倍的基因被富集,并通过Subio平台生成热图(heat map)。图44B:C4-2B亲本细胞和C4-2B MDVR细胞在含10%FBS的RPMI 1640培养基中培养3天,提取总RNA,并通过qRT-PCR分析了CYP17A1、HSD3B1、HSD3B2、HSD17B3、SRD5A1、AKR1C1/2或AKR1C3的mRNA水平。AKR1C3、HSD3B和CYP17A1的蛋白水平通过免疫印迹试验进行检测(右图)。

[0081] 图45显示了AKR1C3在转移性前列腺肿瘤和恩杂鲁胺耐药的异种移植物中高表达。图45A:采集C4-2B亲本、C4-2B MDVR、VCaP、CWR22Rv1、LNCaP和LN-95细胞,并对全裂解液进行免疫印迹试验。图45B:通过IHC染色分析C4-2B亲本、C4-2B MDVR和CWR22Rv1异种移植物中的AKR1C3表达水平。图45C:使用Oncomine数据库的基因表达分析,其中显示AKR1C3在比较了正常前列腺组织和前列腺癌的两个数据集中的相对表达水平。Vana ja: 正常, $n = 8$; 癌症, $n = 32$; Singh: 正常, $n = 50$; 癌症, $n = 52$ 。数据以根据Oncomine输出值的归一化表达单位的平均值 $\pm$ S.E.显示(上图)。AKR1C3基因表达分析,使用GEO数据库在两个数据集中比较了良性、原发或转移前列腺癌。GSE27616: 良性, $n = 4$; 原发性前列腺癌, $n = 5$; 和转移前列腺癌, $n = 4$; GSE32269: 原发性前列腺癌, $n = 22$; 和转移前列腺癌, $n = 29$ 。提取数据并通过Subio平台进行分析(下图)。图45D:使用Oncomine数据库的基因表达分析表明,AKR1C3表达与两个独立的数据集(Glinsky和Singh前列腺)中的前列腺癌进展和复发是相关的。

[0082] 图46显示了在恩杂鲁胺耐药的前列腺癌细胞中,胞内分泌的雄激素是上调的。图46A:C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞在无血清和无酚红的RPMI 1640培养基中培养5天,细胞提取物中的类固醇水平通过LC-MS进行分析。显示了通过MassLynx 4.1软件生成的代表性的睾酮和雌二醇的图谱。图46B:对C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞中雄激素代谢物水平之间的差异进行了分析和量化。图46C:对C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞之间代表性的类固醇代谢物进行量化。图46D:在恩杂鲁胺耐药的前列腺癌细胞中,雄激素代谢通路是被上调的。

[0083] 图47显示了AKR1C3使前列腺癌细胞产生针对恩杂鲁胺的耐药性。图47A:CWR22Rv1细胞用对照shRNA或AKR1C3shRNA(#561和#694)进行瞬时转染,然后用20 μ M恩杂鲁胺进行处理,并在3天测定细胞数。图47B:C4-2B MDVR细胞用对照shRNA或AKR1C3shRNA(#561和#694)进行瞬时转染,然后用20 μ M恩杂鲁胺进行处理,并在3天测定细胞数。图47C:CWR22Rv1或C4-2B MDVR细胞用对照shRNA或AKR1C3shRNA(#561和#694)进行瞬时转染,在3天或5天采集细胞,对全细胞裂解液进行免疫印迹试验。图47D:LNCaP-neo或LNCaP-AKR1C3细胞经不同浓度恩杂鲁胺处理2天,计数总细胞数并计算细胞存活率(%)。图47E:LNCaP-neo或LNCaP-AKR1C3细胞经10 μ M恩杂鲁胺处理,并进行克隆形成试验,在显微镜下拍摄克隆大小的照片。图47F:计数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现。* $p < 0.05$ 。Enza: 恩杂鲁胺。

[0084] 图48显示了吡啶美辛(一种AKR1C3活性抑制剂)克服了恩杂鲁胺耐药性。图48A:CWR22Rv1细胞用10 μ M或20 μ M吡啶美辛并在存在或不存在20 μ M恩杂鲁胺的条件下处理2天,计数总细胞数(左图),并进行克隆形成试验,在显微镜下拍摄克隆大小照片(中图)。计

数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现(右图)。图48B:C4-2B MDVR细胞用10 μ M或20 μ M 吡哆美辛并在存在或不存在20 μ M 恩杂鲁胺的条件下处理2天,计数总细胞数(左图),并进行克隆形成试验,在显微镜下拍摄克隆大小照片(中图)。计数克隆,结果以重复进行的2个实验的平均值 $\pm$ SD呈现(右图)。图48C:带有CWR22Rv1异种移植物的老鼠,用载体对照、恩杂鲁胺(25mg/Kg,口服)、吡哆美辛(3mg/Kg,腹腔内给药)或其组合进行处理3周,每周两次测量肿瘤体积,收集肿瘤并称重。图48D:在每组中进行Ki67的IHC染色与H/E染色并量化。 $*p<0.05$ 。Enza:恩杂鲁胺。Indocin:吡哆美辛。

[0085] 发明详述

[0086] I. 引言

[0087] 如本文所述,发明人已发现了前列腺癌细胞生长、生存或对某些前列腺癌药物耐药的两种新机制以及用于治疗前列腺癌的方法和组合物。在一些实施例中,前列腺癌细胞的生长、生存或耐药性是由雄激素受体(AR)变体如AR-V7的表达或活性所介导的。因此,本发明提供了AR变体表达或活性的抑制剂。例如,氯硝柳胺是一种新型AR变体抑制剂,它抑制前列腺癌细胞生长并诱导细胞凋亡。氯硝柳胺能对耐药的前列腺癌细胞或肿瘤的生长或生存进行抑制。例如,氯硝柳胺能抑制抗雄激素(例如,恩杂鲁胺)耐药的前列腺癌细胞或肿瘤的生长或生存。此外,氯硝柳胺可表现出与前列腺癌药物的协同效应。例如,氯硝柳胺表现出与抗雄激素化合物(如恩杂鲁胺)的协同效应,并可使耐受治疗的前列腺癌细胞对于前列腺癌的治疗(如抗雄激素(例如,恩杂鲁胺)治疗)再度敏感。因此,AR-V7抑制剂如氯硝柳胺是有效的、可口服的、生物可利用的药物,无论它是作为单独治疗或与目前的前列腺癌疗法(包括抗雄激素疗法)联用,从而用于治疗晚期前列腺癌(如转移性前列腺癌)。

[0088] 在一些实施例中,前列腺癌细胞的生长、生存或耐药是由醛-酮还原酶1C3(AKR1C3)的表达或活性所介导的。因此,本发明提供了一种AKR1C3表达或活性的抑制剂。例如,吡哆美辛是一种AKR1C3抑制剂,它能抑制前列腺癌细胞的生长或生存,或能诱导细胞凋亡。如本文所述,AKR1C3抑制剂能抑制耐药的前列腺癌细胞或肿瘤的生长或生存。例如,AKR1C3抑制剂能抑制抗雄激素(例如恩杂鲁胺)耐药的前列腺癌细胞或肿瘤的生长或生存。此外,AKR1C3抑制剂可表现出与其它前列腺癌治疗的协同效应。例如,AKR1C3抑制剂能表现出与抗雄激素化合物(如恩杂鲁胺)的协同效应,并可使耐受治疗的前列腺癌细胞对于抗雄激素(例如,恩杂鲁胺)治疗再度敏感。因此,AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)是有效的、可口服的、生物可利用的药物,它可作为单独治疗或与目前的前列腺癌疗法(包括抗雄激素疗法)联用,从而用于治疗晚期转移性前列腺癌。

[0089] 本发明提供了新的组合物和新方法,它们用于治疗前列腺癌,例如,抗雄激素耐药的前列腺癌、去势难治性前列腺癌、或其组合。这些新的组合物包括但不限于:含AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),和/或AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)的药物组合物。这些新方法包括但不限于:施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和/或AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)来治疗前列腺癌患者的方法。本发明还提供了抑制雄激素受体变体(如AR-V7)的表达的方法和杀死表达AR-V7的细胞的方法。本发明还提供了抑制AKR1C3的表达或活性的方法和杀死表达AKR1C3的细胞的方法。本发明还提供了提高前列腺癌药物(包括抗雄激素前列腺癌药物)有效性的方法。

[0090] II. 定义

[0091] 如本文所用,除非另有指定,下列术语具有其自身的含义。

[0092] 这里应注意的是,如本说明书和所附权利要求所使用的,单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“所述的(the)”包括复数指代,除非文本另有明确指定。

[0093] 如本文所用,术语“有效量”包括在所指的紊乱、病症或精神状态上足以产生期望结果的剂量。期望结果可包括剂量接受者的主观或客观的改善。例如,有效量的AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛)包括足以减轻前列腺癌(如CRPC)的迹象、症状或病因的量。因此,有效量可以是减缓或逆转肿瘤生长、增加平均生存时间、抑制肿瘤的进展或转移,或使前列腺癌细胞对已变得或已形成耐药的前列腺癌药物再致敏的量。还例如,有效量的AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛),包括当施用于一对象时,足以导致该患前列腺癌的对象中实质性改善的量。量可随着以下因素而改变:接受治疗的前列腺癌类型、前列腺癌的进展阶段、所用组合物的类型和浓度、施用于对象的抗雄激素药物的量。例如,有效量的AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛),可包括有效提高药物(如恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇和比卡鲁胺)的前列腺癌治疗活性的量。

[0094] 如本文所用,术语“治疗”包括但不限于,使接受者的健康状态,(例如病人的前列腺癌状态)产生有益变化的方法和操作。所述变化可以是主观的或客观的,并可涉及例如正接受治疗的前列腺癌的症状或迹象等特征。例如,如果患者注意到疼痛减轻,那么就是成功的疼痛治疗。例如,如果出现红肿量减少,那么就是有益的炎症治疗。类似地,如果临床医生注意到客观的变化,例如前列腺癌细胞数量、前列腺癌细胞生长、前列腺癌肿瘤的大小、或前列腺癌细胞对另一种前列腺癌药物耐药性的减少,那么前列腺癌的治疗也是有益的。该术语也包括预防接受者状态的恶化。如本文所用,治疗也包括对前列腺癌患者施用AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛)。

[0095] 如本文所用,术语“施用”包括与为患者提供一定量的本发明所述化合物,例如AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛)有关的行为。施用包括为所需的患者提供本发明所述的单位剂量组合物。施用包括在特定时间段内,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、或31天,或以特定的次序提供有效量的化合物例如AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛),例如,施用AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛)随后施用选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺,及其组合,或者反之亦然。

[0096] 如本文所用,术语“共同给药”包括按次序或同时施用两种或多种结构不同的化合物。例如,两种或多种结构不同的活性化合物,可通过施用适合口服给药的包含两种或多种结构不同的药物活性化合物的药物组合物来共同给药。作为另一个例子,两种或多种结构不同的化合物,可通过施用一种化合物然后施用另一种化合物来共同给药。在一些情况下,共同给药的化合物由相同途径给药。在其他情况下,共同给药的化合物由不同途径给药。例如,一种化合物可口服给药,另一种化合物可例如,按次序或同时,通过静脉内或腹腔内注射给药。

[0097] 如本文所用,短语“晚期阶段前列腺癌”或“晚期前列腺癌”包括已进展到超出这类疾病早期阶段的一类前列腺癌。通常,晚期前列腺癌与差的预后性是相关的。晚期前列腺癌

的类型包括但不限于：转移性前列腺癌，耐药前列腺癌例如抗雄激素耐药的前列腺癌（恩杂鲁胺耐药的前列腺癌、阿比特龙耐药的前列腺癌，比卡鲁胺耐药的前列腺癌等），激素难治性前列腺癌，去势难治性前列腺癌、转移性去势难治性前列腺癌，多西紫杉醇耐药的前列腺癌，AR-V7诱导的耐药的前列腺癌如AR-V7诱导的抗雄激素耐药的前列腺癌（例如AR-V7诱导的恩杂鲁胺耐药的前列腺癌），AKR1C3-诱导的耐药前列腺癌如AKR1C3诱导的抗雄激素耐药的前列腺癌（例如，AKR1C3-诱导的恩杂鲁胺耐药的前列腺癌），及其组合。在某些情况下，晚期前列腺癌通常对一种或多种下列的常规前列腺癌治疗没有响应或耐药：恩杂鲁胺，阿比特龙，比卡鲁胺和多西紫杉醇。提供了用于治疗前列腺癌的本发明的化合物、组合物和方法，例如晚期前列腺癌，其中包括任何一种或多种（例如，二、三、四、五、六、七、八、九、十种，或更多种）本文所述的晚期前列腺癌类型。

[0098] 如本文所用，短语“改善前列腺癌症状”包括缓解或改善前列腺癌患者的症状或状况。缓解症状包括减少与前列腺癌相关的疼痛或不适。缓解症状还包括减少前列腺癌标志（物），例如，减少前列腺癌细胞数目或减少前列腺癌肿瘤的大小。

[0099] 如本文所用，短语“提高治疗效果”包括显示出本文所讨论的有益反应或治疗状况改善的多种主观或客观因素中的任一种。例如，提高抗雄激素药物（例如，恩杂鲁胺、阿比特龙或比卡鲁胺）或多西紫杉醇的疗效，包括使抗雄激素药物或多西紫杉醇耐药的前列腺癌对于抗雄激素药物或多西紫杉醇治疗再度致敏。还例如，提高抗雄激素药物或多西紫杉醇的疗效，包括改变抗雄激素药物或多西紫杉醇耐药的前列腺癌细胞以使细胞不对于抗雄激素药物或多西紫杉醇耐药。还例如，提高抗雄激素药物或多西紫杉醇的疗效，包括叠加或协同地改善或增加抗雄激素药物或多西紫杉醇的活性。在一些实施例中，所述提高包括用于治疗前列腺癌的抗雄激素药物或多西紫杉醇的治疗活性有一倍、两倍、三倍、五倍、十倍、二十倍、五十倍、一百倍、或一千倍的增加。

[0100] 如本文所用，短语“逆转前列腺癌细胞耐药”包括改变或修饰对于抗雄激素药物或多西紫杉醇治疗耐药的前列腺癌细胞，使得所述细胞不再对于抗雄激素药物或多西紫杉醇治疗耐药。

[0101] 如本文所用，短语“减少前列腺癌细胞耐药”包括增加抗雄激素药物或多西紫杉醇对之前对抗雄激素药物或多西紫杉醇治疗耐药的前列腺癌细胞的治疗活性。

[0102] 如本文所用，短语“使前列腺癌细胞耐药再致敏”包括诱导前列腺癌细胞变得对抗雄激素药物或多西紫杉醇治疗敏感化，而所述前列腺癌细胞原本对于抗雄激素药物或多西紫杉醇治疗是耐药的。本文所使用的致敏化包括：诱导前列腺癌细胞使其能够用抗雄激素药物或多西紫杉醇进行有效治疗。致敏化还包括减少为了获得治疗有益效果所需的抗雄激素药物或多西紫杉醇剂量。

[0103] 如本文所用，短语“抗雄激素药物”包括通过阻断雄激素受体，竞争细胞表面的结合部位，或影响或介导雄激素生成，从而改变雄激素通路的抗雄激素化合物。抗雄激素药物用于治疗多种疾病，其中包括但不限于前列腺癌。抗雄激素包括但不限于：恩杂鲁胺、阿比特龙和比卡鲁胺。

[0104] 如本文所用，术语“雄激素受体”或“AR”包括结合细胞质中的雄激素甾酮或双氢甾酮并转移到细胞核的核受体。除其他外，AR通过结合到这类靶基因的启动子中的雄激素反应元件(ARE)来调节靶基因的转录。

[0105] 如本文所用,术语“AR变体”包括全长AR的剪接变(异)体。各种不同的AR变体是已知的。参见,Guo等人,Cancer Res.2009Mar 15;69(6):2305-13。代表性AR变体包括但不限于:缺乏功能配体结合域(LBD)的变体。缺乏LBD的AR变体的一个例子为AR-V7。“AR-V7”包括雄激素受体剪接变体7,它是缺乏功能配体结合域(LBD)的AR的一种组成型激活的变体。参见,例如,Hu等人,Cancer Research,69(1):16-22(2009)。

[0106] 术语“个体”、“对象”或“患者”通常包括人类,但也包括其他动物,例如,其他灵长类、啮齿类、犬、猫、马、牛、猪等。

[0107] “药学上可接受的”或“治疗上可接受的”包括不干扰活性成分有效性或生物活性的物质,以及在使用量下对主体没有毒性的物质,其中所述主体可以是被给药的人或动物。

[0108] III.成分

[0109] a.AR-V7抑制剂

[0110] 本发明涉及AR-V7抑制剂。在本发明的一个方面,令人惊奇地发现:AR-V7的抑制能使耐药的前列腺癌细胞对选自下组的前列腺癌药物再致敏:多西紫杉醇、抗雄激素药物(例如比卡鲁胺、恩杂鲁胺和阿比特龙)、及其组合。在本发明的另一个方面,令人惊奇地发现:AR-V7的抑制能提高选自下组的前列腺癌药物的有效性:多西紫杉醇、抗雄激素药物(例如比卡鲁胺、恩杂鲁胺和阿比特龙),及其组合。而在本发明的另一个方面,AR-V7抑制剂可与AKR1C3抑制剂联合给药。

[0111] AR-V7抑制剂包括但不限于:抑制AR-V7的转录、翻译、稳定性或活性的化合物。AR-V7活性的抑制可包括:抑制AR-V7被募集到雄激素反应元件(AREs)。在一些实施例中,AR-V7活性抑制可包括:抑制AR-V7被募集到PSA启动子。在一些实施例中,AR-V7活性抑制可包括:抑制AR-V7诱导的PSA启动子活化。在一些实施例中,AR-V7活性抑制可包括:抑制AR-V7诱导的PSA生成。例如,AR-V7抑制可包括在不存在DHT的条件下抑制PSA生成。

[0112] 本发明还涉及一种组合物,它包括AR-V7抑制剂和选自下组的化合物:恩杂鲁胺(Xtandi)、阿比特龙(Zytiga)、多西紫杉醇(泰索帝)、比卡鲁胺(商品名:康士得Casodex、Cosudex、Calutide、Kalumid)、呋喃美辛,及其组合。

[0113] 示例性AR-V7抑制剂包括但不限于:基于核酸的抑制剂。这种基于核酸的AR-V7抑制剂可包括但不限于:靶向AR-V7mRNA的短发夹RNAs(shRNAs)或小干扰RNAs(siRNAs)。在一些实施例中,核酸类似物可用于靶向AR-V7的转录、剪接或翻译。这类核酸类似物包括但不限于:反义磷酸二胺吗啉代寡核苷酸、锁核酸或肽核酸。在一些实施例中,代表性AR-V7抑制剂包括但不限于:LY294002、渥曼青霉素(Wortmanin)和AKT抑制剂II。参见,例如,Mediwala等人,Prostate,2013Feb 15;73(3):267-77。

[0114] 测试了超过1200种FDA批准的小分子药物对AR变体(如AR-V7)的潜在抑制活性。令人惊奇的是,氯硝柳胺通过蛋白降解和蛋白酶体依赖的途径,以剂量和时间依赖方式显著下调AR-V7蛋白表达。因此,AR-V7抑制剂可以包括氯硝柳胺。

[0115] 因此,本发明提供了组合物和方法,它们用于施用AR-V7抑制剂如氯硝柳胺,从而抑制AR变体活性(如AR-V7的转录活性)。本发明还提供了组合物和方法,它们用于减少AR变体如AR-V7被募集到PSA启动子。本发明还提供了组合物和方法,它们被用于施用AR-V7抑制剂如氯硝柳胺,通过靶向AR变体信号,从而抑制前列腺癌细胞生长,或诱导前列腺癌细胞死亡。

[0116] 本发明还提供了组合物和方法,它们用于施用AR-V7抑制剂如氯硝柳胺,通过克服前列腺癌细胞的耐药性(如对恩杂鲁胺、比卡鲁胺或阿比特龙的耐药性)来抑制前列腺癌细胞生长,或诱导前列腺癌细胞死亡。本发明进一步提供了包含AR-V7抑制剂如氯硝柳胺的组合物,其中AR-V7抑制剂或者单用或者与前列腺癌治疗联用,如抗雄激素治疗、基于恩杂鲁胺的治疗、基于比卡鲁胺的治疗、基于阿比特龙的治疗、基于多西紫杉醇的治疗、基于吲哚美辛治疗,或其组合。

[0117] 本发明还提供了这种专用于晚期前列腺癌患者,如耐药前列腺癌、转移性前列腺癌、去势难治性前列腺癌,或其组合的组合物。本发明还提供了包括AR-V7抑制剂如氯硝柳胺的组合物,它专用于对已知的前列腺癌治疗(如恩杂鲁胺、比卡鲁胺、阿比特龙或多西紫杉醇)耐药的前列腺癌患者。本发明还提供了包含AR-V7抑制剂如氯硝柳胺的组合物,当其与恩杂鲁胺、比卡鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、吲哚美辛或其组合联合使用时,可提供了对前列腺癌细胞意想不到的协同效果或叠加效果。

[0118] 此外,本发明提供了一类组合物和方法,它们通过蛋白酶体依赖的途径来降解蛋白,从而抑制AR-V7蛋白的表达。基于本文描述的试验,观察到AR变体如AR-V7诱导前列腺癌细胞产生对恩杂鲁胺和阿比特龙的耐药性。此外,本文描述的含AR-V7抑制剂如氯硝柳胺的组合物和方法,适用于抑制AR活性,如AR-V7转录活性。本文描述的含AR-V7抑制剂如氯硝柳胺的组合物和方法,适用于减少AR变体(例如AR-V7)被募集到前列腺特异性抗原(PSA)启动子。例如,通过抑制AR-V7,本文描述的组合物和方法适用于治疗恩杂鲁胺或阿比特龙耐药的前列腺癌,或其组合。

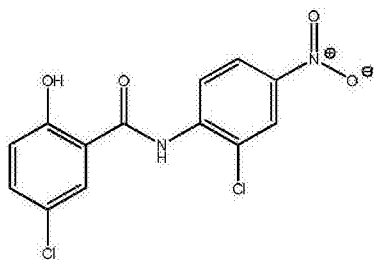
[0119] 在一些实施例中,本发明提供了一种组合物,它包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、吲哚美辛、及其组合。

[0120] 在一些上述的实施例中,AR-V7抑制剂如氯硝柳胺的量是可有效提高选自下组化合物的治疗效益的量:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇和吲哚美辛。在一些实施例中,该化合物是恩杂鲁胺。在一些其他实施例中,该化合物是阿比特龙。在一些其他实施例中,该化合物是多西紫杉醇。在一些其他实施例中,该化合物是比卡鲁胺。在一些其他实施例中,该化合物是吲哚美辛。

[0121] 在一些本文描述的组合物中,该组合物包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和恩杂鲁胺。在本文描述的一些其他组合物中,该组合物包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和阿比特龙。在一些本文描述的组合物中,该组合物包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和多西紫杉醇。而在其它一些本文描述的组合物中,该组合物包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和比卡鲁胺。而在其它一些本文描述的组合物中,该组合物包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂,如吲哚美辛。

[0122] 本文描述的是AR-V7抑制剂氯硝柳胺。氯硝柳胺是一种食品和药物管理局(FDA)批准的对人体绦虫有效的药物。氯硝柳胺的化学结构如下:

[0123]



[0124] 氯硝柳胺的化学名称是(5-氯-N-2-氯-4-硝基苯基)-2-羟基苯甲酰胺。

[0125] 如本文所用,术语“氯硝柳胺”包括其类似物和衍生物,包括在被给药的对象体内转换为氯硝柳胺或其类似物或衍生物的前药。参见,例如,Ulrike Sack等人,J.Natl.Cancer Inst.,7月6日;103(13):1018-36(2011);和国际专利公开号W0 2012/143377。示例的氯硝柳胺类似物包括但不限于:如Sack等人(2011)记载的化合物50643-F/1;69360-X1;82020K/D2;111338-C/1;1164315-M/2;和306664-O/1。术语“氯硝柳胺”也包括氯硝柳胺的盐,如药学上可接受的盐。氯硝柳胺盐可包括但不限于:氯硝柳胺乙醇胺盐、氯硝柳胺甲醇溶剂化物、和氯硝柳胺水合物。术语“氯硝柳胺”还包括纳米颗粒包装的氯硝柳胺制剂,如在Ye等人,Drug Dev.Ind.Pharm.,9月10日:1-9(2014)所述的那些。

[0126] b. 醛-酮还原酶1C3(AKR1C3)抑制剂

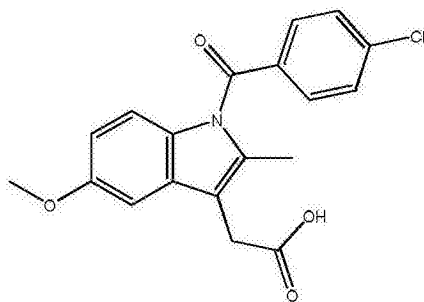
[0127] 本发明还涉及包含醛-酮还原酶1C3(AKR1C3)抑制剂的组合物。醛-酮还原酶1C3是一种催化弱雄激素前体4-雄甾烯-3,17-二酮(Δ^4 -AD)和5 α -雄甾烷-3,17-二酮分别转化为强雄激素睾酮和5 α -双氢睾酮(DHT)的酶。如本文所述,AKR1C3激活可导致对常用于前列腺癌细胞的治疗产生耐药性。例如,AKR1C3激活可导致对比卡鲁胺、恩杂鲁胺或阿比特龙的耐药性。因此,抑制AKR1C3的转录、翻译、蛋白稳定性或酶活性可以减少、逆转或消除前列腺癌细胞的耐药性。

[0128] 示例的AKR1C3抑制剂包括但不限于:基于核酸的抑制剂。这类基于核酸抑制剂AKR1C3包括但不限于:靶向AKR1C3mRNA的短发夹RNAs(shRNAs)或小干扰RNAs(siRNAs)。在一些实施例中,核酸类似物可用于靶向AKR1C3的转录、剪接或翻译。这种核酸类似物包括但不限于:反义磷酸二胺吗啉代寡核苷酸、锁核酸或肽核酸。

[0129] 在一些实施例中,AKR1C3抑制剂为吲哚美辛。吲哚美辛是一种食品和药物管理局(FDA)批准的非类固醇抗炎药(NSAID),它可通过抑制前列腺素生成来减少发烧、疼痛、僵硬和肿胀。吲哚美辛也是一种雄激素生物合成抑制剂。在一些实施例中,吲哚美辛抑制AKR1C3。

[0130] 吲哚美辛(indomethacin)也称为indocin或吲哚美辛(indometacin),其化学结构如下:

[0131]



[0132] 吲哚美辛的化学名称是2-[1-[(4-氯苯基)羰基]-5-甲氧基-2-甲基-1H-吲哚-3-

基}乙酸。如本文所用,术语“吡啶美辛”包括其类似物及其衍生物,包括在被给药的对象体内转换为吡啶美辛或其类似物或衍生物的前药。在一些实施例中,吡啶美辛衍生物可包括 Liedtke等人,J Med Chem.,2013年3月28日;56(6):2429-46中描述的任何衍生物。

[0133] 额外的示例性AKR1C3抑制剂包括但不限于:ASP9521;4-甲基(脱二甲胺)-四环素;巴卡林;刺罂粟碱;氟芬那酸;3-((4'-(三氟甲基)苯基)氨基)苯甲酸;SN33638;N-(4-氯苯甲酰基)-褪黑素;3-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基磺酰基)苯甲酸;3-(4'-(硝基萘-1-氨基))苯甲酸,及它们的盐,类似物或衍生物。示例的AKR1C3抑制剂可进一步包括但不限于:Khanim等人,Br J Cancer.2014年3月18日;110(6):1506-16;Liedtke等人,J Med Chem.2013年3月28日;56(6):2429-46;Adeniji等人,Endocr.Rev.2012,33,SAT-537;Adeniji等,J Med Chem.2012年3月8日;55(5):2311-23;Adeniji等,Bioorg Med Chem Lett.2011年3月1日;21(5):1464-8;Chen等,Bioorg Med Chem Lett.2012年5月15日;22(10):3492-7;Endo等,J Nat Prod.2012年4月27日;75(4):716-21;Jamieson等,J Med Chem.2012年9月13日;55(17):7746-58;Sinreih等,Bioorg Med Chem Lett.2012年9月15日;22(18):5948-51;Brozic等,J Med Chem.2012年9月13日;55(17):7417-24;Bauman等,Mol Pharmacol.2005年1月;67(1):60-8;Yin等人,Front Oncol(2014)4:159;Skarydova等,J Steroid Biochem Mol Biol.2014年9月;143:250-8;以及国际专利公开W02013/142390中描述的任何一种AKR1C3抑制剂化合物。

[0134] 本发明还涉及一种组合物,它包括AKR1C3抑制剂如吡啶美辛或其衍生物,和选自下组的化合物:恩杂鲁胺(Xtandi)、阿比特龙(Zytiga)、多西紫杉醇(泰索帝)、比卡鲁胺(商品名Casodex、Cosudex、Calutide、Kalumid)、氯硝柳胺,及其组合。

[0135] 本发明还提供了一种组合物和方法,它们用于施用AKR1C3抑制剂如吡啶美辛,从而抑制前列腺癌细胞生长或诱导前列腺癌细胞死亡。本发明还提供一种组合物和方法,它们用于施用吡啶美辛,通过克服或减少前列腺癌细胞对比卡鲁胺、恩杂鲁胺、或阿比特龙的耐药,从而抑制前列腺癌细胞生长。本发明进一步提供了单用吡啶美辛,或将吡啶美辛与目前抗雄激素治疗联用的组合物。本发明还提供了这种专用于晚期前列腺癌患者(如耐药前列腺癌、转移性前列腺癌、去势难治性前列腺癌、或其组合)的组合物。本发明还提供了含AKR1C3抑制剂如吡啶美辛的组合物,它专用于对已知的前列腺癌治疗(如恩杂鲁胺、阿比特龙或多西紫杉醇)耐药的前列腺癌患者。本发明另外提供了包含AKR1C3抑制剂如吡啶美辛的组合物,当其与恩杂鲁胺、比卡鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、氯硝柳胺或其组合联合使用时,提供了对前列腺癌细胞意想不到的协同或叠加效果。在一些实施例中,本发明提供了一种组合物,它包含AKR1C3抑制剂如吡啶美辛和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、氯硝柳胺及其组合。

[0136] 在一些上述的实施例中,AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)的量是有效提高选自下组的化合物的治疗效益的量:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺、氯硝柳胺和多西紫杉醇。在一些实施例中,该化合物是恩杂鲁胺。在一些其他实施例中,该化合物是阿比特龙。在一些其他实施例中,该化合物是多西紫杉醇。在一些其他实施例中,该化合物是比卡鲁胺。在一些其他实施例中,该化合物是氯硝柳胺。

[0137] 在一些本文描述的组合物中,该组合物包括AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)和恩杂鲁胺。在本文描述的一些其他组合物中,该组合物包括AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)和阿比特

龙。在一些本文描述的组合物中,该组合物包括AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)和多西紫杉醇。而在其它本文描述的组合物中,该组合物包括AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)和比卡鲁胺。而在其它本文描述的组合物中,该组合物包括AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)和AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)。

[0138] 在本文描述的任何组合物中,组合物还可进一步包括药学上可接受的赋形剂或稀释剂。

[0139] IV. 药物组合物

[0140] 本发明的药物组合物包含将AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和药学上可接受的载体和/或赋形剂或稀释剂混合所制得的组合物。该组合物适合动物或人的药物用途。

[0141] 本发明的药物组合物还包含将AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)和药学上可接受的载体和/或赋形剂或稀释剂混合所制得的组合物。该组合物适合动物或人的药物用途。

[0142] 本发明的药物组合物可通过制药领域熟知的任何方法制备。本发明适合使用的药学上可接受的载体包括任何标准药物载体、缓冲液和赋形剂,包括磷酸-缓冲盐溶液、水和乳液(如油/水或水/油乳液)以及各种类型的润湿剂和/或佐剂。合适的药物载体和其剂型在雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Science)(Mack Publishing Co., Easton, 第19版, 1995)中有描述。优选的药物载体取决于预期的活性剂的施用模式。

[0143] 本发明的药物组合物可包括药物作为活性成分,如恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、和AKR1C3抑制剂(例如,吡喹酮)、或AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)、或其任何药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂或稀释剂。在一些实施例中,该药物组合物可包括AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)和AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)。药物组合物可任选地包含其他治疗成分。

[0144] 本发明的化合物可作为活性成分与合适的药物载体和/或赋形剂根据常规药物混合技术充分混合。适用于给药所需的制剂形式的任何载体和/或赋形剂,可与本文公开的化合物一起使用。

[0145] 该组合物包括适合局部、肠外、肺、鼻、直肠,或口服给药的组合物。在任何给定的情况下,最适合的给药途径将部分取决于前列腺癌的性质和严重程度,以及任选地取决于前列腺癌的阶段。

[0146] 其他优选的组合物包括适合全身(肠内或肠外)给药的组合物。全身给药包括口服、直肠、舌下、或唇下给药。在一些实施例中,组合物可通过注射器给药或静脉内给药。

[0147] 肺部给药的组合物包括但不限于,由本文描述化合物或其盐的粉末,以及合适的载体和/或润滑剂的粉末所组成的干粉组合物。肺部给药的组合物可从本领域技术人员所知的任何合适的干粉吸入器中被吸入。

[0148] 全身给药的组合物包括但不限于,由本文描述化合物以及合适载体和/或赋形剂的粉末组成的干粉组合物。全身给药的组合物的例子包括但不限于:片剂、胶囊、丸剂、糖浆、溶液以及悬浮液。

[0149] 在一些实施例中,本发明提供了进一步包括药学上的表面活性剂的组合物。在其他实施例中,本发明提供了进一步包括冷冻保护剂的组合物。在一些实施例中,所述冷冻保护剂选自下组:葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、谷氨酸钠、PVP、HPBCD、CD、甘油、麦芽糖、甘露醇、和甘蔗糖。

[0150] 在一些实施例中,本发明提供了包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)以及药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施例中,本发明提供了包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)以及药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些这样的实施例中,药学上可接受的赋形剂包括盐或稀释剂。

[0151] 在一些实施例中,本发明提供了包括有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),或有效量的AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)的组合物。在一些实施例中,组合物被配制为口服给药或静脉给药,并包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮),以及选自自由水溶液和缓冲溶液组成的组中的至少一员。在一些实施例中,组合物可包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)。

[0152] 可使用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂,通过标准技术配制用于本发明的药物组合物或药物。合适的药物载体在本文和雷明顿:科学和药学实践,第21版,费城科技大学,Lippencott Williams&Wilkins(2005)中有描述。

[0153] 本发明组合物的控释肠外剂型可制备成植入物、油状注射剂,或微粒体系。递送系统的综述可参看,Banga,A.J.,治疗性的肽和蛋白质:制剂、制备和输送系统(THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS:FORMULATION,PROCESSING,AND DELIVERY SYSTEMS),Technomic 出版公司(Technomic Publishing Company,Inc.),兰卡斯特,PA,(1995),该文献通过引用并入本文。微粒体系包括微球、微粒、微胶囊、纳米胶囊、纳米球和纳米颗粒。

[0154] 聚合物可用于本发明组合物的离子控释。用于控制药物输送的各种不同的可降解和不可降解的聚合物材料是本领域所已知的(Langer R.,Accounts Chem.Res.,26:537-542(1993))。例如,嵌段共聚物,泊洛沙姆407(polaxamer 407)在低温下以粘性流动液体但在体温下以半固态凝胶形式存在。它已证明是一种对重组白细胞介素2和尿酶的剂型和持续输送有效的载体(Johnston等,Pharm.Res.,9:425-434(1992);and Pec等,J.Parent.Sci.Tech.,44(2):5865(1990))。另外,羟基磷灰石已被用作蛋白控释的微载体(Ijntema等.,Int.J.Pharm.,112:215-224(1994))。在另一个方面,脂质体被用于脂质包封药物(lipid-capsulated drug)的控释以及靶向(Betageri等,LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS,Technomic出版公司(Technomic Publishing Co.,Inc.),兰卡斯特,PA(1993))。已知许多另外的蛋白治疗的受控输送系统。参见,例如,美国专利号5,055,303;5,188,837;4,235,871;4,501,728;4,837,028;4,957,735和5,019,369;5,055,303;5,514,670;5,413,797;5,268,164;5,004,697;4,902,505;5,506,206;5,271,961;5,254,342和5,534,496,其中每个专利通过引用并入本文。

[0155] V. 前列腺癌的治疗方法

[0156] 在一些实施例中,本发明提供一种治疗患者前列腺癌(例如,晚期前列腺癌)的方法,所述方法包括对患者施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),AKR1C3抑制剂(如吡喹酮),或其组合。在一些这样的实施例中,前列腺癌为晚期前列腺癌,例如本文所公开的任何一种或多种类型的晚期前列腺癌。在一些这样的实施例中,前列腺癌是耐药的。在一些这样的实施例中,前列腺癌是抗雄激素耐药的。在一些这样的实施例中,前列腺癌是转移性的。在一些这样的实施例中,前列腺癌是转移性和耐药的(例如,抗雄激素药物耐药的)。在一些这样的实施例中,前列腺癌是去势抵抗性的。在一些这样的实施例中,前列腺癌是转移性和去势抵抗性的。在一些这样的实施例中,前列腺癌是恩杂鲁胺耐受的。在一些这样的实

施例中,前列腺癌是恩杂鲁胺和阿比特龙耐受的。在一些这样实施例中,前列腺癌是恩杂鲁胺、阿比特龙和比卡鲁胺耐受的。在一些这样的实施例中,前列腺癌是多西紫杉醇耐受的。在一些这样的实施例中,前列腺癌是恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺和多西紫杉醇耐受的。

[0157] 在一些实施例中,治疗包括抑制前列腺癌细胞生长;抑制前列腺癌细胞的细胞迁移;抑制前列腺癌细胞侵袭;改善前列腺癌症状;减小前列腺癌肿瘤的尺寸;减少前列腺癌肿瘤数量;减少前列腺癌细胞数量;诱导前列腺癌细胞坏死、热亡、胀亡、凋亡、自噬或其他细胞死亡;或提高选自下组化合物的疗效:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。

[0158] 在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括抑制前列腺癌细胞生长。在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括抑制前列腺癌细胞迁移。在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括抑制前列腺癌细胞侵袭。在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括改善前列腺癌症状。在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括减少前列腺癌肿瘤的大小。在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括减少前列腺癌肿瘤数量。在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括减少前列腺癌细胞数量。在一些本文所描述的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括诱导前列腺癌细胞坏死、热亡、胀亡、凋亡、自噬或其他细胞死亡。

[0159] 在本文所描述的特定的治疗前列腺癌的方法中,所述治疗包括提高选自下组化合物的疗效:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,所述治疗包括提高恩杂鲁胺的疗效。在一些其他实施例中,所述治疗包括提高阿比特龙的疗效。而在其它实施例中,所述治疗包括提高多西紫杉醇的疗效。在一些其他实施例中,所述治疗包括提高比卡鲁胺的疗效。所述提高可以是协同的或叠加的。

[0160] 在一些本文描述的方法的实施例中,所述治疗包括逆转、或减少前列腺癌细胞对于抗雄激素药物的耐受。在一些本文描述的方法的实施例中,所述治疗包括使前列腺癌细胞对于抗雄激素药物再致敏。在本文描述的任一方法中,抗雄激素药物是选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,抗雄激素药物是恩杂鲁胺。

[0161] 在前述的任何方法中,所述治疗可包括逆转前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的耐受;降低前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的耐受;或使前列腺癌细胞对恩杂鲁胺再致敏。在一些实施例中,所述治疗包括逆转前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的耐受。在一些其他实施例中,所述治疗包括降低前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的耐受。而在本发明的其他实施例中,所述治疗包括使前列腺癌细胞对恩杂鲁胺再致敏。

[0162] 在一些本文描述的实施例中,所述治疗包括逆转前列腺癌细胞对多西紫杉醇的耐受。在一些其他实施例中,所述治疗包括降低前列腺癌细胞对多西紫杉醇的耐受。而在其它实施例中,所述治疗包括使前列腺癌细胞对多西紫杉醇再致敏。

