



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102083824 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 01

(21) 申请号 200980126159. 5

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2009. 05. 05

11105

代理人 张平元

(30) 优先权数据

61/050, 322 2008. 05. 05 US

(51) Int. Cl.

C07D 413/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C07D 401/00 (2006. 01)

2011. 01. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/042768 2009. 05. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/137429 EN 2009. 11. 12

(71) 申请人 葛兰素史密斯克莱有限责任公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 托纳·M·吉尔莫

詹姆斯·G·格雷格 刘莉 石红

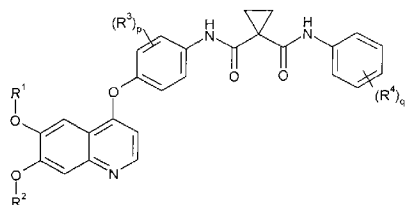
权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 9 页

(54) 发明名称

使用 cMET 和 AXL 抑制剂和 ErbB 抑制剂治疗癌症的方法

(57) 摘要

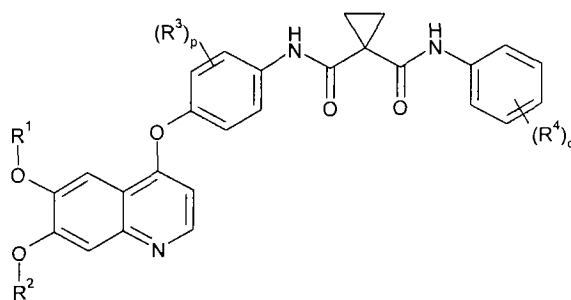
本发明涉及治疗患者的癌症的方法,其包括给予所述患者治疗有效量的:a) 式 A 化合物或其可药用盐,其中 R^1 - R^4 、p 和 q 如定义的那样;以及 (b) erbB 抑制剂,其抑制 erbB-1 或 erbB-2 或 erbB-3 受体或它们的组合。本发明的方法致力于在本领域中发现一种组合疗法的需要,所述组合疗法显示出比先前披露的疗法更有效的证据。



A

1. 治疗患者的癌症的方法,其包括给予所述患者治疗有效量的:

a) 式 A 化合物:



A

或其可药用盐;以及

(b) erbB 抑制剂,其抑制 erbB-1 或 erbB-2 或 erbB-3 受体或它们的组合;

其中

R^1 为 C_1-C_6 -烷基;

R^2 为 C_1-C_6 -烷基或 $-(CH_2)_n-N(R^5)_2$;

R^3 为 Cl 或 F;

R^4 为 Cl 或 F;

各 R^5 独立为 C_1-C_6 -烷基,或与它们所连接的氮原子一起形成吗啉代、哌啶基或吡嗪基;

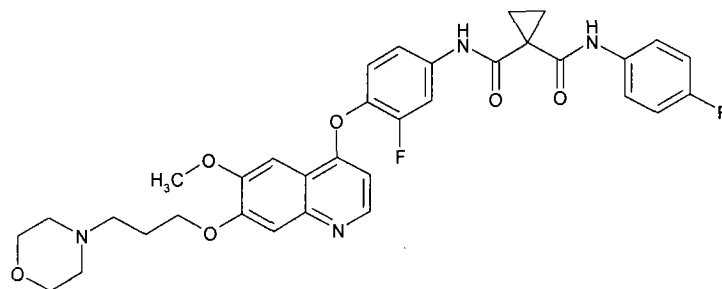
n 为 2、3 或 4;

p 为 0 或 1;以及

q 为 0、1 或 2。

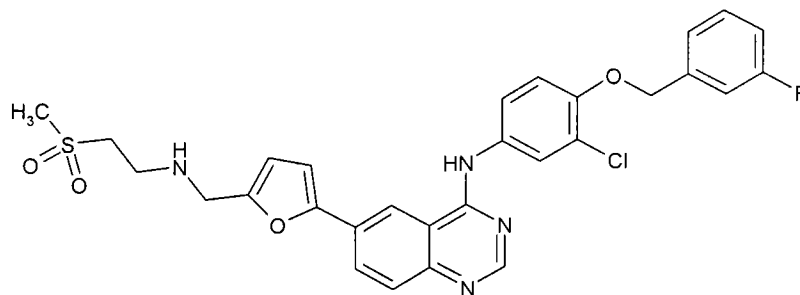
2. 权利要求 1 的方法,其中 q 为 0 或 1;以及 R^1 为甲基。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中式 A 化合物由式 I 化合物或其可药用盐表示:



I

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的方法,其中所述 erbB 抑制剂为式 II 化合物:

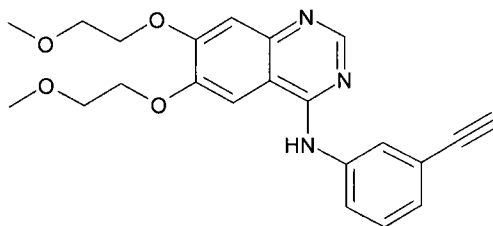


II

或其可药用盐。

5. 权利要求 4 的方法, 其中所述 erb 抑制剂为式 II 化合物的二甲苯磺酸盐或二甲苯磺酸盐一水合物。

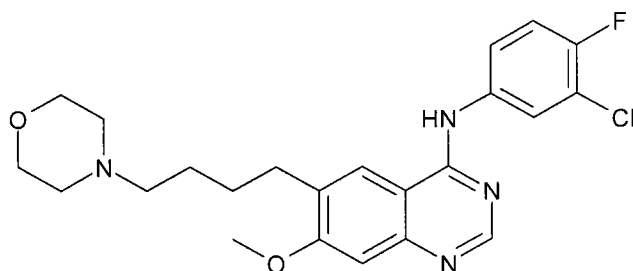
6. 权利要求 1 至 3 中任一项的方法, 其中所述 erbB 抑制剂为式 III 化合物:



III

或其可药用盐。

7. 权利要求 1 至 3 中任一项的方法, 其中所述 erbB 抑制剂为式 IV 化合物:



IV

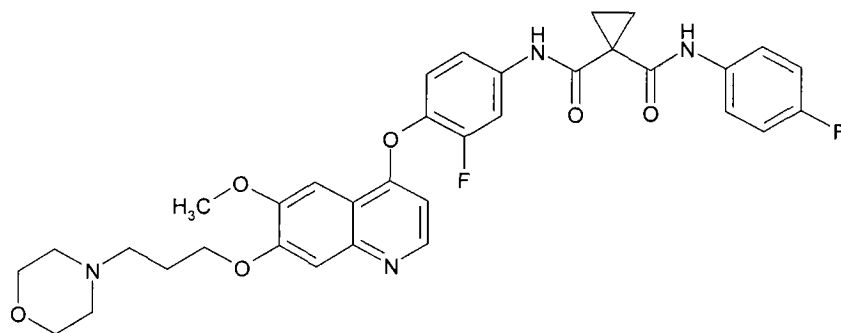
8. 权利要求 1 至 3 中任一项的方法, 其中所述 erbB 抑制剂为曲妥珠单抗。

9. 权利要求 1 至 3 中任一项的方法, 其中所述 erbB 抑制剂为西妥昔单抗。

10. 权利要求 1 至 3 中任一项的方法, 其中所述 erbB 抑制剂为单克隆抗人 erbB3 抗体。

11. 权利要求 1 至 10 中任一项的方法, 其中所述癌症为胃癌、肺癌、食管癌、头颈癌、皮肤癌、表皮癌、卵巢癌或乳腺癌。

12. 治疗患有乳腺癌或头颈癌的患者, 其包括给予所述患者治疗有效量的式 I 化合物:



I

或其可药用盐。

13. 权利要求 12 的方法, 其为治疗患有乳腺癌的患者。

14. 权利要求 12 的方法, 其为治疗患有头颈癌的患者。

15. 权利要求 1 至 14 中任一项的方法, 其中可药用赋形剂与式 A 化合物或可药用盐;

或与 erbb 抑制剂 ;或与它们的组合包括在一起。

使用 cMET 和 AXL 抑制剂和 ErbB 抑制剂治疗癌症的方法

[0001] 相关申请数据

[0002] 本申请要求 2008 年 5 月 5 日提交的美国临时申请 61/050322 的优先权。

背景技术

[0003] 本发明涉及用靶向多种激酶（包括 cMET 和 AXL）的抑制剂与 ErbB 抑制剂组合来治疗癌症的方法。

[0004] 一般而言，癌症起因于控制细胞分裂、分化和凋亡的正常过程的失调（deregulation）。凋亡（程序性细胞死亡）在胚胎发育和各种疾病如变性神经元疾病（degenerative neuronal disease）、心血管疾病和癌症的致病中起着关键作用。一种最常研究的途径，其涉及凋亡的激酶调节，是从细胞表面的生长因子受体到细胞核的细胞信号转导（Crews and Erikson, Cell, 74 :215-17, 1993），具体而言，是来自 erbB 家族的生长因子受体的细胞信号转导。

[0005] ErbB-1（也已知为 EGFR 或 HER1）和 erbB-2（也已知为 HER2）是 erbB 家族的蛋白酪氨酸激酶跨膜生长因子受体。蛋白酪氨酸激酶催化在调节细胞生长和分化中涉及的各种蛋白中的特异性酪氨酸残基的磷酸化（A. F. Wilks, Progress in Growth Factor Research, 1990, 2, 97-111 ; S. A. Courtneidge, Dev. Supp. 1, 1993, 57-64 ; J. A. Cooper, Semin. Cell Biol., 1994, 5(6), 377-387 ; R. F. Paulson, Semin. Immunol., 1995, 7(4), 267-277 ; A. C. Chan, Curr. Opin. Immunol., 1996, 8(3), 394-401）。

[0006] ErbB-3（也已知为 HER3）为 erbB 家族的生长因子受体，其具有配体结合域但缺乏内源性酪氨酸激酶活性。HER3 通过一种其细胞外配体（例如，heregulin (HRG)）活化，然后变成用于二聚作用和随后通过 HER1、HER2 和 HER4 磷酸化的底物；正是这种磷酸化的 HER3 导致了促有丝分裂或转化作用的细胞信号转导途径的活化。

[0007] 这些受体酪氨酸激酶在上皮组织、间充质组织（mesenchymal tissue）和神经元组织中广泛表达，在这些组织中它们起到调节细胞增殖、存活和分化的作用（Sibilia and Wagner, Science, 269 :234(1995) ; Threadgill et al., Science, 269 :230(1995)）。野生型 erbB-2 或 erbB-1 的表达增加或组成性活化的受体突变体的表达在体外转化细胞（Di Fiore et al., 1987 ; DiMarco et al., Oncogene, 4 :831(1989) ; Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84 :7159(1987) ; Qian et al., Oncogene, 10 :211(1995)）。erbB-2 或 erbB-1 的表达增加与一些乳腺癌和多种其他恶性肿瘤中的较差的临床结果有关（Slamon et al., Science, 235 :177(1987) ; Slamon et al., Science, 244 :707(1989) ; Bacus et al., Am. J. Clin. Path., 102 :S13(1994)）。HRG 和 / 或 HER3 的过表达已在多种癌症包括胃肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤、膀胱肿瘤和乳腺肿瘤中报道，并且与较差的预后相关（B. Tanner, J Clin Oncol. 2006, 24(26) :4317-23 ; M. Hayashi, Clin. Cancer Res. 2008. 14(23) :7843-9. ; H. Kaya, Eur J Gynaecol Oncol. 2008 ; 29(4) :350-6）。

[0008] 靶向 erbB 的方式包括单克隆抗-erbB-2 抗体曲妥珠单抗（trastuzumab）、抗-erbB-1 抗体西妥昔单抗（cetuximab）、抗-erbB3 抗体诸如单克隆抗人 erbB3 抗体

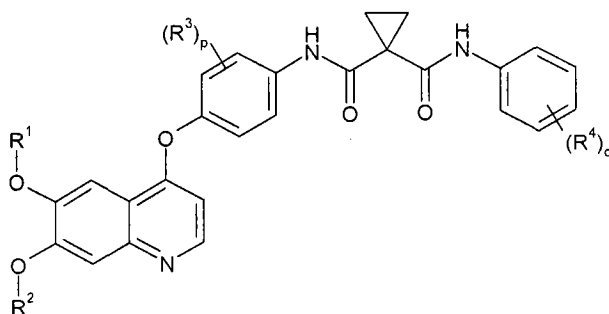
mab3481(商购于 R&D Systems, Minneapolis, MN), 以及小分子酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs) 诸如 erbB-1/erbB-2 选择性抑制剂拉帕替尼 (lapatinib), 和 erbB-1 选择性抑制剂吉非替尼 (gefitinib) 和厄洛替尼 (erlotinib)。然而, 这些药剂作为单一药剂已显示出有限的活性 (Moasser, British J. Cancer 97:453, 2007)。因此, 发现能改善抑制 erbB 功效的治疗来治疗多种癌症将会是肿瘤学领域的优点。

发明内容

[0009] 在一个方面, 本发明为治疗患者的癌症的方法, 其包括给予所述患者治疗有效量的:

[0010] a) 式 A 化合物:

[0011]



A

[0012] 或其可药用盐; 以及

[0013] (b) erbB 抑制剂, 其抑制 erbB-1 或 erbB-2 或 erbB-3 受体或它们的组合;

[0014] 其中,

[0015] R^1 为 C_1-C_6 -烷基;

[0016] R^2 为 C_1-C_6 -烷基或 $-(CH_2)_n-N(R^5)_2$;

[0017] R^3 为 Cl 或 F;

[0018] R^4 为 Cl 或 F;

[0019] 各 R^5 独立为 C_1-C_6 -烷基, 或 R^5 与它们所连接的氮原子一起形成吗啉代、哌啶基或吡嗪基;

[0020] n 为 2、3 或 4;

