



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112997078 A

(43) 申请公布日 2021. 06. 18

(21) 申请号 201980074261.9

(22) 申请日 2019.11.13

(30) 优先权数据

62/767215 2018.11.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/081145 2019.11.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/099470 EN 2020.05.22

(71) 申请人 阿斯利康(瑞典)有限公司

地址 瑞典南泰利耶

(72) 发明人 J·奇达多 S·博伊科 L·德鲁

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李波 李唐

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图5页

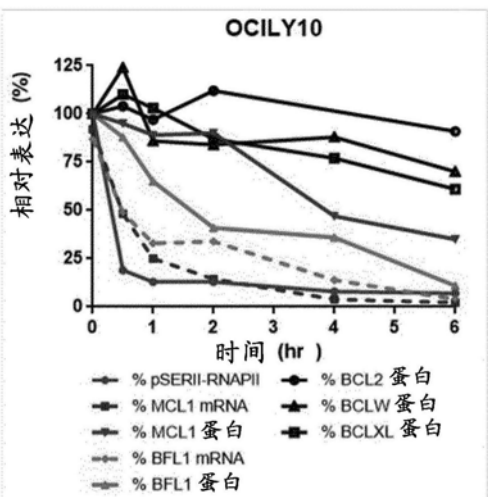
(54) 发明名称

治疗癌症的方法

(57) 摘要

本文描述了治疗Mcl-1依赖性癌症的方法。这些方法可以包括确定癌症是否为Bcl-1阳性, 以及如果癌症为Bcl-1阳性, 则向患者施用CDK9的抑制剂。

C



1. 一种治疗患者中Mc1-1依赖性癌症的方法,该方法包括:
通过获得
或已经获得该患者的生物样品;以及
进行或者已经进行测定来测量Bf1-1的表达水平来确定该癌症是否为Bf1-1阳性;以及
如果该癌症是Bf1-1阳性,则向该患者施用CDK9的抑制剂,从而增加癌症细胞凋亡;
其中施用CDK9的抑制剂后,Bf1-1阳性癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症细胞凋亡的增加要大,和/或施用Mc1-1抑制剂后,Bf1-1阳性癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症细胞凋亡的增加要少。
2. 如权利要求1所述的方法,该方法进一步包括:如果该癌症为Bf1-1阴性,则向该患者施用Mc1-1抑制剂。
3. 如权利要求1至2中任一项所述的方法,其中该CDK9的抑制剂是CDK9的选择性抑制剂。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中该CDK9的抑制剂是AZD4573。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中该癌症是淋巴瘤。
6. 如权利要求5所述的方法,其中该癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)。
7. 如权利要求6所述的方法,其中该癌症是活化的B细胞弥漫性大B细胞淋巴瘤 (ABC-DLBCL)。
8. 如权利要求2至7中任一项所述的方法,其中该Mc1-1抑制剂是AZD5991。
9. CDK9的抑制剂用于治疗Mc1-1依赖性癌症的用途,其中该癌症已被确定为Bf1-1阳性。
10. 如权利要求9所述的用途,其中该CDK9的抑制剂是CDK9的选择性抑制剂。
11. 如权利要求9至10中任一项所述的用途,其中该CDK9的抑制剂是AZD4573。
12. Mc1-1抑制剂用于治疗Mc1-1依赖性癌症的用途,其中该癌症已被确定为Bf1-1阴性。
13. 如权利要求13所述的用途,其中该Mc1-1抑制剂是AZD5991。

治疗癌症的方法

[0001] 骨髓细胞白血病1 (Mcl-1) 是BCL-2蛋白家族的重要抗凋亡成员和细胞存活的主要调节因子。已经在多种癌症类型中观察到MCL1基因的扩增和/或Mcl-1蛋白的过表达,并且通常涉及肿瘤发展。事实上,MCL1是人类癌症中最常被扩增的基因之一。在许多恶性肿瘤中,Mcl-1是关键的存活因子,并且已经显示其介导对多种抗癌剂的耐药性。

[0002] Mcl-1通过与促凋亡蛋白(如Bim、Noxa、Bak和Bax)结合并中和其死亡诱导活性来促进细胞存活。因此,Mcl-1抑制会释放这些促凋亡蛋白,通常导致依赖于Mcl-1而存活的肿瘤细胞中的细胞凋亡的诱导。

[0003] 与Mcl-1一样,Bfl-1也属于抗凋亡蛋白的BCL-2家族。

[0004] 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)代表在结合至细胞周期蛋白调节配偶体上时变得有活性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的家族。CDK/细胞周期蛋白复合物被首先鉴定为细胞周期进程的调节因子。CDK/细胞周期蛋白复合物也涉及转录和mRNA的处理。CDK9/PTEFb(正性转录延伸因子b)主要在Ser-2位点磷酸化RNA聚合酶II(RNAP II)大亚基的羧基末端结构域(CTD),调节转录延伸。抑制CDK9和转录抑制导致短寿命mRNA转录物和相关蛋白(包括Mcl-1和c-myc)的快速耗竭,导致诱导高度依赖这些存活蛋白的癌细胞的细胞凋亡。

[0005] 对如下方法存在需求,这些方法用来确定哪些癌症、从而确定哪些患者易受改变抗凋亡蛋白(例如像Mcl-1和Bfl-1)水平的治疗的影响。

[0006] 在一方面,提供了治疗患者中Mcl-1依赖性癌症的方法,该方法包括通过获得或已经获得该患者的生物样品;并进行或已进行测定以测量Bfl-1的表达水平来确定该癌症是否为Bfl-1阳性;以及如果该癌症是Bfl-1阳性,则向该患者施用CDK9的抑制剂,从而增加癌症细胞凋亡;其中施用CDK9的抑制剂后,Bfl-1阳性癌症细胞凋亡的增加比Bfl-1阴性癌症细胞凋亡的增加要大,和/或施用Mcl-1抑制剂后,Bfl-1阳性癌症细胞凋亡的增加比Bfl-1阴性癌症细胞凋亡的增加要少。

