



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107405348 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201580073526.5

(72) 发明人 V·博泽恩 K·M·加尔文

(22) 申请日 2015.12.22

R·L·布雷克 Q·徐 K·卡纳安

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

申请公布号 CN 107405348 A

(43) 申请公布日 2017.11.28

(51) Int.CI.

A61K 31/505 (2006.01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

62/096,020 2014.12.23 US

CN 102300854 A, 2011.12.28

62/242,629 2015.10.16 US

U.S.National Library of Medicine.A

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Phase 1B Study of MLN2480 in Combination

2017.07.14

With MLN0128 or Alisertib, or Paclitaxel,

(86) PCT国际申请的申请数据

or Cetuximab, or Irinotecan in Adult

PCT/US2015/067462 2015.12.22

Participants With Advanced Nonhematologic

(87) PCT国际申请的公布数据

Malignancies.《http://clinicaltrials.gov/

W02016/106359 EN 2016.06.30

ct2/show/nct02327169》.2014, 第1-13页.

(73) 专利权人 点疗法-1公司

审查员 高昶

地址 美国加利福尼亚州

权利要求书1页 说明书31页

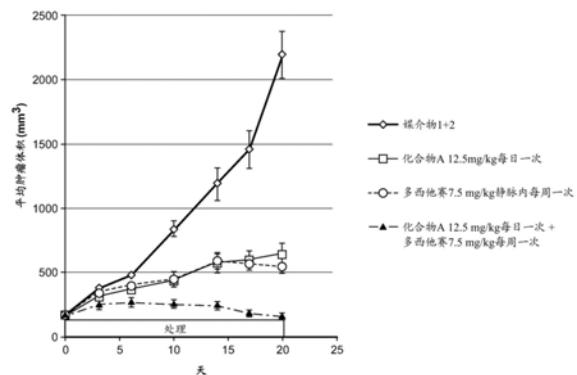
序列表12页 附图4页

(54) 发明名称

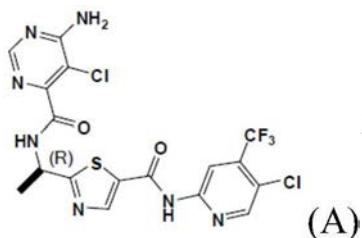
RAF抑制剂与紫杉烷的组合

(57) 摘要

本公开涉及用于治疗癌症的方法。具体地说，本公开提供用于通过施用Raf抑制剂与紫杉烷的组合治疗癌症的方法。本公开涉及治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用：(i) Raf激酶抑制剂或其药学上可接受的盐；以及(ii) 紫杉烷或其药学上可接受的盐；所述Raf激酶抑制剂和紫杉烷或其药学上可接受的盐的量是使得其组合在所述癌症的治疗中是治疗上有效的。



1. 化合物A:

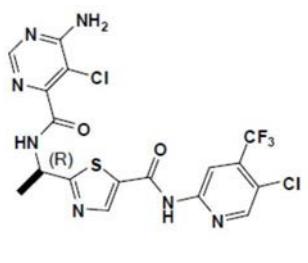


或其药学上可接受的盐在制备用于与多西他赛或其药学上

可接受的盐组合治疗具有K-Ras突变、N-Ras突变或所述两种突变的癌症的药物中的用途。

2. 如权利要求1所述的用途，

(i) 化合物A:



或其药学上可接受的盐；以及

(ii) 多西他赛或其药学上可接受的盐；

用于制备用于治疗具有K-Ras突变、N-Ras突变或所述两种突变的癌症的药物。

3. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述多西他赛或其药学上可接受的盐是多西他赛。

4. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述癌症选自皮肤癌、眼癌、胃肠癌、甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、中枢神经系统癌症、喉癌、子宫颈癌、淋巴系统癌症、泌尿生殖道癌症、骨癌、胆道癌、子宫内膜癌、肝癌、肺癌以及前列腺癌。

5. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述癌症是结肠癌。

6. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述癌症是非小细胞肺癌。

7. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述癌症是肺癌。

8. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述癌症是K-Ras突变阳性癌症。

9. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述癌症是K-Ras外显子2突变阳性癌症。

10. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述癌症是B-Raf突变阳性癌症。

11. 如权利要求10所述的用途，其中所述癌症是非V600 B-Raf突变阳性癌症。

12. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述药物配制用于以每剂量达600mg化合物A或其药学上可接受的盐的量每周一次(QW)施用，在每次施用之间具有6天休息期。

13. 如权利要求12所述的用途，其中所述药物配制用于以每剂量400mg至600mg化合物A或其药学上可接受的盐的量施用。

14. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述药物配制用于按28天周期施用。

15. 如权利要求1或2所述的用途，其中所述药物配制用于以每剂量达200mg化合物A或其药学上可接受的盐的量施用。

RAF抑制剂与紫杉烷的组合

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年12月23日提交的美国临时专利申请号62/096,064和2015年10月16日提交的美国临时专利申请号62/242,629的优先权。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,其以电子可读格式同此提交。电子序列表文件于2015年10月16日创建,名称为sequencelisting.txt,且大小为30kb。电子sequencelisting.txt文件中的序列表的全部内容以引用的方式并入本文。

[0005] 本公开涉及用于治疗癌症的方法。具体地说,本公开提供用于通过施用Raf抑制剂与紫杉烷的组合治疗癌症的方法。

[0006] 在2012年,世界各地估计存在1410万例癌症病例。到2035年,这一数字预计增加至2400万。癌症仍然是美国第二大常见死因,占死亡人数的接近四分之一。在2014年,在美国将存在预计1,665,540例诊断的新癌症病理和585,720例癌症死亡。虽然医学进步已经提高了癌症存活率,但对于新的和更有效的治疗存在持续需要。

[0007] 癌症的特征在于不受控制的细胞繁殖。由于其在细胞分裂周期中的重要作用,已经将抗有丝分裂剂和抗微管剂作为癌症治疗的靶标进行了探索。有丝分裂机制的抑制导致一系列不同的结果,从而主要导致细胞死亡或阻滞。

[0008] 由于抗有丝分裂剂的作用不限于单独癌细胞,因此这些药物在临床环境中的剂量限制性毒性通常表现为快速分裂的组织,并且在抗微管剂的情况下常常伴有严重的周围神经病变。传统的抗有丝分裂剂包括直接干扰微管动力学的那些,有丝分裂纺锤体组装以及DNA随后配对和分离成子代细胞所必需的那些。抗微管剂,如紫杉烷类目前正用于临床环境中。例如,紫杉醇和多西他赛具有类似的临床活动范围,包括卵巢癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌和前列腺癌。

[0009] 紫杉烷通过改变微管解聚的动力学来稳定微管。在培养物中生长的哺乳动物细胞中,高浓度的紫杉醇导致聚集的微管的化稳定。在类似于在临床环境中实现的暴露的较低浓度下,紫杉醇的主要作用是稳定微管,且由此阻抑微管的动力不稳定,这是有效纺锤体组装所必需的。由于这种阻抑,微管不能快速生长和收缩,并且它们在有丝分裂期间结合的能力受到损害。因此,有效的染色体配对受到影响,并且染色体配对的这种失败导致通过纺锤体组装检查点介导的有丝分裂延迟。

[0010] 众所周知,抗有丝分裂化合物损害细胞执行成功分裂的能力。细胞将不能在直接导致细胞死亡的长时间有丝分裂阻滞的情况下分裂,或者它们分裂异常,DNA分布不均匀。在这种不成功的分裂之后,细胞可继续循环或经历细胞周期阻滞或死亡。

[0011] 与紫杉醇和多西他赛相关的毒性相似,并且包括中性粒细胞减少作为主要的剂量限制性毒性,连同显著周围神经病变。事实上,剂量减少在重度预先治疗的患者中是频繁的,以减轻这些毒性的严重性。

[0012] 蛋白激酶在细胞繁殖过程中也起关键作用。具体地说,有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号传导途径由激酶级联组成,所述激酶级联将细胞外信号中继至细胞核以调控基

因表达和关键细胞功能。由Ras/Raf/MEK/ERK信号传导途径控制的基因表达调控基本细胞过程,包括增殖、分化、细胞凋亡和血管生成。Ras/Raf/MEK/ERK信号传导的这些不同作用在各种类型的癌症中异常活化。此途径内的基因突变可能产生组成型活性蛋白,从而导致增加的细胞增殖和对细胞凋亡的抗性。

[0013] Raf(丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶)由基因家族编码,所述基因家族由提供三个Raf同种型成员(B-Raf、C-Raf(Raf-1)和A-Raf)的三种基因组成。这些蛋白质中的每一种在羧基末端共享高度保守的氨基末端调控区和催化结构域。虽然每种同种型均在Ras/Raf/MEK/ERK途径中起作用,但B-Raf已被证明是MEK的主要活化剂。B-Raf由Ras:GTP募集至B-Raf变得活化的细胞内细胞膜。进而,B-Raf负责活化MEK1/2,并且MEK1/2活化ERK1/ERK2。B-Raf基因的突变允许B-Raf独立于上游信号进行信号传导。结果,突变的B-Raf蛋白(如V600E)引起MEK和ERK的过度下游信号传导。这导致过度细胞增殖和存活以及瘤形成。通过突变的B-Raf过度活化信号传导级联已经牵涉于多种恶性肿瘤中。事实上,B-Raf特异性抑制剂(如威罗菲尼)显示对于治疗表达突变型B-Raf V600E的黑色素瘤的希望,然而抗性疾病的出现受到越来越多的关注。

[0014] 因此,如果能够开发更有效的治疗方案则将是有益的。与Raf抑制剂的组合可能有助于治疗癌症并且甚至可能潜在克服对特定抗癌剂的抗性,所述Raf抑制剂抑制除B-Raf V600E突变外的更多Raf蛋白同种型。鉴于参与信号转导途径和细胞分裂周期的蛋白激酶的重要性,Raf抑制剂与紫杉烷的组合可能是特别有效的。Raf抑制剂与紫杉烷的组合可具有相加或甚至协同的治疗作用。因此,需要新的癌症治疗方案,包括组合疗法。

发明概要

[0015] 本公开涉及治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

[0016] (i) Raf激酶抑制剂或其药学上可接受的盐;以及

[0017] (ii) 紫杉烷或其药学上可接受的盐;所述Raf激酶抑制剂和紫杉烷或其药学上可接受的盐的量是使得其组合在所述癌症的治疗中是治疗上有效的。

[0018] 在一些实施方案中,Raf激酶抑制剂不止抑制Raf蛋白的B-RafV600同种型。在一些实施方案中,Raf抑制剂是化合物A或化合物B。在一些实施方案中,紫杉烷是紫杉醇、多西他赛或Abraxane®或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,紫杉烷是紫杉醇或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,癌症是K-Ras外显子2突变阳性癌症。在一些实施方案中,癌症是B-Raf突变阳性癌症。在一些实施方案中,癌症是非V600B-Raf突变阳性癌症。在一些实施方案中,癌症是皮肤癌、眼癌、胃肠癌、甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、中枢神经系统癌症、喉癌、子宫颈癌、淋巴系统癌症、泌尿生殖道癌症、骨癌、胆道癌、子宫内膜癌、子宫癌、肝癌、肺癌、前列腺癌或结肠癌。

[0019] 本公开涉及治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

[0020] (i) 化合物A或其药学上可接受的盐;以及

[0021] (ii) 紫杉醇或多西他赛或其药学上可接受的盐;所述化合物A和紫杉醇或多西他赛或其药学上可接受的盐的量是使得其组合在所述癌症的治疗中是治疗上有效的。

[0022] 在一些实施方案中,癌症是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,非小细胞肺癌是K-Ras突变阳性癌症。在一些实施方案中,癌症是K-Ras外显子2突变阳性癌症。在一些实施方

案中,非小细胞肺癌是B-Raf突变阳性癌症。在一些实施方案中,癌症是非V600B-Raf突变阳性癌症。在一些实施方案中,化合物A或其药学上可接受的盐以每剂量达600mg的量每周一次(QW)施用,在每次施用之间具有6天休息期。在一些实施方案中,化合物A或其药学上可接受的盐以每剂量约400mg至约600mg的量每周一次施用,并且紫杉烷是以每剂量约70mg/m²至约90mg/m²的量施用的紫杉醇或其药学上可接受的盐。

[0023] 本公开涉及一种药物组合物,其包含:

[0024] (i) Raf激酶抑制剂或其药学上可接受的盐;以及

[0025] (ii) 紫杉烷或其药学上可接受的盐;所述Raf激酶抑制剂和紫杉烷或其药学上可接受的盐的量是使得其组合对于延长应答的持续时间而言是有效的。

[0026] 在一些实施方案中,Raf激酶抑制剂是化合物A或化合物B。

[0027] 附图简述

[0028] 图1是示出用作为单一药剂或组合的媒介物、化合物A(12.5mg/kg,QD)或多西他赛给药的携带SK-MEL-2人黑色素瘤异种移植物的雌性无胸腺NCr-nu/nu小鼠中随时间推移的平均肿瘤体积的图。

[0029] 图2是示出用作为单一药剂或组合的媒介物、化合物A(50mg/kg,BIW)或多西他赛给药的携带SK-MEL-2人黑色素瘤异种移植物的雌性无胸腺NCr-nu/nu小鼠中随时间推移的平均肿瘤体积的图。

[0030] 图3是示出用作为单一药剂或组合的化合物A(12.5mg/kg,QD)或泰索帝给药的Calu-6肺癌模型(KRAS突变体Q^{61K})中随时间推移的平均肿瘤体积的图。

[0031] 图4是示出用作为单一药剂或组合的化合物A(50mg/kg,Q3D)或泰索帝给药的Calu-6肺癌模型(KRAS突变体Q^{61K})中随时间推移的平均肿瘤体积的图。

[0032] 发明描述

[0033] 本公开提供用于治疗癌症的新的组合疗法。具体地说,本公开提供一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用:(i)第一组合物,其包含Raf抑制剂或其药学上可接受的盐作为活性剂;和(ii)第二组合物,其包含紫杉烷或其药学上可接受的盐作为活性剂;所述活性剂的量是使得其组合在癌症的治疗中是治疗上有效的。

[0034] 除非另外指明,否则本文使用的术语应以下定义的含义。

[0035] 如本文所用,术语“Raf激酶”是指丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶家族中的任一种。所述家族由三个同种型成员(B-Raf、C-Raf(Raf-1)和A-Raf)组成。Raf蛋白激酶参与由激酶级联组成的MAPK信号传导途径,所述激酶级联将细胞外信号中继至细胞核以调控基因表达和关键细胞功能。除非上下文另外指明,否则术语“Raf激酶”是指来自任何物种的任何Raf激酶蛋白质,包括但不限于。一方面,Raf激酶是人Raf激酶。

[0036] 术语“Raf抑制剂”或“Raf的抑制剂”用于表示能够与丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶Raf的一个或多个同种型成员(B-Raf、C-Raf(Raf-1)和/A-Raf)(包括突变体形式)相互作用的化合物。Raf突变体形式的一些实例包括但不限于B-Raf V600E、B-Raf V600D、B-Raf V600K、B-Raf V600E+T5291和/或B-Raf V600E+G468A。

[0037] 在一些实施方案中,Raf激酶被抑制至少约50%,被抑制至少约75%,被抑制至少约90%,被抑制至少约95%,被抑制至少约98%或被抑制至少约99%。在一些实施方案中,使Raf激酶活性降低50%所需的Raf激酶抑制剂的浓度是小于约1μM、小于约500nM、小于约

100nM、小于约50nM、小于约25nM、小于约10nM、小于约5nM或小于约1nM。

[0038] 在一些实施方案中,这种抑制对一种或多种Raf同种型有选择性,即Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、突变型B-Raf、A-Raf和C-Raf激酶中的一种或多种有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、B-Raf V600E、A-Raf和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、B-Raf V600E、A-Raf和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、B-Raf V600D、A-Raf和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、B-Raf V600K和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂不止对B-Raf V600有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂不止对B-Raf V600E有选择性。

[0039] 在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf和C-Raf激酶有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、B-Raf V600E和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、B-Raf V600D和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf (野生型)、B-Raf V600K和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf V600E有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf V600D有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf V600K有选择性。

[0040] 术语“泛-Raf抑制剂”是不止抑制Raf蛋白的B-Raf V600同种型的Raf抑制剂。

[0041] 如本文所用,术语“紫杉烷”是指由紫衫 (Taxus/yew) 属植物产生的一类双萜。紫杉烷的实例包括但不限于紫杉醇 (TAXOL®)、多西他赛 (TAXOTERE®) 和 ABRAZAXANE® (紫杉醇注射液)。

[0042] 本文使用术语“约”意指大致地、在...范围内、粗略地或在...左右。当结合数值范围来使用术语“约”时,它通过扩展到在所列举数值以上和以下的界限来改变所述范围。通常,本文使用术语“约”来使一个数值改变到所指出的值以上和以下的10%偏差值。

[0043] 如本文所用,术语“包含”是指“包括,但不限于”。

[0044] 如本文所用,术语“治疗 (treatment)”、“治疗 (treat)”和“治疗 (treating)”意在包括受试者所患的癌症的全部干预措施,如施用所述组合以缓解、减缓、终止或逆转所述癌症的一种或多种症状并且延迟所述癌症的进展,即使所述癌症实际上未被消除。治疗可包括例如症状的严重程度、症状的数量或复发频率的降低,例如抑制肿瘤生长、阻滞肿瘤生长或已经存在的肿瘤的消退。

[0045] 如本文中用于指组合疗法的术语“治疗有效量”是指一起服用以使得组合作用引发所需的生物或药物反应(即,破坏靶癌细胞或减缓或阻滞受试者的癌症进展)的药剂的组合的量。例如,如本文中用于指组合疗法的“治疗有效量”将是当在治疗周期期间的相同或不同日期一起施用(顺序或同时)时具有有益的组合作用的Raf抑制剂的量和紫杉烷的量。在一些实施方案中,组合作用是相加的。在一些实施方案中,组合作用是协同的。此外,本领域的技术人员将认识到,在具有治疗有效量的组合疗法的情况下,如在上述实例中,Raf抑制剂的量和/或紫杉烷的量单独地可以是或可以不是治疗有效的。

[0046] 关于药剂对细胞的作用的“细胞毒性作用”是指杀死细胞。“细胞生长抑制作用”是指抑制细胞增殖。“细胞毒性剂”是指对细胞具有细胞毒性或细胞生长抑制作用、从而分别消减细胞群体内的细胞或抑制细胞群体内的细胞的生长的药剂。

