(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104958292 B
(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201510222295.1
(22)申请日 2009.10.16
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104958292 A
(43)申请公布日 2015.10.07
(30)优先权数据
61/106,086 2008.10.16 US
(62)分案原申请数据
200980150472.2 2009.10.16
(73)专利权人 阵列生物制药公司
地址 美国科罗拉多州
(72)发明人 布赖恩.J.滕奎斯特
邓肯.H.沃尔克 理查德.D.沃斯纳
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 曹立莉
(51)Int.Cl.
A61K 31/433(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
(56)对比文件
CN 101083988 A,2007.12.05,
CN 102256603 B,2015.06.03,
审查员 刘军政

权利要求书1页 说明书15页 附图18页

(54)发明名称

用于在治疗中增加凋亡的有丝分裂抑制剂

(57)摘要

一种有丝分裂抑制剂,用于向具有处于有丝分裂抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者以增加所述细胞的凋亡。

CN 104958292 B

1.‘161KSP抑制剂在制备静脉内注射液中的用途，所述静脉内注射液用于增加具有处于‘161KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的血液肿瘤细胞的患者中所述细胞的凋亡，其中在‘161KSP抑制剂诱导了有丝分裂停滞之后12至60小时施用‘161KSP抑制剂，周期为11至24天，且所述‘161KSP抑制剂选自：

2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-甲氧基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺；

(S)-2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-甲氧基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺；

(R)-2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-甲氧基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺；和

2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-羟基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺。

2.权利要求1的用途，其中在‘161KSP抑制剂诱导了有丝分裂停滞之后24至48小时施用‘161KSP抑制剂。

3.权利要求1的用途，其中所述‘161KSP抑制剂的施用周期为14至21天。

4.权利要求2的用途，其中所述‘161KSP抑制剂的施用周期为14至21天。

5.权利要求2的用途，其中所述抑制剂用于以最大耐受剂量施用。

6.权利要求3的用途，其中所述抑制剂用于以最大耐受剂量施用。

7.权利要求4的用途，其中所述抑制剂用于以最大耐受剂量施用。

8.权利要求5的用途，其中所述最大耐受剂量为1.25mg/m^2/日。

9.权利要求6的用途，其中所述最大耐受剂量为1.25mg/m^2/日。

10.权利要求7的用途，其中所述最大耐受剂量为1.25mg/m^2/日。

11.权利要求1-10任一项的用途，其中所述血液肿瘤细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。

用于在治疗中增加凋亡的有丝分裂抑制剂

[0001] 本申请是中国申请号为200980150472.2、发明名称为“用于在治疗中增加凋亡的有丝分裂抑制剂”且申请日为2009年10月16日的专利申请(PCT申请号为PCT/US2009/061106)的分案申请。

[0002] 发明背景

技术领域

[0003] 本发明涉及用于向具有处于有丝分裂抑制剂诱导的有丝分裂停滞(mitotic arrest)状态的病原细胞(pathogenic cells)的患者施用以增加所述细胞的凋亡的有丝分裂抑制剂。

背景技术

[0004] 有丝分裂抑制剂(inhibitor of mitosis)(也称作有丝分裂抑制剂(mitotic inhibitor)或抗有丝分裂剂(anti-mitotics))对于疾病治疗是重要的治疗方法,且其用于治疗癌症,以及抗痛风和抗真菌剂,并治疗再狭窄。这些有丝分裂抑制剂治疗干扰有丝分裂,从而使得细菌不再分裂。在癌症中,有丝分裂抑制剂可停止癌性生长,并导致凋亡,或脱离有丝分裂继以细胞死亡。

[0005] 已知许多有丝分裂抑制剂。一些有丝分裂抑制剂为抗微管蛋白剂。抗微管蛋白剂作用于微管蛋白,其为有丝分裂所必需的蛋白。抗微管蛋白剂包括长春花生物碱类、紫杉烷类和埃坡霉素类(epothilones)。也调查了非微管蛋白靶向性有丝分裂抑制剂作为癌症治疗法。不同的有丝分裂抑制剂影响细胞周期的不同部分,并有时影响有丝分裂之外的其他功能。举例而言,抗微管蛋白剂可在增殖细胞和在终末分化细胞中影响非有丝分裂的细胞骨架功能。已将外周神经毒性与微管蛋白剂相关联。因此不同的有丝分裂抑制剂可具有不同的毒性。

[0006] 长春花生物碱类抑制微管聚合,由此抑制有丝分裂。长春花生物碱类包括长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。长春碱已用于治疗某些种类的癌症,包括霍杰金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非小细胞肺癌、乳腺癌和睾丸癌。长春新碱已用于治疗某些种类的癌症,包括淋巴瘤、乳腺癌、肺癌和急性淋巴母细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia)。长春碱和长春新碱还用于一些主要实体瘤的姑息治疗方案(参见Wood,Kenneth W.等“Past and future of the mitotic spindle as an oncology treatment.”Current Opinion in Pharmacology.Vol.1,Issue 4(August 1,2001):pp.370-377)。长春地辛已用于治疗某些种类的癌症,包括白血病、淋巴瘤、黑素瘤、乳腺癌和肺癌。长春瑞滨已用于治疗某些种类的癌症,包括乳腺癌和非小细胞肺癌。

[0007] 紫杉烷类稳定化微管,由此灭活细胞的微管功能,并抑制细胞分裂。紫杉烷类包括紫杉醇(包括Abraxane®)和多西紫杉醇(docetaxel)。紫杉醇用于治疗某些种类的癌症,包括肺癌、卵巢癌、乳腺癌和晚期形式的卡波西肉瘤。多西紫杉醇用于治疗某些种类的癌症,包括乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌。还在开发新的紫杉烷类,例如BMS275183(参见

2006EJC Poster:Broker,L.E.,et al.“The novel oral taxanes BMS275183 has a favorable activity and toxicity profile in a twice weekly schedule; Preliminary findings from an extended phase I trial.”EJC Suppl.2006Abstract 644,p.194)。

[0008] 此外,秋水仙碱是作为抗微管蛋白剂起作用的有丝分裂抑制剂。秋水仙碱通过抑制微管聚合来抑制有丝分裂。秋水仙碱用于治疗痛风。

[0009] 埃坡霉素类为一类在紫杉醇抗性癌细胞系中有活性的微管稳定化化疗剂(参见Denduluri,Neelima等“Phase II trial of ixabepilone,an epothilones B analog, given daily for three days every three weeks,in metastatic breast cancer.” Invest.New Drugs.25(August 25,2006):pp.63-67)。埃坡霉素类包括埃坡霉素A、埃坡霉素B、埃坡霉素D和埃坡霉素类似物伊沙匹隆(ixabepilone)。伊沙匹隆已经批准用于治疗不再响应现有的化疗的攻击性转移性或局部晚期的乳腺癌。

[0010] 多拉司他汀(dolastatin)和多拉司他汀类似物为有丝分裂抑制剂。这些化合物包括多拉司他汀10、多拉司他汀15、synthadotin(或者SYN-D或ILX651;参见2004 ASCO Abstract No.3068,Hammond,L.A.,et al.“Phase(Ph)I evaluation of the dolastatin analogue synthadotin(SYN-D;ILX651):Pooled data analysis of three alternate schedules in patients(pts)with advanced solid tumors.”J.Clin.Oncology.2004 Suppl.Abstract 3068 14s(2004))、LU103793和西马多丁(cemadotin)。

[0011] Aurora激酶,包括Aurora A、Aurora B和Aurora C,为在有丝分裂中起作用的丝氨酸/苏氨酸激酶。已靶向Aurora激酶作为有丝分裂抑制剂。Aurora A在有丝分裂前期起作用,并为中心体正确起作用所需。Aurora B在有丝分裂纺锤体对中心体的附接中起作用。Aurora激酶抑制剂包括AZD-1152、CYC-116、AS-703569(或R-763)、MLN-8054、PHA-739358、AT-9283、SNS-314、AZD-1152-HQPA、MLN-8237、KW-2449、PF-3814735、ENMD-2076(或ENMD-981693)、PHA-739385、MK-0457(或VX-680)和MK-5108(或VX-689)。对于更多,参见Gautschi,Oliver等“Aurora Kinases as Anticancer Drug Targets.”Clin.Cancer Res.14(6)(March 15,2008):pp.1639-48。

[0012] Polo样激酶类(“Plk”),包括polo样激酶1(“Plk1”)、polo样激酶2(“Plk2”)、polo样激酶3(“Plk3”)和polo样激酶4(“Plk4”),参与有丝分裂过程中有丝分裂纺锤体的形成和变化以及CDK/细胞周期蛋白复合物的激活。已靶向polo样激酶类作为有丝分裂抑制剂。polo样激酶抑制剂包括ON-01910Na(或ON-1910Na或Onc-01910)、BI-2536(参见Steegmaier,Martin等“BI 2536,a Potent and Selective Inhibitor of Polo-like Kinase 1,Inhibits Tumor Growth In Vivo.”Current Biology,17(February 20,2007): pp.316-322)和GSK-461364(或GSK-461364A)。

[0013] 驱动蛋白为一类动力蛋白。有丝分裂驱动蛋白(mitotic kinesin)为有丝分裂纺锤体装配和起作用所必需的酶。在有丝分裂的所有阶段,有丝分裂驱动蛋白起至关重要的作用。在有丝分裂过程中,驱动蛋白将微管组织为双极结构,其为有丝分裂纺锤体。有丝分裂驱动蛋白的抑制导致有丝分裂纺锤体的畸形或功能障碍,经常导致细胞周期停滞和凋亡(细胞死亡)。

[0014] 经鉴定的有丝分裂驱动蛋白包括驱动蛋白纺锤体蛋白(“KSP”)。在有丝分裂过程

中，KSP与有丝分裂纺锤体的微管蛋白相联系。KSP的抑制阻止了前中期过程中纺锤体极的分离，导致单极纺锤体，其造成有丝分裂停滞与程序性细胞死亡的诱导。人KSP也称为HsEg5。

[0015] 美国专利申请公开2006/0100161号描述了包括下述的化合物：2-(3-氨基丙基)-5-(3-氟苯基)-N-(2-甲氧乙基)-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺(2-(3-aminopropyl)-5-(3-fluorophenyl)-N-(2-methoxyethyl)-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-thiadiazole-3(2H)-carboxamide)(下文中称为“化合物1”)、2-(3-氨基丙基)-5-(3-氟苯基)-N-甲氧基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺(2-(3-aminopropyl)-5-(3-fluorophenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-thia diazole-3(2H)-carboxamide)(下文中称为“化合物2”)、2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-甲氧基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺(2-(3-aminopropyl)-5-(2,5-difluorophenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-t hiadiazole-3(2H)-carboxamide)(下文中称为“化合物3”)、(S)-2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-甲氧基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺((S)-2-(3-aminopropyl)-5-(2,5-difluorophenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-thiadiazole-3(2H)-carboxamide)(下文中称为“化合物4”)、(R)-2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-甲氧基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺((R)-2-(3-aminopropyl)-5-(2,5-difluorophenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-thiadiazole-3(2H)-carboxamide)(下文中称为“化合物5”)，和2-(3-氨基丙基)-5-(2,5-二氟苯基)-N-羟基-N-甲基-2-苯基-1,3,4-噻二唑-3(2H)-甲酰胺(2-(3-aminopropyl)-5-(2,5-difluorophenyl)-N-hydroxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-t hiadiazole-3(2H)-carboxamide)(下文中称为“化合物6”)。化合物1、2、3、4、5和6(统称为“‘161 KSP抑制剂”)为KSP抑制剂。

[0016] KSP抑制剂包括伊斯平斯(ispinesib)(或SB-715992或CK-0238273;参见2008ASCO Poster:“A Phase I-II Open-Label Trial of Ispinesib on an Alternating Dosing Schedule in Chemotherapy-Naïve Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer(MBC).”www.cytokinetics.com/pdf/ASCO2008A.pdf)、‘161 KSP抑制剂、AZD-4877、CRx-026、SB-743921(SB-921)、MK-0731、EMD-534085和ARQ 621。已在广泛范围的肿瘤类型中测试了伊斯平斯，并正在人临床试验中进行测试。

[0017] 在其他在有丝分裂过程中起作用的动力蛋白中，还描述了中心体相关蛋白E(“CENP-E”)的小分子抑制剂。CENP-E是动力蛋白(参见Chan,G.K.T.等“Characterization of the Kinetochore Binding Domain of CENP-E Reveals Interactions with the Kinetochore Proteins CENP-F and hBUBR1.”J.Cell Biology.Vol.143,No.1(October 5,1998):pp.49-63)，并可归类为一类有丝分裂驱动蛋白。CENP-E抑制剂包括GSK-295(或GSK-923295)。

[0018] 已测试了许多有丝分裂抑制剂作为治疗剂用于治疗疾病。一些有丝分裂抑制剂以一日日程施用，为每周、每两周(biweekly)、每月，并包括24小时输注(infusion)。仅施用一剂，所述有丝分裂抑制剂可能无法保持细胞有丝分裂停滞足够久以使细胞进入凋亡或脱离有丝分裂并进入细胞死亡。同样，一些有丝分裂抑制剂每周施用两次、每周施用三次或每月

施用三次。在较长时间期间施用几剂常常减少患者能够耐受的剂量，且单独剂量可能无法达到生物学上有效的水平。

发明内容

[0019] 令人意想不到的是，发现在对具有病原细胞的哺乳动物施用第一剂有丝分裂抑制剂，所述细胞进入有丝分裂停滞之后，在所述第一剂之后一或两日施用第二剂有丝分裂抑制剂增加凋亡或从有丝分裂脱离继以细胞死亡。

[0020] 在一个方面，本发明涉及有丝分裂抑制剂，其用于向具有处于有丝分裂抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡。

[0021] 本发明的另一个方面提供‘161 KSP抑制剂，其用于向具有处于‘161 KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡。

[0022] 附图简述

[0023] 图1显示凋亡清洗(washout)实验。

[0024] 图2显示体外HT-29细胞中胱天蛋白酶3/7经时活性(activity over time)。

[0025] 图3显示体外RPMI 8226细胞中胱天蛋白酶3/7经时活性。

[0026] 图4显示对于两个不同给药方案的多个时间点裸鼠中皮下HT-29异种移植物中的单极纺锤体的量。

[0027] 图5显示对于两个不同给药方案的多个时间点裸鼠中皮下HT-29异种移植物中的单极纺锤体的量。

[0028] 图6显示对于两个不同给药方案的多个时间点裸鼠中皮下HT-29异种移植物中的凋亡细胞的百分比。

[0029] 图7显示对于两个不同给药方案的多个时间点裸鼠中皮下HT-29异种移植物中的凋亡细胞的百分比。

[0030] 图8显示对于多个给药量在24小时和48小时裸鼠中皮下HT-29异种移植物中具有单极纺锤体和双极纺锤体的细胞的百分比。

[0031] 图9显示对于多种给药量在24小时和48小时裸鼠中皮下HT-29异种移植物中凋亡细胞的百分比。

[0032] 图10显示用皮下HT-29异种移植物在裸鼠中进行的肿瘤生长抑制(“TGI”)实验。

[0033] 图11显示用皮下HT-29异种移植物在裸鼠中进行的TGI实验。

[0034] 图12显示用皮下HT-29异种移植物在裸鼠中进行的TGI实验。

[0035] 图13显示用皮下HT-29异种移植物在裸鼠中进行的TGI实验。

[0036] 图14显示用皮下HT-29异种移植物在裸鼠中进行的TGI实验。

[0037] 图15显示用皮下HT-29异种移植物在裸鼠中进行的TGI实验。

[0038] 图16显示用皮下HT-29异种移植物在裸鼠中进行的TGI实验。

[0039] 图17显示对于不同给药方案在多个时间点在SCID-beige小鼠中皮下RPMI 8226异种移植物中单极纺锤体的百分比。

[0040] 图18显示对于不同给药方案在多个时间点在SCID-beige小鼠中皮下RPMI 8226异种移植物中凋亡细胞的百分比。

[0041] 图19显示对于不同给药方案在多个时间点在SCID-beige小鼠中皮下RPMI 8226异

种移植物中双极纺锤体的百分比。

[0042] 发明详述

[0043] 现在将详细涉及本发明的某些实施方案。尽管本发明会与列举的实施方案一同描述，应理解的是其并非旨在将本发明限制为这些实施方案。相反，本发明旨在涵盖所有的替代、修饰和等同物，其可如权利要求书所限定的包含于本发明的保护范围内。本领域技术人员会发现许多方法和物质类似或等同于本文描述的那些，其可用于实践本发明。本发明决不限于描述的方法和物质。当一篇或多篇并入的文献和类似材料与本申请不同或相悖(包括但不限于定义的术语、术语使用、描述的技术等)时，以本申请为准。

