

一种治疗 PTEN 基因突变和/或缺失的胆管癌的方法

技术领域

本发明属于医药技术领域，涉及一种治疗癌症的方法，更具体的涉及蛋白酶体抑制剂及其体内活性成分用于制备治疗存在 PTEN 基因突变和/或缺失的胆管癌药物中的应用。

技术背景

胆管癌恶性程度高，进展快，临床就诊时多属晚期，且多已复发转移，可手术率低；常规放化疗对胆管癌的疗效非常有限，在其他肿瘤中已显示明确疗效的靶向治疗、免疫治疗等手段在胆管癌中的尝试也鲜见成功例子。王红阳院士课题组论文《PTEN status determines the chemosensitivity to proteasome inhibition in cholangiocarcinoma》中揭示：近 40%的胆管细胞癌存在重要的抑癌基因 PTEN 的缺失，该突变使蛋白酶体活性明显升高，直接影响肿瘤细胞的恶性行为。

泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-Proteasome Pathway, 简称 UPP)是细胞内蛋白质系统降解的主要途径，并参与许多生理上重要的细胞进程，包括信号转导，免疫应答，未折叠蛋白反应和细胞周期进展。这一途径与心脑血管疾病、癌症及神经系统退行性疾病的发病等都有着重要的关系。蛋白酶体抑制剂已被用于疾病，如癌症的治疗药物。

2003 年第一个蛋白酶体抑制剂硼替佐米(Bortezomib)获 FDA 批准上市，用于治疗复发性骨髓瘤。2004 年该药又被批准在欧盟上市，又用于多发性骨髓瘤。2005 年 9 月，该药由西安杨森引进，首次在我国广州上市。在 2007 年 7 月 11 日又被美国 FDA 批准用于治疗复发或难治性套细胞淋巴瘤(Mantle CellLymphoma, 简称 MCL)，成为目前唯一获 FDA 批准用于治疗 MCL 的药物。万珂在中国市场售价为每 3.5 毫克约 1 万三千元，治疗一个周期费用约 4 万元，如此昂贵的费用对于许多患者是非常沉重的经济负担。而且，目前的临床数据显示，这类药物也存在比较多的副作用，如疲劳乏力、恶心、腹泻以及神经病变等。

一些其他蛋白酶抑制剂也已被开发为药物或正在临床试验和测试阶段，它们包括 carfilzomib、ONX0912、CEP-18770 以及 MLN9708。MLN9708 是二代小分子蛋白酶体抑制剂，用于治疗多种人类恶性胶质瘤。和水溶液和血浆接触后，MLN9708 快速水解为 MLN2238。MLN2238 是 MLN9708 的生物活性形式。

MLN2238 是氮端加帽的二肽亮氨酸硼酸，抑制 20S 蛋白酶体的糜蛋白酶类($\beta 5$) 水解位点， IC_{50} 为 3.4nM， K_i 值为 0.93nM。MLN2238 是蛋白酶体的有效选择性可逆抑制剂，这种可逆性存在时间依赖性。但是，蛋白酶抑制剂由于在治疗实体瘤中存在药物分布问题，例如 Bortezomib 实体瘤患者的临床研究未能证明该药物的任何疗效 (Proteasome inhibitors in cancer therapy, Nat Rev Clin Oncol. 2017 Jul;14(7):417-433)，因此，开发出一种价格低廉、毒副作用低的高疗效蛋白酶体抑制剂药物，根据分子分型基于 PTEN 突变情况的胆管癌进行精准靶向治疗，并研究能够解决药物分布问题实现实体瘤药效是我们目前需要重点解决的问题。

发明内容

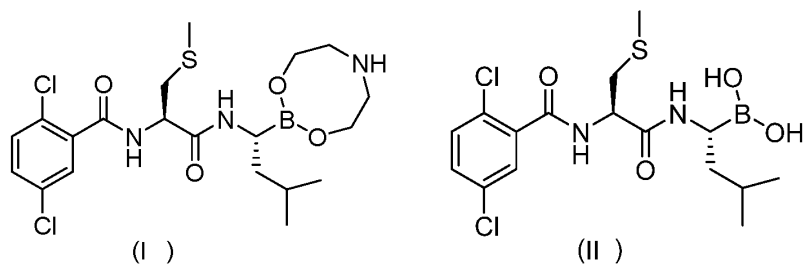
本发明的目的是，针对现有技术中的不足，提供式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐的新用途。

