



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I768087 B

(45) 公告日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 21 日

(21) 申請案號：107125442

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 07 月 24 日

(51) Int. Cl. : A61K31/40 (2006.01)

A61K31/519 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2017/07/24 美國

62/536,121

2017/07/25 歐洲專利局

17305998.1

(71) 申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72) 發明人：波爾波拉 蒙席夫 BOUABOULA, MONSIF (FR)；休馬利 梅蘇 SHOMALI,

MAYSOUN (US)；孫 方憲 SUN, FANGXIAN (US)

(74) 代理人：陳彥希；何愛文

(56) 參考文獻：

TW I737681B

CN 106924210A

審查人員：陳世芹

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：3 共 33 頁

(54) 名稱

包含帕博西尼(PALBOCICLIB)及 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸的組合

(57) 摘要

本申請提供帕博西尼和 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽的組合、含有所述組合的醫藥組合物及其治療用途，特別是用於治療癌症包括乳癌的用途。

Herein are provided a combination of palbociclib and of 6-(2,4-dichlorophenyl)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropyl)pyrrolidin-3-yl]oxyphenyl] -8,9-dihydro-7H-benzo[7]annulene-2-carboxylic acid or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a pharmaceutical composition containing such a combination, and the therapeutic uses thereof, in particular for the treatment of cancer, including breast cancer.

指定代表圖：

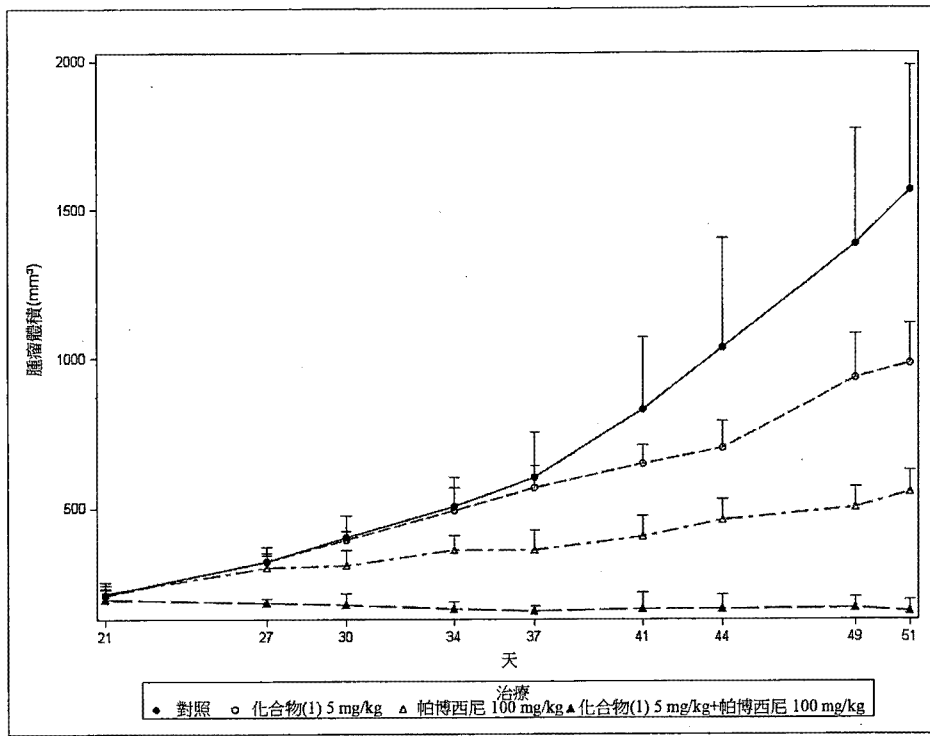


圖 2

發明摘要

【發明名稱】（中文/英文）

包含帕博西尼(PALBOCICLIB)及 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸的組合

COMBINATION COMPRISING PALBOCICLIB AND

6-(2,4-DICHLOROPHENYL)-5-[4-[(3S)-1-(3-FLUOROPROPYL)PYRROLIDIN-3-YL]OXYPHENYL]-8,9-DIHYDRO-7H-BENZO[7]ANNULENE-2-CARBOXYLIC ACID

【中文】

本申請提供帕博西尼和 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽的組合、含有所述組合的醫藥組合物及其治療用途，特別是用於治療癌症包括乳癌的用途。

【英文】

Herein are provided a combination of palbociclib and of 6-(2,4-dichlorophenyl)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropyl)pyrrolidin-3-yl]oxyphenyl]-8,9-dihydro-7H-benzo[7]annulene-2-carboxylic acid or a pharmaceutically acceptable salt thereof, a pharmaceutical composition containing such a combination, and the therapeutic uses thereof, in particular for the treatment of cancer, including breast cancer.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）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】：

無。

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)

包含帕博西尼(PALBOCICLIB)及 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸的組合

COMBINATION COMPRISING PALBOCICLIB AND

6-(2,4-DICHLOROPHENYL)-5-[4-[(3S)-1-(3-FLUOROPROPYL)PYRROLID

IN-3-YL]OXYPHENYL]-8,9-DIHYDRO-7H-BENZO[7]ANNULENE-2-

CARBOXYLIC ACID

【技術領域】

本申請案提供帕博西尼(palbociclib)和6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸的組合、含有所述組合的醫藥組合物，以及所述組合和醫藥組合物的治療用途，特別是用於治療癌症的用途。

【先前技術】

雌激素受體 α (ESR1)在大多數乳腺腫瘤中表現，使它們能夠對雌激素的促有絲分裂作用反應。

6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸，以下稱為“化合物(1)”，是一種選擇性雌激素受體降解劑(SERD)，其具有完全的雌激素受體拮抗劑性質並加速雌激素受體的蛋白酶體降解。該化合物揭露於以 WO 2017/140669 公開的專利申請案 PCT/EP2017/053282 中。

帕博西尼，又稱為 6-乙醯基-8-環戊基-5-甲基-2-[5-(1-哌啶基)吡啶-2-基胺基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮，是一種細胞周期蛋白依賴性激酶(CDK) 4

和 6 的抑制劑。帕博西尼以商品名 Ibrance[®]銷售，並且適用於與芳香酶抑制劑組合或與氟維司群(fulvestrant)組合治療已接受過先前內分泌治療的婦女的激素受體(HR)陽性、人表皮生長因子受體 2 (HER2)-陰性的局部晚期或轉移性乳癌。在停經前或停經期前後婦女，內分泌治療應與促黃體激素釋放激素(LHRH)激動劑組合。

總是需要尋找新的抗腫瘤治療方法。如今，已經顯示化合物(1)與帕博西尼的組合具有良好的耐受性，表現出強的抗腫瘤功效並誘導腫瘤消退，與單獨的每種活性成分相比具有協同效應。

【發明內容】

本申請案提供包含化合物(1)和帕博西尼的組合。

在本申請案提供的組合中，化合物(1)不僅可以兩性離子(即具有酸性基團和鹼性基團的整體中性分子)的形式存在，而且還可以與酸或鹼的加成鹽的形式存在。此等加成鹽可用於上述組合中。因此，本申請案提供包含化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼的組合。

在一個具體實施例中，化合物(1)或其藥學上可接受的鹽與帕博西尼的組合顯示出治療協同作用。如果與單獨的組合的任一活性劑的累積效果相比，組合的治療效果優異，則該組合顯示出治療協同作用。

在另一個具體實施例中，化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼藉由口服路徑投予。

本申請案還提供化合物(1)或其藥學上可接受的鹽與帕博西尼的組合，其用作藥物。

本申請案還提供醫藥組合物，其包含化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼，以及至少一種藥學上可接受的賦形劑。