[0044] 定义

[0045] 术语“癌”和“癌性的”指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状态。“肿瘤”包含一种或多种癌细胞。癌的实例包括但不限于：癌瘤(carcinoma)、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。此类癌的更具体的实例包括鳞状细胞癌(例如，上皮鳞状细胞癌)，肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、肺腺癌和肺鳞状细胞癌，腹膜癌，肝细胞癌(hepatocellular cancer)，胃癌包括胃肠癌，胰腺癌，胶质母细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌(liver cancer)，膀胱癌，肝细胞瘤(hepatoma)，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜或子宫癌，唾液腺癌，肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌(hepatic carcinoma)，肛门癌，阴茎癌，皮肤癌包括黑素瘤，头颈癌，多发性骨髓瘤和急性髓性白血病。

[0046] 术语“治疗/处理(treat or treatment)”指治疗性、预防性(prophylactic)、姑息性或预防性(preventative)方法。就本发明而言，有益的或需要的临床结果上包括但不限于症状的减轻、疾病程度的减少、疾病状态的稳定化(即不再恶化)、疾病进行的延迟和减慢、疾病状态的缓和/或减轻以及缓解(无论部分或完全)，无论其是否能检测。“治疗/处理”还可意指与未接受治疗/处理时预计的存活相比延长的存活。那些需要治疗/处理的包括那些已经罹患病状或病症的，以及那些易于罹患所述病状或病症的，或者那些需预防病状或病症的。

[0047] 在治疗中用于增加凋亡的有丝分裂抑制剂

[0048] 本发明提供用于向具有处于有丝分裂抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的细胞凋亡的有丝分裂抑制剂。

[0049] 向细胞施用有丝分裂抑制剂将这些细胞置于有丝分裂停滞。然而，有丝分裂停滞并不必然导致细胞凋亡或导致抗肿瘤效力(参见，例如Shi,Jue等“Cell Type Variation in Responses to Antimitotic Drugs that Target Microtubules and Kinesin-5.” Cancer Research.68(9)(May 1,2008):pp.3269-76;and 2002AACR Poster:“A Pharmacodynamic marker of mitosis demonstrates the anti-mitotic activity of SB-715992,an inhibitor of the mitotic kinesin KSP.”www.cytokinetics.com/pdf/AACR_2002_Poster_1336.pdf)。已发现细胞在细胞凋亡峰值之前必须维持停滞一段时间(参见图1)。凋亡所需的这一段时间在不同细胞类型和肿瘤类型之间不同(参见图2和3)。此外，施用两剂而非一剂增加了生物学效果的持续时间(参见图4和5)，其在有丝分裂抑制剂的情况下增加了凋亡的持续时间和程度(参见图6和7)。因此，必需使用有丝分裂抑制剂有效地维持细胞处于停滞持续一段适当的时间以增加凋亡。

[0050] 向细胞施用有丝分裂抑制剂干扰有丝分裂。举例而言，施用KSP抑制剂增加单极纺锤体的量。然而，必须施用至少一定量的抑制剂以获得所需生物应答(参见图8)。因此，有丝分裂抑制剂的施用必须达到抑制剂在生物学上的有效剂量才为有效的。KSP抑制剂的生物学上有效剂量为导致停滞的、单极纺锤体出现的抑制剂剂量。这可通过免疫组织化学技术观察(参见图4、5和8)。其他有丝分裂抑制剂的生物学上有效剂量会导致与其靶标分布一致的有丝分裂畸变。

[0051] 如果有丝分裂抑制剂的施用无法达到生物学上的有效剂量，则不会发生合适的生物应答。同样，如果所述抑制剂的施用无法使细胞维持停滞足够久，所述细胞可能不会进入凋亡。因此，使用有丝分裂抑制剂有效地增加凋亡需要细胞凋亡抑制剂至少以生物学上的有效剂量施用以获得所欲的生物学效果(即有丝分裂停滞)，以及，需要给药足够长的一段时间以保持细胞停滞并诱导凋亡(参见图4-9和17-19)。

[0052] 已发现将有丝分裂抑制剂进行剂量分割分为两日施用可比在一日中给予相同的总剂量更为有效(参见图16)。

[0053] 对于其中细胞在有丝分裂阻断之后迅速地进入凋亡的肿瘤(参见图3)，有丝分裂停滞(参见图17)或凋亡(参见图18)可不直接与剂量分割方案中抑制肿瘤生长效力增强相关(参见图16)。在此类情况下，观察到较少细胞处于有丝分裂停滞和凋亡可反映迅速的细胞死亡，从而使得其在肿瘤中不再能检测得到。然而，表明有丝分裂中处于正常细胞周期的具有双极纺锤体的细胞量可与增强的效力负相关(参见图19)。在此类情况下，具有双极纺锤体的细胞较少表明更加完全的有丝分裂阻断，其中更少细胞逃离阻断并重新进入细胞周期。

[0054] 本发明的一个实施方案提供有丝分裂抑制剂，其用于向具有处于有丝分裂抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡。

[0055] 本发明的另一个实施方案提供‘161 KSP抑制剂，其用于向具有处于‘161 KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡。

[0056] 本发明涉及施用与为了诱导有丝分裂停滞而施用的有丝分裂抑制剂相同的有丝分裂抑制剂以增加凋亡。

[0057] 本发明可用于治疗由细胞分裂造成或通过抑制有丝分裂治疗的病原细胞。有丝分裂抑制剂可用于治疗多种疾病，包括过度增殖疾病和痛风。过度增殖疾病包括癌、自身免疫病、关节炎、移植排斥、炎性肠病或医疗方法之后诱导的增殖。

[0058] 在某些实施方案中，本发明使得病原性癌细胞的凋亡增加。更具体而言，所述病原性癌细胞包括但不限于：软组织癌：肉瘤(血管肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤)、粘液瘤、横纹肌瘤、纤维瘤、脂肪瘤和畸胎瘤；肺：支气管癌(鳞状细胞、未分化的小细胞、未分化的大细胞、腺癌)、肺泡(细支气管)癌、支气管腺瘤、肉瘤、淋巴瘤、软骨错构瘤(chondromatous hamartoma)、间皮瘤；胃肠：食道(鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、淋巴瘤)、胃(癌瘤、淋巴瘤、平滑肌肉瘤)、胰腺(导管腺癌、胰岛素瘤、胰高血糖素瘤、胃泌素瘤、类癌瘤、舒血管肠肽瘤(vipoma))、小肠(腺癌、淋巴瘤、类癌瘤、卡波西肉瘤(Karposi’s sarcoma)、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤、纤维瘤)、大肠(腺癌、管状腺瘤、绒毛状腺瘤、错构瘤、平滑肌瘤)；泌尿生殖道：肾(腺癌、维耳姆斯瘤(Wilm’s tumor)[肾胚细胞瘤]、淋巴瘤、白血病)、膀胱和尿道(鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌)、前列腺(腺癌、肉瘤)、

睾丸(精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎性癌、畸胎癌、绒毛膜癌、肉瘤、间质细胞癌、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样瘤、脂肪瘤);肝脏:肝癌(肝细胞癌)、胆管癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤、血管瘤;骨:成骨肉瘤(骨肉瘤)、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性淋巴瘤(网状细胞肉瘤)、多发性骨髓瘤、恶性巨细胞瘤、骨软骨瘤(osteochronfroma)(骨软骨性外生骨疣)、良性软骨瘤、成软骨细胞瘤、软骨肌瘤样纤维瘤、骨样骨瘤和巨细胞瘤;神经系统:头骨(骨瘤、血管瘤、肉芽肿、黄色瘤、畸形性骨炎)、脑脊膜(脑脊膜瘤、脑脊膜肉瘤(meningiosarcoma)、神经胶质过多)、脑(星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、生殖细胞瘤[松果体瘤]、多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiform)、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、视网膜母细胞瘤、先天性肿瘤)、脊髓神经纤维瘤、脑膜瘤、胶质瘤、肉瘤);妇科:子宫(子宫内膜癌)、宫颈(宫颈癌、肿瘤前宫颈非典型增生)、卵巢(卵巢癌[浆液性囊腺癌、粘液性囊腺癌、未分类癌]、粒层泡膜细胞瘤(granulosa-thecal cell tumor)、塞-莱细胞瘤(Sertoli-Leydig cell tumor)、无性细胞瘤、恶性畸胎瘤)、外阴(鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌、纤维肉瘤、黑素瘤)、阴道(透明细胞癌、鳞状细胞癌、葡萄状肉瘤(胚胎性横纹肌肉瘤)、输卵管(癌);血液:血液和骨髓(髓细胞性白血病[急性和慢性]、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、骨髓组织增生性疾病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征)、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤[恶性淋巴瘤];皮肤:恶性黑素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西肉瘤、胎块发育不良性痣(moles dysplastic nevi)、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕疙瘩、银屑病;和肾上腺:成神经细胞瘤。本文中提供的术语“癌细胞”包括遭受任一上述鉴定的病状的细胞。

[0059] 在某些实施方案中,本发明可用于增加病原性癌细胞的凋亡,其中所述病原性癌细胞为实体瘤细胞。所述实体瘤细胞包括皮肤、乳房、脑、宫颈癌、睾丸癌细胞等的肿瘤细胞。在某些实施方案中,所述实体瘤选自乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、唾液腺癌(腺样囊性)、食道癌、间皮瘤癌和混合性小细胞肺癌/非小细胞肺癌。

[0060] 在某些实施方案中,本发明可用于增加病原性癌细胞的凋亡,其中所述病原性癌细胞为血液肿瘤细胞。所述血液肿瘤细胞包括淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤细胞等。在某些实施方案中,本发明可用于增加病原性癌细胞的细胞凋亡,其中所述病原性癌细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。在另一个实施方案中,本发明可用于增加病原性癌细胞的凋亡,其中所述病原性癌细胞为晚期髓性白血病或复发的或顽固的多发性骨髓瘤细胞。在另一个实施方案中,本发明可用于增加病原性癌细胞的凋亡,其中所述病原性癌细胞为复发的或顽固的多发性骨髓瘤细胞。

[0061] 当施用有丝分裂抑制剂寻求凋亡增加时,存在许多种变量。特别是对于有丝分裂抑制剂,其施用需要持续一段足够长的时间以及以充足的暴露水平才在生物学上有效。

[0062] 为了在病原细胞中诱导有丝分裂停滞,施用有丝分裂抑制剂的第一次给药。该第一次给药认为在第一日进行。然后当在第二日或第三日提供所述有丝分裂抑制剂的第二次给药时,可发生凋亡的增加。或者,第二剂在第一剂的24至48小时之内进行。本发明方法的该方面允许病原细胞的凋亡增加,因为所述抑制剂以高至足够达到其生物学上有效剂量的量给药以获得所欲的生物学效果,即,使所述细胞维持有丝分裂停滞,以及使所述有丝分裂停滞维持足够久以促进凋亡或脱离有丝分裂,其导致细胞死亡。

[0063] 所述第二剂的时机无需精确到第一剂之后的24至48小时。这仅为称第二剂应在第

一剂之后一日或两日时施用的方便方式。因此，第二剂在第一剂之后大约24至48小时施用。该第二剂可在第一剂之后12至60小时施用。

[0064] 当施用第二剂的有丝分裂抑制剂时，连续两日(back to back days)施用对于患者更为便利。优选使患者具有便利的给药日程以增加患者对治疗方法的顺应性。对于通过静脉内注射施用于患者的治疗而言这尤其正确，因为额外的剂量可能需要对医院或医师的额外访问以接受注射。

[0065] 已知许多类型的有丝分裂抑制剂，包括长春花生物碱类、紫杉烷类、埃坡霉素类、多拉司他汀和多拉司他汀类似物、Aurora激酶、polo样激酶和有丝分裂驱动蛋白抑制剂。

[0066] 所述有丝分裂抑制剂可选自下组：长春花生物碱类、紫杉烷类、埃坡霉素类、多拉司他汀和多拉司他汀类似物、Aurora激酶抑制剂、polo样激酶抑制剂和有丝分裂驱动蛋白抑制剂。

[0067] 所述有丝分裂抑制剂可为有丝分裂驱动蛋白抑制剂。所述有丝分裂驱动蛋白抑制剂可为CENP-E抑制剂或KSP抑制剂。

[0068] 所述有丝分裂抑制剂可为KSP抑制剂。

[0069] 所述有丝分裂抑制剂可选自下组：GSK-295、伊斯平斯、‘161 KSP抑制剂、AZD-4877、CRx-026、SB-743921(SB-921)、MK-0731、EMD-534085和ARQ 621。

[0070] 所述有丝分裂抑制剂可选自下组：伊斯平斯、‘161 KSP抑制剂、AZD-4877、CRx-026、SB-743921(SB-921)、MK-0731、EMD-534085和ARQ 621。

[0071] 所述有丝分裂抑制剂可选自下组：伊斯平斯、‘161 KSP抑制剂和AZD-4877。

[0072] 所述有丝分裂抑制剂可选自下组：‘161 KSP抑制剂。所述有丝分裂抑制剂可为化合物1。所述有丝分裂抑制剂可为化合物2。所述有丝分裂抑制剂可为化合物3。所述有丝分裂抑制剂可为化合物4。所述有丝分裂抑制剂可为化合物5。所述有丝分裂抑制剂可为化合物6。

[0073] 所述有丝分裂抑制剂可选自下组：SU-6668、AZD-1152、CYC-116、AS-703569、MLN-8054、R763、PHA-739358、AT-9283、SNS-314、AZD-1152-HQPA、MLN-8237、KW-2449、PF-3814735、ENMD-2076、PHA-739385、MK-0457、MK-5108、ON-01910Na、BI-2536、GSK-461364、伊斯平斯、‘161 KSP抑制剂、AZD-4877、CRx-026、SB-743921(SB-921)、MK-0731、EMD-534085、ARQ 621和GSK-295。

[0074] 所述有丝分裂抑制剂可选自下组：长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、紫杉醇、多西紫杉醇、Abraxane®、秋水仙碱、埃坡霉素A、埃坡霉素B、埃坡霉素D、伊沙匹隆、多拉司他汀10、多拉司他汀15、synthadotin、LU103793、西马多丁、SU-6668、AZD-1152、CYC-116、AS-703569、MLN-8054、R763、PHA-739358、AT-9283、SNS-314、AZD-1152-HQPA、MLN-8237、KW-2449、PF-3814735、ENMD-2076、PHA-739385、MK-0457、MK-5108、ON-01910Na、BI-2536、GSK-461364、GSK-295、伊斯平斯、‘161 KSP抑制剂、AZD-4877、CRx-026、SB-743921(SB-921)、MK-0731、EMD-534085、ARQ 621和GSK-295。

[0075] 所述有丝分裂抑制剂可为长春花生物碱。所述长春花生物碱可选自下组：长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0076] 所述有丝分裂抑制剂可为紫杉烷。所述有丝分裂抑制剂可选自下组：紫杉醇、Abraxane®和多西紫杉醇。

[0077] 所述有丝分裂抑制剂可为秋水仙碱。

[0078] 所述有丝分裂抑制剂可为埃坡霉素。所述有丝分裂抑制剂可选自下组:埃坡霉素A、埃坡霉素B、埃坡霉素D和伊沙匹隆。

[0079] 所述有丝分裂抑制剂可为多拉司他汀或多拉司他汀类似物。所述有丝分裂抑制剂可选自下组:多拉司他汀10、多拉司他汀15、synthadotin、LU103793和西马多丁。

[0080] 所述有丝分裂抑制剂可为Aurora激酶抑制剂。所述有丝分裂抑制剂可选自下组:SU-6668、AZD-1152、CYC-116、AS-703569、MLN-8054、R763、PHA-739358、AT-9283、SNS-314、AZD-1152-HQPA、MLN-8237、KW-2449、PF-3814735、ENMD-2076、PHA-739385、MK-0457和MK-5108。

[0081] 所述有丝分裂抑制剂可为polo样激酶抑制剂。所述有丝分裂抑制剂可选自下组:ON-01910Na、BI-2536和GSK-461364。

[0082] 所述有丝分裂抑制剂可为CENP-E抑制剂。所述有丝分裂抑制剂可为GSK-295.

