



(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 I755406 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：106122543 (22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 05 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/4375 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
C07K16/28 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2016/07/05 世界智慧財產權組織 PCT/CN2016/088591

(71)申請人：英屬開曼群島商百濟神州有限公司 (開曼群島) BEIGENE, LTD (KY)
 開曼群島

(72)發明人：李 康 LI, KANG (US) ; 宋 競 SONG, JING (CN) ; 張 彤 ZHANG, TONG (CN) ; 羅
 侶松 LUO, LUSONG (CN) ; 魏 旻 WEI, MIN (CN) ; 湯 志 宇 TANG, TRISTIN
 (CN) ; 汪 來 WANG, LAI (US) ; 張 國 良 ZHANG, GUOLIANG (CN) ; 周 昌 友
 ZHOU, CHANGYOU (US)

(74)代理人：葉璟宗；卓俊傑

(56)參考文獻：
 JP 2015506353A US 8735553B1

審查人員：唐韶璞

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：6 共 53 頁

(54)名稱

包含 PD-1 拮抗劑和 RAF 抑制劑的藥物組合的用途

(57)摘要

本申請公開了用於預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的藥物組合，其中所述藥物組合展現出協同功效。所述藥物組合包含針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體和 RAF 抑制劑。本申請還公開了用於在受試者中預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的方法，其包括向所述受試者施用治療有效量的針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體和治療有效量的 RAF 抑制劑。

Disclosed herein is a pharmaceutical combination for use in the prevention, delay of progression or treatment of cancer, wherein the pharmaceutical combination exhibits a synergistic efficacy. The pharmaceutical combination comprises a humanized antagonist monoclonal antibody against PD-1 and a RAF inhibitor. Also disclosed herein is a combination for use in the prevention, delay of progression or treatment of cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a humanized antagonist monoclonal antibody against PD-1 and a therapeutically effective amount of a RAF inhibitor.



I755406

【發明摘要】

【中文發明名稱】

包含PD-1拮抗劑和RAF抑制劑的藥物組合的用途

【英文發明名稱】

USE OF COMBINATION OF A PD-1 ANTAGONIST AND A RAF INHIBITOR

【中文】本申請公開了用於預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的藥物組合，其中所述藥物組合展現出協同功效。所述藥物組合包含針對PD-1的人源化拮抗劑單克隆抗體和RAF抑制劑。本申請還公開了用於在受試者中預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的方法，其包括向所述受試者施用治療有效量的針對PD-1的人源化拮抗劑單克隆抗體和治療有效量的RAF抑制劑。

【英文】Disclosed herein is a pharmaceutical combination for use in the prevention, delay of progression or treatment of cancer, wherein the pharmaceutical combination exhibits a synergistic efficacy. The pharmaceutical combination comprises a humanized antagonist monoclonal antibody against PD-1 and a RAF inhibitor. Also disclosed herein is a combination for use in the prevention, delay of progression or treatment of cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a

humanized antagonist monoclonal antibody against PD-1 and a therapeutically effective amount of a RAF inhibitor.

【指定代表圖】無。

【代表圖之符號簡單說明】無。

【特徵化學式】無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

包含PD-1拮抗劑和RAF抑制劑的藥物組合的用途

【英文發明名稱】

USE OF COMBINATION OF A PD-1 ANTAGONIST AND A RAF INHIBITOR

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種 PD-1 拮抗劑和 RAF 抑制劑，且特別是有關於一種用於治療癌症的 PD-1 拮抗劑和 RAF 抑制劑的組合。

【0002】 本申請要求國際申請 PCT/CN2016/088591 的優先權，通過引用將其全部內容併入本申請。

【0003】 本申請公開了用於預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的藥物組合，其中所述藥物組合展現出協同功效。所述藥物組合包含針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體和 RAF 抑制劑。本申請還公開了用於在受試者中預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的方法，其包括向所述受試者施用治療有效量的針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體和治療有效量的 RAF 抑制劑。

【先前技術】

【0004】 由 RAS-RAF-MEK-ERK 激酶級聯構成的絲裂原活化蛋白激酶(MAPK)信號傳導途徑是調節多種細胞活性諸如細胞存活、生

109-6-29

長、分化和增殖的關鍵信號轉導途徑之一。通常在人類癌症中觀察到導致 MAPK 途徑組成性活化的遺傳畸變。已在多種人類惡性腫瘤中檢測到致癌性 B-Raf 突變，其中 V600E 突變占至少 90%。選擇性靶向於突變的 B-Raf 的抑制劑諸如威羅菲尼(vemurafenib)和達拉菲尼(dabrafenib)已實現高響應率並被 FDA 批准用於治療攜帶 B-Raf^{V600E} 的黑素瘤患者。先前的研究表明 B-Raf 靶向療法可增加抗原表達，降低腫瘤微環境中的免疫抑制因子並改善 T 效應細胞向腫瘤的歸巢。因此，選擇性 B-Raf 抑制劑被認為具有免疫增敏性質並可與免疫療法聯用以在治療癌症中實現較持久的疾病控制/響應。

【0005】 程序性死亡 1 蛋白(PD-1、Pdc1-1 或 CD279)是一種與 CD28/CTLA4 共刺激/抑制受體家族相關的 55KD 受體蛋白(Blank 等人, 2005 *Cancer Immunol Immunother* 54:307-314)。全長 PD-1 含有 288 個氨基酸殘基(NCBI 登錄號: NP_005009)。它的細胞外結構域由氨基酸殘基 1-167 構成且胞質 C 末端尾部包含殘基 191-288，其具有兩個假設的免疫調節基序即一個基於免疫受體酪氨酸的抑制基序(ITIM; Vivier 等人, 1997 *Immunol Today* 18:286-291)和一個免疫受體酪氨酸切換基序(ITSM; Chemnitz 等人, 2004 *J Immunol* 173:945-954)。

【0006】 已鑒定了兩種與序列相關的配體即 PD-L1(B7-H1)和 PD-L2(B7-DC)與 PD-1 特異性相互作用，由此誘導細胞內信號轉導，其抑制由 CD3 和 CD28 介導的 T 細胞活化(Riley, 2009 *Immunol*

Rev 229:114-125)，這又減弱 T 細胞活性，例如減少細胞增殖、IL-2 和 IFN- γ 分泌及其它生長因子和細胞因子分泌。

【0007】 經常在諸如 T 細胞、B 細胞、單核細胞和天然殺傷(NK)細胞的免疫細胞中發現 PD-1 的表達。其很少在諸如肌肉、上皮、神經元組織等的其它人類組織中表達。另外，高水平的 PD-1 表達常常與免疫細胞的活化相關。例如，當人 T 細胞系 Jurkat 通過植物血凝素(PHA)或佛波醇酯(12-O-十四醯基佛波醇-13-乙酸酯或 TPA)來活化時，在 Western 印跡中可見 PD-1 表達的上調(Vibharka 等人, 1997 Exp Cell Res 232:25-28)。當通過抗 CD3 抗體進行刺激時，在經刺激的鼠類 T 和 B 淋巴細胞及原代人類 CD4⁺T 細胞中觀察到相同的現象(Agata 等人, 1996 Int Immunol 8:765-772; Bennett 等人, 2003 J Immunol 170:711-118)。PD-1 表達在刺激 T 效應細胞後的增加再次使活化的 T 效應細胞趨向於耗竭和減少免疫活性。因此，由 PD-1 介導的抑制信號在免疫耐受中發揮重要作用(Bour-Jordan 等人, 2011 Immunol Rev 241:180-205)。

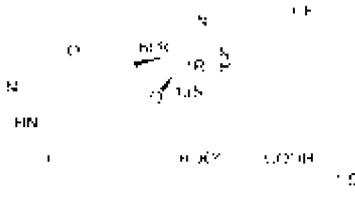
【0008】 在涉及不同類型組織和器官的多種癌症中報告了 PD-1 表達在腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)中的增加和 PD-1 配體表達在腫瘤細胞中的增加，所述組織和器官為諸如肺(Konishi 等人, 2004 Clin Cancer Res 10:5094-5100)、肝(Shi 等人, 2008 Int J Cancer 128:887-896; Gao 等人, 2009 Clin Cancer Res 15:971-979)、胃(Wu 等人, 2006 Acta Histochem 108:19-24)、腎(Thompson 等人, 2004 Proc Natl Acad Sci 101:17174-17179; Thompson 等人, 2007 Clin

109-6-29

Cancer Res 13:1757-1761)、乳腺(Ghebeh 等人, 2006 Neoplasia 8:190-198)、卵巢(Hamanishi 等人 2007 Proc Natl Acad Sci 104:3360-3365)、胰腺(Nomi 等人, 2007 Clin Cancer Res 13:2151-2157)、黑素細胞(Hino 等人, 2010 Cancer 116:1757-1766)和食道(Ohigashi 等人, 2005 Clin Cancer Res 11:2947-2953)。更經常地, PD-1 和 PD-L1 表達在那些癌症中的增加與患者生存結果的不良預後是相關的。敲除 PD-1 基因由此抑制異體移植癌細胞生長的轉基因小鼠進一步闡明了 PD-1 信號傳導在用於癌症根治或耐受的免疫系統調節中的重要性(Zhang 等人, 2009 Blood 114:1545-1552)。

【0009】 WO2013/097224A1 公開了第二代 B-RAF 抑制劑, 其已表現出針對 RAF 家族的絲氨酸/蘇氨酸激酶的強效抑制活性。

【0010】 PCT 申請 PCT/CN2016/079251 在 WO2013/097224A1 中公開了第二代 B-RAF 抑制劑的藥用鹽, 具體為 5-(((1R,1aS,6bR)-1-(6-(三氟甲基)-1H-苯並[d]咪唑-2-基)-1a,6b-二氫-1H-環丙並[b]苯並呋喃-5-基)氧基)-3,4-二氫-1,8-二氮雜萘-2(1H)-酮倍半馬來酸鹽(以下稱為化合物 1), 其用於治療在 RAF-MEK-ERK MAPK 途徑中具有畸變(包括 B-Raf 突變、K-Ras/N-Ras 突變和 NF1 突變)的癌症, 其具有針對 RAF 家族激酶(包括 A-Raf、B-Raf、C-Raf 和 B-Raf^{V600E})的強效和可逆抑制活性。



化合物 1

【0011】 WO2015/035606A1 公開了包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)(分別包含 SEQ ID No 24 和 SEQ ID No 26)及 IgG4 重鏈效應子或恒定結構域(包含 SEQ ID NO: 88)的單克隆抗體(以下稱為 Mab 1)，其特異性結合 PD-1，尤其是包含 K45 和 I93 或 I93、L95 和 P97 的 PD-1 殘基且在免疫細胞中抑制由 PD-1 介導的細胞信號傳導和活性，結合至其配體結合所需要的一組氨基酸殘基的抗體。

【0012】 本申請發明人已發現上述抗 PD1 抗體(即 Mab 1)及其抗體片段與選擇性 B-Raf 抑制劑(即化合物 1)的組合令人驚訝且預料不到地在患有與 K-Ras 突變相關的癌症的受試者中通過增加 IFN- γ 產生而增強 T 細胞響應。具體地，本申請發明人已預料不到地發現具體的抗 PD1 抗體(即 Mab 1)和具體的選擇性 B-Raf 抑制劑(即化合物 1)的組合與單獨的所述抗 PD1 抗體或 B-Raf 抑制劑的單一療法相比在與 K-Ras 突變相關的癌症中實現對腫瘤生長的協同抑制。

【發明內容】

【0013】 在第一個方面，本申請公開了用於預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的藥物組合，其包含針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體和 RAF 抑制劑。所述藥物組合在抑制癌症的腫瘤生長中

產生協同功效。

【0014】 在第二個方面，本申請公開了用於在受試者中預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的方法，其包括向有此需要的受試者施用治療有效量的針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體和治療有效量的 RAF 抑制劑。

【0015】 在第三個方面，本申請公開了針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體，其用於與 RAF 抑制劑組合以預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症。在該方面的一個實施方案中，本申請公開了 RAF 抑制劑，其用於與針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體組合以預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症。

【0016】 在第四個方面，本申請公開了藥物組合在製備用於預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的藥物中的用途，所述藥物組合包含針對 PD-1 的人源化拮抗劑單克隆抗體和 RAF 抑制劑。

【0017】 在第五個方面，本申請公開了製品或“試劑盒”，其包含第一容器、第二容器和包裝插頁，其中所述第一容器包含至少一個劑量的包含 PD-1 拮抗劑的藥物，所述第二容器包含至少一個劑量的包含 RAF 抑制劑的藥物且所述包裝插頁包含使用所述藥物用於治療受試者癌症的說明。

【圖式簡單說明】

【0018】

圖 1 顯示了用單獨的 RAF 抑制劑或用 RAF 抑制劑與抗 PD-1

109-6-29

mAb 的組合進行治療後腫瘤球體/PBMC 共培養體系中活化的 PBMC 所產生的 IFN- γ 的水平。

圖 2 顯示了 RAF 抑制劑和抗 PD-1 mAb 在人 PBMC 存在下對 Calu-6 異種移植模型中腫瘤生長的組合作用。

圖 3 顯示了 RAF 抑制劑和抗 PD-1 mAb 在人 PBMC 存在下對人原發性結腸癌 BCCO-028 異種移植模型中腫瘤生長的組合作用。

圖 4 顯示了呈結晶形式(從異丙醇/水中結晶)的化合物 1 的 X 射線衍射圖。

圖 5 顯示了化合物 1 的結晶形式的 $^1\text{H-NMR}$ 譜。

圖 6 顯示了化合物 1 的結晶形式的 $^{13}\text{C-NMR}$ 譜。

【實施方式】

【0019】 縮寫

在本申請公開的詳細描述和實施例中將使用以下縮寫：

CDR	互補決定區
DPBS	Dulbecco 磷酸鹽緩衝鹽水
DMEM	Dulbecco 基本必需培養基
IgG	免疫球蛋白 G
i.p.	腹腔內
i.v.	靜脈內
IFN- γ	干擾素- γ
mAb	單克隆抗體
MAPK	絲裂原活化蛋白激酶
NK	天然殺傷細胞
PD-1	程序性死亡 1 蛋白、Pcd-1 或 CD279
PBMC	外周血單核細胞
PDX	衍生自患者的異種移植瘤
PHA	植物血凝素
p.o.	“經口”或“口服”
QD	每天一次
QW	每週一次
Q2W	每兩週一次
Q3W	每三週一次
Q4W	每四周一次
TILs	腫瘤浸潤淋巴細胞
Vh	重鏈可變區
Vk	輕鏈可變區