[0021] p 为 0 或 1; 以及

[0022] q 为 0、1 或 2。

[0023] 本发明的方法致力于本领域的一种需要, 其发现一种组合疗法显示出比先前披露的疗法更有效的证据。

附图说明

[0024] 图 1 表示在 OE-33 (cMET+ 和 HER2+) 和 NCI-H1573 (cMET+ 和 HER1+) 细胞中在 HGF 存在下, 由单独的拉帕替尼和化合物 I, 以及摩尔-摩尔比为 1:1 的拉帕替尼: 化合物 I 的组合引起的细胞生长抑制的剂量响应曲线。

[0025] 图 2 表明了 (左栏) 在过表达 N87HER2+ 和 cMET 的肿瘤系中 HGF 对拉帕替尼和拉

帕替尼：化合物 I 摩尔 - 摩尔比为 1 : 1 的拉帕替尼与化合物 I 的组合作用的影响。图 2 还表明了（右栏）经蛋白质印迹（western blot）分析确定，在存在和不存在 HGF 的情况下通过用拉帕替尼和化合物 I 的治疗对 cMET、HER2、HER3、AKT 和 ERK 的磷酸化的抑制。

[0026] 图 3 表示在 BT474（对拉帕替尼和曲妥珠单抗敏感）和 BT474-J4（对拉帕替尼和曲妥珠单抗有耐药性）这两种细胞中，在 HGF 存在下，由单独的拉帕替尼和化合物 I，以及摩尔 - 摩尔比为 1 : 1 的拉帕替尼：化合物 I 的组合引起的细胞生长抑制。

[0027] 图 4 表明在 BT474 和 BT474-J4 这两种细胞中，在 HGF 存在下，由单独的拉帕替尼和化合物 I，以及摩尔 - 摩尔比为 1 : 1 的拉帕替尼：化合物 I 的组合引起的凋亡诱导（DNA 片段化和 caspase 3/7 活化）。

[0028] 图 5 表示在 BT474-J4 细胞中在 HGF 的存在下不同浓度的化合物 I 和拉帕替尼的组合引起的细胞生长抑制和凋亡诱导。

[0029] 图 6 表明在 BT474-J4 细胞中 1) 单独的拉帕替尼对 HER2 磷酸化（pHER2）的抑制；2) 单独的化合物 I 对 AXL 磷酸化（pAXL）的抑制；以及 3) 使用化合物 I 和拉帕替尼的组合对 pHER2 和 pAXL 的抑制以及对 AKT 的磷酸化（pAKT）、ERK1/2 的磷酸化（pERK1/2）和细胞周期蛋白 D1 的降低。

[0030] 图 7 表示在 BT474 和 BT474-J4 两种细胞中在 HGF 的存在下，单独的曲妥珠单抗和化合物 I，以及摩尔 - 摩尔比为 1 : 15 的曲妥珠单抗：化合物 I 的组合在治疗 5 天后引起的细胞生长抑制。

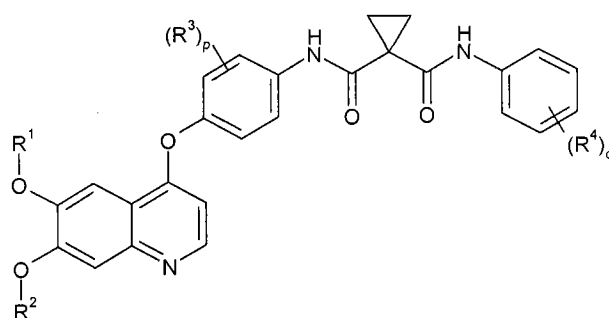
[0031] 图 8 表示在 NCI-H1648（cMET+）和 NCI-H1573（cMET+ 和 HER1+）肺肿瘤细胞中在 HGF 的存在下，由单独的厄洛替尼和化合物 I 以及摩尔 - 摩尔比为 1 : 1 的厄洛替尼：化合物 I 的组合引起的细胞生长抑制的剂量响应曲线。

[0032] 图 9 表明（左栏，经标记的细胞生长抑制）在 MKN45（cMET+ 和 HER3- 过表达）肿瘤细胞中在存在和不存在 HRG 的情况下，单独的拉帕替尼和化合物 I，以及摩尔 - 摩尔比为 1 : 1 的拉帕替尼：化合物 I 的组合引起的细胞生长抑制的剂量响应曲线。图 9 还表明了（右栏，经标记的蛋白印迹分析）经蛋白质印迹分析确定，在存在和不存在 HRG 的情况下通过用拉帕替尼和化合物 I 的治疗对 cMET、HER1、HER3、AKT 和 ERK 的磷酸化的抑制。

具体实施方式

[0033] 在一个方面，本发明涉及使用有效量的式 A 化合物和 erbB 抑制剂治疗癌症，其中所述式 A 化合物由下式表示：

[0034]



A

[0035] 或由其可药用盐表示 ; 其中

[0036] R^1 为 C_1-C_6 - 烷基 ;

[0037] R^2 为 C_1-C_6 - 烷基或 $-(CH_2)_n-N(R^5)_2$;

[0038] R^3 为 Cl 或 F ;

[0039] R^4 为 Cl 或 F ;

[0040] 各 R^5 独立为 C_1-C_6 - 烷基, 或与它们所连接的氮原子一起形成吗啉代、哌啶基或吡嗪基 ;

[0041] n 为 2、3 或 4 ;

[0042] p 为 0 或 1 ; 以及

[0043] q 为 0、1 或 2。

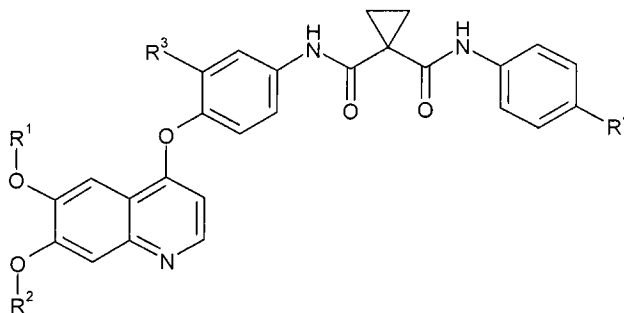
[0044] 在另一方面, n 为 3。

[0045] 在另一方面, p 为 1。

[0046] 在另一方面, q 为 0 或 1。

[0047] 在另一方面, 式 A 化合物由以下结构表示 :

[0048]



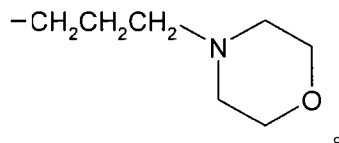
[0049] 或由其可药用盐表示。

[0050] 在另一方面, R^1 为甲基。

[0051] 在另一方面, R^3 和 R^4 各自为 F。

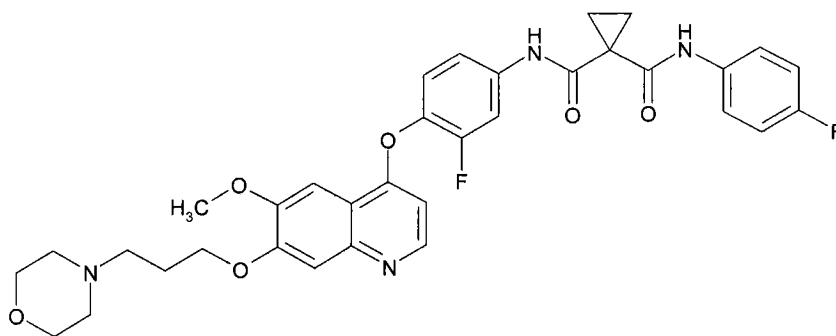
[0052] 在另一方面, $-(CH_2)_n-N(R^5)_2$ 为 :

[0053]



[0054] 在另一方面, 式 A 化合物为以下结构表示的式 I 化合物 (化合物 I) :

[0055]

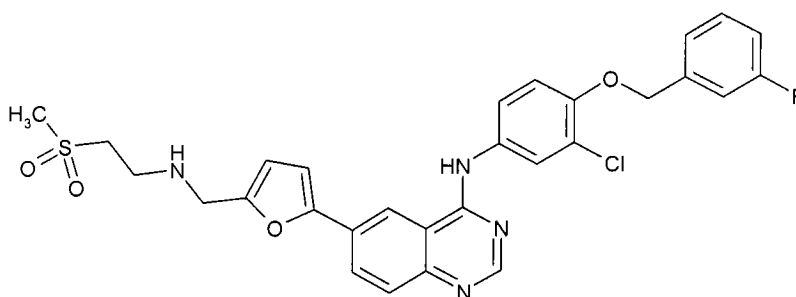


I

[0056] 或其可药用盐。

[0057] 在另一方面,所述 erbB 抑制剂为式 II 化合物:

[0058]

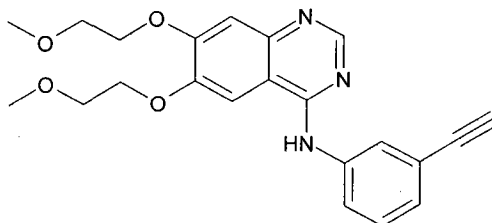


II

[0059] 或其可药用盐。在另一方面,所述 erb 抑制剂为式 II 化合物的二甲苯磺酸盐或二甲苯磺酸盐一水合物。

[0060] 在另一方面,所述 erbB 抑制剂为式 III 化合物:

[0061]



III

[0062] 或其可药用盐。

[0063] 在另一方面,所述 erbB 抑制剂为曲妥珠单抗(以名称 Herceptin 上市)。

[0064] 在另一方面,所述 erbB 抑制剂为西妥昔单抗(以名称 Erbitux 上市)。

[0065] 在另一方面,所述 erbB 抑制剂为单克隆抗人 erbB3 抗体。

[0066] 在另一方面,所述 erbB 抑制剂为吉非替尼(以名称 Iressa 上市)。

[0067] 在另一方面,所述癌症为胃癌、肺癌、食管癌、头颈癌、皮肤癌、表皮癌、卵巢癌或乳腺癌。

[0068] 在本发明的另一方面,其提供了治疗患有乳腺癌或头颈癌患者的方法,其包括给予所述患者治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐。

[0069] 在本发明的另一方面,其提供了治疗患有乳腺癌或头颈癌患者的方法,其包括给

予所述患者治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐。

[0070] 在另一方面,可药用赋形剂与式 A 化合物或与式 A 化合物的可药用盐或 erbB 抑制剂或它们的组合包括在一起。

[0071] 本申请使用的术语“有效量”表示引发组织、系统、动物或人类的期望的生物学或医学响应的药物或药剂的量。此外,术语“治疗有效量”表示与未接受所述量的相应受试者相比,使疾病、病症或副反应得到改善的治疗、治愈、预防或改善,或降低疾病或病症进展速度的任何量。该术语还在其范围内包括有效增强正常生理功能的量。应该理解,所述化合物可顺序给药或基本上同时给药。

[0072] 本发明的方法可通过任何合适的方式给药,包括口服和肠胃外。适于口服给药的药物制剂可呈现为离散单位诸如胶囊剂或片剂;粉末剂或颗粒;在含水或不含水液体中的溶液剂或混悬剂或水包油液体乳剂。口服给药可包括可药用赋形剂诸如本领域已知的那些。

[0073] 适于肠胃外给药尤其是静脉内给药的药物制剂包括:含水和不含水的无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期的受者的血液等渗的溶质;和含水和不含水的无菌混悬剂(sterile suspension),其可包括助悬剂和增稠剂。所述制剂可出现在单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可在冷冻-干燥(冻干)的条件下储存,在使用前仅需要加入无菌液体载体例如注射用水即可。临时注射溶液和混悬液可从无菌粉末、颗粒剂和片剂制备。

[0074] 本申请使用的“erbB 抑制剂”是指抑制 erbB-1 或 erbB-2 或 erbB-3 或它们的组合的化合物、单克隆抗体、免疫偶联物或疫苗。

[0075] 本发明包括化合物以及其可药用盐。在“化合物或其可药用盐”上下文中的单词“或”应理解是指化合物或其可药用盐(二者择一),或化合物和其可药用盐(组合)。

[0076] 本申请使用的“患者”是患有癌症的哺乳动物,更尤其为人类。

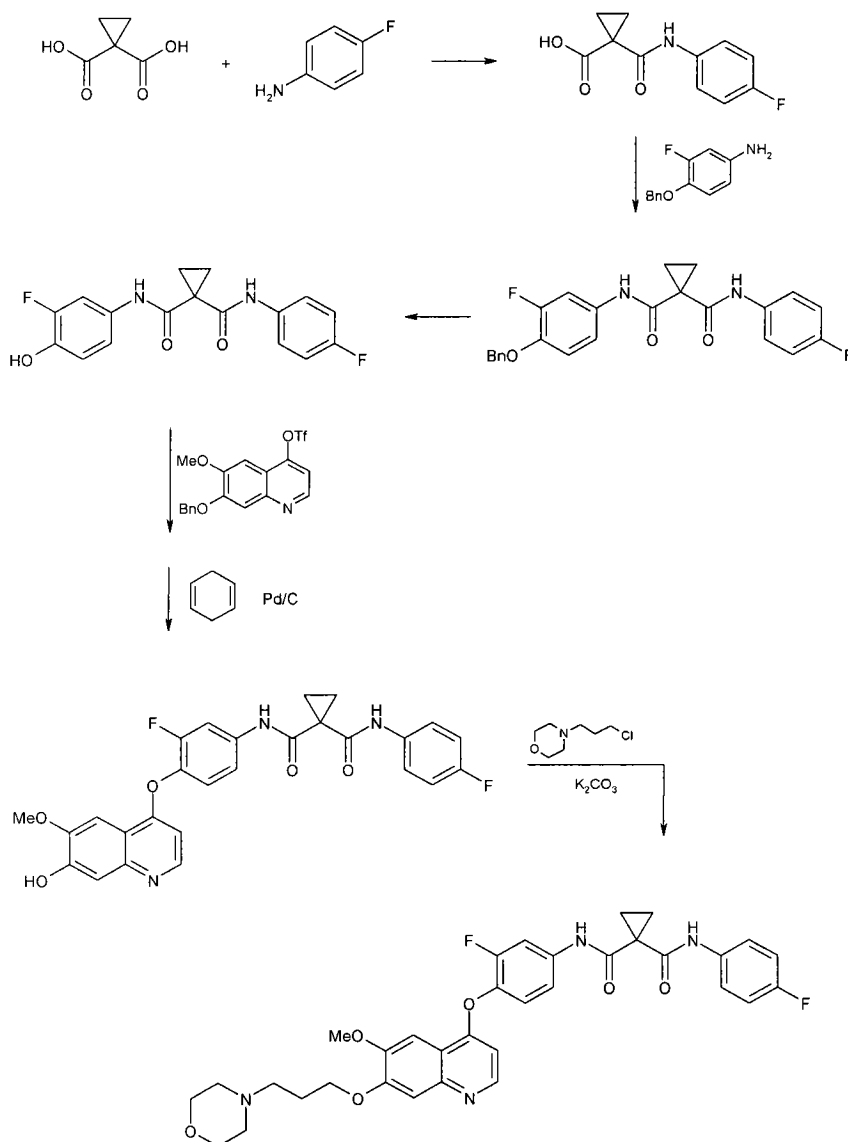
[0077] 本申请使用的术语“可药用”是指这样的化合物、材料、组合物和剂型,其在合理的医学判断范围内适于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激(irritation)或其它问题或并发症。本领域技术人员应该理解,可制备本申请所述的本发明方法的化合物的可药用盐。这些可药用盐可在所述化合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或使经纯化的呈其游离酸或游离碱形式的化合物与合适的酸或碱分别反应来制备。

