



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202031253 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：108142557

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K31/4025 (2006.01)

C07D405/10 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/07/12 美國

61/845,749

(71)申請人：印度商皮拉馬爾企業有限公司 (印度) PIRAMAL ENTERPRISES LIMITED (IN)
印度(72)發明人：阿葛瓦爾 維納 AGARWAL, VEENA (US)；派瑞亞沙米 葛瑞得哈倫
PERIYASAMY, GIRIDHARAN (IN)；拉瑟斯 瑪基 喬伊斯 RATHOS, MAGGIE
JOYCE (IN)；斯里瓦斯塔瓦 安基塔 SRIVASTAVA, ANKITA (IN)；錫里尼娃撒
蘇里薩 SRINIVASA, SREESHA (US)

(74)代理人：蔡清福；蔡馭理

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：13 共 67 頁

(54)名稱

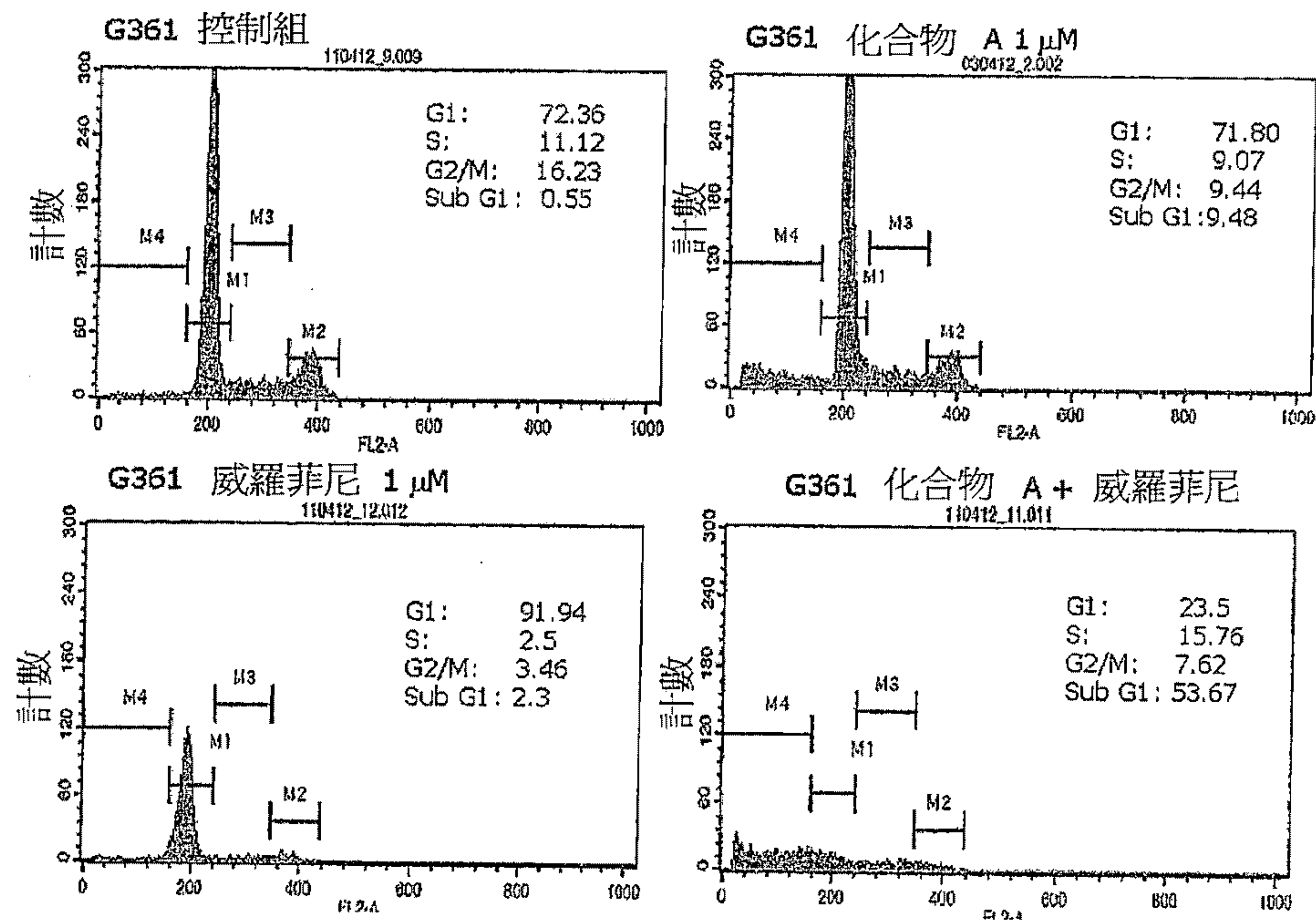
治療黑色素瘤的藥物組合

(57)摘要

本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，該醫藥組合包括週期蛋白依賴型激酶(CDK)抑制劑以及至少一抗癌劑，該 CDK 抑制劑以(如本文所述的)式 I 化合物或其藥學上可接受鹽類表示，該至少一抗癌劑選自 BRAF 抑制劑或 MEK 抑制劑。本發明也關於一種用於治療黑色素瘤的方法，包括將治療有效量的 CDK 抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑投予需要之個體，該至少一抗癌劑選自 BRAF 抑制劑或 MEK 抑制劑。

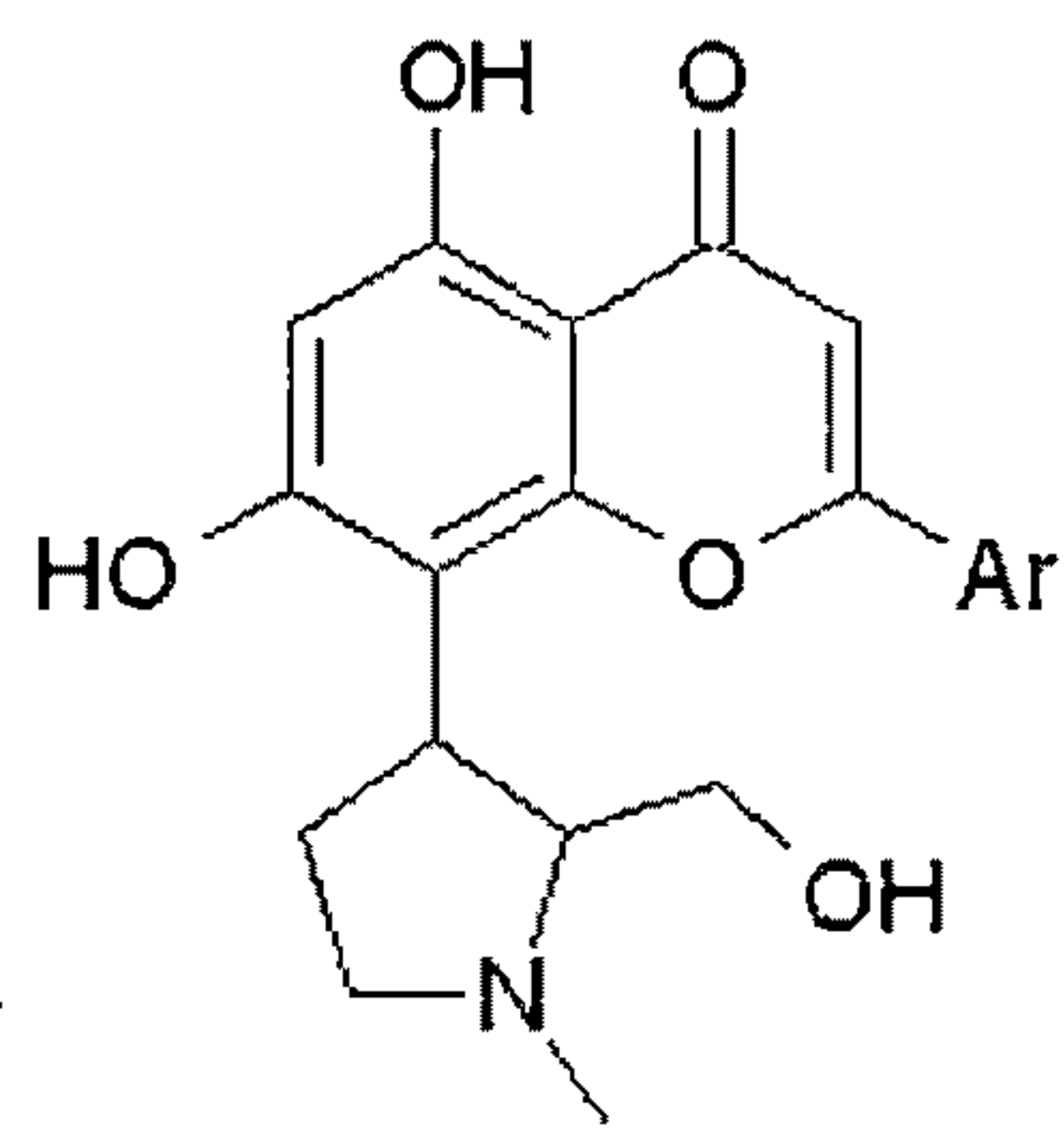
The present invention relates to a pharmaceutical combination comprising a cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor represented by a compound of formula I (as described herein) or a pharmaceutically acceptable salt thereof; and at least one anticancer agent selected from a BRAF inhibitor or a MEK inhibitor, for use in the treatment of melanoma. The present invention also relates to a method for the treatment of melanoma comprising administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of a CDK inhibitor and a therapeutically effective amount of at least one anticancer agent selected from a BRAF inhibitor or a MEK inhibitor.

指定代表圖：



第1圖

特徵化學式：



式I

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

治療黑色素瘤的藥物組合

A Pharmaceutical Combination For The Treatment Of Melanoma

【中文】

本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，該醫藥組合包括週期蛋白依賴型激酶(CDK)抑制劑以及至少一抗癌劑，該CDK抑制劑以(如本文所述的)式I化合物或其藥學上可接受鹽類表示，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。本發明也關於一種用於治療黑色素瘤的方法，包括將治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑投予需要之個體，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【英文】

The present invention relates to a pharmaceutical combination comprising a cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor represented by a compound of formula I (as described herein) or a pharmaceutically acceptable salt thereof; and at least one anticancer agent selected from a BRAF inhibitor or a MEK inhibitor, for use in the treatment of melanoma. The present invention also relates to a method for the treatment of melanoma comprising administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of a CDK inhibitor and a therapeutically effective amount of at least one anticancer agent selected from a BRAF inhibitor or a MEK inhibitor.

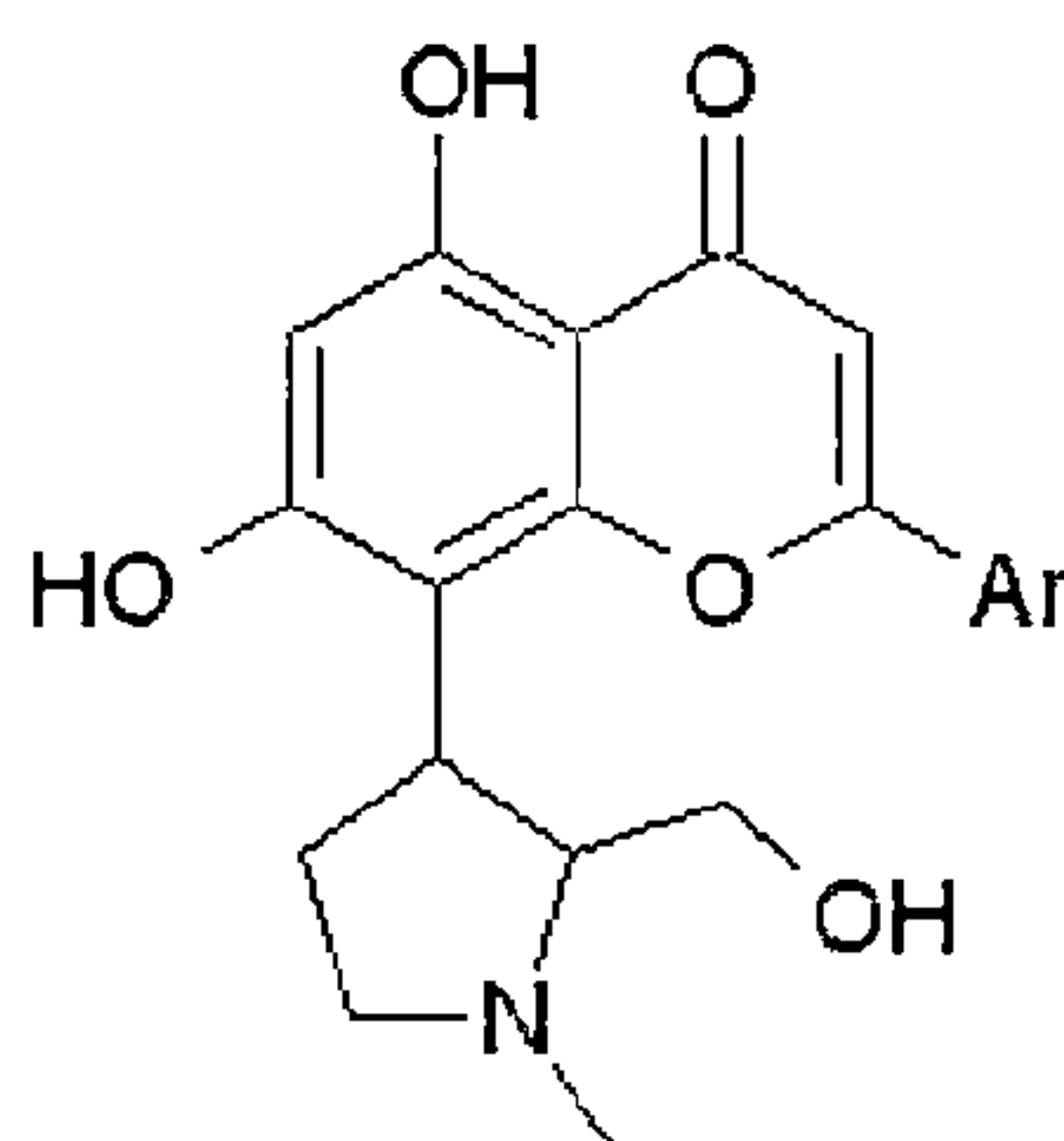
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



式I

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

治療黑色素瘤的藥物組合

A Pharmaceutical Combination For The Treatment Of Melanoma

【技術領域】

【0001】 本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，該醫藥組合包括週期蛋白依賴型激酶（CDK）抑制劑以及至少一抗癌劑，該CDK抑制劑以（如本文所述的）式I化合物或其藥學上可接受鹽類表示，該至少一抗癌劑選自絲胺酸-蘇胺酸蛋白激酶B-raf（BRAF）抑制劑或促分裂原活化蛋白激酶（MEK）抑制劑。本發明也關於一種使用該醫藥組合治療黑色素瘤的方法。

【先前技術】

【0002】 黑色素瘤是皮膚癌的最嚴重類型。事實上，黑色素瘤是源自稱為黑色素細胞（其為製造色素的細胞）的細胞的惡性腫瘤。它最經常發生於皮膚，但也可在眼睛或在鼻子、嘴巴或生殖器的內層發展。隨後，黑色素瘤可擴散至內部器官。當黑色素瘤發生在皮膚中時，被稱為皮膚的黑色素瘤。當發生在眼睛時，黑色素瘤被稱為眼或眼內黑色素瘤。黑色素瘤的發生率正在世界各地增加中，經報導惡性黑色素瘤佔皮膚癌死亡的80%（N. Engl. J. Med., 2010, 363, 8, 711-723）。

【0003】 當黑色素瘤擴散時，癌細胞通常在淋巴結中被發現。當癌細胞到達淋巴結時，表示癌細胞可能已擴散至身體其他部位，如肝臟、肺臟或腦，造成轉移性黑色素瘤。事實上，黑色素瘤轉移為高度侵略性的，且具有轉移性黑色素瘤的病患的存活時間平均只有3-15個月。不幸地，對於轉移性黑色素瘤的有效治療並不存在。早期診斷及即時手術移除是病患對於

可能治癒的可能選擇。轉移性黑色素瘤的療法起初包括如介白素-2、達卡巴仁（dacarbazine）、temozolomide、fotemustine及carboplatin的藥物，但每種藥物與不良反應率及不良整體存活率相關。例如，達卡巴仁被發現與7-12%的反應率及開始治療後5-8個月的中間整體存活率相關（N. Engl. J. Med., 2011, 364, 26, 2507-2516）。

【0004】 在一項對於一大群常見癌症中分裂原活化蛋白（MAP）激酶路徑的研究中，已發現40-60%的黑色素瘤在編碼絲胺酸-蘇胺酸蛋白激酶B-raf（BRAF）的基因中攜帶活化突變。在黑色素瘤中觀察到的BRAF突變，超過90%是位在密碼子600，而且在這些當中，超過90%是造成以麩胺酸取代纈胺酸的單一核苷酸突變（BRAFFV600E）。第二種最常見的突變是以離胺酸取代纈胺酸的BRAFFV600K，其代表5-6%的黑色素瘤，接著是BRAFFV600R（以精胺酸取代纈胺酸）以及BRAFFV600D（以天門冬胺酸取代纈胺酸）。（Journal of Translational Medicine, 2012, 10, 85, 1-9）。

【0005】 BRAF抑制劑已被發現在低奈米莫耳濃度下在具有BRAF突變黑色素瘤的多數病患中的腫瘤縮減是有效的。功效的限制因子是抗藥性及限制在5-7個月的無惡化存活期（Progression-free survival）。有效力的BRAFFV600抑制劑的幾個例子包括BAY43-9006（索拉非尼（sorafenib），Bayer）、威羅菲尼（vemurafenib，PLX4032，Plexxikon；RG7204、RO5185426，Hofmann-LaRoche）、GDC-0879（GlaxoSmithKline）、達拉菲尼（dabrafenib，GSK2118436，GlaxoSmithKline）、PLX4720（Hofmann-LaRoche）、BMS-908662（XL281，Bristol-Myers Squibb）、LGX818（Novartis）、PLX3603（RO5212054，Hofmann-LaRoche）、ARQ-736（ArQule）、DP-4978（Deciphera）以及RAF265（Novartis）。

【0006】 威羅菲尼是突變型BRAF的有效力抑制劑；特別是BRAFFV600E突變型。威羅菲尼在81%具有BRAFFV600E突變的黑色素瘤的病人中引發完全或部分的腫瘤消退。在所有疾病位置（包括骨、肝臟以及小

腸)觀察到反應。然而，在對威羅菲尼的可靠早期反應之後，發現反應性腫瘤發展出對治療的抗性。在某些具有BRAFFV600E突變的病人中，腫瘤顯示出抗性但沒有早期反應的證據(N. Engl. J. Med., 2010, 363, 9, 809-819)。達拉菲尼是人類野生型BRAF及CRAF酵素以及突變形式的BRAFFV600E、BRAFFV600K及BRAFFV600D的有效力的及選擇性的RAF激酶抑制劑。

【0007】 MEK1及MEK2是催化目標蛋白質中酪胺酸及蘇胺酸兩者磷酸化作用的雙重特異性激酶；雙重特異性激酶被包括在蛋白質-絲胺酸/蘇胺酸激酶家族中。蛋白質磷酸化作用是訊息傳遞中使用的最廣泛類型的轉譯後修飾作用(Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 417, 5-10)。MEK1及MEK2是參與RAS-RAF-MEK-ERK訊息傳遞級聯反應(cascade)的廣泛表現的親水性非受體蛋白質，其有時表示為分裂原活化蛋白激酶(MAPK)級聯反應。Ras調控的Raf活化反應觸發MEK1及MEK2(MAP/ERK激酶1及2)的活化，其依序將ERK1及ERK2(胞外訊息調節激酶1及2)的酪胺酸-185及蘇胺酸-183磷酸化。活化的ERK1及ERK2易位並累積在細胞核中，其中它們可磷酸化各種受質，包括控制細胞生長及存活的轉錄因子。這些級聯反應的控制調節涉及了細胞增生與分化，而這些激酶的未調節活化可造成腫瘤形成。已在超過30%的人類腫瘤中偵測到RAS/RAF/MEK路徑的失調，然而，在MEK1及MEK2基因中的突變很少，所以MEK1/2的過度活化通常起因於RAS及/或BRAF中的功能獲得型突變(gain-of-function mutations)。考慮到Ras/Raf/MEK/ERK路徑在人類癌症發展的重要性，訊息傳遞級聯反應的激酶組成是在癌症及其他增生性疾病中調節疾病進程的潛在重要標的。

【0008】 有效力的MEK抑制劑的一些例子包括曲美替尼(trametinib, MekinistTM)、司美替尼(selumetinib, AstraZeneca)、比美替尼(binimetinib)(Array Biopharma)、PD-0325901(Pfizer)、考比替尼(cobimetinib)(Exelixis)、瑞法替尼(refametinib)(Valeant Pharmaceutical

Int.)、pimasertib (Santhera Pharmaceuticals)、TAK-733 (Takeda) 及WX-554 (UCB Pharma S A)。

【0009】 Trametinib是MEK1及MEK2的有效力選擇性抑制劑。當與化學療法(dacarbazine或paclitaxel)比較時，在帶有BRAFFV600E或BRAFFV600K突變的轉移性惡性黑色素瘤而先前未以BRAF抑制劑治療的病患中，顯現了trametinib的顯著臨床活性。

【0010】 因此，由以上討論證實了轉移性黑色素瘤及抵抗性BRAF突變型黑色素瘤以現有療法仍然難以治療；以及因此，對於預防這些症狀的進程及治療這些症狀的新有效治療有持續的需求。

【發明內容】

【0011】 在一方面，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，該醫藥組合包括週期蛋白依賴型激酶(CDK)抑制劑以及至少一抗癌劑，該CDK抑制劑以(如本文所述的)式I化合物或其藥學上可接受鹽類表示，該至少一抗癌劑選自絲胺酸-蘇胺酸蛋白激酶B-raf(BRAF)抑制劑或促分裂原活化蛋白激酶(MEK)抑制劑。

【0012】 另一方面，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括將治療有效量的CDK抑制劑與治療有效量的至少一抗癌劑合併投予需要之個體，該CDK抑制劑以(如本文所述的)式I化合物或其藥學上可接受鹽類表示，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【0013】 另一方面，本發明有關於一種本發明的醫藥組合物，包括CDK抑制劑及至少一抗癌劑，以及一個或多個藥學上可接受載體、稀釋劑或賦型劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其藥學上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【0014】 在其他方面，本發明有關於一種藥物組合用於治療黑色素瘤的用途，該醫藥組合包括CDK抑制劑及至少一抗癌劑，該CDK抑制劑以式I

化合物或其藥學上可接受鹽類表示，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【0015】 其他方面，本發明有關於一種CDK抑制劑與至少一抗癌劑用於製造治療黑色素瘤的藥劑的用途，該CDK抑制劑以式I化合物或其藥學上可接受鹽類表示，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【0016】 其他方面，本發明有關於一種醫藥套組，包括CDK抑制劑以及至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其藥學上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【0017】 本發明的其他方面及進一步的可應用性範圍將從以下的詳細描述變得更清楚。

【圖式簡單說明】

【0018】 第1圖使用流式細胞術描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲尼對於5天後G361黑色素瘤細胞的細胞週期及細胞凋亡的效果。

【0019】 第2圖使用Annexin染色法描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲尼對於經24小時處理的G361黑色素瘤細胞的早期細胞凋亡的效果。

【0020】 第3圖使用流式細胞術描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲尼對於5天後SK-MEL3黑色素瘤細胞的細胞週期及細胞凋亡的效果。

【0021】 第4圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲尼（48小時）在A375細胞株中的效果。

【0022】 第5圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲尼（48小時）在G361細胞株中的效果。

【0023】 第6圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲

尼（48小時）在MDA-MB435S細胞株中的效果。

【0024】 第7a圖及第7b圖描述單獨的化合物A（voruciclib）及威羅菲尼（48小時）對於A375親代及A375R抗藥性細胞株的劑量反應曲線。

【0025】 第8a圖及第8b圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲尼（48小時）在A375抗藥性細胞株中的效果。

【0026】 第9a圖及第9b圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及威羅菲尼（48小時）在A375R抗藥性細胞株中的效果。

【0027】 第10a圖及第10b圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及曲美替尼（48小時）在A375抗藥性細胞株中的效果。

【0028】 第11a圖及第11b圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及曲美替尼（48小時）在A375R抗藥性細胞株中的效果。

【0029】 第12a圖及第12b圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及達拉菲尼（48小時）在A375抗藥性細胞株中的效果。

【0030】 第13a圖及第13b圖描述單獨與組合使用化合物A（voruciclib）及達拉菲尼（48小時）在A375R抗藥性細胞株中的效果。

【實施方式】

【0031】 除非另外指出，在此之前與在此之後所使用的一般術語，在本文揭露內容的上下文中較佳地具有以下含意。因此，以下提供如本發明內容中使用的一般術語的定義：

除非上下文另外清楚地指定，單數形式的「一」及「該」包括複數參考。

【0032】 使用「多個」作為術語的一部分，包括單數地或以複數參考該術語，例如術語「劑」可指單一劑或更多劑。

【0033】 如本文使用，術語「至少一」是指一或多個。例如，術語「至少一抗癌劑」意指該組合包括單一抗癌劑或更多抗癌劑。

【0034】 將被了解的是，「取代」或「以...取代」包括這種取代是根據被取代原子及取代物的容許效價的隱式但書 (implicit proviso)，以及代表一穩定化合物，其不容易進行重新排列、環化反應、消去作用等轉化作用。

【0035】 如本文所使用，術語「藥學上可接受」意指載體、稀釋劑、賦型劑及/或鹽類必須與製劑的其他成分相容，且對其接受者不是有害的。

「藥學上可接受」也意指組合物或劑量型式在宣告的醫療判斷的範圍內，適合用於動物或人類而沒有過度的毒性、刺激、過敏反應、或其他問題或併發症，與合理的效益/風險比例相稱。

【0036】 如本文所使用，術語「組合」或「醫藥組合」在本發明的上下文中意指多個抗癌劑的合併給藥；CDK抑制劑（式I化合物）及至少一抗癌劑，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑；其中抗癌劑可在同時獨立地給藥或在時間間隔內分開給藥，該時間間隔特別是允許組合夥伴顯示協同效果。

【0037】 週期蛋白依賴型激酶（CDKs）是在細胞週期的特定時期中變為活化的酵素家族。CDK由催化次單元（實際的週期蛋白依賴型激酶或CDK）以及調節次單元（週期蛋白）組成。有至少9種CDK（CDK1、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8、CDK9等）以及至少15種不同類型的週期蛋白（cyclin A、B1、B2、D1、D2、D3、E、H等）。細胞週期的每一步驟受到這種CDK複合體調節：G1/S轉化（CDK2/cyclin A、CDK4/cyclin D1-D3、CDK6/cyclin D3）、S期（CDK2/cyclin A）、G2期30（CDK1/cyclin A）、G2/M轉化期（CDK1/cyclin B）。

【0038】 如本文所使用，術語「CDK抑制劑」意指能夠抑制一或多個週期蛋白依賴型激酶（CDK）的藥劑。這些激酶的異常表現及過度表現在許多如癌症的疾病症狀中被證實。在本發明的上下文中，包含在本發明的醫藥組合中的CDK抑制劑是指式I化合物或其藥學上可接受鹽類。本發明的化合物專一性抑制CDK1/cyclin B、CDK2/cyclin E、CDK4/cyclin D、