定義

【0020】 除非本申請另有具體定義，本申請使用的所有其它技術和科學術語具有本申請所屬領域普通技術人員通常理解的含義。

【0021】 除非上下文另有明確指示，本申請(包括所附權利要求書)使用的詞語的單數形式諸如“一個”、“一種”和“該”包括其相應的複

數指代。

【0022】 在定量測量的上下文中使用的術語“約”是指標示量 $\pm 20\%$ 或標示量 $\pm 10\%$ 或 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 。例如，對於化合物 1，約 1 的摩爾比(游離鹼/馬來酸, n)可在 0.8 和 1.2 之間變化。

【0023】 本申請中的術語“烷基”是指單價支鏈或直鏈飽和烴鏈，其包含 1-18 個諸如 1-12 個進一步諸如 1-6 個碳原子。烷基包括但不限於甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、叔丁基、正己基、正癸基、十四烷基等。

【0024】 本申請中的術語“烯基”是指單價支鏈或直鏈不飽和烴基，其包含至少一個 C=C 雙鍵和 2-18 個諸如 2-8 個進一步諸如 2-6 個碳原子。烯基包括但不限於乙烯基(即 $-\text{CH}=\text{CH}_2$)、1-丙烯基(或烯丙基即 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、異丙烯基($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$)等。

【0025】 本申請中的術語“炔基”是指單價支鏈或直鏈不飽和烴基，其包含至少一個 C \equiv C 三鍵和 2-18 個諸如 2-8 個進一步諸如 2-6 個碳原子。炔基包括但不限於乙炔基($-\text{C}\equiv\text{CH}$)、炔丙基(或丙炔基即 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$)等。

【0026】 本申請中的術語“環烷基”是指環狀烷基，其包含 3-20 個碳原子或 3-10 個碳原子或 3-8 個碳原子或 3-6 個碳原子，其具有單環或多個稠環。環烷基可為飽和和部分不飽和的。單環飽和環烷基的實例包括但不限於選自環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基和環辛基的 C₃₋₈ 環烷基。單環部分不飽和環烷基的實例包括但不限於環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、1-環己

-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基和環己二烯基。

【0027】 本申請中的術語“芳基”是指通過由母體芳族環系的一個碳原子除去一個氫原子而衍生的包含 6-20 個碳原子諸如 6-10 個碳原子的單價芳族烴基。芳基包括二環基團，其包含與飽和、部分不飽和或芳族碳環或雜環稠合的芳環。芳基的實例包括但不限於衍生自苯(苯基)、經取代的苯、萘、蒽、聯苯、茛、茛滿、1,2-二氫萘、1,2,3,4-四氫萘等的基團。

【0028】 本申請中的術語“鹵素”或“鹵代”是指 F、Cl、Br 或 I。

【0029】 本申請中的術語“雜芳基”是指選自以下的基團：

【0030】 5-7 元芳族單環，其包含至少一個例如 1-4 個或在一些實施方案中 1-3 個選自 N、O 和 S 的雜原子且其餘環原子為碳；

【0031】 8-12 元二環，其包含至少一個例如 1-4 個或在一些實施方案中 1-3 個或在其它實施方案中 1 或 2 個選自 N、O 和 S 的雜原子且其餘環原子為碳且其中至少一個環為芳族的且在芳族環中存在至少一個雜原子；及

【0032】 11-14 元三環，其包含至少一個例如 1-4 個或在一些實施方案中 1-3 個或在其它實施方案中 1 或 2 個選自 N、O 和 S 的雜原子且其餘環原子為碳且其中至少一個環為芳族的且在芳族環中存在至少一個雜原子。

【0033】 例如，雜芳基包括與 5-7 元環烷基環稠合的 5-7 元雜環芳環。就其中僅一個環包含至少一個雜原子的上述稠合二環雜芳基環系而言，連接點可位於雜芳環或環烷基環。

109-6-29

【0034】 當雜芳基中 S 和 O 原子的總數超過 1 時，這些雜原子不彼此相鄰。在一些實施方案中，雜芳基中 S 和 O 原子的總數不大於 2。在一些實施方案中，芳族雜環中 S 和 O 原子的總數不大於 1。

【0035】 雜芳基的實例包括但不限於(由優先指定為 1 的連接位置開始編號)吡啶基(諸如 2-吡啶基、3-吡啶基或 4-吡啶基)、噁啉基、吡嗪基、2,4-嘓啶基、3,5-嘓啶基、2,4-咪唑基、咪唑並吡啶基、異噁唑基、噁唑基、噻唑基、異噻唑基、噻二唑基、四唑基、噻吩基、三嗪基、苯並噻吩基、呋喃基、苯並呋喃基、苯並咪唑基、吡啶基、異吡啶基、二氫吡啶基、酞嗪基、吡嗪基、噻嗪基、吡咯基、三唑基、喹啉基、異喹啉基、吡唑基、吡咯並吡啶基(諸如 1H-吡咯並[2,3-b]吡啶-5-基)、吡唑並吡啶基(諸如 1H-吡唑並[3,4-b]吡啶-5-基)、苯並噁唑基(諸如苯並[d]噁唑-6-基)、蝶啶基、嘌呤基、1-氧雜-2,3-二唑基、1-氧雜-2,4-二唑基、1-氧雜-2,5-二唑基、1-氧雜-3,4-二唑基、1-硫雜-2,3-二唑基、1-硫雜-2,4-二唑基、1-硫雜-2,5-二唑基、1-硫雜-3,4-二唑基、呋咱基、苯並呋咱基、苯並噻吩基、苯並噻唑基、苯並噁唑基、喹啉基、喹喔啉基、二氮雜萘基、呋喃並吡啶基、苯並噻唑基(諸如苯並[d]噻唑-6-基)、吡啶基(諸如 1H-吡啶-5-基)和 5,6,7,8-四氫異喹啉基。

【0036】 本申請中的術語“雜環”或“雜環基”是指選自 4-12 元單環、二環和三環飽和和部分不飽和環的環，其除至少一個諸如 1-4 個進一步諸如 1-3 個進一步諸如 1 或 2 個選自氧、硫和氮的雜原子外還包含至少一個碳原子。本申請中的“雜環”還指與 5、6 和/

109-6-29

或 7 元環烷基、碳環芳環或雜芳環稠合的包含至少一個選自 N、O 和 S 的雜原子的 5-7 元雜環，條件是當雜環與碳環芳環或雜芳環稠合時，連接點位於雜環，而當雜環與環烷基稠合時，連接點可位於環烷基或雜環。本申請中的“雜環”還指包含至少一個選自 N、O 和 S 的雜原子的脂族螺環，條件是連接點位於雜環。所述環可為飽和的或具有至少一個雙鍵(即部分不飽和)。雜環可取代有氧代。連接點可為雜環中的碳或雜原子。雜環不是本申請定義的雜芳基。

【0037】 雜環的實例包括但不限於(由優先指定為 1 的連接位置開始編號)1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、2,4-咪唑烷基、2,3-吡唑烷基、1-吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2,5-吡嗪基、吡喃基、2-嗎啉基、3-嗎啉基、氧雜環丙基、氮雜環丙基、硫雜環丙基、氮雜環丁基、氧雜環丁基、硫雜環丁基、1,2-二硫雜環丁基、1,3-二硫雜環丁基、二氫吡啶基、四氫吡啶基、硫嗎啉基、氧硫雜環己基、吡嗪基、高吡嗪基、高吡啶基、氮雜環庚基、氧雜環庚基、硫雜環庚基、1,4-氧硫雜環己基、1,4-二氧雜環庚基、1,4-氧硫雜環庚基、1,4-氧氮雜環庚基、1,4-二硫雜環庚基、1,4-硫氮雜環庚基、1,4-二氮雜環庚基、1,4-二噻烷基、1,4-氮硫雜環己基、氧氮雜草基、二氮雜草基、硫氮雜草基、二氫噻吩基、二氫吡喃基、二氫呋喃基、四氫呋喃基、四氫噻吩基、四氫吡喃基、四氫噻喃基、1-吡咯啉基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氫吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、1,4-二噁烷基、1,3-二氧雜環戊基、吡唑啉基、

吡唑烷基、二噻烷基、二硫雜環戊基、吡唑烷基、咪唑啉基、噻啉酮基、1,1-二氧化-硫嗎啉基、3-氮雜二環[3.1.0]己基、3-氮雜二環[4.1.0]庚基和氮雜二環[2.2.2]己基。經取代的雜環還包括取代有一個或多個氧代的環系諸如呱啉基-N-氧化物、嗎啉基-N-氧化物、1-氧代-1-硫嗎啉基和 1,1-二氧化-1-硫嗎啉基。

【0038】 本申請中的術語“稠環”是指多環環系例如二環或三環環系，其中兩個環僅共享兩個環原子和一個鍵。稠環的實例可包括稠合二環環烷基環，諸如具有 7-12 個環原子的那些二環環烷基環，其排列成選自上述[4,4]、[4,5]、[5,5]、[5,6]和[6,6]環系的二環；稠合二環芳基環，諸如上述 7-12 元二環芳基環系；稠合三環芳基環，諸如上述 10-15 元三環芳基環系；稠合二環雜芳基環，諸如上述 8-12 元二環雜芳基環；稠合三環雜芳基環，諸如上述 11-14 元三環雜芳基環；及上述稠合二環或三環雜環基環。

【0039】 本申請中的術語“施用”、“給藥”、“治療”和“處置”當應用於動物、人類、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人類、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。對細胞的處置包括試劑與細胞的接觸及試劑與流體的接觸，其中所述流體與細胞接觸。術語“施用”、“給藥”、“治療”和“處置”也指用試劑、診斷劑、結合物或另一個細胞進行的體外和離體處置，例如對細胞的體外和離體處置。本申請中的術語“受試者”包括任何生物體，優選動物，更優選哺乳動物(例如大鼠、小鼠、犬、貓、兔)且最優選人類。

【0040】 本申請中的術語“藥用鹽”包括但不限於與無機酸的鹽，其選自例如鹽酸鹽、磷酸鹽、磷酸二氫鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、亞硫酸鹽和硝酸鹽；及與有機酸的鹽，其選自例如蘋果酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、酒石酸鹽、琥珀酸鹽、枸橼酸鹽、乳酸鹽、甲磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、2-羥基乙磺酸鹽、苯甲酸鹽、水楊酸鹽、硬脂酸鹽、烷酸鹽諸如乙酸鹽和與其中 n 選自 0-4 的 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 的鹽。類似地，藥用陽離子的實例包括但不限於鈉、鉀、鈣、鋁、鋰和銨。

【0041】 本申請中的術語“抗體”在最廣意義下使用且具體包括抗體(包括全長單克隆抗體)及抗體片段，只要其識別 PD-1 即可。抗體分子通常為單特異性，但也可描述為獨特特異性、異種特異性或多特異性。抗體分子通過特異性結合位點與抗原上的特異性抗原決定簇或表位結合。“抗體片段”包含全長抗體的一部分，通常為全長抗體的抗原結合或可變區。抗體片段的實例包括 Fab、Fab'、 $\text{F(ab}')_2$ 和 Fv 片段；雙抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；和由抗體片段形成的多特異性抗體。

【0042】 本申請中的術語“單克隆抗體”或“mAb”或“Mab”是指基本上均質的抗體群，即包含在群中的抗體分子除可少量存在的可能天然突變外在氨基酸序列方面是相同的。相反地，常規(多克隆)抗體製品通常包含多種不同的抗體，所述多種不同的抗體在其可變結構域特別是其 CDR 中具有不同的氨基酸序列，所述常規(多克隆)抗體製品通常對不同的表位都具有特異性。修飾語“單克隆”表

示由基本上均質的抗體群獲得的抗體的特徵且不應被解釋為需要通過任何特定方法產生抗體。單克隆抗體(mAb)可通過本領域技術人員已知的方法獲得。參見例如 Kohler 等人(1975)；U.S.專利 4,376,110；Ausubel 等人(1987-1999)；Harlow 等人(1988)；和 Colligan 等人(1993)。本申請公開的 mAb 可為任何免疫球蛋白類別，包括 IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 及其任何亞類。可對產生 mAb 的雜交瘤進行體外或體內培養。體內產生可獲得高滴度的 mAb，其中將來自各個雜交瘤的細胞腹膜內注射到小鼠(諸如原始致敏 Balb/c 小鼠)中以產生含有高濃度所需 mAb 的腹水液。可使用本領域技術人員已知的柱色譜法由上述腹水液或培養物上清液純化同種型 IgM 或 IgG 的 mAb。

