(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106177963 A
(43)申请公布日 2016.12.07

(21)申请号 201610829079.8

(22)申请日 2010.06.04

(30)优先权数据
61/184,658 2009.06.05 US

(62)分案原申请数据
201080024757.4 2010.06.04

(71)申请人 陶制药有限责任公司
地址 美国弗吉尼亚州

(72)发明人 安德鲁·J·克劳斯
劳埃德·S·格雷
蒂莫西·麦克唐纳 乔伊尔·林登

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 张国梁

(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61K 31/4184(2006.01)
A61K 31/675(2006.01)
A61K 31/4015(2006.01)
A61K 31/496(2006.01)
A61K 33/24(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

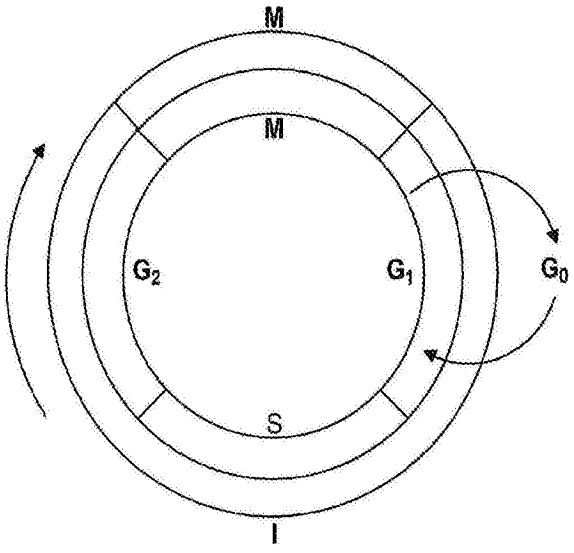
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

用于治疗癌症或癌前病症的交错方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于治疗癌症或癌前病症的交错方法。本发明提供了用于治疗哺乳动物中的疾病或病症的方法，其包括以下步骤：施用治疗上有效量的T型钙通道抑制剂以有效减缓或停止真核细胞通过细胞周期的S、G_2和M期的进程，以增加处于G_1期的真核细胞的比例；停止施用所述T型钙通道抑制剂一个时间段，和施用选自由至少一种化疗剂的剂量、放射剂量及其组合组成的组的剂量以杀死在停止施用所述T型钙通道抑制剂之后进展越过细胞周期的G_1期的真核细胞的比例。



CN 106177963 A

1.用于治疗哺乳动物中的疾病或病症的方法，其包括以下步骤：

(a)施用治疗上有效量的T型钙通道抑制剂以有效减缓或停止真核细胞通过细胞周期的S、G_2和M期的进程，以增加处于G_1期的真核细胞的比例；

(b)停止施用所述T型钙通道抑制剂一个时间段；和

(c)施用选自由至少一种化疗剂的剂量、放射剂量及其组合组成的组的剂量以杀死在停止施用所述T型钙通道抑制剂之后进展越过细胞周期的G_1期的比例的真核细胞。

2.权利要求1的方法，还包括步骤(d)：在施用选自由至少一种化疗剂的剂量、放射剂量及其组合组成的组的剂量之后，施用治疗上有效量的T型钙通道抑制剂以有效停止或减缓真核细胞通过G1与S期之间的检查点的进程。

3.权利要求1的方法，其中所述疾病或病症选自由癌症和癌前病症组成的组。

4.权利要求3的方法，其中所述疾病或病症是肿瘤。

5.权利要求4的方法，其中所述肿瘤是癌性或癌前肿瘤。

6.权利要求1的方法，其中所述哺乳动物是人。

7.权利要求1的方法，其中所述T型钙通道抑制剂包括米贝拉地尔、依福地平、乙琥胺、舒替尼、TTL-1177和镍。

8.权利要求1的方法，其中大约5％至大约25％的真核细胞具有停止在G1与S期之间的细胞周期检查点的进程。

9.权利要求1的方法，还包括通过重复步骤(a)至(c)一次或多次的延伸治疗方法。

10.权利要求9的方法，其中所述疾病或病症是肿瘤。

用于治疗癌症或癌前病症的交错方法

[0001] 本申请是国际申请号PCT/US2010/037437,国际申请日2010年6月4日,中国申请号201080024757.4,发明名称为“用于治疗癌症或癌前病症的交错方法”的专利申请的分案申请。

背景技术

[0002] 常规的癌症治疗鲜有治愈性的,并且可能具有显著的副作用。这部分是由于多数化疗药物的细胞周期特异性作用机理,这使它们对于代表所有细胞周期的细胞的群体不那么有效。