[0078] 一般而言,式 A 化合物和 erbB 抑制剂的给药量是既有效又耐受的量。优选地,式 A 化合物,更具体为化合物 I 的量在约 1mg 至 1000mg/日的范围中,erbB 抑制剂的量优选在约 1 μg 至 2000mg/日的范围中。

[0079] 化合物 I (N^1 -{3-氟-4-[(6-(甲基氧基)-7-{[3-(4-吗啉基)丙基]氧基}-4-喹啉基)氧基]苯基}- N^1 -(4-氟苯基)-1,1-环丙烷二甲酰胺),可如 W02005/030140(2005 年 4 月 7 日公开)中所述那样来制备。实施例 25(193 页)、36(202-203 页)、42(209 页)、43(209 页)和 44(209-210 页)描述了如何制备化合物 I。式 A 化合物可类似地进行制备。化合物 I 的一般制备方案概述于方案 1 中:

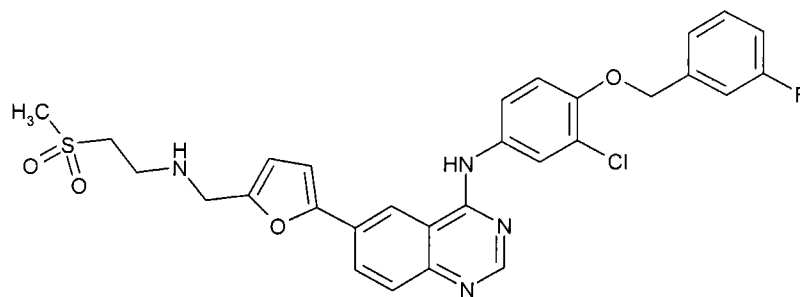
[0080] 方案 1

[0081]



[0082] erbB 抑制剂的实例包括拉帕替尼、厄洛替尼和吉非替尼。拉帕替尼，即 N-(3-氯-4-[(3-氟苯基)甲基]氧基)苯基)-6-[5-((2-(甲基磺酰基)乙基)氨基)甲基)-2-呋喃基]喹唑啉-4-胺 (由式 II 表示，如所图示的那样)，是 erbB-1 和 erbB-2 (EGFR 和 HER2) 酪氨酸激酶的强效口服小分子双重抑制剂，其被批准与卡培他滨 (capecitabine) 组合来治疗 HER2- 阳性转移性乳腺癌。

[0083]



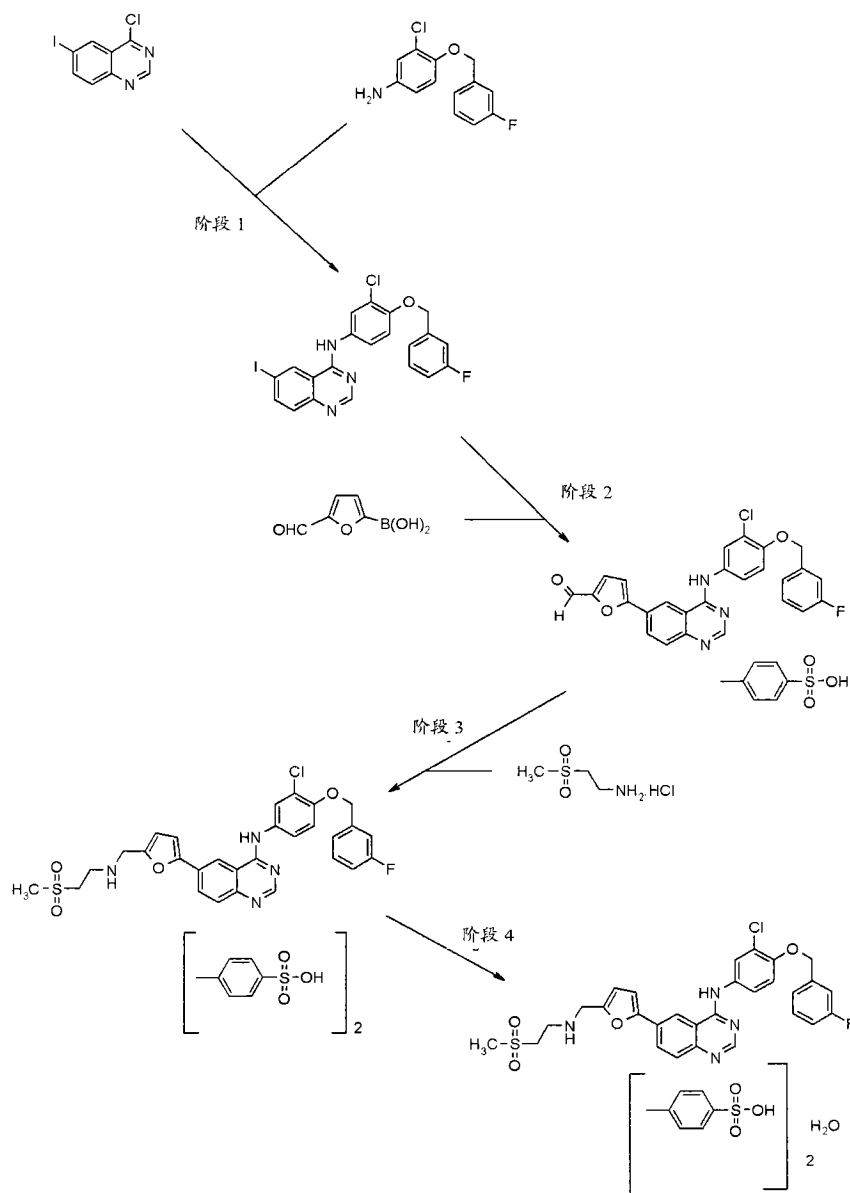
II

[0084] 式 (II) 化合物的游离碱、HCl 盐和二甲苯磺酸盐可根据 W099/35146 (1999 年 7 月 15 日公开) 和 W0 02/02552 (2002 年 1 月 10 日公开) 所述的操作制备。制备化合物 II 的

二甲苯磺酸盐的一般方案图示于方案 2 中。

[0085] 方案 2

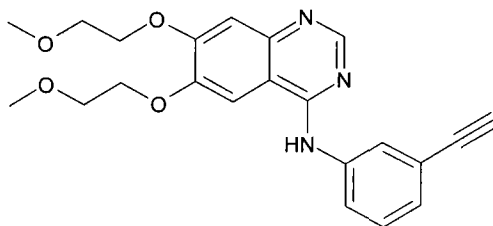
[0086]



[0087] 在方案 2 中,式 (I) 化合物的二甲苯磺酸盐的制备分四个阶段进行:阶段 1(stage 1):使指定的二环化合物与胺反应得到指定的碘代喹唑啉衍生物;阶段 2(stage 2):制备相应的醛的盐;阶段 3(stage 3):制备喹唑啉二甲苯磺酸盐;以及阶段 4(stage 4):制备二甲苯磺酸盐一水合物。

[0088] 厄洛替尼, N-(3-乙炔基苯基)-6,7-二[[2-(甲基氧基)乙基]氧基]喹唑啉-4-胺(以商标名 Tarceva 商购)由所图示的式 III 表示:

[0089]

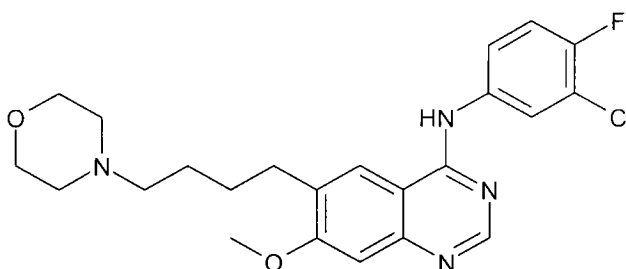


III

[0090] 厄洛替尼的游离碱和 HCl 盐可例如根据 U. S. 5, 747, 498 的实施例 20 来制备。

[0091] 吉非替尼, 即 N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-[3-(吗啉-4-基)丙氧基]喹唑啉-4-胺由所图示的式 IV 表示:

[0092]



IV

[0093] 吉非替尼是 erbB-1 抑制剂, 其以商标名 IRESSA® (Astra-Zeneca) 商购, 用作局部晚期非小细胞肺癌或转移性非小细胞肺癌患者基于铂的化疗和多西他赛 (docetaxel) 化疗失败后的单一疗法。吉非替尼的游离碱、HCl 盐和二 HCl 盐可根据国际专利申请 PCT/GB96/00961 (1996 年 4 月 23 日提交, 1996 年 10 月 31 日作为 WO 96/33980 公开) 的方法来制备。

[0094] 方法

[0095] 细胞系和培养物

[0096] 人乳腺癌细胞系 BT474、HCC1954 和 MDA-MB-468, 头颈鳞状细胞癌细胞系 SCC15、Detroit 562 和 SCC12, 胃癌细胞系 SNU-5、HS746T、AGS、SNU-16 和 N87, 肺癌细胞系 NCI-H1993、NCI-H1573、NCI-H441、NCI-H2342、NCI-H1648、HOP-92、NCI-H596、NCI-H69、NCI-H2170 和 A549, 表皮癌细胞系 A431 和结肠癌细胞系 HT29、SW48 和 KM12 购于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。食管癌细胞系 OE33 购于 ECACC (欧洲细胞培养物保藏中心 (European Collection of Cell Cultures), (UK))。乳腺癌细胞系 JIMT-1 和胃癌细胞系 MKN-45 购于 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Germany); KPL-4, 即一种乳腺癌细胞系, 由 J Kurebayashi 教授 (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan) 友好的提供。LL1-BT474-J4 (BT474-J4) 乳腺癌细胞克隆通过将 BT474 (HER2+ 乳腺, 对拉帕替尼高度敏感) 暴露于浓度增加 (至多 3 μM) 的拉帕替尼后进行单细胞克隆而得到。LICR-LON-HN5 头颈癌细胞系 (HN5) 是 Institute of Cancer Research, Surrey, U. K 赠予的。HN5C12 是通过对 HN5 进行单细胞克隆、接着暴露于浓度增加的拉帕替尼而得到的。

[0097] BT474、HCC1954、MDA-MB-468、SCC15、Detroit 562、SCC12、SNU-5、HS746T、AGS、NCI-N87、A-431、NCI-H1993、NCI-H441、HOP-92、NCI-H596、NCI-H69、NCI-H2170、A549、

JIMT-1、MKN-45、OE-33、SNU-16、SW48、KM12 和 HT29 细胞系在加湿的培养箱中,在 37℃、95% 空气、5% CO₂ 条件下,在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 培养基中培养。NCI-H1573 和 NCI-H1648 都在不含 ACL-4 血清的培养基中培养,所述培养基含有 50 : 50Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)/F12、胰岛素运铁蛋白硒 X 添加剂、50nM 氢化可的松、1ng/mL EGF、0.01mM 乙醇胺、0.01mM 磷酸乙醇胺、100pM 三碘甲状腺原氨酸 (triiodothyronine)、0.5% (w/v) BSA (2mg/mL)、2L- 谷氨酰胺、0.5mM 丙酮酸钠。NCI-H2342 在 ATCC 配制的 DMEM:F12 培养基 (目录号 30-2006) 中培养,所述培养基含有 0.005mg/mL 胰岛素、0.01mg/mL 运铁蛋白、30nM 亚硒酸钠 (最终浓度)、10nM 氢化可的松 (最终浓度)、10nM β-雌二醇 (最终浓度)、10nM HEPES (最终浓度)、额外的 2mM L- 谷氨酰胺 (最终浓度为 4.5mM) 和 5% 胎牛血清 (最终浓度)。BT474-J4 在含有 10% FBS 和 1 μM 拉帕替尼的 RPMI 1640 中培养。KPL-4 和 HN5 在含有 5% FBS 的 DMEM 中培养;HN5 C12 在含有 5% FBS 和 1 μM 拉帕替尼的 DMEM 中培养。