【0043】 通常，基本抗體結構單元包含四聚體。每個四聚體包含兩對相同的多肽鏈，每對具有一條“輕鏈”(約 25kDa)和一條“重鏈”(約 50-70kDa)。每條鏈的氨基末端部分包含具有約 100-110 個或更多個氨基酸的主要負責抗原識別的可變區。重鏈的羧基末端部分可限定主要負責效應子功能的恒定區。通常，人輕鏈被分類為 κ 和 λ 輕鏈。另外，人重鏈通常被分類為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 且將抗體的同種型分別限定為 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。在輕鏈和重鏈中，可變區和恒定區通過具有約 12 個或更多個氨基酸的“J”區連接，其中重鏈還包含具有約 10 個或更多個氨基酸的“D”區。

【0044】 每個輕鏈/重鏈(Vk/Vh)對的可變區形成抗體結合位點。因此，完整抗體通常具有兩個結合位點。除雙功能或雙特異性抗體

外，兩個結合位點通常是相同的。

【0045】 通常，重鏈和輕鏈的可變結構域都包含位於相對保守的框架區(FR)中的三個高變區(也稱為“互補決定區(CDR)”)。CDR 通常通過框架區來對齊，由此能夠結合特異性表位。通常，從 N 末端到 C 末端，輕鏈和重鏈可變結構域都包含 FR-1、CDR-1、FR-2、CDR-2、FR-3、CDR-3 和 FR-4。通常，根據以下文獻的定義將氨基酸指派至各個結構域：Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat 等人, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 5th ed., NIH Publ. No. 91-3242(1991)；Kabat(1978)Adv. Prot. Chem. 32:1-75；Kabat 等人(1977)J. Biol. Chem. 252:6609-6616；Chothia 等人(1987)J Mol. Biol. 196:901-917；或 Chothia 等人(1989)Nature 342:878-883。

【0046】 術語“高變區”是指抗體的負責抗原結合的氨基酸殘基。高變區包含來自“互補決定區”或“CDR”(即輕鏈可變域中的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 及重鏈可變域中的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3)的氨基酸殘基。參見 Kabat 等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(通過序列來定義抗體的 CDR 區)；另見 Chothia and Lesk(1987)J. Mol. Biol. 196:901-917(通過結構來定義抗體的 CDR 區)。術語“框架”或“FR”殘基是指除本申請定義為 CDR 殘基的高變區殘基外的那些可變結構域殘基。

【0047】 除非另有說明，“抗體片段”或“抗原結合片段”是指抗體的抗原結合片段即保留與由全長抗體結合的抗原特異性結合的能力的抗體片段例如保留一個或多個 CDR 區的片段。抗體結合片段的實例包括但不限於 Fab、Fab’、F(ab’)₂ 和 Fv 片段；雙抗體；線性抗體；單鏈抗體分子，例如 sc-Fv；納米抗體；和由抗體片段形成的多特異性抗體。

【0048】 與特定靶標蛋白“特異性結合”的抗體是與其它蛋白質相比優先與該靶標結合的抗體，但是該特異性不需要絕對結合特異性。若抗體的結合在例如不產生不期望的結果諸如假陽性的情況下決定了樣品中靶標蛋白的存在，則抗體被認為就其所預期的靶標而言是“特異性的”。可用於本申請的抗體或其結合片段將以比與非靶標蛋白的親和力大至少 2 倍、優選大至少 10 倍、更優選大至少 20 倍且最優選大至少 100 倍的親和力與靶標蛋白結合。本申請抗體被描述為與包含給定氨基酸序列的多肽例如成熟人 PD-1 分子的氨基酸序列特異性結合，條件是其與包含該序列的多肽結合，但是不與不具有該序列的蛋白質結合。

【0049】 本申請中的術語“人抗體”是指僅包含人免疫球蛋白序列的抗體。若在小鼠、小鼠細胞或衍生自小鼠細胞的雜交瘤中產生，則人抗體可含有鼠型糖鏈。類似地，“小鼠抗體”或“大鼠抗體”是指分別僅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗體。

【0050】 術語“人源化抗體”是指以下抗體形式，其含有來自非人類(例如鼠類)抗體及人抗體的序列。上述抗體含有衍生自非人類免

109-6-29

疫球蛋白的小序列。通常，人源化抗體將包含基本上所有至少一個且通常為兩個可變結構域，其中所有或基本上所有高變環與非人類免疫球蛋白的那些高變環是對應的且所有或基本上所有 FR 區是人免疫球蛋白序列的那些 FR 區。人源化抗體任選還將包含免疫球蛋白恒定區(Fc)通常為人免疫球蛋白恒定區(Fc)的至少一部分。當必要時，將前綴“hum”、“hu”或“h”加至抗體克隆名稱以區分人源化抗體與親本齧齒動物抗體。齧齒動物抗體的人源化形式通常將包含與親本齧齒動物抗體相同的 CDR 序列，儘管可包括某些氨基酸取代以增加親和力、增加人源化抗體的穩定性或出於其它原因。

【0051】 本申請中的術語“癌症”或“腫瘤”是指或描述哺乳動物中通常以不受調節的細胞生長為特徵的生理狀態。癌症的實例包括但不限於腎上腺癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、乳腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、頭頸癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括小細胞肺癌或非小細胞肺癌)、淋巴瘤、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、皮膚癌或甲狀腺腫瘤及其併發症。可通過本申請公開的組合來治療的特別優選的癌症或腫瘤包括以 B-Raf 突變、K-Ras/N-Ras 突變和/或 NF1 突變為特徵的那些癌症或腫瘤。可通過本申請公開的組合來治療的最優選的癌症或腫瘤包括各自與 K-Ras 突變相關的非小細胞肺癌、結腸直腸癌和子宮內膜癌。

【0052】 除非另有說明，術語“CDR”是指免疫球蛋白可變區中使用 Kabat 編號系統來定義的互補決定區。

【0053】 “PD-1 拮抗劑”是指阻斷在癌細胞上表達的 PD-L1 與在免疫細胞(T 細胞、B 細胞或 NKT 細胞)上表達的 PD-1 的結合且優選還阻斷在癌細胞上表達的 PD-L2 與免疫細胞所表達的 PD-1 的結合的任何化合物或生物分子。PD-1 及其配體的替代名稱或同義詞包括：對於 PD-1，包括 PDCD1、PD1、CD279 和 SLEB2；對於 PD-L1，包括 PDCD1L1、PDL-1、B7H1、B7-4、CD274 和 B7-H；且對於 PD-L2，包括 PDCD1L2、PDL2、B7-DC、Btdc 和 CD273。

PD-1 拮抗劑

【0054】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為與人 PD-1 特異性結合的抗體或其抗原結合片段。

【0055】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)的抗體，所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)含有下列互補決定區(CDR)：

a)mu317	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 11, 12, 13)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 14, 15, 16)；
b)mu326	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 17, 18, 19)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 20, 21, 22)；
c)317-4B6	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 31, 32, 33)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 34, 35, 36)；
d)326-4A3	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 37, 38, 39)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 40, 41, 42)；
e)317-1H	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 11, 59, 13)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 14, 15, 16)；
f)317-4B2	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 11, 60, 13)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 61, 15, 16)；
g)317-4B5	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 11, 60, 13)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 61, 15, 16)；
h)317-4B6	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 11, 32, 13)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 61, 15, 16)；
i)326-1	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 17, 62, 19)；和

109-6-29

	CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 20, 21, 22)；
j)326-3B1	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 17, 62, 19)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 20, 21, 22)；
或 k)326-3G1	CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3(分別為 SEQ ID NO: 17, 62, 19)；和 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3(分別為 SEQ ID NO: 20, 21, 22)。

【0056】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)的抗體，所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)含有下列 CDR 的任意組合：

(a)	CDR-H1(SEQ ID NO 31)、CDR-H2(SEQ ID NO 12, 32, 59 或 60)和 CDR-H3(SEQ ID NO 33)， CDR-L1(SEQ ID NO 14, 34 或 61)、CDR-L2(SEQ ID NO 35)和 CDR-L3(SEQ ID NO 36)；或
(b)	CDR-H1(SEQ ID NO 37)、CDR-H2(SEQ ID NO 18, 38 或 62)和 CDR-H3(SEQ ID NO 39)， CDR-L1(SEQ ID NO 40)、CDR-L2(SEQ ID NO 41)和 CDR-L3(SEQ ID NO 42)。

【0057】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)的抗體，所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)包含：

a)mu317(分別為 SEQ ID NO: 4 和 6)；	p)317-3H1(分別為 SEQ ID NO: 69 和 26)；
b)mu326(分別為 SEQ ID NO: 8 和 10)；	q)317-3I1(分別為 SEQ ID NO: 70 和 26)；
c)317-4B6(分別為 SEQ ID NO: 24 和 26)；	r)317-4B1(分別為 SEQ ID NO: 71 和 26)；
d)326-4A3(分別為 SEQ ID NO: 28 和 30)；	s)317-4B3(分別為 SEQ ID NO: 72 和 26)；
e)317-4B2(分別為 SEQ ID NO: 43 和 44)；	t)317-4B4(分別為 SEQ ID NO: 73 和 26)；
f)317-4B5(分別為 SEQ ID NO: 45 和 46)；	u)317-4A2(分別為 SEQ ID NO: 74 和 26)；
g)317-1(分別為 SEQ ID NO: 48 和 50)；	v)326-3A1(分別為 SEQ ID NO: 75 和 30)；
h)326-3B1(分別為 SEQ ID NO: 51 和 52)；	w)326-3C1(分別為 SEQ ID NO: 76 和 30)；
i)326-3GI(分別為 SEQ ID NO: 53 和 54)；	x)326-3D1(分別為 SEQ ID NO: 77 和 30)；
j)326-1(分別為 SEQ ID NO: 56 和 58)；	y)326-3E1(分別為 SEQ ID NO: 78 和 30)；
k)317-3A1(分別為 SEQ ID NO: 64 和 26)；	z)326-3F1(分別為 SEQ ID NO: 79 和 30)；
l)317-3C1(分別為 SEQ ID NO: 65 和 26)；	aa)326-3B N55D(分別為 SEQ ID NO: 80 和 30)；
m)317-3E1(分別為 SEQ ID NO: 66 和 26)；	ab)326-4A1(分別為 SEQ ID NO: 28 和 81)；或
n)317-3F1(分別為 SEQ ID NO: 67 和 26)；	

o)317-3G1(分別為 SEQ ID NO: 68 和 26)；	ac)326-4A2(分別為 SEQ ID NO: 28 和 82)。
------------------------------------	-------------------------------------

【0058】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為含有 IgG4 重鏈效應子或恒定域的抗體，所述 IgG4 重鏈效應子或恒定域包含 SEQ ID NO: 83-88 中的任何一種。

【0059】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為含有 F(ab) 或 F(ab)₂ 的抗體，所述 F(ab)或 F(ab)₂ 包含上述結構域，包括重鏈可變區(Vh)、輕鏈可變區(Vk)和 IgG4 重鏈效應子或恒定域。

【0060】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)及 IgG4 重鏈效應子或恒定域的抗體，所述 IgG4 重鏈效應子或恒定域包含 SEQ ID NO: 87 或 88，其中所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)包含：

a)mu317(分別為 SEQ ID NO: 4 和 6)；	p)317-3H1(分別為 SEQ ID NO: 69 和 26)；
b)mu326(分別為 SEQ ID NO: 8 和 10)；	q)317-3I1(分別為 SEQ ID NO: 70 和 26)；
c)317-4B6(分別為 SEQ ID NO: 24 和 26)；	r)317-4B1(分別為 SEQ ID NO: 71 和 26)；
d)326-4A3(分別為 SEQ ID NO: 28 和 30)；	s)317-4B3(分別為 SEQ ID NO: 72 和 26)；
e)317-4B2(分別為 SEQ ID NO: 43 和 44)；	t)317-4B4(分別為 SEQ ID NO: 73 和 26)；
f)317-4B5(分別為 SEQ ID NO: 45 和 46)；	u)317-4A2(分別為 SEQ ID NO: 74 和 26)；
g)317-1(分別為 SEQ ID NO: 48 和 50)；	v)326-3A1(分別為 SEQ ID NO: 75 和 30)；
h)326-3B1(分別為 SEQ ID NO: 51 和 52)；	w)326-3C1(分別為 SEQ ID NO: 76 和 30)；
i)326-3GI(分別為 SEQ ID NO: 53 和 54)；	x)326-3D1(分別為 SEQ ID NO: 77 和 30)；
j)326-1(分別為 SEQ ID NO: 56 和 58)；	y)326-3E1(分別為 SEQ ID NO: 78 和 30)；
k)317-3A1(分別為 SEQ ID NO: 64 和 26)；	z)326-3F1(分別為 SEQ ID NO: 79 和 30)；
l)317-3C1(分別為 SEQ ID NO: 65 和 26)；	aa)326-3B N55D(分別為 SEQ ID NO: 80 和 30)；
m)317-3E1(分別為 SEQ ID NO: 66 和 26)；	ab)326-4A1(分別為 SEQ ID NO: 28 和 81)；或
n)317-3F1(分別為 SEQ ID NO: 67 和 26)；	ac)326-4A2(分別為 SEQ ID NO: 28 和 82)。
o)317-3G1(分別為 SEQ ID NO: 68 和 26)；	

【0061】 如上述五個方面各自所公開，PD-1 拮抗劑為包含重鏈可

109-6-29

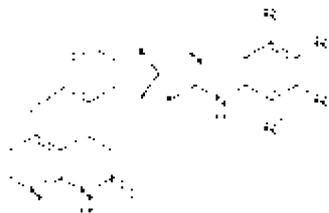
變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)及 IgG4 重鏈效應子或恒定域的抗體，所述 IgG4 重鏈效應子或恒定域包含 SEQ ID NO: 88，其中所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)分別包含 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 26。

【0062】本申請公開的抗 PD1 抗體及其抗體片段可根據 WO2015/035606A1 所公開的內容來製備，通過引用將其全部內容明確併入本申請。

RAF 抑制劑

【0063】“RAF 抑制劑”是指式(I)化合物或其立體異構體或其藥用鹽。

【0064】如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為式(I)化合物或其立體異構體或其藥用鹽：