[0163] 在一些本文描述的实施例中,所述治疗包括逆转前列腺癌细胞对阿比特龙的耐受。在一些本文描述的其他实施例中,所述治疗包括降低前列腺癌细胞对阿比特龙的耐受。而在本文描述的其它实施例中,所述治疗包括使前列腺癌细胞对阿比特龙再致敏。

[0164] 在本文描述的任何方法中,所述前列腺癌选自下组:去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、晚期前列腺癌、耐药的前列腺癌、抗雄激素耐受的前列腺癌、比卡鲁

胺耐受的前列腺癌、恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、多西紫杉醇耐受的前列腺癌、AR-V7或AKR1C3诱导的耐药的前列腺癌、AR-V7或AKR1C3诱导的抗雄激素耐药的前列腺癌、AR-V7或AKR1C3诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、及其组合。

[0165] 在本发明的一些实施例中,所述前列腺癌是去势抵抗性前列腺癌。在其他实施例中,所述前列腺癌是转移性去势抵抗性前列腺癌。在另外一些实施例中,所述前列腺癌是晚期前列腺癌。在一些其他实施例中,所述前列腺癌是抗雄激素耐受的前列腺癌。在一些其他实施例中,所述前列腺癌是恩杂鲁胺耐受的前列腺癌。而在其它实施例中,所述前列腺癌是阿比特龙耐受的前列腺癌。在一些其他实施例中,所述前列腺癌是多西紫杉醇耐受的前列腺癌。在一些其他实施例中,所述前列腺癌是AR-V7或AKR1C3诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌。在一些实施例中,所述前列腺癌是前述前列腺癌类型中的一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、或多种的组合。

[0166] 治疗前列腺癌的方法可包括:共同施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)、及其组合。治疗前列腺癌的方法可额外地或替代地包括共同施用AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、氯硝柳胺、及其组合。

[0167] 本发明的一些实施例包括治疗恩杂鲁胺耐受和阿比特龙耐受的前列腺癌的方法,所述方法包括对恩杂鲁胺耐药或阿比特龙耐药的前列腺癌患者施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)、AKR1C3抑制剂(如吡啶美辛)、或其组合。

[0168] VI. 抑制前列腺癌细胞的方法

[0169] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制细胞内的雄激素受体剪接变异体的方法,其中所述方法包括:将细胞或雄激素受体剪接变异体与一定量的AR变异体抑制剂接触,例如氯硝柳胺。在一些实施例中,所述变异体为AR-V7剪接变异体。在一些实施例中,所述的量为有效量。在一些实施例中,所述细胞为前列腺癌细胞,例如去势抵抗性前列腺癌细胞,抗雄激素耐受的(例如,恩杂鲁胺耐受的)前列腺癌细胞,或其组合。

[0170] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制细胞内STAT3活化的方法,其中所述方法包括:将细胞或STAT3与一定量的AR-V7抑制剂接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。在一些实施例中,AR-V7抑制剂为氯硝柳胺或其类似物或其衍生物。在一些实施例中,所述细胞为前列腺癌细胞,例如去势抵抗性前列腺癌细胞、抗雄激素耐受的(例如,恩杂鲁胺耐受的)前列腺癌细胞,或其组合。

[0171] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制细胞内IL-6信号传导的方法,其中所述方法包括:将细胞或STAT3与一定量的AR-V7抑制剂接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。在一些实施例中,AR-V7抑制剂为氯硝柳胺或其类似物或其衍生物。在一些实施例中,所述细胞为前列腺癌细胞,例如去势抵抗性前列腺癌细胞、抗雄激素耐受的(例如,恩杂鲁胺耐受的)前列腺癌细胞,或其组合。

[0172] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制细胞内AKR1C3的方法,其中所述方法包括:将细胞或AKR1C3与一定量的AKR1C3抑制剂接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂为吡啶美辛或其类似物或其衍生物。在一些实施例中,所述细胞为前列腺癌细胞,例如去势抵抗性前列腺癌细胞、抗雄激素耐受的(例如,恩杂鲁胺耐受的)前列腺癌细胞,或其组合。

[0173] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制前列腺癌细胞生长的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)以及任选的选自下组的一种或多种化合物进行接触:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇和比卡鲁胺。

[0174] 在一些其它实施例中,本发明提供一种抑制前列腺癌细胞迁移的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂接触(如吡喹酮)以及任选的选自下组的一种或多种化合物进行接触:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇和比卡鲁胺。

[0175] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制前列腺癌细胞侵袭的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂接触(如吡喹酮)以及任选的选自下组的一种或多种化合物进行接触:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇和比卡鲁胺。

[0176] 在一些实施例中,本发明提供一种逆转前列腺癌细胞对于抗雄性激素药物的耐受性的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂接触(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种逆转前列腺癌细胞对于抗雄性激素药物的耐受性的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0177] 在一些实施例中,本发明提供一种逆转前列腺癌细胞对恩杂鲁胺耐受的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种逆转前列腺癌细胞对恩杂鲁胺耐受的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0178] 在一些实施例中,本发明提供一种逆转前列腺癌细胞对恩杂鲁胺和阿比特龙的双耐受性的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种逆转前列腺癌细胞对恩杂鲁胺和阿比特龙双耐受的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0179] 在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对于抗雄性激素药物再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对抗雄性激素药物再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0180] 在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对恩杂鲁胺再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对恩杂鲁胺再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0181] 在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对阿比特龙再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹酮)

辛)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对阿比特龙再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0182] 在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对恩杂鲁胺(enzalutamide)和阿比特龙再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对恩杂鲁胺和阿比特龙再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0183] 在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对比卡鲁胺再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对比卡鲁胺再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0184] 在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对多西紫杉醇再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种使前列腺癌细胞对多西紫杉醇再致敏的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,所述的量为有效量。

[0185] 在一些实施例中,本发明提供一种降低、逆转、或再致敏前列腺癌细胞对于抗雄性激素药物的耐受性的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。在一些实施例中,本发明提供一种降低、逆转、或再致敏前列腺癌细胞对于抗雄性激素药物的耐受性的方法,其中所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)进行接触。

[0186] 在前述任一方法中,所述抗雄激素药物可以是选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。

[0187] 在本文所述的一些实施例中,前列腺癌细胞对于抗雄性激素药物耐受的降低、逆转、或再致敏是在前列腺癌患者中。

[0188] 在一些实施例中,本发明还提供一种增强抗雄激素药物对前列腺癌患者疗效的方法,其中所述方法包括:对需要抗雄激素药物的患者施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)。在一些实施例中,本发明还提供一种增强抗雄激素药物对前列腺癌患者疗效的方法,其中所述方法包括:对需要抗雄激素药物的患者施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)。

[0189] 在一些其他实施例中,本发明提供一种提高恩杂鲁胺对前列腺癌患者疗效的方法,所述方法包括:对患者联合施用有效量的恩杂鲁胺和AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)。在一些实施例中,本发明提供一种提高恩杂鲁胺对前列腺癌患者疗效的方法,所述方法包括:对患者联合施用有效量的恩杂鲁胺以及AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡咯美辛)。

[0190] 在其他实施例中,本发明提供一种提高多西紫杉醇对前列腺癌患者疗效的方法,

所述方法包括：对患者联合施用有效量的多西紫杉醇和AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。在一些实施例中，本发明提供一种提高多西紫杉醇对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的多西紫杉醇以及AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。

[0191] 在一些实施例中，本发明提供一种提高阿比特龙对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的阿比特龙和AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。在一些实施例中，本发明提供一种提高阿比特龙对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的阿比特龙以及AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。

[0192] 在某些实施例中，本发明提供一种提高比卡鲁胺对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的比卡鲁胺和AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。在一些实施例中，本发明提供一种提高比卡鲁胺对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的比卡鲁胺以及AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。

[0193] 在一些实施例中，本发明提供一种提高AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。在一些实施例中，本发明提供一种提高AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和选自下组的药物：恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、和比卡鲁胺、及其组合。

[0194] 在一些实施例中，本发明提供一种提高AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)对前列腺癌患者疗效的方法，所述方法包括：对患者联合施用有效量的AKR1C3抑制剂和选自下组的药物：恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、和比卡鲁胺、及其组合。

[0195] 在其他实施例中，本发明提供一种抑制雄激素受体(AR)变异体的方法，包括：将AR变异体与一定量的AR-V7抑制剂接触，如氯硝柳胺。在一些这些实施例中，所述AR变异体为AR-V7。

[0196] 在一些其他实施例中，本发明提供一种抑制AR的反式激活、抑制AR的表达、抑制AR细胞迁移、抑制前列腺癌细胞中AR细胞入侵、抑制前列腺癌细胞克隆形成，和抑制AR变异体被募集到前列腺特异性抗原(PSA)启动子的方法。在一些情况下，该抑制方法包括：将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)，以及任选的一种或多种选自下组的化合物接触：恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇和比卡鲁胺。

[0197] 本发明还提供一种抑制全长AR和AR-V7的表达的方法，所述方法包括：将AR或前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)接触。本发明进一步提供一种抑制全长AR和AR-V7的表达的方法，所述方法包括：将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)接触。

[0198] 在一些其他实施例中，本发明提供一种抑制恩杂鲁胺/阿比特龙耐受的CRPC细胞的生长、迁移或入侵的方法，所述方法包括：将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)进行接触。在一些实施例中，所述方法包括：将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)进行接触。在一些实施例中，所述前列腺癌细胞为CRPC细胞。

[0199] 在一些其它实施例中,本发明提供一种协同提高恩杂鲁胺/阿比特龙对前列腺癌的疗效的方法,其中所述方法包括:对前列腺癌患者施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)。在一些实施例中,所述方法包括:对前列腺癌患者施用有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)。

[0200] 本发明还提供一种抑制AR被募集到PSA启动子的方法,所述方法包括:将AR与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)接触。

[0201] 在一些施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)的方法中,所述AR-V7抑制剂是口服施用的,其中或者单用或与恩杂鲁胺、阿比特龙、AKR1C3抑制剂、或其组合联用。在一些施用AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)的方法中,所述AKR1C3抑制剂是口服施用的,其中或者单用或与恩杂鲁胺、阿比特龙、AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)、或其组合联用。在一些施用AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)的方法中,AKR1C3抑制剂与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)是联合口服施用的。

[0202] 本发明还提供一种在前列腺癌细胞中协同或叠加提高抗雄激素(例如,比卡鲁胺、恩杂鲁胺或阿比特龙)的效果的方法,所述方法包括:将前列腺癌细胞与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)或AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛),以及任选的一种或多种抗雄激素药物接触,如比卡鲁胺、恩杂鲁胺或阿比特龙。在这些方法中,前列腺癌细胞对一个或多个选自下组的化合物耐受:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇和比卡鲁胺。在一些实施例中,所述化合物为恩杂鲁胺。在其他实施例中,所述化合物为阿比特龙。在一些其他实施例中,所述化合物为多西紫杉醇。在其它实施例中,所述化合物为比卡鲁胺。

[0203] 在一些实施例中,本发明还提供一种抑制STAT3的方法,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)接触。

[0204] 在一些实施例中,本发明还提供一种逆转前列腺癌细胞中STAT3介导的恩杂鲁胺耐受的方法,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)接触。

[0205] 在一些其他实施例中,本发明提供一种抑制STAT3的方法,所述方法包括:对前列腺癌患者施用AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)。在另一些实施例中,本发明提供一种抑制STAT3的方法,所述方法包括:对前列腺癌患者(例如,恩杂鲁胺耐受的患者)施用AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)。

[0206] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制STAT3的方法,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)接触。在一些实施例中,所述的接触是指在前列腺癌细胞中,在前列腺癌细胞上,或靠近前列腺癌细胞。在一些实施例中,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)和恩杂鲁胺接触。

[0207] 在一些其他实施例中,本发明提供一种抑制前列腺癌细胞生长的方法,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)接触。在一些实施例中,所述的接触是指在前列腺癌细胞中,在前列腺癌细胞上,或靠近前列腺癌细胞。在一些实施例中,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)和恩杂鲁胺接触。

[0208] 在一些实施例中,本发明提供一种诱导前列腺癌细胞凋亡的方法,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)接触。在一些实施例中,所述的接触是指在前列腺癌细胞中,在前列腺癌细胞上,或靠近前列腺癌细胞。在一些实施例中,所述方法包括:将STAT3与AR-V7抑制剂(例如,氯硝柳胺)和恩杂鲁胺接触。

[0209] 在一些实施例中,本发明提供一种抑制前列腺癌细胞克隆形成的方法,所述方法

包括：将STAT3与AR-V7抑制剂（例如，氯硝柳胺）接触。在一些实施例中，所述的接触是指在前列腺癌细胞中，在前列腺癌细胞上，或靠近前列腺癌细胞。在一些实施例中，所述方法包括：将STAT3与AR-V7抑制剂（例如，氯硝柳胺）和恩杂鲁胺接触。

[0210] 在一些实施例中，本发明提供一种通过抑制STAT3表达从而逆转恩杂鲁胺耐药的方法，所述方法包括：将STAT3与AR-V7抑制剂（例如，氯硝柳胺）接触。在一些实施例中，所述的接触是指在前列腺癌细胞中，或在前列腺癌细胞上，或靠近前列腺癌细胞。在一些实施例中，所述方法包括：将STAT3与AR-V7抑制剂（例如，氯硝柳胺）和恩杂鲁胺接触。

[0211] VII. 施用

[0212] 在本发明的一些实施例中，对前列腺癌患者施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）。

[0213] 在本发明的一些实施例中，将AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与恩杂鲁胺联合施用。

[0214] 在本发明的一些实施例中，将AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与阿比特龙联合施用。

[0215] 在本发明的一些实施例中，将AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与恩杂鲁胺和阿比特龙联合施用。

[0216] 在本发明的一些实施例中，将AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与多西紫杉醇联合施用。

[0217] 在本发明的一些实施例中，将AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与恩杂鲁胺和多西紫杉醇联合施用。

[0218] 在本发明的一些实施例中，将AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与阿比特龙和多西紫杉醇联合施用。

[0219] 在一些如本文所述的治疗前列腺癌的方法中，所述方法包括：对前列腺癌患者先施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺），然后对患者施用恩杂鲁胺。在一些如本文所述的治疗前列腺癌的方法中，所述方法包括：对前列腺癌患者先施用恩杂鲁胺，然后对患者施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）。

[0220] 在本发明的一些实施例中，所述施用方法包括：对所需要的患者单独施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺），或联合施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与恩杂鲁胺。在本发明的一些其他实施例中，所述施用方法包括：对所需要的患者单独施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺），或联合施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与阿比特龙。在本发明的另一些实施例中，所述方法包括：对所需要的患者单独施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺），或联合施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与多西紫杉醇。在本发明的另一些实施例中，所述方法包括：对所需要的患者单独施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺），或联合施用AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）与比卡鲁胺。

[0221] 在一些实施例中，本发明提供一种对前列腺癌患者递送有效量AR-V7抑制剂（如氯硝柳胺）的方法。

[0222] 本发明AR-V7抑制剂（例如，氯硝柳胺）剂型，在药物组合物或药物的制造上是有用的。药物组合物或药物可施用于有需要的对象，如前列腺癌患者。

[0223] 在任一上述实施例中，前列腺癌选自下组：去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、晚期前列腺癌、耐药前列腺癌如抗雄激素耐受的前列腺癌（例如，恩杂鲁胺耐受的前列腺癌、阿比特龙耐受的前列腺癌、比卡鲁胺耐受的前列腺癌等）、多西紫杉醇耐药的前列腺癌、AR-V7诱导的抗雄激素耐受的前列腺癌（如AR-V7诱导的恩杂鲁胺耐受的前列腺癌）、及其组合。

[0224] 在本发明的一些实施例中，对前列腺癌患者施用AKR1C3抑制剂（如吡啶美辛）。

[0225] 在本发明的一些实施例中,将AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与恩杂鲁胺联合施用。

[0226] 在本发明的一些实施例中,将AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与阿比特龙联合施用。

[0227] 在本发明的一些实施例中,将AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与恩杂鲁胺和阿比特龙联合施用。

[0228] 在本发明的一些实施例中,将AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与多西紫杉醇联合施用。在一些其他实施例中,将AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)联合施用。

[0229] 在本发明的一些实施例中,将AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与恩杂鲁胺和多西紫杉醇联合施用。

[0230] 在本发明的一些实施例中,将AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与阿比特龙和多西紫杉醇联合施用。

[0231] 在一些如本文所述的治疗前列腺癌的方法中,所述方法包括:对前列腺癌患者先施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛),然后对患者施用恩杂鲁胺。在一些如本文所述的治疗前列腺癌的方法中,所述方法包括:对前列腺癌患者先施用恩杂鲁胺,然后对患者施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)。

[0232] 在本发明的一些实施例中,所述施用方法包括:对所需要的患者单独施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛),或联合施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与恩杂鲁胺。在本发明的一些其他实施例中,所述施用方法包括:对所需要的患者单独施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛),或联合施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与阿比特龙。在本发明的另一些实施例中,所述方法包括:对所需要的患者单独施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛),或联合施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与多西紫杉醇。在本发明的另一些实施例中,所述方法包括对所需要的患者单独施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛),或联合施用AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)与比卡鲁胺。

[0233] 在一些实施例中,本发明提供一种对前列腺癌患者递送有效量AKR1C3抑制剂(如吡哌美辛)的方法。

[0234] 本发明AKR1C3抑制剂(例如,吡哌美辛)剂型,在药物组合物或药物的制造上是有用的。药物组合物或药物可施用于有需要的对象,如前列腺癌患者。

[0235] 在任一上述实施例中,前列腺癌选自下组:去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、晚期前列腺癌、耐药前列腺癌如抗雄激素耐药的前列腺癌(例如,恩杂鲁胺耐药的前列腺癌、阿比特龙耐药的前列腺癌、比卡鲁胺耐药的前列腺癌等)、多西紫杉醇耐药前列腺癌、AKR1C3诱导的抗雄激素耐药的前列腺癌(如AKR1C3诱导的恩杂鲁胺耐药的前列腺癌)、及其组合。

[0236] 本发明所使用的药物组合物或药物,可使用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂,通过标准技术来制备。合适的药物载体在本文以及在由E.W.Martin所著的“雷明顿药物科学”中有所描述。本发明的化合物和试剂及其生理上可接受的盐和溶剂化物,可通过任何合适的途径给药,其中包括:经吸入、局部、经鼻、口服、静脉内、肠外、或直肠给药。

[0237] a. 给药途径

[0238] 局部给药的典型剂型包括乳膏剂、软膏剂、喷雾剂、乳液、和贴剂。然而,药物组合物可根据任何类型的给药方式进行配制,例如,皮内、皮下、静脉内、肌肉内、鼻内、脑内、气管

内、动脉内、腹腔内、膀胱内、胸膜内、冠状动脉内或瘤内注射,其中可使用注射器或其他设备。也可考虑吸入(例如,喷雾剂)给药的剂型,或口服给药或直肠给药的剂型。

[0239] 用于透皮的合适剂型包括有效量的一种或多种本文描述的化合物,以及任选的载体。优选的载体包括可吸收的药学上可接受的、用于协助透过个体的肌肤的溶剂。例如,透皮装置是如下形式:包括背衬部件(backing member)的绑带,包含化合物和任选的载体的贮藏器(reservoir),并可任选地用来在延长的时间内以可控的和预先设定的速度将化合物传递到个体肌肤的速度控制屏障,以及确保该设备对皮肤安全的装置。也可使用基质透皮制剂。

[0240] 对于口服给药,药物组合物或药物可以采取的形式为,例如,采用常规手段并用药学上可接受赋形剂制备的片剂或胶囊。本发明提供了片剂和明胶胶囊,它们包含AKR1C3抑制剂(如吲哚美辛)和/或AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),其中或单用或与其他化合物如抗雄激素药物和/或多西紫杉醇联用,或是这些药物的干燥固体粉末并与以下物质共混:(a)稀释剂或填料,如乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇,纤维素(例如,乙基纤维素,微晶纤维素),甘氨酸、果胶、聚丙烯酸酯和/或钙磷酸氢钙、硫酸钙,(b)润滑剂,例如,二氧化硅、滑石粉、硬脂酸,镁盐或钙盐、金属硬脂酸盐、胶体二氧化硅、氢化植物油、玉米淀粉、苯甲酸钠、醋酸钠和/或聚乙二醇;对于片剂也包括(c)粘合剂,如镁铝硅酸盐、淀粉糊、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮和/或羟丙基甲基纤维素;如果需要还包括(d)崩解剂,例如,淀粉(例如,马铃薯淀粉或淀粉钠)、乙醇酸、琼脂、海藻酸或其钠盐或泡腾混合物;(e)润湿剂,例如十二烷基硫酸钠,和/或(f)吸收剂、着色剂、香料和甜味剂。

[0241] 根据本领域已知方法,片剂可以是薄膜包衣或肠溶包衣。口服给药的液体制剂可以采用的形式为,例如溶液、糖浆或悬浮液,或它们可以是干燥产品形式,并在使用之前用水或其它适宜载体进行重构。这种液体制剂可与药学上可接受的添加剂通过常规手段制备,例如,悬浮剂,例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用油脂;乳化剂,例如卵磷脂或阿拉伯胶;非水相载体,例如杏仁油、油酯、乙醇,或分馏植物油;和防腐剂,例如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯或抗坏血酸。制备也可以适当包含缓冲盐、调味剂、着色剂、和/或增甜剂。如果需要,可以合适地配制用于口服给药的制剂,以提供活性化合物的受控释放。

[0242] 如本文所述的组合物和剂型可制成肠外注射给药,例如通过弹丸注射或持续输注。注射剂型可以单位剂量形式呈现,例如,在安瓿或多剂量容器中,并添加防腐剂。可注射组合物优选为等渗水溶液或悬浮液,栓剂优选用脂肪乳剂或悬浮液制备。所述组合物可以是消毒的和/或含有佐剂,如保存剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶液促进剂、调节渗透压的盐和/或缓冲剂。另外,活性成分可以是形成粉末形式,并在使用前用合适的载体(如无菌无热原的水)进行重构。此外,它们也可包含其他有治疗价值的物质。可分别按照常规的混合、制粒或涂布方法来制备所述组合物,它含有大约0.1至75%,优选为大约1到50%的活性成分。

[0243] 对于吸入给药,本发明的组合物可使用合适的推进剂,例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适气体,从而从加压包或喷雾器以气溶胶喷雾形式方便地输送。就加压气溶胶而言,通过提供阀门来输送计量的量,从而确定剂量单位。可制成含有化合物粉末混合物和合适粉末基质(如乳糖或淀粉)的例如明胶胶囊和药筒,以用于吸入器或吹药器。

[0244] 本发明所述组合物也可制成直肠组合物,例如,栓剂或保留灌肠剂,例如,包含常规的栓剂基质,例如可可黄油或其他甘油酯。

[0245] 此外,活性成分可以配制成长效(depot)制剂。这种长效制剂可通过植入(例如,皮下或肌内)或通过肌内注射给药。因此,例如,本文所述的一个或多个化合物可用合适的聚合物材料或疏水材料(例如作为可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂进行配制,或作为微溶衍生物,例如作为微溶盐。

[0246] 在一些特定的实施例中,本发明的药物组合物或药物可以包括(i)有效量的AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),和(ii)任选的选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、及其组合。在一些特定的实施例中,本发明的药物组合物或药物可额外地或替代地包括(i)有效量的AKR1C3抑制剂(如吲哚美辛),和(ii)任选的选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、及其组合。治疗剂可单独、按次序、或与一种或多种其他此类治疗剂(例如,第一治疗剂、第二治疗剂、本发明化合物等)联合使用。可通过相同的或不同的给药途径,或在相同药物制剂中一起给药。

[0247] b. 剂量

[0248] 可对对象施用治疗有效剂量的药物组合物或药物以预防、治疗、再致敏,或控制本文所述的前列腺癌。对对象施用足够量的足以在对象中引起有效的治疗反应的药物组合物或药物。

[0249] 所施用的活性剂的剂量依赖于个体的体重、年龄、个体条件、被治疗者的表面积或体积以及施用形式。剂量的大小也由伴随于对特定对象施用特定剂型的任何副作用的存在、性质和程度而确定。对约50到约70千克的哺乳动物,口服给药的剂量单位可包含约5和约500毫克,约25-200毫克,约100和约1000毫克,约200和约2000毫克,约500和约5000毫克,或约1000和约2000毫克之间的活性成分。对约50到约70千克哺乳动物,口服给药的剂量单位可包含约10毫克、20毫克、25毫克、50毫克、75毫克、100毫克、200毫克、300毫克、400毫克、500毫克、600毫克、700毫克、800毫克、900毫克、1000毫克、1,250毫克、1500毫克、2000毫克、2,500毫克、3000毫克或更多的活性成分。通常,本发明的活性化合物的剂量是足以达到所需的效果的剂量。最佳剂量方案可从测量对象体内活性剂的积累而计算出。一般情况下,可每日、每周或每月一次或多次给予剂量。本领域的普通技术人员能容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率(repetition rates)。

[0250] 本发明组合物的最佳剂量、毒性和疗效可依据所施用组合物的相对效力而改变,并可通过细胞培养或实验动物中标准制药程序而确定,例如,通过确定LD₅₀(50%试验总体的致死剂量)和ED₅₀(在50%试验总体中产生疗效的剂量)。毒性和疗效之间的剂量比是治疗指数,能表达成LD₅₀/ED₅₀比例。展现巨大疗效指标的试剂是优选的。虽然可以使用具有毒副作用的试剂,在设计将这类试剂靶向到受影响的组织部位的递送系统时应注意将对正常细胞潜在损害最小化,从而减少副作用。

[0251] 最佳剂量方案可从测量个体体内活性成分的积累计算出。通常,剂量从约1纳克到约1000毫克每千克体重,可每日、每周、每月或每年进行一次或多次给予。本领域普通技术人员可容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。本领域技术人员基于本领域的已知方案和本文公开内容,能够确定对人类施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),或AKR1C3抑制剂(如吲哚美辛)的最佳剂量。

[0252] 从例如动物研究(如啮齿类和猴子)得到的数据,可用于配制用于人类的剂量范围。本发明化合物的剂量优选位于包括很小或没有毒性的ED₅₀的循环浓度范围内。剂量可在依赖于使用的剂量形式和给药途径的范围内改变。对于本发明方法中使用的任何组合物,最初可从细胞培养试验估算治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量以达到循环血浆浓度的范围,其中包括细胞培养中确定的IC₅₀(达到症状的最大值半数抑制的受试化合物浓度)。这种信息可用于更准确地确定对人类有用的剂量。可通过例如高性能液相色谱法(HPLC)测量血浆水平。通常,对典型的受试者,嵌合蛋白的剂量当量,优选地该组合物(composition)是约1纳克/千克到大约100毫克/千克。在一些实施例中,大鼠口服单剂量5毫克/千克氯硝柳胺,可产生1.08 μ mol/mL的最大血浆浓度。

[0253] 本发明口服或静脉给药的典型组合物,可为约0.1至约10毫克活性成分每病人每天;约1至约100毫克每病人每天;约25至约200毫克每病人每天;约50至约500毫克每病人每天;约100至约1000毫克每病人每天;或约1000到约2000毫克每病人每天。示例的剂量包括但不限于,约10毫克、20毫克、25毫克、50毫克、75毫克、100毫克、200毫克、300毫克、400毫克、500毫克、600毫克、700毫克、800毫克、900毫克、1000毫克、1,250毫克、1500毫克、2000毫克、2,500毫克、3000毫克,或更多活性成分每病人每天。制备可施用组合物的方法对那些本领域技术人员是已知的或明显的,这些方法在如雷明顿:科学和药学实践,第21版,费城科学大学,Lippencott Williams&Wilkins(2005)等出版物中被更详细地描述。

[0254] 本文所述组合物的示例性剂量包括,每千克个体或样本重量的毫克或微克量(例如,约1微克每千克至约500毫克每千克,约100微克每千克至约5毫克每千克,或约1微克每千克至约50微克每千克。应进一步理解,组合物的合适剂量取决于所要到达的期望效果的组合物的效力。当对哺乳动物施用一种或多种这些组合物时,医生、兽医或研究员会例如,首先开相对较低的剂量,随后增加剂量直到获得合适的响应。此外,应理解,对任何特定哺乳动物个体的特定剂量水平将取决于各种因素,包括所使用的特定组合物的活性,个体的年龄、体重、一般健康、性别和饮食,给药时间、给药途径、排泄率,任何药物组合,和被调节的表达或活性程度。

[0255] 在一些实施例中,施用本发明药物组合物或药物,例如,每日剂量在从约1毫克化合物每千克个体重量(1毫克/千克)至约1克/千克范围。在另一实施例中,剂量在约5毫克/千克至约500毫克/千克的范围。在另一实施例中,剂量为约10毫克/千克至约250毫克/千克。在另一实施例中,剂量为约25毫克/千克至大约150毫克/千克。优选的剂量是约2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、18、20、25、30、40或50毫克/千克。每日剂量可每日一次给药或分为亚剂量和多剂量给药,例如,每日两次,三次,或四次。然而,熟练技术人员能够理解的,本文描述的组合物可以不同的数量以及在不同时间给药。熟练技术人员也能够理解一些因素可能影响有效治疗个体所需的剂量和时间,包括但不限于:个体疾病的严重程度或恶性情况,之前的治疗,总体健康情况和/或年龄,以及目前的其它疾病。此外,用治疗有效量的化合物对个体的治疗可包括单一治疗,或优选地包括一系列治疗。

[0256] 为达到理想的治疗效果,本文所述的化合物或试剂可以按有疗效的每日剂量,在多天给药。因此,有疗效地施用化合物以治疗个体前列腺癌,可在三天到两周或更长的一段时间范围内持续定期(例如,每天)给药。本文所述组合物可至少连续三天给药,经常为至少连续五天给药,更经常至少十天给药,有时连续20、30、40天或更多天给药。尽管连续每日剂

量是到达有效治疗剂量的优选的途径,但即使没有每日施用,试剂也能达到有益治疗效果,只要频繁重复给药足够维持试剂在个体中的治疗有效浓度。例如,一个人可以每隔一天,每三天给药,或者,如果采用更高剂量范围并被个体所接受,则每周一次给药。

[0257] 在一些实施例中,AR-V7抑制剂氯硝柳胺是口服给药。在一些实施例中,将氯硝柳胺口服给药予个体(例如,成人),每日剂量约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、或更多毫克氯硝柳胺每天。在一些实施例中,将氯硝柳胺口服给药予个体(例如,成人),每日剂量在1,000和2,000毫克每天之间。在一些实施例中,AKR1C3抑制剂吡哆美辛是口服给药。在一些实施例中,将吡哆美辛口服给药予个体(例如,成人),每日剂量接近10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、500,或更多毫克吡哆美辛每天。在一些实施例中,将吡哆美辛口服给药予个体(例如,成人),每日剂量在25和200毫克每天之间。在一些实施例中,吡哆美辛和氯硝柳胺是联合口服给药。例如,吡哆美辛的每日口服剂量在每天25到200毫克之间,并与氯硝柳胺联合给药,其中氯硝柳胺的每日口服剂量在每天1000至2000毫克之间。

[0258] 在一些实施例中,该方法包括:按次序施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),接着施用选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺和多西紫杉醇。在一些实施例中,该方法包括:按次序施用选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺和多西紫杉醇,接着施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)。

[0259] 在其他实施例中,该方法包括:联合施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和选自下组的化合物:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙和多西紫杉醇。在一些这样的实施例中,比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙或多西紫杉醇的施用量,小于如果不对患者施用AR-V7抑制剂如氯硝柳胺时将比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙或多西紫杉醇施用于前列腺癌患者的量。

[0260] 在一些实施例中,该方法包括:按次序施用AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛),接着施用选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺和多西紫杉醇。在一些实施例中,该方法包括:按次序施用选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、比卡鲁胺和多西紫杉醇,接着施用AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛)。

[0261] 在其他实施例中,该方法包括:联合施用AKR1C3抑制剂(如吡哆美辛),和选自下组的化合物:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙和多西紫杉醇。在一些这样实施例中,比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙或多西紫杉醇的施用量,小于如果不对患者施用AKR1C3抑制剂时将比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙或多西紫杉醇施用前列腺癌患者的量。

[0262] 在本发明的一些实施例中,药物组合物或药物以治疗有效剂量对患者给药,以预防、治疗或控制前列腺癌。对患者施用足够量的药物组合物或药物以引起患者有效的治疗或诊断反应。有效的治疗或诊断反应是一种至少部分地阻止或减缓前列腺癌症状或并发症的反应。足以实现该目的的量被定义为“治疗有效剂量”。

[0263] 成功治疗后,让个体进行维持治疗以预防前列腺癌的复发是有利的。

[0264] 有效量的确定是在那些本领域技术人员能力范围内的,特别是依据本发明所提供的详细公开内容。一般来说,成分的见效或有效的量,首先通过施用低剂量或小量的组合物来确定,然后渐进增加施用剂量或药量,如果需要,添加第二或第三种药物,直到在被治疗个体中观察到所需的效果,且带有最小或不带有毒副作用。

[0265] 组合物单次或多次施用取决于病人所需的和能够接受的剂量和频率。在任何情况下,应提供足够量的本发明组合物以有效地治疗患者。一般来说,剂量足以治疗或减轻患者症状或疾病迹象,而不产生无法接受的毒性。

[0266] VIII. 试剂盒、容器、设备和系统

[0267] 各式各样的试剂盒、系统和组合物,可根据本发明依据该试剂盒和系统的预期用户以及该用户的特定需要进行制备。在一些实施例中,本发明提供了一种试剂盒,它包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺,及其组合。在一些实施例中,该试剂盒包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和恩杂鲁胺。在一些其他实施例中,该试剂盒包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和阿比特龙。在其他实施例中,该试剂盒包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和多西紫杉醇。在一些其他实施例中,该试剂盒包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和比卡鲁胺。在一些其他实施例中,该试剂盒包括AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)。

[0268] 在一些实施例中,本发明提供了一种试剂盒,它包括AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)和选自下组的化合物:恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇、比卡鲁胺、及其组合。在一些实施例中,该试剂盒包括AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)和恩杂鲁胺。在一些其他实施例中,该试剂盒包括AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)和阿比特龙。在其他实施例中,该试剂盒包括AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛),和多西紫杉醇。在一些其他实施例中,该试剂盒包括AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)和比卡鲁胺。在其他实施例中,该试剂盒包括AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛),和AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)。

[0269] 本文描述的一些试剂盒包括描述施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)方法的标签。例如,所述标签可描述口服施用AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)。本文描述的一些试剂盒包括包括描述施用AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)方法的标签。例如,所述标签可描述口服施用AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)。本文描述的一些试剂盒包括描述预防、治疗或控制前列腺癌方法的标签,例如,去势抵抗性前列腺癌或抗雄激素耐药前列腺癌。

[0270] 本发明的组合物,包括但不限于:包含AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),的组合物,或包含AKR1C3抑制剂(如吡喹美辛)的组合物;如果需要,本发明的组合物可以瓶、罐、小瓶、安瓿、试管,或其它经食品和药物管理局(FDA)或其他监管机构批准的容器密封系统呈现,这些容器可提供一种或多种包含活性成分的剂量形式。该包装或分配器也可附带与政府机构所制定的容器形式相关的规定药品的制造、使用或销售的注意事项,而所述注意事项表明得到了该机构的批准。在某些方面,该试剂盒可包括本文所教导的剂型或组合物,含剂型或含剂型的剂量单位的容器密封系统,以及描述本文所教导的使用方法的注意事项或说明。

[0271] 在一些实施例中,该试剂盒包括被划分多个分割区的容器,以便用于存放制剂(如干的成分和液体成分)或组合物的各种元件,或制备制剂或组合物的说明,以及用于预防、治疗或控制前列腺癌的说明,如去势抵抗性前列腺癌、抗雄激素耐药前列腺癌或其组合。在一些实施例中,该试剂盒可包括脱水或干燥形式的药物剂型,以及将其水化(或重构)和施用的说明。

[0272] 提供了带有活性成分单位剂量的试剂盒,如口服、直肠、透皮或注射(例如肌肉、静脉内或皮下注射)剂量。除了包含单位剂量的容器以外,在这种试剂盒中有一个信息型插页,它描述了组合物在预防、治疗或控制前列腺癌方面的用途和附带的益处,如去势抵抗性

前列腺癌、抗雄激素耐药前列腺癌或其组合。合适的活性成分和单位剂量为本文已描述的那些。

[0273] 本发明的一些实施例包括这样的包装,它含有AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺),并与选自下组的化合物一起包装:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇,及其组合。本发明的一些实施例包括这样的包装,它含有AKR1C3抑制剂(如吡喹酮),并与选自下组的化合物一起包装:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇,及其组合。本发明的一些实施例包括这样的包装,它含有AR-V7抑制剂(如氯硝柳胺)和AKR1C3抑制剂(如吡喹酮),并与选自下组的化合物一起包装:比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、多西紫杉醇,及其组合。

[0274] 尽管本发明的每个元素在此描述为包含多个实例,但应理解的是,除非另有指示,否则本发明给定元素的每个实例能够与本发明其它元素的每个实例一起使用中,每种这样的使用将形成本发明一个独特的实施例。

[0275] IX. 实施例

[0276] 将通过具体示例更详细地描述本发明。提供下面的示例用于说明目的,并非要以任何方式来限制本发明。本领域技术人员可容易地认识到各种非关键性参数可以改变或修改以产生本质上相同的结果。

[0277] 实施例1. AR-V7在前列腺癌细胞中的活性,恩杂鲁胺(Enzalutamide)的耐受性以及治疗前列腺癌细胞的组合物和方法。

[0278] a. 导言

[0279] 删除LBD导致前列腺癌细胞中AR的组成型激活。在不同细胞系中表达AR-V7mRNA的检测如图1A所示。CWR22rv1和VCaP细胞表达的AR-V7明显比LNCaP和C4-2细胞更高;AR-V7在CWR22rv1细胞中的表达水平比其在LNCaP和C4-2细胞中的表达水平高25倍,而相比之下VCaP细胞表现出15倍的增加。该结果也被免疫印迹试验证实,如图1B所示,其中CWR22rv1和VCaP细胞比LNCaP和C4-2细胞表达出更高的AR变异体(尤其是AR-V7)的蛋白表达水平。AR-V7已在前列腺癌细胞中显示出是组成型激活的。为证实这些结果,将EGFP-AR-V7瞬时转染到C4-2细胞中,48小时后,如图1C所示,AR-V7仅在C4-2细胞的细胞核中表达,这表明缺乏经典NLS(核定位序列)的AR-V7仍能够通过目前还不清楚的机制转移到细胞核中。接下来,PC3细胞系和LNCaP细胞中AR-V7的转录活性被证实,其中PC3细胞系无AR,而LNCaP细胞表达突变AR(T877A)。如图1D和E所示,AR-V7在PC3和LNCaP细胞中组成型激活,并且不能被雄激素所阻断。为进一步了解AR-V7在前列腺癌细胞中的功能,将AR-V7稳定地转染到C4-2细胞中,如图1F所示。与C4-2neo细胞相比,C4-2AR-V7稳定的克隆株表达明显更高的AR-V7mRNA。此外,AR-V7功能性地增加了C4-2细胞中PSA mRNA和蛋白表达(图1G和H)。总体上,这些数据证实了,AR-V7在前列腺癌细胞中是组成型激活的。

[0280] b. 试剂和方法

[0281] i. 通用细胞培养

[0282] 所有细胞在37℃下维持在含5%二氧化碳的加湿培养箱中。LNCaP、C4-2、C4-2B、CWR22rv1、DU145和293细胞维持在补充有10%胎牛血清(FBS),100单位/ml青霉素和0.1mg/ml链霉素的RPMI 1640中。VCaP细胞维持在补充有10%胎牛血清(FBS)、100单位/ml青霉素和0.1mg/ml链霉素的DMEM中。C4-2-neo和C4-2AR-V7细胞通过pcDNA3.1或含AR-V7质粒的pcDNA3.1稳定地转染,并维持在300μg/mL G418RPMI 1640培养基中。293-AR-V7-PSA-E/P-

