



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115282149 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202211003162.1

(22) 申请日 2017.06.05

(30) 优先权数据

62/346,344 2016.06.06 US

(62) 分案原申请数据

201780035323.6 2017.06.05

(71) 申请人 细胞基因公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 索拉雅·卡兰西奥

保罗·霍伦巴赫

安东尼娅·洛佩兹-吉罗纳

凯尔·麦克白

迈克尔·普尔德纳德

艾里特·拉普莱 陆刚

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰 张奎燕

(51) Int.Cl.

A61K 31/454 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

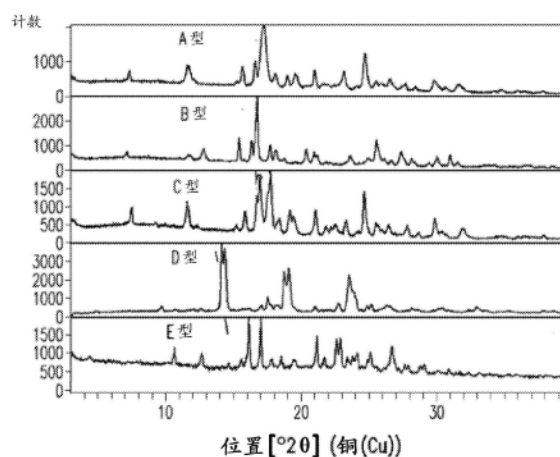
权利要求书3页 说明书80页 附图35页

(54) 发明名称

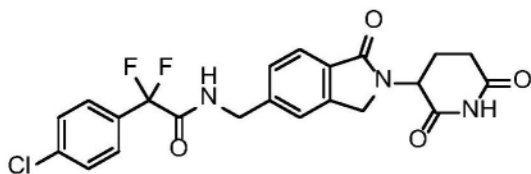
用抗癌剂治疗血液恶性肿瘤

(57) 摘要

本文提供了治疗、预防、管理和/或改善白血病或骨髓增生异常综合征的方法,包括将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物施用于患者。



1. 一种治疗、预防、管理或改善血液癌症的方法,包括将具有以下结构的2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺:



或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物(化合物1)施用于有需要的对象,其中化合物1以约0.1mg至约20mg的剂量施用于所述对象。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述血液癌症是急性骨髓性白血病。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述急性骨髓性白血病是难治性或复发性急性骨髓性白血病。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中化合物1在28天治疗周期的第1天至第5天施用。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述治疗周期包括23天的休息期。

6. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中化合物1在42天治疗周期的第1天至第5天施用。

7. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中化合物1在28天治疗周期的第1天至第3天施用。

8. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中化合物1在28天治疗周期的第1天至第5天和第15天至第19天施用。

9. 如权利要求4至7中任一项所述的方法,其中所述治疗周期重复至少一次。

10. 如权利要求4至8中任一项所述的方法,其中所述治疗周期重复2至4次。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.1mg至约10mg的剂量施用。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.3mg至约8.1mg的剂量施用。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.3mg、0.6mg、1.2mg、2.4mg、3.6mg、5.4mg或8.1mg的剂量施用。

14. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的方法,其中给所述对象施用钙、骨化三醇和/或维生素D补充剂中的一者或多者。

16. 如权利要求15所述的方法,其中在施用化合物1之前,给所述对象施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂中的一者或多者。

17. 如权利要求15所述的方法,其中在所述周期的第1天施用化合物1之前,给所述对象施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂至少3天。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述对象不具有破坏正常钙稳态或阻止钙补充的病症。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的方法,包括施用(2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代嘧啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺)的多晶型物。

20. 如权利要求1至18中任一项所述的方法,包括施用(2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代嘧啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺)的无定形形式。

21. 如权利要求1至18中任一项所述的方法,包括施用化合物1的冻干制剂,其中所述冻干制剂包含化合物1、缓冲剂和填充剂。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,还包括施用治疗有效量的第二活性剂或支持性护理疗法。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述对象是18岁或更年长的患者。

24. 如权利要求1所述的方法,其中所述血液癌症是骨髓增生异常综合征。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征是难治性或复发性骨髓增生异常综合征。

26. 如权利要求24至25中任一项所述的方法,其中化合物1在28天治疗周期的第1天至第5天施用。

27. 如权利要求24至25中任一项所述的方法,其中化合物1在42天治疗周期的第1天至第5天施用。

28. 如权利要求24至25中任一项所述的方法,其中化合物1在28天治疗周期的第1天至第3天施用。

29. 如权利要求24至25中任一项所述的方法,其中化合物1在28天治疗周期的第1天至第5天和第15天至第19天施用。

30. 如权利要求26至29中任一项所述的方法,其中所述治疗周期重复至少一次。

31. 如权利要求26至29中任一项所述的方法,其中所述治疗周期重复2至4次。

32. 如权利要求24至30中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.1mg至约10mg的剂量施用。

33. 如权利要求24至30中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.3mg至约8.1mg的剂量施用。

34. 如权利要求24至30中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.3mg、0.6mg、1.2mg、2.4mg、3.6mg、5.4mg或8.1mg的剂量施用。

35. 如权利要求24至30中任一项所述的方法,其中化合物1以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用。

36. 如权利要求24至35中任一项所述的方法,其中给所述对象施用钙、骨化三醇和/或维生素D补充剂中的一者或多者。

37. 如权利要求36所述的方法,其中在施用化合物1之前,给所述对象施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂中的一者或多者。

38. 如权利要求36所述的方法,其中在所述周期的第1天施用化合物1之前,给所述对象施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂中的一者或多者至少3天。

39. 如权利要求24至38中任一项所述的方法,其中所述对象不具有破坏正常钙稳态或阻止钙补充的病症。

40. 如权利要求24至39中任一项所述的方法,包括施用(2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二

氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺)的多晶型物。

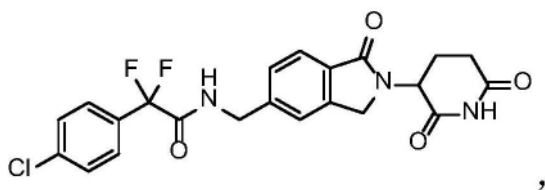
41. 如权利要求24至39中任一项所述的方法,包括施用(2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺)的无定形形式。

42. 如权利要求24至39中任一项所述的方法,包括施用化合物1的冻干制剂,其中所述冻干制剂包含化合物1、缓冲剂和填充剂。

43. 如权利要求24至42中任一项所述的方法,还包括施用治疗有效量的第二活性剂或支持性护理疗法。

44. 如权利要求24至43中任一项所述的方法,其中所述对象是18岁或更年长的患者。

45. 一种适用于治疗血液癌症的方法的化合物,所述方法包括将所述化合物施用于有需要的对象,其中所述化合物是具有以下结构的2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺:



或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物。

用抗癌剂治疗血液恶性肿瘤

[0001] 1. 相关申请案

[0002] 本申请为2017年6月5日提交的、发明名称为“用2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺治疗血液恶性肿瘤”、申请号为2017800353236的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 本专利申请要求2016年6月6日提交的美国临时申请号62/346,344的权益,该临时申请的公开内容全文以引用的方式并入。

2. 技术领域

[0004] 本文提供了用2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体(isotopologue)、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物来治疗、预防、控制和/或改善血液恶性肿瘤的方法。还提供了用于治疗、预防、管理和/或改善血液恶性肿瘤的方法的化合物,其中所述化合物为2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物。

3. 背景技术

[0005] 癌症的特征主要在于来源于给定正常组织的异常细胞的数量增加、这些异常细胞侵袭邻近组织、或者恶性细胞通过淋巴或血液传播至局部淋巴结和转移。临床数据和分子生物学研究表明,癌症是一个多步骤过程,从微小癌前变化开始,这些癌前变化在某些条件下可恶化为赘生物形成。赘生性病变可以克隆进化并产生逐渐增加的侵袭、生长、转移和异质性的能力,尤其是在其中赘生性细胞逃避宿主的免疫监视的条件下。目前的癌症疗法可涉及根除患者中的赘生性细胞的手术、化学疗法、激素疗法和/或放射治疗。Rajkumar等人在Nature Reviews Clinical Oncology 11,628-630(2014)中讨论了癌症治疗的最新进展。

[0006] 目前所有的癌症治疗方法均对患者造成显著的不利影响。例如,由于患者的健康,手术可能是禁忌的,或对患者来说可能是不可接受的。另外,手术可能无法完全移除赘生性组织。放射疗法仅在赘生性组织表现出对辐射的敏感性高于正常组织时有效。放射疗法通常还引起严重的副作用。激素疗法很少作为单一药剂给予。虽然激素疗法可为有效的,但是它通常用于在其他治疗移除大部分癌细胞之后,预防或延缓癌症的复发。

[0007] 关于化学疗法,存在多种可用于治疗癌症的化学治疗剂。大多数癌症化疗药物通过抑制DNA合成,直接或间接通过抑制脱氧核糖核苷酸三磷酸前体的生物合成,以防止DNA复制和伴随的细胞分裂来发挥作用。Gilman等人,Goodman和Gilman's:The Pharmacological Basis of Therapeutics,第十二版.(McGraw Hill,New York)。

[0008] 尽管可获得多种化学治疗剂,但是化学疗法具有很多缺点。Stockdale,Medicine,

第3卷, Rubenstein和Federman编, 第12章, 第10部分, 1998年。几乎所有化学治疗剂都是有毒的, 并且化学疗法会导致显著的并且通常是危险的副作用, 包括严重恶心、骨髓细胞减少和免疫抑制。另外, 即使施用化学治疗剂的组合, 很多肿瘤细胞也具有对化学治疗剂的耐受性或产生对化学治疗剂的耐受性。事实上, 对治疗方案中使用的特定化学治疗剂具有耐受性的那些细胞, 通常被证明对其他药物具有耐受性, 即使这些药剂通过与具体治疗中使用的那些药物不同的机制来发挥作用。这种现象称为多效药物或多药物耐受性。由于耐药性, 很多癌症被证明是或变得标准化学治疗方案难以治愈的。

[0009] 需要施用抗癌剂的安全和有效的剂量和给药方案, 所述抗癌剂包括用于治疗血液恶性肿瘤, 诸如白血病、霍奇金 (Hodgkin) 和非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征 (MDS) 的2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物。

4. 发明内容

[0010] 在一个实施方案中, 本文提供了通过将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物(“化合物1”)施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善血液恶性肿瘤, 例如白血病的方法。在一个实施方案中, 所述白血病是急性骨髓性白血病 (AML)。在一个实施方案中, 所述AML是复发性或难治性AML。在一个实施方案中, 本文提供了一种通过将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺施用于对象来治疗AML的方法。

[0011] 在一个实施方案中, 本文提供了通过将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物(“化合物1”)施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善骨髓增生异常综合征 (MDS) 的方法。在一个实施方案中, 所述MDS是复发性、耐受性或难治性MDS。在一个实施方案中, 本文提供了一种通过将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺施用于对象来治疗MDS的方法。

[0012] 在一个实施方案中, 本文提供了通过在一个周期中将有效量的化合物1施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善血液恶性肿瘤的方法, 其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在一个实施方案中, 本文提供了一种通过在一个周期中将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺施用于对象来治疗AML的方法, 其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天以约0.1mg至约20mg的剂量施用2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺。在一个实施方案中, 本文提供了一种通过在一个周期中将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺施用于对象来治疗复发性或难治性AML的方法, 其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天以约0.1mg至约20mg的剂量施用2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧

代哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺。在一个实施方案中,本文提供了一种通过在一个周期中将2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺施用于对象来治疗MDS的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天以约0.1mg至约20mg的剂量施用2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺。

[0013] 在一个实施方案中,在施用化合物1之前给对象施用钙、骨化三醇和/或维生素D补充剂。在一个实施方案中,在治疗周期的第1天施用化合物1之前至少3天给对象施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂。

[0014] 在一个实施方案中,化合物1在一个治疗周期施用,所述治疗周期包括至少2天的施用期和至少1天的休息期。

[0015] 在一个实施方案中,治疗周期包括28天周期中至少5天的施用期。在一个实施方案中,治疗周期包括28天周期中5天的施用期。

[0016] 在某些实施方案中,本文提供了包含适用于治疗、预防、改善和/或管理白血病(包括AML,更具体地讲复发性或难治性AML)的化合物1的药物组合物、单次单位剂型和试剂盒。在某些实施方案中,本文提供了包含适用于治疗、预防、改善和/或管理MDS的化合物1的药物组合物、单次单位剂型和试剂盒。在某些实施方案中,这种组合物包含任选地与一种或多种其他治疗剂组合的化合物1。在某些实施方案中,本文提供了包含用于治疗白血病(包括AML,更具体地讲复发性或难治性AML)的化合物1的药物组合物。在某些实施方案中,本文提供了包含用于治疗MDS的化合物1的药物组合物。在某些实施方案中,这种组合物包含任选地与一种或多种其他治疗剂组合的化合物1。

[0017] 参考以下具体实施方式,本文所述的主题的这些和其他方面将显而易见。

5. 附图说明

[0018] 图1描绘了化合物1的A型、B型、C型、D型和E型的X射线粉末衍射图叠加图。

[0019] 图2描绘了化合物1的A型的X射线粉末衍射图(XRPD)。

[0020] 图3描绘了化合物1的A型的SEM图像。

[0021] 图4描绘了化合物1的A型的热重分析(TGA)图。

[0022] 图5描绘了化合物1的A型的差示扫描量热(DSC)温度自记图。

[0023] 图6提供了化合物1的A型的动态水分吸附(DVS)等温图。

[0024] 图7提供了化合物1的A型的¹H NMR谱。

[0025] 图8描绘了压缩之前(a)和之后(b)的化合物1的A型的X射线粉末衍射图的比较。

[0026] 图9描绘了化合物1的B型的XRPD图。

[0027] 图10描绘了化合物1的B型的SEM图像。

[0028] 图11描绘了化合物1的B型的TGA温度自记图。

[0029] 图12描绘了化合物1的B型的DSC温度自记图。

[0030] 图13提供了化合物1的B型的DVS等温图。

[0031] 图14提供了化合物1的B型的¹H NMR谱。

[0032] 图15描绘了压缩之前(a)和之后(b)的化合物1的B型的X射线粉末衍射图的比较。

[0033] 图16描绘了化合物1的C型的XRPD图。

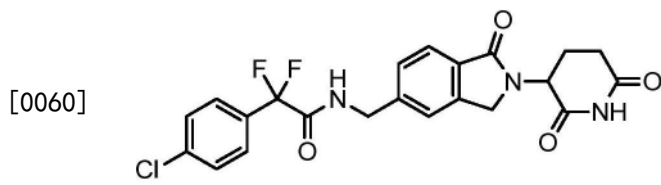
- [0034] 图17描绘了化合物1的C型的SEM图像。
- [0035] 图18描绘了化合物1的C型的TGA温度自记图。
- [0036] 图19描绘了化合物1的C型的DSC温度自记图。
- [0037] 图20提供了化合物1的C型的DVS等温图。
- [0038] 图21提供了化合物1的C型的¹H NMR谱。
- [0039] 图22描绘了压缩之前 (a) 和之后 (b) 的化合物1的C型的X射线粉末衍射图的比较。
- [0040] 图23描绘了化合物1的D型的XRPD图。
- [0041] 图24描绘了化合物1的D型的TGA温度自记图。
- [0042] 图25描绘了化合物1的E型的XRPD图。
- [0043] 图26描绘了化合物1的E型的TGA温度自记图。
- [0044] 图27描绘了无定形化合物1的调制DSC温度自记图。
- [0045] 图28描绘了无定形化合物1的XRPD图。
- [0046] 图29描绘了无定形化合物1的¹H NMR谱。
- [0047] 图30A和图30B展示了HNT-34细胞在与化合物1一起温育的8至16小时内致力于细胞凋亡。
- [0048] 图31提供了AML骨髓样品中肿瘤与正常淋巴细胞的活性面积的比较分析。在图中,****p<0.0001。图中符号表示从估算拟合函数计算的骨髓AML样品的肿瘤(圆形)和淋巴(正方形)群体的个体活性面积值。
- [0049] 图32示出了来自化合物1处理的四种不同供体的粒细胞-单核细胞和红细胞祖细胞的抑制。
- [0050] 图33A、图33B和图33C提供了在暴露至化合物1不同长度之后来自供体HD46、HD47、HD48和HD50的骨髓和红细胞祖细胞的集落数。在图33A至图33C中,使用双因素ANOVA然后是Tukey多重比较检验,与DMSO对照相比,*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。
- [0051] 图34提供了在暴露至30nM浓度的化合物1时细胞活力研究的结果。
- [0052] 图35A展示了暴露至化合物1 24小时对骨髓增生异常综合征患者的骨髓细胞的作用。活细胞数以剂量依赖性方式减少(A)。
- [0053] 图35B展示了暴露至化合物1 24小时对骨髓增生异常综合征患者的骨髓细胞的作用通过诱导细胞凋亡来介导,所述细胞凋亡通过半胱天冬酶3活化测定(B)。
- [0054] 图35C展示了在集落形成测定中化合物1对MDS祖细胞的强效作用(C)。
- [0055] 图36A展示了在集落形成测定中化合物1对基质共培养物中的HR-MDS和AML祖细胞的维持的作用:来自MDS(n=3)、sAML(n=4)和正常供体(NBM;n=5)的CD34+骨髓细胞与SL/M2基质共培养1周,然后接种于甲基纤维素中两周。
- [0056] 图36B展示了在集落再接种测定中化合物1对基质共培养物中的HR-MDS和AML祖细胞的维持的作用:将与图36A相同数量的集落再接种于甲基纤维素中另外两周。化合物1在共培养开始时以指定浓度加入,DMSO作为媒介物对照。对集落评分,以确定化合物1对细胞存活率(图36A)和自我更新率(图36B)的作用。***,p<0.001,用1nM化合物1处理的AML与正常骨髓对照(单因素ANOVA)。**,p=0.01,用10nM化合物1处理的AML与正常骨髓对照(单因素ANOVA)。误差棒表示平均值±SD。

6. 具体实施方式

[0057] 6.1 定义

[0058] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有本领域的普通技术人员通常所理解的含义。所有专利、专利申请、公布的专利申请和其他出版物全文以引用的方式并入。如果本文对术语有多个定义,除非另有说明,以本节中的定义为准。

[0059] 术语化合物1是指具有下式结构的“2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺”:



[0061] 及其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物。在某些实施方案中,化合物1是指2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺及其互变异构体。在某些实施方案中,化合物1是指2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的多晶型物。在某些实施方案中,化合物1是指2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的多晶型物C型。在一个实施方案中,立体异构体是对映异构体。

[0062] 术语“对象”或“患者”是指动物,包括但不限于哺乳动物,包括灵长类动物(例如,人)、奶牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠或小鼠。术语“对象”和“患者”在本文中可结合例如哺乳动物对象,诸如人对象互换使用。

[0063] 如本文所用,“血液癌症”包括骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。术语“血液癌症”和“血液恶性肿瘤”在本文中可互换使用。在一个实施方案中,骨髓瘤是多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,白血病是例如急性粒细胞性或骨髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、成人T细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、多毛细胞白血病、骨髓增生异常、骨髓增生性疾病、慢性粒细胞性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、人类嗜淋巴细胞病毒-1型(HTLV-1)白血病、肥大细胞增生症或B细胞急性淋巴母细胞白血病。在一些实施方案中,淋巴瘤是例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、B细胞免疫母细胞淋巴瘤、小无裂细胞性淋巴瘤、人类嗜淋巴细胞病毒-1型(HTLV-1)白血病/淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、AIDS相关淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、转化型淋巴瘤、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、里希特(Richter)转化、结节边缘区淋巴瘤或ALK阳性大B细胞淋巴瘤。在一个实施方案中,血液癌症或血液恶性肿瘤是惰性淋巴瘤,包括例如DLBCL、滤泡淋巴瘤或边缘区淋巴瘤。

[0064] 术语“白血病”是指造血组织的恶性赘生物。白血病包括但不限于慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性骨髓性白血病和急性原粒细胞性白血病。白血病可以是复发性的、至少一种抗癌疗法难治性的或对其具有耐受性的。

[0065] 在一个实施方案中,对象患有白血病,包括例如慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性骨髓性白血病和急性原粒细胞性白血病。在一个实

施方案中,对象患有慢性淋巴细胞白血病。在一个实施方案中,对象患有慢性髓细胞性白血病。在一个实施方案中,对象患有急性淋巴母细胞白血病。在一个实施方案中,对象患有急性骨髓性白血病。在一个实施方案中,对象患有急性粒细胞性白血病。在一个实施方案中,白血病可以是复发性的、至少一种抗癌疗法难治性的或对至少一种抗癌疗法耐受的。在一个实施方案中,白血病可以是复发性的。在一个实施方案中,白血病可以是至少一种抗癌疗法难治性的。在一个实施方案中,白血病可以对至少一种抗癌疗法具有耐受性。在一个实施方案中,患有复发性或难治性AML的对象为18岁或更年长。在一个实施方案中,患有难治性AML的对象为18岁或更年长。

[0066] 在一个实施方案中,对象患有急性粒细胞性或骨髓性白血病(AML),包括例如以下AML亚型。术语“急性粒细胞性或骨髓性白血病”是指特征为主要未分化型或最小分化型骨髓细胞在骨髓中增殖和累积的血液病症,包括通过FAB(French,American,British)或WHO分类系统分类的亚型。如本文所述,根据FAB分类,AML包括以下亚型:M0(最小分化型AML);M1(最小成熟型AML);M2(成熟型AML);M3(急性早幼粒细胞白血病);M4(急性骨髓单核细胞性白血病);M4(eos急性骨髓单核细胞性白血病伴嗜酸性粒细胞增多);M5(急性单核细胞性白血病);M6(急性红细胞白血病);和M7(急性巨核母细胞性白血病)。如本文所述,根据WHO分类,AML包括以下亚型:具有复现性遗传异常的AML(具有染色体8和染色体21之间的易位的AML;具有染色体16中的易位或倒位的AML;具有染色体9和染色体11之间的易位的AML;具有染色体15和染色体17之间的易位的APL(M3);具有染色体6和染色体9之间的易位的AML;具有染色体3中的易位或倒位的AML);具有染色体1和染色体22之间的易位的AML(巨核母细胞性);具有骨髓增生异常相关变化的AML;涉及前期化学疗法或放射疗法的AML(烷基化剂相关AML;拓扑异构酶II抑制剂相关AML);不可另外分类的AML(不属于上述类别的AML,即最小分化型AML(M0);最小成熟型AML(M1);成熟型AML(M2);急性骨髓单核细胞性白血病(M4);急性单核细胞性白血病(M5);急性红细胞白血病(M6);急性巨核母细胞性白血病(M7);急性嗜碱性粒细胞白血病;急性全骨髓增殖症伴骨髓纤维化);骨髓肉瘤(也称为颗粒细胞肉瘤、绿色瘤或髓外成骨髓细胞瘤);以及未分化型和双表型急性白血病(也称为混合表型急性白血病)。(参见<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-classified.html>,最近查阅日期2017年5月25日)。

