

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利说明书

(10) 申请公布号 CN 1364084 A

(43) 申请公布日 2002. 08. 14

---

(21) 申请号 CN00808529. 3

(22) 申请日 2000. 04. 06

(71) 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 W·R·比肖普 DE·布拉萨德 TE·纳加布胡山

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳

(51) Int. CI

A61K31/44

A61K31/55

A61P35/00

权利要求说明书 说明书 附图

---

(54) 发明名称

诱导癌细胞死亡和肿瘤消退的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗癌症的方法, 该方法包含给予(1)法呢基蛋白转移酶抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂来诱导癌细胞死亡和肿瘤消退。

法律状态

法律状态公告日

法律状态信息

法律状态

## 权利要求说明书

- 1.治疗需要这种治疗的病人中癌症的方法，所述治疗包含给予诱导协同水平的癌细胞死亡有效量的(1)FPT抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂。
- 2.权利要求 1 的方法，其中所述 FPT 抑制剂是稠环三环苯并环庚三烯并吡啶。
- 3.权利要求 1 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是激酶抑制剂。
- 4.权利要求 1 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂抑制 Ras 信号传递途径中 Ras 的下游成分。
- 5.权利要求 1 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是 MEK 抑制剂。
- 6.权利要求 1 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是生长因子受体抑制剂。
- 7.权利要求 6 的方法，其中生长因子受体抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂。

8.权利要求 7 的方法，其中酪氨酸激酶抑制剂是选自(1) erbB2受体抑制剂，(2)PDGF 受体抑制剂，(3) IGF受体抑制剂，和(4)EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂的小分子。

9.权利要求 6 的方法，其中生长因子受体抑制剂是直接对抗生长因子受体细胞外区域的抗体。

10.权利要求 9 的方法，其中所述抗体是靶向于 erbB2 受体的单克隆抗体或靶向于 EGF 受体的单克隆抗体。

11.权利要求 9 的方法，其中所述抗体是靶向于 erbB2 受体的单克隆抗体。

12.权利要求 1 的方法，其中 FPT 抑制剂给药量为 1.4-400mg/天。

13.权利要求 12 的方法，其中 FPT 抑制剂给药量为 3.5-70mg/天。

14.权利要求 1 的方法，其中另一种 Ras 途径抑制剂给药量为 1-350mg/天。

15.权利要求 14 的方法，其中另一种 Ras 途径抑制剂给药量为 3.5-70mg/天。

16.权利要求 1 的方法，其中所述 FPT 抑制剂和所述另一种 Ras 途径抑制剂被同时给药。

17.权利要求 1 的方法，其中所述 FPT 抑制剂和所述另一种 Ras 途径抑制剂被依次给药。

18.权利要求 17 的方法，其中所述另一种 Ras 途径抑制剂被首先给药。

19.权利要求 17 的方法，其中所述 FPT 抑制剂被首先给药。

20.权利要求 1 的方法，其中癌症为肺癌、胰腺癌、结肠癌、卵巢癌、肝癌、骨髓白血病、黑素瘤、甲状腺卵泡癌、膀胱癌、神经胶质瘤、骨髓发育不良综合征、乳腺癌或前列腺癌。

21.权利要求 1 的方法，其中还包括给予化疗剂。

22.权利要求 21 的方法，其中所述化疗剂选自：乌拉莫司汀，氮芥，环磷酰胺，异环磷酰胺，美法仑，苯丁酸氮芥，哌泊溴浣，曲他胺，三亚乙基硫代磷酰胺，白消安，卡莫司汀，洛莫司汀，链佐星，达卡巴嗪，替莫唑胺、甲氨蝶呤，5-氟尿嘧啶，氟尿苷，阿糖胞苷，6-巯基嘌呤，6-硫鸟嘌呤，磷酸氟达拉滨，喷司他丁，吉西他滨，长春碱，长春新碱，长春地辛，博来霉素，放线菌素 D，柔红霉素，多柔比星，表柔比星，伊达比星，Paclitaxel普卡霉素，脱氧考福霉素，丝裂霉素-C，L-门冬酰胺酶，干扰素，依托泊苷，替尼泊苷，17 $\alpha$ -炔雌醇，己烯雌酚，睾酮，泼尼松，氟甲睾酮，丙酸屈他雄酮，睾内酯，醋酸甲地孕酮，他莫昔芬，甲泼尼龙，甲睾酮，泼尼松龙，曲安西龙，氯烯雌醚，羟孕酮，氨鲁米特，雌莫司汀，醋酸甲羟孕酮，Leuprolide 氟他胺，托瑞米芬，戈舍瑞林，顺铂，卡铂，羟基脲，安吡啶，丙卡巴肼，米托坦，米托蒽醌，左旋咪唑，Navelbene，CPT-11，Anastrozole Letrazole Capecitabine Reloxafine Droloxafine gemcitabine paclitaxel或六甲蜜胺。