式(I)

其中，X 選自 CH₂ 和 O；R⁸、R⁹、R¹⁰ 和 R¹¹ 可相同或不同，各自選自氫、鹵素、烷基、烯基、環烷基、芳基、雜環基、雜芳基、炔基、-NR¹³R¹⁴、-OR¹³、-COR¹³、-CO₂R¹³、-CONR¹³R¹⁴、-C(=NR¹³)NR¹⁴R¹⁵、-NR¹³COR¹⁴、-NR¹³CONR¹⁴R¹⁵、-NR¹³CO₂R¹⁴、-SO₂R¹³、-SO₂ 芳基、-NR¹³SO₂NR¹⁴R¹⁵ 和 -NR¹³SO₂R¹⁴，其中所述烷基、烯基、炔基、環烷基、雜芳基、芳基和雜環基各自任選取代有至少一個取代基 R¹⁶；或(R⁸ 和 R⁹)和/或(R⁹ 和 R¹⁰)和/或(R¹⁰

和 R^{11})與和它們連接的環一起形成選自雜環基和雜芳基環的稠環，其任選取代有至少一個取代基 R^{16} ； R^{13} 、 R^{14} 和 R^{15} 可相同或不同，各自選自 H、鹵代烷基、烷基、烯基、炔基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基；或(R^{13} 和 R^{14})和/或(R^{14} 和 R^{15})與和它們連接的原子一起各自形成選自雜環基和雜芳基環的環，其取代有至少一個取代基 R^{16} ； R^{16} 選自鹵素、鹵代烷基、烷基、烯基、環烷基、芳基、雜芳基、雜環基、炔基、氧代、 $-CN$ 、 $-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-COR'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-C(=NR')NR''R'''$ 、 $-NR'COR''$ 、 $-NR'CONR'R''$ 、 $-NR'CO_2R''$ 、 $-SO_2R'$ 、 $-SO_2$ 芳基、 $-NR'SO_2NR''R'''$ 、 $-NR'O_2R''$ 和 $-NR'SO_2$ 芳基，其中 R' 、 R'' 和 R''' 獨立選自 H、鹵代烷基、烷基、烯基、炔基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基；或(R' 和 R'')和/或(R'' 和 R''')與和它們連接的原子一起形成選自雜環基和雜芳基環的環。

【0065】 在一些實施方案中，式(I)化合物為光學純的。

【0066】 在一些實施方案中，式(I)中的 X 為 O。

【0067】 在一些實施方案中，式(I)中的 X 為 CH_2 。

【0068】 在一些實施方案中，式(I)中的 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{11} 可相同或不同，各自獨立選自烷基(例如甲基、叔丁基)、氫、鹵代烷基(例如 $-CF_3$)、鹵素、羥基、 $-CN$ 、 $-O$ 烷基(例如烷氧基)、 $-O$ 鹵代烷基(例如 OCF_3)和芳基(例如苯基)。

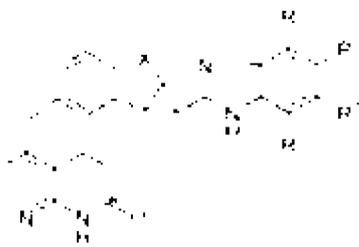
【0069】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為式(I)化合物或其立體異構體或其藥用鹽：



式(I)

其中，X 選自 CH_2 和 O； R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{11} 可相同或不同，各自選自氫、鹵素、烷基、 $-\text{CN}$ 、環烷基、芳基、雜環基、 $-\text{OR}^{13}$ 、 $-\text{CONR}^{13}\text{R}^{14}$ ，其中所述烷基和芳基各自任選取代有至少一個取代基 R^{16} ；或(R^8 和 R^9)和/或(R^9 和 R^{10})和/或(R^{10} 和 R^{11})與和它們連接的環一起形成選自環烷基的稠環； R^{13} 和 R^{14} 可相同或不同，各自選自 H、烷基和鹵代烷基； R^{16} 選自鹵素、鹵代烷基和烷基。

【0070】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為式(I)化合物或其立體異構體或其藥用鹽：

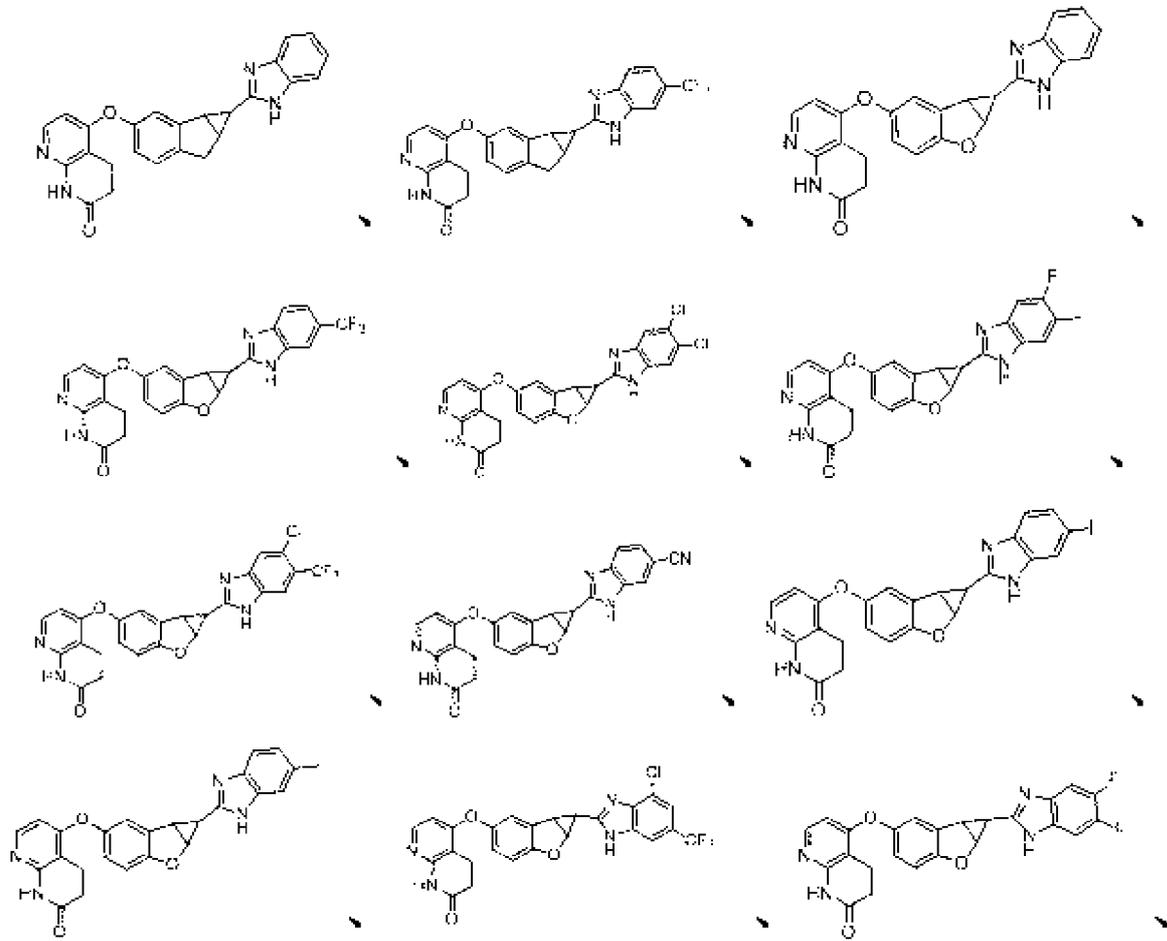


式(I)

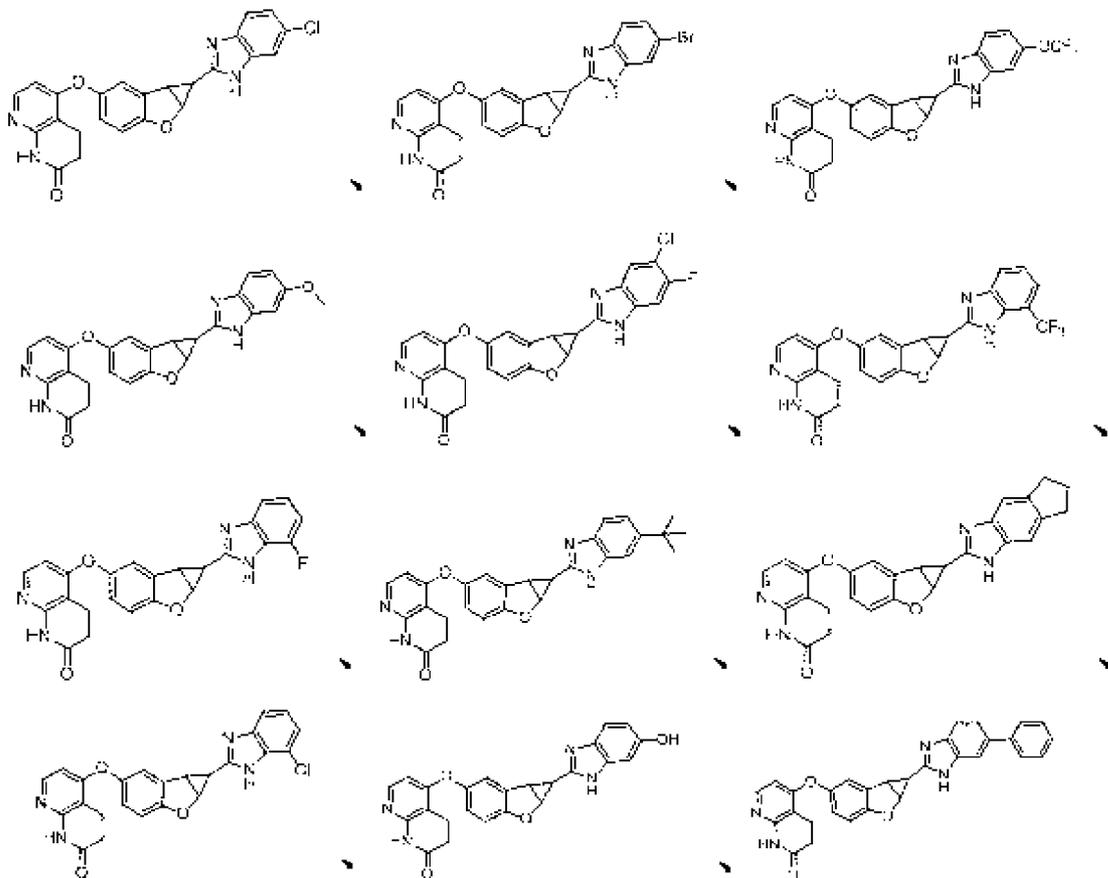
其中，X 選自 CH_2 和 O； R^8 選自 H、F、Cl 和 Br； R^9 選自 H、F、Cl、Br 和 C_{1-6} 烷基； R^{10} 選自 H、F、Cl、Br、OH、 $-\text{CN}$ 、 C_{1-6} 烷基、 CF_3 、苯基、 OC_{1-6} 烷基、 OC_{1-6} 鹵代烷基和 $-\text{CONR}^{13}\text{R}^{14}$ ，其中 R^{13} 和 R^{14} 可相同或不同，各自選自 H 和 C_{1-6} 烷基； R^{11} 選自 H、F、Cl、Br 和 CF_3 ；或(R^9 和 R^{10})與和它們連接的環一起形成選自 C_{5-6} 環烷基的稠環。

