



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102665720 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201080056439. 6

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2010. 10. 12

11105

代理人 孔宪静

(30) 优先权数据

61/250, 635 2009. 10. 12 US

(51) Int. Cl.

A61K 31/54 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/052242 2010. 10. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02011/046894 EN 2011. 04. 21

(71) 申请人 葛兰素史密斯科莱有限责任公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 K. 奥格 K. E. 巴克曼

J. D. 格雷肖克 T. 吉尔默

S. 拉克雷 S. R. 莫里斯

权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图 1 页

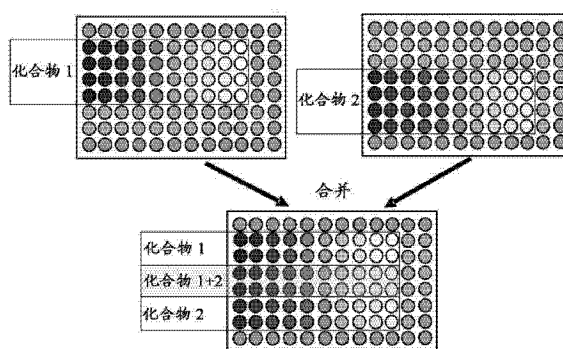
(54) 发明名称

组合

(57) 摘要

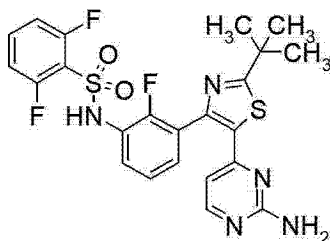
本发明涉及治疗哺乳动物中癌症的方法, 以及涉及用于这种治疗的药物组合。具体地, 该方法涉及包括 MEK 抑制剂 :N-{3-[3- 环丙基 -5-(2- 氟 -4- 碘 - 苯基氨基)6,8- 二甲基 -2,4,7- 三氧代 -3,4,6,7- 四氢 -2H- 吡啶并 [4,3-d] 嘧啶 -1- 基] 苯基} 乙酰胺或其可药用盐或溶剂化物, 和 PI3 激酶抑制剂 :2,4- 二氟 -N-{2-(甲氧基) -5-[4-(4- 哒嗪基) -6- 喹啉基] -3- 吡啶基} 苯磺酰胺或其可药用盐的新组合, 包括该组合的药物组合物, 以及使用该组合治疗癌症的方法。

在 96 孔板中给药的固定浓度的平板排列示例



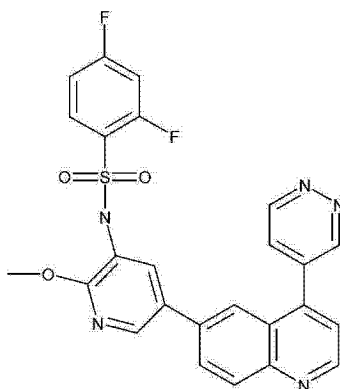
1. 一种组合,其含有:

(i) 结构 (I) 的第一化合物:



或其可药用盐或溶剂化物;和

(ii) 第二化合物,其为结构 (II) 的化合物:



或其可药用盐。

2. 根据权利要求 1 的组合,其中所述结构 (I) 的化合物为甲磺酸盐的形式,所述结构 (II) 的化合物为游离碱的形式。

3. 一种组合试剂盒,其包含根据权利要求 1 或权利要求 2 的组合以及一种或多种可药用载体。

4. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的组合,其中所述结构 (I) 的化合物的量为选自 10mg~300mg 的量,并且每天给药该量 1~4 次,以及所述结构 (II) 的化合物的量为选自 0.5mg~20mg 的量,并且每天给药该量一次。

5. 一种组合试剂盒,其包括根据权利要求 1~4 中任一项所述的组合以及一种或多种可药用载体。

6. 治疗需要的人中癌症的方法,其包括向该人体内给药治疗有效量的 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐以及 2,4-二氟-N-[2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基]苯磺酰胺的组合,

其中所述组合在规定的期间内给药,和

其中所述组合给药一段持续时间。

7. 根据权利要求 6 的方法,其包括向该人体内给药治疗有效量的 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺甲磺酸盐和 2,4-二氟-N-[2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基]苯磺酰胺的组合,

其中所述组合在规定的期间内给药,和

其中所述组合给药一段持续时间。

8. 根据权利要求6的方法,其中N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐的量选自约10mg~约300mg,并且每天给药该量1~3次,以及2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺的量选自约0.5mg~约10mg。

9. 根据权利要求6的方法,其中N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐的量选自约70mg~约260mg,并且每天给药该量2次,以及2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺的量选自约0.5mg~约6mg。

10. 根据权利要求8的方法,其中在每天彼此相隔12小时内给药N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐,和2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺至少连续7天的周期,任选接着重复一个或多个周期。

11. 根据权利要求6的方法,其中在每天彼此相隔12小时内给药N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺甲磺酸盐,和2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺至少连续14天的周期,任选接着重复一个或多个周期。

12. 治疗需要的人中癌症的方法,其包括一个或多个给药周期,其中每个所述周期包括:

(1) 向所述人给药约10~300mg的N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,每天给药1~4次,给药1~30天;以及

(2) 向所述人周期性地给药约0.05mg~10mg的2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物。

13. 治疗需要的人中癌症的方法,其包括一个或多个给药周期,其中每个所述周期包括:

(1) 向所述人给药约70~260mg的N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,每天给药1~4次,给药1~30天;以及

(2) 向所述人周期性地给药约0.5mg~5mg的2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,给药1~30天。

14. 治疗需要的人中癌症的方法,其包括一个或多个给药周期,其中每个所述周期包括:

(1) 向所述人给药约0.05~10mg的2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,每天给药1或2次,给药1~30天;以及

(2) 向所述人周期性地给药约10~300mg的N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,给药1~30天。

15. 治疗需要的人中癌症的方法,其包括一个或多个给药周期,其中每个所述周期包括:

(1) 向所述人给药约 0.5~5mg 的 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,每天给药 1 或 2 次,给药 1~30 天;以及

(2) 向所述人周期性地给药约 70~260mg 的 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,给药 1~30 天。

16. 根据权利要求 12 或 13 的方法,其中每 2~4 天给药 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺一次。

17. 根据权利要求 12 或 13 的方法,其中每 5~7 天给药 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺一次。

18. 根据权利要求 12 或 13 的方法,其中每 8~15 天给药 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺一次。

19. 根据权利要求 14 或 15 的方法,其中每 2~4 天给药 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺甲磺酸盐一次。

20. 根据权利要求 14 或 15 的方法,其中每 5~7 天给药 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺甲磺酸盐一次。

21. 根据权利要求 14 或 15 的方法,其中每 8~15 天给药 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺甲磺酸盐一次。

22. 治疗需要的人中癌症的方法,其包括一个或多个重复给药周期,其中每个所述周期包括向所述人给药约 10~300mg 的 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,每天给药 1~4 次,给药 5~14 天,接着向所述人给药约 0.05mg~10mg 的 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,给药 5~14 天。

23. 治疗需要的人中癌症的方法,其包括一个或多个重复给药周期,其中每个所述周期包括向所述人给药约 70~260mg 的 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,每天给药 1~2 次,给药 5~14 天,接着向所述人给药约 0.5mg~5mg 的 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,给药 5~14 天。

24. 根据权利要求 12~23 中任一项的方法,其中所述癌症是黑素瘤或结肠癌。

25. 根据权利要求 24 的方法,其中所述癌症是 BRAF 突变型。

26. 根据权利要求 1~4 中任一项的组合,其中所述第二化合物为游离碱的形式。

27. 用于治疗的根据上述权利要求中任一项的组合。

28. 用于治疗癌症的根据权利要求 1~4 中任一项的组合。
29. 药物组合物,其包括根据权利要求 1~4 中任一项的组合以及可药用载体。
30. 根据权利要求 1~4 中任一项的组合在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
31. 根据权利要求 8 或 9 的方法,其中所述癌症是黑素瘤、肺癌、胰腺癌、乳腺癌或结肠癌。
32. 根据权利要求 17 的方法,其中所述癌症是黑素瘤或结肠癌。
33. 根据权利要求 32 的方法,其中所述癌症是 BRaf 突变型。
34. 根据权利要求 12~15 中任一项的方法,其中所述癌症是在用 BRaf 抑制剂治疗之后发展的黑素瘤。
35. 根据权利要求 12~15 中任一项的方法,其中所述癌症是对 BRaf 抑制剂具有抗性的黑素瘤。
36. 根据权利要求 12~15 中任一项的方法,其中所述癌症是在用 BRaf 抑制剂治疗之后发展的结肠癌。
37. 根据权利要求 12~15 中任一项的方法,其中所述癌症是对 BRaf 抑制剂具有抗性的结肠癌。

组合

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗哺乳动物中癌症的方法,以及涉及用于这种治疗的组合。具体地,该方法涉及包括 B-Raf 抑制剂 :N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物,以及 PI3K 抑制剂 :2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐的组合,含有该组合的药物组合物,以及在治疗癌症中使用该组合的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 对过度增殖疾病包括癌症的有效治疗一直是肿瘤学领域的目标。一般而言,癌症从控制细胞分裂、分化和细胞凋亡的正常过程中的失调而产生。凋亡(程序性细胞死亡)在胚胎发育和各种疾病的发病机制中起重要作用,所述疾病如变性神经元疾病(degenerative neuronal diseases)、心血管疾病和癌症。一种最常见的涉及激酶调节凋亡的研究途径是从细胞表面生长因子受体向细胞核的细胞信号传导(Crews and Erikson, Cell, 74:215-17, 1993)。