LUC细胞通过AR-V7质粒和PSA-E/P-LUC报告基因质粒(reporter plasmid)稳定地转染,并维持在300 μ g/mL G418RPMI1640培养基中。LNCaP-neo(稳定表达pcDNA3.1对照载体的LNCaP细胞),LNCaP-S17(稳定表达IL-6的LNCaP细胞)及LNCaP-STAT3C细胞(稳定表达组成型激活的STAT3的LNCaP细胞),是依据以下文献制备:Lou W、Ni Z、Dyer K、Tweardy DJ、Gao AC,“白介素-6诱导前列腺癌细胞生长并伴随有stat3信号通路激活”(Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of STAT3 signaling pathway),前列腺(Prostate)2000;42(3):239-242,和DeMiguel F、Lee SO、Lou W、Xiao X、Pflug BR、Nelson JB、Gao AC,“STAT3增强完整的和被阉割的裸鼠中LNCaP人前列腺癌细胞生长”(STAT3 enhances the growth of LNCaP human prostate cancer cells in intact and castrated male nude mice),前列腺(Prostate)2002;52(2):123-129。人重组IL-6获自R&D Systems公司(明尼阿波利斯,MN)。

[0283] C4-2B细胞在FBS中和在浓度渐增(5 μ M~40 μ M)的恩杂鲁胺中孵育超过12个月,并保存供进一步分析。分离耐受性细胞,称为C4-2B MR(即,C4-2B恩杂鲁胺耐受型)。在用恩杂鲁胺处理细胞的同时,亲本C4-2B细胞也进行传代,以作为合适的对照。C4-2B MR细胞维持在含20 μ M恩杂鲁胺的培养基中。氯硝柳胺购自Sigma。

[0284] ii. 质粒和细胞转染

[0285] 对于小干扰RNA(siRNA)转染,细胞以每孔 1×10^5 细胞的密度接种于12孔板,或以每孔 3×10^5 细胞的密度接种于6孔板,并使用脂质体-RNAiMAX(invitrogen),通过靶向ARExon7序列的siRNA(Dharmacon)UCAAGGAACUCGAUCGUAU(SEQ ID NO:1),或靶向AR-V7序列的siRNA(Dharmacon)GUAGUUGUAAGUAUCAUGA(SEQ ID NO:2),或靶向STAT3(细胞信号#6582)的siRNA进行转染。靶向荧光素酶(Luc)基因的对照序列,si对照(siControl)CTTACGCTGAGTACTTCGA(SEQ ID NO:3),也使用脂质体-RNAiMAX(invitrogen)进行转染。细胞使用Attractene(QIAGEN),通过所示的表达质粒,例如,AR-V7或EGFP-AR-V7,进行瞬时转染。

[0286] iii. 染色质免疫沉淀试验

[0287] C4-2neo和C4-2AR-V7细胞用本文所述方式进行处理。DNA-AR蛋白复合物通过加入1%甲醛在细胞内交联。超声制备全细胞提取物,交联的DNA-蛋白质复合物的等分试样,通过在4 $^{\circ}$ C下与AR-特异性抗体(从Santa Cruz Biotechnology获得的AR-441)旋转孵育过夜来进行免疫沉淀。染色质抗体复合物通过在4 $^{\circ}$ C下与蛋白A/G琼脂糖珠旋转孵育1小时而从溶液中分离出,洗涤结合的DNA-蛋白质复合物,并用洗脱缓冲液(1%SDS和0.1mol/L NaHCO₃)将其从珠上洗脱,对交联进行逆转,并提取DNA。利用跨越PSA启动子的近端或远端增强子AREs的引物,通过PCR分析得到的染色质制备物。将同种匹配的IgG用作对照。

[0288] iv. 免疫印迹分析

[0289] 全细胞蛋白提取物在SDS-PAGE中溶解,蛋白质被转移到硝酸纤维素膜上。室温下在5%牛奶的PBS/0.1%吐温-20中封闭1小时后,硝酸纤维素膜与所示的第一抗体[例如,AR(441,sc-7305,小鼠单克隆抗体,1:1000稀释,Santa Cruz Biotechnology,圣克鲁兹,CA);AR-V7(AG10008,小鼠单克隆抗体,1:1000稀释,精准抗体);微管蛋白(T5168,单克隆的抗- α -微管蛋白抗体,1:5000稀释,Sigma-Aldrich,圣路易斯,MO)]在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。微管蛋白用来监测所用样本的数量。在与第二抗体孵育后,免疫反应蛋白通过增强型化学发光检测

系统(Millipore,比勒利卡,MA)进行可视化。

[0290] v. 荧光素酶试验

[0291] 在FBS或CS-FBS条件下,LNCaP、C4-2或293细胞通过pGL3-PSA6.0-Luc、pGL3-AREI/II-Luc报告基因和AR-V7进行转染,如图所示。用荧光素酶试验体系(Promega)对细胞裂解物进行荧光素酶试验。

[0292] vi. 细胞生长试验

[0293] 将C4-2neo、C4-2AR-V7、CWR22rv1或pzHPV7细胞,以 1×10^5 细胞/孔的密度接种于含有10%FBS的RPMI 1640培养基的12孔板中,并用 $0.5 \mu\text{M}$ 氯硝柳胺处理48小时。计数总细胞数并计算细胞存活率(%)。细胞存活率(%)=(处理组细胞数/对照组细胞数) $\times 100\%$ 。CWR22rv1细胞、C4-2B MR或C4-2B AbiR细胞按 0.5×10^5 细胞/孔的密度接种于含有10%FBS的RPMI 1640培养基的12孔板中,并在含FBS的培养基中用含 $20 \mu\text{M}$ 恩杂鲁胺或 $20 \mu\text{M}$ 阿比特龙的 $0.25 \mu\text{M}$ 氯硝柳胺处理。2、4和7天后计数总细胞数。LNCaP-neo、LNCaP-S17、LNCaP-IL6+或LNCaP-STAT3C细胞,以 1×10^5 细胞/孔的密度接种于含10%FBS的RPMI 1640培养基的12孔板中。按所示方式处理细胞并计数总细胞数。

[0294] vii. 克隆形成试验

[0295] 将C4-2neo、C4-2AR-V7、CWR22rv1或C4-2B MR细胞,在含10%完全FBS的培养基中,用DMSO、 $0.5 \mu\text{M}$ 或 $1.0 \mu\text{M}$ 氯硝柳胺进行处理。CWR22rv1细胞或C4-2B MR细胞在含或不含 $20 \mu\text{M}$ 恩杂鲁胺的条件下,用 $0.25 \mu\text{M}$ 氯硝柳胺进行处理。细胞以相同密度在100mm盘中铺板14天;每7天更换培养基。克隆在用0.5%结晶紫/4%甲醛染色之前,用PBS冲洗30分钟,并计算克隆数量。LNCaP-neo细胞或LNCaP-S17稳定克隆细胞,在含10%完全FBS的培养基中用DMSO或恩杂鲁胺处理。细胞以相同密度(1000个细胞/盘),在100mm盘中铺板14天;克隆在用0.5%结晶紫/4%甲醛染色之前,用PBS冲洗30分钟,并计算克隆数量。

[0296] viii. 细胞死亡ELISA

[0297] 将C4-2neo、C4-2AR-V7、CWR22rv1或pzHPV7细胞接种于含10%FBS的RPMI1640培养基的12孔板(1×10^5 细胞/孔)中,用DMSO或 $0.5 \mu\text{M}$ 氯硝柳胺处理48小时。在细胞质部分的单核小体和寡聚核小体通过细胞死亡检测ELISA试剂盒(Roche,Cat.NO.11544675001)按照制造商的说明进行检测。收集漂浮和附着的细胞,并在400 μL 的孵育缓冲液中进行均质化。各孔用抗组蛋白抗体进行包被,并与裂解物、辣根过氧化物酶偶联的抗DNA抗体和底物进行孵育。在405nm下测量吸光度。

[0298] ix. 实时定量RT-PCR

[0299] 用TriZOL试剂(Invitrogen)提取总RNAs。在用RNase-free RQ1DNase(Promega)消化后,制备cDNAs。使用Sso Fast Eva Green Supermix(Bio-Rad)按照制造商的说明,或按照Liu C等人,“在前列腺癌中穿心莲内酯靶向雄激素受体途径”(Andrographolide targets androgen receptor pathway in castrate-resistant prostate cancer), Genes Cancer;2:151-9中所描述的方法,对cDNAs进行实时逆转录PCR(RT-PCR)。每个反应通过肌动蛋白的共扩增进行均一化(normalized)。三份样品在Bio-Rad CFX-96实时循环机的默认设置的下运行。

[0300] x. PSA的测量

[0301] 按照制造商的说明书,使用ELISA(United Biotech,Inc.,山景城,CA)在培养物上

清液中测量PSA水平。

[0302] i. IL-6的测量

[0303] 用50 μ L细胞培养物上清液测定IL-6分泌水平。LNCaP-neo和LNCaP-s17细胞的IL-6的分泌情况,按照制造商的方案(eBioscience, 圣地亚哥, CA)用ELISA来测定。

[0304] xi. 统计分析

[0305] 数据以平均值 $\pm$ 平均值标准偏差(SD)呈现。使用Microsoft Excel分析工具进行统计分析。各组之间的差异通过单向方差分析(ANOVA)接着通过对均值比较的Scheffé步骤进行分析。 $P < 0.05$ 被认为是统计学显著的。

[0306] c. 结果

[0307] i. 在Prestwick Chemical Library中进行针对AR-V7抑制剂的化合物筛选

[0308] Prestwick Chemical Library®包含1200种小分子(FDA、EMEA和其他机构)。这些活性化合物因其高化学和药理学多样性以及其已知的人生物利用度和安全性而被选择。本试验鉴定了FDA批准的药物,而该药物可以靶向AR-V7活性。在用化学库的化合物处理24小时后,使用荧光素酶活性试验进行药物筛选以测定AR-V7活性。为了避免全长AR的阻断,使用缺乏AR的293细胞系。293细胞通过EGFP-AR-V7质粒和PSA-E/P-荧光素酶报告基因质粒进行稳定转染,并通过G418选出稳定克隆,如图8和图12所示。293AR-V7-PSA-luc稳定克隆比293neo细胞更多地表达AR-V7蛋白。CWR22rv1细胞被用作阳性对照。在荧光显微镜下检测核转位。如图8B所示,293AR-V7-PSA-luc稳定克隆在细胞核内高表达AR-V7。AR-V7表达也被qRT-PCR所证实,其中293AR-V7-PSA-luc稳定克隆表达的AR-V7 mRNA水平比293neo细胞高140倍,尽管两种细胞都不表达全长AR(图8C)。为了确认293AR-V7-PSA-luc稳定克隆也稳定表达PSA-luc活性,将细胞以不同细胞数量在CS-FBS条件下铺板。两天后,进行荧光素酶试验,如图8D所示。结果显示,293AR-V7-PSA-luc细胞具有组成型PSA启动子活性,这表明在293细胞系统中成功地构建了稳定的细胞。建立筛选方案以进行化合物筛选,如图8E所示。293AR-V7-PSA-luc稳定克隆接种于96孔板中,随后用化合物库中的每个化合物处理24小时。再进行一次荧光素酶试验,在第一轮筛选中排除明显抑制细胞生长的化合物。第二轮后,稀释高毒性化合物再进一步进行筛选,从这一组标准中,氯硝柳胺被选择作为一种感兴趣的药物。

[0309] ii. 氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞生长和诱导细胞凋亡

[0310] 为检验氯硝柳胺对前列腺癌细胞的影响,将C4-2neo、C4-2AR-V7、CWR22rv1和pz-HPV7细胞用DMSO或0.5 μ M氯硝柳胺处理48小时,如图2A所示。0.5 μ M氯硝柳胺显著抑制前列腺癌细胞的细胞生长并对pz-HPV7正常前列腺上皮细胞影响小。进行细胞死亡ELISA以进一步检验氯硝柳胺的抗癌效果,如图2B所示。0.5 μ M氯硝柳胺显著诱导前列腺癌细胞的细胞凋亡并对pz-HPV7细胞影响小。检验被氯硝柳胺抑制下的克隆形成能力并如图2C和2D所示。氯硝柳胺以剂量依赖性方式显著抑制前列腺癌细胞克隆形成能力,这证实了氯硝柳胺有很大潜力成为一种治疗前列腺癌的候选药物。总之,上述结果表明氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞生长并诱导细胞凋亡,但对正常前列腺上皮细胞影响很小。

[0311] 如图33-34所示,氯硝柳胺以剂量依赖性方式显著抑制前列腺癌细胞的克隆形成能力。如图37和38所示,氯硝柳胺显著抑制C42B MR细胞的克隆形成。此外,氯硝柳胺显著增强了C42B MR和CWR22rv1细胞中恩杂鲁胺对克隆形成的抑制。这些结果表明,氯硝柳胺抑制

前列腺癌细胞生长并诱导细胞凋亡,对正常前列腺上皮细胞影响很小。

[0312] 为检验前列腺癌细胞中AR-V7的细胞生长功能,将CWR22rv1细胞在CS-FBS条件下通过AR外显子7siRNA或AR-V7siRNA进行瞬时转染。在随后的天数中计数细胞数量,如图10所示,基因下调的(knocked-down)全长AR对CWR22rv1细胞具有中度的增长抑制效果,而基因下调的AR-V7显著抑制细胞生长。基因下调的效果被免疫印迹试验(图10)所证实,这表明AR-V7功能对前列腺癌细胞生长是重要的,因而靶向AR-V7是一种治疗CRPC患者的有效策略。

[0313] iii. 氯硝柳胺通过提高蛋白降解来抑制AR-V7蛋白表达

[0314] 为确定氯硝柳胺是否影响AR-V7表达,将表达高内源性AR-V7的CWR22rv1细胞用不同浓度的氯硝柳胺处理过夜,提取全细胞蛋白,如图3A所示,氯硝柳胺以剂量依赖性方式抑制AR-V7蛋白。 $0.5\mu\text{M}$ 氯硝柳胺显著抑制AR-V7表达,但对全长AR(AR FL)的表达影响很小,这表明氯硝柳胺对截断型AR的抑制有更大的效果。氯硝柳胺也以时间依赖性方式抑制AR-V7蛋白表达(图3B)。为了进一步说明氯硝柳胺如何降低AR-V7蛋白表达,在转录水平下测定了氯硝柳胺对AR-V7表达的影响。如图3C所示,氯硝柳胺并不影响AR-V7或全长AR的mRNA水平,这表明氯硝柳胺在转录水平下不影响AR-V7表达。接下来,在新蛋白合成被放线菌酮阻断后(作为一种下调AR-V7蛋白水平的潜在机制),检测氯硝柳胺对AR-V7蛋白降解的影响。在有或没有 $2\mu\text{M}$ 氯硝柳胺时,在0小时加入蛋白合成抑制剂放线菌酮($50\mu\text{g}/\text{mL}$)。在特定的时间点收获细胞,通过使用针对AR-V7的特异性抗体的免疫印迹法,测定AR-V7蛋白水平。如图3D和32所示,在经氯硝柳胺处理的细胞中,AR-V7蛋白的半衰期从对照细胞中的8小时减至不到4小时。类似结果是由泛素-蛋白酶体系统所致的系统性蛋白降解,对保持蛋白稳定性起到重要的作用。为了检测氯硝柳胺诱导AR-V7蛋白降解是否通过泛素-蛋白酶体系,将26S蛋白酶体抑制剂MG132($5\mu\text{M}$)加到经氯硝柳胺处理的细胞中。MG132能延缓氯硝柳胺对AR-V7蛋白水平的影响(图3E),这表明氯硝柳胺通过蛋白酶体依赖性途径诱导AR-V7的降解。如图32所示,与未处理对照组比较,氯硝柳胺增加了AR-V7蛋白降解。

[0315] iv. 氯硝柳胺抑制AR-V7转录活性并减少AR-V7被募集到PSA启动子

[0316] 本测试证实了恩杂鲁胺不能抑制AR-V7转录活性,也不能减少前列腺癌细胞中AR-V7被募集到PSA启动子(图9)。为了检验氯硝柳胺是否对AR-V7转录活性具有影响,使用293AR-V7-PSA-E/P-LUC细胞体系,如图4A所示,氯硝柳胺显著抑制AR-V7转录活性,而恩杂鲁胺没有影响。为进一步检验该影响是否可以转化到前列腺癌细胞体系,将LNCaP细胞通过AR-V7瞬时转染,然后在有或没有DHT时用氯硝柳胺或恩杂鲁胺处理过夜,如图4B所示。氯硝柳胺和恩杂鲁胺都显著抑制DHT诱导的AR转录活性,但只有氯硝柳胺抑制AR-V7转录活性。与LNCaP细胞相似,在被AR-V7稳定转染的C4-2细胞中,AR-V7转录活性被氯硝柳胺而不被恩杂鲁胺显著抑制(图4C)。该结果也被PSA ELISA所证实,如图4D所示。C4-2AR-V7细胞在CS-FBS条件下培养,显示比C4-2neo细胞更高的PSA表达水平。氯硝柳胺显著抑制C4-2AR-V7细胞中的PSA水平。这种现象被免疫印迹试验所证实。为进一步剖析氯硝柳胺对AR-V7抑制作用的机制,进行ChIP试验。C4-2AR-V7细胞在CS-FBS条件下培养3天,然后用 $1\mu\text{M}$ 氯硝柳胺或 $20\mu\text{M}$ 恩杂鲁胺处理过夜,全细胞裂解液进行ChIP试验,如图4D所示,氯硝柳胺显著减少AR-V7被募集到PSA启动子,而恩杂鲁胺没有效果。总之,结果证实氯硝柳胺具有在蛋白和mRNA水平成为新型AR-V7抑制剂的潜力。

[0317] 该结果也被免疫印迹试验所证实,如图30所示,氯硝柳胺显著抑制PSA蛋白表达,但恩杂鲁胺效果很小。进行ChIP试验。C4-2AR-V7细胞在CS-FBS条件下培养3天后,用氯硝柳胺($0.5\mu\text{M}$ 和 $1\mu\text{M}$)或 $20\mu\text{M}$ 恩杂鲁胺处理过夜,将全细胞裂解液进行ChIP试验。如图31所示,氯硝柳胺显著减少将AR-V7被募集到PSA启动子,而恩杂鲁胺没有效果。这些结果表明,氯硝柳胺能够抑制AR-V7反式激活而恩杂鲁胺不能抑制AR-V7反式激活。将C4-2AR-V7细胞在具有不同浓度氯硝柳胺的活性炭脱色血清培养基中孵育过夜后,得到类似结果,如图13所示。

[0318] 在LNCap-Stat3C细胞中得到类似结果。如图20所示,氯硝柳胺和恩杂鲁胺联合处理,抑制了将AR-V7被募集到PSA启动子。

[0319] v. 经恩杂鲁胺长期处理的C4-2B细胞表达AR变异体且对氯硝柳胺敏感

[0320] 已显示AR变异体是诱导恩杂鲁胺耐受性的可能机制之一,但到目前为止,很少有证据表明恩杂鲁胺诱导前列腺癌细胞或患者中的AR变异体。为了解决这一问题,C4-2B细胞在FBS条件下经恩杂鲁胺长期处理,如图5A和B所示。在含恩杂鲁胺的培养基中培养12个月后,C4-2B MR(耐恩杂鲁胺的C4-2B)细胞比C4-2B亲本细胞表现出更强的耐受性。接下来,我们检测了C4-2B亲本细胞和C4-2B MR细胞中AR变异体水平,如图5C所示。C4-2B MR细胞比C4-2B亲本细胞表达更高的AR变异体mRNA水平,包括AR-V1、AR-V7、AR1/2/2b和AR1/2/3/2b。结果也被免疫印迹试验所证实,如图5D所示。与C4-2B亲本细胞相比,C4-2B MR细胞在细胞核中表达显著更高的AR-V7。在C4-2B MR细胞中全长AR也被上调,这表明AR信号的过表达可能是一种对恩杂鲁胺耐受的重要机制。经下调的AR-V7显著扭转C4-2B MR细胞中恩杂鲁胺耐受性(图5E),这表明AR-V7是C4-2B MR细胞中恩杂鲁胺耐受性的主要驱动力。接下来,在C4-2B MR细胞上检验了氯硝柳胺的影响,如图5F所示。C4-2B MR细胞对恩杂鲁胺耐受,但被氯硝柳胺以剂量依赖性方式显著地抑制。该结果也被克隆形成试验所证实,如图5G所示,其中 $0.5\mu\text{M}$ 氯硝柳胺显著抑制C4-2B MR细胞的克隆形成及克隆大小(colony size)。总之,上述数据表明,AR变异体可能是恩杂鲁胺耐受的一种重要机制,靶向AR信号传导将是一种治疗晚期前列腺癌患者的有效策略。

[0321] 如图35-36所示,氯硝柳胺而不是恩杂鲁胺显著抑制C4-2B MR细胞克隆形成。如图35-36所示,氯硝柳胺而不是恩杂鲁胺显著抑制C4-2B MR细胞克隆大小。如图21所示,氯硝柳胺和恩杂鲁胺联合处理显著抑制C4-2B、C4-2B MR、CB-2B TAXR和C4-2B TAXR-MR细胞的细胞生长。如图22所示,氯硝柳胺增强了恩杂鲁胺对C4-2B和C4-2B MR细胞的生长或存活率的影响。如图23所示,氯硝柳胺增强了阿比特龙对C4-2B和C4-2B AbiR细胞的生长或存活率的影响。

[0322] vi. 氯硝柳胺通过对AR-V7的抑制,增强了恩杂鲁胺和阿比特龙的疗效

[0323] AR变异体已经显示可诱导CWR22rv1细胞中的恩杂鲁胺耐受性。本测试证实了AR-V7而不是全长AR主导了CWR22rv1细胞生长,CWR22rv1细胞比经阿比特龙处理的LNCaP和C4-2B细胞更具有耐受性(图11)。为确定AR-V7是否也诱导CWR22rv1细胞中阿比特龙耐受性,将AR-V7特异性siRNA或AR外显子7siRNA瞬时转染到CWR22rv1细胞中,然后用 $10\mu\text{M}$ 阿比特龙处理48小时,如图11B所示。经下调的AR-V7明显使CWR22rv1细胞对阿比特龙重新致敏,这表明AR-V7也可能诱发前列腺癌细胞中的阿比特龙耐受性。为检验被筛选为AR-V7抑制剂的氯硝柳胺是否可逆转前列腺癌细胞中的恩杂鲁胺或阿比特龙的耐受性,将CWR22rv1细胞用氯

硝柳胺处理,或用氯硝柳胺与恩杂鲁胺和阿比特龙的联合处理48小时,如图6A和B所示。单一处理对CWR22rv1细胞具有适度的影响,而联合处理以时间依赖性方式显著抑制了细胞生长。用氯硝柳胺,或用氯硝柳胺和比卡鲁胺对CWR22rv1细胞处理后,得到类似的结果,如图14所示。对恩杂鲁胺耐受和阿比特龙耐受细胞系的影响也进行了测试。与单一处理相比,氯硝柳胺与恩杂鲁胺或阿比特龙的联合处理,显著抑制了C4-2B MR或C4-2B AbiR细胞生长(图6C和图6D)。克隆形成试验(图6E)也证实了抑制效果。由于AR-V7在前列腺癌细胞中具有作为恩杂鲁胺和阿比特龙耐受机制的功能,因此检测了经氯硝柳胺和恩杂鲁胺处理的CWR22rv1细胞中AR-V7水平,如图7A和15所示。经氯硝柳胺单一处理降低了AR-V7表达,但当与恩杂鲁胺或阿比特龙联合处理时,抑制效果显著增强,这表明抑制AR-V7表达,可能是一种对恩杂鲁胺或阿比特龙耐受性的直接治疗策略。在C4-2B MR细胞(图7B)中也证实了该结果。总之,结果表明,作为一种新型AR-V7抑制剂的氯硝柳胺,对于晚期前列腺癌患者尤其对于那些对恩杂鲁胺或阿比特龙耐受的患者,可能是一种有效的药物。

[0324] vii.抑制STAT3和逆转恩杂鲁胺耐受性

[0325] 用细胞生长试验及克隆形成试验,检测前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的敏感性。进行定量逆转录-PCR、ELISA和免疫印迹检测IL-6、c-Myc、生存素和AR的表达水平。使用STAT3特异性siRNA下调STAT3的表达。进行ChIP试验,检验AR被募集到PSA启动子的募集情况。

[0326] 结果表明,表达自分泌IL-6的前列腺癌细胞对恩杂鲁胺有耐受性,并且自分泌IL-6导致STAT3和其靶基因的组成型激活。STAT3的下调导致前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的敏感性增加。前列腺癌细胞中组成型激活STAT3的过表达诱导对恩杂鲁胺治疗的耐受性。前列腺癌细胞中组成型激活STAT3也增强了将AR募集到PSA启动子,这样它就不会被恩杂鲁胺破坏。STAT3抑制剂氯硝柳胺逆转了前列腺癌细胞中恩杂鲁胺耐受性,而恩杂鲁胺和氯硝柳胺的联合处理显著抑制细胞生长,诱导细胞凋亡和抑制克隆形成。自分泌IL-6通路,通过STAT3组成型激活,诱导前列腺癌细胞中恩杂鲁胺耐受性。

[0327] 在此处观察到,前列腺癌细胞中的自分泌IL-6诱导对恩杂鲁胺的耐受性。

[0328] viii.抑制STAT3和逆转恩杂鲁胺耐受性

[0329] LNCaP-neo、LNCaP-s17或LNCaP-STAT3C细胞,按照所示方式进行处理。DNA-AR蛋白复合物通过加入1%甲醛在细胞内交联。超声制备全细胞提取物,交联DNA-蛋白复合物的等分试样,通过在4℃下与AR特异性抗体(AR-C19;Santa Cruz Biotechnology)旋转孵育过夜来免疫沉淀。染色质-抗体复合物通过在4℃下与蛋白A/G琼脂糖珠旋转孵育1小时而从溶液中分离。洗涤结合的DNA-蛋白复合物,并用洗脱缓冲液(1%SDS和0.1mol/L NaHCO₃)将其从珠上洗脱,逆转交联,并提取DNA。利用跨越PSA启动子的近端或远端增强子AREs的引物,通过PCR分析得到的染色质制备物。同种匹配的IgG被用作对照。

[0330] IL-6的过表达增加了LNCaP细胞对恩杂鲁胺的耐受性。观察到LNCaP(LNCaP-s17)细胞中的IL-6自分泌表达,促进细胞生长并增加对比卡鲁胺治疗的耐受性。本测试检测了IL-6表达是否影响前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的反应,LNCaP-s17细胞经剂量渐增的恩杂鲁胺处理,并计数细胞数量。如图26A-C所示,与LNCaPs17细胞相比,LNCaP-neo细胞对恩杂鲁胺处理高度敏感。5μM浓度的恩杂鲁胺可降低LNCaP-neo细胞生长达30%以上,而对LNCaPs17细胞生长几乎没有影响。甚至在更高的恩杂鲁胺(40μM)浓度下,LNCaPs17细胞生长仅降低30%,而LNCaP-neo细胞生长几乎降低60%。

[0331] 进行克隆形成测试。LNCaP-neo细胞和LNCaP-s17细胞经20 μ M恩杂鲁胺处理,测定克隆形成能力。如图26A-C所示,在经20 μ M恩杂鲁胺处理的LNCaP-neo细胞中克隆形成能力被显著抑制,而LNCaP-s17细胞继续生长并形成克隆。

[0332] 已证实IL-6过表达与恩杂鲁胺耐受性相关。LNCaP-IL6+细胞(即通过在含IL-6的培养基中长期培育LNCaP细胞从而表达IL-6的LNCaP细胞),经10 μ M和20 μ M恩杂鲁胺在含有完全FBS的培养基中处理48小时。如图26D所示,恩杂鲁胺显著抑制LNCaP细胞生长。与此相反,恩杂鲁胺对LNCaP-IL6+细胞生长影响很小。总之,这些数据表明,前列腺癌细胞中IL-6过表达与恩杂鲁胺耐受性相关。

[0333] 自分泌IL-6组成型激活STAT3通路并提高前列腺癌细胞中雄激素受体的反式激活;其他报告已表明组成型STAT3激活是致癌的,并有助于肿瘤生长和转移。以往的研究表明STAT3在LNCaP-s17细胞中是组成型激活的。为测试LNCaP-s17细胞是否表现升高的STAT3信号,本检测测定了包括c-Myc、生存素、和Bcl-2的几种STAT3靶基因的表达水平。

[0334] 如图27A所示,LNCaP-s17细胞表达组成型激活的STAT3(在Tyr705磷酸化的STAT3)并比LNCaP-neo细胞表达更高的AR、c-Myc、生存素、和Bcl-2蛋白水平。与蛋白水平一致,LNCaP-s17细胞比LNCaP-neo细胞表达更高的c-Myc和生存素mRNA水平(图27B和C)。

[0335] LNCaP-s17细胞比LNCaP-neo细胞表达更高水平的IL-6mRNA和蛋白。(图27D和E)。

[0336] 该测试也测定了组成型激活的STAT3是否增加AR对ARE位点的募集,在LNCaP、LNCaP-s17和LNCaP-STAT3C细胞中进行了ChIP试验。如图27F所示,与LNCaP-neo细胞相比,LNCaP-s17细胞和LNCaP-STAT3C细胞显示出增强的将AR募集到PSA启动子的近端结合位点(AREI/II)和远端增强子结合位点(AREIII)的募集情况。

[0337] 总之,这些数据表明,IL-6过表达激活前列腺癌细胞中STAT3和AR的信号通路。

[0338] 下调(knocked-down)STAT3表达,将恢复LNCaP-s17细胞对恩杂鲁胺的敏感性:通过STAT3特异性的siRNA转染LNCaP-neo和LNCaP-s17细胞,从而确定STAT3是否与表达IL-6的前列腺癌细胞中的恩杂鲁胺耐受性相关。

[0339] 细胞经20 μ M恩杂鲁胺处理额外的3天,确定细胞数量。如图28A所示,LNCaP-s17细胞中经下调的STAT3表达,使细胞对恩杂鲁胺处理再次致敏。通过使用p-STAT3(Tyr705)和STAT3抗体的免疫印迹试验,证实了下调的影响(图28B)。此外,表达组成型活化的STAT3(STAT3C)的LNCaP细胞,表现出对恩杂鲁胺耐受性的增加(图28C)。这些结果表明STAT3激活与前列腺癌细胞中恩杂鲁胺耐受性相关。

[0340] 恩杂鲁胺的作用机制之一是抑制将AR募集到靶基因启动子中AREs。进行ChIP试验以测试STAT3-介导的恩杂鲁胺耐受性是否影响将AR募集到AREs。如图28D所示,恩杂鲁胺显著抑制LNCaP-neo细胞中将AR募集到PSA启动子的AREs(近端结合位点和远端结合位点)的募集情况。与此相反,在LNCaP-s17细胞和LNCaP-STAT3C细胞中,恩杂鲁胺对将AR募集到AREs的募集影响很小。这些结果表明,STAT3-介导的恩杂鲁胺耐受性可能与将AR募集到PSA启动子的AREs的募集情况受影响有关。

[0341] ix. 抑制STAT3和逆转恩杂鲁胺耐受性

[0342] 该试验检测一种小的非肽类药物-氯硝柳胺(图29A),是否能逆转前列腺癌细胞中恩杂鲁胺耐受性。该小的非肽类药物之前已被表明能逆转DU145细胞中STAT3表达。

[0343] 氯硝柳胺被观察到显著抑制前列腺癌细胞中STAT3激活(图29B)。

[0344] 该试验检测氯硝柳胺对STAT3激活的抑制是否能逆转LNCaP-s17细胞中恩杂鲁胺耐受性。如图29C所示,经20 μ M恩杂鲁胺处理,对LNCaP-s17细胞生长影响极小。然而,在0.25 μ M氯硝柳胺存在下,恩杂鲁胺显著抑制细胞生长(图29C),这可能是由于诱导凋亡性细胞死亡(图29D)。AG490,一种已知的Jak2-STAT3抑制剂,也观察到逆转恩杂鲁胺耐受性(图29C和D)。

[0345] 这些结果也已在时间依赖性实验中被证实。LNCaP-s17细胞在不同时间点用20 μ M恩杂鲁胺和0.25 μ M氯硝柳胺分别单独处理或联合处理。LNCaP-s17细胞生长在氯硝柳胺存在下被恩杂鲁胺显著抑制,而单独用恩杂鲁胺或氯硝柳胺处理则对细胞生长影响很小(图29E)。与细胞生长的抑制一致,LNCaP-s17细胞的克隆形成能力在氯硝柳胺存在下被恩杂鲁胺显著抑制(图29F)。总之,这些数据表明,通过抑制STAT3表达,氯硝柳胺能克服或逆转恩杂鲁胺耐受性。

[0346] 本实施例显示,IL-6和持续的STAT3激活之间的轴线,可能是与恩杂鲁胺耐受性相关的关键机制中的一种机制。

[0347] 本实施例表明,LNCaP细胞中自分泌IL-6激活STAT3通路并增强对恩杂鲁胺耐受性,同时下调LNCaP-s17细胞中的STAT3明显使LNCaP-s17细胞对恩杂鲁胺再致敏化。此外,将组成型活化的STAT3转染到LNCaP细胞,诱导恩杂鲁胺耐受性,这表明恩杂鲁胺耐受性可能被前列腺癌细胞中STAT3激活所驱动。

[0348] 本实施例表明,在表达组成型活化的STAT3的前列腺癌细胞系中,与LNCaP亲本细胞相比,恩杂鲁胺处理仅稍微降低将AR募集到PSA启动子的募集情况,这意味着持久性STAT3激活可能抵消恩杂鲁胺将AR募集到靶基因启动子的阻断作用。

[0349] 本实施例表明,氯硝柳胺抑制STAT3激活并显著逆转表现STAT3持续活化的前列腺癌细胞中恩杂鲁胺耐受性。恩杂鲁胺和氯硝柳胺联合治疗不仅抑制细胞增殖,而且还抑制克隆形成。

[0350] 本实施例表明,IL6-STAT3轴线与前列腺癌中恩杂鲁胺耐受性的发展有关。此外,本实施例表明,靶向IL6-STAT3轴线可能是对恩杂鲁胺耐受的患者的一种潜在治疗策略。

[0351] x. 氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞中的细胞生长、迁移、入侵和克隆形成

[0352] 如图16-19所示,氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞中细胞生长、迁移、入侵和克隆形成。该效果似乎是剂量依赖性的。如图24所示,氯硝柳胺抑制LNCaP-s17细胞中的细胞迁移或入侵,并且当氯硝柳胺与恩杂鲁胺联合使用时该效果增强。如图25所示,氯硝柳胺抑制LNCaP-Stat3C细胞的细胞迁移或入侵,并且当氯硝柳胺与恩杂鲁胺联合使用时该效果增强。

[0353] xi. 体内肿瘤发生试验

[0354] 该试验检测氯硝柳胺是否在体内克服前列腺癌的恩杂鲁胺耐受性。在该试验中,从CWR22rv1细胞产生的异种移植瘤,用载体(vehicle)、恩杂鲁胺、氯硝柳胺、或其组合处理3周。

[0355] CWR22rv1细胞(300万)与基质胶(1:1)混合,皮下注射到6-7周龄的雄性SCID小鼠的侧部。荷瘤小鼠(肿瘤体积约50-100mm³)被随机分为四组并做如下处理:(1)空白载体对照(含5%吐温80和5%乙醇的PBS,腹腔内给药i.p.), (2)恩杂鲁胺(25mg/kg,口服给药p.o.), (3)氯硝柳胺(25mg/kg,腹腔内给药), (4)恩杂鲁胺(25mg/kg,口服给药)+氯硝柳胺(25mg/kg,腹腔内给药)。一周两次用卡尺测量肿瘤,使用长度 $\times$ 宽度²/2计算肿瘤体积。处理

后3周,收集肿瘤组织。

[0356] 如图39所示,对恩杂鲁胺处理耐受的CWR22rv1细胞显示的肿瘤体积与那些用载体处理的对照组是相当的。单用氯硝柳胺缩小了肿瘤体积,而氯硝柳胺和恩杂鲁胺的联用协同地缩小CWR22rv1肿瘤。该试验表明,氯硝柳胺能克服恩杂鲁胺耐受性并恢复体内CWR22rv1异种移植物对恩杂鲁胺的敏感性。总之,这些结果表明,氯硝柳胺可改善恩杂鲁胺治疗和克服恩杂鲁胺耐受性。

[0357] 实施例2.氯硝柳胺对恩杂鲁胺耐受细胞的影响

[0358] CWR22Rv1细胞(400万)与基质胶(1:1)混合,皮下注射到雄性SCID小鼠的侧部,荷瘤小鼠(肿瘤体积约50-75mm³)按以下方式每周处理5天:对照(含5%PGE8000的水,口服,每天二次),氯硝柳胺(200mg/kg,口服,每天二次)。一周两次用卡尺测量肿瘤,使用长度x宽度²/2计算肿瘤体积。处理3周后收集肿瘤组织。结果如图40所示。如图40A-C所示,当口服给药时,氯硝柳胺显著抑制Rv1异种移植肿瘤的生长。如图40D所示,与未接受氯硝柳胺的对照组小鼠比较,体重的维持说明氯硝柳胺的剂量被很好地接受。

[0359] 检测了体外和体内氯硝柳胺与比卡鲁胺联合的效果。如图41所示,在体外,氯硝柳胺在CWR22Rv1细胞中以剂量依赖性方式(图41A)和时间依赖性方式(图41B)显著增强比卡鲁胺的效果。在体内,氯硝柳胺也增强小鼠异种移植模型中比卡鲁胺对CWR22Rv1细胞的治疗。

[0360] 在体内实验中,CWR22Rv1细胞(400万)与基质胶(1:1)混合,皮下注射到雄性SCID小鼠的侧部。荷瘤小鼠(肿瘤体积约50-75mm³)按以下方式每周处理5天:对照:(0.5%重量/体积(w/v)Methocel A4M,口服;和含5%吐温80和5%乙醇的PBS,腹腔内给药),比卡鲁胺(25mg/kg口服)、氯硝柳胺(25mg/kg腹腔内)和组合(25mg/kg比卡鲁胺,口服+25mg/kg氯硝柳胺,腹腔内给药)。一周两次用卡尺测量肿瘤,使用长度x宽度²/2计算肿瘤体积。处理3周后收集肿瘤组织。结果如图42所示。如图42A-C所示,在体内,氯硝柳胺显著增强比卡鲁胺对小鼠异种移植模型中CWR22Rv1细胞的效果。如图42D所示,与未接受氯硝柳胺的对照组小鼠比较,体重的维持说明,氯硝柳胺的剂量,不论是单独或是与比卡鲁胺联用,都能被很好地接受。

[0361] 实施例3.AKR1C3活化和胞分泌的雄激素导致对恩杂鲁胺的耐受

[0362] a. 引言

[0363] 通过雄激素阻断治疗靶向雄激素信号传导,已成为前列腺癌(PCa)临床干预的主要措施,虽然最初有效,但大部分患者只经历了短暂的受益,然后复发为目前不可治愈的去势抵抗性前列腺癌(CRPC)。恩杂鲁胺,一种第二代抗雄激素,最近被批准用于治疗去势抵抗性前列腺癌(CRPC)患者。尽管这些进展提供了暂时的缓解,但对恩杂鲁胺的耐受性频繁发生。一些潜在的耐受机制已被揭示,如AR变异体表达(Antonarakis等.,2014;Li等.,2013;Liu等.,2014a),IL6-STAT3-AR的轴线激活(Liu等,2014b)、ARF876L突变(Joseph等,2013;Korpai等,2013)和糖皮质激素受体(GR)过表达(Arora等,2013;Isikbay等,2014)。

[0364] 瘤体内雄激素生物合成,已清楚地被确定为一种CRPC机制(Cai等,2011;Ishizaki等,2013;Locke等,2008;Mohler等,2011),但其在恩杂鲁胺耐受性中的作用仍需要了解。临床报告已表明,经恩杂鲁胺治疗的患者的骨髓中睾酮水平是升高的(Efstathiou等.,2014;Efstathiou E,2011)。一连串的酶参与瘤内的雄激素的生物合成,包括CYP17A1、HSD3B和

AKR1C3。最近,已在CRPC患者中确认了在HSD3B1中获得功能突变(N367T),该功能突变被提出导致对恩杂鲁胺产生耐受性(Chang等.,2014;Chang等.,2013)。醛-酮还原酶家族1成员C3(AKR1C3)是一种多功能酶,是参与雄激素合成和代谢的最重要的基因之一。AKR1C3促使弱的雄激素雄烯二酮(A'二酮)和5 α -雄烯二酮(5 α -二酮)分别转化为更活泼的雄激素睾酮和DHT(Bauman等.,2006;Labrie等.,1997)。它催化类固醇的转换并调节类固醇受体的反式激活。AKR1C3的高表达是与前列腺癌的进展和侵袭性有关(Stanbrough等,2006;Wako等,2008)。在本发明中,研究了AKR1C3在恩杂鲁胺耐受的前列腺癌中的作用。