[0067] 在一个实施方案中,对象患有骨髓增生异常综合征(MDS),包括例如以下MDS亚型。术语“骨髓增生异常综合征”是指特征为血液的一种或多种细胞组分(红细胞、白细胞(除淋巴细胞之外)和血小板(或其祖细胞、巨核细胞))产生异常的血液病症,包括以下病状:难治性贫血(RA);环形铁粒幼红细胞性RA(RARS);RA伴母细胞过量(RAEB);难治性血细胞减少症伴多系增生异常(RCMD)、难治性血细胞减少症伴单系增生异常(RCUD);不可分类的骨髓增生异常综合征(MDS-U)、单独del(5q)染色体异常相关的骨髓增生异常综合征、治疗相关的骨髓增生异常和慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)。本文所用的MDS还包括极低风险、低风险、中风险、高风险和极高风险MDS。在一些实施方案中,MDS是原发性或新生MDS。在另一个实施方案中,MDS是继发性的。

[0068] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“治疗”、“医疗”和“医治”是指根除或改善疾病或病状,或者疾病或病状相关的一种或多种症状。在某些实施方案中,该术语是指使一种或多种预防剂或治疗剂施用于患有这种疾病或病状的患者所产生的疾病或病状的传播或

恶化最小化。在一些实施方案中,该术语是指在特定疾病的症状发作之后,在存在或不存在其他另外的活性剂的情况下,施用本文提供的化合物。在一个实施方案中,疾病是白血病,包括但不限于慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性骨髓性白血病和急性原粒细胞性白血病。在一个实施方案中,白血病可以是复发性的、至少一种抗癌疗法难治性的或对至少一种抗癌疗法耐受的。在一个实施方案中,疾病是AML,包括上文讨论的AML的亚型。在一个实施方案中,疾病是MDS,包括上文讨论的MDS的亚型。

[0069] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“预防”、“防止”和“阻止”是指预防疾病或病状,或者其一种或多种症状的发作、复发或传播。在某些实施方案中,该术语是指在症状发作之前,在存在或不存在其他另外的活性化合物的情况下,用本文提供的化合物治疗或施用本文提供的化合物,特别是施用于处于本文提供的疾病或病状风险的患者。该术语涵盖抑制或减少特定疾病的症状。特别地,在某些实施方案中,具有疾病家族史的患者是预防方案的候选者。此外,具有复发性症状史的患者也是预防的潜在候选者。就此而言,术语“预防”可与术语“预防性治疗”可互换使用。在一个实施方案中,疾病是白血病,包括但不限于慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性骨髓性白血病和急性原粒细胞性白血病。在一个实施方案中,白血病可以是复发性的、至少一种抗癌疗法难治性的或对至少一种抗癌疗法耐受的。在一个实施方案中,疾病是AML,包括本文讨论的AML的亚型。在一个实施方案中,疾病是MDS,包括本文讨论的MDS的亚型。

[0070] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“控制”、“管理”和“管控”是指预防或减缓疾病或病状,或者其一种或多种症状的发展、传播或恶化。通常,患者从预防剂和/或治疗剂得到的有益效果不会产生疾病或病状的治愈的结果。就此而言,术语“控制”涵盖治疗患有特定疾病的患者,以试图预防或最小化疾病的复发,或延长维持缓解持续的时间。在一个实施方案中,疾病是白血病,包括但不限于慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性骨髓性白血病和急性原粒细胞性白血病。在一个实施方案中,白血病可以是复发性的、至少一种抗癌疗法难治性的或对至少一种抗癌疗法耐受的。在一个实施方案中,疾病是AML,包括本文讨论的AML的亚型。在一个实施方案中,疾病是MDS,包括本文讨论的MDS的亚型。

[0071] 术语“副作用”根据其在领域中的普通和常见含义使用,并且如本文所用可指用本文所述的化合物或组合物治疗所产生的本文所述的疾病的治疗、预防、管理或改善相关的特定病症。一种此副作用是中性粒细胞减少症的发作。中性粒细胞减少症可以是骨髓损伤的结果,是指导致中性粒细胞产生和/或成熟的抑制、消除或破坏(直接或间接)的任何病症。

[0072] 术语“难治性或耐受性”是指即使在强化治疗后,对象或哺乳动物体内也有残留的癌细胞的情况。

[0073] 术语“耐药性”是指疾病对一种或多种某些药物的治疗无响应的病症。耐药性可以是固有的,这意味着疾病从未对一种或多种特定药物产生响应,或者耐药性可以是获得的,这意味着疾病停止对该疾病此前产生响应的一种或多种特定药物产生响应。在某些实施方案中,耐药性是固有的。在某些实施方案中,耐药性是获得的。

[0074] 术语“复发性”是指在治疗后具有癌症缓解的对象或哺乳动物的癌细胞恢复的情况。

[0075] “周期疗法”是指包括本文所述的施用期和本文所述的休息期的方案或疗法。

[0076] 如本文所用,术语“施用期”是指将本文所述的化合物或组合物连续或主动施用于对象的一段时间。

[0077] 如本文所用,术语“休息期”是指通常在施用期后,本文所述的化合物或组合物不施用于对象(例如停止治疗)的一段时间。在某些实施方案中,“休息期”是指单次药剂不施用于对象或停止使用特定化合物治疗的一段时间。在这些实施方案中,可将第二治疗剂(例如,不同于此前施用期所施用的化合物或组合物的药剂)施用于对象。

[0078] 术语“QD”是指每日一次剂量施用。

[0079] 如本文所用,术语“确定”、“测量”、“评价”、“评估”和“测定”通常是指任何形式的测量,包括确定一种要素是否存在。这些术语包括定量和/或定性测定二者。评估可以是相对的或绝对的。“评估……的存在”可包括确定某物存在的量,以及确定其是否存在。

[0080] 如本文所用,并且除非另外指明,化合物的“治疗有效量”是足以在疾病或病状的治疗或管理中提供治疗有益效果,以延缓或最小化疾病或病状相关的一种或多种症状的量。化合物的治疗有效量意指单独或与其他疗法组合的治疗剂的量,其在疾病或病状的治疗或管理中提供了治疗有益效果。术语“治疗有效量”可涵盖改善总体治疗、减少或避免疾病或病状的症状或起因,或者增强另一种治疗剂的治疗功效的量。

[0081] 如本文所用,并且除非另外指明,化合物的“预防有效量”是足以预防疾病或病状,或者预防其复发的量。化合物的预防有效量意指单独或与其他药剂组合的治疗剂的量,其在疾病的预防中提供了预防有益效果。术语“预防有效量”可涵盖改善总体预防或增强另一种预防剂的预防功效的量。

[0082] 如本文所用,ECOG状态是指美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)行为状态(Okun M等人, Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982;5(6):649-655),如下所示:

[0083]	评分	描述
	0	具有完全活动能力,能够执行所有疾病前期行为,无限制
	1	身体剧烈活动受限制,但能够步行并且能够进行轻型或案头工作,例如轻型家务劳动、办公室工作。
	2	能够步行,并且能够进行全部自我护理,但不能进行任何工作活动。在超过 50%的清醒时间里能够下床活动。
	3	只能够进行有限的自我护理,在超过 50%的清醒时间里局限于床或轮椅上。
	4	完全丧失劳动力。不能进行任何自我护理。完全局限于床或轮椅上。
	5	死亡

[0084] 如本文所用,总体存活期(OS)意指从临床试验中的随机分组直到由于任何原因而死亡的时间。无恶化存活期(PFS)意指从临床试验中的随机分组直到恶化或死亡的时间。无事件存活期(EFS)意指从研究进入直到任何治疗失败(包括疾病恶化、由于任何原因而停止治疗、或死亡)的时间。整体反应率(ORR)意指实现完全和部分反应的患者的百分比的总和。反应持续时间(DoR)是从实现反应直到复发或疾病恶化的时间。

[0085] 如本文所用,“用化合物1治疗的患者群体”是指已接受任何化合物1治疗的患者群体。

[0086] 如本文所用,“未用化合物1治疗的患者群体”是指未接受任何化合物1治疗的患者群体。这种患者群体包括未接受任何癌症治疗的患者、已用安慰剂治疗的患者、以及已用除化合物1治疗之外的任何癌症疗法治疗的患者。

[0087] 在白血病患者,特别是AML患者中,可以根据国际工作组AML反应标准(International Working Group Response Criteria in AML)来评估对治疗的反应(Cheson等人Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis,standardization of response criteria,treatment outcomes,and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia.J Clin Oncol 2003;21(24):4642-9)。

	反应标准	评估时间	中性粒细胞 (μL)	血小板 (μL)	骨髓母 细胞(%)	其他
[0088]	早期治疗评估	治疗后 7-10 天	NA	NA	<5	
	形态学无白	依方案而异	NA	NA	<5	流式细胞术 EMD
[0089]	血病状态					
	形态学 CR	依方案而异	$\geq 1,000$	$\geq 100,000$	<5	输注 EMD
	细胞遗传学 CR (CRc)	依方案而异	$\geq 1,000$	$\geq 100,000$	<5	细胞遗传学—正常, EMD
	分子 CR (CRm)	依方案而异	$\geq 1,000$	$\geq 100,000$	<5	分子—阴性, EMD
	血液未完全 恢复的形态 学 CR (CRi)	依方案而异	除残留的中性粒细胞减少症(<1,000/ μL)或血小板减少症(<100,000/ μL)之外, 满足全部 CR 标准。			
	部分缓解	依方案而异	$\geq 1,000$	$\geq 100,000$	从 ≥ 50 减 少为 5 至 25	如果奥氏(Auer)小体 呈阳性, 则母细胞 $\leq 5\%$
	CR 后复发	依方案而异	白血病母细胞在外周血中或 $\geq 5\%$ 的母细胞在骨髓中的再现不再归因于任何其他原因(例如, 巩固疗法后的骨髓再生)。			

[0090] 图例: AML=急性粒细胞性白血病; CR=完全缓解; EMD=髓外病; IWG=国际工作组; NA=不适用。

[0091] 如本文所用, 并且除非另外指明, 术语“药学上可接受的盐”包括但不限于酸性基团的盐。在某些酸性条件下, 化合物可形成多种无机酸和有机酸的许多不同的盐。可用于制备此类碱性化合物的药学上可接受的盐的酸为形成诸如药理上可接受的阴离子的盐的那些酸, 所述盐包括但不限于乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、氢溴酸盐、乙二胺四乙酸钙盐、樟脑磺酸盐、碳酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、柠檬酸盐、二盐酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐、月桂基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、甘苯肿酸盐、己基间苯二酚盐、海巴明盐、羟基萘甲酸盐、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲烷磺酸盐(甲磺酸盐)、甲基硫酸盐、肉豆蔻盐(muscate)、萘磺酸盐、硝酸盐、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、单宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、三乙基碘盐和双羟萘酸盐。

[0092] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“水合物”意指本文提供的化合物或其盐,还包括通过非共价分子间力结合的化学计量或非化学计量的水。水合物可以是结晶的或非结晶的。

[0093] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“溶剂合物”意指一种或多种溶剂分子与本文提供的化合物结合而形成的溶剂合物。术语“溶剂合物”包括水合物(例如,一水合物、二水合物、三水合物、四水合物等等)。溶剂合物可以是结晶的或非结晶的。

[0094] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“立体异构体”涵盖所有对映异构/立体异构纯的和/或对映异构/立体异构富集的本文提供的化合物。

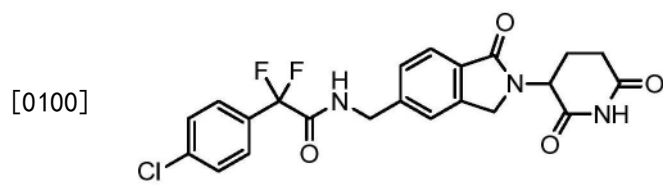
[0095] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“立体异构纯的”或“对映异构纯的”意指化合物包括一种立体异构体,且实质上不含其相反立体异构体或对映异构体。例如,当化合物含有80%、90%或95%或更多的一种立体异构体和20%、10%或5%或更少的相反立体异构体时,化合物是立体异构或对映异构纯的。在某些情况下,当化合物关于手性中心为约80% ee(对映异构体过量)或更大,优选地关于特定手性中心等于或大于90% ee,更优选地关于特定手性中心95% ee时,本文提供的化合物被认为具有光学活性或为立体异构/对映异构纯的(即,实质上R-型或实质上S-型)。

[0096] 如本文所用,并且除非另外指明,术语“立体异构富集的”或“对映异构富集的”涵盖本文提供的化合物的立体异构体的外消旋混合物以及其他混合物(例如,R/S=30/70、35/65、40/60、45/55、55/45、60/40、65/35和70/30)。

[0097] 如本文所用,除非另外指明,任何保护基团、氨基酸和其他化合物的缩写符合其通用用途、公认缩写或IUPAC-IUB生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature)(参见,Biochem.1972,11:942-944)。

[0098] 6.2化合物

[0099] 适用于本文提供的方法的化合物是具有下式结构的化合物1:2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺:



[0101] 或其立体异构体或立体异构体的混合物、同位素体、药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂合物、水合物、共晶体、包合物或多晶型物。在某些实施方案中,化合物1是指2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺。

[0102] 化合物1可以根据本文提供的实施例所述的或美国专利No.9,499,514所述的方法制备,该专利的公开内容全文以引用的方式并入本文。根据本文的教导,化合物也可根据本领域的技术人员显而易见的其他方法合成。

[0103] 在某些实施方案中,化合物1是固体。在某些实施方案中,化合物1是水合物形式。在某些实施方案中,化合物1是溶剂合物形式。在某些实施方案中,化合物1是无水的。

[0104] 在某些实施方案中,化合物1是无定形形式。在某些实施方案中,化合物1是结晶。在某些实施方案中,化合物1是结晶形式,如2017年1月6日提交的美国临时申请No.15/400,630所述,该临时申请全文以引用的方式并入本文。示例性固体形式如第86-101页所述。

[0105] 化合物1的固体形式可以根据2017年1月6日提交的美国专利申请No.15/400,630的公开内容所述的方法制备。参见第86-101页。固体形式也可以根据本领域的技术人员显而易见的其他方法制备。

[0106] 在一个实施方案中,化合物1是2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的多晶型物A型、B型、C型、D型、E型或无定形式。2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的多晶型物在本文中简要描述。

[0107] 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的A型

[0108] 在某些实施方案中,方法所用的化合物是2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的A型。

[0109] 在一个实施方案中,A型是2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无水形式。在另一个实施方案中,2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的A型是结晶。

[0110] 在某些实施方案中,A型从某些溶剂体系,例如包含以下溶剂中的一种或多种的溶剂体系通过结晶来获得:丙酮以及室温下异丙醇和水的溶剂混合物。在某些实施方案中,A型在高温下从浆液,例如约50℃,乙醇/水(1:1)、丙酮或乙腈中,以中间固体形式获得。

[0111] 在某些实施方案中,A型是实质上结晶,如例如X-射线粉末衍射测定所示。在一个实施方案中,A型具有实质上如图2所示的X-射线粉末衍射图案。

[0112] 在一个实施方案中,如图2所示,A型在大约11.5、15.6、16.6、17.2、18.1、19.0、19.6、21.1、23.2或24.8度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个或多个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,A型在大约15.6、16.6、17.2或24.8度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个、两个、三个或四个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表A所示,A型具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表A所示,A型具有一个、两个或三个特征X-射线粉末衍射峰。

[0113] 表A

[0114]	编号	位置[° 2θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
	1	7.23	12.2187	17.6
	2	11.52	7.6789	29.7
	3	15.22	5.8209	7.5
	4	15.62	5.6720	31.2
	5	16.58	5.3466	40.3
	6	17.19	5.1576	100.0
	7	18.08	4.9056	22.3
	8	19.00	4.6702	19.6
	9	19.60	4.5302	22.1
	10	21.05	4.2197	29.2
	11	21.74	4.0884	8.3
	12	22.01	4.0388	7.1

[0115]	编号	位置[°2 θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
	13	22.47	3.9576	6.0
	14	23.22	3.8312	28.6
	15	24.17	3.6825	5.6
	16	24.77	3.5945	57.2
	17	25.59	3.4813	14.6
	18	25.94	3.4356	10.5
	19	26.63	3.3470	17.4
	20	27.73	3.2172	10.0
	21	28.51	3.1307	7.1
	22	29.88	2.9906	19.3
	23	30.76	2.9065	7.1
	24	31.59	2.8327	11.1
	25	34.82	2.5766	4.8
	26	36.05	2.4913	4.3

[0116] 在一个实施方案中,A型具有图3所示的SEM图。

[0117] 在一个实施方案中,结晶A型具有实质上对应于图4所示的代表性TGA温度自记图的热重量(TGA)温度过程线。在某些实施方案中,未观察到A型的TGA重量损失。

[0118] 在一个实施方案中,结晶A型具有实质上对应于图5所示的DSC温度自记图。在某些实施方案中,A型的特征在于包括起始温度为229°C并且熔化热为118J/g的熔融事件的DSC图。

[0119] 在某些实施方案中,A型的特征在于动态水分吸附分析。代表性动态水分吸附(DVS)等温图如图6所示。在某些实施方案中,当相对湿度(“RH”)从约0%增加至约90%RH时,A型表现出小于1.5%、小于1.2%或约1.2%w/w的水摄取。在某些实施方案中,如配备有设定为225°C的样品加热处理器的库伦卡尔·费歇尔(Karl Fischer,KF)滴定器所确定,A型包含小于0.1%的水。

[0120] 在某些实施方案中,通过¹H NMR观察到A型无显著降解或残留溶剂(图7)。

[0121] 在某些实施方案中,A型的特征在于其在压缩时的稳定特征。在某些实施方案中,A型是稳定的,例如在施加2000-psi压力约1分钟时,其XRPD图案保持实质上不变,但具有更宽的衍射峰(图8)。

[0122] 在又一个实施方案中,A型是实质上纯的。在某些实施方案中,实质上纯的A型实质上不含其他固体形式,例如无定形形式。在某些实施方案中,实质上纯的A型的纯度为不小于约95%纯的、不小于约96%纯的、不小于约97%纯的、不小于约98%纯的、不小于约98.5%纯的、不小于约99%纯的、不小于约99.5%纯的或不小于约99.8%纯的。

[0123] 某些实施方案,A型是实质上纯的。在本文的某些实施方案中,A型实质上不含包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的其他固体形式,包括例如B型、C型、D型、E型和/或包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。在某些实施方案中,A型是包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的固体形式的混合物,包括例如包含以下一者或多者的混合物:B型、C型、D型、E型和包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡

啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。

[0124] 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的B型

[0125] 在某些实施方案中,方法所用的化合物是2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无水B型。

[0126] 在某些实施方案中,B型从某些溶剂体系,例如包含以下溶剂中的一种或多种的溶剂体系:甲醇/水、DMSO/异丙醇、DMSO/甲苯和DMSO/水通过反溶剂再结晶来获得。在某些实施方案中,B型从THF/水(1:1)通过冷却再结晶来获得。

[0127] 在某些实施方案中,B型是结晶,如例如X-射线粉末衍射测定所示。在一个实施方案中,B型具有实质上如图9所示的X-射线粉末衍射图案。

[0128] 在一个实施方案中,如图9所示,B型在大约15.4、16.3、16.7、17.7、20.4、25.6或27.5度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个或多个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,B型在大约16.7、25.6、15.4或16.3度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个、两个、三个或四个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表B所示,B型具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表B所示,B型具有一个、两个或三个特征X-射线粉末衍射峰。

[0129] 表B. 化合物1的B型的X-射线衍射峰

[0130]

编号	位置[° 2θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
1	7.01	12.6035	9.3
2	11.58	7.6444	8.3
3	11.80	7.5027	6.8
4	12.73	6.9551	18.4
5	15.38	5.7601	34.8
6	16.32	5.4330	31.4
7	16.72	5.3012	100.0
8	17.72	5.0046	26.6
9	18.13	4.8930	19.8
10	18.77	4.7271	7.5
11	20.41	4.3516	22.0
12	21.02	4.2258	15.9
13	21.21	4.1881	13.5
14	21.93	4.0529	3.4
15	23.68	3.7581	14.2
16	25.01	3.5601	10.4

[0131]	编号	位置[°2 θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
	17	25.63	3.4755	37.3
	18	26.19	3.4030	9.8
	19	26.73	3.3349	8.5
	20	27.45	3.2499	20.9
	21	27.71	3.2193	9.4
	22	28.22	3.1623	11.8
	23	29.48	3.0296	4.7
	24	30.10	2.9692	15.0
	25	31.08	2.8775	18.3
	26	31.65	2.8272	6.2
	27	34.29	2.6150	3.4

[0132] 在一个实施方案中,B型具有图10所示的SEM图。在一个实施方案中,B型具有实质上对应于图11所示的代表性TGA温度自记图的热重量(TGA)温度过程线。在某些实施方案中,在小于170℃下,B型未显示出TGA重量损失。在某些实施方案中,在170-230℃之间,B型显示出0.4%的TGA重量损失。

[0133] 在一个实施方案中,结晶B型具有实质上对应于图12所示的DSC温度自记图。在某些实施方案中,B型的特征在于包括在219-224℃下的熔融/再结晶事件和峰值温度为231℃的主要熔融事件的DSC图。

[0134] 在某些实施方案中,B型的特征在于动态水分吸附分析。代表性动态水分吸附(DVS)等温图如图13所示。在某些实施方案中,当相对湿度(“RH”)从约0%增加至约90%RH时,B型表现出约1.4%w/w的水摄取。在某些实施方案中,如配备有设定为225℃的样品加热处理器的库伦卡尔·费歇尔(Karl Fischer,KF)滴定器所确定,B型包含小于0.1%的水。

[0135] 在某些实施方案中,通过¹H NMR检测到,B型未显示出显著降解或残留溶剂(图14)。

[0136] 在某些实施方案中,B型的特征在于其在压缩时的稳定特征。在某些实施方案中,B型是稳定的,例如在施加2000-psi压力约1分钟时,其XRPD图案保持实质上不变,但具有更宽的衍射峰(图15)。