[0004] 酶的一个重要的大家族是蛋白激酶家族。目前,存在约 500 种不同的已知的蛋白激酶。蛋白激酶起到催化不同的蛋白质中氨基酸侧链磷酸化的作用,其是通过向所述氨基酸侧链转移 ATP-Mg²⁺ 复合物的 γ -磷酸盐来进行催化。这些酶控制细胞内部中的大量的信号处理,从而通过蛋白质中的丝氨酸、苏氨酸以及酪氨酸残基的羟基的反向磷酸化控制细胞功能、生长、分化以及破坏(凋亡)。研究证明蛋白激酶是多种细胞功能的关键调节剂,所述细胞功能包括信号转导、转录调节、细胞运动、以及细胞分裂。已经显示一些致癌基因编码蛋白激酶,表明激酶在肿瘤生成过程中起重要作用。这些过程是高度调节的,通常通过复杂的互相结合的途径来调节,其中每个激酶本身受到一种或多种激酶调节。因此,异常的或不适当的蛋白激酶活性可能会导致与此类异常激酶活性相关的疾病状态的增加,所述疾病包括良性和恶性的增殖性病症,以及由免疫和神经系统不适当激活导致的疾病。由于它们的生理学关联性、多样性以及普遍性,蛋白激酶已经变成了最重要的和在生物化学和医学研究中得到广泛研究的一类酶。

[0005] 酶的蛋白激酶家族通常被分成两个主要的亚族:蛋白酪氨酸激酶和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶,基于它们磷酸化氨基酸残基来分类。蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(PSTK)包括环 AMP-和环 GMP-依赖性蛋白激酶、钙和磷脂依赖性蛋白激酶、钙-和钙调蛋白依赖性蛋白激酶、酪蛋白激酶、细胞分裂周期蛋白激酶等。这些激酶通常是细胞质的或与细胞的颗粒部分关联,可能是通过锚定蛋白关联。异常的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性涉及或有可能涉及大量病理学问题,例如类风湿性关节炎、银屑病、感染性休克、骨丢失、多种癌症以及其它增殖性疾病。因此,丝氨酸/苏氨酸激酶和它们是其中的一部分的信号转导途径是药物设计的重要靶标。酪氨酸激酶磷酸化酪氨酸残基。在细胞调节中,酪氨酸激酶起到相当重要的作用。这些激酶包括分子(诸如生长因子以及激素)的一些受体,包括表皮生长因子受体、胰岛素受体、血小板衍生生长因子受体等。研究已经显示多种酪氨酸激酶是跨膜蛋白质,并

且它们的受体域位于细胞外表面以及它们的激酶域在内部。还在进行大量的工作以识别酪氨酸激酶的调节因子 (modulator)。

[0006] 促细胞分裂剂-活化的蛋白质激酶 (MAPK)/细胞外信号调节激酶 (ERK) 激酶 (下文称为 MEK) 已知与大量细胞过程的调节相关。Raf 家族 (B-Raf, C-Raf 等) 激活 MEK 家族 (MEK-1, MEK-2 等) 和 MEK 家族激活 ERK 家族 (ERK-1 和 ERK-2)。广泛来说, RAF/MEK/ERK 途径的信号传导活化控制 mRNA 转移。这包括与细胞周期相关的基因。因此, 该途径的过度活化会引起不受控制的细胞增殖。由 ERK 过度活化造成的 RAF/MEK/ERK 途径的失调在所有人恶性肿瘤中约 30% 被发现 (Allen, LF, et al. *Semin. Oncol.* 2003. 30 (5 Suppl 16):105-16)。活化的 BRAF 突变型已经在特定的肿瘤类型 (例如黑素瘤) 中被高频率鉴定出来 (Davies, H. et al. *Nature.* 2002. 417:949-54)。在人类癌症中出现的所有确定的 BRAF 的突变型中的约 90% 是外显子 15 中的 T1799 颠换突变型, 其导致 V600E/D/K (T1799A) 氨基酸取代 (Wellbrock, C. 等人, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. 5:875-85; Wan, PT et al. *Cell.* 2004. 116:855-67)。该突变型可能会拟态调节磷酸化并且与野生型相比增加 BRAF 活性约 10 倍 (Davies, H. 等人, *Nature.* 2002. 417:949-54)。这类激活突变型频率以及途径依赖使突变型的 BRAF 成为极其受关注的靶标。

[0007] 磷酸肌醇 3- 激酶 (PI3K) 途径在人癌症中是一种最常见的活化途径。对该途径在肿瘤发生和肿瘤进展中的功能和重要性已经有很好的了解 (Samuels & Ericson. *Curr. Opp in Oncology*, 2006. 18:77-82)。PI3K-AKT 信号转导可能是细胞存活、增殖和代谢的非常重要的调节器。这包括雷帕霉素哺乳动物靶标 (mTOR) 的激活, 其是 PI3K 蛋白质家族成员以及细胞生长和翻译的直接调节剂。因此, 肿瘤中 PI3K/AKT/mTOR 信号传导的失调有助于显示大量的恶性肿瘤标志的细胞表型, 其包括不受限的繁殖潜能和逃避凋亡 (Hanahan & Weinberg, *Cell.* 2000. 100:57-70)。

[0008] PI3K 家族由 15 个蛋白质构成, 这 15 个蛋白质具有序列同源性, 特别是在激酶结构域内; 然而, 它们具有不同的底物特异性以及调节模式 (Vivanco & Sawyers. *Nat. Rev. Cancer*, 2002. 2:489-501)。含 I 类 PI3- 激酶磷酸化的肌醇的脂质, 已知为在 3 位为磷脂酰肌醇 (PtdIns)。通过这些激酶将 I 类家族成员的一级底物, PtdIns-4, 5-P2 (PIP2), 转化为 PtdIns-3, 4, 5-P3 (PIP3)。PIP3 是重要的第二信使, 其将含有普列克底物蛋白 (pleckstrin) 同源性结构域的蛋白质募集至细胞膜, 它们在此处被活化。这些蛋白中研究最多的是促进细胞存活、生长和增殖的 AKT。基于激活, AKT 移动到细胞质和细胞核, 并在此其磷酸化大量基质, 包括 mTOR (TORC1)。除了 AKT, PI3K 激活其它途径, 其它途径涉及致癌作用诸如 PDK1、CDC42 和 RAC1 (Samuels & Ericson. *Curr. Opp in Oncology*, 2006. 18:77-82)。

[0009] 在对人类肿瘤的研究中, 可以通过不同的机理出现 PI3K/AKT/mTOR 信号转导途径的激活。该途径的基因失调是常见的并且以多种方式出现 (在 Samuels & Ericson. *Curr. Opp in Oncology*, 2006. 18:77-82 中综述)。PIK3CA 基因 (编码 PI3K 的 p110 α 催化亚基) 的激活突变型在大量人类肿瘤中出现, 所述肿瘤包括乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌和结肠直肠癌。该基因的激活 DNA 扩增在一些不同的肿瘤类型中出现的频率较低。在 PI3K 的 p85 α 调节亚基 (PIK3R1) 上的突变, 认为其会中断 PIK3R1 和 PIK3CA 之间的 C2-iSH2 相互作用, 出现在卵巢癌、恶性胶质瘤以及结肠直肠癌中。肿瘤抑制剂 PTEN 通常被突变、缺失或后生沉默 (epigenetically silenced), 该肿瘤抑制剂使 PIP3 去磷酸化从而产生 PIP2, 由

此其可以作为 PI3K 途径的抑制剂。最终,可以通过 DNA 扩增或 AKT 的突变来从遗传学上从 PI3K 的下游激活该途径;但是这些基因事件在人类肿瘤中出现的频率很低。已知抑制 PI3K 亚型,尤其是 PI3K α 对于治疗癌症是有用的(参见例如 WO 05/121142、WO 08/144463、WO 08/144464、WO 07/136940)。

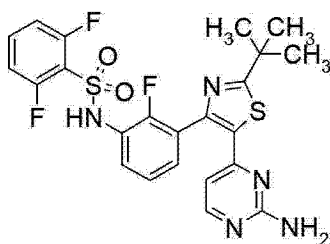
[0010] 有用的是提供一种新的,单一或组合疗法,该疗法向受癌症作用的个体提供更有有效的和/或增强的治疗。

发明内容

[0011] 本发明的一个实施方案提供了一种组合,其含有:

[0012] (i) 结构 (I) 的化合物:

[0013]

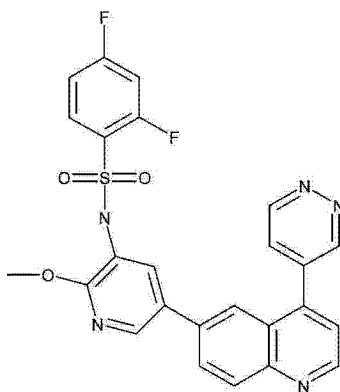


(I)

[0014] N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺(以下称为化合物 A),或其可药用盐;以及

[0015] (ii) 结构 (II) 的化合物:

[0016]



(II)

[0017] 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(以下称为化合物 B)或其可药用盐。

[0018] 本发明的一个实施方案提供治疗需要的人中癌症的方法,其包括向该人体内给药治疗有效量的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐的组合。

[0019] 本发明的一个实施方案提供治疗需要的人中癌症的方法,其包括向该人体内给药治疗有效量的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐的组合,

[0020] 其中所述组合在规定的期间内给药,和

[0021] 其中所述组合给药一段持续时间。

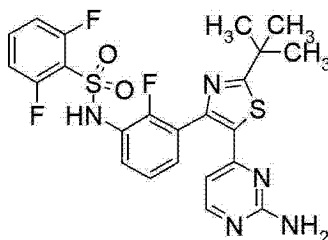
[0022] 本发明的一个实施方案提供治疗需要的人中癌症的方法,其包括向该人体内给药治疗有效量的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐的组合,

[0023] 其中,顺序给药化合物 A 和 B。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明涉及显示抗增殖活性的组合。适当地,该方法涉及通过共同给药下列化合物治疗癌症的方法:N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺(化合物 A)或其可药用盐或溶剂化物,适当地为其二甲基亚砜溶剂化物,该化合物由结构 I 表示:

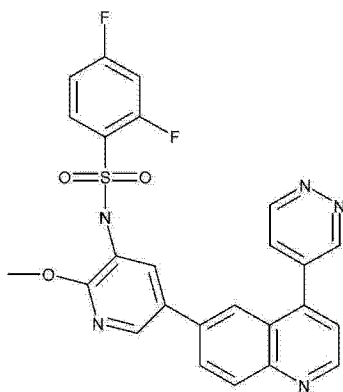
[0026]



(I)

[0027] 和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(化合物 B)或其可药用盐;该化合物由下述结构表示:

[0028]



(II)

[0029] 在国际申请 PCT/US2009/042682 号(国际申请日 2009 年 5 月 4 日;国际公开 WO 2009/137391 号以及 WO 2009/137391 的国际公开日)中公开并要求保护的化合物 A 及其可药用盐,它们特别在癌症治疗中用作 B-Raf 活性的抑制剂,该文献的全文公开在此引入作为参考,化合物 A 为实施例 58 的化合物。化合物 A 可以根据国际申请 PCT/US2009/042682 号中的说明制备。

[0030] 合适地,化合物 A 为甲磺酸盐的形式。本领域技术人员可以根据国际申请 PCT/US2009/042682(国际申请日 2009 年 5 月 4 日)号中的说明制备该盐形式。

[0031] 在国际申请 PCT/US2008/063819 号(国际申请日 2008 年 5 月 16 日;国际公开号 WO 2008/1444463,以及国际公开日 2008 年 11 月 27 日)中公开并要求保护的化合物 B 及其可药用盐,它们特别在癌症治疗中用作 PI3K 活性的抑制剂,该文献的全文公开在此引入作为参考,化合物 B 为实施例 345 的化合物。化合物 B 可以根据在国际申请 PCT/US2008/063819

号中的说明制备。

[0032] 适当地,化合物 B 为游离碱的形式。

[0033] 给药治疗有效量的本发明的组合相对于单个的组分化合物是有利的,因为与单独给药治疗有效量的组分化合物相比,该组合将会提供一个或多个下列改进的性质:i) 与活性最大的单个药物(agent)相比有更大的抗癌作用,ii) 协同效应的或高度协同效应的抗癌活性,iii) 提供增强的抗癌活性和减少的副作用的给药方案,iv) 毒性作用减少,v) 治疗窗口增加,或者vi) 组分化合物中的一个或两者的生物利用度增加。

[0034] 本发明的化合物可以形成溶剂化物,其可以理解为由溶质(在本发明中,化合物 A 或其盐和/或化合物 B 或其盐)和溶剂形成的各种化学计量的复合物。用于本发明目的的溶剂不可以干扰溶质的生物学活性。合适溶剂的实例包括但不限于:水、甲醇、二甲基亚砜、乙醇和乙酸。适当地,所使用的溶剂为可药用的溶剂。合适的可药用溶剂的实例包括但不限于:水、二甲基亚砜、乙醇和乙酸。适当地,所用的溶剂为水。

[0035] 本领域技术人员可以容易地制备本发明化合物的可药用盐。

[0036] 因此,本发明还包括使用本发明的组合治疗癌症的方法,其中给药以前药形式的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和/或化合物 B 或其可药用盐。本领域技术人员可以容易地制备本发明化合物的可药用前药。

[0037] 当涉及给药方案(dosing protocol),术语“天”、“每天”等是指日历上一天内的时间,其从子夜开始,结束于下一个子夜。

[0038] 如本文所使用的,术语“治疗”及其相关表述表示治疗性治疗。当涉及具体的病症时,治疗表示:(1) 改善或预防该病症的一个或多个生物学表现的状况,(2) 干扰(a) 引起或响应于该病症的生物学级联中的一个或多个点,或(b) 该病症的一个或多个生物学表现,(3) 减轻与该病症或其治疗相关联的一个或多个症状、作用或副作用,或者(4) 减缓该病症的进展,或者减缓该病症的一个或多个生物学表现。由此,也包括了预防性治疗。本领域技术人员将会理解“预防”不是绝对的术语。在医学中,将“预防”理解为预防性给药以基本上减少病症或其生物学表现的可能性或严重性,或者以延缓这种病症或其生物学表现的开始。例如,当受治疗者被认为处于患癌症的高风险时,例如当受治疗者具有强大的癌症家族史时或者当受治疗者已经暴露于致癌物时,预防性治疗是合适的。

[0039] 如本文所使用的,术语“有效量”表示产生研究者或临床医师所寻求的例如组织、系统、动物或人的生物学或药学响应的药物或药用制剂的量。此外,术语“治疗有效量”表示,与没有接受该量的相应受治疗者相比,引起疾病、病症或副作用的改进治疗、治愈、预防或减轻的量,或者引起疾病或病症的进展的速率降低的量。该术语还包括在其范围内有效地增强正常生理功能的量。

[0040] 术语“周期性地给药”或其变形表示以具有休药期(drug holiday)的形式给药。休药期(有时也称为药物假期(drug vacation)、药物疗法假期、计划性间断治疗(structured treatment interruption)或策略性间断治疗(strategic treatment interruption))是指病人停止进行药物疗法一段时间;无论从几天到几个月。

[0041] 如本文所使用的,术语“组合”及其相关表述表示同时给药或者以任何分开的顺序给药治疗有效量的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐。优选地,如果给药不是同时的,那么所述化合物以相互紧密相邻的时间给药。此外,化合物是否以相

同的剂型给药是无关紧要的,例如一个化合物可以局部给药,另一个化合物可以口服给药。适当地,这两个化合物均口服给药。

[0042] 如本文所使用的,术语“组合试剂盒”,表示用于给药根据本发明的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐的一种或多种药物组合物。当该两种化合物同时给药时,所述组合试剂盒可以含有在单个药物组合物如片剂或在分开的药物组合物中的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐。当不同时给药所述化合物时,所述组合试剂盒将含有在分开的药物组合物中的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐。该组合试剂盒可以包括在单个包装中的分开的药物组合物中,或在分开包装中的分开药物组合物中的化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物和化合物 B 或其可药用盐。

[0043] 在一个方面中提供了包含下列成分的组合试剂盒:

[0044] 化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物,以及可药用载体;和

[0045] 化合物 B 或其可药用盐,以及可药用载体。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,该组合试剂盒包含下列成分:

[0047] 化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物,以及可药用载体;和

[0048] 化合物 B 或其可药用盐,以及可药用载体,

[0049] 其中所述成分以适于顺序、分开和/或同时给药的形式提供。

[0050] 在一个实施方案中,该组合试剂盒包含:

[0051] 第一容器,其包含化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物,以及可药用载体;和

[0052] 第二容器,其包含化合物 B 或其可药用盐,以及可药用载体,和用于容纳所述第一容器和第二容器的容器装置。

[0053] 所述“组合试剂盒”还可以提供说明书,如剂量和给药说明书。这些剂量和给药说明书可以为向医师提供的资料(kind),例如药物产品标签,或者它们可以为由医师提供的资料,如向患者提供的说明书。

[0054] 除非另有说明,在本文所述的所有给药方案中,给药化合物的方案没有必要在治疗开始时开始,也没有必要在治疗结束时终止,仅要求给药该两种化合物的连续天数以及任选仅给药组分化合物中仅一种的连续的天数,或者所指明的给药方案-包括所给予的化合物量,在治疗过程中的一些点发生。

[0055] 如本文所使用的术语“化合物 A²”表示---化合物 A 或其可药用盐或溶剂化物---。

[0056] 如本文所使用的术语“化合物 B²”表示---化合物 B 或其可药用盐---。

[0057] 适当地,本发明的组合“在规定的期间内”给药。

[0058] 如本文所使用的术语“规定的期间(specified period)”及其类似表达,表示给药化合物 A² 和化合物 B² 中的一个以及给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个之间的时间间隔。除非另有说明,规定的期间可以包括同时给药。当一天一次给药本发明的两个化合物时,规定的期间是指在一日内给药化合物 A² 和化合物 B²。当给药本发明的一个或两个化合物一天多于一次时,基于首次给药各化合物的具体日期计算规定的期间。在计算规定的期间时,不考虑在该具体日期中首次给药后所有本发明化合物的给药。

[0059] 适当地,如果在“规定的期间”内给药所述化合物而不同时给药,它们均可以在彼此相隔约 24 小时内给药-在该情况中,所述规定的期间将为约 24 小时;适当地,它们均可

以在彼此相隔约 12 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 12 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 11 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 11 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 10 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 10 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 9 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 9 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 8 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 8 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 7 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 7 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 6 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 6 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 5 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 5 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 4 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 4 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 3 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 3 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 2 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 2 小时;适当地,它们均可以在彼此相隔约 1 小时内给药 – 在该情况中,所述规定的期间将为约 1 小时。如本文所使用的,化合物 A² 和化合物 B² 的给药相隔小于约 45 分钟被认为是同时给药。

[0060] 适当地,当本发明的组合给药一段“规定的期间”时,各化合物共同给药一段“持续时间”。

[0061] 如本文所使用的术语“持续时间”及其类似表述,表示给药本发明的两个化合物指定数目的连续天数。

[0062] 关于“规定的期间”给药:

[0063] 适当地,两个化合物在规定的期间内给药至少一天 – 在该情况中,所述持续时间为至少一天;适当地,在治疗过程中,两个化合物在规定的期间内给药至少连续 3 天 – 在该情况中,所述持续时间为至少 3 天;适当地,在治疗过程中,两个化合物在规定的期间内给药至少连续 5 天 – 在该情况中,所述持续时间为至少 5 天;适当地,在治疗过程中,两个化合物在规定的期间内给药至少连续 7 天 – 在该情况中,所述持续时间为至少 7 天;适当地,在治疗过程中,两个化合物在规定的期间内给药至少连续 14 天 – 在该情况中,所述持续时间为至少 14 天;适当地,在治疗过程中,两个化合物在规定的期间内给药至少连续 30 天 – 在该情况中,所述持续时间为至少 30 天。