[0365] 在本研究中,开发了对恩杂鲁胺耐受的PCa细胞系,并发现:胞内分泌雄激素合成在恩杂鲁胺耐药的前列腺癌细胞中被激活。重要的类固醇生成酶之一,即AKR1C3,的激活,被确认为是一种导致恩杂鲁胺耐受的关键机制。使用shRNA或吡咯美辛抑制AKR1C3活性,可使恩杂鲁胺耐受的PCa细胞对恩杂鲁胺再致敏。此外,吡咯美辛和恩杂鲁胺的联用,导致显著抑制对恩杂鲁胺耐受的PCa异种移植肿瘤的生长。

[0366] b. 结果

[0367] i. 恩杂鲁胺耐受的前列腺癌细胞中AKR1C3活化的确定

[0368] 之前,恩杂鲁胺耐受的前列腺癌细胞(命名为C4-2B MDVR),是在含恩杂鲁胺的培养基中通过长期培养C4-2B细胞而产生(Liu等.,2014a)。如图43A和43B所示,恩杂鲁胺显著抑制C4-2B亲本细胞的增殖和克隆形成能力,但对C4-2B MDVR细胞影响很小。也在体内检测了用恩杂鲁胺处理C4-2B MDVR细胞的效果。如图43C所示,C4-2B MDVR异种移植对恩杂鲁胺耐受。经恩杂鲁胺处理3周后,C4-2B异种移植的肿瘤重量显著被恩杂鲁胺抑制,但经处理的C4-2B MDVR组的肿瘤重量与那些未经处理的对照组是相当的。这些结果表明,C4-2B MDVR细胞在体外和体内对恩杂鲁胺耐受。还测试了其他几种前列腺癌细胞系对恩杂鲁胺处理的反应。如图43D所示,LNCaP细胞对恩杂鲁胺敏感,而CWR22Rv1和LN-95细胞对恩杂鲁胺处理有耐受性,这与先前发表的研究(Dehm等,2008;Hu等,2013;Nadiminty等,2013)一致。

[0369] 瘤体内雄激素生物合成,已清楚地被确定为一种CRPC机制(Cai等,2011;Fankhauser等,2014;Ishizaki等,2013;Locke等,2008;Mohler等.,2011),但其在恩杂鲁胺耐受中的作用尚不明确。为进一步了解构成恩杂鲁胺耐受基础的潜在机制,对恩杂鲁胺耐受的C4-2B MDVR细胞和恩杂鲁胺敏感的C4-2B亲本细胞进行微阵列分析。通过基因集富集方法,对类固醇激素生物合成的编码转录本的表达进行分析。在参与激素生物合成的45种基因中,C4-2B MDVR细胞中的31种基因被上调而14种基因被下调。如图44A所示,与C4-2B亲本细胞相比,发现在C4-2B MDVR细胞中AKR1C3、AKR1C1、AKR1C2、HSD3B1、CYP17A1和SRD5A3表达增加,而UGT2B15、UGT2B17、CYP39A1、HSD17B6和SRD5A1表达降低。为证实基因表达数据,通过qRT-PCR使用特定引物来测量CYP17A1、HSD3B1、HSD3B2、HSD17B3、SRD5A1、AKR1C1/2和AKR1C3的mRNA水平。如图44B的左图所示,mRNA表达水平与微阵列数据一致。该结果也被免疫印迹试验所证实,如图44B的右图所示,C4-2B MDVR细胞表达AKR1C3、HSD3B和CYP17A1的蛋白水平显著高于C4-2B亲本细胞。这些结果表明,雄激素合成信号传导在恩杂鲁胺耐药的前列腺癌细胞中被上调。

[0370] ii. AKR1C3在转移性和复发性前列腺癌和恩杂鲁胺耐受的前列腺异种移植肿瘤中高表达

[0371] 已发现,AKR1C3在恩杂鲁胺耐受的C4-2B MDVR细胞中比在C4-2B亲本细胞中被上

调16倍之多。在以下不同的前列腺癌细胞系中检测了AKR1C3表达:VCaP、CWR22Rv1、LNCaP、LN-95、C4-2B和C4-2B-MDVR细胞。C4-2B MDVR、CWR22Rv1、和LN-95细胞对恩杂鲁胺耐受,而C4-2B和LNCaP细胞则对恩杂鲁胺敏感。如图45A所示,C4-2B MDVR、VCaP、CWR22Rv1和LN-95细胞均都表达明显更高水平的AKR1C3;C4-2B MDVR、CWR22Rv1和LN-95细胞表达更高水平的HSD3B;C4-2B MDVR和LN-95细胞还表达了更高水平的CYP17A1。肿瘤异种移植中AKR1C3表达也通过IHC进行了检测,如图45B所示,C4-2B MDVR和CWR22Rv1肿瘤比C4-2B亲本肿瘤表达更高水平的AKR1C3。也通过使用Oncomine和GEO数据库进行数据挖掘,以比较正常前列腺和前列腺癌中AKR1C3的表达。正常前列腺和原发性前列腺癌在两种独立的前列腺数据集中表达相似水平的AKR1C3,而在GEO数据集中的转移性前列腺癌中,AKR1C3显著升高(图45C),这与之前的报告(Mitsiades等.,2012;Montgomery等.,2008)相一致。进一步探讨了AKR1C3与前列腺癌疾病进展的相关性。如图45D所示,AKR1C3与Gleason分级以及和Oncomine中两种独立的前列腺数据集中的前列腺癌患者复发状态明显相关。总之,这些结果表明,AKR1C3在晚期前列腺癌和恩杂鲁胺耐受的前列腺癌异种移植中高表达。

[0372] iii. 胞内分泌的雄激素在恩杂鲁胺耐药的前列腺癌细胞中是升高的

[0373] AKR1C3(也称17 β HSD5)是参与雄激素合成和代谢的最重要的基因之一。AKR1C3促使弱的雄激素雄烯二酮(A'二酮)和5 α -雄烯二酮(5 α -二酮)分别转化为更活泼的雄激素,即睾酮和DHT。为进一步确认C4-2B MDVR细胞获得了细胞内雄激素合成,通过液相色谱-质谱法(LC-MS)分析了C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞中的类固醇代谢。C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞在无血清和无酚红的培养基中培养5天,从50x 10⁶细胞中提取类固醇代谢物,并进行LC-MS分析。如图46A-C所示,C4-2B MDVR细胞比C4-2B亲本细胞合成极高水平的睾酮(131.025vs 0.15pg/5千万细胞)、双氢睾酮(17.55vs 0pg/5千万细胞)、和DHEA(72.075vs 0pg/5千万细胞)。有趣的是,C4-2B MDVR细胞中活性的雌激素代谢物雌二醇显著降低(82.725vs 207.3pg/5千万细胞),这表明在C4-2B MDVR细胞中,雄激素的生物合成被激活,而从雄激素转化为雌激素被抑制。值得注意的是,与C4-2B亲代细胞相比,C4-2B MDVR细胞中参与胞内分泌雄激素合成的前体,如胆固醇、DHEA和黄体酮也被升高(图46C)。图46D显示了参与雄激素的合成和代谢类固醇合成酶,粗箭头和粗体表示,恩杂鲁胺耐药的前列腺癌细胞与C4-2B亲本细胞相比是上调的(图46D)。总之,这些结果表明,胞内分泌获得的雄激素合成在恩杂鲁胺耐受的前列腺癌细胞中是升高的。

[0374] iv. AKR1C3使前列腺癌细胞中恩杂鲁胺耐受

[0375] 已表明AKR1C3在恩杂鲁胺耐受的前列腺癌细胞和晚期前列腺癌患者中被上调,发明人接着检测了AKR1C3是否使恩杂鲁胺耐受。已发现,AKR1C3足以使前列腺癌细胞对恩杂鲁胺耐受。CWR22Rv1细胞或C4-2B MDVR细胞,用对照shRNA或AKR1C3shRNA进行瞬时转染,然后用恩杂鲁胺处理三天。如图47A和B所示,CWR22Rv1或C4-2B MDVR细胞对恩杂鲁胺耐受,而通过两种独立的shRNAs(#561和#694)使AKR1C3表达减少,则恢复了对恩杂鲁胺敏感性。shRNA导致AKR1C3的下调,这被免疫印迹试验所证实(图47C)。稳定表达AKR1C3的LNCaP细胞(LNCaP-AKR1C3)也被制备,以检测外源性表达AKR1C3是否诱导恩杂鲁胺耐受。LNCaP-AKR1C3和LNCaP-neo载体对照细胞,用不同浓度的恩杂鲁胺处理48小时后,计算细胞数量。如图47D所示,LNCaP-AKR1C3细胞比LNCaP-neo细胞表现出对恩杂鲁胺更高的耐受性。这些结果也被克隆形成能力试验所证实。对于恩杂鲁胺处理,LNCaP-AKR1C3细胞比LNCaP-neo对

照细胞表现出更显著的克隆形成能力(图47E和F)。总之,这些结果表明,AKR1C3的过表达使恩杂鲁胺耐受,而AKR1C3的下调使恩杂鲁胺耐受的前列腺癌细胞对恩杂鲁胺处理再致敏。

[0376] v. 吡唑美辛(一种AKR1C3活性抑制剂)克服了恩杂鲁胺耐受性

[0377] 吡唑美辛是一种用于降低发热、疼痛和炎症的非类固醇抗炎药(NSAID),已被证明它能够抑制AKR1C3的活性(Cai等.,2011;Flanagan等.,2012;Liedtke等.,2013)。为进一步检验AKR1C3在恩杂鲁胺耐受上的作用,吡唑美辛被用于阻碍AKR1C3的激活,并检验了在体外和体内情况下,PCa细胞对恩杂鲁胺处理反应的效果。如图48A左图所示,吡唑美辛在10 μ M下对CWR22Rv1细胞生长没有效果,但在20 μ M下稍微抑制了细胞生长。然而,吡唑美辛与恩杂鲁胺的联用,显著抑制了恩杂鲁胺耐受的CWR22Rv1细胞生长。该结果也被克隆形成试验所证实。如图48A右图所示,吡唑美辛与恩杂鲁胺的联用,显著抑制了CWR22Rv1细胞中的克隆数并减少了克隆大小。类似结果也在C4-2B MDVR细胞中得到(图48B)。为检测吡唑美辛对AKR1C3抑制是否在体内克服了对恩杂鲁胺处理的耐受,采用了CWR22Rv1异种移植模型。如图48C所示,虽然CWR22Rv1肿瘤对恩杂鲁胺处理耐受,但吡唑美辛明显抑制了肿瘤的生长。吡唑美辛与恩杂鲁胺的联用,进一步抑制CWR22Rv1异种移植物的肿瘤生长。Ki67免疫组化染色表明,细胞增殖被吡唑美辛显著抑制,并更进一步被联合治疗所抑制(图48D)。总之,这些结果表明,吡唑美辛对AKR1C3的抑制减少恩杂鲁胺耐受的肿瘤生长,并且恩杂鲁胺与吡唑美辛的联用进一步减少了恩杂鲁胺耐受的前列腺癌的肿瘤生长。这些结果表明,吡唑美辛对AKR1C3的抑制增强恩杂鲁胺的细胞杀伤效应。

[0378] c. 讨论

[0379] 第二代雄激素拮抗剂恩杂鲁胺,代表了对晚期转移性CRPC治疗选项上的一个进步(Scher等.,2010;Scher等.,2012)。然而,最初的应答者不可避免地产生耐受性。与恩杂鲁胺耐受相关的潜在机制已成为迫切研究的焦点。几种与恩杂鲁胺耐受相关的新型机制之前已被确认,其中包括NF- κ B/p53激活(Cui等.,2014;Nadiminty等.,2013),AR-V7(Liu等.,2014a;Nadiminty等.,2013),STAT3(Liu等.,2014b),和细胞自噬的诱导(Nguyen等.,2014)。在本研究中,AKR1C3激活和胞内分泌的雄激素的升高,被确定为导致恩杂鲁胺耐受的潜在机制。本研究表明,AKR1C3在恩杂鲁胺耐受的前列腺癌细胞中过表达。此外,本研究显示AKR1C3过表达赋予恩杂鲁胺耐受性,而AKR1C3的下调使前列腺癌细胞对于恩杂鲁胺处理敏感化。此外,AKR1C3过表达表现在临床转移性前列腺癌中并且与疾病发展有关。还表明,可能通过增加类固醇生成酶(如AKR1C3)的表达,使包括雄激素在内的胞内分泌类固醇在恩杂鲁胺耐受细胞中被提高。还表明,吡唑美辛(一种潜在的AKR1C3抑制剂),可用于克服恩杂鲁胺耐受。对胞内分泌雄激素合成的提高以及恩杂鲁胺耐受细胞中AKR1C3激活被增强的发现,揭示了一种恩杂鲁胺耐受CRPC的发展和进展的新机制。共同靶向AKR1C3有可能克服耐受性,并实现男性对第二代抗雄激素治疗的持久反应。

[0380] 胞内的分泌雄激素生物合成,已被确定为一种CRPC机制(Cai等.,2011;Fankhauser等.,2014;Ishizaki等.,2013;Locke等.,2008;Mohler等.,2011)。许多酶参与了雄激素的合成,包括CYP17A1、AKR1C3和HSD3B。CYP17A1在临床治疗中能被阿比特龙抑制(de Bono等.,2011;Ryan等.,2013)。AKR1C3是一种参与类固醇生物合成的类固醇生成酶,并介导从生物合成中从雄烯二酮到睾酮的最后一步。它催化类固醇的转换并调节甾体受体的反式激活。AKR1C3表达的提高已与前列腺癌(Pca)进展和侵袭性相关(Stanbrough等.,2006;Wako等.,

2008)。AKR1C3也被确认为一种AR共活化因子(Yepuru等., 2013)。在本研究中,基因富集分析被用于比较恩杂鲁胺耐受细胞和恩杂鲁胺敏感细胞。已发现类固醇生物合成基因在C4-2B MDVR细胞中被高度富集。几种参与雄激素合成的重要基因,如AKR1C3、HSD3B和CYP17A1在恩杂鲁胺耐受细胞中被上调。与C4-2B或LNCaP细胞相比,在另一个新的(de novo)恩杂鲁胺耐受细胞系CWR22Rv1中,AKR1C3被更高水平地表达,这表明AKR1C3在恩杂鲁胺耐受中起着关键的作用。为进一步证实C4-2B MDVR细胞获得了胞内分泌雄激素合成,对C4-2B亲本和C4-2BMDVR细胞中类固醇水平通过液相色谱-质谱法(LC-MS)进行测定。与C4-2B亲本细胞相比,除了恩杂鲁胺耐受细胞中更高的睾酮和DHT水平外,C4-2B-MDVR细胞中诸如胆固醇、DHEA和黄体酮等睾酮前体的水平均被提高。这些结果表明,AKR1C3在恩杂鲁胺耐受的前列腺癌细胞中被显著提高,这可能导致恩杂鲁胺耐受细胞中睾酮和DHT的水平更高。

[0381] 已开发几种靶向AKR1C3激活的抑制剂,包括吲哚美辛(Flanagan等., 2012)。吲哚美辛是一种用于减少发热、疼痛和炎症的非甾体抗炎药(NSAID)。几项研究显示,吲哚美辛具有增加癌细胞对抗癌药物敏感性的潜能,例如增加人黑色素瘤细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性(Tse等, 2013),和增加结肠癌细胞对顺铂的敏感性(Brunelli等, 2012)。吲哚美辛也具有抑制PSA和ERG蛋白表达并降低复发性VCaP异种移植肿瘤中睾酮和DHT水平的能力(Cai等, 2011)。在本研究中,已显示吲哚美辛对AKR1C3酶活性的抑制,在体内和体外均恢复恩杂鲁胺在恩杂鲁胺耐受前列腺癌细胞中的敏感性。此外,吲哚美辛和恩杂鲁胺的联用,导致对恩杂鲁胺耐受肿瘤生长的明显更强的抑制作用。本文所述数据表明,抑制AKR1C3可恢复恩杂鲁胺耐受患者的抗肿瘤效果。

[0382] 综合考虑,本发明的结果表明,AKR1C3激活和由此产生的胞内分泌雄激素合成,赋予了前列腺癌细胞恩杂鲁胺耐受性。shRNA或吲哚美辛对AKR1C3的抑制克服了恩杂鲁胺耐受性。此外,吲哚美辛和恩杂鲁胺的联用导致对恩杂鲁胺耐受肿瘤生长产生显著抑制。因此靶向AKR1C3为恩杂鲁胺耐受患者提供一种有效的治疗策略。

[0383] d. 实验步骤

[0384] i. 试剂和细胞培养

[0385] LNCaP、CWR22Rv1、VCaP和HEK293T细胞从美国典型培养物保藏中心(ATCC, 马纳萨斯, VA)获得。所有细胞系实验在从ATCC获得后6个月内进行,或冷冻保存后复苏使用。ATCC使用短串联重复序列(STR)分析测试和验证细胞系。C4-2B细胞由加利福尼亚州洛杉矶市希德斯-西奈医疗中心的Leland Chung博士友好地提供并验证。LN-95细胞由宾夕法尼亚州匹兹堡大学的Joel Nelson博士友好地提供并验证。细胞保存在辅以含10%胎牛血清(FBS)、100单位/ml青霉素和0.1mg/ml链霉素的RPMI 1640中。LNCaP-neo和LNCaP-AKR1C3细胞通过空载体pcDNA3.1或pcDNA3.1(编码AKR1C3)对LNCaP细胞稳定转染而生成,并保存在含300μg/ml G418的RPMI1640培养基中。AKR1C3shRNA(TRCN0000026561和TRCN0000025694)购于Sigma。恩杂鲁胺耐受细胞参照如之前所描述的C4-2B MDVR(C4-2B恩杂鲁胺耐受)(Liu等., 2014a)。所有细胞37℃下保存在含5%二氧化碳的湿润培养箱中。

[0386] ii. 样品制备和类固醇分析

[0387] 类固醇提取和分析在之前已经描述(Gaikwad, 2013)。简单地说,5000万的C4-2B亲本和C4-2BMDVR细胞在无血清和无酚红的RPMI 1640培养基中培养5天,然后将细胞悬浮在4mL水/甲醇1:1的混合物中。悬浮物均质化,由此产生的匀浆在冰上冷却。高速离心5分钟除

去沉淀物质,移除上清液,并在SpeedVac(Labconco Inc.)中蒸发并经冻干机(Labconco Inc.)冻干。残留物悬浮在150 μ L的CH3OH/H2O(1:1)中,通过0.2 μ M超速离心过滤机(Millipore inc.)过滤并进行UPLC/MS-MS分析。在UPLC-MS/MS分析过程中运行双份样品。将样品置于冷却到8℃的Acquity样品管理器中以保存被分析物。纯标准品用于在样品分析前优化UPLC-MS/MS条件。在第一个样品之前也运行标准品混合物以防止因基体效应和日常仪器变化引起的误差。此外,在初始标准品之后(第一个样品之前),立即运行两种添加的样品,以校准因基体效应引起的所有分析物保留时间的漂移。在标准品和添加的样品运行后,注射空白液洗净注射器,除去遗留效应。

[0388] iii.UPLC-MS/MS分析的类型醇代谢物

[0389] 所有质谱实验在Waters Xevo-TQ三重四极杆质谱仪(Milford,MA,USA)上进行操作,使用以正离子(PI)和负离子(NI)模式的电喷雾电离(ESI)来记录MS和MS/MS谱,毛细管电压3.0kV,提取器(extractor)锥孔电压3V和检测器电压650V。锥孔气流量设定为50L/h,脱溶剂气流量保持在600L/h。源温和脱溶剂温度分别设定在150℃和350℃。改变碰撞能量以优化离子。采集范围在20–500Da。分析分离通过使用保持50℃并以0.15ml/min流速的Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ m 1X 150mm分析柱在UPLC系统上操作。梯度起始为100%A(含0.1%甲酸的水)和0%B(含0.1%甲酸的乙腈),2分钟后,在超过2分钟时间内变成80%A,然后在超过5分钟时间内变成45%A,接着在2分钟时间内变成20%A。最终在超过1分钟时间内变成最初的100%A,所得总分离时间为15分钟。来自UPLC柱的洗脱液被引入质谱仪中,使用MassLynx 4.1软件对所得数据进行分析 and 处理。

[0390] iv.cDNA微阵列分析

[0391] 微阵列分析在之前已经描述了(Zhu等,2013)。简单地说,在铺展 1×10^5 C4-2B亲本和C4-2B MDVR细胞后24小时,使用TRIzol试剂(Invitrogen)分离总RNA,并通过Eppendorf phase-lock-gel管纯化。所有样品的RNA质量通过RNA电泳法测试以确保RNA完整性。通过基因组共享资源(Genomics Shared Resource)(UC Davis医疗中心,萨克拉门托,CA)使用Affymetrix Human Gene1.0ST阵列对样品进行分析。通过Subio平台和信号网络分析(Ingenuity Pathway Analysis)(IPA)分析数据。

[0392] v.免疫印迹分析

[0393] 细胞蛋白提取物溶解在SDS-PAGE上,将蛋白转移到硝酸纤维素膜中。室温下在含5%牛奶的PBS/0.1%吐温-20中封闭1小时后,在4℃下用所示初级抗体[AKR1C3(A6229, Sigma);CYP17A1(SC-66849, Santa Cruz Biotechnology, 圣克鲁兹, CA);HSD3B(SC-28206, Santa Cruz Biotechnology, 圣克鲁兹, CA);微管蛋白(T5168, Sigma-Aldrich, 圣路易斯, MO)]对膜过夜孵育,微管蛋白被用作上样对照(loading control)。继二级抗体孵育后,免疫反应蛋白用增强的化学发光检测系统(Millipore, 比勒利卡, MA)可视化。

[0394] vi.细胞生长测定

[0395] C4-2BMDVR、CWR22Rv1细胞在含10%FBS RPMI 1640培养基中以密度为 0.5×10^5 细胞/孔的12孔板中接种,并通过AKR1C3shRNA或对照shRNA瞬时转染,然后用20 μ M恩杂鲁胺处理。3或5天后计算总细胞数。LNCaP-neo、LNCaP-AKR1C3或LN-95细胞用不同浓度的恩杂鲁胺处理48小时。计算总细胞数或计算细胞存活率(%)。细胞存活率(%)=(处理组细胞数/对照组细胞数) $\times$ 100%。

[0396] vii. 克隆生成试验

[0397] C4-2亲本或C4-2B MDVR细胞在含10%FBS的培养基中经DMSO、10 μ M或20 μ M恩杂鲁胺处理。CWR22Rv1细胞或C4-2B MDVR细胞经10 μ M或20 μ M吡哆美辛与或不与20 μ M恩杂鲁胺处理,细胞等密度(1500细胞/盘)地在100mm盘中铺展14天,每3天更换培养基;LNCaP-neo或LNCaP-AKR1C3细胞在含10%完全FBS的培养基中经DMSO或10 μ M恩杂鲁胺处理,细胞等密度(10000细胞/盘)地在100mm盘中铺展28天,克隆在用0.5%结晶紫/4%甲醛染色30分钟以前,先用PBS冲洗,计算克隆数量。

[0398] viii. 实时定量RT-PCR

[0399] 使用TriZOL试剂(Invitrogen)提取总RNAs。在经无RNA酶的RQ1 DNA酶(Promega)消化后制备cDNAs。使用Sso Fast Eva Green Supermix(Bio-Rad)按照制造商的说明以及之前描述的(Liu等,2011)对cDNAs进行实时逆转录PCR(RT-PCR)。每个反应通过肌动蛋白的共扩增正常化。三份样品在Bio-Rad CFX-96实时循环机的默认设置下运行。用于实时PCR的引物是:AKR1C3,5'-gagaagtaagctttggagggtcaca-3'(正向)和5'-caacctgctcctcattattgtataaatga-3'(反向);AKR1C1/2,5'-ggtcacttcatgcctgtcct-3'(正向)和5'-actctggtcgatgggaattg-3'(反向);HSD3B1,5'-agaatctagaccactcttctgtccagcttt-3'(正向)和5'-ctttgaattcaactatgtgaaggaatggaa-3'(反向);HSD3B2,5'-cgggcccaactcctacaag-3'(正向)和5'-ttttccagaggctcttcttctcgt-3'(反向);CYP17A1,5'-gggcggcctcaaattgg-3'(正向)和5'-cagcgaaggcgaaggcgataccctta-3'(反向);HSD17B3,5'-tgggacagtgggcagtga-3'(正向)和5'-cgagtacgctttcccaattcc-3'(反向);SRD5A1,5'-acgggcatcggtgcttaatt-3'(正向)和5'-ccaacagtggcataggctttc-3'(反向);和肌动蛋白,5'-agaactggcccttcttggagg-3'(正向)和5'-gtttttatgttctctatggg-3'(反向)。

[0400] ix. PSA的测定

[0401] 使用PSA ELISA试剂盒(KA0208,Abnova,Inc.,沃尔纳特,CA)按照制造商的说明对来自C4-2B亲本或C4-2B MDVR荷瘤小鼠的血清中的PSA水平进行测定。

[0402] x. 体内成瘤试验

[0403] C4-2B亲本或C4-2B MDVR细胞(400万)与基质胶(1:1)混合,并注入到6-7周雄性SCID小鼠的前列腺中。当血清PSA水平达到5ng/ml时,小鼠被随机分为两组(每组4只小鼠)并作如下处理:(1)空白对照(0.5%重量/体积(w/v)Methocel A4M口服),(2)恩杂鲁胺(25mg/kg,口服)。根据PSA水平监测肿瘤。处理3周后收集所有肿瘤组织。

[0404] CWR22rv1细胞(400万)与基质胶(1:1)混合,皮下注射到6-7周雄性SCID小鼠的侧腹部。荷瘤小鼠(肿瘤体积约50-100mm³)被随机分为四组(每组5只小鼠)并做如下处理:(1)空白对照(含5%吐温80和5%乙醇的PBS,腹腔),(2)恩杂鲁胺(25mg/kg,口服),(3)吡哆美辛(3mg/kg,腹腔),(4)恩杂鲁胺(25mg/kg,口服)+吡哆美辛(3mg/kg,腹腔)。一周两次用卡尺测量肿瘤,使用长度x宽度²/2计算肿瘤体积。处理3周后收集肿瘤组织。

[0405] xi. 免疫组化

[0406] 肿瘤被福尔马林固定,对石蜡包埋的组织块进行脱蜡、再水化,并阻断内源性过氧化物酶活性。在微波炉中在柠檬酸钠缓冲液(0.01mol/L,pH 6.0)中在1000W下进行抗原提取3分钟,然后在100W下进行20分钟。通过与含10%胎牛血清的PBS室温孵育30分钟阻断非

特异性抗体结合。然后将玻片(Slides)与抗-Ki-67(1:500;NeoMarker),抗-AKR1C3(1:100;Sigma)在4℃下孵育过夜。清洗玻片,然后与生物素结合的二级抗体孵育30分钟,接着与亲和素DH生物素化的辣根过氧化物酶复合物孵育30分钟(Vectastain ABC Elite试剂盒,Vector Laboratories)。该部分由二氨基联苯胺底物试剂盒(Vector Laboratories)开发(developed)并用苏木素复染。核染色细胞在5个不同的视觉区域中评分并计算。通过配有DP72相机的Olympus BX51显微镜拍照。

[0407] xii. 统计分析

[0408] 所有数据以平均值±平均值标准偏差(SD)方式呈现。使用Microsoft Excel分析工具进行统计分析。各组之间的差异通过单向方差分析(ANOVA)接着通过对均值比较的Scheffé步骤进行分析。 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

[0409] e. 文献

[0410] Antonarakis, E.S., Lu, C., Wang, H., Lubner, B., Nakazawa, M., Roeser, J.C., Chen, Y., Mohammad, T.A., Chen, Y., Fedor, H.L., 等人(2014). AR-V7与恩杂鲁胺和阿比特龙在前列腺癌中的耐药性(AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer). The New England journal of medicine 371, 1028-1038.

[0411] Arora, V.K., Schenkein, E., Murali, R., Subudhi, S.K., Wongvipat, J., Balbas, M.D., Shah, N., Cai, L., Efsthathiou, E., Logothetis, C., 等人(2013). 糖皮质激素受体通过绕过雄激素受体阻滞剂赋予抗雄激素抗性(Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade). Cell 155, 1309-1322.

[0412] Bauman, D.R., Steckelbroeck, S., Williams, M.V., Peehl, D.M., 和 Penning, T.M. (2006). 识别人前列腺中的能够将5 α 雄甾烷-3 α ,17 β -二醇转化为5 α -二氢睾酮的主要氧化3 α 羟基类固醇脱氢酶:对于雄激素依赖性疾病的潜在治疗靶标(Identification of the major oxidative 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in human prostate that converts 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol to 5 α -dihydrotestosterone: a potential therapeutic target for androgen-dependent disease). Mol Endocrinol 20, 444-458.

[0413] Brunelli, C., Amici, C., Angelini, M., Fracassi, C., Belardo, G., 和 Santoro, M.G. (2012). 非甾体抗炎药物吲哚美辛激活eIF2 α 激酶PKR在人大肠癌细胞引起平移块(The non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin activates the eIF2 α kinase PKR, causing a translational block in human colorectal cancer cells). The Biochemical journal 443, 379-386.

[0414] Cai, C., Chen, S., Ng, P., Bubley, G.J., Nelson, P.S., Mostaghel, E.A., Marck, B., Matsumoto, A.M., Simon, N.I., Wang, H., 等人(2011). 瘤内从头类固醇合成激活雄激素受体在去势抗性前列腺癌中并被CYP17A1抑制剂上调(Intratatumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors). Cancer research 71, 6503-6513.

[0415] Chang, K.H., Ercole, C.E., 和 Sharifi, N. (2014). 前列腺癌中雄激素代谢:从分子

机制到临床后果(Androgen metabolism in prostate cancer:from molecular mechanisms to clinical consequences).British journal of cancer 111, 1249-1254.

[0416] Chang,K.H.,Li,R.,Kuri,B.,Lotan,Y.,Roehrborn,C.G.,Liu,J.,Vessella,R.,Nelson,P.S.,Kapur,P.,Guo,X.,等人(2013).去势抗性前列腺癌中DHT合成中的增益功能突变(A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer).Cell 154,1074-1084.

[0417] Cui,Y.,Nadiminty,N.,Liu,C.,Lou,W.,Schwartz,C.T.,和Gao,A.C.(2014).通过NF- κ B2/p52上调糖代谢介导去势抗性前列腺癌细胞中的恩杂鲁胺抗性(Upregulation of glucose metabolism by NF-kappaB2/p52mediates enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells).Endocrine-related cancer 21,435-442.

[0418] de Bono,J.S.,Logothetis,C.J.,Molina,A.,Fizazi,K.,North,S.,Chu,L.,Chi,K.N.,Jones,R.J.,Goodman,O.B.,Jr.,Saad,F.,等人(2011).阿比特龙和在转移性前列腺癌中增加的存活率(Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer).The New England journal of medicine 364,1995-2005.

[0419] Dehm,S.M.,Schmidt,L.J.,Heemers,H.V.,Vessella,R.L.,和Tindall,D.J.(2008).剪接一种新颖的雄激素受体的外显子产生持续活性雄激素受体介导前列腺癌的治疗抗性(Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance).Cancer Res 68,5469-5477.

[0420] Efsthathiou,E.,Titus,M.,Wen,S.,Hoang,A.,Karlou,M.,Ashe,R.,Tu,S.M.,Aparicio,A.,Troncoso,P.,Mohler,J.,和Logothetis,C.J.(2014).恩杂鲁胺治疗骨转移去势抗性前列腺癌的分子特征(Molecular Characterization of Enzalutamide-treated Bone Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer).European urology10.1016/j.eururo.2014.05.005.

[0421] Efsthathiou E,T.M.,Tsavachidou D,Hoang A,Karlou M,Wen S,et al(2011).MDV3100影响雄激素受体(AR)信号和骨髓睾酮浓度调节:初步报告(MDV3100effects on androgen receptor(AR)signaling and bone marrow testosterone concentration modulation:Apreliminary report).ASCO Meeting Abstracts 29,4501.

[0422] Fankhauser,M.,Tan,Y.,Macintyre,G.,Haviv,I.,Hong,M.K.,Nguyen,T.,Pedersen,J.,Costello,A.J.,Hovens,C.M.,和Corcoran,N.M.(2014).在激素难治性前列腺癌中典型雄烯二酮降低是雄激素信号传输的主要来源(Canonical Androstenedione Reduction is the Predominant Source of Signalling Androgens in Hormone Refractory Prostate Cancer).Clinical cancer research:美国癌症研究协会的官方刊物doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3483.

[0423] Flanagan,J.U.,Yosaatmadja,Y.,Teague,R.M.,Chai,M.Z.,Turnbull,A.P.,和Squire,C.J.(2012).与醛-酮还原酶1C3复合的三类非甾体抗炎药的晶体结构(Crystal structures of three classes of non-steroidal anti-inflammatory drugs in

complex with aldo-keto reductase 1C3).PloS one 7,e43965.

[0424] Gaikwad,N.W.(2013).用于人体组织类固醇代谢分析的超高效液相色谱-串联质谱法(Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for profiling of steroid metabolome in human tissue).Analytical chemistry 85, 4951-4960.

[0425] Hu,R.,Lu,C.,Mostaghel,E.A.,Yegnasubramanian,S.,Gurel,M.,Tannahill,C., Edwards,J.,Isaacs,W.B.,Nelson,P.S.,Bluemn,E.,等人(2013).在去势抗性前列腺癌中通过配体依赖性全长雄激素受体介导的独特转录程序和它的剪接变体(Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer).Cancer Res72,3457-3462.

[0426] Ishizaki,F.,Nishiyama,T.,Kawasaki,T.,Miyashiro,Y.,Hara,N.,Takizawa,I.,Naito,M.,和Takahashi,K.(2013).在前列腺癌中雄激素匮乏促进瘤内从雄激素代谢产物合成双氢睾酮(Androgen deprivation promotes intratumoral synthesis of dihydrotestosterone from androgen metabolites in prostate cancer).Scientific reports 3,1528.

[0427] Isikbay,M.,Otto,K.,Kregel,S.,Kach,J.,Cai,Y.,Vander Griend,D.J., Conzen,S.D.,和Szmulewitz,R.Z.(2014).前列腺癌中糖皮质激素受体活性增强抗雄激素靶向治疗的抗性(Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer).Hormones&cancer 5,72-89.

[0428] Joseph,J.D.,Lu,N.,Qian,J.,Sensintaffar,J.,Shao,G.,Brigham,D.,Moon,M., Maneval,E.C.,Chen,I.,Darimont,B.,和Hager,J.H.(2013).临床相关的雄激素受体突变赋予第二代抗雄激素恩杂鲁胺和ARN-509抗性(A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide andARN-509).Cancer discovery 3,1020-1029.

[0429] Korpai,M.,Korn,J.M.,Gao,X.,Rakiec,D.P.,Ruddy,D.A.,Doshi,S.,Yuan,J., Kovats,S.G.,Kim,S.,Cooke,V.G.,等人(2013).雄激素受体的F876L突变赋予对MDV3100(恩杂鲁胺)的遗传和表型抗性(An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100(enzalutamide)).Cancer discovery 3,1030-1043.

[0430] Labrie,F.,Luu-The,V.,Lin,S.X.,Labrie,C.,Simard,J.,Breton,R.,和 Belanger,A.(1997).17 β -羟基类固醇脱氢酶在性类固醇生物学中的关键作用(The key role of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology).Steroids 62,148-158.

[0431] Li,Y.,Chan,S.C.,Brand,L.J.,Hwang,T.H.,Silverstein,K.A.,和Dehm,S.M.(2013).在去势抗性前列腺癌细胞系中雄激素受体的剪接变体介导恩杂鲁胺抗性(Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines).Cancer Res 73,483-489.

[0432] Liedtke,A.J.,Adeniji,A.O.,Chen,M.,Byrns,M.C.,Jin,Y.,Christianson,

D.W.,Marnett,L.J.,和Penning,T.M.(2013).开发在去势抗性前列腺癌中有效的和选择性的吲哚美辛类似物来抑制AKR1C3(517 β 类-羟基类固醇脱氢酶/前列腺素F合成酶)(Development of potent and selective indomethacin analogues for the inhibition ofAKR1C3(Type 517 β -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase)in castrate-resistant prostate cancer).Journal of medicinal chemistry 56,2429-2446.

[0433] Liu,C.,Lou,W.,Zhu,Y.,Nadiminty,N.,Schwartz,C.T.,Evans,C.P.,和Gao,A.C.(2014a).在去势抗性前列腺癌中氯硝柳胺抑制雄激素受体变体表达和克服恩杂鲁胺抗性(Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer).Clin Cancer Res 20,3198-3210.

[0434] Liu,C.,Nadiminty,N.,Tummala,R.,Chun,J.Y.,Lou,W.,Zhu,Y.,Sun,M.,Evans,C.P.,Zhou,Q.,和Gao,A.C.(2011).在去势抗性前列腺癌中穿心莲内酯针对雄激素受体通路(Andrographolide targets androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer).Genes Cancer 2,151-159.

[0435] Liu,C.,Zhu,Y.,Lou,W.,Cui,Y.,Evans,C.P.,和Gao,A.C.(2014b).在LNCaP衍生前列腺癌细胞中抑制组成型活性STAT3逆转恩杂鲁胺抗性(Inhibition of constitutively active STAT3reverses enzalutamide resistance in LNCaP derivative prostate cancer cells).Prostate 74,201-209.

[0436] Locke,J.A.,Guns,E.S.,Lubik,A.A.,Adomat,H.H.,Hendy,S.C.,Wood,C.A.,Ettinger,S.L.,Gleave,M.E.,和Nelson,C.C.(2008).在去势抗性前列腺癌的进展过程中通过瘤内从头类固醇合成增加雄激素水平(Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer).Cancer Res68,6407-6415.

[0437] Mitsiades,N.,Sung,C.C.,Schultz,N.,Danila,D.C.,He,B.,Eedunuri,V.K.,Fleisher,M.,Sander,C.,Sawyers,C.L.,和Scher,H.I.(2012).在转移性前列腺癌肿瘤中涉及雄激素合成及代谢的酶的异常表达的不同模式(Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors).Cancer research 72,6142-6152.

[0438] Mohler,J.L.,Titus,M.A.,Bai,S.,Kennerley,B.J.,Lih,F.B.,Tomer,K.B.,和Wilson,E.M.(2011).在前列腺癌中通过将雄甾烷二醇瘤内生物转化成二氢睾酮来活化雄激素受体(Activation of the androgen receptor by intratumoral bioconversion of androstanediol to dihydrotestosterone in prostate cancer).Cancer research 71, 1486-1496.

[0439] Montgomery,R.B.,Mostaghel,E.A.,Vessella,R.,Hess,D.L.,Kalhorn,T.F.,Higano,C.S.,True,L.D.,和Nelson,P.S.(2008).在转移性前列腺癌肿瘤内雄激素的维持:去势抗性肿瘤生长的机制(Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer:a mechanism for castration-resistant tumor growth).Cancer Res

68,4447-4454.

[0440] Nadiminty, N., Tummala, R., Liu, C., Yang, J., Lou, W., Evans, C.P., 和 Gao, A.C. (2013). 前列腺癌中 NF- κ B2/p52 诱导恩杂鲁胺抗性: 雄激素受体及其变体的作用 (NF- κ B2/p52 induces resistance to enzalutamide in prostate cancer: role of androgen receptor and its variants). *Molecular Cancer therapeutics* 12, 1629-1637.

[0441] Nguyen, H.G., Yang, J.C., Kung, H.J., Shi, X.B., Tilki, D., Lara, P.N., Jr., De Vere White, R.W., Gao, A.C., 和 Evans, C.P. (2014). 靶向自噬克服去势抗性前列腺癌细胞恩杂鲁胺抗性并提高在异种移植模型中的治疗反应 (Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model). *Oncogene* 33, 4521-4530.