[0098] 细胞生长抑制测定和数据分析

[0099] 细胞生长抑制经由 CellTiter-Glo 细胞活力分析确定。细胞用以下铺板密度接种于 96 孔组织培养板中:根据细胞生长速度的不同,在含有 10% FBS 的它们各自的培养基中以 1000 或 2000 细胞/孔接种。BT474-J4 和 HN5C12 用 PBS 洗涤,然后用不含拉帕替尼的它们的培养基铺板。铺板约 24h 后;将细胞暴露于化合物;细胞用十个两倍连续稀释的 (最终化合物浓度为 10、5、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0.04 至 0.02 μM) 化合物或以恒定比例 (摩尔比为 1 : 1) 组合的两种药剂或以所指明的那样进行处理。细胞在含有 5% 或 10% FBS 的培养基中在有或无 2ng/mL HGF (用于对 cMET 进行 3 天活化的配体) 的情况下用化合物孵育,或如所指明的那样来孵育。ATP 水平通过加入 Cell Titer Glo® (Promega),孵育 20 分钟,然后在 SpectraMax M5 板上以积分时间 (integration time) 0.5 秒读取发光信号来确定。相对于媒介物 (DMSO) 处理的对照孔,计算细胞生长。使用以下的四参数曲线拟合方程内推出抑制 50% 对照细胞生长的化合物浓度 (IC₅₀) :

$$[0100] \quad y = (A + (B - A) / (1 + 10^{(x - c) \cdot d}))$$

[0101] 其中 A 为最小响应 ($y_{\min}$), B 为最大响应 ($y_{\max}$), c 为曲线的拐点 (EC₅₀), d 为希尔系数 (Hill coefficient), x 为 log₁₀ 化合物浓度 (摩尔/L)。

[0102] 组合效应使用组合指数 (Combination Index, CI) 值和单一药剂最高剂量过量 (Excess Over Highest Single Agent, EOHS) 统计学分析来评价。

[0103] CI 值用内推的 IC₅₀ 值和 Chou 和 Talalay 得到的非互斥方程 (mutually non-exclusive equation) 计算:

$$[0104] \quad CI = D_a / IC_{50(a)} + D_b / IC_{50(b)} + (D_a \times D_b) / (IC_{50(a)} \times IC_{50(b)})$$

[0105] 其中 IC_{50(a)} 为抑制剂 A 的 IC₅₀; IC_{50(b)} 为抑制剂 B 的 IC₅₀; D_a 为抑制 50% 细胞生长的抑制剂 A 与抑制剂 B 的组合中抑制剂 A 的浓度; 以及 D_b 为抑制 50% 细胞生长的抑制剂 B 与抑制剂 A 的组合中抑制剂 B 的浓度。一般而言, 0.9 和 1.10 之间的 CI 值指示了两种药剂的组合的累加作用。CI < 0.9 指示协同作用 (越小的数指示越大的协同作用强度), 以及 CI > 1.10 指示拮抗作用。

[0106] 单一药剂最高剂量过量 (EOHSA) 定义为与单组分疗法相比组合治疗的统计学显著的改善。例如, 若 A 和 B 分别以浓度 q 和 r 组合, 则组合 Aq+Br 中的平均响应将显著优于

单独的 Aq 或 Br 中的平均响应。在统计学术语中,就两种比较 Aq+Br 相比 Aq 和 Aq+Br 相比 Br 而言, p 值的最大值应该小于或等于约截止值, $p \leq 0.05$ 。EOHSA 为评价药物组合的常用方法,并且为 FDA 许可组合药物的标准 (21 CFR 300.50)。实例和讨论参见 Borisy et al. (2003) 或 Hung et al. (1993)。使用涉及相互作用的两因素变量分析进行分析(模型项(model term)为药物 A 的剂量、药物 B 的剂量以及药物 A 和药物 B 剂量之间的相互作用),接着在每个组合组和相应的单一疗法之间进行线性对比。使用 SAS(第 9 版,由 SAS Institute, Cary, N.C. 提供)进行分析。从近似 ANOVA 对比计算每个剂量的 EOHSA,为组合和每个单一疗法之间的平均%抑制的最小差异。因为针对%抑制终点有多种比较,所以就多种比较而言对 p 值进行调整。执行 Hommel's 操作以改善效力同时使用连续排斥法(sequentially rejective method)保持 Familywise 误差率(FWE)控制。用该调整来计算协同作用和拮抗作用的 p 值。使用 EOHSA 方法,协同作用表示组合的作用(或响应)显著好于单独使用单一药剂的最高作用(或响应), $p \leq 0.05$;累加作用表示,组合的作用与单独使用单一药剂的最高作用相比没有显著差异($p > 0.05$),拮抗作用表示,组合的作用显著小于使用单一药剂的最高作用, $p \leq 0.05$ 。

[0107] 细胞凋亡测定-细胞死亡 ELISA^{Plus}(测量 DNA 片段化)和 Caspase-Glo® 3/7 测定

[0108] 细胞凋亡使用以下两种方法测量:细胞死亡 ELISA 方法,其测量 DNA 片段化,是凋亡的一种标志;以及 Caspase-Glo® 3/7 测定,其检测 Caspase 3/7 的活性,这是细胞凋亡的一种执行酶(execution enzyme)。

[0109] 根据制造商的指示使用细胞死亡 ELISA^{Plus}试剂盒(Roche, Mannheim, Germany)。将细胞以 10,000/孔接种于 96-孔板中。24h 后,对细胞用药,然后在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 中在 5% CO₂, 37°C 再培养 48h。将对照细胞和处理细胞的细胞质级份转移到包被链亲和素的 96 孔板中,然后在室温与生物素化的小鼠抗组蛋白抗体和过氧化物酶偶联的小鼠抗-DNA 抗体一起孵育 2h。使用 Spectra Max Gemini 微孔板读数器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)在 405-490nm 确定吸光度。

[0110] Caspase-Glo® 3/7 测定(Promega)为均相发光测定,其测量 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性。将细胞以 5,000/孔接种于 96 孔板。24h 后,对细胞用药,然后在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 中在 5% CO₂, 37°C 再培养 24h。根据制造商的指示,添加溶于优化试剂中的 Caspase-3/7 发光底物,来检测 Caspase 3/7 活性,所述优化试剂针对 Caspase 活性、萤光素酶活性和细胞裂解进行了优化,所述底物含有四肽序列 DEVD。

[0111] 蛋白印迹分析

[0112] 将细胞以 250,000 至 500,000/孔铺板于六孔板(Falcon multiwell, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。次日,将细胞在含有 10% FBS 的生长培养基中用化合物处理。处理后,将细胞用冷的 PBS 洗涤,然后使用含有蛋白酶抑制剂(Complete Protease Inhibitor Tablets, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)的细胞裂解缓冲液[40mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10% 甘油, 50mmol/L β-磷酸甘油, 5mmol/L EGTA, 2mmol/L EDTA, 0.35mmol/L 钒酸盐, 10mmol/L NaF 和 0.3% Triton X-100]在培养皿中裂解。将来自对照细胞和处理细胞的溶胞产物的蛋白样品(50 μg)(使用 Bio-Rad 洗涤剂相容性蛋白测定确定)装载于 4%至 12%梯度 NuPAGE 凝胶(Novex, Inc., San Diego, CA)上,在还

原条件下进行电泳,然后转移到硝酸纤维素膜(0.45 μm ;Bio-Rad Laboratories)上。将膜印迹(blot)用PBS清洗,然后在Odyssey阻断缓冲液中在室温阻断1h。将印迹在添加有0.1% Tween 20的阻断缓冲液中用抗特异性蛋白的抗体进行探测,室温孵育2h。将膜进行洗涤,然后在添加有0.1% Tween 20的阻断缓冲液中在室温用IRDye 680或IRDye 800第二抗体孵育1h。用Odyssey红外成像系统(LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska)使膜显影。

[0113] 蛋白印迹分析(图6)的条件如下:将细胞用单独的拉帕替尼(1 μM)、单独的化合物I(1 μM)或拉帕替尼(1 μM)与化合物I(1 μM)的组合处理4h。将细胞溶胞产物(50 μg 总蛋白)或用抗-磷酸-酪氨酸抗体免疫沉淀的蛋白质装载于SDS-PAGE凝胶中。用抗特异性蛋白的抗体进行蛋白印迹分析。

[0114] 蛋白印迹分析(图2右栏和图9右栏)的条件如下:将细胞用单独的拉帕替尼(1 μM)、单独的化合物I(0.1 μM)或拉帕替尼(1 μM)与化合物I(0.1 μM)的组合在所指明的有或无HGF或HRG的情况下处理2h。细胞溶胞产物(50 μg 总蛋白)或用抗-MET或抗-HER3抗体免疫沉淀的蛋白质装载于SDS-PAGE凝胶中。用抗特异性蛋白的抗体进行蛋白印迹分析。

[0115] 化合物I细胞生长抑制

[0116] 化合物I是靶向cMET、RON、AXL、VEGFR 1/2、TIE2、PDGFR β 、cKIT和FLT3的强效多激酶抑制剂。细胞生长抑制经由CellTiter-Glo细胞活力分析在乳腺(BT474、HCC1954、KPL-4、JIMT-1、MDA-MB-468和BT474-J4)、头颈(SCC15、HN5、Detriot 562、SCC12和HN5C12)、胃(SNU-5、MKN-45、HS746T、AGS、SNU-16和NCI-N87)、肺(NCI-H1993、NCI-H1573、NCI-H441、NCI-H2342、NCI-H1648、HOP-92、NCI-H596、NCI-H69、NCI-H2170、A549)、食管(OE-33)、皮肤(A431)和结肠(HT29、SW48和KM12)肿瘤细胞系中确定。

[0117] 肝细胞生长因子(HGF)是cMET活化的配体。它是具有多种生物活性的细胞因子,包括刺激细胞增殖、迁移和形态发生。HGF作为无活性前体分泌,再被分泌的蛋白酶(包括纤溶酶原激活剂)转换为活性异二聚体。在体外细胞培养条件中,大多数肿瘤细胞系都不表达HGF的活化形式。将人类HGF的活化形式加到培养基中提供了旁分泌cMET活化系统。人血清的HGF水平在健康人类中报道为约0.2ng/mL(J. Immunol. Methods 2000;244:163-173),在肝转移性乳腺癌患者中增加至高达2ng/mL(Tumor Biol 2007;28:36-44)。因此,将HGF以2ng/mL加到含有5%或10% FBS的培养基中,用于细胞生长抑制和凋亡测定。

[0118] 表中的缩写

[0119] 以下为在表中使用的缩写的解释:

[0120] N = 2表示实验独立重复两次。除非用星号指明,所有分析都一式两份;

[0121] IC₅₀表示使用四参数曲线拟合方程内推的抑制50%对照细胞生长的化合物浓度, μM 是指微摩尔每升;

[0122] HER^{amp+}指明基因HER1(HER1+)或HER2(HER2+)在细胞系中扩增;“无”表示HER1或HER2在细胞系中不扩增;

[0123] > 10表示IC₅₀未达到所测试的最高浓度(10 μM);

[0124] HER3-过量(over)是指经Affymetrix微阵列分析确定的过表达水平的HER3RNA(MAS 5强度> 300);

[0125] HER3-低(low)是指经 Affymetrix 微阵列分析确定的低表达水平的 HER3RNA (MAS 5 强度 < 100) ;cMET+ 是指经 SNP-CHIP 确定, cMET 基因扩增 ≥ 5 拷贝的 MET DNA ;

[0126] cMET+ (< 5) 是指经 SNP-CHIP 确定, cMET 基因扩增 < 5 拷贝的 METDNA ;

[0127] cMET- 过量是指经 Affymetrix 微阵列分析确定的过表达的 cMET RNA (MAS 5 强度 > 300) ;

[0128] cMET- 低(low)是指经 Affymetrix 微阵列分析确定的低表达水平的 cMETRNA (MAS 5 强度 < 300) ;

[0129] cMET- 突变(mut) 是指 cMET 基因中的点突变、缺失、插入或错义突变 ;

[0130] -HGF 表示未加入 HGF ;

[0131] +HGF 表示将 2ng/mL HGF 加到含有 5% 或 10% FBS 的培养基中。

[0132] -HRG 表示未加入 HRG ;

[0133] +HRG 表示将 10ng/mL HRG 加到含有 10% FBS 的培养基中。

[0134] NA = 不适用, 因为不能确定单独的药剂的 IC_{50} 绝对值。

[0135] 化合物 I 的细胞生长抑制作用

[0136] 单独的化合物 I 在肿瘤细胞系中的生长抑制作用概述于表 1 中。如表 1 中所示, 该化合物对于抑制 cMET+ 和 HER 非扩增的 (HER+ = 无) 肿瘤系 MKN-45、SNU-5、HS746T 和 NCI-H1993 是非常强效的, 显示出小于 100nM 的 IC_{50} 值。NCI-H1648, 即一种 cMET 扩增的肿瘤细胞系, 在 HGF 的存在下对化合物 I 更敏感, 说明该细胞系依赖于 HGF-cMET 活化的细胞生长。

[0137] 表 1. 单独的化合物 I 在肿瘤细胞系中引起的细胞生长抑制的 IC_{50} (μ M) 值

[0138]

细胞系	cMET	HER amp+	化合物 I(IC ₅₀ , μM), N=2	
			-HGF	+HGF
胃_SNU-5	cMET+	无	0.012	0.019
胃_MKN-45	cMET+	无	0.014	0.019
肺_H1993	cMET+	无	0.044	0.087
胃_HS746T	cMET+	无	0.044	0.162
肺_H1648	cMET+	无	1.202	0.470
食管_OE33	cMET+	HER2+	0.386	0.445
肺_H1573	cMET+	HER1+	1.651	1.478
hn_Detroit562	cMET+ (<5)	无	0.458	0.450
肺_H441	cMET+ (<5)	无	1.031	1.155
肺_H2342	cMET+ (<5)	无	1.925	1.452
肺_H596	cMET-突变(E14Del)	无	1.061	0.705
肺_H69	cMET-突变(R988C)	无	1.274	0.970
肺_HOP-92	cMET-突变(T1010I)	无	0.827	0.566
胃_SNU16	cMET-过量	无	0.055	0.054
肺_A549	cMET-过量	无	0.885	0.411
结肠_HT-29	cMET-过量	无	0.556	0.559
结肠_SW48	cMET-过量	无	0.260	0.220
结肠_KM12	cMET-过量	无	0.040	0.100
肺_H2170	cMET-过量	HER2+	0.684	0.522
皮肤_A431	cMET-过量	HER1+	0.687	0.674
hn_SCC15	cMET-过量	HER1+	0.700	0.690
hn_HN5	cMET-过量	HER1+	0.726	0.824
hn_SCC12	cMET-过量	无	0.988	1.189
hn_HN5C2	cMET-过量	HER1+	0.858	1.213
乳腺_HCC1954	cMET-过量	HER2+	1.855	1.856
乳腺_JimT1	cMET-过量	HER2+	1.732	1.911
胃_N87	cMET-过量	HER2+	2.446	2.320
乳腺_KPL4	cMET-低	HER2+	0.459	0.625
胃_AGS	cMET-低	无	0.656	0.427
乳腺_MDA-MB-468	cMET-低	HER1+	0.813	0.589
乳腺_BT474-J4	cMET-低	HER2+	4.515	4.016
乳腺_BT474	cMET-低	HER2+	4.974	4.899