[0064] 适当地,如果所述化合物不在“规定的期间 (during a specified period)”给药,那么它们就顺序给药。如本文所使用的术语“顺序给药”及其相关表述,表示一天一次给药化合物 A² 和化合物 B² 中的一个一天或连续多天,接着一天一次给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个连续两天或更多天。同样地,本发明还包括在顺序给药化合物 A² 和化合物 B² 中的一个以及给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个之间所使用的休药期。如本文所使用的,休药期为在顺序给药化合物 A² 和化合物 B² 中的一个之后和在给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个之前不给药化合物 A² 也不给药化合物 B² 的间隔天数。休药期为选自以下的间隔天数:1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天和 14 天。

[0065] 关于顺序给药 (sequential administration):

[0066] 适当地,给药化合物 A² 和化合物 B² 中的一个连续 2~30 天,接着任选的休药期,接着给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个连续 2~30 天。适当地,给药化合物 A² 和化合物 B²

中的一个连续 2~21 天,接着任选的休药期,接着给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个连续 2~21 天。适当地,给药化合物 A² 和化合物 B² 中的一个连续 2~14 天,接着 1~14 天的休药期,接着给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个连续 2~14 天。适当地,给药化合物 A² 和化合物 B² 中的一个连续 3~7 天,接着 3~10 天的休药期,接着给药化合物 A² 和化合物 B² 中的另一个连续 3~7 天。

[0067] 适当地,化合物 B² 首先连续给药,接着任选的休药期,接着给药化合物 A²。适当地,给药化合物 B² 连续 3~21 天,接着任选的休药期,接着给药化合物 A² 连续 3~21 天。适当地,给药化合物 B² 连续 3~21 天,接着 1~14 天的休药期,接着给药化合物 A² 连续 3~21 天。适当地,给药化合物 B² 连续 3~21 天,接着 3~14 天的休药期,接着给药化合物 A² 连续 3~21 天。适当地,给药化合物 B² 连续 21 天,接着任选的休药期,接着给药化合物 A² 连续 14 天。适当地,给药化合物 B² 连续 14 天,接着 1~14 天的休药期,接着给药化合物 A² 连续 14 天。适当地,给药化合物 B² 连续 7 天,接着 3~10 天的休药期,接着给药化合物 A² 连续 7 天。适当地,给药化合物 B² 连续 3 天,接着 3~14 天的休药期,接着给药化合物 A² 连续 7 天。适当地,给药化合物 B² 连续 3 天,接着 3~10 天的休药期,接着给药化合物 A² 连续 3 天。

[0068] 应当理解,“规定的期间”给药和“顺序”给药可以接着重复给药 (dosing) 或者可以接着交替给药方案,休药期可以在重复给药或交替给药方案之前。

[0069] 适当地,作为本发明组合的一部分的化合物 A² 的给药量为选自约 10mg~约 300mg;适当地,所述量选自约 30mg~约 280mg;适当地,所述量选自约 40mg~约 260mg;适当地,所述量选自约 60mg~约 240mg;适当地,所述量选自约 80mg~约 220mg;适当地,所述量选自约 90mg~约 210mg;适当地,所述量选自约 100mg~约 200mg,适当地,所述量选自约 110mg~约 190mg,适当地,所述量选自约 120mg~约 180mg,适当地,所述量选自约 130mg~约 170mg,适当地,所述量选自约 140mg~约 160mg,适当地,所述量为 150mg。因此,作为本发明组合的一部分的化合物 A² 的给药量为选自约 10mg~约 300mg。例如,作为本发明组合的一部分的化合物 A² 的给药量可以选自 10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、85mg、90mg、95mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg、140mg、145mg、150mg、155mg、160mg、165mg、170mg、175mg、180mg、185mg、190mg、195mg、200mg、205mg、210mg、215mg、220mg、225mg、230mg、235mg、240mg、245mg、250mg、255mg、260mg、265mg、270mg、275mg、280mg、285mg、290mg、295mg 和 300mg。适当地,一天 1~4 次给药所选量的化合物 A²。适当地,一天 2 次给药所选量的化合物 A²。适当地,一天 1 次给药所选量的化合物 A²。适当地,化合物 A² 的给药将从负荷剂量 (loading dose) 开始。适当地,该负荷剂量将为维持剂量的 2~100 倍的量;适当地 2~10 倍;适当地 2~5 倍;适当地为 2 倍;适当地为 3 倍;适当地为 4 倍;适当地为 5 倍。适当地,所述负荷剂量给药 1~7 天;适当地 1~5 天;适当地 1~3 天;适当地为 1 天;适当地为 2 天;适当地为 3 天,接着为维持剂量给药方案。

[0070] 适当地,作为本发明组合的一部分的化合物 B² 的给药量选自约 0.25mg~约 75mg;适当地,所述量选自约 0.5mg~约 50mg;适当地,所述量选自约 1mg~约 25mg;适当地,所述量选自约 2mg~约 20mg;适当地,所述量选自约 4mg~约 16mg;适当地,所述量选自约 6mg~约 12mg;适当地,所述量为约 10mg。因此,作为本发明组合的一部分的化合物 B² 的给药量选自约 0.5mg~约 50mg。例如,作为本发明组合的一部分的化合物 B² 的给药量可以为 0.5mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg、16mg、17mg、

18mg、20mg、21mg、22mg、23mg、25mg、26mg、27mg、28mg、29mg、30mg、35mg、40mg、45mg 或 50mg。

[0071] 如本文所使用的,针对化合物 A² 和化合物 B² 详细说明的所有量表示为每剂量给药游离的或未成盐的和未溶剂化的化合物的量。

[0072] 本发明的方法还可以与其他治疗癌症的治疗方法一起使用。

[0073] 尽管对于治疗应用而言,治疗有效量的本发明的组合可以以粗化学品 (raw chemical) 给药,但是优选该组合以一种或多种药物组合物存在。因此,本发明还提供药物组合物,其包括化合物 A² 和 / 或化合物 B² 以及一种或多种可药用载体。本发明的组合如上文所述。所述载体在以下意义上必须是可接受的:与制剂中其他成分相容,能够形成药用制剂以及对其接受者无害。根据本发明的其他方面,还提供了制备药物制剂的方法,该方法包括混合化合物 A² 和 / 或化合物 B² 与一种或多种可药用载体。如上文所示,所用药物组合中的这些要素可以以分开的药物组合物存在,或者一起配制成一种药物制剂。

[0074] 药物制剂可以以含有预定量的活性成分 / 单位剂量的单位剂型存在。如本领域技术人员所已知的,活性成分的量 / 剂量取决于所治疗的病症、给药途径和患者的年龄、体重和状况。优选的单位剂量制剂为那些含有每日剂量或亚剂量或其合适部分的活性成分的单位剂量。此外,这些药物制剂可以通过药物领域公知的任何方法制备。

[0075] 化合物 A² 和化合物 B² 可以通过任何适合的途径给药。合适的途径包括经口、经直肠、经鼻、局部 (包括含服 (buccal) 和舌下)、经阴道和肠胃外 (包括皮下、肌内、静脉内、真皮内、鞘内和硬膜外)。可以理解优选途径可随着例如该组合的受治疗者的病症和所治疗的癌症而变化。还可以理解各个药物可以通过相同或不同的途径给药,化合物 A² 和化合物 B² 可以一起配制成药物组合物 / 制剂。

[0076] 将本发明的化合物或组合混合成方便的剂型,如胶囊、片剂或可注射制剂。可以使用固体或液体药用载体。固体载体包括:淀粉、乳糖、硫酸钙二水合物、石膏粉、蔗糖、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁和硬脂酸。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、盐水和水。类似地,载体可以包括延时释放材料,如单独的或与蜡混合的甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯。固体载体的量变化范围广,但是优选约 25mg~ 约 1g/ 剂量单位。当使用液体载体时,该制剂合适的为糖浆、酏剂、乳剂、软明胶胶囊剂、无菌可注射液体 (如安瓿) 或者含水或非含水液体混悬剂的形式。

[0077] 例如,对于片剂或胶囊剂形式的口服给药,活性药物组分可以与口服的、无毒的可药用惰性载体如乙醇、甘油、水等混合。粉末剂通过将所述化合物研磨成合适的细小尺寸并与类似粉末化的药用载体 (如可食用碳水化合物,例如,淀粉或甘露醇) 混合而制备。还可以存在调味剂、防腐剂、分散剂和着色剂。

[0078] 应当理解,除了上述成分之外,所述制剂可以含有在本领域中与所关注制剂类型相关的其他试剂,例如适于口服给药的试剂可以包括调味剂。

[0079] 如所说明的,将治疗有效量的本发明组合 (化合物 A² 与化合物 B² 组合) 给药于人。典型地,给药的治疗有效量的本发明药物将取决于许多因素,包括,例如,受治疗者的年龄和重量、需要治疗的精确病症、该病症的严重程度、制剂的性质和给药途径。最后,治疗有效量依据主治医师的决定。

[0080] 根据已知的方法测试本发明的组合的功效、有利和协同效应性质。适当地,一般根据以下的联合细胞增殖实验测试本发明的组合的功效、有利和协同效应性质。在 96 或

384-孔板中在适于各细胞类型,且补充了 10%FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素的培养基中将细胞铺板,并在 37°C、5%CO₂ 温育过夜。使用化合物 A² 的稀释液 (10 个稀释液,包括无化合物、0.50~10 μM 以 3- 倍稀释液) 以格栅方式处理细胞,并用化合物 B² (10 个稀释液,包括无化合物、0.10~1.0 μM 3- 倍稀释液) 处理,并如上述再温育 72 小时。在一些情况中,以交错方式添加化合物,并且可以将温育时间延长到最高达 7 天。使用 CellTiter-Glo[®] 试剂根据制造商的实验规范测量细胞生长,在 PerkinElmer EnVision[™] 阅读器上读取信号 (设为发光模式,0.5 秒一个读数)。如下所述对数据进行分析。