[0083] 如上所讨论,必须施用合适量的有丝分裂抑制剂以达到所需的生物学效果。因此,为了通过施用有丝分裂抑制剂增加凋亡应至少施用达到所需生物学效果的最小量,或生物学上的有效剂量。然而,该量不应高至具有超过生物学效果的益处的不可接受的副作用。因此,通过施用有丝分裂抑制剂增加凋亡应施用不多于最大耐受剂量(“MTD”)的量。每一次施用有丝分裂抑制剂应介于生物学上的有效剂量和最大耐受剂量之间。

[0084] 最大耐受剂量定义为产生可接受的剂量限制性毒性(“DLT”)的发生率的最高剂量。导致不可接受的DLT率的剂量被认为是无法耐受的。通常,对于具体日程的MTD在I期临床试验中确立。这通常是在患者中通过下述方式实施的:以啮齿类中严重毒性剂量的1/10(“STD10”)的安全起始剂量(基于mg/m^2)来起始,并以三个一组积累患者,根据修改的斐波那契数列提升剂量,其中提升步骤越高,相对增值越低(例如,剂量增加为100%、65%、50%、40%以及之后30%至35%)。在三个一组的患者中提升剂量直至达到无法耐受的剂量。次低的产生可接受DLT率的剂量水平被视为所述MTD。

[0085] 同样,有丝分裂抑制剂的MTD取决于抑制剂、物种、配制物(formulation)和给药日程而变化。举例而言,仅在七、十四、二十一或二十八日中的第一日,相对在此期间的第一和第二日,相对在此期间的第一至第三日,均可具有不同的MTD。然而,如上所讨论,使用有丝分裂抑制剂增加凋亡需要将抑制剂以足够高的量施用使其为生物学上有效的,还需要施用足够久以使细胞维持有丝分裂停滞。仅在第一日施用虽然可达到生物学上的有效剂量,但可能不够久到足以在细胞中增加凋亡。或者,在第一至第三日施用有丝分裂抑制剂可能足够久,但可能该施用不足以达到生物学上的有效剂量,因而细胞凋亡不会增加。这可能是由于给药三日的MTD比生物学上的有效剂量低。

[0086] 通常,当治疗病原细胞如癌时,将特定化合物的MTD施用于患者,从而使得可达到该治疗中的最大益处。相应地,本发明的一个实施方案提供有丝分裂抑制剂,其用于向具有处于有丝分裂抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡,其中所述有丝分裂抑制剂以最大耐受剂量施用。

[0087] 本发明的另一个实施方案提供‘161 KSP抑制剂,其用于向具有处于‘161 KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡,其中所述‘161 KSP抑制剂以最大耐受剂量施用。

[0088] 当治疗病原细胞如癌时，确立给药周期，从而使得在完成第一个周期之后，可施用附加的周期直至此种治疗不再必要或有效。决定周期长度的因素之一为允许恢复或消退副作用。在施用了药物组合物或治疗剂，特别是有丝分裂抑制剂之后，患者可能经历副作用。取决于副作用的类型，可能需要恢复或消退副作用。该恢复或消退副作用可能需要时间，其继而可决定第二周期可起始之前该周期的长度。

[0089] 有丝分裂抑制剂，特别是KSP抑制剂的副作用之一是急性嗜中性粒细胞减少。嗜中性粒细胞减少是以异常低数量的嗜中性粒细胞(一种白细胞)为特征的血液病症。一般而言，经历来自有丝分裂抑制剂(或KSP抑制剂)的此种副作用的患者在不接受附加剂量的所述抑制剂时随着时间流逝恢复或该嗜中性粒细胞减少消退。

[0090] 在KSP抑制剂的单次施用之后，在周期的第14至21日许多患者从副作用恢复，或所述副作用消退。

[0091] 本发明提供有丝分裂抑制剂，其用于向具有处于有丝分裂抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡，其中达成允许恢复或消退副作用的周期。

[0092] 第一剂诱导有丝分裂停滞。本发明以在第一剂之后一或两日施用的第二剂使得凋亡增加。本发明提供的包括第一和第二剂量施用的周期为14至21日。这是2或3周的方便说法，并不需要精确到14至21日。因此，所述周期大约为14至21日。所述周期可为11至24日。所述周期可为14日，或11至17日。所述周期还可为21日，或18至24日。

[0093] 本发明的另一个实施方案提供‘161 KSP抑制剂，其用于向具有处于‘161KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物1。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物2。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物3。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物4。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物5。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物6。在某些实施方案中，所述病原细胞是癌细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞是血液肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞是实体瘤细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞选自皮肤、乳房、脑、宫颈癌和睾丸癌细胞的肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述实体瘤细胞选自乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、唾液腺癌(腺样囊性)、食道癌、间皮瘤癌和混合性小细胞肺癌/非小细胞肺癌。在某些实施方案中，所述抑制剂以最大耐受剂量给药。

[0094] 本发明的另一个实施方案提供‘161 KSP抑制剂，其用于向具有处于‘161KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的细胞凋亡，其中所述抑制剂以最大耐受剂量施用。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物1。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物2。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物3。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物4。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物5。在某些实施方案中，所述‘161 KSP抑制剂为化合物6。在某些实施方案中，所述病原细胞是癌细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞是血液肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞是实体瘤细胞。在某些实施方案中，所述病原细胞选自皮肤、乳房、脑、宫

颈癌和睾丸癌的肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述实体瘤细胞选自乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、唾液腺癌(腺样囊性)、食道癌、间皮瘤癌和混合性小细胞肺癌/非小细胞肺癌。

实施例

[0095] 为了说明本发明，包括了下述实施例。然而，应理解的是这些实施例并不限制本发明，且仅意为支持并表明实施本发明的一种方法。

[0096] 实施例1

[0097] 凋亡清洗

[0098] 将用媒介对照(DMSO)或10nM化合物4处理的HT-29细胞接种在相同的96孔组织培养板中。在8或24小时之后，从HT-29细胞去除化合物4，并用新鲜的生长培养基取代以确定可否防止凋亡诱导。胱天蛋白酶3/7活性是使用CaspaseGlo 3/7试剂(Promega)和发光计在所示时间作为反应产物发光度测量的。报道经化合物4处理的细胞的胱天蛋白酶3/7活性除以经DMSO处理的细胞的胱天蛋白酶3/7活性的值。结果示于图1。

[0099] 实施例2

[0100] 在用化合物4持续处理之后HT-29中的凋亡

[0101] 将用媒介对照(DMSO)或100nM、10nM、1nM或0.1nM化合物4连续处理的HT-29细胞接种于相同的96孔组织培养板中。胱天蛋白酶3/7活性是使用CaspaseGlo 3/7试剂(Promega)和发光计在所示时间作为发光的反应产物测量的。报道经化合物4处理的细胞的胱天蛋白酶3/7活性除以经DMSO处理的细胞的胱天蛋白酶3/7活性的值。数据包括来自4个独立实验的平均值和标准偏差值。结果示于图2。

[0102] 实施例3

[0103] RPMI 8226中的凋亡

[0104] 将用媒介对照(DMSO)、10nM化合物4或10nM长春新碱处理的RPMI8226细胞接种于相同的96孔组织培养板中。胱天蛋白酶3/7活性是使用CaspaseGlo 3/7试剂(Promega)和发光计在所示时间作为发光的反应产物测量的。报道经药物处理的细胞的胱天蛋白酶3/7活性除以经DMSO处理的细胞的胱天蛋白酶3/7活性的值。数据包括来自4个独立实验的平均值和标准偏差值。结果示于图3。

[0105] 实施例4

[0106] 单极纺锤体的持续时间和凋亡的程度(HT-29异种移植物)

[0107] 为雌性裸鼠皮下植入100μL PBS中的$5x10^6$个HT-29细胞。十日之后，测量肿瘤，并将小鼠随机分为三个一组，其中每组的平均肿瘤体积大约为240mm^3。紧接着给药之前，将化合物4溶解于生理盐水。确定化合物4的MTD为20mg/kg。剂量体积为10mL/kg。给药为在第一日仅给予媒介；和在第一日给予20mg/kg；和在第一和第三日给予20mg/kg的化合物4。在给药之后的多个时间点(24、48、72、96、120和144小时)，通过CO_2吸入处死小鼠，并收获肿瘤，并将其立即置于福尔马林中。在给药之后24和72小时收集媒介对照组样品。在给药之后24、48、72和96小时收集第一日组样品。在第一剂之后72、96、120和144小时之后收集第一和第三日组样品。通过标准步骤制备肿瘤组织的石蜡块。单极纺锤体的显影通过用小鼠抗人α-微管蛋白一抗(克隆B-7，Santa Cruz Biotechnology)然后用偶联Alexafluor 488

(Invitrogen)的山羊抗小鼠二抗对切片染色来进行。将核用Hoechst 33342染色以供细胞计数。在每个样品的三个40X区域使用荧光显微镜手动计数纺锤体结构。凋亡通过也在每个样品的三个40X区域手动计数TUNEL阳性细胞来量化(TUNEL染色使用来自Roche的In Situ Cell Death Detection Kit,AP)。结果示于图4和6。

[0108] 实施例5

[0109] 单极纺锤体的持续时间和凋亡的程度(HT-29异种移植物)

[0110] 实施例5的方法与实施例4相同,但是给药为在第一日仅给予媒介;和在第一日给予8mg/kg;和第一和第三日给予8mg/kg的化合物4。在给药之后24和72小时收集媒介对照组样品。在给药之后24、48、72和96小时收集第一日组样品。在第一剂之后72、96、120和144小时收集第一和第三日组样品。结果示于图5和图7。

[0111] 实施例6

[0112] 有丝分裂阻断和凋亡(HT-29)

[0113] 为雌性裸鼠皮下植入100μL PBS中的$3x10^6$个HT-29细胞。十四日之后,测量肿瘤,并将小鼠随机分为三个一组,其中每个组平均肿瘤体积为大约300mm^3。给药为单独的媒介,和5、10、20和30mg/kg的化合物4。在给药之后24和48小时收集所有样品。所有其他方法如实施例4所述。结果示于图8和9。

[0114] 实施例7

[0115] 在不同给药日程中的肿瘤生长抑制(HT-29)

[0116] 为雌性裸鼠皮下植入100μL PBS中的$4x10^6$个HT-29细胞。十三日之后,测量肿瘤,并将小鼠随机分为八个一组,其中每组中平均肿瘤体积大约为210mm^3。在临给药之前即刻将化合物4溶解于生理盐水,并以每日4mg/kg、每两日(every other day)8mg/kg和每四日(every fourth day)16mg/kg的剂量将10mL/kg的体积腹膜内施用12日。每周两次测量动物重量和肿瘤体积(使用电子测径器)。使用下述公式计算肿瘤体积:体积=(宽度^{2}x长度)/2。结果示于图10。

[0117] 实施例8

[0118] 在不同给药日程中的肿瘤生长抑制(HT-29)

[0119] 为雌性裸鼠皮下植入100μL PBS中的$5x10^6$个HT-29细胞。十一至十四日之后,测量肿瘤,并将小鼠随机分为七个一组,其中每组中平均肿瘤体积大约为230mm^3。在临给药之前即刻将化合物4溶解于生理盐水,并以10mL/kg的体积腹膜内施用。给药为在第一和第二日仅给予媒介;和在第一日给予20mg/kg;在第一和第二日给予20mg/kg;在第一和第三日给予20mg/kg;在第一、第二和第三日给予5mg/kg;在第一、第二和第三日给予10mg/kg;在第一、第二、第三、第四和第五日给予10mg/kg;在第一和第二日给予10mg/kg;和在第一和第三日给予10mg/kg的化合物4。每周两次测量动物重量和肿瘤体积(使用电子测径器)。使用下述公式计算肿瘤体积:体积=(宽度^{2}x长度)/2。在第一、第二、第三、第四和第五日以10mg/kg给药是无法耐受的(大于20%的重量丧失和/或一些小鼠死亡)。结果示于图11-15。

[0120] 实施例9

[0121] 在不同给药日程中的肿瘤生长抑制(RPMI 8226)

[0122] 为雌性SCID-beige小鼠皮下植入100μL含50%基质胶的PBS中的$1x10^7$个RPMI 8226细胞。二十五日之后,测量肿瘤,并将小鼠随机分为七个一组,其中每组中平均肿瘤体

积大约为225mm^3。在临给药之前即刻将化合物4溶解于生理盐水，并以10mL/kg的体积腹膜内施用。给药为在第一日仅给予媒介；和在第1日给予20mg/kg；第一和第二日给予10mg/kg；第一和第三日给予10mg/kg；和第一、第五和第九日给予20mg/kg的化合物4。每周两次测量动物重量和肿瘤体积(使用电子测径器)。使用下述公式计算肿瘤体积：体积＝(宽度^{2}x长度)/2。结果示于图16。

[0123] 实施例10

[0124] 单极纺锤体、双极纺锤体的持续时间和凋亡程度(RPMI 8226)

[0125] 为雌性SCID-beige小鼠皮下植入100μL含50％基质胶的PBS中的1x10^{7}个RPMI 8226细胞。三十一日之后，测量肿瘤，并将小鼠随机分为三个一组，其中每组中平均肿瘤体积大约为210mm^3。在临给药之前即刻将化合物4溶解于生理盐水。给药体积为10mL/kg。给药为在第一日仅给予媒介；和在第一日给予10mg/kg；在第一日给予20mg/kg；在第一和第二日给予10mg/kg；在第一和第三日给予10mg/kg的化合物4。在给药之后的多个时间(24、48、72和96小时)，通过CO_2吸入处死小鼠，并收获肿瘤并将其立即置于福尔马林中。在给药之后48小时收集媒介对照组样品。在给药之后24和48小时收集第一日给予10mg/kg的样品。在给药之后24、48和72小时收集在第一日给予20mg/kg的样品。在第一剂之后48和72小时收集在第一和第二日给予10mg/kg的样品。在第一剂之后72和96小时收集在第一和第三日给予10mg/kg的样品。通过标准步骤制备肿瘤组织的石蜡块。单极纺锤体的显影通过用小鼠抗人α-微管蛋白一抗(克隆B-7，Santa Cruz Biotechnology)然后用偶联Alexafluor 488(Invitrogen)的山羊抗小鼠二抗对切片染色来进行。将核用Hoechst 33342染色以供细胞计数。在每个样品的三个40X区域使用荧光显微镜手动计数纺锤体结构。凋亡通过同样在每个样品的三个40X区域手动计数TUNEL阳性细胞来量化(TUNEL染色使用来自Roche的In Situ Cell Death Detection Kit,AP)。结果示于图17、18和19。