[0137] 在又一个实施方案中,B型是实质上纯的。在某些实施方案中,实质上纯的B型实质上不含其他固体形式,例如无定形形式。在某些实施方案中,实质上纯的B型的纯度为不小于约95%纯的、不小于约96%纯的、不小于约97%纯的、不小于约98%纯的、不小于约98.5%纯的、不小于约99%纯的、不小于约99.5%纯的或不小于约99.8%纯的。

[0138] 某些实施方案,B型是实质上纯的。在某些实施方案中,B型实质上不含包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的其他固体形式,包括例如A型、C型、D型、E型和/或包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。在某些实施方案中,B型是包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的固体形式的混合物,包括例如包含以下一者或多者的混合物:A型、C型、D型、E型和包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。

[0139] 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,

2-二氟乙酰胺的C型

[0140] 在某些实施方案中,方法所用的化合物是2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无水C型。在某些实施方案中,在2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的晶体形式中,C型是热力学最稳定的无水物。

[0141] 在某些实施方案中,C型通过使溶于某些溶剂体系(例如包含以下溶剂中的一种或多种的溶剂体系:乙腈/水、丙酮或乙醇/水)的2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺长时间浆化来获得。

[0142] 在某些实施方案中,C型是结晶,如例如X-射线粉末衍射测定所示。在一个实施方案中,C型具有实质上如图16所示的X-射线粉末衍射图案。

[0143] 在一个实施方案中,如图16所示,C型在大约7.4、11.5、15.8、16.7、16.9、17.7、18.4、19.2、19.5、21.1、23.4、24.7或29.9度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个或多个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,C型在大约16.7、16.9、17.7或24.7度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个、两个、三个或四个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表C所示,C型具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表C所示,C型具有一个、两个或三个特征X-射线粉末衍射峰。

[0144] 表C. 化合物1的C型的X-射线衍射峰

[0145]

编号	位置[° 2θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
1	7.36	12.0091	32.0
2	9.14	9.6750	8.3
3	11.51	7.6855	44.7
4	12.22	7.2420	4.9
5	15.17	5.8398	8.4
6	15.82	5.6011	31.8
7	16.68	5.3140	57.1
8	16.92	5.2392	86.8
9	17.72	5.0057	100.0
10	18.39	4.8242	21.9
11	19.18	4.6268	36.4
12	19.45	4.5649	27.1
13	21.11	4.2077	40.4
14	21.82	4.0724	12.4
15	22.28	3.9902	12.0
16	22.57	3.9398	17.6

[0146]

编号	位置[°2 θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
17	23.36	3.8082	24.7
18	24.26	3.6695	7.1
19	24.71	3.6026	72.5
20	25.74	3.4615	16.9
21	26.03	3.4231	9.7
22	26.51	3.3627	17.7
23	27.88	3.1998	18.0
24	28.70	3.1104	6.9
25	29.91	2.9871	30.5
26	30.43	2.9375	10.7
27	30.83	2.9006	5.8
28	32.01	2.7960	16.6
29	37.94	2.3718	5.5

[0147] 在一个实施方案中,C型具有图17所示的SEM图。在一个实施方案中,C型具有实质上对应于图18所示的代表性TGA温度自记图的热重量(TGA)温度过程线。在某些实施方案中,C型未显示出TGA重量损失。

[0148] 在一个实施方案中,结晶C型具有实质上对应于图19所示的DSC温度自记图。在某些实施方案中,C型的特征在于包括起始温度为232℃并且熔化热为126J/g的熔融事件的DSC图。

[0149] 在某些实施方案中,C型的特征在于动态水分吸附分析。代表性动态水分吸附(DVS)等温图如图20所示。在某些实施方案中,当相对湿度(“RH”)从约0%增加至约90%RH时,C型表现出约0.6%w/w的水摄取。在某些实施方案中,如配备有设定为225℃的样品加热处理器的库伦卡尔·费歇尔(Karl Fischer, KF)滴定器所确定,C型包含小于0.1%的水。

[0150] 在某些实施方案中,通过¹H NMR检测到,C型未显示出显著降解或残留溶剂(图21)。

[0151] 在某些实施方案中,C型的特征在于其在压缩时的稳定特征。在某些实施方案中,C型是稳定的,例如在施加2000-psi压力约1分钟时,其XRPD图案保持实质上不变,但具有更宽的衍射峰(图22)。

[0152] 在又一个实施方案中,C型是实质上纯的。在某些实施方案中,实质上纯的C型实质上不含其他固体形式,例如无定形式。在某些实施方案中,实质上纯的C型的纯度为不小于约95%纯的、不小于约96%纯的、不小于约97%纯的、不小于约98%纯的、不小于约98.5%纯的、不小于约99%纯的、不小于约99.5%纯的或不小于约99.8%纯的。

[0153] 在某些实施方案中,C型是实质上纯的。在某些实施方案中,C型实质上不含包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的其他固体形式,包括例如A型、B型、D型、E型和/或包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。在某些实施方案中,C型是包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的固体形式的混合物,包括例如包含以下一者或多者的混合物:A型、B型、D型、E型和包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吡啶啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。

[0154] 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的D型

[0155] 在某些实施方案中,方法所用的化合物是2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的D型。在某些实施方案中,2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的D型是DMSO溶剂合物。

[0156] 在某些实施方案中,D型通过加热溶于DMSO/甲基异丁基酮的B型并冷却溶液来获得。

[0157] 在某些实施方案中,D型是结晶,如例如X-射线粉末衍射测定所示。在一个实施方案中,D型具有实质上如图23所示的X-射线粉末衍射图案。

[0158] 在一个实施方案中,如图23所示,D型在大约14.1、14.3、18.8、19.1、23.6或24.0度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个或多个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,D型在大约14.1、14.3、18.8或19.1度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个、两个、三个或四个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表D所示,D型具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表D所示,D型具有一个、两个或三个特征X-射线粉末衍射峰。

[0159] 表D. 化合物1的D型的X-射线衍射峰

[0160]

编号	位置[°2 θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
1	4.77	18.5435	3.0
2	9.57	9.2399	7.0
3	10.55	8.3876	3.1
4	11.95	7.4070	3.7
5	12.50	7.0808	3.5
6	14.06	6.2990	100.0
7	14.30	6.1927	92.9
8	16.13	5.4943	3.8
9	17.02	5.2097	8.4
10	17.50	5.0676	19.8
11	17.78	4.9881	8.0
12	18.09	4.9049	7.7
13	18.27	4.8561	9.0
14	18.75	4.7326	58.5
15	19.09	4.6482	63.5
16	21.04	4.2228	7.3
17	22.77	3.9053	10.9
18	23.58	3.7738	53.6
19	24.02	3.7045	24.6
20	24.90	3.5756	8.4
21	25.22	3.5310	10.0

[0161]	编号	位置[°2 θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
	22	26.37	3.3796	9.4
	23	26.63	3.3470	7.9
	24	28.21	3.1640	5.8
	25	29.82	2.9958	3.0
	26	30.16	2.9629	5.0
	27	30.45	2.9361	6.7
	28	32.48	2.7566	3.3
	29	33.03	2.7120	8.1
	30	33.69	2.6604	3.4
	31	35.32	2.5413	3.0
	32	37.96	2.3702	3.2
	33	38.70	2.3269	3.0

[0162] 在一个实施方案中,本文提供了具有实质上对应于图24所示的代表性TGA温度自记图的热重量(TGA)温度过程线的D型。在某些实施方案中,D型在高达140℃下显示出约14.1%的TGA重量损失。

[0163] 在某些实施方案中,如气相色谱所测定,D型包含约14.3重量%的DMSO。

[0164] 在又一个实施方案中,D型是实质上纯的。在某些实施方案中,实质上纯的D型实质上不含其他固体形式,例如无定形形式。在某些实施方案中,实质上纯的D型的纯度为不小于约95%纯的、不小于约96%纯的、不小于约97%纯的、不小于约98%纯的、不小于约98.5%纯的、不小于约99%纯的、不小于约99.5%纯的或不小于约99.8%纯的。

[0165] 在某些实施方案中,D型是实质上纯的。在某些实施方案中,D型实质上不含包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的其他固体形式,包括例如A型、B型、C型、E型和/或包含本文提供的2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。在某些实施方案中,D型是包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的固体形式的混合物,包括例如包含以下一者或多者的混合物:A型、B型、C型、E型和包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。

[0166] 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的E型

[0167] 在某些实施方案中,方法所用的化合物是2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的E型。在某些实施方案中,2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的E型是DMSO溶剂合物。

[0168] 在某些实施方案中,E型室温下从溶于DMSO/MIBK或DMSO/IPA或DMSO/苯甲醚的C型获得。

[0169] 在某些实施方案中,E型是结晶,如例如X-射线粉末衍射测定所示。在一个实施方案中,E型具有实质上如图25所示的X-射线粉末衍射图案。

[0170] 在一个实施方案中,如图25所示,E型在大约10.5、12.5、16.1、17.0、18.5、21.2、21.7、22.6、22.9、23.4、23.8、24.1、25.1或26.7度2 θ 的两倍 θ 角下具有一个或多个特征X-射

线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,E型在大约16.1、17.0、21.2或22.9度 2θ 的两倍 θ 角下具有一个、两个、三个或四个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表E所示,E型具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个特征X-射线粉末衍射峰。在另一个实施方案中,如表E所示,E型具有一个、两个或三个特征X-射线粉末衍射峰。

[0171] 表E. 化合物1的E型的X-射线衍射峰

编号	位置[° 2θ]	d-间隔[Å]	相对强度[%]
1	4.20	21.0329	9.6
2	10.48	8.4394	32.0
3	12.54	7.0591	28.4
4	14.52	6.1023	9.9
5	15.51	5.7131	17.7
6	16.08	5.5121	100.0
7	16.97	5.2256	94.5
8	17.77	4.9908	17.1
9	18.48	4.8001	20.5
10	19.54	4.5422	14.7
11	21.15	4.2007	62.8
12	21.72	4.0924	20.8
13	22.64	3.9270	57.4
14	22.91	3.8826	59.9
15	23.43	3.7977	23.6
16	23.83	3.7348	23.2
17	24.13	3.6881	29.5
18	25.14	3.5421	35.2
19	26.72	3.3362	49.5
20	27.68	3.2232	14.6
21	27.93	3.1949	15.3
22	28.86	3.0942	15.6
23	29.08	3.0703	18.3
24	30.12	2.9671	7.1
25	30.92	2.8923	12.8
26	32.35	2.7672	5.0
27	33.21	2.6979	6.9

[0173] 在一个实施方案中,本文提供了具有实质上对应于图26所示的代表性TGA温度自记图的热重量(TGA)温度过程线的E型。在某些实施方案中,E型在最高120℃下显示出约19.4%的TGA重量损失。在某些实施方案中,E型在120和220℃下显示出24.9%的另外重量损失。

[0174] 在一个实施方案中,E型是实质上纯的。在某些实施方案中,实质上纯的E型实质上不含其他固体形式,例如无定形式。在某些实施方案中,实质上纯的E型的纯度为不小于约95%纯的、不小于约96%纯的、不小于约97%纯的、不小于约98%纯的、不小于约98.5%纯的、不小于约99%纯的、不小于约99.5%纯的或不小于约99.8%纯的。

[0175] 在某些实施方案中,E型是实质上纯的。在本文的某些实施方案中本文,E型实质上不含包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的其他固体形式,包括例如A型、B型、C型、D型和/或包含2-(4-氯苯基)-N-

((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。在某些实施方案中,E型是包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的固体形式的混合物,包括例如包含以下一者或多者的混合物:A型、B型、C型、D型和包含2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形固体形式。

[0176] 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的无定形形式

[0177] 在某些实施方案中,方法所用的化合物是无定形2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺。

[0178] 在某些实施方案中,本文提供了通过加热溶于THF和水的2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺并冷却溶液来制备无定形形式的方法。

[0179] 在一个实施方案中,本文提供了具有图27所示的调制DSC温度自记图的无定形固体形式。

[0180] 在一个实施方案中,无定形2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺具有实质上如图28所示的X-射线粉末衍射图案。

[0181] 在一个实施方案中,无定形2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺具有实质上如图29所示的¹H NMR谱。

[0182] 在又一个实施方案中,无定形2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺是实质上纯的。在某些实施方案中,实质上纯的无定形2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺实质上不含任何结晶固体形式,例如A型、B型、C型、D型或E型。在某些实施方案中,实质上纯的无定形2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的纯度为不小于约95%纯的、不小于约96%纯的、不小于约97%纯的、不小于约98%纯的、不小于约98.5%纯的、不小于约99%纯的、不小于约99.5%纯的或不小于约99.8%纯的。

[0183] 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的同位素体

[0184] 本文还提供了本文提供的2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的同位素富集类似物(“同位素体”)。此前已经用一些种类的药物展示了改善药代动力学(“PK”)、药效动力学(“PD”)和毒性特征的药物的同位素富集(例如,氘化)。参见例如Lijinsky等人,Food Cosmet.Toxicol.,20:393(1982);Lijinsky等人,J.Nat.Cancer Inst.,69:1127(1982);Mangold等人,Mutation Res.308:33(1994);Gordon等人,Drug Metab.Dispos.,15:589(1987);Zello等人,Metabolism,43:487(1994);Gately等人,J.Nucl.Med.,27:388(1986);Wade D,Chem.Biol.Interact.117:191(1999)。

[0185] 不受任何特定理论的限制,药物的同位素富集可用于例如(1)减少或消除不需要的代谢物,(2)增加母体药物的半衰期,(3)减少实现预期效果所需的剂量数,(4)减少实现预期效果所需的剂量的量,(5)增加活性代谢物(如果形成)的形成和/或(6)减少特定组织

中有害代谢物的产生和/或产生用于组合疗法的更有效的药物和/或更安全的药物,无论组合疗法是否为有意的。

[0186] 一个原子被其同位素之一置换通常将引起化学反应速率的变化。这种现象称为动力学同位素效应(“KIE”)。例如,如果C-H键在化学反应中的速率确定步骤(即具有最高过渡态能量的步骤)期间断裂,那么氘置换氢将导致反应速率降低并且该过程将放缓。这种现象称为氘动力学同位素效应(“DKIE”)。(参见例如Foster等人,Adv. Drug Res.,第14卷,第1-36页(1985);Kushner等人,Can. J. Physiol. Pharmacol.,第77卷,第79-88页(1999))。

[0187] DKIE的量级可以表示为其中C-H键断裂的给定反应的速率和氘取代氢的相同反应之间的比率。DKIE的范围可以为约1(无同位素效应)至非常大的数字,诸如50或更大,这意味着当氘取代氢时,反应可以减缓五十或更多倍。不受特定理论的限制,高DKIE值可以部分归因于称为隧道效应的现象,这是不确定性原理的结果。隧道效应归因于氢原子的小质量,因为在不存在所需的活化能量的情况下,有时可形成涉及质子的过渡态,而发生隧道效应。因为氘的质量大于氢,所以其经历该现象的概率在统计学上低得多。

[0188] 氚(“T”)是研究、聚变反应堆、中子发生器和放射性药物中所用的氢的放射性同位素。氚是核中具有2个中子并且具有接近3的原子量的氢原子。它以非常低的浓度在环境中天然存在,最常见的是T₂O。氚缓慢衰变(半衰期=12.3年)并且发射不能穿透人体皮肤的外层的低能量β粒子。内部暴露是该同位素相关的主要危害,但其必须被大量摄入才会造成显著的健康风险。与氘相比,较少量的氚必须在达到危险水平之前消耗。但是氚(“T”)置换氢会产生比氘更强的键,并且在数值上产生更大的同位素效应。

[0189] 类似地,其他元素的同位素置换,包括但不限于碳的¹³C或¹⁴C、硫的³³S、³⁴S或³⁶S、氮的¹⁵N和氧的¹⁷O或¹⁸O,将提供类似的动力学同位素效应。

[0190] 6.3使用方法

[0191] 在一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善血液癌症或血液恶性肿瘤的方法。在一些实施方案中,血液癌症或血液恶性肿瘤是骨髓瘤、淋巴瘤或白血病。在某些实施方案中,血液癌症或血液恶性肿瘤是骨髓瘤。在某些实施方案中,血液癌症或血液恶性肿瘤是淋巴瘤。在某些实施方案中,血液癌症或血液恶性肿瘤是白血病。

[0192] 在一个实施方案中,血液癌症是多发性骨髓瘤(MM)。在一个实施方案中,血液癌症是复发性/难治性(R/R)多发性骨髓瘤。在一个实施方案中,患有R/R多发性骨髓瘤的患者具有肾功能损伤。

[0193] 在一个实施方案中,血液癌症是急性粒细胞性白血病(AML)。在一个实施方案中,血液癌症是急性淋巴细胞白血病(ALL)。在一个实施方案中,血液癌症是成人T细胞白血病。在一个实施方案中,血液癌症是慢性淋巴细胞白血病(CLL)。在一个实施方案中,血液癌症是多毛细胞白血病。在一个实施方案中,血液癌症是骨髓增生异常。在一个实施方案中,血液癌症是骨髓增生性疾病。在一个实施方案中,血液癌症是慢性粒细胞性白血病(CML)。在一个实施方案中,血液癌症是骨髓增生异常综合征(MDS)。在一个实施方案中,血液癌症是人类嗜淋巴细胞病毒-1型(HTLV-1)白血病。在一个实施方案中,血液癌症是肥大细胞增生症。在一个实施方案中,血液癌症是B细胞急性淋巴母细胞白血病。在一个实施方案中,血液癌症是CLL。

[0194] 在一个实施方案中,血液癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、B细胞免疫母细胞淋巴瘤、小无裂细胞性淋巴瘤、人类嗜淋巴细胞病毒-1型(HTLV-1)白血病/淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、AIDS相关淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、转化型淋巴瘤、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、里希特(Richter)转化、结节边缘区淋巴瘤或ALK阳性大B细胞淋巴瘤。在一个实施方案中,血液癌症是HL。在一个实施方案中,血液癌症是NHL。在一个实施方案中,血液癌症是惰性淋巴瘤,包括例如DLBCL、滤泡淋巴瘤或边缘区淋巴瘤。

[0195] 在某些实施方案中,血液癌症对至少一种抗癌疗法具有耐药性。在某些实施方案中,血液癌症是复发性的或至少一种抗癌疗法难治性的。在某些实施方案中,血液癌症是转移性的。

[0196] 在一个实施方案中,本文提供了通过将治疗活性量的化合物1施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善白血病的方法。在一个实施方案中,所述白血病是急性骨髓性白血病(AML)。在一个实施方案中,所述AML是复发性或难治性AML。在一个实施方案中,AML是新诊断的AML。在另一个实施方案中,AML具有FAB分类M0/1。在另一个实施方案中,AML具有FAB分类M2。在另一个实施方案中,AML具有FAB分类M3。在另一个实施方案中,AML具有FAB分类M4。在另一个实施方案中,AML具有FAB分类M5。在一个实施方案中,AML是具有至少一种复现性遗传异常的AML(例如,具有染色体8和染色体21之间的易位的AML;具有染色体16中的易位或倒位的AML;具有染色体9和染色体11之间的易位的AML;具有染色体15和染色体17之间的易位的APL(M3);具有染色体6和染色体9之间的易位的AML;具有染色体3中的易位或倒位的AML);具有染色体1和染色体22之间的易位的AML(巨核母细胞性);具有骨髓增生异常相关变化的AML;涉及前期化学疗法或放射疗法的AML(例如,烷基化剂相关AML;或拓扑异构酶II抑制剂相关AML);不可另外分类的AML(例如,不属于上述类别的AML,即最小分化型AML(M0);最小成熟型AML(M1);成熟型AML(M2);急性骨髓单核细胞性白血病(M4);急性单核细胞性白血病(M5);急性红细胞白血病(M6);急性巨核母细胞性白血病(M7);急性嗜碱性粒细胞白血病;或急性全骨髓增殖症伴骨髓纤维化);骨髓肉瘤(也称为颗粒细胞肉瘤、绿色瘤或髓外成骨髓细胞瘤);或未分化型和双表型急性白血病(也称为混合表型急性白血病))。

[0197] 在一个实施方案中,本文提供了通过将治疗活性量的化合物1施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善骨髓增生异常综合征(MDS)的方法。在一个实施方案中,本文提供了治疗MDS的方法。在一个实施方案中,所述MDS是复发性、耐受性或难治性MDS。在一个实施方案中,MDS是难治性贫血(RA);环形铁粒幼红细胞性RA(RARS);RA伴母细胞过量(RAEB);难治性血细胞减少症伴多系增生异常(RCMD)、难治性血细胞减少症伴单系增生异常(RCUD);不可分类的骨髓增生异常综合征(MDS-U)、单独del(5q)染色体异常相关的骨髓增生异常综合征、治疗相关的骨髓增生异常或慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)。在一些实施方案中,MDS是极低风险、低风险、中风险、高风险或极高风险MDS。在一个实施方案中,MDS是极低风险的。在另一个实施方案中,MDS是低风险的。在另一个实施方案中,MDS是中风险的。在另一个实施方案中,MDS是高风险的。在另一个实施方案中,MDS是极高风险MDS。在一些实施方案中,MDS是原发性或新生MDS。在另一个实施方案中,MDS是继发性MDS。

[0198] 在一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1以约0.1mg至约20mg的剂量施用于

[illegible]

其中所述周期包括在28天周期的第1天至第3天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在又一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善AML的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在又一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善复发性或难治性AML的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在一些这种实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善AML的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第3天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。在一些这种实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善复发性或难治性AML的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第3天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。在又一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善AML的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。在又一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善复发性或难治性AML的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。

[0199] 在一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1以约0.1mg至约20mg的剂量施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善MDS的方法。在一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1以约0.1mg至约20mg的剂量施用于对象来治疗MDS的方法。在一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善MDS的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天、第1天至第10天、第1天至第21天或第1天至第28天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中以约0.1mg至约20mg的剂量施用于对象来治疗MDS的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天、第1天至第10天、第1天至第21天或第1天至第28天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在另一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善MDS的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第3天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在又一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善MDS的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天以约0.1mg至约20mg的剂量施用化合物1。在一些这种实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善MDS的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第3天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。在又一个实施方案中,本文提供了通过将化合物1在一个周期中施用于对象来治疗、预防、管理和/或改善MDS的方法,其中所述周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。