23.权利要求 21 的方法，其中所述抗肿瘤剂是替莫唑胺。

24.权利要求 1 的方法，还进一步包含施用放疗。

25.治疗需要这种治疗的病人中癌症的方法，所述治疗包含同时或依次施用有效量的(1)FPT抑制剂(+)对映体

和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂。

26.权利要求 25 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是激酶抑制剂。

27.权利要求 25 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂抑制 Ras 信号传递途径中 Ras 的下游成分。

28.权利要求 25 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是 MEK 抑制剂。

29.权利要求 25 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是生长因子受体抑制剂。

30.权利要求 29 的方法，其中生长因子受体抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂。

31.权利要求 30 的方法，其中酪氨酸激酶抑制剂是选自(1)erbB2抑制剂，(2)PDGF

受体抑制剂, (3) IGF受体抑制剂, 和(4) EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂的小分子。

32.权利要求 29 的方法, 其中生长因子受体抑制剂是直接对抗生长因子受体细胞外区域的抗体。

33.权利要求 32 的方法, 其中所述抗体是靶向于 erbB2 受体的单克隆抗体或靶向于 EGF 受体的单克隆抗体。

34.权利要求 32 的方法, 其中所述抗体是靶向于 erbB2 受体的单克隆抗体。

35.权利要求 25 的方法, 其中 FPT 抑制剂给药量为 1.4-400mg/天。

36.权利要求 35 的方法, 其中 FPT 抑制剂给药量为 3.5-70mg/天。

37.权利要求 25 的方法, 其中另一种 Ras 途径抑制剂给药量为 1-350mg/天。



38.权利要求 37 的方法，其中另一种 Ras 途径抑制剂给药量为 3.5-70mg/天。

39.在癌症病人中诱导协同水平的癌细胞死亡的方法，该方法包含给予有效量的  
(1)FPT抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂。

40.权利要求 39 的方法，其中所述 FPT 抑制剂是稠环三环苯并环庚三烯并吡啶。

41.权利要求 39 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是激酶抑制剂。

42.权利要求 39 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂抑制 Ras 信号传递途径中 Ras 的下游成分。

43.权利要求 39 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是 MEK 抑制剂。

44.权利要求 39 的方法，其中另一种 Ras 信号传递途径抑制剂是生长因子受体抑制剂。

45.权利要求 44 的方法，其中生长因子受体抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂。

46.权利要求 45 的方法，其中酪氨酸激酶抑制剂是选自(1)erbB2抑制剂，(2)PDGF受体抑制剂，(3)IGF受体抑制剂，和(4)EGF受体酪氨酸激酶抑制剂的小分子。

47.权利要求 44 的方法，其中生长因子受体抑制剂是直接对抗生长因子受体细胞外区域的抗体。

48.权利要求 47 的方法，其中所述抗体是靶向于 erbB2 的单克隆抗体或靶向于 EGF 受体的单克隆抗体。

49.权利要求 47 的方法，其中所述抗体是靶向于 erbB2 受体的单克隆抗体。

50.权利要求 39 的方法，其中 FPT 抑制剂给药量为 1.4-400mg/天。

51.权利要求 50 的方法，其中 FPT 抑制剂给药量为 3.5-70mg/天。

52.权利要求 39 的方法，其中另一种 Ras 途径抑制剂给药量为 1-350mg/天。

53.权利要求 52 的方法，其中另一种 Ras 途径抑制剂给药量为 3.5-70mg/天。

54.治疗需要这种治疗的病人中癌症的方法，所述治疗包含给予(1)FPT抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂，其中 FPT 抑制剂给药量为 1.4-400mg/天。

55.治疗需要这种治疗的病人中癌症的方法，所述治疗包含给予(1)FPT抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂，其中另一种 Ras 途径抑制剂给药量为 1-350mg/天。

56.在癌症病人中使肿瘤体积消退的方法，该方法包含给予有效量的(1)FPT抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂。

57.权利要求 1 的方法，其中癌细胞死亡是通过细胞程序性死亡进行的。



# 说明书

## 发明领域

本发明描述了治疗受试体癌症包括肿瘤和转移性疾病的新方法。特别是，本发明提供了治疗癌症的方法，该方法包含联合使用(1)法呢基蛋白质转移酶(“FPT”抑制剂)和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂来诱导协同水平的癌细胞死亡(特别是细胞程序性死亡)，因此允许低剂量治疗方案。

## 发明背景

本说明书的附图 1 显示导致细胞增殖的信号转导途径的简化线性图。该途径在本文中被称作“Ras 信号传递途径”，因为 Ras 在该途径中是中心交换点，从上游成分接受信号(如，生长因子受体)并将其传递到下游成分。

描述了通过导致细胞增殖并且在某些情况下恶性转型的生长因子受体来启动的信号传递途径。许多生长因子受体(如那些表皮生长因子(EGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)的)，以及 EGF 受体相关分子(如，Her-2/Neu/ErbB2)具有内在酪氨酸激酶活性，该活性通过配体诱导的受体二聚化来激活(Heldin 1995)。这导致酪氨酸残基上受体的自身磷酸化和含有 Src 同系物 2 (SH2)区域的蛋白质的结合。两个这种 SH2 蛋白质是 Grb2 和 SHC，它们间接激活与血浆膜相关的、小的结合 GTP 蛋白质的 Ras。Ras 的激活作用在对配体与 7 个偶合受体(如，Gutkind, 1998)的转膜区 G-蛋白质结合中发生。Ras 和其他调节生长因子受体的信号传递途径的激活最终导致细胞支架和基因表达的改变，细胞支架和基因表达对于细胞增殖、分化和转化来说是必需的(在 Campbell 等人的综述中，1998)。