CDK4/cyclin D1及/或CDK9/cyclin T1。

【0039】 如本文所使用，術語「BRAF抑制劑」是指能夠抑制BRAF激酶或突變的BRAF激酶活性（一或多個突變形式的絲胺酸-蘇胺酸蛋白激酶B-RAF（BRAF））的藥劑。90%已報導的BRAF突變造成在胺基酸600處以麩胺酸取代纈胺酸（V600E突變）。因此，術語「BRAF抑制劑」將在非難治性及難治性的黑色素瘤中能夠抑制BRAF或其突變型式的化合物；或者能夠抑制V600突變型式的BRAF的化合物；或者能夠抑制V600E突變型式的BRAF的化合物涵蓋在其範圍內。

【0040】 如本文所使用，術語「MEK抑制劑」是指能夠與分裂原活化蛋白激酶（MEK）交互作用以及抑制其酵素活性的藥劑。抑制MEK酵素活性依次減少MEK將受質胜肽或蛋白質磷酸化的能力。MEK1及MEK2是參與RAS-RAF-MEK-ERK訊息傳遞級聯反應的蛋白質激酶。此級聯反應參與多種過程的調控，包括細胞凋亡、細胞週期進程、細胞遷移、分化、代謝及增生。因此，術語「MEK抑制劑」將能夠抑制MEK的化合物涵蓋在其範圍內。

【0041】 如本文所使用，術語「協同的」或「協同效果」或「協同作用」是指化合物的組合（BRAF抑制劑及CDK抑制劑，即式I化合物）的治療效果，其大於在藥物組合中使用多個化合物的加成果。有益地，這種有效成分（治療上有活性的化合物）之間被組合時的協同作用，允許使用較小劑量的一或兩個有效成分，在相同劑量下提供了更大效用，及/或預防或延緩多重藥物抗藥性的增大。Chou及Talalay的組合指數（CI）法可被用來測定合併使用的化合物的協同、加成或拮抗效果。當CI值小於1時，在組合中使用的化合物之間有協同作用；當CI值等於1時，在組合中使用的化合物之間有加成作用，而當CI值大於1時有拮抗效果。協同效果可藉由將包含在本發明醫藥組合或組合物中的化合物共同配製、並透過單位劑量型式同時給藥所述化合物而獲得，或者作為同時或依序給藥的分開製劑而獲得。

【0042】 如本文所使用，「黑色素瘤」是指特徵為從皮膚或其他器官的黑色素細胞系統產生的腫瘤的生長的症狀。大部分的黑色素細胞發生在皮膚中，但也在腦膜、消化道、淋巴結及眼睛中發現。當黑色素瘤在皮膚中發生時，稱為皮下黑色素瘤。黑色素瘤也可在眼睛中發生而被稱為眼或眼內黑色素瘤。黑色素瘤很少在腦膜、消化道、淋巴結或其他發現黑色素細胞的區域發生。

【0043】 術語「突變型黑色素瘤」或「惡性黑色素瘤」可交替使用，意指包含具有缺陷的（也稱為「突變型」）黑色素瘤細胞的黑色素細胞腫瘤。惡性黑色素瘤通常從痣發生或接近痣發生，其由一團具有明顯轉移傾向的細胞組成。40-60%的黑色素瘤在編碼絲胺酸-蘇胺酸蛋白激酶B-RAF（BRAF）的基因中攜帶活化的突變。在黑色素瘤中觀察到的BRAF突變中，超過90%是位在密碼子600，而在這些中，超過90%是造成以麩胺酸取代纈胺酸的單一核苷酸突變（BRAFFV600E）。第二種最常見的突變是以離胺酸取代纈胺酸的BRAFFV600K，其代表5-6%的黑色素瘤，接著是BRAFFV600R以及BRAFFV600D。（Journal of translational Medicine, 2012, 10, 85, 1-9）。

【0044】 術語「惡性黑色素瘤」是指已透過淋巴系統及/或血管擴散至身體其他位置的黑色素瘤，其他位置包括位於皮膚下的皮下組織、淋巴結、以及其他器官，如肺臟、肝臟、至骨頭或至腦部。第三期黑色素瘤的特徵在於淋巴結轉移的程度。沒有遠端轉移的證據。第四期黑色素瘤的特徵在於遠端轉移的位置以及血清乳酸去氫酶（LDH）的量。此時期也稱為轉移性黑色素瘤。

【0045】 除非另外指出，術語「黑色素瘤」也可包括復發或抗藥性黑色素瘤。術語「復發」或「抗藥性」是指黑色素瘤的重複爆發、或是黑色素瘤的進程，無論疾病是否在所述爆發或進程之前被治癒。

【0046】 因此，提供用於治療黑色素瘤的藥物組合（如本文所述），是指治療非難治性、轉移性或難治性的BRAF突變型黑色素瘤，特別是

BRAFV600突變型黑色素瘤，以及更特別是BRAFFV600E突變黑色素瘤。

【0047】 所使用關於黑色素瘤的術語「無反應性/難治性」，在本文中用來指具有黑色素瘤的個體或病患，其已接受目前用於治療黑色素瘤可用的癌症治療，如化學療法、放射療法、手術、荷爾蒙療法及/或生物療法/免疫療法；其中該療法在臨床上不適合用來治療該病患，使得這些病患需要額外有效的療法，即仍對治療不具易受性。該用詞也可描述個體或病患，其對治療有反應但患有副作用、復發、產生抗藥性或未從黑色素瘤的一或多個症候中經歷任何緩解。在許多具體實施例中，「無反應性/難治性」意指癌細胞的至少某些明顯部分未被殺死或它們的細胞分裂被阻斷。藉由任何本領域已知用於試驗對癌細胞的治療效果的方法，在此上下文中使用為本領域接受的「難治性」意義，可在體內或體外作出癌細胞是否為「無反應性/難治性」的決定。

【0048】 如本文所使用，術語「治療週期（treatment cycle）」是指在進行CDK抑制劑（即式I化合物或其醫藥上可接受鹽類）；以及選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑的至少一抗癌劑的循環性給藥順序的期間的一時間週期。

【0049】 術語「細胞凋亡」是指程式化細胞死亡的自然過程。它是一種自我毀滅的過程，在該過程中細胞使用特化的細胞機制來殺死自己。細胞瓦解為膜連（membrane-bound）粒子，然後被細胞吞噬作用消滅。細胞凋亡是一種使後生動物控制細胞數並消滅威脅動物存活的細胞的機制。

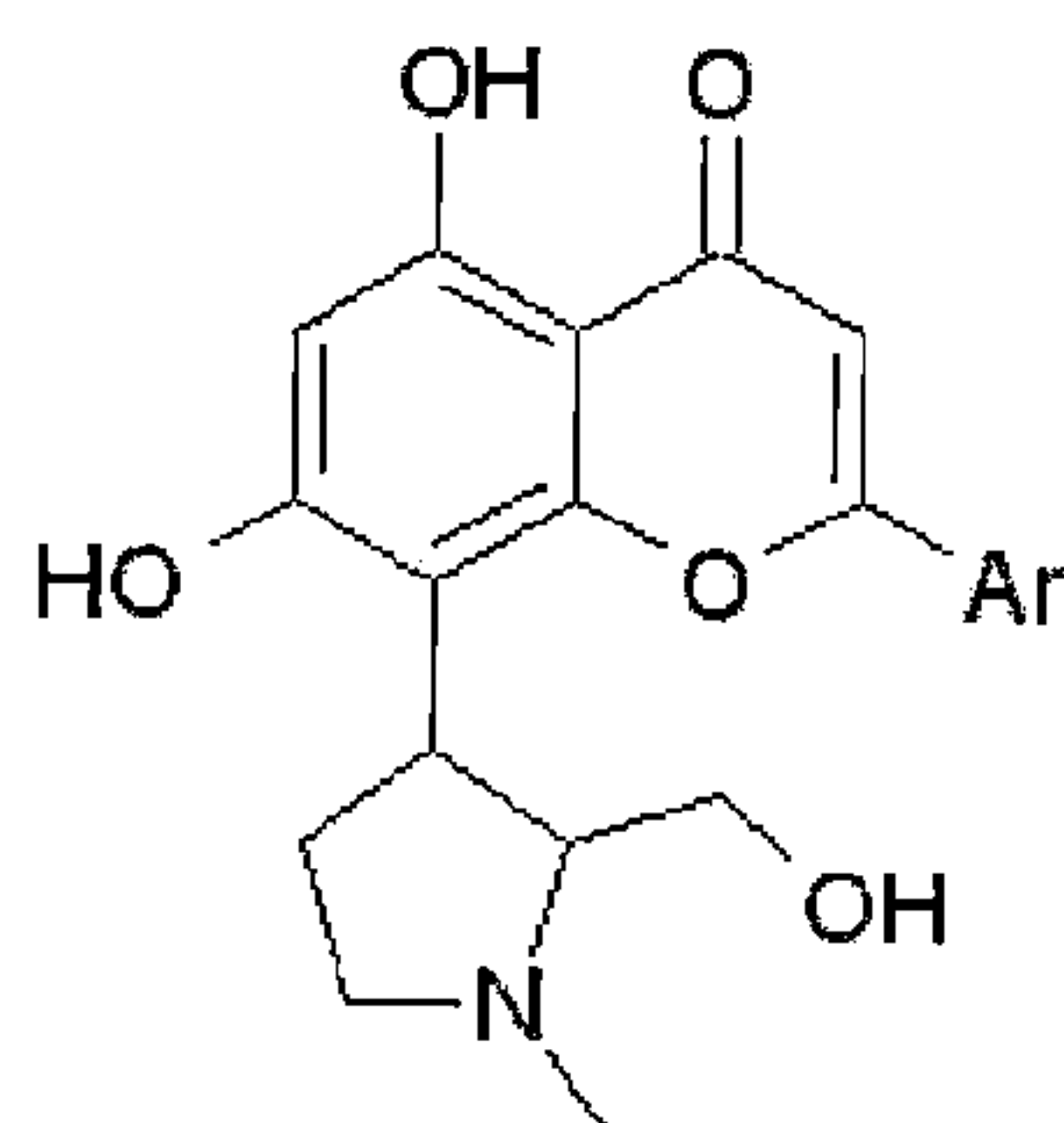
【0050】 如本文所使用的術語「個體」，是指已成為治療、觀察或實驗的對象的動物，較佳地為哺乳類，最佳地為人類，更特別是患有黑色素瘤的人類。術語「個體」可與術語「病患」交替使用。在本發明上下文中，術語「需要的個體」意指需要突變型或惡性黑色素瘤的治療的個體。替代地，術語「需要的個體」意指被診斷具有突變型或惡性黑色素瘤的個體（病患）。

【0051】 如本文所使用的術語「哺乳類」意圖在涵蓋人類以及非人類的哺乳類。非人類的哺乳類包括但不限於家畜，如牛、豬、馬、狗、貓、兔、大鼠及小鼠，以及非家畜動物。

【0052】 如本文所使用，術語「治療上有效量」是指：當對需要這種治療的個體給藥時，足夠提供治療效益的CDK抑制劑（即式I化合物或其醫藥上可接受鹽類）以及選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑的至少一抗癌劑的量，該治療效益應該包括(i)預防或延緩黑色素瘤的一或多個症候；(ii)改善或消除黑色素瘤的一或多個症候；或(iii)治療黑色素瘤。

【0053】 在個體中，較佳地為哺乳類，更佳地為人類，關於黑色素瘤的術語「治療」或「經治療」包括：(i)抑制黑色素瘤，即阻斷黑色素瘤的發展；(ii)減少黑色素瘤退化；(iii)抑制腫瘤細胞滲入週邊器官；(iv)抑制（即減少、減緩或完全停止）轉移；(v)改良黑色素瘤，即減少與黑色素瘤相關症候的嚴重性；以及(vi)某種程度地緩解與黑色素瘤相關的一或多個症候。

【0054】 根據本發明的一個方面，提供一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其包括選自式I化合物的CDK抑制劑或其醫藥上可接受鹽類；以及至少一抗癌劑；



式I

其中Ar為苯基，其被1或2個不同取代基取代，該1或2個不同取代基選自氯及三氟甲基；該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【0055】 根據另一具體實施例，包含在本發明醫藥組合中的CDK抑制劑是選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中Ar為以2個不同基團取代

的苯基，該基團選自氯及三氟甲基。

【0056】 根據另一其他具體實施例，包含在本發明醫藥組合中的CDK抑制劑是選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中Ar為以氯取代之苯基。

【0057】 式I化合物或其醫藥上可接受鹽類的製造，及包含該化合物的醫藥組合物的製造已揭露於PCT專利公開號WO2004004632（對應於美國專利7,271,193號）及PCT專利公開號WO2007148158。這些PCT專利公開案揭露了以式I表示的化合物可用於治療增生性異常。如本文以上所指出，式I化合物可以其鹽類的形式來使用。式I化合物的較佳鹽類包括醋酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天門冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、酸式硫酸鹽、硼酸鹽、肉桂酸鹽、檸檬酸鹽、乙磺酸鹽、延胡索酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、麩胺酸鹽、乙醇酸鹽、鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫氟酸鹽、酮戊二酸鹽、乳酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、硝酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、過氯酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、水楊酸鹽、琥珀酸鹽、氨基磺酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、甲苯磺酸鹽、三氟乙酸鹽及本領域技術人士已知的其他酸加成鹽。

【0058】 在一個具體實施例中，包含在醫藥組合中的CDK抑制劑（式1化合物）為(+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基)-5,7-二羥-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮或其醫藥上可接受鹽類。

【0059】 在另一具體實施例中，包含在醫藥組合中的CDK抑制劑（式1化合物）為(+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基)-5,7-二羥-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮氫氯化物（本文稱為「化合物A」。本文中化合物A也稱為「voruciclib」）。

【0060】 在一個具體實施例中，包含在醫藥組合中的CDK抑制劑（式1化合物）為(+)-反-2-(2-氯-苯基)-5,7-二羥-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮或其醫藥上可接受鹽類。

【0061】 在另一具體實施例中，包含在醫藥組合中的CDK抑制劑（式1化合物）為(+)-反-2-(2-氯-苯基)-5,7-二羥-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮氫氯化物（本文稱為「化合物B」。本文中化合物B也稱為「riviciclib」）。

【0062】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的BRAF抑制劑是V600突變形式的BRAF的抑制劑。

【0063】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的BRAF抑制劑是V600E突變形式的BRAF的抑制劑。

【0064】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的BRAF抑制劑選自BAY43-9006（索拉非尼，Bayer）、威羅菲尼（PLX4032，Plexxikon；RG7204、RO5185426，Hofmann-LaRoche）、GDC-0879（5-(1-(2-羥基乙基)-3-(吡啶-4-基)-1H-吡唑-4-基)-2,3-二氫-1H-茚-1-酮肟，5-(1-(2-hydroxyethyl)-3-(pyridin-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one oxime，GlaxoSmithKline）、達拉菲尼（GSK2118436，GlaxoSmithKline）、PLX4720（N-[3-[(5-氯-1H-吡咯[2,3-b]吡啶-3-基)羰基]-2,4-二氟苯基]-1-丙烷磺醯胺，N-[3-[(5-chloro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)carbonyl]-2,4-difluorophenyl]-1-propanesulfonamide，Hofmann-LaRoche）、BMS-908662（(5-(2-(5-氯-2-甲基苯基)-1-羥基-3-側氧基異吲哚啉-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)胺甲酸甲酯，methyl (5-(2-(5-chloro-2-methylphenyl)-1-hydroxy-3-oxoisindolin-1-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate，XL281，Bristol-Myers Squibb）、LGX818（(S)-甲基（1-((4-(3-(5-氯-2-氟-3-(甲基磺醯胺基)苯基)-1-異苯基-1H-吡唑-4-基)嘧啶-2-基)胺基)丙烷-2-基)胺甲酸，(S)-methyl (1-((4-(3-(5-chloro-2-fluoro-3-(methylsulfonamido)phenyl)-1-isopropyl-1H-pyrazol-4-yl)pyrimidin-2-yl)amino)propan-2-yl)carbamate，Novartis）、PLX3603（RO5212054，Hofmann-LaRoche）、ARQ-736（(R)-(3-(5-(2-((1-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)磺醯基)呋喃-3-基)胺基)嘧啶-4-基)咪唑[2,1-b]噁唑-6-基)苯氧基)

甲基磷酸鈉，sodium (R)-(3-(5-(2-((1-((1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)sulfonyl)-piperidin-3-yl)amino)pyrimidin-4-yl)imidazo[2,1-b]oxazol-6-yl)phenoxy)methyl phosphate，ArQule）、DP-4978（1-(3,3-二甲基丁基)-3-(2-氟-4-甲基-5-(7-甲基-2-(甲基胺基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-6-基)苯基)尿素，1-(3,3-dimethylbutyl)-3-(2-fluoro-4-methyl-5-(7-methyl-2-(methylamino)pyrido[2,3-d]pyrimidin-6-yl)phenyl)urea，Deciphera）或RAF265（1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2-基]-4-吡啶基]氧基]-N-[4-(三氟甲基)苯基]-1H-苯并咪唑-2-胺，1-methyl-5-[[2-[5-(trifluoromethyl)-1H-imidazol-2-yl]-4-pyridinyl]-oxy]-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-benzimidazol-2-amine，Novartis）。

【0065】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的BRAF抑制劑是威羅菲尼。

【0066】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的BRAF抑制劑是達拉菲尼。

【0067】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的MEK抑制劑是V600突變形式的BRAF的抑制劑。

【0068】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的MEK抑制劑是V600E或V600K突變形式的BRAF的抑制劑。

【0069】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的MEK抑制劑選自司美替尼（AstraZeneca）、binimetinib（Array Biopharma）、PD-0325901（N-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)胺基]-苯甲醯胺，N-[(2R)-2,3-dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide，Pfizer）、曲美替尼（MekinistTM）、cobimetinib（Exelixis）、refametinib（Valeant）、pimasertib（Santhera Pharmaceuticals）、TAK-733（(R)-3-(2,3-二羥基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基胺基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮，(R)-3-(2,3-dihydroxypropyl)-6-fluoro-5-(2-fluoro-4-iodophenylamino)-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidine-4,7(3H,8H)-dione），

Takeda) 或WX-554 (UCB Pharma S A)。

【0070】 在一具體實施例中，包含在醫藥組合中的MEK抑制劑是曲美替尼。

【0071】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑及MEK抑制劑，其中所述CDK抑制劑及所述抗癌劑的至少其中之一為同時給藥。

【0072】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑及MEK抑制劑，其中所述CDK抑制劑及所述抗癌劑的至少其中之一為依序給藥。

【0073】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中所述抗癌劑在該CDK抑制劑給藥之前給藥。

【0074】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中該CDK抑制劑在所述抗癌劑給藥之前給藥。

【0075】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該

至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中該CDK抑制劑及所述抗癌劑都是一天給藥一次。

【0076】 在另一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中該CDK抑制劑一天給藥一次，而所述抗癌劑一天給藥兩次。

【0077】 在另一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中該CDK抑制劑及所述抗癌劑都是一天給藥兩次。

【0078】 在一方面，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自（如本文描述的）式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。

【0079】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中該CDK抑制劑及所述抗癌劑為同時給藥。

【0080】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中該CDK抑制劑及所述抗癌劑為依序給藥。

【0081】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中所述抗癌劑在所述CDK抑制劑給藥之前給藥。

【0082】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中所述CDK抑制劑在所述抗癌劑給藥之前給藥。

【0083】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的至少一抗癌劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑，其中所述CDK抑制劑及所述抗癌劑都是一天給藥一次。

【0084】 在另一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的BRAF抑制劑或MEK抑制劑至少其中之一，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑一天給藥一次，而所述抗癌劑一天給藥兩次。

【0085】 在又一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的BRAF抑制劑或MEK抑制劑至少其中之一，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述抗癌劑都是一天給藥兩次。

【0086】 在一具體實施例中，治療黑色素瘤的方法包括在本文所述的劑量範圍中，對需要的個體投予選自式I化合物的CDK抑制劑及選自BRAF

抑制劑或MEK抑制劑的至少一抗癌劑。

【0087】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述BRAF抑制劑及所述CDK抑制劑為同時給藥。

【0088】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述BRAF抑制劑及所述CDK抑制劑為依序給藥。

【0089】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述BRAF抑制劑在所述CDK抑制劑給藥之前給藥。

【0090】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑在所述BRAF抑制劑給藥之前給藥。

【0091】 在一個具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述BRAF抑制劑都是一天給藥一次。

【0092】 在另一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑一天給藥一次且所述BRAF抑制劑一天給藥兩次。

【0093】 在又一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤

的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述BRAF抑制劑都是一天給藥兩次。

【0094】 在一方面，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自（如本文所述的）式I化合物或其醫藥上可接受鹽類。

【0095】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述BRAF抑制劑及所述CDK抑制劑同時給藥。

【0096】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述BRAF抑制劑及所述CDK抑制劑依序給藥。

【0097】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述BRAF抑制劑在所述CDK抑制劑給藥之前給藥。

【0098】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑在所述BRAF抑制劑給藥之前給藥。

【0099】 在一個具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑與所述BRAF抑制劑都是一天給藥一次。

【0100】 在另一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑一天給藥一次，而所述BRAF抑制劑一天給藥兩次。

【0101】 在又一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑以及治療有效量的BRAF抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述BRAF抑制劑都是一天給藥兩次。

【0102】 在一具體實施例中，治療黑色素瘤的方法包括對需要的個體以本文所述的劑量範圍投予BRAF抑制劑及CDK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類。

【0103】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述MEK抑制劑及所述CDK抑制劑同時給藥。

【0104】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中該MEK抑制劑及該CDK抑制劑依序給藥。

【0105】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述MEK抑制劑在所述CDK抑制劑給藥之前給藥。

【0106】 在一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中

所述CDK抑制劑在所述MEK 抑制劑給藥之前給藥。

【0107】 在一個具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述MEK抑制劑都是一天給藥一次。

【0108】 在另一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑一天給藥一次，而所述MEK抑制劑一天給藥兩次。

【0109】 在又一具體實施例中，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述MEK抑制劑都是一天給藥兩次。

【0110】 在一方面，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自（如本文所述的）式I化合物或其醫藥上可接受鹽類。

【0111】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述MEK抑制劑及所述CDK抑制劑為同時給藥。

【0112】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述MEK抑制劑及所述CDK抑制劑為依序給藥。

【0113】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK

抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述MEK抑制劑在所述CDK抑制劑給藥之前給藥。

【0114】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑在所述MEK抑制劑給藥之前給藥。

【0115】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述MEK抑制劑都是一天給藥一次。

【0116】 在另一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑一天給藥一次，而所述MEK抑制劑一天給藥兩次。

【0117】 在又一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，其中所述CDK抑制劑及所述MEK抑制劑都是一天給藥兩次。

【0118】 在一具體實施例中，治療黑色素瘤的方法包括對需要的個體以本文所述的劑量範圍投予MEK抑制劑及CDK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類。

【0119】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的醫藥組合，其中所述醫藥組合包括治療有效量的CDK抑制劑及治療有效量的BRAF抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類。

【0120】 在一具體實施例中，本發明有關於一種治療黑色素瘤的方

法，包括對需要的個體投予治療有效量的CDK抑制劑、治療有效量的BRAF抑制劑及治療有效量的MEK抑制劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類。

【0121】 在本發明的一個具體實施例中，經治療的黑色素瘤是非難治性黑色素瘤。

【0122】 在本發明的另一具體實施例中，經治療的黑色素瘤是非難治性BRAF突變型黑色素瘤。

【0123】 在本發明的又一具體實施例中，經治療的黑色素瘤是非難治性BRAF V600突變型黑色素瘤。

【0124】 在本發明的其他具體實施例中，經治療的黑色素瘤是非難治性BRAF V600E或BRAF V600K突變型黑色素瘤。

【0125】 在本發明的一個具體實施例中，經治療的黑色素瘤是復發或難治性黑色素瘤。

【0126】 在本發明的另一具體實施例中，經治療的黑色素瘤是抗藥性BRAF突變型黑色素瘤。

【0127】 在本發明的又一具體實施例中，經治療的黑色素瘤是抗藥性BRAF V600突變型黑色素瘤。

【0128】 在本發明的其他具體實施例中，經治療的黑色素瘤是抗藥性BRAF V600E或BRAF V600K突變型黑色素瘤。

【0129】 在本發明的一個具體實施例中，經治療的黑色素瘤是轉移性黑色素瘤。

【0130】 在本發明的另一具體實施例中，經治療的黑色素瘤是轉移性BRAF突變型黑色素瘤。

【0131】 在本發明的又一具體實施例中，經治療的黑色素瘤是轉移性BRAFFV600突變型黑色素瘤。

【0132】 在本發明的其他具體實施例中，經治療的黑色素瘤是轉移性

BRAFV600E或BRAFV600K突變型黑色素瘤。

【0133】 根據本發明，CDK抑制劑（式I化合物）及/或選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑的給藥可經由任何合適路徑，包括但不限於腸胃外的、口服、舌下、經皮、局部、鼻內、噴霧、眼內、氣管內或直腸內。

【0134】 在一個具體實施例中，CDK抑制劑可以口服給藥，以產生並維持其良好的血液濃度，而選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑可經由靜脈內、皮下、肌肉內、血管內或注入路徑，以腸胃外給藥。

【0135】 在另一具體實施例中，CDK抑制劑可經由靜脈內、皮下、肌肉內、血管內或注入路徑，以腸胃外給藥，而選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑可以口服給藥。

【0136】 在其他具體實施例中，CDK抑制劑及選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑兩者可以口服給藥，以產生並維持其良好的血液濃度。

【0137】 在其他具體實施例中，式I的CDK抑制劑及選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑兩者可經由靜脈內、皮下、肌肉內、血管內或注入路徑，以腸胃外給藥，以產生並維持其良好的血液濃度。

【0138】 在一方面，本發明有關於一種用於治療黑色素瘤的醫藥組合物，其中所述醫藥組合物包括CDK抑制劑及至少一抗癌劑及一或多個藥學上可接受載體、稀釋劑或賦型劑，該CDK抑制劑選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類，該至少一抗癌劑選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑。針對丸劑、錠劑、包衣錠及硬明膠膠囊的製造，可使用的藥學上具活性的賦型劑包括但不限於乳糖、玉米澱粉或其衍生物、阿拉伯膠、氧化鎂或葡萄糖等。針對軟明膠膠囊及栓劑，可使用的載體包括但不限於脂肪、臘、天然或硬化油等。用於製造溶液的合適載體為，例如注射溶液，或是用於乳液或糖漿為，例如水、生理氯化鈉溶液或酒精，例如乙醇、丙醇或甘油、糖溶液，

如葡萄糖溶液或甘露醇溶液，或已被提及的各種溶劑的混合物。

【0139】 使用本領域具通常知識者所熟悉的傳統的藥學技術，如以摻合、粒化、溶解或冷凍乾燥的方式，CDK抑制劑（式I化合物）及選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑可以單一地調劑或以組合方式調劑為藥學劑量形式。

【0140】 一般來說，意圖用於醫藥用途的組合物可根據該領域中任何已知用於製造醫藥組合物的方法而製備，例如*Remington – The Science and Practice of Pharmacy (21st Edition)* (2005)、*Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (11th Edition)* (2006) 以及*Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (9th Edition)*、以及*Solid-State Chemistry of Drugs (2nd Edition)* (1999)。