[0047] 在一些实施方案中,与非接触细胞的生长相比,与Raf抑制剂和紫杉烷接触的细胞的生长被抑制至少约50%。在一些实施方案中,与非接触细胞相比,接触细胞的细胞增殖被抑制至少约75%、至少约90%或至少约95%。在一些实施方案中,短语“抑制细胞增殖”包括与非接触细胞相比,接触细胞的数目减少。因此,抑制接触细胞中的细胞增殖的Raf抑制剂和紫杉烷可诱导所述接触细胞经历生长迟缓、经历生长停滞、经历程序性细胞死亡(即,细胞凋亡)或经历坏死性细胞死亡。

[0048] 如本文所用的术语“受试者”是指哺乳动物,并且“哺乳动物”包括但不限于人。在一些实施方案中,在根据本公开的方法开始治疗之前,已经用药剂(例如,Raf抑制剂或紫杉烷)治疗了受试者。在一些实施方案中,受试者处于发展或经历癌症复发的风险中。

[0049] 除非另外说明,否则本文所描绘的结构意在包括不同之处仅在于存在一个或多个同位素富集的原子的化合物。例如,具有本发明的结构(除了氢原子被氘或氚置换或碳原子被富含¹³C-或¹⁴C的碳置换外)的化合物在本公开的范围内。

[0050] 将对本领域的技术人员显而易见的是,本文描述的某些化合物可以互变异构体形式存在,所述化合物的所有此类互变异构体形式在本公开的范围内。除非另外说明,否则本文所描绘的结构还意在包括所述结构的所有立体化学形式;即,每个不对称中心的R和S构型。因此,本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构体和非对映异构体混合物在本公开的范围内。

[0051] 可在本公开的方法中使用能够抑制Raf激酶的活性的化合物。在一些实施方案中,Raf抑制剂抑制除B-Raf V600外的更多Raf激酶蛋白同种型。在一些实施方案中,Raf抑制剂抑制除B-Raf V600E外的更多RAf激酶蛋白同种型。在一些实施方案中,Raf抑制剂抑制B-Raf(野生型)、突变型B-Raf、A-Raf和C-Raf。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf(野生型)、B-Raf V600E、A-Raf和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf(野生型)、B-Raf V600D、A-Raf和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf(野生型)、B-Raf V600K和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf(野生型)、B-Raf V600E和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf(野生型)、B-Raf V600D和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对B-Raf(野生型)、B-Raf V600K和C-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf V600E有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf V600D有选择性。在一些实施方案中,Raf抑制剂对突变型B-Raf V600K有选择性。

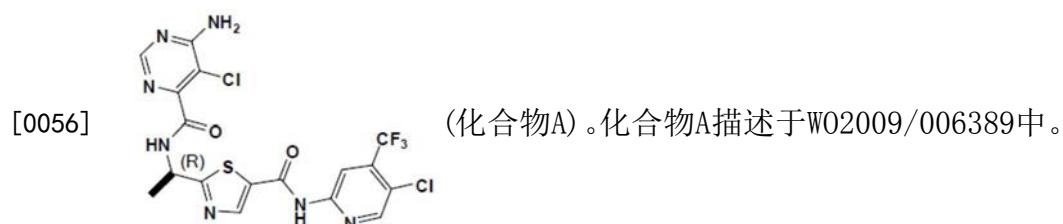
[0052] 具体地说,Raf抑制剂包括本文所述的化合物,以及在例如WO 2006/065703、WO 2010/064722、WO 2011/117381、WO 2011/090738、WO 2011/161216、WO 2011/097526、WO 2011/025927、WO 2011/023773、WO 2011/147764、WO 2011/079133和WO 2011/063159中公开的化合物。B-Raf特异性抑制剂包括威罗菲尼(Roche)、达拉菲尼(GSK)和encoratinib(Novatis)。这些化合物中任一种的溶剂化形式和水合形式也适用于本公开的方法中。所述化合物中任一种的药学上可接受的盐以及此类盐的溶剂化形式和水合形式也适用于本公开的方法中。这些Raf抑制剂可以有机合成领域中的技术人员所熟知的多种方式制备,包括但不限于上述参考文献中详细描述的合成方法。

[0053] 在一些实施方案中,Raf抑制剂是抑制除B-Raf V600外的更多Raf激酶蛋白同种型

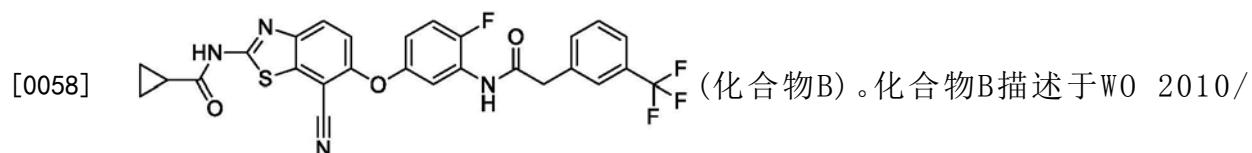
的化合物。具体地说,抑制除B-Raf V600外的更多Raf激酶蛋白同种型的Raf激酶抑制剂包括例如,在WO 2009/006389和US 2013/0252977 (DP-4978/LY3009120) 中公开的化合物,并且包括但不限于化合物RAF-265、ARQ-736、CEP-32496、CCT 196969、CCT 241161以及REDX-04988

[0054] 可在体外或体内测定Raf抑制剂结合和/或抑制Raf激酶的能力。体外测定包括测量Raf激酶对MEK的磷酸化作为定量化合物抑制Raf激酶的酶活性的能力的方法的生物化学FRET测定。还可以测定所述化合物影响由Raf激酶活性介导的细胞或生理功能的能力。例如,体外测定定量癌细胞中磷-ERK的量。这些活性中的每一种的测定是本领域中已知的。

[0055] 在一些实施方案中,Raf抑制剂是(R)-2-(1-(6-氨基-5-氯嘧啶-4-甲酰胺)乙基)-N-(5-氯-4-(三氟甲基)吡啶-2-基)噻唑-5-甲酰胺(化合物A)或其药学上可接受的盐:



[0057] 在一些实施方案中,Raf抑制剂是N-[7-氰基-6-[4-氟-3-([3-(三氟甲基)苯基]乙酰基)氨基]苯氧基]-1,3-苯并噻唑-2-基]环丙烷甲酰胺(化合物B)或其药学上可接受的盐;



可抑制除B-Raf V600外的更多Raf激酶蛋白同种型的Raf抑制剂如化合物A和化合物B具有抑制Raf单体和二聚体介导的信号传导的能力,这是区分这些Raf抑制剂与最近批准的B-Raf特异性抑制剂(威罗菲尼和达拉菲尼)的关键特性。

[0059] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指在合理医学判断的范围内,适合用于与人和低等动物的组织接触而无不适当的毒性、刺激、过敏反应等并且与合理的益处/风险比相称的那些盐。“药学上可接受的盐”是指在施用于接受者之后能够直接或间接地提供本发明化合物或其活性代谢物或残余物的本文公开的化合物的任何无毒的盐。

[0060] 药学上可接受的盐在本领域中是熟知的。例如,S. M. Berge 等人在J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19中详细描述了药学上可接受的盐;所述文献以引用的方式并入本文。本文所述的化合物的药学上可接受的盐包括由合适的无机和有机酸和碱所衍生的那些盐。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例是氨基与无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸以及高氯酸)或与有机酸(如乙酸、草酸、顺丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)形成的盐,或通过使用本领域中所用的其他方法(如离子交换法)形成的盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基

硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。衍生自适当的碱的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐以及N⁺(C₁₋₄烷基)₄盐。本公开还设想任何碱性含氮基团的季铵化。可通过这种季铵化获得水溶性的或油溶性的或可分散的产物。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。其他药学上可接受的盐包括，在适当时，使用抗衡离子如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根以及芳基磺酸根形成的无毒的铵、季铵和胺阳离子。

[0061] 为由紫杉(Taxus/yew)属植物植物产生的二萜类的化合物可由本公开中描述的方法使用。具体地说，紫杉烷包括但不限于本文描述的化合物、紫杉醇(TAXOL®)、多西他赛(TAXOTERE®)和 ABRAXANE®(蛋白质结合的紫杉醇注射液)。在一些实施方案中，紫杉烷是紫杉醇或多西他赛，或紫杉醇或多西他赛的药学上可接受的盐。在一些实施方案中，紫杉烷是紫杉醇或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，紫杉烷是多西他赛或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，紫杉烷是紫杉醇。在一些实施方案中，紫杉烷是多西他赛。

[0062] 另一方面，本公开提供一种药物组合物，其包含i) Raf抑制剂和ii) 紫杉烷。本公开提供用于治疗癌症的新的组合疗法。具体地说，本公开提供一种治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用：(i) 第一组合物，其包含Raf抑制剂或其药学上可接受的盐作为活性剂；和(ii) 第二组合物，其包含紫杉烷或其药学上可接受的盐作为活性剂；所述活性剂的量是使得其组合在癌症的治疗中是治疗上有效的。在一些实施方案中，Raf抑制剂是化合物A，并且紫杉烷是紫杉醇或多西他赛。在一些实施方案中，Raf抑制剂是化合物B，并且紫杉烷是紫杉醇或多西他赛。

[0063] 在一些实施方案中，癌症是实体肿瘤。在一些实施方案中，癌症是血液恶性肿瘤。在一些实施方案中，癌症复发性的。一方面，复发性癌症是在不可检测到癌症的一段时间之后复发的癌症。

[0064] 在一些实施方案中，癌症是难治性的。一方面，难治性癌症对癌症治疗无反应；它也被称为抗性癌症。在一些实施方案中，肿瘤是不可切除的。一方面，不可切除的肿瘤不能通过外科手术移除。在一些实施方案中，癌症先前尚未进行治疗。在一些实施方案中，癌症是局部晚期的。一方面，“局部晚期”是指比较广泛但仍局限在一个区域的癌症。在一些情况下，“局部晚期”可以指尚未扩散但已侵入附近器官或组织而使其难以用单独外科手术移除的小肿瘤。在一些实施方案中，癌症是转移性的。一方面，转移性癌症是从其开始的身体部位(主要部位)扩散到身体其他部位的癌症。

[0065] 在一些实施方案中，癌症是B-Raf、N-Ras和/或K-Ras阳性癌症。

[0066] 如本文所用，“BRAF”或“B-Raf”是指B-Raf原癌基因丝氨酸/苏氨酸激酶，与指定为NM_004333, SEQ ID N0:1(开放阅读框是SEQ ID N0:2, SEQ ID N0:1的核苷酸62至2362)的mRNA序列相关的基因，所述mRNA序列编码GenPept登录号NP_004324, SEQ ID N0:3)。B-Raf的其他名称包括rafB1和努南综合征7(NS7)。B-Raf充当丝氨酸/苏氨酸激酶，在调控MAP激酶/ERK信号传导路径中起作用且可在染色体7q上发现。

[0067] 如本文所用,“KRAS”或“K-Ras”是指v-Ki-ras2Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物,与指定为GenBank登录号NM_004985,SEQ ID N0:4(开放阅读框是SEQ ID N0:5,SEQ ID N0:4的核苷酸193至759)的mRNA序列相关的基因,所述mRNA序列编码NP_004976,SEQ ID N0:6(染色体12上的K-Ras基因的主要转录物变体)。K-Ras的其他名称包括KRAS2和努南综合征3(NS3)。K-Ras充当具有GTP酶活性的致癌基因且可在染色体12上发现。K-Ras与细胞膜和各种效应蛋白(如Akt和Cdc42)相互作用,所述效应蛋白通过细胞骨架和对细胞能动性的作用执行其信号传导功能(Fotiadou等人(2007)Mol.Cel.Biol.27:6742-6755)。

[0068] 如本文所用,“NRAS”或“N-Ras”是指成神经细胞瘤RAS病毒(v-ras)致癌基因同源物,与指定为GenBank登录号NM_002524,SEQ ID N0:7(开放阅读框是SEQ ID N0:8,SEQ ID N0:7的核苷酸255至824)的mRNA序列相关的基因,所述mRNA序列编码GenPept登录号NP_002515,SEQ ID N0:9)。N-Ras的其他名称包括IV型自身免疫性淋巴细胞增生综合征(ALPS4)、NRAS1和努南综合征6(NS6)。N-Ras充当具有GTP酶活性的致癌基因且可在染色体1p上发现。N-Ras与细胞膜和各种效应蛋白(如Raf和RhoA)相互作用,所述效应蛋白通过细胞骨架和对细胞粘附的作用执行其信号传导功能(Fotiadou等人(2007)Mol.Cel.Biol.27:6742-6755)。

[0069] 本公开中的组合可用于治疗高的未满足医疗需求的癌症。在一些实施方案中,所述组合用于治疗遗传学定义的癌症子集。在一些实施方案中,癌症是B-Raf突变阳性癌症(即,癌症具有一种或多种B-Raf突变)。在一些实施方案中,B-Raf突变是在外显子11或15中。在一些实施方案中,B-Raf突变是在密码子466、469、594、600或601中。在一些实施方案中,B-Raf突变是在密码子600中。在一些实施方案中,B-Raf突变包括但不限于V600E、V600D或V600K突变。在一些实施方案中,B-Raf突变是V600E。在一些实施方案中,B-Raf突变是V600D。在一些实施方案中,B-Raf突变是V600K。在一些实施方案中,B-Raf突变是V600E+T529I。在一些实施方案中,B-Raf突变是V600E+G468A。“V600E突变”是指在氨基酸位置600处用谷氨酸取代缬氨酸。T529I是苏氨酸至异亮氨酸B-Raf守门员突变,并且G468A是外显子11中G1403C处的B-Raf二级突变。“V600K突变”是指在氨基酸位置600处用赖氨酸取代缬氨酸。“V600D突变”是指在氨基酸位置600处用天冬氨酸取代缬氨酸。V600K突变导致B-Raf中位置600处从缬氨酸(V)至赖氨酸(K)的氨基酸取代。V600K突变导致B-Raf中位置600处从缬氨酸(V)至赖氨酸(K)的氨基酸取代。

[0070] 在一些实施方案中,癌症是非V600B-Raf突变阳性癌症(即,癌症具有一种或多种B-Raf突变,并且所述一种或多种突变不是B-RafV600)。在一些实施方案中,B-Raf突变是在外显子11或15中。在一些实施方案中,B-Raf突变是在密码子466、469、594或601中。一方面,一种或多种非V600E突变是G466A、G466V、N581S、D594H、R146W、L613F、D565_剪接、S394*、P367R、G469A、G469V、G469*、G466V、G464V、G397S、S113I、A762E、G469L、D594N、G596S、G596R、D594N、D594H或G327_剪接。一方面,一种或多种非V600E突变是G469R、R95T、A621_剪接、V639I、Q609H、G464V或G466V。星号“*”是指终止密码子。

[0071] 在一些实施方案中,癌症是K-Ras突变阳性癌症(即,癌症具有一种或多种K-Ras突变)。在一些实施方案中,K-Ras突变是在外显子2中。在一些实施方案中,K-Ras突变是在密码子12或13中。

[0072] 在一些实施方案中,癌症是N-Ras突变阳性癌症(即,癌症具有一种或多种N-Ras突

变)。在一些实施方案中,N-Ras突变是在外显子2、3或4中。在一些实施方案中,N-Ras突变是在外显子2中。在一些实施方案中,N-Ras突变是在外显子3中。在一些实施方案中,N-Ras突变是在外显子4中。在一些实施方案中,N-Ras突变是Q61R、Q61K、Q61L、Q61H或Q61P。在一些实施方案中,N-Ras突变是Q61R突变。

[0073] 本公开提供一种治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,癌症选自皮肤癌、眼癌、胃肠癌、甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、中枢神经系统癌症、喉癌、子宫颈癌、淋巴系统癌症、泌尿生殖道癌症、骨癌、胆道癌、子宫内膜癌、肝癌、肺癌、前列腺癌以及结肠癌。在一些实施方案中,肺癌包括非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC)。在一些实施方案中,癌症不是NSCLC。在一些实施方案中,癌症选自皮肤癌、眼癌、胃肠癌、甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、脑癌、喉癌、子宫颈癌、淋巴系统癌症、泌尿生殖道癌症、骨癌、胆道癌、子宫内膜癌、子宫癌、肝癌、肺癌、前列腺癌以及结肠癌。

[0074] 在一些实施方案中,癌症是血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和骨髓增生异常综合征。

[0075] 在一些实施方案中,癌症选自甲状腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、急性骨髓性白血病(AML)和结肠癌。在一些实施方案中,癌症是黑色素瘤或结肠癌。

[0076] 在一些实施方案中,癌症选自皮肤癌和胃肠癌。

[0077] 在一些实施方案中,癌症是皮肤癌。在一些实施方案中,皮肤癌是黑色素瘤。在一些实施方案中,黑色素瘤是B-Raf突变型黑色素瘤。在一些实施方案中,黑色素瘤是N-Ras突变型黑色素瘤。

[0078] 在一些实施方案中,癌症是肺癌。在一些实施方案中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施方案中,癌症是鳞状NSCLC。在一些实施方案中,癌症是非鳞状NSCLC。

[0079] 在一些实施方案中,癌症是胃肠癌。如本文所用,“胃肠癌”包括食道癌、胃癌(也称胃癌)、胆道系统癌、胰腺癌、小肠癌、大肠癌、直肠癌和肛门癌)。在一些实施方案中,胃肠癌是食道腺癌、胃食管结合部腺癌或胃腺癌。在一些实施方案中,胃肠癌是胃癌。

[0080] 在一些实施方案中,癌症是结肠癌。结肠癌也被称为结肠直肠(CRC)癌、肠癌或直肠癌。

[0081] 在一些实施方案中,癌症是中枢神经系统癌症。在一些实施方案中,中枢神经系统癌症是脑癌。

[0082] 在一些实施方案中,甲状腺癌是甲状腺癌。

[0083] 在一些实施方案中,泌尿生殖道癌症是膀胱癌。

[0084] 在一些实施方案中,血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病(AML)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0085] Raf抑制剂和紫杉烷以使得它们在癌症治疗中提供有益作用的这样一种方式施用。施用可通过任何合适的方式,条件是所述施用提供所需的治疗作用,即相加性或协同作用。在一些实施方案中,Raf抑制剂和紫杉烷在同一治疗周期期间施用,例如,在一个治疗周期期间,将Raf激酶抑制剂和紫杉烷两者均施用至受试者。

[0086] 在一些实施方案中,将Raf抑制剂和紫杉烷循环施用至受试者。循环治疗涉及施用第一药剂(例如,第一预防或治疗剂)一段时间,随后施用第二药剂和/或第三药剂(例如,第