該賦形劑選自熟習此項技術者已知的常規賦形劑。更特別地，該賦形

劑選自可用於以任何形式(液體溶液、分散液或懸浮液、片劑、膠囊等)口服投予的彼等賦形劑。

在另一個實施例中，化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼可以同時、分開或在一段時間內間隔(spaced out)投予(依序投予)。因此，本申請提供的組合不僅僅限於藉由單一醫藥組合物中的成分的物理結合而獲得的組合，還涉及允許分開投予者，其可同時或隨時間間隔(或“分散(spread out)”)投予。

本申請案還提供一種藥物套組，其包含：

(i)第一醫藥組合物，其包含化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和至少一種藥學上可接受的賦形劑；

(ii)第二醫藥組合物，其包含帕博西尼和至少一種藥學上可接受的賦形劑；

醫藥組合物(i)和(ii)兩者均在獨立的隔室中並且旨在獨立投予，各自與另一者同時、分開或隨時間分散(依序)投予。

在上述組合、醫藥組合物和藥物套組中，化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼有利地以考慮到所治療的病理學和給予患者的病症而適用的有效劑量存在。特別是對於帕博西尼，成人患者的癌症治療的推薦起始劑量是 125 mg，每天一次，持續 21 天，然後是 7 天停止治療，以及基於個體安全性和耐受性的劑量中斷和/或劑量減少。

本申請案還提供包含化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼的組合，以及如上所述的醫藥組合物和套組，其用於治療癌症。

本申請案還提供化合物(1)或其藥學上可接受的鹽，其藉由與帕博西尼共同投予用於治療癌症。

本申請案還提供帕博西尼，其藉由與化合物(1)或其藥學上可接受的鹽

共同投予用於治療癌症。

在另一個具體實施例中，該癌症是激素依賴性癌症。

在另一個具體實施例中，該癌症是雌激素受體依賴性癌症，特別是該癌症是雌激素受體 α 依賴性癌症。

在另一個具體實施例中，該癌症對抗激素治療具有抗性。

在另一個具體實施例中，該癌症是具有野生型雌激素受體的癌症。

在另一個具體實施例中，該癌症是具有雌激素受體失調功能的癌症，該失調功能涉及但不限於雌激素受體的至少一種表觀遺傳和遺傳改變，諸如突變、擴增、剪接變體。

在另一個具體實施例中，該癌症是具有突變的雌激素受體的癌症。

在另一個具體實施例中，該雌激素受體的突變可包括但不限於新的或已知的突變，諸如 Leu536Arg、Tyr537Ser、Tyr537Asn 或 Asp538Gly。

在另一個具體實施例中，該癌症是雌激素敏感性癌症。

在另一個具體實施例中，該癌症是乳癌，更特別是雌激素受體陽性乳癌(ER α 陽性乳癌)或其轉移，諸如腦轉移。

本申請案還提供治療上述病理狀況，特別是乳癌的方法，包括向有此需要的個體投予治療有效量的化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和治療有效量的帕博西尼。

本申請案還提供治療上述病理狀況，特別是乳癌的方法，包括向有此需要的個體投予如上所述的醫藥組合物。

本申請案還提供治療上述病理狀況，特別是乳癌的方法，包括向有此需要的個體投予如上所述的組合。

本申請案還提供治療上述病理狀況，特別是乳癌的方法，包括向有此需要的個體共同投予化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼。

本申請案還提供治療上述病理狀況，特別是乳癌的方法，包括向有此需要的個體共同投予帕博西尼和化合物(1)或其藥學上可接受的鹽。

在上述方法的一個實施例中，該個體是人。

本申請案還提供包含化合物(1)或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼的組合，用於製備可用於治療上述病理狀況，特別是乳癌的藥物。

本申請案還提供化合物(1)或其藥學上可接受的鹽在製備用於藉由與帕博西尼共同投予治療上述病理狀況，特別是乳癌的藥物中的用途。

本申請案還提供帕博西尼在製備用於藉由與化合物(1)或其藥學上可接受的鹽共同投予治療上述病理狀況，特別是乳癌的藥物中的用途。

本申請案還提供一種製品、包裝或投予單元，其包含：

- 包裝材料；
- 上述組合、醫藥組合物或藥物套組；和
- 包含在所述包裝材料內的仿單或包裝說明書，表明向患者投予所述組合、醫藥組合物或藥物套組以治療癌症。

以下實施例顯示如何合成化合物(1)，以及用化合物(1)、帕博西尼及其組合對小鼠乳癌細胞系異種移植物獲得的藥理學結果。

【實施方式】

1 - 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸的合成

以下再現了專利申請案 WO 2017/140669 中描述的 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸 (化合物(1))的實驗反應圖及其分析資料。合成化合物(1)的合成反應圖見圖 1。

¹H NMR 譜在 Bruker Avance DRX-400 光譜儀上進行，在溶劑二甲基亞

氫-d6 (d6-DMSO)中化學位移(以 ppm 計的 δ)在 303 K 溫度的參考值為 2.5 ppm。偶合常數(J)以赫茲(Hertz)給出。

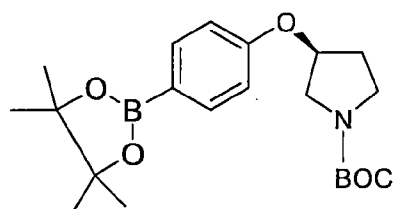
液相層析/質譜(LC/MS)如下獲得：在 UPLC Acquity Waters 儀器，光散射偵測器 Sedere 和 SQD Waters 質譜儀上，使用 UV 偵測 DAD 210<l<400 nm 和柱 Acquity UPLC CSH C18 1.7 μm ，尺寸 2.1x30 mm，移動相 $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{HCO}_2\text{H} / \text{CH}_3\text{CN} + 0,1\% \text{HCO}_2\text{H}$ 。

使用以下縮寫和經驗式：

AcOEt	乙酸乙酯
AlCl_3	三氯化鋁
Cs_2CO_3	碳酸銫
DCM	二氯甲烷
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲醯胺
DMSO	二甲基亞砷
HCl	氯化氫
K_2CO_3	碳酸鉀
LC/MS	液相層析/質譜
MeOH	甲醇
MgSO_4	硫酸鎂
NaHCO_3	碳酸氫鈉
NaOH	氫氧化鈉
$\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$	1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯化鈣(II)
Ph_3P 或 $\text{P}(\text{Ph})_3$	三苯基膦
$\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$	三苯基氧膦
$^\circ\text{C}$	攝氏度

ml	毫升
mmol	毫莫耳
μmol	微莫耳
μM	微莫耳濃度
nM	納莫耳濃度
ppm	百萬分之一

中間物(c). (3S)-3-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基]吡咯啉-1-甲酸三級丁酯

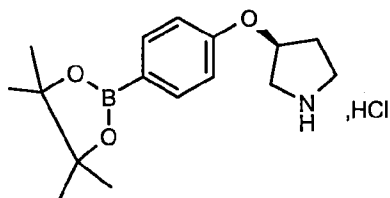


在氬氣下，向市售 4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯酚(a) (82.7 g, 364.51 mmol)於 THF (2 L)中的溶液中添加(R)-1-N-Boc-3-羥基吡咯啉(b) (84.43 g, 437.41 mmol)，然後添加 N,N,N',N'-四甲基偶氮二甲醯胺(99.1 g, 546.77 mmol)。澄清的反應混合物變為橙色，添加三苯基膦(143.41 g, 546.77 mmol)。將反應混合物在室溫攪拌 24 小時，同時形成的三苯基氧化膦沉澱($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$)。將反應混合物倒入水(1.5 L)中並用乙酸乙酯(AcOEt) (3x1.5 L)萃取。將收集的有機相以硫酸鎂(MgSO_4)乾燥，過濾並減壓濃縮。將殘餘物溶於二異丙醚(1.5 L)中，過濾形成的固體($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$)。減壓濃縮溶劑，殘餘物藉由用庚烷與 AcOEt (90/10; v/v)的混合物溶離的柱層析純化，得到 145 g (100%)的(3S)-3-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基]吡咯啉-1-甲酸三級丁酯(c)，其為無色油狀物。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 1.27 (s : 12H); 1.39 (s : 9H); 2.05 (m : 1H); 2.14 (m : 1H); 3.37 (3H); 3.55 (m : 1H); 5.05 (s : 1H); 6.94 (d, $J = 8.4$