[0200] 本文还提供了实现AML和/或MDS相关的一个或多个临床终点的方法,包括将治疗有效量的化合物1施用于有需要的患者。

[0201] 在某些实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了

已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的总体存活期(OS)、完全缓解率(CRR)、客观反应率(ORR)、恶化的时间、无复发存活期(RFS)、无恶化存活期(PFS)、无事件存活期、缓解持续时间、反应持续时间和/或缓解/反应的时间。在某些实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的总体存活期(OS)、完全缓解率(CRR)、客观反应率(ORR)、恶化的时间、无复发存活期(RFS)、无恶化存活期(PFS)、无事件存活期、缓解持续时间、反应持续时间、缓解/反应的时间和/或输注独立性。

[0202] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的总体存活期(OS)。

[0203] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的完全缓解率(CRR)。

[0204] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的客观反应率(ORR)。

[0205] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的恶化的时间。

[0206] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的无复发存活期(RFS)。

[0207] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的无恶化存活期(PFS)。

[0208] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的无事件存活期。

[0209] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的缓解的持续时间。

[0210] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的反应的持续时间。

[0211] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的缓解/反应的时间。

[0212] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗的AML患者群体的输注独立性。

[0213] 在某些实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的总体存活期(OS)、完全缓解率(CRR)、客观反应率(ORR)、恶化的时间、无复发存活期(RFS)、无恶化存活期(PFS)、无事件存活期、缓解持续时间、反应持续时间和/或缓解/反应的时间。

[0214] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的总体存活期(OS)。

[0215] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的完全缓解率(CRR)。

[0216] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的客观反应率(ORR)。

[0217] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的恶化的时间。

[0218] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的无复发存活期(RFS)。

[0219] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的无恶化存活期(PFS)。

[0220] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的无事件存活期。

[0221] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的缓解的持续时间。

[0222] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的反应的持续时间。

[0223] 在一个实施方案中,与未用化合物1治疗的患者群体相比,本文提供的方法提高了已用有效量的化合物1治疗MDS的患者群体的缓解/反应的时间。

[0224] 在某些实施方案中,ORR包括所完全缓解(CR)(即,形态学无白血病状态、形态学CR、细胞遗传学CR、分子CR和具有不完全血液恢复的形态学CR)和部分缓解的所有反应。

[0225] 6.4周期疗法/剂量

[0226] 在本文提供的方法中,治疗有效量的化合物1可以独立于癌症治疗周期性地施用于有需要的患者。周期疗法可以减少对一种或多种疗法产生耐受性,避免或减少一种疗法的副作用,和/或改善治疗的功效。

[0227] 在一个实施方案中,在一个治疗周期中施用治疗有效量的化合物1,所述治疗周期包括最多5天的施用期,然后是休息期。在一个实施方案中,治疗周期包括5天的施用期,然后是休息期。在一个实施方案中,治疗周期包括最多10天的施用期,然后是休息期。在一个实施方案中,休息期为约10天至最多约40天。在一个实施方案中,治疗周期包括最多10天的施用期,然后是约10天至最多约40天的休息期。在一个实施方案中,治疗周期包括最多10天的施用期,然后是约23天至最多约37天的休息期。在一个实施方案中,休息期为约23天至最多约37天。在一个实施方案中,休息期为23天。在一个实施方案中,治疗周期包括最多10天的施用期,然后是23天的休息期。在一个实施方案中,休息期为37天。在一个实施方案中,治疗周期包括最多10天的施用期,然后是37天的休息期。

[0228] 在一个实施方案中,治疗周期包括在28天周期的第1天至第5天施用治疗有效量的化合物1。在另一个实施方案中,治疗周期包括在28天周期的第1天至第10天施用化合物1。在一个实施方案中,治疗周期包括在42天周期的第1天至第5天施用化合物1。在另一个实施方案中,治疗周期包括在42天周期的第1天至第10天施用化合物1。

[0229] 在一个实施方案中,治疗周期包括在28天周期的第1天至第21天施用治疗有效量的化合物1。在另一个实施方案中,治疗周期包括在7天周期的第1天至第5天施用治疗有效量的化合物1。在另一个实施方案中,治疗周期包括在7天周期的第1天至第7天施用治疗有效量的化合物1。在一个实施方案中,治疗周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天施用治疗有效量的化合物1。

[0230] 本文所述的任何治疗周期可以重复至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个

周期。在某些情况下,本文所述的治疗周期包括1个至约24个周期、约2个至约16个周期,或约2个至约4个周期。在某些情况下,本文所述的治疗周期包括1个至约4个周期。在某些实施方案中,周期1至周期4均为28天周期。在某些实施方案中,周期1为42天周期,周期2至周期4为28天周期。在一些实施方案中,施用治疗有效量的化合物1达1个至13个28天周期(例如约1年)。在某些情况下,周期疗法的周期数无限制,疗法持续直到疾病恶化。在某些情况下,周期可包括本文所述的施用期和/或休息期的不同持续时间。

[0231] 在一个实施方案中,治疗周期包括以约0.05mg/天至约20mg/天、约0.1mg/天至约15mg/天、约0.1mg/天至约10mg/天、约0.3mg/天至约10mg/天、约0.3mg/天至约8.5mg/天或约0.3mg/天至约8.1mg/天的剂量施用化合物1,每日施用一次。

[0232] 在一个实施方案中,治疗周期包括以约0.3mg/天、0.6mg/天、1.2mg/天、1.8mg/天、2.4mg/天、3.6mg/天、5.4mg/天、7.2mg/天、8.1mg/天、9.0mg/天、10.0mg/天、10.8mg/天或12.2mg/天的剂量施用化合物1,每日施用一次。在一个实施方案中,治疗周期包括以约0.3mg/天、0.6mg/天、1.2mg/天、1.8mg/天、2.4mg/天、3.6mg/天、5.4mg/天、7.2mg/天、8.1mg/天、9.0mg/天、10.0mg/天、10.8mg/天、12.2mg/天或20mg/天的剂量施用化合物1,每日施用一次。在一个实施方案中,治疗周期包括以约0.6mg/天、1.2mg/天、1.8mg/天、2.4mg/天或3.6mg/天的剂量施用化合物1,每日施用一次。在一些这种实施方案中,治疗周期包括在28天周期的第1天至第3天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。在另一个实施方案中,治疗周期包括在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天以约0.6mg、1.2mg、1.8mg、2.4mg或3.6mg的剂量施用化合物1。

[0233] 对于一个治疗周期的所有施用期化合物1可以以相同的量施用。或者,在一个实施方案中,化合物在施用期中以不同的剂量施用。

[0234] 6.5示例性制剂

[0235] 2017年1月6日提交的美国专利申请No.15/400,791描述了包含化合物1(包括固体形式(例如,化合物1的A型、B型、C型、D型、E型和/或无定形))的示例性制剂,该专利申请的公开内容全文以引用的方式并入本文。下文描述了示例性冻干制剂。

[0236] 在某些实施方案中,冻干制剂包含化合物1、缓冲剂和填充剂。在一个实施方案中,冻干制剂包含以冻干制剂的总重量计约0.1-2%的化合物1、约2-15%的缓冲剂和约70-95%的填充剂。

[0237] 在一个方面,冻干制剂包含以冻干制剂的总重量计约0.1至约2%的量的化合物1。在某些实施方案中,化合物1的量为以冻干制剂的总重量计约0.1%至约1.5%、约0.1%至约1%或约0.35%至约0.9%。在某些实施方案中,化合物1的量为以冻干制剂的总重量计约0.1%、0.2%、0.3%、0.35%、0.36%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%或1.0%。在一个实施方案中,冻干制剂中化合物1的量为以冻干制剂的总重量计约0.3至约0.4%。在一个实施方案中,冻干制剂中化合物1的量为以冻干制剂的总重量计约0.36%。在一个实施方案中,冻干制剂中化合物1的量为以冻干制剂的总重量计约0.9至约1%。在一个实施方案中,冻干制剂中化合物1的量为以冻干制剂的总重量计约0.93%。

[0238] 在另一个方面,冻干制剂包含20cc小瓶里约0.1mg至约5mg的量的化合物1。在又一个方面,冻干制剂包含20cc小瓶里约0.1mg至约5mg、约0.1mg至约4mg、约0.1mg至约3mg、约0.1mg至约2mg、约0.5mg至约5mg、约0.5mg至约3mg、约0.5mg至约2mg或约0.5mg至约1.5mg的

量的化合物1。在一个方面,化合物1以约0.5、0.6、0.7、0.75、0.76、0.8、0.9、1.0或1.2mg的量存在于20cc小瓶中。在一个方面,化合物1以约0.76mg的量存在于20cc小瓶中。在一个方面,化合物1以约1mg的量存在于20cc小瓶中。

[0239] 在一个方面,冻干制剂含有柠檬酸缓冲剂。在一个方面,制剂中柠檬酸缓冲剂的量为以冻干制剂的总重量计约5%至约25%。在一个方面,制剂中柠檬酸缓冲剂的量为以冻干制剂的总重量计约10%、11%、12%、12.5%、12.7%、12.78%、12.8%、13%、14%、15%、16%、17%、17.3%、17.42%、17.5%、17.7%、18%、19%或20%。在一个方面,制剂中柠檬酸缓冲剂的量为以冻干制剂的总重量计约12.78%。在一个方面,制剂中柠檬酸缓冲剂的量为以冻干制剂的总重量计约17.42%。

[0240] 在一个实施方案中,柠檬酸缓冲剂包含无水柠檬酸和无水柠檬酸钠。在某些实施方案中,无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约2%至约10%、约3%至约9%、约5%至约8%或约6%至约8%。在某些实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约2%、4%、6%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%、7%、7.3%、7.4%、7.5%、8%、8.5%或9%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约6%、6.2%、6.4%、6.41%、6.6%、6.8%或7%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约7%、7.3%、7.4%、7.43%、7.5%或8%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约6.41%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约7.43%。

[0241] 在又一个方面,冻干制剂包含20cc小瓶里约5mg至约20mg的量的无水柠檬酸。在一个实施方案中,无水柠檬酸的量为20cc小瓶里约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20mg。在一个实施方案中,无水柠檬酸的量为20cc小瓶里约17.7mg。在一个实施方案中,无水柠檬酸的量为20cc小瓶里约6.1mg。

[0242] 在某些实施方案中,无水柠檬酸钠的量为以冻干制剂的总重量计约2%至约15%、约4%至约15%或约5%至约10%。在某些实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为以冻干制剂的总重量计约2%、3%、4%、5%、6%、6.2%、6.37%、6.4%、6.6%、6.8%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、12%或约15%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为以冻干制剂的总重量计约6%、6.2%、6.37%、6.4%、6.6%、6.8%或7%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为以冻干制剂的总重量计约8%、8.5%、9%、9.5%、9.99%、10%或10.5%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为以冻干制剂的总重量计为约6.37%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为以冻干制剂的总重量计为约9.99%。

[0243] 在又一个方面,冻干制剂包含20cc小瓶里约5mg至约20mg的量的无水柠檬酸钠。在一个实施方案中,无水柠檬酸钠的量为20cc小瓶里约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20mg。在一个实施方案中,无水柠檬酸钠的量为20cc小瓶里约17.6mg。在一个实施方案中,无水柠檬酸钠的量为20cc小瓶里约8.2mg。

[0244] 在某些实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约2%、4%、6%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%、7%、7.3%、7.4%、7.5%、8%、8.5%或9%,并且冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为以冻干制剂的总重量计约2%、3%、4%、5%、6%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、12%或约15%。在一个实施

方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约6%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%或7%,并且冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为约6%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%或7%。在一个实施方案中,冻干制剂中无水柠檬酸的量为以冻干制剂的总重量计约7%、7.3%、7.4%、7.5%或8%,并且冻干制剂中无水柠檬酸钠的量为约8%、8.5%、9%、9.5%、10%或10.5%。在一个实施方案中,无水柠檬酸的量为20cc小瓶中约6.1mg,并且无水柠檬酸钠的量为20cc小瓶中约8.2mg。在一个实施方案中,无水柠檬酸的量为20cc小瓶中约17.7mg,并且无水柠檬酸钠的量为20cc小瓶中约17.6mg。

[0245] 在一个方面,冻干制剂中的填充剂包括Captisol®、甘露糖醇或Kleptose®,例如β-环糊精、羟丙基β-环糊精和甲基化β-环糊精。在某些实施方案中,冻干制剂中的填充剂包括Kleptose®羟丙基β-环糊精(Kleptose®HPB)。在某些实施方案中,冻干组合物中填充剂的量为以冻干制剂的总重量计约70%至约95%、约75%至约90%或约80%至约90%。在某些实施方案中,冻干组合物中的羟丙基β-环糊精的量为以冻干制剂的总重量计约70%至约95%、约75%至约90%或约80%至约90%。在某些实施方案中,冻干组合物中羟丙基β-环糊精的量为以冻干制剂的总重量计约75%、80%、81%、81.61%、82%、83%、84%、85%、86%、86.86%、87%、88%、89%或90%。在一个实施方案中,冻干组合物中羟丙基β-环糊精的量为以冻干制剂的总重量计约86.86%。在一个实施方案中,冻干组合物中羟丙基β-环糊精的量为以冻干制剂的总重量计约81.61%。

[0246] 在另一个方面,冻干制剂包含20cc小瓶中约67mg的量的Kleptose®HPB。在又一个方面,冻干制剂包含20cc小瓶中约240mg的量的Kleptose®HPB。

[0247] 在某些实施方案中,冻干制剂在复原时具有约4至5的pH。在一个实施方案中,冻干制剂在复原时具有约4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5的pH。

[0248] 在某些实施方案中,本文提供包含冻干组合物的容器。在一个方面,容器是玻璃小瓶。在一个方面,容器是20cc玻璃小瓶。

[0249] 本文提供的冻干制剂可以使用任何药学上可接受的稀释剂复原,用于肠胃外施用于患者。此类稀释剂包括但不限于无菌注射用水(SWFI)、5%右旋糖水溶液(D5W)或共溶剂体系。可使用任何量的稀释剂来复原冻干制剂,以制备适用于注射的溶液。因此,稀释剂的量必须足以溶解冻干制剂。在一个实施方案中,使用1-5mL或1-3mL稀释剂复原冻干制剂,以得到约0.1-5mg/mL、约0.1-1mg/mL、约0.5-1mg/mL化合物1的终浓度。在某些实施方案中,复原溶液中化合物1的终浓度为约0.5mg/mL。在某些实施方案中,复原稀释剂的体积在2mL和20mL之间变化,以得到0.05-0.5mg/mL的终浓度。在某些实施方案中,根据所需的剂量,可使用多个小瓶进行复原。

[0250] 可储存冻干制剂的复原溶液并在最多约24小时、约12小时或约8小时内使用。在一些实施方案中,溶液在制备的8小时内使用。在一些实施方案中,溶液在制备的5小时内使用。在一些实施方案中,溶液在制备的1小时内使用。

[0251] 在一个方面,在20cc小瓶中提供了包含以下组分的冻干制剂:提供1mg 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的量的化合物1和药学上可接受的载剂或赋形剂,所述载剂或赋形剂包括本文所述的缓冲剂和填充剂。缓冲剂和填充剂可以以本文所述的量存在。

[0252] 在一个方面,在20cc小瓶中提供了包含以下组分的冻干制剂:提供1mg 2-(4-氯苯基)-N-((2-(2,6-二氧化咪唑-3-基)-1-氧代异吲哚啉-5-基)甲基)-2,2-二氟乙酰胺的量的化合物1、17.7mg无水柠檬酸、17.6mg无水柠檬酸钠和240mg本文所述的Kleptose® HPB。在一个实施方案中,用2mL无菌注射用水复原20cc小瓶中的冻干制剂。

[0253] 在一个方面,本文提供了包含本文提供的冻干制剂的水性组合物。在一个实施方案中,水溶液包含0.5mg/mL化合物1。

[0254] 6.6组合疗法

[0255] 在某些实施方案中,本文提供的方法包括将治疗有效量的化合物1与治疗有效量的其他治疗剂组合施用。

[0256] 在一个实施方案中,本文提供了治疗、预防或管理白血病的方法,包括将治疗有效量的化合物1在本文提供的周期疗法中与治疗有效量的一种或多种第二活性剂组合,任选地与放射疗法、输血、生物或免疫疗法或手术组合施用于患者。本文公开了第二活性剂的实例。

[0257] 如本文所用,术语“组合”包括使用多于一种疗法(例如,一种或多种预防剂和/或治疗剂)。然而,术语“组合”的使用不限制其中疗法(例如,预防剂和/或治疗剂)施用于具有疾病或病状的患者顺序。第一疗法(例如,预防剂或治疗剂,诸如本文提供的化合物1的冻干制剂)可以在第二疗法(例如,预防剂或治疗剂)施用于对象之前(例如,之前5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)、同时或之后(例如,之后5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)施用。本文还设想了第三疗法。

[0258] 在某些实施方案中,本文提供的方法包括将钙、骨化三醇和维生素D补充剂中的一者或多者与化合物1一起施用。在某些实施方案中,本文提供的方法包括将钙、骨化三醇和维生素D补充剂与化合物1一起施用。在某些实施方案中,本文提供的方法包括在用化合物1治疗之前施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂。在某些实施方案中,本文提供的方法包括在每个周期中在施用第一剂量的化合物1之前施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂。在某些实施方案中,本文提供的方法包括在用化合物1治疗之前至少达到3天施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂。在某些实施方案中,本文提供的方法包括在每个周期中在施用第一剂量的化合物1之前施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂。在某些实施方案中,本文提供的方法包括在每个周期中施用第一剂量的化合物1之前至少达到3天施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂。在某些实施方案中,本文提供的方法包括在每个周期中施用第一剂量的化合物1之前施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂,并且在每个周期中在施用最后剂量的化合物1之后继续施用。在某些实施方案中,本文提供的方法包括在每个周期中施用第一剂量的化合物1之前至少达到3天施用钙、骨化三醇和维生素D补充剂,并且在每个周期中施用最后剂量的化合物1之后继续施用至少达到3天(例如,当在第1天-第5天施用化合物1时,至少达到第8天)。

[0259] 在某些实施方案中,施用钙补充剂,以每日递送至少1200mg元素钙,这些元素钙以分剂量给予。在某些实施方案中,钙补充剂以500mg剂量的碳酸钙施用,每日口服(P0)施用三次。

[0260] 在某些实施方案中,施用骨化三醇补充剂,以每日一次递送0.25μg骨化三醇(P0)。

[0261] 在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每日一次递送约500IU至约50,000IU维生素D。在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每日一次递送约1000IU维生素D。在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每日一次递送约500IU维生素D。在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每周递送约50,000IU维生素D。在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每周递送约20,000IU维生素D。在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每日一次递送约1000IU维生素D2或D3。在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每周递送约50,000IU维生素D2或D3。在某些实施方案中,施用维生素D补充剂,以每周递送约20,000IU维生素D2或D3。

[0262] 在某些实施方案中,治疗有效量的化合物1和一种或多种第二活性剂施用于患者可以通过相同的或不同的给药途径同时或按顺序进行。用于特定活性剂的特定给药途径的适用性将取决于活性剂本身(例如,它是否可以口服施用且在进入血液循环之前不分解)和待治疗的癌症。

[0263] 化合物1的给药途径与第二疗法的给药途径无关。因此,根据这些实施方案,静脉内施用化合物1,并且第二疗法可以口服、肠胃外、腹膜内、静脉内、动脉内、经皮、舌下、肌肉内、直肠、经口含化、鼻内、脂质体、吸入、阴道内、眼内、通过导管或支架局部递送、皮下、脂肪内、关节内、鞘内或以缓释剂型施用。在一个实施方案中,化合物1和第二疗法通过相同的给药方式IV施用。在另一个实施方案中,化合物1通过一种给药方式(例如IV)施用,而第二药剂(抗癌剂)通过另一种给药方式(例如口服)施用。

[0264] 在一个实施方案中,第二活性剂以约1至约1000mg、约5至约500mg、约10至约350mg或约50至约200mg的量每日一次或两次静脉内或皮下施用。第二活性剂的具体量将取决于所用的具体药剂、待治疗或管理的疾病的类型、疾病的严重性和分期以及同时施用于患者的化合物1和任何任选的另外活性剂的量。

[0265] 在一些实施方案中,将本文所述的组合疗法的组分周期性地施用于患者。在另一个实施方案中,第二活性剂在周期施用中与本文提供的组合疗法一起共施用。周期疗法涉及施用活性剂一段时间,然后停用一段时间,并重复此连续施用。对于每种活性剂(例如,化合物1和/或本文所述的第二活性剂),周期疗法可以独立进行指定的持续时间。在某些实施方案中,每种活性剂的周期施用取决于施用于对象的一种或多种活性剂。在一个实施方案中,化合物1或本文所述的第二活性剂的施用固定了每种药剂的施用日或持续时间。在另一个实施方案中,化合物1或本文所述的第二活性剂的施用固定了第二活性剂的施用日或持续时间。

[0266] 在一些实施方案中,化合物1和本文所述的第二活性剂连续施用(例如,每日、每周、每月),无休息期。周期疗法可以减少对一种或多种疗法产生耐受性,避免或减少一种疗法的副作用,和/或改善治疗或治疗剂的功效。

[0267] 在一个实施方案中,治疗有效量的化合物1作为本文所述的组合疗法的组分在28天周期的第1天至第5天、第1天至第10天、第1天至第21天或28个连续天每日一次施用。这些组合疗法包括在一天或更多天(例如,在周期1的第1天)施用化合物1之前、同时或之后施用本文所述的第二活性剂。在一个实施方案中,组合疗法施用1个至13个28天周期(例如,约12个月)。这种组合的化合物1和本文所述的第二活性剂可以以本文所示的浓度或量存在。在某些实施方案中,第二活性剂可以在周期疗法期间每日一次、每周一次或每月一次施用。在