二和/或第三预防或治疗剂)一段时间,并且重复这种顺序施用。循环治疗可减少对一种或多种疗法的抗性的发展、避免或减少所述疗法之一的副作用和/或提高治疗的功效。

[0087] 在一些实施方案中,施用药剂的治疗期间之后是特定时间持续时间的非治疗期,在此期间不向受试者施用治疗剂。所述非治疗期之后可以是相同或不同频率的一系列后续治疗期和非治疗期持续相同或不同的时间长度。在一些实施方案中,治疗期和非治疗期是交替的。应理解,循环治疗中的治疗期可持续直到受试者实现完全应答或部分应答,此时可停止治疗。或者,循环治疗中的治疗期可持续直到受试者实现完全应答或部分应答,此时治疗期可持续特定数量的循环。在一些实施方案中,治疗期的长度可以是特定数量的循环,而不管受试者应答。在一些其他实施方案中,治疗期的长度可持续直到受试者复发。

[0088] Raf抑制剂的量或合适剂量取决于许多因素,包括待治疗病状的严重程度的性质、特定抑制剂、施用途径以及个体受试者的年龄、体重、一般健康状况和应答。在一些实施方案中,合适的剂量水平是除B-Raf V600外的更多B-Raf激酶蛋白同种型的抑制的剂量水平。在一些实施方案中,合适的剂量水平是实现B-Raf、C-Raf、A-Raf和/或B-Raf V600E的抑制的剂量水平。在一些实施方案中,合适的剂量水平是实现B-Raf、C-Raf和/或B-Raf V600E的抑制的剂量水平。在一些实施方案中,合适的剂量水平是如通过肿瘤消退、或疾病进展、无进展存活或总体存活的其他标准测量而测量的实现治疗应答的剂量水平。在一些实施方案中,合适的剂量水平是实现这种治疗应答并且还使与施用治疗剂相关的任何副作用最小化的剂量水平。

[0089] Raf激酶抑制剂的合适每日剂量通常可以单次或分次或多次剂量在作为单一药剂的最大耐受剂量的约10%至约100%的范围内。在一些实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约15%至约100%。在一些实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约25%至约90%。在一些其他实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约30%至约80%。在一些其他实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约40%至约75%。在一些其他实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约45%至约60%。在一些实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约100%、约105%或约110%。

[0090] 应理解,可在白天或晚上的任何时间服用合适剂量的Raf抑制剂。在一些实施方案中,在早晨服用合适剂量的Raf抑制剂的选择性抑制剂。在一些其他实施方案中,在晚上服用合适剂量的Raf抑制剂。在一些其他实施方案中,在早晨和晚上均服用合适剂量的Raf抑制剂。应理解,可与或不与食物一起服用合适剂量的Raf抑制剂。在一些实施方案中,与膳食一起服用合适剂量的Raf抑制剂。在一些实施方案中,在禁食时服用合适剂量的Raf抑制剂。

[0091] 本公开提供一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用:(i)第一组合物,其包含化合物A或其药学上可接受的盐作为活性剂;和(ii)第二组合物,其包含紫杉醇或其药学上可接受的盐作为活性剂;所述活性剂的量是使得其组合在癌症的治疗中是治疗上有效的。在一些实施方案中,化合物A以每剂量约100mg至约200mg的量每隔一天(QOD)施用。在一些实施方案中,化合物A以每剂量约100mg的量QOD施用。在一些实施方案中,化合物A以每剂量约200mg的量QOD施用。

[0092] 在一些实施方案中,化合物A以每剂量达约200mg施用。在一些实施方案中,化合物A以每剂量达200mg施用。Raf抑制剂(例如化合物A)的合适QOD剂量通常可以单次或分次或多次剂量在每剂量达约200mg的范围内。在一些实施方案中,化合物A作为单剂量施用。在一些实施方案中,化合物A以分次剂量施用。在一些实施方案中,化合物A以多个剂量施用。化合物A的其他合适剂量通常可以单次或分次或多次剂量在每剂量约50mg至约200mg的范围内。化合物A的其他合适剂量通常可以单次或分次或多次剂量在每剂量约75mg至约200mg的范围内。在一些实施方案中,合适的剂量是每剂量约100mg至约200mg。在一些其他实施方案中,合适的剂量是每天两次约150mg至约200mg。在一些实施方案中,合适的剂量是每剂量约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约105mg、约110mg、约115mg、约120mg、约125mg、约130mg、约135mg、约140mg、约145mg、约150mg、约155mg、约160mg、约165mg、约170mg、约175mg、约180mg、约185mg、约190mg、约195mg或约200mg。在一些实施方案中,化合物A的合适剂量是每剂量约100mg至约200mg。

[0093] 化合物A是具有长半衰期的可支持每周一次给药(QW)的Raf激酶抑制剂。在一些实施方案中,每周一次施用化合物A,在每次施用之间具有6天休息期。Raf抑制剂(例如化合物A)的合适每周剂量通常可以单次或分次或多次剂量在每周一次(QW)达约1500mg的范围内。化合物A通常可以单次或分次或多次剂量在每周一次(QW)达1500mg的范围内。在一些实施方案中,化合物A以每周一次达约1000mg施用。在一些实施方案中,化合物A以每周一次达1000mg施用。每周一次意味着每次施用之间具有6天休息期。在一些实施方案中,化合物A作为单剂量施用。在一些实施方案中,化合物A以每剂量达约600mg的量QW施用。在一些实施方案中,化合物A在28天周期的第2天、第9天、第16天和第23天以每剂量达600mg的量施用。在一些实施方案中,化合物A以分次剂量施用。在一些实施方案中,化合物A作为在同一天的分次剂量施用。在一些实施方案中,化合物A以多个剂量施用。合适的每周剂量包括每周一次每剂量达约1000mg,在每次施用之间具有6天休息期。在一些实施方案中,化合物A以每周一次每剂量达1000mg施用,在每次施用之间具有6天休息期。化合物A的其他合适的每周剂量通常可以单次或分次或多次剂量在每周一次每剂量约200mg至约1000mg的范围内。化合物A的其他合适的每周剂量通常可以单次或分次或多次剂量在约400mg至约1000mg的范围内。在一些实施方案中,合适的每周剂量是每周一次每剂量约400mg至约900mg。在一些实施方案中,合适的每周剂量是每周一次每剂量约500mg至约900mg。在一些其他实施方案中,合适的每周剂量是每周一次每剂量约400mg至约600mg。在一些其他实施方案中,合适的每周剂量是每周一次每剂量约200mg至约500mg。在一些其他实施方案中,合适的每周剂量是每周一次每剂量约200mg至约300mg。在一些实施方案中,合适的每周剂量是每周一次每剂量约200mg、300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg或约900mg。在一些实施方案中,QW给药方案将基于优异安全性的化合物A和紫杉烷的组合与其他可用的疗法区别开来。在一些实施方案中,QW给药方案将基于优异功效的化合物A和紫杉烷的组合与其他可用的疗法区别开来。

[0094] 施用至受试者的Raf抑制剂的剂量还将取决于施用频率。在一些实施方案中,每周一次(QW)施用化合物A,在每次施用之间具有6天休息期。在一些实施方案中,每天施用化合物A。在一些实施方案中,每隔一天施用化合物A。在一些实施方案中,化合物A在28天周期中

施用,其中化合物A在28天周期的第1天、第3天、第5天、第8天、第10天、第12天、第15天、第17天、第19天、第22天、第24天和第26天施用。在一些实施方案中,化合物A按28天周期施用,其中化合物A在28天周期的第2天、第9天、第16天和第23天施用。

[0095] 对于本领域的技术人员将显而易见的是,提供所需治疗作用的其他Raf抑制剂剂量或施用频率适用于本公开。

[0096] 紫杉烷可通过本领域的技术人员已知的任何方法施用。例如,紫杉烷可以组合物的形式施用,在一个实施方案中以紫杉烷和药学上可接受的载体的药物组合物(如本文所述的那些)的形式施用。在一些实施方案中,所述药物组合物是液体剂型,其可经由静脉内途径如静脉内注射或静脉内输注施用。在一个实施方案中,紫杉醇经由静脉内注射施用。在另一个实施方案中,ABRAXANE®经由静脉内注射施用。此类药物组合物描述于美国专利号6096331和美国专利号6506405中。

[0097] 紫杉烷的量或合适剂量取决于许多因素,包括待治疗病状的严重程度的性质、特定抑制剂、施用途径以及个体受试者的年龄、体重、一般健康状况和应答。在一些实施方案中,合适剂量水平是如通过癌症患者中有效暴露的标准测量而测量的实现有效暴露的剂量水平。在一些实施方案中,合适的剂量水平是如通过肿瘤消退、或疾病进展、无进展存活或总体存活的其他标准测量而测量的实现治疗应答的剂量水平。在一些实施方案中,合适的剂量水平是实现这种治疗应答并且还使与施用治疗剂相关的任何副作用最小化的剂量水平。

[0098] 紫杉烷的合适剂量通常可以单次或分次或多次剂量在作为单一药剂的最大耐受剂量的约10%至约100%的范围内。在一些实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约15%至约100%。在一些实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约25%至约90%。在一些其他实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约30%至约80%。在一些其他实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约40%至约75%。在一些其他实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约45%至约60%。在一些实施方案中,合适的剂量是作为单一药剂的最大耐受剂量的约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约100%、约105%或约110%。

[0099] 应理解,可在白天或晚上的任何时间服用合适剂量的紫杉烷。在一些实施方案中,在早晨服用合适剂量的紫杉烷。在一些其他实施方案中,在晚上服用合适剂量的紫杉烷。在一些其他实施方案中,在早晨和晚上均服用合适剂量的紫杉烷。应理解,可与或不与食物一起服用合适剂量的紫杉烷。在一些实施方案中,与膳食一起服用合适剂量的紫杉烷。在一些实施方案中,在禁食时服用合适剂量的紫杉烷。

[0100] 紫杉醇的合适剂量通常可以单次或分次或多次剂量在约40mg/m²至约90mg/m²/周的范围内。紫杉醇的其他合适的每周剂量通常可以单次或分次或多次剂量在约70mg/m²至约90mg/m²/周的范围内。紫杉醇的其他合适的每周剂量通常可以单次或分次或多次剂量在约60mg/m²至约90mg/m²/周或约60mg/m²至约80mg/m²/周的范围内。在其他实施方案中,合适的剂量是约40mg/m²、约45mg/m²、约50mg/m²、约55mg/m²、约60mg/m²、约65mg/m²、约70mg/m²、约75mg/m²、约80mg/m²、约85mg/m²或约90mg/m²/周。在一些实施方案中,紫杉醇的剂量是约

80mg/m²。

[0101] 另外,应理解,紫杉烷可作为约3小时、约2小时、约1小时、约45分钟或约30分钟IV输注施用。在一些实施方案中,紫杉烷可通过1小时IV输注施用。

[0102] 在一些实施方案中,紫杉醇的剂量是通过1小时IV输注约80mg/m²。在一些实施方案中,

[0103] ABRAXANE®的合适剂量通常可在约100mg/m²至约260mg/m²的范围内。在一些实施方案中,ABRAXANE以每剂量约100mg/m²静脉内施用。在一些实施方案中,ABRAXANE在21天周期的第1天、第8天和第15天以每剂量约100mg/m²经30分钟静脉内施用。在一些实施方案中,ABRAXANE在28天周期的第1天、第8天和第15天以每剂量约100mg/m²经30分钟静脉内施用。

[0104] 多西他赛的合适剂量通常可在静脉内约60mg/m²至约100mg/m²的范围内。在一些实施方案中,多西他赛的剂量以约75mg/m²静脉内施用。在一些实施方案中,多西他赛的剂量以每3周约75mg/m²经60分钟施用。

[0105] 在一些实施方案中,其中施用第一量的紫杉烷的第一治疗期之后可以是另一个治疗期,其中施用相同或不同量的相同或不同的紫杉烷。第二个治疗期之后可以是其他治疗期。在治疗期和非治疗期期间,可向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。

[0106] 在一些实施方案中,每周一次(QW)施用紫杉烷,在每次施用之间具有6天休息期。在一些实施方案中,紫杉烷按28天周期施用,其中紫杉烷在第1天、第8天和第15天施用。

[0107] Raf抑制剂和紫杉烷的施用可在相同或不同的日期,条件是施用提供所需的治疗作用。在本公开的一些实施方案中,Raf抑制剂和紫杉烷的施用将在相同日期。在一些实施方案中,Raf抑制剂和紫杉烷的施用将在相同和/或不同的日期,例如,化合物A在28天周期的第1天、第3天、第5天、第8天、第10天、第12天、第15天、第17天、第19天、第22天、第24天和第26天施用,并且紫杉烷在28天周期的第1天、第8天和第15天施用。在一些实施方案中,化合物A在28天周期的第2天、第9天、第16天和第23天施用,并且紫杉烷在28天周期的第1天、第8天和第15天施用。本公开涵盖替代治疗方案,只要它们产生所需的结果即可。

[0108] 紫杉烷可以单一剂型或作为单独的剂型与Raf抑制剂一起施用。当作为单独剂型施用时,Raf抑制剂可在施用紫杉烷之前、同时或之后施用。

[0109] 在一些实施方案中,施用有益量的治疗剂涵盖以在28天治疗周期期间的第1天、第3天、第5天、第8天、第10天、第12天、第15天、第17天、第19天、第22天、第24天和第26天给予的每剂量约100mg至约200mg的量(游离化合物A的测量的量)施用化合物A或药学上可接受的盐与以在28天治疗周期期间的第1天、第8天和第15天给予的每剂量约70mg/m²至约90mg/m²的量(作为游离紫杉烷的量测量的)施用紫杉醇或其药学上可接受的盐的组合。在一些实施方案中,有益量的治疗剂提供协同益处。在一些实施方案中,有益量的治疗剂提供相加益处。

[0110] 在一些实施方案中,用于治疗患有癌症的受试者的方法包括向所述受试者施用治疗有效量的一定量的化合物A或其药学上可接受的盐和一定量的紫杉烷或其药学上可接受的盐的组合。这些癌症受试者包括但不限于具有B-Raf突变的黑色素瘤受试者、威罗菲尼或其他B-Raf抑制剂失败的黑色素瘤受试者、具有N-Ras突变B-Raf野生型的黑色素瘤患者、具有B-Raf V600E突变B-Raf野生型的结肠直肠癌受试者、具有B-Raf V600E突变B-Raf野生型

的卵巢癌受试者、具有B-Raf V600E突变B-Raf野生型的肺癌患者、具有N-Ras突变B-Raf野生型的AML受试者、具有N-Ras突变B-Raf野生型的肝癌受试者、具有B-Raf V600E或N-Ras突变B-Raf野生型的甲状腺癌受试者、具有B-Raf野生型的胰腺癌受试者、具有B-Raf野生型的胆道癌受试者。癌症受试者包括具有K-Ras外显子2突变或B-Raf突变非V600B-Raf的非小细胞肺癌受试者。在一些实施方案中，癌症受试者的标准疗法失败。

[0111] 本公开提供一种用于延长患有癌症的受试者中对治疗的应答的持续时间的方法，所述方法包括向所述受试者施用：(i) 第一组合物，其包含Raf抑制剂或其药学上可接受的盐作为活性剂；和 (ii) 第二组合物，其包含紫杉烷或其药学上可接受的盐作为活性剂；所述活性剂的量是使得其组合对于延长应答的持续时间而言是有效的。

[0112] Raf抑制剂可通过本领域的技术人员已知的任何方法施用。例如，Raf抑制剂可以第一组合物的形式施用，在一些实施方案中作为Raf抑制剂和药学上可接受的载体的药物组合物(如本文所述的那些)施用。在一些实施方案中，第一组合物是如在2015年3月26日提交的PCT申请PCT/2015/022792 (WO 2015/148828)中描述的固体分散体挤出物。在一些实施方案中，第一组合物是包含乙烯基吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的固体分散体挤出物。在一些实施方案中，共聚物是共聚维酮，例如Kollidon® VA64。在一些实施方案中，第一组合物是非晶形的。

[0113] 紫杉烷可通过本领域的技术人员已知的任何方法施用。例如，紫杉烷可以第二组合物的形式施用，在一些实施方案中以紫杉烷和药学上可接受的载体的药物组合物(如本文所述的那些)的形式施用。

[0114] 如果在这些组合物中使用Raf抑制剂或紫杉烷的药学上可接受的盐，则所述盐优选地衍生自无机或有机酸或碱。对于合适的盐的综述，参见例如，Berge等人，J.Pharm.Sci.66:1-19 (1977) 和Remington:The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, A.Gennaro编著, Lippincott Williams&Wilkins, 2000。

[0115] 合适的酸加成盐的非限制性实例包括以下：乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐(lucoheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基-丙酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐以及十一酸盐。

[0116] 合适的碱加成盐包括但不限于，铵盐；碱金属盐，如钠盐和钾盐；碱土金属盐，如钙盐和镁盐；与有机碱如二环己基胺、N-甲基-D-葡萄糖胺、叔丁胺、乙二胺、乙醇胺和胆碱的盐；以及与氨基酸如精氨酸、赖氨酸等的盐。

[0117] 此外，含有氮的碱性基团可用此类试剂季铵化：如低级烷基卤化物，如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物以及碘化物；二烷基硫酸酯，如二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸酯；长链卤化物，如癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂酰基氯化物、溴化物和碘化物；芳烷基卤化物，如苄基和苯乙基溴化物；以及其他。因此获得水或油可溶性或可分散性产物。

[0118] 术语“药学上可接受的载体”在本文中用于指与受体受试者相容的材料。一方面，受试者是哺乳动物。一方面，受试者是人。一方面，所述材料适合于将活性剂递送至靶位点

而不终止所述活性剂的活性。与载体相关的毒性或不利作用(如果有的话)优先地与活性剂的预期用途的合理风险/益处比相称。

[0119] 术语“载体”、“佐剂”或“媒介物”可互换使用并且包括任何和所有溶剂、稀释剂或其他液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,如适合于所需的具体剂型。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, A. Gennaro编著, Lippincott Williams&Wilkins, 2000公开了用于配制药学上可接受的组合物的各种载体和用于其制备的已知技术。除了如通过产生任何所不希望的生物效应或另外以有害的方式与药物组合物的任何其他组分相互作用而与本公开的化合物不相容的任何常规的载体介质以外,所述载体的用途将涵盖在本公开的范围内。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质(如磷酸氢二钠、磷酸氢钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、氢氧化镁和氢氧化铝)、甘氨酸、山梨酸或山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、无热原水、盐或电解质(如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠和锌盐)、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、羊毛脂、糖(如乳糖、葡萄糖、蔗糖)、淀粉(如玉米淀粉和马铃薯淀粉)、纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素)、粉状黄蓍胶、麦芽、明胶、滑石、赋形剂(如可可脂和栓剂蜡)、油(如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油)、二醇类(如丙二醇和聚乙二醇)、酯(如油酸乙酯和月桂酸乙酯)、琼脂、藻酸、等渗盐水、林格氏溶液、醇(如乙醇、异丙醇、十六烷醇和甘油)、环糊精、润滑剂(如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁)、石油烃(如矿物油和凡士林)。根据配方师的判断,着色剂、释放剂、包覆剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂以及抗氧化剂也可存在于组合物中。