Hz : 2H); 7.61 (d, J = 8.4 Hz : 2H)

中間物(d). (3S)-3-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基]吡咯啉鹽酸鹽

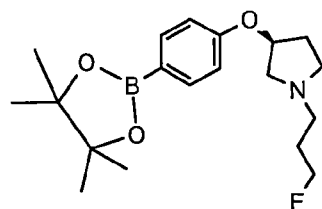


向(S)-3-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基)吡咯啉-1-甲酸三級丁酯(c) (80 g, 195.23 mmol)於MeOH (450 ml)中的溶液中緩慢添加 HCl 4N/二噁烷(250 ml)。1.5 小時後，減壓濃縮反應混合物並伴隨攪拌將殘餘物吸收於 Et₂O，得到固體，然後將該固體過濾並真空乾燥，得到 61.8 g (95%)的(3S)-3-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-yl)苯氧基]吡咯啉鹽酸鹽(d)，其為白色粉末。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 1.28 (s : 12H); 2.10 (m : 1H); 2.21 (m : 1H); 3.31 (3H); 3.48 (m : 1H); 5.19 (m : 1H); 6.97 (d, J = 8.4 Hz : 2H); 7.63 (d, J = 8.4 Hz : 2H); 9.48 (s : 1H); 9.71 (s : 1H)。

LC/MS (m/z, MH⁺): 290

中間物(e). (3S)-1-(3-氟丙基)-3-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基]吡咯啉



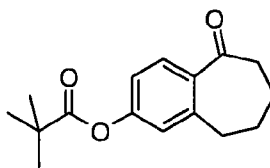
在氫氣下，向(S)-3-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基)吡咯啉鹽酸鹽(d) (20 g, 61.42 mmol)於乙腈(100 ml)中的懸浮液中添加 K₂CO₃ (21.22 g, 153.54 mmol)和 1-碘-3-氟丙烷(12.15 g, 61.42 mmol)。將反應混合物

在 40°C 攪拌 24 小時。冷卻至室溫後，過濾反應混合物並用乙腈洗滌。減壓濃縮濾液，將殘餘物吸收於 DCM，過濾形成的固體並用 DCM 洗滌。濃縮濾液，得到 21.5 g (100%) 的 (3S)-1-(3-氟丙基)-3-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基]吡咯啉(e)，其為黃色泡沫狀物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 1.27 (s : 12H); 1.77 (m : 2H); 1.84 (m : 1H); 2.27 (m : 1H); 2.41 (m : 1H); 2.49 (2H); 2.62 (dd, $J = 2.6$ and 10.4 Hz : 1H); 2.69 (m : 1H); 2.83 (dd, $J = 6.2$ and 10.4 Hz : 1H); 4.47 (td, $J = 6.2$ and 47 Hz : 2H); 4.99 (m : 1H); 6.77 (d, $J = 8.4$ Hz : 2H); 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz : 2H)。

LC/MS (m/z , MH^+): 350

中間物(B). 2,2-二甲基丙酸 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-基酯



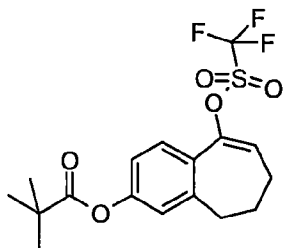
向 2-羥基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-5-酮(A) (1.52 g, 8.63 mmol) 於丙酮 (60 ml) 中的溶液中添加 K_2CO_3 (1.19 g, 8.63 mmol) 和特戊醯氯 (1.06 ml, 8.63 mmol)。將反應混合物在室溫攪拌 16 小時，過濾並減壓濃縮。藉由用庚烷/AcOEt (100/0 至 85/15, v/v) 的梯度溶離的快速層析法純化殘餘物，得到 1.55 g (69%) 的 2,2-二甲基丙酸 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-基酯(B)，其為無色油狀物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 7.65 (d, 1H); 7.10-7.04 (m, 2H); 2.95 (t, 2H); 2.68 (t, 2H); 1.85-1.65 (m, 4H)。

LC/MS (m/z , MH^+): 261

中間物(C). 2,2-二甲基丙酸 9-(三氟甲磺醯基氧基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯

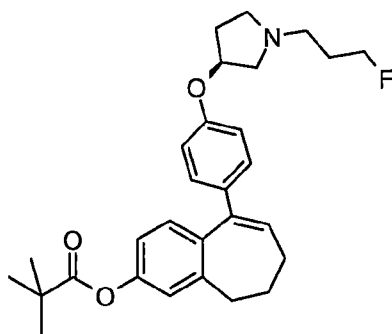
-3-基酯



在氬氣下，向 2,2-二甲基丙酸 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-基酯(**B**) (15 g, 57.62 mmol)於 DCM (500 ml)中的溶液中逐滴添加吡啶(7.28 ml, 86.43 mmol)和三氟甲磺酸酐(19.58 ml, 115.24 mmol)。將反應混合物在室溫攪拌 2 小時並添加冰(200 g)。分離各相，水相用 DCM 洗滌，收集的有機相以 $MgSO_4$ 乾燥，過濾並減壓蒸發，得到 22 g (97%)的 2,2-二甲基丙酸 9-(三氟甲磺酰基氧基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯(**C**)，其為白色固體。

LC/MS (m/z, MH⁻): 391

中間物(**D**)，2,2-二甲基丙酸 9-(4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯

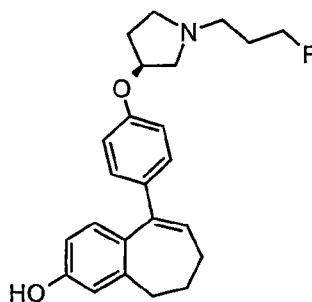


在氬氣下，向 2,2-二甲基丙酸 9-(三氟甲磺酰基氧基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯(**C**) (22 g, 56.07 mmol)和(3S)-1-(3-氟丙基)-3-[4-(四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基]吡咯啉(**e**) (20.56 g, 58.87 mmol)於二噁烷(420 ml)和水(120 ml)中的溶液中添加 $Pd(dppf)Cl_2$ (2.75 g, 3.36 mmol)和 Cs_2CO_3 (36.57 g, 112.13 mmol)。將反應混合物在室溫攪拌 1 小時，並在水和 DCM 之間分配。將水相用 DCM 洗滌，將收集的有機相經 $MgSO_4$ 乾燥，過

濾並減壓濃縮。藉由用 MeOH/DCM 的梯度(0 至 5%; V/V)溶離的柱層析純化殘餘物，得到 31 g (100%)的 2,2-二甲基丙酸 9-(4-[[[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基}苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯(D)。

LC/MS (m/z, MH⁺): 466

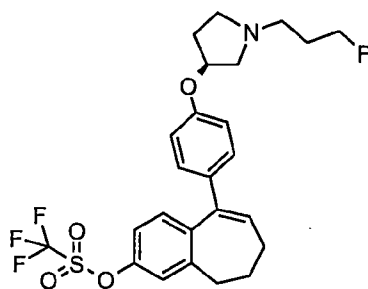
中間物(E). 9-(4-[[[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基}苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-醇



在氫氣下，向 2,2-二甲基丙酸 9-(4-[[[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基}苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯(D) (24.8 g, 53.26 mmol)於 MeOH (300 ml)中的溶液中添加 NaOH 5M (23 ml, 115.00 mmol)。將反應混合物在室溫攪拌 2 小時。然後藉由添加 6N HCl 水溶液將 pH 調節至 7。減壓濃縮 MeOH，然後添加 DCM。將有機相以 MgSO₄ 乾燥，減壓濃縮。藉由用 DCM/MeOH 的梯度(100/0 至 95/05)溶離的快速層析純化殘餘物，得到 18.8 g (93%)的 9-(4-[[[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基}苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-醇(E)，其為黃褐色固體。