[0003] 细胞周期是发生于细胞中的一系列事件,其引起细胞分裂和复制。在真核细胞中,周期可以分为两个阶段:间期和有丝分裂期。细胞周期的这两个阶段之间的跨越被称作进展或增殖。在间期,细胞生长、积累有丝分裂所需的营养物并复制其DNA。在有丝分裂期,细胞自己分裂为两个不同子代细胞。间期包括3个不同阶段:Gap 1(G_1)期、S期和Gap 2(G_2)期,而有丝分裂期包括两个阶段。G_1期包括细胞尺寸增大,细胞的生物合成活性增大和后续步骤中的DNA复制所需的酶的合成。S期包括DNA合成的开始和所有的染色体的复制。G_2期持续至细胞进入有丝分裂期并包括蛋白合成,包括产生用于有丝分裂的微管。有丝分裂期包括“细胞的染色体在两个子代细胞之间分配”的过程和“原始细胞的细胞质分裂形成两个不同子代细胞”的胞质分裂过程。细胞周期还包括静止期,通常被称作G_0。各个时期之间的界限,例如G_1与S期之间的界限被称作细胞周期检查点(checkpoint)。

[0004] 细胞周期的进程可以被抑制,从而特定的细胞在进入下一个阶段之前,周期停止在某个点——细胞检查点。细胞周期检查点位于细胞周期的不同阶段,两个检查点在G_1与S期之间交界处(G_1/S)和G_2与M期交界处。细胞周期抑制剂能够停止细胞进入下一个阶段的进程,例如,细胞可以在G_1/S细胞周期检查点被抑制,这迫使细胞保持在G_1期直至该抑制剂被消除。

[0005] 在个体中的任何特定癌细胞群体或肿瘤中,细胞周期的长度是可变的。该可变性是由于在G_1或G_0所花的时间段是不同的,而从S期开端至M期末尾的时间长度是相对恒定的。

[0006] 常规的化疗处理仅打乱细胞周期的S或M期中的事件,处于细胞周期的其它阶段的细胞保持相对未受伤害。例如,烷基化剂将作用于S期,而微管稳定性或破坏性药物则作用于M期。不幸的是,某特定的细胞在特定的时间可能不在细胞周期的S或M期。为了补偿这一点,必须在长时间段内重复施用化疗药物,以增加到达处于特定细胞周期阶段的细胞的机会。这种重复施用导致受试者内的较大剂量的有害药物和增加的毒性。

[0007] 理想的是使临床相关的份数的细胞停滞在G_1/S细胞周期检查点,从而可以增强化疗的功效。

发明内容

[0008] 本发明提供了用于治疗哺乳动物中的疾病或病症的方法,其包括以下步骤:施用治疗上有效量的T型钙通道抑制剂以有效减缓或停止真核细胞通过细胞周期的S、G_2和M期

的进程，以增加处于G_1期的真核细胞的比例，停止施用所述T型钙通道抑制剂一个时间段，和施用选自由至少一种化疗剂的剂量、放射剂量及其组合组成的组的剂量以杀死在停止施用所述T型钙通道抑制剂之后进展越过细胞周期的G_1期的真核细胞的比例。

附图说明

[0009] 图1是细胞周期的示意图。外圆圈包括间期(I)和有丝分裂(M)期，其中夸大了有丝分裂期的持续时间相对于其它阶段。内圆圈包括Gap1(G_1)、Gap 2(G_2)和合成(S)期。没有显示Gap 0(G_0)或静止期。

[0010] 图2显示了几种化学试剂抑制钙流入的能力与相同的化学试剂抑制细胞增殖的能力的对比。

[0011] 图3是细胞周期的示意图以及几种钙通道阻断剂对细胞周期进程的影响。

[0012] 图4是在交错治疗中测定的数据的代表性图示。

[0013] 图5是在交错治疗中测定的数据的代表性图示。

[0014] 定义

[0015] 在描述和要求保护本发明时，将根据下文给出的定义使用下列术语。

[0016] 如本文使用的术语“治疗”包括施用疗法以预防、治愈、缓解、减少、抑制或减轻/防止与特定病症、疾病、损失或病症相关的症状。例如，治疗癌症包括肿瘤的抑制或完全停止生长，肿瘤细胞数目的减少，肿瘤尺寸的减小，肿瘤细胞向外周器官/组织浸润的抑制，转移的抑制，以及与病症相关的一种或多种症状的一定程度上的减轻。癌症的治疗也包括施用直接减少肿瘤细胞的病理或使肿瘤细胞对其它治疗剂、例如放疗和/或化疗更易感的治疗剂。如本文使用的术语“治疗”包括特定病症或病症的预防，或与特定病症或病症相关的症状的减轻和/或预防或消除所述症状。

[0017] 如本文使用的术语“药学上可接受的载体、介质或稀释剂”包括任何标准的药学载体，诸如磷酸盐缓冲的盐溶液，水，乳液诸如油/水或水/油乳液，以及多种类型的润湿剂。该术语还包括美国联邦政府的管理部门批准的或美国药典中所列的用于动物包括人的任何试剂。

[0018] 术语“治疗上有效量”意思是本发明的化合物的缓解、减弱、减少或消除特定疾病或病症或预防或延缓特定疾病或病症的发作的量。

[0019] “哺乳动物”意指所有哺乳动物，包括，例如，灵长类，例如人和猴子。并且本文中包括的其它哺乳动物的实例是兔子、狗、猫、牛、山羊、绵羊、小鼠、大鼠和马。优选地，哺乳动物是女人或男人。