[0126] 实施例11

[0127] 在1期研究中确定MTD

[0128] 招收总共13位具有多种实体瘤和中位年龄66岁(范围为40-79岁)的患者参加人1期临床试验(参见"Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of ARRY-520in Solid Tumors."http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00462358)。受处理的实体瘤为乳腺癌(2)，结肠直肠癌(2)，非小细胞肺癌(2)，胰腺癌(2)，膀胱癌，唾液腺癌(腺样囊性)，食道癌，间皮瘤癌和混合性小细胞肺癌/非小细胞肺癌。提供化合物4作为包含于用于IV用途的1型透明玻璃小瓶中的冻干粉施用。施用的剂量水平为每两周在第一和第二日1.25和1.6mg/m^2/日的化合物4。MTD确定为1.25mg/m^2/日(每周期的累积剂量为2.5mg/m^2)，其中DLT为3级低钠血症，食欲缺乏，AST增加和发热性嗜中性粒细胞减少。

[0129] 还参见"A Phase 1/2Study of ARRY-520in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma."http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00821249。

[0130] 尽管本发明与列举的实施方案一同描述，应理解的是其并非旨在将本发明限制于这些实施方案。相反，本发明旨在涵盖所有的替代、修饰和等同物，其可如权利要求书所定义包含于本发明的保护范围内。因此，前述描述仅视为本发明的原理。

[0131] 单词“包括/包含("comprise"、"comprising"、"include"、"including"和"includes")，当用于本说明书及所附权利要求中时旨在明确说明所陈述的特征、整数、组分

或步骤的存在，但其并未排除一种或多种其他特征、整数、组分或其组的存在或附加。

[0132] 本发明还涉及以下项：

[0133] 1.一种‘161 KSP抑制剂，其用于向具有处于‘161 KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用，以增加所述细胞的凋亡。

[0134] 2.项1的抑制剂，其为与诱导了有丝分裂停滞的抑制剂相同的抑制剂。

[0135] 3.项1或2的抑制剂，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物1。

[0136] 4.项1或2的抑制剂，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物2。

[0137] 5.项1或2的抑制剂，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物3。

[0138] 6.项1或2的抑制剂，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物4。

[0139] 7.项1或2的抑制剂，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物5。

[0140] 8.项1或2的抑制剂，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物6。

[0141] 9.项1-8任一项的抑制剂，其中所述病原细胞是癌细胞。

[0142] 10.项1-9任一项的抑制剂，其中所述病原细胞是血液肿瘤细胞。

[0143] 11.项1-10任一项的抑制剂，其中所述病原细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。

[0144] 12.项1-9任一项的抑制剂，其中所述病原细胞是实体瘤细胞。

[0145] 13.项1-9或12任一项的抑制剂，其中所述病原细胞选自皮肤、乳房、脑、宫颈癌和睾丸癌细胞的肿瘤细胞。

[0146] 14.项1-9或12任一项的抑制剂，其中所述病原细胞选自乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、唾液腺癌(腺样囊性)、食道癌、间皮瘤癌和混合型小细胞肺癌/非小细胞肺癌。

[0147] 15.项1-14任一项的抑制剂，其中所述抑制剂用于以最大耐受剂量施用。

[0148] 16.用于向具有处于化合物4诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者施用以增加所述细胞的凋亡的化合物4，其中化合物4以最大耐受剂量施用。

[0149] 17.项16的化合物4的施用，其中所述病原细胞是癌细胞。

[0150] 18.项16或17的化合物4的施用，其中所述病原细胞是血液肿瘤细胞。

[0151] 19.项16-18任一项的化合物4的施用，其中所述病原细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。

[0152] 20.项16-19任一项的化合物4的施用，其中所述病原细胞是实体瘤细胞。

[0153] 21.项16-18或20任一项的化合物4的施用，其中所述病原细胞选自皮肤、乳房、脑、宫颈癌和睾丸癌细胞的肿瘤细胞。

[0154] 22.项16-18或20任一项的化合物4的施用，其中所述病原细胞选自乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、唾液腺癌(腺样囊性)、食道癌、间皮瘤癌和混合性小细胞肺癌/非小细胞肺癌。

[0155] 23.项16-22任一项的化合物4的施用，其中所述最大耐受剂量为1.25mg/m^2/日。

[0156] 24.‘161 KSP抑制剂在制备药物中的用途，所述药物用于增加具有处于‘161 KSP抑制剂诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者中所述细胞的凋亡。

[0157] 25.项24的用途，所述抑制剂为与诱导了有丝分裂停滞的抑制剂相同的抑制剂。

[0158] 26.项24或25的用途，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物1。

[0159] 27.项24或25的用途，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物2。

[0160] 28.项24或25的用途，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物3。

[0161] 29.项24或25的用途，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物4。

[0162] 30.项24或25的用途，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物5。

[0163] 31.项24或25的用途，其中所述‘161 KSP抑制剂为化合物6。

[0164] 32.项24-31任一项的用途，其中所述病原细胞是癌细胞。

[0165] 33.项24-32任一项的用途，其中所述病原细胞是血液肿瘤细胞。

[0166] 34.项24-33任一项的用途，其中所述病原细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。

[0167] 35.项24-32任一项的用途，其中所述病原细胞是实体瘤细胞。

[0168] 36.项24-32或12任一项的用途，其中所述病原细胞选自皮肤、乳房、脑、宫颈癌和睾丸癌细胞的肿瘤细胞。

[0169] 37.项24-32或35任一项的用途，其中所述病原细胞选自乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、唾液腺癌(腺样囊性)、食道癌、间皮瘤癌和混合型小细胞肺癌/非小细胞肺癌。

[0170] 38.项24-37任一项的用途，其中所述抑制剂用于以最大耐受剂量施用。

[0171] 39.化合物4在制备药物中的用途，所述药物用于在具有处于化合物4诱导的有丝分裂停滞状态的病原细胞的患者增加所述细胞的凋亡，其中化合物4以最大耐受剂量施用。

[0172] 40.项39的化合物4的用途，其中所述病原细胞是癌细胞。

[0173] 41.项39或40的化合物4的用途，其中所述病原细胞是血液肿瘤细胞。

[0174] 42.项39-41任一项的化合物4的用途，其中所述病原细胞选自淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤细胞。

[0175] 43.项39-42任一项的化合物4的用途，其中所述病原细胞是实体瘤细胞。

[0176] 44.项39-41或43任一项的化合物4的用途，其中所述病原细胞选自皮肤、乳房、脑、宫颈癌和睾丸癌细胞的肿瘤细胞。

[0177] 45.项39-41或43任一项的化合物4的用途，其中所述病原细胞选自乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、唾液腺癌(腺样囊性)、食道癌、间皮瘤癌和混合性小细胞肺癌/非小细胞肺癌。

[0178] 46.项39-45任一项的化合物4的用途，其中所述最大耐受剂量为1.25mg/m^2/日。

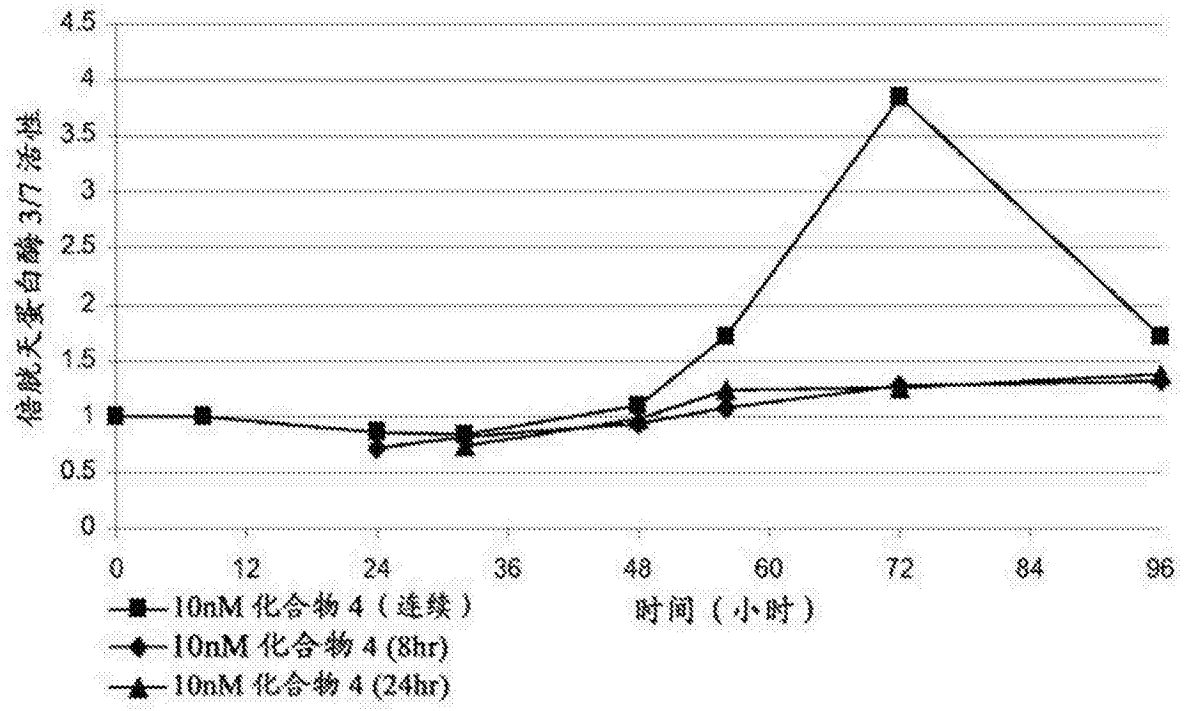
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
倍肽天蛋白酶 3/7 活性
0
12
24
36
48
60
72
84
96
时间（小时）
10nM 化合物 4（连续）
10nM 化合物 4 (8hr)
10nM 化合物 4 (24hr)

图1

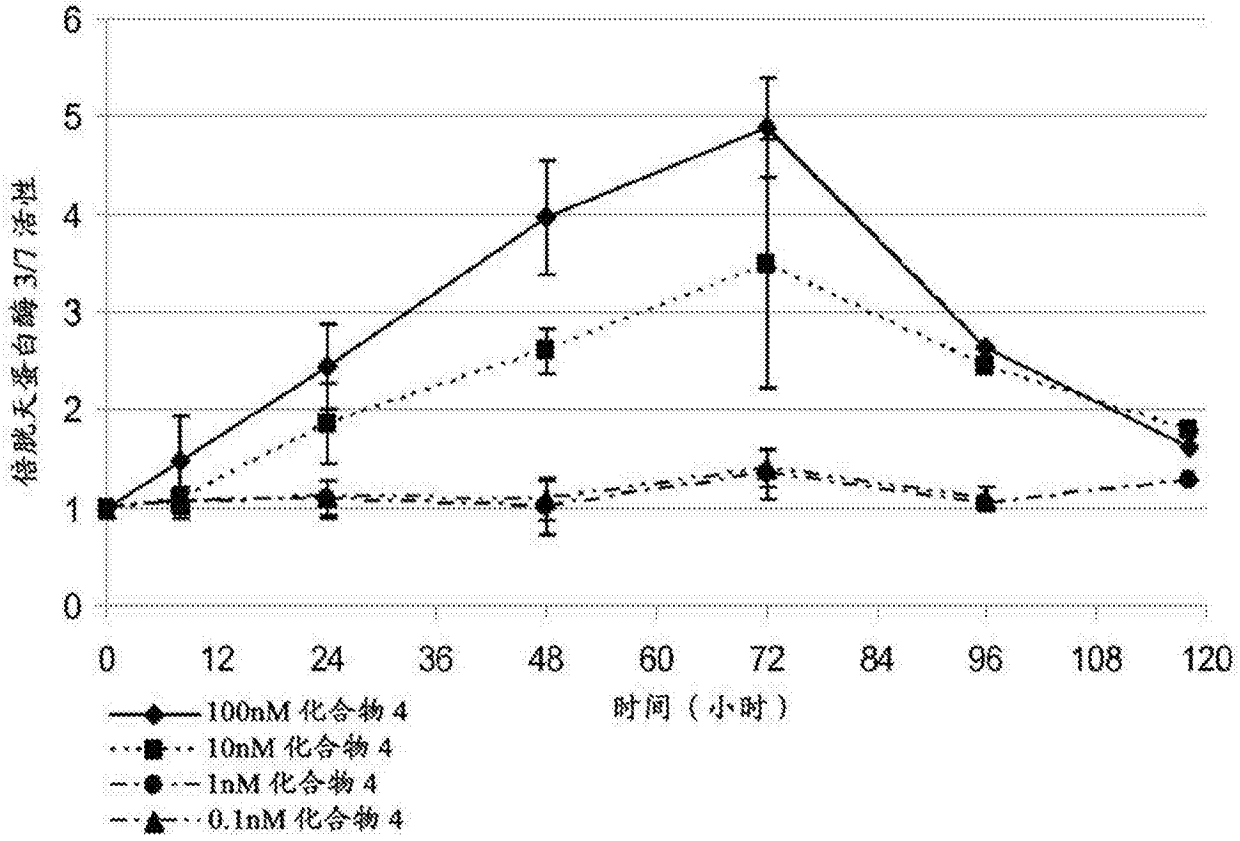
6
5
4
3
2
1
0
倍肽天蛋白酶 3/7 活性
0
12
24
36
48
60
72
84
96
108
120
时间（小时）
100nM 化合物 4
10nM 化合物 4
1nM 化合物 4
0.1nM 化合物 4