3 个人 ras 基因(Ha-Ras, N-Ras 和 Ki-Ras)编码 4 种蛋白(由于 Ki-Ras mRNA 另外拼接)。在正常环境下，Ras 蛋白质在活化(GTP-结合的)状态和失活(GDP-结合的)状态之间循环。Ras 激活通过结合的 GDP 与 GTP 的交换产生的，这种交换是由一族鸟

嘌呤核苷酸交换因子促进的。Ras 失活是通过结合的 GTP 水解为 GDP 而产生的。该反应是由 GTP 酶激活的蛋白质 (GAPs) 促进的 (Trahey 和 McCormick, 1987)。在许多人癌症中, Ras 蛋白质通过突变而变成致瘤的激活, 这种突变破坏 GTP 酶活性, 并因此下调 Ras 的信号传递 (在 Campbell 等人的综述中, 1998)。

存在许多候选 Ras 效应器, 它们可在信号转导和致瘤转化中的 Ras 下游起作用, 包括小 GTP 酶 Rho 族成员、磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 c-Raf-1 (在 Campbell 等人的综述中, 1998)。Raf 介导的信号传递是 Ras 效应器途径最好的特征。激活的 Ras 使 Raf 补充到存在 Raf 激活的膜上。激活的 Raf 是激酶级联, Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 级联的起始成分 (在 Lowy 和 Willumsen, 1993; Campbell 等人, 1998 的综述中)。Raf 磷酸化和激活 MEK1 和 MEK2 (MAPK/ERK 激酶) 蛋白激酶, 然后再磷酸化和激活细胞外信号调节激酶 ERK1 和 ERK2 (也称作 MAPK1 和 MAPK2)。不像其下游靶 ERK1, 2, MEK1, 2 蛋白质是高度特异的酶, 其已知的底物仅仅是 ERK1, 2 蛋白质。激活时, ERK1 和 ERK2 磷酸化 (并因此调节) 各种靶蛋白, 包括核转录因子, 导致最终细胞反应。在附图 1 中描述了这种 Ras 信号传递的线性途径。

通过生长因子受体和 Ras 途径成分在癌症中经常突变和/或过度表达的发现表明在癌细胞异常生长中这些信号传递途径的重要性。例如, Ras 在大约 30% 的人癌症中突变性激活, 癌症包括高百分数的严重的上皮癌如肺、结肠和胰腺癌。另外, 在许多癌症中发生生长因子受体的过度表达 (如, 在大约 30% 的人乳腺癌中发生 Her-2/Neu 受体的过度表达)。这些观察使得寻找和开发了阻滞信号转导途径各个成分的试剂。这些试剂具有作为新的癌症治疗的潜在能力的同时, 认为许多信号转导抑制剂是在抑制细胞生长中起作用而不是通过阻滞细胞在细胞循环中的进展而以细胞毒方式起作用。这使它们在低毒和具有明显低的抗肿瘤活性上区别于传统癌症化疗药物。

所以, 对提供一种新的并且改进的治疗癌症的方法仍然是一个挑战。例如, 对治疗

致瘤细胞来说，非常理想的是提供能够显著和选择性诱导癌细胞死亡同时最大限度地减少对正常未转化细胞的毒副作用的新方法。本发明正是提供这样的治疗方法。

## 本发明简述

本发明提供了一种治疗需要这种治疗的患者(例如，哺乳动物如人)的癌症的方法，该方法包含给予有效量的(1)法呢基蛋白质转移酶(FPT)抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂。本发明方法获得意想不到的诱导癌细胞死亡(特别是细胞程序性(apoptotic)死亡)作用。该作用是协同性的，并且对转化细胞(特别是致肿瘤性癌细胞)具有高度选择性，因此能够使用低剂量以便将可能的抑制正常非转化细胞的毒副作用降低到最小。而且，令人惊奇地发现，本发明方法具有阻断信号传递的长效、持续作用，同时又将可能的抑制正常非转化细胞的毒副作用降低到最小。在本发明之前，没有预料到任何这些作用，更不用提这些作用的大小，此外，本发明所产生的惊奇的协同和持续、长效作用的优点提供了特别低剂量的方法，这使得在达到癌细胞死亡的同时，对正常非转化细胞维持低的毒副作用。本发明的方法对于治疗各种导致肿瘤的癌症，特别是上皮癌(如胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌和膀胱癌)和黑素瘤是特别有用的。

## 附图的简要说明

在附图 1-7 中所述的 FPT 抑制剂化合物(有时称作“SCH66336”如下：(+))对映体

图 1：Ras 信号转导：图示 Ras/MAPK 信号转导途径的成分。从生长因子受体到 ERK 激活的线性途径是被说明的第一个 Ras 介导的途径。也表述了各种抑制剂靶向的步骤，抑制剂包括 FPT 抑制剂 SCH66336 和 MEK 抑制剂 PD098059 和 U0126。