[0081] 结果表达为 t=0 时的值的百分比,并且针对化合物浓度作图。t=0 时的值归一化为 100%,并且表示添加化合物时存在的细胞数。各个化合物和 / 或化合物组合的细胞响应如下确定:使用用于 Microsoft Excel 软件的 IDBS XLfit plug-in 对细胞存活力 - 浓度进行 4 参数曲线拟合,并确定 50% 抑制细胞生长所需要的浓度 (gIC₅₀)。背景校正通过减去不含细胞的孔中的值来进行。对于各药物组合,组合指数 (Combination Index, CI)、超过最高单药物的量 (Excess Over Highest Single Agent, EOHS) 和超过 Bliss 的量 (Excess Over Bliss, EOBliss) 根据例如记载于 Chou and Talalay (1984) *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 37 至 55; 和 Berenbaum, MC (1981) *Adv. Cancer Research*, 35, 269-335 中的已知方法计算。

[0082] 由于本发明的组合在上述测定中具有活性,因此它们在癌症治疗中显示出有利的治疗实用性。

[0083] 适当地,本发明涉及治疗选自下列的癌症或减轻其严重性的方法:脑癌 (神经胶质瘤)、恶性胶质瘤、星形细胞瘤、多形性恶性胶质瘤、Bannayan-Zonana 综合征、考登病、Lhermitte-Duclos 病、乳腺癌、炎性乳腺癌、维尔姆斯肿瘤、尤因肉瘤、横纹肌肉瘤、室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、骨肉瘤、骨巨细胞瘤、甲状腺癌,

[0084] 淋巴母细胞 T 细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、慢性中性粒细胞性白血病、急性淋巴母细胞 T 细胞性白血病、浆细胞瘤、免疫母细胞大细胞白血病、套细胞白血病、多发性骨髓瘤巨核母细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性巨核细胞白血病、前髓细胞性白血病、红白血病,

[0085] 恶性淋巴瘤、何杰金淋巴瘤、非-何杰金淋巴瘤、淋巴母细胞 T 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤,

[0086] 神经母细胞瘤、膀胱癌、膀胱上皮癌、肺癌、外阴癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、间皮瘤、食管癌、唾液腺癌、肝细胞癌、胃癌、鼻咽癌、颊癌、口腔癌、GIST (胃肠道间质瘤) 和睾丸癌。

[0087] 适当地,本发明涉及治疗选自下列的癌症或减轻其严重性的方法:脑癌 (神经胶质瘤)、恶性胶质瘤、Bannayan-Zonana 综合征、考登病、Lhermitte-Duclos 病、乳腺癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌。

[0088] 适当地,本发明涉及治疗选自下列的癌症或减轻其严重性的方法:卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌。

[0089] 适当地,本发明涉及治疗选自下列的癌症或减轻其严重性的方法:肺癌、胰腺癌和

结肠癌。

[0090] 适当地,本发明涉及治疗下述癌症或减轻其严重性的方法,所述癌症是确定生物标志的野生型或突变型。

[0091] 适当地,本发明涉及治疗 Raf 野生型或突变型的癌症和 PI3K/PTEN 野生型或突变型的癌症或减轻其严重性的方法。该方法包括 Raf 和 PI3K/PTEN 均为野生型、Raf 和 PI3K/PTEN 均为突变型、Raf 为突变型和 PI3K/PTEN 为野生型以及 Raf 为野生型和 PI3K/PTEN 为突变型的患者。

[0092] 术语“野生型”,如本领域中所理解的,是指在未经基因修饰的天然种群中存在的多肽或多核苷酸序列。本领域中还应当理解的是,“突变型”包括,分别与野生型多肽或多核苷酸中相应的氨基酸或核酸相比,具有至少一个对氨基酸或核酸的修饰的多肽或多核苷酸序列。在术语突变型中包括单核苷酸多态性 (SNP),其中,与最普遍存在的(野生型)核酸链相比,单个碱基对差异存在于核酸链序列中。

[0093] 通过已知的方法鉴定生物标志野生型或突变型癌症和 PI3K/PTEN 野生型或突变型癌症。

[0094] 例如,野生型或突变型的 Ras/Raf 或 PI3K/PTEN 肿瘤细胞可以通过 DNA 扩增和测序技术、DNA 和 RNA 检测技术(分别包括但不限于 RNA 印迹(Northern blot)和 DNA 印迹(Southern blot))和/或各种生物芯片和阵列技术鉴定。野生型和突变型多肽可以通过多种技术包括但不限于免疫诊断学技术如 ELISA、蛋白质印迹(Western blot)、免疫细胞化学进行检测。适当地,可以使用焦磷酸解激活的聚合反应(PAP)和/或 PCR 方法。Liu, Q et al; Human Mutation 23:426-436(2004)。

[0095] 本发明提供了一种包含 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐的组合。

[0096] 本发明还提供了一种包含 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐的组合,其用于治疗。

[0097] 本发明还提供了一种包含 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐的组合,其用于治疗癌症。

[0098] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐的组合。

[0099] 本发明还提供了一种组合试剂盒,其包含 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}

苯磺酰胺或其可药用盐。

[0100] 本发明还提供了一种包含 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噁唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐的组合在制备药物中的用途。

[0101] 本发明还提供了一种包含 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噁唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐在制备治疗癌症的药物中的用途。

[0102] 本发明还提供了治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者给药 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噁唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺或其可药用盐或溶剂化物和 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺或其可药用盐的组合。

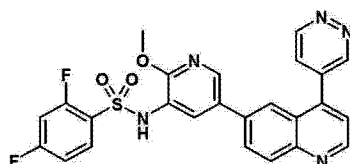
[0103] 下面的实施例仅用于解释本发明,不以任何方式限制本发明的范围。

[0104] 实验说明

[0105] 在国际申请 PCT/US2009/042682 号(国际申请日 2009 年 5 月 4 日;国际公开 WO 2009/137391 号以及 WO 2009/137391 的国际公开日)中公开并要求保护 N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噁唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺(化合物 A)以及可药用盐,它们特别在癌症治疗中用作 B-Raf 活性的抑制剂,该文献的全文公开在此引入作为参考,化合物 A 为实施例 58 的化合物。化合物 A 可以根据国际申请 PCT/US2009/042682 号中的说明制备。

[0106] 适合用于本发明组合的 PI3K 抑制剂,特别是 2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺,

[0107]



[0108] 可以根据国际专利公开 WO 2008/1444463 号(实施例 345)来制备。

[0109] 研究 #1:由化合物 A、化合物 B 以及它们的组合诱导的在肿瘤细胞系中的体外细胞生长抑制和细胞凋亡

[0110] 结肠癌细胞系

[0111] 实验准备

[0112] 利用来自人结肠癌的一组细胞系(n=25)(表 1)进行了化合物 A 和化合物 B 的组合药物测试。商购了细胞系[从 ATCC(Manassas, VA, 美国)或 DSMZ(Braunschweig, 德国)],使其在补充有 2mM 谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠以及 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 中生长,且在潮湿的培养箱中在 37°C 以及 5%CO₂ 下保持。

[0113] 实验方案

[0114] 固定比例药物组合检测

[0115] 从图 1 中可以看出固定比例药物组合检测的稀释设计。首先,在 100% 二甲基亚砜

(DMSO) 中制备 10mM 母液形式的测试化合物。接着,利用 DMSO 稀释该化合物。在 96 孔微量滴定板中,在行 B-E 中,利用 3 倍系列稀释液水平地稀释第一测试化合物(称为化合物 A)10 个稀释点。在另一个 96 孔微量滴定板中,在行 D-G 中,利用 3 倍系列稀释液水平地稀释第二测试化合物(称为化合物 B)10 个稀释点。利用来自每个药物滴定板中的等体积来混合两个化合物并加入到细胞培养基中。从而得到在细胞培养基中以 1:50 稀释的药物。在行 B 和行 C 中单独滴加(titrate)了化合物 A,而只有化合物 B 的则投入(dose)到滴定板的行 F 和 G 中。在添加到细胞中之前,在细胞培养基中另外进行了药物的 1:10 稀释。将药物添加到细胞中从而进一步 1:2 稀释药物。从药物滴定板到细胞的总稀释率为 1:1000。化合物 B 的最终给药浓度为 0.1-1000.0nM,且化合物 A 的最终给药浓度为 0.5-10000.0nM。阳性对照由培养基组成,该培养基含有 0.1% 的 DMSO 以及细胞并且没有药物。阴性对照由含有 0.1%DMSO 的培养基组成。

[0116] 在 96 孔微量滴定板中利用合适的接种密度来进行检测,该合适的接种密度是根据针对每个细胞系的在先的研究确定的。在给药之后,将细胞系于 37℃、5%CO₂,在潮湿的空气中温育 72 小时。利用 CellTiter Glo(Promega Corporation, Madison, WI, 美国)试剂根据制造商的实验规范来测量细胞增殖。利用 CellTiter Glo 溶液处理滴定板并利用 Molecular Devices SpectraMax M5(Sunnyvale, CA, 美国)光吸收酶标仪(plate reader)分析了 RLU(相对光单位)。

[0117] 数据分析

[0118] 结果表达为在化合物添加时存在的细胞数量值(T_0)的百分比,并且针对化合物浓度作图。将百分比强度值用于 Microsoft Excel 软件的 IDBS XLfit plug-in 的模型 205 中,从而利用 4 参数逻辑拟合计算出 gIC_{50} 值。背景校正通过减去不含细胞的孔中的值来进行。生长窗的中点(gIC_{50})处于加入化合物之时($T=0$)的细胞数目和用 DMSO 处理的对照细胞生长 72 小时之时的细胞数目之间的中点。将响应曲线底部的强度值(Y_{min})除以在零点时的细胞数(T_0)得到细胞死亡的量度(Y_{min}/T_0)。 Y_{min}/T_0 低于 1 的值表明与更高的值相比该治疗对诱导细胞死亡具有更强的能力。对于重复检测,对所有的响应量度(response metrics)取平均值以表示结果。