[0139]

[0140] 表1的结果表明具有cMET基因扩增的肿瘤细胞就增殖而言对cMET是高度依赖的。如表1进一步说明的那样,化合物I在cMET扩增小于5拷贝且cMET在近膜(juxtamembrane)结构域(HOP-92:cMET-T1010I;H69:cMET-R988C和H596:cMET-外显子14框内缺失(in frame deletion))发生突变的细胞系中或在cMET非扩增的肿瘤系(其表达较高或较低量的cMETRNA,分别表示为cMET过量或cMET-低)中,显示细胞生长抑制的IC₅₀值范围为0.04至~5 μM。这些结果与如下的观察结果一致:即化合物I在肿瘤细胞中抑制多种致癌激酶。

[0141] 化合物I与拉帕替尼的组合对有cMET和HER扩增的细胞系的细胞生长抑制作用

[0142] 如表2所示,在低水平cMET和HER2+的乳腺BT474肿瘤细胞系中,单独的拉帕替

尼显示出平均 IC₅₀ 为 0.12 和 0.11 (分别有或无 HGF), 而单独的化合物 I 显示出平均 IC₅₀ 为 4.97 μ M (存在 HGF) 和 4.90 μ M (不存在 HGF) 。该结果并不意外, 因为与化合物 I 不同, 拉帕替尼已知为经扩增的 erbB-2 (HER amp+) 的强效抑制剂。拉帕替尼和化合物 I 的组合在乳腺 _BT474 细胞系中, 当不存在 HGF 时 CI 为 0.95, 据此表明累加作用, 或者当存在 HGF 时 CI 为 0.71, 据此表明协同作用, 在较高的浓度则增强对细胞生长的抑制作用 (图 3) 。

[0143] 相比之下, 拉帕替尼和化合物 I 的组合对具有共扩增的 cMET 和 HER2 的食管肿瘤细胞系 (eso_OE33) 的细胞生长抑制作用是显著且意料之外的。如表 2 和图 1 所示, OE33 显示对拉帕替尼有耐药性 (不存在 HGF 时 IC₅₀ = 6.5 μ M, 存在 HGF 时 > 10 μ M), 对单独的化合物 I 为中度敏感 (不存在 HGF 时 IC₅₀ = 0.42 μ M, 存在 HGF 时 0.40 μ M) 。然而, 拉帕替尼和化合物 I 的组合在有或无 HGF 时显示了对 OE-33 食管肿瘤细胞的细胞生长抑制的有力的协同作用 (基于 CI 和 EOHSA) 。类似地, 如表 2 和图 1 所示, NCI-H1573 作为一种具有 cMET 和 EGFR 共扩增的肺肿瘤细胞系, 在分别给药时对拉帕替尼耐药而对化合物 I 中度敏感 ; 然而, 这两种抑制剂的组合改善了效力 (降低了 IC₅₀ 值) 、并增加了细胞生长抑制活性 (基于 EOHSA 判定为协同作用) 。尽管不受理论的束缚, 这些结果表明 cMET 和 HER 可相互作用 (“ 交谈 (cross-talk) ”), 从而逃避了单独的 HER 抑制剂或 cMET 抑制剂引起的生长抑制作用, 而拉帕替尼和化合物 I 的组合在有 cMET 和 HER 共扩增的肿瘤细胞中克服了这种耐药性。

[0144] 表 2 : 化合物 I 和拉帕替尼的组合对有 cMET 和 HER1 基因或 cMET 和 HER2 基因共扩增的肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0145]

细胞系	cMET	HER amp+	平均 IC50 (μM) N=2						组合作用	
			拉帕替尼		拉帕替尼或化合物 I (拉帕替尼+化合物 I)		化合物 I		CI @IC50	
			-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF
食管_OE33	cMET+	HER2+	6.52	5.52	0.04	0.07	0.42	0.40	0.11	0.20
肺_H1573	cMET+	HER1+	9.83	>10	0.52	0.41	1.52	1.38	0.41	NA
乳腺_BT474	cMET-低	HER2+	0.11	0.11	0.10	0.07	4.76	4.72	0.93	0.72

[0146] 化合物 I 与拉帕替尼的组合对有 cMET 扩增、突变或过表达的肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0147] 如表 3 所示, 拉帕替尼和化合物 I 的组合在 cMET 扩增、突变或过表达的乳腺、肺、胃、头颈、卵巢和皮肤肿瘤细胞中显示协同作用, CI < 0.9。EOHSA 分析证实了在所有情况中的协同作用, 除了以下情况 : 不存在 HGF 时的 N87 以及有或无 HGF 的 H1993。在这些例外中的每种情况中, 单一的药剂拉帕替尼或化合物 I 本身就具有非常大的活性, 组合作用是累加的。

[0148] 出人意料的是, 如表 3 所示, HGF 降低了拉帕替尼在 HER1/HER2 扩增的和 cMET 过表达的肿瘤细胞 (HER2+ :N87、H2170 和 HCC1954 ;HER1+ :SCC15、HN5 和 A431) 中引起的细胞生长抑制的效力。此外, 将拉帕替尼与化合物 I 组合不仅克服了 HGF 的作用, 还增强了敏感性, 尤其是在有或无 HGF 时在细胞系 H2170、HCC1954、SCC15、HN5 和 A431 中。相反, HGF 未降低拉帕替尼在 BT474 (表 2) 和 KPL-4 (表 3) (HER2 扩增的 cMET RNA 或蛋白低表达的两种

乳腺肿瘤细胞系) 中的活性。

[0149] 对 N87 而言 HGF 作用示于图 2。图 2(左图, 经标记的细胞生长抑制) 显示, 在不存在 HGF 时, N87 对单独的拉帕替尼高度敏感 ($IC_{50} = 0.05 \mu M$) 或对摩尔比为 1 : 1 的拉帕替尼与化合物 I 的组合高度敏感。相反, 在 HGF 存在下, N87 对拉帕替尼不敏感 ($IC_{50} = 4.80 \mu M$), 但对拉帕替尼和化合物 I 的组合相当敏感 ($IC_{50} = 0.05 \mu M$)。图 2(右图, 经标记的蛋白印迹分析) 还显示, 拉帕替尼和化合物 I 的组合抑制 HER2、HER3 和 cMET 的磷酸化, 且降低 pAKT 和 pERK 的细胞信号转导, 这与存在和不存在 HGF 时的细胞生长抑制一致。

[0150] 表 3 和图 2 与先前关于支持 HGF 活化 cMET 的主张的发现一致。上述结果进一步表明, HGF 介导的 cMET 活化可与 HER 相互作用, 并降低 HER 抑制剂引起的生长抑制。这些结果证明, 将化合物 I 与拉帕替尼组合在 cMET 过表达的和 HER 扩增的肿瘤细胞中提供了更有效的治疗。

[0151] 表 3. 化合物 I 与拉帕替尼的组合对 cMET 扩增、突变或过表达的肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0152]

细胞系	cMET	HER amp+	平均 IC_{50} (μM) N=2						组合作用	
			拉帕替尼		拉帕替尼或化合物 I (拉帕替尼+化合物 I)		化合物 I		CI @ IC_{50}	
			-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF
胃_N87	cMET-过量	HER2+	0.05	4.80	0.04	0.05	2.62	2.62	0.77	0.03
肺_H2170	cMET-过量	HER2+	0.26	4.24	0.12	0.08	0.68	0.50	0.79	0.19
乳腺_HCC1954	cMET-过量	HER2+	0.80	5.27	0.12	0.25	1.85	1.98	0.47	0.18
乳腺_KPL4	cMET-低*	HER2+	1.00	0.89	0.10	0.11	0.64	0.35	0.33	0.51
卵巢_SKOV3	cMET-过量	HER2+	5.02	5.67	0.58	0.51	1.57	1.43	0.53	0.48
hn_SCC15	cMET-过量	HER1+	1.08	3.81	0.13	0.16	0.66	0.66	0.33	0.29
皮肤_A431	cMET-过量	HER1+	2.19	4.60	0.27	0.24	0.69	0.65	0.55	0.44
hn_HN5	cMET-过量	HER1+	2.37	3.69	0.20	0.23	0.88	0.97	0.33	0.32
hn_SCC12	cMET-过量	无	>10	>10	0.30	0.37	1.11	1.16	NA	NA
肺_H1993	cMET+	无	>10	>10	0.01	0.02	0.02	0.09	NA	NA
肺_H1648	cMET+	无	7.39	>10	0.15	0.06	1.18	0.52	0.15	NA
hn_Detroit562	cMET+ (<5	无	4.02	4.64	0.15	0.17	0.41	0.41	0.44	0.44
肺_H2342	cMET+ (<5	无	6.81	6.64	0.65	0.55	1.80	1.52	0.50	0.47
肺_H441	cMET+ (<5	无	>10	>10	0.67	0.63	1.12	1.17	NA	NA
肺_H596	cMET-突变	无	>10	>10	0.67	0.43	1.18	0.82	NA	NA
肺_H69	cMET-突变	无	5.36	4.74	0.72	0.61	1.27	0.97	0.78	0.83
肺_HOP-92	cMET-突变	无	>10	>10	0.44	0.33	0.83	0.57	NA	NA

[0153] * 基于蛋白表达

[0154] 化合物 I 和拉帕替尼对拉帕替尼耐药性 HER+ 肿瘤细胞系的组合作用

[0155] BT474-J4、JIMT1 和 HN5C12 是拉帕替尼耐药性 HER2+ 或 HER1+ 细胞系。JIMT-1, 对拉帕替尼或曲妥珠单抗而言为遗传耐药系, 得自对曲妥珠单抗无响应的患者。BT474-J4 和 HN5C12 都是拉帕替尼获得性耐药克隆。如表 4 所示, 化合物 I 与拉帕替尼的组合在所有这三

种拉帕替尼耐药性肿瘤细胞系中都显示了细胞生长抑制的协同作用 (EOHSA 分析)。此外, 如图 3 所示, 化合物 I 在耐药性 BT474-J4 细胞中恢复了拉帕替尼敏感性, 并且在 BT474 (对拉帕替尼敏感) 和 BT474-J4 (对拉帕替尼和曲妥珠单抗耐药) 细胞中都增加了拉帕替尼活性。化合物 I 和拉帕替尼组合的协同作用不仅在细胞生长抑制中检测出, 而且还在凋亡诱导中检测出, 如图 4 所示。如图 4 所示, 将化合物 I 和拉帕替尼组合在 BT474 和 BT474-J4 两种细胞中都增加 DNA 片段化和 Caspase 3/7 活化 (凋亡的标志); 然而, 分别给药时, 化合物 I (高浓度) 或拉帕替尼仅在 BT474 (拉帕替尼敏感型细胞系) 中诱导凋亡。

[0156] 表 4: 化合物 I 与拉帕替尼的组合对拉帕替尼耐药性 HER+ 肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0157]

细胞系	cMET	HER amp+	平均 IC50 (μM) N=2						组合作用	
			拉帕替尼		拉帕替尼或化合物 I (拉帕替尼+化合物 I)		化合物 I		CI @IC50	
			-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF
乳腺_BT474	cMET-低	HER2+	0.11	0.11	0.10	0.07	4.76	4.72	0.93	0.72
乳腺_BT474-J4	cMET-低	HER2+	>10	>10	0.08	0.07	4.79	4.05	NA	NA
乳腺_JimT1	cMET-过量	HER2+	>10	>10	0.73	0.74	1.77	2.19	NA	NA
hn_HN5C12	cMET-过量	HER1+	4.12	3.85	0.31	0.41	0.81	1.26	0.50	0.47

[0158] 化合物 I 在细胞系 BT474-J4 中的剂量响应使用 1 μM 固定浓度的拉帕替尼来确定。如图 5A 所示, 发现化合物 I 的 IC₅₀ 在拉帕替尼浓度为 1 μM 时为 0.11 μM。在不存在拉帕替尼时, 化合物 I 的 IC₅₀ 为 3 μM, 而拉帕替尼本身在 1.0 μM 显示最小的作用 (< 50% 抑制)。此外, 如图 5B 所示, 当化合物 I 和拉帕替尼在相同给药条件下组合时也检测到凋亡诱导。

[0159] 在 BT474-J4 细胞中通过化合物 I 抑制 AXL 恢复拉帕替尼敏感性

[0160] 出人意料地发现, AXL 在 BT474-J4 中高度表达和磷酸化, 但在 BT474 细胞中不表达, 如经蛋白印迹分析 (图 6 中所示) 确定和经定量 RT-PCR 证实的那样。已报道 AXL 在多种癌症中过表达, 包括结肠癌 (Craven et al., Int J Cancer 1995 ;60 :791-7)、肺癌 (Shieh et al., Neoplasia 2005 ;7 :1058-64)、食管癌 (Nemoto et al., Pathobiology. 1997 ; 65(4) :195-203)、甲状腺癌 (Ito et al., Thyroid1999, 9(6) :563-7)、卵巢癌 (Sun et al, Oncology 2004 ;66 :450-7)、胃癌 (Wu et al, Anticancer Res. 2002 ;22(2B) :1071-8) 和乳腺癌 (Berclaz et al., Ann Oncol2001 ;12 :819-24), AXL 与这些癌症中较差的预后有关。AXL 在组织培养物中的过表达引起致癌性转化 (oncogenic transformation)。因此, 本发明的组合可用于治疗所有这些 AXL- 过量表达的肿瘤。