图 2：PD098059 治疗的剂量依赖性细胞程序性死亡反应因加入 SCH66336 而增强：H-Ras-CVLS-转化的 Rat2 细胞用单一的或与 SCH66336 组合的、所示浓度的

PD098059 (A385-023-M005 ; Alexis Corporation) 处理 36 小时。细胞通过胰蛋白酶/EDTA 处理来收获, 在丙酮/甲醇 (50% : 50%) 于 -20°C 温度下固定 30 分钟, 用 PBS 广泛洗涤并在室温下用含有 75  $\mu$ g/ml 碘化丙锭 (PI; Calbiochem; La Jolla CA) 和 500  $\mu$ g/ml RN 酶 (Sigma; St. Louis MO) 的 PBS 标记 30 分钟。通过碘化丙锭染色染色体 DNA 并用 FACS 分析细胞群 (FACS-Calibur; Becton-Dickinson Mountain View, CA) 来测定细胞程序性死亡。在 100nM SCH66336 存在 (▲) 或不存在 (■) 下, PD098059 的浓度从 0.25 变到 20  $\mu$ M。

图 3: SCH66336 治疗的剂量依赖性细胞程序性死亡反应因加入 PD098059 而增强: H-Ras-CVLS- 转化的 Rat2 细胞用单一的或与 PD098059 组合的、所示浓度的 SCH66336 处理 36 小时。按上文图 2 中描述的方法进行分析。在 2.5  $\mu$ M PD098059 存在 (▲) 或不存在 (■) 下, SCH66336 的浓度从 0.0125 变到 0.75  $\mu$ M

图 4: SCH66336 和 U0126 对由 FACS 测量的细胞死亡的影响: H-Ras-转化的 Rat2 细胞用 0-10  $\mu$ M U0126 (#V1121; Promega Corporation Madison, WI) 在 0.5  $\mu$ M SCH66336 存在或不存在下处理 24 小时。按图 2 所述方法进行分析。1 = 未处理细胞; 2 = SCH66336 ; 3 = 1  $\mu$ M U0126; 4 = 1  $\mu$ M U0126 + SCH66336 ; 5 = 5  $\mu$ M U0126; 6 = 5  $\mu$ M U0126 + SCH66336 ; 7 = 10  $\mu$ M U0126; 8 = 10  $\mu$ M U0126 + SCH66336 。

图 5: SCH66336 和 PD098059 对由 Casp 酶激活测量的细胞死亡的影响: H-Ras-转化的 Rat2 和母本 Rat2 细胞用 20  $\mu$ M PD098059、0.5  $\mu$ M SCH66336 或两种药物的组合处理 24 小时。细胞溶解在 Clontech 推荐的洗涤剂缓冲液 (Apo-Alert CPP32/Casp 酶-3 测定) 中, 并在 4°C 温度下以 14000rpm 转速离心 15 分钟使细胞碎片成团。所得上清液的蛋白质浓度通过 BCA 蛋白质测定法 (Pierce Rockford, IL) 来测定, 该测定法各自用 175  $\mu$ g 用于测定 Casp 酶-3 活性的溶胞液和荧光肽底物 (AC-DEVD-AMC ; Clontech, Palo Alto, CA) 并通过荧光测定 (CytoFluor 板读数器; Perseptve Biosystems Framingham, MA) 来进行。1 = 未处理 H-ras 细胞; 2 = H-ras



细胞+SCH66336 ; 3=H-ras 细胞+PD09059 ; 4=H-ras 细胞+SCH66336+PD098959 ;  
5=未处理 Rat2 细胞; 6=Rat2 细胞+SCH66336 ; 7=Rat2 细胞+PD09059 ; 8=Rat2  
细胞+SCH66336+PD098959 。

图 6: SCH66336 和 PD098059 对由 ERK1 和 ERK2 磷酸化作用的影响: H-Ras-转化的 Rat2 细胞用 20  $\mu$  M PD098059 或 0.5  $\mu$  M SCH66336 处理 0-36 小时。细胞溶解在洗涤剂缓冲液中, 并在 4°C 温度下以 14000rpm 转速离心 15 分钟使细胞碎片成团。所得上清液的蛋白质浓度通过 BCA 蛋白质测定法 (Pierce Rockford, IL) 来测定。细胞蛋白 (20  $\mu$  g) 通过 8-16% Tris-Glycine 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Novex; San Diego, CA) 来分离。将蛋白质转化到用于 Western Blot 分析的 PVDF 膜上。磷酸化的 ERK1 和 ERK2 使用特异于磷酸化 p42/44MAPK 蛋白质的兔多克隆抗体 (磷酸-Thr202/Tyr204 特异的; #9101; New England Biolabs Inc; Beverly MA) 来检测。总 ERK1 和 ERK2 使用特异于 p42/44MAPK 蛋白质的兔多克隆抗体 (#9102; New England Biolabs Inc; Beverly MA) 来检测。两种抗体用山羊抗-小鼠-HRP 抗体 (辣根过氧化物酶; Chemicon; Temecula, CA) 识别并通过增强化学发光 (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce Rockford, IL) 来显示。