【0141】 本文所述的組合物可為適合用於口服給藥的形式，例如，固體劑量形式如錠劑、膠囊、菱形糖或顆粒；液體劑量形式如乳劑、溶液、懸浮液；用於腸胃外注射（包括靜脈內、皮下、肌肉內、血管內或注入）例如為滅菌溶液、懸浮液或乳劑；用於局部給藥例如為軟膏、乳霜、凝膠或乳液。

【0142】 用於口服給藥的組合物可為錠劑、菱形糖、水性或油性懸浮液、顆粒、粉末、扁囊劑、乳劑、膠囊、糖漿或酏劑的形式。口服給藥的組合物可包含一或多個可選的試劑，例如甜味劑如果糖、阿斯巴甜或糖精；調味劑如薄荷、冬綠油或櫻桃；著色劑；及保藏劑，以提供醫藥上美味的製劑。滲透活性驅動化合物周圍的選擇性可通透膜也適合用於包含在根據本發明藥物組合中的化合物（CDK抑制劑，及/或選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑）的口服給藥。適合用於口服給藥的組合物可包括標準載體，如甘露醇、乳糖、澱粉、玉米澱粉、硬脂酸鎂、滑石、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。此種載體較佳地為藥學等級。

【0143】 針對軟膏、乳霜，活性成分（CDK抑制劑及/或選自BRAF

抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑)是以水包油或油包水的基礎而調劑。

【0144】 對於肌肉內、腹腔內、皮下及靜脈內使用，通常使用有效成分(CDK抑制劑及/或選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑)的滅菌溶液，且溶液的pH 值應被合適地調整或緩衝。

【0145】 再者，包含在醫藥組合物中的化合物(即CDK抑制劑及/或選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑)可經由合適的調劑被延期或延長。舉例來說，可製備化合物的可緩慢溶解團塊並且併入錠劑或膠囊中。可藉由製造數個不同溶解率的團塊及以團塊的混合物填充膠囊來改進該技術。錠劑或膠囊可以抵抗溶解一段可預測時間期間的薄膜來包覆。即使是腸胃外製劑也可藉由將化合物溶解或懸浮在油或乳化載體中而製造為長效作用，該載體允許化合物只在血清中緩慢分散。

【0146】 雖然用於給藥的選自式I化合物的CDK抑制劑及選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑的有效劑量取決於疾病(黑色素瘤)的嚴重性、症候的嚴重性、年齡、性別、體重及病患的敏感度差異、給藥的模式、時間、間隔及持續時間、調劑的性質及型態等而改變。在某些具體實施例中，包含在根據本發明醫藥組合中的治療劑在兩種試劑仍有活性的時段中被給藥。本領域具通常知識者能夠藉由決定所給藥治療劑的半生期來決定此一時段。如本文先前所指出，包含在藥物組合物中的抗癌劑可被同時或依序給藥。本領域具通常知識者將認知數種變化在此發明的範圍及精神內是可能的。

【0147】 應選擇將被給藥的治療劑的劑量來產生所期望的效果。CDK抑制劑的合適劑量可從約5 mg至約500 mg。將被給藥的CDK抑制劑的劑量可根據將被治療的黑色素瘤的嚴重性涵蓋一廣泛範圍。可選擇每天將被給藥的劑量來獲得期望的效果。CDK抑制劑合適的劑量範圍可從約50 mg/天至350 mg/天。如果需要，也可給藥較高或較低的每天劑量。

【0148】 在一具體實施例中，BRAF抑制劑可從約1 mg/天至約2500

mg/天給藥，且此數量可以每天或每劑量或每治療週期以單一或多重劑量來給藥。

【0149】 在一具體實施例中，MEK抑制劑可從約0.01 mg/天至2000 mg/天給藥，且此數量可以每天或每劑量或每治療週期以單一或多重劑量來給藥。

【0150】 在一具體實施例中，CDK抑制劑及選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑都是一天給藥一次。在另一具體實施例中，CDK抑制劑及選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑都是一天給藥兩次。在其他具體實施例中，CDK抑制劑一天給藥一次，而選自BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑的抗癌劑一天給藥兩次。然而，包含在根據本發明的醫藥組合中的每種治療劑的量，當合併使用時將會典型地少於單獨給藥時會產生治療效果的量。為了方便，如果想要的話，每日總劑量可在一天期間分為部份且部分給藥。

【0151】 此發明提供的組合已在某些試驗系統中、且在數個不同的體外施用藥物的計畫中被評估。實驗細節如本文以下所提供。本文呈現的數據清楚地指出BRAF抑制劑或MEK抑制劑與選自式I化合物或其醫藥上可接受鹽類的CDK抑制劑進行組合時顯現協同效果。其已清楚指出，比起當細胞只以CDK抑制劑（即式I化合物或其藥學上可接受鹽類，單獨）或只以BRAF抑制劑或只以MEK抑制劑治療時，該治療劑在合併用於治療黑色素瘤時增加了增生性細胞的細胞凋亡或細胞毒性。

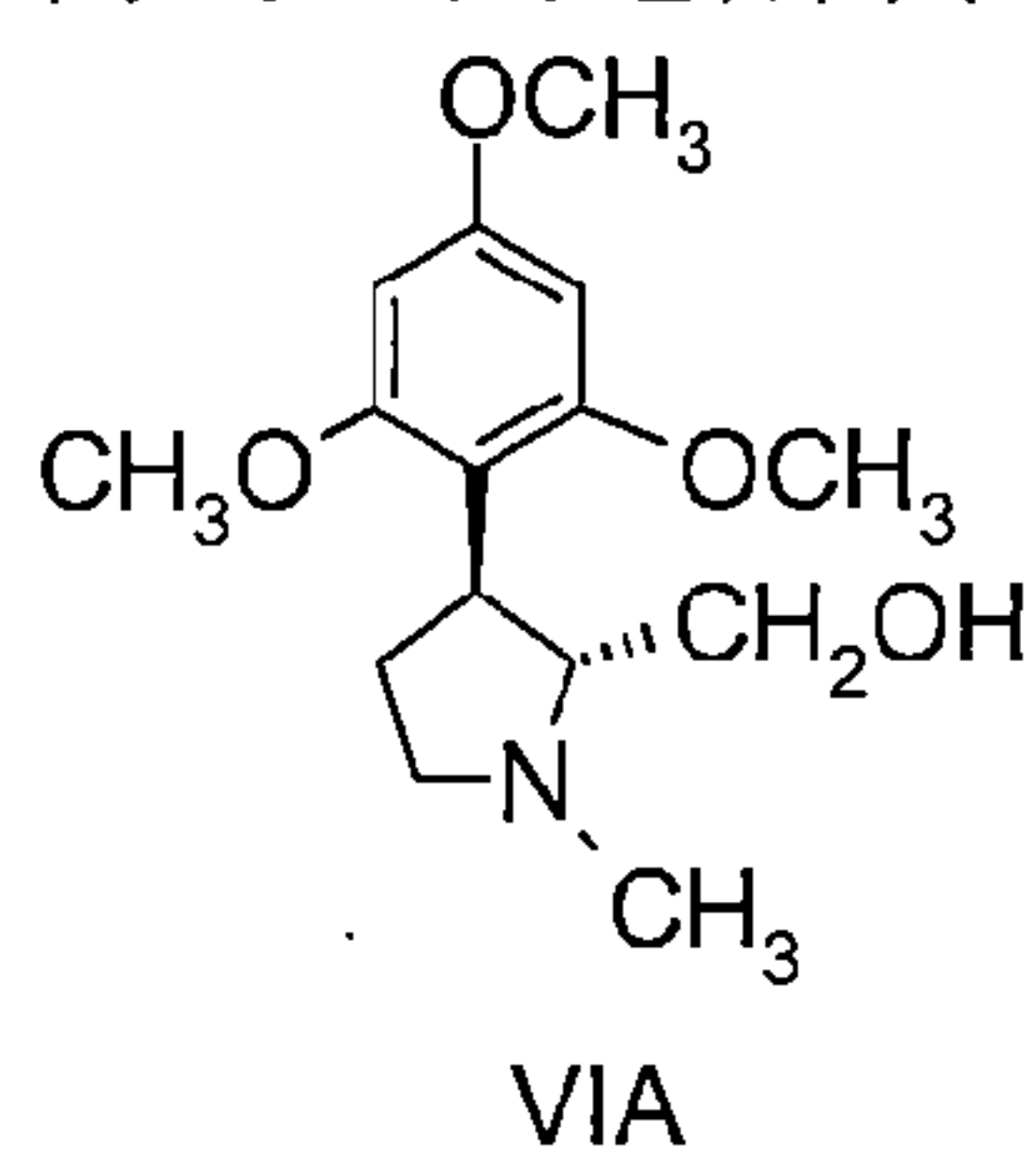
【0152】 在一方面，本發明有關於一種醫藥套組，包括CDK抑制劑（式I化合物或其醫藥上可接受鹽類）及選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑的至少一抗癌劑。該醫藥套組可包括一容器，該容器包含式I化合物或其醫藥上可接受鹽類及選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑的至少一抗癌劑做為一固定劑量配方；或者該套組可包括用於式I化合物或其醫藥上可接受鹽類以及選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑的至少一抗癌劑的兩個或更多分開的容

器。該套組可更包括包裝插件，包括有關指示、用法、劑量、給藥用法說明、禁忌、預防措施及警告的資訊。可使用的合適容器包括瓶子、螺旋管、安瓶、針筒或套蓋包裝。該醫藥套組可選擇性地包括另外的容器，包括用於注射的藥學上可接受緩衝劑、水、磷酸鹽緩衝溶液、林格氏（Ringer's）溶液及葡萄糖溶液。

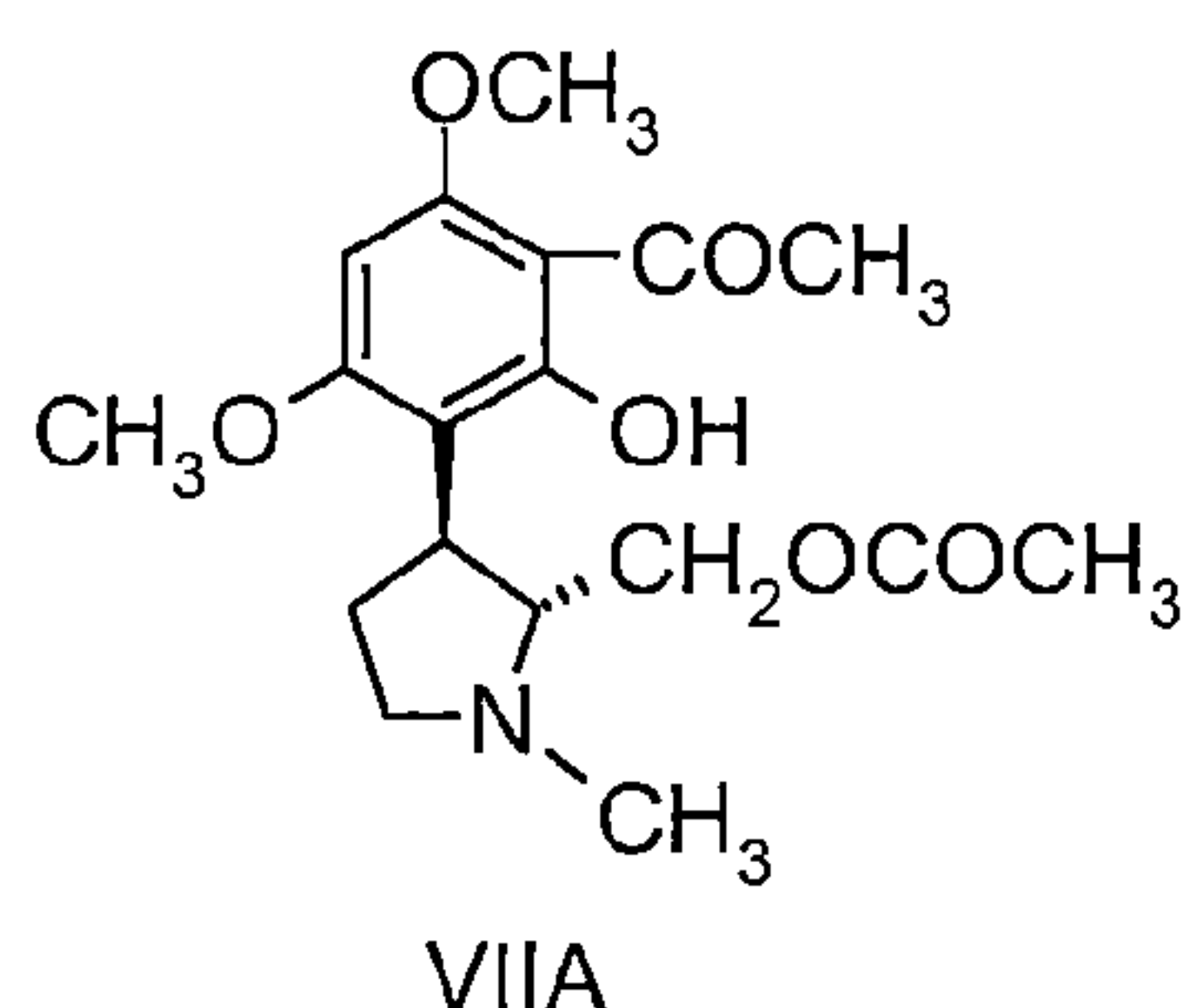
【0153】 包含在本發明醫藥組合中的CDK抑制劑（即式I化合物）可根據PCT專利公開號WO2004004632及PCT專利公開號WO2007148158中揭露的方法來製備。

【0154】 製備式I化合物或其醫藥上可接受鹽類的一般流程包括以下步驟：

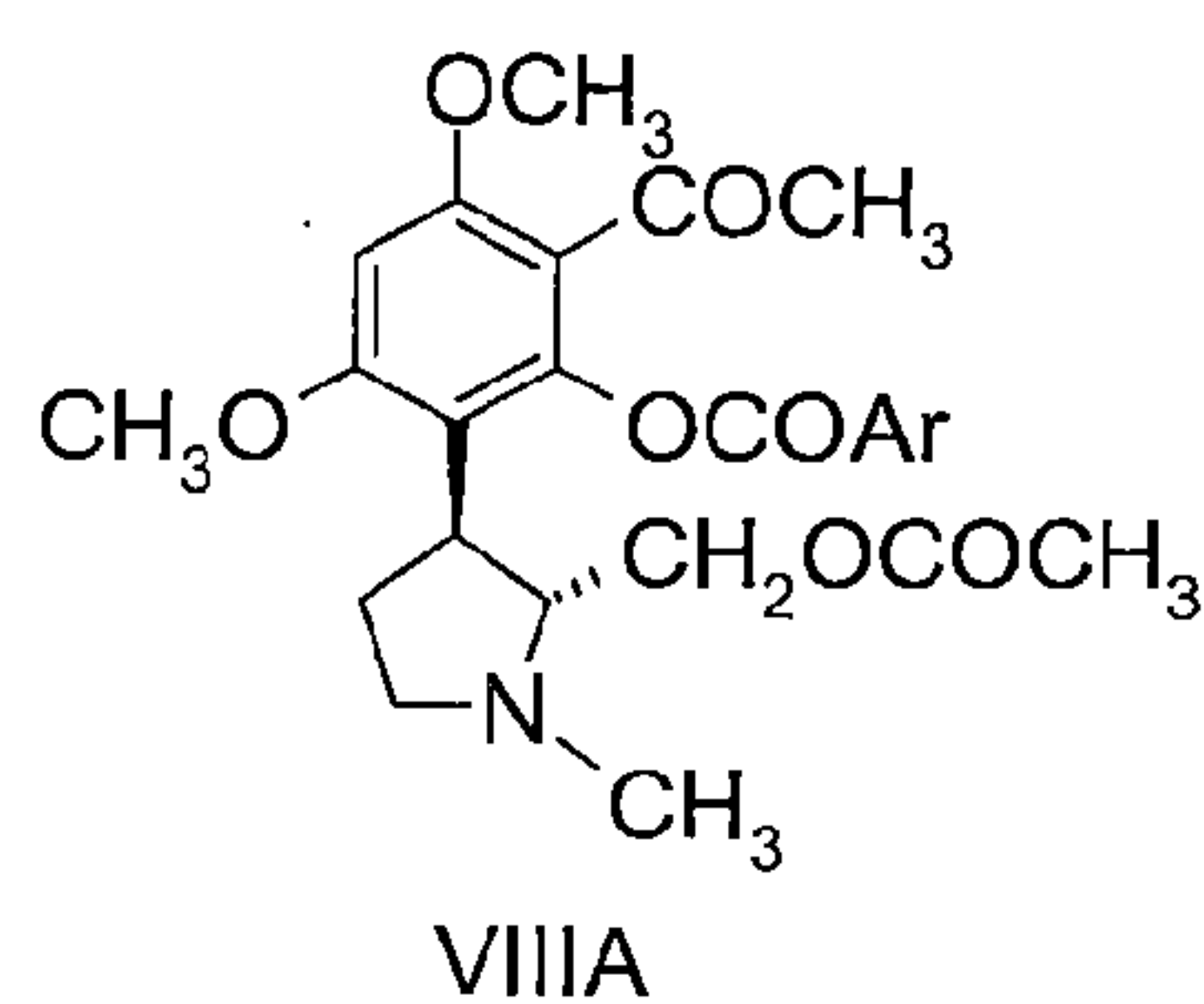
【0155】 (a)在路易士酸催化劑的存在下，以無水醋酸處理式VIA中間化合物的已對應解析的純(-)-反式鏡像異構物，



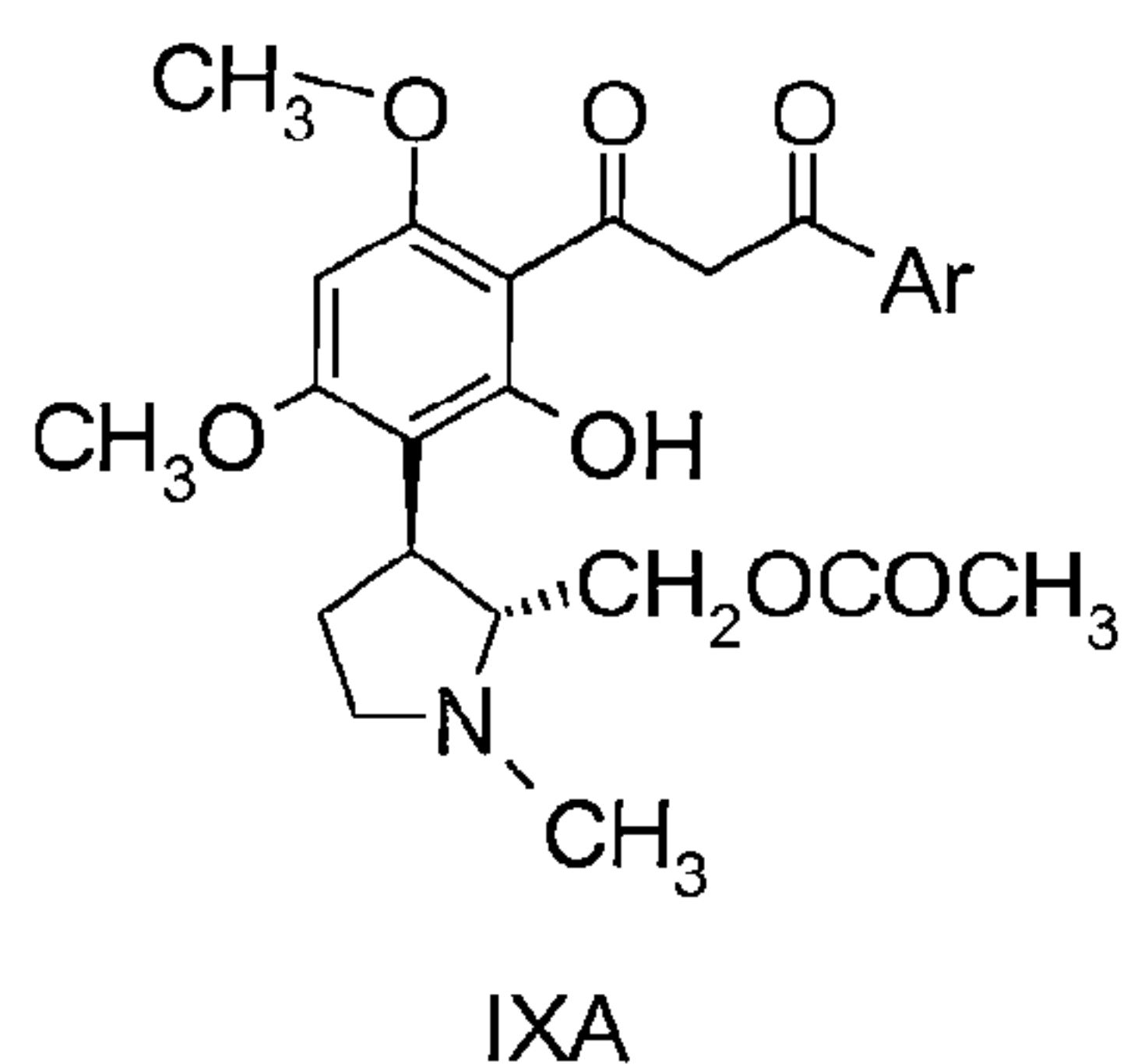
以獲得式VIIA的已解析乙醯化化合物，



【0156】 (b)在鹼及溶劑存在下，將式VIIA的已解析乙醯化化合物與化學式ArCOOH的酸或化學式ArCOCl的氯酸或化學式(ArCO)₂O的酸酐或化學式ArCOOCH₃的酯進行反應，以獲得式VIIIa的已解析化合物，其中Ar如以上關於式I化合物而定義；

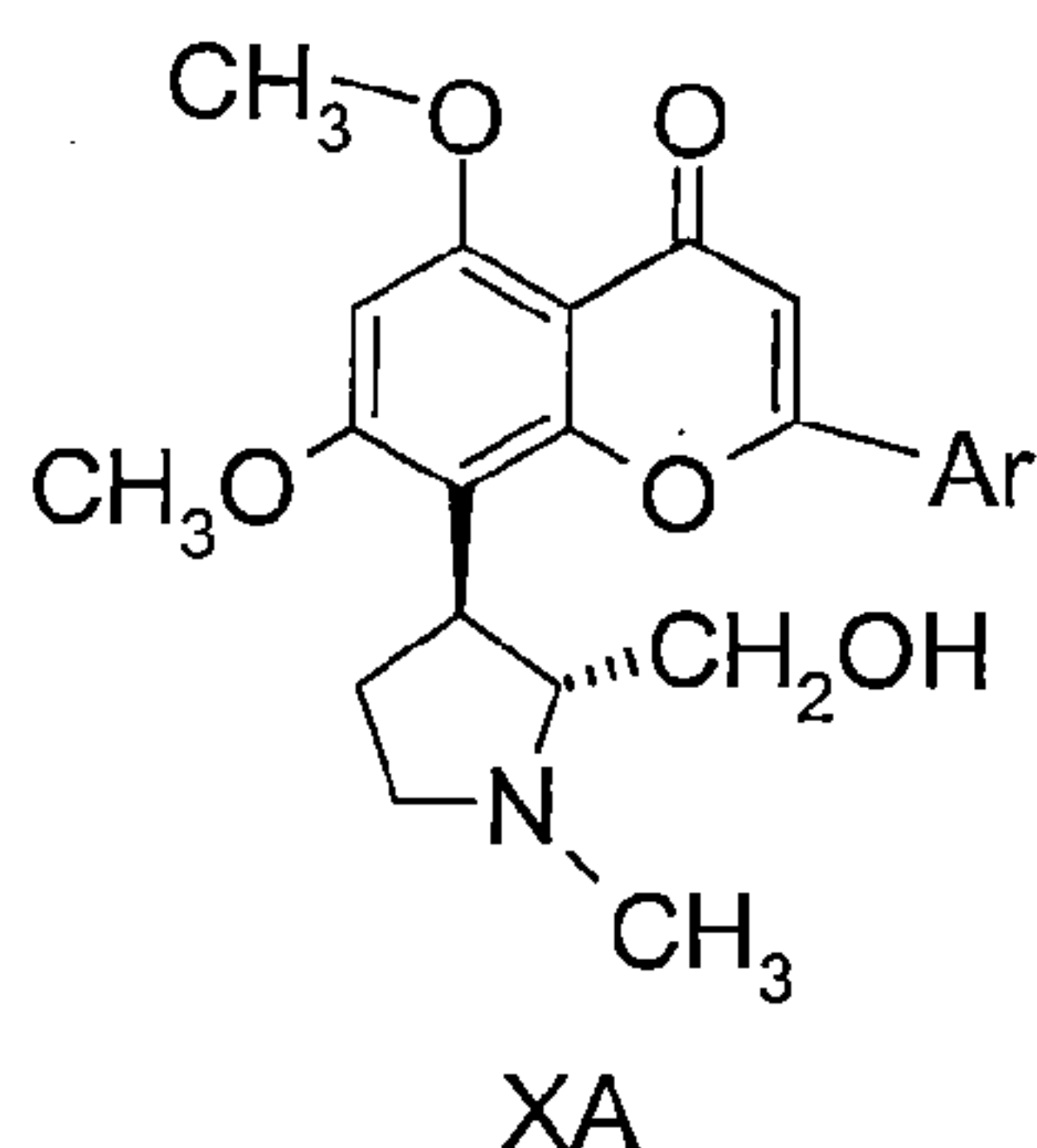


【0157】 (c)在合適溶劑中，以鹼處理式VIII A的已解析化合物，以獲得對應的式IX A已解析β-乙二酮化合物；



其中Ar如以上所定義；

【0158】 (d)以例如鹽酸的酸處理式IX A已解析β-乙二酮化合物，以獲得對應的式XA環化化合物，



【0159】 (e)藉由以去烷化試劑在120-180°C的溫度下加熱式XA化合物使其進行去烷化反應，以獲得式I化合物的(+)-反式鏡像異構物以及可選地，將受試化合物轉化為其醫藥上可接受鹽類。

【0160】 在以上步驟(a)中使用的路易士酸催化劑可選自：BF₃、Et₂O、氯化鋅、氯化鋁及氯化鈦。

【0161】 在方法步驟(b)中使用的鹼可選自三乙胺、吡啶及DCC-DMAP組合(N, N'-二環己碳二亞胺及4-二甲胺吡啶的組合)。

【0162】 本領域具通常知識者將清楚，式VIII A化合物重新排列為對應的式IX A β -乙二酮化合物已知為*Baker-Venkataraman*重新排列 (*J. Chem. Soc.*, 1933, 1381及*Curr. Sci.*, 1933, 4, 214)。

【0163】 在方法步驟(c)中使用的鹼可選自：六甲基二矽胺化鋰、六甲基二矽胺化鈉、六甲基二矽胺化鉀、氫化鈉及氫化鉀。較佳的鹼為六甲基二矽胺化鋰。

【0164】 在方法步驟(e)中用於將式IX A化合物進行去烷化反應的去烷化劑可選自：吡啶鹽酸鹽、三溴化硼、三氟化硼合乙醚及三氯化鋁。較佳的去烷化劑為吡啶鹽酸鹽。