[0161] 如图 6 进一步显示的那样, 单独的拉帕替尼在 BT474 和 BT474-J4 两种细胞中抑制 HER2 的磷酸化; 然而, 拉帕替尼抑制 AKT 和 ERK 磷酸化的下游信号转导, 且仅在 BT474 而非 BT474-J4 细胞中降低细胞周期蛋白 D1 水平。在另一方面, 单独的化合物 I 在 BT474-J4 细胞中抑制 AXL 的磷酸化, 但不抑制 AXL 磷酸化的下游信号转导。出人意料的是, 化合物 I 和拉帕替尼的组合在 BT474-J4 细胞中实质上抑制 HER2、AXL、AKT 和 ERK 的磷酸化且降低细胞周期蛋白 D1 水平。上述细胞信号转导抑制作用与在 BT474-J4 中检测的化合物 I 和拉帕

替尼的组合对细胞生长抑制和凋亡诱导的有力的协同作用非常好地相关。这些结果,以及表 5 和图 7 中所示的结果,提供了以下证据 1) AXL 过表达赋予对拉帕替尼或曲妥珠单抗的耐药机理,以及 2) 化合物 I 和拉帕替尼的组合或化合物 I 和曲妥珠单抗的组合克服了这些肿瘤细胞中的耐药性。

[0162] 化合物 I 和曲妥珠单抗的组合对 HER2+ 肿瘤细胞系的作用

[0163] 曲妥珠单抗是人源化单克隆抗体,其与 HER2 受体的胞外节段结合并抑制 HER2 信号转导。如图 7 所示,在治疗 5 天后,单独的曲妥珠单抗在 BT474 细胞中显示了 40% (不存在 HGF) 和 35% (存在 HGF) 的细胞生长抑制,而在 BT474-J4、OE-33 和 N87 细胞中无显著抑制。如表 5 所示,化合物 I 和曲妥珠单抗的组合在所有四种有 HER2 扩增的细胞系中增强了细胞生长抑制,如通过更低的 IC_{50} 值或协同作用 (使用 EOHSA 分析) 所指示的那样。所述结果还证明了将化合物 I 与 HER2 抑制剂组合对有 HER2 扩增的肿瘤细胞系的益处。

[0164] 表 5. 化合物 I 和曲妥珠单抗对 HER2+ 肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0165]

细胞系	cMET	HER+	HGF	IC ₅₀ (μM), 5 天治疗, N=2			
				曲妥珠单抗	在(曲妥珠单抗+化合物 I)中的曲妥珠单抗	在(曲妥珠单抗+化合物 I)中的化合物 I	化合物 I
乳腺_BT474	cMET-低	HER2+	-HGF	>0.687**	0.032	0.465	3.651
乳腺_BT474	cMET-低	HER2+	+HGF	>0.687**	0.051	0.746	3.941
乳腺_BT474_J4	cMET-低	HER2+	-HGF	>0.687	0.010	0.139	2.954
乳腺_BT474_J4	cMET-低	HER2+	+HGF	>0.687	0.009	0.132	2.909
胃_N87	cMET-过量	HER2+	-HGF	>0.687	0.039	0.570	1.361
胃_N87	cMET-过量	HER2+	+HGF	>0.687	0.040	0.582	1.616
食管_OE33	cMET+	HER2+	-HGF	>0.687	0.001	0.016	0.035
食管_OE33	cMET+	HER2+	+HGF	>0.687	0.003	0.037	0.127

[0166] ** 在治疗 5 天后,曲妥珠单抗在 BT474 中最大抑制 35 ~ 40% 细胞生长。

[0167] 化合物 I 和厄洛替尼对肿瘤细胞系的作用

[0168] 厄洛替尼为 EGFR 抑制剂,并且在细胞培养物中在高浓度时也抑制 HER2。单独的厄洛替尼在所测试的大多数肿瘤细胞系中活性不很好。化合物 I 和厄洛替尼的组合在表 6 中列出的肺、头颈 (hn)、乳腺、卵巢、胃和表皮肿瘤细胞系中显示细胞生长抑制的协同作用,如 $CI < 0.9$ 所指示和经 EOHSA 分析证实的那样。

[0169] 应注意,如图 8 所示,发现 NCI-H1648 肺肿瘤细胞系对厄洛替尼耐药 ($IC_{50} > 10 \mu M$),对化合物 I 中度敏感 (不存在 HGF 时 $IC_{50} = 0.96 \mu M$,存在 HGF 时 $0.40 \mu M$),但对厄洛替尼和化合物 I 的组合高度敏感。类似地,发现 NCI-H1573 即一种有 cMET 和 EGFR 共扩增的肺肿瘤细胞系,对厄洛替尼耐药且对化合物 I 中度敏感,但对这两种化合物的组合更敏感。这些结果表明厄洛替尼与式 I 化合物的组合可在这些肿瘤细胞中提供更有效的治疗。

[0170] 表 6. 化合物 I 和厄洛替尼的组合对乳腺、结肠、胃、头颈、肺、卵巢和皮肤肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0171]

细胞系	cMET	HER amp+	平均 IC50 (nM) N=2						组合作用	
			厄洛替尼		厄洛替尼或化合物 I (厄洛替尼+化合物 I)		化合物 I		CI @IC50	
			-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF
乳腺_KPL4	cMET-低	HER2+	>10	>10	0.21	0.19	0.47	0.59	NA	NA
结肠_HT29	cMET-过量	无	>10	>10	0.43	0.47	0.56	0.57	NA	NA
结肠_SW48	cMET-过量	无	2.35	2.62	0.12	0.09	0.23	0.18	0.56	0.44
胃_AGS	cMET-低	无	>10	>10	0.30	0.31	0.61	0.61	NA	NA
胃_SNU16	cMET-过量	无	6.46	9.37	0.05	0.06	0.06	0.07	0.86	0.78
hn_Detroit562	cMET+ (<5)	无	>10	>10	0.25	0.16	0.41	0.37	NA	NA
hn_HN5*	cMET-过量	HER1+	6.72	>10	0.13	0.21	0.80	1.09	0.18	NA
hn_HN5C2*	cMET-过量	HER1+	>10	>10	0.21	0.29	0.81	1.33	NA	NA
hn_SCC12	cMET-过量	无	>10	>10	0.37	0.44	1.14	1.36	NA	NA
hn_SCC15	cMET-过量	HER1+	1.62	7.70	0.13	0.14	0.63	0.61	0.30	0.25
肺_H1573	cMET+	HER1+	>10	>10	0.43	0.34	1.51	1.03	NA	NA
肺_H1648	cMET+	无	>10	>10	0.33	0.06	0.96	0.40	NA	NA
肺_H1975	TBD	无	>10	>10	0.98	0.99	1.39	1.22	NA	NA
肺_H1993*	cMET+	无	8.13	>10	0.004	0.02	0.01	0.04	0.32	NA
肺_H2170	cMET-过量	HER2+	1.28	7.74	0.33	0.30	0.67	0.53	0.90	0.61
肺_H2342	cMET+	无	>10	>10	0.84	0.79	1.61	1.62	NA	NA
肺_H441	cMET+ (<5)	无	>10	>10	0.61	0.62	1.26	1.44	NA	NA
肺_H596	cMET-突变	无	>10	>10	0.59	0.44	1.22	0.82	NA	NA
肺_H69	cMET-突变	无	>10	>10	0.90	0.79	1.20	1.05	NA	NA
肺_HOP-92	cMET-突变	无	>10	>10	0.45	0.35	0.82	0.65	NA	NA
卵巢_SKOV3	cMET-过量	HER2+	5.62	5.39	0.84	0.78	1.64	1.54	0.74	0.72
皮肤_A431*	cMET-过量	HER1+	3.22	>10	0.18	0.20	0.50	0.52	0.44	NA

[0172] *N = 1, 进行了一次实验

[0173] 化合物 I 与拉帕替尼或抗-HER3 抗体对 HER3 过表达的肿瘤细胞系的组合作用

[0174] MKN45 细胞具有 cMET+ 和过表达水平的 HER3。如表 7 和图 9 所示, HRG 在 MKN45 肿瘤细胞中降低了化合物 I 抑制细胞生长的敏感性 (IC₅₀ 值从不存在 HRG 时的 20nM 增加至存在 HRG 时的 450nM) 和抑制 HER3 磷酸化的敏感性。出人意料的是, 在 MKN45 细胞中拉帕替尼恢复了化合物 I 的敏感性, 且当其与化合物 I 组合时在存在 HRG 的情况下显示了强的细胞生长抑制协同作用, 如 CI = 0.12 和 EOHSA 分析所指示的那样。作为对照, 具有 MET+ 和低表达 HER3 的 HS746T 胃肿瘤细胞即使在存在 HRG 的情况下仍然对化合物 I 敏感。上述结果证明, 将化合物 I 与拉帕替尼组合对 MET+ 和 HER3- 过表达的肿瘤细胞是有益的。此外, 将化合物 I 与抗-HER3 抗体 (单克隆抗人 erbB3 抗体 mab3481, 获自 R&D Systems, Minneapolis, MN) 组合在 MKN45 细胞中增强了化合物 I 的敏感性, 且显示了对细胞生长抑制的协同作用 (EOHSA) (表 8)。

[0175] 表 7: 化合物 I 与拉帕替尼的组合对 MET+ 和 HER3 过表达的肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0176]

细胞系	HER3	平均 IC ₅₀ (μM) N=2						组合作用	
		拉帕替尼		拉帕替尼或化合物 I (拉帕替尼+化合物 I)		化合物 I		CI @IC ₅₀	
		-HRG	+HRG	-HRG	+HRG	-HRG	+HRG	-HRG	+HRG
MKN-45	HER3- 过量	6.16	5.06	0.01	0.04	0.02	0.45	0.75	0.12
HS746T	HER3- 低	7.69	7.37	0.01	0.01	0.01	0.01	0.86	0.73

[0177] 表 8: 化合物 I 与抗-HER3 抗体的组合在 HER3 过表达的 MKN-45 肿瘤细胞系中的细胞生长抑制作用

[0178]

细胞系	cMET	HER3	+HRG (10ng/mL), 平均 IC ₅₀ N=2		
			抗-HER3ab (μg/mL)	抗-HER3ab (μg/mL) 或化合物 I (μM) (抗-HER3ab+化合物 I)	化合物 I (μM)
MKN-45	cMET+	HER3-过量	>10	0.05	0.47

[0179] 化合物 I 和吉非替尼对肿瘤细胞系的作用

[0180] 吉非替尼是选择性 HER1 抑制剂。单独的吉非替尼在所测试的两种肺肿瘤细胞系中活性不是很好, 且在 SCC15 头颈肿瘤系中显示了中度的活性。化合物 I 和吉非替尼的组合在表 9 中所列的肺和头颈肿瘤细胞系中显示了细胞生长抑制的协同作用, 如 CI < 0.9 和 / 或 EOHSA 分析所指明的那样。

[0181] 表 9. 以 1 : 1 恒定摩尔比组合的化合物 I 和吉非替尼对肺和头颈 (hn) 肿瘤细胞系的细胞生长抑制作用

[0182]

细胞系	cMET	HER amp+	平均 IC ₅₀ (μM) N=2						组合作用	
			吉非替尼		吉非替尼或化合物 I (吉非替尼+化合物 I)		化合物 I		CI @IC ₅₀	
			-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF	-HGF	+HGF
肺_H1648	cMET+	无	10.28	>10	0.18	0.12	0.85	0.62	0.15	NA
肺_H1573	cMET+	HER1+	>10	>10	0.52	0.37	1.75	1.12	NA	NA
hn_SCC15	cMET-过量	HER1+	1.21	5.44	0.10	0.12	0.67	0.82	0.25	0.17