本发明的目的通过以下技术方案实现：

本发明提供治疗有效量的式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备治疗胆管癌药物中的应用，优选的所述胆管癌为存在 PTEN 基因突变和/或缺失的胆管癌。

本发明还提供一种治疗胆管癌的方法，将治疗有效量的式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐施于胆管癌患者，优选的所述胆管癌为存在 PTEN 基因突变和/或缺失的胆管癌。

本发明式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂结构如下：



在本申请的一些实施方案中，本发明所述的胆管癌包括肝内胆管癌、肝门部胆管癌或远端胆管癌。在一些实施方案中，所述胆管癌为肝内胆管癌。

本发明所述的胆管癌存在 PTEN 基因突变和/或缺失，其中 PTEN 基因突变和/或缺失，可以是 PTEN 基因转录和蛋白丰度减少，也可以为 PTEN 基因完全缺失。诊断 PTEN 基因是否存在突变和/或缺失可以是常用的基因诊断法。优选

的是在 PTEN 基因完全缺失的胆管癌中的应用。

本发明所述的胆管癌可以为处于不同时期的胆管癌，例如早期、中期、晚期或转移性胆管癌，或者为复发后的胆管癌。

本发明所述的应用具体是给予需要治疗的患者治疗有效量的式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐。具体的胆管癌治疗中式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐的剂量可以根据症状的严重程度、年龄、性别、体重、以及患者敏感性的差异、给药方式、给药时间、给药间隔、药物制剂类型等进行适宜地选择，例如可以是每天 1 μ g 到 20g，可以单日单次给药，也可以单日分多次，例如 2 次、3 次或 4 次给药。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的胆管癌患者可以是既往已接受过化疗、小分子靶向治疗和/或放疗后疾病发生进展；既往已接受的化疗可以为本领域常用的化疗方法，例如吉西他滨、5-氟尿嘧啶、紫杉醇、奥沙利铂、顺铂和/或替吉奥的治疗，小分子靶向治疗也可以为本领域的常用的小分子靶向治疗剂，例如舒尼替尼。

本发明式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐可通过多种途径给药，该途径包括但不限于口服、静脉、舌下、鼻内、吸入、皮下等；在一些具体的实例中，是通过口服或注射。适用于口服的制剂可以为本领域任何适用于口服的剂型，例如包括但不限于片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、滴丸、糊剂、散剂等，优选片剂或胶囊剂。所述的口服制剂可使用本领域公知的药学上可接受的载体通过常规方法制得。

本发明还提供一种治疗存在 PTEN 基因突变和/或缺失的胆管癌的药物组合物，其包含式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐，以及至少一种药学上可接受的载体。

本发明还提供如上式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备 20S 蛋白酶体 $\beta 5$ 亚基糜蛋白酶样抑制剂中的应用。

本发明还提供如上式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备 $\beta 1$ 亚基半胱天冬酶样抑制剂中的应用。

本发明还提供如上式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备 $\beta 2$ 亚基半胱天冬酶样抑制剂中的应用。

除非另有说明，为本申请的目的，本说明书和权利要求书中所用的下列术语应具有下述含义。

“患者”是指哺乳动物，优选人。

“药学上可接受的”是指其用于制备药物组合物，该药物组合物通常是安全、无毒的并且既不在生物学上或其它方面不合乎需要，并且包括其对于人类药物使用是可接受的。

“治疗有效量”意指化合物被给予人用于治疗疾病时，足以实现对该疾病控制的使用量。

“治疗”意指治疗上有效量的化合物的任何施用，并且包括：

(1) 抑制正经历或显示出所述疾病的病理学或症状学的人体中的该疾病(即，阻止所述病理学和/或症状学的进一步发展)，或

(2) 改善正经历或显示出所述疾病的病理学或症状学的人体中的该疾病(即逆转所述病理学和/或症状学)。

本发明提供的治疗胆管癌的方法，克服了现有蛋白酶抑制剂在治疗实体瘤中因药物分布问题导致的没有疗效的问题，对胆管癌尤其是 PTEN 基因突变和/或缺失导致的胆管癌患者，显示出良好的药效(抑瘤率接近 60%)。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步说明，根据本领域普通技术知识和惯用手段。以下实施例仅是本发明的部分优选实施例，不应当视为对本发明的限制，对本领域普通技术人员来说，在不脱离本发明的范围内，还可以做出若干改进，这些改进也应视为本发明的保护范围。