另一个实施方案中,第二活性剂与本文所述的组合疗法组合每周一次施用。

[0268] 在一个实施方案中,治疗有效量的化合物1作为本文所述的组合疗法的组分在7天周期的7个连续天每日一次施用。这些组合疗法包括在一天或更多天(例如,在周期1的第1天)施用治疗有效量的化合物1之前、同时或之后施用治疗有效量的本文所述的第二活性剂。在另一个实施方案中,在7天周期中每日一次施用治疗有效量的化合物1达5个连续天,然后停用2天(例如,不施用化合物/停止治疗)。这种组合疗法包括在一天或更多天(例如,在周期1的第1天)施用化合物1之前、同时或之后施用治疗有效量的本文所述的第二活性剂。在一个实施方案中,组合疗法施用1个至13个28天周期(例如,约3个月)。这种组合的化合物1和本文所述的第二活性剂可以以本文所示的浓度或量存在。在一个实施方案中,组合疗法包括在7天周期的5天连续施用治疗有效量的化合物1,并且在每个周期的至少一天(例如,周期1的第1天)施用治疗有效量的第二活性剂,与在每个周期的至少一天施用第二活性剂的组合。在一个实施方案中,治疗有效量的化合物1作为本文所述的组合疗法的组分在28天周期的第1天至第5天、第1天至第10天、第1天至第21天或第1天至第28天每日一次施用。这些组合疗法包括在一天或更多天施用治疗有效量的化合物1之前、同时或之后施用治疗有效量本文所述的第二活性剂。在另一个实施方案中,在28天周期的第1天至第3天每日一次施用治疗有效量的化合物1。这种组合疗法包括在一天或更多天施用化合物1之前、同时或之后施用治疗有效量的本文所述的第二活性剂。在另一个实施方案中,在28天周期的第1天至第5天和第15天至第19天每日一次施用治疗有效量的化合物1。这种组合疗法包括在一天或更多天施用化合物1之前、同时或之后施用治疗有效量的本文所述的第二活性剂。

[0269] 在某些实施方案中,第二活性剂可以在周期疗法期间每日一次、每周一次或每月一次施用。在另一个实施方案中,第二活性剂与本文所述的组合疗法组合每周一次施用。

[0270] 用于本文所述的组合疗法的化合物可以每日一次(QD)独立施用,或者分成作为本文所述的组合疗法的一部分的多个日剂量,诸如每日两次(BID)、每日三次(TID)和每日四次(QID)。此外,施用可以是连续的(即,在几个连续日的每日或每一天)、间歇的,例如在多个周期中(即,包括几天、几周或几个月的无药物休息期)。如本文所用,术语“每日”旨在表示例如每天施用治疗剂一次或多于一次一段时间。术语“连续”旨在表示每日施用治疗剂至少10天至52周的不间断时间。如本文所用,术语“间歇”或“间歇地”旨在表示以规则或不规则的间隔停止和开始。例如,用于本文所述的组合疗法的化合物的间歇施用可以是每周施用一至六天、在多个周期施用(例如,每日施用达两个至八个连续周,然后是不施用的休息期达一周)、或隔日施用。如本文所用,术语“周期”旨在表示每日或连续施用治疗剂,但具有休息期。

[0271] 在某些实施方案中,用于本文所述的组合疗法的化合物每日施用一次达一天至六个月、一周至三个月、一周至四周、一周至三周或一周至两周。在某些实施方案中,用于本文所述的组合疗法的化合物每日施用一次达一周、两周、三周或四周。在一个实施方案中,用于本文所述的组合疗法的化合物每日施用一次达一周。在另一个实施方案中,用于本文所述的组合疗法的化合物每日施用一次达两周。在又一个实施方案中,用于本文所述的组合疗法的化合物每日施用一次达三周。在又一个实施方案中,用于本文所述的组合疗法的化合物每日施用一次达四周。

[0272] 一种或多种第二活性成分或活性剂可以与化合物1一起用于本文提供的方法和组

合物中。第二活性剂可以是高分子(例如,蛋白质)或小分子(例如,合成无机、有机金属或有机分子)。

[0273] 大分子活性剂的实例包括但不限于造血生长因子、细胞因子以及单克隆抗体和多克隆抗体(特别是癌症抗原的治疗抗体)。典型的大分子活性剂是生物分子,诸如天然存在的或合成的或重组蛋白质。特别可用于本文提供的方法和组合物的蛋白质包括在体外或体内刺激造血前体细胞和免疫活性生成细胞的存活和/或增殖的蛋白质。其他可用的蛋白质在体外或体内刺激细胞中定向红细胞祖细胞的分裂和分化。具体蛋白质包括但不限于:白介素,诸如IL-2(包括重组IL-II(“rIL2”)和金丝雀痘IL-2)、IL-10、IL-12和IL-18;干扰素,诸如干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n1、干扰素 α -n3、干扰素 β -1a和干扰素 γ -1b;GM-CSF和GM-CSF;以及EPO。

[0274] 在某些实施方案中,GM-CSF、G-CSF、SCF或EPO在四周或六周周期的约五天期间内以约1至约750mg/m²/天、约25至约500mg/m²/天、约50至约250mg/m²/天或约50至约200mg/m²/天范围内的量皮下施用。在某些实施方案中,GM-CSF可以以约60至约500mcg/m²的量静脉内施用达2小时或以约5至约12mcg/m²/天的量皮下施用。在某些实施方案中,G-CSF最初可以以约1mcg/kg/天的量皮下施用,并且可以根据总粒细胞计数的升高调整。G-CSF的维持剂量可以以约300(在较小的患者中)或480mcg的量皮下施用。在某些实施方案中,EPO可以以10,000个单位的量皮下施用每周3次。

[0275] 可用于方法和组合物的具体蛋白质包括但不限于:非格司亭(filgrastim),它以商品名**Neupogen**[®](Amgen,Thousand Oaks,CA)在美国销售;沙格司亭(sargramostim),它以商品名**Leukine**[®](Immunex,Seattle,WA)在美国销售;以及重组EPO,它以商品名**Epogen**[®](Amgen,Thousand Oaks,CA)在美国销售。

[0276] GM-CSF的重组和突变形式可以如美国专利no.5,391,485、5,393,870和5,229,496所述制备;所有这些专利以引用的方式并入本文。G-CSF的重组和突变形式可以如美国专利no.4,810,643、4,999,291、5,528,823和5,580,755所述制备;这些专利全文以引用的方式并入本文。

[0277] 还提供了与化合物1组合使用的自然的、天然存在的和重组蛋白质。还涵盖天然存在的蛋白质的突变体和衍生物(例如,修饰形式),这些突变体和衍生物在体内表现出它们基于的蛋白质的至少一些药理活性。突变体的实例包括但不限于具有与蛋白质的天然存在形式中对应的残基不同的一个或多个氨基酸残基的蛋白质。术语“突变体”还涵盖缺乏天然存在的形式(例如,非糖基化形式)中通常存在的碳水化合物部分的蛋白质。衍生物的实例包括但不限于聚乙二醇化衍生物和融合蛋白,诸如通过将IgG1或IgG3融合至蛋白质或所关注的蛋白质的活性部分来形成的蛋白质。参见例如Penichet,M.L.和Morrison,S.L., J.Immunol.Methods 248:91-101(2001)。

[0278] 可与化合物1组合使用的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。抗体的实例包括但不限于曲妥珠单抗(trastuzumab,**Herceptin**[®])、利妥昔单抗(rituximab,**Rituxan**[®])、贝伐珠单抗(bevacizumab,Avastin[™])、帕妥珠单抗(pertuzumab,Omnitarg[™])、托西莫单抗(tositumomab,**Bexxar**[®])、依决洛单抗(edrecolomab,**Panorex**[®])、埃洛妥珠单抗(elotuzumab,Empliciti[™])、达雷木单抗(daratumumab,Darzalex[™])、伊沙昔单抗(isatuximab)(也称为SAR650984)和G250。化合物1的冻干制剂也可以与抗TNF- α 抗体和/或

抗EGFR抗体,例如**Erbitux**[®] (西妥昔单抗 (cetuximab)) 或帕尼单抗 (panitumumab) 组合或与它们组合使用。

[0279] 大分子活性剂可以以抗癌疫苗的形式施用。例如,分泌细胞因子(诸如IL-2、G-CSF和GM-CSF)或引起细胞因子分泌的疫苗可以用于所提供的方法和药物组合物。参见例如Emens, L.A.等人, Curr.Opinion Mol.Ther.3(1):77-84(2001)。

[0280] 小分子第二活性剂也可用于减轻施用本文提供的化合物1相关的副作用。然而,与一些大分子类似,当与本文提供的化合物1一起(例如,之前、之后或同时)施用时,据信很多小分子能够提供协同作用。小分子第二活性剂的实例包括但不限于抗癌剂、抗生素、免疫抑制剂和类固醇。

[0281] 在某些实施方案中,第二药剂是HSP抑制剂、蛋白酶体抑制剂、FLT3抑制剂或TOR激酶抑制剂。

[0282] 在本文所述的方法或组合物中使用的抗癌剂的实例包括但不限于:阿西维辛(acivicin);阿柔比星(aclarubicin);盐酸阿考达唑(acodazole hydrochloride);阿克罗宁(acronine);阿多来新(adozelesin);阿地白介素(aldesleukin);六甲蜜胺(altretamine);安波霉素(ambomycin);乙酸阿美蒽醌(ametantrene acetate);安吡啶(amsacrine);阿那曲唑(anastrozole);安曲霉素(anthracycline);天冬酰胺酶;曲林菌素(asperlin);阿扎胞苷(azacitidine);阿扎替派(azetepa);阿佐霉素(azotomycin);巴马司他(batimastat);苯佐替派(benzodepa);比卡鲁胺(bicalutamide);盐酸比生群(bisantrene hydrochloride);二甲磺酸双奈法德(bisnafide dimesylate);比折来新(bizelesin);硫酸博来霉素(bleomycin sulfate);硼替佐米(bortezomib, **Velcade**[®]);布喹那钠(brequinar sodium);溴匹立明(bropirimine);白消安(busulfan);放线菌素C(cactinomycin);卡鲁甾酮(calusterone);卡醋胺(caracemide);卡贝替姆(carbetimer);卡铂(carboplatin);卡非佐米(carfilzomib, **Kyprolis**[®]);卡莫司汀(carmustine);盐酸卡柔比星(carubicin hydrochloride);卡折来新(carzelesin);西地芬戈(cedefingol);塞来昔布(celecoxib, COX-2抑制剂);瘤克宁锭(chlorambucil);西罗霉素(cirolemycin);顺铂(cisplatin);克拉屈滨(cladribine);克罗拉滨(clofarabine);甲磺酸克立那托(crisnatol mesylate);环磷酰胺;Ara-C;达卡巴嗪(dacarbazine);放线菌素D(dactinomycin);盐酸柔红霉素(daunorubicin hydrochloride);地西他滨(decitabine);右奥马铂(dexormaplatin);地扎胍宁(dezaguanine);甲磺酸地扎胍宁(dezaguanine mesylate);亚胺醌氨酯(diaziquone);多西他赛(docetaxel);多柔比星(doxorubicin);盐酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride);屈洛昔芬(droloxifene);柠檬酸屈洛昔芬(droloxifene citrate);丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate);偶氮霉素(duazomycin);依达曲沙(edatrexate);盐酸依氟鸟氨酸(eflornithine hydrochloride);依沙芦星(elsamitrucin);恩洛铂(enloplatin);恩普氨酯(enpromate);依匹哌啶(epipropidine);盐酸表柔比星(epirubicin hydrochloride);厄布洛唑(erbulozole);盐酸依索比星(esorubicin hydrochloride);雌莫司汀(estramustine);雌莫司汀磷酸钠(estramustine phosphate sodium);依他硝唑(etanidazole);依托泊苷(etoposide);磷酸依托泊苷(etoposide phosphate);埃托宁(etoprine);盐酸法曲唑(fadrozole hydrochloride);法扎拉滨(fazarabine);维甲酰胺(fenretinide);氟尿苷

(floxuridine); 磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate); 氟尿嘧啶(flourouracil); 氟西他滨(flurocitabine); 磷喹酮(fosquidone); 福司曲星钠(fostriecin sodium); 吉西他滨(gemcitabine); 盐酸吉西他滨(gemcitabine hydrochloride); 羟基脲(hydroxyurea); 盐酸伊达比星(idarubicin hydrochloride); 异环磷酰胺(ifosfamide); 伊莫福新(ilmofosine); 异丙铂(iproplatin); 伊立替康(irinotecan); 盐酸依立替康(irinotecan hydrochloride); 埃沙佐米(ixazomib, **Nanlaro®**); 乙酸兰瑞肽(lanreotide acetate); 来那度胺(lenalidomide, **Revlimid®**); 来曲唑(letrozole); 乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate); 盐酸利阿唑(liarozole hydrochloride); 洛美曲索钠(lometrexol sodium); 洛莫司丁(lomustine); 盐酸洛索萘醌(losoxantrone hydrochloride); 马索罗酚(masoprocol); 美坦生(maytansine); 盐酸氮芥(mechlorethamine hydrochloride); 乙酸甲地孕酮(megestrol acetate); 乙酸美仑孕酮(melengestrol acetate); 美法仑(melphalan); 美诺立尔(menogaril); 巯基嘌呤; 甲氨蝶呤; 甲氨蝶呤钠; 甲氧普烯(metoprime); 美妥替哌(meturedopa); 米丁度胺(mitindomide); 米托卡星(mitocarcin); 丝裂红素(mitocromin); 丝林霉素(mitogillin); 丝裂马菌素(mitomalcin); 丝裂霉素(mitomycin); 米托司培(mitosper); 米托坦(mitotane); 盐酸米托萘醌(mitoxantrone hydrochloride); 霉酚酸; 诺考达唑(nocodazole); 诺拉霉素(nogalamycin); 高三尖杉酯碱(omacetaxine); 奥马铂(ormaplatin); 奥昔舒仑(oxisuran); 紫杉醇(paclitaxel); 帕比司他(panobinostat); 培加帕酶; 佩里霉素(peliomycin); 戊氮芥(pentamustine); 硫酸培洛霉素(peplomycin sulfate); 培磷酰胺(perfosfamide); 哌泊溴烷(pipobroman); 哌泊舒凡(piposulfan); 盐酸吡罗萘醌(piroxantrone hydrochloride); 普卡霉素(plicamycin); 普洛美坦(plomestane); 泊马度胺(pomalidomide, **Pomalyst®**); 卟吩姆钠(porfimer sodium); 泊非霉素(porfiromycin); 泼尼莫司汀(prednimustine); 盐酸甲基苄肼; 嘌呤霉素; 盐酸嘌呤霉素; 吡唑呋喃菌素(pyrazofurin); 利波腺苷(ribooprime); 沙芬戈(safingol); 盐酸沙芬戈(safingol hydrochloride); 司莫司汀(semustine); 辛曲秦(simtrazene); 索拉非尼(sorafenib); 司泊索非钠(sparfosate sodium); 稀疏霉素(sparsomycin); 盐酸锗螺胺(spirogermanium hydrochloride); 螺莫司汀(spiromustine); 螺铂(spiroplatin); 链黑菌素; 链脲佐菌素(streptozocin); 磺氯苯脲(sulofenur); 他利霉素(talisomycin); 替可加兰钠(tecogalan sodium); 克癌易(taxotere); 替加氟(tegafur); 盐酸替洛萘醌(teloxantrone hydrochloride); 替莫泊芬(temoporfin); 替尼泊苷(teniposide); 替罗昔隆(teroxirone); 睾内酯(testolactone); 沙利度胺(thalidomide, **Thalomid®**); 硫唑嘌呤胺(thiamiprine); 硫鸟嘌呤; 噻替哌(thiotepa); 噻唑呋林(tiazofurin); 替拉扎明(tirapazamine); 柠檬酸托瑞米芬(toremifene citrate); 乙酸曲托龙(trestolone acetate); 磷酸曲西瑞宾(triciribine phosphate); 三甲曲沙(trimetrexate); 葡糖醛酸三甲曲沙(trimetrexate glucuronate); 曲普瑞林(triptorelin); 盐酸妥布氯唑(tubulozole hydrochloride); 尿嘧啶氮芥; 乌瑞替派(uredepa); 伐普肽(vapreotide); 维替泊芬(verteporfin); 硫酸长春花碱(vinblastine sulfate); 硫酸长春新碱(vincristine sulfate); 长春地辛(vindesine); 硫酸长春地辛(vindesine sulfate); 硫酸长春匹定(vinepidine sulfate); 硫酸长春甘酯(vinglycinate sulfate); 硫酸长春罗新(vinleurosine sulfate); 酒石酸长春瑞滨

(vinorelbine tartrate); 硫酸长春罗定(vinrosidine sulfate); 硫酸长春利定(vinzolidine sulfate); 伏氯唑(vorozole); 折尼铂(zeniplatin); 净司他丁(zinostatin); 和盐酸佐柔比星(zorubicin hydrochloride)。

[0283] 方法或组合物中包括的其他抗癌药物包括但不限于: 20-表-1,25-二羟基维生素D3; 5-乙炔基尿嘧啶; 阿比特龙(abiraterone); 阿柔比星; 酰基富烯(acylfulvene); 腺环戊醇(adecypenol); 阿多来新; 阿地白介素; ALL-TK拮抗剂; 六甲蜜胺; 氨莫司汀(ambamustine); 2,4-二氯苯氧乙酸(amidox); 阿米福汀(amifostine); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 氨柔比星(amrubicin); 安吡啶; 阿那格雷(anagrelide); 阿那曲唑; 穿心莲内酯(andrographolide); 血管新生抑制剂; 拮抗剂D; 拮抗剂G; 安塔瑞利(antarelix); 抗背部化形态发生蛋白-1; 抗雄激素, 前列腺癌; 抗雌激素; 抗瘤酮(antineoplaston); 反义寡核苷酸; 甘氨酸阿非迪霉素(aphidicolin glycinate); 细胞凋亡基因调节剂; 细胞凋亡调控剂; 脱嘌呤核酸; ara-CDP-DL-PTBA; 精氨酸脱氨酶; 奥沙那宁(asulacrine); 阿他美坦(atamestane); 阿莫司汀(atrimustine); 阿新司坦汀1(axinastatin 1); 阿新司坦汀2(axinastatin 2); 阿新司坦汀3(axinastatin 3); 阿扎司琼(azasetron); 阿扎毒素(azatoxin); 重氮酪氨酸(azatyrosine); 浆果赤霉素III衍生物; balanol; 巴马司他; BCR/ABL拮抗剂; 苯并二氢卟吩(benzochlorin); 苯甲酰十字孢碱(benzoylstauroporine); β 内酰胺衍生物; β -阿立辛(beta-alethine); 亚阿克拉霉素B(betaclamycin B); 桦木酸; bFGF抑制剂; 比卡鲁胺; 比生群(bisantrene); 双吡丙啶基精胺(bisaziridinylspermine); 双奈法德(bisnafide); 双曲群A(bistratene A); 比折来新; 比锐来特(breflate); 溴匹立明; 布度钛(budotitane); 丁硫氨酸亚砷亚胺; 钙泊三醇(calciptriol); 钙磷酸蛋白C(calphostin C); 喜树碱衍生物; 卡培他滨(capecitabine); 甲酰胺-氨基-三唑; 羧胺三唑; CaRest M3; CARN 700; 软骨源性抑制剂; 卡折来新; 酪蛋白激酶抑制剂(ICOS); 栗精胺(castanospermine); 天蚕素B(cecropin B); 西曲瑞克(cetrorelix); 二氢卟吩(chlorin); 氯喹啉磺酰胺; 西卡前列素(cicaprost); 顺-卟啉; 克拉屈滨; 克罗米芬(clomifene)类似物; 克霉唑(clotrimazole); 克里斯霉素A(collismycin A); 克里斯霉素B; 康布瑞汀A4(combretastatin A4); 康布瑞汀类似物; 康纳京尼(conagenin); crambescidin 816; 克立那托(crisnatol); 念珠藻素8(cryptophycin 8); 念珠藻素A衍生物; 卡拉新A(curacin A); 环戊萘醌; 环普兰姆(cycloplatam); 赛普霉素(cypemycin); Ara-C十八烷基磷酸盐; 细胞溶解因子; 磷酸己烷雌酚(cytostatin); 达昔单抗(dacliximab); 地西他滨; 脱氢膜海鞘素B(dehydrodidemnin B); 地洛瑞林(deslorelin); 地塞米松(dexamethasone); 右异环磷酰胺(dexifosfamide); 右雷佐生(dexrazoxane); 右维拉帕米(dexverapamil); 亚胺醌氨酯; 代代宁B(didemnin B); 3,4-二羟基苯甲羟肟酸(didox); 二乙基去甲精胺; 二氢-5-阿扎胞苷; 9-二氢紫杉醇; 二噁霉素(dioxamycin); 二苯基螺莫司汀; 多西他赛; 二十二烷醇; 多拉司琼(dolasetron); 去氧氟尿苷(doxifluridine); 多柔比星; 屈洛昔芬; 屈大麻酚(dronabinol); 倍癌霉素SA(duocarmycin SA); 依布硒(ebselen); 依考莫司汀(ecomustine); 依地福新(edelfosine); 依决洛单抗; 依氟鸟氨酸(eflornithine); 榄香烯(elemene); 乙噻替氟(emitofur); 表柔比星(epirubicin); 依立雄胺(epristeride); 雌莫司汀类似物; 雌激素激动剂; 雌激素拮抗剂; 依他硝唑; 磷酸依托泊苷; 依西美坦(exemestane); 法曲唑(fadrozole); 法扎拉滨; 维甲