【0165】 起始的式VIA化合物的製備涉及了在冰醋酸中將1-甲基-4-哌啶酮與1,3,5-三甲氧苯的溶液進行反應，以獲得1-甲基-4-(2,4,6-三甲氧苯基)-1,2,3,6-四氫吡啶，其與三氟化硼二乙醚、氫硼化鈉及四氫呋喃進行反應，以獲得1-甲基-4-(2,4,6-三甲氧苯基)哌啶-3-醇。將1-甲基-4-(2,4,6-三甲氧苯基)哌啶-3-醇轉化為式VIA化合物涉及了藉由在氧親核劑（如三乙胺、吡啶、碳酸鉀或碳酸鈉）存在下，以合適的試劑（如對甲苯磺醯氯、甲烷磺醯氯、三氟甲烷磺酸酐或五氯化磷）將出現在化合物1-甲基-4-(2,4,6-三甲氧苯基)哌啶-3-醇的哌啶環上的羥基轉化為如甲苯磺醯基、甲磺醯基、三氟甲磺酸酯或鹵化物的脫離基，接著在醇類溶劑（如異丙醇、乙醇或丙醇）中的氧親核劑（如醋酸鈉或醋酸鉀）存在下進行縮環反應。

【0166】 在藥學試驗中使用的代表性化合物，化合物A（也稱為voruciclib）是指(+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基)-5,7-二羥-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并哌喃-4-酮氫氯化物且為已公開的PCT公開號WO2007148158中揭露的化合物其中之一。

【0167】 在藥學試驗中使用的另一代表性化合物，化合物B（也稱為riviciclib）是指(+)-反-2-(2-氯苯基)-5,7-二羥-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并哌喃-4-酮氫氯化物且為已公開的PCT公開號WO2004004632中揭露的

化合物其中之一。

【0168】 根據本發明組合的協同效果，該組合包括CDK抑制劑及選自BRAF抑制劑或MEK抑制劑的至少一抗癌劑，現在參考其較佳實施例被更詳細解釋。將注意到這些僅以範例被提供且不意圖限制本發明。

【0169】 除了明顯指出相反以外，將了解本發明可假設各種替代變化及步驟順序。此外，除了其他任何操作範例或其中另外指出，所有表示的數字（例如說明書及申請專利範圍中使用的成分的量）將被了解為在所有情況下以術語「約」被修改。因此，除非指出為相反，在以下說明書及所附申請專利範圍中提出的數字參數可取決於將由本發明所獲得的期望特性而變化。

【0170】 本領域具通常知識者將認知到此發明的範圍及精神內的數種變化是有可能的。本發明現在將藉由參考以下非限制範例被較詳細描述。以下範例進一步說明本發明，但當然不應以任何方式被解釋為限制其範圍。

【0171】 範例：

【0172】 本文使用以下縮寫或術語：

BF₃：三氟化硼

BF₃·Et₂O：三氟化硼二乙醚

CaCl₂：氯化鈣

CHCl₃：氯仿

CDCl₃：氘代氯仿

CO₂：二氧化碳

DCC：N, N'-二環己碳二亞胺

DMAP：4-二甲胺基吡啶

DMF：N,N-二甲基甲醯胺

DMSO：二甲亞砜

Et₂O：乙醚

EtOAc：乙酸乙酯

g：克

h：小時

HCl：鹽酸

IPA：異丙醇

KBr：溴化鉀

Kg：公斤

L：公升

MeOH：甲醇

min：分鐘

mg：毫克

mL：毫升

μL：微升

μM：微莫耳濃度

mmol：毫莫耳

mol：莫耳

NaCl：氯化鈉

Na₂CO₃：碳酸鈉

NaHCO₃：碳酸氫鈉

Na₂SO₄：硫酸鈉

n-BuLi：正-丁基鋰

PEL：皮拉馬爾企業有限公司

°C：攝氏度

THF：四氫呋喃

【0173】 範例

【0174】 化合物A (voruciclib) 及化合物B (riviciclib) 的製備，式1 的代表性化合物在本文呈現為參考範例：

【0175】 參考範例1：

【0176】 (a) (+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基-苯基)-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-5,7-二甲氧基-苯并呋喃-4-酮的製備

【0177】 在氮氣環境下維持在0°C，逐滴將六甲基二矽氮烷 (1.08 mL, 5.1 mmol) 加至THF (10 mL) 中的正丁基鋰 (在己烷中的15%溶液，2.2 mL, 5 mmol) 溶液並攪拌15分鐘。逐滴將THF (10 mL) 中的(+)-反-2-氯-4-三氟甲基苯甲酸2-(2-乙醯氧基甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-6-乙醯基-3,5-二甲氧苯基酯 (1.44 g, 2.5 mmol) 溶液加入於此，維持溫度在0°C。在加入之後，讓反應回溫至室溫並攪拌2.5小時。以稀釋的HCl酸化反應混合物，並以10%碳酸氫鈉鹼化至pH 8至9。以氯仿 (3 × 25 mL) 萃取水層。以水 (25 mL)、鹽水 (25 mL) 清洗有機層並通過無水Na₂SO₄乾燥。將有機層減壓濃縮並在真空中乾燥，以得到為油狀物的3-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基-苯基)-3-氧代-丙醯基]-2-羥基-4,6-二甲氧基-苯基}-1-甲基-吡啶-2-基甲基醋酸酯 (1.3 g, 90.2%)。此酯溶解在濃HCl (10 mL) 中並攪拌3小時以造成環化效果。在3小時結束時，以固體NaHCO₃將反應混合物鹼化至pH 8至9。以氯仿 (25 × 3 mL) 萃取水層並以水 (25 mL) 及鹽水 (25 mL) 清洗。有機層以無水Na₂SO₄乾燥、減壓濃縮並在真空中乾燥。殘餘物經由管柱層析純化，以氯仿中的3% 甲醇及0.1% 氨水作為沖提液，得到為黃色固體的化合物，(+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基-苯基)-8-(2-羥甲基-1-甲基吡啶-3-基)-5,7-二甲氧基-苯并呋喃-4-酮。

【0178】 產率：0.56 g (48.2%); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.95 (d, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.69 (d, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.71 (dd, 1H), 3.41 (d, 1H), 3.26 (m, 1H), 2.84 (m, 1H), 2.70 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.10 (m, 2H); MS (ES⁺): m/z 497 (M+1)。

【0179】 (b) (+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基-苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥基-甲基-1-甲基吡啶-3-基)-苯并哌喃-4-酮的製備

【0180】 在180°C將(a)部份中獲得的化合物 (0.25 g, 0.5 mmol)、吡啶鹽酸鹽 (0.25 g, 2.16 mmol) 及一催化量的喹啉的混合物加熱2.5小時的期間。反應混合物以甲醇 (25 mL) 稀釋並以固體Na₂CO₃鹼化至pH 10。過濾反應混合物，並以甲醇清洗。濃縮有機層且使用氯仿中的0.1%氨水及4.5%甲醇作為洗提液，經由管柱層析純化殘餘物，得到為黃色固體的化合物，(+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基-苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥基-甲基-1-甲基吡啶-3-基)-苯并哌喃-4-酮。

【0181】 產率：0.15 g (63.7%); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.99 (m, 2H), 7.83 (d, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.24 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 2.99 (s, 3H), 2.54 (m, 1H), 2.28 (m, 1H); MS (ES⁺): m/z 470 (M+1)。

【0182】 (c) (+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基-苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥基-甲基-1-甲基吡啶-3-基)-苯并哌喃-4-酮氫氯化物的製備

【0183】 (化合物A或voruciclib)

【0184】 將(b)中獲得的化合物 (0.1 g, 0.2 mmol) 懸浮於甲醇 (2 mL) 中並以酸式HCl處理且將有機溶劑蒸發以得到化合物(+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基-苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并哌喃-4-酮氫氯化物。

【0185】 產率：0.1 g (92.8%); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.02 (d, 2H), 7.83 (d, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.73 (m, 2H), 3.68 (m, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 2.99 (s, 3H), 2.54 (m, 1H), 2.31 (m, 1H)。

【0186】 參考範例2：

【0187】 (a) (+)-反-2-(2-氯-苯基)-8-(2-羥甲基-1-甲基吡啶-3-基)-5,7-二甲氧基-苯并哌喃-4-酮的製備

【0188】 在0°C、氮氣環境下，將氫化鈉（50%，0.54 g，11.25 mmol）分批加入無水DMF（15 mL）中的(-)-反-1-[2-羥基-3-(2-羥甲基-1-甲基吡啶-3-基)-4,6-二甲氧苯基]-乙酮（0.7 g，2.2 mmol）溶液並攪拌。10分鐘後，加入甲基2-氯苯甲酸甲酯（1.15 g，6.75 mmol）。在25°C攪拌反應混合物2小時。在20°C以下小心地加入甲醇。將反應混合物倒在碎冰（300 g）上，以1:1 HCl（pH 2）酸化並使用EtOAc（2 × 100 mL）萃取。使用飽和Na₂CO₃（pH 10）鹼化水層並使用CHCl₃（3 × 200 mL）萃取。乾燥（無水Na₂SO₄）並濃縮有機層。將濃HCl（25 mL）加入殘餘物，並在室溫下攪拌2小時。將反應混合物倒在碎冰（300 g）上並使用飽和Na₂CO₃水溶液使變成鹼性。使用CHCl₃（3 × 200 mL）萃取混合物。有機萃取物以水清洗、乾燥（無水Na₂SO₄）及濃縮，以獲得化合物(+)-反-2-(2-氯-苯基)-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-5,7-二甲氧基-苯并呋喃-4-酮。

【0189】 產率：0.67 g (64%); mp: 91-93°C; $[\alpha]_D^{25} = +5.8^\circ$ (c = 0.7, 甲醇); IR (KBr): 3431, 1648, 1598, 1571 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.70 (dd, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.45 (m, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.64 (dd, 1H), 3.40 (d, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.74 (d, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.00 (m, 2H); MS (ES⁺): m/z 430 (M+1)。

【0190】 (b) (+)-反-2-(2-氯苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮的製備

【0191】 將熔化的吡啶氫氯化物（4.1 g，35.6 mmol）加至在(a)部份中獲得的化合物（0.4 g, 0.9 mmol）並在180°C下加熱1.5小時。將反應混合物冷卻至25°C，以MeOH（10 mL）稀釋並使用Na₂CO₃鹼化至pH 10。過濾混合物並濃縮有機層。將殘餘物懸浮於水（5 mL）中，攪拌30分鐘，過濾並乾燥以獲得化合物(+)-反-2-(2-氯-苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮。

【0192】 產率：0.25 g (70%); IR (KBr): 3422, 3135, 1664, 1623, 1559

cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.56 (d, 1H), 7.36 (m, 3H), 6.36 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.88 (m, 1H), 2.58 (s, 3H), 2.35 (m, 1H), 1.88 (m, 1H); MS (ES+): m/z 402 (M+1); 分析: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClNO}_5$, 62.24 (62.71); H, 5.07 (4.97); N, 3.60 (3.48); Cl, 9.01 (8.83)。

【0193】 (c) (+)-反-2-(2-氯苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮氫氯化物(化合物B或riviciclib)的製備

【0194】 將(b)部份中獲得的化合物 (0.2 g, 0.48 mmol) 懸浮於IPA (5 mL) 中並加入3.5% HCl (25 mL)。加熱懸浮液以獲得澄清溶液。將溶液冷卻並以固體過濾，以獲得化合物(+)-反-2-(2-氯苯基)-5,7-二羥甲基-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮氫氯化物。

【0195】 產率: 0.21 g (97%); mp: 188 - 192°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +21.3^\circ$ (c = 0.2, 甲醇); ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 7.80 (d, 1H), 7.60 (m, 3H), 6.53 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.89 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 3.59 (dd, 1H), 3.38 (m, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.45 (m, 1H), 2.35 (m, 1H); MS (ES+): m/z 402 (M+1) (游離鹼)。

【0196】 生物學數據:

【0197】 藥學試驗:

【0198】 範例1:

【0199】 I.涉及在BRAFV600E突變的黑色素瘤細胞株中使用化合物A (CDK抑制劑, 也稱為voruciclib) 及威羅菲尼 (BRAFV600E抑制劑) 的組合的體外研究

【0200】 目的:

【0201】 研究化合物A (CDK抑制劑, 也稱為voruciclib) 及威羅菲尼 (BRAFV600E抑制劑) 的組合對於BRAFV600E突變的黑色素瘤細胞株中細胞週期及細胞凋亡的效果。

【0202】 材料與方法:

【0203】 細胞株

【0204】 在此研究中使用由美國ATCC（美國細胞培養暨儲存中心）獲得的G361及SK-MEL3黑色素瘤細胞株。G361是威羅菲尼敏感性細胞株而SK-MEL3是威羅菲尼抗藥性細胞株。兩種細胞株都是BRAFV600E突變的。

【0205】 A.使用流式細胞術的細胞週期分佈分析：

【0206】 將G361/SK-MEL3黑色素瘤細胞植入25 mm³組織培養瓶中。24小時後，以：i)化合物A（1 μM）；ii)威羅菲尼（1 μM）；及iii)化合物A（1 μM）及威羅菲尼（1 μM）一起處理G361細胞5天。

【0207】 在SK-MEL3黑色素瘤細胞的例子中，以：i)化合物A（1 μM）；ii)威羅菲尼（10 μM）；及iii)化合物A（1 μM）及威羅菲尼（10 μM）一起處理細胞5天。

【0208】 控制組細胞維持未處理5天。在5天結束時收集掉落及附著的細胞。以將近5 mL的磷酸鹽緩衝液（PBS）清洗細胞兩次，在1000 rpm下離心10分鐘。將細胞重新懸浮於500 μL的PBS並固定在500 μL冰冷的70%乙醇中。將固定的細胞置於室溫30分鐘，在1000 rpm下旋轉10分鐘。將1 mL的冷70%乙醇加至細胞團塊，並保存於0°C以下直到進一步分析。以PBS清洗細胞兩次以移除固定劑並重新懸浮於250 μL PBS。將12.5 μL的碘化丙啶（在PBS中1 mg/mL）及12.5 μL Rnase A（1 mg/mL）加至此中。在37°C靜置30分鐘後，使用流式細胞術分析細胞。

【0209】 根據製造商的建議使用流式細胞儀（Becton Dickinson FACS Calibur, USA）於這些研究。設定在488 nm的氬離子雷射被用來作為激發源。如紅色螢光量所定義，具有2n及4n之間的DNA含量的細胞被標定為在細胞週期的G1、S及G2/M期中。呈現少於2n DNA含量的細胞被標定為sub-G1細胞。在每個細胞週期間隔中的細胞數被表示為細胞呈現總數的百分比。

【0210】 B. Annexin V-FITC染色（用於偵測早期細胞凋亡）

【0211】 Annexin V-FITC是用於識別凋亡細胞的敏感性探針。在早期細胞凋亡期間，細胞膜磷脂磷脂絲胺酸（PS）從漿膜的內葉轉移至外葉，藉此將PS暴露於外部細胞環境。Annexin V是35-36 kDa的鈣依賴磷脂結合蛋白，其具有對於PS的高親和力且利用暴露的PS與細胞結合。

【0212】 碘化丙啶是一種極性染劑，其透過有漏洞的膜進入細胞且因此與螢光異硫氰酸鹽（FITC）耦合用於偵測晚期細胞凋亡。

【0213】 將黑色素瘤細胞G361植入25 mm³的組織培養瓶中。24小時後，以：i)化合物A（1 μM）；ii)威羅菲尼（1 μM）；以及iii)化合物A（1 μM）及威羅菲尼（1 μM）一起處理細胞24小時。控制組細胞維持未處理24小時。在不同時間點以胰蛋白酶收集之後，將含有漂浮細胞的培養液與附著細胞集合及聚集在一起。以冷的PBS清洗細胞兩次，在1000 rpm下離心10分鐘。以1 × 10⁶細胞/mL的濃度將細胞團塊重新懸浮於1X結合緩衝液（10 mm HEPES pH 7.4，140 mM NaCl，2.5 mM CaCl₂）。以Annexin V-FITC及碘化丙啶染色100 μL的溶液（1 × 10⁵細胞）。在黑暗中將細胞靜置於室溫（25-30°C）15分鐘，且以流式細胞術分析樣品。

【0214】 結果：

【0215】 這些研究的結果描述於第1圖至第3圖。

【0216】 結論：

【0217】 第1圖指出經威羅菲尼處理的G361細胞相較於控制組細胞（72.36%）顯示顯著的91.94% G1阻斷。如由sub-G1期所見，以化合物A及威羅菲尼單獨處理的細胞只分別顯示9.48%及2.3%的細胞凋亡，然而當細胞以化合物A及威羅菲尼的組合處理時顯示53.67%的細胞經歷細胞凋亡，表明該組合是具協同作用的。

【0218】 在第2圖中，右上角四分之一張圖表明在早期細胞凋亡的G361細胞。隨後這些細胞歷經導致細胞死亡的細胞凋亡。以化合物A及威羅菲尼的組合處理的細胞顯示27%的細胞在早期細胞凋亡（annexin染色的

細胞)，而只以化合物A及威羅菲尼處理的細胞分別為8%及20%。此數據表明該組合呈現協同效益。

【0219】 在第3圖中，只以威羅菲尼處理的SK-MEL3細胞相較於控制組細胞（67.38%）顯示顯著的76.78% G1阻斷。在29.75%的以化合物A及威羅菲尼的組合處理的細胞中見到細胞凋亡，如由sub-G1期所見，而以化合物A及威羅菲尼單獨處理的細胞只分別顯示19.63%及15.12%的細胞凋亡，表明該組合是具協同作用的。

【0220】 如在第1圖至第3圖中描述及如以上解釋的結果，清楚地確定化合物A及威羅菲尼的組合在威羅菲尼敏感性及抗藥性BRAFV600E突變的黑色素瘤細胞株中是具協同作用的，且與化合物A及威羅菲尼單獨使用相比，組合使用時導致較多的細胞凋亡。

【0221】 **II.在人類BRAF-突變的黑色素瘤細胞中化合物A與威羅菲尼(BRAFV600E抑制劑)的體外雙重組合研究**

【0222】 目的：此研究的目的為評估化合物A（CDK抑制劑）及威羅菲尼（BRAFV600E抑制劑）的組合在BRAF突變的黑色素瘤細胞中的效用。

【0223】 **A.材料**

【0224】 測試化合物：化合物A（在PEL實驗室中製備）；威羅菲尼（南京康滿林化工實業有限公司，中國）

【0225】 媒液：DMSO（Sigma-Aldrich-Chemie GmbH，德國）

【0226】 劑量製備：將化合物A及威羅菲尼稱重並溶解於需要量的DMSO中以得到所需要的儲備溶液。

【0227】 測試系統：測試系統包括G361、A375及MDAMB-435S（BRAFV600E突變的）細胞株，其購買自美國ATCC（美國細胞培養暨儲存中心）。

【0228】 **B.方法**

【0229】 使用CCK8活細胞去氫酶試驗進行，使用化合物A及威羅菲

尼的各種組合的細胞毒性研究。

【0230】 i)細胞計數套組-8 (CCK8) 活細胞去氫酶試驗

【0231】 將人類BRAFV600E突變的黑色素瘤細胞株G361、A375及MDAMB-435S以199 μ L的RPMI 1640培養液及3000細胞/孔的密度植入96孔盤中，並培養隔夜以使細胞貼附。之後以個別的測試化合物處理細胞。共有10組；

- i) 1 μ M的威羅菲尼單獨處理48小時；
- ii) 0.3 μ M/0.1 μ M的化合物A單獨處理48小時；
- iii) 1 μ M/0.3 μ M的化合物A單獨處理48小時；
- iv) 3 μ M/1 μ M的化合物A單獨處理48小時；
- v) 10 μ M/3 μ M的化合物A單獨處理48小時；
- vi) 0.3 μ M/0.1 μ M的化合物A及1 μ M的威羅菲尼的組合處理48小時；
- vii) 1 μ M/0.3 μ M的化合物A及1 μ M的威羅菲尼的組合處理48小時；
- iii) 3 μ M/1 μ M的化合物A及1 μ M的威羅菲尼的組合處理48小時；
- ix) 10 μ M/3 μ M的化合物A及1 μ M的威羅菲尼的組合處理48小時；
- x) 以DMSO媒液處理控制組細胞48小時。

【0232】 將培養盤培養在 $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、加濕5% CO_2 培養箱中。以1.0 μ M的濃度將威羅菲尼使用於所有3種不同的細胞株，而以0.3 μ M、1 μ M、3 μ M及10 μ M的濃度將化合物A使用在A375黑色素瘤細胞的例子中，且以0.1 μ M、0.3 μ M、1.0 μ M、3.0 μ M的濃度將化合物A使用在G361及MDA MB435S黑色素瘤細胞的例子中。在培養週期結束時，使用CCK8細胞毒性試驗流程分析培養盤。使用Chou及Talalay (4)的Compusyn軟體計算的組合指數 (CI) 來測定協同作用。CI<1為具協同作用，CI=1為加成作用而CI>1為具拮抗作用。

【0233】 統計分析：

【0234】 使用司徒頓t檢定 (Student t test) 來進行統計分析，且p值

<0.05被認為是顯著的。數據以平均值±平均值標準誤（SEM）表示。平均值由至少兩個獨立實驗獲得，每個實驗以三重複執行。

【0235】 ii)細胞毒性試驗流程

【0236】 以對數成長的細胞以 3×10^3 細胞/孔的密度鋪平並使其恢復16-18小時。以變化濃度的兩種化合物（化合物A及威羅菲尼）刺激細胞48小時。48小時後，以CCK-8試劑（Dojindo分子科技公司，馬利蘭及日本）來測定細胞毒性。根據製造商的操作指南，加入5 μ L/孔的CCK-8試劑並將培養盤放置2小時。藉由在Tecan Sapphire 多重螢光微孔盤讀取儀（multi-fluorescence micro-plate reader）上測量波長450 nm校正至650 nm並對控制組標準化的吸光值來測定毒性。所有實驗以三重複進行兩次。

【0237】 化合物A及威羅菲尼的治療計畫：

【0238】 表1及表2分別表明化合物A及威羅菲尼在A375細胞及在G361與MDA-MB435S細胞中的治療計畫。

表 1：化合物 A 及威羅菲尼在 A375 細胞中的療計畫

計畫編號	A375 細胞的治療組別	治療計畫 (小時(h))
i	化合物 A (1 μ M)	48h
ii	化合物 A (0.3 μ M)	48h
iii	化合物 A (1.0 μ M)	48h
iv	化合物 A (3.0 μ M)	48h
v	化合物 A (10.0 μ M)	48h
vi	化合物 A (0.3 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	48h
vii	化合物 A (1.0 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	48h
viii	化合物 A (3.0 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	48h
ix	化合物 A (10.0 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	48h
x	控制組 + 媒液 (DMSO)	48h

表 2：化合物 A 及威羅菲尼在 G361 與 MDA-MB435S 細胞中的治療計畫

計畫編號	G361 及 MDA-MB435S 細胞的治療組別	治療計畫 (小時(h))
i	威羅菲尼 (1 μM)	48h
ii	化合物 A (0.1 μM)	48h
iii	化合物 A (0.3 μM)	48h
iv	化合物 A (1.0 μM)	48h
v	化合物 A (3.0 μM)	48h
vi	化合物 A (0.1 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	48h
vii	化合物 A (0.3 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	48h
viii	化合物 A (1.0 μM)及威羅菲尼 (1μM)	48h
ix	化合物 A (3.0 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	48h
x	控制組 + 媒液 (DMSO)	48h

【0239】 結果：

【0240】 化合物A及威羅菲尼及其組合在不同細胞株中的細胞毒性的IC₅₀值顯示於表3中。第4圖至第6圖及表4-6描述化合物A及威羅菲尼的組合在各種黑色素瘤細胞株中的效果。

表 3：化合物 A 及威羅菲尼在 G361、A375 及 MDAMB-435S (BRAF^{V600E}突變的)細胞株中的 IC₅₀ 測定

序號	細胞株	化合物	IC ₅₀ ± SEM (μM)
1	A375	化合物 A	5.5 ± 0.67
		化合物 A	0.8 ± 0.07
2	G361	化合物 A	0.75 ± 0.056
		化合物 A	0.2 ± 0.032
3	MDAMB435S	化合物 A	0.85 ± 0.064
		化合物 A	0.7 ± 0.058

【0241】 在第4圖至第6圖中，X-軸顯示單獨的化合物A及威羅菲尼的濃度以及該等化合物組合的濃度，左側Y-軸顯示細胞毒性百分比而右側Y-軸顯示組合指數值。

【0242】 在第4圖中，以1 μ M威羅菲尼處理的細胞顯示23%細胞抑制作用，而以3 μ M化合物A處理的細胞顯示46%細胞抑制作用。然而，當以此次佳濃度以威羅菲尼合併化合物A處理細胞時，觀察到具有組合指數（CI）0.70的83%細胞抑制作用的協同效果。所呈現的協同性數據代表兩次獨立實驗的平均值，每次實驗以三重複進行。

表 4：化合物 A 及威羅菲尼的組合在 A375 細胞中的平均組合指數值

濃度(μ M)	A375 細胞中的組合指數(95% CI)
化合物 A (0.3 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	0.66 (0.58 至 0.75)
化合物 A (1.0 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	0.68 (0.60 至 0.77)
化合物 A (3.0 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	0.70 (0.62 至 0.79)
化合物 A (10.0 μ M)及威羅菲尼 (1 μ M)	0.76 (0.68 至 0.85)
CI = 信賴區間	

【0243】 在第5圖中，以1 μ M威羅菲尼處理的細胞顯示30%細胞抑制作用，而以0.3 μ M化合物A處理的細胞只顯示2%細胞抑制作用。然而，當以此次佳濃度以威羅菲尼合併化合物A處理細胞時，觀察到具有組合指數值0.77的52%細胞抑制作用的顯著協同效果。當以化合物A（3 μ M）合併威羅菲尼（1 μ M）處理細胞時，顯示具有組合指數0.9的91%細胞抑制作用。所呈現的協同性數據代表兩次獨立實驗的平均值，每次實驗以三重複進行。

表 5：化合物 A 及威羅菲尼的組合在 G361 細胞中的平均組合指數值

濃度 (μM)	G361 細胞中的組合指數(95% CI)
化合物 A (0.1 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.79 (0.74 至 0.84)
化合物 A (0.3 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.77 (0.72 至 0.82)
化合物 A (1.0 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.87 (0.82 至 0.92)
化合物 A (3.0 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.97 (0.92 至 1.02)
CI = 信賴區間	

【0244】 在第6圖中，以1 μM威羅菲尼處理的細胞顯示31%細胞抑制作用，而以1 μM化合物A處理的細胞顯示32%細胞抑制作用。當以此次佳濃度以威羅菲尼合併化合物A處理細胞時，注意到具有組合指數0.74的90%細胞抑制作用的協同效果。所呈現的協同性數據代表兩次獨立實驗的平均值，每次實驗以三重複進行。

表 6：化合物 A 及威羅菲尼的組合在 MDA MB-435S 細胞中的平均組合指數值

濃度(μM)	MDA-MB435S 細胞中的組合指數(95% CI)
化合物 A (0.1 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.83 (0.78 至 0.88)
化合物 A (0.3 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.78 (0.72 至 0.83)
化合物 A (1.0 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.74 (0.68 至 0.79)
化合物 A (3.0 μM)及威羅菲尼 (1 μM)	0.90 (0.85 至 0.96)
CI = 信賴區間	

【0245】 結論：

【0246】 威羅菲尼及化合物A的組合在BRAF突變的黑色素瘤細胞中顯示顯著的協同效果。

【0247】 參考文獻：

1. Smalley KS, Lioni M, Palma MD, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson

J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M, Nathanson KL; “Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas”; Mol. Cancer Ther., 2008, 7, 2876-2883.