【0071】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為選自以下化

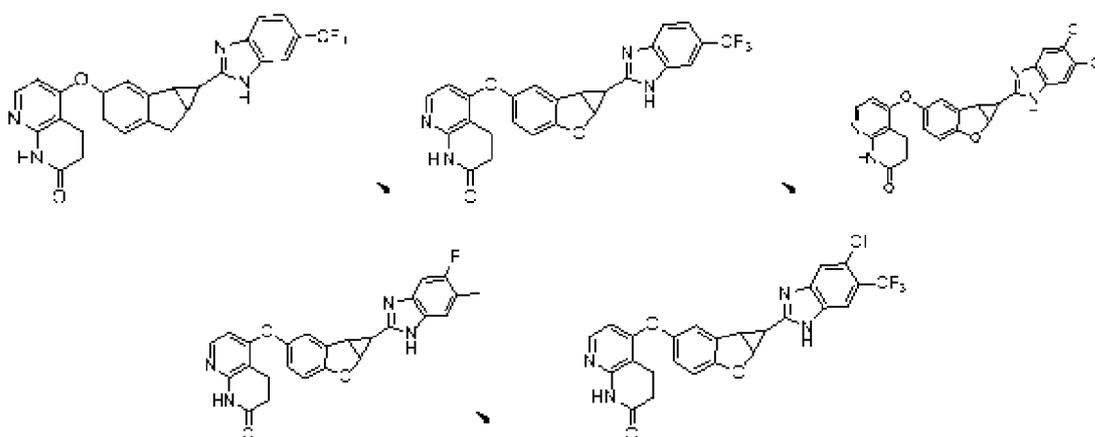
化合物的化合物或其立體異構體或其藥用鹽：



109-6-29

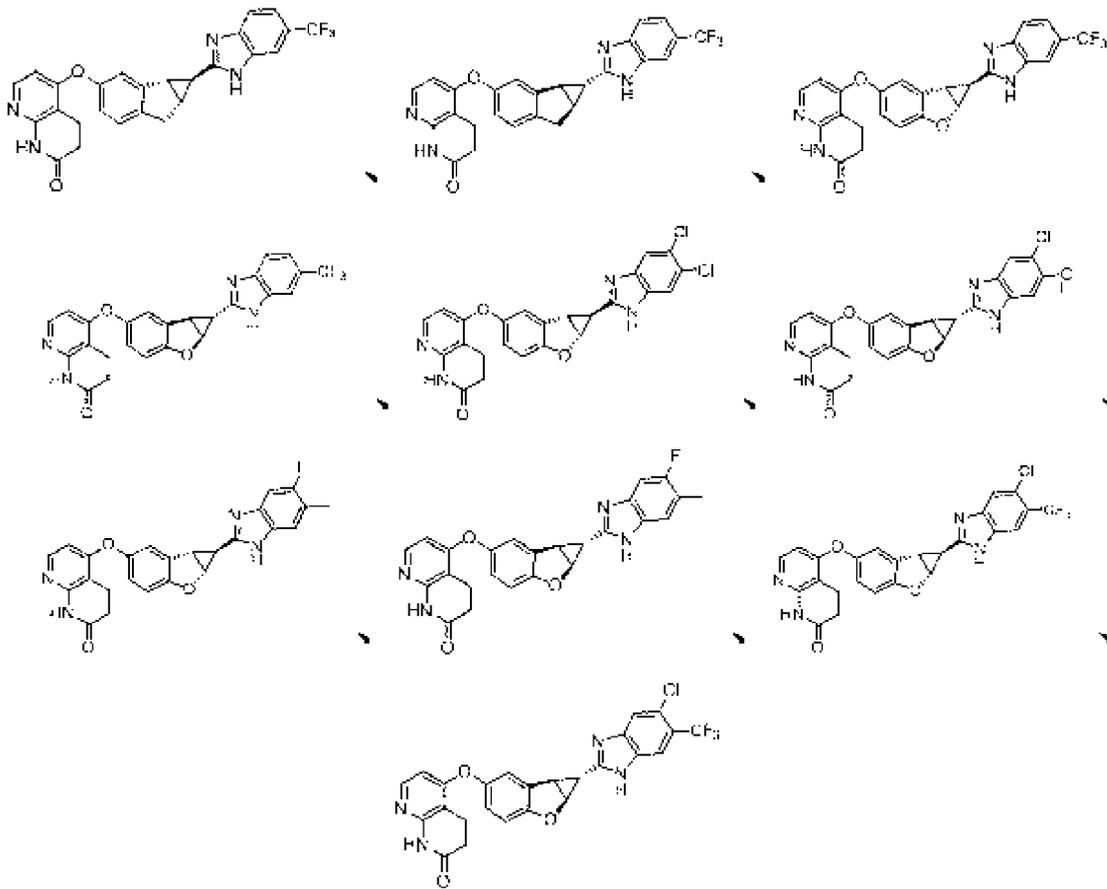


【0072】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為選自以下化合物的化合物或其立體異構體或其藥用鹽：

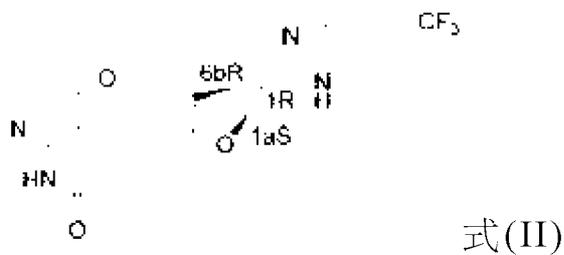


【0073】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為選自以下化合物的化合物或其藥用鹽：

109-6-29

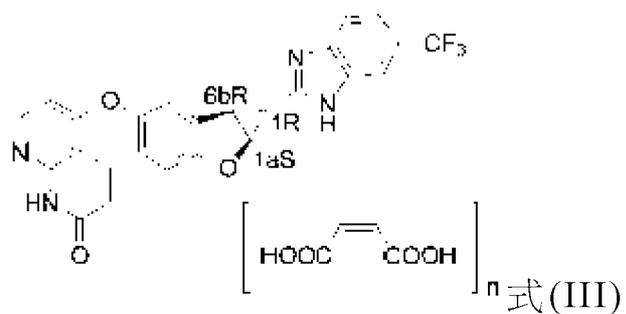


【0074】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為式(II)化合物或其藥用鹽：



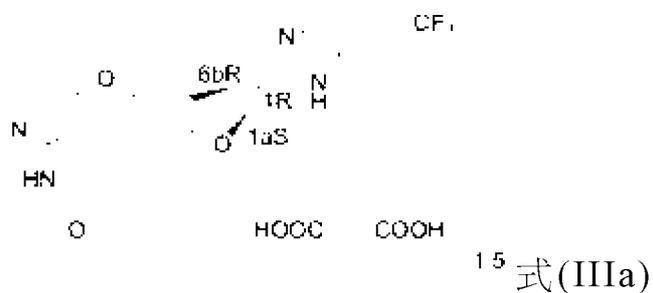
【0075】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為式(II)化合物的馬來酸鹽。

【0076】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為式(III)化合物：



其中， n 為約 0.5 至約 1.5 的數字。

【0077】 如上述五個方面各自所公開，RAF 抑制劑為式(IIIa)化合物即化合物 1：



【0078】 本申請公開的 RAF 抑制劑諸如式(I)化合物可通過 WO2013/097224A1 所公開的合成路線來合成，通過引用將其全部內容明確併入本申請。本申請公開的 RAF 抑制劑即化合物 1 可根據 PCT/CN2016/079251 中的操作來製備，通過引用將其全部內容明確併入本申請。

組合療法

【0079】 組合療法可按同時或分開或依序方案來施用。當依序施用時，組合可按兩次或更多次給藥來施用。組合施用包括使用分開的製劑共同施用和以任意順序連續施用，其中優選存在兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性的時段。

【0080】 在上述五個方面各自的一個實施方案中，RAF 抑制劑或

其藥用鹽可在施用 PD-1 拮抗劑後施用約 1 至約 10 天的時段。在上述五個方面各自的另一個實施方案中，RAF 抑制劑或其藥用鹽可在組合施用開始前施用約 1 至 10 天的時段。在上述五個方面各自的另一個實施方案中，RAF 抑制劑或其藥用鹽的施用和 PD-1 拮抗劑的施用在同一天開始。

【0081】 任何上述共同施用的藥劑的合適劑量是目前使用的那些劑量且可由於 RAF 抑制劑和 PD-1 拮抗劑的組合作用(協同作用)諸如增加的治療指數或減輕的毒性或其它副作用或後果而降低。

【0082】 在抗癌療法的具體實施方案中，RAF 抑制劑和 PD-1 拮抗劑可進一步與手術療法和放射療法組合。

【0083】 在上述五個方面各自的實施方案中，本申請公開的 RAF 抑制劑和 PD-1 拮抗劑的量及施用的相對時間安排通過待治療的患者的個體需要、施用途徑、疾病或病痛的嚴重程度、給藥時間表及指定醫生所作出的評價和判斷來確定。

【0084】 例如，RAF 抑制劑的施用劑量為 1-100mg/天(以母體化合物計)且施用頻率為每天一至三次；優選地，RAF 抑制劑的施用劑量為 5-80mg/天(以母體化合物計)且施用頻率為每天一至三次；更優選地，RAF 抑制劑的施用劑量為 10-40mg/天(以母體化合物計)且施用頻率為一天一次。然而，基於活性化合物，本申請公開的 RAF 抑制劑的有效劑量的優選範圍可為約 0.01-10mg/天/千克體重或更優選 0.1-1mg/天/千克體重，在單一或分開劑量中。在一些情況下，應用上述劑量範圍的下限是較合適的，而在其它情況下，

109-6-29

可使用較高的劑量而不引起有害的副作用。在上述五個方面各自的一些優選實施方案中，RAF 抑制劑以 5-80mg 的劑量每天施用一次。

【0085】 PD-1 拮抗劑以 0.5-30mg/kg 諸如 0.5-20mg/kg 進一步諸如 0.5-10mg/kg 的劑量每週一次或每兩週一次或每三週一次或每四周一次施用。

【0086】 本申請公開的 RAF 抑制劑和 PD-1 拮抗劑可按多種已知方式來施用，諸如口服、局部、經直腸、胃腸外、通過吸入噴霧或經由所植入的儲庫，儘管任何給定情況下最合適的途徑將取決於具體的宿主及施用活性成分所針對的病症的性質和嚴重程度。本申請使用的術語“胃腸外”包括皮下、皮內、靜脈內、肌內、關節內、動脈內、滑膜內、胸骨內、鞘內、病灶內和顱內注射或輸注技術。

【0087】 在上述五個方面各自的一個實施方案中，本申請公開的 RAF 抑制劑和 PD-1 拮抗劑可按不同途徑來施用。在優選實施方案中，RAF 抑制劑口服施用，而 PD-1 拮抗劑胃腸外諸如皮下、皮內、靜脈內或腹膜內施用。

【0088】 在上述五個方面各自的實施方案中，PD-1 拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)及 IgG4 重鏈效應子或恒定域的抗體，所述 IgG4 重鏈效應子或恒定域包含 SEQ ID NO: 88，其中所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)分別包含 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 26；且 RAF 抑制劑為本申請公開的式(IIIa)化合物。

109-6-29

【0089】 在上述五個方面各自的實施方案中，PD-1 拮抗劑 Mab-1 以 0.5-10mg/kg 的劑量每週一次(QW)或每兩週一次(Q2W)或每三週一次(Q3W)向受試者靜脈內(i.v.)或腹膜內(i.p.)施用，而 RAF 抑制劑化合物 1 以 5-80mg 的劑量每天一次(QD)向受試者施用。在一些優選實施方案中，PD-1 拮抗劑 Mab-1 以 0.5-10mg/kg 的劑量每週一次(QW)或每兩週一次(Q2W)或每三週一次(Q3W)向受試者靜脈內(i.v.)或腹膜內(i.p.)施用，而 RAF 抑制劑化合物 1 以 10-30mg 的劑量每天一次(QD)向受試者施用。在更優選的實施方案中，PD-1 拮抗劑 Mab-1 胃腸外諸如皮下、皮內、靜脈內或腹膜內施用。

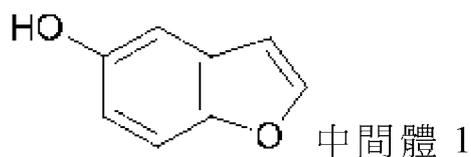
治療方法

【0090】 所述藥物組合在抑制癌症的腫瘤生長中產生協同功效，所述癌症為諸如腎上腺癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、乳腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、頭頸癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括小細胞肺癌或非小細胞肺癌)、淋巴瘤、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、皮膚癌或甲狀腺腫瘤及其併發症。具體地，所述組合在與 B-Raf 突變、K-Ras/N-Ras 突變和/或 NF1 突變相關的上述癌症中是有效的。可通過本申請公開的組合來治療的最優選的癌症或腫瘤包括各自與 K-Ras 突變相關的非小細胞肺癌、結腸直腸癌和子宮內膜癌。所述組合可在用於預防癌症、延緩癌症進展或治療癌症的方法中使用。

實施例

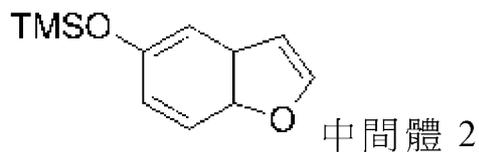
【0091】 實施例 A：化合物 1(即倍半馬來酸鹽)的製備

【0092】 步驟 1：中間體 1 的合成：



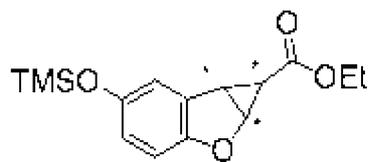
【0093】 在氮氣保護下在內溫 $\leq 35^{\circ}\text{C}$ 向 EtONa(154kg) 於 DMF(989kg)中的攪拌的溶液中添加 EtSH(68.6kg)。將混合物在內溫 $\leq 35^{\circ}\text{C}$ 攪拌 60-90min。添加 5-甲氧基苯並呋喃(58.75kg)於 DMF(55.0kg)中的溶液。將混合物加熱至 $110-130^{\circ}\text{C}$ ，攪拌 45 小時，然後在低於 90°C 真空濃縮。將混合物冷卻至 $10-20^{\circ}\text{C}$ 後，逐滴添加 2N HCl(1326kg)，然後在內溫 $\leq 35^{\circ}\text{C}$ 添加 EtOAc(531kg)和 H_2O_2 (129kg)。將混合物攪拌 30-60min。分離有機層後，水相用 EtOAc 萃取。合併的有機相用飽和鹽水洗滌兩次，然後將溶劑蒸發至幹。在低於 40°C 將 MeOH 和 NaOH(44.5kg)于水(185kg)中的溶液逐滴加到殘餘物中。將混合物在 $30-40^{\circ}\text{C}$ 攪拌 5-7 小時。添加用水(77kg)濕潤的活性碳(74kg)。將混合物在 $30-40^{\circ}\text{C}$ 攪拌 4-6 小時並過濾；且濾餅用 MeOH 和水洗滌。將 DCM 加到濾液中並在低於 40°C 用 35%HCl 水溶液將 pH 調節至 1。水相用 DCM 萃取且有機相用 25%NaCl 洗滌且在低於 40°C 濃縮。殘餘物直接用於下一步。 ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ 9.14(s, 1H), 7.86(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.36(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 6.94(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.79(dd, $J=2.0, 0.9\text{Hz}$, 1H), 6.74(dd, $J=8.8, 2.4\text{Hz}$, 1H)ppm。MS: m/e 135($M+1$) $^+$ 。