图 7: 细胞内信号转导途径: 图 1 显示由生长因子受体经 Ras 导致激活 MAPK 级联的线形途径。清楚的是, 信号传递途径非常复杂, 有多个分支并互相连络。在本文图 7 中举例说明了某些此种复杂性。

## 本发明详述

本发明提供了通过 (1) 法呢基蛋白质转移酶 (FPT) 抑制剂和 (2) 另一种 Ras 信号传递途径抑制剂组合来治疗癌症的新方法。

(1) 本文将“法呢基蛋白质转移酶抑制剂”或“FPT 抑制剂”或“FTI”定义为下列化合物: 该化合物 (i) 强力抑制 FPT (但不优选香叶基香叶基蛋白质转移酶 I, 体外的); (ii) 阻

滞由转化 H-ras 是一种法呢基受体)形式诱导的(但不优选由工程化为香叶基香叶基受体的转化 H-ras 形式诱导的)表型改变; (ii) 阻滞 ras 细胞内法呢基化; 和 (iv) 阻滞异常细胞生长。

(2) 本文将“Ras 信号传递途径抑制剂”定义为阻滞图 1 所示信号转导途径中任何蛋白的活性的试剂。特别优选的 Ras 信号传递途径抑制剂是“MEK 抑制剂”, 它在本文被定义为阻滞 MEK (MAPK/ERK 激酶) 蛋白质(优选抑制 MEK1 和 MEK2) 体外酶活性, 并因此如通过 MAPK 蛋白质磷酸化的阻滞所证明的阻滞 MAPK 蛋白质激活的试剂。这可通过如 Dudley 等人, Proc Natl Acad Sci: 92:686-7689 (1995) 和 Favata 等人, J. Biol Chem. 273: 18623-32 (1998) 中所述的用于磷酸化 MAPK 的 western 印迹分析来监测。1、FPT 抑制剂

作为单一或与化疗联合的试剂(参见, 如 Liu 等人, 1998), FPT 抑制剂表示阻滞 Ras 癌蛋白质功能的引导方法。FPT 催化异戊二烯基脂质部分加成到存在于 Ras 蛋白质羧基末端附近的半胱氨酸残基上。这是翻译过程后途径中的第一步, 它对于 Ras 膜相关的和 Ras 诱导的致癌转化来说都是必要的。多种 FPT 抑制剂已被报道, 包括各种肽模拟抑制剂以及其他小分子抑制剂, 最著名的是三环 FPT 抑制剂, 例如 SCH66336。FPT 抑制剂干扰细胞中翻译过程后的 Ras 蛋白质并在各种各样的体外和体内肿瘤模型中表明有抗肿瘤活性(Bishop 等人, 1995; Liu 等人, 1998)。SCH66336 的抗肿瘤活性包括体外抑制各种人肿瘤细胞系的无贴壁依赖性生长和抑制免疫妥协小鼠中异种移植的生长(Liu 等人, 1998)。人肿瘤细胞系在其对 FPT 抑制剂生长作用的敏感性上是明显不同的。敏感性或抵抗性与 Ras 突变状态无关。

在一些转基因小鼠肿瘤模型(如, MMTV-H-Ras, WAP-H-Ras, TGF $\alpha$  和 TGF $\alpha$ /neu) 中, 用 FPT 抑制剂治疗诱导肿瘤明显退化。这些退化与细胞程序性死亡的增加有关(Liu 等人, 1998; Barrington 等人, 1998; Norgaard 等人, 1999)。FPT 抑制剂在培养中也可诱导转化细胞的细胞程序性死亡。报道体外细胞程序性死亡作用需要在低血清中生长或在悬浮液中强制生长(Hung 和 Chaung, 1998; Lebowitz 等人,

1997; Suzuki等人, 1998)。

也显示 FPT 抑制剂治疗减小 Ha-Ras-转化的 Rat1 细胞中 MAPK 途径的活性(如, James 等人, 1994)。这种 MAPK 活性的减小与细胞生长的降低相关。FPT 抑制剂不减小未转化 Rat1 细胞的 MAPK 活性。2、靶向 MEK 的试剂:

MAPK 途径作为用于开发抗癌治疗剂的靶向物进行了检查并且描述了肿瘤细胞系中该途径特异性抑制剂的作用(Dudley等人, 1995; Favata等人, 1998)。最具特征的 MEK 抑制剂是小分子的 PD098059, 它通过以底物(ATP 或 ERK 蛋白质)非竞争性方式直接结合来抑制 MEK1 和 MEK2 的活性。这导致 MEK1 和 MEK2 磷酸化的减少和 MEK 底物(ERK1 和 ERK2) 激活的减少。PD098059 的治疗阻滞 Ras 转化细胞的生长因子介导的增殖和无贴壁依赖性生长(Alessi等人, 1995, J. Biol. Chem. 270: 27489-27494)。