酰胺;非格司亭;非那雄胺(finasteride);夫拉平度(flavopiridol);氟卓斯汀(flezestastine);夫斯特隆(flusterone);氟达拉滨(fludarabine);盐酸氟柔红霉素(fluorodaunorubicin hydrochloride);福酚美克(forfenimex);福美司坦(formestane);福司曲星(fostriecin);福莫司汀(fotemustine);德叶啉钆(gadolinium texaphyrin);硝酸镓;加洛他滨(galocitabine);加尼瑞克(ganirelix);明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;庚磺胺(hepsulfam);heregulin;六亚甲基双乙酰胺;金丝桃素(hypericin);伊班膦酸(ibandronic acid);伊达比星(idarubicin);艾多昔芬(idoxifene);伊决孟酮(idramantone);伊莫福新;伊洛马司他(ilomastat);伊马替尼(imatinib)(例如,Gleevec®);咪喹莫特(imiquimod);免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍(iobenguane);碘多柔比星(iododoxorubicin);4-番薯醇(ipomeanol, 4-);伊罗普拉(iroplact);伊索拉定(irsogladine);异苯胍唑(isobengazole);异高软海绵素B(isohomohalicondrin B);伊他司琼(itasetron);茉莉酮(jasplakinolide);卡哈拉德F(kahalalide F);三乙酸片螺素-N(lamellarin-N triacetate);来那度胺,兰瑞肽;雷拉霉素(leinamycin);来格司亭(lenograstim);硫酸蘑菇多糖(lentinan sulfate);leptolstatin;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+孕酮;亮丙瑞林;左旋咪唑(levamisole);利阿唑(liarozole);直链多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;立索克林酰胺7(lissoclinamide 7);洛铂(lobaplatin);蚯蚓磷脂(lombricine);洛美曲索(lometrexol);氯尼达明(lonidamine);洛索萘醌(losoxantrone);洛索立宾(loxoribine);勒托替康(lurtotecan);德叶啉钆(lutetium texaphyrin);利索茶碱(lysofylline);溶解肽;美登素(maitansine);麦洛坦汀A(mannostatin A);马立马司他(marimastat);马索罗酚;乳腺丝抑蛋白(maspin);基质裂解蛋白(matrilysin)抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;麦尔巴隆(merbarone);美替瑞林(meterelin);甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺(metoclopramide);MIF抑制剂;米非司酮(mifepristone);米替福新(miltefosine);米立司亭(mirimostim);米托胍脲(mitoguazone);二溴卫矛醇(mitolactol);丝裂霉素类似物;米托蒽胺(mitonafide);迈托毒素成纤维细胞生长因子-皂草素;米托蒽醌(mitoxantrone);莫法罗汀(mofarotene);莫拉司亭(molgramostim);Erbitux,人绒毛膜促性腺激素;单磷酸基脂质A+分枝杆菌细胞壁sk;莫哌达醇(mopidamol);氮芥抗癌剂;美卡普罗B(mycaperoxide B);分枝杆菌细胞壁提取物;美瑞泡仁(myriaporone);N-乙酰地那林(N-acetylinaline);N-取代苯酰胺;那法瑞林(nafarelin);纳格瑞替(nagrestip);纳洛酮(naloxone)+喷他佐辛(pentazocine);纳普维(napavin);萘萘二醇(naphterpin);那托司亭(nartograstim);奈达铂(nedaplatin);奈莫柔比星(nemorubicin);奈立膦酸(neridronic acid);尼鲁米特(nilutamide);尼沙霉素(nisamycin);一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;尼多林(nitrullyn);奥利默森(oblimersen, Genasense®);0⁶-苄基鸟嘌呤;奥曲肽(octreotide);奥克恩(okicenone);寡核苷酸;奥纳司酮(onapristone);昂丹司琼(ondansetron);昂丹司琼;奥拉新(oracin);口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆(osaterone);奥沙利铂(oxaliplatin);噁诺霉素(oxaunomycin);紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;帕诺明(palauamine);棕榈酰根霉素(palmitoylrhizoxin);帕米膦酸(pamidronic acid);人参炔三醇(panaxytriol);帕诺米芬(panomifene);副球菌素(parabactin);帕折普汀(pazelliptine);培加帕酶;培得星

(peldesine);戊聚糖聚硫酸钠;喷司他丁(pentostatin);喷托唑(pentozole);全氟溴烷(perflubron);培磷酰胺;紫苏醇;吩嗪霉素(phenazinomycin);乙酸苯酯;磷酸酶抑制剂;溶链菌素(picibanil);盐酸匹鲁卡品(pilocarpine hydrochloride);吡柔比星(pirarubicin);吡曲克辛(piritrexim);普来司汀A(placetin A);普来司汀B(placetin B);纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼松(prednisone);丙基双-吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂;微藻;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;吡唑啉吡啶(pyrazoloacridine);吡哆酰化血红蛋白聚氧乙烯缀合物;raf拮抗剂;雷替曲塞(raltitrexed);雷莫司琼(ramosetron);ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;脱甲基化瑞替普汀(retelliptine demethylated);依替膦酸铼Re 186;根霉素(rhizoxin);核酶;RII视黄酰胺;罗希吐碱(rohitukine);罗莫肽(romurtide);罗喹美克(roquinimex);鲁滨吉隆B1(rubiginone B1);鲁泊塞(ruboxyl);沙芬戈;圣特平(saintopin);SarCNU;肌肉叶绿醇A(sarcophytol A);沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老源性抑制剂1;正义寡核苷酸;信号转导抑制剂;西佐喃(sizofiran);索布佐生(sobuzoxane);硼卡钠(sodium borocaptate);苯乙酸钠(sodium phenylacetate);索佛罗(solverol);生长调节素(somatomedin)结合蛋白;索纳明(sonermin);磷乙酰门冬氨酸(sparfosic acid);斯皮卡霉素D(spicamycin D);螺莫司汀;脾脏五肽(splenopentin);海绵素1(spongistatin 1);角鲨胺(squalamine);斯替皮米德(stipiamide);基质溶素(stromelysin)抑制剂;索非罗新(sulfinosine);超活性血管活性肠肽拮抗剂;舒拉地塔(suradista);苏拉明(suramin);苦马豆素(swainsonine);他莫司汀(tallimustine);泰莫西芬甲碘化物(tamoxifen methiodide);牛磺莫司汀(tauromustine);他扎罗汀(tazarotene);替可加兰钠;替加氟;碲吡喃鎓(tellurapyrylium);端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替尼泊昔;四氯癸烷氧化物(tetrachlorodecaoxide);四氮杂苯(tetrazomine);噻立拉斯汀(thaliblastine);噻可拉林(thiocoraline);血小板生成素(thrombopoietin);血小板生成素模拟物;胸腺法新(thymalfasin);胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南(thymotrinan);促甲状腺激素;乙基锡初紫红素;替拉扎明;二氯二茂钛;托普升替(topsentin);托瑞米芬(toremifene);翻译抑制剂;维生素A酸;三乙酰尿苷;曲西立滨(triciribine);三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼(tropisetron);妥罗雄脲(turosteride);酪氨酸激酶抑制剂;tyrphostin;UBC抑制剂;乌苯美司(ubenimex);泌尿生殖窦源性生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;凡瑞林B(variolin B);维拉雷琐(velaresol);藜芦胺(veramine);瓦丁斯(verdins);维替泊芬;vidaza,长春瑞滨;维沙拉汀(vinxaltine);维他欣(vitaxin);伏氯唑;扎诺特隆(zanoterone);折尼铂;亚苡维C(zilascorb);和净司他丁斯酯(zinostatin stimalamer)。

[0284] 在某些实施方案中,化合物1与检查点抑制剂组合施用。在一个实施方案中,结合本文提供的方法,一种检查点抑制剂与化合物1组合使用。在另一个实施方案中,结合本文提供的方法,两种检查点抑制剂与化合物1组合使用。在又一个实施方案中,结合本文提供的方法,三种或更多种检查点抑制剂与化合物1组合使用。

[0285] 如本文所用,术语“免疫检查点抑制剂”或“检查点抑制剂”是指完全或部分减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。不受特定理论的限制,检查点蛋白调控T

细胞活化或功能。很多检查点蛋白是已知的,诸如CTLA-4及其配体CD80和CD86;以及PD-1及其配体PD-L1和PD-L2 (Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012, 12, 252-264)。这些蛋白质显示出负责T细胞反应的共刺激或抑制相互作用。免疫检查点蛋白显示出调控和维持自身耐受性以及生理免疫反应的持续时间和幅度。免疫检查点抑制剂包括抗体或来源于抗体。

[0286] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是CTLA-4抑制剂。在一个实施方案中,CTLA-4抑制剂是抗CTLA-4抗体。抗CTLA-4抗体的实例包括但不限于美国专利No:5,811,097、5,811,097、5,855,887、6,051,227、6,207,157、6,682,736、6,984,720和7,605,238中所述的那些,所有这些专利全文并入本文。在一个实施方案中,抗CTLA-4抗体是曲美单抗(tremelimumab)(也称为替西木单抗(ticilimumab)或CP-675,206)。在另一个实施方案中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(ipilimumab)(也称为MDX-010或MDX-101)。伊匹单抗是结合CTLA-4的完全人单克隆IgG抗体。伊匹单抗以商品名YervoyTM销售。

[0287] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是PD-1/PD-L1抑制剂。PD-1/PD-L1抑制剂的实例包括但不限于美国专利No.7,488,802、7,943,743、8,008,449、8,168,757、8,217,149以及PCT专利申请公开No.W02003042402、W02008156712、W02010089411、W02010036959、W02011066342、W02011159877、W02011082400和W02011161699中所述的那些,所有这些专利全文并入本文。

[0288] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是PD-1抑制剂。在一个实施方案中,PD-1抑制剂是抗PD-1抗体。在一个实施方案中,抗PD-1抗体是纳武单抗(nivolumab)(也称为ONO-4538、BMS-936558或MDX1106)或帕博利珠单抗(pembrolizumab)(也称为MK-3475、SCH 900475或拉姆布罗力珠单抗(lambrolizumab))。在一个实施方案中,抗PD-1抗体是纳武单抗。纳武单抗是人IgG4抗PD-1单克隆抗体,以商品名OpdivoTM销售。在另一个实施方案中,抗PD-1抗体是帕博利珠单抗。帕博利珠单抗是人源化单克隆IgG4抗体,以商品名KeytrudaTM销售。在又一个实施方案中,抗PD-1抗体是人源化抗体CT-011。CT-011单独施用在复发时治疗急性骨髓性白血病(AML)不显示出反应。在又一个实施方案中,抗PD-1抗体是融合蛋白AMP-224。

[0289] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是PD-L1抑制剂。在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是抗PD-L1抗体。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体是MEDI4736(得瓦鲁单抗(durvalumab))。在另一个实施方案中,抗PD-L1抗体是BMS-936559(也称为MDX-1105-01)。在又一个实施方案中,PD-L1抑制剂是阿特殊单抗(atezolizumab)(也称为MPDL3280A和Tecentriq®)。

[0290] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是PD-L2抑制剂。在一个实施方案中,PD-L2抑制剂是抗PD-L2抗体。在一个实施方案中,抗PD-L2抗体是rHIgM12B7A。

[0291] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)抑制剂。在一个实施方案中,LAG-3抑制剂是可溶性Ig融合蛋白IMP321(Brignone等人,J.Immunol.,2007,179,4202-4211)。在另一个实施方案中,LAG-3抑制剂是BMS-986016。

[0292] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是B7抑制剂。在一个实施方案中,B7抑制剂是B7-H3抑制剂或B7-H4抑制剂。在一个实施方案中,B7-H3抑制剂是抗B7-H3抗体MGA271(Loo等人,Clin.Cancer Res.,2012,3834)。

[0293] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是TIM3(T细胞免疫球蛋白域和粘蛋白域3)抑制剂(Fourcade等人,J.Exp.Med.,2010,207,2175-86;Sakuishi等人,J.Exp.Med.,2010,207,

2187-94)。

[0294] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是OX40 (CD134) 激动剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂是抗OX40抗体。在一个实施方案中,抗OX40抗体是抗OX-40。在另一个实施方案中,抗OX40抗体是MEDI6469。

[0295] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是GITR激动剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂是抗GITR抗体。在一个实施方案中,抗GITR抗体是TRX518。

[0296] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是CD137激动剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂是抗CD137抗体。在一个实施方案中,抗CD137抗体是乌瑞鲁单抗 (urelumab)。在另一个实施方案中,抗CD137抗体是PF-05082566。

[0297] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是CD40激动剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂是抗CD40抗体。在一个实施方案中,抗CD40抗体是CF-870,893。

[0298] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是重组人白介素-15 (rhIL-15)。

[0299] 在一个实施方案中,检查点抑制剂是IDO抑制剂。在一个实施方案中,IDO抑制剂是INCB024360。在另一个实施方案中,IDO抑制剂是吲哚莫德 (indoximod)。

[0300] 在某些实施方案中,本文提供的组合疗法包括两种或更多种本文所述的检查点抑制剂(包括相同或不同种类的检查点抑制剂)。此外,本文所述的组合疗法可与本文所述的第二活性剂组合使用,适用于治疗本文所述和本领域所理解的疾病。

[0301] 在某些实施方案中,化合物1可与在表面上表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)的一种或多种免疫细胞(例如,经修饰的免疫细胞)组合使用。通常,CAR包含来自第一蛋白例如,抗原结合蛋白)的胞外域、跨膜域和胞内信号传导域。在某些实施方案中,一旦胞外域结合靶蛋白(诸如肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异性抗原(TSA)),即通过胞内信号传导域产生信号,所述胞内信号传导域活化免疫细胞,例如以靶向和杀死表达靶蛋白的细胞。

[0302] 胞外域:CAR的胞外域结合所关注的抗原。在某些实施方案中,CAR的胞外域包含结合所述抗原的受体或受体的一部分。在某些实施方案中,胞外域包含或为抗体或其抗原结合部分。在具体实施方案中,胞外域包含或为单链Fv(scFv)域。单链Fv域可包含例如通过柔性接头连接至 V_H 的 V_L ,其中所述 V_L 和 V_H 来自结合所述抗原的抗体。

[0303] 在某些实施方案中,本文所述的多肽的胞外域识别的抗原是肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异性抗原(TSA)。在多个具体实施方案中,肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原是但不限于Her2、前列腺干细胞抗原(PSCA)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌症抗原-125(CA-125)、CA19-9、钙网膜蛋白、MUC-1、B细胞成熟抗原(BCMA)、上皮膜蛋白(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、酪氨酸酶、黑素瘤-24相关抗原(MAGE)、CD19、CD22、CD27、CD30、CD34、CD45、CD70、CD99、CD117、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、间皮素、PAP(前列腺酸性磷酸酶)、prostein、TARP(T细胞受体 γ 交替阅读框蛋白)、Trp-p8、STEAPI(前列腺的六次跨膜上皮抗原1)、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、蛋白质melan-A(T淋巴细胞识别的黑素瘤抗原;MART-I)、myo-D1、肌肉特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶同工酶M2型(肿瘤M2-PK)的二聚体形式、异常ras蛋白或异常p53蛋白。在某些其他实施方案中,CAR的胞外域识别的TAA或TSA是整合素 $\alpha v \beta 3$ (CD61)、催乳激素或Ral-B。

[0304] 在某些实施方案中, CAR的胞外域识别的TAA或TSA是癌症/ 睾丸 (CT) 抗原, 例如 BAGE、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-ES0-1、NY-SAR-35、OY-TES-1、SPANXBI、SPA17、SSX、SYCPI 或 TPTE。

[0305] 在某些其他实施方案中, CAR的胞外域识别的TAA或TSA是碳水化合物或神经节苷脂, 例如 fuc-GMI、GM2 (癌胚抗原-免疫原-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2)、GM3、GD3 等等。

[0306] 在某些其他实施方案中, CAR的胞外域识别的TAA或TSA是 α -辅肌动蛋白-4、Bage-1、BCR-ABL、Bcr-Abl 融合蛋白、 β -连环蛋白、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、Casp-8、cdc27、cdk4、cdkn2a、CEA、coa-1、dek-can 融合蛋白、EBNA、EF2、爱泼斯坦-巴尔 (Epstein Barr) 病毒抗原、ETV6-AML1 融合蛋白、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-1、2 和 3、neo-PAP、肌球蛋白 I 类、OS-9、pml-RAR α 融合蛋白、PTPRK、K-ras、N-ras、丙糖磷酸异构酶、Gage 3、4、5、6、7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP17、SSX-2、TRP2-Int2、gp100 (Pmel17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、RAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15 (58)、RAGE、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、p53、HRas、HER-2/neu、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原 E6 和 E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、13-连环蛋白、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、CT7、端粒酶、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、C0-029、FGF-5、G250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-C0-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP 或 TPS。

[0307] 在多个具体实施方案中, 肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原是 AML 相关肿瘤抗原, 如 S. Anguille 等人, Leukemia (2012), 26, 2186-2196 所述。

[0308] 其他肿瘤相关和肿瘤特异性抗原是本领域已知的。

[0309] 用于构建嵌合抗原受体的结合 TSA 和 TAA 的受体、抗体和 scFv 是本领域已知的, 编码它们的核苷酸序列也是本领域已知的。

[0310] 在某些具体实施方案中, 嵌合抗原受体的胞外域识别的抗原是通常不视为 TSA 或 TAA 的抗原, 但是它与肿瘤细胞或肿瘤导致的损伤相关。例如, 在某些实施方案中, 抗原是例如生长因子、细胞因子或白介素, 例如血管新生或血管发生相关的生长因子、细胞因子或白介素。此类生长因子、细胞因子或白介素可包括例如血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血小板源性生长因子 (PDGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子 (IGF) 或白介素-8 (IL-8), 肿瘤也可在肿瘤局部产生缺氧环境。因此, 在其他具体实施方案中, 抗原是缺氧相关因子, 例如 HIF-1 α 、HIF-1 β 、HIF-2 α 、HIF-2 β 、HIF-3 α 或 HIF-3 β 。肿瘤也可引起正常组织的局部损伤, 导致称为损伤相关分子模式分子 (DAMP; 也称为警报素) 的释放。所以, 在某些其他具体实施方案中, 抗原是 DAMP, 例如热休克蛋白、染色质相关蛋白质高迁移率族框 1 (HMGB 1)、S100A8 (MRP8, 钙粒蛋白 A)、S100A9 (MRP14, 钙粒蛋白 B)、血清淀粉样蛋白 A (SAA), 或可以是脱氧核糖核酸、腺苷三磷酸、尿酸或硫酸肝素。

[0311] 跨膜域: 在某些实施方案中, CAR 的胞外域通过接头、间隔或铰链多肽序列, 例如来自 CD28 的序列或来自 CTLA4 的序列连接至多肽的跨膜域。跨膜域可以从任何跨膜蛋白的跨膜域获得或来源, 并且可包括这种跨膜域的全部或一部分。在具体实施方案中, 跨膜域可以从例如 CD8、CD16、细胞因子受体和白介素受体或生长因子受体等等获得或来源。

[0312] 胞内信号传导域：在某些实施方案中，CAR的胞内域是或包括在T细胞的表面上表达并且触发所述T细胞的活化和/或增殖的蛋白质的胞内域或基序。这种域或基序能够传输主要抗原结合信号，所述主要抗原结合信号对于响应于抗原结合至CAR的胞外部分而活化T淋巴细胞是必需的。通常，该域或基序包括或为ITAM（基于免疫受体酪氨酸的活化基序）。适用于CAR的含ITAM多肽包括例如 ζ CD3链（CD3 ζ ）或其含ITAM部分。在一个具体实施方案中，胞内域是CD3 ζ 胞内信号传导域。在其他具体实施方案中，胞内域来自淋巴细胞受体链、TCR/CD3复合蛋白、Fc受体亚基或IL-2受体亚基。在某些实施方案中，CAR另外包含一个或多个共刺激域或基序，例如作为多肽的胞内域的一部分。所述一个或多个共刺激域或基序可以是或可以包含共刺激CD27多肽序列、共刺激CD28多肽序列、共刺激OX40（CD134）多肽序列、共刺激4-1BB（CD137）多肽序列或共刺激诱导型T细胞共刺激（ICOS）多肽序列或其他共刺激域或基序中的一者或多者，或它们的任何组合。

[0313] CAR也可以包含T细胞存活基序。T细胞存活基序可以是在受到抗原刺激后促进T淋巴细胞存活的任何多肽序列或基序。在某些实施方案中，T细胞存活基序是或来源于CD3、CD28、IL-7受体（IL-7R）的胞内信号传导域、IL-12受体的胞内信号传导域、IL-15受体的胞内信号传导域、IL-21受体的胞内信号传导域或转化生长因子 β （TGF β ）受体的胞内信号传导域。

[0314] 表达CAR的经修饰的免疫细胞可以是例如T淋巴细胞（T细胞，例如CD4+T细胞或CD8+T细胞）、细胞毒性淋巴细胞（CTL）或自然杀伤（NK）细胞。本文提供的组合物和方法中所用的T淋巴细胞可以是天然T淋巴细胞或MHC限制T淋巴细胞。在某些实施方案中，T淋巴细胞是肿瘤浸润性淋巴细胞（TIL）。在某些实施方案中，T淋巴细胞已从肿瘤活检分离，或已从肿瘤活检分离的T淋巴细胞扩大。在某些其他实施方案中，T细胞已从外周血、脐带血或淋巴分离的T淋巴细胞分离或扩大。用于产生表达CAR的经修饰的免疫细胞的免疫细胞可以使用本领域公认的常规方法分离，例如血液收集，然后进行血液成分单采术以及任选地抗体介导细胞分离或分选。

[0315] 经修饰的免疫细胞优选地对于经修饰的免疫细胞所施用的个体是自体的。在某些其他实施方案中，经修饰的免疫细胞对于经修饰的免疫细胞所施用的个体是同种异体的。当同种异体的T淋巴细胞或NK细胞用于制备经修饰的T淋巴细胞时，优选地选择减少在个体中产生移植物抗宿主病（GVHD）的可能性的T淋巴细胞或NK细胞。例如，在某些实施方案中，选择病毒特异性T淋巴细胞用于制备经修饰的T淋巴细胞；预期此类淋巴细胞大大减少了结合任何受体抗原从而活化的天然能力。在某些实施方案中，受体介导的同种异体T淋巴细胞排斥可以通过将一种或多种免疫抑制剂，例如环孢素、他克莫司（tacrolimus）、西罗莫司（sirolimus）、环磷酰胺等等共施用于宿主来减少。

[0316] 可以使用CD3和CD28的抗体，例如附接到珠粒的抗体来扩大T淋巴细胞，例如未经修饰的T淋巴细胞，或表达CD3和CD28或包含含CD3 ζ 信号传导域和CD28共刺激域的多肽的T淋巴细胞；参见例如美国专利No. 5,948,893、6,534,055、6,352,694、6,692,964、6,887,466和6,905,681。

[0317] 经修饰的免疫细胞（例如经修饰的T淋巴细胞）可以任选地包含在需要时能够杀死实质上全部经修饰的免疫细胞的“自杀基因”或“安全开关”。例如，在某些实施方案中，经修饰的T淋巴细胞可包含HSV胸苷激酶基因（HSV-TK），其在接触更昔洛韦（gancyclovir）时导

致经修饰的T淋巴细胞死亡。在另一个实施方案中,经修饰的T淋巴细胞包含诱导型半胱天冬酶,例如诱导型半胱天冬酶9(icaspace9),例如允许使用特定小分子药物进行二聚化的半胱天冬酶9和人FK506结合蛋白之间的融合蛋白。参见Straathof等人,Blood 105(11): 4247-4254 (2005)。