2. Smalley KSM and Flaherty KT; “Integrating BRAF/MEK inhibitors into combination therapy for melanoma”; British Journal of Cancer, 2009, 100, 431-435.

3. Dhomen N, Marais R; “BRAF signaling and targeted therapies in melanoma” Hematol. Oncol. Clin. North Am., 2009, 23, 3, 529-45.

4. Ting-Chao Chou; “Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies” Pharmacol. Rev., 2006, 58, 621-81.

【0248】 範例2：

【0249】 A.化合物A（CDK抑制劑，也稱為voruciclib）與一種選自BRAF抑制劑（威羅菲尼或達拉菲尼）或MEK抑制劑（曲美替尼）的抗癌劑在人類BRAFFV600E突變的黑色素瘤細胞株（A375）及其威羅菲尼抗藥性衍生物（A375R）中的體外組合研究

【0250】 目的：

【0251】 本研究的目的是評估CDK抑制劑（voruciclib）與BRAF抑制劑（威羅菲尼或達拉菲尼）或MEK抑制劑（曲美替尼）的組合在BRAF突變的黑色素瘤細胞中的效果。

【0252】 B.材料：

【0253】 測試化合物：化合物A（在PEL實驗室中製備）；威羅菲尼（Selleckchem USA，S1267）；達拉菲尼（Selleckchem USA，S2807）以及曲美替尼（Selleckchem USA，S2673）

【0254】 媒液：DMSO（Sigma-Aldrich-Chemie GmbH，德國）

【0255】 劑量製備：將測試化合物稱重並溶解於需要量的DMSO中以

得到所需要的儲備溶液。

【0256】 測試系統：測試系統包括購買自美國ATCC（美國細胞培養暨儲存中心）的A375（BRA^FV600E突變的）細胞株以及A375R細胞株（在PEL實驗室中研發的具威羅菲尼抗藥性）

【0257】 C.方法：

【0258】 使用CCK8活細胞去氫酶試驗來進行使用所有測試化合物作為單一試劑及以組合方式的細胞毒性研究。

【0259】 細胞計數套組-8（CCK8）活細胞去氫酶試驗：

【0260】 使用Tecan自動化平台（FreedomEvo液體操作系統），將以對數成長的人類BRA^FV600E突變的黑色素瘤細胞以30 μL的杜爾伯科改良伊格爾培養液（Dulbecco's Modified Eagle medium, DMEM）、1500細胞/孔的密度培養於384孔盤（Corning, USA）中，並培養約12-16小時使細胞貼附。之後以不同劑量的化合物A及抗癌劑（威羅菲尼或達拉菲尼或曲美替尼）做為單一藥物治療（單一地使用）以及以組合方式處理細胞48小時。針對每種組合（例如化合物A及威羅菲尼的組合）進行使用不同劑量的研究。當在A375及A375R細胞中單一地及組合使用時，測試化合物的治療比例描述於表7A-7C中（即化合物A及威羅菲尼的組合；化合物A及達拉菲尼的組合；以及化合物A及曲美替尼的組合）。使用以下劑量：化合物A（μM）：1、0.5、0.25、0.125、0.06、0.03、0.015；威羅菲尼（μM）：30、15、7.5、3.75、1.875、0.9、0.4、0.2、0.1、0.05；達拉菲尼（μM）：3、1.5、0.75、0.37、0.18、0.09、0.04、0.02、0.01、0.005；曲美替尼（μM）：1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.031、0.015、0.007、0.003、0.001。如表7A-7C中所示，抗癌劑（威羅菲尼或達拉菲尼或曲美替尼）的以上劑量以多種比例與化合物A混合。所使用的控制組僅有細胞或細胞與媒液（DMSO）。

【0261】 將培養盤培養在37° ± 1°C、加濕5% CO₂的培養箱中48小時。培養之後，使用CCK8試劑（Dojindo分子科技公司，馬利蘭及日本）分

析培養盤。根據製造商的操作指南，在384孔盤的每一個孔中加入3 μ L CCK-8試劑並將培養盤培養2小時。藉由在Tecan Sapphire多重螢光微孔盤讀取儀上測量波長450 nm對控制組標準化的吸光值來測定毒性。所有實驗以四重複進行。

【0262】 使用Calculusyn軟體（Biosoft，Ferguson，MO，USA）來定量組合的潛力，該軟體是基於Chou Talalay方法，其計算具有表明協同效益的小於1的組合指數（CI）值的CI。

【0263】 表7A-表7C：化合物A及抗癌劑（威羅菲尼或達拉菲尼或曲美替尼）做為單一藥物治療（單一地使用）及組合使用在A375及A375R細胞中的治療比例。

【0264】 化合物A（以A表示）及威羅菲尼（以V表示）單獨或組合使用的治療比例呈現於表7A中。

表 7A：

濃度 (μ M)										
A (0)	V (30)	V (15)	V (7.5)	V (3.75)	V (1.88)	V (0.94)	V (0.47)	V (0.23)	V (0.12)	V (0.059)
A (1)	A (1) + V (30)	A (1) + V (15)	A (1) + V (7.5)	A (1) + V (3.75)	A (1) + V (1.88)	A (1) + V (0.94)	A (1) + V (0.47)	A (1) + V (0.23)	A (1) + V (0.12)	A (1) + V (0.059)
A (0.5)	A (0.5) + V (30)	A (0.5) + V (15)	A (0.5) + V (7.5)	A (0.5) + V (3.75)	A (0.5) + V (1.88)	A (0.5) + V (0.94)	A (0.5) + V (0.47)	A (0.5) + V (0.23)	A (0.5) + V (0.12)	A (0.5) + V (0.059)
A (0.25)	A (0.25) + V (30)	A (0.25) + V (15)	A (0.25) + V (7.5)	A (0.25) + V (3.75)	A (0.25) + V (1.88)	A (0.25) + V (0.94)	A (0.25) + V (0.47)	A (0.25) + V (0.23)	A (0.25) + V (0.12)	A (0.25) + V (0.059)
A (0.125)	A (0.125) + V (30)	A (0.125) + V (15)	A (0.125) + V (7.5)	A (0.125) + V (3.75)	A (0.125) + V (1.88)	A (0.125) + V (0.94)	A (0.125) + V (0.47)	A (0.125) + V (0.23)	A (0.125) + V (0.12)	A (0.125) + V (0.059)
A (0.0625)	A (0.0625) + V (30)	A (0.0625) + V (15)	A (0.0625) + V (7.5)	A (0.0625) + V (3.75)	A (0.0625) + V (1.88)	A (0.0625) + V (0.94)	A (0.0625) + V (0.47)	A (0.0625) + V (0.23)	A (0.0625) + V (0.12)	A (0.0625) + V (0.059)
A (0.0312)	A (0.0312) + V (30)	A (0.0312) + V (15)	A (0.0312) + V (7.5)	A (0.0312) + V (3.75)	A (0.0312) + V (1.88)	A (0.0312) + V (0.94)	A (0.0312) + V (0.47)	A (0.0312) + V (0.23)	A (0.0312) + V (0.12)	A (0.0312) + V (0.059)
A (0.0156)	A (0.0156) + V (30)	A (0.0156) + V (15)	A (0.0156) + V (7.5)	A (0.0156) + V (3.75)	A (0.0156) + V (1.88)	A (0.0156) + V (0.94)	A (0.0156) + V (0.47)	A (0.0156) + V (0.23)	A (0.0156) + V (0.12)	A (0.0156) + V (0.059)

【0265】 化合物A（以A表示）及達拉菲尼（以D表示)單獨或組合使用的治療比例呈現於表7B中。

表 7B：

濃度 (μM)										
A (0)	D (3)	D (1.5)	D (0.75)	D (0.38)	D (0.19)	D (0.094)	D (0.047)	D (0.023)	D (0.012)	D (0.006)
A (1)	A (1) + D (3)	A (1) + D (1.5)	A (1) + D (0.75)	A (1) + D (0.38)	A (1) + D (0.19)	A (1) + D (0.094)	A (1) + D (0.047)	A (1) + D (0.023)	A (1) + D (0.012)	A (1) + D (0.006)
A (0.5)	A (0.5) + D (3)	A (0.5) + D (1.5)	A (0.5) + D (0.75)	A (0.5) + D (0.38)	A (0.5) + D (0.19)	A (0.5) + D (0.094)	A (0.5) + D (0.047)	A (0.5) + D (0.023)	A (0.5) + D (0.012)	A (0.5) + D (0.006)
A (0.25)	A (0.25) + D (3)	A (0.25) + D (1.5)	A (0.25) + D (0.75)	A (0.25) + D (0.38)	A (0.25) + D (0.19)	A (0.25) + D (0.094)	A (0.25) + D (0.047)	A (0.25) + D (0.023)	A (0.25) + D (0.012)	A (0.25) + D (0.006)
A (0.125)	A (0.125) + D (3)	A (0.125) + D (1.5)	A (0.125) + D (0.75)	A (0.125) + D (0.38)	A (0.125) + D (0.19)	A (0.125) + D (0.094)	A (0.125) + D (0.047)	A (0.125) + D (0.023)	A (0.125) + D (0.012)	A (0.125) + D (0.006)
A (0.0625)	A (0.0625) + D (3)	A (0.0625) + D (1.5)	A (0.0625) + D (0.75)	A (0.0625) + D (0.38)	A (0.0625) + D (0.19)	A (0.0625) + D (0.094)	A (0.0625) + D (0.047)	A (0.0625) + D (0.023)	A (0.0625) + D (0.012)	A (0.0625) + D (0.006)
A (0.0312)	A (0.0312) + D (3)	A (0.0312) + D (1.5)	A (0.0312) + D (0.75)	A (0.0312) + D (0.38)	A (0.0312) + D (0.19)	A (0.0312) + D (0.094)	A (0.0312) + D (0.047)	A (0.0312) + D (0.023)	A (0.0312) + D (0.012)	A (0.0312) + D (0.006)
A (0.0156)	A (0.0156) + D (3)	A (0.0156) + D (1.5)	A (0.0156) + D (0.75)	A (0.0156) + D (0.38)	A (0.0156) + D (0.19)	A (0.0156) + D (0.094)	A (0.0156) + D (0.047)	A (0.0156) + D (0.023)	A (0.0156) + D (0.012)	A (0.0156) + D (0.006)

【0266】 化合物A（以A表示）及曲美替尼（以T表示)單獨或組合使用的治療比例呈現於表7C中。

表7C：

濃度 (μM)										
A (0)	T (1)	T (0.5)	T (0.25)	T (0.13)	T (0.06)	T (0.031)	T (0.016)	T (0.008)	T (0.004)	T (0.002)
A (1)	A (1) + T (1)	A (1) + T (0.5)	A (1) + T (0.25)	A (1) + T (0.13)	A (1) + T (0.06)	A (1) + T (0.031)	A (1) + T (0.016)	A (1) + T (0.008)	A (1) + T (0.004)	A (1) + T (0.002)
A (0.5)	A (0.5) + T (1)	A (0.5) + T (0.5)	A (0.5) + T (0.25)	A (0.5) + T (0.13)	A (0.5) + T (0.06)	A (0.5) + T (0.031)	A (0.5) + T (0.016)	A (0.5) + T (0.008)	A (0.5) + T (0.004)	A (0.5) + T (0.002)

A (0.25)	A (0.25) + T (1)	A (0.25) + T (0.5)	A (0.25) + T (0.25)	A (0.25) + T (0.13)	A (0.25) + T (0.06)	A (0.25) + T (0.031)	A (0.25) + T (0.016)	A (0.25) + T (0.008)	A (0.25) + T (0.004)	A (0.25) + T (0.002)
A (0.125)	A (0.125) + T (1)	A (0.125) + T (0.5)	A (0.125) + T (0.25)	A (0.125) + T (0.13)	A (0.125) + T (0.06)	A (0.125) + T (0.031)	A (0.125) + T (0.016)	A (0.125) + T (0.008)	A (0.125) + T (0.004)	A (0.125) + T (0.002)
A (0.0625)	A (0.0625) + T (1)	A (0.0625) + T (0.5)	A (0.0625) + T (0.25)	A (0.0625) + T (0.13)	A (0.0625) + T (0.06)	A (0.0625) + T (0.031)	A (0.0625) + T (0.016)	A (0.0625) + T (0.008)	A (0.0625) + T (0.004)	A (0.0625) + T (0.002)
A (0.0312)	A (0.0312) + T (1)	A (0.0312) + T (0.5)	A (0.0312) + T (0.25)	A (0.0312) + T (0.13)	A (0.0312) + T (0.06)	A (0.0312) + T (0.031)	A (0.0312) + T (0.016)	A (0.0312) + T (0.008)	A (0.0312) + T (0.004)	A (0.0312) + T (0.002)
A (0.0156)	A (0.0156) + T (1)	A (0.0156) + T (0.5)	A (0.0156) + T (0.25)	A (0.0156) + T (0.13)	A (0.0156) + T (0.06)	A (0.0156) + T (0.031)	A (0.0156) + T (0.016)	A (0.0156) + T (0.008)	A (0.0156) + T (0.004)	A (0.0156) + T (0.002)

【0267】 結果：

【0268】 這些研究的結果描述於第7圖至第13圖中。

【0269】 結論：

【0270】 1. 從第7a圖及第7b圖中，可得出A375細胞株對威羅菲尼非常敏感而A375R為抗藥性的結論。再者，A375及A375R兩者對於化合物A (voruciclib) 同樣地敏感。

【0271】 2. 從第8a圖及第8b圖中，可得出化合物A (voruciclib) 及威羅菲尼的組合在A375細胞株中顯示強協同效益 (CI<0.5) 的結論。

【0272】 3. 從第9a圖及第9b圖中，可得出化合物A (voruciclib) 及威羅菲尼的組合在A375R細胞株中顯示強協同效益 (CI<0.5) 的結論。

【0273】 4. 從第10a圖及第10b圖中，可得出化合物A (voruciclib) 及達拉菲尼的組合在A375細胞株中顯示強協同效益 (CI<0.5) 的結論。

【0274】 5. 從第11a圖及第11b圖中，可得出化合物A (voruciclib) 及達拉菲尼的組合在A375R細胞株中顯示強協同效益 (CI<0.5) 的結論。

【0275】 6. 從第12a圖及第12b圖中，可得出化合物A (voruciclib) 及曲美替尼的組合在A375細胞株中顯示強協同效益 (CI<0.5) 的結論。

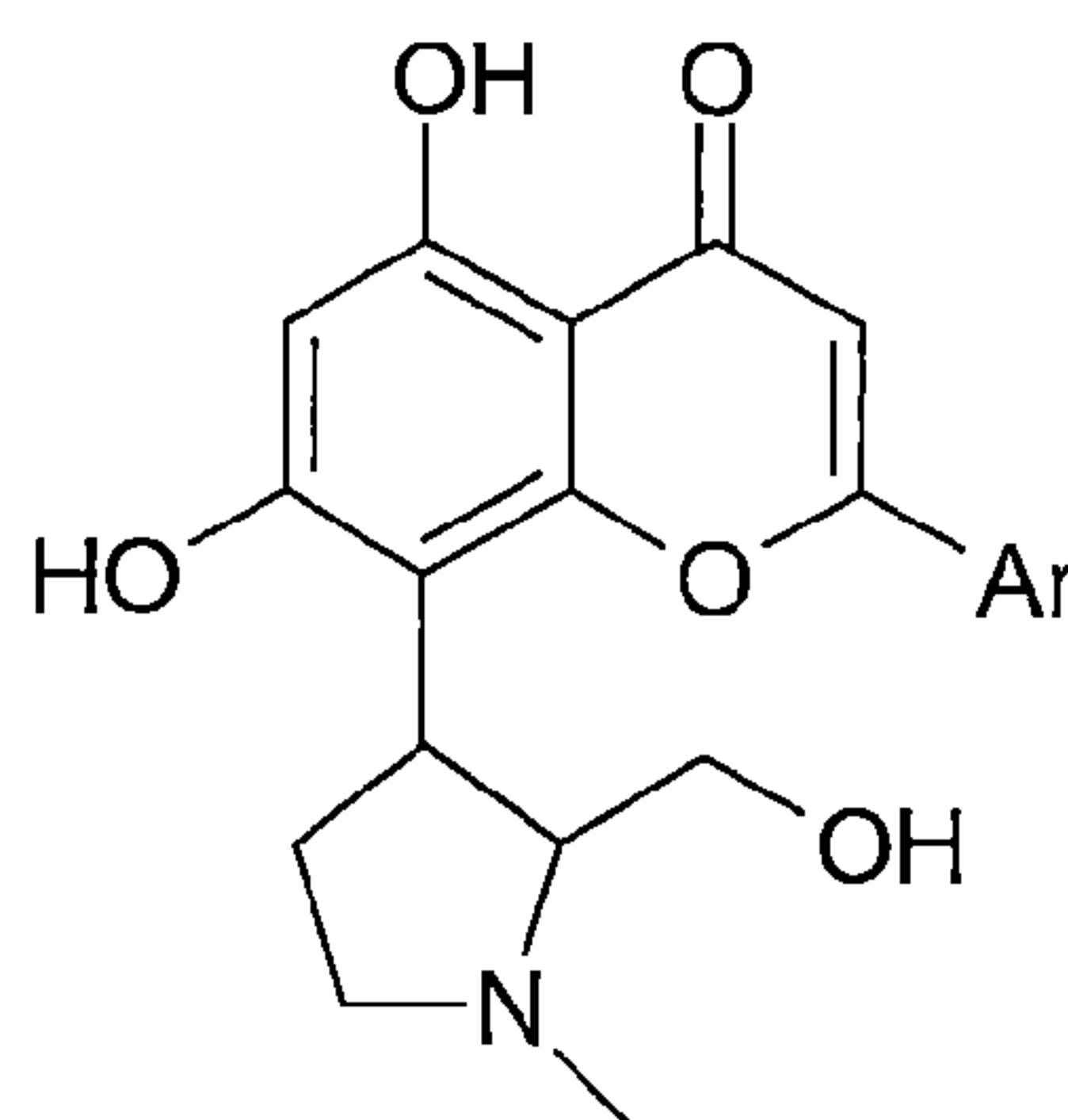
【0276】 7. 從第13a圖及第13b圖中，可得出化合物A（voruciclib）及曲美替尼在A375R細胞株中顯示強協同效益（CI<0.5）的結論。

【符號說明】

【0277】 無

申請專利範圍

【請求項1】一種式I的一週期蛋白依賴型激酶（CDK）抑制劑或其藥學上可接受鹽類與至少一抗癌劑的一組合在製造一藥劑的用途，該藥劑用於治療需要該藥劑的一個體的黑色素瘤，該CDK抑制劑為式I化合物；



式I

其中Ar為被2個不同的取代基取代的苯基，該取代基選自氯及三氟甲基，該至少一抗癌劑選自一絲胺酸-蘇胺酸蛋白激酶B-raf（BRAF）抑制劑以及一促分裂原活化蛋白激酶（MEK）抑制劑。

【請求項2】如請求項1所述的用途，其中該CDK抑制劑是(+)-反-2-(2-氯-4-三氟甲基苯基)-5,7-二羥-8-(2-羥甲基-1-甲基-吡啶-3-基)-苯并呋喃-4-酮氫氯化物。

【請求項3】如請求項1所述的用途，其中該BRAF抑制劑或該MEK抑制劑為BRAF的一V600突變形式抑制劑。

【請求項4】如請求項3所述的用途，其中該BRAF抑制劑為BRAF的一V600E突變形式抑制劑。

【請求項5】如請求項1所述的用途，其中該BRAF抑制劑是選自索拉非尼（sorafenib）、威羅菲尼（vemurafenib）、GDC-0879、達拉菲尼（dabrafenib）、PLX4720、BMS-908662、LGX818、PLX3603、ARQ-736、DP-4978或RAF265。

【請求項6】如請求項3至請求項5中任一項所述的用途，其中該BRAF抑制

劑是威羅菲尼。

【請求項7】如請求項3至請求項5中任一項所述的用途，其中該BRAF抑制劑是達拉菲尼。

【請求項8】如請求項1或請求項2所述的用途，其中該MEK抑制劑是BRAF的一V600E突變形式抑制劑或一V600K突變形式抑制劑。

【請求項9】如請求項1所述的用途，其中該MEK抑制劑是選自司美替尼（selumetinib）、比美替尼（binimetinib）、PD-0325901、曲美替尼（trametinib）、考比替尼（cobimetinib）、瑞法替尼（refametinib）、pimasertib、TAK-733或WX-554。

【請求項10】如請求項8或請求項9所述的用途，其中該MEK抑制劑是曲美替尼。

【請求項11】如請求項1至請求項10中任一項所述的用途，其中該CDK抑制劑以及選自一BRAF抑制劑及一MEK抑制劑的該至少一抗癌劑被同時投予需要其的該個體。

【請求項12】如請求項1至請求項10中任一項所述的用途，其中該CDK抑制劑以及選自一BRAF抑制劑及一MEK抑制劑的該至少一抗癌劑被依序投予需要其的該個體。

【請求項13】如請求項1所述的用途，其中該黑色素瘤是非難治性黑色素瘤。

【請求項14】如請求項13所述的用途，其中該黑色素瘤是非難治性BRAF突變黑色素瘤。

【請求項15】如請求項14所述的用途，其中該黑色素瘤是非難治性BRAFF600突變黑色素瘤。

【請求項16】如請求項15所述的用途，其中該黑色素瘤是非難治性BRAFF600E或BRAFF600K突變黑色素瘤。

【請求項17】如請求項1所述的用途，其中該黑色素瘤是復發或難治性黑色素瘤。

【請求項18】如請求項17所述的用途，其中該黑色素瘤是復發或難治性 BRAF突變黑色素瘤。

【請求項19】如請求項18所述的用途，其中該黑色素瘤是復發或難治性 BRAFV600突變黑色素瘤。

【請求項20】如請求項19所述的用途，其中該黑色素瘤是復發或難治性 BRAFV600E黑色素瘤或BRAFV600K突變黑色素瘤。

【請求項21】如請求項1所述的用途，其中該黑色素瘤是轉移黑色素瘤。

【請求項22】如請求項21所述的用途，其中該黑色素瘤是轉移BRAF突變黑色素瘤。

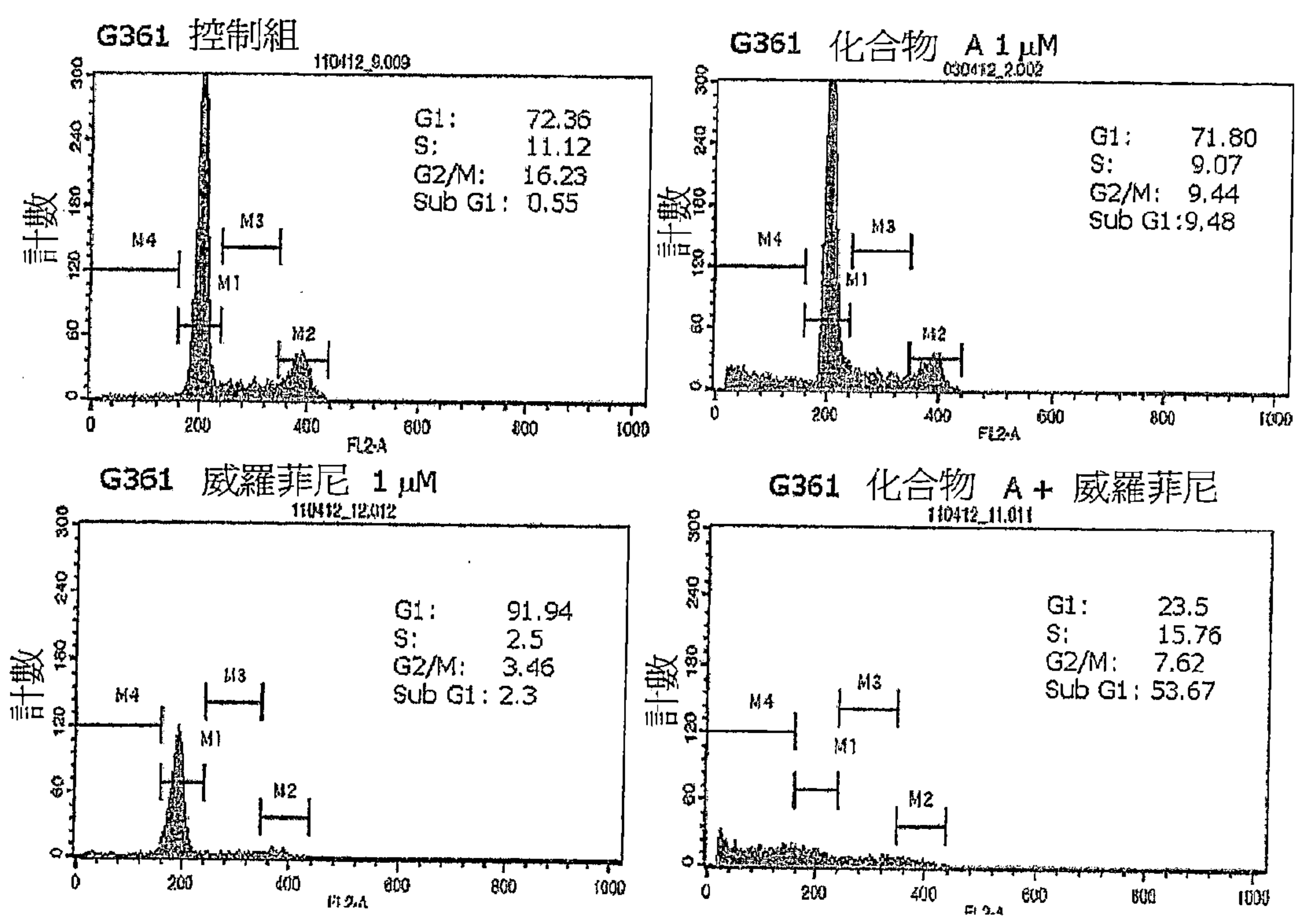
【請求項23】如請求項22所述的用途，其中該黑色素瘤是轉移BRAFV600突變黑色素瘤。