[0007] 在另一个方面,提供了CDK9的抑制剂用于治疗Mcl-1依赖性癌症的用途,其中该癌症已被确定为Bfl-1阳性。

[0008] 在另一个方面,提供了Mcl-1抑制剂用于治疗Mcl-1依赖性癌症的用途,其中该癌症已被确定为Bfl-1阴性。

[0009] 其他特征、目的和优点将从说明书和附图以及权利要求中显而易见。

[0010] 图1A-1B展示了CDK9抑制与Mcl-1抑制相比对一些淋巴瘤细胞系的不同反应。

[0011] 图2显示,与对Mcl-1抑制的敏感性相比,Bfl-1表达与对CDK9抑制的相对较高敏感性相关。

[0012] 图3A-3D显示,Bfl-1是不稳定蛋白,并且其表达受瞬时CDK9抑制的调节。

[0013] 图4A-4B显示,表达Bfl-1的淋巴瘤细胞系依赖于多种Bcl-2家族蛋白以存活。

[0014] 图5A-5C显示,AZD4573在ABC-DLBCL细胞系中展示稳健的抗肿瘤活性。

[0015] 本文描述了治疗Mcl-1依赖性癌症的方法。这些方法通常涉及识别与其他Mcl-1依赖性癌症相比,那些对CDK9抑制敏感性增加和/或对Mcl-1抑制敏感性降低的Mcl-1依赖性癌症。

[0016] 不希望受到特定机制的束缚, 在一些Mc1-1依赖性癌症中, 完全的细胞凋亡反应可能需要抑制和/或耗竭不止一种抗凋亡蛋白。因为CDK9的抑制可以减少包括Mc1-1在内的其他抗凋亡蛋白(例如像Bf1-1)的表达, 所以一些Mc1-1依赖性癌症对CDK9的抑制剂的敏感性可以高于对Mc1-1抑制剂的敏感性。

[0017] 术语“治疗(treat、treating、treatment)”是指至少部分地减轻、抑制、预防和/或改善症状、障碍、或疾病(如癌症)。术语“癌症的治疗”或“癌细胞的治疗”包括体外治疗和体内治疗两者(包括在温血动物(如人类)中)。癌细胞的治疗的有效性能以多种方式进行评估, 这些方式包括但不限于: 抑制癌细胞增殖(包括逆转癌症生长); 促进癌细胞死亡(例如, 通过促进细胞凋亡或另一种细胞死亡机制); 改善症状; 治疗响应的持续时间; 延缓疾病的发展; 和延长存活。

[0018] 也可以关于与治疗相关的副作用的性质和程度来评估治疗。此外, 有效性可以通过生物标志物(如已知与特定生物学现象相关的蛋白的表达水平或磷酸化水平)来评估。有效性的其他评估方式是本领域技术人员已知的。

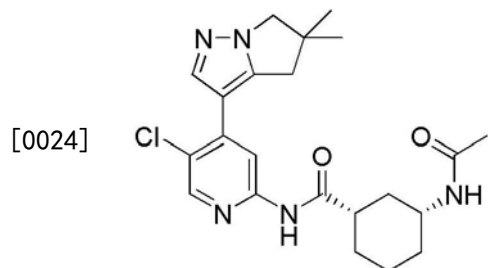
[0019] 如本文使用的, “Mc1-1依赖性癌症”是指Mc1-1耗竭或抑制引起足以证明临床有益效果的癌细胞凋亡增加的癌症。细胞凋亡可以通过多种方法进行评估(如细胞死亡、裂解的胱天蛋白酶的增加、或本领域中已知的其他方法)。

[0020] 如本文使用的, “Bf1-1阳性”是指癌症、癌细胞或癌细胞系表达Bf1-1蛋白。相反, “Bf1-1阴性”是指癌症、癌细胞或癌细胞系不表达Bf1-1蛋白。对于给定的癌症、癌细胞或癌细胞系, 可以通过例如蛋白质印迹来确定Bf1-1的表达状态。

[0021] 如本文使用的, 术语“CDK9的抑制剂”是指能够抑制CDK9(并且可选地, 能够抑制一种或多种其他CDK)的化合物。抑制包括CDK9在内的一种或多种CDK的化合物是CDK9的非选择性抑制剂, 即使该化合物的主要目标不是CDK9。例如, 迪那西利(dinaciclib)抑制多个CDK(包括CDK9)。因此, 如本文中作为术语使用的, 迪那西利是CDK9的非选择性抑制剂。CDK9的选择性抑制剂是抑制CDK9的化合物, 并且对其他CDK具有很少或没有抑制活性。因此, 如本文使用的“CDK9的抑制剂”包括CDK9的非选择性抑制剂和选择性抑制剂两者。

[0022] CDK9的抑制剂包括例如AZD4573、BAY-1251152、BAY-1143572、CYC065、阿沃西地(alvociclib)、AT7519、沃卢西利(voruciclib)、洛尼西利(roniciclib)、和迪那西利。CDK9的选择性抑制剂包括AZD4573、BAY-1251152、和BAY-1143572。CDK9的非选择性抑制剂包括CYC065、阿沃西地、AT7519、沃卢西利、洛尼西利、和迪那西利。

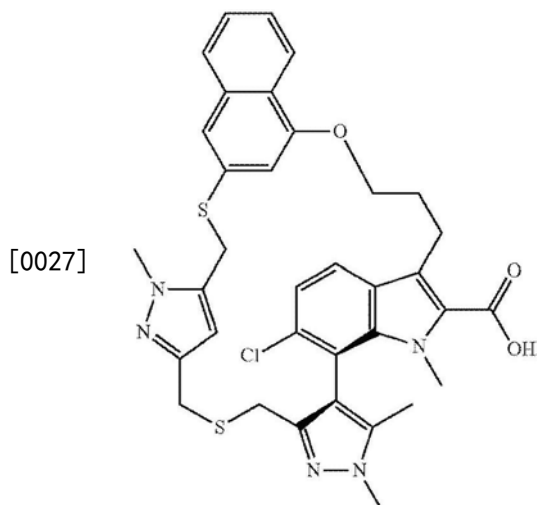
[0023] AZD4573(选择性CDK9抑制剂)也称为(1S, 3R)-3-乙酰胺基-N-(5-氯-4-(5, 5-二甲基-5, 6-二氢-4H-吡咯并[1, 2-b]吡啶-3-基)吡啶-2-基)环己烷甲酰胺, 具有以下式:



[0025] 并且描述于例如WO 2017/001354中(通过援引以其全文并入)。

[0026] 如本文使用的, 术语“Mc1-1抑制剂”是指能够通过Mc1-1结合而抑制Mc1-1的化

合物。如本文使用的,术语“Mc1-1抑制剂”排除了通过例如限制Mc1-1蛋白的表达间接影响Mc1-1的化合物。因此,如本文使用的术语,CDK9的抑制剂不会被认为是Mc1-1抑制剂。Mc1-1抑制剂的一个说明性实例是AZD5991:



[0028] 如描述于美国专利第9,840,518号中(通过援引以其全文并入)。

[0029] Mc1-1依赖性的癌细胞系对如Mc1-1抑制剂和CDK9的抑制剂等治疗的敏感性可以变化。在一组Mc1-1依赖性癌细胞系中,出乎意料地发现,与Bf1-1阴性细胞系相比,Bf1-1阳性细胞系趋于显示降低的对Mc1-1抑制的敏感性、增加的对CDK9抑制的敏感性、或者两者。因此,与Mc1-1的抑制剂相比,Bf1-1阳性细胞系对CDK9的抑制剂具有更高的相对敏感性。以这种方式,Bf1-1可以用来区分不同的Mc1-1依赖性癌症以识别那些可能对CDK9的抑制剂敏感的Mc1-1依赖性癌症(即使其对Mc1-1抑制剂不敏感)。

[0030] 在一个实施例中,提供了治疗患者中Mc1-1依赖性癌症的方法,该方法包括通过获得或已经获得患者的生物样品,并且进行或者已经进行测定来测量Bf1-1的表达水平来确定该癌症是否为Bf1-1阳性;以及如果该癌症是Bf1-1阳性,则向该患者施用CDK9的抑制剂,从而增加癌症细胞凋亡;其中施用CDK9的抑制剂后,Bf1-1阳性癌症癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症癌症细胞凋亡的增加要大,和/或施用Mc1-1抑制剂后,Bf1-1阳性癌症癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症癌症细胞凋亡的增加要少。

[0031] 在一个实施例中,提供了增加Mc1-1依赖性癌症中癌症细胞凋亡的方法,该方法包括通过获得或已经获得患者的生物样品,并且进行或者已经进行测定来测量Bf1-1的表达水平来确定该癌症是否为Bf1-1阳性;以及如果该癌症是Bf1-1阳性,则向该患者施用CDK9的抑制剂,从而增加癌症细胞凋亡;其中施用CDK9的抑制剂后,Bf1-1阳性癌症癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症癌症细胞凋亡的增加要大,和/或施用Mc1-1抑制剂后,Bf1-1阳性癌症癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症癌症细胞凋亡的增加要少。

[0032] 在一个实施例中,提供了降低Mc1-1依赖性癌症中一种或多种抗凋亡蛋白水平的方法,该方法包括通过获得或已经获得患者的生物样品,并且进行或者已经进行测定来测量Bf1-1的表达水平来确定该癌症是否为Bf1-1阳性;以及如果该癌症是Bf1-1阳性,则向该患者施用CDK9的抑制剂,从而增加癌症细胞凋亡;其中施用CDK9的抑制剂后,Bf1-1阳性癌症癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症癌症细胞凋亡的增加要大,和/或施用Mc1-1抑制剂后,Bf1-1阳性癌症癌症细胞凋亡的增加比Bf1-1阴性癌症癌症细胞凋亡的增加要少。

[0033] 在上述实施例的每一个中,所述方法可以进一步包括如果癌症为Bcl-2阴性,则向患者施用Mcl-1抑制剂。CDK9的抑制剂可以是CDK9的选择性抑制剂。CDK9的抑制剂可以是AZD4573。癌症可选自弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、小慢性淋巴细胞白血病、华氏巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia)、边缘区淋巴瘤、慢性移植物抗宿主病、滤泡性淋巴瘤、和急性淋巴细胞白血病。如本文使用的,DLBCL包括活化的B细胞DLBCL(ABC-DLBCL)和生发中心B细胞DLBCL(GCB-DLBCL)。该癌症可以是淋巴瘤。该癌症可以是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。该癌症可以是活化的B细胞弥漫性大B细胞淋巴瘤(ABC-DLBCL)。Mcl-1抑制剂可以是AZD5991。

[0034] 在一个实施例中,提供了CDK9的抑制剂用于治疗Mcl-1依赖性癌症的用途,其中该癌症已被确定为Bcl-2阳性。CDK9的抑制剂可以是CDK9的选择性抑制剂。CDK9的抑制剂可以是AZD4573。

[0035] 在一个实施例中,提供了Mcl-1抑制剂用于治疗Mcl-1依赖性癌症的用途,其中该癌症已确定为Bcl-2阴性。Mcl-1抑制剂可以是AZD5991。

[0036] 在一个实施例中,提供了治疗患者中淋巴瘤的方法,该方法包括通过获得或已经获得患者的生物样品,并且进行或者已经进行测定来测量Bcl-2的表达水平来确定该淋巴瘤是否为Bcl-2阳性;以及如果该淋巴瘤是Bcl-2阳性,则向患者施用CDK9的抑制剂,从而增加癌症细胞凋亡;其中施用CDK9的抑制剂后,Bcl-2阳性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加比Bcl-2阴性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加要大,和/或施用Mcl-1抑制剂后,Bcl-2阳性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加比Bcl-2阴性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加要少。

[0037] 在一个实施例中,提供了治疗患者中活化B细胞弥漫性大B细胞淋巴瘤(ABC-DLBCL)的方法,该方法包括通过获得或已经获得患者的生物样品,并且进行或者已经进行测定来测量Bcl-2的表达水平来确定该癌症是否为Bcl-2阳性;以及如果该淋巴瘤是Bcl-2阳性,则向患者施用CDK9的抑制剂,从而增加癌症细胞凋亡;其中施用CDK9的抑制剂后,Bcl-2阳性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加比Bcl-2阴性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加要大,和/或施用Mcl-1抑制剂后,Bcl-2阳性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加比Bcl-2阴性淋巴瘤癌症细胞凋亡的增加要少。

[0038] 实例1:与Mcl-1抑制相比,淋巴瘤模型的子集显示对CDK9抑制的增强的敏感性

[0039] 与Mcl-1抑制相比,淋巴瘤细胞系的子集显示对CDK9抑制的增强的敏感性。在6小时的胰天蛋白酶激活测定中,用选择性CDK9抑制剂(AZD4573)或选择性Mcl-1抑制剂(AZD5991)处理33个淋巴瘤细胞系(如图2A所示)。基于胰天蛋白酶 EC_{50} ,与AZD5991相比,用AZD4573处理的33个细胞系中的7个展示对CDK9抑制的大于20倍的增强的敏感性。此外,在这些模型的子集中,与Mcl-1抑制相比,响应于CDK9抑制的胰天蛋白酶激活幅度明显增大。