[0020] 表述“癌前病症”是指非恶性但如果不治疗可能变为恶性的生长。“癌前病症”也被本领域普通技术人员称作“恶病变前病症”。

[0021] 本领域技术人员理解：“T型钙通道阻抑剂”也被称作“T型钙通道抑制剂”。

[0022] 如本文使用的术语“细胞周期抑制剂”是指能够减缓或停止细胞进程，或细胞停在细胞周期的一个阶段、不进入细胞周期的下一阶段的化合物。

[0023] 如本文使用的术语“细胞毒素”是指能够引起被该化合物影响的细胞坏死或凋亡的化合物。

具体实施方式

[0024] 细胞周期的可变长度主要是由G_1期所花的时间决定的。因此，群体中的任何特定细胞将停留在G_1一段时间，然后细胞进入细胞周期的S期。为了使细胞停止而不继续通过细胞周期检查点，可以施用细胞周期抑制剂，包括T型钙通道抑制剂。

[0025] 首先将治疗有效量的细胞周期抑制剂施用至哺乳动物以有效减缓或停止真核细胞通过细胞周期的S、G_2和M期的进程，从而增加处于G_1期与S期之间的细胞周期检查点(G_1/S)的真核细胞的比例。哺乳动物可以是人。该方法可用于治疗哺乳动物中的癌症和癌前病症，以及癌性和癌前肿瘤。

[0026] 细胞周期抑制剂的施用引起细胞群体中的异步性进展或增殖的癌细胞随着它们通过细胞周期而在G_1/S积累，因为它们进入S期的能力被细胞周期抑制剂阻抑。对于从G_1期经由细胞周期检查点进入S期的细胞，该细胞需要细胞外钙的流入，以激发进程所需的生物化学级联。从细胞外介质中除掉钙会阻断每个细胞的细胞周期运转。这种阻断可以通过施用T型钙通道抑制剂来实现。适宜的T型钙通道抑制剂包括米贝拉地尔(mibefradil)、依福地平(efonidipine)、乙琥胺(ethosuxamide)、舒替尼(sutinib)、TTL-1177(专利化合物，描述于下列参考文献：Gray，L.S.，Perez-Reyes，E.，Gomora，J.C.，Haverstick，D.M.，Shattock，M.，McLatchie，L.，Harper，J.，Brooks，G.，Heady，T.和MacDonald，T.L.(2004) Cell Calcium(细胞钙)36，489-497)和镍等等。因此，每个细胞保持在G_1期，只要存在细胞外的钙，但当在没有钙的情况下到达G_1/S时，细胞将被锁定不动，从而使细胞同步于G_1/S。钙流入进细胞对于通过细胞周期的进展和跨越是必需的。在以下实施例1中进一步描述了这一点。

[0027] 细胞周期抑制剂的施用增加了处于G_1/S的细胞的百分率。在该施用之后，施用至少一种化疗剂的剂量、放射的剂量或二者的剂量，所述剂量靶向杀死处于细胞周期的S期的细胞。化疗剂可以是癌症化疗剂，细胞毒素或其组合。细胞毒素可以是烷基化剂。癌症化疗剂可以是抗代谢物或抗有丝分裂剂，并且可以选自下列实例：替莫唑胺[temozolamide(Temo)]、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、博来霉素(bleomycin)、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、达卡巴嗪(dacarbazine)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依托泊苷(etoposide)、羟基脲(hydroxyurea)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)、拓扑替康(topotecan)、氨甲蝶呤(metotrexate)、米托蒽醌(mitoxantrone)、奥沙利铂(oxaliplatin)、紫杉醇(paclitaxel)、多西紫杉醇(doocetaxol)、长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春瑞滨(vinorelbine)、长春地辛(vindesine)、丝裂霉素C及其组合。至少一种化疗剂的剂量可以在放射的剂量之前、之后或之中施用。放射的剂量可以在至少一种化疗剂的剂量之前、之后或之中施用。首先施用细胞周期抑制剂和细胞毒素之间的时间段，允许细胞积累于细胞周期的G_1/S。该方法增加了处于S或M期的细胞的百分率，从而增加了至少一种化疗剂的剂量、放射的剂量或二者的剂量的效力，并且随后降低了杀死预先确定数量的真核细胞所需的毒素载量。

[0028] 可以在施用至少一种化疗剂的剂量、放射的剂量或二者的剂量之后，第二次施用细胞周期抑制剂，以减缓靶向的细胞或肿瘤的再生长，从而可以视需要提供进一步的剂量

施用。细胞周期抑制剂的第二次施用将使一定百分率的细胞群体再次同步于G_1/S。

[0029] 细胞周期抑制剂可以通过数种途径施用，包括胃肠外、静脉内、肌内、腹膜内、鞘内、栓剂、透皮、表面或口服。细胞周期抑制剂的口服施用是最优选的。口服给药可以以剂量单元的形式施用，通常是药丸或胶囊连同药学上可接受的载体。