LC/MS (m/z, MH⁺): 382

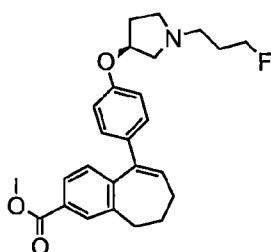
中間物(F).三氟甲磺酸 9-(4-[[[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基}苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯



在氫氣下，向 9-(4-((3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基)氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-醇(E) (20.6 g, 54.00 mmol)於 DCM (200 ml)和吡啶(6.55 ml, 81.00 mmol)中經冷卻至 5°C (冰浴)的溶液中逐滴添加三氟甲磺酸酐 (18.93 ml, 108.00 mmol)，並將反應溫度保持在<15°C。移去冰浴，將棕色懸浮液在室溫攪拌 2 小時。添加冰(200 g)和 DCM (200 ml)並分離各相。將有機相以 MgSO₄ 乾燥，減壓濃縮。藉由用的 DCM/MeOH 的梯度(100/0 至 95/05)溶離的快速層析純化殘餘物，得到 24.7 g (89.1%)的三氟甲磺酸 9-(4-((3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基)氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯(F)，其為棕色油狀物。

LC/MS (m/z, MH⁺): 514

中間物(G). 9-(4-((3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基)氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯

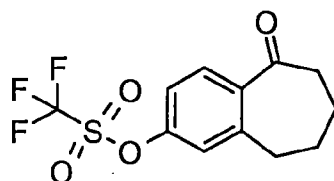


向三氟甲磺酸 9-(4-((3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基)氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-基酯(F) (10.1 g, 19.67 mmol)於 DMF (66 ml)和 MeOH (33 ml)的溶液中添加 Pd(dppf)Cl₂ (909 mg, 1.18 mmol)和二異丙基乙基胺 (7.21 ml)。將黑色懸浮液在高壓釜中在 70°C 在 5 巴 CO 下羰基化 5 小時。過濾反應混合物，然後在減壓下部分濃縮濾液。將殘餘物在 AcOEt 和水之間

分配。將有機相用水(2x 100 ml)洗滌，以 MgSO_4 乾燥，減壓濃縮。藉由用 DCM/MeOH 的梯度(100/0 至 95/05)溶離的快速層析純化殘餘物，得到 7.13 g (86%)的 9-(4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基}苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯(G)，其為棕色膠狀物。

LC/MS (m/z, MH^+): 424

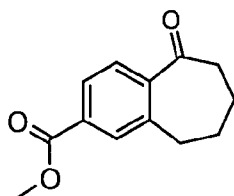
中間物(A1). 三氟甲磺酸 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-基酯



在氫氣下，向市售 2-羥基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-5-酮(A) (18.5 g, 105 mmol)於 DCM (185 ml)和二甲基吡啶(13.35 ml, 113.505 mmol)中在 5°C 冷却的溶液中逐滴添加三氟甲磺酸酐(20.22 ml, 123.29 mmol)，同時保持溫度在 10 至 20°C。將反應混合物在 5°C 攪拌 1 小時，然後在室溫攪拌 1 小時。然後，添加冰(200 g)並將漿液在水和 DCM 之間分配。用 NaHCO_3 水溶液洗滌有機相，以 MgSO_4 乾燥，濾出並減壓濃縮。藉由用庚烷/AcOEt 的梯度(100 至 90/10)溶離的快速層析純化殘餘物，得到 28.2 g (87%)的三氟甲磺酸 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-基酯(A1)，其為橙色油狀物。

LC/MS (m/z, MH^+): 309

中間物(B1). 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-甲酸甲酯

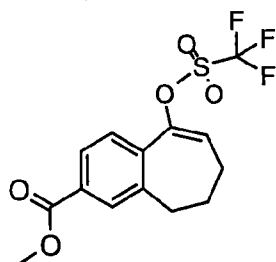


向三氟甲磺酸 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-基酯(A1) (5.03 g, 16.32 mmol)於 DMF (24 ml)和 MeOH (12 ml)的溶液中添加 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (754 mg, 0.98 mmol)和二異丙基乙基胺(6 ml)。將黑色懸浮液在高壓釜中在

70°C 在 5 巴 CO 下羰基化 2.5 小時。過濾反應混合物，然後在減壓下部分濃縮濾液，並將殘餘物在 AcOEt 和水之間分配。將有機相用水(2x 75 ml)和 0.5 N HCl 水溶液洗滌，以 MgSO₄ 乾燥並減壓濃縮。藉由用庚烷/AcOEt 的梯度 (100/0 至 90/10) 溶離的快速層析純化殘餘物，得到 3.4 g (95%) 的 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-甲酸甲酯(**B1**)，其為無色油狀物。

LC/MS (m/z, MH⁺): 219

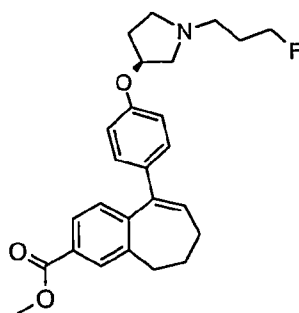
中間物(**C1**). 9-(三氟甲磺醯基氧基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯



在氫氣下，向 5-側氧基-6,7,8,9-四氫-5H-苯并[7]輪烯-2-甲酸甲酯(**B1**) (18.19 g, 83.34 mmol) 於 DCM (500 ml) 和無水吡啶(11 ml, 130.56 mmol) 中在 5°C 冷卻的溶液中逐滴添加三氟甲磺酸酐(30 ml, 176.54 mmol)。將濃稠懸浮液的反應混合物在室溫攪拌 24 小時，然後添加冰並在水和 DCM 之間分配。將有機相以 MgSO₄ 乾燥，濾出并減壓濃縮，得到 29 g (100%) 的 9-(三氟甲磺醯基氧基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯(**C1**)，其為黃色膠狀物。

LC/MS (m/z, MH⁺): 351

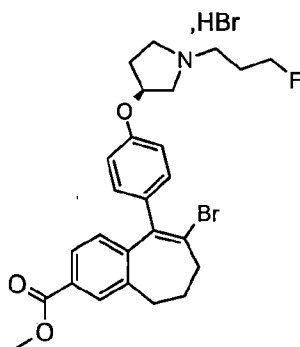
中間物(**G**). 9-(4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯



在氫氣下，向 9-(三氟甲磺酰基氧基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯(**C1**) (29 g, 82.9 mmol)、(3S)-1-(3-氟丙基)-3-[4-(四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基)苯氧基]吡咯啉(**e**) (28.9 g, 82.9 mmol)於二噁烷(225 ml)中溶液中添加與 DCM 絡合的 Pd(dppf)Cl₂ (3.73 g, 4.57 mmol)和 1.5 M Cs₂CO₃ 水溶液(111.12 ml, 166.68 mmol)。將反應混合物在 60°C 攪拌 1 小時。冷卻至室溫後，將反應混合物倒入水(500 ml)和 AcOEt (400ml)的混合物中。將有機相用鹽水洗滌，以 MgSO₄ 乾燥，在矽藻土上過濾並減壓濃縮。藉由用 DCM/MeOH 的梯度(100/0 至 95/05)溶離的快速層析純化殘餘物，得到 23 g (65%)的 9-(4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯(**G**)，其為棕色膠狀物。