目前, 报道了一种新的 MEK 抑制剂, U0126, 它与 MEK 结合的亲和性比 PD098059 高(Favata等人, 1998)。有关 MEK 抑制剂和制备 MEK 抑制剂的方法的更详细信息, 可参考文献如国际专利公开 W099/01421(1999年1月14日)和 W099/01426(1999年1月14日)。3、靶向于生长因子受体的试剂:

有两种主要的阻滞生长因子受体信号传递途径的方法:(i)直接对抗受体的单克隆抗体;(ii)受体酪氨酸激酶活性的抑制剂;和(iii)阻滞蛋白表达的反义核酸。抗受体单克隆抗体包括靶向于 erbB2 受体的(如, Genentech' HERCEPTIN<sup><sup></sup></sup>和靶向于 EGF 受体的那些。最佳特征化的抗-EGF 受体抗体是嵌合抗体 C225(Goldstein等人(1995), Clin Cancer Res. 11311-1318)。已证实 HERCEPTIN<sup><sup></sup></sup>和 C225 在表达其同源受体的临床前肿瘤模型中具有效力。

也报道了酪氨酸激酶活性的小分子抑制剂在人临床试验中已经至少有两种这样的化

合物: Sugen' s PDGF 受体抑制剂, SU101 (针对神经胶质瘤进行第三期临床试验并针对其他癌适应症进行更早期阶段的试验)和辉瑞的 EGF 受体抑制剂, CP-358, 774 (它处于早期阶段的临床试验, Moyer 等人 (1997), *Cancer Res.* 57: 4838-4848)。

#### 4、其他信号传递拮抗剂:

除上述方法外, Ras 信号传递途径和其他信号转导途径的其他成分是癌症药物发现的目标。SH2 蛋白质 (SHC 和 Grb2, 它们将生长因子受体与 Ras 激活连接起来) 是阻滞 SH2 区域与含有磷酸酪氨酸的蛋白质序列结合的肽模拟活性剂的目标。

蛋白质激酶 Raf (连接 Ras 和 MEK1, 2 激活) 也是小分子激酶抑制剂和反义方法的目标。后者的方法 (ISIS-5132 处于第 II 期临床试验 (Monia 等人, 1996))。

其他相关的细胞内信号靶向物包括磷酸-脂质激酶 PI3K (磷脂酰肌醇-3 激酶) 和蛋白质激酶 C。

在优选的实施方案中, 本发明的方法可用于治疗致瘤的癌细胞, 这是因为在癌细胞的情况下对细胞死亡 (如, 通过细胞程序性死亡) 有显著影响 (即, 不仅抑制生长而且对细胞死亡有显著作用), 同时活性剂可以较低剂量 (和/或较低频率) 给药来最大限度地减小对正常未转化细胞的潜在的毒副作用。另外, 本发明提供新的治疗癌症的方法, 该方法对阻滞细胞信号传递产生较长的更持续的作用, 同时最大限度地减小对正常细胞的潜在的毒副作用的危险。

因此, 本发明也提供在癌症患者中诱导协同水平的癌细胞死亡 (如, 细胞程序性死亡) 的方法, 该方法包含同时或先后给予有效量的 (1) FPT 抑制剂和 (2) 另一种 Ras 信号传递途径抑制剂 (即, 其量足诱导协同水平的癌细胞死亡, 如可通过如 Dengler 等人 (1995) *Anticancer Drugs* 6: 522-32 中所述的碘化丙锭荧光测定法来测量)。类似地, 本文提供杀死癌症患者中癌细胞的方法 (如通过 Dengler 等人 1995 的测定法测量的), 该方法包含给予有效量的 (1) FPT 抑制剂和 (2) 另一种 Ras 信号传递途径抑

制剂。

而且，在优选的实施方案中，本发明的方法包括在需要这种治疗的患者中(如哺乳动物，如人)治疗肿瘤和消退肿瘤体积(如通过 CAT 扫描测定的)的方法，该方法同时或先后给予足够达到量的(1)FPT抑制剂和(2)另一种 Ras 信号传递途径抑制剂。可被治疗的肿瘤的例子包括但不限于上皮癌如前列腺癌、肺癌(如，肺腺瘤)、胰腺癌(如，胰腺癌如外分泌胰腺癌)、乳腺癌、结肠癌(如，结肠直肠癌，如结肠腺癌和结肠腺瘤)、卵巢癌、膀胱癌和肝癌。其他可被治疗的癌症包括黑素瘤、骨髓白血病(例如，急性骨髓性白血病)、肉瘤、甲状腺卵泡癌和骨髓发育不良综合征。

本发明也提供包含 FPT 抑制剂和另一种 Ras 信号传递途径抑制剂的用于治疗癌症(包括诱导癌细胞死亡和肿瘤消退)的药物组合物和该组合物的制备方法。

本文所使用的下列术语具有下列意思，除非另有说明：

“生长因子受体抑制剂”：阻滞生长因子受体信号转导特性的试剂。如 Levitzk和 Gazit, 1995(Science 267: 1782-1788)所述，这些活性剂可作为受体酪氨酸激酶活性的直接抑制剂或通过抑制受体激酶活性的配体刺激的激活来起作用。