图2

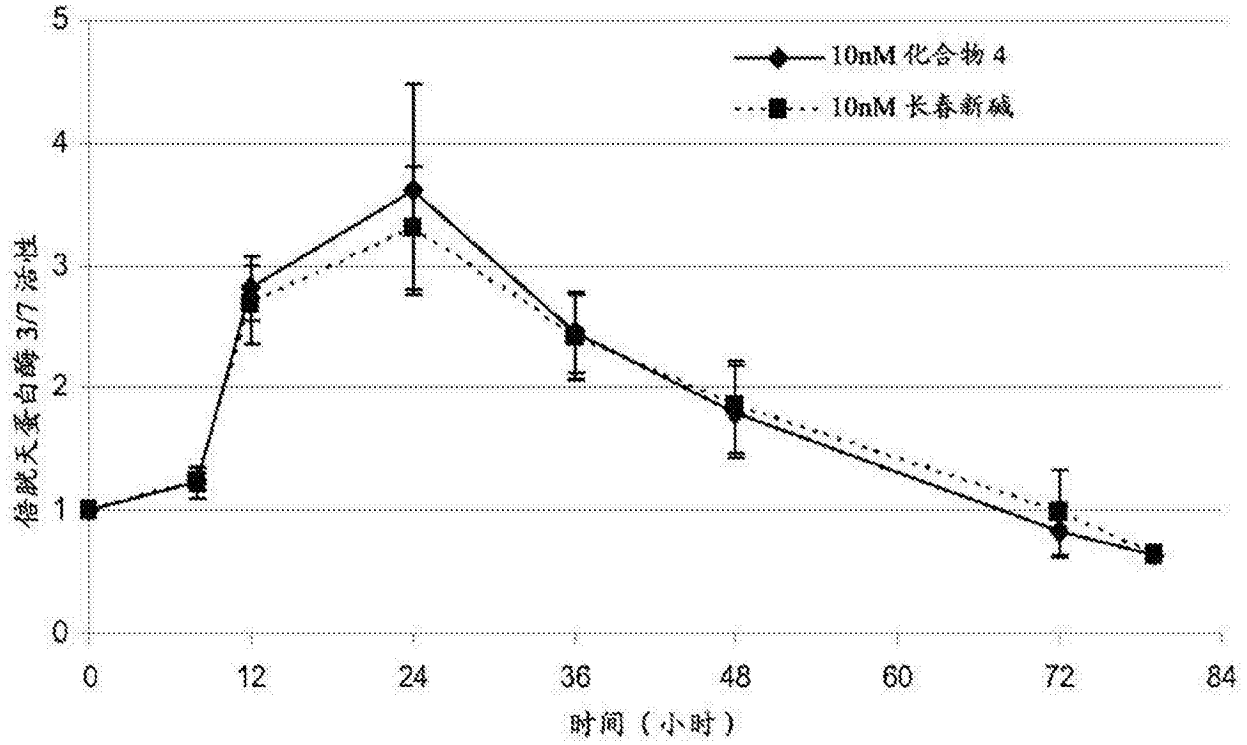
10nM 化合物 4
10nM 长春新碱
倍肽天蛋白酶 3/7 活性
0
1
2
3
4
5
0
12
24
36
48
60
72
84
时间（小时）

图3

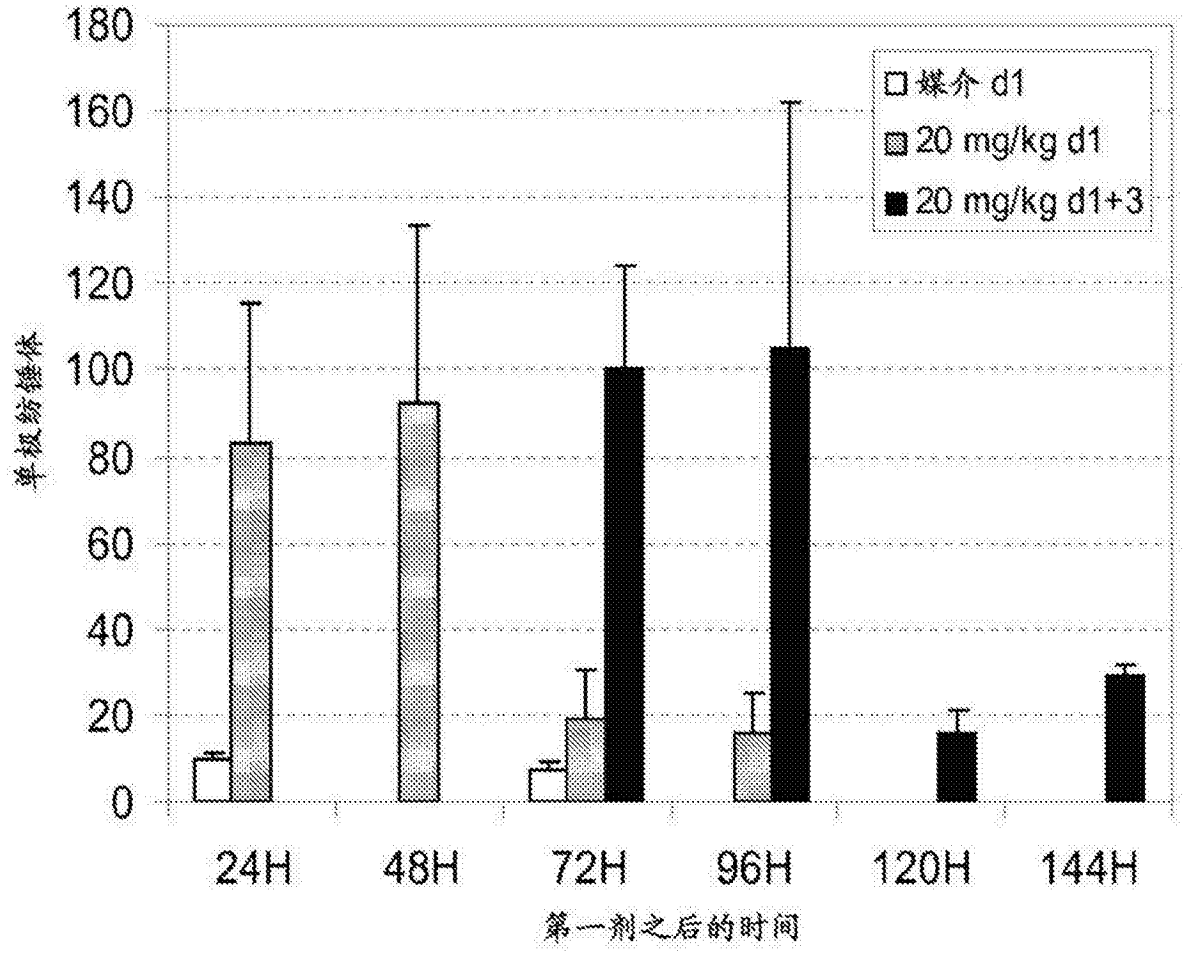
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
单极纺锤体
□ 媒介 d1
▨ 20 mg/kg d1
■ 20 mg/kg d1+3
24H
48H
72H
96H
120H
144H
第一剂之后的时间

图4

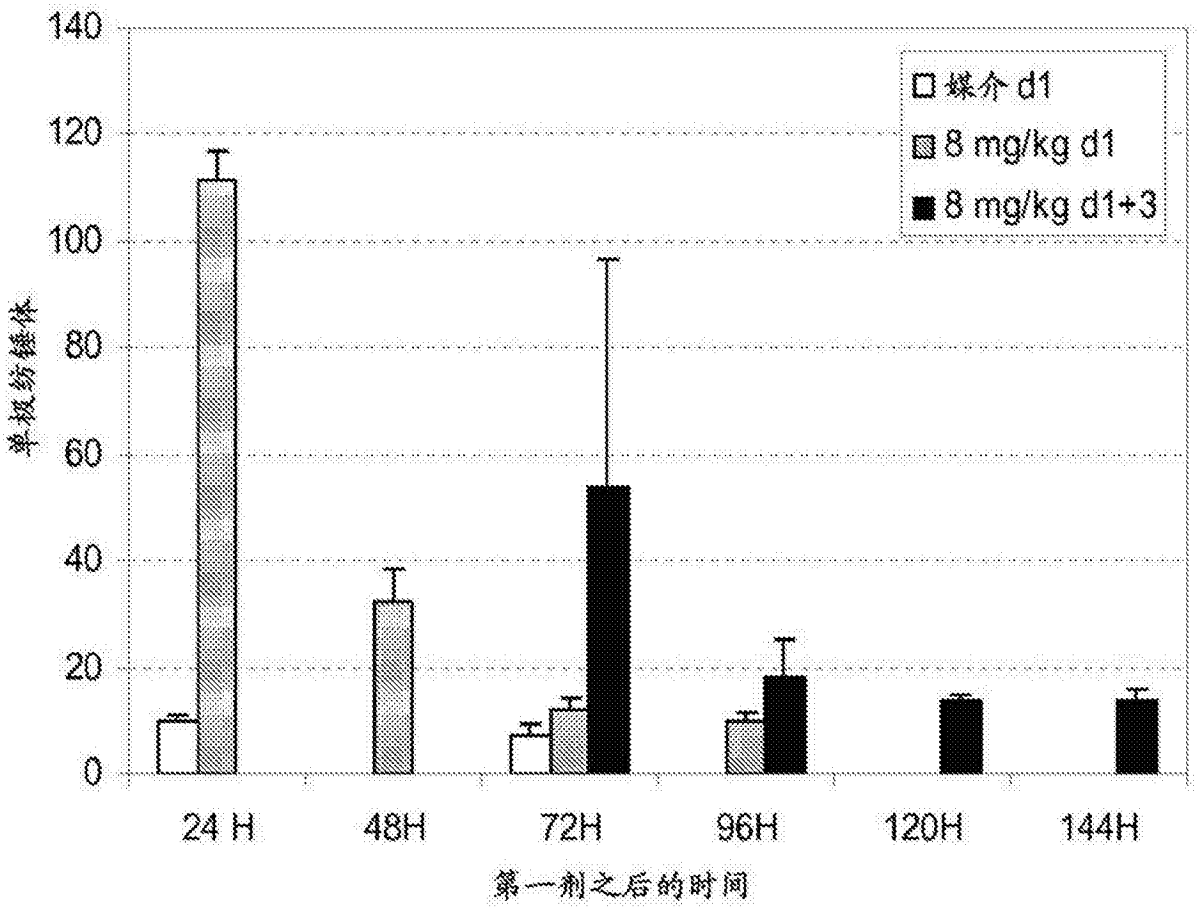
140
120
100
80
60
40
20
0
单规纺链体
媒介 d1
8 mg/kg d1
8 mg/kg d1+3
24 H
48H
72H
96H
120H
144H
第一剂之后的时间

图5

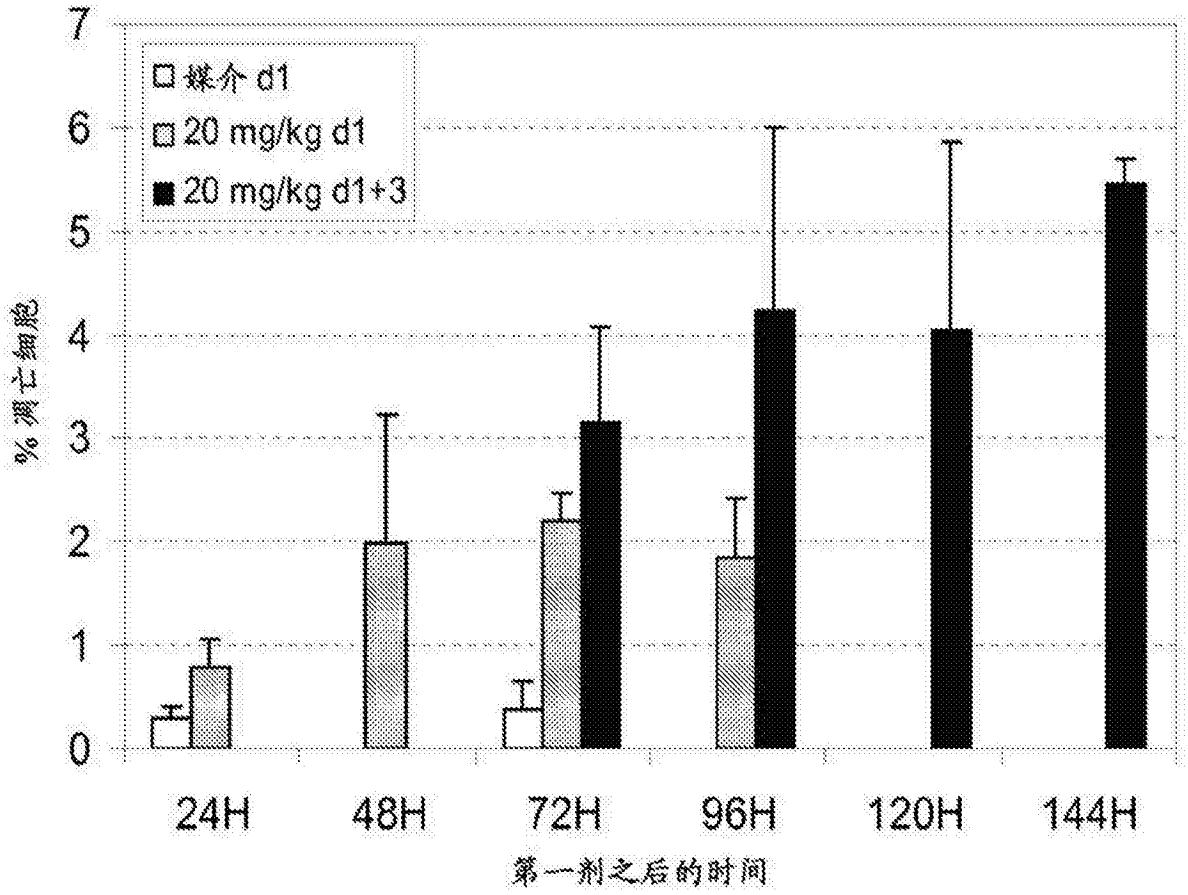
媒介 d1
20 mg/kg d1
20 mg/kg d1+3
% 凋亡细胞
0
1
2
3
4
5
6
7
24H
48H
72H
96H
120H
144H
第一剂之后的时间

图6

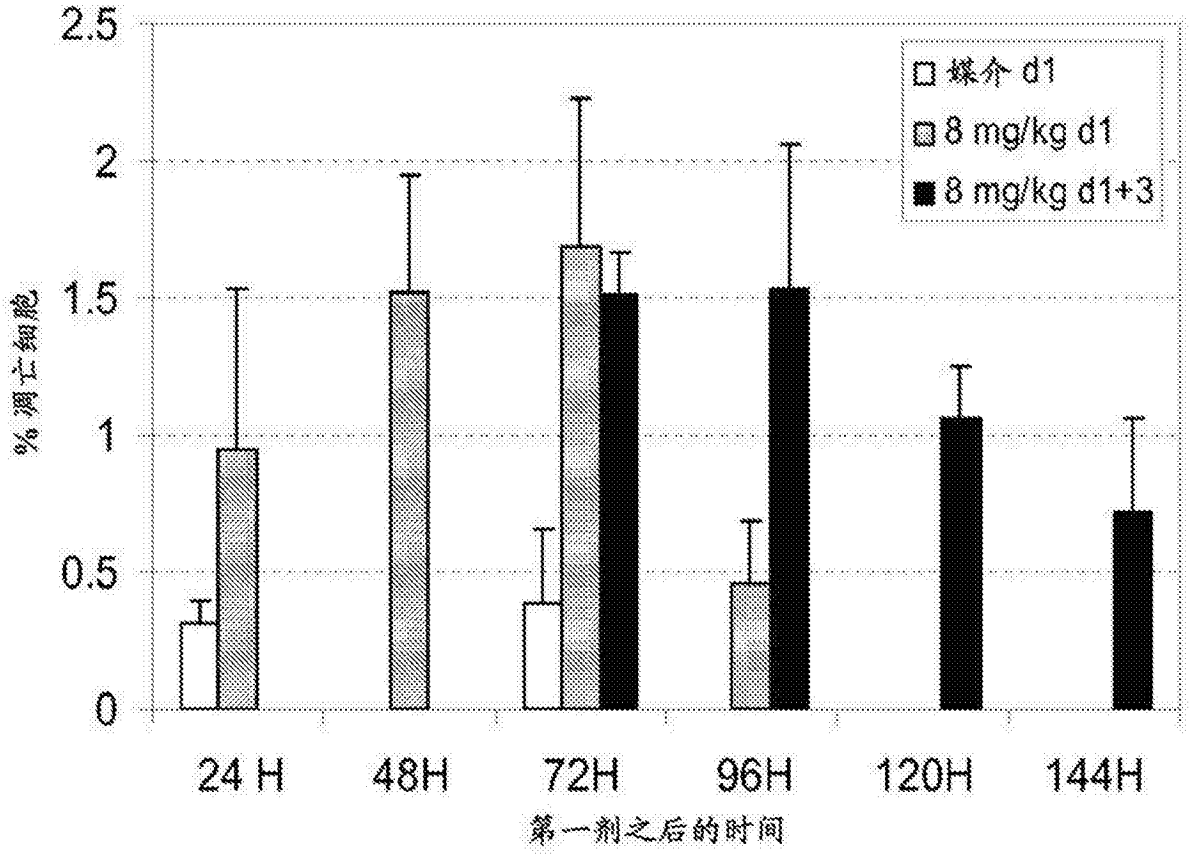
2.5
2
1.5
1
0.5
0
% 凋亡细胞
媒介 d1
8 mg/kg d1
8 mg/kg d1+3
24 H
48H
72H
96H
120H
144H
第一剂之后的时间