LC/MS (m/z, MH⁺): 424

中間物(**H**). 8-溴-9-(4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯氫溴酸鹽

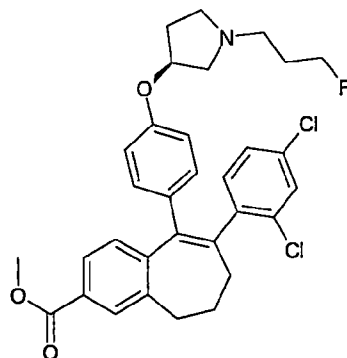


在氫氣下，向 9-(4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯(**G**) (13.93 g, 32.89 mmol)於 DCM (150 ml)中的溶液中添加三溴化吡啶鎊(15.78 g, 44.41 mmol)。將反應混合物在室溫攪拌 1 小時。添加水(200 ml)，然後將有機相以 MgSO₄ 乾燥，減壓濃縮。藉由用 DCM/MeOH 的梯度(100/0 至 95/05)溶離的快速層析純化殘餘物，得到 16.4 g (85%)的 8-溴-9-(4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基)苯基)-6,7-二氫-5H-

苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯氫溴酸鹽(**H**)，其為黃色酥脆物(meringue)。

LC/MS (m/z, MH⁺): 502

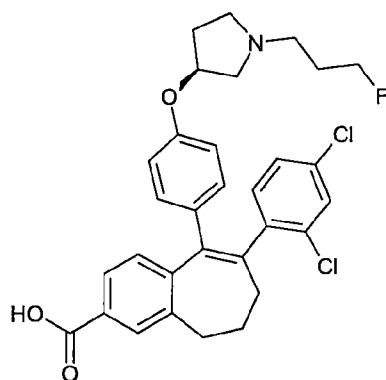
中間物(**I**). 6-(2,4-二氯-苯基)-5-{4-[1-(3-氟-丙基)-吡咯啉-3-基氧基]-苯基}-8,9-二氫-7H-苯并環庚烯-2-甲酸甲酯。



向 8-溴-9-(4-{[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基}苯基)-6,7-二氫-5H-苯并[7]輪烯-3-甲酸甲酯氫溴酸鹽(**H**) (150 mg, 298.56 μmol)於二噁烷(12 ml)和水(2 ml)中的溶液中添加 2,4-二氯苯基-硼酸(62.67 mg, 328.41 μmol)、Cs₂CO₃ (204.48 mg, 626.97 μmol)和 Pd(dppf)Cl₂ (14.63 mg, 17.91 μmol)。將反應混合物在 90°C 加熱 3 小時，並在 AcOEt 和水之間分配。分離各相，有機相用鹽水洗滌，以 MgSO₄ 乾燥並減壓濃縮。藉由用 DCM、乙腈和 MeOH 的混合物(96/2/2; V/V/V)溶離的柱層析純化殘餘物，得到 80 mg (47%)的 6-(2,4-二氯-苯基)-5-{4-[1-(3-氟-丙基)-吡咯啉-3-基氧基]-苯基}-8,9-二氫-7H-苯并環庚烯-2-甲酸甲酯(**I**)。

LC/MS (m/z, MH⁺): 568

化合物(**1**). 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸



向 6-(2,4-二氯-苯基)-5-{4-[1-(3-氟-丙基)-吡咯啉-3-基氧基]-苯基}-8,9-二氫-7H-苯并環庚烯-2-甲酸甲酯(I) (80 mg, 140.72 μmol)於 MeOH (5 ml)中的溶液中添加 NaOH 的溶液(562.88 μl , 5 M)並將反應混合物在 60°C 加熱 5 小時，減壓除去溶劑。將殘餘物溶於水(10 ml)中，添加 HCl 水溶液(5 M)至 pH 7。用 DCM 萃取漿液，以 MgSO_4 乾燥並減壓濃縮。藉由用 DCM、乙腈和 MeOH 的混合物(90/5/5; V/V/V)溶離的柱層析純化固體，得到 60 mg (77%) 的 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 1.68 (m, 1 H); 1.79 (dm, $J=25.3$ Hz, 2 H); 2.07 to 2.23 (m, 5 H); 2.38 (m, 1 H); 2.46 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H); 2.52 (m, 1 H); 2.62 (m, 1 H); 2.55 to 2.89 (m, 3 H); 4.47 (td, $J=6.2$ and 47.6 Hz, 2 H); 4.72 (m, 1 H); 6.63 (d, $J=8.9$ Hz, 2 H); 6.71 (m, 3 H); 7.18 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H); 8.26 (dd, $J=2.0$ and 8.4 Hz, 1 H); 7.58 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H); 7.63 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H); 7.79 (s, 1 H); 12.3 (m, 1 H)

LC/MS (m/z , MH^+): 554

2 – 評估 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸與帕博西尼的組合針對雌性裸鼠皮下乳癌細胞系異種移植物的功效

在本研究中，在針對雌性裸鼠皮下 MCF7-Y537S 人乳癌細胞系異種移

植物治療 30 天後，研究了 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸(“化合物(1)”)與細胞周期蛋白依賴性激酶 4 (CDK4)抑制劑帕博西尼的組合的抗腫瘤功效。

治療組包括單獨 5 mg/kg 的化合物(1)，單獨 100 mg/kg 的帕博西尼，以及相同劑量和反應圖的化合物(1)和帕博西尼的組合。

化合物(1)每天口服投予兩次(BID)，帕博西尼每天口服一次(QD)，持續 30 天。藉由腫瘤體積測量評價抗腫瘤功效。

2-1: 實驗操作

2-1-1: 動物、細胞系、化合物

雌性無胸腺裸鼠獲自 Harlan (Indianapolis, IN, USA)。在研究登記之前允許動物適應環境至少四天。小鼠為 12 至 13 周齡，在治療開始時稱重為 20.2 至 27.3 克。根據美國農業部實驗室動物福利法案(USDA Laboratory Animal Welfare Act)，在 NIH 實驗動物護理和使用指南(the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals)中概述的條件下飼養此等動物。

親代 MCF7 細胞獲自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC® HTB-22™)。MCF7-Y537S (ESR1)細胞系是表現由 Sanofi Biology Discovery Group 生成的 ER.Y537S 變體的 MCF7 細胞。藉由定點誘變(Toy W. *et al.*, *Cancer Discovery*, 2017, 7, 277-287)在 ESR1 構建體 (GenBank NM_000125.3)中引入 Y537S 突變。將構建體轉染到 MCF7 細胞中，選擇它們在不存在雌二醇的情況下生長。MCF-Y537S 是 ESR1 突變，其賦予 ER α (雌激素受體 α)雌激素非依賴性活性並且有助於內分泌抗性疾病(Robinson D.R. *et al.*, *Nat Genet.*, 2013, 45 (12), 1446-1451)。細胞在補充有 10%胎牛血清(FBS)、人胰島素的 Eagle 最低必需培養基(EMEM)中於 37°C 在 5% CO₂ 中生長。在 0.25%胰蛋白酶 EDTA 中收穫細胞，並用 Dulbecco

磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)洗滌，並用 50%基質膠(Becton Dickinson 目錄號 356234，批號 32277)再懸浮於 DPBS 中。將細胞(20×10^6 個細胞/小鼠)皮下(SC)植入雌性裸鼠的右脅腹。

當建立 MCF7-Y537S 腫瘤時，將腫瘤保留為用於片段植入的腫瘤原種(tumor stock)。腫瘤藉由碎片組織移植經皮下連續繁殖。將片段腫瘤組織皮下植入雌性裸鼠的右脅腹。在該實驗中分配了 50 隻小鼠。

化合物(1)和帕博西尼(可商購，以商品名 Ibrance[®]出售)如下配製：

- 媒劑 A：20% Labrasol[®] (由 Gattefosse SAS, France 提供)；
- 媒劑 B：5%葡萄糖。

在媒劑 A 中製備化合物(1)，然後添加 Solutol HS15(購自 Sigma)至終濃度 5%，將溶液攪拌 1 小時以完全溶解。之後，添加媒劑 B。最終 pH 為 5.5。