【請求項24】如請求項23所述的用途，其中該黑色素瘤是轉移BRAFV600E黑色素瘤或BRAFV600K突變黑色素瘤。

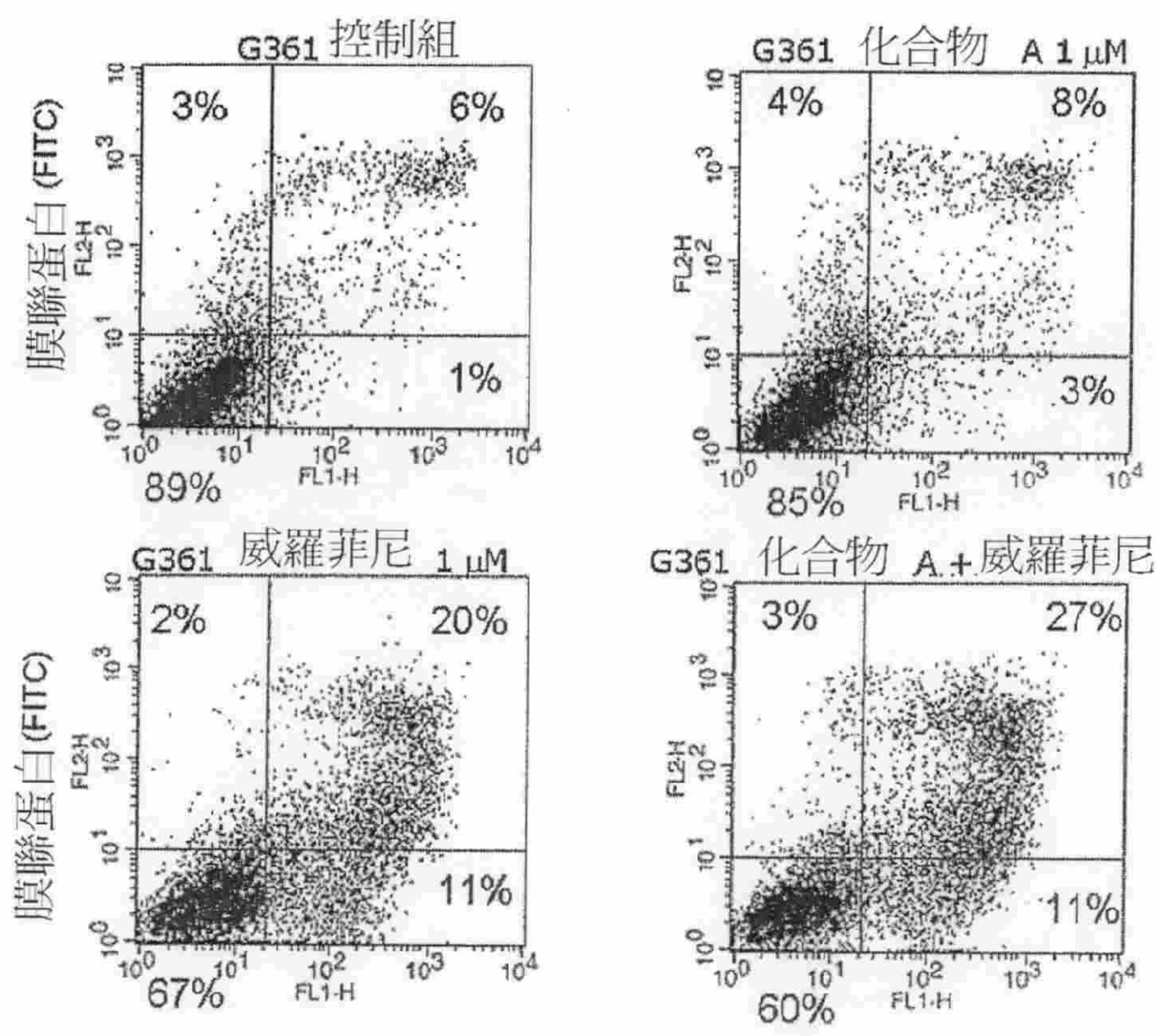
【請求項25】如請求項1所述的用途，其中該黑色素瘤是一低轉移黑色素瘤。

【請求項26】如請求項1所述的用途，其中該黑色素瘤是無黑色素瘤。

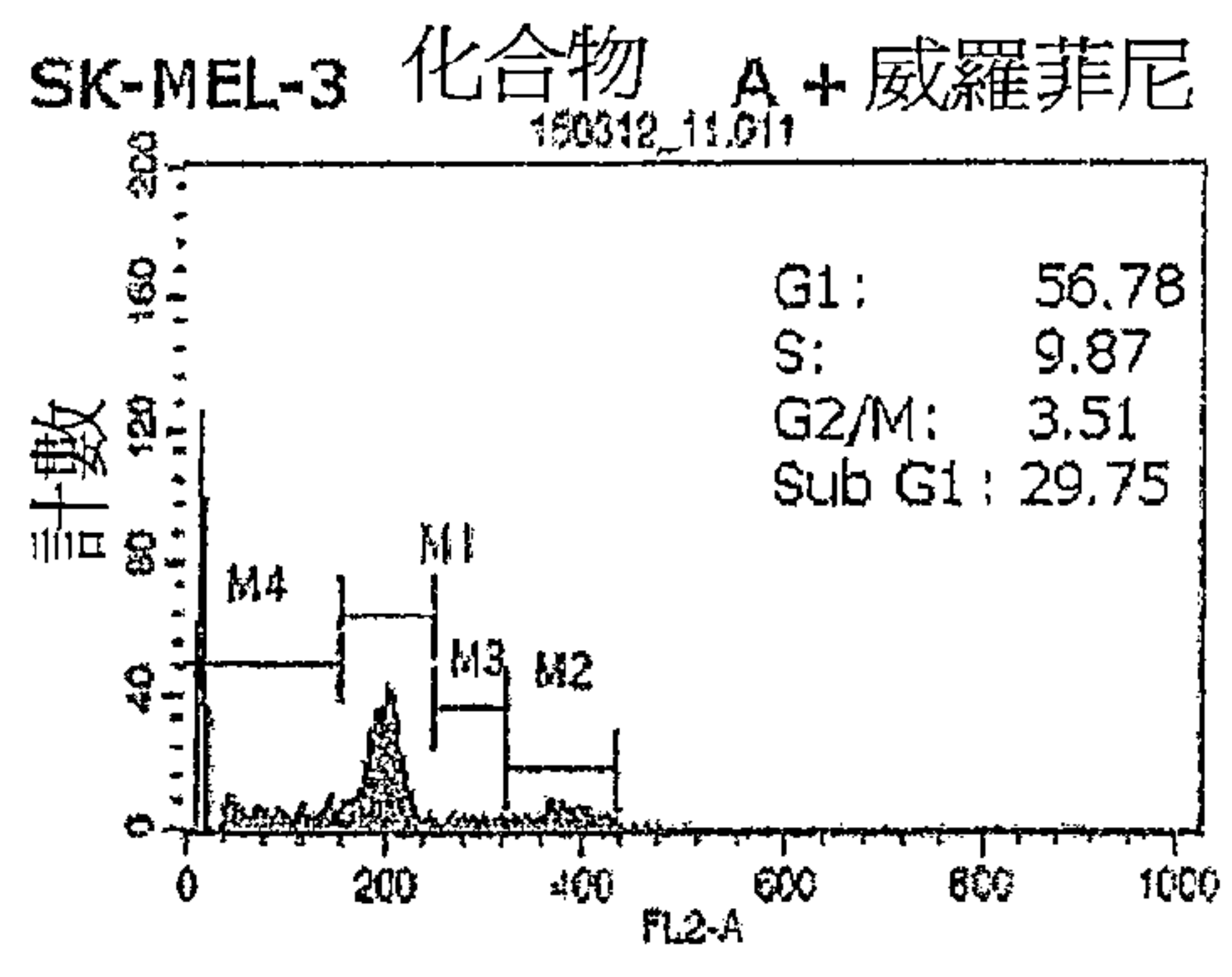
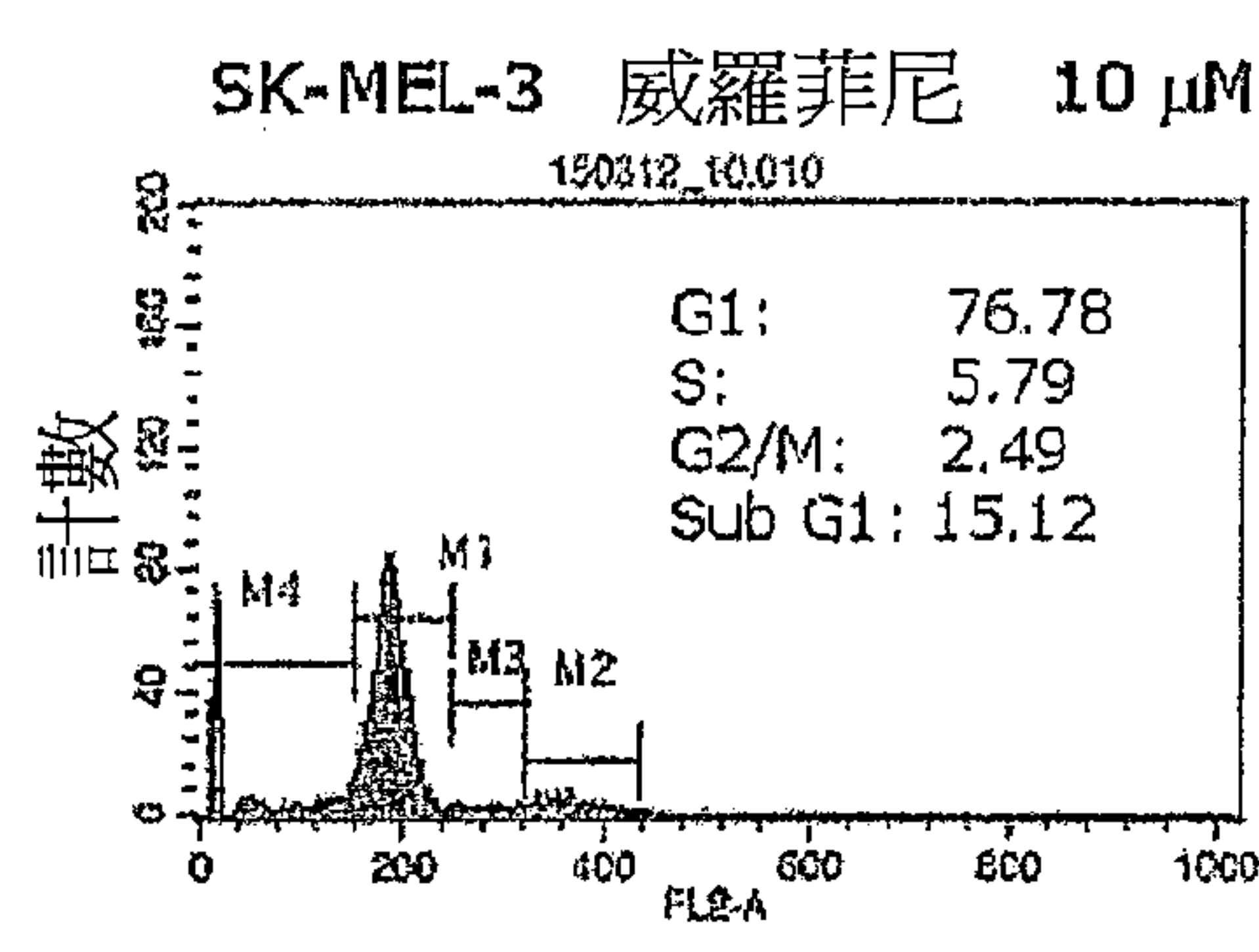
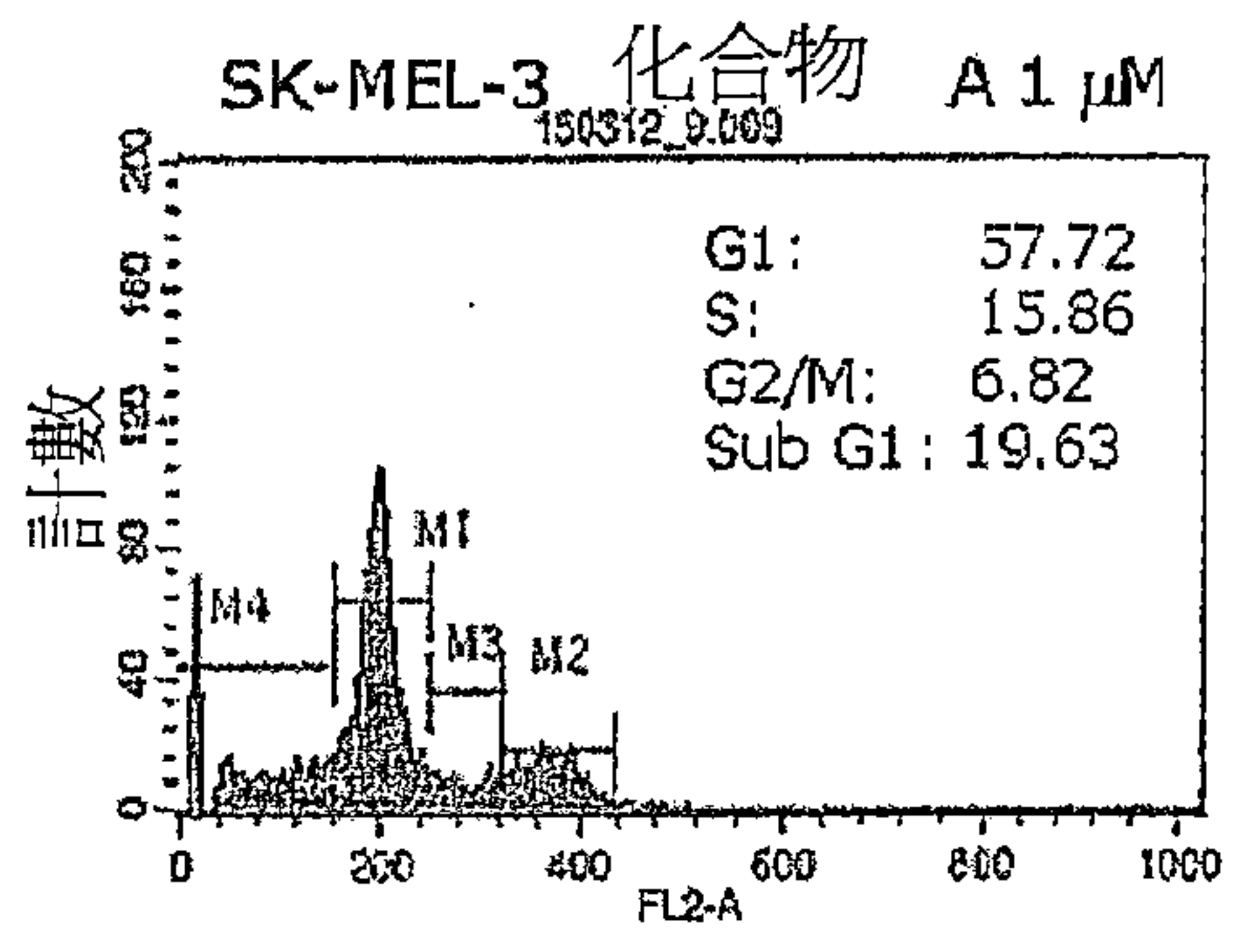
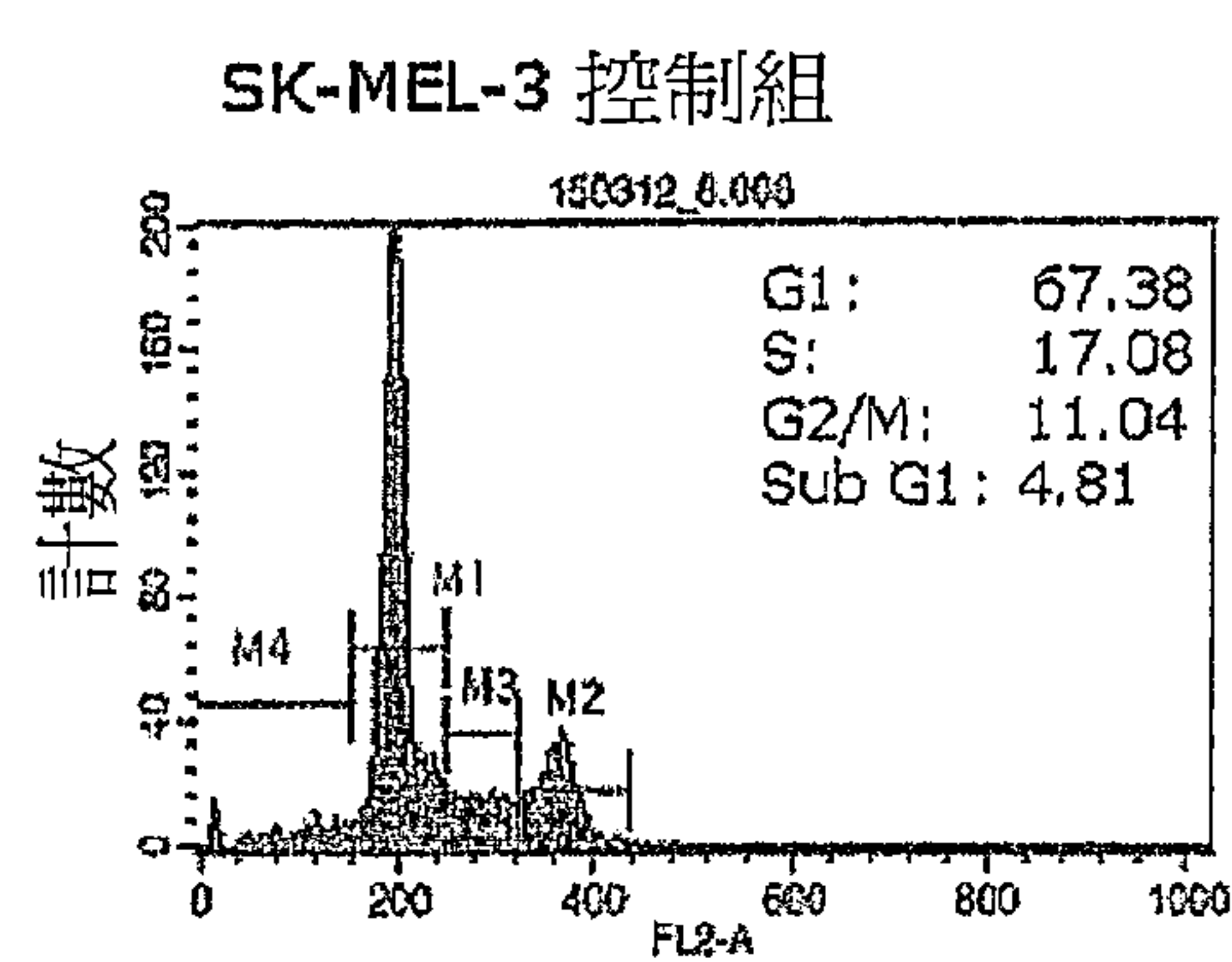
圖式