图7

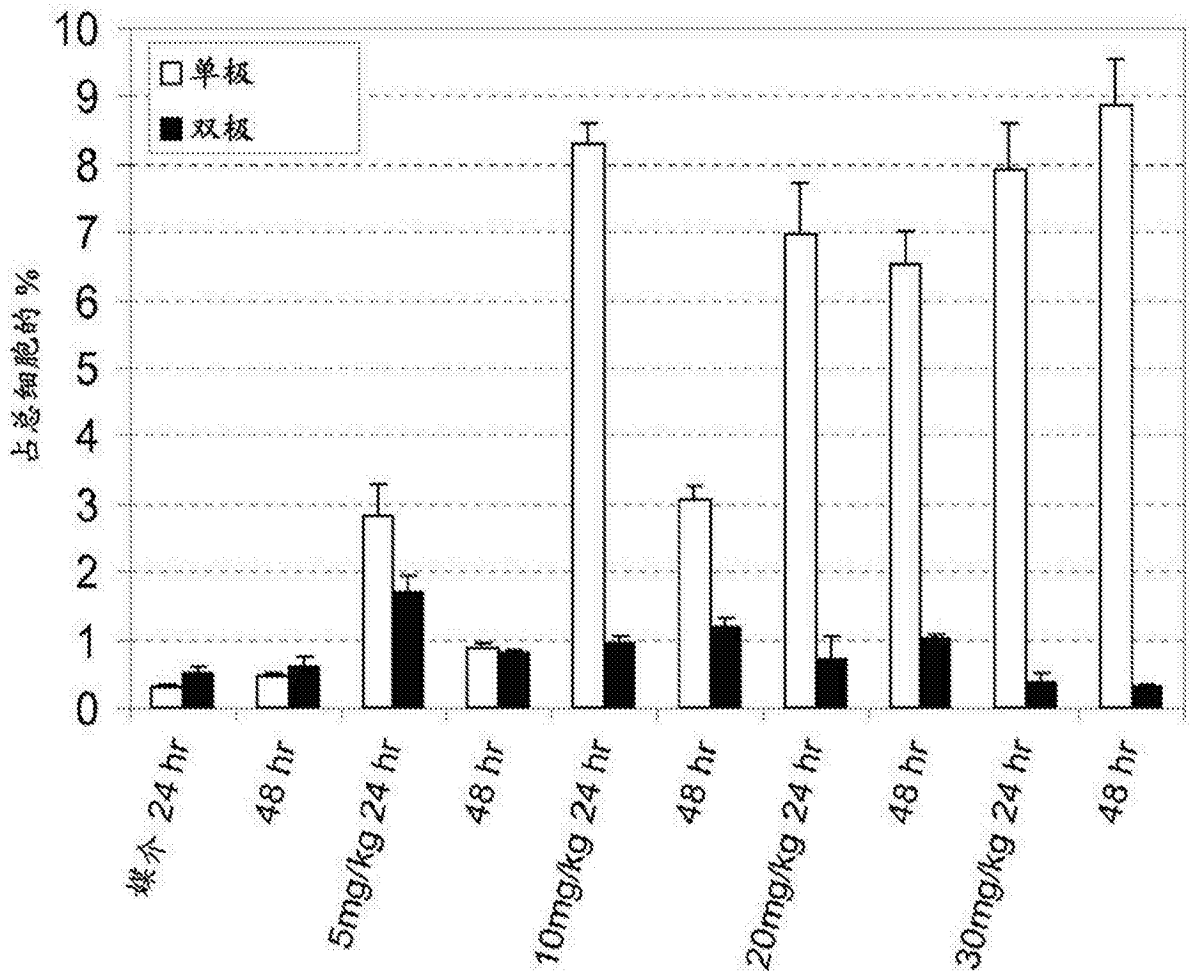
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
占总细胞的%
单核
双核
媒介 24 hr
48 hr
5mg/kg 24 hr
48 hr
10mg/kg 24 hr
48 hr
20mg/kg 24 hr
48 hr
30mg/kg 24 hr
48 hr

图8

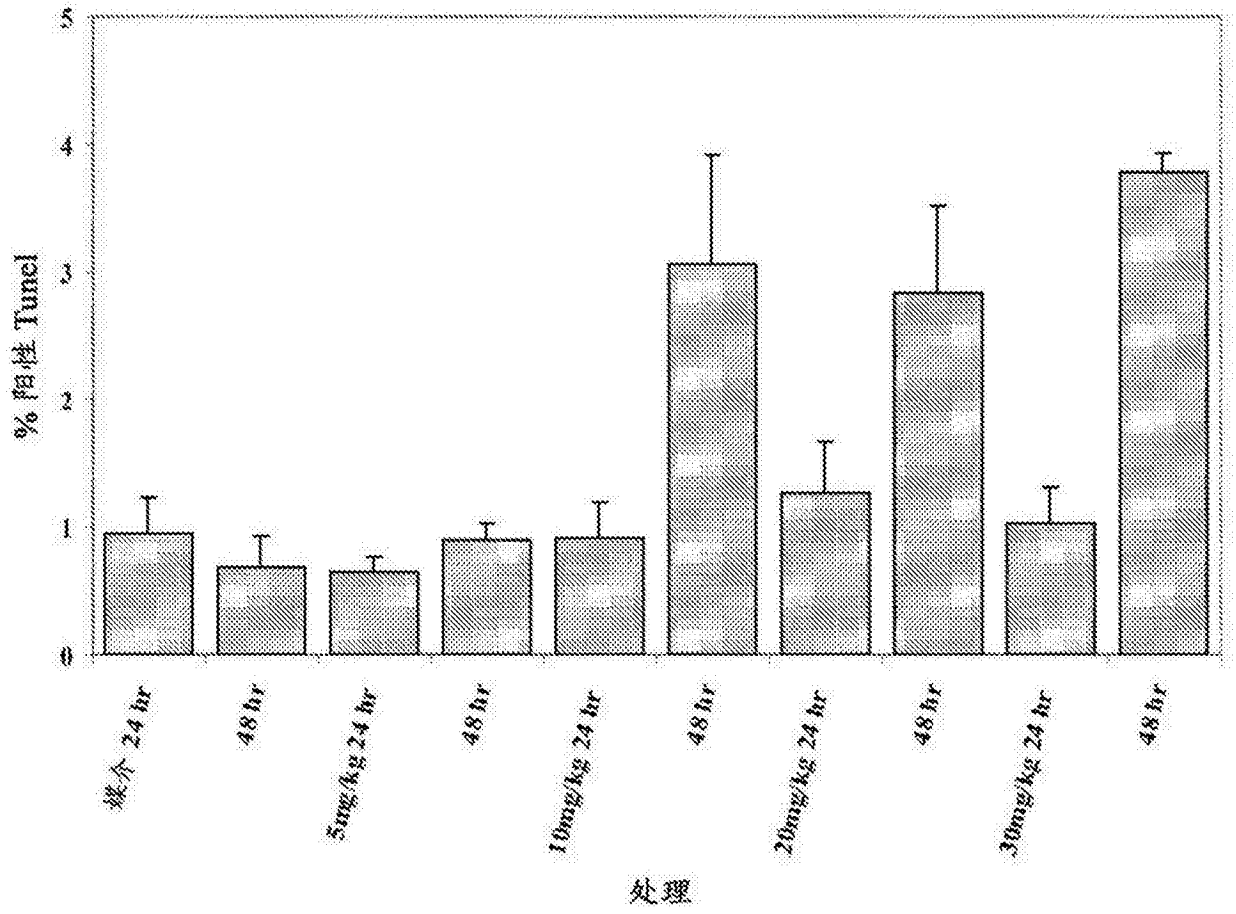
% 阳性 Tunel
0
1
2
3
4
5
媒介 24 hr
48 hr
5mg/kg 24 hr
48 hr
10mg/kg 24 hr
48 hr
20mg/kg 24 hr
48 hr
30mg/kg 24 hr
48 hr
处理

图9

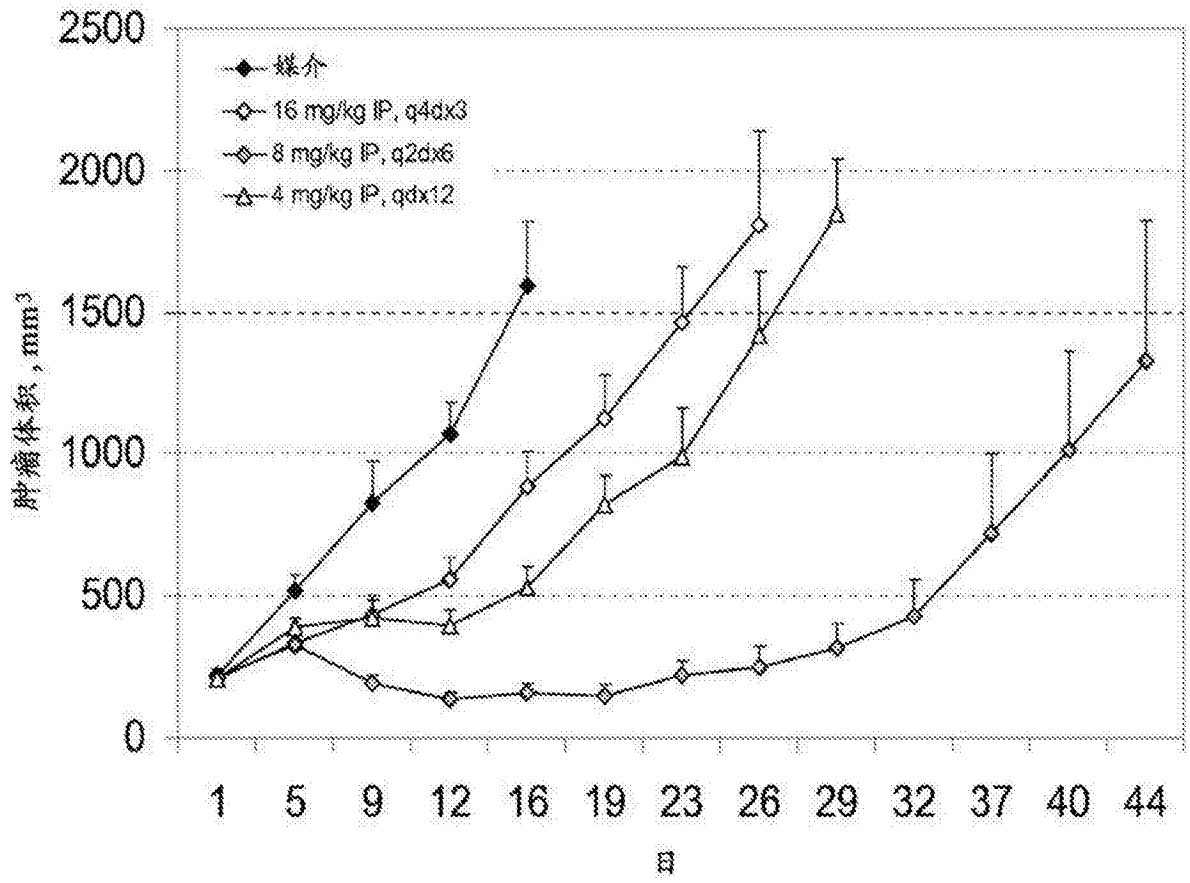
2500
2000
1500
1000
500
0
媒介
16 mg/kg IP, q4dx3
8 mg/kg IP, q2dx6
4 mg/kg IP, qdx12
肿瘤体积，mm3
1 5 9 12 16 19 23 26 29 32 37 40 44
日

图10

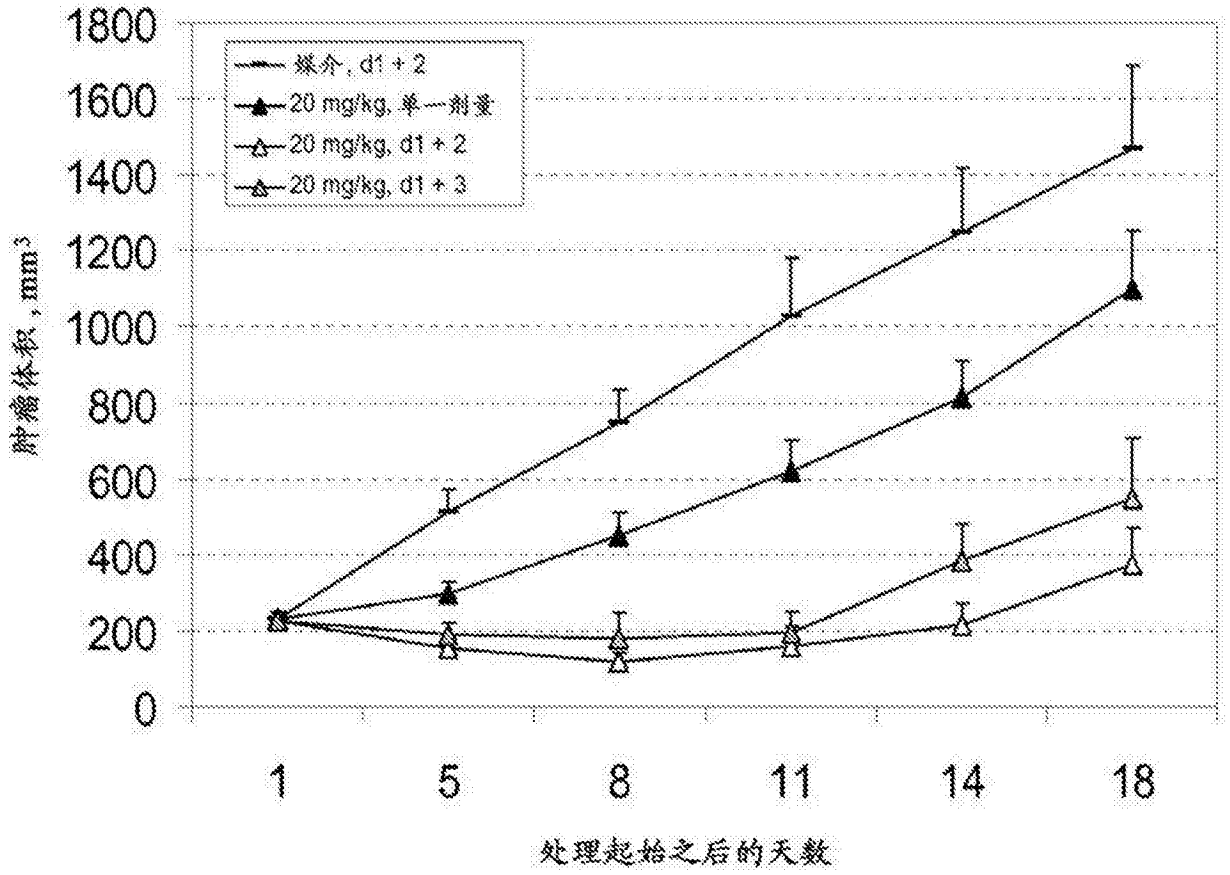
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
媒介, d1 + 2
20 mg/kg, 单一剂量
20 mg/kg, d1 + 2
20 mg/kg, d1 + 3
肿瘤体积, mm3
1
5
8
11
14
18
处理起始之后的天数