[0442] Ryan, C.J., Smith, M.R., de Bono, J.S., Molina, A., Logothetis, C.J., de Souza, P., Fizazi, K., Mainwaring, P., Piulats, J.M., Ng, S., 等人 (2013). 无既往化疗的转移性前列腺癌中的阿比特龙 (Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy). *The New England journal of medicine* 368, 138-148.

[0443] Scher, H.I., Beer, T.M., Higano, C.S., Anand, A., Taplin, M.E., Efsthathiou, E., Rathkopf, D., Shelkey, J., Yu, E.Y., Alumkal, J., 等人 (2010). MDV3100 在去势抗性前列腺癌中的抗肿瘤作用: 1-2 期临床研究 (Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study). *Lancet* 375, 1437-1446.

[0444] Scher, H.I., Fizazi, K., Saad, F., Taplin, M.E., Sternberg, C.N., Miller, K., de Wit, R., Mulders, P., Chi, K.N., Shore, N.D., 等人 (2012). 化疗后使用恩杂鲁胺前列腺癌生存期延长恩杂鲁胺 (Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy). *N Engl J Med* 367, 1187-1197.

[0445] Stanbrough, M., Bubley, G.J., Ross, K., Golub, T.R., Rubin, M.A., Penning, T.M., Febbo, P.G., 和 Balk, S.P. (2006). 雄激素非依赖性前列腺癌中转换肾上腺雄激素为睾酮的基因表达增加 (Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer). *Cancer Res* 66, 2815-2825.

[0446] Tse, A.K., Cao, H.H., Cheng, C.Y., Kwan, H.Y., Yu, H., Fong, W.F., 和 Yu, Z.L. (2013). 吡啶美辛使 TRAIL 抗性黑色素瘤细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感通过 ROS 介导的死亡受体 5 的上调和存活素的下调 (Indomethacin Sensitizes TRAIL-Resistant Melanoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis through ROS-Mediated Upregulation of Death Receptor 5 and Downregulation of Survivin). *The Journal of investigative dermatology* 134, 1397-1407.

[0447] Wako, K., Kawasaki, T., Yamana, K., Suzuki, K., Jiang, S., Umezu, H., Nishiyama, T., Takahashi, K., Hamakubo, T., Kodama, T., 和 Naito, M. (2008). 通过雄激素转化酶的雄激素受体的表达与前列腺癌生物侵袭性相关联 (Expression of androgen receptor through androgen-converting enzymes is associated with biological aggressiveness in prostate cancer). *Journal of clinical pathology* 61, 448-454.

[0448] Yepuru, M., Wu, Z., Kulkarni, A., Yin, F., Barrett, C.M., Kim, J., Steiner, M.S., Miller, D.D., Dalton, J.T., 和 Narayanan, R. (2013). 类固醇合成酶AKR1C3是一种新型的雄激素受体选择性共激活因子促进前列腺癌的生长(Steroidogenic enzymeAKR1C3is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth). Clinical cancer research: 美国癌症研究协会的官方刊物19, 5613-5625.

[0449] Zhu, Y., Liu, C., Nadiminty, N., Lou, W., Tummala, R., Evans, C.P., 和 Gao, A.C. (2013). 在前列腺癌中抑制ABCB1表达克服了获得性多西他赛抗性(Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer). Molecular cancer therapeutics 12, 1829-1836.

[0450] 尽管为了清楚和理解, 用说明和示例的方式较为详细地描述了前述发明, 不必脱离本发明的精神和范围依据本发明的教导而所做出的某些变动, 改变, 修改和等价替换对本领域一般技术人员来说是显而易见的。因此, 对此处描述的实施例进行各种修改、改变等等在仅依据所附权利要求确定的本发明的范围内。那些本领域技术人员将很容易地意识到各种非关键参数可以被更改、改变或修改从而得到本质上相似的结果。也应该理解本文所用术语仅仅为了描述特定的实施例, 并不意味着限定, 因为本发明的范围仅被所附权利要求限制。此外, 本文提供的每篇文献以其全部内容通过引用同等程度地并入, 如同每篇文献各自通过引用并入一样。本申请与本文提供的文献之间存在冲突时, 本申请应占主导地位。

[0451] X. 非正式序列表

[0452] UCAAGGAACUCGAUCGUAAU (SEQ ID NO:1)

[0453] GUAGUUGUAAGUAUCAUGA (SEQ ID NO:2).

[0454] CTTACGCTGAGTACTTCGA (SEQ ID NO:3)

[0455] 引物序列

[0456] 用于实时PCR的引物:

[0457] AR-全长: 5'-AAG CCA GAG CTG TGC AGA TGA (SEQ ID NO:4)

[0458] 3'-TGT CCT GCA GCC ACT GGT TC (SEQ ID NO:5)

[0459] AR-V1: 5'-AAC AGA AGT ACC TGT GCG CC (SEQ ID NO:6)

[0460] 3'-TGA GAC TCC AAA CAC CCT CA (SEQ ID NO:7)

[0461] AR-V7: 5'-AAC AGA AGT ACC TGT GCG CC (SEQ ID NO:8)

[0462] 3'-TCA GGG TCT GGT CAT TTT GA (SEQ ID NO:9)

[0463] ARV1/2/2b: 5'-TGG ATG GAT AGC TAC TCC GG (SEQ ID NO:10)

[0464] 3'-GTT CAT TCT GAA AAA TCC TTC AGC (SEQ ID NO:11)

[0465] AR1/2/3/2b: 5'-AAC AGA AGT ACC TGT GCG CC (SEQ ID NO:12)

[0466] 3'-TTC TGT CAG TCC CAT TGG TG (SEQ ID NO:13)

[0467] 肌动蛋白: 5'-AGA ACT GGC CCT TCT TGG AGG (SEQ ID NO:14)

[0468] 3'-GTT TTT ATG TTC CTC TAT GGG (SEQ ID NO:15)

[0469] 用于ChIP试验的引物:

[0470] PSA启动子: AREI/II-5'-CCTAGATGAAGTCTCCATGAGCTACA (SEQ ID NO:16) AREI/II-3'-GGGAGGGAGAGCTAGCACTTG (近端) (SEQ ID NO:17)。

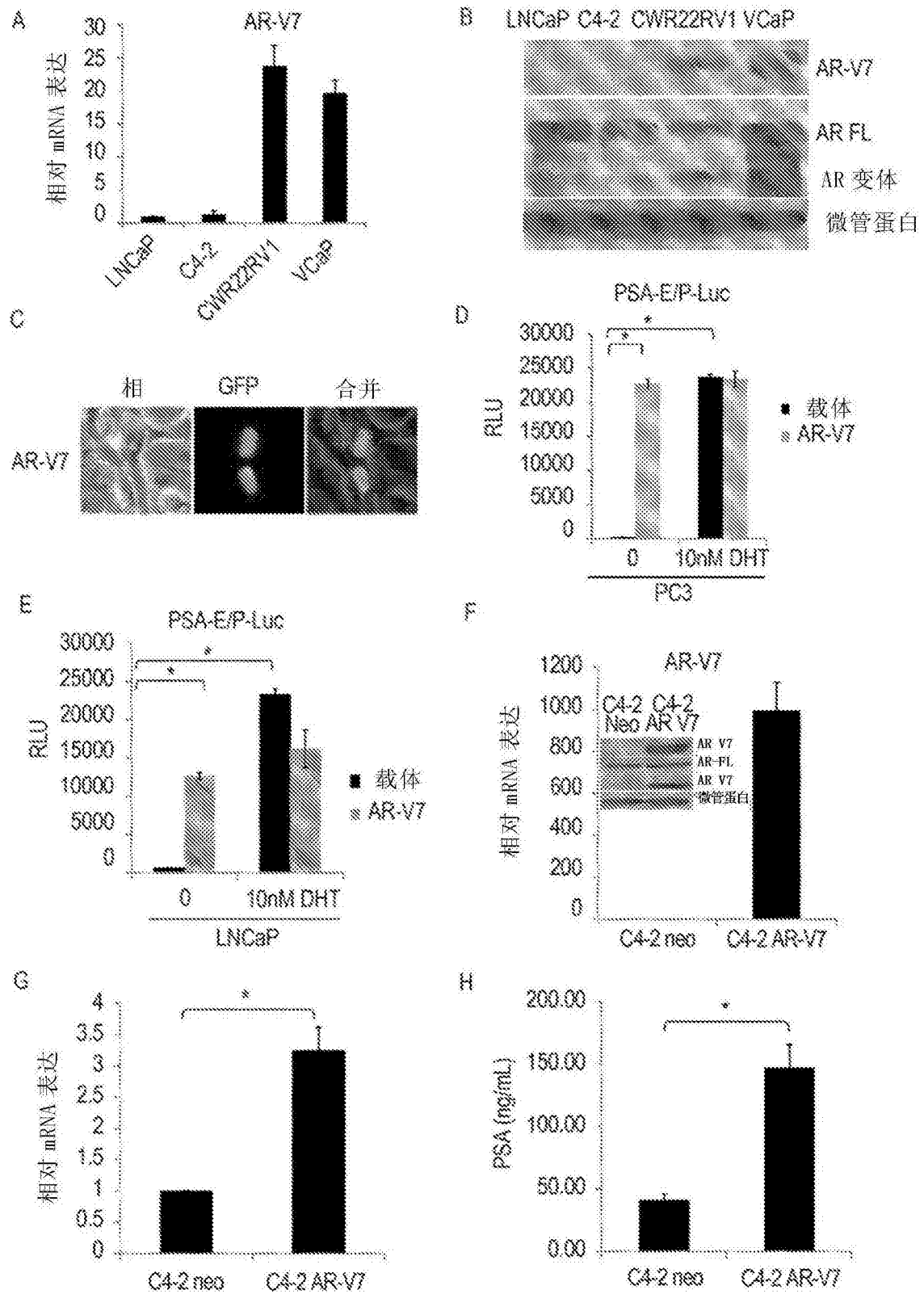


图1

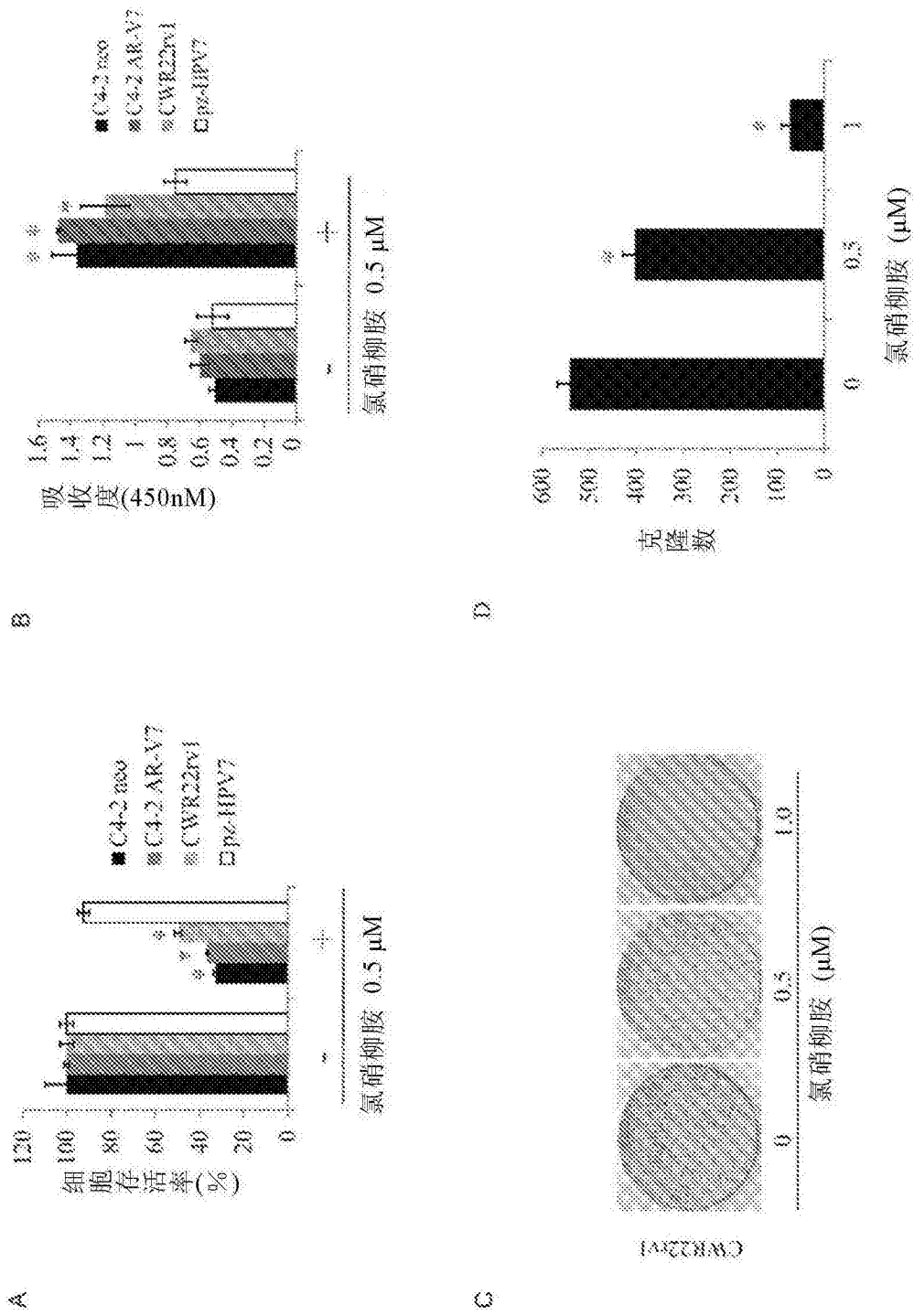


图2

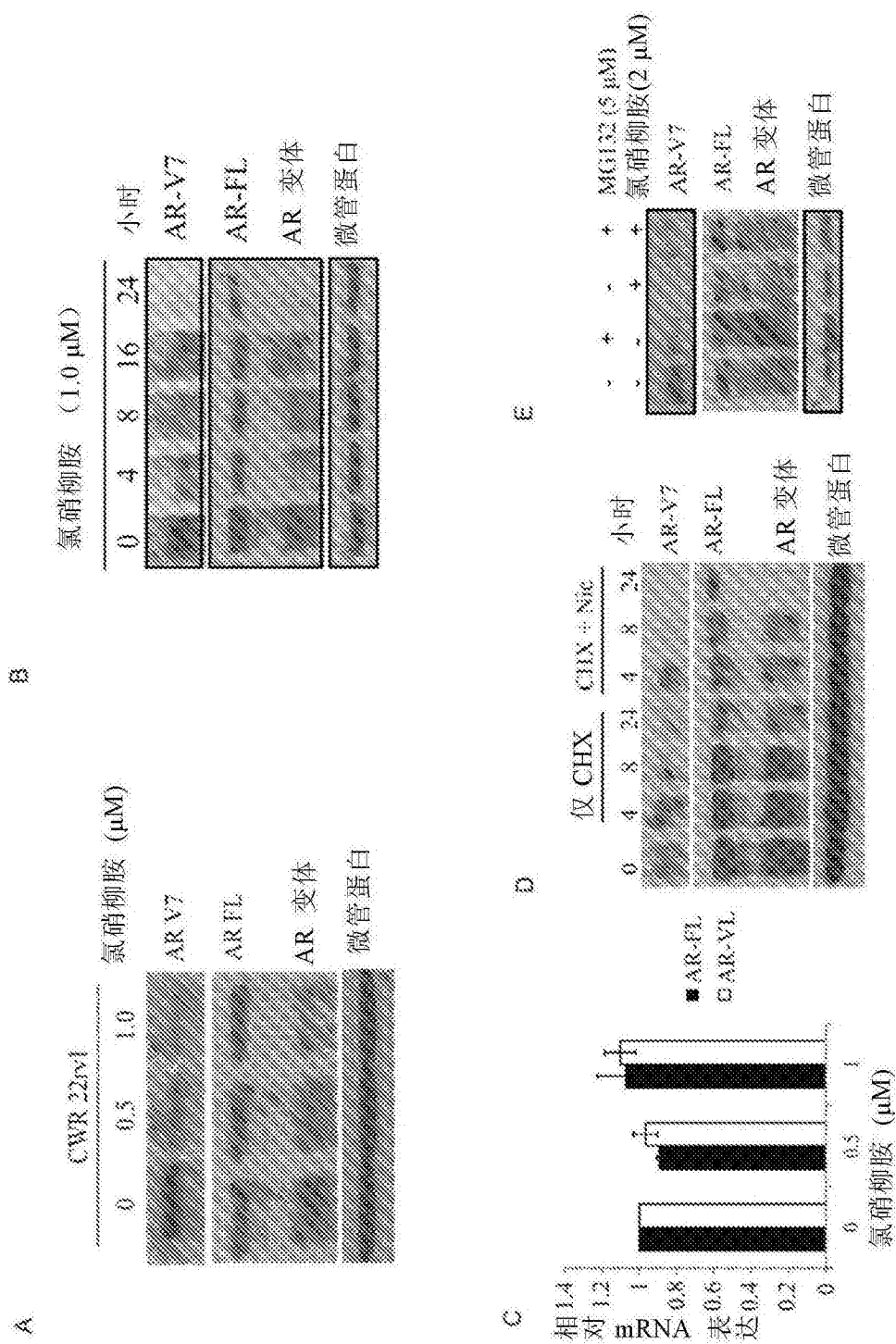


图3

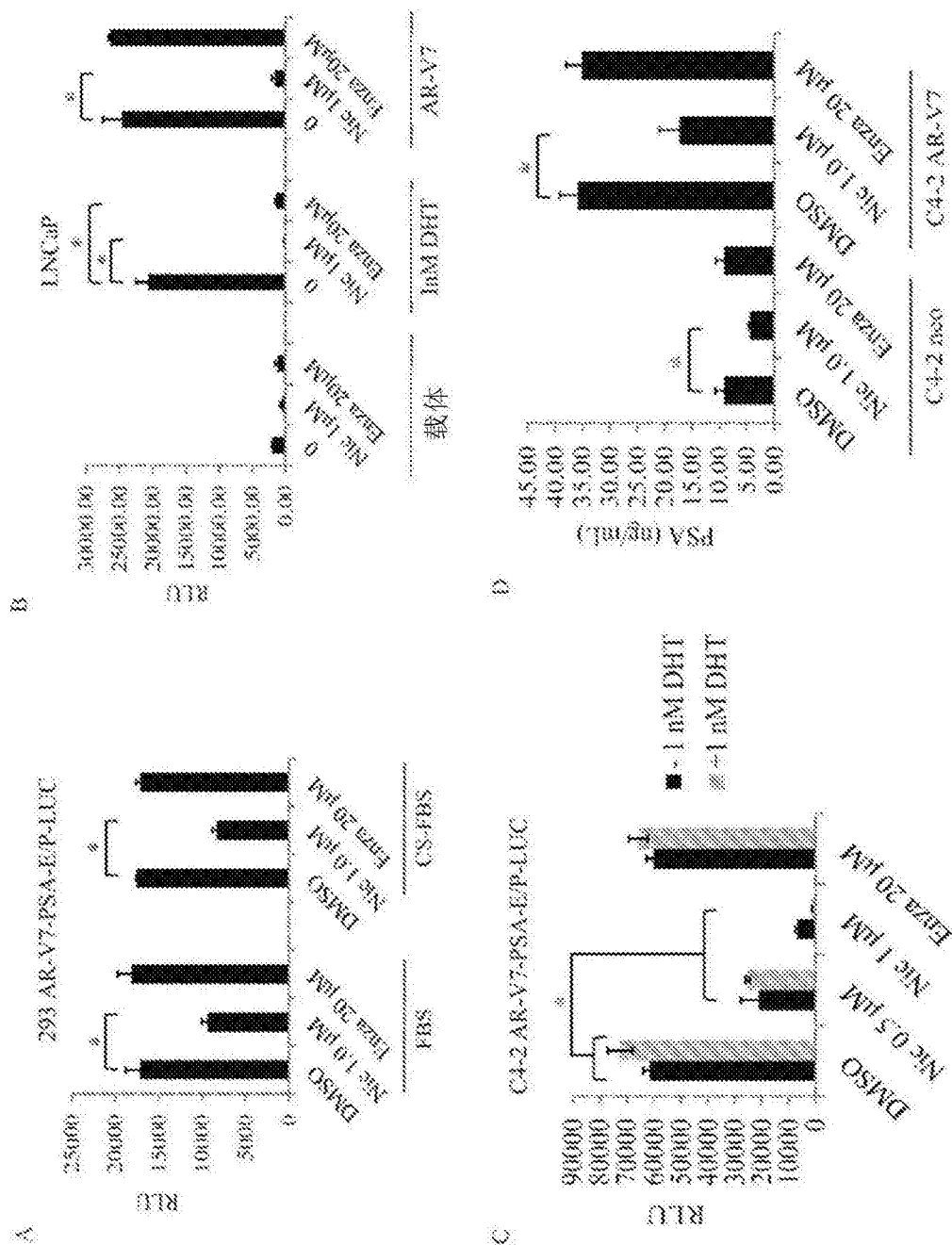


图4

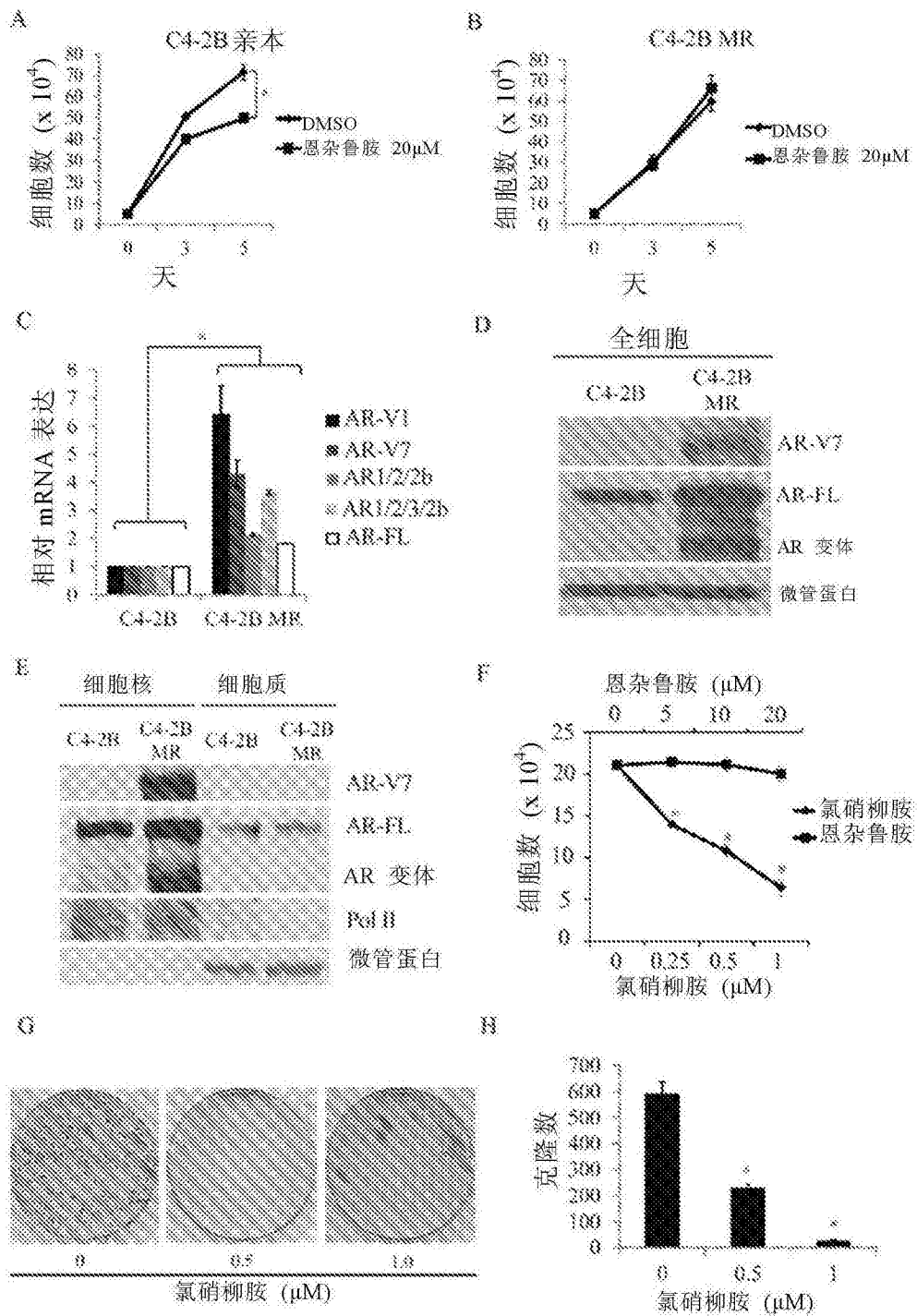


图5

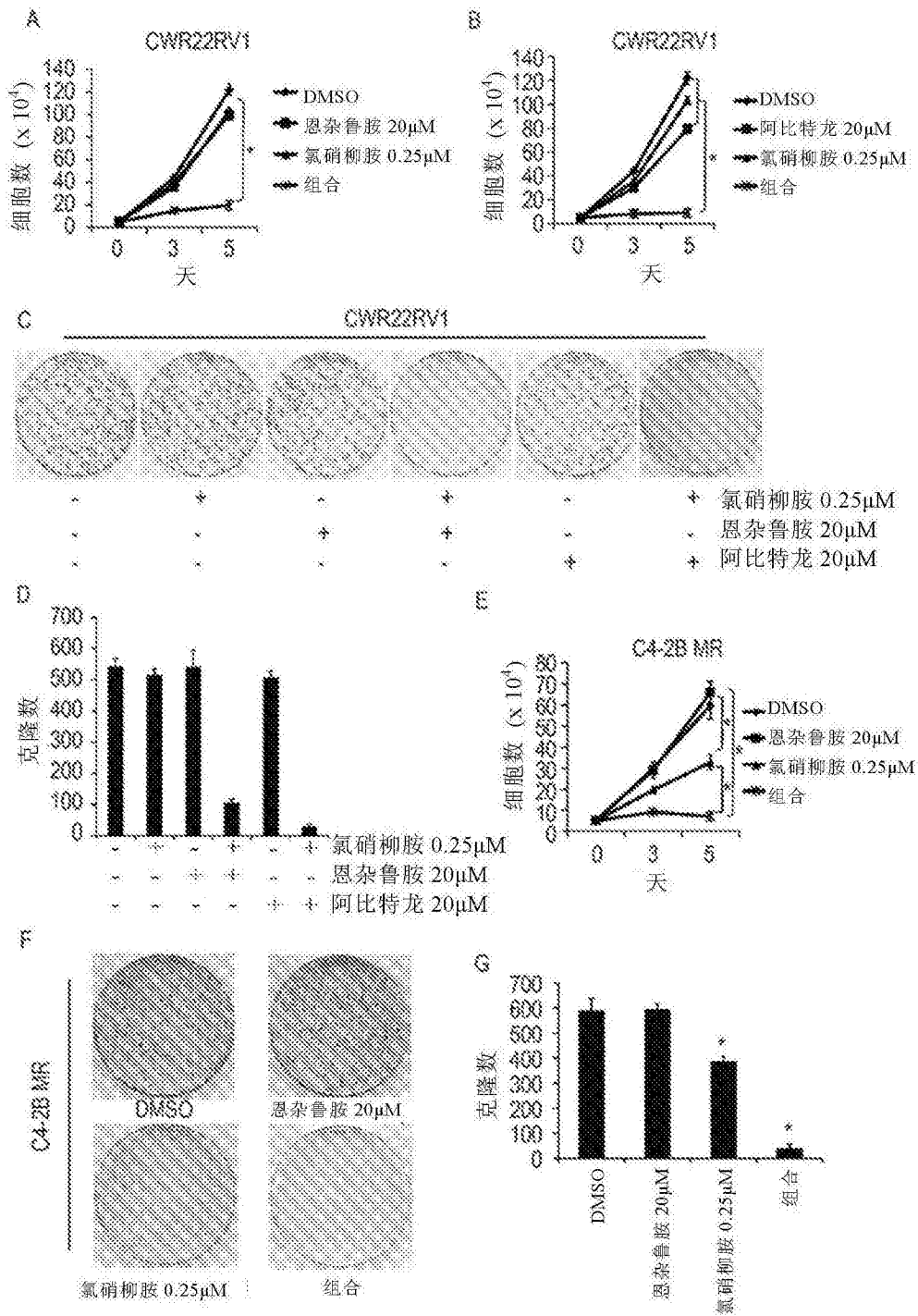


图6

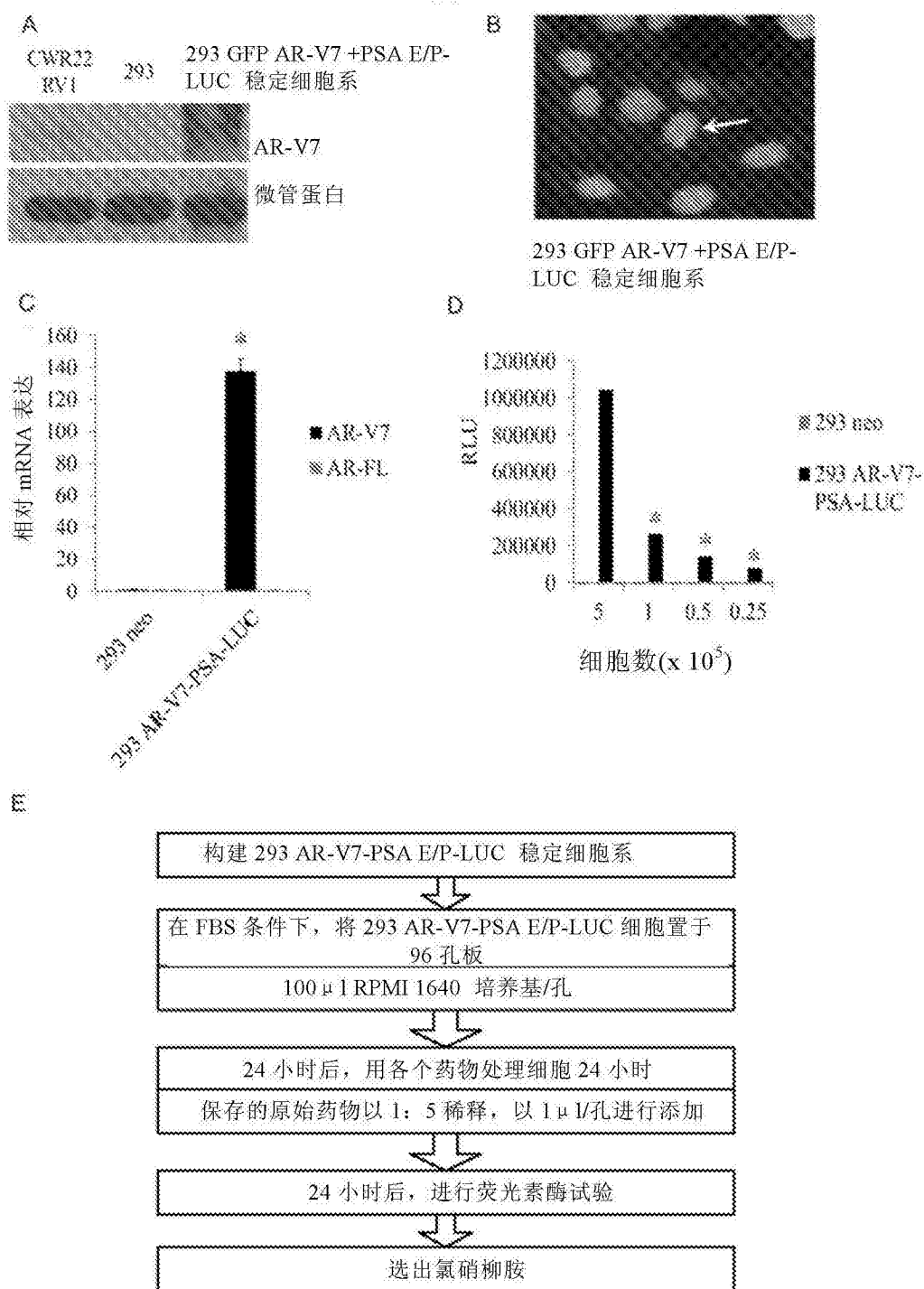


图8

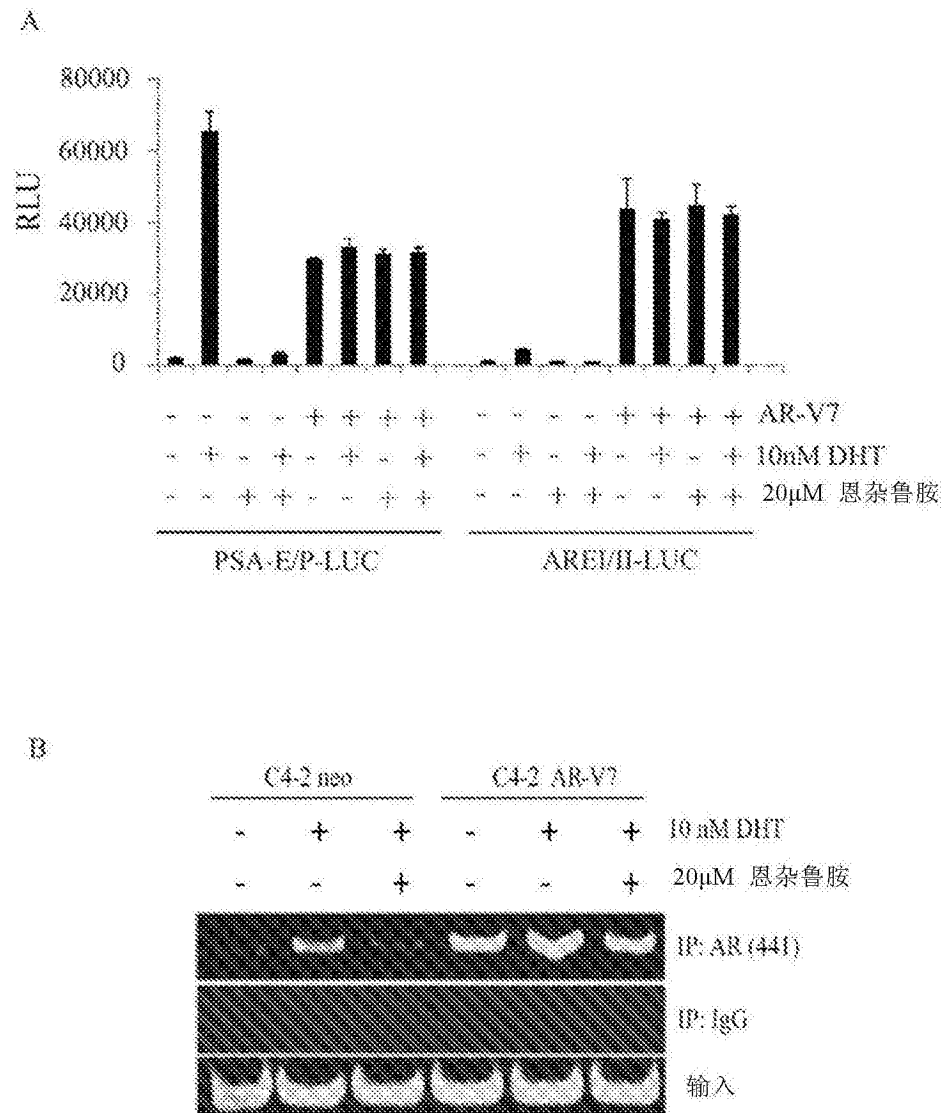


图9

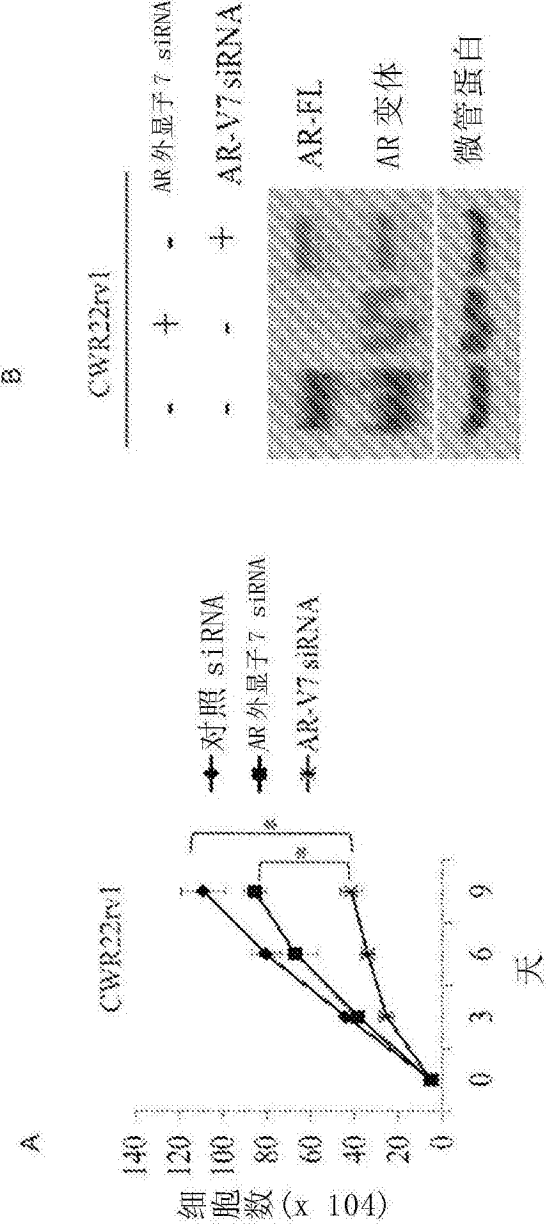


图10

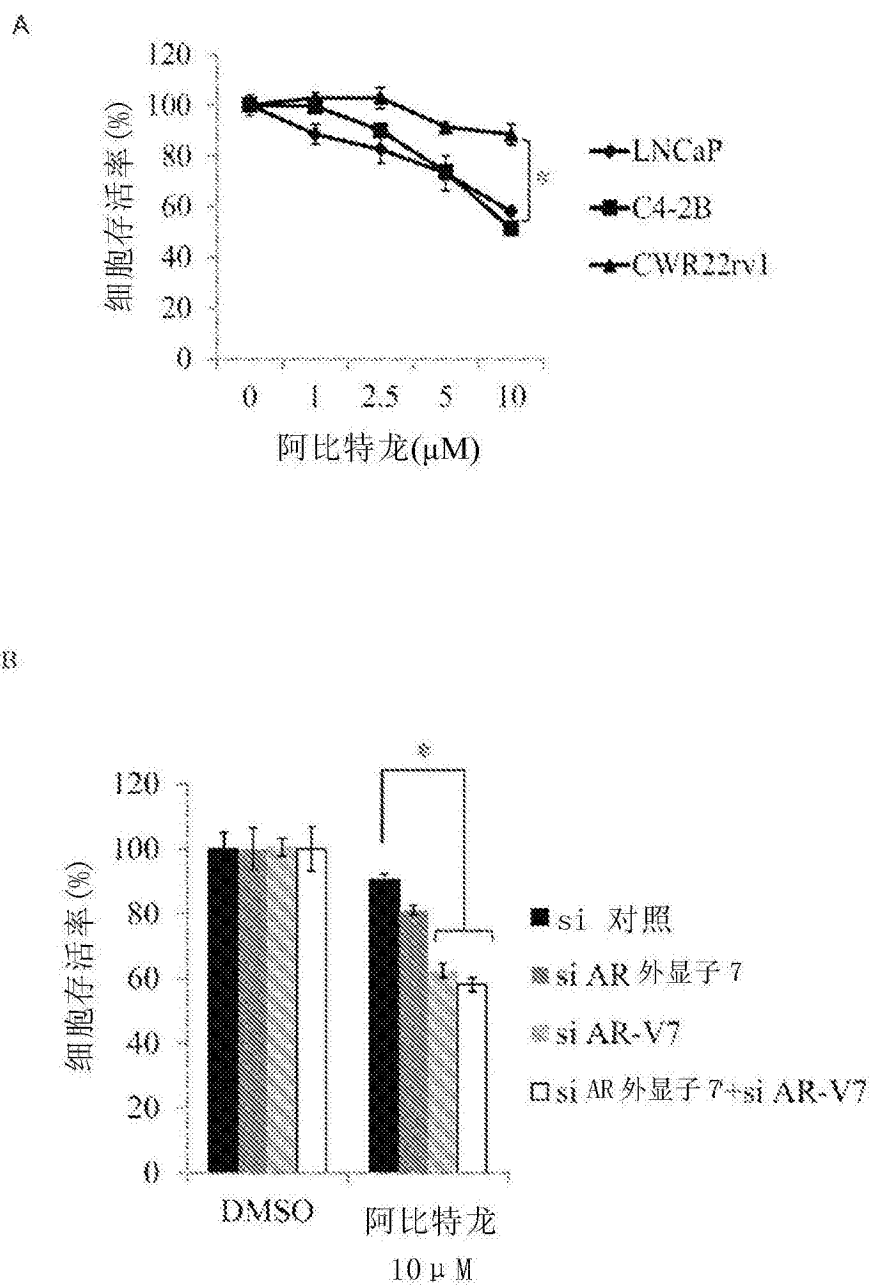


图11

药物筛选程序(来自 Prestwick Chemical Library 的药物库)