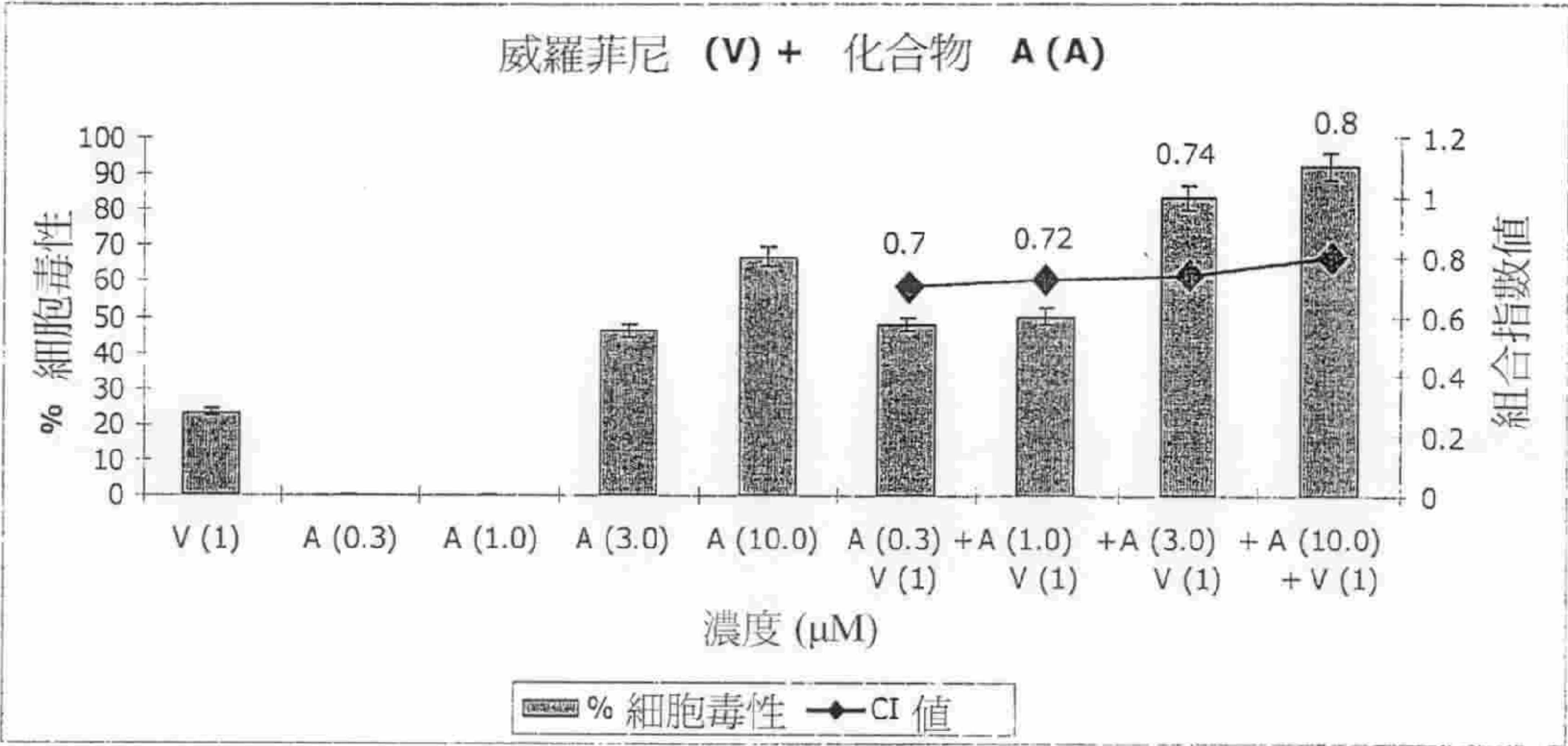
第1圖



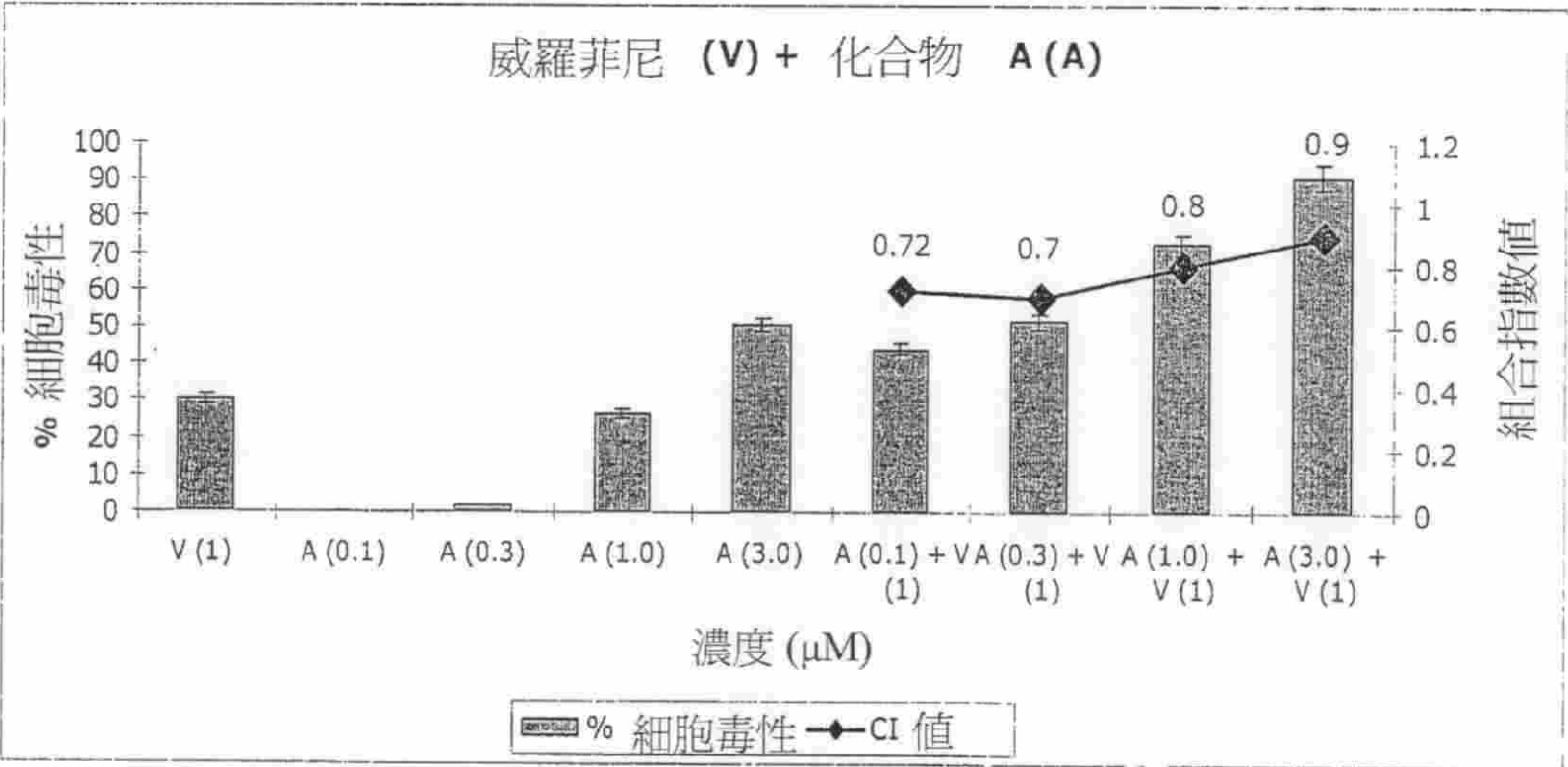
第2圖



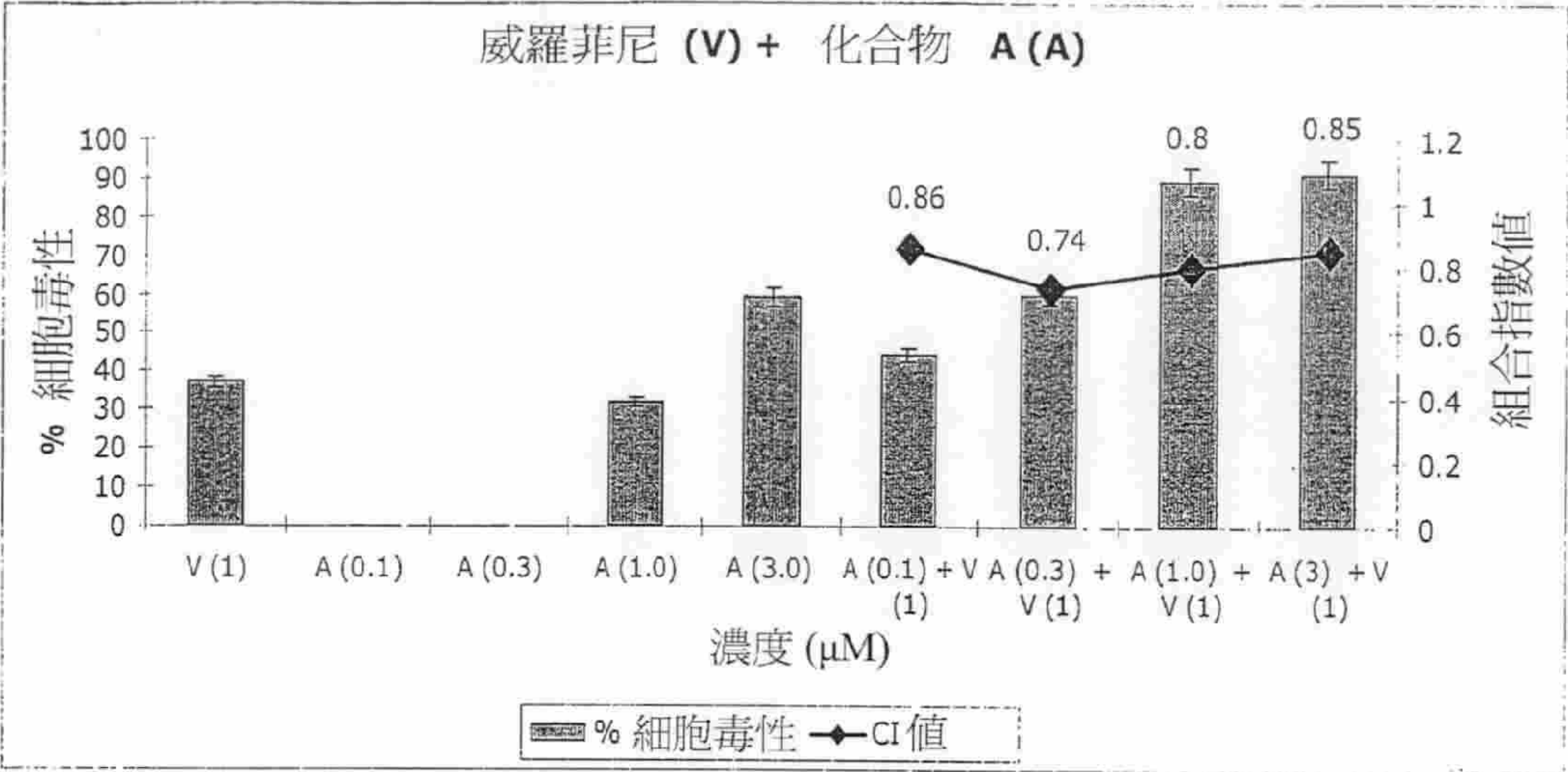
第3圖



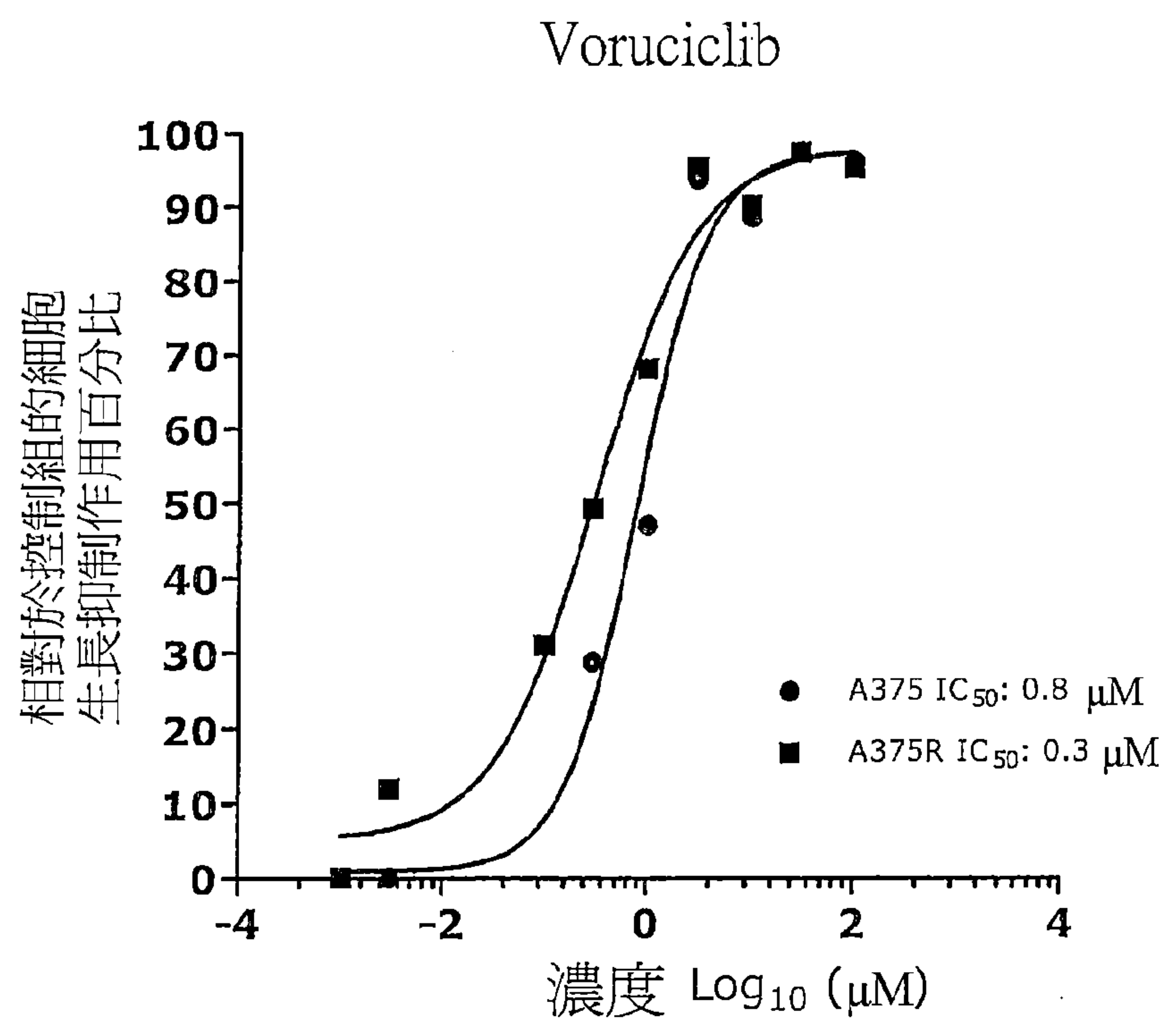
第4圖



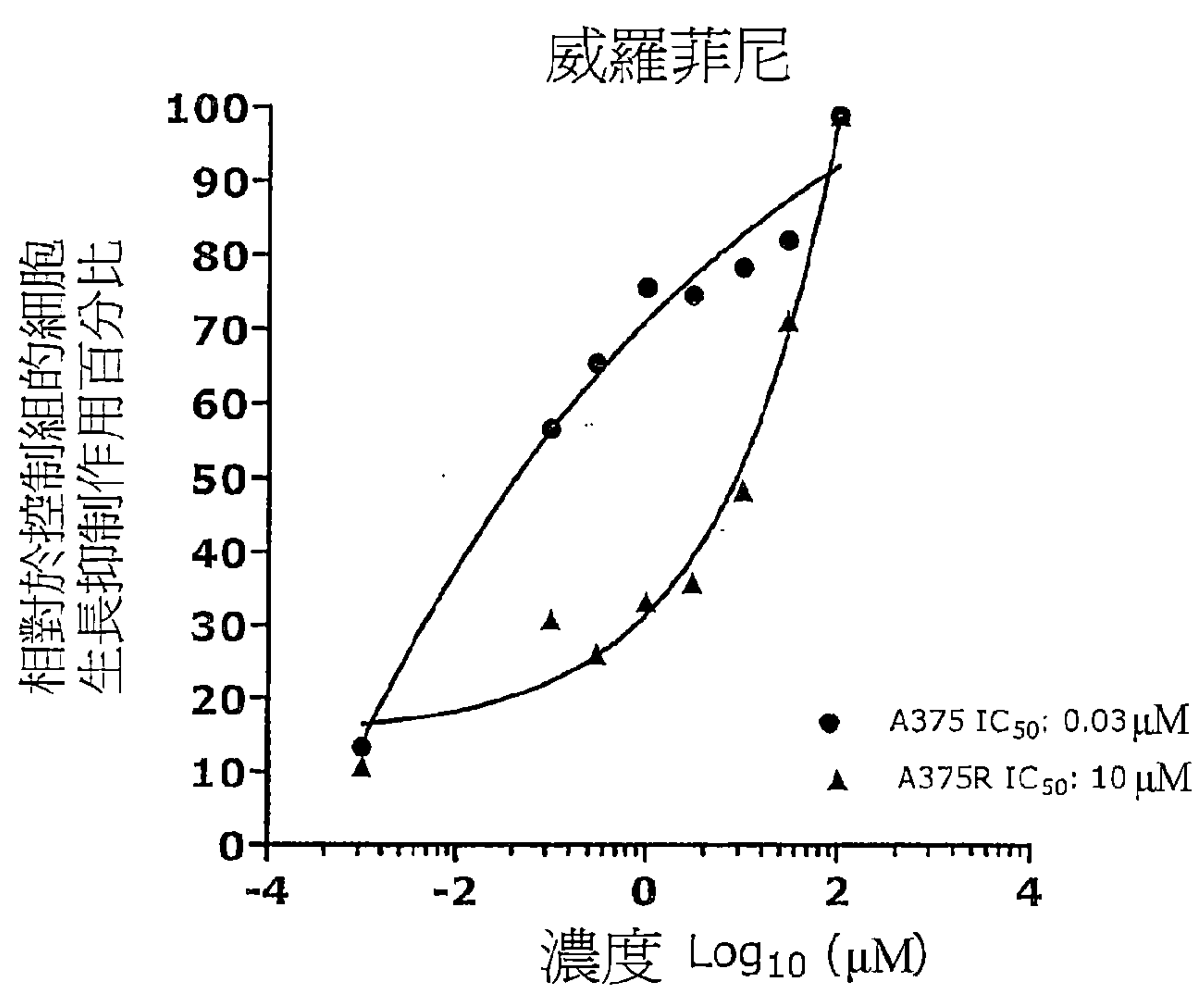
第5圖



第6圖

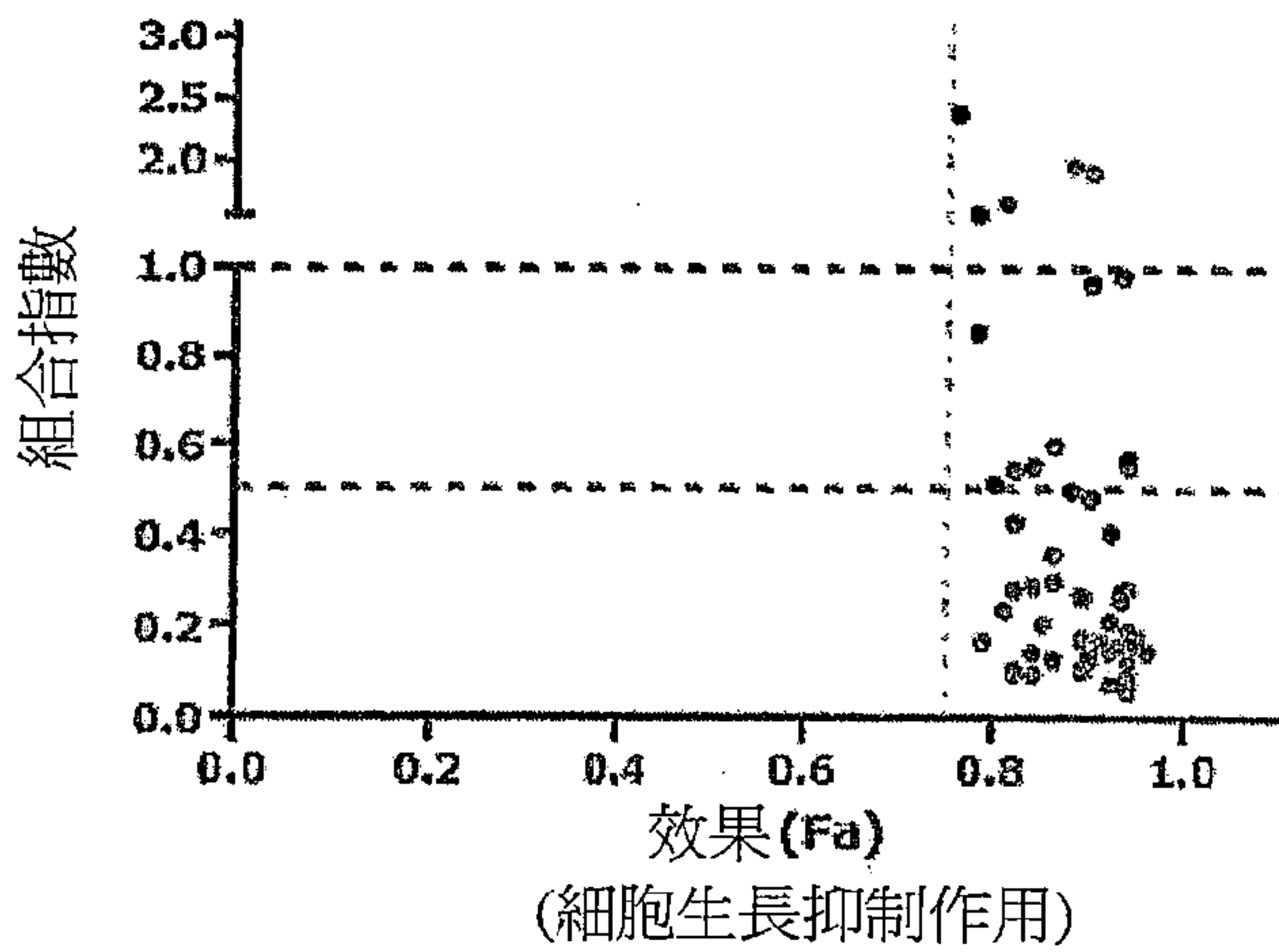


第7a圖



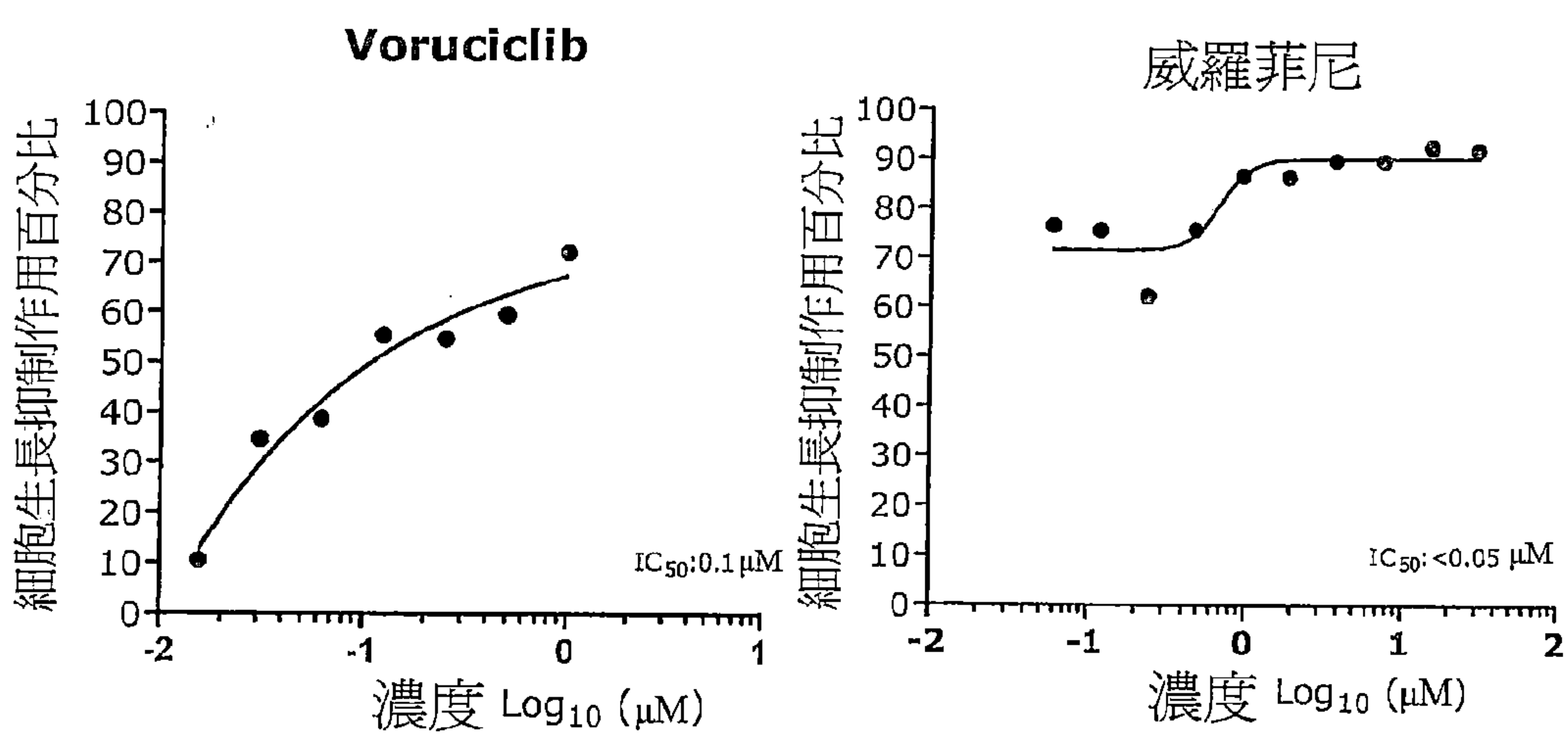
第7b圖

Voruciclib 及威羅菲尼
(A375)
(68 組合點)



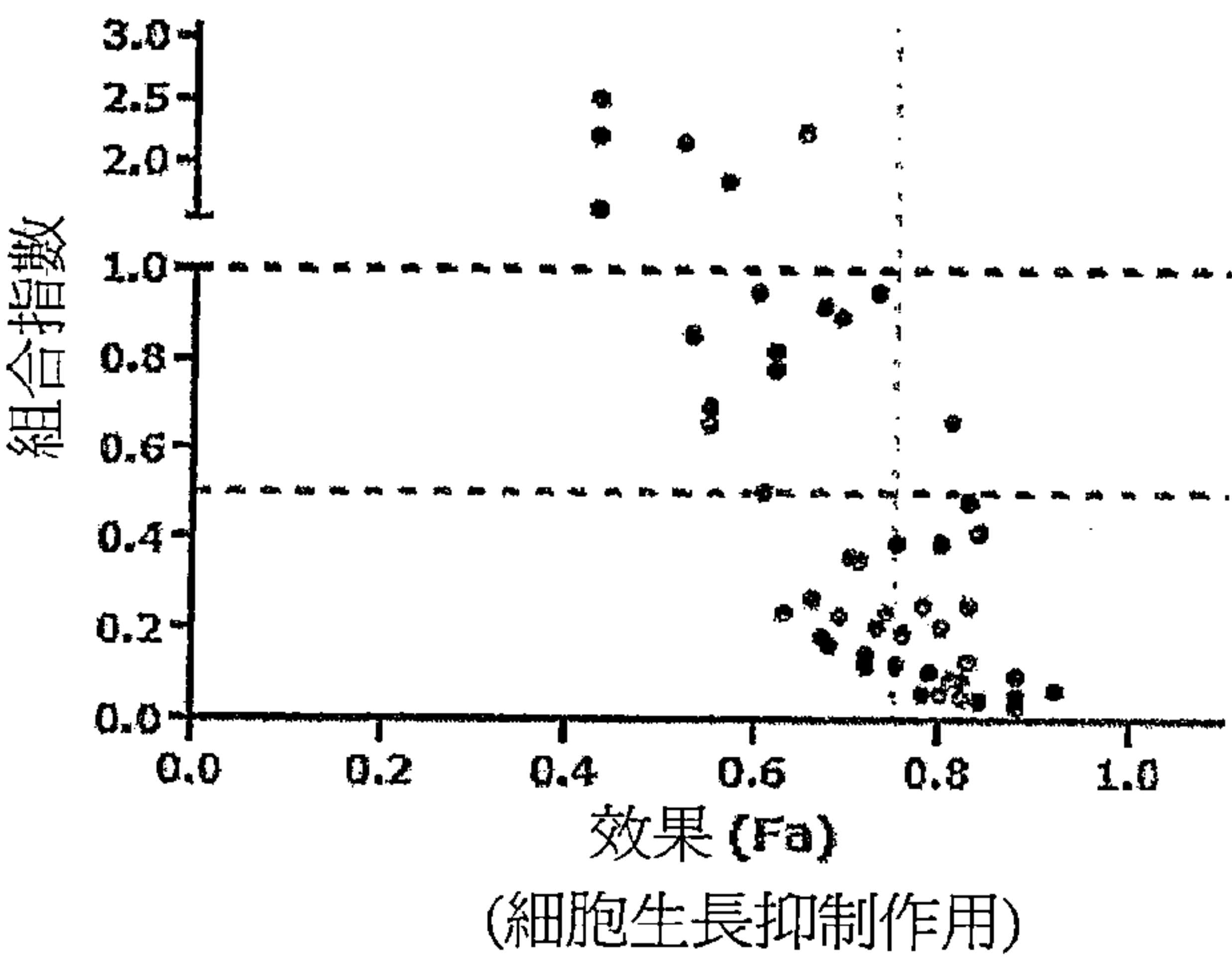
(細胞生長抑制作用)

第8a圖

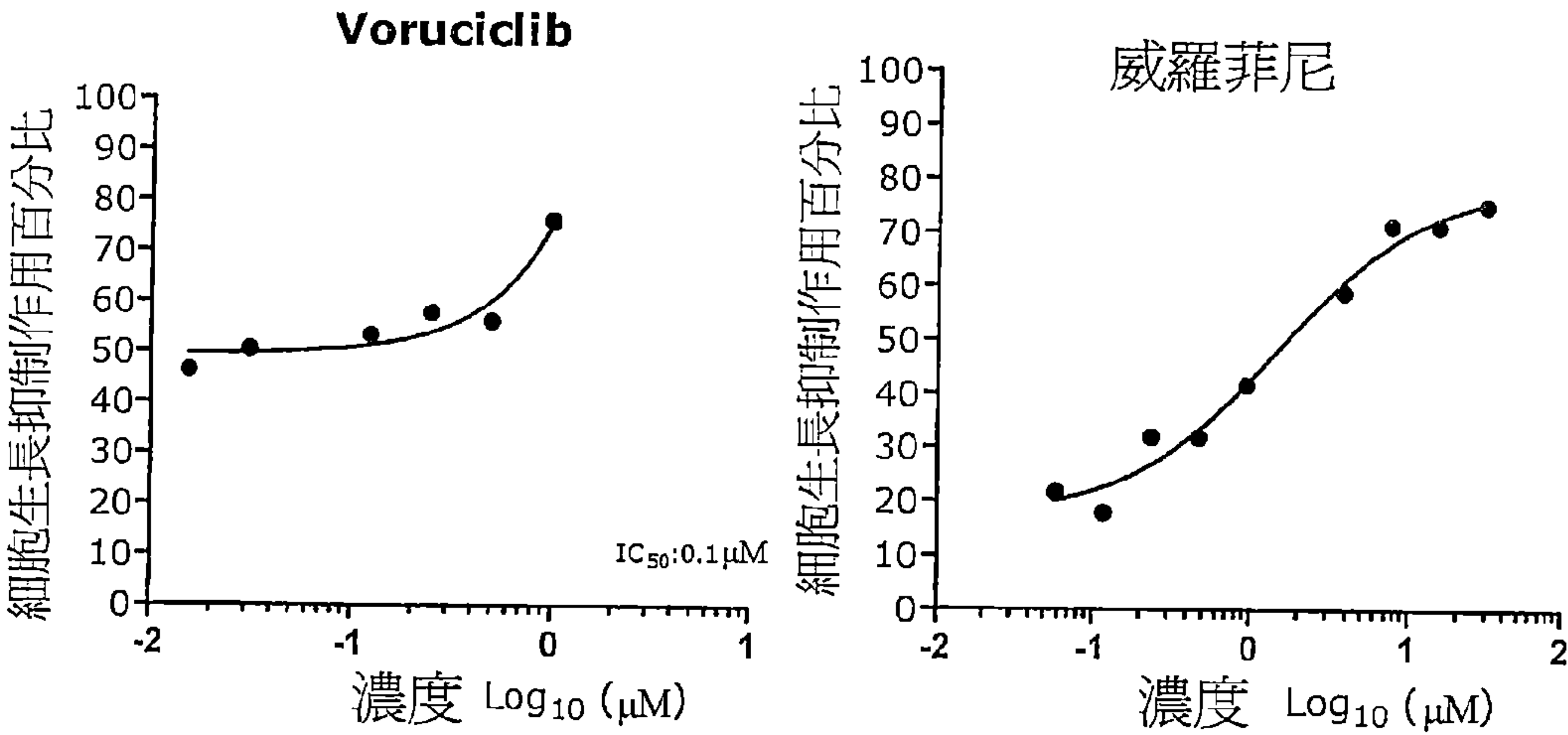


第8b圖

Voruciclib 及威羅菲尼
(A375R)
(68 組合點)