[0120] 本公开的药物组合物可通过本领域中熟知的方法如常规粒化、混合、溶解、胶囊化、冻干或乳化工艺等来生产。组合物可以多种形式产生,包括颗粒、沉淀、或微粒、粉末,包括冷冻干燥、旋转干燥或喷雾干燥粉末、非晶粉末、片剂、胶囊、糖浆、栓剂、注射液、乳液、酏剂、混悬液或溶液。制剂可任选地包含溶剂、稀释剂和其他液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、pH调节剂、等渗剂、增稠或乳化剂、稳定剂和防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,如适合于所需的具体剂型。

[0121] 在一些实施方案中,本公开的组合物被配制用于向哺乳动物药物施用。一方面,用于向人药物施用。本公开的此类药物组合物可通过口服、胃肠外、吸入喷雾、局部、直肠、鼻、口腔、阴道或经由植入式储药器的方式施用。如本文所用的术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内以及颅内注射或输注技术。优先地,口服、静脉内或皮下施用所述组合物。本公开的制剂可被设计为短效、快速释放或长效。此外,化合物可以局部而非全身的方式施用,如在肿瘤部位施用(例如通过注射)。

[0122] 用于口服施用的液体剂型包括但不限于,药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬液、糖浆剂以及酏剂。除活性化合物外,液体剂型可含有通常在本领域中使用的惰性稀释剂,例如像水或其他溶剂、溶解剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、环糊精、二甲基甲酰胺、油(尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油以及芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇以及山梨醇酐的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂以外,口服组合物还可包含佐剂如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜

味剂、调味剂以及芳香剂。

[0123] 可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性混悬液可根据已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可注射制剂也可为在肠胃外可接受的无毒稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬液或乳剂,例如,作为1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的赋形剂和溶剂为水、林格氏溶液(U.S.P.)和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。出于这个目的,可采用任意温和固定油,包括合成的甘油单酯或二甘油酯。另外,脂肪酸如油酸用于制备可注射制剂。可注射制剂可例如通过过滤细菌滞留过滤器或通过并入灭菌剂来灭菌,呈在使用之前可溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中的无菌固体组合物形式。配制用于胃肠外施用的组合物可通过快速浓注或通过定时推入注射,或者可通过连续输注来施用。

[0124] 为了延长本公开的化合物的作用,通常可期望减缓对来自皮下注射或肌内注射的化合物的吸收。这可通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体混悬液来实现。化合物的吸收速率则取决于其溶解速率,而溶解速率可取决于晶体大小和晶形。可选地,肠胃外施用的化合物形式的延迟吸收通过将化合物溶解于或混悬于油性赋形剂中来实现。可注射储库式形式通过在可生物降解聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成化合物的微胶囊化基质来形成。根据化合物与聚合物的比率和所采用的特定聚合物的性质,可控制化合物的释放速率。其他可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储库式可注射制剂也可通过在可与身体组织相容的脂质体或微乳液中包封化合物来制备。

[0125] 用于直肠或阴道施用的组合物优选地是可通过使公开的化合物与合适的非刺激性赋形剂或载体混合而制备的栓剂,所述赋形剂或载体如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡,它们在环境温度下为固体但在体温下为液体,并且因此在直肠或阴道腔中融化并释放活性化合物。

[0126] 用于经口施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在此类固体剂型中,活性化合物与至少一种药学上可接受的惰性赋形剂或载体(如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或以下物质混合:a)填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸;b)粘合剂,例如像羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙二醇、聚丙交酯-聚乙交酯、蔗糖和阿拉伯胶;c)湿润剂,如甘油;d)崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;e)溶解阻滞剂,如石蜡;f)吸收促进剂,如季铵化合物;g)润湿剂,例如像十六醇和单硬脂酸甘油酯;h)吸附剂,如高岭土和膨润土;以及i)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可包含缓冲剂,如磷酸盐或碳酸盐。

[0127] 相似类型的固体组合物也可使用这些赋形剂如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等来用作软质和硬质填充的明胶胶囊中的填充剂。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以使用包衣和包壳如肠溶衣和制药领域已知的其他包衣来制备。它们可任选地含有乳浊剂并且也可具有仅在或优选在肠道的某一部分,任选地以延迟的方式释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。相似类型的固体组合物也可使用这些赋形剂如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等来用作软质和硬质填充的明胶胶囊中的填充剂。

[0128] 所述活性化合物还可为具有如上所述的一种或多种赋形剂的微囊化形式。片剂、

糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以使用包衣和包壳如肠溶衣、释放控制包衣和制药领域已熟知的其他包衣来制备。在此类固体剂型中,活性化合物可与至少一种惰性稀释剂如蔗糖、乳糖或淀粉混合。.这类剂型按照正常操作,还可包含除惰性稀释剂以外的其他物质,例如,压片润滑剂和其他压片助剂,如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可包含缓冲剂。它们可任选地含有乳浊剂并且也可具有仅在或优选在肠道的某一部分,任选地以延迟的方式释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。

[0129] 本公开的化合物的局部或经皮施用的剂型包括:软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。在无菌条件下,将活性组分与药学上可接受的载体以及任意所需的防腐剂或可能需要的缓冲剂混合。眼用制剂、滴耳剂和滴眼剂也涵盖在本公开的范围内。另外,本公开涵盖经皮贴剂的用途,所述经皮贴剂具有提供将化合物受控制地递送至身体的额外优点。此类剂型可通过将化合物溶解于或分散于适当的介质中来制得。吸收促进剂也可用于增加化合物穿过皮肤的通量。速率可通过提供速率控制膜或通过将化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制。

[0130] 用于本公开的方法中的组合物可以单位剂型配制,以便于施用和剂量的均匀性。如本文所用的表达“单位剂型”是指适合于所治疗受试者的物理上离散的药剂单元。然而,应理解,本公开的化合物和组合物的总每日用量将由主治医师在合理医学判断范围内决定。用于胃肠外施用的单位剂型可在安瓿或多剂量容器中。

[0131] 本公开包括一种试剂盒,其包括:(i)第一组合物,其包含Raf抑制剂或其药学上可接受的盐作为活性剂;和(ii)第二组合物,其包含紫杉烷或其药学上可接受的盐作为活性剂;以及用于施用所述第一组合物与所述第二组合物的组合的说明书。

[0132] 本公开包括一种试剂盒,其包括:当用于治疗受试者的癌症时(i)第一组合物,其包含Raf抑制剂或其药学上可接受的盐作为活性剂;和(ii)第二组合物,其包含紫杉烷或其药学上可接受的盐作为活性剂;以及用于施用所述第一组合物与所述第二组合物的组合的说明书。

[0133] 威罗菲尼(Roche)被美国食品与药品管理局(FDA)批准用于治疗具有B-Raf V600E突变的黑色素瘤患者。最近,达拉菲尼(B-Raf抑制剂)和曲美替尼(MEK抑制剂)被批准用于具有B-Raf V600E阳性黑色素瘤的患者。与3期研究中的化学疗法相比,两种药物均显著提高中位无进展存活期。然而,与威罗菲尼的情况一样,这些应答被认为是短暂的(Lancet (2012;380:358-365),N Engl J Med 2012;367:107-114)。与许多其他靶向疗法类似,对B-Raf抑制的获得性抗性对这一患者群体的长期存活益处提出了治疗性挑战。

[0134] 为了提高B-Raf抑制剂的益处,研究继续以鉴定使表达突变型B-Raf的黑素瘤细胞对威罗菲尼有抗性的机制。最近的研究表明,MAPK途径的再活化是对B-Raf抑制的抗性机制。抗性机制主要涉及通过旁路机制再活化ERK信号传导,所述旁路机制是Ras/Raf依赖性的,如N-Ras活化(Nazarian等人,Nature.2010,468:973-7)、H-Ras活化(Su等人,New England Journal of Medicine.2012,366:207-215)或C-Raf上调(Johannessen等人,Nature.2010,468:968-72;Montagut等人,Cancer Res.2008,68:4853-61)、B-Raf V600E的异常剪接变体(Poulikakos等人,Nature.2011,480:387-390),或Ras/Raf无关的(Tp12/COT过度表达)Johannessen等人,Nature.2010,468:968-72。因此,多种机制可减弱B-Raf突变

型癌症中B-Raf抑制对MAPK信号传导的影响。虽然可能引起对B-Raf抑制的抗性的B-Raf (T529I) 的守门员突变尚未在临幊上鉴定,但是这种突变已在实验上证明引起抗性, Whittaker等人,Sci Transl Med.2010,2 (35) :ra41。最近的研究还表明,通过RTK如IGF-1R 或PDGFR β 活化MAPK-冗余信号传导途径可在对B-Raf抑制的获得性抗性中起作用;Nazarian 等人,Nature.2010,468:973-7;Villanueva等人,Cancer Cell.2010,18:683-95;Shi等人, Cancer Res.2011,71:5067-74。显然,MAPK再活化参与许多这些抗性机制。泛Raf抑制剂预期阻断MAPK再活化。

[0135] 另外,包括威罗菲尼及其紧密类似物N-[3-(5-氯-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-羰基)-2,4-二氟苯基]丙烷-1-磺酰胺(PLX4720;一种可商购的选择性B-Raf抑制剂)的B-Raf特异性抑制剂被证明通过与B-Raf野生型背景中的其他Raf同种型二聚化而诱导反常途径活化,Hatzivassiliou G,等人Nature,2010,464:431-435;Poulikakos等人,Nature,2010, 464:427-430;Heidorn,等人,Cell,2010,140:209-221。据信,威罗菲尼通过结合B-Raf野生型并刺激B-Raf-C-Raf二聚化来活化Raf/MEK/ERK途径。据信,通过B-Raf特异性抑制的这种反常途径活化是在用威罗菲尼治疗的一些黑色素瘤患者中皮肤副作用(如鳞状细胞癌)的主要原因。由于其在这种遗传背景中的反常途径活化活性,威罗菲尼未被批准用于治疗具有B-Raf野生型遗传背景的癌症患者。

[0136] 化合物A是能够抑制除B-Raf V600外的更多Raf激酶蛋白同种型的Raf激酶抑制剂。具体地说,化合物A抑制B-Raf、C-Raf和B-Raf V600E突变(参见实施例1)。由于其泛Raf活性,化合物A通过上游信号传导如N-Ras突变和K-Ras突变(两者均具有B-Raf野生型遗传背景)而是针对具有MAPK途径活化的肿瘤细胞有活性的。因此,化合物A具有用于治疗具有B-Raf突变(如黑色素瘤、结肠直肠癌、肺癌(NSCLC)、卵巢癌和甲状腺癌)或N-Ras突变、B-Raf野生型(如黑色素瘤、AML、CML、ALL、CLL、肝癌)的癌症患者的潜力,(Schubbert等人, Nature Reviews Cancer,2007,7:295;Pylayeva-Gupta等人,Nature Reviews Cancer, 2011,11:761)。化合物A还是针对发展对威罗菲尼的抗性的黑色素瘤肿瘤细胞有活性的。因此,据信化合物A与紫杉烷的组合对于威罗菲尼或其他B-Raf抑制剂失败的黑色素瘤患者将是有效的。在一些实施方案中,化合物A与紫杉醇的组合是产生最长治疗持续时间的良好耐受组合。本公开涉及一种用于延长患有癌症的受试者中对治疗的应答的持续时间的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的药物组合物。

[0137] 本公开涉及一种用于确定是否用本文所述的药物组合物治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

[0138] a) 测量包含肿瘤细胞的受试者样品中与基因突变相关的至少一种或多种B-Raf、N-Ras和/或K-Ras标志物的至少一种特征;

[0139] b) 鉴定在用所述药物组合物治疗后,在步骤a)中测量的至少一种特征对于结果是否是信息性的;以及

[0140] c) 如果所述信息特征表明所述肿瘤细胞包含至少一种指示用所述药物组合物治疗的有利结果的具有B-Raf、N-Ras和/或K-Ras突变状态的标志物基因,则确定用所述药物组合物治疗所述受试者。

[0141] 本公开涉及一种通过向患有癌症的受试者施用本文所述的药物组合物来治疗所述受试者的方法,所述方法包括:

[0142] a) 测量包含肿瘤细胞的受试者样品中与基因突变相关的至少一种或多种B-Raf、N-Ras和/或K-Ras标志物的至少一种特征；

[0143] b) 鉴定在用所述药物组合物治疗后,在步骤a)中测量的至少一种特征对于结果是否是信息性的;以及

[0144] c) 如果所述信息特征表明所述肿瘤细胞包含至少一种指示用所述药物组合物治疗的有利结果的具有B-Raf、N-Ras和/或K-Ras突变状态的标志物基因,则确定用所述药物组合物治疗所述受试者。

[0145] 本公开涉及一种用于确定被诊断患有癌症的受试者中通过如权利要求16或17所述的药物组合物治疗的药理学有效性的增加的可能性的方法,所述方法包括:使来自所述受试者的癌症(肿瘤)样品的核酸样品经受B-Raf、N-Ras或K-Ras突变测试或PCR,其中在B-Raf、N-Ras或K-Ras基因中存在至少一种突变表明所述治疗的药理学有效性的可能性增加。

[0146] 本公开涉及一种通过向患有癌症的受试者施用本文所述的药物组合物来治疗所述受试者的方法,所述方法包括:使来自所述受试者的癌症(肿瘤)样品的核酸样品经受B-Raf、N-Ras或K-Ras突变测试或PCR,其中在B-Raf、N-Ras或K-Ras基因中存在至少一种突变表明所述治疗的药理学有效性的可能性增加。

[0147] 本公开涉及一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

[0148] i) 从来自所述受试者的癌症样品获得核酸样品;

[0149] ii) 使所述样品经受B-Raf、N-Ras或K-Ras突变测试或PCR,以及

[0150] 鉴定B-Raf、N-Ras或K-Ras基因中至少一种突变的存在;以及

[0151] 将有效量的本文所述的药物组合物施用至其样品中鉴定出B-Raf、N-Ras或K-Ras基因中存在至少一种突变的受试者。

[0152] 在一些实施方案中,可通过测序核酸,例如DNA、RNA、cDNA或与标志物基因(例如,基因型标志物基因,例如B-Raf或N-Ras)相关的蛋白质来鉴定标志物中的突变。本领域中存在若干测序方法来对核酸进行测序。核酸引物可被设计成结合至包含潜在突变位点的区域,或者可被设计成补充突变序列而不是野生型序列。引物对可被设计成包括包含标志物基因的潜在突变的区域。引物或引物对可用于测序对应于标志物基因的DNA的一条或两条链。引物可与探针(例如核酸探针,例如杂交探针)结合使用以在测序之前扩增目标区域来加强用于检测标志物基因中的突变的序列量。可进行测序的区域的实例包括整个基因、基因的转录物以及基因或转录物的片段,例如外显子或非翻译区或包含突变位点的标志物的一部分中的一个或多个。用于引物选择和序列或组成分析的靶标的突变的实例可在收集突变信息的公共数据库中找到,如由美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) (Bethesda, MD) 维护的基因型和表型数据库(dbGaP),以及由威康信托基金会桑格研究所(威康信托基金会桑格研究所) (Cambridge, UK) 维护的癌症体细胞突变目录(COSMIC) 数据库。

[0153] 测序方法是本领域的技术人员已知的。方法的实例包括桑格法、SEQUENOMTM方法和下一代测序(NGS)方法。包括使用电泳(例如毛细管电泳以分离引物延伸的标记的DNA片段)的桑格法可自动化用于高通量应用。引物延伸测序可在目标区域的PCR扩增后进行。软件可帮助序列碱基识别和突变鉴别。SEQUENOMTM MASSARRAY[®]测序分析(San Diego, CA)是将实际质量与特定目标片段的预期质量进行比较以鉴别突变的一种质谱方法。NGS技术(也

称为“大规模并行测序”和“第二代测序”)通常提供比先前方法高得多的通量并且使用各种方法(综述于Zhang等人(2011) *J. Genet. Genomics* 38:95-109以及Shendure和Hanlee(2008) *Nature Biotech.* 26:1135-1145)。NGS方法可鉴别样品中标记物中的低频率突变。一些NGS方法(参见例如,GS-FLX基因组测序仪(Roche Applied Science, Branford, CT)、基因组分析仪(Illumina, Inc. San Diego, CA)、SOLIDTM分析仪(Applied Biosystems, Carlsbad, CA)、Polonator G.007(Dover Systems, Salem, NH)、HELISCOPETM(Helicos Biosciences Corp., Cambridge, MA))在流动池中空间上分离的PCR产物进行或不进行克隆扩增的情况下使用循环阵列测序以及各种方案来检测通过测序酶(例如聚合酶或连接酶)并入的标记的修饰的核苷酸。在一种NGS方法中,引物对可用于PCR反应中以扩增目标区域。扩增区域可连接成级联产物。克隆文库在流动池中从PCR或连接的产物产生并且进行进一步扩增(“桥”或“聚簇”PCR)以用于单末端测序,因为聚合酶添加标记的可逆封端碱基,所述碱基取决于标记的碱基的身份在四个通道中的一个中成像且然后在下一个循环中移除。软件可帮助与基因组序列的比较来鉴别突变。另一种NGS方法是外显子测序,其重点在于测序基因组中所有基因的外显子。与其他NGS方法一样,可通过捕获方法或扩增方法富集外显子。

[0154] 在一些实施方案中,可使用本领域中已知的方法在生物样品中通过原位和体外形式分析DNA,例如对应于野生型或突变标志物的基因组DNA。DNA可直接从样品中分离或在分离另一种细胞组分(例如, RNA或蛋白质)后分离。试剂盒可供用于DNA分离,例如QIAAMP[®] DNA Micro试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)。也可使用此类试剂盒扩增DNA。

[0155] 在另一个实施方案中,可使用本领域中已知的方法在生物样品中通过原位和体外形式分析对应于标志物的mRNA。许多表达检测方法使用分离的RNA。对于体外方法,不针对分离mRNA选择的任何RNA分离技术可用于纯化来自肿瘤细胞的RNA(参见例如, Ausubel等人,编著, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, New York 1987-1999)。此外,可使用本领域的技术人员熟知的技术,例如像Chomczynski(1989,美国专利号4,843,155)的单步RNA分离方法容易地加工大量组织样品。可使用标准程序(参见例如, Chomczynski和Sacchi(1987) *Anal. Biochem.* 162:156-159)、溶液(例如, trizol, TRI REAGENT[®] (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH; 参见美国专利号5,346,994)或试剂盒(例如, QIAGEN[®] Group RNEASY[®] 分离试剂盒(Valencia, CA)或LEUKOLOCKTM 总RNA分离系统,Ambion division of Applied Biosystems, Austin, TX)来分离RNA。