[0030] T型钙通道抑制剂限制细胞外钙流入进细胞，这对于多个关键的细胞过程是关键性的。这些过程所需的钙经由通过钙通道的流入而来自细胞外环境。基于序列分析、生物物理特性和药理学敏感性，钙通道被归类为几个家族。这些钙通道被指牵涉于血压的调节、心律和细胞增殖。研究也指出，T型钙通道可能在年龄相关黄斑变性中具有重要作用。至少一种药理学试剂，米贝拉地尔，已经被证明是临床上有效的，因为其抑制T通道的功能。钙进入的抑制剂对于治疗高血压、心律不齐和临床上有害的细胞增殖是有用的。

[0031] T型钙通道存在于细胞、细胞系、尤其是癌细胞系中。具体地，T型钙通道的Cav3.2同种型已经被证明在日本妇女的乳腺癌组织中相对于正常的邻近乳腺组织中异常表达，如下列参考文献中所讨论:Asaga,S.,Ueda,M.,Jinno,H.,Kikuchi,K.,Itano,O.,Ikeda,T.和Kitajima,M.(2006)Anticancer Res(抗癌研究)26,35-42。

[0032] 细胞周期抑制剂有效停止或减缓真核细胞在细胞周期检查点、包括G_1/S的进展，其在下文实施例2中进一步解释。此外，细胞周期抑制剂的施用有效减缓疾病或病症的生长或增值，如下文实施例3所解释的。

[0033] 在施用细胞周期抑制剂之后，有一个不添加细胞周期抑制剂的时间段。该时间段可以是大约0小时至大约336小时的范围。该时间段允许积累于G_1/S的细胞进入细胞周期的S期。通过施用细胞周期抑制剂，大约5％至大约25％的细胞将积累于G_1/S。处于S期的细胞数目的增加使所施用的至少一种化疗剂的剂量、放射的剂量或二者的剂量更加有效，因为高百分率的细胞将被每个剂量影响。“影响”意指杀死或未杀死。

[0034] 在不添加细胞周期抑制剂的时间段之后，施用至少一种化疗剂的剂量、放射的剂量或二者的剂量以杀死处于S期的细胞。“杀死”意指细胞进行凋亡或坏死。至少一种化疗剂的具体剂量、放射的剂量或二者的剂量将由本领域技术人员的临床经验确定，其中不同的疾病由不同的剂量和不同的试剂治疗。仅为举例的目的而言，可以使用下列化疗剂的剂量来治疗下列疾病。在治疗成胶质细胞瘤时，可以使用细胞毒素替莫唑胺(temozolamide)。在治疗黑素瘤时，可以使用细胞毒素美法仑(melphalan)或替莫唑胺。在治疗胰腺癌时，可以使用细胞毒素吉西他滨(gemcitabine)。在治疗乳腺癌时，可以使用细胞毒素吉西他滨。在治疗结肠癌时，可以使用细胞毒素伊立替康(irinotecan)或5-氟尿嘧啶。

[0035] 这种交错治疗，即，施用细胞周期抑制剂，然后施用至少一种化疗剂的剂量、放射的剂量或二者的剂量，可用于降低疾病或病症的进展、增殖或生长，如下文实施例4和5中更详细地解释。在使用该交错治疗时，相比于单独使用的化疗或放射剂量，等量的至少一种化疗剂的剂量、放射的剂量或二者的剂量更加有效。

[0036] 实施例1

[0037] 为了测定钙流入的抑制与进展或增殖之间的对应性，将数种化学试剂的抑制钙流入的能力针对这些试剂的抑制增殖的能力作图，如以下图2中可见。这些试剂是在维吉尼亚大学合成的专利化的化学实体。获得了斜率为0.98、R^2值为0.92的最小乘方相关曲线。按照惯例，相关性不能用于推断因果关系，但在本例中，贝叶斯(Bayesian)方法是符合的，因为

钙流入对于增殖必然是由因及果的，所以阻断钙进入将相应地阻断增殖。具有非常接近1的斜率的回归线表示变量中几乎所有的差异都由其它中的差异促成，意味着除了抑制钙进入之外，这些试剂对于增殖没有作用。

[0038] 实施例2

[0039] 使用流式细胞术和BUdR染色进行了细胞周期分析。在图3中，“Con”代表未经处理的对照细胞。所有其它细胞培养物都经过诺考达唑(nocodazole)处理，其干扰微管的聚合并在M期阻断细胞周期。仅以诺考达唑处理A10细胞阻断了通过M期的细胞周期跨越，如流式细胞术所确定的。因为A10细胞主要停留在G_0与G_1之间的细胞周期检查点(见图3中的“Con”)，所以，评价药理学试剂抑制该阶段之外的跨越的可能性并不比确定在其它细胞周期检查点的阻断更直接。因此，以T型钙通道阻断剂米贝拉地尔(mib)、镍(Ni)或TTL-1177(由受让人Tau Therapeutics拥有的专利化合物)处理细胞培养物24小时，然后加入诺考达唑。在不存在T通道阻断剂的效应时，细胞将被诺考达唑锁定在G_2与M之间的细胞周期检查点，如同单独使用它处理细胞时发生的情况一样。相反，以T型钙通道阻断剂的处理使细胞停留在G_0与G_1之间的细胞周期检查点，并阻止了如果不这样的话将由诺考达唑引起的在G_2与M之间的细胞周期检查点的积累。这证明T型钙通道阻断剂使周期中的细胞停止在G_1/S。