【0094】 步驟 2：中間體 2 的合成



【0095】 在 -5 至 0℃ 向苯並呋喃-5-醇 (中間體 1, 33.1kg) 和 Et₃N(50.8kg) 於 DCM(155kg) 中的攪拌的溶液中逐滴添加 TMSCl(30.4kg) 於 DCM(50kg) 中的溶液。將混合物溫熱到 0 至 10℃ 並在該溫度攪拌 2 小時 (IPC 檢查 INT-1/INT-2=37.4%)。將混合物冷卻到 -5 至 0℃ 並逐滴添加 TMSCl(10.6kg) 於 DCM(8kg) 中的溶液，然後將混合物溫熱到 0 至 10℃ 並在該溫度攪拌 1h。將混合物在低於 40℃ 濃縮並向混合物中添加正庚烷。將混合物攪拌 20-30min 且過濾且濾餅用正庚烷洗滌。從濾液中蒸餾出溶劑，得到粗中間體 2 (INT-2%: 62.7%, KF: 0.01%)。在 -5 至 0℃ 向上述粗中間體 2 和 Et₃N(8.6kg) 於 DCM(149kg) 中的攪拌的溶液中逐滴添加 TMSCl(9.0kg) 於 DCM(10kg) 中的溶液。將混合物溫熱到 0 至 10℃ 並在該溫度攪拌 1h (TLC 顯示反應完成)。將反應混合物在低於 40℃ 濃縮並向混合物中添加正庚烷。將混合物攪拌 20-30min，然後過濾且濾餅用正庚烷洗滌。從濾液中蒸餾出溶劑，得到中間體 2 (41.5kg, INT-2%: 98.1%)，其為無色油狀物。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 7.69(d, J=2.0Hz, 1H), 7.21(d, J=8.8Hz, 1H), 6.84(d, J=2.5Hz, 1H), 6.61(d, J=2.0Hz, 1H), 6.56(dd, J=8.8, 2.5Hz, 1H), 0.00(s, 9H) ppm。

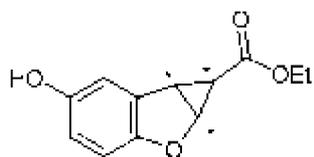
【0096】 步驟 3：中間體 3 的合成



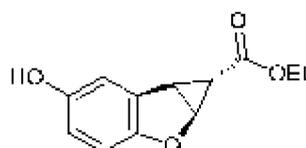
中間體 3

【0097】 在環境溫度在 N_2 氣氛下將三氟甲磺酸亞銅(I)(與甲苯的 2:1 絡合物, 0.41kg)和(S,S)-Evans 配體(0.552kg)在 DCM(160kg)中攪拌 1-2 小時。添加中間體 2(37.0kg), 然後在 20-30°C 緩慢添加重氮基乙酸乙酯(58kg)於 DCM(450kg)中的溶液。將反應混合物在 20-30°C 攪拌 0.5-1h(IPC: INT-2/INT-3 \leq 0.2%, 殘留的 N_2CHCO_2Et : 0.05% \leq 1.0%)。在 20-30°C 歷時 40-50min 將 EDTA 二鈉溶液 (0.05mol/L, 150kg)分三次加到反應混合物中。有機相在 20-30°C 用 25%NaCl 水溶液洗滌兩次並在低於 30°C 濃縮。將殘餘物減壓蒸餾並在 120-144°C 收集粗中間體 3(36.26kg, 84.5%)。該粗化合物包含內型對映異構體, 其可在下一步中被除去。 1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ 6.79(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.42(dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, 1H), 4.95(dd, $J=5.4, 1.0$ Hz, 1H), 3.08(dd, $J=5.4, 3.2$ Hz, 1H), 1.02(dd, $J=3.1, 1.2$ Hz, 1H), 0.00(s, 9H)ppm。

【0098】 步驟 4 和 5: 中間體 5 和中間體 6 的合成



中間體 5、



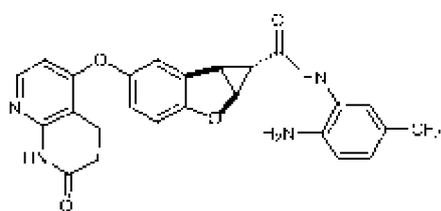
中間體 6

【0099】 在 20-30°C 向中間體 4(36.3kg)於 MeOH(108kg)中的溶液中添加 HCl/MeOH 溶液(5M, 0.11kg)且將混合物攪拌 2-3 小時(IPC: L/M: 0.5%, 手性純度 90.0%)。在 20-30°C 逐滴添加 Et_3N (0.22kg)。

109-6-29

4N HCl(37kg)將混合物的 pH 調節至 4-5，然後攪拌 0.5-1h。將混合物在低於 50°C 濃縮且固體從溶液中析出。過濾後，在 35-45°C 將濕產物在 THF 中再次漿化 1-2 小時，然後過濾。將所得濕產物在 45-65°C 乾燥 40 小時，得到標題化合物中間體 8(18.95kg: 化學純度 99%，手性純度 100%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ 12.59(s, 1H), 10.43(s, 1H), 7.92(d, J=5.8Hz, 1H), 7.29(d, J=2.4Hz, 1H), 6.97(d, J=8.8Hz, 1H), 6.93(dd, J=8.8, 2.4Hz, 1H), 6.21(d, J=5.8Hz, 1H), 5.21(dd, J=5.4, 1.0Hz, 1H), 3.27-3.25(m, 1H), 2.89(t, J=7.8Hz, 2H), 2.51(d, J=8.8Hz, 2H), 1.19(dd, J=3.0, 1.0Hz, 1H)ppm。MS: m/e 339(M+1)⁺。

【0102】 步驟 8：中間體 9 的合成

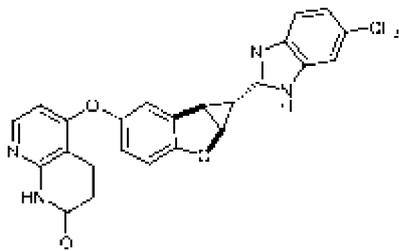


中間體 9

【0103】 在 0-15 °C 將中間體 8(13.3kg)、DIPEA(16kg) 和 HATU(18.1kg)於 DMF(167kg)中的溶液逐滴加到 4-(三氟甲基)苯-1,2-二胺(SM3, 7.6kg)於 DMF(74kg)中的混合物中。將混合物在 20-25 °C 攪拌 4-6 小時(IPC: INT-9/INT-9: 未檢測)。將活性碳(5.3kg)/DMF(7.5kg)加到反應混合物中，在 40-45 °C 攪拌 2-4 小時，然後過濾。在 15-30 °C 將水(846kg)逐滴加到濾液中且當攪拌 1-2 小時時，固體從溶液中析出。將析出物過濾並在 20-30 °C 在 EtOH 中漿化 2-4 小時。過濾後，將濕產物在 45-60 °C 乾燥 37 小時，得到

標題化合物中間體 9(17.60kg: 95.5%)。

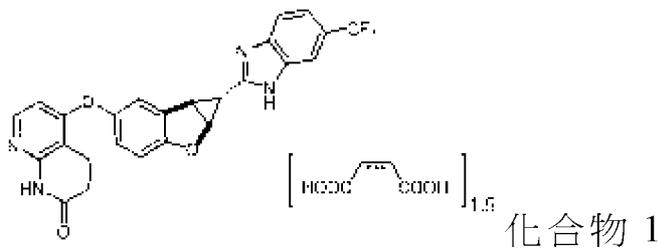
【0104】 步驟 9：化合物 1 的游離鹼的合成



化合物 1 的游離鹼

【0105】 將中間體 9(17kg)和水(1.5kg)於 AcOH(360kg)中的溶液在 65-70°C 攪拌 20 小時(IPC: R/S≤1.0%)。將混合物在低於 55°C 濃縮至幹並向殘餘物中添加活性碳(17kg)及 MeOH(32kg)。將混合物在約 50°C 攪拌 1h。過濾後，將濾液在低於 45°C 濃縮以除去溶劑。向殘餘物中添加 EA(160kg)和水(330kg)，然後在 20-30°C 添加 NaOH 水溶液(2mol/L)直至 pH 為 8-9。將有機層分離且水相用 EA 萃取。合併的有機相用水洗滌兩次，濃縮至幹，得到呈游離鹼形式的化合物 1。¹H-NMR(600MHz, DMSO-d₆)δ 12.84(s, 1H), 10.47(s, 1H), 7.98(d, J=5.8Hz, 1H), 7.86(d, J=1.2Hz, 1H), 7.69(m, 1H), 7.48(t, J=6.2Hz, 1H), 7.38(d, J=2.6Hz, 1H), 7.08(d, J=8.7Hz, 1H), 7.02(dd, J=8.7, 2.6Hz, 1H), 6.29(d, J=5.8Hz, 1H), 5.43(dd, J=5.4, 1.2Hz, 1H), 3.55(dd, J=5.3, 3.3Hz, 1H), 2.95(t, J=7.7Hz, 2H), 2.55(t, J=7.7Hz, 2H), 1.97(d, J=1.3Hz, 1H)ppm。

【0106】 步驟 10：化合物 1 的合成



【0107】 向步驟 9 的殘餘物中添加 IPA(83kg)。向混合物中添加馬來酸(5kg)于水(29kg)中的溶液並在約 50°C 攪拌 4 小時，然後冷卻至 35°C 並在該溫度攪拌 12 小時。將所得固體過濾，在 40-60°C 乾燥並在微粉磨中微粉化，得到白色固體(化合物 1 倍半馬來酸鹽, 8.36kg)，其具有 D90=4.1 μ m、D10=1.5 μ m、D50=2.4 μ m 的粒徑。如圖 4 所示，通過粉末 X 射線衍射圖方法將化合物 1 鑒定為結晶形式。呈結晶形式的化合物 1 的 ¹H-NMR 譜如圖 5 所示。呈結晶形式的化合物 1 的 ¹³C-NMR 譜如圖 6 所示。

實施例 1

【0108】 RAF 抑制劑與抗 PD-1-mAb 的組合對體外 3D 球體/PBMC 共培養模型中 T 細胞功能的作用。

方法

【0109】 為了生成腫瘤球體，將 HEK-293-OS8-PD-L1 細胞和 Sk-Mel-28 細胞(B-Raf^{V600E})以 1:1 的比例以 5×10⁴ 個細胞/mL 的密度在冰冷的培養基中混合。將 Matrigel[®]Matrix(Corning)以 2% 的最終濃度加到細胞混懸液中以促進三維結構的形成。將細胞鋪于 ULA 96 孔圓底板(Corning)中並生長三天以形成腫瘤球體。將來自健康供體的血液樣品收集在肝素化管中且 PBMC 使用 Fiolli-Paque PLUS 試劑(GE Healthcare)根據製造商說明書來分離。PBMC 在與

109-6-29

腫瘤球體共培養前用 1 μ g/mL 抗 CD3 抗體活化兩天。在含有一個腫瘤球體和 10⁴ 個 PBMC/孔的 ULA 96 孔圓底板中在與 Mab 1(含有如 SEQ ID NO: 24 所示的重鏈可變區(Vh)、如 SEQ ID NO: 26 所示的輕鏈可變區(Vk)和包含 SEQ ID NO: 88 的 IgG4 重鏈效應子或恒定域)組合的化合物 1(5-(((1R,1aS,6bR)-1-(6-(三氟甲基)-1H-苯並[d]咪唑-2-基)-1a,6b-二氫-1H-環丙並[b]苯並呋喃-5-基)氧基)-3,4-二氫-1,8-二氮雜萘-2(1H)-酮倍半馬來酸鹽)的系列稀釋液存在下共培養三天。培養物上清液中的 IFN- γ 產生水平使用來自 eBioscience 的 ELISA 試劑盒來確定。

結果

【0110】 單獨的化合物 1 在共培養體系中在 10nM 至 100nM 的濃度促進 IFN- γ 從 PBMC 中釋放，而在高濃度($\geq 3\mu$ M)抑制 IFN- γ 釋放。中等水平的化合物 1 與 Mab 1 的組合顯示出顯著增加的 PBMC IFN- γ 產生，這表明較好的體外 T 細胞活性(圖 1)。

實施例 2

【0111】 抗 PD-1 mAb 與 RAF 抑制劑的組合在 K-Ras 突變肺癌和 B-Raf^{V600E} 突變結腸癌模型中在人 PBMC 存在下的作用。

方法

【0112】 在植入當天，從健康志願者所捐獻的 120mL 血液中分離人外周血單核細胞(PBMC)。簡言之，將外周血收集到含有肝素鈉的真空采血管中。PBMC 通過密度梯度離心使用 Histopaque-1077 來分離且用 Dulbecco 磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)洗滌一次。細胞團塊

109-6-29

用適當體積的 DPBS 混懸以使最終濃度為 1×10^8 個細胞/ml 並在接種前置於冰上。NOD/SCID 小鼠每天一次且持續兩天用環磷醯胺 (cyclophosphamide)(在鹽水中製備, 150mg/kg, i.p.) 和雙硫侖 (disulfiram)(在 0.8%吐溫-80/鹽水中製備, 125mg/kg, p.o., 每劑環磷醯胺後 1 小時)預處理。然後在第二劑環磷醯胺後 24 小時, 向動物注射腫瘤細胞或腫瘤片段和 PBMC 的混合物。

【0113】 對於 Calu-6 K-Ras 突變肺癌模型, 將細胞在補充有 10%(v/v)胎牛血清及 100 μ g/ml 青黴素和鏈黴素的 Dulbecco 基本必需培養基(DMEM)中培養。在植入當天, 培養基用新鮮培養基替換。5 小時後, 除去培養基並如上所述收集細胞, 除了將細胞重新混懸于冷的(4 $^{\circ}$ C)DPBS 中以使最終濃度為 5×10^7 個細胞/ml 並在接種前置於冰上。以 1:1:2 的比例混合 Calu-6 細胞、PBMC 和基質膠 (BD, 目錄號 356237)。每只小鼠的右腋區用 70%乙醇清潔, 然後接種細胞。通過 26 號針頭在右前脅向每只動物皮下注射 5×10^6 個 Calu-6 細胞和 2.5×10^6 個 PBMC(200 μ l 細胞混合物在 50%基質膠中)。