[0156] 可采用另外步骤来从RNA样品中除去DNA。细胞溶解可用非离子洗涤剂完成,然后进行微量离心以除去细胞核且因此除去大部分细胞DNA。随后可从细胞核分离DNA以用于DNA分析。在一个实施方案中,使用硫氰酸胍溶解、随后CsCl离心以分离RNA与DNA来从各种目标类型的细胞提取RNA(Chirgwin等人(1979) *Biochemistry* 18:5294-99)。通过用oligo-dT纤维素选择来选择Poly (A) +RNA(参见Sambrook等人(1989) *Molecular Cloning--A Laboratory Manual* (第2版), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)。或者,可通过例如用热苯酚或苯酚/氯仿/异戊醇有机萃取来完成RNA与DNA的分离。如果需要,可将RNA酶抑制剂添加至溶解缓冲液。同样,对于某些细胞类型,可能需要向所述方案添加蛋白质变性/消化步骤。对于许多应用,希望相对于其他细胞RNA(如转移RNA

(tRNA) 和核糖体RNA (rRNA)) 富集mRNA。大多数mRNA在其3'端含有poly (A) 尾。这允许它们通过亲和色谱法富集, 例如使用偶联至固体支持体如纤维素或SEPHADEX.RTM. 介质的oligo (dT) 或poly (U) (参见Ausubel等人 (1994) Current Protocols In Molecular Biology, 第2卷, Current Protocols Publishing, New York)。一旦结合, 使用2mM EDTA/0.1% SDS从亲和柱洗脱poly (A) +mRNA。

[0157] 可通过用于检测或测量(例如)核酸(例如, RNA、mRNA、基因组DNA或cDNA)和/或翻译的蛋白质的(例如)一种标志物或多种标志物的特征的各种熟知的方法中的任一种来评定例如在从测试受试者获得样品(例如, 肿瘤活检)之后样品中的标志物的特征。此类方法的非限制性实例包括用于检测分泌的蛋白、细胞表面蛋白、细胞质蛋白或核蛋白的免疫学方法, 蛋白质纯化方法, 蛋白质功能或活性测定, 核酸杂交方法(任选地包括“错配裂解”步骤 (Myers, 等人 (1985) Science 230:1242) 来消化错配的(即突变体或变体)区域以及分离和鉴别来自所得消化片段的突变体或变体), 核酸逆转录方法以及核酸扩增方法和扩增产物的分析。这些方法包括基因阵列/芯片技术、RT-PCR、TAQMAN[®]基因表达测定 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (例如, 在GLP批准的实验室条件下)、原位杂交、免疫组织化学、免疫印迹、FISH(荧光原位杂交)、FACS分析、RNA印迹、DNA印迹、INFINIUM[®] DNA分析珠粒芯片 (Illumina, Inc., San Diego, CA)、定量PCR、细菌人工染色体阵列、单核苷酸多态性 (SNP) 阵列 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 或细胞遗传学分析。

[0158] 用于检测两种核酸之间的至少一个核苷酸的差异的技术的实例包括但不限于选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增或选择性引物延伸。例如, 可制备寡核苷酸探针, 其中将已知的多态性核苷酸置于中心位置(等位基因或突变体特异性探针), 且然后在仅发现完美匹配的情况下允许杂交的条件下与靶DNA杂交 (Saiki等人 (1986) Nature 324:163) ; Saiki等人 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230; 以及Wallace等人 (1979) Nucl. Acids Res. 6: 3543)。这种等位基因特异性寡核苷酸杂交技术可用于同时检测N-Ras的不同多态性或突变区域中的若干核苷酸变化。例如, 将具有特定等位基因变体或突变体的核苷酸序列的寡核苷酸连接至固体支持体(例如杂交膜)上, 且然后将所述支持体(例如膜)与标记的样品核酸杂交。因此, 杂交信号的分析可揭示样品核酸的核苷酸的身份。

[0159] 除非另外定义, 否则本文所用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义。尽管可在本公开的实践或测试中使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料, 但本文描述优选的方法、装置和材料。本文提及的所有出版物出于描述和公开在出版物中报道的可与本公开结合使用的材料和方法的目的以引用的方式整体并入本文。

实施例

[0160] 定义

[0161]	ANOVA	方差分析
	ΔAUC	曲线下面积的差异
	BID	每日两次
	BIW	每周两次

[0162]	BWL	体重损失
	HPBCD	2-羟丙基- β -环糊精
	HPMC	羟丙基甲基纤维素
	IV	静脉内
	MTD	最大耐受剂量
	N/A	不适用
	NaHCO ₃	碳酸氢钠
	SEM	平均标准误差
	SCID	严重联合免疫缺陷
	PEG	聚乙二醇
	po.	口服(经口(by mouth/per os))
	QD	每日一次
	QW 或 Q7D	每周一次
	SC	皮下
	TG	处理组
	TGI	肿瘤生长抑制
	WFI	注射用水

[0163] 实施例1: 使用纯化的Raf激酶同种型进行的激酶抑制测定

[0164] 使用如在WO 2009/006389中描述的生物化学荧光共振能量转移(FRET)测定来测定化合物A的激酶活性。化合物A对突变体B-Raf V600E、野生型B-Raf和野生型C-Raf激酶的半数最大抑制浓度(IC₅₀)值在以下表1中示出。化合物A与B-Raf激酶的无活性的DFG-向外构象结合。

[0165] 表1.

生物化学激酶测定	
Raf	IC ₅₀ 值(nM)
B-Raf 突变体(V600E)	7.1
B-Raf 野生型	10.1
C-Raf 野生型	0.7

[0167] 实施例2: 在N-Ras突变的SK-MEL-2人黑色素瘤异种移植模型中的体内肿瘤功效

[0168] 测试化合物:

[0169] 将化合物A配制在PEG 400中, 并将悬浮液在温水浴中超声处理直到获得澄清溶液。对于较低剂量, 将10mg/mL溶液用100%PEG 400稀释。

[0170] 将多西他赛[Taxotere® (多西他赛)注射液浓缩物; 于乙醇/Tween80中20mg/mL]用盐水稀释至1.5mg/mL。由于小鼠中的制剂限制, 所以仅多西他赛用于非临床研究中。

[0171] 将2种媒介物100%PEG 400(媒介物1)和WFI中的10%HPBCD/1%NaHCO₃(媒介物2)同时施用(0.05mL/10g BW)至媒介物组中的小鼠。

[0172] 肿瘤测量:

[0173] 在处理的第一天开始每周两次测量肿瘤大小和体重。当动物的肿瘤达到大约

2000mm³时将动物终止,并且研究在处理开始后的第62天终止。

[0174] 通过计算在处理开始后第20天的TGI% (媒介物组的MTV-处理组的MTV) /媒介物组的MTV来确定肿瘤生长的抑制。使用关于 Δ AUC的线性混合效应回归分析来进行处理组与媒介物之间肿瘤生长的统计学比较。

[0175] 统计分析

[0176] 使用线性混合效应回归模型评定媒介物对照组与处理组之间随时间推移的肿瘤生长趋势的差异。这些模型考虑到在多个时间点测量每只动物。将一种模型拟合以用于所述比较,并且使用从所述模型预测的值来计算对照组和处理组的肿瘤体积对时间曲线下面积(AUC)。统计上显著的p值表明两组(媒介物和处理)随时间推移的趋势是不同的。

[0177] 在 \log_{10} 转化之前,将所有肿瘤体积具有的值加1。将这些值在处理组之间进行比较以评定随时间推移的趋势差异是否是统计上显著的。为了比较多对处理组,使用最大似然法将以下混合效应线性回归模型拟合为数据:

$$[0178] Y_{ijk} - Y_{i0k} = Y_{i0k} + \text{处理}_i + \text{天}_j + \text{天}_j^2 + (\text{处理} * \text{天})_{ij} + (\text{处理} * \text{天}^2)_{ij} + e_{ijk} \quad (1)$$

[0179] 其中 Y_{ijk} 是第i次处理中第k个动物的第j个时间点的 \log_{10} 肿瘤值, Y_{i0k} 是第i次处理中第k个动物的第0天(基线) \log_{10} 肿瘤值,天_j是以中位数为中心的时间点且(连同天²_j)被视为连续变量,并且 e_{ijk} 是残余误差。空间幂律协方差矩阵用于说明随时间推移关于同一动物的重复测量值。如果不是统计上显著的,则将相互作用项以及天²_j项去除。

[0180] 使用似然比检验来评定一对给定处理组是否展示统计上显著的差异。将完整模型的-2对数似然值与无任何处理项的模型(简化模型)进行比较,并且使用卡方检验来检验值的差异。所述检验的自由度被计算为完整模型的自由度与简化模型的自由度之间的差异。

[0181] 从上述模型中获取 \log 肿瘤值($Y_{ijk} - Y_{i0k}$,其可被解释为 \log_{10} (从第0天的倍数变化))的预测差异以计算每个处理组的平均AUC值。然后将dAUC值计算为:

$$[0182] dAUC = \frac{\text{平均值}(AUC_{ctl}) - \text{平均值}(AUC_{trt})}{\text{平均值}(AUC_{ctl})} * 100 \quad (2)$$

[0183] 这假定 AUC_{ctl} 为整数。在 AUC_{ctl} 为负数的情况下,将上述公式乘以-1。

[0184] 对于协同作用分析,使用 \log 肿瘤值的观察到的差异来计算每只动物的AUC值。在处理组中的动物从研究中除去时的情况下,最后观察到的肿瘤值结转通过所有随后时间点。使用来自上述成对模型的预测值计算对照或媒介物组的AUC。协同作用的量度定义如下:

$$[0185] Frac_{A_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{A_k}}{AUC_{ctl}} \quad (3)$$

$$[0186] Frac_{B_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{B_k}}{AUC_{ctl}} \quad (4)$$

$$[0187] Frac_{AB_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{AB_k}}{AUC_{ctl}} \quad (5)$$

$$[0188] \text{协同作用得分} = (\text{平均值}(Frac_A) + \text{平均值}(Frac_B) - \text{平均值}(Frac_{AB})) * 100 \quad (6)$$

[0189] 其中 A_k 和 B_k 是单独处理组中的第k个动物,且 AB_k 是组合处理组中的第k个动物。 AUC_{ctl} 是对照组的模型预测AUC,并且被视为无变异性的常数。协同作用得分的标准误差被

计算为A组、B组和AB组之间的标准误差平方和的平方根。使用Welch-Satterthwaite方程估计自由度。进行假设检验以确定协同作用得分是否与0不同。通过将协同作用得分除以其标准误差来计算P值，并用上述计算的自由度针对t-分布(双尾)进行检验。

[0190] 作用被分为四个不同的类别。如果协同作用得分小于0则其被认为是协同的，并且如果协同作用得分与0没有统计学差异则其被认为是相加的。如果协同作用得分大于零，但组合的平均AUC低于两种单一药剂处理中的最低平均AUC，则所述组合是次相加的。如果协同作用得分大于零，并且组合的平均AUC大于单一试剂处理中的至少一种的平均AUC，则所述组合是拮抗性的。

[0191] 如果需要，区间分析涉及与另一处理组和时间间隔相比较的指定处理组和时间间隔。对于给定组、时间间隔和动物，通过以下估计每天的肿瘤生长速率

$$\text{速率} = 100 * (10^{\Delta Y / \Delta t} - 1) \quad (7)$$

[0193] 其中 ΔY 是目标区间内 \log_{10} 肿瘤体积的差异，并且 Δt 是时间间隔的长度。如果一个或两个时间点缺失，则所述动物被忽略。然后将动物间的平均速率与使用具有不等方差的双侧未配对t检验进行比较。对于多次比较和所检查的终点，不存在预先规定的调整。所有P值 <0.05 被称为统计上显著的。协同分析： $p>0.05$ =相加； $p<0.05$ 且得分 <0 =协同； $p<0.05$ ，得分 >0 且组合生长速率低于两个单一药剂生长速率=次相加； $p<0.05$ ，得分 >0 且组合生长速率高于单一药剂生长速率中的至少一个=拮抗。

[0194] 结果

[0195] 用化合物A(12.5mg/kg QD或50mg/kg BIW)和多西他赛(IV, 7.5mg/kg QW; TGI分别=92.7%或91.3%)组合治疗产生超过单一药剂疗法的治疗优点，并且两种药剂的相互作用是相加的。在用12.5mg/kg QD的化合物A和7.5mg/kg Q的多西他赛治疗的组合组中，存在两例完全肿瘤消退，其中一只动物在研究终止时保持无肿瘤。此研究的细节在以下表2中示出。

[0196] 表2.结果的总结(N-Ras突变的SK-MEL-2人黑色素瘤)

[0197]

处理组	剂量 (mg/kg)	施用方法/频率	性别/数 目/组	物种/ 品系	终点	发现
媒介物 1 + 媒介物 2	0.0	PO / QD 第 0-20 天	F/8	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 NCr-nu/nu	TGI ^a 最大平均 BWL% ^b	N/A 0%
化合物 A + 媒介物 2	12.5	PO / QD 第 0-20 天	F/8	小鼠 (小家鼠/ 无胸腺 NCr-nu/nu)	TGI ΔAUC 平均最大 BWL ^b	70.7% p < 0.001 1% (第 3 天 和第 10 天)
化合物 A + 媒介物 2	50 ^c	PO / BIW 第 0 天、第 3 天、 第 7 天、第 10 天、 第 14 天和第 17 天	F/8	小鼠 (小家鼠/ 无胸腺 NCr-nu/nu)	TGI ΔAUC 平均最大 BWL ^b ΔAUC 平均最大 BWL ^b	62.9% p < 0.001 4% (第 17 天) p < 0.001 4% (第 14 天)
多西他赛 + 媒介物 1	7.5	IV / QW 第 0 天、第 7 天 和第 14 天	F/8	小鼠 (小家鼠/ 无胸腺 NCr-nu/nu)	TGI ΔAUC 平均最大 BWL ^b ΔAUC ^c 协同作用分析 ^d 平均最大 BWL ^b	74.9% p < 0.001 15% (第 14 天) p < 0.001 相加 p = 0.524 7% (第 14 天)

处理组	剂量 (mg/kg)	施用方法/频率	性别/数 目/组	物种/ 品系	终点	发现				
					协同作用分析 ^d	次相加 $p = 0.042$				
					平均最大 BWL ^b	9% (第 14 天)				
					ΔAUC^c	$p < 0.001$				
					协同作用分析 ^d	相加 $p = 0.404$				
					平均最大 BWL ^b	5% (第 14 天)				
[0198]	化合物 A + 多西他赛	12.5 7.5 PO / QD 第 0-20 天 IV / QW 第 0 天、第 7 天 和第 14 天	F/8	小鼠 (小家鼠/ 无胸腺 NCr-nu/nu)	TGI	92.7%				
					ΔAUC^c	$p < 0.001$				
	化合物 A + 多西他赛	50 7.5 PO / BIW 第 0 天、第 3 天、 第 7 天、第 10 天、 第 14 天和第 17 天 IV / QW 第 0 天、第 7 天 和第 14 天	F/8	小鼠 (小家鼠/ 无胸腺 NCr-nu/nu)	协同作用分析 ^d	相加 $p = 0.344$				
					平均最大 BWL ^b	10% (第 14 天)				
					TGI	91.3%				
					ΔAUC^c	$p < 0.001$				
					协同作用分析 ^d	相加 $p = 0.252$				
					平均最大 BWL ^b	16% (第 17 天)				
a 每种媒介物的剂量体积是 0.05 mL/10g BW										
b TGI 值是在处理开始后第 20 天计算的。										
c 最大平均 BWL%。										
d ΔAUC = 统计分析用线性混合效应回归模型进行。p 值 <0.05 被认为是显著的。										
e 在处理开始后第 20 天计算的。										

[0199] 实施例3: 用于测量标志物的方法

[0200] 基于B-Raf PCR的测定(供应商:Qiagen; 目录#:870801)

[0201] B-Raf RGQ PCR试剂盒v2结合两种技术ARMS®和Scorpions®以检测实时PCR测定中的突变。这种测定检测B-Raf V600突变V600E (GAG) 和V600E复合物 (GAA) 、V600D (GAT) 、V600K (AAG) 、V600R (AGG) 。所述试剂盒检测到V600E (GAG) 和V600E复合物 (GAA) 的存在, 但不能区分它们。

[0202] ARMS

[0203] 通过被设计用于匹配突变DNA的等位基因特异性引物来选择性地扩增特异性突变序列。

[0204] Scorpions

[0205] 使用Scorpions进行扩增检测。Scorpions是与荧光标记的探针(即FAM™或HEX™)和淬灭剂共价连接的PCR引物。在PCR期间, 当所述探针与扩增子结合时, 荧光团和淬灭剂变得分离, 从而导致荧光信号的增加。

[0206] 步骤

[0207] B-Raf RGQ PCR试剂盒v2包括两步程序。在第一步骤中, 进行对照测定以评定样品

中的总可扩增的B-Raf DNA。在第二步骤中,进行突变测定和对照测定两者来确定突变DNA的存在或不存在。

[0208] • 对照测定

[0209] 用FAM标记的对照测定用于评定样品中的总可扩增的B-Raf DNA。对照测定扩增B-Raf基因的外显子3的区域。引物和Scorpion探针被设计为独立于任何已知的B-Raf多态性而扩增。

[0210] • 突变测定

[0211] 每个突变测定包含FAM标记的Scorpion探针和用于区分野生型DNA和特异性突变DNA的ARMS引物。

[0212] 数据分析: ΔCt 方法

[0213] Scorpion实时测定使用检测在背景信号以上的荧光信号所需的PCR循环次数作为在反应开始时存在的靶分子的量度。检测到在背景荧光以上的信号的点被称为“循环阈值”(Ct)。

[0214] 样品 ΔCt 值被计算为来自同一样品的突变测定 Ct 与对照测定 Ct 之间的差异。如果样品的 ΔCt 小于所述测定的截断 ΔCt 值, 则将所述样品分类为突变阳性。在所述值以上, 样品含有少于通过所述试剂盒能够检测到的突变百分比(超出测定限制), 或者样品是突变阴性。

[0215] 当使用ARMS引物时, 可能发生一些无效的引发, 从而从不含突变的DNA得到非常晚的背景 Ct 。从背景扩增计算的所有 ΔCt 值都大于截断 ΔCt 值, 并且样品被分类为突变阴性。

[0216] 对于每个样品, 如下计算 ΔCt 值, 从而确保突变 Ct 值和对照 Ct 值来自同一样品:

[0217] $\Delta Ct = \{\text{样品突变} Ct\} - \{\text{样品对照} Ct\}$

[0218] 样品对照 Ct 可在 27-33 之间的范围内

[0219] 样品突变 Ct 可在 15-40 之间的范围内

[0220] 突变体识别的可接受的 ΔCt 是 <6 或 7

[0221] 用于测量N-Ras突变的方法与以上针对B-Raf描述的那些相似。用于检测N-Ras Q61突变的Qiagen N-Ras测定包括:

[0222] Q61K (181C>A)

[0223] Q61R (182A>G)

[0224] 用于测量K-Ras突变的方法是可容易获得的。例如, Qiagen TheraScreen®K-Ras突变试剂盒。

[0225] 实施例4: KRAS突变体肺癌模型中的化合物A和多西他赛组合

[0226] 在KRAS突变体肺癌模型, 包括Calu-6肺癌模型($KRAS^{Q61K}$)和A549肺癌模型($KRAS^{G12S}$)中评估化合物A和多西他赛组合。Calu-6肺癌模型的结果在下文描述。在A549模型中, 所述组合不显示比单一药剂更好的活性。

[0227] 对于Calu-6模型, 化合物在100%PEG400中如下配制:

[0228] 1. 10.0mg/mL的化合物A: 4.0mL

[0229] -称出40.40mg的化合物A粉末;

[0230] -将所述粉末添加在4mL的100%PEG400中;

[0231] -超声处理直到无化合物A颗粒残留且获得溶液;

- [0232] - 储存在室温下直到使用。
- [0233] 2. 2.5mg/mL的化合物A:20.0mL
- [0234] - 称出50.51mg的化合物A粉末；
- [0235] - 将所述粉末添加在20mL的100%PEG400中；
- [0236] - 超声处理直到无药物颗粒残留且获得溶液；
- [0237] - 储存在室温下直到使用。
- [0238] 多西他赛(如,泰索帝注射液浓缩物, Sanofi-Aventis U.S.LLC) 在0.9%盐水中如下配制：
- [0239] 1. 0.75mg/mL的泰索帝:8mL
- [0240] - 将0.3mL的泰索帝注射液浓缩物(20mg/mL) 添加至离心管中；
- [0241] - 添加7.7mL生理盐水且手动混合；
- [0242] - 保持所述管不受光照且在4小时内使用。
- [0243] 2. 0.50mg/mL的泰索帝:6mL
- [0244] - 将0.15mL的泰索帝注射液浓缩物(20mg/mL) 添加至离心管中；
- [0245] - 添加5.85mL生理盐水且手动混合；
- [0246] - 保持所述管不受光照且在4小时内使用。
- [0247] 泰索帝注射液浓缩物而不是多西他赛用于记录原始数据。
- [0248] 将媒介物处理组中的动物给予100%PEG400。媒介物或化合物的剂量体积对于P0是5mL/kg体重，并且对于IV施用是10mL/kg。
- [0249] 用于此研究中的动物是Balb/c裸雌性小鼠(Shanghai SINO-British SIPPR/BK Lab Animal Ltd)。每组的动物数量是7。在第0天小鼠的年龄是9周。在第0天组平均重量是20.1-21.5g。
- [0250] 表3示出用于研究中的每个处理组的给药方案。
- [0251] 表3. 结果的总结(KRAS突变的Calu-6人肺癌)。

[0252]

处理组	剂量 (mg/kg)	施用方法/频 率	性别/ 数量/组	物种/ 品系	终点	发现
媒介物 ^a	0.0	PO / QD 第 1-21 天	F/7	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 Balb/c 裸	TGI ^b	N/A
					平均最大 BWL% ^c	0%
化合物 A	12.5	PO / QD 第 1-21 天	F/7	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 Balb/c 裸	TGI ^b	58.9%
					ΔAUC ^d	55.4 (p < 0.001)
					平均最大 BWL% ^c	0%
化合物 A	50	PO / BIW 第 1 天、第 4 天、第 8 天、 第 11 天、第 15 天和第 18 天	F/7	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 Balb/c 裸	TGI ^b	59.4%
					ΔAUC ^d	62.7 (p < 0.001)
					平均最大 BWL% ^c	-0.1% (第 7 天)
					ΔAUC ^d	29.7 (p < 0.01)
					平均最大 BWL% ^c	0%
多西他赛	5	IV / QW 第 1 天、第 8	F/7	小鼠 (小家鼠)	TGI ^b	5.2%
					ΔAUC ^d	9.0 (p > 0.05)

处理组	剂量 (mg/kg)	施用方法/频 率	性别/ 数量/组	物种/ 品系	终点	发现	
		天和第 15 天		无胸腺 Balb/c 裸	平均最大 BWL% ^c	0%	
多西他赛	7.5	IV / QW 第 1 天、第 8 天和第 15 天	F/7	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 Balb/c 裸	TGI ^b	17.7%	
					ΔAUC ^d	18.4 (p < 0.05)	
					平均最大 BWL% ^c	2.5% (第 21 天)	
化合物 A + 多西他赛	12.5 5	PO / QD 第 1-21 天 IV / QW 第 1 天、第 8 天和第 15 天	F/7	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 Balb/c 裸	TGI ^b	69.1%	
					ΔAUC ^d	71.3 (p < 0.001)	
					协同作用分析 ^e	相加(p = 0.614)	
					平均最大 BWL% ^c	8.9% (第 21 天)	
[0253]	化合物 A + 多西他赛	12.5 7.5	PO / QD 第 1-21 天 IV / QW 第 1 天、第 8 天和第 15 天	F/7	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 Balb/c 裸	TGI ^b	69.4%
					ΔAUC ^d	75.4 (p < 0.001)	
					协同作用分析 ^e	相加(p = 0.926)	
					平均最大 BWL% ^c	14.0% (第 21 天)	
化合物 A + 多西他赛	50 7.5	PO / BIW 第 1 天、第 4 天、第 8 天、 第 11 天、第 15 天和第 18 天 IV / QW 第 1 天、第 8 天和第 15 天	F/7	小鼠 (小家鼠) 无胸腺 Balb/c 裸	TGI ^b	63.9%	
					ΔAUC ^d	71.5 (p < 0.001)	
					协同作用分析 ^e	相加(p = 0.360)	
					平均最大 BWL% ^c	8.0% (第 21 天)	
$\Delta AUC = \text{肿瘤体积对时间曲线下面积的变化}$; BIW = 每周两次; BWL = 体重损失; IV = 静脉内; N/A = 不适用; QD = 每天; QW = 每周; TGI = 肿瘤生长抑制; 媒介物 = 100% PEG400。 ^a 媒介物或化合物的剂量体积对于 PO 是 5 mL/kg 体重, 并且对于 IV 施用是 10 mL/kg。 ^b TGI 值是在处理开始后第 21 天计算的。 ^c 第 0 天至第 21 天之间的最大平均 BWL% ^d $\Delta AUC = \text{统计分析用线性混合效应回归模型进行。p 值} < 0.05 \text{ 被认为是显著的。}$ ^e 在处理开始后第 21 天计算的。							

[0254] 将每只动物用 2×10^6 个Calu-6肿瘤细胞(0.1mL中,与基质胶1:1)接种在右侧腹以用于肿瘤模型开发。每周两次监测体重和肿瘤生长。使用游标卡尺并应用公式 $V = W^2 \times L/2$ 将肿瘤大小测量到最接近0.1mm,其中V=体积,W=宽度且L=肿瘤异种移植物的长度。允许异种移植生长直到它们在14天后达到大约 220mm^3 的平均大小。将携带适当大小的异种移植植物的小鼠随机分配到上表中所示的组中的一个中,并开始用其指定的测试材料,媒介物(100%PEG400)、化合物A(12.5或50mg/kg)、多西他赛(5或7.5mg/kg)、或化合物A/多西他赛的组合处理。

[0255] 从动物分组当天开始每周两次测量肿瘤大小和体重。研究在处理开始后第35天终

止。

[0256] 通过计算在研究的第21天的TGI% (媒介物组的MTV-处理组的MTV) /媒介物组的MTV]来确定肿瘤生长的抑制。使用关于 Δ AUC的线性混合效应回归分析来进行处理组与媒介物之间肿瘤生长的统计学比较。

[0257] 统计检验

[0258] Δ AUC

[0259] 使用线性混合效应回归模型评定媒介物对照组与处理组之间随时间推移的肿瘤生长趋势的差异。这些模型考虑到在多个时间点测量每只动物。将一种模型拟合以用于所述比较，并且使用从所述模型预测的值来计算对照组和处理组的肿瘤体积对时间曲线下面积(AUC)。统计上显著的p值表明2个组(媒介物和处理)随时间推移的趋势是不同的。p值<0.05被认为是统计上显著的。关于成对比较的进一步细节提供在实施例2中。

[0260] 组合得分计算用于解决组合治疗的作用是相对于单独治疗协同的、相加的、次相加的还是拮抗的问题。如果协同作用得分小于0则所述作用被认为是协同的，并且如果协同作用得分与0没有统计学差异则所述作用被认为是相加的。如果协同作用得分大于零，但组合的平均AUC低于两种单一药剂处理中的最低平均AUC，则所述组合是次相加的。如果协同作用得分大于零，并且组合的平均AUC大于单一试剂处理中的至少一种的平均AUC，则所述组合是拮抗性的。

- [0001] 序列表
[0002] <110> Bozon, Viviana
[0003] Galvin, Katherine
[0004] Brake, Rachel
[0005] 米伦纽姆医药公司
[0006] <120> Raf抑制剂与紫杉烷的组合
[0007] <130> MPI14-028P2M
[0008] <160> 9
[0009] <170> 用于Windows 4.0版的FastSEQ
[0010] <210> 1
[0011] <211> 2949
[0012] <212> DNA
[0013] <213> 智人
[0014] <400> 1
[0015] cgcctccctt ccccccccccc gccccacagc ggccgctcg gccccggctc tcggttataa 60
[0016] gatggcgccgcttgagcggtg cggtgggtgg cggcgccggag ccggggccagg ctctgttcaa 120
[0017] cggggacatg gagccccgagg ccggcgccgg cgccggcgcc gcggcccttt cggctgcgga 180
[0018] ccctgccatt ccggaggagg tgtgaaatataaacaatg attaagttga cacaggaaca 240
[0019] tatagaggcc ctattggaca aatttgggtgg ggagcataat ccaccatcaa tatatctgga 300
[0020] ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgcactccaa caaagagaac aacagttatt 360
[0021] ggaatctctg ggaaacggaa ctgattttc tggttcttagc tctgcataa tggataccgt 420
[0022] tacatcttct tcctcttcta gccttcagt gctacccctca tctcttcag ttttcaaaa 480
[0023] tcccacagat gtggcacggc gcaaccccaa gtcaccacaa aaacccatcg ttagagtctt 540
[0024] cctgccccac aaacagagga cagtggtacc tgcaaggtgt ggagttacag tccgagacag 600
[0025] tctaaagaaa gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg tttacagaat 660
[0026] tcaggatgga gagaagaaac caattgggttgg gacactgtat atttcctggc ttactggaga 720
[0027] agaattgcat gtggaaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact ttgtacgaaa 780
[0028] aacgttttc accttagcat ttgtgactt ttgtcgaaag ctgctttcc agggtttccg 840
[0029] ctgtcaaaca tgtggttata aatttccacca gcgtttagt acagaagttc cactgatgtg 900
[0030] tggtaattat gaccaacttg atttgctgtt tgtctccaaat ttcttgaac accacccaaat 960
[0031] accacaggaa gaggcgtct tagcagagac tgccctaaaca tctggatcat ccccttccgc 1020
[0032] acccgccctcg gactctatttggccccaaat tctcaccagt ccgtctccctt caaaatccat 1080
[0033] tccaatttcca cagcccttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaatcaat ttgggcaacg 1140
[0034] agaccgatcc tcatcagctc ccaatgtgca tataaacaca atagaacctg tcaatattga 1200
[0035] tgacttgatt agagaccaag gattcgtgg tcatggagga tcaaccacag gtttgcgtgc 1260
[0036] taccctcccttgcctcattac ctggctcaact aactaacgtg aaaggcttac agaaatctcc 1320
[0037] aggacctcag cgagaaagga agtcatcttc atcctcagaa gacaggaatc gaatgaaaac 1380
[0038] acttggtaga cgggactcga gtgtgatttgg gggatttctt gatggcaga ttacagtgg 1440
[0039] acaaagaatt ggatctggat catttggaaac agtctacaag ggaagttggc atggtgatgt 1500
[0040] ggcagtggaaa atgttgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa 1560
[0041] tgaagtagga gtactcagga aaacacgaca tgtgaatatac ctactcttca tgggctattc 1620

[0042] cacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtgggtgag ggctccagct tgtatcacca 1680
 [0043] tctccatatac attgagacca aatttgagat gatcaaactt atagatattg cacgacagac 1740
 [0044] tgcacagggc atggattact tacacgcca gtcaatcatc cacagagacc tcaagagtaa 1800
 [0045] taatatattt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gatttggc tagctacagt 1860
 [0046] gaaatctgta tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca ttttgtggat 1920
 [0047] ggcaccagaa gtcatcagaa tgcaagataa aaatccatac agcttcagt cagatgtata 1980
 [0048] tgcatttggta attgttctgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa 2040
 [0049] caacaggac cagataattt ttatggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa 2100
 [0050] ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa 2160
 [0051] aagagatgag agaccactt ttccccaaat tctgcctctt attgagctgc tggcccgctc 2220
 [0052] attgccaaaa attcaccgca gtgcatcaga accctcctt aatcggtggc gtttccaaac 2280
 [0053] agaggatttt agtctatatg cttgtgttc tccaaaaaca cccatccagg cagggggata 2340
 [0054] tggtgcgtt cctgtccact gaaacaaaatg agtgagagag ttcaggagag tagcaacaaa 2400
 [0055] agaaaaataa atgaacatata gtttgctt atgttaaattt gaataaaaata ctctttttt 2460
 [0056] tttaaggtg aaccaaagaa cacttgggtg gttaaagact agatataattt ttccccaaa 2520
 [0057] ctaaaaattt tacttaacat tggattttt acatccaagg gttaaaatac atagacattt 2580
 [0058] ctaaaaattt gcagagcctc ttcttagggc ttactttt gttcgggtt tgtatcattt 2640
 [0059] acttggttt tttaagtagt aaacttcagt ttctcatgca acttttggc ccagctatca 2700
 [0060] catgtccact agggactcca gaagaagacc ctacctatgc ctgtgtttgc aggtgagaag 2760
 [0061] ttggcagtcg gttagcctgg gttagataag gcaaaactgaa cagatctaattt ttaggaagtc 2820
 [0062] agtagaattt aataattcta ttattattct taataatttt tctataacta ttctttttt 2880
 [0063] taacaattt gaaaatgtgg atgtttttt tttccttggaa gcaataaaact aagttttttt 2940
 [0064] ttataaaaa 2949
 [0065] <210> 2
 [0066] <211> 2301
 [0067] <212> DNA
 [0068] <213> 智人
 [0069] <400> 2
 [0070] atggcggcgc tgagcgggtgg cgggtggc ggcgcggagc cggggccaggc tctgttcaac 60
 [0071] ggggacatgg agcccgaggc cggcgccggc gccggcgcccg cggcccttgc ggctgcggac 120
 [0072] cctgccattt cggaggaggt gtggaatatc aaacaaatga ttaagttgac acaggaacat 180
 [0073] atagaggccc tattggacaa atttggtggg gagcataatc caccatcaat atatctggag 240
 [0074] gcctatgaag aatacaccag caagcttagat gcactccaac aaagagaaca acagttattt 300
 [0075] gaatctctgg ggaacggaaac tgatttttct gtttcttagt ctgcataat ggataccgtt 360
 [0076] acatcttctt cctttcttag ctttcagtg ctaccttcat ctcttcagt ttttcaaaat 420
 [0077] cccacagatg tggcacggag caaccccaag tcaccacaaa aaccttatcgt tagagtctt 480
 [0078] ctgccccaca aacagaggac agtggtaacct gcaaggtgtg gagttacagt ccgagacagt 540
 [0079] ctaaaagaaag cactgatgat gagaggtcta atcccagagt gctgtgtgt ttacagaattt 600
 [0080] caggatggag agaagaaacc aattgggtgg gacactgata tttcctggct tactggagaa 660
 [0081] gaattgcattt tggaagtgtt ggagaatgtt ccacttacaa cacacaactt tgtacgaaaa 720
 [0082] acgttttca ccttagcatt ttgtgacttt tgtcgaaagc tgctttcca gggttccgc 780
 [0083] tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cggtgttagta cagaagttcc actgatgtgt 840

[0084] gttaattatg accaacttga tttgctgtt gtctccaagt tcttgaaca ccacccaata 900
 [0085] ccacaggaag aggcgtcctt agcagagact gccctaacat ctggatcatc ccctccgca 960
 [0086] cccgcctcg actctattgg gccccaaatt ctcaccagtc cgttccttc aaaatccatt 1020
 [0087] ccaattccac agcccttccg accagcagat gaagatcatc gaaatcaatt tggcaacga 1080
 [0088] gaccgatcct catcagctcc caatgtcatc ataaacacaa tagaacctgt caatattgt 1140
 [0089] gacttgatta gagaccaagg atttcgttgt gatggaggat caaccacagg tttgtctgt 1200
 [0090] accccccctg cctcattacc tggctacta actaacgtga aagccttaca gaaatctcca 1260
 [0091] ggacctcagc gagaaggaa gtcatctca tcctcagaag acagaatcg aatgaaaaca 1320
 [0092] ctggtagac gggactcgag tcatgttgg gagattcctg atggcagat tacagtggg 1380
 [0093] caaagaattt gatctggatc atttggaca gtctacaagg gaaagtggca tggtgatgt 1440
 [0094] gcagtgaaaa tggtaatgt gacagcacct acacccatc agttacaagc cttcaaaaat 1500
 [0095] gaagtaggag tactcaggaa aacacgacat gtgaatatcc tactttcat gggctattcc 1560
 [0096] acaaaggccac aactggatc tgttacccag tgggtgtgagg gctccagctt gtatcaccat 1620
 [0097] ctccatatca ttgagaccaa atttggatg atcaaactta tagatattgc acgacagact 1680
 [0098] gcacaggcga tggattactt acacgccaag tcaatcatcc acagagacct caagagtaat 1740
 [0099] aatatatttc ttcatgaaga ctcacagta aaaataggta attttggct agctacagtg 1800
 [0100] aaatctcgat ggagtgggtc ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg 1860
 [0101] gcaccagaag tcatcagaat gcaagataaa aatccataca gcttcagtc agatgtatata 1920
 [0102] gcatttgaa ttgttctgtt tgaattgtt actggacagt taccttattc aaacatcaac 1980
 [0103] aacagggacc agataatttt tatggggcga cgaggatacc tgtctccaga tctcagtaag 2040
 [0104] gtacggagta actgtccaaa agccatgaag agattaatgg cagagtgcct caaaaagaaa 2100
 [0105] agagatgaga gaccactt tcccaaatt ctcgcctcta ttgagctgct ggcccgctca 2160
 [0106] ttgccaaaaa ttccaccgag tgcacgaa ccctccttga atcgggctgg tttccaaaca 2220
 [0107] gaggattta gtctatatgc ttgtgcttcc ccaaaaacac ccatccaggc agggggatata 2280
 [0108] ggtgcgttcc ctgtccactg a 2301
 [0109] <210> 3
 [0110] <211> 766
 [0111] <212> PRT
 [0112] <213> 智人
 [0113] <400> 3
 [0114] Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln
 [0115] 1 5 10 15
 [0116] Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly
 [0117] 20 25 30
 [0118] Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
 [0119] 35 40 45
 [0120] Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
 [0121] 50 55 60
 [0122] Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
 [0123] 65 70 75 80
 [0124] Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
 [0125] 85 90 95