化合物(1)投予的劑量體積：10 ml/kg (口服灌喂)。

劑量：5 mg/kg (上述體積中化合物(1)的劑量)。

在媒劑 A 中製備帕博西尼，然後添加 Solutol HS15 至終濃度 5%，將溶液攪拌 1 小時以完全溶解。之後，添加媒劑 B。最終 pH 為 5.5。

劑量體積：10 ml/kg (口服灌喂)。

劑量：100 mg/kg (上述體積中帕博西尼的劑量)。

2-1-2：研究設計、終末點

彙集實驗所需的動物(加上額外的)並在第 0 天植入 MCF7-Y537S 腫瘤碎片組織。在植入後第 21 天，彙集小鼠並隨機分配至治療組和對照組(每組 10 隻小鼠)，其中每組的中位腫瘤體積範圍為 202.5 至 211.5 mm³。化合物(1)和帕博西尼的治療在第 22 天開始。化合物(1)以 5 mg/kg BID (間隔至少 5 小時)口服投予，帕博西尼以 100 mg/kg QD 口服投予，持續 30 天。每天評估動物體重。

劑量以 mg/kg 表示，並基於每隻動物的每天體重。媒劑處理的動物用作對照。每天檢查小鼠並記錄不良臨床反應。每天稱重個體小鼠直至實驗結束。當觀察到病態或體重減輕 $\geq 20\%$ 時，將對小鼠實施安樂死。每周兩次用卡尺測量腫瘤直至最後處死。當腫瘤大小達到約 2000 mm^3 或存在動物健康問題時(40%面積的腫瘤潰瘍)，將對動物實施安樂死並記錄死亡日期。從二維腫瘤測量估計實體腫瘤體積並根據以下等式計算：

$$\text{腫瘤體積 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{長度 (mm)} \times \text{寬度}^2 \text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

毒性終末點：

對於單個小鼠連續 3 天產生 15% 體重減輕、1 天內 20% 體重減輕或 10% 或更多與藥物相關的死亡的劑量被認為是過量毒性劑量，除非在某些情況下體重減輕或動物死亡可被認為是非藥物相關的。實例包括動物處理問題(諸如錯誤灌喂)、腫瘤模型相關問題(諸如腫瘤誘導的惡病質導致體重減輕，其可在對照或媒劑處理組中觀察到)和過度腫瘤潰瘍。具有非藥物相關死亡或顯著體重減輕的小鼠將不被視為毒性的並且將被排除在統計分析之外。動物體重包括腫瘤重量。

功效終末點：

主要功效終末點包括從基線開始的腫瘤體積變化，藉由治療組和對照組之間腫瘤體積變化的中值與基線的比率($\Delta T/\Delta C$)總結。藉由在指定觀察日從腫瘤體積中減去第一次治療當天(分期日)的腫瘤體積，計算每隻動物每個治療組(T)和對照組(C)的腫瘤體積變化。計算治療組的中值 ΔT ，並計算對照組的中值 ΔC 。計算 $\Delta T/\Delta C$ 比率並以百分比表示：

$$\Delta T / \Delta C = \left(\frac{\text{中值 } \Delta T}{\text{中值 } \Delta C} \right) \times 100$$

$\Delta T/\Delta C \leq 40\%$ 被認為是治療活性的， $\Delta T/\Delta C = 0\%$ 被認為是腫瘤停滯，

並且 $\Delta T/\Delta C < 0\%$ 被認為是腫瘤消退(非常有效)。 $\Delta T/\Delta C > 40\%$ 被認為是治療無效的。

腫瘤消退百分比定義為在特定觀察日與開始研究時的體積相比治療組中腫瘤體積減少的%(百分比)。在特定時間點(t)且對於每隻動物，消退百分比使用以下公式計算：

$$\% \text{消退}(t \text{ 時}) = \left(\frac{\text{體積}_{t_0} - \text{體積}_t}{\text{體積}_{t_0}} \right) \times 100$$

然後藉由獲取針對組中每隻動物計算的個體%消退值的中值來計算給定日期組的消退中值百分比。計算天數由計算 $\Delta T/\Delta C$ 的天數確定，除非中值消退百分比不代表該組的有效性。在這種情況下，天數由中值消退百分比最大的第一天確定。

2-1-3：統計學分析

對自基線的腫瘤體積變化進行具有因子治療和天數(重複)的雙因素方差分析(two-way Anova-Type analysis)。接著進行對比分析，使用 Bonferroni-Holm 校正多重性，將所有治療組與對照組進行比較，並在第 27 至 51 天每天的組合中所涉及的劑量比較組合與每種單一藥劑。

在圖中，表示每個測量日每組的中值和中值絕對偏差(MAD)。

在表中，報告每個測量日每組的中值和歸一化 MAD (nMAD = $1.4826 \times \text{MAD}$)。

藉由從指定觀察日的腫瘤體積中減去第一次治療當天(第 21 天)的腫瘤體積，計算每隻動物和每天自基線的腫瘤體積變化。

所有統計分析均使用 SAS 9.2 版軟體進行。小於 5% 的概率($p < 0.05$)被認為是顯著的。

2-2: 結果

化合物(1) 5 mg/kg BID、帕博西尼 100 mg/kg QD 以及化合物(1)和帕博

西尼的組合在劑量和反應圖中持續 30 天，在該研究中耐受良好，顯示在最低點(組中體重減輕的最低點)每組平均體重變化%分別為-1.7% (第 22 天)、-2.0% (第 22 天)和-6.4% (第 26 天)(表 1)。

化合物(1)以 5 mg/kg BID 的劑量持續 30 天對腫瘤生長的影響最小，在第 51 天 $\Delta T/\Delta C$ 值為 59% ($p = 0.4113$)。帕博西尼以 100 mg/kg QD 的劑量持續 30 天實現抗腫瘤功效，在第 51 天 $\Delta T/\Delta C$ 值為 27% ($p < 0.0001$)。當化合物(1)以 5 mg/kg 與帕博西尼 100 mg/kg 組合時，其中劑量反應圖為化合物(1) BID 和帕博西尼 QD，組合治療顯示出強的抗腫瘤功效，在第 51 天 $\Delta T/\Delta C$ 值小於 0 ($p < 0.0001$)並誘導腫瘤消退(中值腫瘤消退 32%)。統計分析表明，在第 51 天，與單獨的化合物(1)或單獨的帕博西尼相比，組合效果顯著不同 ($p < 0.0001$)。詳細結果顯示在下面的表 1、2 和 3，以及圖 2 和 3 中：

- 圖 2：化合物(1)與帕博西尼組合對裸鼠皮下人乳癌細胞系 MCF7-Y537S 異種移植物的抗腫瘤活性：腫瘤體積演變。曲線表示每組每天中值+或-MAD (中值絕對偏差)；

- 圖 3：化合物(1)與帕博西尼組合對裸鼠皮下人乳癌細胞系 MCF7-Y537S 異種移植物的抗腫瘤活性：在第 51 天自基線的腫瘤體積變化。點表示第 51 天自基線的個體腫瘤體積變化，條對應中值。

從該實驗中，我們得出結論，在裸鼠的 MCF7-Y537S 人乳癌細胞系異種移植模型中，化合物(1)以 5 mg/kg 每天兩次與 CDK4 抑制劑帕博西尼以 100 mg/kg 每天一次的組合誘導顯著的抗腫瘤功效和腫瘤消退，其優於單獨的單一藥物。