[0119] 利用三个独立的量度来分析化合物 B 和化合物 A 对于生长抑制的组合效果。

[0120] 数据分析

[0121] 利用三个独立的量度来分析化合物 B 和化合物 A 对于生长抑制的组合效果。

[0122] 1. 超过最高单药物的量 (EOHSA) - 用于测量药物组合效果的一个标准准则是分析在绝对条件下对于细胞生长抑制的效果。在这种情况下,将药物的组合与更为具有响应性的两个单独治疗(单个药物)进行比较。对于每个组合实验,沿着曲线产生相对于每个药物单独的最高单个药物的百分比效果。这种“超过最高单药物的量 (EOHSA)”的量度是用于评价药物组合的协同效应的标准之一。(Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, Serbedzija G, Zimmermann GR, Foley MA, Stockwell BR, Keith CT. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24; 100(13):7977-82)

[0123] 2. Bliss 协同效应 - 通常用于确定组合药物协同效应的第二个准则是评价超过 Bliss 独立作用或“相加作用 (additivity)”的过量抑制作用 (Bliss, C. I, Mexico, DF,

The Toxicity of Poisons Applied Jointly. Annals of Applied Biology 1939, Vol 26, Issue 3, August 1939)。该模型设想独立地利用下式计算两个化合物的组合响应：

[0124] 得分 (score) = $E_a + E_b - (E_a * E_b)$

[0125] 其中 E_a 是化合物 A 的效果 (或抑制率), 并且 E_b 是化合物 B 的效果。将两个化合物的组合的最终效果与它们通过 Bliss 预测的相加作用相比, 沿着响应曲线得到每个剂量的协同分数。

[0126] 3. 组合指数 (CI) - 用于评价协同效应的第三个准则是来自 Chou 和 Talalay 的组合指数 (CI) (Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul. 1984; 22: 27-55)。下列公式是用于以不同作用机理作用的化合物的模型 (彼此非排他性公式)。

[0127]

$$\text{组合指数 (Combination Index)} = \frac{D_a \text{ 在 } a:b \text{ 中}}{IC_{50(a)}} + \frac{D_b \text{ 在 } a:b \text{ 中}}{IC_{50(b)}} + \frac{(D_a \text{ 在 } a:b \text{ 中})(D_b \text{ 在 } a:b \text{ 中})}{(IC_{50(a)})(IC_{50(b)})}$$

[0128] CI 值越低组合可能具有的协同效应越大。CI 大于 1 表示所研究的组合可能是拮抗的。对于 25% (IC_{25}) 和 75% (IC_{75}) 的抑制浓度的 CI 得分还可通过将上式中每个化合物的 IC_{50} 用各自的抑制浓度代替得到。

[0129] 将强度百分比值用于 Microsoft Excel 软件的 IDBS XLfit plug-in 的模型 205 中, 从而利用 4 参数逻辑拟合计算出 gIC_{50} 值。生长窗的中点 (gIC_{50}) 处于加入化合物之时 ($T=0$) 的细胞数目和用 DMSO 处理的对照细胞生长 72 小时之时的细胞数目之间的中点。将响应曲线底部的强度值 (Y_{min}) 除以在零点时的细胞数 (T_0) 得到细胞死亡的量度 (Y_{min}/T_0)。 Y_{min}/T_0 低于 1 的值表明与更高的值相比该治疗对诱导细胞死亡具有更强的能力。

[0130] 对于 EOHSa 和 Bliss, 协同效应得分必须在实验中的两个技术重复试验中均观察到, 从而才可以适当地确定 (协同效应、适中的协同效应等)。每个组合实验包含将两个化合物作为单个药物的重复试验, 以及该组合的技术重复试验 (technical replicate)。

[0131] 在极低浓度 (例如剂量 1、剂量 2) 下, EOHSa 和 Bliss 的协同效应得分变化较大, 通常从分析中排除。相反地, 在最高浓度 (剂量 10) (远落在治疗剂量的范围之外) 下的协同效应得分通常从分析中排除, 因为认为观察的效果更易于发生偏离目标的事件。

[0132] 针对 EOHSa 和 Bliss 协同效应测量, 针对每个剂量沿着响应曲线产生得分。将得分分类为“拮抗效应” (<-10)、“相加效应” ($-10 \sim 10$)、“适中的协同效应” ($10 \sim 20$) 或“协同效应” (>20)。取决于解释哪一个模型, 这些得分反映超过最高药物的百分比或高于 Bliss 相加的百分比。

[0133] 对于组合指数, CI 越低, 组合可能具有越大的协同效应。得分为 $0 \sim 0.7$ 被认为是协同效应, 而得分在 $0.7 \sim 0.9$ 被认为是适中的协同效应。对于组合指数, 所有其它得分表示不表示协同效应。

[0134] 对于组合中有 1 种化合物未达到 25% 的抑制浓度的那些细胞系, 不能计算 CI 值, 在 CI 一栏标出的是“NA”。

[0135] 细胞系突变数据

[0136] 针对 KRAS、BRAF、PIK3CA 以及 PTEN 基因的情况, 对点突变数据进行了整理。数

据源是以癌症数据库体细胞突变目录 (Catalog of Somatic Mutations in Cancer database) (COSMIC) 的一部分发表的癌症细胞系突变筛选数据 (Bamford S. et al. Br. J. Cancer. 2004. 91:355-58)。为了保证用于增殖分析的细胞系的鉴定与 COSMIC 数据库中的相符,对在敏感性筛选中的那些细胞系和 COSMIC 中的那些细胞系进行了基因型的比较。具体地,如下进行:

[0137] 1. 使用 Affymetrix 500K ‘SNP Chip’ (Affymetrix, Inc., Sunnyvale, CA) 以及 RLMM 算法 (Rabbee & Speed, Bioinformatics, 2006. 22:7-12) 计算每个细胞系的基因型。

[0138] 2. 鉴定每个细胞系与对于每个具有 COSMIC 中的突变分布的那些预先计算的细胞系的基因型匹配。

[0139] 3. 基于基因型匹配来对于每个细胞系确定突变状态。

[0140] 结果

[0141] 在细胞系的亚类中,所有基因均突变。在 60%(15/25) 的样品中发现了 KRAS 基因突变,而在 40%(10/25) 样品中发现了 PIK3CA 基因突变,在 20%(5/25) 样品中发现了 BRAF 基因突变,在 4%(1/25) 的细胞系中发现了 PTEN 基因突变(数据参见表 1)。

[0142] 对于利用 PI3K 抑制剂化合物 B 和 BRAF 抑制剂化合物 A 的组合处理的每个细胞系,进行了协同效应程度的复杂分类。明显地,由于数据质量较低,将细胞系 SW1116 从分析中排除。当至少一个量度被评分为协同效应时,认为细胞系具有协同效应。通过该准则,细胞系中的 54%(13/24) 显示协同效应。 $Y_{\min}/T_0$ 比值,与更高的值比较,该值 <1 显示更高的细胞净细胞死亡 (cell netcell death),与最具细胞毒性的单个药物比较在细胞系的 79%(19/24) 中该值降低。组合给药化合物 A 和 B 得到在细胞系的 71%(17/24) 中 $Y_{\min}/T_0$ 比例 <1 。结肠癌细胞系的协同效应和细胞毒性数据列在表 2 中。

[0143] 表 1. 在组合研究中使用的一组结肠癌细胞系的得分

细胞系	诊断/组织学	KRAS	PIK3CA	BRAF	PTEN
HT29	癌	WT	1345C>A	1799T>A	WT
SW948	腺癌	182A>T	1624G>A	WT	WT
T84	癌	38G>A	1624G>A	WT	WT
HCT15	腺癌	38G>A	1633G>A	WT	WT
HCT8	腺癌	38G>A	1633G>A	WT	WT
DLD1	癌	38G>A	1633G>A	WT	WT
NCIH508	腺癌	WT	1633G>A	1786G>C	WT
LS174T	腺癌	35G>A	3140A>G	WT	WT
HCT116	癌	38G>A	3140A>G	WT	WT
RKO	癌	WT	3140A>G	1799T>A	WT
SW1463	癌	34G>T	WT	WT	WT
SW837	腺癌	34G>T	WT	WT	WT
[0144] SW1116	癌	35G>C	WT	WT	WT
SW480	腺癌	35G>T	WT	WT	WT
SW403	癌	35G>T	WT	WT	WT
NCIH747	腺癌	38G>A	WT	WT	WT
LS1034	腺癌	436G>A	WT	WT	WT
HCC2998	癌	436G>A	WT	WT	WT
NCIH716	腺癌	WT	WT	WT	WT
NCIH630	腺癌	WT	WT	WT	WT
KM12	腺癌	WT	WT	WT	800delA, 385G>T
SW48	腺癌	WT	WT	WT	WT
COLO320DM	腺癌	WT	WT	WT	WT
COLO205	腺癌	WT	WT	1799T>A	WT
SW1417	腺癌	WT	WT	1799T>A	WT

[0145] 表 1 关键词

[0146] 细胞系 = 细胞系名称

[0147] 诊断 / 组织学 = 组织的病理诊断

[0148] KRAS/BRAF/PIK3CA/PTEN= 突变状态 ;WT= 野生型

[0149] 表 2. 对于每个结肠癌细胞系的基本测量和协同效应

[0150]