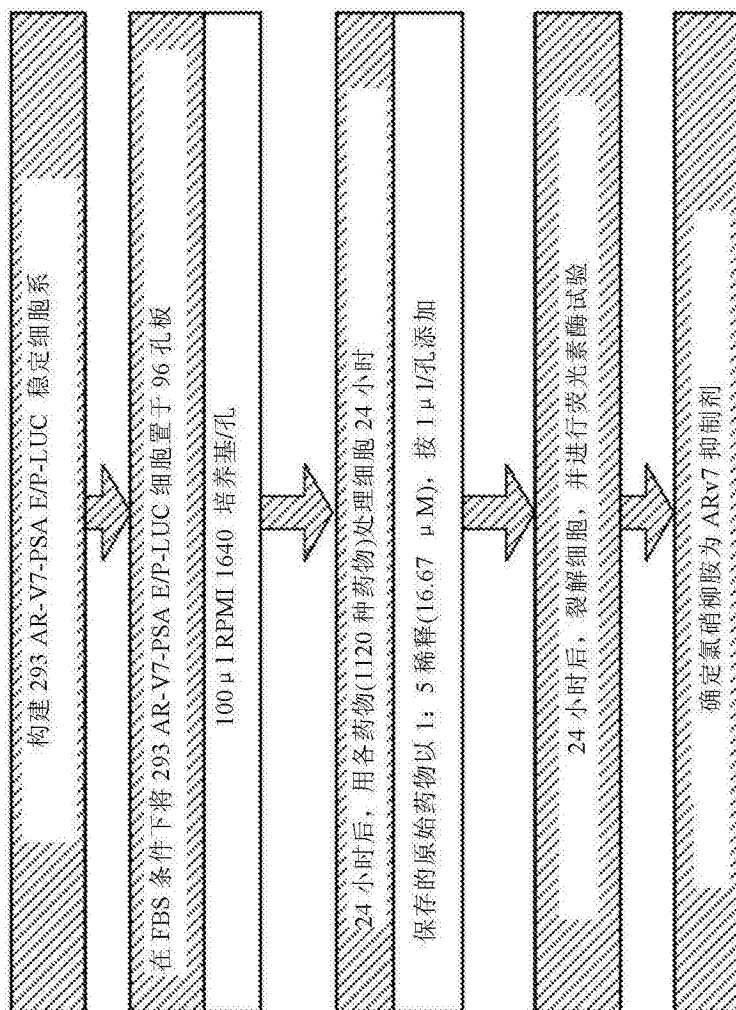
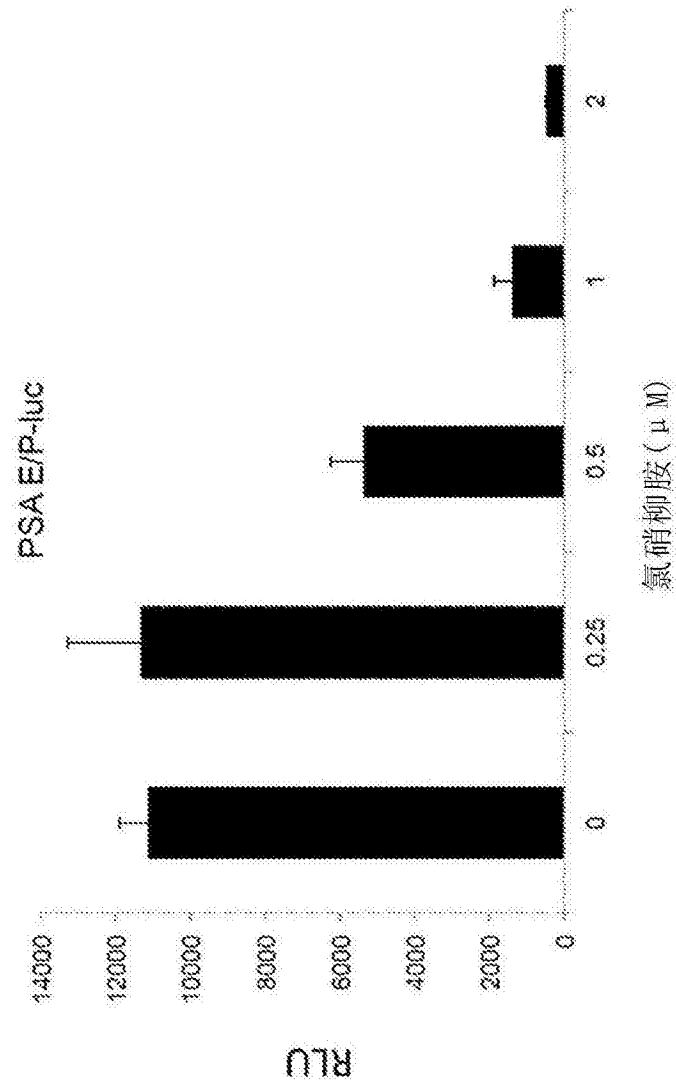


图12

氯硝柳胺抑制 ARv7 的反式激活



在 CSS 条件下, C4-2 V7 稳定克隆 0/N

图13

氯硝柳胺而非比卡鲁胺抑制 ARv7 的反式激活

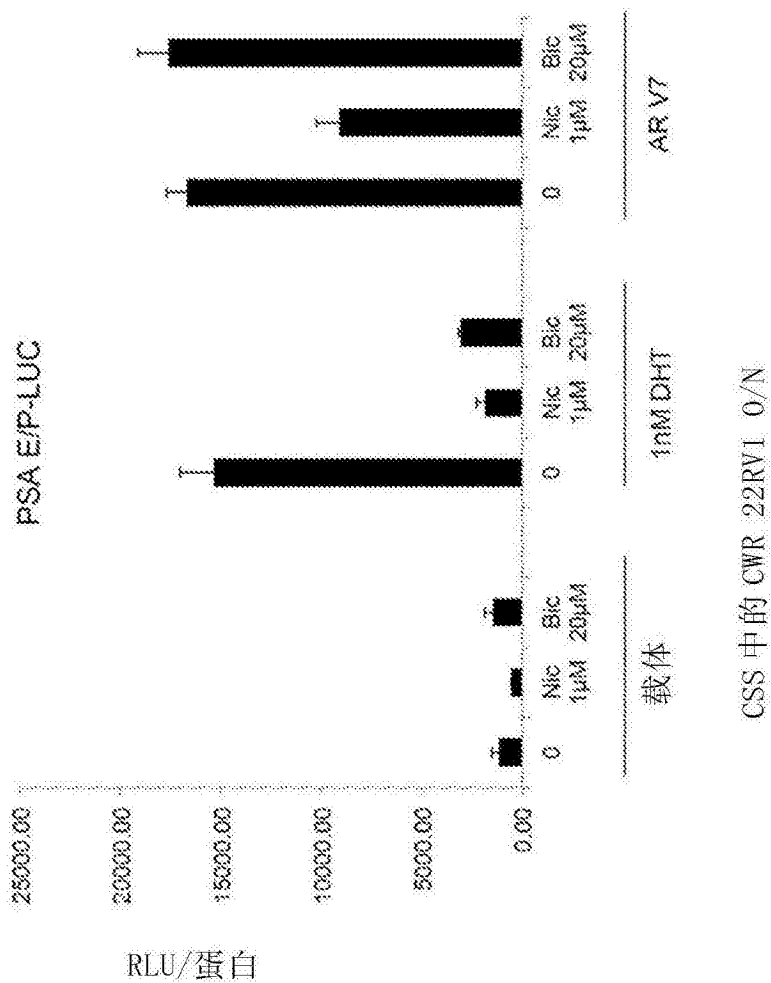


图14

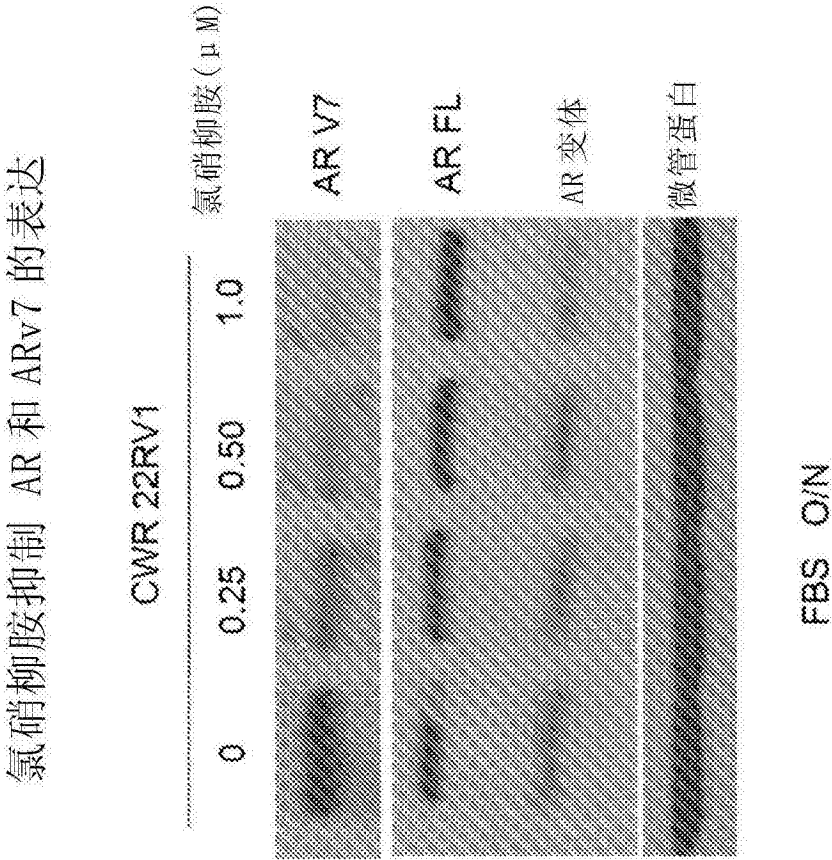


图15

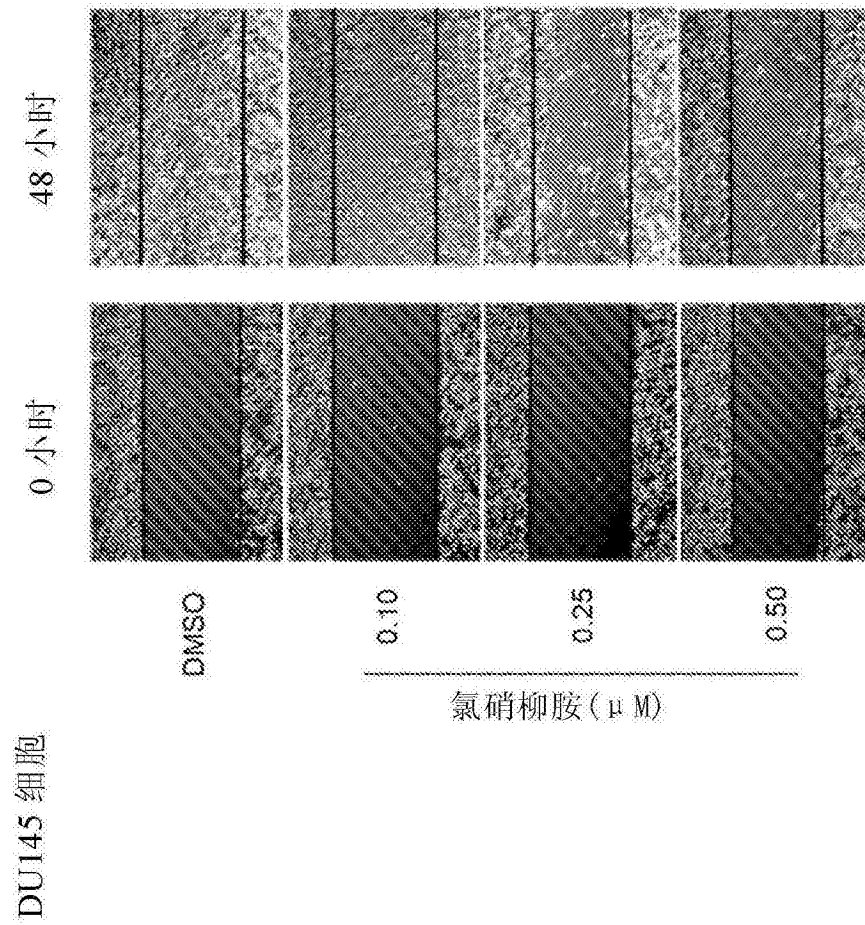


图16

氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞中的细胞侵袭

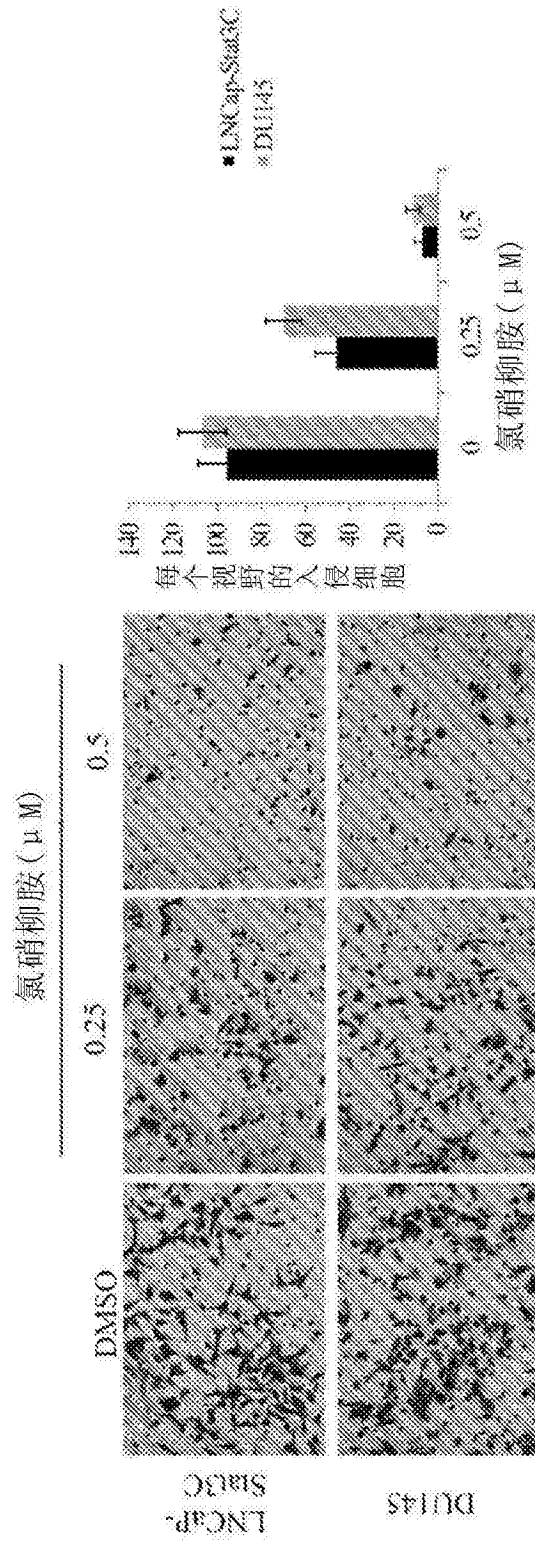


图17

氯硝柳胺抑制前列腺癌细胞中的克隆形成

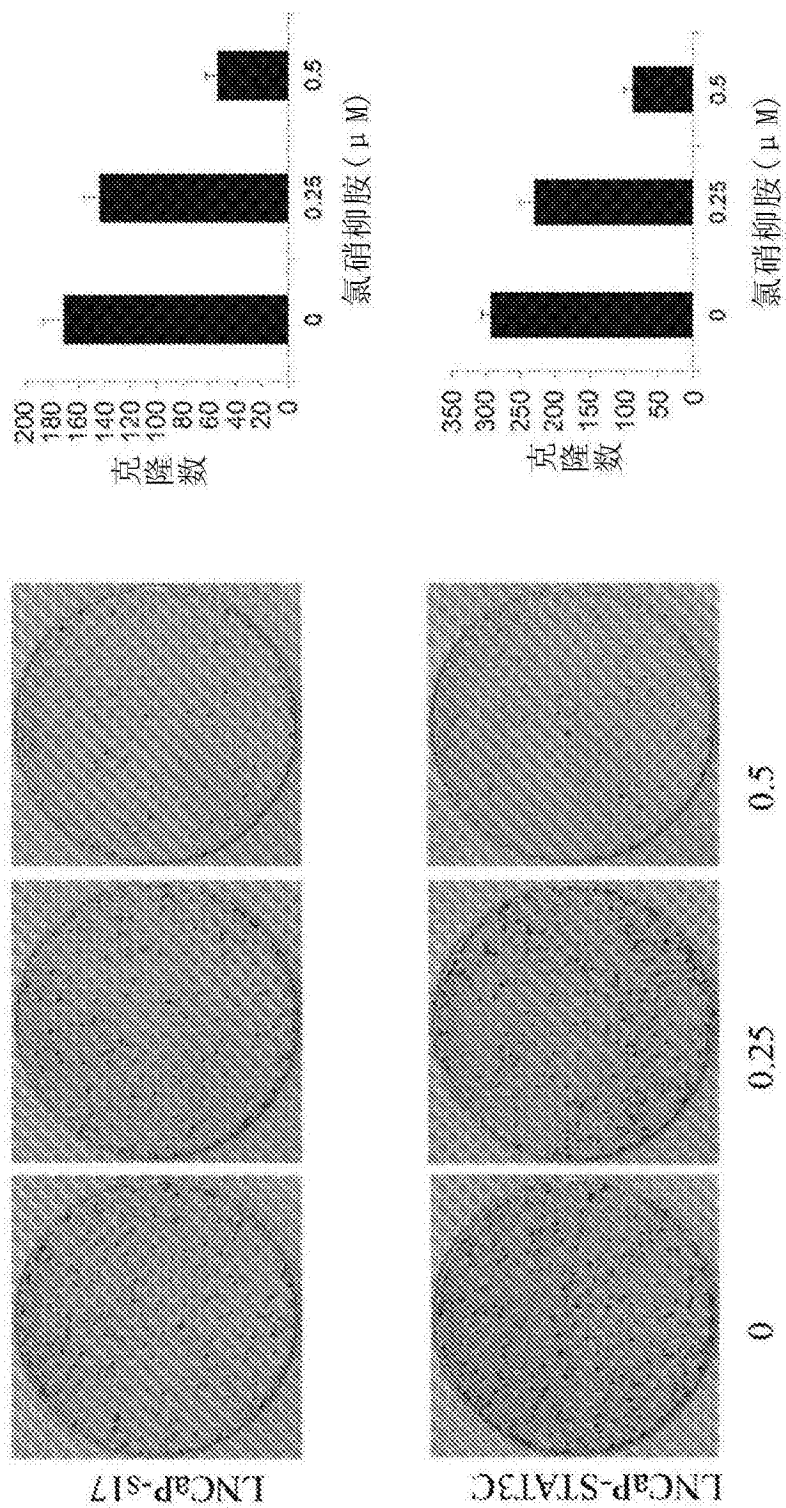


图18

氯硝柳胺以剂量依赖型方式抑制 C4-2B MR 细胞生长

C4-2B MR (48 小时)

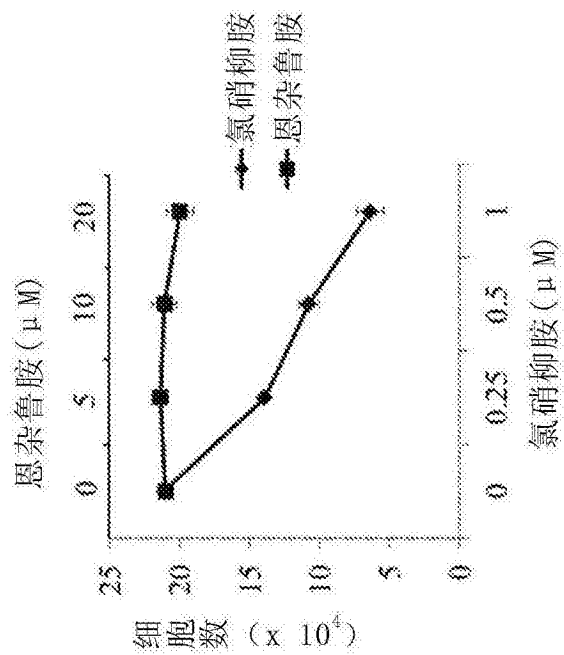


图19

联合处理抑制将 AR 募集到 PSA 启动子的募集

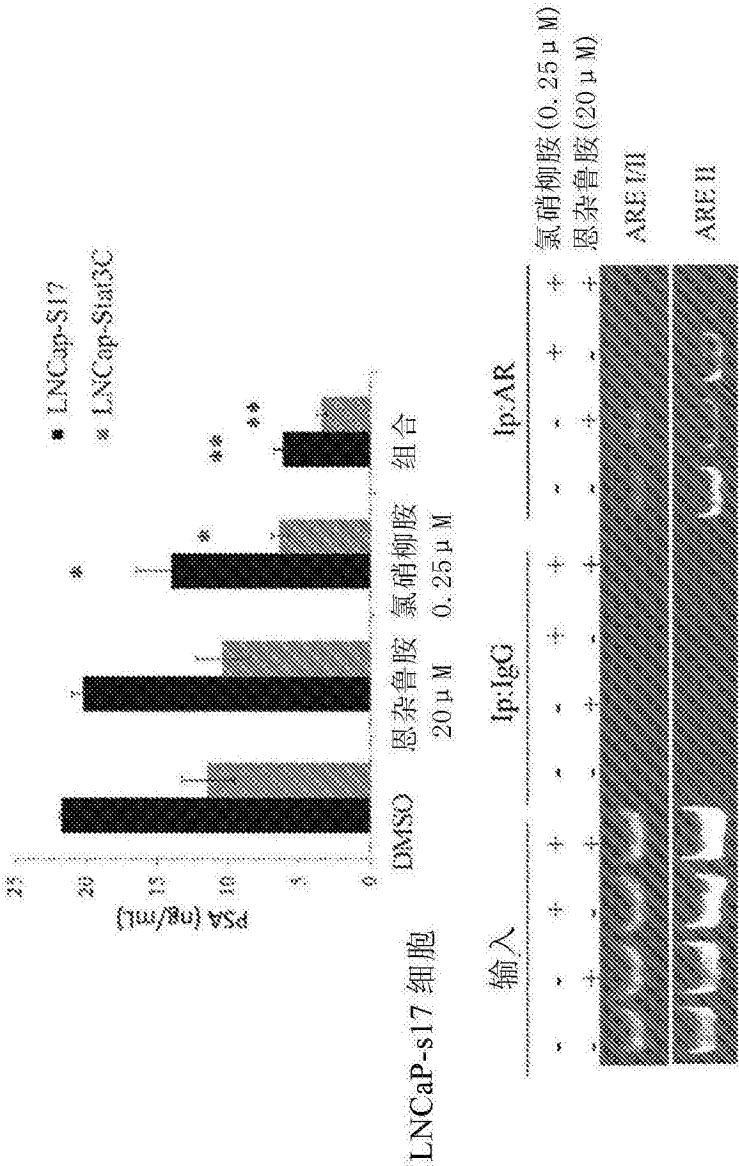
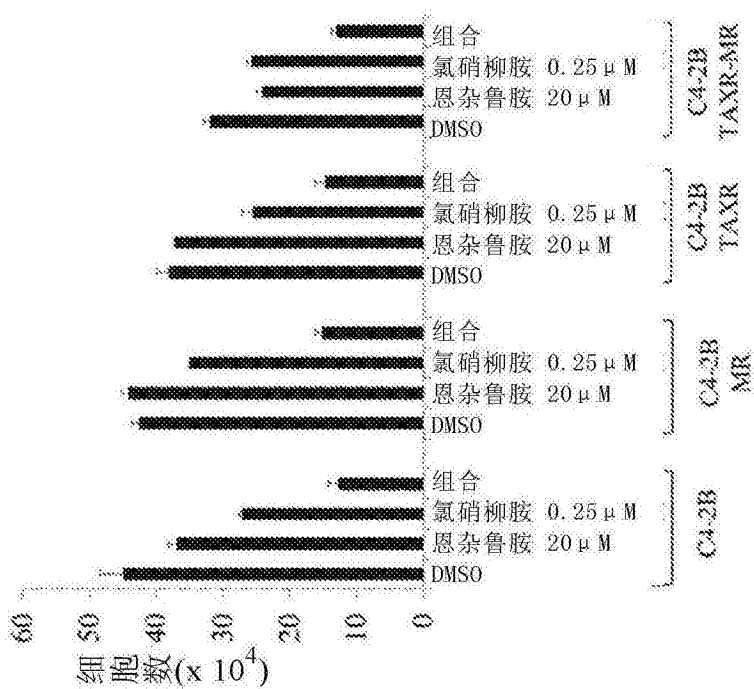