图11

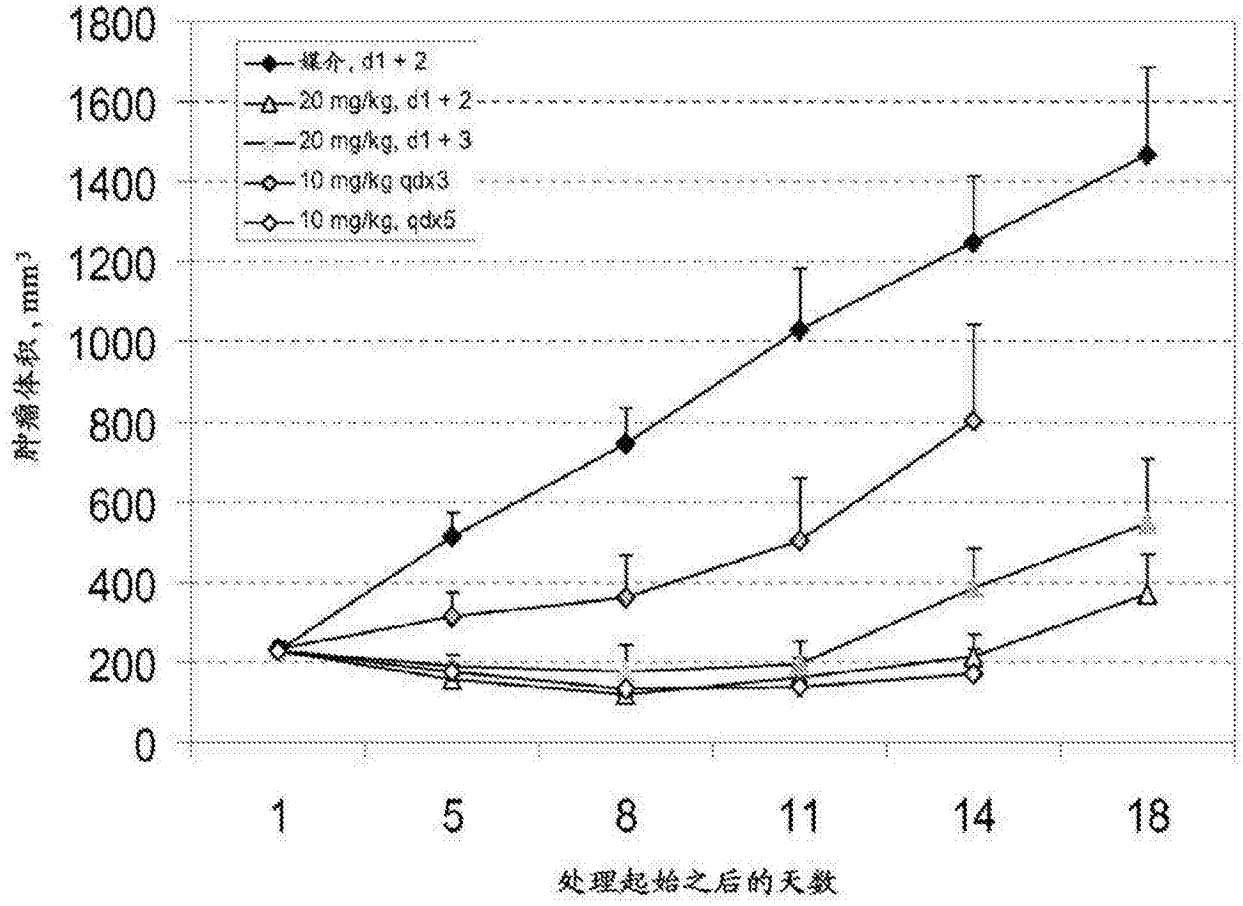
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
媒介, d1 + 2
20 mg/kg, d1 + 2
20 mg/kg, d1 + 3
10 mg/kg qdx3
10 mg/kg, qdx5
肿瘤体积, mm3
1
5
8
11
14
18
处理起始之后的天数

图12

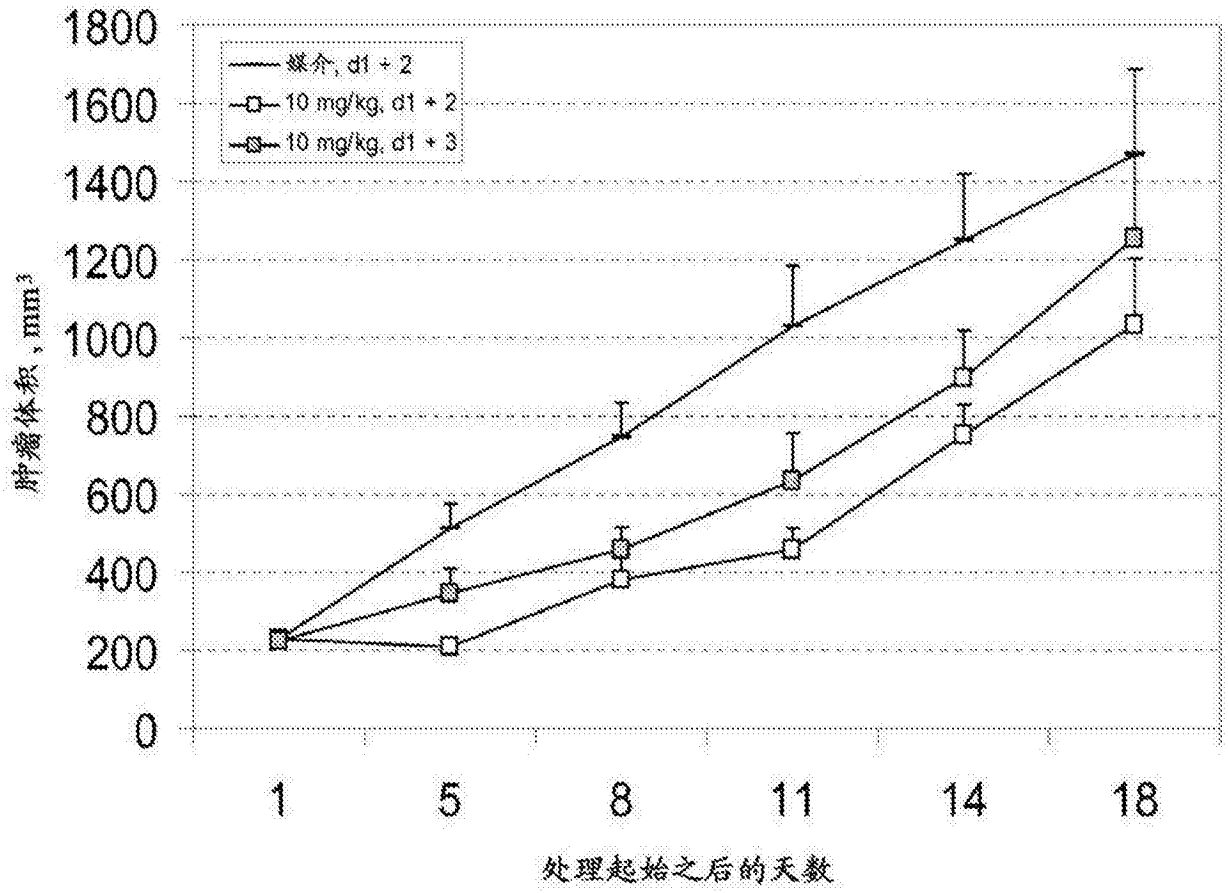
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
媒介, d1 + 2
10 mg/kg, d1 + 2
10 mg/kg, d1 + 3
肿瘤体积，mm3
1
5
8
11
14
18
处理起始之后的天数

图13

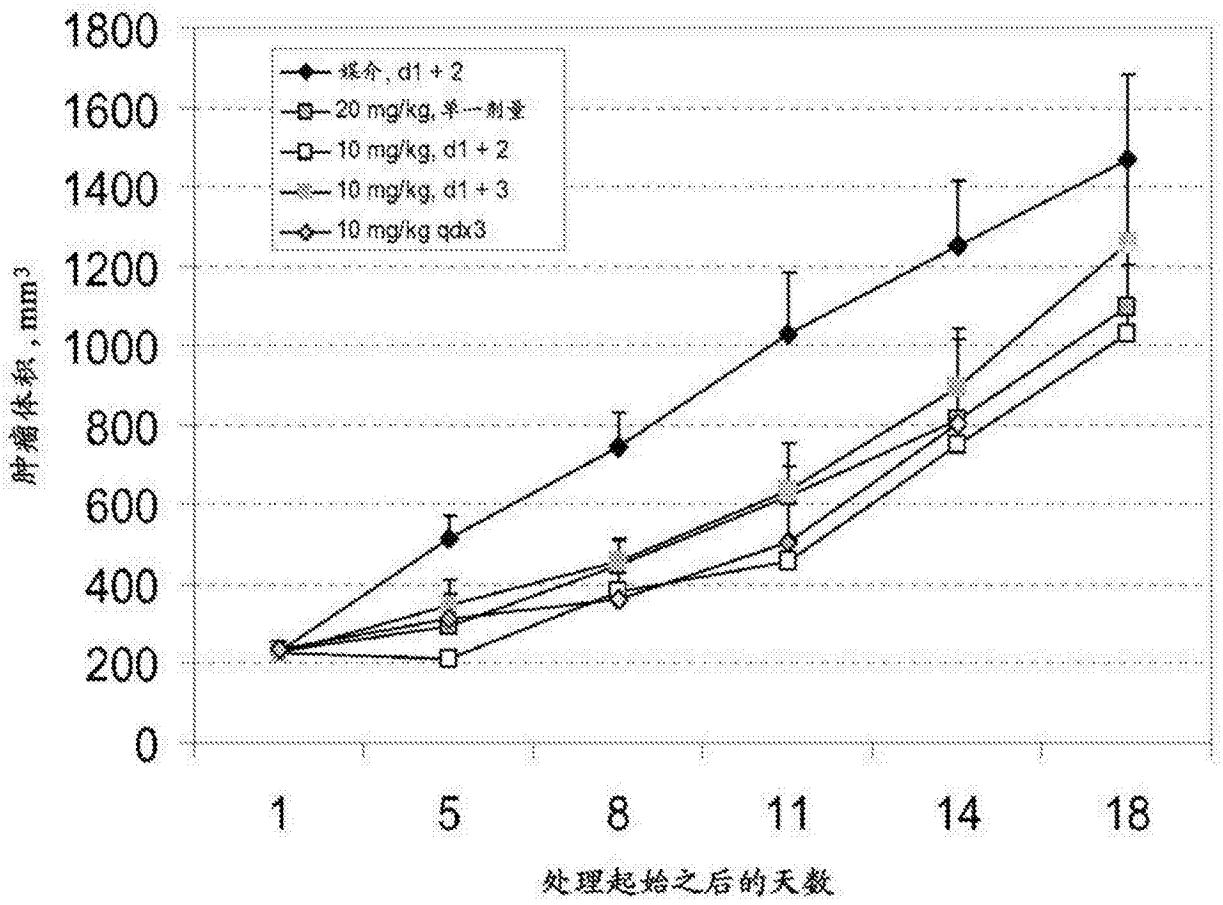
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
媒介, d1 + 2
20 mg/kg, 单一剂量
10 mg/kg, d1 + 2
10 mg/kg, d1 + 3
10 mg/kg qdx3
肿瘤体积, mm3
1
5
8
11
14
18
处理起始之后的天数

图14

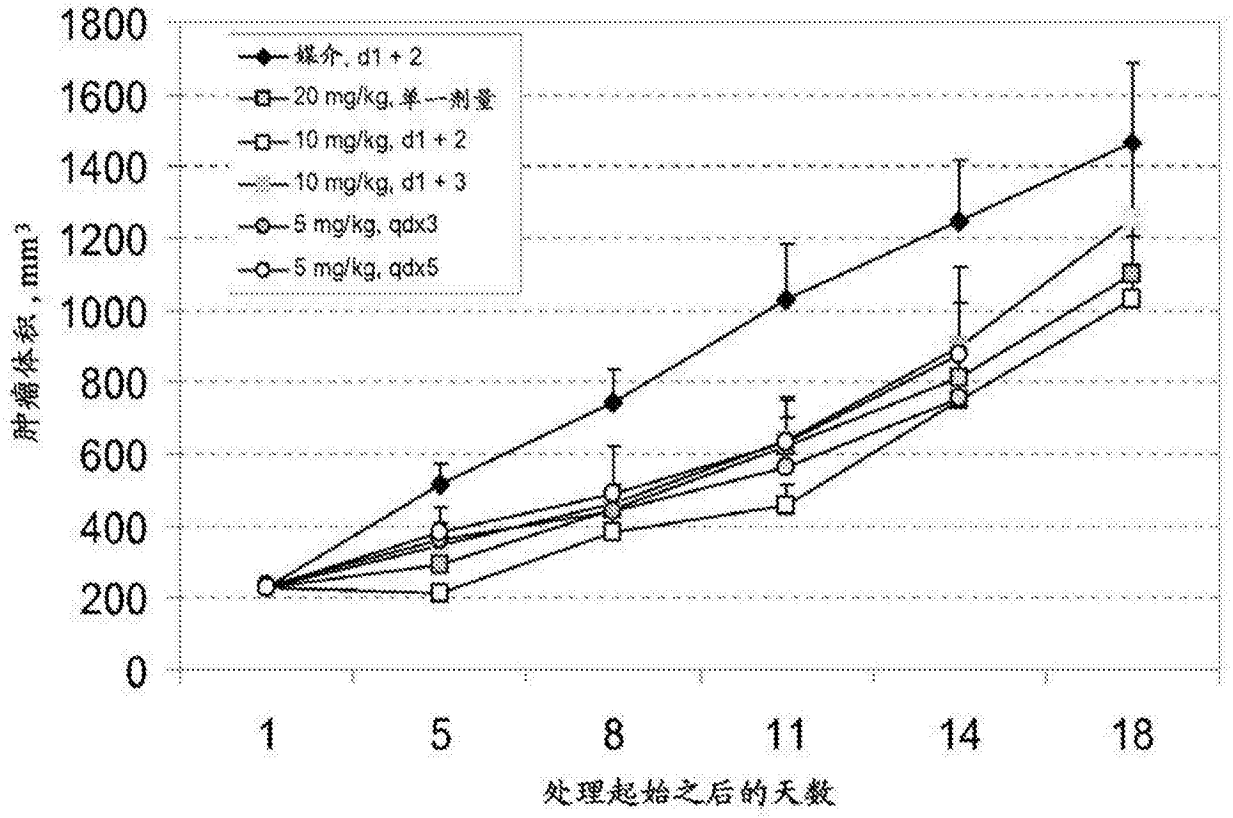
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积，mm³
媒介，d1 + 2
20 mg/kg，单一剂量
10 mg/kg，d1 + 2
10 mg/kg，d1 + 3
5 mg/kg，qdx3
5 mg/kg，qdx5
1
5
8
11
14
18
处理起始之后的天数