【0114】 對於 B-Raf^{V600E} 突變結腸癌衍生自患者的異種移植 (PDX)模型, BCCO-028 衍生自由結腸癌患者手術取出的腫瘤組織。在患者手術後 2-4 小時內, 將腫瘤樣品皮下植入到經麻醉的 NOD/SCID 小鼠的肩胛區中。腫瘤生長至約 300-1000mm³ 後, 將腫瘤手術取出並通過隨後的移植將片段在 NOD/SCID 小鼠中傳代。在第二劑環磷醯胺後 24 小時, 向動物植入 BCCO-028 腫瘤片

109-6-29

段和 PBMC。每只 NOD/SCID 小鼠的右腋區用 70%乙醇清潔，然後接種腫瘤片段。通過 14 號套針針頭在右脅向每只動物皮下植入 BCCO-028 結腸癌(第 5 代)的片段(約 $3 \times 3 \times 3 \text{mm}^3$)，然後通過 26 號針頭在腫瘤片段的邊緣附近皮下注射於 $200 \mu\text{l}$ 50%基質膠中的 5×10^6 個 PBMC。

【0115】 自接種細胞或片段後第 0 天開始，將動物隨機分成 4 組，其中每組 8-11 只小鼠。這些組包括對照組(無藥物治療)、5mg/kg 化合物 1 組(基於游離鹼重量)、10mg/kg Mab 1 組和化合物 1+Mab 1 組合組。治療以 10ml/kg 體重的體積施用，在給藥前即刻評估並相應地調整給藥體積。化合物 1 通過經口管飼法(p.o.)每天一次(QD)施用，而 Mab 1 通過腹膜內(i.p.)注射每週一次(QW)施用。植入後，初始腫瘤體積使用卡尺在兩個維度測量。

【0116】 每週兩次記錄個體體重及在研究期間每天監測小鼠的毒性臨床體征。一旦其腫瘤體積達到 $2,500 \text{mm}^3$ 、腫瘤發生潰瘍或體重減輕超過 20%，就使用二氧化碳對小鼠進行安樂死。

【0117】 腫瘤體積使用以下公式來計算： $V=0.5 \times (a \times b^2)$ ，其中 a 和 b 分別為腫瘤的長徑和短徑。腫瘤生長抑制(TGI)使用以下公式來計算：

$$\%TGI=100 \times [1 - (\text{治療 } t / \text{安慰劑 } t)]$$

治療 t = 時間 t 時的經治療的腫瘤體積

安慰劑 t = 時間 t 時的安慰劑腫瘤體積

結果

【0118】 在 NOD/SCID 小鼠中在人 PBMC 存在下皮下生長的 BCCO-028 PDX 和 Calu-6 細胞中檢查化合物 1 和 Mab 1 的體內功效。化合物 1 針對裸鼠中的 PDX BCCO-028 結腸直腸癌(B-Raf^{V600E} 突變)和人 Calu-6 肺腺癌(K-Ras 突變)腫瘤異種移植物具有顯著的抗腫瘤活性。另外，如下圖所示，化合物 1 和 Mab 1 的協同功效通過這些模型中的腫瘤生長曲線而得以清楚的顯示。組合治療組中的腫瘤顯著小於任何單項治療(圖 2 和圖 3)。

【0119】 上述實施例和對某些實施方案的描述應被認為是說明性的而非限制權利要求書所定義的本申請。容易理解的是，可在不脫離權利要求書所描述的本申請的情況下使用上述特徵的多種變化和組合。所有這些變化都意欲包括在本申請的範圍內。所引用的所有參考文獻通過引用整體併入本申請。

【0120】 應理解的是，在本申請引用任何現有技術出版物的情況下，該引用不意味著承認該出版物在任何國家或地區構成本領域常規知識的一部分。

【0121】 在本申請下述權利要求書和上述說明書中，除非上下文出於語言清楚或含義必要的目的而另有要求，詞語“包括”、“包含”或“含有”以包括性含義使用即表明存在所描述的特徵，但是不排除在本申請各個實施方案中存在或添加其它特徵。

【0122】 本申請通過指明出處而引用的所有出版物、專利、專利申請和公開的專利申請所公開的內容通過引用整體併入本申請。

【符號說明】

【0123】 無。

【發明申請專利範圍】

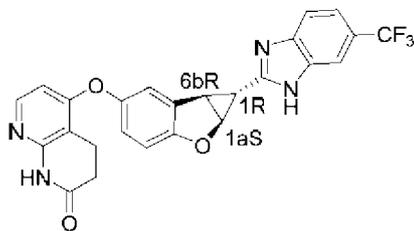
【第1項】一種包含PD-1拮抗劑和RAF抑制劑的藥物組合的用途，其用以製造用於延緩癌症進展或治療癌症的藥劑，

其中所述PD-1拮抗劑為與人PD-1特異性結合的包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)的抗體或其抗原結合片段，所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)含有下列互補決定區(CDR)：

CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3(分別為SEQ ID NO: 31, 32, 33)；和

CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3(分別為SEQ ID NO: 34, 35, 36)；且

其中所述RAF抑制劑為式(II)化合物或其藥用鹽：



式(II)。

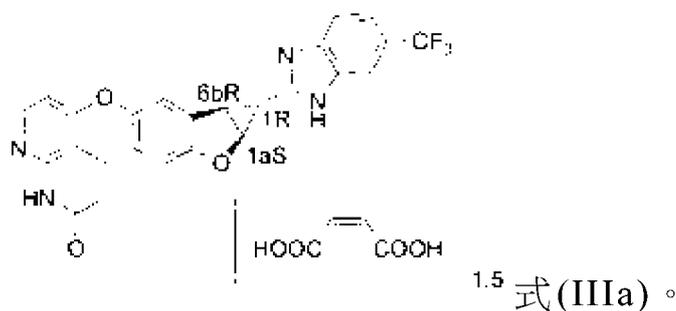
【第2項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中所述PD-1拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)的抗體，所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)分別包含SEQ ID NO: 24和SEQ ID NO: 26。

【第3項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中所述PD-1拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)及IgG4重鏈效應子或恒定域的抗體，所述IgG4重鏈效應子或恒定域包含SEQ ID NO:

88，其中所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)分別包含SEQ ID NO: 24和SEQ ID NO: 26。

【第4項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中所述RAF抑制劑為式(II)化合物的馬來酸鹽。

【第5項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中所述RAF抑制劑為式(IIIa)化合物：



【第6項】如申請專利範圍第1項至第5項中任一項所述的用途，其中所述癌症為實體腫瘤。

【第7項】如申請專利範圍第1項至第5項中任一項所述的用途，其中所述癌症選自腎上腺癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、乳腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、頭頸癌、腎癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、皮膚癌或甲狀腺腫瘤及其併發症。

【第8項】如申請專利範圍第7項所述的用途，其中所述肺癌為小細胞肺癌或非小細胞肺癌。

【第9項】如申請專利範圍第7項所述的用途，其中所述癌症與B-Raf突變、K-Ras/N-Ras突變和/或NF1突變相關。

110-10-18

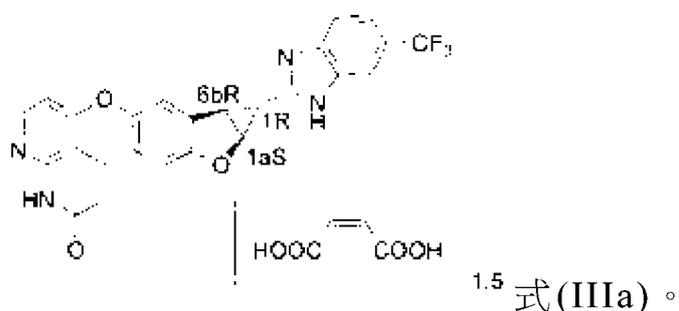
【第10項】如申請專利範圍第1項至第5項中任一項所述的用途，其中所述癌症為各自與K-Ras突變相關的非小細胞肺癌、結腸直腸癌和子宮內膜癌。

【第11項】如申請專利範圍第1項至第5項中任一項所述的用途，其中所述PD-1拮抗劑和所述RAF抑制劑同時、依序或分開施用。

【第12項】如申請專利範圍第1項至第5項中任一項所述的用途，其中所述RAF抑制劑以5-80mg的劑量每天一次口服施用。

【第13項】如申請專利範圍第1項至第5項中任一項所述的用途，其中所述PD-1拮抗劑以0.5-10mg/kg的劑量每週一次或每兩週一次或每三週一次或每四周一次胃腸外施用。

【第14項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中所述PD-1拮抗劑為包含重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)及IgG4重鏈效應子或恒定域的抗體，所述IgG4重鏈效應子或恒定域包含SEQ ID NO: 88，其中所述重鏈可變區(Vh)和輕鏈可變區(Vk)分別包含SEQ ID NO: 24和SEQ ID NO: 26；且所述RAF抑制劑為式(IIIa)化合物：



【第15項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中所述PD-1拮抗劑以0.5-10mg/kg的劑量每週一次或每兩週一次或每三週一次施用

且作為所述RAF抑制劑的式(IIIa)化合物以5-80mg的劑量每天一次施用。

【第16項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中所述PD-1拮抗劑以0.5-10mg/kg的劑量每週一次或每兩週一次或每三週一次靜脈內施用且作為所述RAF抑制劑的式(IIIa)化合物以10-30mg的劑量每天一次施用。