[0126]	Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser		
[0127]	100	105	110
[0128]	Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu		
[0129]	115	120	125
[0130]	Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val		
[0131]	130	135	140
[0132]	Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe		
[0133]	145	150	155
[0134]	Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr		
[0135]	165	170	175
[0136]	Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro		
[0137]	180	185	190
[0138]	Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile		
[0139]	195	200	205
[0140]	Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val		
[0141]	210	215	220
[0142]	Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys		
[0143]	225	230	235
[0144]	240		
[0145]	Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe		
[0146]	245	250	255
[0147]	Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys		
[0148]	260	265	270
[0149]	Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu		
[0150]	275	280	285
[0151]	Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu		
[0152]	290	295	300
[0153]	Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala		
[0154]	305	310	315
[0155]	320		
[0156]	Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro		
[0157]	325	330	335
[0158]	Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp		
[0159]	340	345	350
[0160]	His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn		
[0161]	355	360	365
[0162]	Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg		
[0163]	370	375	380
[0164]	Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala		
[0165]	385	390	395
[0166]	400		
[0167]	Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu		
[0168]	405	410	415
[0169]	Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser		
[0170]	420	425	430

[0168]	Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp		
[0169]	435	440	445
[0170]	Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly		
[0171]	450	455	460
[0172]	Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val		
[0173]	465	470	475
[0174]	Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln		
[0175]	485	490	495
[0176]	Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn		
[0177]	500	505	510
[0178]	Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val		
[0179]	515	520	525
[0180]	Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile		
[0181]	530	535	540
[0182]	Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr		
[0183]	545	550	555
[0184]	Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp		
[0185]	565	570	575
[0186]	Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile		
[0187]	580	585	590
[0188]	Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His		
[0189]	595	600	605
[0190]	Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val		
[0191]	610	615	620
[0192]	Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr		
[0193]	625	630	635
[0194]	Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr		
[0195]	645	650	655
[0196]	Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly		
[0197]	660	665	670
[0198]	Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala		
[0199]	675	680	685
[0200]	Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Arg Asp Glu Arg		
[0201]	690	695	700
[0202]	Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser		
[0203]	705	710	715
[0204]	Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala		
[0205]	725	730	735
[0206]	Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys		
[0207]	740	745	750
[0208]	Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His		
[0209]	755	760	765

[0252] aaatgaagtg agatggcatg gtgagggtcaa agtatactg gactaggaag aaggtgactt 2280
 [0253] aggttctaga taggtgtctt ttaggactct gatttgagg acatcaactt ctatccattt 2340
 [0254] cttcatgtta aaagaagtca tctcaaactc ttagttttt tttttacaa ctatgttaatt 2400
 [0255] tatattccat ttacataagg atacacttat ttgtcaagct cagcacaatc tgtaaatttt 2460
 [0256] taacctatgt tacaccatct tcagtgcag tcctggccaa aattgtgcaa gaggtgaagt 2520
 [0257] ttatattga atatccattc tcgttttagg actcttcttc catattagtg tcatcttgcc 2580
 [0258] tccttacctt ccacatgccc catgacttga tgcaagttt atacttgtaa ttcccctaac 2640
 [0259] cataagattt actgctgctg tggatatctc catgaagttt tcccactgag tcacatcaga 2700
 [0260] aatgccctac atcttatttc ctcaaggctc aagagaatct gacagatacc ataaagggat 2760
 [0261] ttgacctaattt cactaatttt caggtggtgg ctgatgctt gaacatctct ttgctgccc 2820
 [0262] atccattagc gacagtagga ttttcaaac ctggatgaa tagacagaac cctatccagt 2880
 [0263] ggaaggagaa ttaataaaag atagtgtga aagaattct tagtaatct ataacttagga 2940
 [0264] ctactcctgg taacagtaat acattccatt gtttttagtaa ccagaaatct tcattgcaatg 3000
 [0265] aaaaataactt taattcatga agcttacttt tttttttgg tgtcagagtc tcgctttgt 3060
 [0266] cacccaggct ggaatgcagt ggcgccatct cagctcactg caacctccat ctcccagggtt 3120
 [0267] caagcgattc tcgtgcctcg gcctcctgag tagctggat tacaggcgtg tgccactaca 3180
 [0268] ctcaactaat tttgtattt ttaggagaga cggggttca ccctgttggc caggctggc 3240
 [0269] tcgaactcct gacctaagg gattcacca ccttggccctc ataaacctgt tttgcagaac 3300
 [0270] tcatttatttca agcaaataattt tattgagtgc ctaccagatg ccagtcaccg cacaaggcac 3360
 [0271] tgggtatatg gtatccccaa acaagagaca taatcccggt ccttaggtag tgcttagtgc 3420
 [0272] gtctgtaata tcttactaag gcctttggta tacgaccagg agataacacg atgcgtattt 3480
 [0273] tagtttgca aagaagggtt ttggctctg tgccagctt ataaattgtt tgctacgatt 3540
 [0274] ccactgaaac tcttcgatca agctacttta tgtaaatcac ttcattgttt taaaggaaata 3600
 [0275] aacttgatta tattttttt ttatggca taactgtgat tcttttagga caattactgt 3660
 [0276] acacattaag gtgtatgtca gatattcata ttgaccctaa tgttaatatt tccagtttc 3720
 [0277] tctgcataag taattaaaat atactaaaaa attaatagtt ttatctgggt acaaataaaac 3780
 [0278] aggtgcctga actagttcac agacaaggaa acttctatgt aaaaatcaat atgatttctg 3840
 [0279] aattgctatg taaaactaca gatctttgga acactgttta ggttaggggtgtaaagacttac 3900
 [0280] acagtacctc gtttctacac agagaaagaa atggccatac ttcaggaact gcagtgctt 3960
 [0281] tgagggata tttaggcctc ttgaattttt gatgttagatg ggcattttt taaggttagt 4020
 [0282] gtaatttacc ttatgtgaa cttgaatgg tttacaaaaa gattttttt ttttagagatt 4080
 [0283] taaaaggggg agaattctag aaataaaatgt tacctaatta ttacagccctt aaagacaaaaa 4140
 [0284] atccttggta aagttttttt aaaaaaaagct aaattacata gacttaggca ttaacatgtt 4200
 [0285] tgtggaagaa tatagcagac gtatattgtt tcatttgagt gaatgttccc aagtagggcat 4260
 [0286] tctaggctct atttaactga gtcacactgc attagaattt agaacctaac tttttaggtt 4320
 [0287] tatcaaaact gttgtcacca ttgcacaatt ttgtcctaattt atatacatag aaactttgt 4380
 [0288] gggcatgtta agttacagtt tgccacaaggat catctcattt gtattccatt gatttttttt 4440
 [0289] ttcttctaaa catttttct tcaaacagta tataactttt ttttagggat ttttttttag 4500
 [0290] acagcaaaaaa ctatctgaag attccattt gtcaaaaagt aatgatttct tgataattgt 4560
 [0291] gtagtaatgt tttttagaaac ccagcagttt ccttaaaagct gaatttatattt ttagtaactt 4620
 [0292] ctgtgttaat actggatagc atgaattctg cattgagaaa ctgaatagct gtcataaaaat 4680
 [0293] gaaactttct ttctaaagaa agatactcac atgagttttt gaagaatagt cataactaga 4740

- [0294] ttaagatctg tgtttagtt taatagttt aagtgcctgt ttgggataat gataggtaat 4800
[0295] ttagatgaat ttagggaaa aaaaagttat ctgcagatat gttgagggcc catctctccc 4860
[0296] cccacacccc cacagagcta actgggttac agtgtttat ccgaaagtt ccaattccac 4920
[0297] tgtcttgtt tttcatgtt aaaaacttt tgcattttc ctttgagtgc caattctta 4980
[0298] ctagtactat ttcttaatgt aacatgttta cctggaatgt attttaacta ttttgtata 5040
[0299] gtgtaaactg aaacatgcac atttgtaca ttgtgcttc ttttgtggg catatgcagt 5100
[0300] gtgatccagt tgccccat cattgggtt cgctgaccta ggaatgttgg tcatatcaa 5160
[0301] cattaaaaat gaccacttt ttaattgaaa ttaactttt aatgtttata ggagtatgt 5220
[0302] ctgtgaagtg atctaaaatt tgtaatattt ttgtcatgaa ctgtactact cctaattatt 5280
[0303] gtaatgtaat aaaaatagtt acagtgacta tgagtgtgta tttattcatg aaatttgaac 5340
[0304] tgcccccc gaaatggata tggaataactt tataagccat agacactata gtataccagt 5400
[0305] gaatctttt tgcagcttgt tagaagtatc ctttatttct aaaaggtgct gtggatatta 5460
[0306] tgtaaaggcg tgccatgtt aactaaaaac catattaga agtagatgca aaacaaatct 5520
[0307] gccttatga caaaaaaaa ggataacatt atttattt ttccttttcaaagaaggt 5580
[0308] aattgataca caacaggtga ctgggttta gcccaaagg tagcagcagc aacattaata 5640
[0309] atggaaataa ttgaatagtt agttatgtat gttatgccat gtcaccagca ggctattca 5700
[0310] aggtcagaag taatgactcc atacatatta tttatttcta taactacatt taaatcatta 5760
[0311] ccagg 5765
[0312] <210> 5
[0313] <211> 567
[0314] <212> DNA
[0315] <213> 智人
[0316] <400> 5
[0317] atgactgaat ataaacttgt ggttagttt gctggggcg taggcaagag tgccttgacg 60
[0318] atacagctaa ttccagaatca ttttggac gaaatgtatc caacaataga ggattcctac 120
[0319] aggaagcaag tagtaatttga tggagaaacc tgcgttggat atattctcgac cacagcaggt 180
[0320] caagaggagt acagtgcattt gaggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttcttgc 240
[0321] gtatggca taaataatac taaatcattt gaagatattt accattatag agaacaattt 300
[0322] aaaagagttt aggactctga agatgtaccc atggccttag taggaatataa atgtgatttgc 360
[0323] cttcttagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagttt tggaattcct 420
[0324] tttatttggaa catcagcaaa gacaagacag ggtttgtatg atgccttcta tacattttttt 480
[0325] cgagaaattt gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag 540
[0326] tcaaagacaa agtgtgtat tatgtaa 567
[0327] <210> 6
[0328] <211> 188
[0329] <212> PRT
[0330] <213> 智人
[0331] <400> 6
[0332] Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
[0333] 1 5 10 15
[0334] Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
[0335] 20 25 30

[0336] Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 [0337] 35 40 45
 [0338] Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 [0339] 50 55 60
 [0340] Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 [0341] 65 70 75 80
 [0342] Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 [0343] 85 90 95
 [0344] Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 [0345] 100 105 110
 [0346] Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 [0347] 115 120 125
 [0348] Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 [0349] 130 135 140
 [0350] Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 [0351] 145 150 155 160
 [0352] Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
 [0353] 165 170 175
 [0354] Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
 [0355] 180 185
 [0356] <210> 7
 [0357] <211> 4454
 [0358] <212> DNA
 [0359] <213> 智人
 [0360] <400> 7
 [0361] gaaaacgtccc gtgtgggagg ggccgggtctg ggtgcggcct gccgcattgac tcgtggttcg 60
 [0362] gaggccccacg tggccggggc gggactcag ggcgcctgggg cggccactga ttacgttagcg 120
 [0363] ggcggggcccg gaagtgcgcgc tccttggtgg gggctgttca tggcggttcc ggggtctcca 180
 [0364] acattttcc cggctgtggc cctaaatctg tccaaagcag aggcaatggc gcttgagggtt 240
 [0365] ctgtcgtgt tgaaatgact gagtacaaac tggctgtgg tggagcaggt ggtgttggg 300
 [0366] aaagcgcact gacaatccag ctaatccaga accacttgtt agatgaatat gatcccacca 360
 [0367] tagaggattc ttacagaaaa caagtggta tagatggta aacctgtttt ttggacatac 420
 [0368] tggatacagc tggacaagaa gagtacagt ccatgagaga ccaatacatg aggacaggcg 480
 [0369] aaggcttcct ctgtgtattt gccatcaata atagcaagtc atttgcggat attaacctct 540
 [0370] acaggggagca gattaagcga gtaaaaagact cggatgtatgt acctatggc ttagtggaa 600
 [0371] acaagtgtga tttgccaaca aggacagttt atacaaaaca agcccacgaa ctggccaaga 660
 [0372] gttacgggat tccattcatt gaaacctcag ccaagaccag acagggtgtt gaagatgctt 720
 [0373] ttacacact ggtaagagaa atacgccagt accgaatgaa aaaactcaac agcagtgtt 780
 [0374] atgggactca gggttgtatg ggattgccat gtgtgggtat gtaacaagat acttttaaag 840
 [0375] tttgtcaga aaagagccac ttcaagctg cactgacacc ctggcctgta cttccctgga 900
 [0376] ggagaagtat tcctgttgcgt tccttcagtc tcacagagaa gctcctgcta cttccccagc 960
 [0377] tctcagtagt ttagtacaat aatctctatt tgagaagttc tcagaataac tacctcctca 1020

[0378] cttggctgtc tgaccagaga atgcacccct tgttactccc tgttattttt ctgcctggg 1080
[0379] ttcttccaca gcacaaacac acctctgcca ccccagggtt ttcatctgaa aagcagttca 1140
[0380] tgtctgaaac agagaaccaa accgcaaaacg tgaattcta ttgaaaacag tgtcttgagc 1200
[0381] tctaaagtag caactgctgg tgatttttt ttctttta ctgtgaact tagaactatg 1260
[0382] ctaattttg gagaaatgtc ataaattact gtttgccaa gaatatagtt attattgctg 1320
[0383] tttggttgt ttataatgtt atcggctcta ttctctaaac tggcatctgc tctagattca 1380
[0384] taaataaaaa aatgaatact gaatttttag tctatcctag tcttcacaac tttgacgtaa 1440
[0385] ttaaatccaa cttcacagt gaagtgcctt ttccctagaa gtggttgt gactccctt 1500
[0386] ataataatttc agtggaatag atgtctcaaa aatcctttag catgaaatga atgtctgaga 1560
[0387] tacgtctgtg acttatctac cattgaagga aagctatatac tatttgagag cagatgccat 1620
[0388] tttgtacatg tatgaaattt gtttccaga ggcctgttt ggggcttcc caggagaaag 1680
[0389] atgaaactga aagcacatga ataatttcac ttaataattt ttacctaatac tccactttt 1740
[0390] tcataggtt ctacccatac aatgtatgtt atttgtttcc cctagcttac tgataaacct 1800
[0391] aatattcaat gaacttccat ttgtattcaa atttgtgtca taccagaaaag ctctacattt 1860
[0392] gcagatgttcc aaatattgtt aaactttggt gcattgttat ttaatagctg tgatcagtga 1920
[0393] ttttcaaaacc tcaaataatag tatattaaca aattacattt tcactgtata tcatggtatac 1980
[0394] ttaatgatgt atataattgc cttcaatccc cttctcaccc caccctctac agctcccccc 2040
[0395] acagcaatag gggcttgatt atttcagttg agttaaagcat ggtgctaata gaccagggtc 2100
[0396] acagttcaaa aacttgaaca atccagttag catcacagag aaagaaattt ttctgcattt 2160
[0397] gctcattgca ccagtaactc cagctagtaa ttttgcttagg tagctgcagt tagccctgca 2220
[0398] aggaaagaag aggtcagttt gcacaaacccc ttaccatga ctggaaaact cagttatcacg 2280
[0399] tatttaaaca ttttttttc ttttagccat gtagaaactc taaattaagc caatattctc 2340
[0400] atttgagaat gaggatgtct cagctgagaa acgtttaaa ttctctttt tcataatgtt 2400
[0401] ctttgaaggg tttaaaacaa gatgttgata aatctaagct gatgagtttgc tcaaaaacag 2460
[0402] gaagttgaaa ttgttgagac aggaatggaa aatataatta attgataacct atgaggattt 2520
[0403] ggaggcttgg cattttaaatt tgcagataat accctggtaa ttctcatgaa aaatagactt 2580
[0404] ggataacttt tgataaaaaga ctaattccaa aatggccact ttgttcctgt cttaatatac 2640
[0405] taaatactta ctgaggtcct ccatcttcta tattatgaat ttcatttt taagcaaatg 2700
[0406] tcatattacc ttgaaattca gaagagaaga aacatatact gtgtccagag tataatgaac 2760
[0407] ctgcagagtt gtgcttctta ctgctaattc tggagctt cacagtactg tcatcatttgc 2820
[0408] taaatggaaa ttctgctttt ctgtttctgc tcctctgga gcagtgtac tctgttaattt 2880
[0409] tcctgaggct tattcacctca gtcatttctt tttaaatgt ctgtgactgg cagtgattct 2940
[0410] ttttcttaaa aatctattaa atttgatgtc aaatttaggaa gaaagatagt tactcatctt 3000
[0411] gggcttgc gccaatagcc cttgtatgtt tgactttaga gtttccaag tatgttctaa 3060
[0412] gcacagaagt ttctaaatgg ggccaaaattt cagacttgag tatgttctt gaataccctt 3120
[0413] agaagttaca attagccggg catggtgcc cgtgcctgtt gtcccaagctt cttgagaggc 3180
[0414] tgaggcagga gaatcacttc aacccaggag gtggaggtt cagtgagcag agatcgtgcc 3240
[0415] actgcactcc agcctgggtt acaagagaga cttgtctcca aaaaaaaagt tacacctagg 3300
[0416] tgtgaattttt ggcacaaagg agtgacaaac ttatagttaa aagctgaata acttcagtgt 3360
[0417] ggtataaaaac gtggttttt ggctatgtttt gtgattgtc aaaagaattt tagtttacct 3420
[0418] caaaaatccctt ctctttcccc aaattaagtg cctggccagc tgcataataat tacatattcc 3480
[0419] ttttggttttt tttaaagggtt acatgttcaa gagtgaaaat aagatgttct gtctgaaggc 3540