表 1：化合物(1)與帕博西尼的組合對裸鼠皮下 MCF7-Y537S 人乳癌異種移植植物的功效。

藥劑	路徑/ 劑量 (每次注射 以 mL/kg 計)	每次注射 以 mL/kg 計的劑量 (總劑量)	以計 天的 時間 表(總 計 30 天)	*計劃 外死 亡(死 亡日)	在最低 的組 %的 均重 化(最 低日)	最點 每以 計平 體變 化(最 低日)	在 51 以計 天% 的 $\Delta T/\Delta C$	在 51 天退 中 消的 值%	消退		在 47 天的 # p 值	生物學 解釋
									部分	完全		
媒劑	PO, BID (10)	-	-	0/10	-2.2 (22)	100	-	0/10	0/10	-	-	
化合物 (1)	PO, BID (10)	5 (295) N.B.	22 至 51	2/10	-1.7 (22)	59	NR	0/8	0/8	p = 0.4113	無效	
帕博西尼	PO, QD (10)	100 (3000)	22 至 51	0/10	-2.0 (22)	27	NR	0/10	0/10	p < 0.0001	有效	
化合物 (1) + 帕博西尼	PO, BID (10) + PO, QD (10)	5 (295) N.B. + 100 (3000)	22 至 51	1/10	-2.3 (26)	<0	32	2/9	0/9	p < 0.0001	非常有效	

PO：口服
N.B.：動物在開始日期接受一劑。
NR：沒有消退（0%消退）。
#統計學分析：每種單一藥劑和組合與對照組的比較。如下獲得 p 值：在用重複測量自基線的腫瘤體積變化進行雙因素方差分析後，使用 Bonferroni-Holm 調整多重性，使用對比分析以在每天比較每個治療組與對照。概率小於 5% (p<0.05)被認為是顯著的。
*3 隻小鼠被排除在統計分析之外，因為此等小鼠在研究期間對應於非藥物相關的死亡或終止。

表 2：化合物(1)與帕博西尼組合對裸鼠皮下人乳癌細胞系 MCF7-Y537S 異種移植模型的功效。每天比較每組與對照組。

自基線的腫瘤體積變化 mm ³ ：中值(nMAD)*, n 和 p 值 [#]									
治療組	總計	第 27 天	第 30 天	第 34 天	第 37 天	第 41 天	第 44 天	第 49 天	第 51 天
對照	-	111.5 (44.48) n=10	181.0 (78.58) n=10	296.0 (133.43) n=10	392.0 (235.73) n=10	663.0 (363.24) n=10	867.0 (456.64) n=10	1140.0 (615.28) n=10	1322.0 (633.07) n=10
化合物(1) 5 mg/kg	- 0.3975	114.0 (19.27) n=8	171.5 (31.13) n=8	270.5 (112.68) n=8	336.0 (112.68) n=8	440.0 (39.29) n=8	498.5 (91.18) n=8	727.5 (160.86) n=8	782.0 (112.68) n=8
帕博西尼 100 mg/kg	- <0.0001	68.5 (31.88) n=10	98.0 (25.20) n=10	121.5 (34.10) n=10	132.0 (31.88) n=10	193.5 (52.63) n=10	249.5 (43.74) n=10	298.5 (97.11) n=10	363.5 (108.23) n=10
化合物(1) 5 mg/kg + 帕博西尼 100 mg/kg	- <0.0001	-8.0 (63.75) n=9	-17.0 (97.85) n=9	-35.0 (74.13) n=9	-30.0 (57.82) n=9	-43.0 (60.79) n=9	-63.0 (45.96) n=9	-53.0 (72.65) n=9	-52.0 (72.65) n=9

[#]對自基線的腫瘤體積變化進行雙因素方差分析後，使用 Bonferroni-Holm 調整多重性，用每天與對照對比分析獲得 p 值。

* MAD=中值絕對偏差；nMAD =歸一化的 MAD；nMAD = 1.4826*MAD。

對於 100 mg/kg 的帕博西尼，從第 30 天到第 51 天，與對照組相比，對自基線的腫瘤體積變化的影響是顯著的。

對於 5 mg/kg 化合物(1)+100 mg/kg 帕博西尼的組合，從第 27 天至第 51 天，與對照組相比，對自基線的腫瘤體積變化的影響是顯著的。

n =動物數量。從統計分析中排除 3 隻小鼠，因為此等小鼠在研究期間對應於非藥物相關的死亡或終止。

表 3：化合物(1)與帕博西尼的組合對裸鼠皮下人乳癌細胞系 MCF7-Y537S 異種移植模型的功效。每天將作為單一藥劑化合物(1) 5 mg/kg 和帕博西尼 100 mg/kg 與組合進行比較。

自基線的腫瘤體積變化 mm ³ ：中值(nMAD)*, n 和 p 值 [#]									
治療組	總計	第 27 天	第 30 天	第 34 天	第 37 天	第 41 天	第 44 天	第 49 天	第 51 天
化合物(1) 5 mg/kg + 帕博西尼 100 mg/kg	-	-8.0 (63.75) n=9	-17.0 (97.85) n=9	-35.0 (74.13) n=9	-30.0 (57.82) n=9	-43.0 (60.79) n=9	-63.0 (45.96) n=9	-53.0 (72.65) n=9	-52.0 (72.65) n=9
帕博西尼 100 mg/kg	-	68.5 (31.88) n=10	98.0 (25.20) n=10	121.5 (34.10) n=10	132.0 (31.88) n=10	193.5 (52.63) n=10	249.5 (43.74) n=10	298.5 (97.11) n=10	363.5 (108.23) n=10
	<0.0001	0.2417	0.0736	0.0026	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
化合物(1) 5 mg/kg	-	114.0 (19.27) n=8	171.5 (31.13) n=8	270.5 (112.68) n=8	336.0 (112.68) n=8	440.0 (39.29) n=8	498.5 (91.18) n=8	727.5 (160.86) n=8	782.0 (112.68) n=8
	<0.0001	0.0342	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

[#]對自基線的腫瘤體積變化進行雙因素方差分析後，使用 Bonferroni-Holm 調整多重性，藉由對比分析獲得的 p 值，以在組合中涉及的劑量每天比較化合物(1)和帕博西尼的組合與每種單一藥劑。

* MAD=中值絕對偏差；nMAD =歸一化的 MAD；nMAD = 1.4826*MAD。

在第 34 天至第 51 天，5 mg/kg 化合物(1)+100 mg/kg 帕博西尼的組合的效果顯著大於單獨 100 mg/kg 帕博西尼的效果。

在第 34 天至第 51 天，5 mg/kg 化合物(1)+100 mg/kg 帕博西尼的組合的效果顯著大於單獨 5 mg/kg 化合物(1)的效果。

n =動物數量。從統計分析中排除 3 隻小鼠，因為此等小鼠在研究期間對應於非藥物相關的死亡或終止。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】 無

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】 (請換頁單獨記載)

無

申請專利範圍

1. 一種組合，其包含 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼(palbociclib)。
2. 如請求項 1 的組合，其顯示出治療協同作用。
3. 如請求項 1 或 2 的組合，其用於治療癌症。
4. 如請求項 3 的組合，其中所述癌症是乳癌。
5. 一種醫藥組合物，其包含 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼，以及至少一種藥學上可接受的賦形劑。
6. 如請求項 1 的組合，其中 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽和帕博西尼同時、分開或在一段時間內間隔投予。
7. 如請求項 5 的醫藥組合物或如請求項 6 的組合，其用於治療癌症。
8. 如請求項 7 的醫藥組合物或如請求項 7 的組合，其中所述癌症是乳癌。
9. 一種化合物 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽的用途，其用於製備與帕博西尼組合以治療癌症之藥物。
10. 如請求項 9 的用途，其中化合物 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽係與帕博西尼組合，在同時、分開或在一段時間內間隔投予。
11. 一種帕博西尼的用途，其用於製備與化合物 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯

-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽組合以治療癌症之藥物。

12. 如請求項 11 的用途，其中帕博西尼係與 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽組合，在同時、分開或在一段時間內間隔投予。

13. 一種藥物套組，其包含：

(i) 第一醫藥組合物，其包含 6-(2,4-二氯苯基)-5-[4-[(3S)-1-(3-氟丙基)吡咯啉-3-基]氧基苯基]-8,9-二氫-7H-苯并[7]輪烯-2-甲酸或其藥學上可接受的鹽和至少一種藥學上可接受的賦形劑；