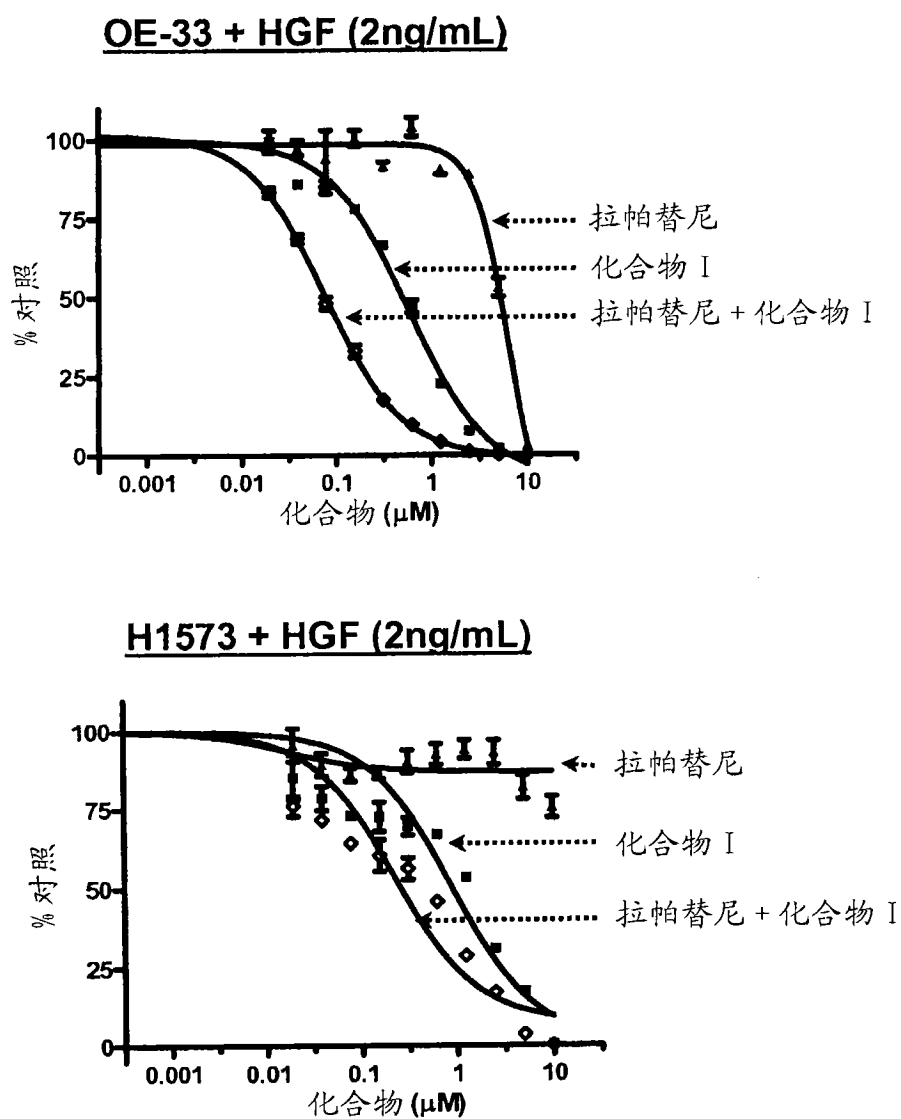


图 1

N87-HER2+ 和 c-MET 过表达的细胞系

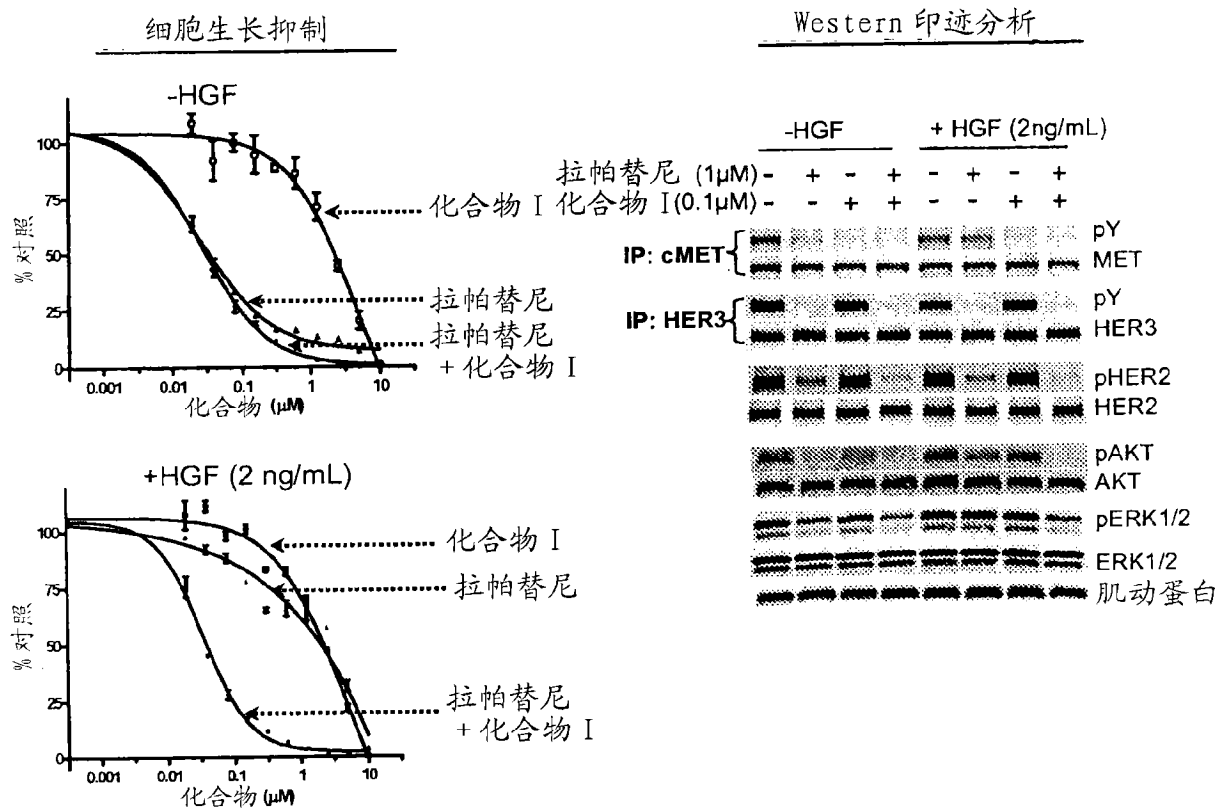


图 2

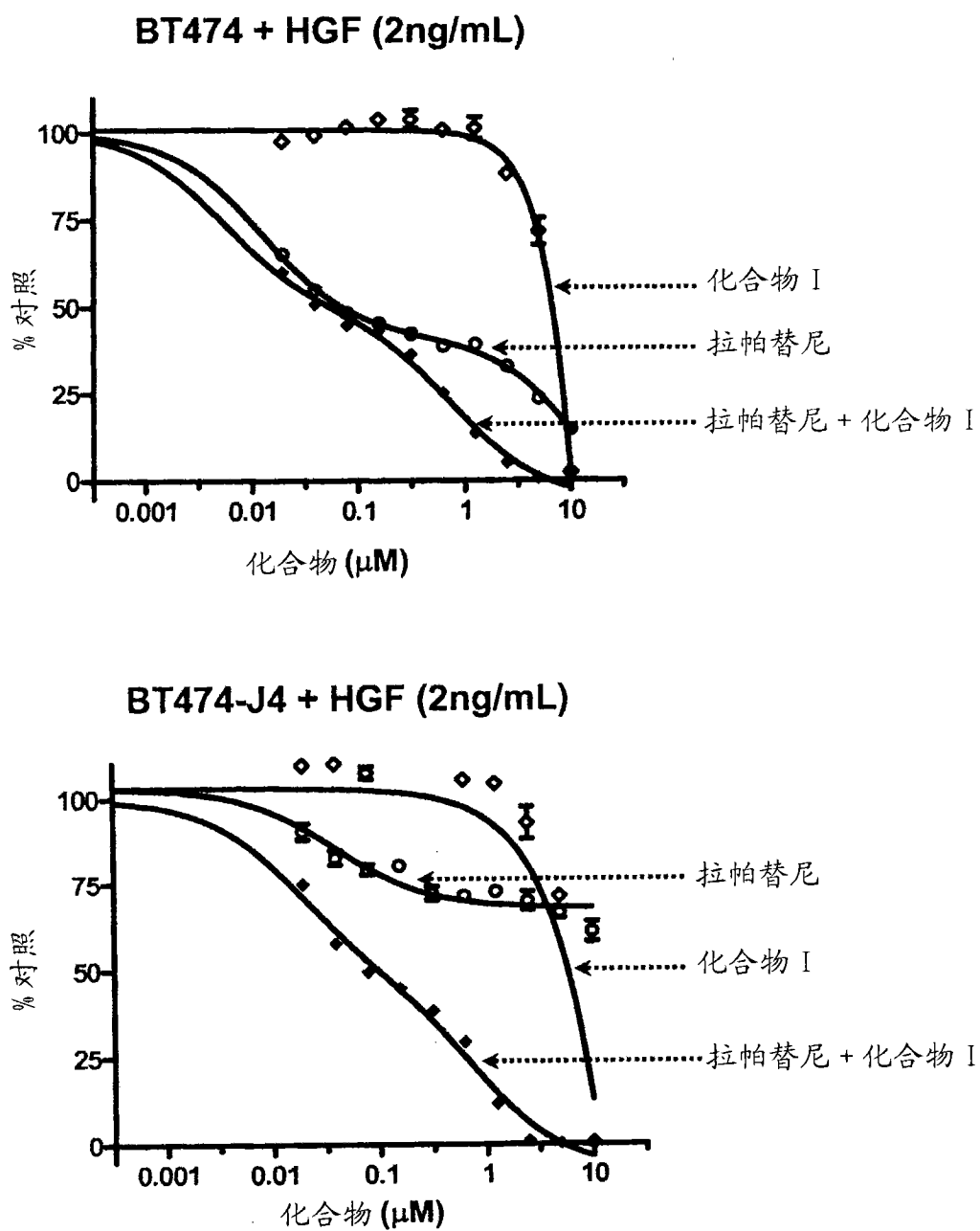


图 3

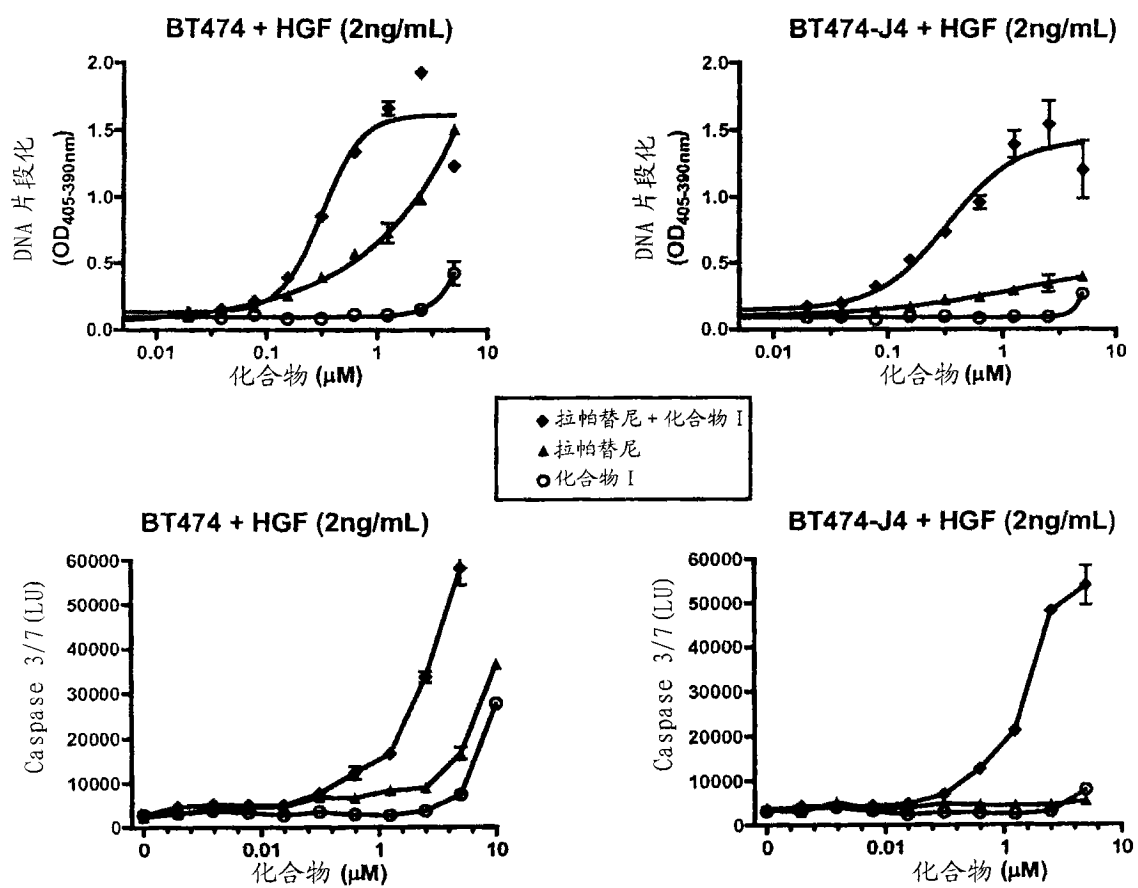


图 4

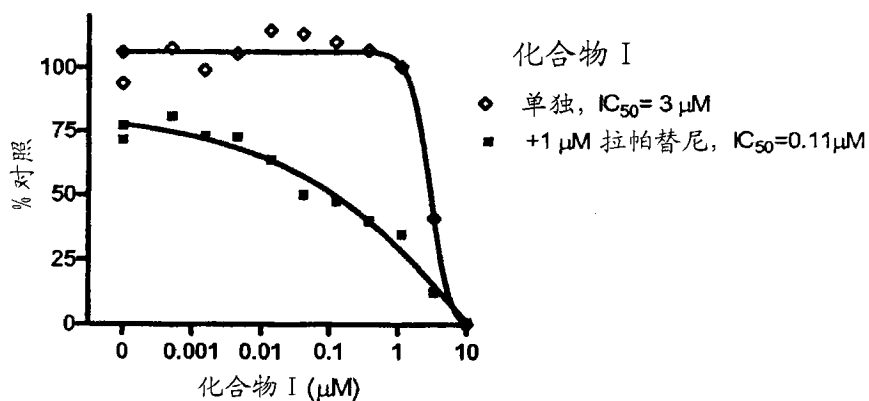
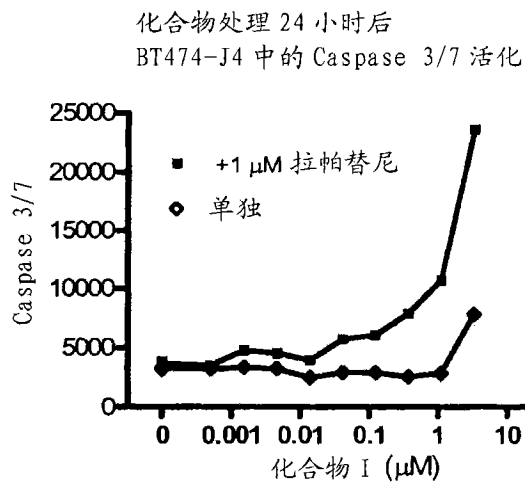
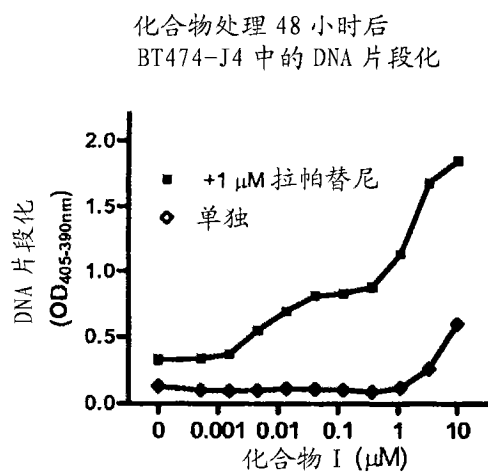
A. BT474-J4 中的细胞生长抑制 (含有 2ng/ml HGF)**B. BT474-J4 中的凋亡诱导 (含有 2ng/ml HGF)**