[0420] taccatgccg gatctgtaaa tgaacctgtt aaatgctgta tttgctccaa cggcttacta 3600
 [0421] tagaatgtta cttaatacaat ttcataactt attacaattt ttactatagg agtgtatag 3660
 [0422] gtaaaaattaa tctctatttt agtggccca tggtagtct ttcaccatcc tttaaactgc 3720
 [0423] tgtgaatttt tttgtcatga ctgaaagca aggatagaga aacacttag agatatgtgg 3780
 [0424] gttttttta ccattccaga gctgtgagc ataatcatat ttgccttata tttatagtca 3840
 [0425] tgaactccta agttggcagc tacaaccaag aaccaaaaaa tggtcggttc tgcttcttg 3900
 [0426] aattcatctc tgctaataaa ttataagaag caaggaaaat tagggaaaat attttatttg 3960
 [0427] gatggtttct ataaacaagg gactataatt cttgtacatt attttcatc ttgcgtt 4020
 [0428] cttgagcag tctaattgtgc cacacaatta tctaaggat ttgtttcta taagaattgt 4080
 [0429] tttaaaagta ttcttggtac cagagtagtt gtattatatt tcaaaacgta agatgatttt 4140
 [0430] taaaagcctg agtactgacc taagatggaa ttgtatgaac tctgctctgg agggagggaa 4200
 [0431] ggatgtccgt ggaagttgtc agactttat tttttgtgc catcaaatat aggtaaaaat 4260
 [0432] aattgtgcaat ttctgctgtt taaacaggaa ctattggcct cttggccct aatggagg 4320
 [0433] gccgatattt taagttgatt attttattgt aaattaatcc aacctagttc ttttaattt 4380
 [0434] gttgaatgt ttttctgt taaatgatgt ttaaaaataaaaactggaa gttcttggt 4440
 [0435] tagtcataat tctt 4454
 [0436] <210> 8
 [0437] <211> 570
 [0438] <212> DNA
 [0439] <213> 智人
 [0440] <400> 8
 [0441] atgactgagt acaaactgg ggtgggttgg gcagggtggc ttggaaaaag cgcactgaca 60
 [0442] atccagctaa tccagaacca cttgttagat gaatatgatc ccaccataga ggattcttac 120
 [0443] agaaaacaag tggttataga tggtaaacc tggtagttgg acatactggc tacagctgg 180
 [0444] caagaagagt acagtccat gagagacca tacatgaggg caggcgaagg cttcctctgt 240
 [0445] gtatttgcca tcaataatag caagtcattt gcggatatta acctctacag ggagcagatt 300
 [0446] aagcgagtaa aagactcgga tggatgtaccc atggtgcttag tggaaaacaa gtgtgatttg 360
 [0447] ccaacaagga cagttgatac aaaacaagcc cacgaactgg ccaagagttt cgggattcca 420
 [0448] ttcattgaaa cctcagccaa gaccagacag ggtgttgaag atgctttta cacactggta 480
 [0449] agagaaatac gccagtaccg aatgaaaaaa ctcaacagca gtgatgtgg gactcagggt 540
 [0450] tgtatggat tgccatgtgt ggtgtatgtaa 570
 [0451] <210> 9
 [0452] <211> 189
 [0453] <212> PRT
 [0454] <213> 智人
 [0455] <400> 9
 [0456] Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 [0457] 1 5 10 15
 [0458] Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 [0459] 20 25 30
 [0460] Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 [0461] 35 40 45

[0462]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr		
[0463]	50	55	60
[0464]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys		
[0465]	65	70	75
[0466]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr		80
[0467]	85	90	95
[0468]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val		
[0469]	100	105	110
[0470]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys		
[0471]	115	120	125
[0472]	Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr		
[0473]	130	135	140
[0474]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val		
[0475]	145	150	155
[0476]	Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp		160
[0477]	165	170	175
[0478]	Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met		
[0479]	180	185	

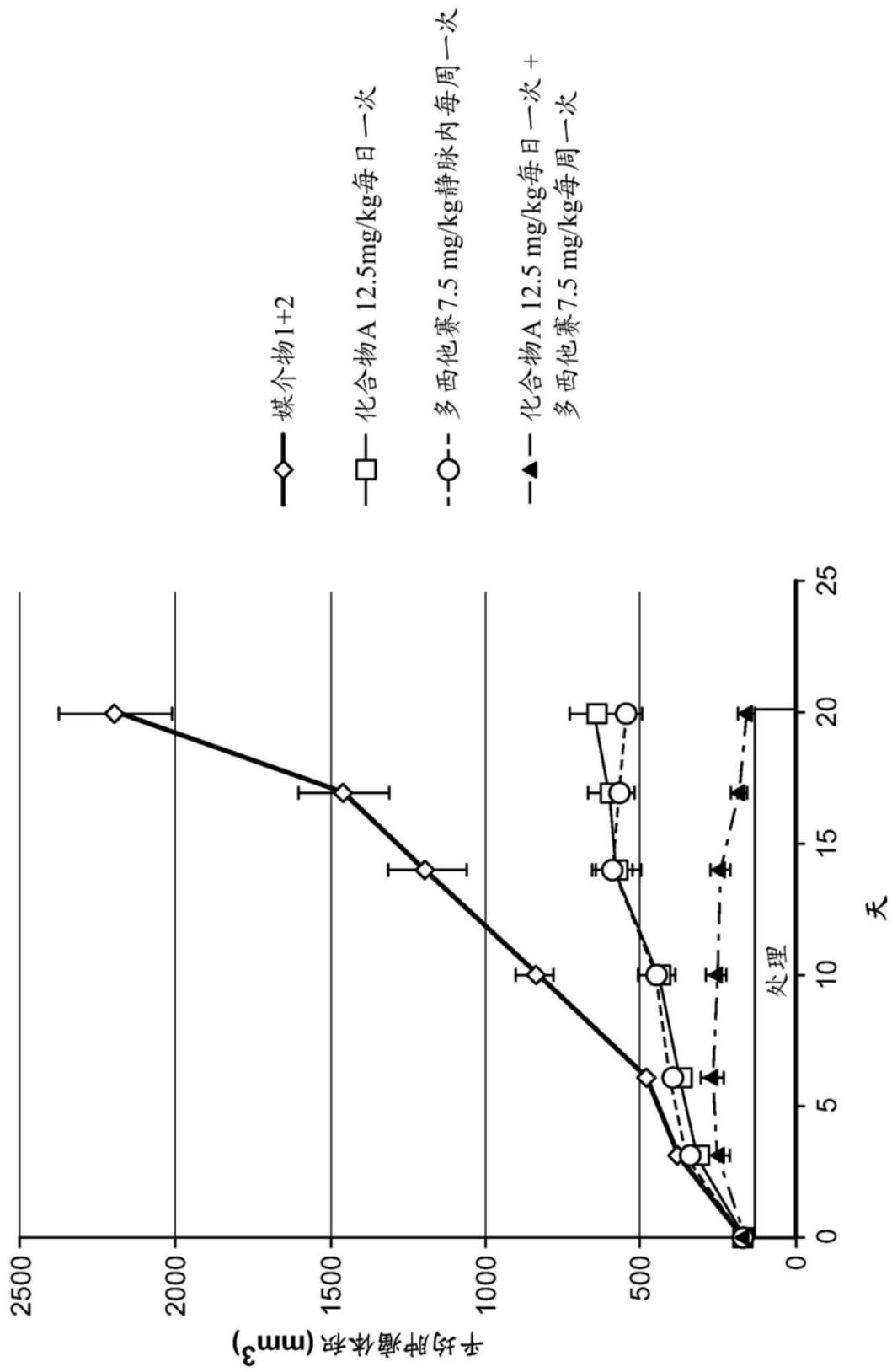


图1

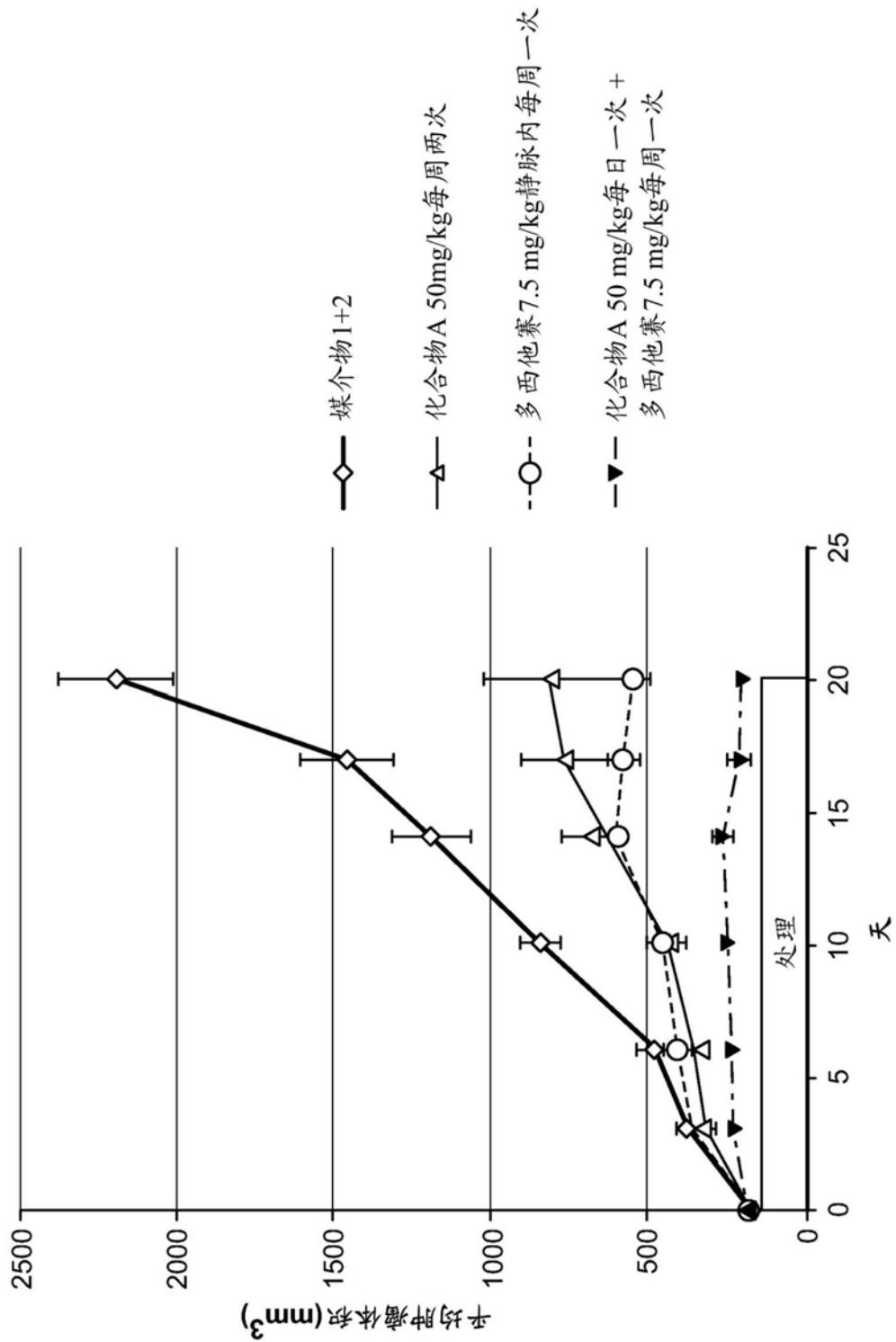


图2

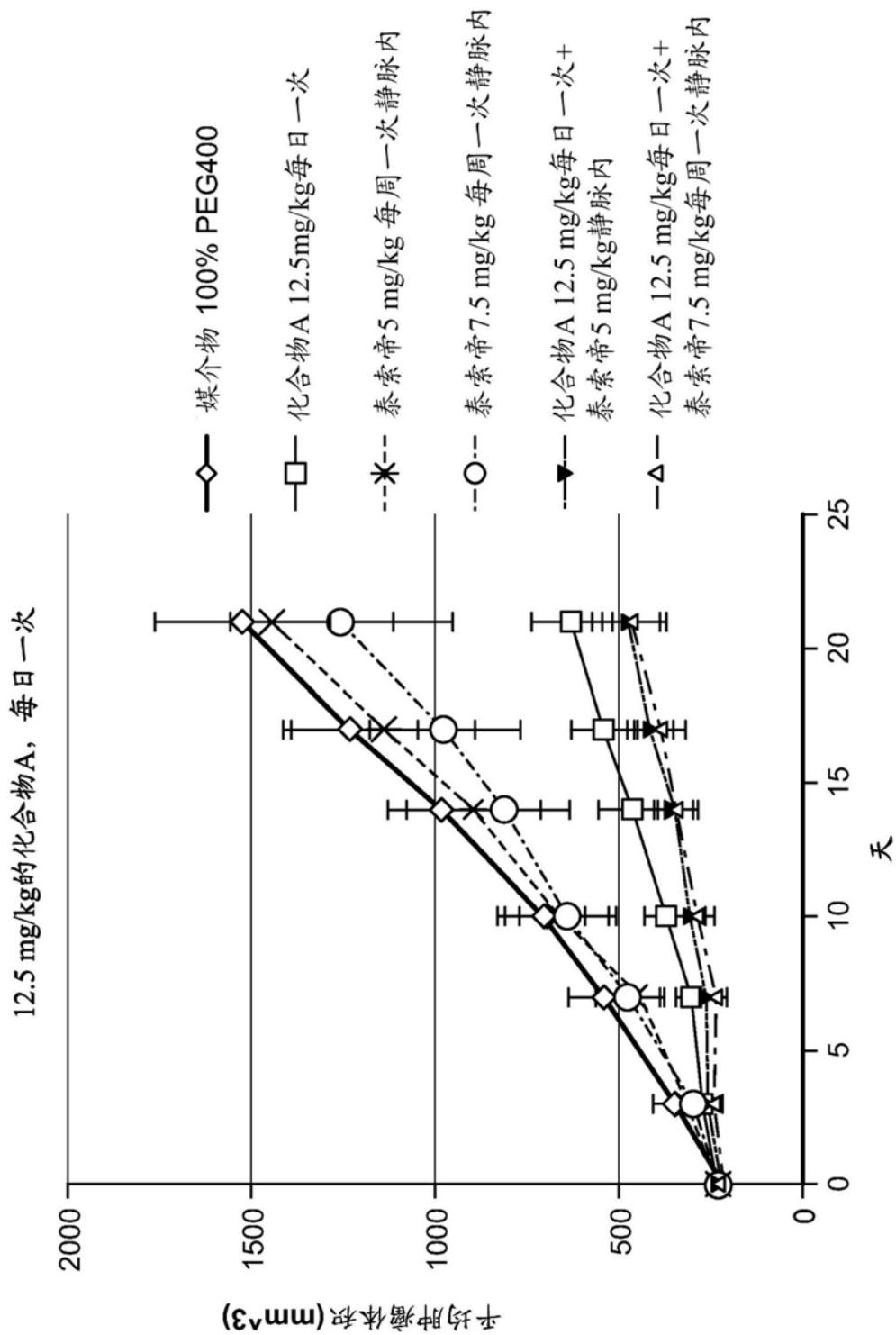


图3

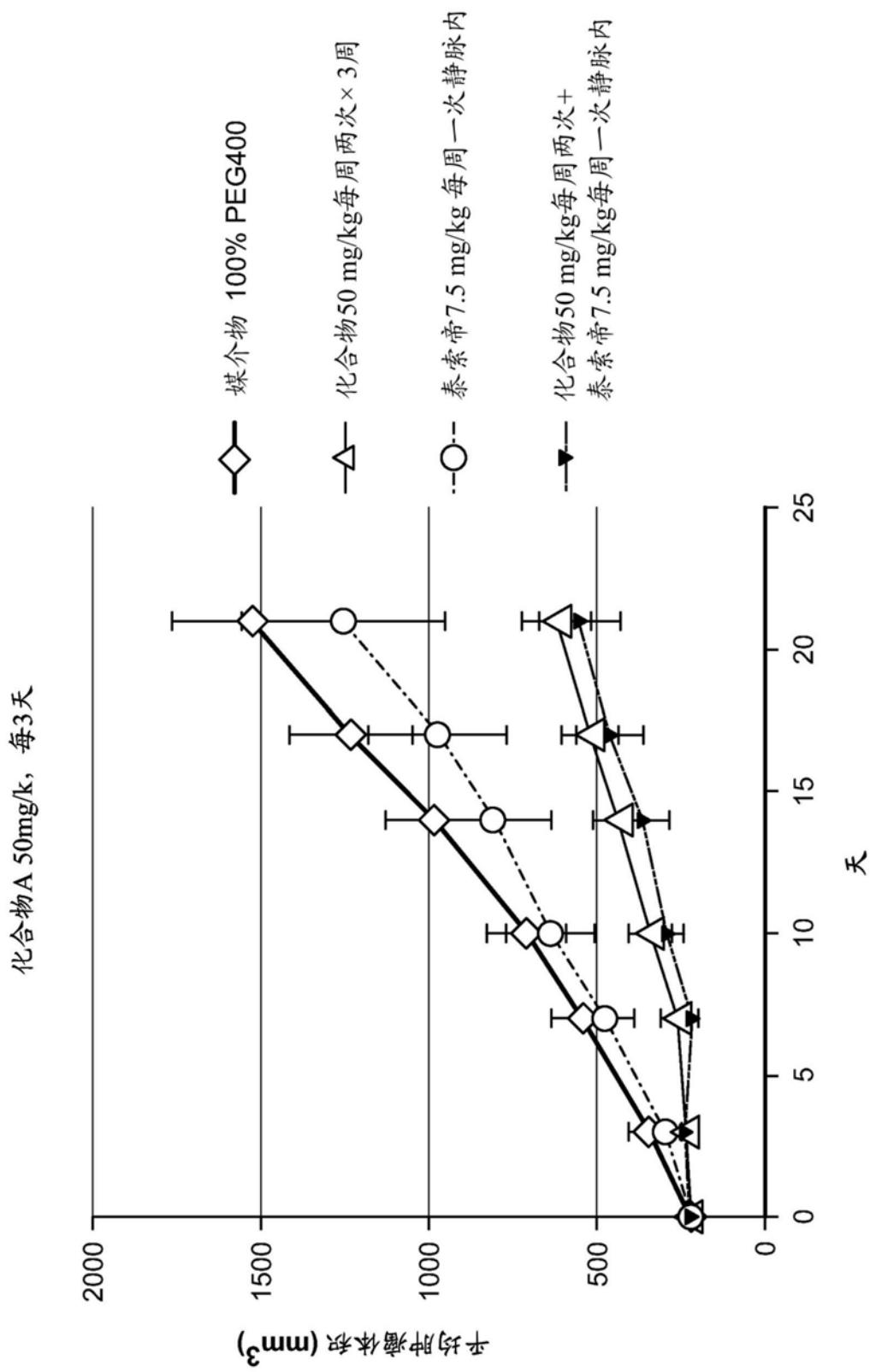


图4