“酪氨酸激酶抑制剂”：如 Levitzk和 Gazit, 1995 所述通过与 ATP 竞争或通过与该酶的别构作用来阻滞酪氨酸磷酸化活性的试剂。

“蛋白质激酶抑制剂”：如 Levitzk和 Gazit, 1995 所述阻滞丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的蛋白磷酸化活性的试剂。

“p185erb B2/HER2/neu受体抑制剂”或“erbB2受体抑制剂”：如 Levitzk和 Gazit, 1995 所述的通过抑制受体酪氨酸激酶活性或阻滞受体激酶活性的配体刺激作用来阻滞 erbB2受体信号转导特性的试剂。

“PDGF 受体酪氨酸激酶抑制剂”：如 Kovalenko, M. 等人(1994), *Cancer Res.* 54:6106-6114所述通过抑制受体酪氨酸激酶活性或阻滞受体激酶活性的 PDGF 刺激作用来阻滞血小板衍生的生长因子(PDGF) 受体的信号转导特性的试剂。

“EGF受体酪氨酸激酶抑制剂”：如 Fry.等人(1994), *Science* 9: 1093-1095所述通过抑制受体酪氨酸激酶活性或阻滞受体激酶活性的 EGF 刺激作用来阻滞表皮生长因子(EGF) 受体的信号转导特性的试剂。

“直接对抗生长因子受体细胞外区域的抗体”：如 Mendelsohn, J. (1992) *J. Natl Cancer Inst Monogr*:13:25-131所述通过抑制配体的结合和/或防止受体酪氨酸激酶的配体刺激激活作用来阻滞生长因子受体生物活性的抗体。

“靶向于 p185 erbB2/HER2/neu受体的单克隆抗体”或“靶向于 erbB2 受体的单克隆抗体”：如 Pegram 等人, 1998 所述；也可参见 Carter等人(1992), *Proc. Natl Acad. Sci.* 89:4285-4289, 通过抑制配体的结合和/或防止生长因子受体激酶的配体刺激激活作用来阻滞 HER2 受体生物活性的抗体。

“靶向于 EGF 受体的单克隆抗体”：如 Mendelsohn, J. (1992) *J. Natl Cancer Inst Monogr*:13:25-131所述通过抑制 EGF 结合和/或 EGF 刺激的激酶活性的单克隆抗体所示的。

“直接对抗 Ras 信号途径中生长因子受体或其他成分的反义分子”：如 Wang 等人, 1998 或 Resnicoff 1998 所述干扰途径中任何蛋白质成分的信使 RNA 翻译的(并因此干扰蛋白质表达)的修饰的低聚核苷酸。对于反义技术的一般性讨论, 可参见如, *Antisense DNA and RNA*, (Cold Spring Harbor Laboratory, Melton, ed., 1988)。

“同时”：(1)相同时间, 或(2)在共同治疗方案的不同时间；和

“先后”：(1)先给予该方法中的一种成分((a)FPT抑制剂，或(b)另一种 Ras 途径抑制剂)然后再给予其他成分；给予一种成分后，第二种成分可在第一种成分之后基本上立即给药或者在第一种成分之后的有效期后给予第二种成分；有效期是认为从第一种成分给药之后获得最大益处的时间。

“下游”在本文中被定义为由 Ras 直接通过蛋白质：蛋白质结合或间接通过 Ras-调节的效应器蛋白质调节的蛋白质活性(Ras信号传导途径之中)。因此，图 1 中，“Ras 下游成分”可以是如 Mek1，2 或 Erk1，2。

“上游”在本文中被定义为直接通过蛋白质：蛋白质结合或间接通过调节另一蛋白质来调节 Ras 活性的蛋白质活性(Ras信号传导途径之中)，所述另一蛋白质直接结合并调节 Ras 活性。因此，“Ras上游成分”可以是如 erbB2、PDGF 受体、IGF 受体或 EGF 受体。

本文所述“细胞死亡”是如 Raff, M. (1998), Nature. 396 119-122所述在生理条件下或细胞器和蛋白质的解装配和代谢过程消失所引起的急性损伤诱导的细胞死亡。可通过如 Dengler等人，(1995)Anticancer Drug6: 522-32所述的碘化丙锭流动细胞计量术测定法测量细胞死亡。

本文作为一种细胞死亡形式所描述的“细胞程序性死亡”程序性细胞死亡)是表示如 Raff, M. (1998), Nature. 396 119-122所综述的定型的形态改变。细胞程序性死亡可通过如 Dengler等人，(1995)Anticancer Drug6: 522-32所述的碘化丙锭流动细胞计量术测定法来测量或通过 Gorczyca, (1993)Cancer Res 53:1945-51所述的原位末端脱氧核苷酸转移酶和切口翻译测定法(TUNEL 分析法)来测量。