[0040] 方法:将33个弥漫性大B细胞(DLBCL)和套细胞淋巴瘤(MCL)细胞系接种到用10点和1/2对数滴定预添加AZD4573或AZD5991的384孔板中并孵育6小时。孵育后,按照制造商的方案,使用Caspase-Glo 3/7(美国普洛麦格公司(Promega))测量裂解的胰天蛋白酶。使用基因数据库(GeneData)筛选器和Spotfire分析数据。

[0041] 结果显示在图1A-1B:淋巴瘤模型对CDK9和Mcl-1抑制剂的药理反应中。图1A是比较一组33个细胞系上AZD4573和AZD5991胰天蛋白酶 pEC_{50} 值的散点图。实线和虚线分别展示1:1或1:10 $y=x$ 轴单位。与AZD5991处理相比,响应于AZD4573处理的用红色突出显示/用

箭头表示的细胞系在胱天蛋白酶 EC_{50} 中具有 $>20x$ 的更有效转移。图1B为复合孵育6小时后,对应的AZD4573和AZD5991胱天蛋白酶最大效应的散点图。用红色突出显示/用箭头表示的细胞系符合响应于AZD4573处理的 $>50\%$ 最大效应和响应于AZD5991治疗的 $<50\%$ 最大效应的标准。

[0042] 实例2:表达Bf1-1的淋巴瘤模型对CDK9抑制高度敏感,而对Mc1-1抑制较不敏感

[0043] 评估了Bcl2家族成员的蛋白表达以帮助理解为什么淋巴瘤模型的子集与Mc1-1抑制相比对CDK9抑制具有增强的敏感性。在评估的淋巴瘤细胞系($n=33$)的超过20%中鉴定Bf1-1表达,其中大多数表达细胞系属于ABC-DLBCL淋巴瘤亚型。当基于没有表达Bf1-1($n=25$)对细胞系进行聚类时,AZD5991与AZD4573之间的几何平均胱天蛋白酶 EC_{50} 差异只有4倍。有趣的是,在表达Bf1-1的细胞系($n=8$)中,AZD5991与AZD4573之间胱天蛋白酶 EC_{50} 的差异显著增加22倍。在应用中值胱天蛋白酶 EC_{50} 时也观察到相似的趋势。

[0044] 方法:并行产生来自33个淋巴瘤细胞系的细胞裂解物,以评估促存活Bcl2家族成员的蛋白表达。使用BCA蛋白测定试剂盒对细胞裂解物的蛋白浓度进行归一化处理,并根据标准方案进行蛋白质印迹。Bf1-1表达的阳性细胞系对照(TMD8)被用来对该组中的其他细胞系进行归一化。AZD4573和AZD5991各自的中值和几何平均胱天蛋白酶 EC_{50} 分别从基于高和低Bf1-1表达聚类的细胞系中计算。

[0045] 结果显示在图2A-2B:Bf1-1蛋白在淋巴瘤模型中的表达中。图2A显示了33个淋巴瘤细胞系中Bf1-1蛋白表达的评估。条颜色代表淋巴瘤亚型。通过蛋白质印迹法检测,穿过虚线的条为阳性Bf1-1表达。该比例与TMD8细胞系对照的表达有关。图2B显示33个淋巴瘤模型中AZD4573和AZD5991的胱天蛋白酶几何平均和中值 EC_{50} 。根据阳性或阴性的Bf1-1表达将表分组。对每个细胞系类别列出了AZD5991与AZD4573之间的 EC_{50} 差异倍数。

[0046] 实例3:Bf1-1在淋巴瘤细胞系中是由瞬时AZD4573处理调控的不稳定的蛋白

[0047] 由于发现Bf1-1表达与CDK9抑制敏感性的增强呈正相关,因此,推测CDK9抑制在淋巴瘤细胞系中除了靶向Mc1-1外,还靶向Bf1-1。将ABC-DLBCL细胞系OCILY10用AZD4573的连续稀释物处理,并且免疫印迹检测其下游靶蛋白。近端CDK9生物标志物(pSer2-RNAP2)被AZD4573以剂量依赖的方式抑制。当AZD4573的浓度抑制近端CDK9生物标志物时,发现了Mc1-1和Bf1-1蛋白的等效降低。通过用环己酰亚胺处理OCILY10细胞证实Bf1-1是不稳定蛋白,表明Bf1-1的半衰期小于1小时(与Mc1-1相似)。其他Bcl2家族蛋白的半衰期均大于9小时。

[0048] 在用100nM AZD4573处理的OCILY10细胞中也观察到CDK9抑制的时间依赖性响应。向细胞给药后30分钟,pSer2-RNAP2的表达被抑制 $>80\%$,而Mc11和Bf11mRNA的表达在2小时降至同等水平,随后在4小时,Mc1-1和Bf1-1蛋白的表达降低。在6小时检测到裂解的胱天蛋白酶。用AZD4573处理6h后,较长寿蛋白Bcl2、Bcl-xL和Bcl-W的表达保持相对不变。我们在另外的ABC-DLBCL细胞系(TMD8)中观察到AZD4573处理后Bf1-1和Mc1-1的相似结果。

[0049] 方法:将ABC-DLBCL细胞系OCILY10用9pt、1/2对数剂量反应的AZD4573处理6h,并收获细胞以用于产生蛋白裂解物。还将这些细胞用在100nM的AZD4573在6小时内的不同时间点进行处理。在每个时间点(0、0.5、1、2、4、6小时)收获细胞,分别用于mRNA分离或产生蛋白裂解物。将mRNA转化为cDNA,并且使用Mc11和Bcl2a1引物按照标准方案进行PCR序列扩增。使用BCA蛋白检测试剂盒对蛋白裂解物的蛋白浓度进行归一化,并根据标准方案进行蛋

白质印迹。为了确保达到预期的靶接合,针对CDK9 (pSer2-RNAPolII) 的近端生物标志物,以及Mc1-1和Bf1-1来检测印记。为了测定诱导细胞凋亡的时间,评估了裂解的胱天蛋白酶-3。上样对照(黏着斑蛋白)也用于归一化。

[0050] 并行产生来自33个DLBCL和MCL淋巴瘤细胞系的细胞裂解物,以评估促存活Bcl2家族成员的蛋白表达。使用BCA蛋白测定试剂盒对细胞裂解物的蛋白浓度进行归一化处理,并根据标准方案进行蛋白质印迹。使用来自TMD8细胞的阳性对照细胞裂解物,采用对照以确保蛋白质印迹测定中蛋白(GAPDH)的相等上样和相等表达。