[0318] 特别可用于方法或组合物的特定第二活性剂包括但不限于利妥昔单抗、奥利默森(Genasense®)、英利昔单抗(remicade)、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松(Decadron®)、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺(temozolomide)、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、甲基苄肼、gliadel、泰莫西芬、拓扑替康、甲氨蝶呤、Arisa®、紫杉酚、克癌易、氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸、伊立替康、希罗达(xeloda)、干扰素 α 、聚乙二醇化干扰素 α (例如,PEG INTRON-A)、卡培他滨、顺铂、噻替哌、氟达拉滨、卡铂、脂质体道诺霉素、Ara-C、doxetaxol、紫杉醇、长春花碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、甲红霉素(biaxin)、白消安、泼尼松、双磷酸盐、三氧化二砷、长春新碱、阿霉素(Doxil®)、紫杉醇、更昔洛韦、亚德里亚霉素(adriamycin)、雌莫司汀磷酸钠(Emcyt®)、舒林酸(sulindac)和依托泊苷。在本文所述的方法或组合物的一些实施方案中,第二活性剂是恩西地平、阿扎胞苷、CC-486、地西他滨、阿糖胞苷(ara-C)、道诺霉素(daunomycin)、伊达比星、克拉屈滨、米哌妥林(midostaurin)、氟达拉滨、拓扑替康、三氧化二砷或米托蒽醌中的一者或多者。

[0319] 在本文提供的方法的某些实施方案中,如本领域的技术人员所适当理解,在本文提供的化合物1的施用期间或之后不久,可以修改或延缓第二活性剂与化合物1的组合使用。在某些实施方案中,化合物1单独或与其他疗法组合施用的对象可以适当接受支持性护理,包括止吐药、骨髓生长因子和血小板输注。在一些实施方案中,根据本领域技术人员的判断,可以给施用化合物1的对象施用生长因子第二活性剂。在一些实施方案中,提供了化合物1与红细胞生成素或达贝泊汀(darbepoetin, Aranesp)的组合施用。

[0320] 在某些实施方案中,化合物1与三氧化二砷、氟达拉滨、卡铂、道诺霉素、环磷酰胺、阿糖胞苷、阿霉素、伊达比星、盐酸米托蒽醌、硫代鸟嘌呤、长春新碱和/或拓扑替康组合施用于急性骨髓性白血病(包括难治性或复发性急性骨髓性白血病)患者。在某些实施方案中,化合物1与三氧化二砷、氟达拉滨、卡铂、道诺霉素、环磷酰胺、阿糖胞苷、阿霉素、伊达比星、盐酸米托蒽醌、硫代鸟嘌呤、长春新碱、拓扑替康和/或恩西地平组合施用于急性骨髓性白血病(包括难治性或复发性急性骨髓性白血病)患者。

[0321] 在某些实施方案中,化合物1与阿扎胞苷、阿糖胞苷、道诺霉素、地西他滨、伊达比星或来那度胺组合施用于MDS患者。在某些实施方案中,化合物1与恩西地平、阿扎胞苷、CC-486、阿糖胞苷、道诺霉素、地西他滨、伊达比星或来那度胺组合施用于MDS患者。

[0322] 应当理解,本文设想了本文提供的化合物与一种或多种前述化合物和任选地一种或多种其他药理活性物质的每种合适组合。

[0323] 6.7患者群体

[0324] 在本文提供的方法的某些实施方案中,对象是动物,例如哺乳动物或非人灵长类动物。在一个特定实施方案中,对象是人。对象可以是男性或女性对象。

[0325] 特别适用于本文提供的方法的对象包括人类白血病患者,例如已诊断为急性骨髓

性白血病(包括复发性或难治性急性骨髓性白血病)的那些患者。

[0326] 在一些实施方案中,对象为18岁或更年长。在一些实施方案中,对象为18岁、25岁、35岁、40岁、45岁、50岁、55岁、60岁、65岁或70岁以上。在另一个实施方案中,对象为65岁以下。

[0327] 在一些实施方案中,根据白血病对象的美国东部肿瘤协作组(ECOG)行为状态评分治疗对象。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0至2。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为1。在另一个实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为2。

[0328] 在一些实施方案中,根据非霍奇金淋巴瘤(NHL)对象的美国东部肿瘤协作组(ECOG)行为状态评分治疗对象。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0至1。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为1。

[0329] 在一些实施方案中,根据骨髓增生异常综合征(MDS)对象的美国东部肿瘤协作组(ECOG)行为状态评分治疗对象。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0至2。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为1。在另一个实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为2。

[0330] 在一些实施方案中,根据套细胞淋巴瘤(MCL)对象的美国东部肿瘤协作组(ECOG)行为状态评分治疗对象。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0至2。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为0。在一些实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为1。在另一个实施方案中,对象的ECOG行为状态评分为2。

[0331] 在某些实施方案中,本文提供的方法涵盖其中供体淋巴细胞输注(DLI)已过去至少4周(从化合物1的第一剂量开始)但无改善的对象的治療。

[0332] 在某些实施方案中,本文提供的方法涵盖具有以下筛选实验室值的对象的治疗:

[0333] 校正血清Ca或游离(离子化)血清Ca在正常限度内(WNL)。

[0334] 校正Ca(mg/dL) = 总Ca(mg/dL) - 0.8(白蛋白[g/dL] - 4)

[0335] 在第一次输注之前总白细胞计数(WBC) < 25 x 10⁹/L。允许前期白细胞单采术和/或使用羟基脲前期或同时治疗来实现该水平。

[0336] 钾和镁在正常限度内或可补充剂用校正。

[0337] 天冬氨酸氨基转移酶/血清谷氨酸草酰乙酸转氨酶(AST/SGOT)或丙氨酸氨基转移酶/血清谷氨酸丙酮酸转氨酶(ALT/SGPT) ≤ 2.5x正常值上限(ULN)。

[0338] 尿酸 ≤ 7.5mg/dL (446μmol/L)。允许使用低尿剂(例如,别嘌呤醇、拉布立酶)前期和/或同时治疗。

[0339] 血清胆红素 ≤ 1.5 x ULN。

[0340] 使用Cockcroft-Gault公式估算血清肌酸酐清除率 ≥ 60mL/min。

[0341] INR < 1.5 x ULN, 并且PTT < 1.5 x ULN。

[0342] 在另一个实施方案中,方法涵盖治疗此前已治疗或目前正在治疗白血病的对象。例如,此前已使用标准治疗方案治疗或目前正在治疗对象的白血病。对象已用本领域的技术人员指定的任何白血病治疗方案治疗。在某些实施方案中,对象此前已用至少一种诱导/再诱导或巩固AML方案治疗。在一些实施方案中,对象已经历作为巩固方案的一部分的自体

移植的骨髓移植或干细胞移植。

[0343] 在某些实施方案中,对象不具有提示活动性中枢神经系统(CNS)白血病或已知的CNS白血病的临床症状。

[0344] 在某些实施方案中,对象不会立即受到生命威胁、白血病的严重并发症,诸如弥散性/难以控制的感染、难以控制的出血和/或难以控制的弥散性血管内凝血。

[0345] 在某些实施方案中,对象的心脏功能未受到损害或不具有临床意义的心脏疾病。

[0346] 在一些实施方案中,根据本文提供的方法,在化合物1的治疗之前3个或小于3个月,对象未经历前期自体移植的造血干细胞移植。

[0347] 在一些实施方案中,根据本文提供的方法,在开始化合物1治疗之前小于6个月,对象未经历前期同种异体造血干细胞移植(HSCT),其具有标准或减少强度改善。

[0348] 在一些实施方案中,对象不接受HSCT后全身免疫抑制疗法,或不具有临床意义的移植物抗宿主病(GVHD)。

[0349] 在一些实施方案中,在开始化合物1治疗之前小于五个半衰期或4周(以较短者为准),对象未经历前期全身癌症定向治疗或研究方式。在一些实施方案中,对象已接受羟基脲治疗。

[0350] 在一些实施方案中,对象在开始化合物1治疗之前小于两周未经历大手术。

[0351] 在一些实施方案中,对象无已知的HIV感染。在一些实施方案中,对象无已知的慢性、活动性乙肝或丙肝病毒(HBV/HCV)感染。

[0352] 在一些实施方案中,对象未经历抗凝血剂(例如,华法林(warfarin)、低分子量肝素、因子Xa抑制剂)的慢性治疗性给药治疗。在一些实施方案中,对象不具有需要积极、持续的全身治疗的第二并发癌症史。

[0353] 在某些实施方案中,对象不具有破坏正常钙稳态或阻止钙补充的病状或病症。

[0354] 因为癌症对象具有异质的临床表现和不同的临床结局,给予患者的治疗可以根据他/她的预后而变化。熟练的临床医生将能够在不进行过度实验的情况下容易地确定可有效地用于治疗患有癌症的个体对象的具体第二药剂、手术类型和基于非药物的标准疗法的类型。

[0355] 6.8活性的评价

[0356] 标准生理、药理和生物化学程序可用于测试化合物,以鉴定具有所需抗增殖活性的那些化合物。

[0357] 这些测定包括例如生物化学测定,诸如结合测定、放射性掺入测定以及多种基于细胞的测定。

[0358] 结合以下实施例可以更完全地理解本文提供的实施方案。这些实施例旨在说明本文提供的药物组合物和剂型,但不是以任何方式限制。

[0359] 7. 实施例

[0360] 以下实施例以说明而非限制方式提供。在描述和实施例中使用以下缩写。

[0361] ABC=活化B细胞,

[0362] ALL=急性淋巴母细胞白血病,

[0363] AML=急性骨髓性白血病,

[0364] ATCC=美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection),

- [0365] AUC=曲线下面积=活性面积，
- [0366] AV=膜联蛋白V，
- [0367] BCL=B细胞淋巴瘤；
- [0368] BFU-E=红细胞的爆发型集落形成单位，
- [0369] BME= β -巯基乙醇，
- [0370] CFU-E=红细胞的集落形成单位，
- [0371] CFU-GEMM=粒细胞/红细胞/单核细胞/巨核细胞的集落形成单位，
- [0372] CFU-GM=粒细胞/单核细胞的集落形成单位，
- [0373] CLL=慢性淋巴白血病，
- [0374] c-Maf=v-maf 鸟类肌腱膜纤维肉瘤癌基因同系物，
- [0375] DLBCL=弥漫性大B细胞淋巴瘤，
- [0376] DMEM=Dulbecco改良的Eagle培养基，
- [0377] DMSO=二甲基亚砷，
- [0378] DSMZ=德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)，
- [0379] FAB=法国-美国-英国，
- [0380] FBS=胎牛血清，
- [0381] FGFR3=成纤维细胞生长因子受体3，
- [0382] GCB=生发中心B
- [0383] g/L=克/升，
- [0384] GM-CSF=粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子，
- [0385] hr=小时，
- [0386] HEPES=2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸，
- [0387] HP=触珠蛋白，
- [0388] HPC=造血祖细胞，
- [0389] IMDM=Iscove改良的Dulbecco培养基，
- [0390] TBA=叔丁基醇，
- [0391] MCL=套细胞淋巴瘤，
- [0392] N=实验次数，
- [0393] NA=不可用，
- [0394] NF=无“良好曲线”拟合，
- [0395] nM=纳摩尔/升，
- [0396] NR=未排序，
- [0397] PBMC=外周血单个核细胞，
- [0398] MafB=V-maf肌腱膜纤维肉瘤癌基因同系物B，
- [0399] MEM=最低必需培养基，
- [0400] MMSET=多发性骨髓瘤SET域，
- [0401] RPMI=罗斯威尔公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)组织培养基，

[0402] SD=标准偏差,

[0403] μM =微摩尔/升,以及

[0404] y=岁。

[0405] 实施例1:冻干制剂

[0406] 使用美国专利申请No.15/400,791所述的程序制备具有表A和B所述的组合物的化合物1的冻干制剂。

[0407] 表A

	制剂 IA	制剂 IC	制剂 II	制剂 III
化合物 1 (mg/mL)*	0.125	0.125	0.40	0.50
赋形剂	Captisol® (30 mg/mL)	Kleptose® (30 mg/mL)	Captisol® (20 mg/mL)	甘露糖醇 (50 mg/mL)
柠檬酸缓冲剂(%v/v)	100	100	60	50
TBA (%v/v)	0	0	40	50

[0409] 表B

批次 No.	制剂 IX	制剂 IC	制剂 ID
C 型(mg/小瓶)	0.76	1.0	1.0
无水柠檬酸, USP (mg/小瓶)	6.1	17.7	17.7
无水柠檬酸钠, USP (mg/小瓶)	8.2	17.6	17.6
Kleptose®HPB, 肠胃外级(mg/小瓶)	67	240	240
TBA (溶于处理培养基)	在干燥时除去	0	0
N,N-二甲基乙酰胺, PW (溶于处理培养基)*	在干燥时除去		
总计	82.1	276.3	276.3

[0411] 实施例2:通过CellTiterGlo® (CTG) 发光细胞活力测定进行化合物1对体外AML细胞系的抗增殖和促细胞凋亡作用评价,以及与3天非肿瘤发生正常细胞的比较

[0412] 细胞培养材料:人AML、套细胞淋巴瘤 (MCL)、伯基特 (Burkitt) 淋巴瘤和骨髓瘤细胞系从表1所示的供应商购买。

[0413] 表2和表3.人正常供体PBMC和慢性淋巴白血病 (CLL) 患者母细胞得自A11Cells, LLC (Alameda, CA)。在表1所示的培养基中在37°C和5%CO₂下培养血液和原代细胞样品。

[0414] 表、表2和表3.所有细胞系保持在对数期,使用Vi-cell XR细胞活力分析仪 (Beckman Coulter, Brea, CA) 通过台盼蓝排除来监测细胞密度和活力。在Corning® BioCoat™T细胞活化抗人CD3 96孔板 (Corning Inc., Corning, NY) 上培养人PBMC。

[0415] 表1:测试急性骨髓性白血病细胞系

[0416]

细胞系	AML FAB 分类	来源	细胞培养基
KG-1	FAB M0/1	ATCC	RPMI + 10% FBS 1X HEPES 1X 丙酮酸钠 1X 非必需氨基酸
NB-4	FAB M3	DSMZ	
Kasumi-1	FAB M2	ATCC	
U937	FAB M5	ATCC	
HNT-34	FAB M4	DSMZ	
MOLM-13	FAB M5a	ATCC	
HL-60	FAB M2	ATCC	IMDM + 15% FBS
KG-1a	FAB M0/1	ATCC	
MV-4-11	FAB M5	ATCC	
OCI-AML2	FAB M4	DSMZ	MEM + 10% FBS
OCI-AML3	FAB M4	DSMZ	

[0417]

表2:测试淋巴瘤细胞系

[0418]

细胞系	淋巴瘤分类	来源	细胞培养基
WSUFSCCL	滤泡淋巴瘤	DSMZ	10% FBS RPMI
Mino	MCL	ATCC	
JeKo-1	MCL	ATCC	
DoHH2	滤泡淋巴瘤	DSMZ	
SR	ALL	DSMZ	
SU-DHL-1	GCB DLBCL	DSMZ	
U2932	ABC DLBCL	DSMZ	
RC-K8	ABC DLBCL	DSMZ	
DG-75	伯基特淋巴瘤	DSMZ	
WSU-NHL	滤泡淋巴瘤	DSMZ	
Rec-1	MCL	ATCC	15% FBS RPMI
SU-DHL-5	GCB DLBCL	DSMZ	
SU-DHL-6	GCB DLBCL	DSMZ	
Karpas 231	ALL	DSMZ	
MC-116	ALL	DSMZ	
Karpas 299	ALL	DSMZ	
SC-1	DLBCL	DSMZ	20% FBS

[0419]	细胞系	淋巴瘤分类	来源	细胞培养基
	Namalwa	伯基特淋巴瘤	DSMZ	RPMI
	JVM-2	MCL	DSMZ	
	JVM-13	MCL	ATCC	
	SU-DHL-8	GCB DLBCL	DSMZ	
	EB-1	伯基特淋巴瘤	DSMZ	10% FBS RPMI + 50 μ M BME
	BL-70	伯基特淋巴瘤	DSMZ	
	Blue-1	伯基特淋巴瘤	DSMZ	
	OCI-LY-10	ABC DLBCL	DSMZ	
	Daudi	伯基特淋巴瘤	DSMZ	RPMI + 10% FBS 1.5 g/L 碳酸氢钠 4.5 g/L 葡萄糖 1 mM 丙酮酸钠
	HS-Sultan	伯基特淋巴瘤	ATCC	
	Ramos	伯基特淋巴瘤	ATCC	
	Raji	伯基特淋巴瘤	ATCC	
	Granta	MCL	ATCC	20%溶于DMEM的 FBS
	OCI-LY7	GCB DLBCL	DSMZ	IMDM + 20% HP + 20 μ M BME
	BL-41	伯基特淋巴瘤	DSMZ	10% FBS RPMI + 50 μ M BME

[0420] 表3:测试多发性骨髓瘤细胞系

[0421]	细胞系	遗传易位	来源	细胞培养基
	DF15	t(14;16) c-Maf/MafB	John D. Shaughnessy 博 士的惠赠	RPMI + 10% FBS 1X HEPES 1X 丙酮酸钠 1X 非必需氨基酸
	DF15R (泊马度胺耐受性)	t(14;16) c-Maf/MafB	Celgene 制造	
	OPM-2	t(4;14) - FGFR3 & MMSET	ATCC	
	OPM2 P10 (泊马度胺耐受性)	t(4;14) - FGFR3 & MMSET	Celgene 制造	
	H929	t(4;14) - FGFR3 & MMSET	ATCC	
	H929 R10-1 (来那度胺耐受性)	t(4;14) - FGFR3 & MMSET	Celgene 制造	
	JJN3	t(14;16) - c-Maf	DSMZ	
	U266	t(11;14) - 周期蛋 白 D1	ATCC	
	RPMI 8226	t(16;22)	ATCC	
	SK-MM-2	t(11;14) - 周期蛋 白 D1(BCL1)	DSMZ	
	EJM	t(14;20) - MafB	DSMZ	

[0422] 测试制品溶液的制备:将化合物加入黑色384孔板(Corning Inc.),达到0.1%的最终DMSO体积,假设最大体积为50 μ L。使用EDC ATS-100平台通过声波移液一式两份标记从10 μ M开始以1:3稀释的10点剂量反应。

[0423] 细胞增殖测定:根据制造商的说明,在温育72小时后使用CTG(Promega)评估化合物1对血液细胞系(表1、

[0424] 表2和表3)、THLE-2或PBMC的增殖/活力的作用。通过Multidrop™Combi试剂移液器(Thermo Scientific, Waltham, MA), 以50μL总体积、0.1至0.3x10⁶个细胞/mL的浓度, 将血液细胞系分配到化合物板中。以50μL体积、1000个细胞/孔接种THLE-2细胞, 并温育72小时。在72小时, 通过Multidrop™Combi试剂移液器以25μL/孔CTG进行分配, 在30分钟后使用Envision平台以相对发光单位测定活细胞释放的腺苷三磷酸(ATP)。

[0425] 对于冷冻PBMC, 在37℃下含10%FBS的RPMI中解冻细胞2分钟, 如上文所述在ViCell上测定细胞计数和活力。洗涤外周血单个核细胞, 并稀释至1x10⁶个细胞/mL, 通过Multidrop™Combi试剂移液器以25μL/孔的体积分配到化合物板中, 并温育2小时。在2小时后, 每孔分配25μL抗CD3抗体结合的珠粒(1份细胞:2份抗人CD3抗体涂覆的M-450珠粒), 再温育72小时。在72小时后, 收集15μL上清液, 用于使用人IL-2 384孔组织培养试剂盒(Meso Scale Diagnostics)根据制造商的说明进行白介素(IL)-2应答分析, 用CTG处理其余的细胞悬浮液。

[0426] 细胞凋亡测定: 在所选的AML细胞系和健康PBMC中在所示时间点和化合物浓度下评估化合物1诱导细胞凋亡的能力。对于流式细胞术的膜联蛋白V/7-AAD读数, 在200μL完全培养基中以0.1至0.3x10⁶个细胞/mL的接种密度将AML细胞系接种于平底96孔板(BD Falcon)中。将化合物1分配到板中, 并温育细胞指定的时间。对于冷冻PBMC, 如上文所述解冻细胞, 并以200μL、1x10⁶个细胞/mL的接种密度接种于Corning®BioCoat™T细胞活化抗人CD3 96孔板(Corning Inc., Corning, NY)中。将化合物1分配到板中, 并温育细胞指定的时间。在温育期结束时, 将100μL细胞转移到96孔U型底平板(BD Falcon)中, 以1200rpm离心5分钟, 除去培养基。然后将2.5μL膜联蛋白V-AF647(Biolegend)和5μL 7-AAD(Biolegend)加入100μL 1X膜联蛋白结合缓冲剂(BD Biosciences)。每孔加入一百微升膜联蛋白V/7-AAD缓冲剂, 温育细胞15分钟, 然后使用Attune流式细胞仪(Life Technologies, Carlsbad, CA)进行分析。对于半胱天冬酶3/7活性, 其余100μL用CellEvent™半胱天冬酶-3/7绿色ReadyProbes®试剂(1:1000稀释; Molecular Probes)温育15分钟, 然后使用Attune流式细胞仪进行分析。对于评估细胞健康的正交方法, 即线粒体电势的测定, 根据制造商的说明使用JC-1线粒体膜电势测定试剂盒(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan), 并使用TECAN Safire II多模式读板器进行读数。

[0427] 化合物1冲洗测定: 对于冲洗实验, 将AML细胞系以60,000个细胞/孔的密度接种于U型底96孔板中。在时间零点(t=0)用化合物1处理所有细胞, 然后在每个时间点, 将细胞重悬于冲洗培养基(含有与化合物工作浓度相比1000倍过量的戊二酰亚胺(例如, 对于100nM化合物处理的冲洗, 100μM戊二酰亚胺))中。在温育期结束时, 以200g离心板3分钟, 除去上清液, 将细胞重悬于含有膜联蛋白V(2.5μL/孔)和7-AAD(5μL/孔)的100μL/孔1X膜联蛋白V结合缓冲剂中。使用BD FACSAarray仪器进行流式细胞术, 并使用FlowJo软件定量结果。同时, 将CTG加入96(黑色)孔板, 如上文细胞增殖测定所述进行处理。

[0428] 结果. 化合物1展示出在整个急性骨髓性白血病细胞系组具有抗增殖活性。在11种AML细胞系组中测试化合物1的体外抗增殖活性。被选择用于该研究的细胞系表示AML患者中所见的宽范围表型(表1)。化合物1在11种评估AML细胞系中的10种中抑制细胞增殖, 如72小时后培养基中存在的ATP水平的定量评估所确定。在11种测试AML细胞系的10种中, 化合物1的抗增殖IC₅₀值在3和75nM之间的范围内(表4)。一种AML细胞系(OCI-AML3)对化合物1的

生长抑制作用相对不敏感 ($IC_{50}=3\mu M$)。还在多发性骨髓瘤组和淋巴瘤细胞系以及CLL患者样品中测试了化合物1的抗增殖作用(表2、表3和表4)。