【發明圖式】

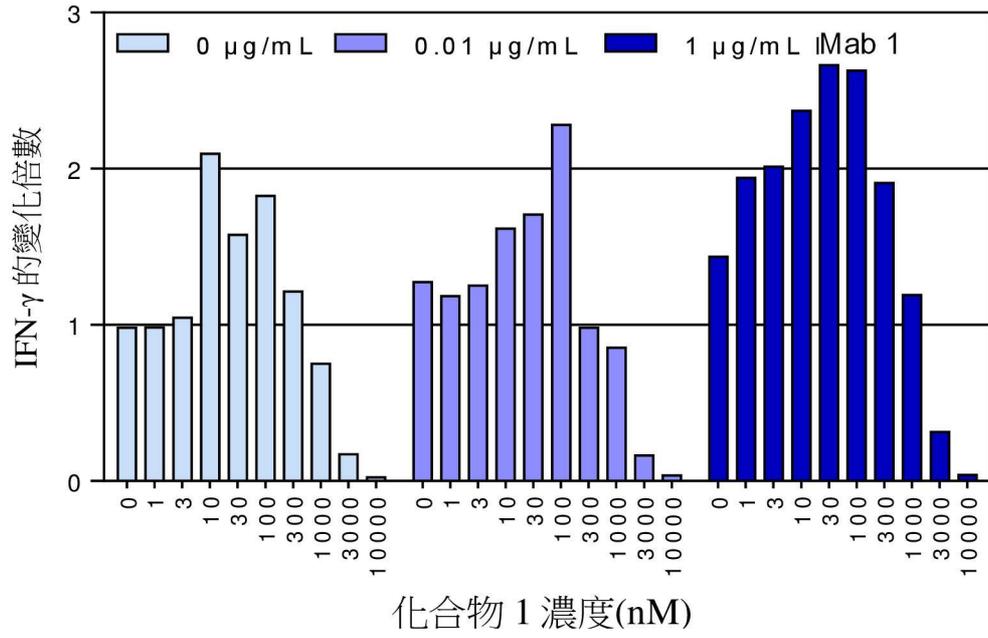


圖 1

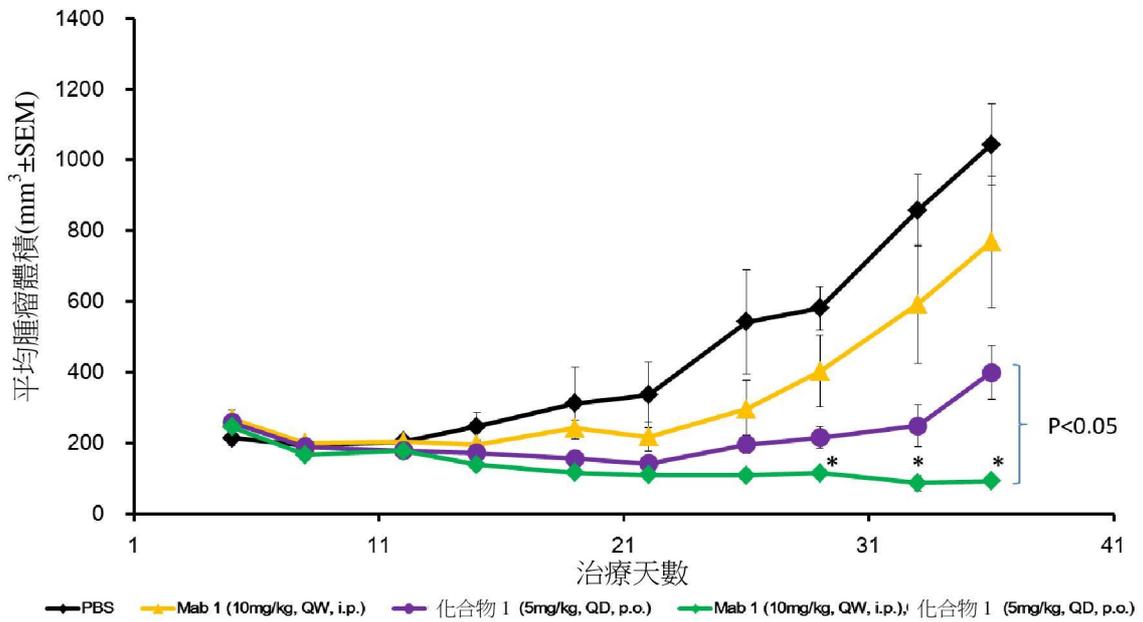


圖 2

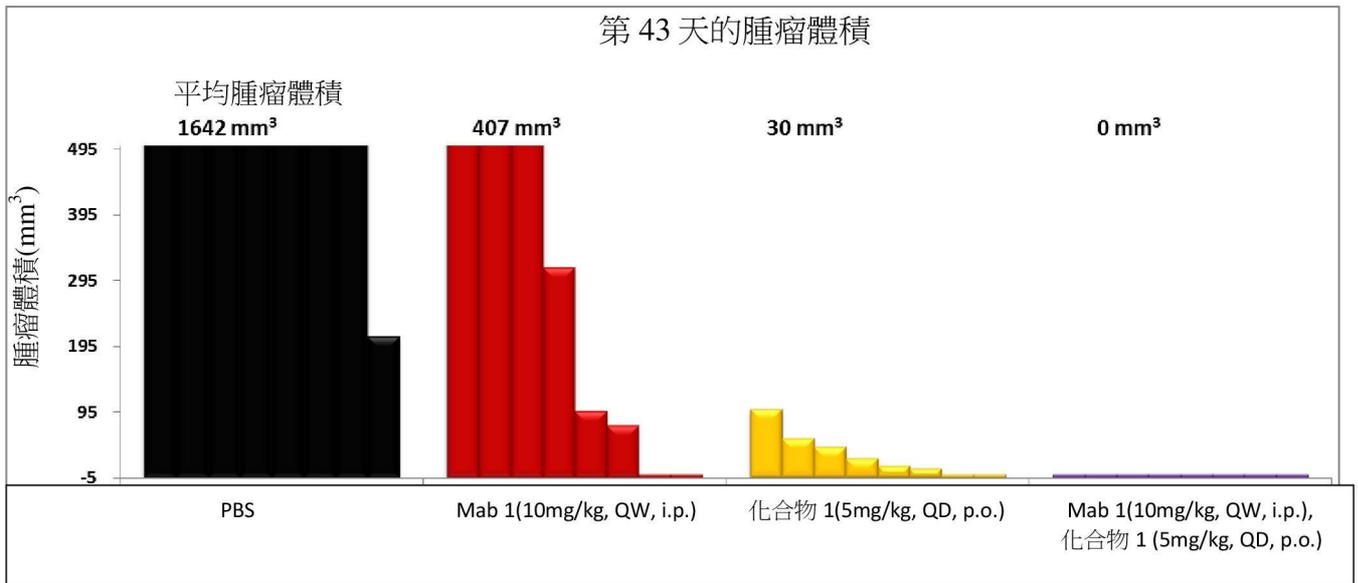


圖 3

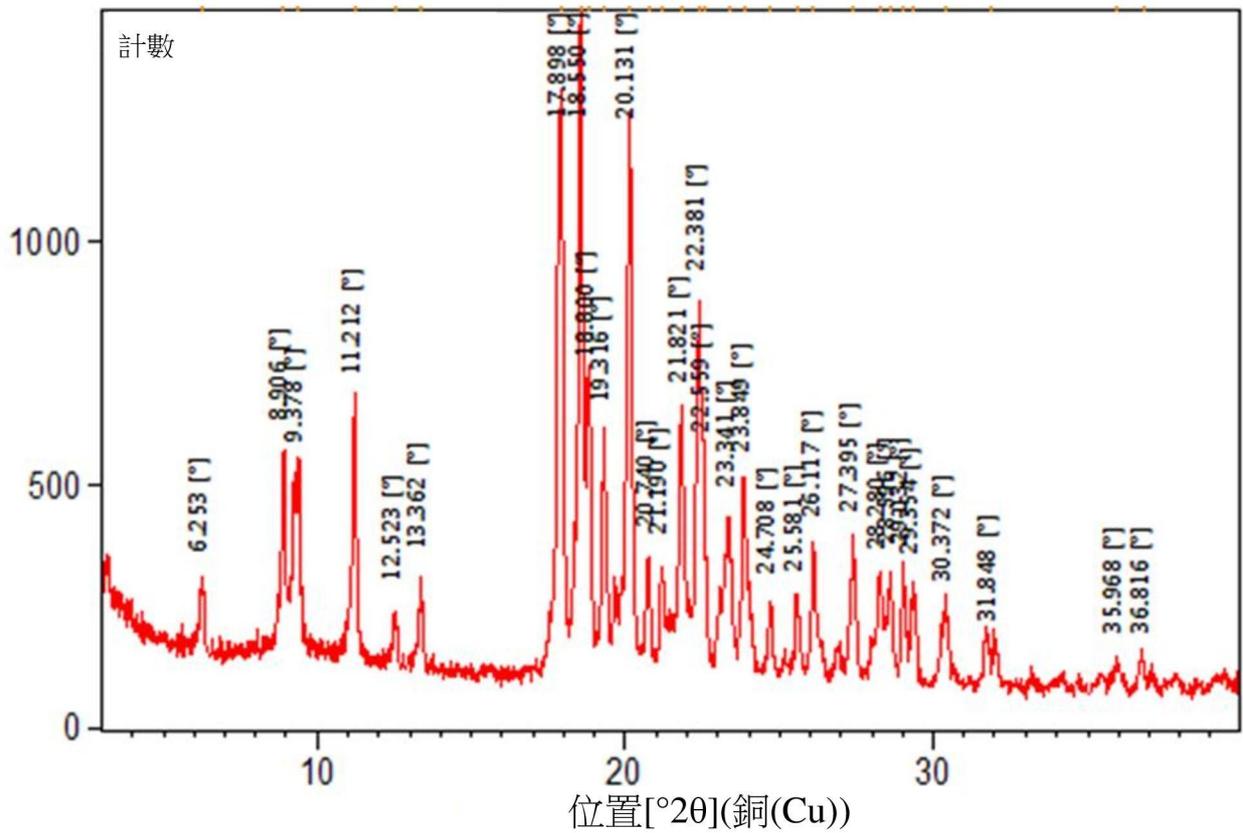


圖 4

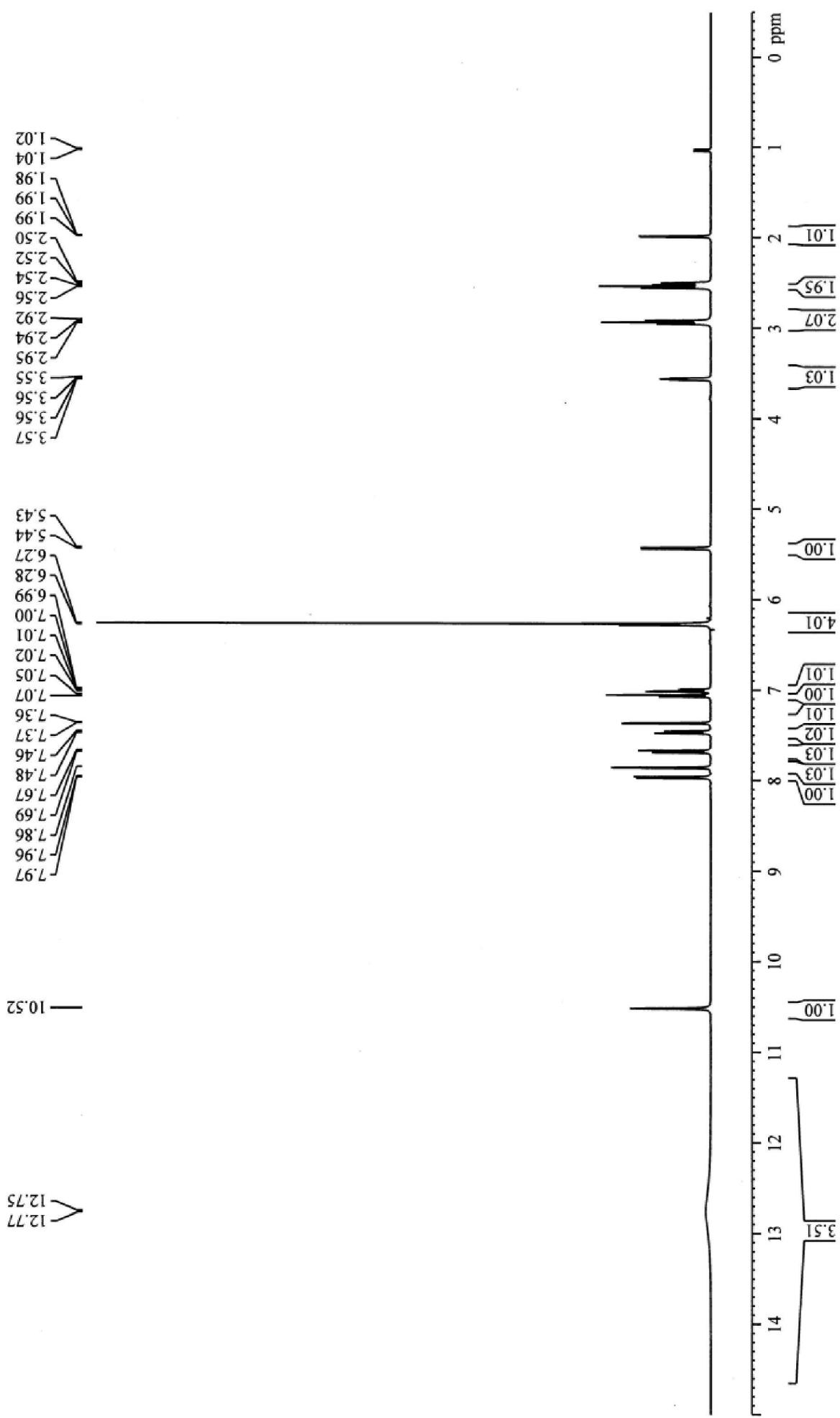


圖 5

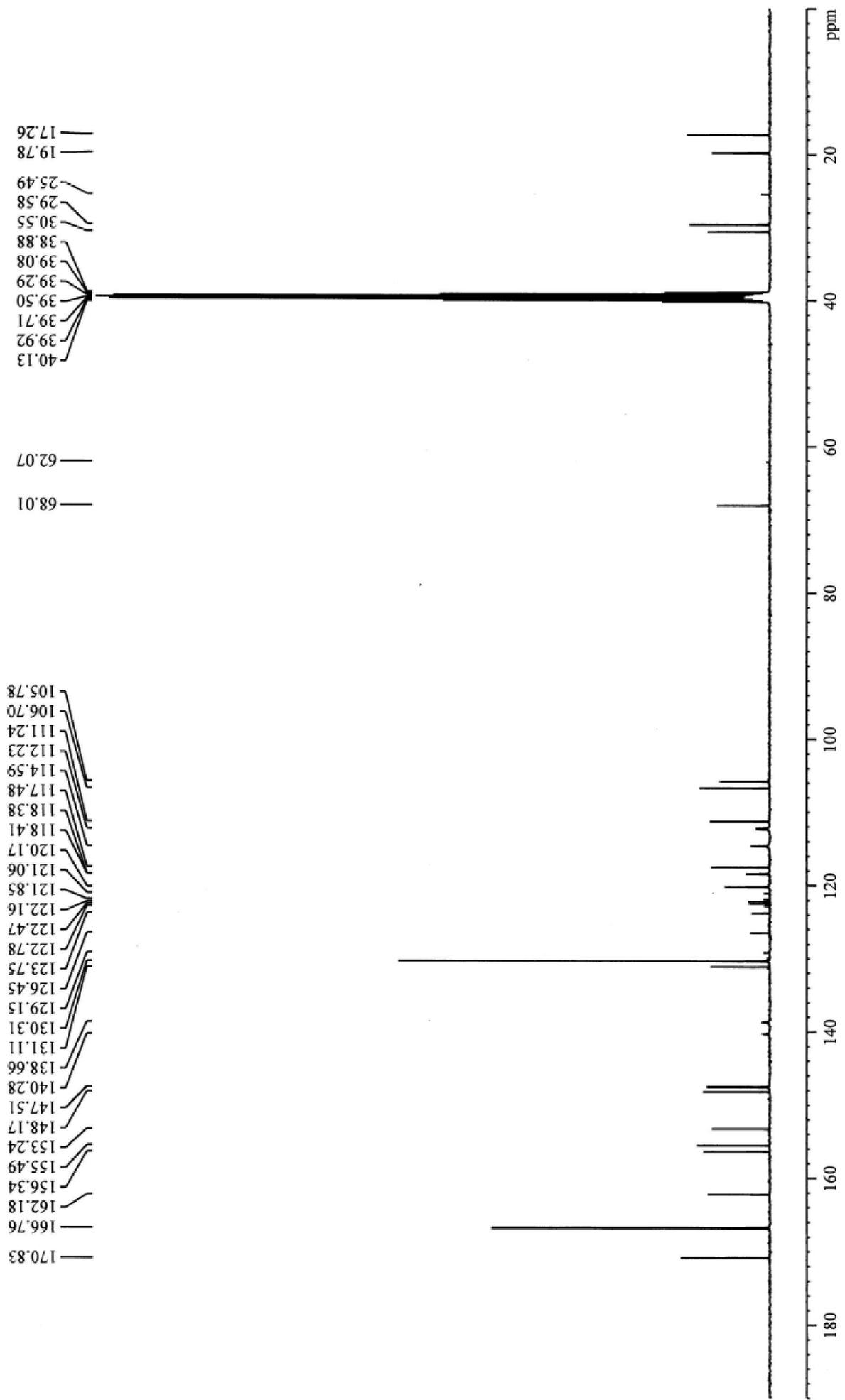


圖 6