实施例 1：化合物 I 和化合物 II 体外抗肿瘤活性及作用机制研究

试验 1：化合物对 20S 蛋白酶体以及各亚型抑制

通过纯化的人 20S 蛋白酶体以及各亚基特异性荧光底物研究化合物 I、活性形式化合物 II 以及 MLN9708 对蛋白酶体不同亚基活性抑制作用，证明本发明化合物 I 能选择性地抑制 20S 蛋白酶体 $\beta 5$ 亚基糜蛋白酶样 (CT-L) 的活性， IC_{50} 为 2.22 ± 0.71 nM；对 $\beta 1$ 亚基半胱天冬酶样 (C-L) 抑制作用次之， IC_{50} 为 32.69 ± 7.93 nM；对 $\beta 2$ 亚基胰蛋白酶样 (T-L) 抑制作用最弱， IC_{50} 为 460.70 ± 170.06 nM；活性形式化合物 II 对 20S 蛋白酶体 3 个亚基 ($\beta 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$) 的抑制作用与

化合物 I 相当，IC₅₀ 分别为 2.61±0.75、24.27±0.34、410.03±137.95 nM；参比药物 MLN9708 对 20S 蛋白酶体 3 个亚基（β5、β1、β2）的抑制 IC₅₀ 分别为 8.07±2.47、48.25±12.21、>2000 nM；上述结果表明，化合物 II 与化合物 I 活性相当，均可选择性地抑制蛋白酶体 β5 亚基的活性，且抑制作用均强于参比药物 MLN9708，IC₅₀ 约低于 MLN9708 3.09-3.64 倍（如表 1 所示）。

表 1 化合物对 20S 蛋白酶体抑制 IC₅₀ 总结（n=3）

化合物	IC ₅₀ (nM, Mean±SD)		
	β1	β2	β5
化合物 I	32.69±7.93	460.70±170.06	2.22±0.71
化合物 II	24.27±0.34	410.03±137.95	2.61±0.75
MLN9708	48.25±12.21	>2000	8.07±2.47

试验 2：化合物对胆管癌细胞内蛋白酶体 CT-L 活性抑制

胆管癌细胞 RBE、HuCCT1、HCCC-9810 分别与化合物 I 和 MLN9708 孵育 1h 后，检测药物对细胞内 20S 蛋白酶体 β5 亚基糜蛋白酶样（CT-L）活性抑制作用。其中 RBE 细胞 PTEN 基因完整表达，HuCCT1 细胞 PTEN 基因转录和蛋白丰度减少（半合子缺失），而 HCCC-9810 细胞 PTEN 基因完全缺失（外显子 6~9 缺失）。

结果如表 2，化合物 I 和 MLN9708 对胆管癌细胞内 20S 蛋白酶体 CT-L 活性均有一定抑制作用。其中化合物 I 对三种细胞的抑制活性均显著优于 MLN9708，特别是对 PTEN 完全缺失型 HCCC-9810 细胞内 20S 蛋白酶体 CT-L 活性抑制作用最强，IC₅₀ 为 23.09nM，显著优于 MLN9708。

以上结果表明，化合物 I 可抑制胆管癌细胞内蛋白酶体 CT-L 的活性，抑制强度显著强于 MLN9708。

表 2 化合物对胆管癌细胞内蛋白酶体 CT-L 活性抑制 IC₅₀ 总结

细胞株	IC ₅₀ (nM)	
	化合物 I	MLN9708
RBE	28.93	49.40
HCCC-9810	23.09	55.62
HuCCT1	112.4	474.7

试验 3：化合物对胆管癌细胞增殖抑制

采用 CellTiter-Glo 检测试剂盒检测化合物 I 和 MLN9708 对胆管癌细胞增殖的影响。

如表 3 所示，化合物 I 对 HCCC-9810、HuCCT1、RBE 三种细胞均具有相对于 MLN9708 显著提高的抑制活性，特别是对 PTEN 完全缺失的胆管癌细胞具有选择性的更显著的增殖抑制活性，相比于 PTEN 完整表达的细胞，选择性约 1.7 倍。