“协同”或“协同水平”在本文中被定义为两种成分组合所产生的作用，该作用大于所述两种成分单独作用之和(两种成分的量保持恒定)。因此，如短语“诱导协同水平

的癌细胞死亡的有效量”指实现癌细胞死亡水平的两种成分的量(如按 Dengler 等人, (1995) *Anticancer Drugs*: 522-32所述的碘化丙锭流动细胞计量术测定法测量的或者通过 Gorczyca, (1993) *Cancer Res* 53:1945-51所述的原位末端脱氧核苷酸转移酶和切口翻译测定法(TUNEL 分析法)测量细胞程序性死亡的细胞死亡), 组合所产生的作用大于所述两种成分单独作用之和。

“持续作用”在本文中被定义为与单一治疗相比, 对用 FPTI 和 MEK1, 2 抑制剂组合治疗的延长/增强的细胞程序性死亡反应。“持续作用”的结果可通过上文所述的 MAPK 活性或细胞死亡或细胞程序性死亡的测量来监测。各个药物对 MAPK 途径抑制作用的有效期是剂量依赖性的。然而, 本文实验显示 MEK1, 2 抑制剂在治疗后的 6 小时或 6 小时前最佳抑制 MAPK 途径, 同时 SCH66336 表明最佳 MAPK 途径抑制作用在治疗后的 12-18 小时。据显示 SCH66336 对 MAPK 途径的抑制作用持续到治疗后的 72 小时。因此, 两种药物的组合可对 MAPK 途径产生长期的“持续的”抑制作用, 优选地从治疗后的 6 小时或 6 小时之前开始的一段时间, 并优选持续到治疗后的 36 小时, 更优选 72 小时(如参见附图 6)。

短语“杀死癌细胞”意指诱导转化的、致瘤的癌细胞的癌细胞死亡。

### 抑制剂的更详细说明

可用作 FPT 抑制剂的化合物类型包括: 稠环的三环苯并环庚三烯并吡啶类 (benzocyclo hepta pyridine) 聚肽、肽模拟化合物、法呢基化的肽模拟化合物、羰基哌嗪基化合物、羰基哌啶基化合物、法呢基衍生物和天然产物和衍生物。

下文给出 FPT 抑制剂化合物的实例和涉及这些化合物的文献。

稠环三环苯并环庚三烯并吡啶类: W095/10514 ; W095/10515 ; W095/10516 ; W096/30363 ; W096/30018 ; W096/30017 ; W096/30362 ; W096/31111 ;



W096/31478 ; W096/31477 ; W096/31505 ; W097/23478 ; 国际专利申请  
PCT/US97/17314(W098/15556) ; 国际专利申请 PCT/US97/15899(W098/11092) ; 国  
际专利申请 PCT/US97/15900(W098/11096) ; 国际专利申请  
PCT/US97/15801(W098/11106) ; 国际专利申请 PCT/US97/15902(W098/11097) ; 国  
际专利申请 PCT/US97/15903(W098/11098) ; 国际专利申请 PCT/US97/15904 ; 国际  
专利申请 PCT/US97/15905(W098/11099) ; 国际专利申请  
PCT/US97/15906(W098/11100) ; 国际专利申请 PCT/US97/15907(W098/11093) ; 国  
际专利申请 PCT/US97/19976(W098/11091) ; 美国专利申请 08/877049; 美国专利  
申请 08/877366; 美国专利申请 08/877399; 美国专利申请 08/877336; 美国专利申  
请 08/877269; 美国专利申请 08/877050; 美国专利申请 08/877052; 美国专利申请  
08/877051; 美国专利申请 08/877498; 美国专利申请 08/877057; 美国专利申请  
08/877739; 美国专利申请 08/877677; 美国专利申请 08/877741; 美国专利申请  
08/877743; 美国专利申请 08/877457; 美国专利申请 08/877673; 美国专利申请  
08/876570; 和美国专利申请 09/216398。

某些 FPT 抑制剂是低聚肽，特别是基于式  $\text{Cys-Xaa}_{1\text{</sub>}-\text{Xaa}_{2\text{</sub>}-\text{Xaa}_{3\text{</sub>}}$  的四肽或其衍生物，其中  $\text{Xaa}_{3\text{</sub>}$  代表丝氨酸、甲硫氨酸或谷氨酰胺残基，并且  $\text{Xaa}_{1\text{</sub>}$  和  $\text{Xaa}_{2\text{</sub>}$  可代表各种氨基酸残基，特别是那些具有脂肪族侧链的氨基酸残基。其衍生物可以具有或不具有三个肽键；因此发现，将肽键  $-\text{CO}-\text{NH}-$  还原为仲胺基或者甚至用碳原子替换肽链中的氮原子(前提条件是某些因素如分子的一般形状和末端分离大量地保存下来)获得通常比低聚肽更稳定的化合物并且，如果该化合物是有活性的，那么所获得的化合物具有更长久的活性。本文将所述这种化合物称作拟肽化合物。

低聚肽(主要是四肽，也可以是五肽)包括式  $\text{Cys-Xaa}_{1\text{</sub>}-\text{Xaa}_{2\text{</sub>}-\text{Xaa}_{3\text{</sub>}}$ 。 EPA 461, 489; EPA 520, 823; EPA 528, 486; 和 WO 95/11917。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/476102142025011001>