[0040] 实施例3

[0041] 将从患者切除的胰腺癌立即移植进入裸鼠的腰窝并通过连续体内传代维持。移植的肿瘤以大约100mm^3的体积移植，并允许生长至200至300mm^3，然后启动治疗。携带PANC 219肿瘤的小鼠保持不予处理或以米贝拉地尔以65mg/kg p.o.b.i.d.处理(每组n＝10)。将肿瘤生长就处理开始时所测量的的尺寸进行校正。这些结果显示于图4中。处理组中的1只小鼠在第9天(D9)死亡，如图4中的箭头所示。与常规的化疗药物不同，以T型钙通道抑制剂处理未引起肿瘤消退。相反，处理通过使肿瘤细胞停止于G_1/S而控制了肿瘤生长。

[0042] 实施例4

[0043] 使用D54细胞系在鼠异种移植模型中进行了人成胶质细胞瘤的交错治疗的研究。使携带D54肿瘤的皮下移植物的小鼠，其被允许建立大约100mm^3的体积，以米贝拉地尔以40mg/kg p.o.q.i.d.处理7天或不予处理。在第7天，所有的动物接受剂量为LD_{10}的25％的S期细胞毒素替莫唑胺，持续5天。在2天无处理之后，在最初以米贝拉地尔处理的小鼠组中再次启动米贝拉地尔，剂量为35mg/kg p.o.q.i.d.。在第20天，仅接受替莫唑胺组的小鼠中的平均肿瘤体积是173mm^3，与此对比，替莫唑胺+米贝拉地尔组小鼠中的平均肿瘤体积是102mm^3($p＝0.0485$；n＝10/组；Student’s汇集，双尾t-检验)。在所有7个肿瘤体积测定值上进行的汇集的、双尾Student’s t-检验产生$p＝0.0329$。在每个组中没有动物由于肿瘤尺寸而被施以安乐死。没有接受干预的对照组中的平均体积是1214mm^3，有3只动物由于肿瘤尺寸而被施以安乐死。

[0044] 实施例5

[0045] 使用D54细胞系在鼠异种移植模型中进行了人成胶质细胞瘤的交错治疗的进一步研究。使携带D54肿瘤的皮下移植物的小鼠被允许建立，以米贝拉地尔以40mg/kg p.o.q.i.d.处理7天或不予处理。在第7天，所有的动物接受剂量为LD_{10}的25％的S期细胞毒素替莫唑胺，持续5天。在2天无处理之后，在最初以米贝拉地尔处理的小鼠组中再次启动米贝拉地尔，剂量为35mg/kgp.o.q.i.d.。在米贝拉地尔处理5天之后，再次施用替莫唑胺，持

续5天，但剂量为LD_{10}的10％，因为在第一轮细胞毒素处理之后，细胞毒素已经使20只小鼠中的6只的肿瘤变得太小以致于不能测定。结果显示于下文图5中。仅以替莫唑胺处理的小鼠具有156±65mm^3的平均体积，而以替莫唑胺和米贝拉地尔处理的动物的肿瘤体积为70±19mm^3。体积的差异表明以交错治疗的小鼠具有的肿瘤比仅以细胞毒素治疗的小鼠在30天的时间里大约更小55％。在第35天，交错组中的所有小鼠的癌症都触摸不到了。对于第30天和第35天的双尾t检验，$p<0.0001$。在第35天，非参数Wilcoxon符号秩检验给出相同的p值：0.00010。这部分反映了下列事实：交错组中的所有肿瘤都消退至不可触到的尺寸。