[0051] 为估计Bcl2家族蛋白的半衰期,用10 μ g/mL的环己酰亚胺处理OCILY10细胞以中止新蛋白合成。在环己酰亚胺处理后不同的时间点(0、1、3、6、9、24小时)收获1e⁶个细胞,用于产生蛋白裂解物。

[0052] 结果显示在图3A-3D。淋巴瘤细胞系中通过AZD4573处理对Bf1-1的抑制中:图3A:将OCILY10细胞用剂量反应的AZD4573处理6小时,并后用蛋白质印迹进行评估。图3B:对于指定的时间点,将OCILY10细胞用10 μ g/mL的环己酰亚胺处理,并进行免疫印迹以检测Bcl2家族蛋白表达。图3C:用100nM AZD4573处理后在OCILY10细胞中Bf1-1转录本和蛋白调节随时间变化的动力学。图3D:来自TMD8细胞(用100nM AZD4573处理指定的时间点,并评估Mc1-1、Bf1-1和裂解的胱天蛋白酶的蛋白调节)的免疫印迹数据。

[0053] 实例4:表达Bf1-1的淋巴瘤细胞系依赖于多种Bcl-2家族蛋白以存活

[0054] 如以下描述确定淋巴瘤细胞对Bf1-1的单基因依赖性(使用siRNA)。在OCILY10和TMD8细胞系中,敲除>80%的靶向Bf1-1的siRNA后,内源性细胞凋亡生物标志物裂解的PARP的表达相对于打乱的对照没有增加。然而,当将Bf1-1敲低细胞用AZD5991处理并再评估裂解的胱天蛋白酶时,在OCILY10和TMD8细胞系中均实现最大水平的细胞凋亡(从平均45%上升到超过90%),表型模拟了响应于经由AZD4573进行瞬时CDK9抑制实现的最大胱天蛋白酶激活的相似幅度。

[0055] 方法:OCILY10和TMD8细胞在对数生长期生长,并以1x10⁶个细胞/mL在12孔板(Dharmacon B-005000)中在无血清siRNA递送培养基中铺板。将靶向Bf1-1或打乱的阴性对照(NTC)的siRNA SMARTpool以0.1或0.5 μ M添加到各自的孔中持续24小时(Dharmacon Bcl2a1-597,NTC-D-001910-01)。将2mL细胞培养基添加到所有转染的孔中,并转移到6孔板中持续另外的48小时。收集转染的细胞,通过蛋白质印迹评估Bf1-1蛋白敲低及裂解的胱天蛋白酶-3。还将转染后的细胞接种于用8点滴定预添加AZD4573或AZD5991的384孔板上并孵育6小时。按照制造商的方案,使用Caspase-Glo 3/7(美国普洛麦格公司)测量板的裂解的胱天蛋白酶激活。

[0056] 结果显示在图4A-4B。淋巴瘤模型中Bf1-1依赖性中:图4A:免疫印迹显示转染Bf1-1siRNA后,OCILY10和TMD8细胞裂解物中Bf1-1和裂解的PARP的表达。图4B:图表显示,在Bf1-1敲低条件下,对于AZD5991处理OCILY10和TMD8细胞系中的胱天蛋白酶激活呈剂量依赖性增加。

[0057] 实例5:AZD4573在ABC-DLBCL细胞系中展示稳健的抗肿瘤活性

[0058] 评估CDK9抑制对Bf1-1体内表达的作用。与Mc1-1抑制相比,ABC-DLBCL异种移植瘤OCILY10和TMD8的AZD4573间歇给药引起稳健的肿瘤消退(TG1分别为198%和184%)。AZD4573介导的抗肿瘤活性与pSer2-RNAPII、Mc1-1和Bf1-1的药效学降低有关,其次与胱天

蛋白酶激活有关。

[0059] 方法:将AZD4573以二甲基乙酰胺(DMA)/聚乙二醇400(PEG400)/1%w/v吐温80溶液2/30/68进行配制,并以15mg/kg腹腔内(ip)给药,第1天和第2天中以2小时间隔BID给药后停止给药5天。

[0060] 将AZD5991在30%HPBCD(羟基-丙基-β-环糊精)中以注射用水配制用于静脉内使用,调节pH为9.0-9.5,直到浓度高达20mg/mL(基于亲本形式)。以60mg/kg的剂量每周一次尾静脉注射AZD5991。

[0061] 将 5×10^6 个OCILy10肿瘤细胞或 10×10^6 个TMD8肿瘤细胞以含有50%基质胶的0.1mL体积皮下注射至C.B.-17SCID雌性小鼠的右肋腹中。

[0062] 研究期间,每周记录两次肿瘤体积(通过卡尺测量)、动物体重和肿瘤状况。使用以下公式计算肿瘤体积:长度(mm) × 宽度(mm)² × 0.52。对于疗效研究,通过比较对照组与处理组的肿瘤体积的差异来评估从处理起始的生长抑制。当平均肿瘤大小达到约150-180mm³时开始给药。CR=完全响应。

[0063] 药效学测量是按照肿瘤分离的标准方案进行的。使用BCA蛋白测定试剂盒对分离的肿瘤的蛋白裂解物进行归一化。运行免疫印迹并检测pSERII-RNAPII和Bcl2家族蛋白的表达。上样对照(GAPDH)用于确定相等的蛋白上样。

[0064] 结果显示在图5A-5B中:AZD4573在Bf1-1表达淋巴瘤异种移植物中的体内抗肿瘤活性。图5A:在OCILY10和TMD8 ABC-DLBCL异种移植物模型中,AZD4573处理导致完全肿瘤消退。图5B:3个给药周期后,分别达到的AZD4573和AZD5991疗效的汇总表。图5C:急性AZD4573处理后OCILY10和TMD8模型中Bf1-1的药效学调节。