图 5

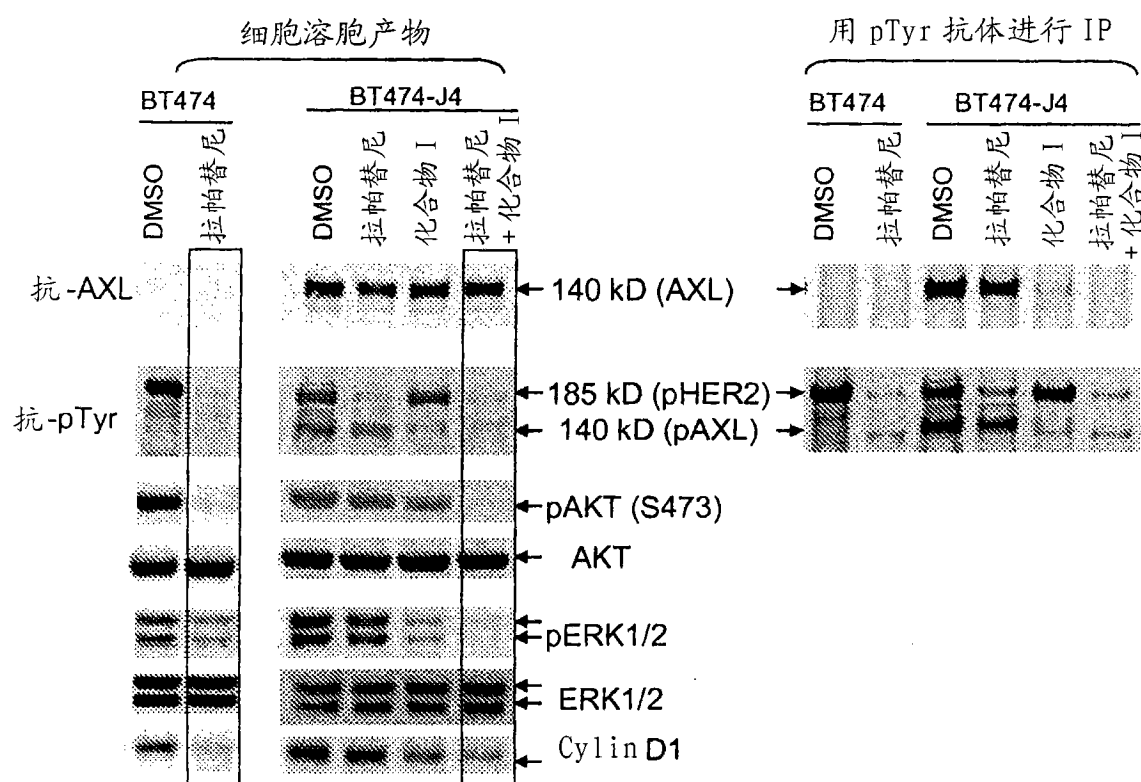


图 6

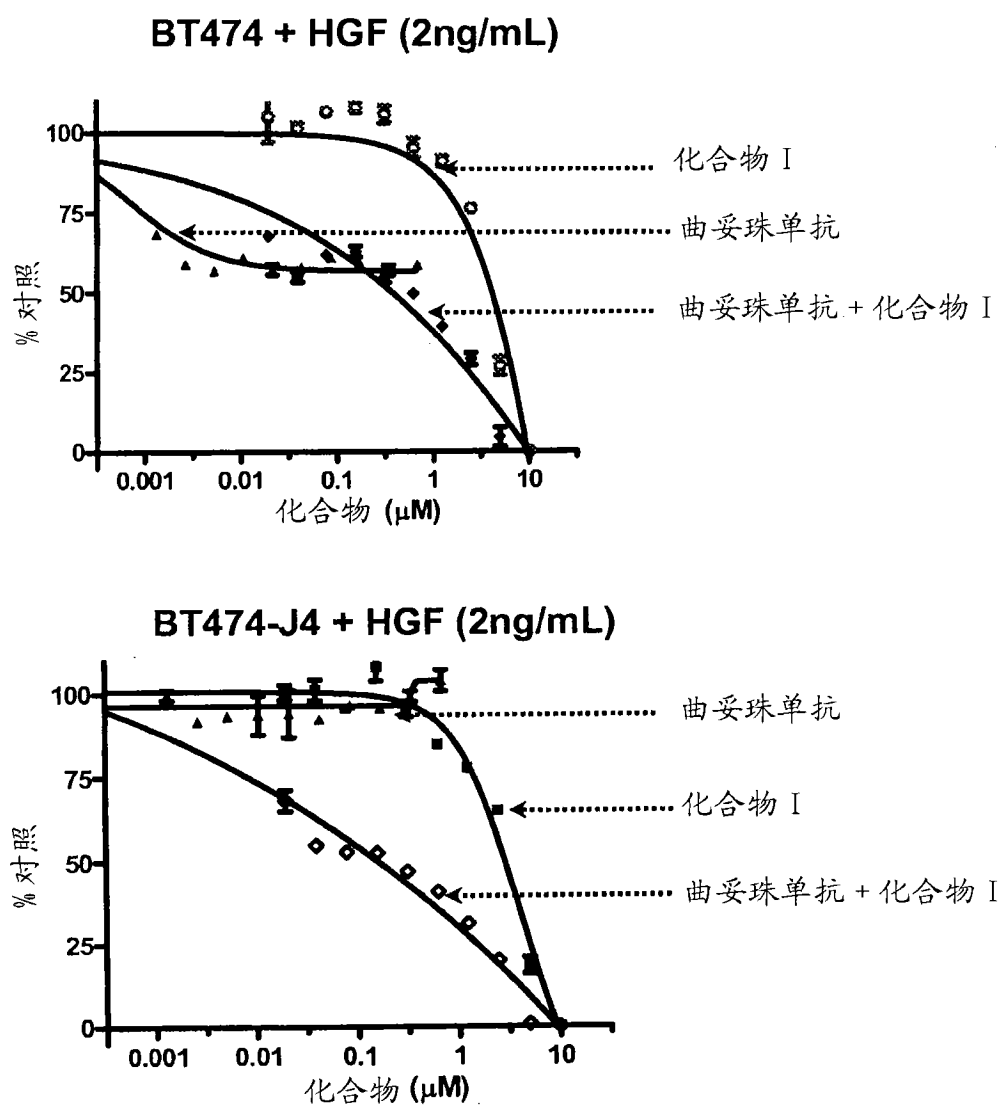


图 7

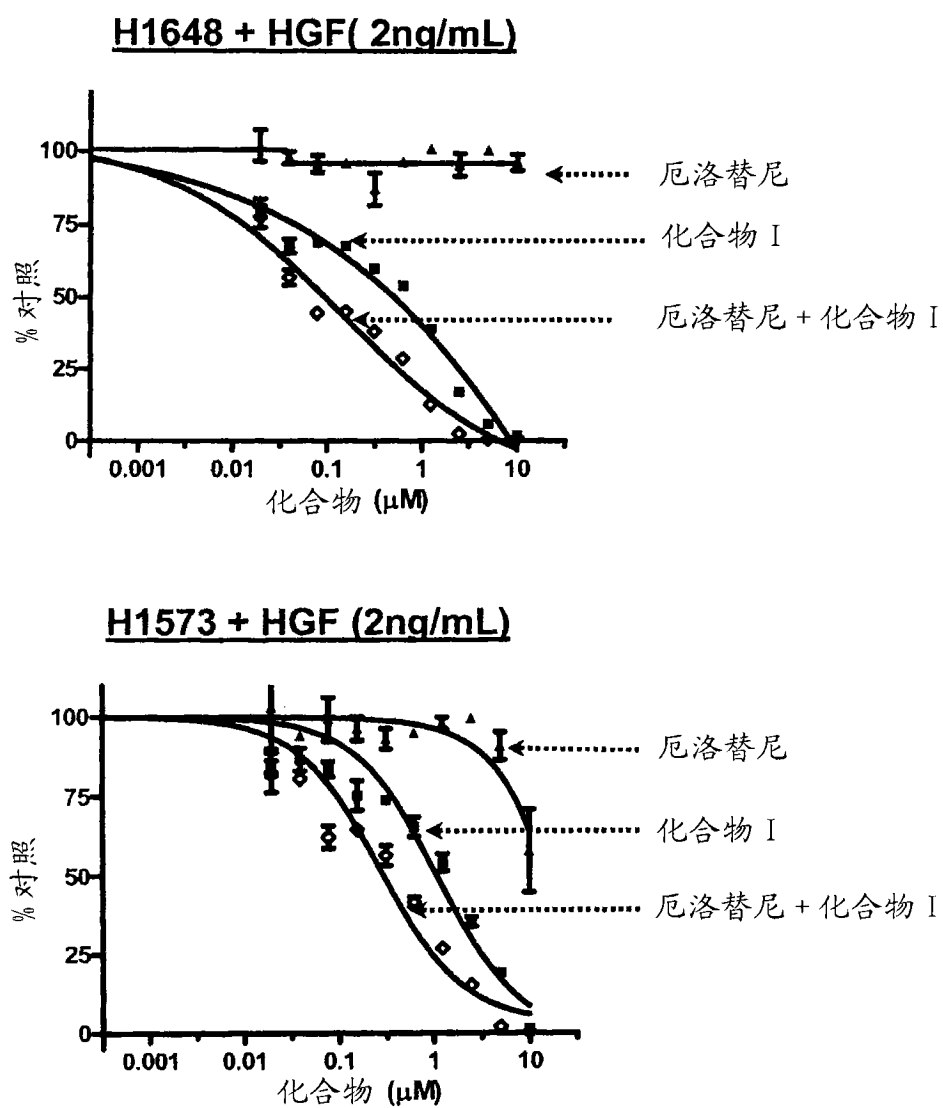


图 8

MKN45-c-MET+ 和 HER3- 过表达的肿瘤细胞系

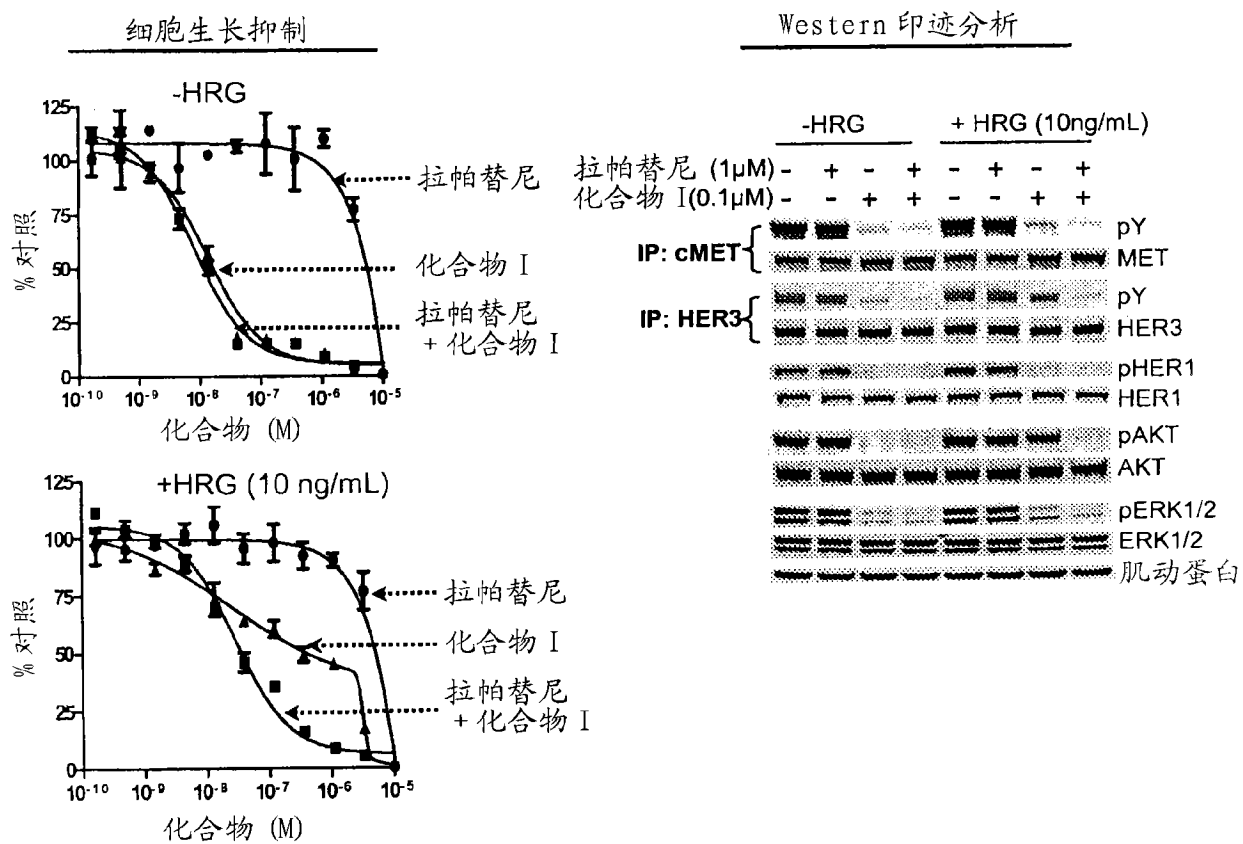


图 9