细胞系	化合物 A		化合物 B		组合		协同效应量度		
	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min} / T ₀	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min} / T ₀	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min} / T ₀	EOHSA	BLISS	组合指数
COLO205	7.3	1.2	12.0	1.4	2.7	<0.1	适中	无协同效应	协同效应
COLO320									
DM	>10000	4.9	4.7	1.5	8.2	1.2	适中	无协同效应	协同效应
DLD1	198.6	6.7	20.5	1.8	66.4	1.1	协同效应	无协同效应	协同效应
HCC2998	2396.1	2.8	4.7	0.9	19.3	0.7	适中	无协同效应	无协同效应
HCT116	>10000	9.2	34.2	4.1	94.2	1.3	协同效应	无协同效应	协同效应
HCT15	>10000	6.1	7.2	2.4	48.9	1.3	无协同效应	适中	
HCT8	>10000	9.2	8.4	1.6	42.9	1.3	适中	适中	
HT29	17.2	4.0	7.4	2.0	4.0	0.8	适中	适中	协同效应
KM12	>10000	8.8	22.1	1.4	373.4	1.7	无协同效应	无协同效应	
LS1034	>10000	1.9	1.4	0.5	3.6	0.5	适中	无协同效应	
LS174T	>10000	7.0	34.1	0.8	332.9	0.8	混合的	协同效应	
NCIH508	365.6	2.1	1.2	0.5	4.2	0.4	适中	适中	协同效应
NCIH630	5000.0	1.9	18.3	0.9	2.4	0.7	协同效应	协同效应	
NCIH716	>10000	1.3	1.1	0.7	0.1	0.5	适中	适中	协同效应
NCIH747	>10000	1.3	2.7	0.5	0.2	0.2	协同效应	协同效应	协同效应
RKO	8951.3	6.7	10.9	3.0	15.1	0.3	协同效应	协同效应	
SW1417	245.6	1.1	1.4	1.3	0.6	0.6	协同效应	适中	协同效应
SW1463	>10000	1.9	8.2	0.9	142.5	0.5	适中	协同效应	
SW403	>10000	2.7	1.5	0.5	7.4	0.5	无协同效应	无协同效应	
SW48	>10000	4.7	2.6	0.4	29.4	0.7	适中	适中	
SW480	>10000	2.9	5.4	1.1	93.5	1.1	协同效应	适中	
SW837	>10000	2.3	6.4	0.8	8.3	0.5	适中	适中	
SW948	>10000	1.5	0.3	0.4	1.3	0.4	无协同效应	无协同效应	
T84	>10000	2.0	6.0	0.7	5004.7	0.6	无协同效应	适中	

[0151] 表 2 关键词:

[0152] 细胞系 = 肿瘤衍生的细胞系

[0153] gIC₅₀ = 引起 50% 生长抑制所需的化合物浓度 (nM)

[0154] Y_{min} = 在存在化合物 B 时的最小细胞生长 (相对于 DMSO 对照), 以 T=0 (化合物 B 添加时的细胞数量) 时的百分比表示。负数表示相对于 T=0 时细胞的净损失 (net loss)。

[0155] Y_{min}/T₀ = Y_{min} 值除以 T₀ 值, 其中 Y_{min} 是得自浓度响应曲线且 T₀ 值表示在化合物添加时的细胞的数量 (CTG 测量值)。

[0156] EOHSA = 超过最高单药物量的量度

[0157] BLISS = Bliss 协同效应量度

[0158] Comb 指数 = 组合指数得分

[0159] 研究 #2 : BRAF (化合物 A) 和 PI3K 抑制剂 (化合物 B) 对于来自编码在 MAPK 和 AKT/PI3K 途径中的不同突变的多种来源的癌症细胞系的体外组合研究

[0160] 在 384 孔板中进行了药物组合实验。在适合每种细胞类型的补充了 10%FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素的培养基中以 500 细胞 / 孔将细胞铺板, 并在 37°C、5%CO₂ 温育过夜。以矩阵的方式检测了 16 种浓度的每个药物的 2 倍稀释液对细胞生长的抑制。针对 BRAF 抑制剂化合物 A 的试验浓度为 10 μM~0.3nM, 且针对 PI3K 抑制剂 (化合物 B) 为 5 μM~0.15nM。用化合物组合处理细胞并在 37°C 温育 72 小时。使用 CellTiter-Glo® 试剂根据制造商的实

验规范测量细胞生长,在 PerkinElmer EnVision™ 读取器上读取信号(设定为发光模式,0.5 秒一个读数)。结果是以相对于利用 DMSO 处理的细胞的抑制百分比的形式表示的,并且背景校正通过减去不含细胞的孔中的值来进行。

[0161] 针对该研究的目的,使用超过最高单药物的量 (EOHSA) 来确定每个化合物之间的协同效应的程度。关于 EOHSA 计算的详细描述可以参照上文。简单来说,将化合物 A 在“a”浓度的响应 (R_a) (相对于未处理样品的抑制百分比且针对培养基归一化) 以及化合物 B 在“b”浓度的响应 (R_b) 与化合物 A 和化合物 B 的混合物分别在浓度“a”和“b”的响应 (R_{ab}) 进行比较。公式:

[0162] R_{ab} 比 R_a 和 R_b 中较高值大 10%= 相加效应

[0163] R_{ab} 比 R_a 和 R_b 中较高值小 10%= 拮抗效应

[0164] 使用该公式,如果 R_{ab} 高于 R_a 和 R_b 中最高值 10% 或更多,则认为药物组合具有“相加效应”。如果 R_{ab} 小于 R_a 和 R_b 中最高值 10% 或更多,则认为药物组合具有“拮抗效应”。在这种情况下,与“拮抗效应”细胞系相比,认为“相加效应”细胞系更具有协同效应。

[0165] 在 16X16 矩阵中响应与组合处理的相加效应方式的组合的数列举和总结在表 3 中。在该表中,我们标出对于给定细胞系更为有益的组合(灰色方框)>测试组合中的 20%(256 个测试的组合中的 51 个组合)显示相加效应,通过其大于 10% 超过最高单药物的量 (10%EOHSA) 来确定。

[0166] 表 3 :PI3K 和 BRAF 抑制剂对于多种癌症细胞系的组合效应

[0167]

来源	细胞系	MAPK	PI3K/PTEN	药物组合# w EOHSA	大于 EOHSA 的%
皮肤癌	A375P	BRAF ^{V600E}	WT/WT	101	39
结肠癌	RKO	BRAF ^{V600E}	H1047R/WT	126	49
皮肤癌	A101D	BRAF ^{V600E}	WT/ G165_*404dc	68	27
皮肤癌	SK-MEL-5	BRAF ^{V600E} NRAS ^{G12V}	WT/inc	110	43
肺癌	A-549	KRAS ^{G12S}	WT/WT	39	15
结肠癌	LoVo	KRAS ^{G13D}	WT/WT	50	20
结肠癌	HCT116	KRAS ^{G13D}	H1047R/WT	51	20
皮肤癌	SK-MEL-2	NRAS ^{Q61R}	WT/WT	62	24
肺癌	H1299	NRAS ^{Q61R}	WT/WT	67	26
肉瘤	HT-1080	NRAS ^{Q61K}	WT/WT	89	35
乳腺癌	MDA-MB-231	NRAS ^{Q61K}	WT/WT	88	34

[0168] 这些数据表明 PI3K 和 BRAF 抑制剂的组合对于多种癌症细胞系是有效的,多种癌症细胞系是来自独立于在 MAPK 或 AKT/PI3K 途径中的关键癌基因的突变状态的多种来源,因为多种药物组合 (>20%) 显示抑制活性 >10% 超过最高单药物的量 (EOHSA)。

[0169] 研究 #3 :化合物 A、化合物 B 和它们的组合在肿瘤细胞系中的体外细胞生长抑制

[0170] 方法：

[0171] 细胞系和生长条件

[0172] 黑素瘤 A375PF11 细胞系来自 A375(ATCC)。12R5-1、12R5-3、12R8-1、12R8-3、16R5-2、16R6-3 和 16R6-4 为来自 A375PF11 细胞的混合种群的单细胞克隆,选择其在浓度 1200 和 1600nM 的化合物 A 中生长。所有的细胞系在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 培养基中培养。

[0173] 细胞生长抑制检测和组合数据分析

[0174] 所有的细胞均至少培养 72 小时,然后细胞铺板。在对所有细胞都在含 10%FBS 的 RPMI 培养基的 96 孔组织培养板 (NUNC 136102) 中以 1000 细胞 / 孔检测细胞。铺板后约 24 小时,使细胞暴露于化合物的十个三倍的系列稀释液,或者暴露于在含 10%FBS 的 RPMI 培养基中的,以化合物 A 对化合物 B 的恒定摩尔比为 1:10 的这两个药物的组合十个三倍系列稀释液。细胞在化合物的存在下温育 3 天。通过添加 Cell Titer Glo® (Promega) 根据制造商的实验规范确定 ATP 水平。简单来说,将 Cell Titer Glo® 加入各板中,温育 30 分钟,然后在 SpectraMax L 光吸收酶标仪上读取发光信号 (0.5 秒整合时间)。

[0175] 在用化合物或各化合物的组合处理三天后,与用载体 (DMSO) 处理的细胞比较信号,以此评估细胞生长的抑制。计算相对于用载体 (DMSO) 处理的对照孔细胞的细胞生长。当 $y=50\%$ 载体对照时用非线性回归内插 (interpolate) 得到抑制 50% 对照细胞生长的化合物浓度 (IC_{50}), 公式为 $y=(A+(B-A)/(1+(C/x)^D))$, 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 (EC_{50}), D 为希尔系数 (Hill coefficient)。

[0176] 对效能的组合作用使用组合指数 (CI) 评估,组合指数使用后向插入 (back-interpolated) 的 IC_{50} 值以及 Chou 和 Talalay 推导的彼此非排他性方程计算 (Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 1984; 22: 27-55.)。对 CI 的详细描述参见上文。一般而言, CI 值 <0.9 , 在 0.9 和 1.1 之间, 或者 >1.1 , 分别表明协同效应、相加效应和拮抗效应。一般而言, CI 数越小, 协同效应的强度越大。