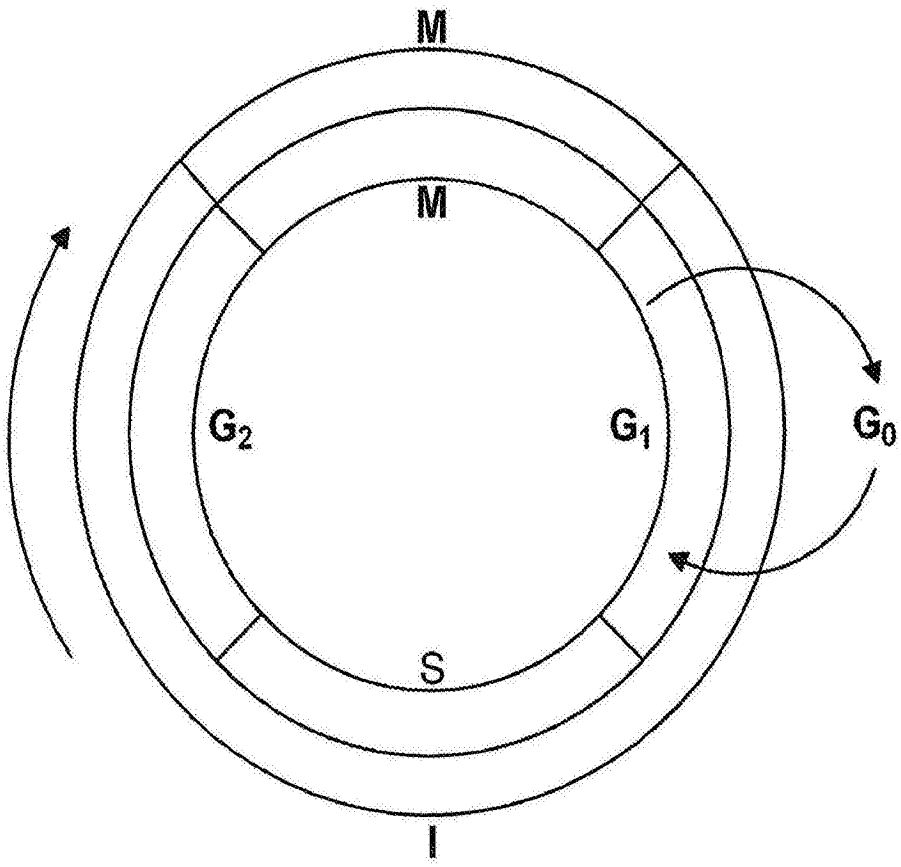


图1

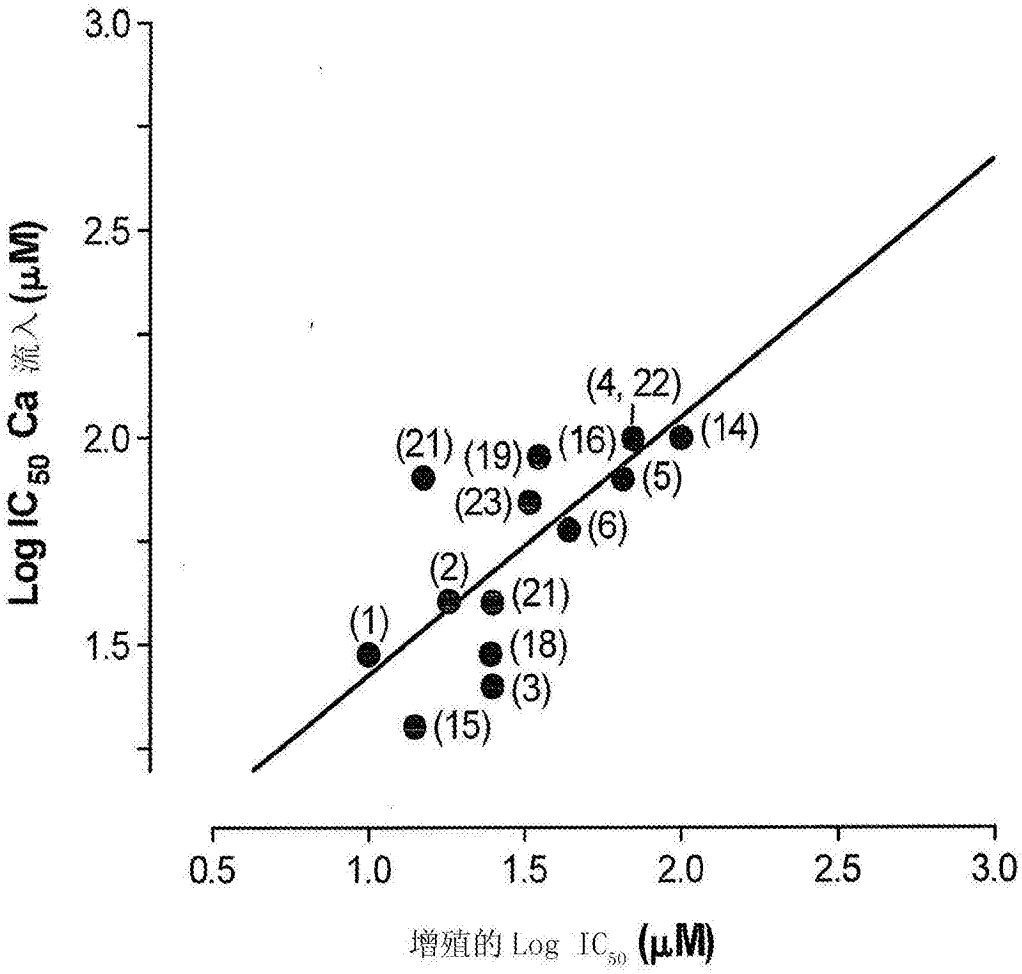

3.0
2.5
2.0
1.5
Log IC50 Ca 流入 (μM)
(4, 22)
(14)
(21)
(19)
(16)
(5)
(23)
(6)
(2)
(21)
(1)
(18)
(3)
(15)
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
增殖的 Log IC50 (μM)