(ii) 第二醫藥組合物，其包含帕博西尼和至少一種藥學上可接受的賦形劑；

醫藥組合物(i)和(ii)兩者均在分開的隔室中並且旨在獨立投予，各自與另一者同時、分開或隨時間分散投予。

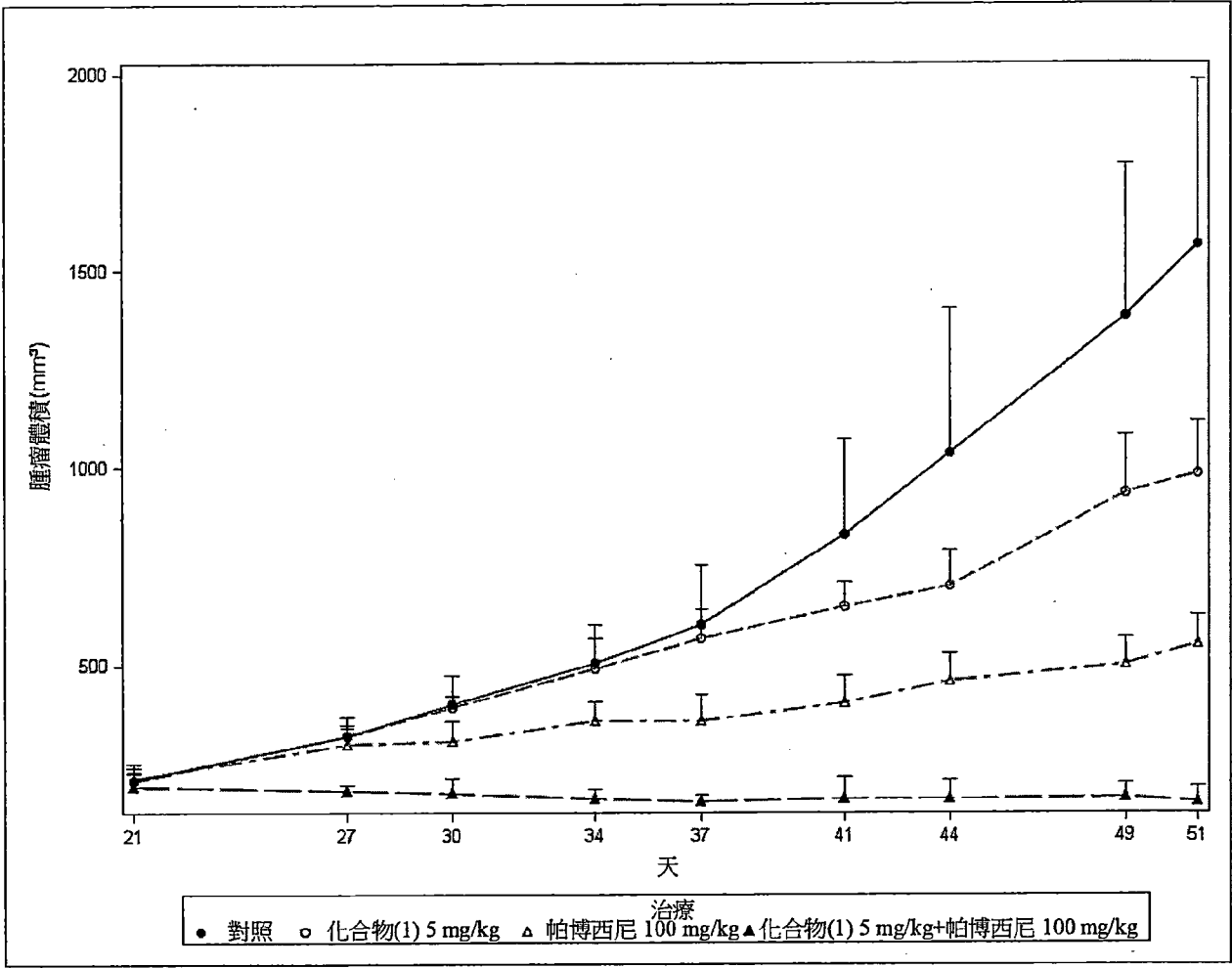


圖 2

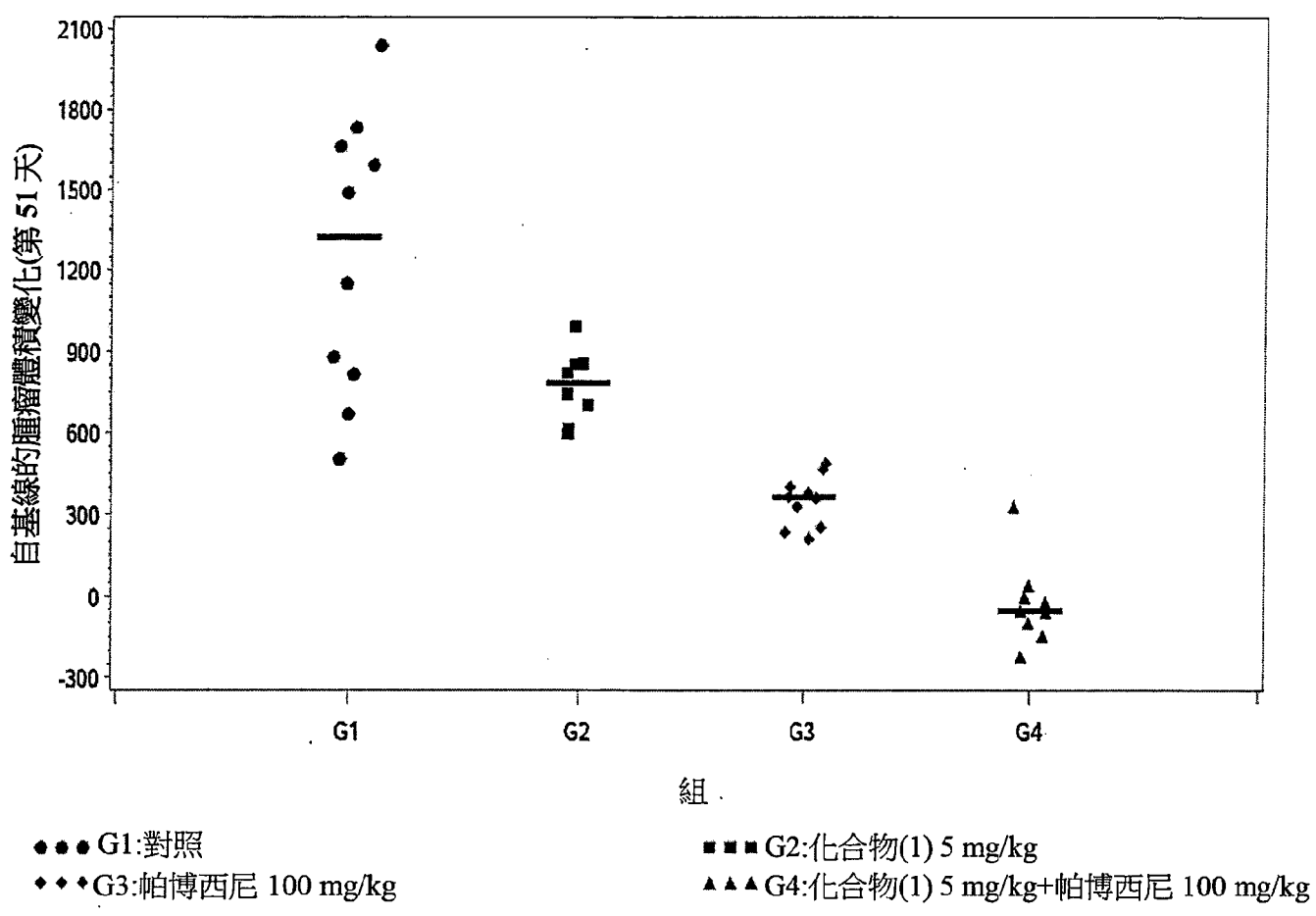


圖 3