图20

联合处理抑制 C4-2B MR、C4-2B TAXR、C4-2B TAXR + MR
和 C4-2B AbiR 的细胞生长



处理两天

图21

氯硝柳胺增强恩杂鲁胺在 C4-2B MR 细胞中的作用

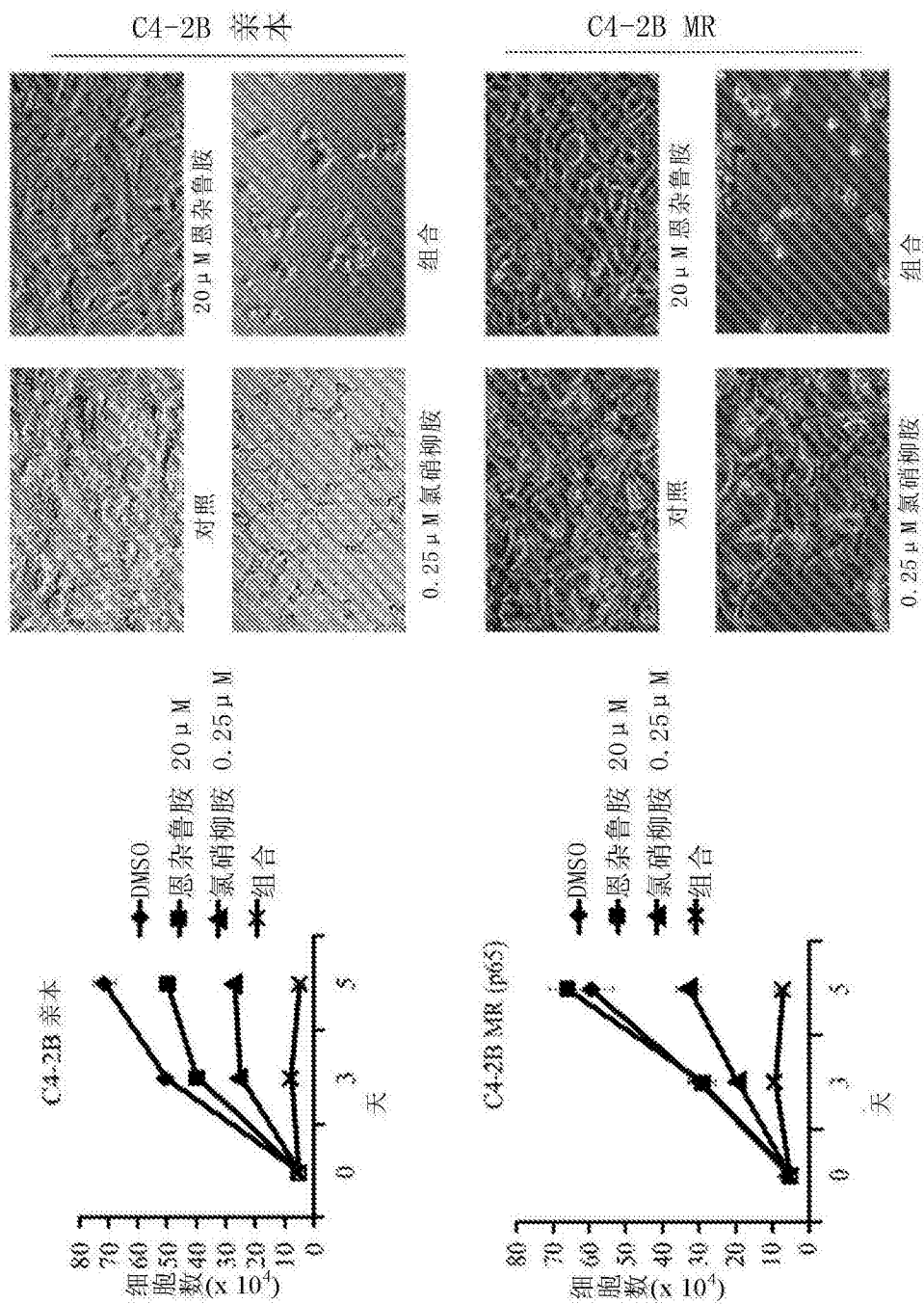


图22

氯硝柳胺增强阿比特龙在 C4-2B AbiR 细胞中的作用

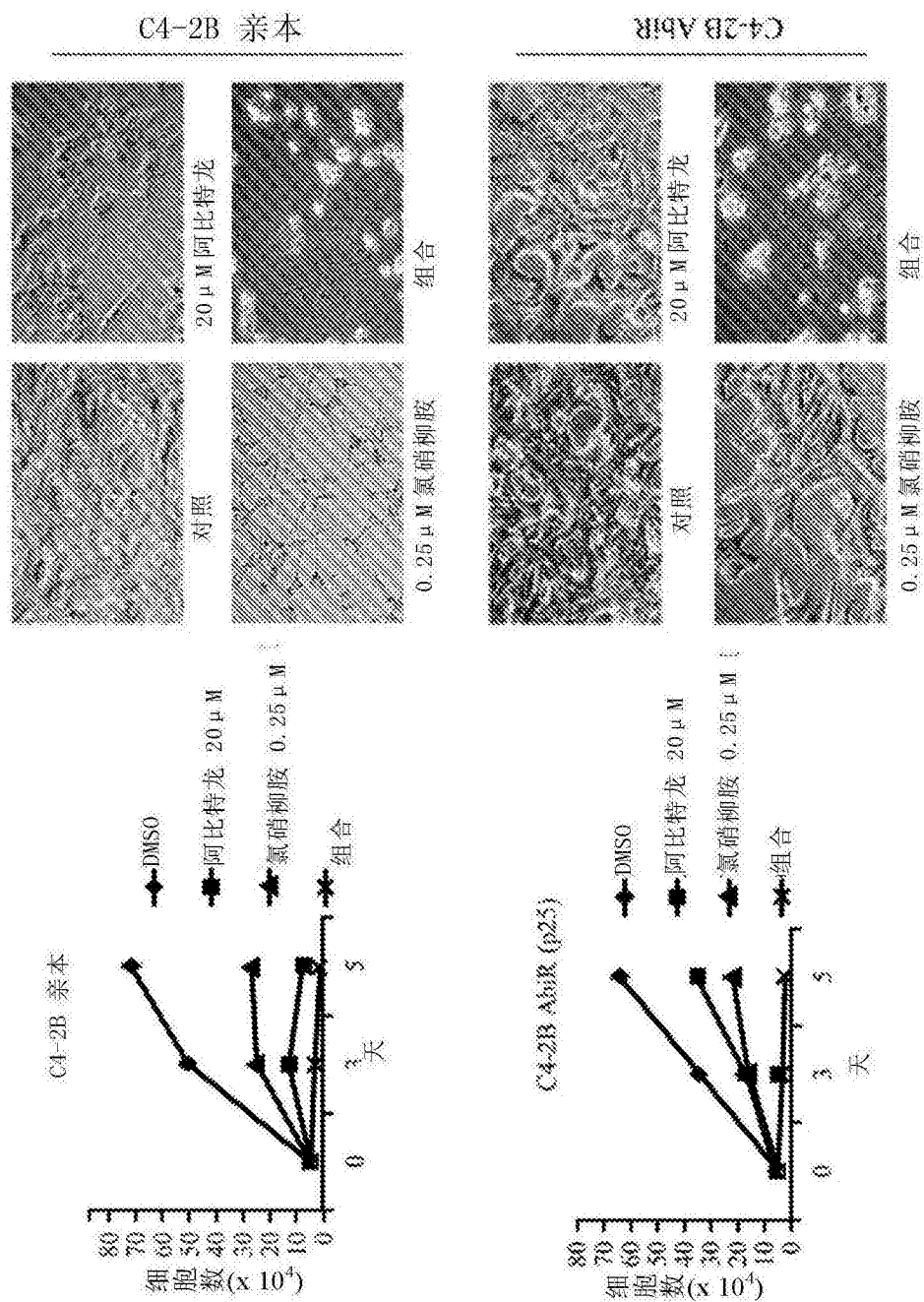


图23

LNCaP-s17 细胞

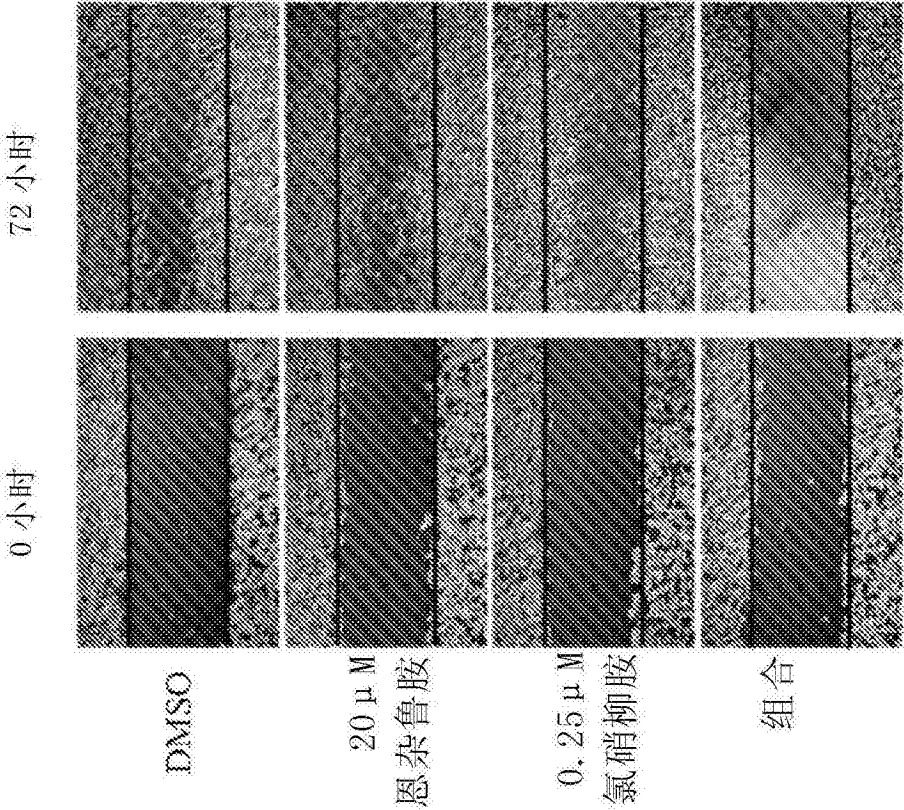


图24

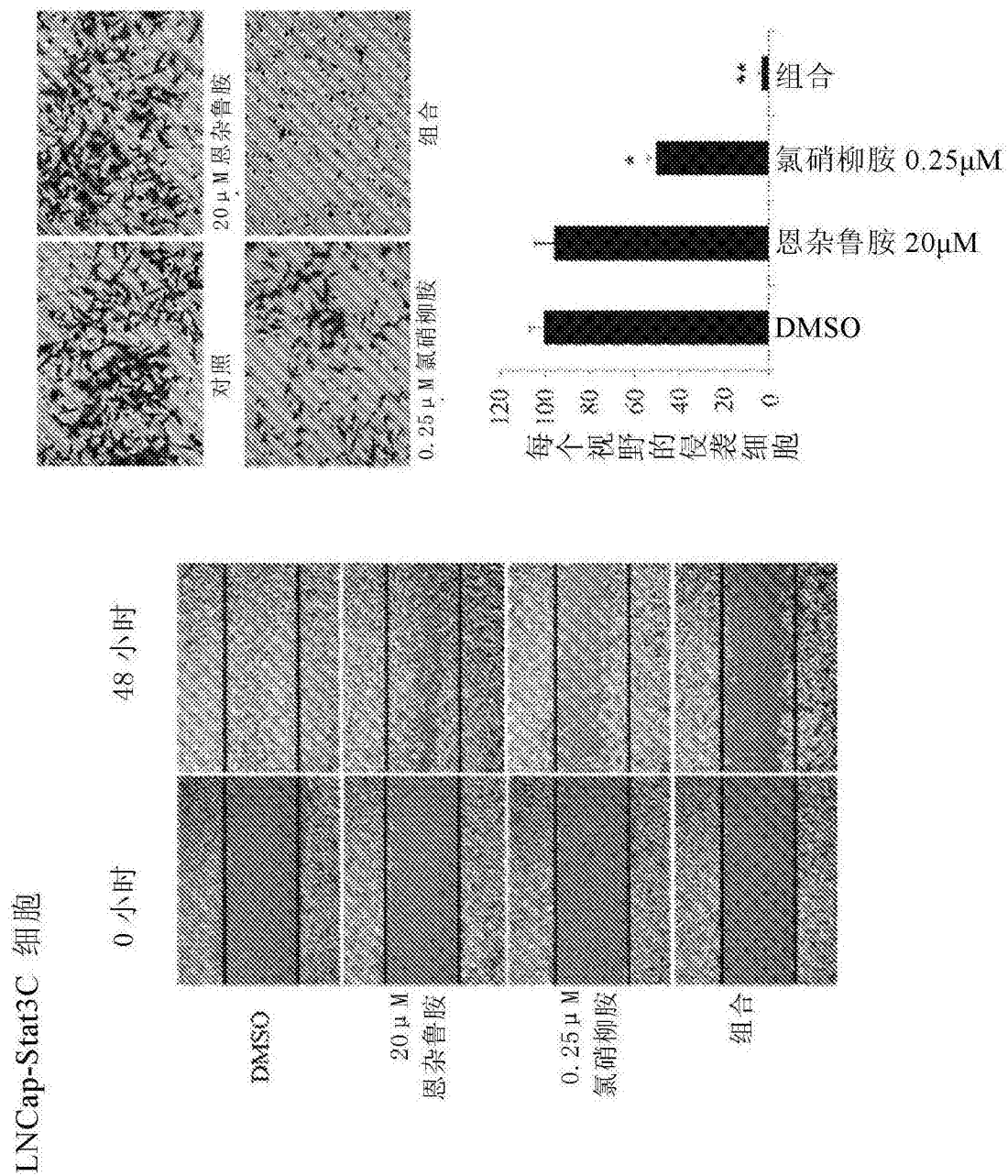


图25

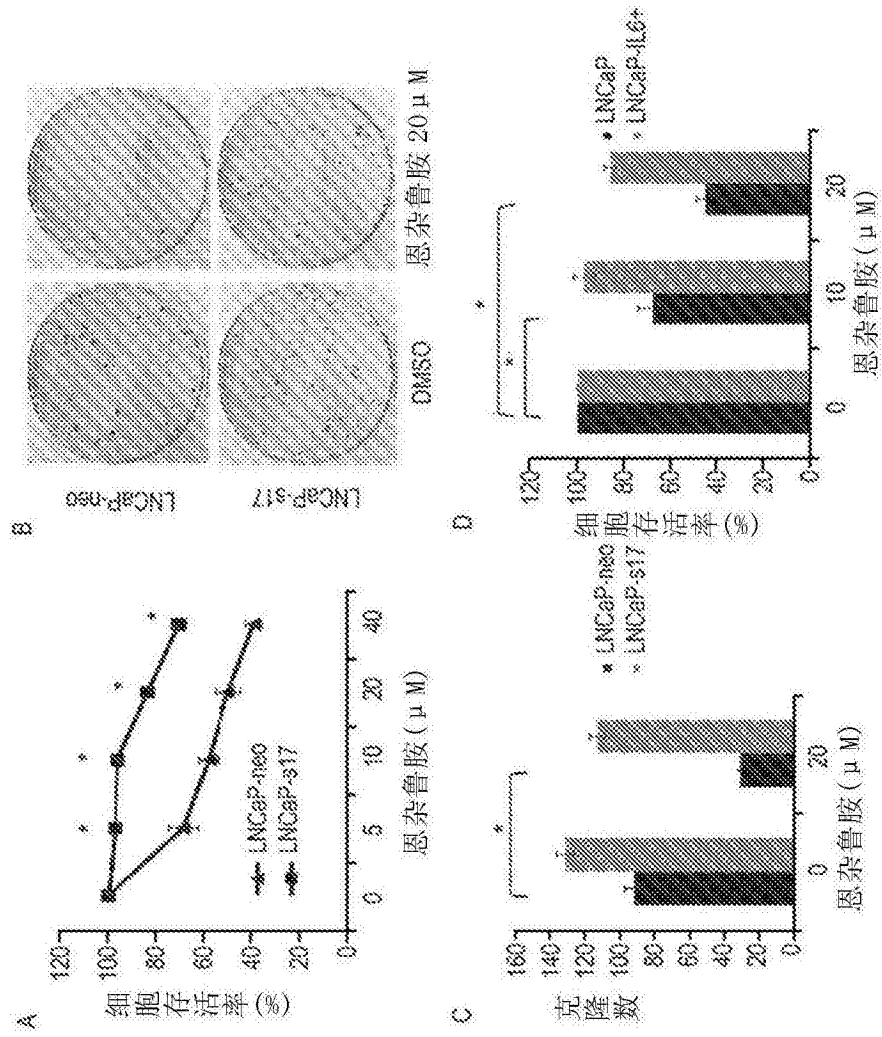


图26

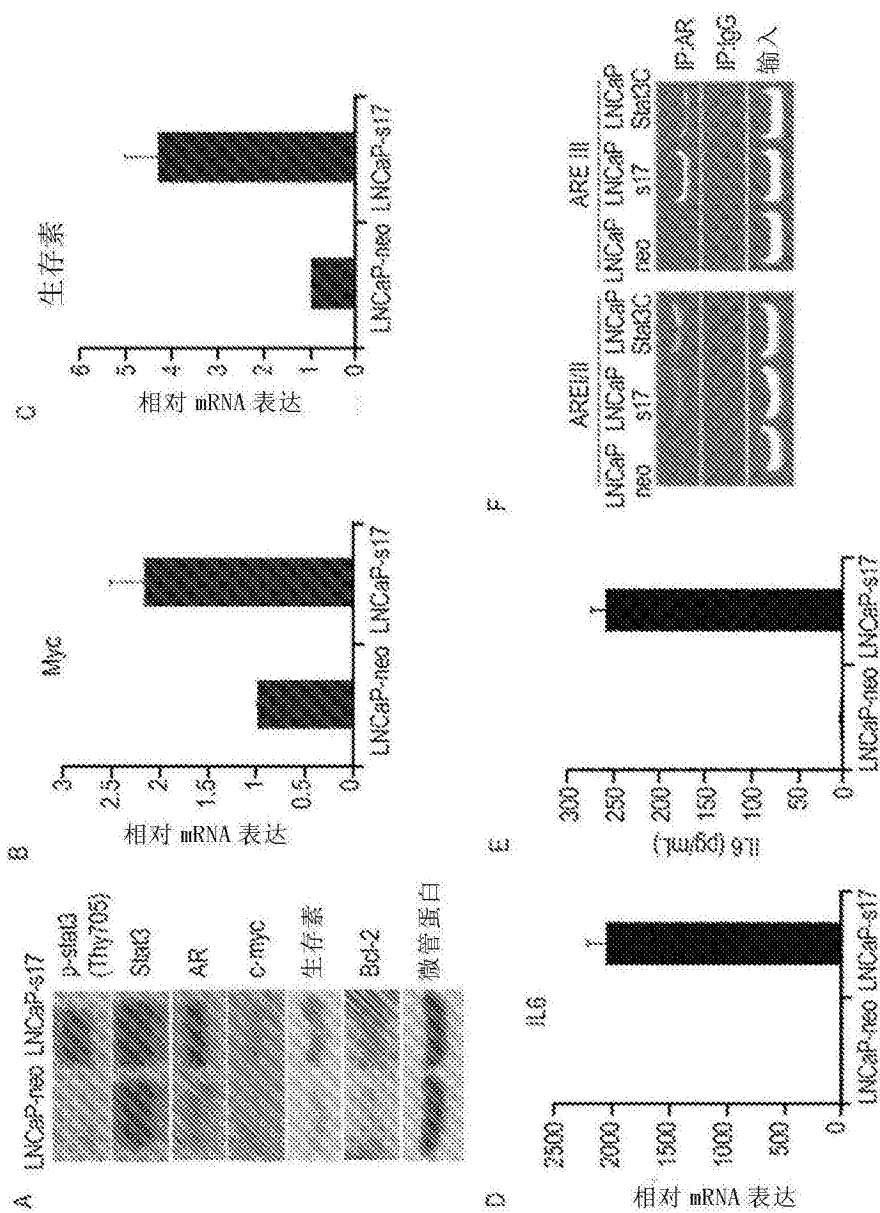


图27

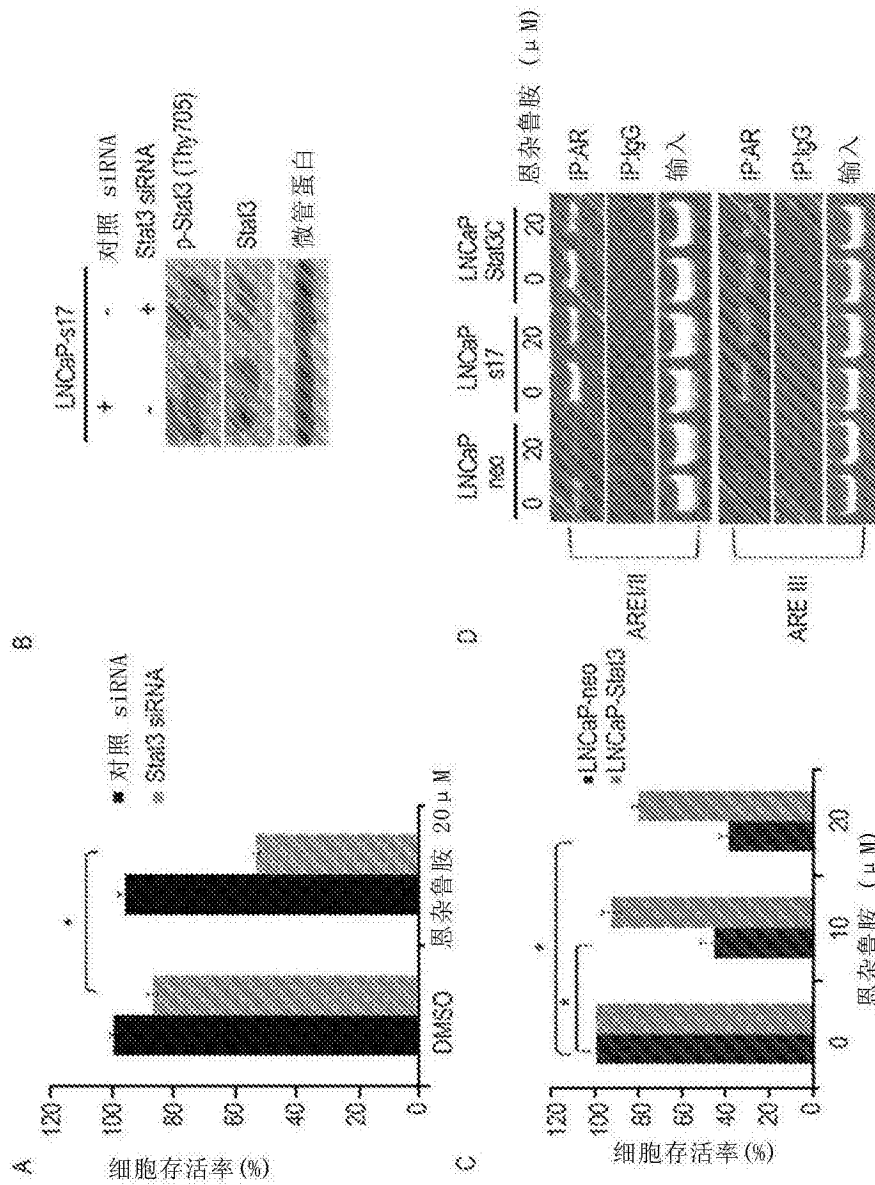


图28

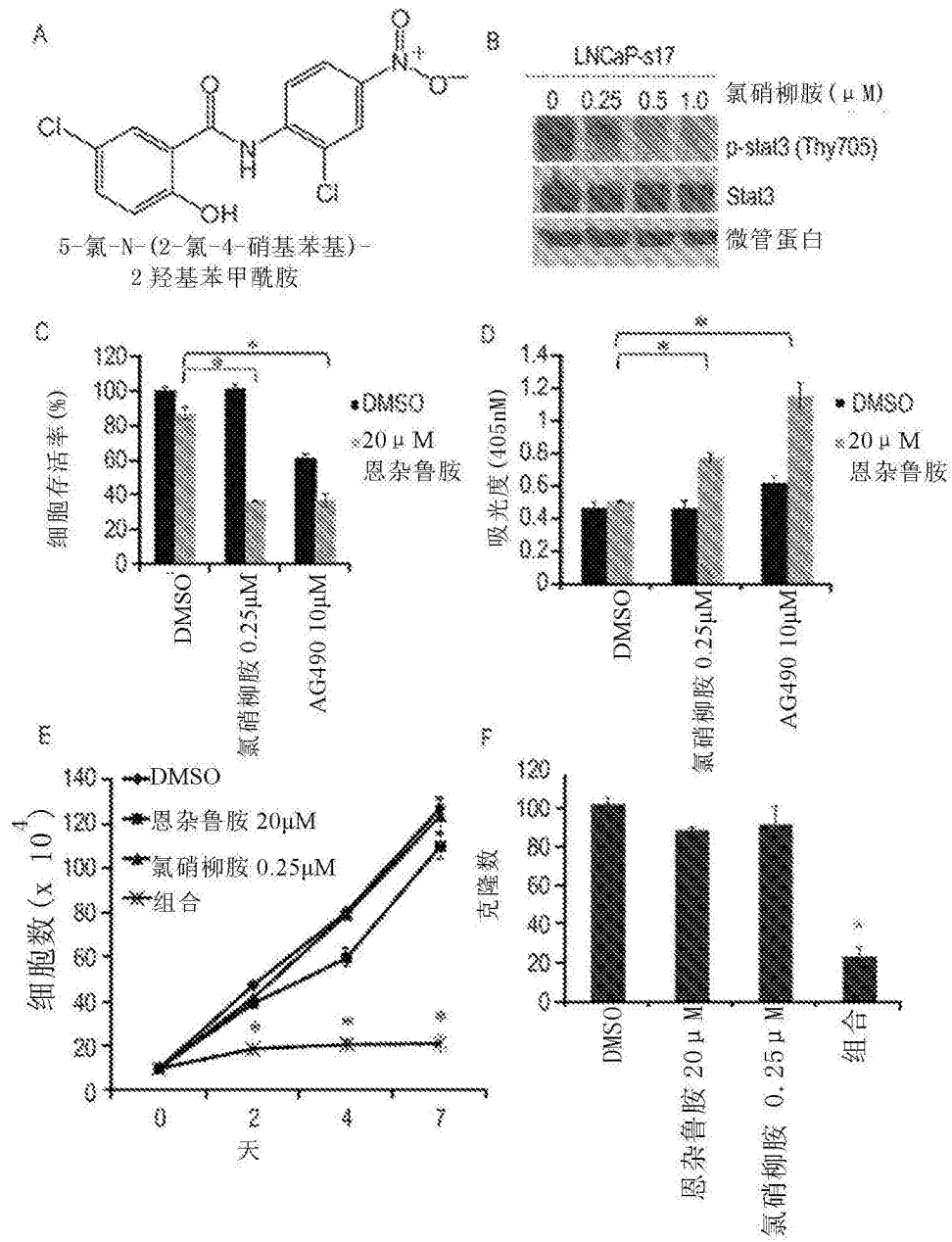


图29

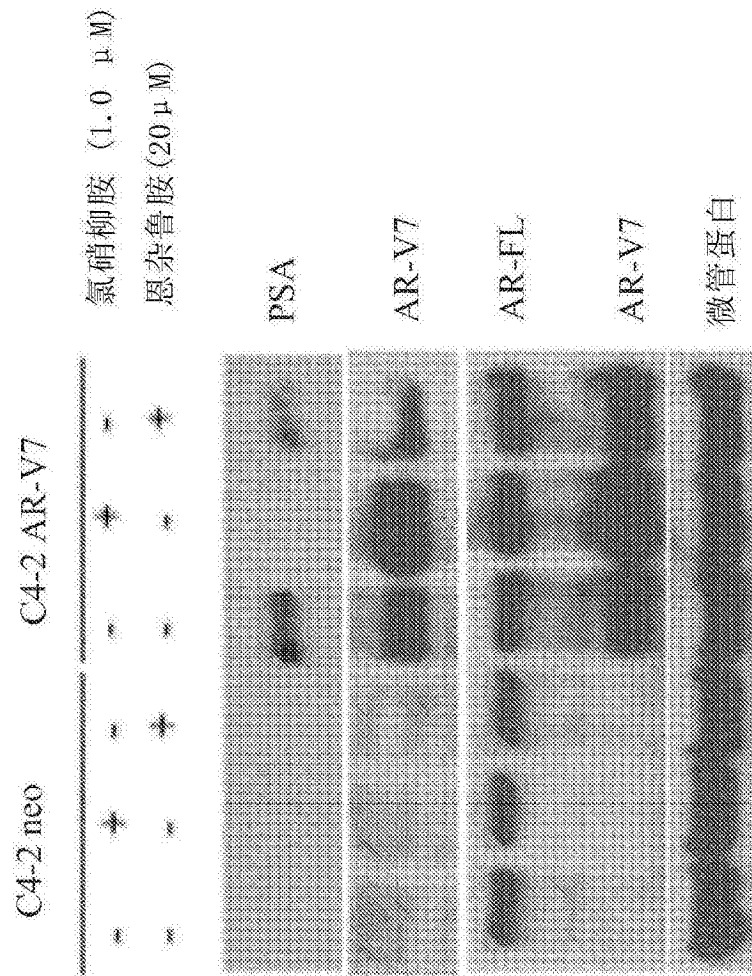


图30

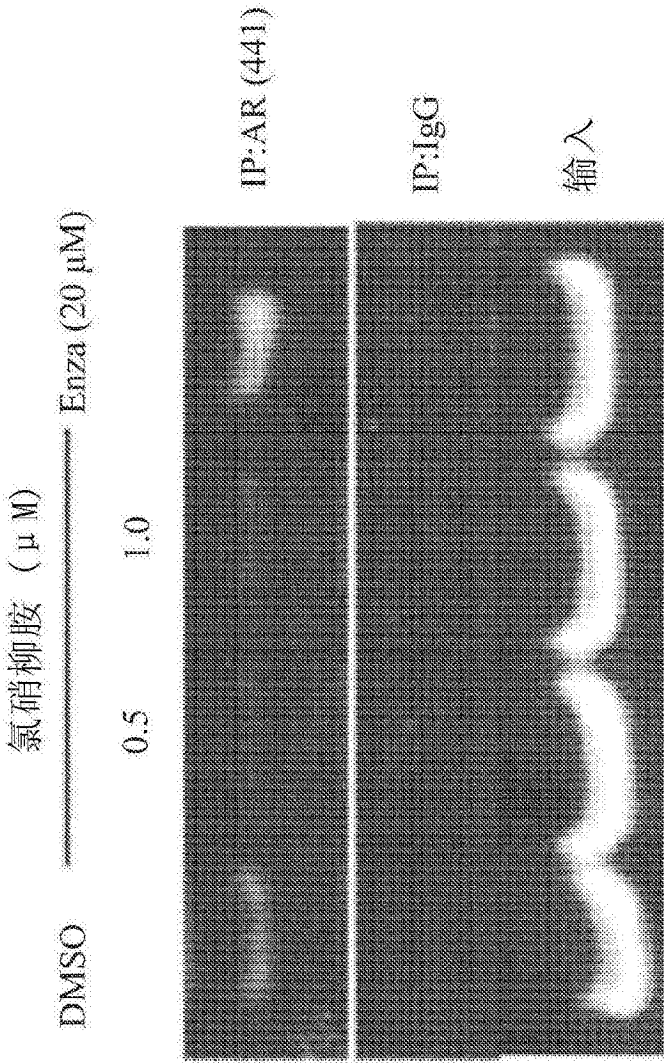


图31

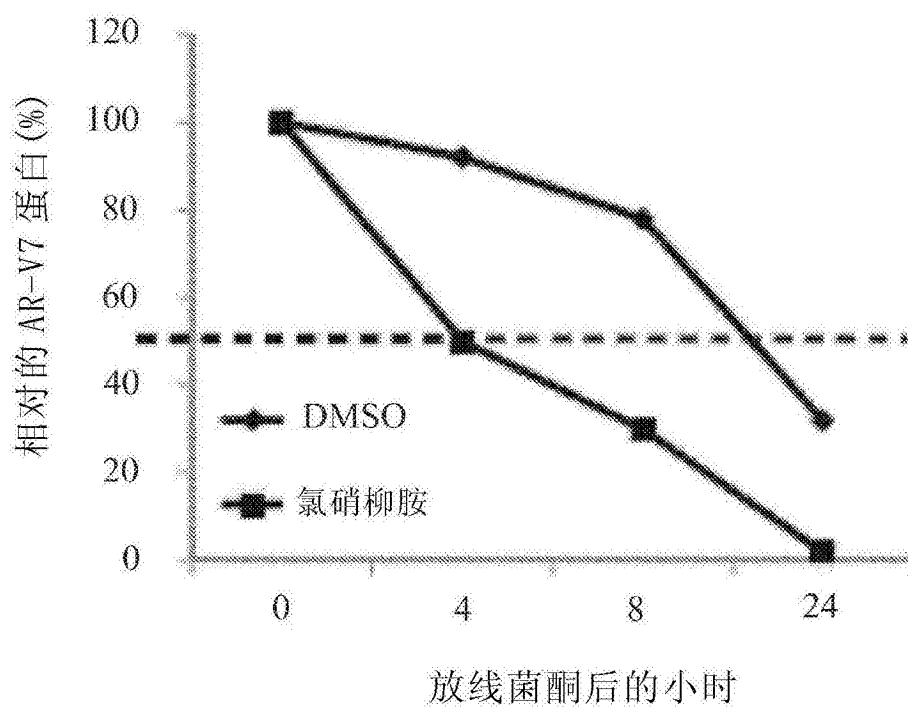


图32

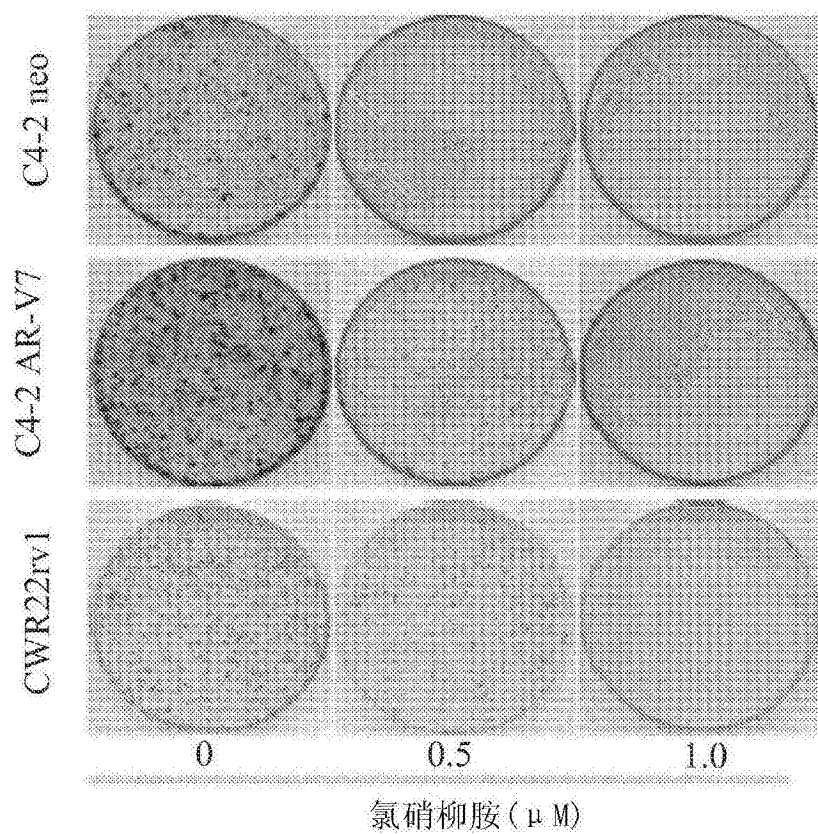


图33

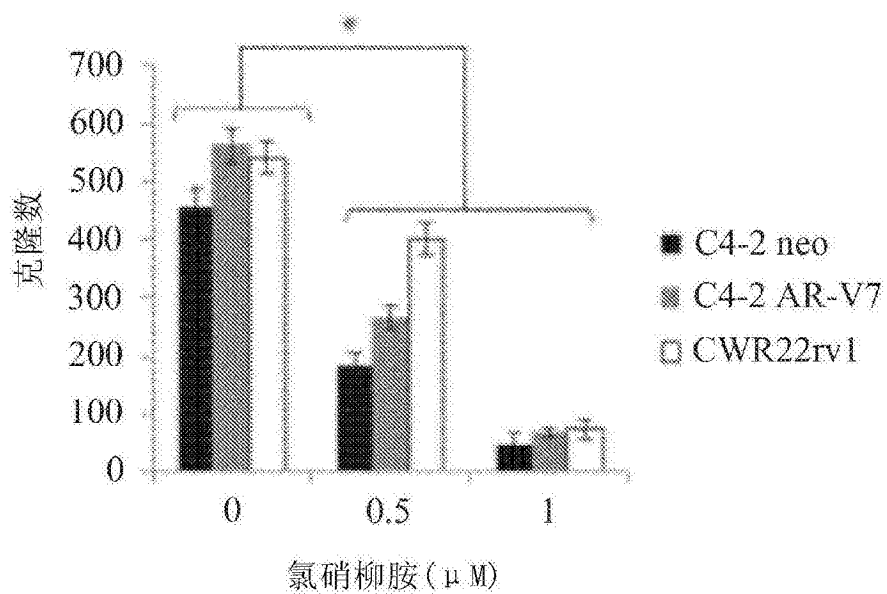


图34

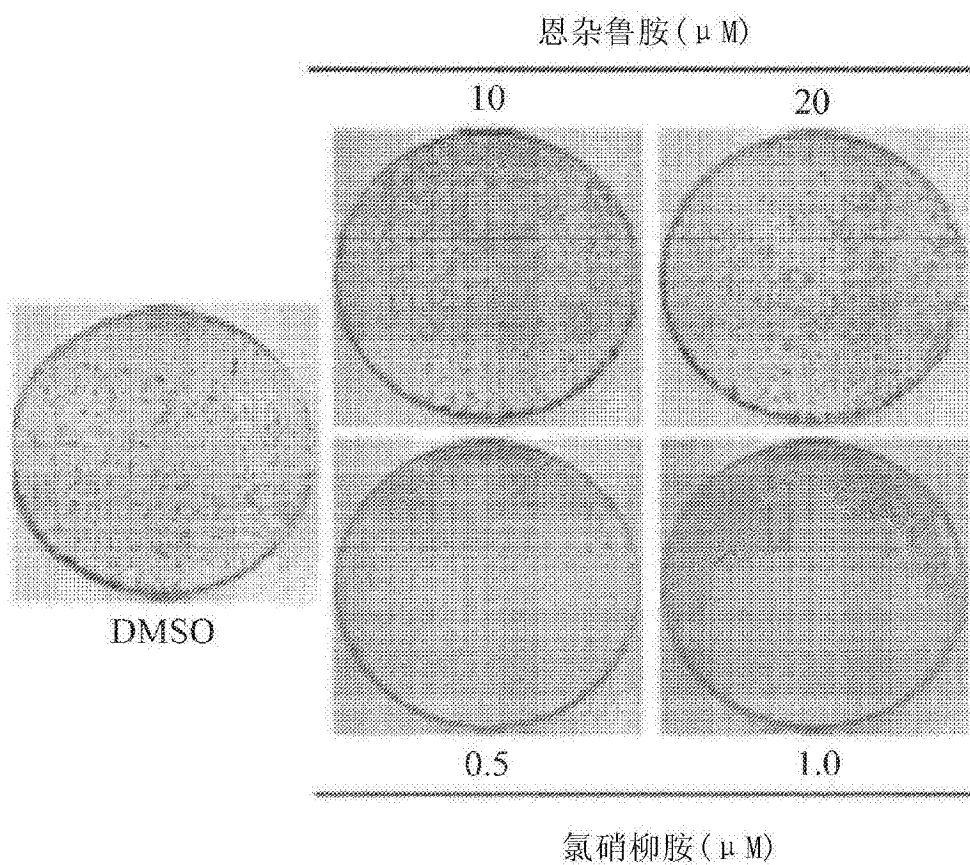


图35

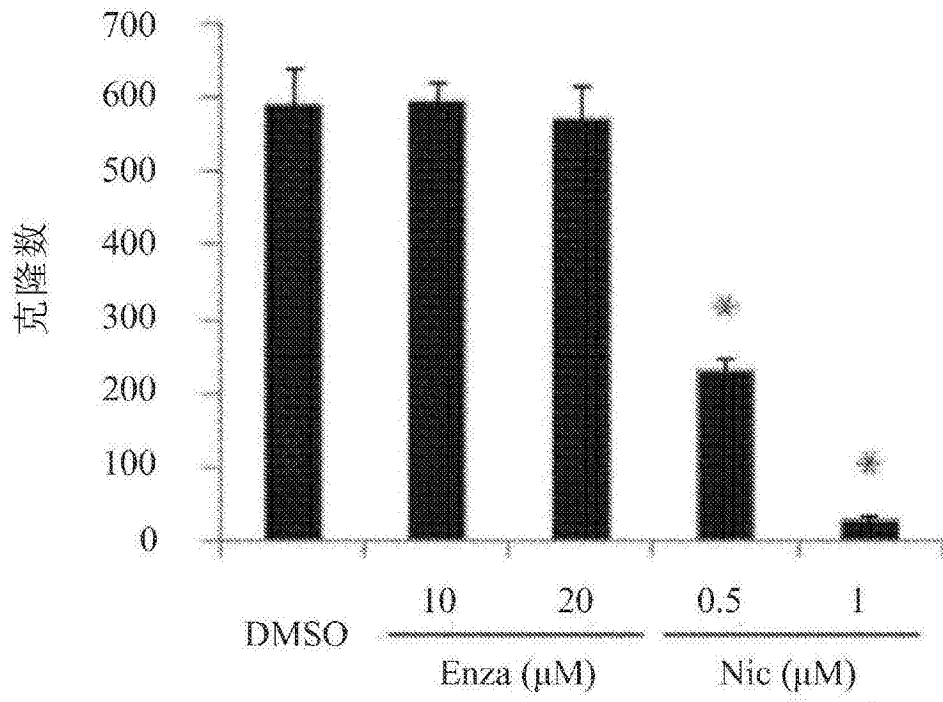


图36

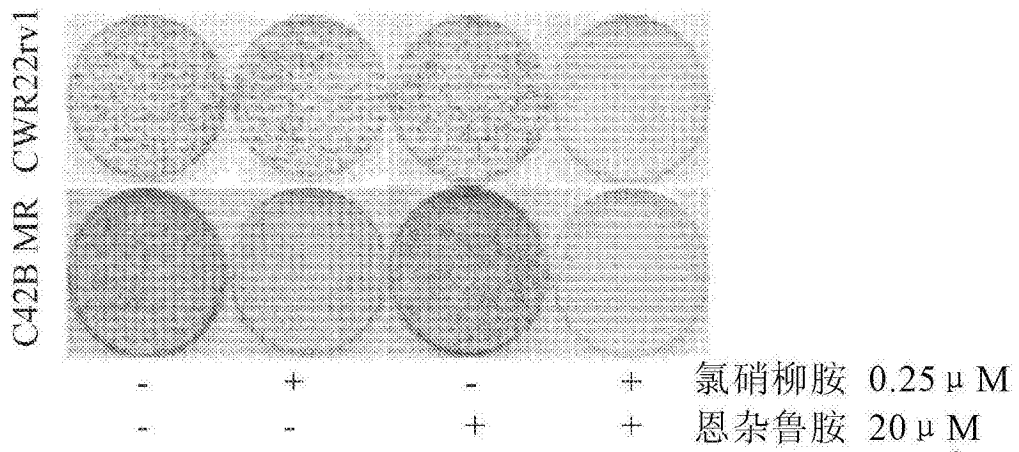


图37

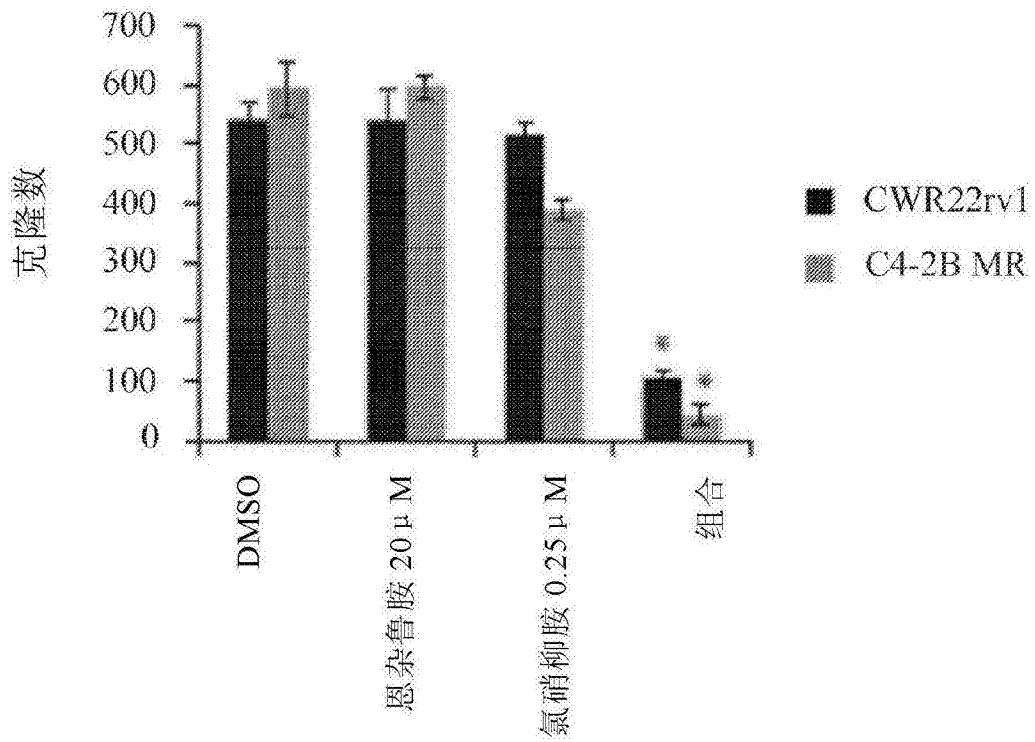


图38

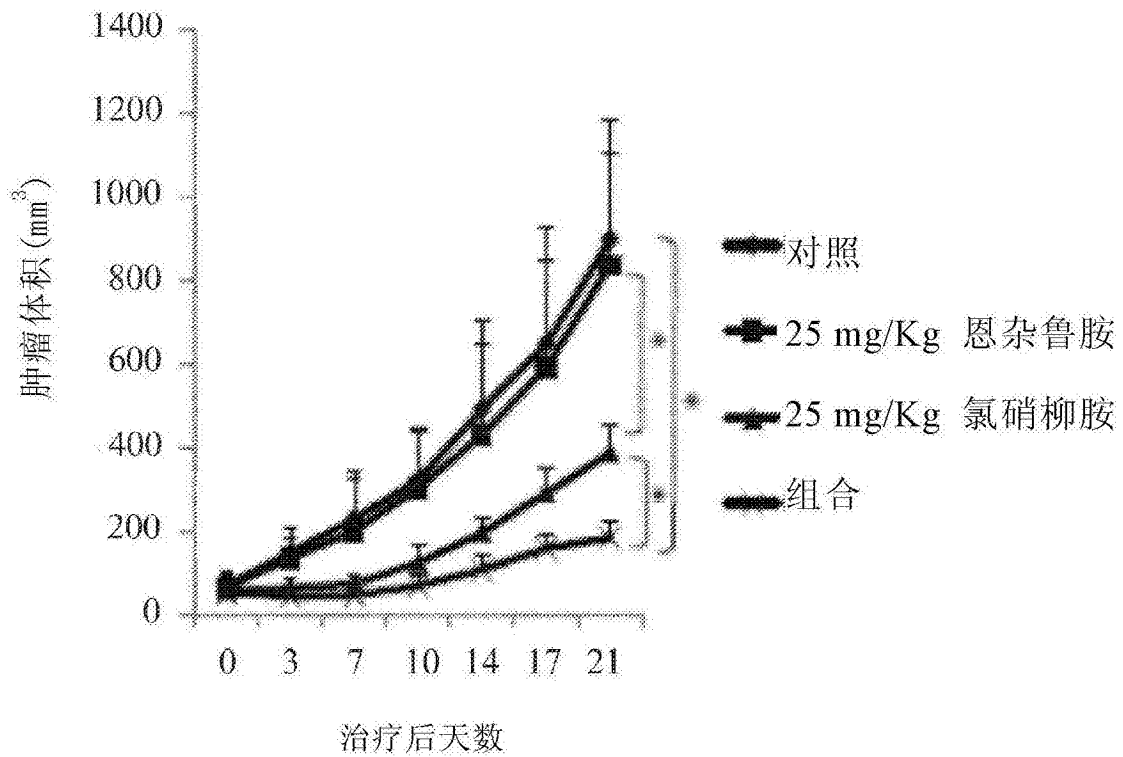


图39

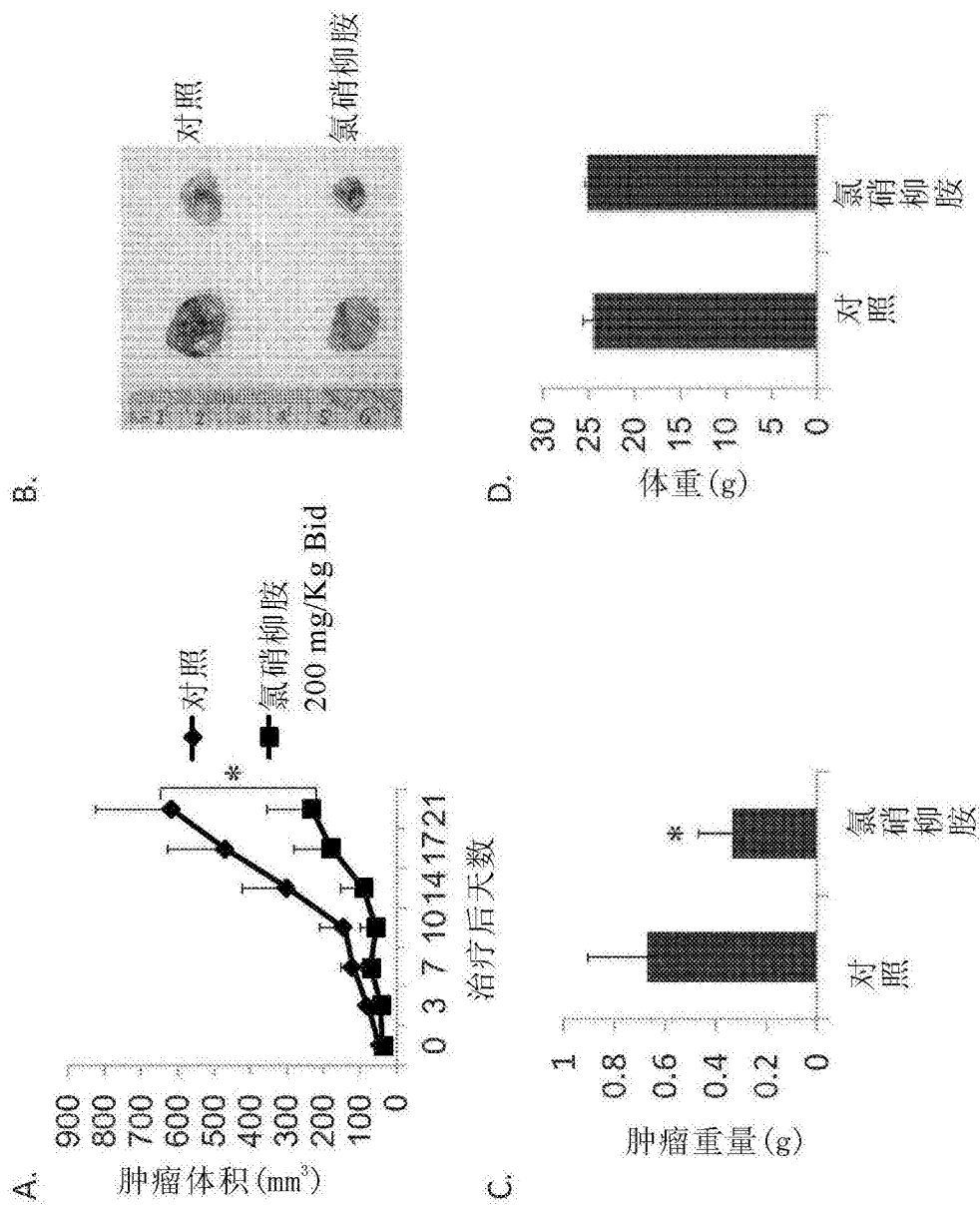