[0065] 其他实施例在以下权利要求的范围内。

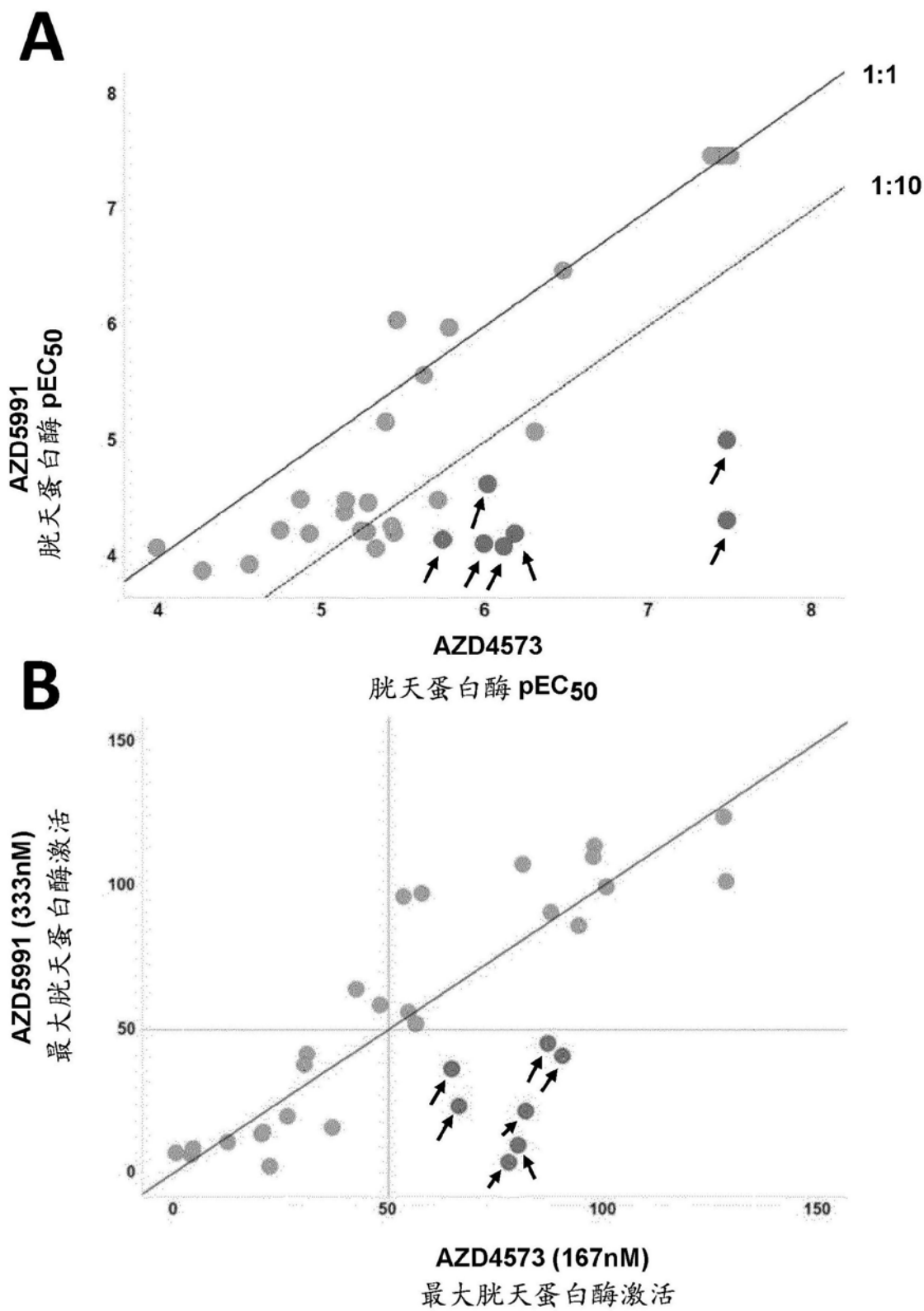
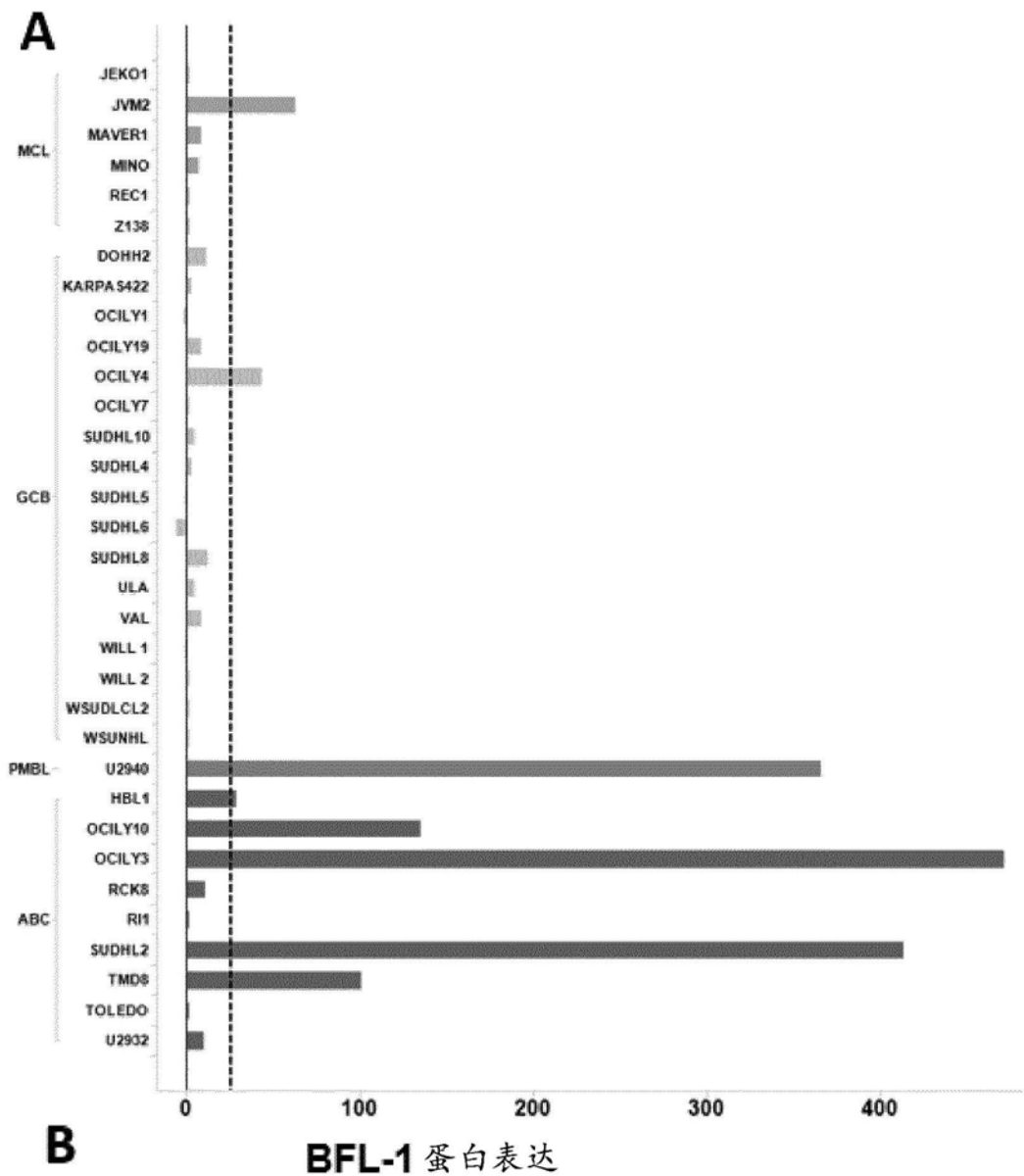