表 3 化合物 I 和 MLN9708 对胆管癌细胞增殖抑制 IC₅₀ 总结 (n=3)

细胞株	PTEN 基因表达	IC ₅₀ (nM)	
		化合物 I	MLN9708
RBE	完整	10.08	128.7
HCCC-9810	完全缺失 (6~9 外显子缺失)	5.868	62.09
HuCCT1	部分缺失 (半合子缺失)	12.55	26.78

实施例 2 化合物药物分布研究

SD 大鼠 30 只，雌雄各半，体重 195 ~ 217 g，5 个采样时间点，每一时间组 6 只，灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I，采样时间点为给药前 0 h，给药后 5 min、1 h、4 h 和 24 h。

经 CO₂ 安乐死后，心脏穿刺采血至少 1.0 mL，EDTA-K₂ 抗凝，采集混匀后放置冰上。全血吸取 100 μL 的全血样品加至预先加有 200 μL 的 0.5%甲酸乙腈的 EP 管中，全血：0.5%甲酸乙腈 (v:v) =1:2，涡旋混匀。全血样本存放于超低温冰箱内。血液样本采集后（或剩余血液样本）于 30 min 之内离心分离血浆（离心条件：11000 rpm，5 分钟，2-8 °C）；吸取一定量的血浆样品加至预先加有 0.5% 甲酸乙腈的 EP 管中，血浆：0.5%甲酸乙腈 (v:v) =1:2（例如 100 μL 血浆+200 μL 0.5%甲酸乙腈），涡旋混匀。血浆样本存放于超低温冰箱内。

动物采集完血液样品后，采集脑、心、肝、脾、肺、肾；各组织用生理盐水分别冲洗，避免交叉污染，滤纸吸干，然后放入标记好的管子/自封袋中（一个组织一个管子/自封袋），样品在存放入超低温冰箱前临时放置在冰上。

用高速匀浆机彻底匀浆制成组织样品匀浆液后，采用 LC-MS/MS 法测定血浆、全血、组织匀浆液中的浓度。

结果：大鼠灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后，组织中化合物 II 的浓度见表 4 ~ 表 7；不同组织中化合物 II 的暴露量以及与血浆暴露量比较见表 8。

灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后，雄性和雌性大鼠各组织中化合物 II 暴露量的排列顺序为：脾>肝>肾脏>肺>心>全血>血浆>脑。根据结果可见，大鼠灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后，化合物 II 在靶器官肝脏中分布较多，肝脏组织暴露量是血浆暴露量的 36.9-51.0 倍，具有显著的临床应用价值。

表 4 大鼠灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后 5 min 化合物 II 在各组织中的浓度(ng/g 或 ng/mL)

组织	大鼠编号						雄性	雌性
	201M	202M	203M	204F	205F	206F	均值	均值
全血	BQL	24.0	3.48	55.5	18.9	21.75	13.7	32.1
大脑	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
心	BQL	6.91	BQL	20.9	8.27	8.81	NA	12.7
肾脏	9.15	8.01	BQL	29.4	7.81	23.4	8.58	20.2
肝	7.22	34.3	BQL	151	48.6	128	20.8	109
肺	BQL	15.1	BQL	64.0	15.3	28.7	NA	36.0
血浆	BQL	27.09	3.75	102.9	27.9	27.0	15.4	52.6
脾	BQL	BQL	BQL	25.2	7.10	7.73	NA	13.3

(BQL: 低于定量下限: 5.00 ng/g 或 0.300 ng/mL; NA: 不适用; /: 匀浆液不足或者无样品, 下同)

表 5 大鼠灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后 1 h 化合物 II 在各组织中的浓度 (ng/g 或 ng/mL)

组织	大鼠编号						雄性	雌性
	301M	302M	303M	304F	305F	306F	均值	均值
全血	12.24	35.1	42.6	24.81	12.45	21.99	30.0	19.8
脑	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
心	11.2	23.1	33.9	19.0	14.0	33.4	22.7	22.1
肾脏	33.9	90.8	116	75.7	56.8	89.8	80.2	74.1
肝	80.4	194	259	240	205	308	178	251
肺	19.5	48.8	46.7	40.3	33.3	70.4	38.3	48.0
血浆	7.92	20.97	20.97	8.49	7.80	12.54	16.6	9.61
脾	57.3	155	206	143	92.2	223	139	153