图40

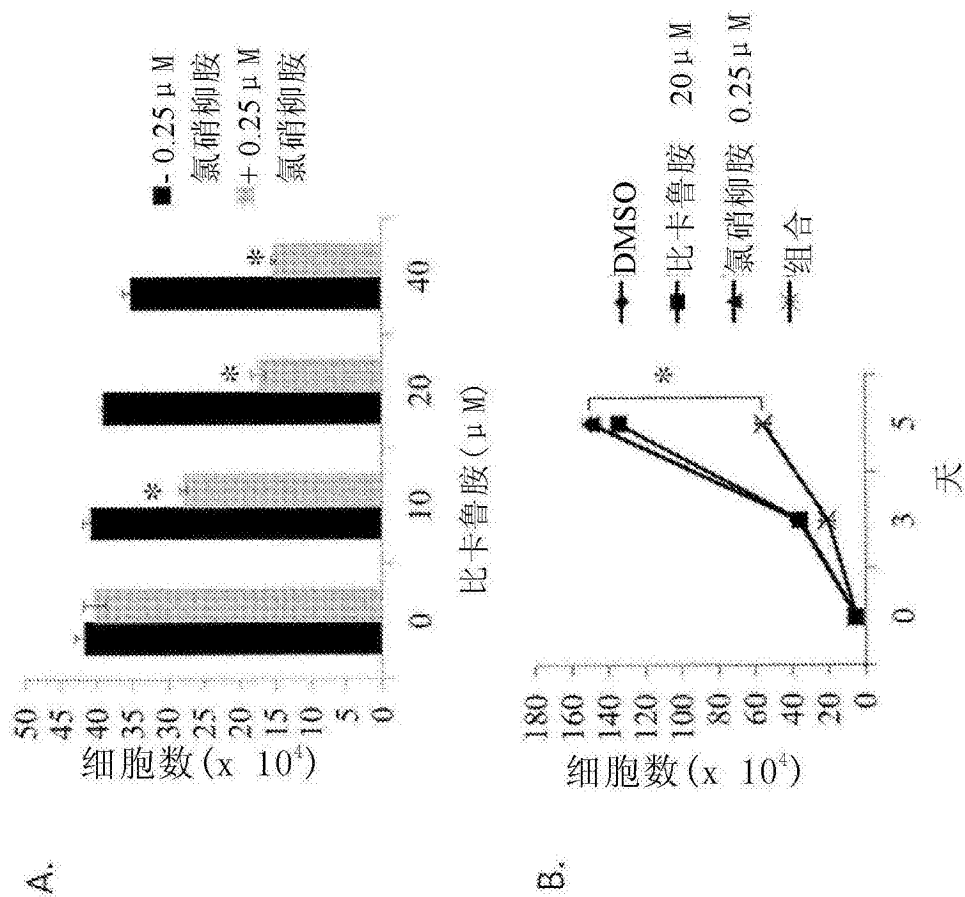


图41

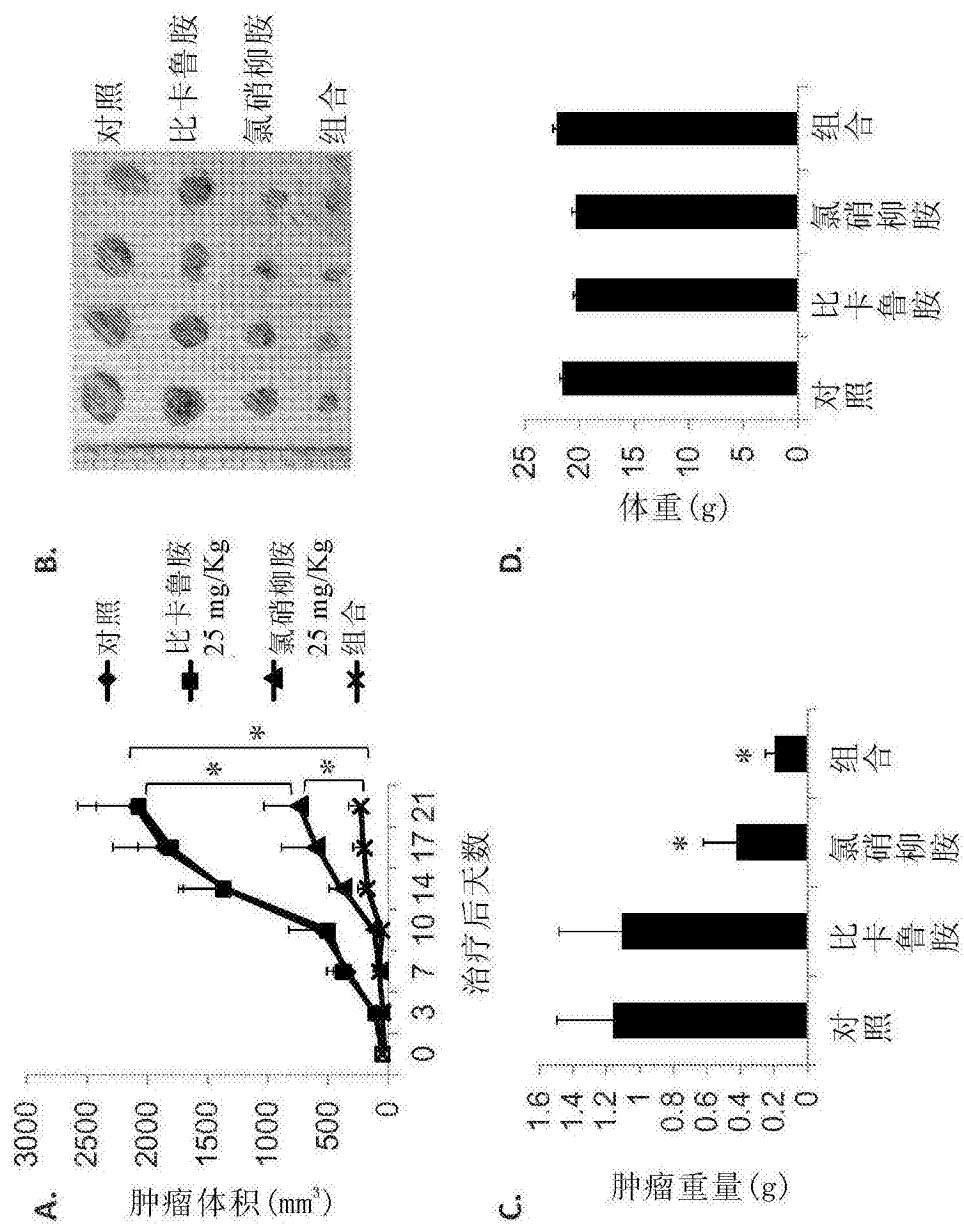


图42

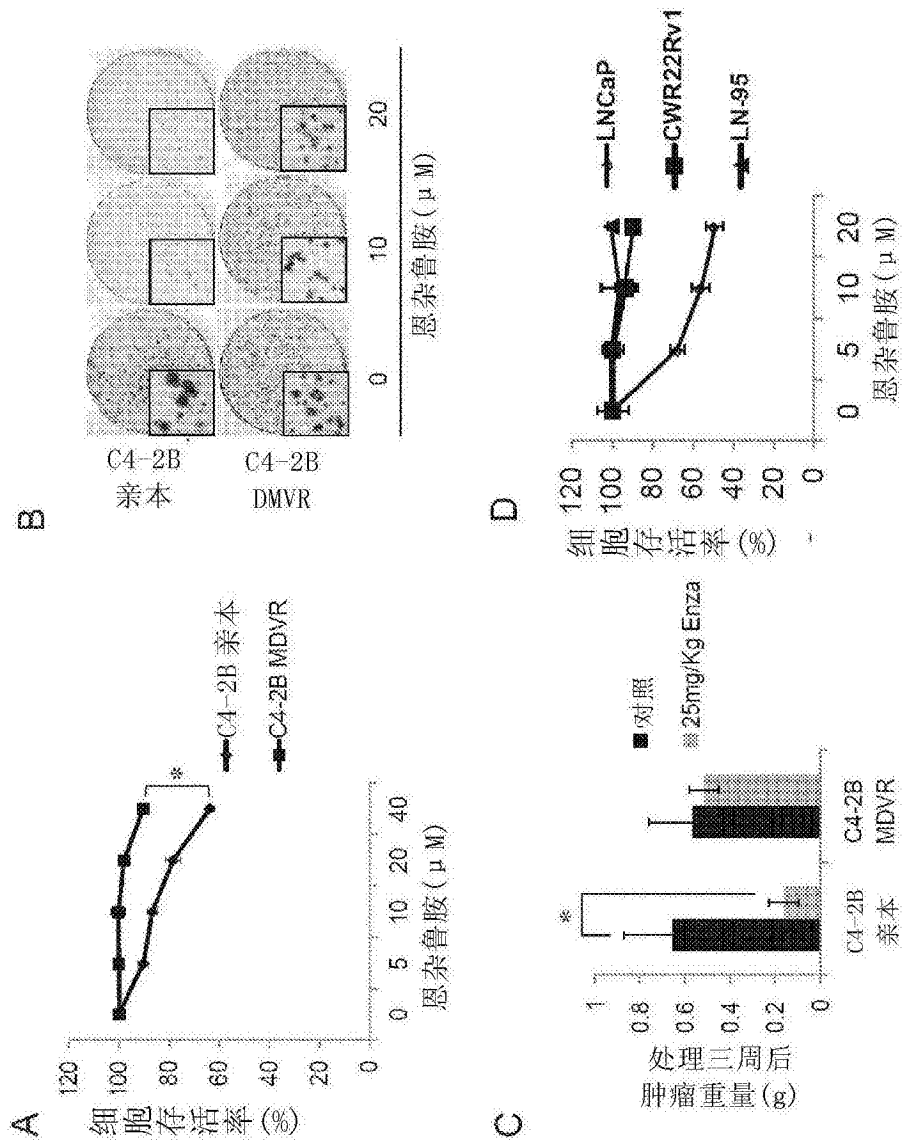


图43

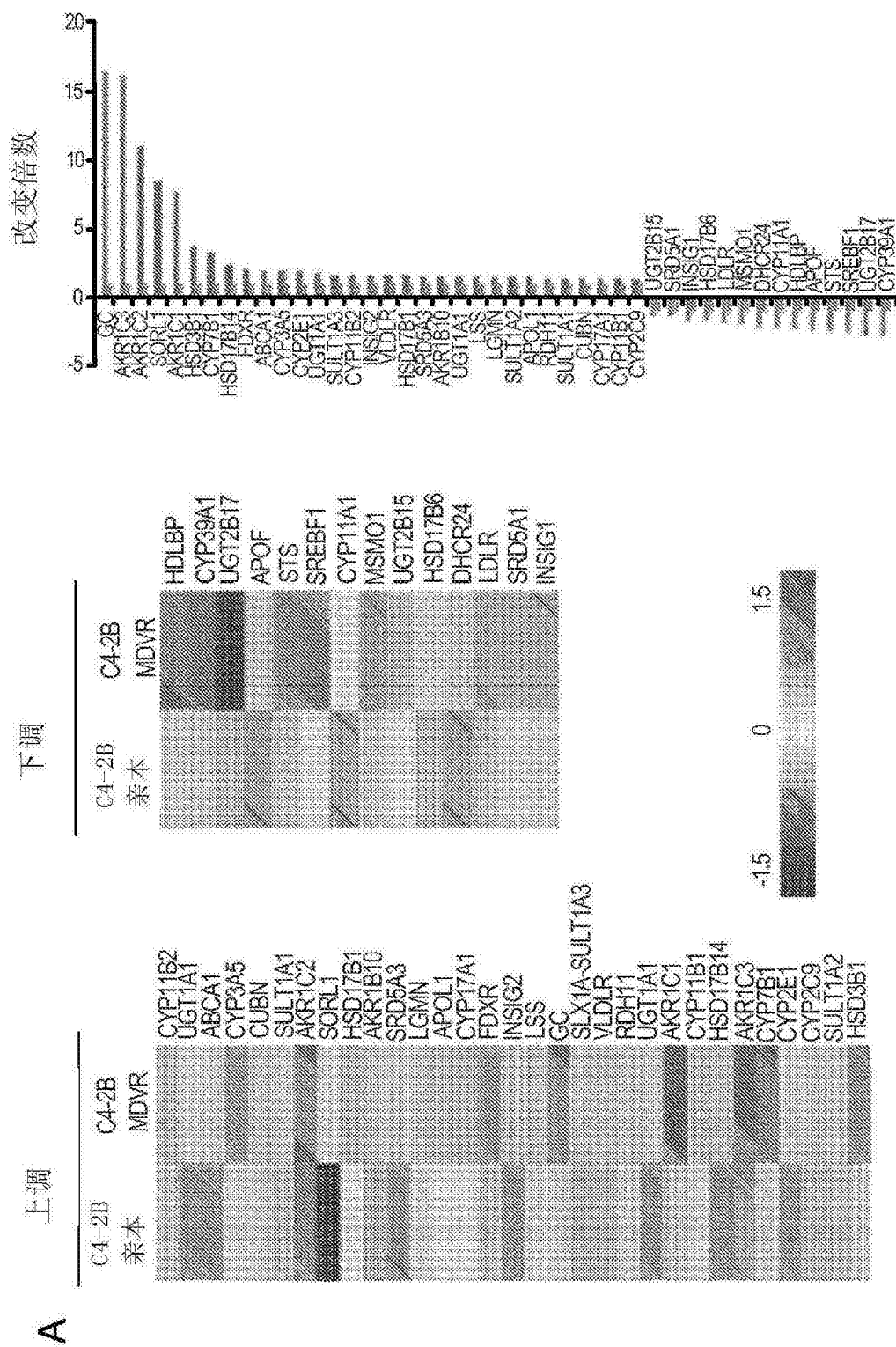


图44

B

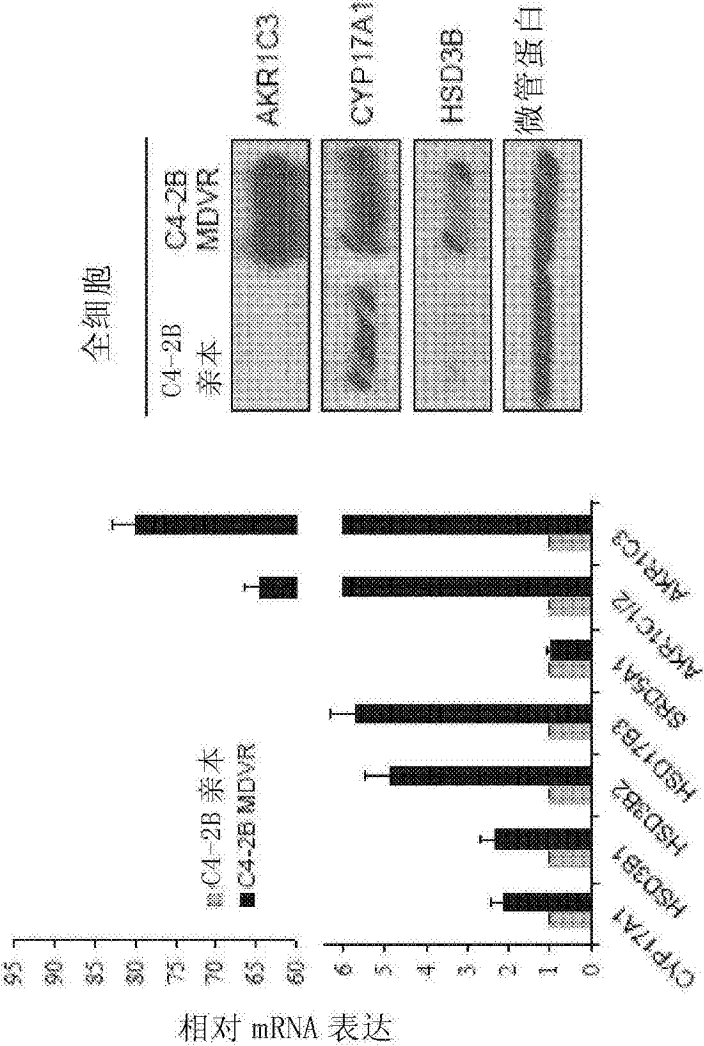


图44(续)

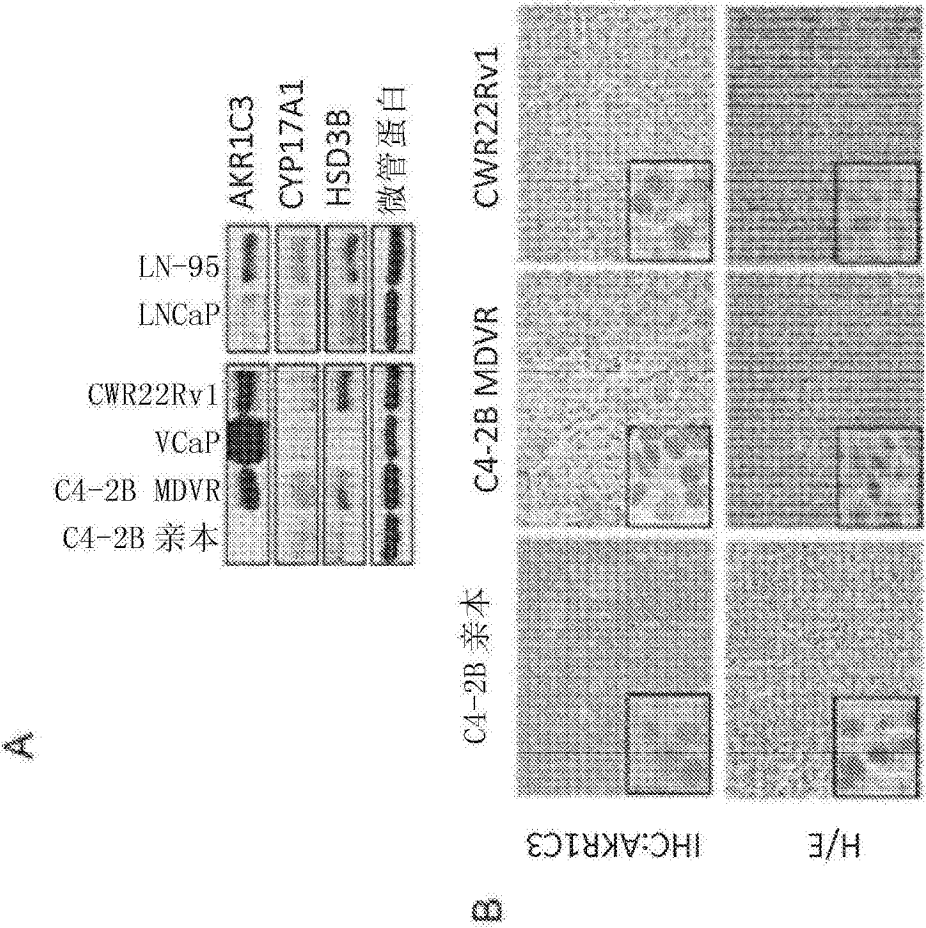


图45

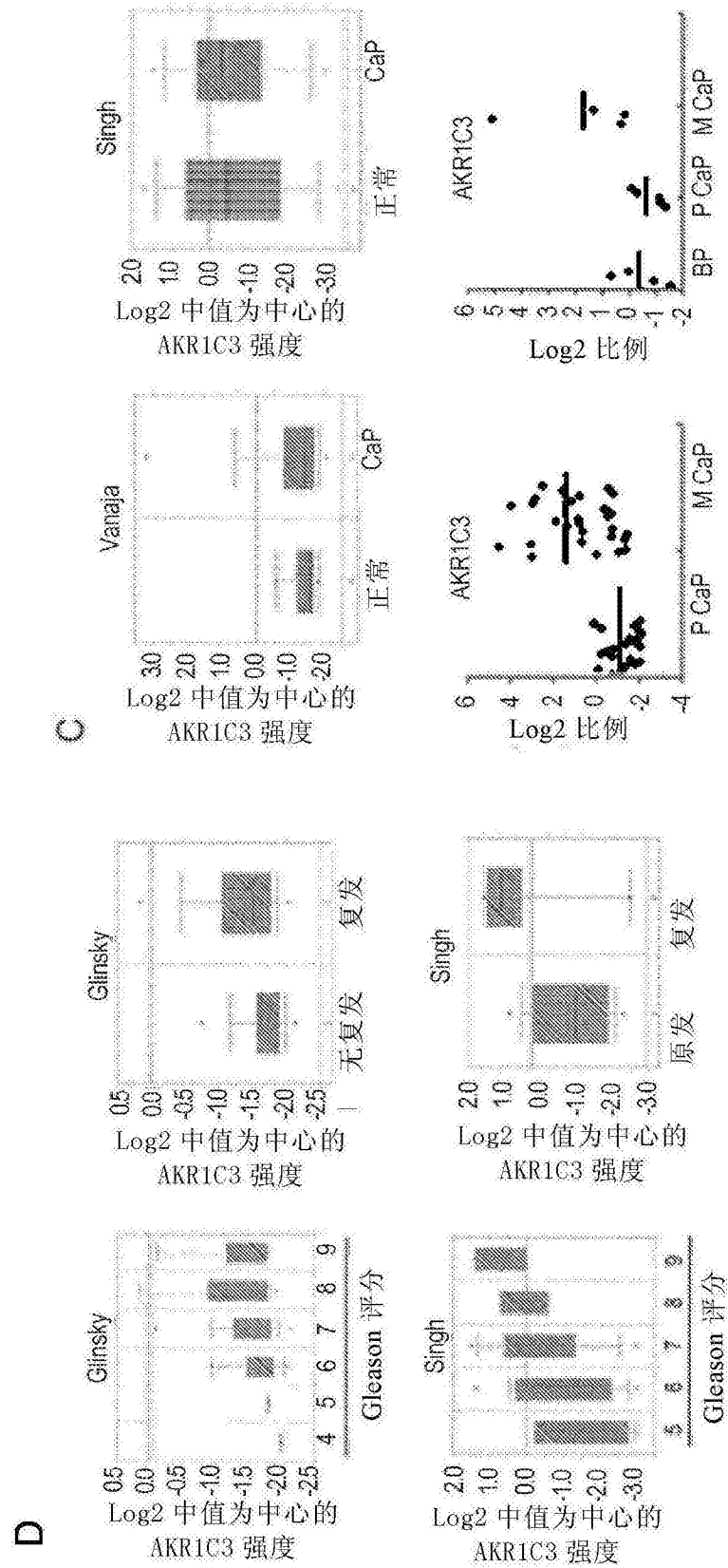
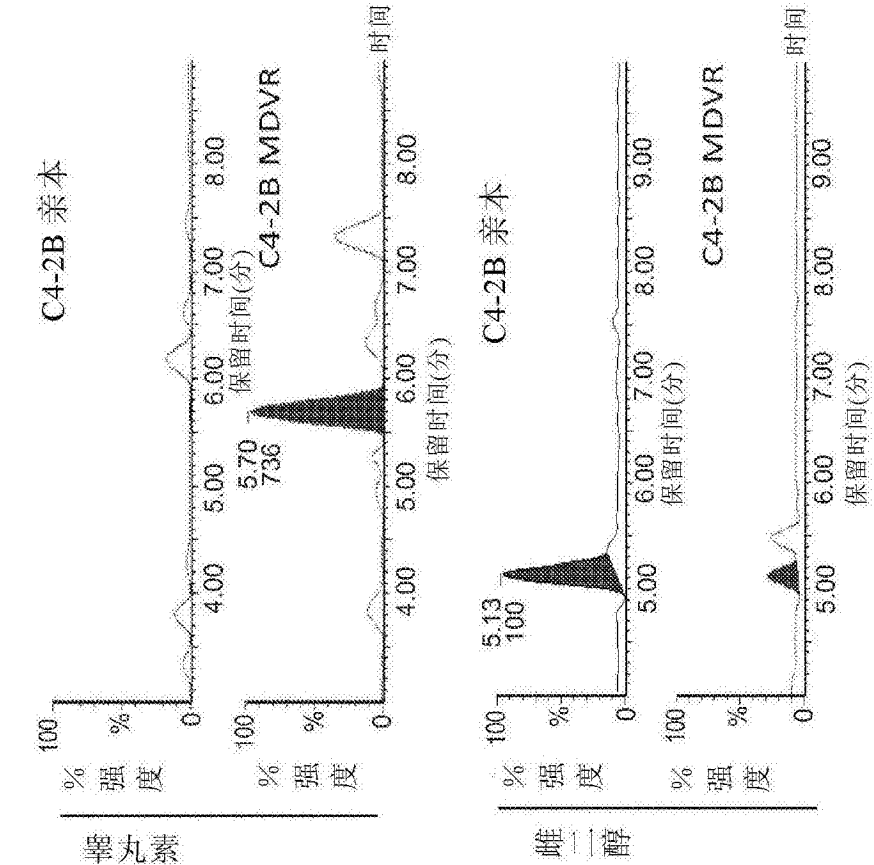
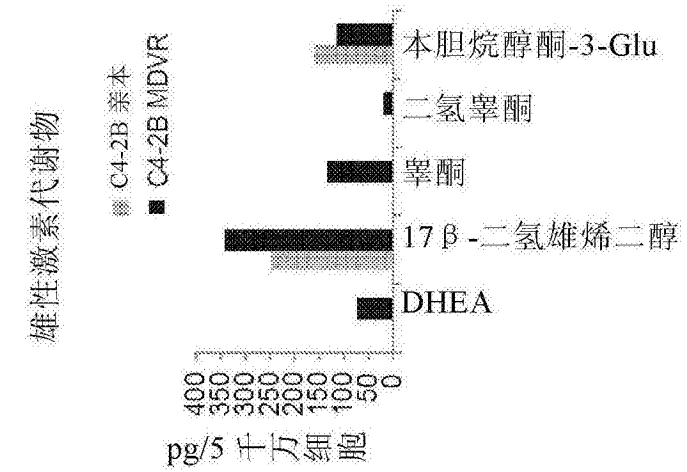


图45(续)



A



B

图46

C

代谢物(pg/5 千万细胞)	C4-2B 亲本	C4-2B MDVR
胆固醇	54094.35	777311.025
20-羟基孕烯醇酮	1721.775	3802.875
孕烯醇酮	41.85	164.325
DHEA	0	72.075
17β -二氢雄烯二醇	247.65	339.225
睾酮	0.15	131.025
二氢睾酮	0	17.55
雌二醇	207.3	82.725
4-OH 雌二醇	63.075	0
2-OH 雌三醇	18.375	11.325
6-羧 雌三醇	1667.7	917.1
去氧皮质酮	0.825	9.975
肾上腺酮	96.975	101.025

图46(续)

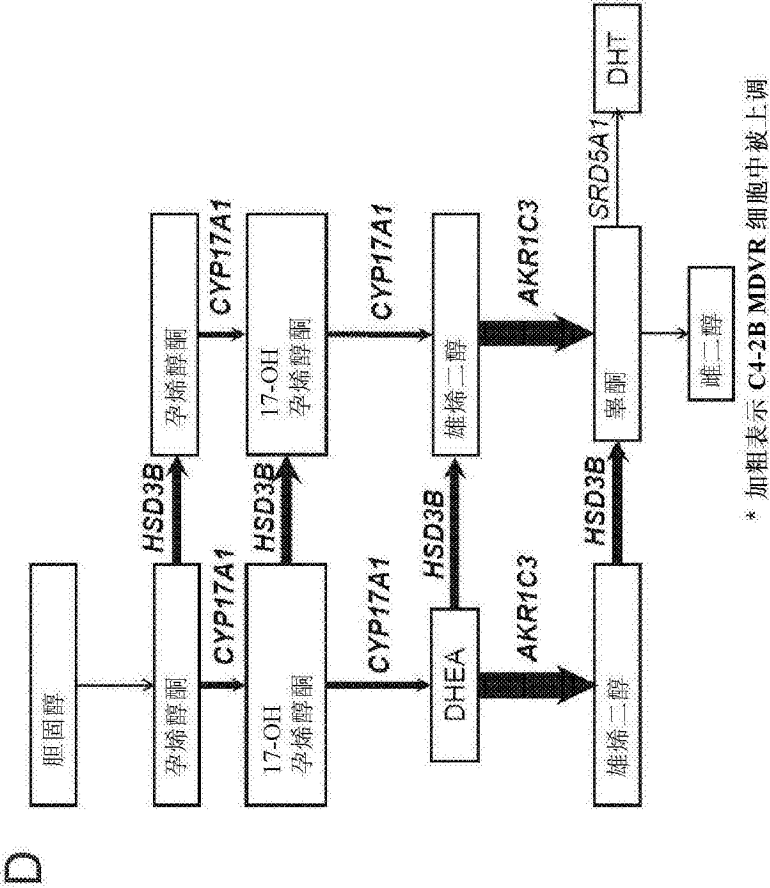


图46(续)

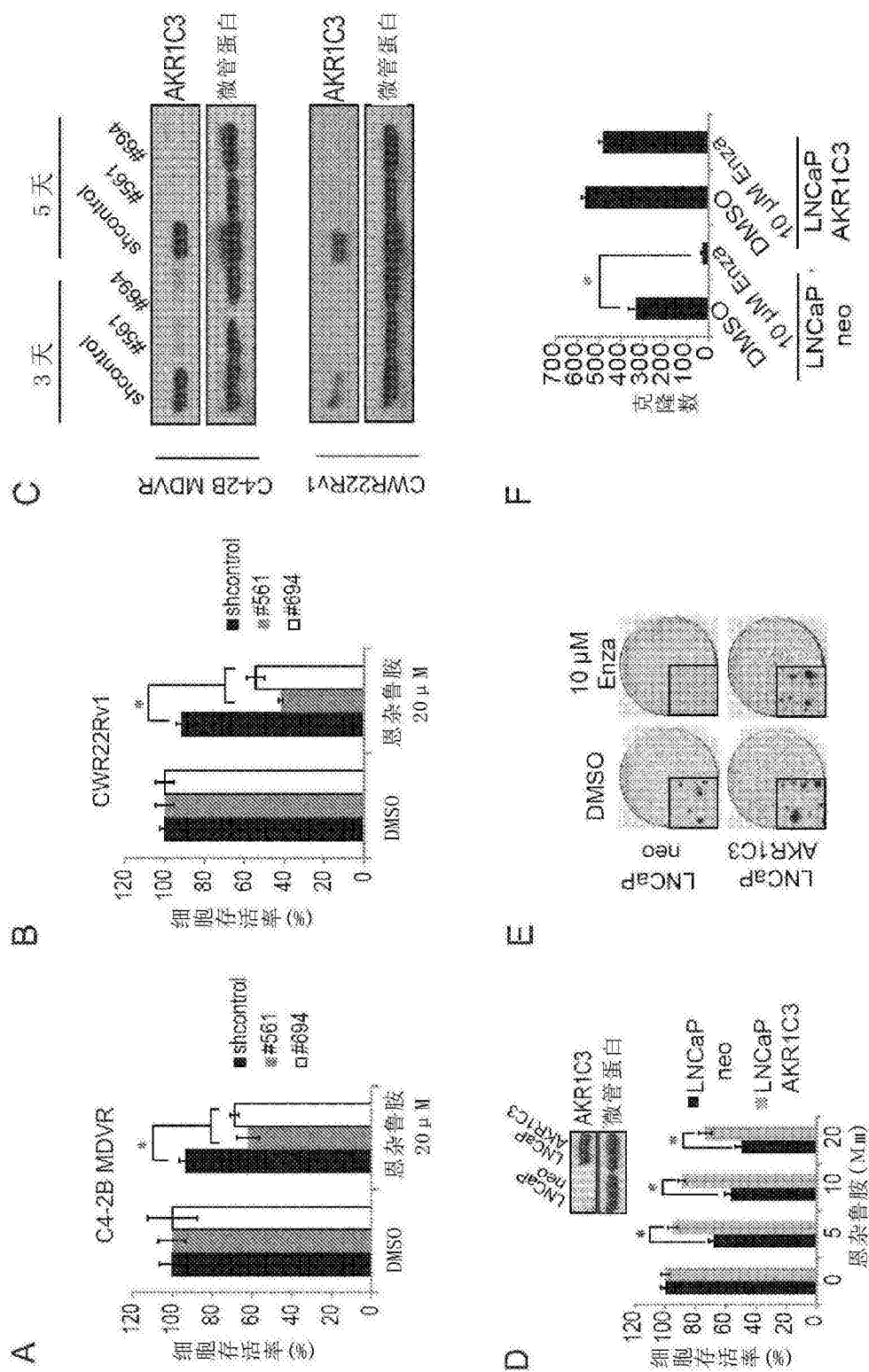


图47

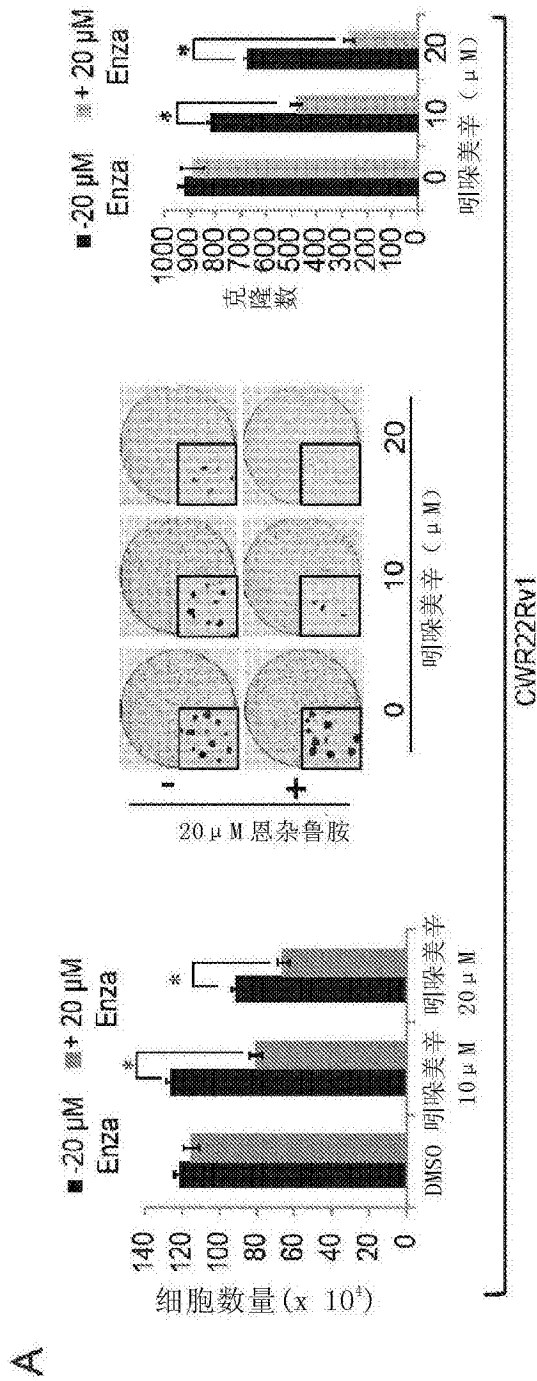


图48

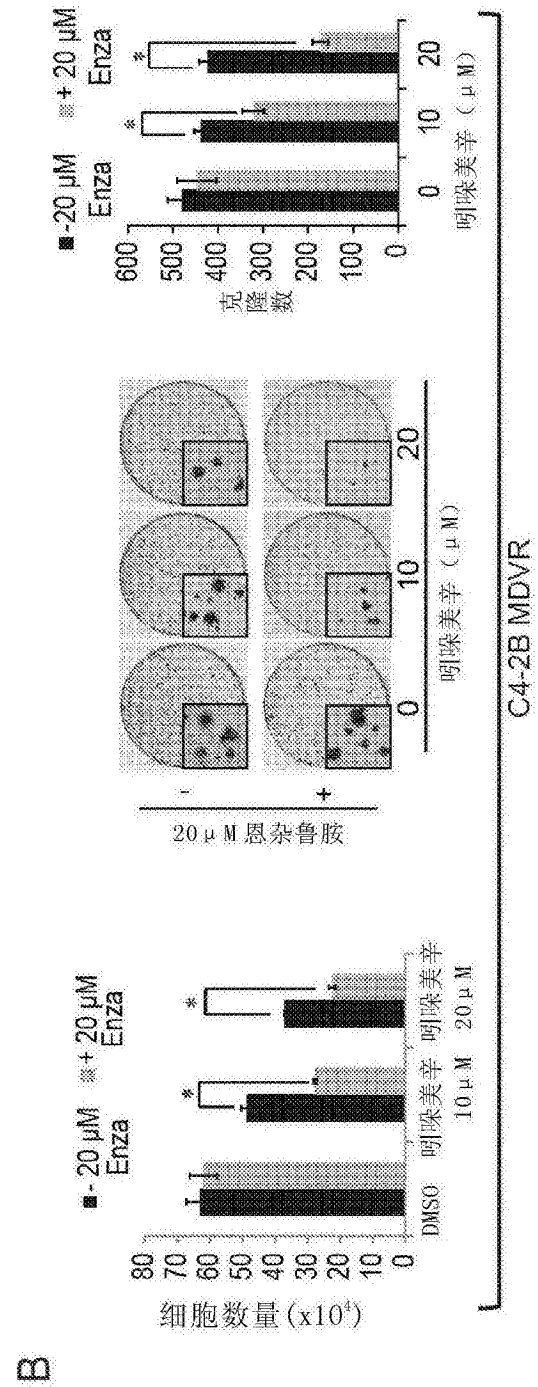


图48(续)

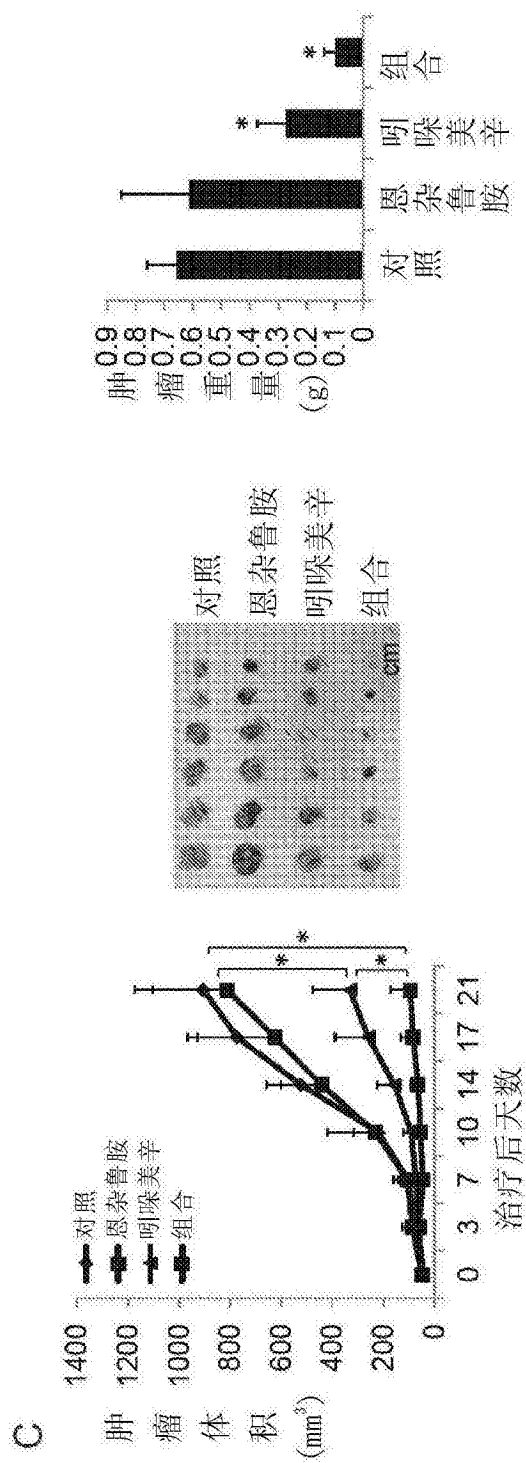


图48(续)

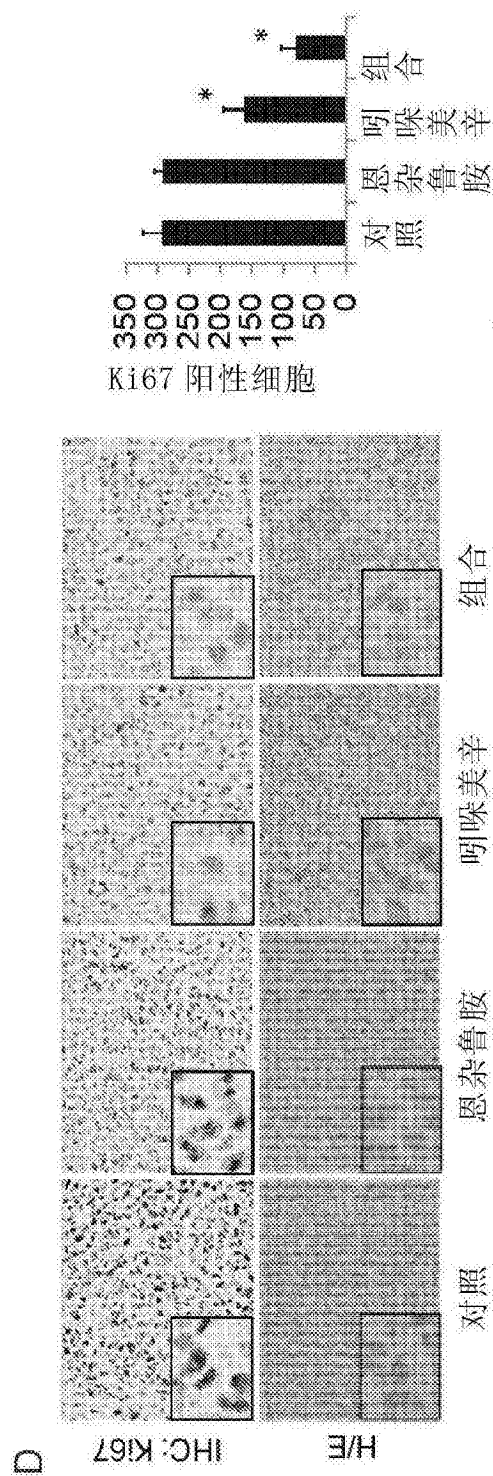


图48(续)