图1



标准	几何平均胱天蛋白酶 EC50 (μM)		
	AZD4573	AZD5991	差异倍数
所有细胞系 (n=33)	0.08	0.42	6
Bfl-1 阴性 (n=25)	0.09	0.32	4
Bfl-1 阳性 (n=8)	0.04	0.99	22

标准	中值胱天蛋白酶 EC50 (μM)		
	AZD4573	AZD5991	差异倍数
所有细胞系 (n=33)	0.03	0.42	14
Bfl-1 阴性 (n=25)	0.03	0.27	9
Bfl-1 阳性 (n=8)	0.02	1.27	69

图2

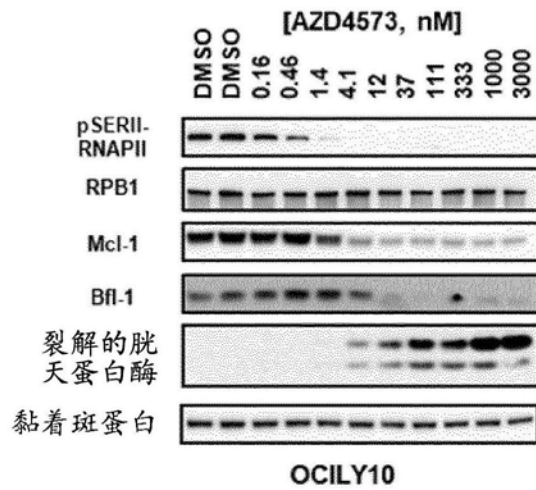
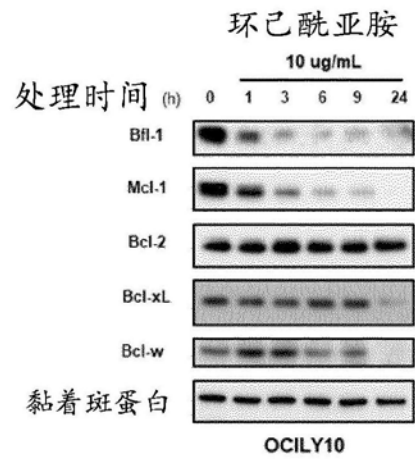
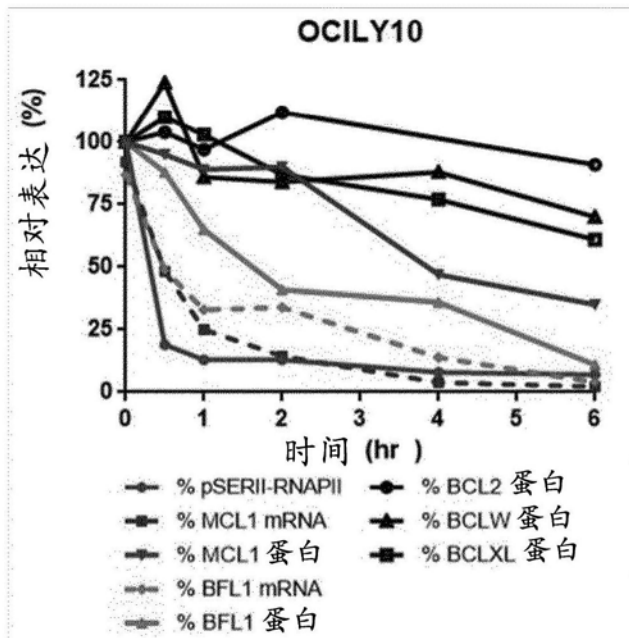
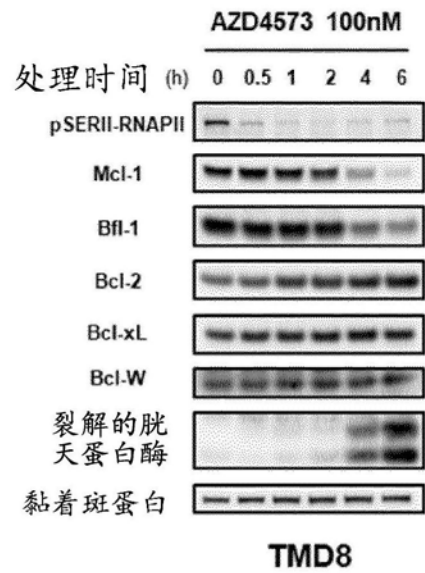
A**B****C****D**