表 6 大鼠灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后 4 h 化合物 II 在各组织中的浓度 (ng/g 或 ng/mL)

组织	大鼠编号						雄性	雌性
	401M	402M	403M	404F	405F	406F	均值	均值
全血	29.1	36.9	34.8	55.2	26.16	34.2	33.6	38.5
脑	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
心	28.3	50.6	32.1	80.5	48.4	69.5	37.0	66.1
肾脏	104	160	111	217	133	172	125	174
肝	173	345	166	439	298	334	228	357
肺	52.4	132	63.5	213	163	175	82.6	184
血浆	3.51	4.98	3.60	8.58	3.96	5.28	4.03	5.94
脾	173	301	211	530	279	400	228	403

表 7 大鼠灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后 24 h 化合物 II 在各组织中的浓度 (ng/g 或 ng/mL)

组织	大鼠编号						雄性	雌性
	501M	502M	503M	504F	505F	506F	均值	均值
全血	69.3	26.31	55.8	35.7	59.7	83.1	50.5	59.5
脑	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
心	82.1	38.4	54.4	43.5	65.8	115	58.3	74.8
肾脏	213	105	215	121	263	231	178	205
肝	325	180	319	280	428	407	275	372
肺	102	61.0	118	80.7	116	180	93.7	126
血浆	9.27	3.93	7.32	3.54	5.73	5.94	6.84	5.07
脾	414	254	376	269	374	475	348	373

表 8 大鼠灌胃给予 0.6 mg/kg 化合物 I 后各组织和血浆中化合物 II 的暴露量 (AUC_{0-t}, ng·h/g 或 ng·h/mL)

组织	雄性大鼠		雌性大鼠		AUC 比值
	AUC	AUC 比值	AUC	AUC 比值	
	(ng·h/g 或 ng·h/mL)	(组织/血浆)	(ng·h/g 或 ng·h/mL)	(组织/血浆)	(雌性/雄性)

全血	957	6.17	1093	6.66	1.14
脑	*	NA	*	NA	NA
心	1056	6.81	1558	9.50	1.48
肾脏	3376	21.8	4206	25.6	1.25
肝	5727	36.9	8368	51.0	1.46
肺	1970	12.7	3480	21.2	1.77
血浆	155	1.00	164	1.00	1.06
脾	6385	41.2	8667	52.8	1.36

(*: 软件未计算出该药动学参数; NA: 不适用。)

实施例 3：化合物 I 体内抗肿瘤活性研究-人源胆管癌 CC6679 皮下异种移植 (PDX) 模型

本研究委托中美冠科生物技术 (北京) 有限公司进行。从 HuPrime® (https://www.crownbio.cn/wp-content/uploads/2023/01/Crownbio_HuPrime_Factsheet_CN.pdf) 胆管癌异种移植模型 CC6679 (PTEN 移码突变, p.N323KfsTer2) 荷瘤小鼠收取肿瘤组织, 切成直径为 2-3 mm 的瘤块接种于 Balb/c 裸小鼠右前肩胛处皮下。当荷瘤鼠平均肿瘤体积达到约 104.46 mm³ 时, 随机分组给药。化合物 I 给药剂量分别为 1.0 mg/kg、1.2 mg/kg 和 1.0/1.5 mg/kg (第一周给予 1.0 mg/kg, 而后两周给予 1.5 mg/kg)。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式: 肿瘤体积 (mm³) = 1/2 × (a × b²) (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

实验结果如表 9 所示, 化合物 I (1.0、1.2、1.0/1.5 mg/kg, i.g., BIW, D1-19) 剂量依赖性地抑制裸小鼠皮下移植瘤的生长, 抑瘤率分别为 38.32%、39.63%、52.32%, 可见化合物 I 对 PTEN 基因突变和/或缺失的胆管癌具有良好的治疗效果, 尤其化合物 I 第一周给予 1.0 mg/kg, 而后两周给予 1.5 mg/kg 抑瘤率接近 60%。