图2

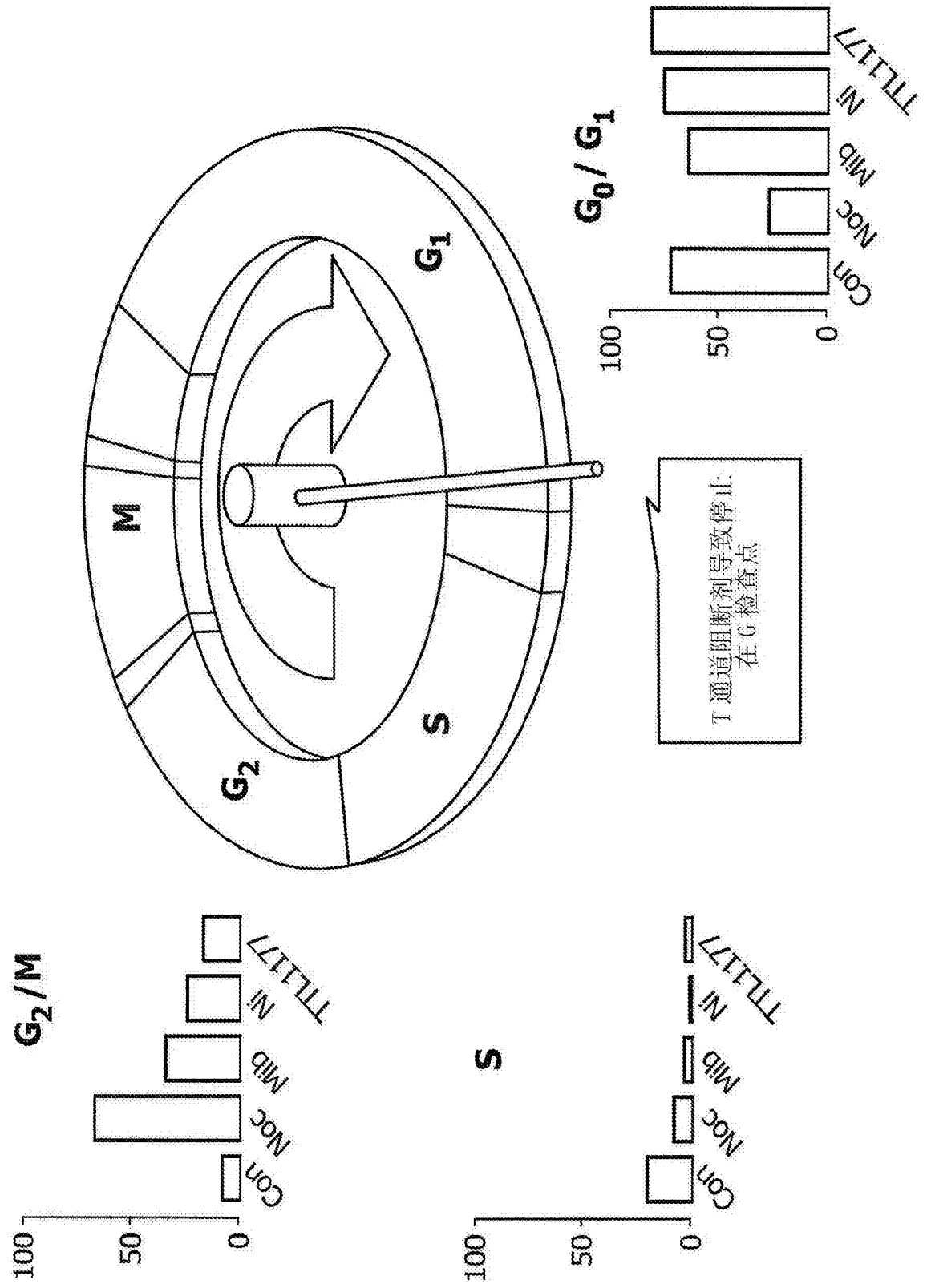

G1
M
G2
S
T 通道阻断剂导致停止
在 G 检查点
G0/ G1
G2/M
S
Con
NoC
Mib
Ni
TTLL17
100
50
0

图3

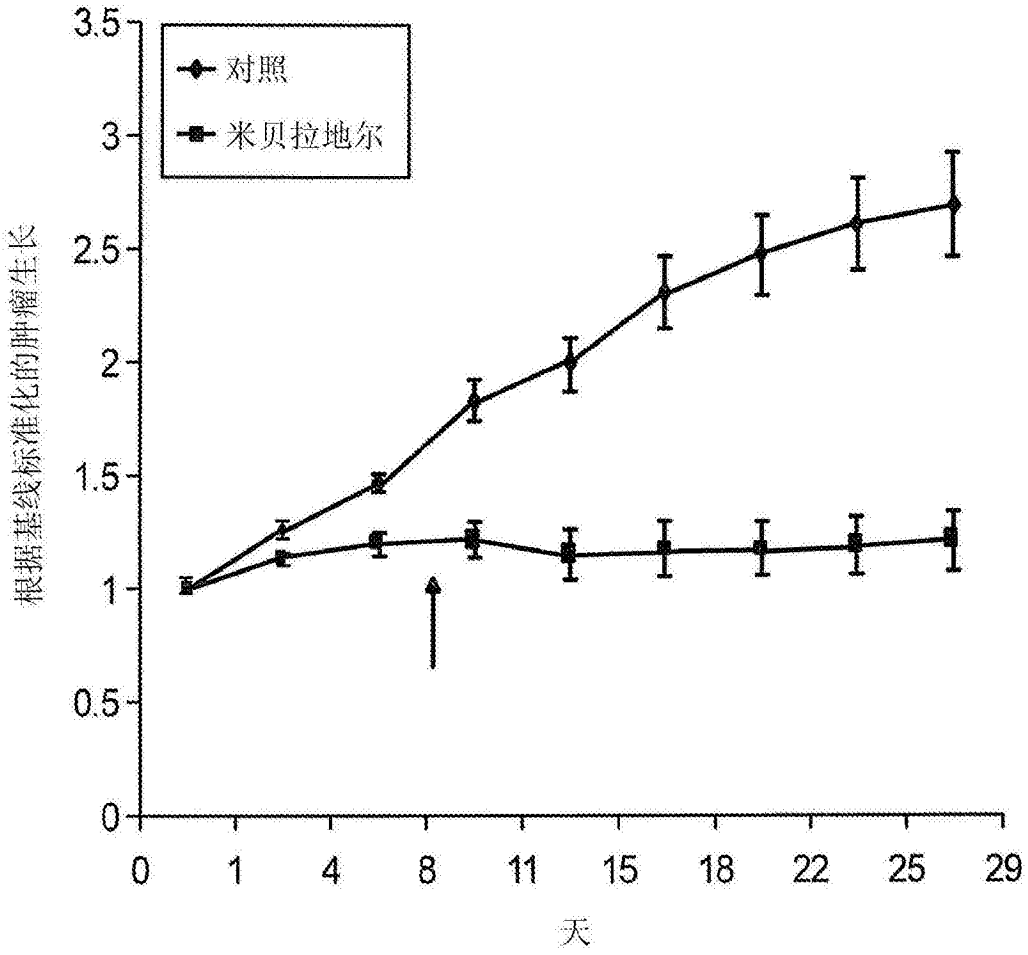