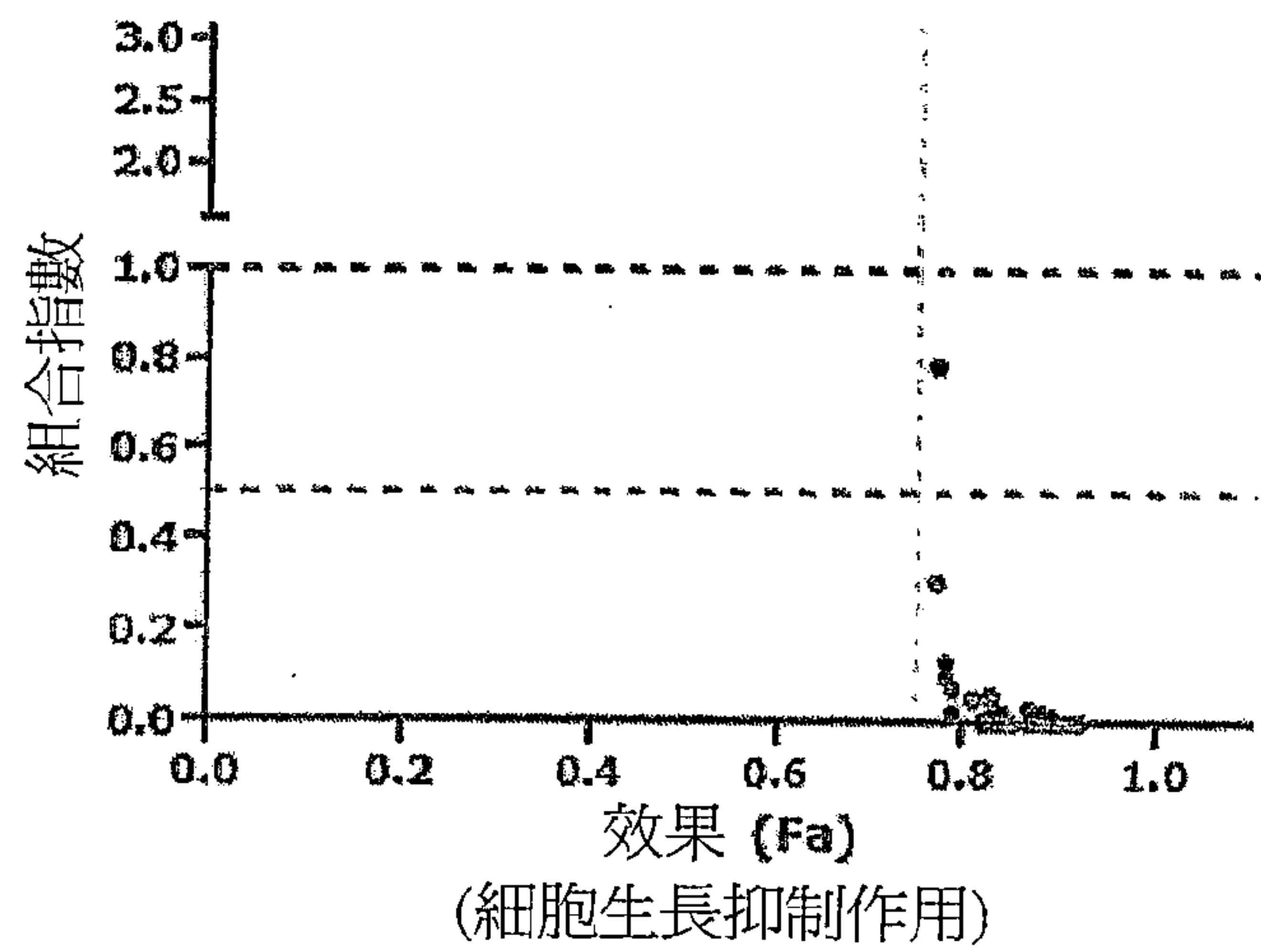


第9a圖

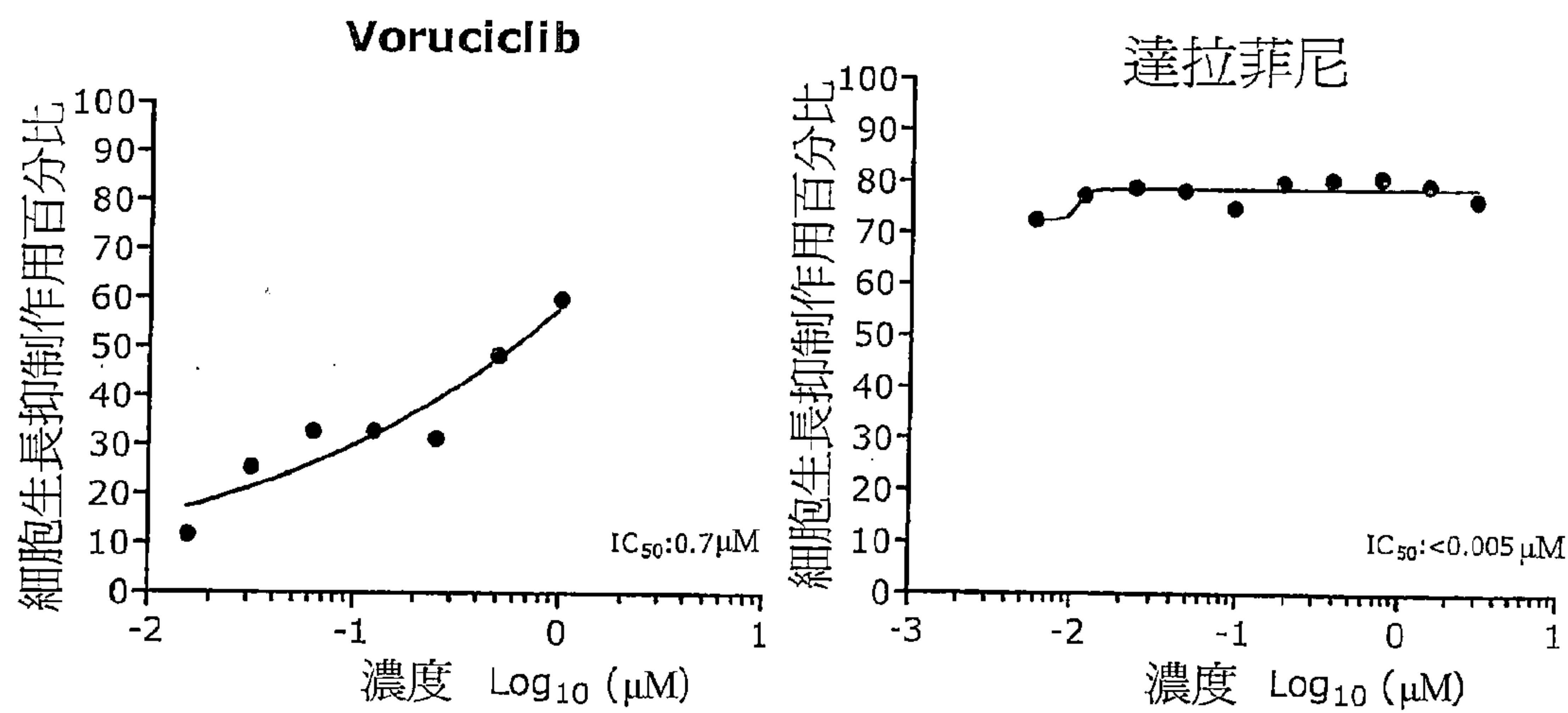


第9b圖

Voruciclib 及達拉菲尼
(A375)
(68 組合點)

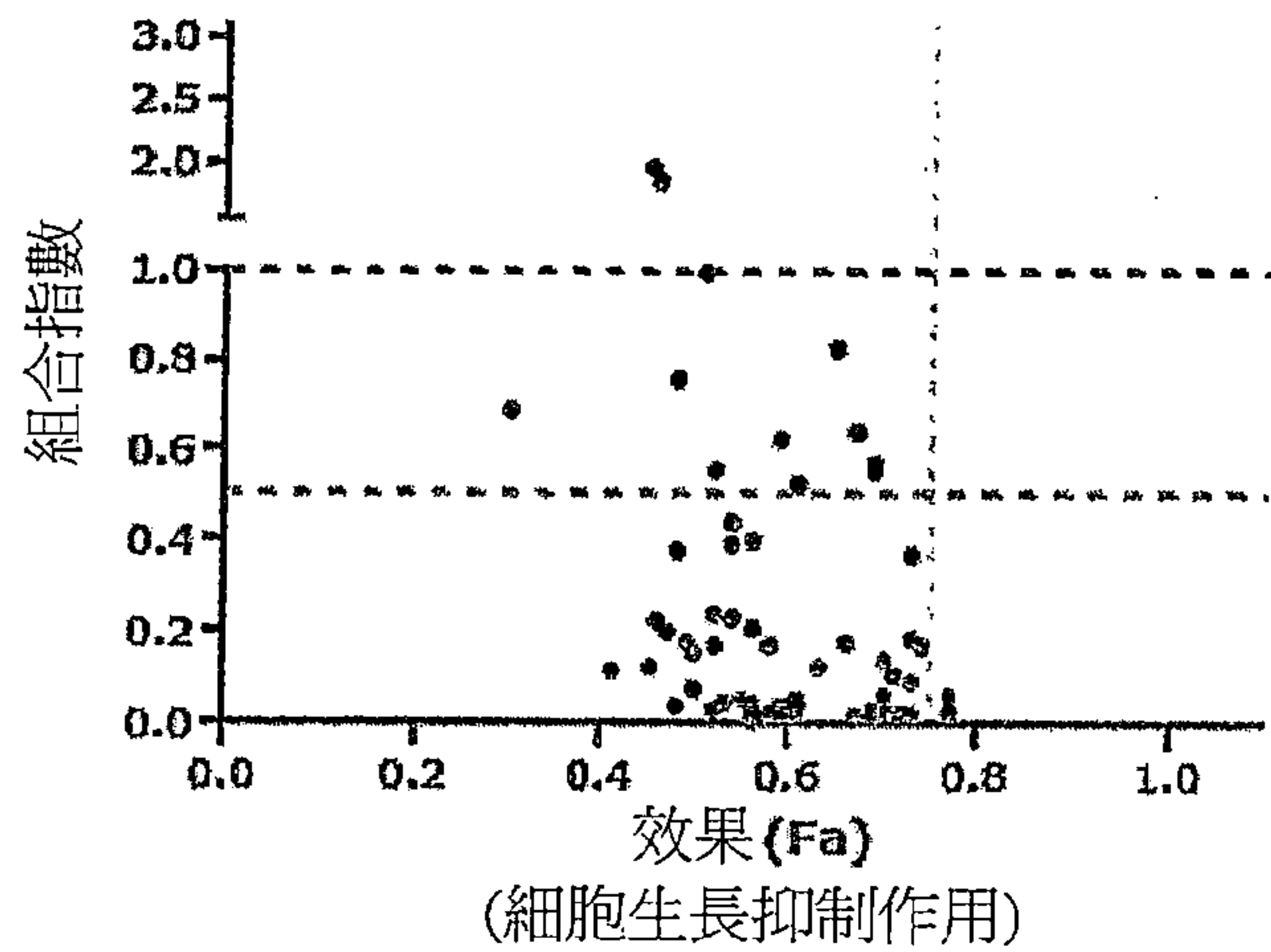


第10a圖

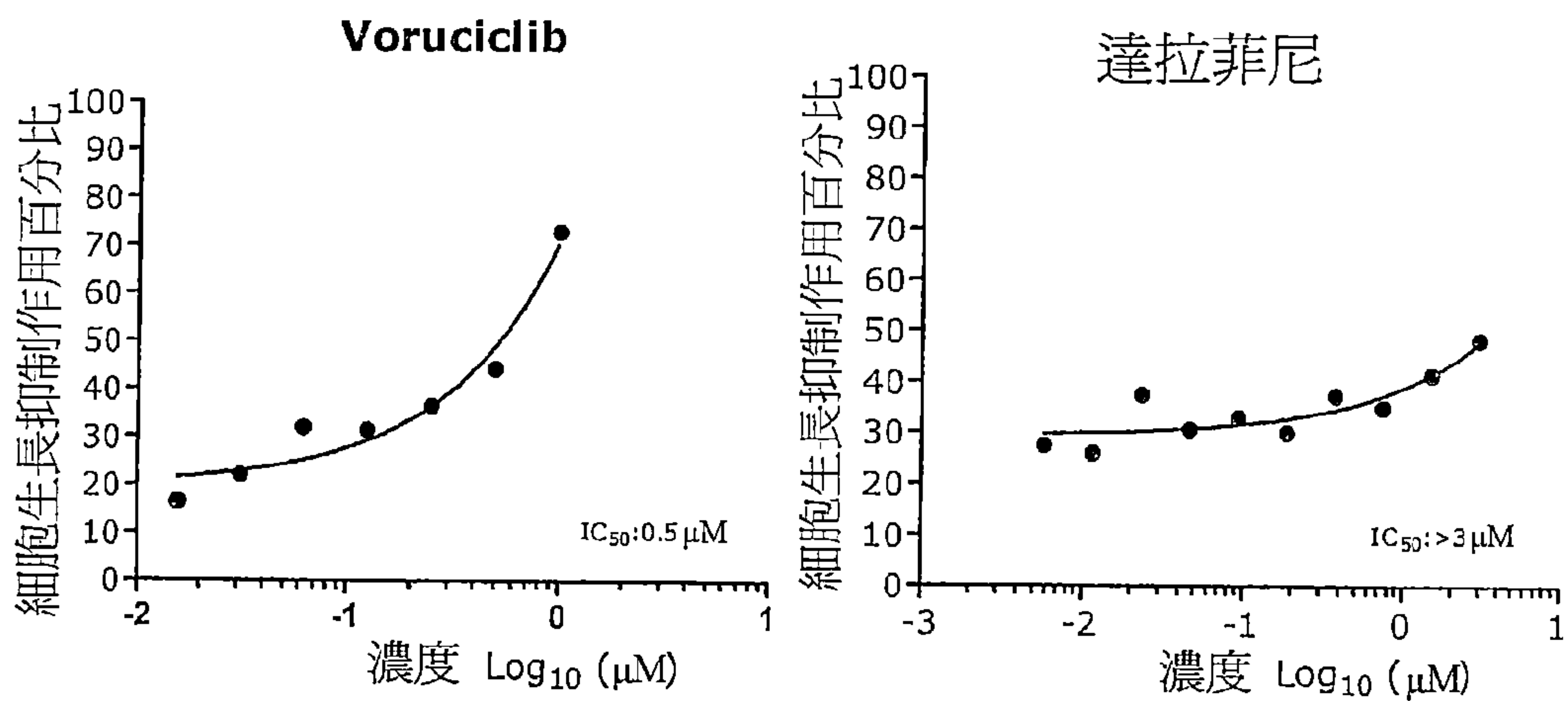


第10b圖

Voruciclib 及達拉菲尼
(A375R)
(68 組合點)

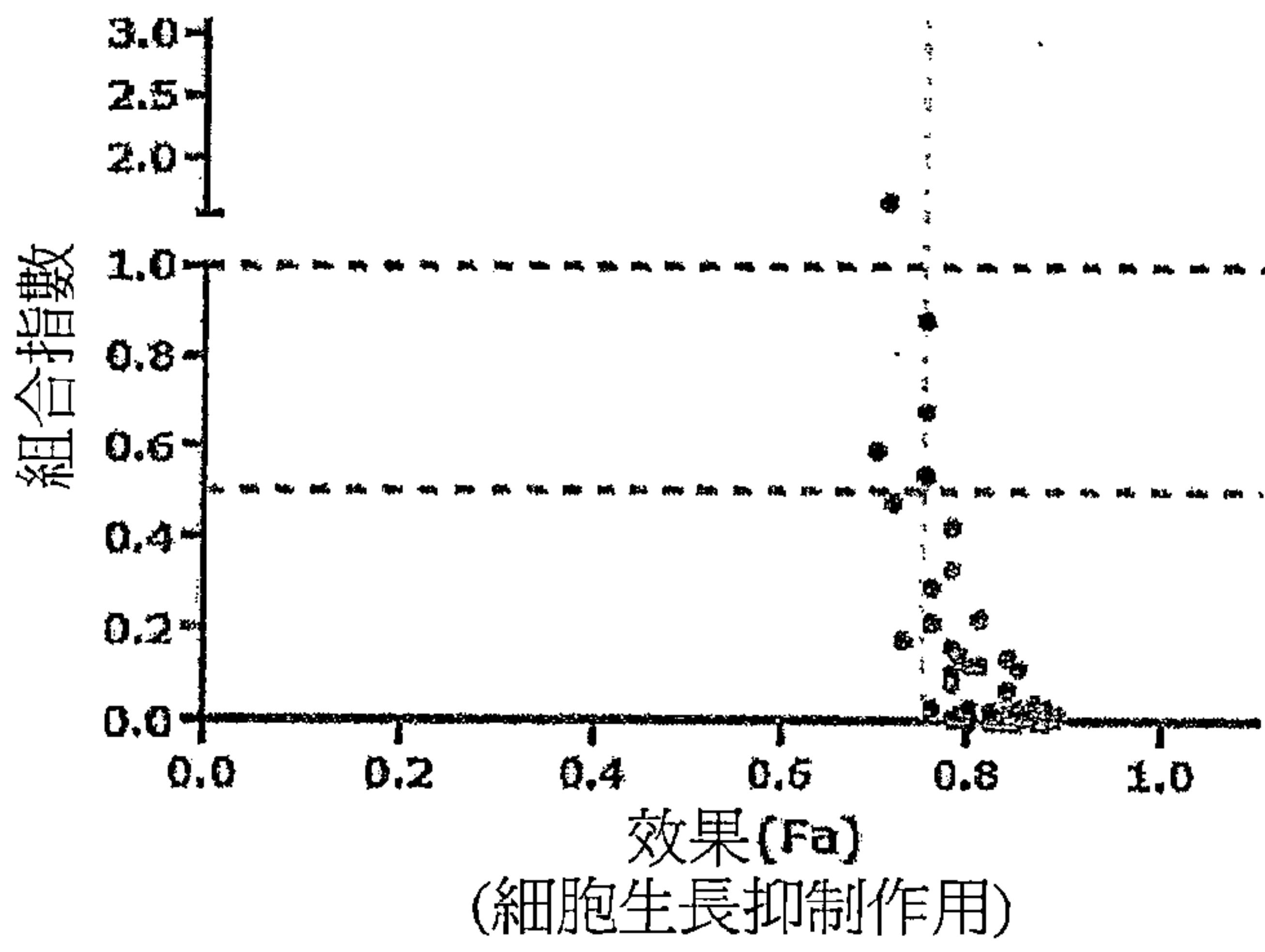


第11a圖

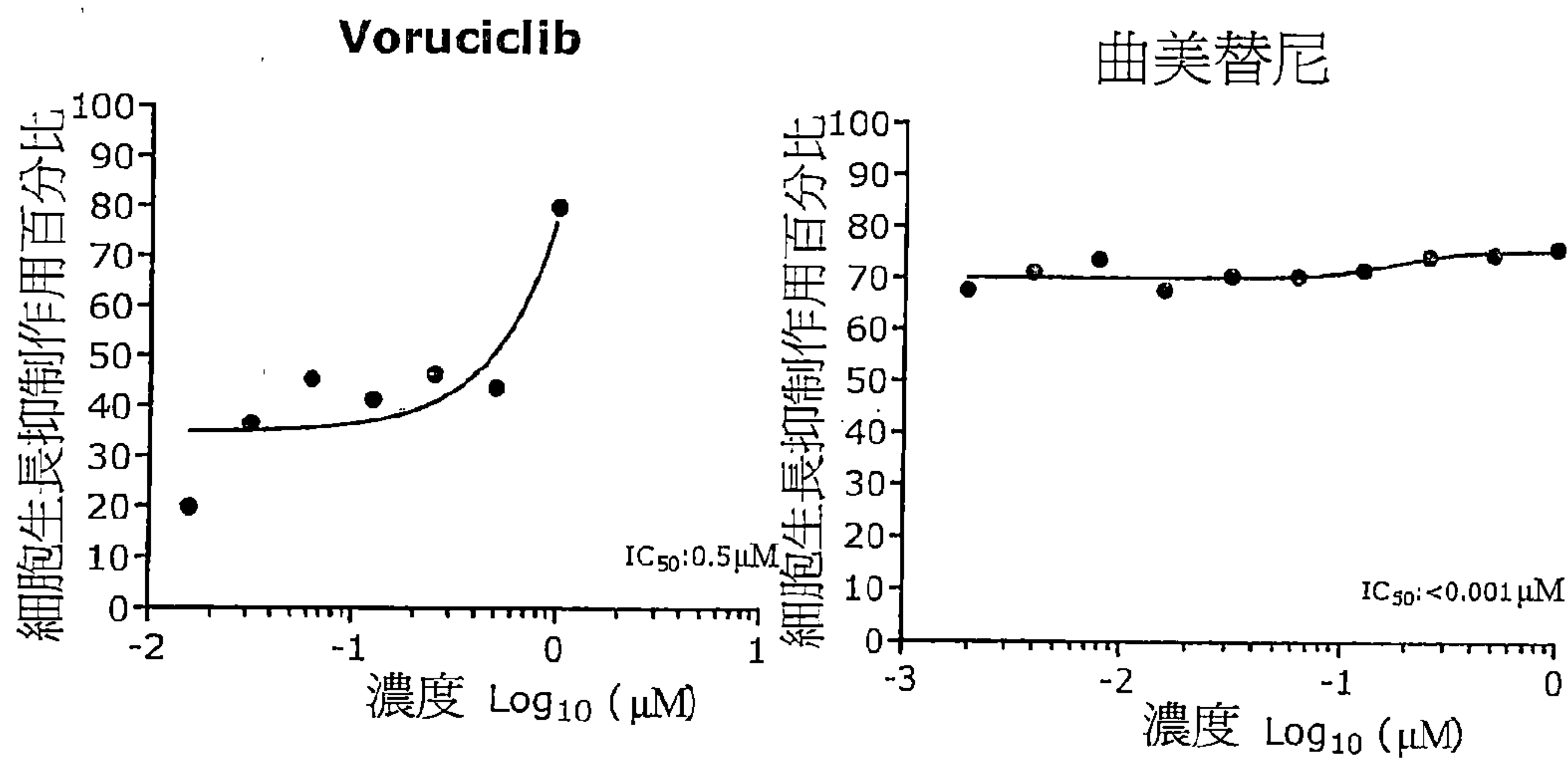


第11b圖

Voruciclib 及曲美替尼
(A375)
(68 組合點)

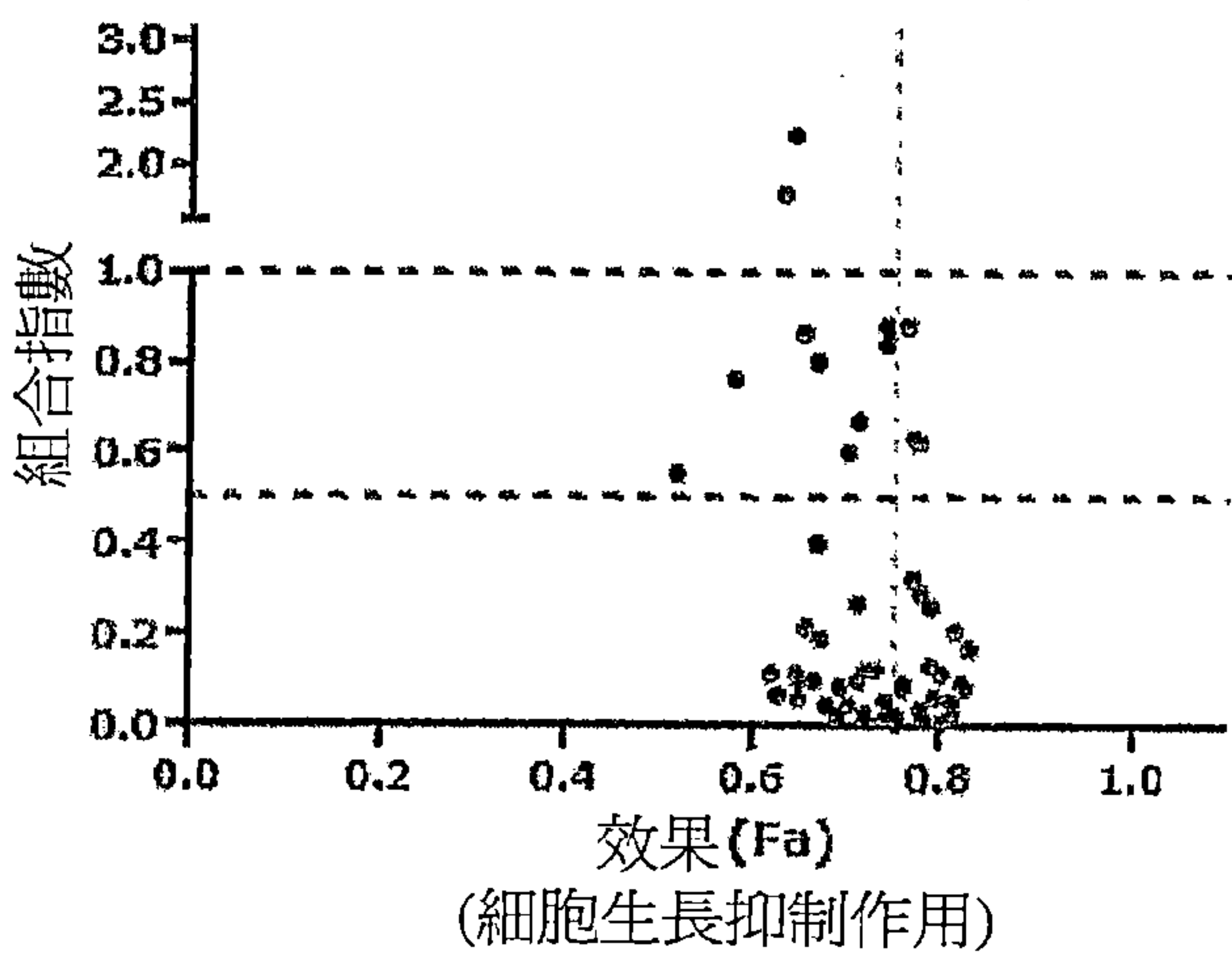


第12a圖

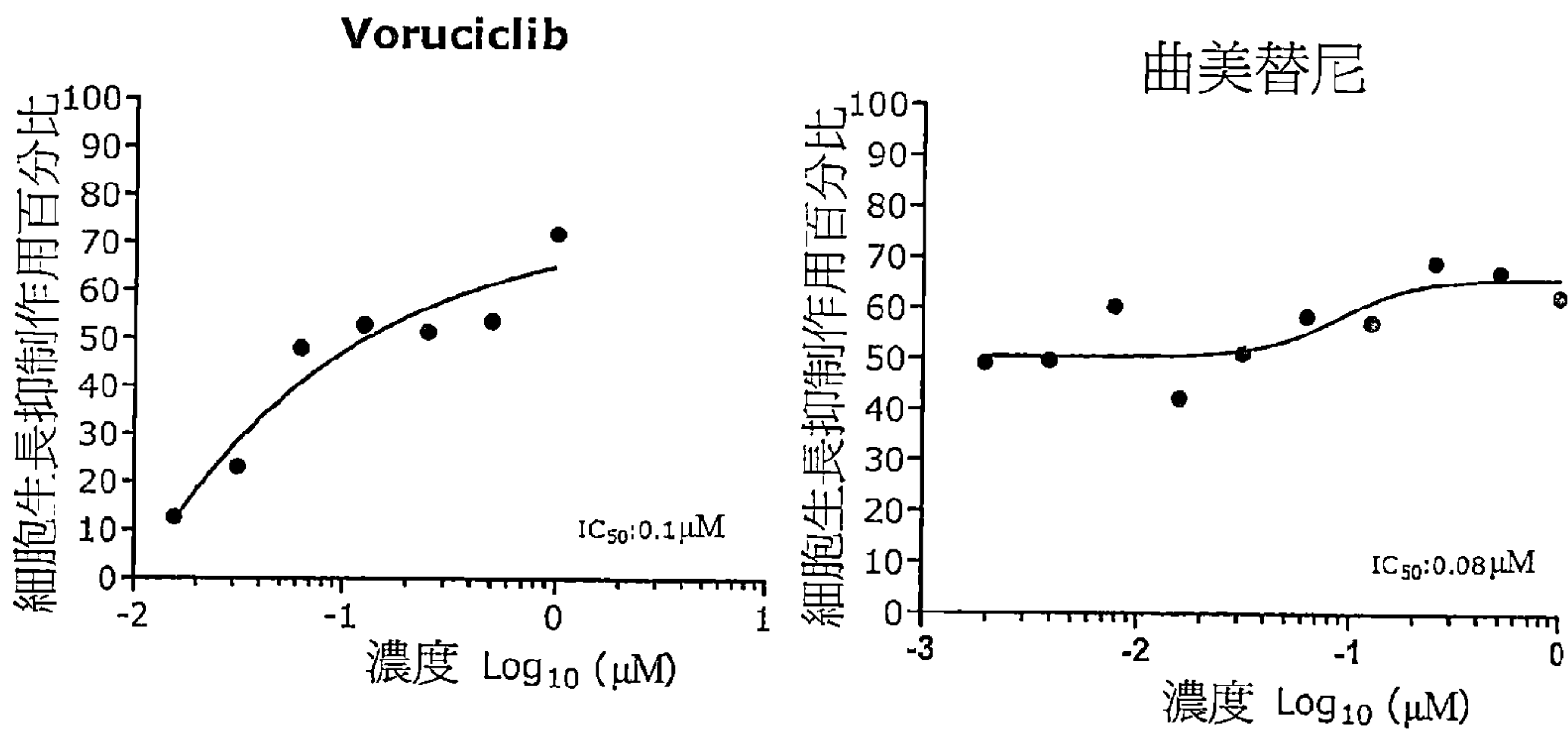


第12b圖

Voruciclib 及曲美替尼
(A375R)
(68 組合點)



第13a圖



第13b圖