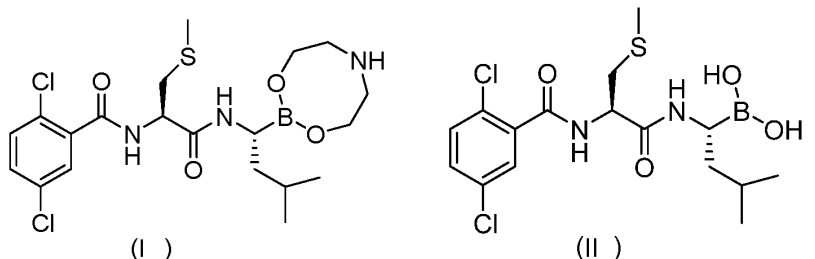
表 9 化合物 I 体内抗肿瘤药效总结

给药	剂量 (mg/kg)	Day 19			
		肿瘤体积(mean ± SEM)	ΔT/ΔC (%)	TGI (%)	p Value
溶媒对照	--	677±109.41	-	-	-
化合物 I	1.0	457.58±72.68	61.68	38.32%	0.301
化合物 I	1.2	450.11±92.95	60.37	39.63%	0.272
化合物 I	1.0/1.5	377.44±88.94	47.68	52.32%	0.104

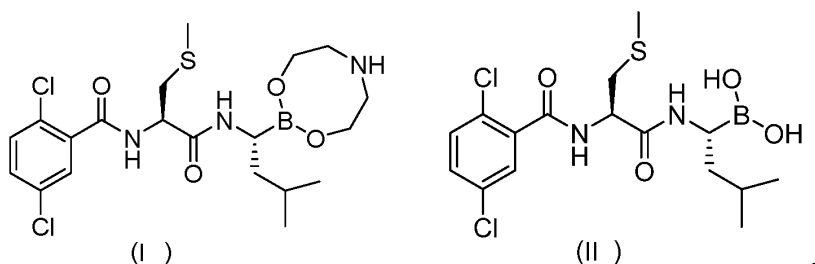
注：TGI: $1 - (T_i - T_0) / (C_i - C_0) \times 100\%$ 。因为 Bartlett 检验值为 >0.05 ，且 Kruskal Wallis 检验值 >0.05 ，Dunnett's test 检验用于进行所有组之间两两比较；p value 由绝对肿瘤体积计算得出。

权 利 要 求 书

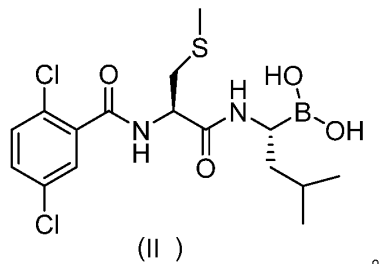
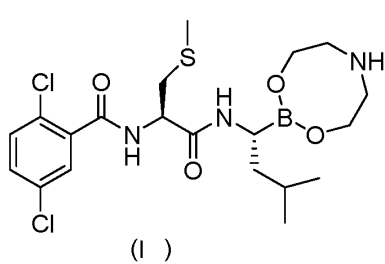
1. 式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备治疗癌症药物中的应用，所述癌症为存在 PTEN 基因突变和/或缺失的胆管癌；



2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述胆管癌为肝门部胆管癌、肝内胆管癌或远端胆管癌。
3. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述胆管癌为肝内胆管癌。
4. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述 PTEN 基因突变和/或缺失，为 PTEN 基因转录和蛋白丰度减少，或者为 PTEN 基因完全缺失。
5. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述 PTEN 基因突变和/或缺失为 PTEN 基因完全缺失。
6. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述胆管癌为早期、中期、晚期或转移性胆管癌，或者为复发后的胆管癌。
7. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐的给药途径为口服、静脉、舌下、鼻内、吸入或皮下；优选为口服或注射，更优选为口服。
8. 式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备 20S 蛋白酶体 $\beta 5$ 亚基糜蛋白酶样抑制剂中的应用；



9. 式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备 $\beta 1$ 亚基半胱天冬酶样抑制剂中的应用；



10. 式(I)或式(II)所示的蛋白酶体抑制剂或其药学上可接受的盐在制备β2-亚基半胱天冬酶样抑制剂中的应用；