图4

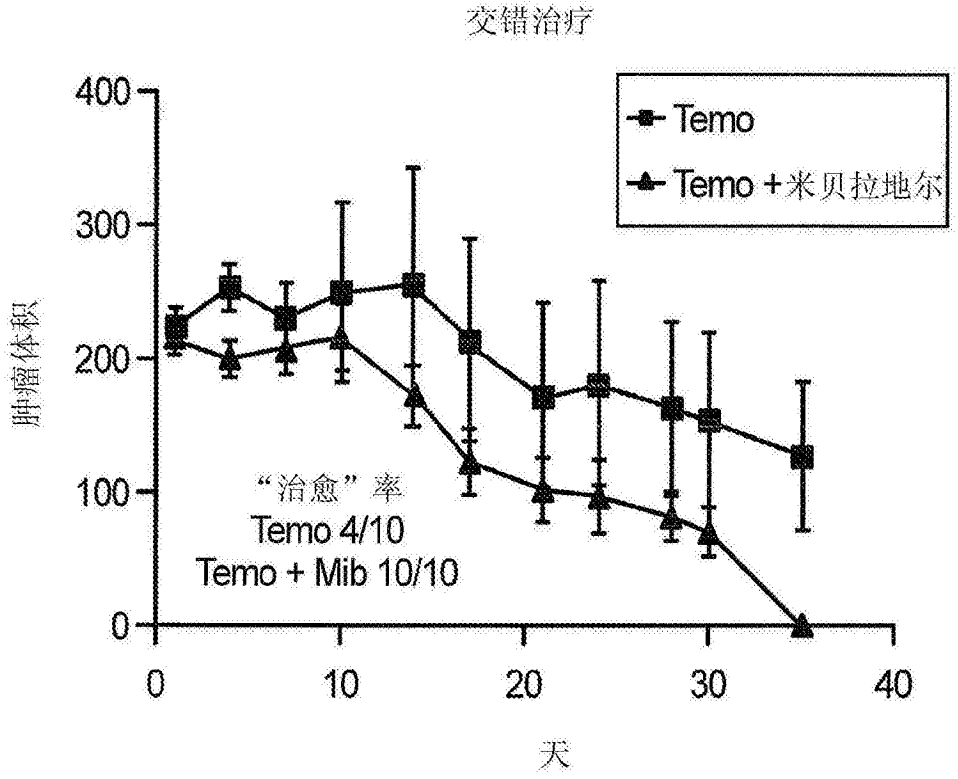

交错治疗
400
300
200
100
0
肿瘤体积
0
10
20
30
40
天
Temo
Temo +米贝拉地尔
“治愈”率
Temo 4/10
Temo + Mib 10/10

图5