图3

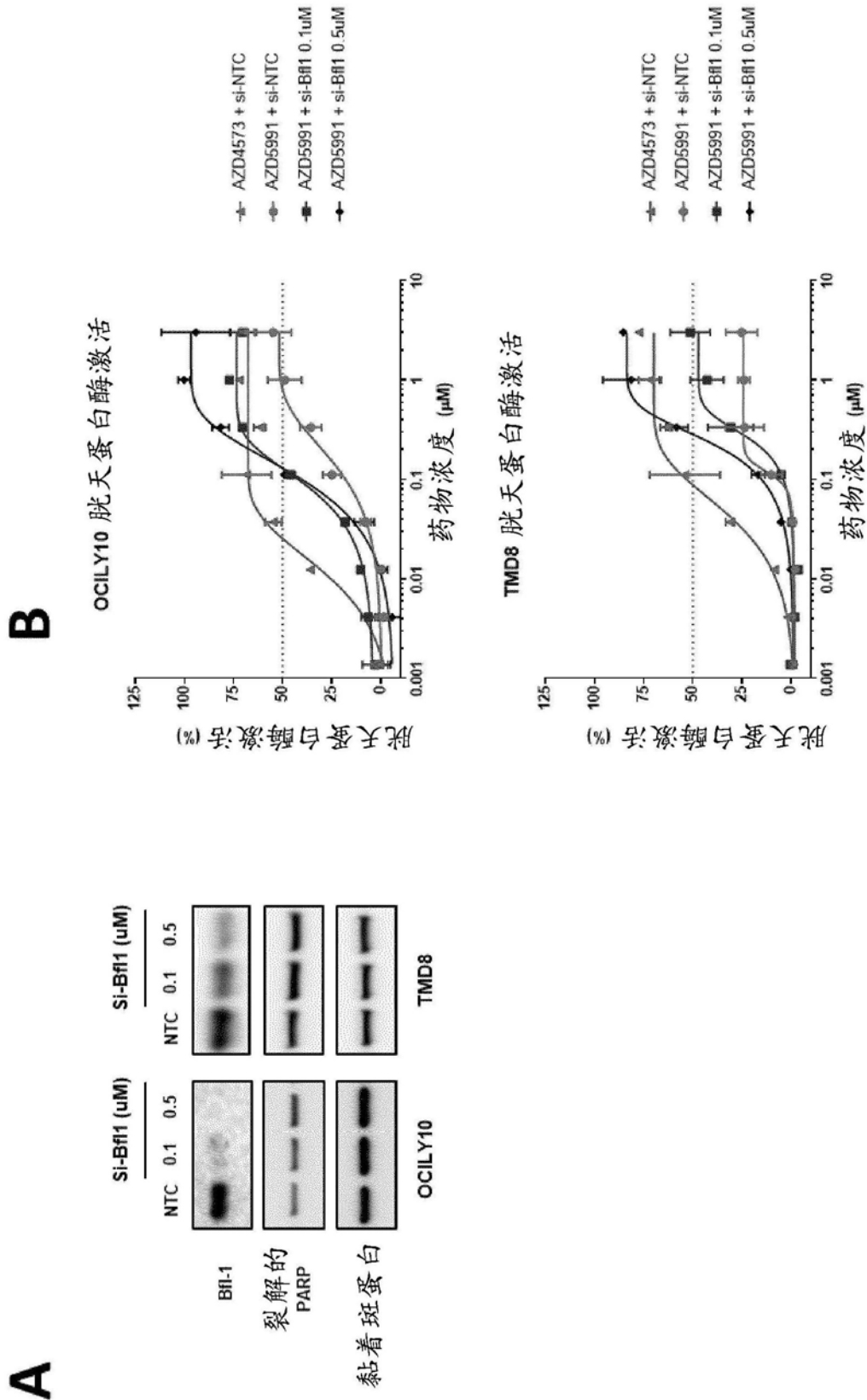


图4

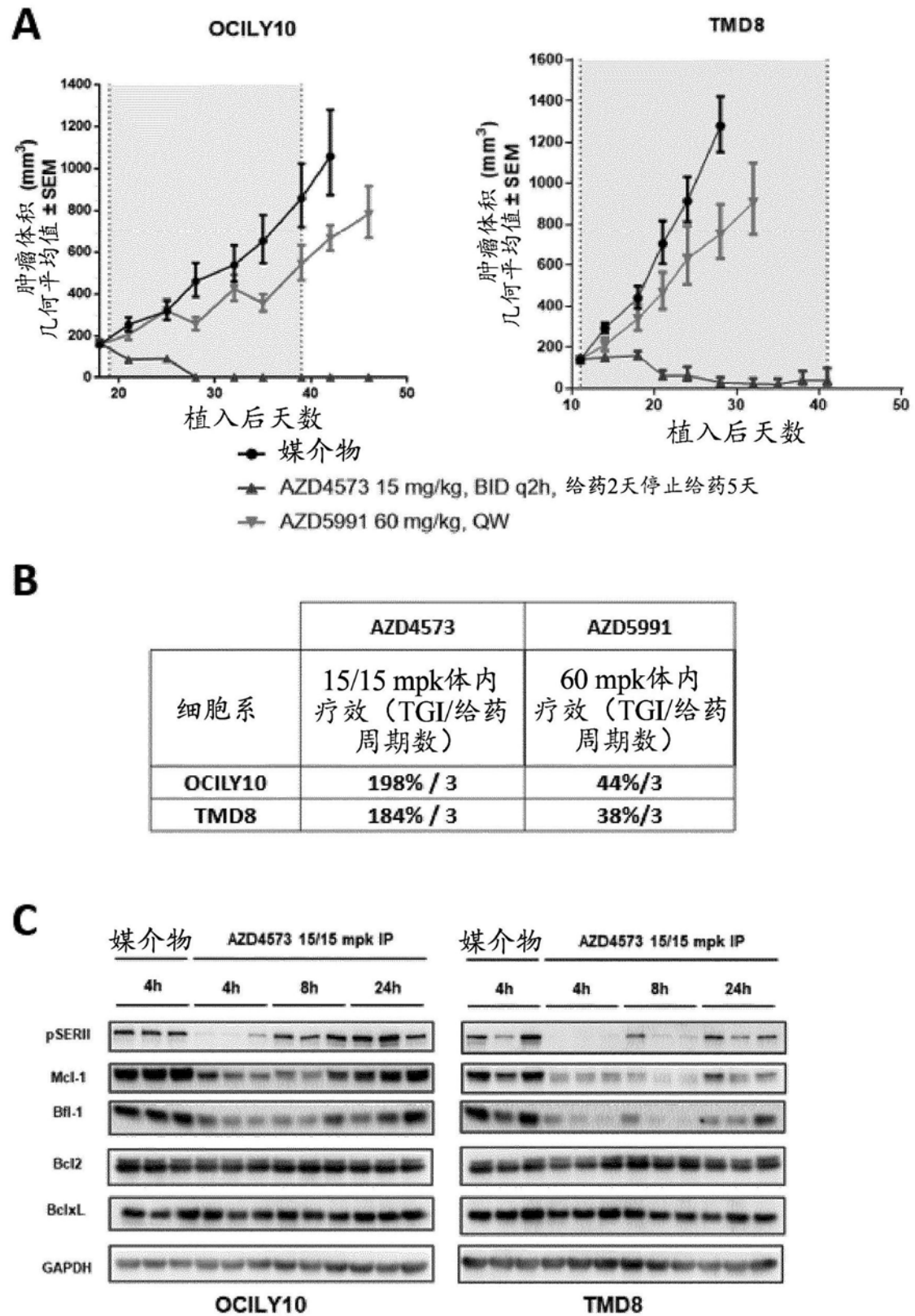


图5