[0177] 对响应程度的组合作用通过超过最高单药物的量 (EOHSA) 定量表示,其基于非线性混合的概念,如 Peterson 和 Novick (2007), 以及 Peterson (2010) [Peterson JJ, Novick SJ. J Recept Signal Transduct Res 2007; 27 (2-3) :125-46, Peterson J. Frontiers of Bioscience S2, 483-503. 2010] 所详细描述。EOHSA 值定义为,由所述组合产生的相比于最佳单个药物在该组合中的组分剂量水平时的改善的增加 (在此,表示为“百分点”(ppt) 差异)。对于 EOHSA 的计算的详细描述参见上文。对于单个药物和组合治疗,将细胞暴露于固定的剂量比的化合物,并且将剂量响应曲线拟合于实验数据,并且使用回归模型进行分析。沿着剂量响应曲线在指定的 IC_{50} 总剂量水平处,确定剂量组合 (相应于 IC_{50}) 以作出 EOHSA 统计学结论。更具体地,对于涉及以剂量 d1 的药物 1 和以剂量 d2 的药物 2 的组合药物实验, (即总剂量等于 $d1+d2$), 如果组合时的平均响应好于对剂量 d1 的药物 1 或剂量 d2 的药物 2 的平均响应,被认为具有正 EOHSA。

[0178] 结果：

[0179] 在一组人黑素瘤细胞系中确定 BRAF 抑制剂化合物 A、PI3K 抑制剂化合物 B 和它们

的组合对于细胞生长抑制的作用。关于 BRAF 突变状态的平均 IC_{50} (来自至少两个独立的实验) 和各 IC_{50} 处的组合作用总结于表 4 中。具有 BRAF V600E 突变的 A375PF 11 细胞对于化合物 A ($IC_{50}=0.059 \mu M$) 或化合物 B ($IC_{50}=0.048 \mu M$) 单个药物均高度敏感。通过 A375PF11 细胞中的 CI 值 0.74 说明化合物 A 和化合物 B 的组合具有协同效应。对于单个化合物 B, 7 个化合物 A 抗性克隆 (来自 A375PF11 黑素瘤细胞系的 12R8-3、12R8-1、12R5-3、16R5-2、16R6-3、16R6-4 和 12R5-1) 显示 $0.041 \sim 0.212 \mu M$ 范围的 IC_{50} , 对于化合物 A 和化合物 B 的组合具有针对化合物 A 范围为 $0.256 \sim 0.731 \mu M$ 的 IC_{50} , 和针对化合物 B 范围为 $0.026 \sim 0.073 \mu M$ 的 IC_{50} 。化合物 A 和化合物 B 的组合在黑素瘤细胞系中显示出提高的细胞生长抑制, 其 EOHSa 值在 3~34ppt 之间。

[0180] 表 4. 化合物 A、化合物 B 和它们的组合在人肿瘤细胞系中对细胞生长的抑制

[0181] 表 4.

[0182]

肿瘤细胞系		突变状态	IC ₅₀ 值, 微摩尔 (平均值 ± 标准差)				在 IC ₅₀ 处的 组合作用	
			单个药物		化合物 A 或 B=10:1 摩尔比组合			
		KRAS/BRAF	化合物 A	化合物 B	化合物 A	化合物 B	CI	EOHSA (ppt)
黑素瘤	A375PF11	BRAF_V600E	0.059 ± 0.011	0.048 ± 0.009	0.044 ± 0.019	0.004 ± 0.002	0.74 ± 0.03	8 ± 2
	12R5-1	BRAF_V600E	>10	0.212 ± 0.038	0.643 ± 0.227	0.064 ± 0.023	N/A	34 ± 1
	12R5-3	BRAF_V600E	>10	0.088 ± 0.002	0.505 ± 0.085	0.050 ± 0.009	N/A	12 ± 2
	12R8-1	BRAF_V600E	>10	0.103 ± 0.016	0.680 ± 0.182	0.068 ± 0.018	N/A	10 ± 2
	12R8-3	BRAF_V600E	>10	0.129 ± 0.024	0.612 ± 0.008	0.061 ± 0.001	N/A	23 ± 4
	16R5-2	BRAF_V600E	>10	0.041 ± 0.018	0.256 ± 0.057	0.026 ± 0.006	N/A	7 ± 3
	16R6-3	BRAF_V600E	>10	0.080 ± 0.017	0.731 ± 0.204	0.073 ± 0.020	N/A	3 ± 3
	16R6-4	BRAF_V600E	>10	0.061 ± 0.010	0.408 ± 0.031	0.041 ± 0.003	N/A	13 ± 6

[0183] 表 4 关键词:

[0184] IC_{50} : 化合物以单个药物时的浓度, 或者化合物 A 或化合物 B 在当化合物 A 和化合物 B=10:1 摩尔比的组合中的浓度, 该浓度减少细胞生长 50%;

[0185] CI; 组合指数; N/A= 无法获得

[0186] EOHSa: 超过最高单药物的量, 以百分比形式测定。

[0187] 实施例 1- 胶囊组合物

[0188] 按照下面表 I 中所示比例, 将各成分填充标准双部分硬明胶胶囊中, 制备用于给药本发明组合的口服剂型。

[0189] 表 I

[0190]

<u>成分</u>	<u>量</u>
N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺(化合物 A)	100mg
2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(化合物 B)	10mg
甘露醇	250 mg
滑石	50 mg
硬脂酸镁	20 mg

[0191] 实施例 2- 胶囊组合物

[0192] 按照下面表 II 中所示比例,将各成分填充标准双部分硬明胶胶囊中,制备用于给药本发明化合物之一的口服剂型。

[0193] 表 II

[0194]

<u>成分</u>	<u>量</u>
N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺(化合物 A)	100mg
甘露醇	200 mg
滑石	320 mg
硬脂酸镁	80 mg

[0195] 实施例 3- 胶囊组合物

[0196] 按照下面表 III 中所示比例,将各成分填充标准双部分硬明胶胶囊中,制备用于给药本发明化合物之一的口服剂型。

[0197] 表 III

[0198]

<u>成分</u>	<u>量</u>
2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(化合物 B)	10mg

[0199]

甘露醇	50mg
滑石	25mg
硬脂酸镁	2mg

[0200] 实施例 4- 片剂组合物

[0201] 用 10% 的明胶溶液,将下面表 IV 所示的蔗糖、微晶纤维素和本发明组合中的化合物按所示的比例混合和造粒。将湿的颗粒筛分,干燥,并与淀粉、滑石和硬脂酸混合;然后筛

分并压制成片剂。

[0202] 表 IV

[0203]

成分	量
N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺(化合物 A)	100mg
2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(化合物 B)	10mg
微晶纤维素	250mg
蔗糖	50mg
淀粉	50mg
滑石	20mg
硬脂酸	2mg

[0204] 实施例 5- 片剂组合物

[0205] 用 10% 的明胶溶液,将下面表 V 所示的蔗糖、微晶纤维素和本发明组合中的一种化合物按所示的比例混合和造粒。将湿的颗粒筛分,干燥,并与淀粉、滑石和硬脂酸混合;然后筛分并压制成片剂。

[0206] 表 V

[0207]

成分	量
N-{3-[5-(2-氨基-4-嘧啶基)-2-(1,1-二甲基乙基)-1,3-噻唑-4-基]-2-氟苯基}-2,6-二氟苯磺酰胺(化合物 A)	100mg
微晶纤维素	300mg
蔗糖	40mg
淀粉	20mg
滑石	10mg
硬脂酸	5mg

[0209] 实施例 6- 片剂组合物

[0210] 用 10% 的明胶溶液,将下面表 VI 所示的蔗糖、微晶纤维素和本发明组合中的一种化合物按所示的比例混合和造粒。将湿的颗粒筛分,干燥,并与淀粉、滑石和硬脂酸混合;然后筛分并压制成片剂。

[0211] 表 VI

[0212]

<u>成分</u>	<u>量</u>
2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(化合物 B)	10mg
微晶纤维素	60mg
蔗糖	5mg
淀粉	10mg
滑石	5mg
硬脂酸	2mg

[0213] 尽管上面已经说明了本发明的优选实施方案,但是应当理解,本发明并不限于本文中所公开的明确说明,而且保留在权利要求书范围内的所有修改的权利。

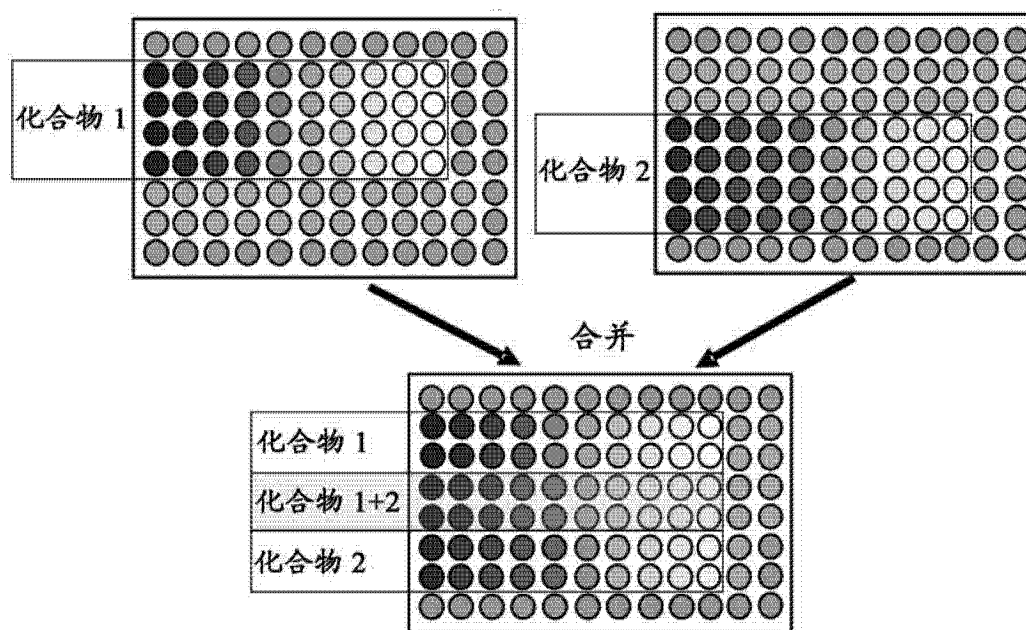


图 1. 在 96 孔板中给药的固定浓度的平板排列示例