图15

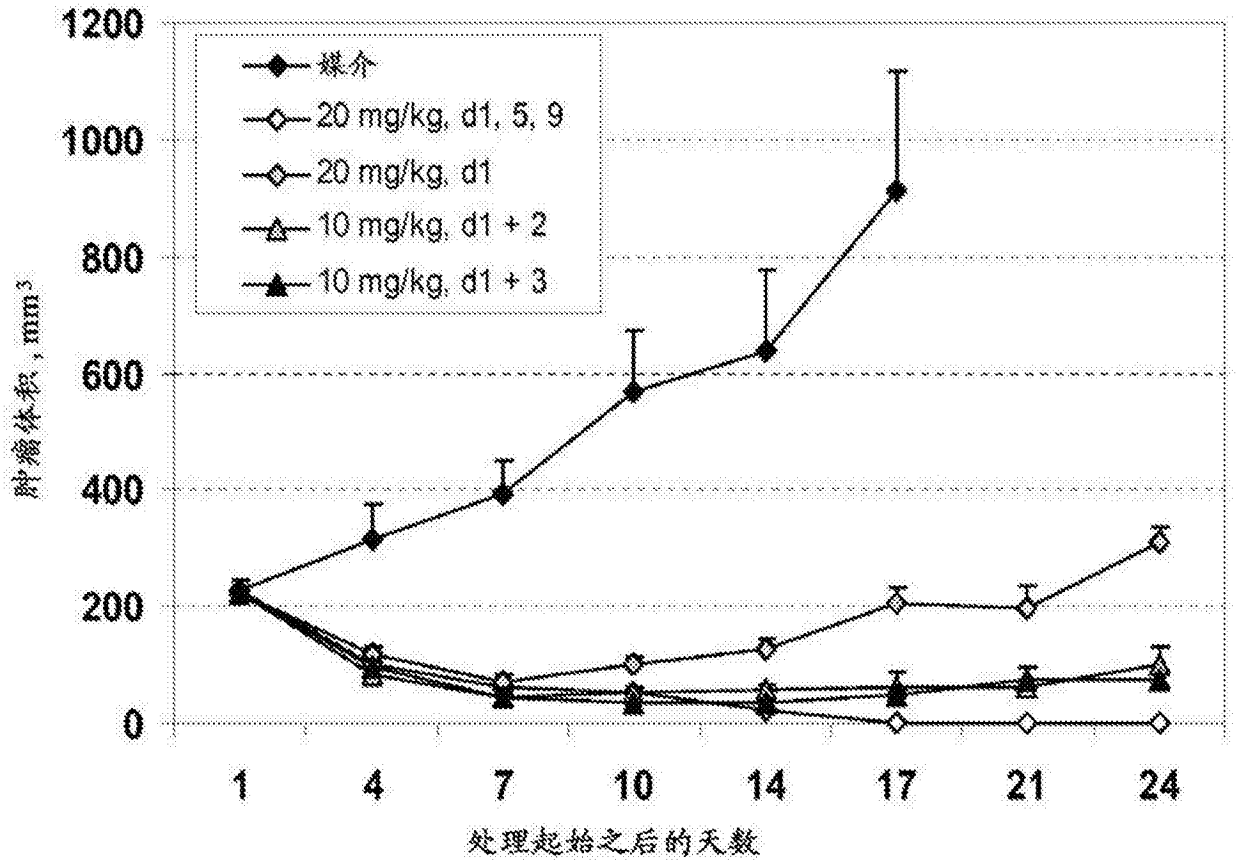
1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积，mm3
媒介
20 mg/kg, d1, 5, 9
20 mg/kg, d1
10 mg/kg, d1 + 2
10 mg/kg, d1 + 3
1
4
7
10
14
17
21
24
处理起始之后的天数

图16

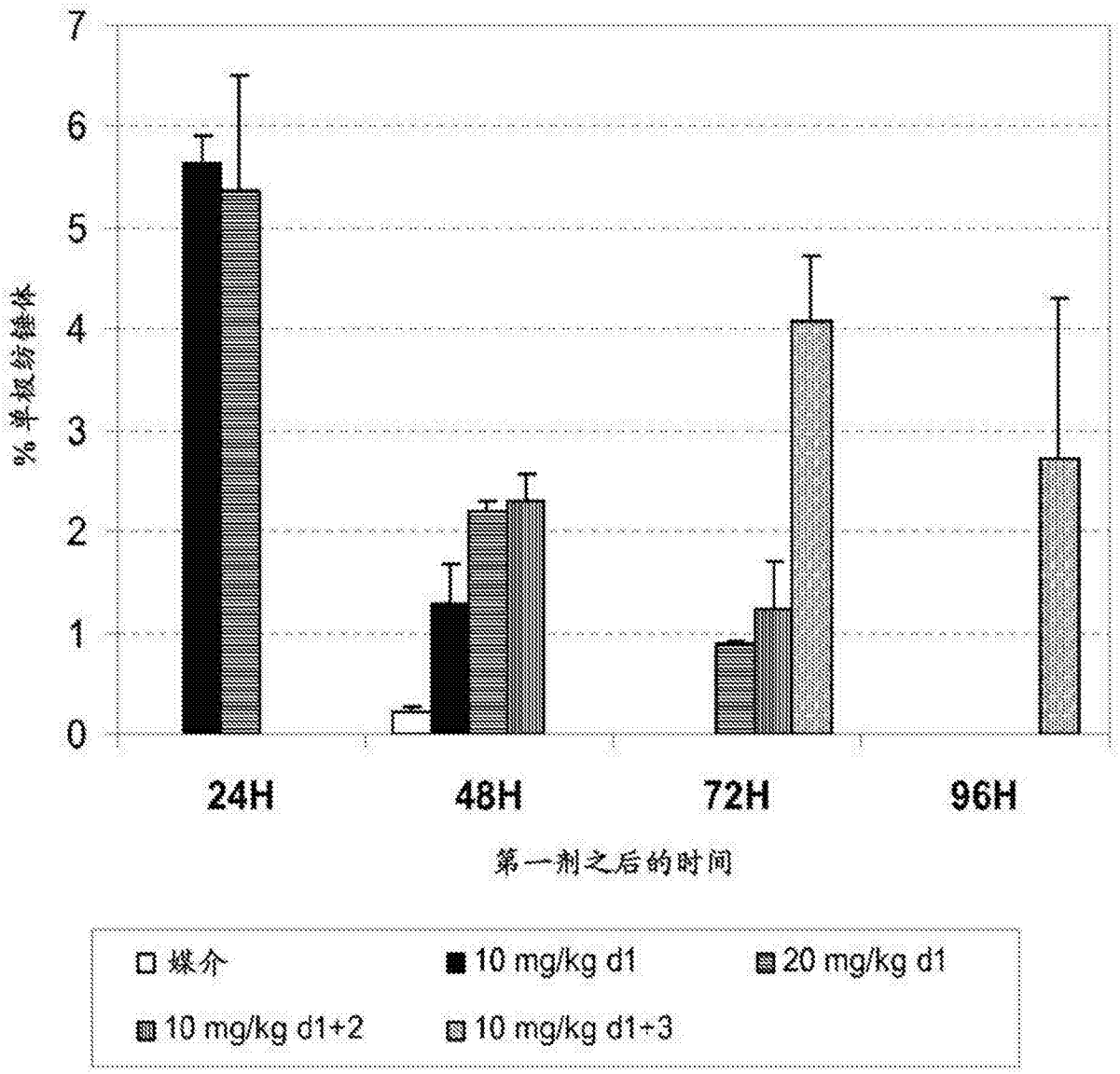
7
6
5
4
3
2
1
0
% 单极纺锤体
24H
48H
72H
96H
第一剂之后的时间
媒介
10 mg/kg d1
20 mg/kg d1
10 mg/kg d1+2
10 mg/kg d1+3

图17

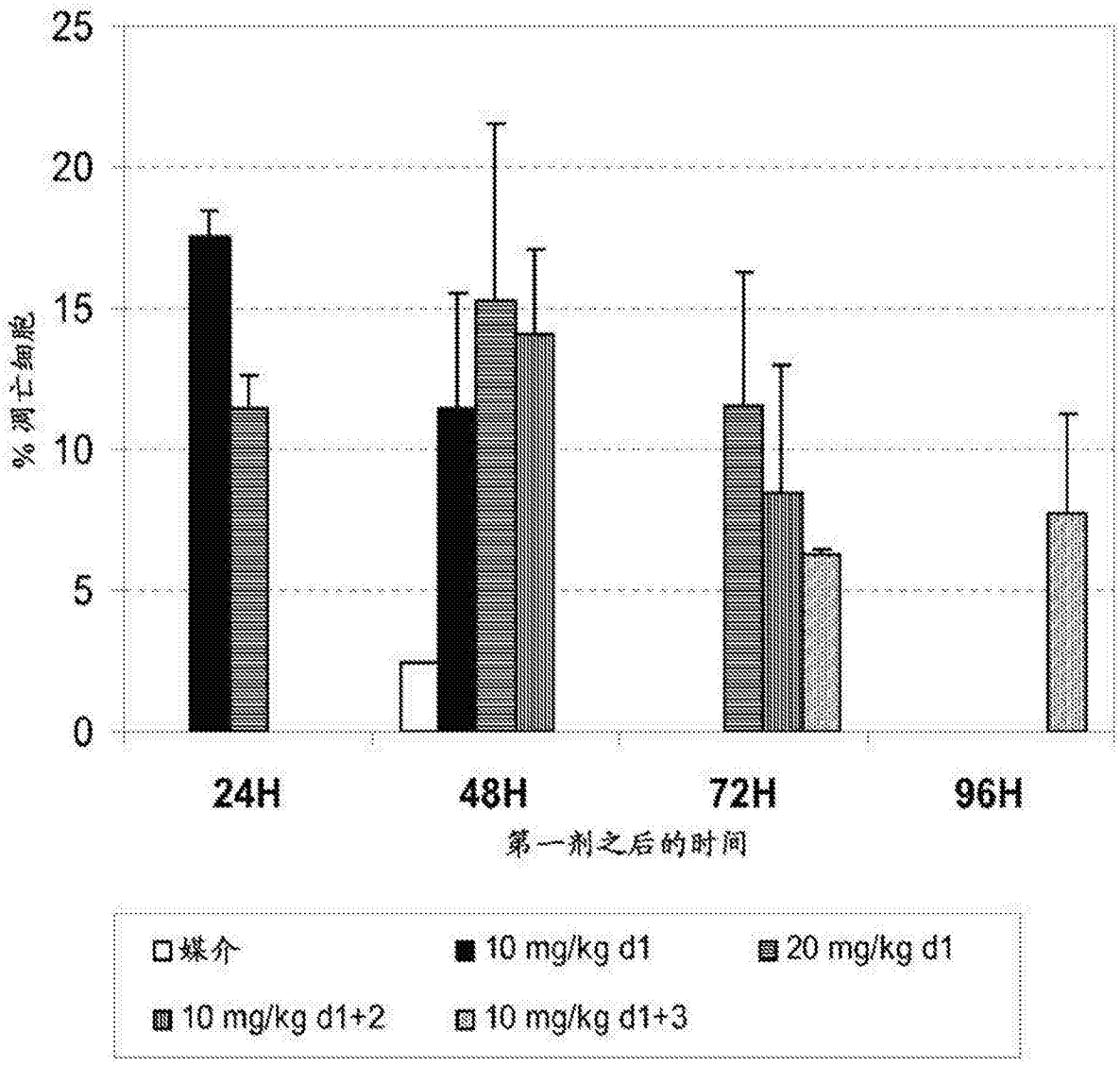
25
20
15
10
5
0
% 凋亡细胞
24H
48H
72H
96H
第一剂之后的时间
媒介
10 mg/kg d1
20 mg/kg d1
10 mg/kg d1+2
10 mg/kg d1+3

图18

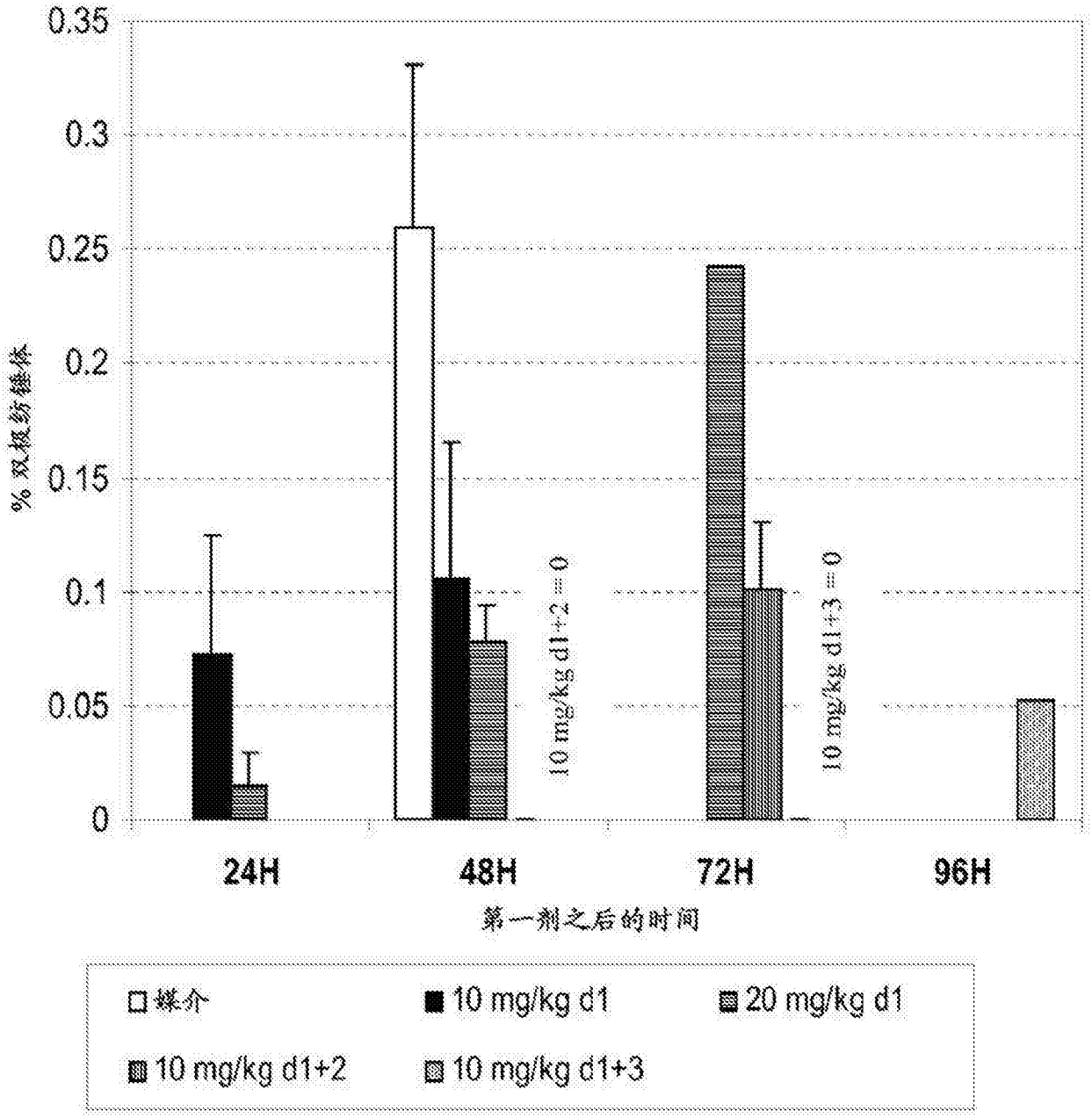
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
% 双极纺缝体
10 mg/kg d1+2 = 0
10 mg/kg d1+3 = 0
24H
48H
72H
96H
第一剂之后的时间
媒介
10 mg/kg d1
20 mg/kg d1
10 mg/kg d1+2
10 mg/kg d1+3

图19