[0429] 表4:在液体培养基中的急性骨髓性白血病细胞系组中通过化合物1抑制细胞生长

[0430]

AML 细胞系	AML FAB 分类	驱动突变	增殖 IC_{50} (平均值 \pm SD) (μM)	N
KG-1	M0/1	FGFR1 Act; NRas	0.015 ± 0.006	81
NB-4	M3	PML-RARA	0.017 ± 0.005	82
Kasumi-1	M2	RUNX1-RUNX1T1; KIT ^{N822K}	0.021 ± 0.013	77
U-937	M5	CALM-AF10	0.074 ± 0.025	73
HNT-34	M4	-	0.003 ± 0.001	49
MOLM-13	M5a	Mll-Af9; FLT3 ^{ITD}	0.075 ± 0.033	83
HL-60	M2	Myc ^{amplified} ; NRas	0.020 ± 0.010	79
KG-1a	M0/1	FGFR1 Act; NRas	0.021 ± 0.010	81
MV-4-11	M5	Mll-Af4; FLT3 ^{ITD}	0.029 ± 0.010	73
OCI-AML2	M4	DNMT3A ^{R635W}	0.057 ± 0.021	82
OCI-AML3	M4	NPM1c; DNMT3A ^{R882C}	3.397 ± 3.326	79

[0431] 使用CellTitre-Glo[®]测定评估增殖。将培养物与化合物1温育的结果归一化为每种细胞系的对照培养物的结果。使用ActivityBase软件确定每种细胞系的化合物1抑制细胞生长的 IC_{50} 。

[0432] 来源:Quentmeier, 2005; 美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)网站(atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Disease_Model/Cancer/Source_Tissue/Leukemia.aspx); 莱布尼茨学会-德国微生物菌种保藏中心(Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)网站(dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html)。

[0433] 表5:化合物1在多发性骨髓瘤和淋巴瘤细胞系组中的抗增殖作用(续)

[0434]

血液疾病	细胞系	增殖 IC ₅₀ (μM)
弥散性大 B 细胞淋巴瘤 (活化 B 细胞样)	U2932	0.9045
	RC-K8	0.9558
	OCI-LY-10	>10
急性淋巴母细胞白血病	SR	>10
	Karpas 231	0.7896
	MC-116	>10
	Karpas 299	>10
伯基特淋巴瘤	DG-75	>10
	Namalwa	0.0746
	EB-1	0.0663
	BL-70	0.3474
	Blue-1	0.9861
	Daudi	0.3933
	HS-Sultan	>10
	Ramos	>10
	Raji	>10
慢性淋巴细胞白血病	BL-41	>10
	患者样品(n = 3)	0.01

[0435] 为了计算化合物1的治疗窗口,针对永生化(但非肿瘤发生)人肝细胞来源细胞系 THLE-2 (Pfeifer等人, Proc Natl Acad Sci U S A 1993 90(11):5123-5127) 和针对原代人 PBMC 反筛选化合物。化合物1展示出与 AML 细胞系相比,在 THLE-2 中抗增殖活性减少 (IC₅₀ ~10 μM), 但对原代人 PBMC 具有一些活性 (IC₅₀ = 0.12 μM)。与 THLE-2 细胞相比, 10 种敏感 AML 细胞系的化合物1治疗窗口在 4.1 (KG-1a) 至 57 (HNT-34) (方法1) 或 5.7 (KG-1a) 至 79.5 (HNT-34) (方法2) 的范围内; 与 PBMC 相比, 化合物1治疗窗口在 2.6 (KG-1a) 至 36 (HNT-34) 或 1.5 (KG-1a) 至 21 (HNT-34) 的范围内 (表6)。

[0436] 表6: 与 THLE-2 细胞和外周血单个核细胞相比, 液体培养基中的急性骨髓性白血病细胞系组中化合物1的治疗窗口

[0437]

AML 细胞系	AUC	N	治疗窗口 方法 1		治疗窗口 方法 2	
			与 THLE-2 细胞相比	与 PBMC 相比	与 THLE-2 细胞相比	与 PBMC 相比
KG-1	65.8	4	6.0	3.8	8.3	2.2
NB-4	14.4	7	27	17	38.1	10.1
Kasumi-1	37.9	3	10	6.6	14.5	3.8
U-937	40.0	6	9.8	6.3	13.7	3.6
HNT-34	6.9	2	57	36	79.5	21.0
MOLM-13	39.6	7	9.9	6.3	13.9	3.7
HL-60	23.7	5	17	11	23.2	6.1

[0438]

AML 细胞系	AUC	N	治疗窗口 方法 1		治疗窗口 方法 2	
KG-1a	96.9	5	4.1	2.6	5.7	1.5
MV-4-11	20.5	4	19	12	26.8	7.1
OCI-AML2	17.9	5	22	14	30.7	8.1
OCI-AML3	563.0	6	0.70	0.45	1.0	0.3
正常细胞						
		N	AUC 方法 1		AUC 方法 2	
THLE-2		3	393.0		549.1	
PBMC		5	251.1		145.1	

[0439] 用浓度为0.5nM至10 μ M的化合物1温育11种不同AML细胞系的培养物72小时。使用CellTitre-Glo[®]测定评估增殖。将培养物与化合物1温育的结果归一化为每种细胞系的对照培养物的结果。还确定化合物1浓度为0.1nM至100 μ M下THLE-2细胞中以及化合物1浓度为0.5nM至10 μ M下PBMC中的细胞生长抑制。使用曲线下面积 (AUC; 活性面积 [Barretina等人, Nature (2012) 483603-607] 测量值 (任意单位) 来计算化合物1治疗窗口, 所述曲线下面积如下所述确定: 使用GraphPad Prism软件绘制细胞增殖与浓度图, 然后将永生化的 (但非肿瘤发生) 人THLE-2肝细胞细胞系或PBMC的AUC除以AML细胞系的AUC。

[0440] 化合物1在急性骨髓性白血病细胞系中诱导细胞凋亡。研究化合物1在AML细胞系中对细胞凋亡的作用。使用浓度为0.001 μ M的化合物1温育HNT-34细胞。评估0.01 μ M和0.1 μ M以及细胞凋亡随时间的变化。结果显示, 对于HNT-34细胞, 100nM化合物1在8至16小时温育内诱导细胞凋亡达到最大。然后, 检查所选的AML细胞系组中化合物1诱导的细胞凋亡。在5种评价的细胞系的4种中在24和48小时后观察到显著诱导的细胞凋亡。正如预期, 化合物1在化合物1不敏感的AML细胞系OCI-AML3中不诱导细胞凋亡。

[0441] 为了确定化合物1导致AML细胞系发生细胞凋亡的时间点, 在不同的时间点进行冲洗实验, 并在72小时后评估细胞活力 (参见图30A的示意图)。化合物1 (100nM) 在处理的8至16小时内使细胞不可逆地发生细胞凋亡 (图30B)。在1和4小时之间冲洗100nM化合物1使效力降低 (EC_{50} 曲线右移) \sim 10倍。在8至16小时冲洗使效力降低 \sim 4倍, 在24小时化合物具有类似于未冲洗样品的效力 (图30B)。

[0442] 化合物1展示出对正常供体的外周血单个核细胞的抗增殖作用与急性骨髓性白血病细胞系相比的差异。还评估了化合物1在健康PBMC中的作用。将化合物1在时间零点加入一个供体的PBMC并在72小时评估。这相当于在化合物1加入之前预先活化并在抗CD3抗体涂覆的板上增殖72小时并且再温育细胞72小时的PBMC。HNT-34细胞用作敏感阳性对照细胞系。如CTG和活细胞计数所确定, 预先活化的外周血单个核细胞对化合物1的抗增殖作用具有耐受性 ($IC_{50} > 10\mu$ M)。然而, 如使用两种方法 (即CTG和流式细胞计数) 所测定, 化合物1不降低未预先活化的PBMC的细胞增殖 (CTG $IC_{50} = 0.1\mu$ M; 细胞计数 $IC_{50} = 0.5\mu$ M)。当未预先活化的PBMC中的抗增殖活性相当于HNT-34细胞中时 (CTG $IC_{50} = 0.002\mu$ M; 细胞计数 $IC_{50} = 0.004\mu$ M), 可以计算50至125的治疗窗口。对于细胞凋亡的诱导, 在72小时后, 与未预先活化的PBMC相比, 在0.1 μ M化合物1下, 在HNT-34细胞中观察到半胱天冬酶3/7活性升高 \sim 3倍的差异和膜去极化增加 \sim 7倍的差异。在预先活化的PBMC和HNT-34细胞之间观察到化合物1诱导的半胱天冬酶3/7升高和膜去极化的相似或更大的差异。

[0443] 结论. 化合物1在11种测试的急性骨髓性白血病 (AML) 细胞系中的10种中展示出强

抗增殖活性。抗增殖作用似乎是由于细胞凋亡的快速诱导而导致的。在大部分敏感AML细胞系HNT-34中,在100nM化合物1温育的8至16小时内诱导最大细胞凋亡,如流式细胞术膜联蛋白V/7-氨基放线菌素D (7-AAD) 分析所测定。在10种敏感AML细胞系中,抗增殖作用的 IC_{50} 值在3至75nM的范围内,对于不敏感的细胞系(OCI-AML3), IC_{50} 为3 μ M。还评价了11种AML细胞系的组中化合物1的R-和S-对映异构体的抗增殖作用。两种对映异构体均显示出细胞增殖的抑制,类似于72小时的化合物1(数据未示出)。

[0444] 与不同来源的非肿瘤发生细胞相比,急性骨髓性白血病细胞系对化合物1的杀伤作用更敏感。化合物1在非肿瘤发生人类肝细胞来源细胞系THLE-2中显示出抗增殖活性降低($IC_{50} \sim 10\mu$ M)。另外,在原代健康外周血单个核细胞(PBMC)中,化合物1的抗增殖作用降低。预先活化的外周血单个核细胞对化合物1的细胞增殖作用具有耐受性($IC_{50} > 10\mu$ M),如CellTiter-Glo[®] (CTG) 和活细胞计数所确定;然而,如使用两种方法(即CTG和流式细胞计数)所测定,化合物1不降低未预先活化的PBMC的细胞增殖(CTG $IC_{50} = 0.1\mu$ M;细胞计数 $IC_{50} = 0.5\mu$ M)。此外,与健康供体PBMC相比,化合物1在肿瘤细胞中对细胞凋亡的诱导具有不同作用。使用流式细胞术半胱天冬酶3/7测定和线粒体膜电势测定评价HNT-34细胞系和PBMC中的细胞凋亡。在100nM下,化合物1在HNT-34细胞中诱导半胱天冬酶3/7活化比PBMC大 ~ 3 倍,并且膜去极化大 ~ 7 倍。

[0445] 实施例3:使用IncuCyte[™]动力学半胱天冬酶-3/7细胞凋亡分析评价使用化合物1体外温育的急性骨髓性白血病细胞系的细胞凋亡和活力

[0446] 方法. 急性骨髓性白血病细胞系组:人AML细胞系、AML-193、F36-P、GDM-1、HL-60、HNT-34、Kasumi-1、Kasumi-3、KG-1、KG-1a、ML-2、MOLM-13、MUTZ-8、MV-4-11、NOMO-1、OCI-AML2、OCI-AML3、SIG-M5、TF-1、THP-1和UT-7得自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC; Manassas, VA) 和德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) (Germany) 细胞库。AML组包括每种FAB分类的细胞系(M0-M7) (表7)。

[0447] 表7:急性骨髓性白血病细胞系的特征

[0448]

人 AML 细胞系	疾病	细胞类型	组织	性别	年龄	FAB 分类	ATCC/DSMZ 数
AML-193	急性单核细胞性白血病	单核细胞	外周血	女	13 岁	M5	CRL-9589
F-36P	急性骨髓性白血病	NA	胸腔积液	男	68 岁	M6	ACC-543
GDM-1	粒细胞-单核细胞性白血病	单核母细胞	外周血	女	66 岁	M4	CRL-2627
HL-60	急性早幼粒细胞白血病	早幼粒细胞	外周血	女	36 岁	M2/M ₃	CCL-240
HNT-34	急性骨髓性白血病	NA	外周血	女	47 岁	M4	ACC-600
Kasumi-1	急性原粒细胞性白血病	原粒细胞	外周血	男	7 岁	M2	CRL-2724
Kasumi-3	急性原粒细胞性白血病	淋巴母细胞	外周血	男	57 岁	M0	CRL-2725
KG-1	急性粒细胞性白血病	巨噬细胞	骨髓	男	59 岁	M0	CCL-246
KG-1a	急性粒细胞性白血病	早幼粒细胞; 巨噬细胞	骨髓	男	59 岁	M0/M ₁	ACC-421
ML-2	急性粒细胞-单核细胞性白血病	NA	外周血	男	26 岁	M4	ACC-15
MOLM-13	急性骨髓性白血病	NA	外周血	男	20 岁	M5a	ACC-554
MUTZ-8	急性骨髓性白血病	NA	外周血	女	63 岁	M4	ACC-689
MV-4-11	双表型 B 骨髓单核细胞性白血病	巨噬细胞	外周血	男	10 岁	M5	CRL-9591
NOMO-1	急性骨髓性白血病	NA	骨髓	女	31 岁	M5a	ACC-542
OCI-AML2	急性骨髓性白血病	NA	外周血	男	65 岁	M4	ACC-99
OCI-AML3	急性粒细胞性白血病	NA	外周血	男	57 岁	M4	ACC-582
SIG-M5	急性单核细胞性白血病	NA	骨髓	男	63 岁	M5a	ACC-468
TF-1	红白血病	成红细胞	骨髓	男	35 岁	M6	CRL-2003
THP-1	急性单核细胞性白血病	单核细胞	外周血	男	1 岁	M5	TIB-202

	人 AML 细胞系	疾病	细胞类型	组织	性别	年龄	FAB 分类	ATCC/DSMZ 数
[0449]		胞性白血病	胞	血				
	UT-7	急性骨髓性白血病	NA	骨髓	男	64 岁	M7	ACC-137

[0450] 细胞培养条件:细胞系维持在含有20%胎牛血清(FBS)(Hyclone目录号SH30910.03,批次号AZF188864;Corning参考号35-010-CV,批次号35010124)、补充有或未补充有10ng/mL人重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Sigma-Aldrich目录号SRP3050)的生长培养基中(表8)。培养基购自ATCC(目录号30-2001、30-2002、30-2003、30-2005)和Gibco(参考号12561-056)。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达人重组粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。ATCC和DSMZ提供了每种细胞系的细胞倍增时间。细胞维持在5%二氧化碳(CO₂)的潮湿温育箱中。使所有细胞系适应含有或不含有GM-CSF的Eagle最小必需培养基(EMEM)+20%FBS达2至4周,然后使用IncuCyte Zoom(Essen Biosciences)进行活细胞成像。EMEM的使用是消除大多数培养基中核黄素导致的背景荧光必需的。

[0451] 表8:生长条件

	人 AML 细胞系	培养基	报告倍增时间(小时)
	AML-193	IMDM + 20% FBS + 10ng/mL GM-CSF	50-60
	F-36P	RPMI 1640 + 20% FBS + 10ng/mL GM-CSF	24-36
	GDM-1	RPMI 1640 + 20% FBS	40-50
	HL-60	RPMI 1640 + 20% FBS	40
	HNT-34	RPMI 1640 + 20% FBS	40
	KASUMI-1	RPMI 1640 + 20% FBS + 10ng/mL GM-CSF	40-72
	KASUMI-3	RPMI 1640 + 20% FBS + 10ng/mL GM-CSF	55-60
	KG-1	RPMI 1640 + 20% FBS	38
[0452]	KG-1a	RPMI 1640 + 20% FBS	50
	ML-2	RPMI 1640 + 20% FBS	60
	MOLM-13	RPMI 1640 + 20% FBS	50
	MUTZ-8	MEMα + 20% FBS + 10ng/mL GM-CSF	72-120
	MV-4-11	RPMI 1640 + 20% FBS	50
	NOMO-1	RPMI 1640 + 20% FBS	35
	OCI-AML2	MEMα + 20% FBS	30-50
	OCI-AML3	DMEM + 20% FBS	35-40
	SIG-M5	IMDM + 20% FBS	72
	TF-1	RPMI 1640 + 20% FBS + 10ng/mL GM-CSF	70
	THP-1	RPMI 1640 + 20% FBS	35-50
	UT-7	MEMα + 20% FBS + 10ng/mL GM-CSF	70

[0453] 红色标记的急性骨髓性白血病细胞系的衍生化:用红色慢病毒稳定转导十二种细胞系,包括AML-193、HL-60、KG-1、ML-2、MOLM-13、MV-4-11、NOMO-1、OCI-AML2、OCI-AML3、SIG-M5、TF-1和THP-1。将细胞接种于6孔板中的生长培养基中,用8μg/mL聚凝胺(EMD Millipore目录号TR-1003-G)进行温育,然后用CellPlayer™NucLight™红色慢病毒颗粒(Essen Biosciences目录号4478)在0.5至2.5的感染复数(MOI)下感染24小时。MOI是指病毒颗粒与细胞的比例。将含有病毒的培养基更换为新鲜的生长培养基,再温育24至48小时,

然后用博来霉素的衍生物,即Zeocin(500至2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Life Technologies-Invitrogen 目录号R250-01) 选择。每3至4天用新鲜Zeocin选择细胞3至8周。使用荧光显微镜周期性地观察细胞中受限于细胞核的红色荧光。一旦确认群体具有稳定的红色荧光,即终止Zeocin选择。使所有红色标记细胞系适应含有20%FBS、含有或不含有GM-CSF补充剂的EMEM,允许进行最佳活细胞成像。

[0454] 用化合物1温育细胞培养物:化合物1由Celgene chemistry group以溶于20 μL 冷冻二甲基亚砜(DMSO)的30mM储存浓度提供用于研究。在37 $^{\circ}\text{C}$ 下用100 μL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤连蛋白(Sigma-Aldrich目录号F1141)涂覆Costar96孔细胞培养板(Corning目录号3595)4小时,立即使用或冷冻过夜义工后续使用。将细胞(3000至6000个细胞)接种于纤连蛋白涂覆的96孔板中的生长培养基中,并温育最少几小时至过夜。用化合物1(0至10 μM) (包括DMSO和培养基对照)以12点浓度反应一式三份温育细胞。在0.6%DMSO(在培养基中稀释)中从200 μM 浓度开始进行化合物1的3倍系列稀释。对于最敏感的细胞系,在0.6%DMSO(在培养基中稀释)中从20 μM 浓度开始进行化合物1的3倍系列稀释。对于每个稀释,分别将5 μL 或10 μL 体积加入100 μL 或200 μL 细胞(最终浓度0.3%DMSO),并温育以进行活细胞成像。

[0455] 在IncuCyte Zoom上进行活细胞成像:在用化合物1温育细胞后,将稀释的半胱天冬酶3/7试剂(Essen Biosciences目录号4440)加入每个孔。半胱天冬酶-3/7试剂将活化的半胱天冬酶-3/7识别基序(DEVD)与DNA嵌入染料,即NucViewTM488偶联。通过活化的半胱天冬酶-3/7切割底物会导致DNA染料释放,使核DNA发生绿色荧光染色。这允许细胞的成像随时间的推移经历半胱天冬酶-3/7介导的细胞凋亡。使用IncuCyteTMZOOM基本分析仪定量半胱天冬酶-3/7活化。还使用IncuCyteTMZOOM基本分析仪进行红色标记的细胞系随时间推移的成像,以确定细胞倍增时间和化合物1对细胞活力的作用。每种细胞系进行至少两次实验。

[0456] 剂量响应数据分析:对于使用一定浓度范围的化合物1(0至10 μM)温育的每种细胞系,在12、24、48、72和96小时的时间点,对于每个浓度和重复值,通过R‘pracma’软件包中的“trapz”功能计算细胞生长的曲线下面积(AUC)(总红色积分强度(RCU $\times \mu\text{m}^2/\text{孔}$)或红色对象计数(1/孔))和细胞死亡的曲线下面积(AUC)(绿色对象计数(1/孔))(Borchers HW.Practical Numerical Math Functions.R软件包1.8.6.版<https://cran.r-project.org/web/packages/pracma/pracma.pdf>.第340-341页.2015年11月27日.2016年2月1日访问)。然后,通过R‘drc’软件包的‘drm’功能使用4参数对数-逻辑模型确定每个时间点的相对EC50(Ritz C,Streibig JC.Bioassay Analysis using R.J.Statist.Software 2005;12(5):1-22)。通过 $\geq 80\%$ 的R平方(通过模型拟合解释的确定系数或变异量)测定拟合优度,通过求解标准误差与 $\leq 40\%$ 的参数的比例,以及存在至少一个大于和小于报告EC₅₀的浓度点来评估EC₅₀参数。

[0457] 使用Essen Biosciences,Inc.的IncyCyte ZOOM设备软件中的绘图功能绘制RFP标记的细胞的绿色对象(1/孔)对时间的曲线和总红色积分强度(RCU $\times \mu\text{m}^2/\text{孔}$)或红色对象计数(1/孔)对时间的曲线。

[0458] 结果

[0459] 用化合物1温育的急性骨髓性白血病细胞系组中的细胞凋亡响应定量。在一定浓度范围的化合物1温育的AML细胞系中进行细胞凋亡的实时成像,所述细胞凋亡如半胱天冬

酶3/7活化所测定。表9示出了在24、48、72和96小时时间AML细胞系中化合物1介导的半胱天冬酶3/7活化的平均 EC_{50} 值。

[0460] 观察二十种AML细胞系中化合物1诱导的不同敏感性的细胞凋亡。由于除THP-1之外的所有细胞系在48小时具有至少一个成功的曲线拟合,因此该时间用于定义细胞系的相对敏感性。

[0461] • 八种细胞系(HNT-34、Kasumi-3、HL-60、ML-2、MV4-11、KG-1、MUTZ-8、GDM-1)具有小于 $0.05\mu\text{M}$ 的 $EC_{50_{48\text{小时}}}$ (范围为 0.004 至 $0.049\mu\text{M}$);这些细胞系归类为高敏感的,具有 $0.027\mu\text{M}$ 的平均 $EC_{50_{48\text{小时}}}$ 。HNT-34是最敏感的细胞系, $EC_{50_{48\text{小时}}}$ 为 $0.004\mu\text{M}$ 。

[0462] • 七种细胞系(OCI-AML-2、AML-193、SIG-M5、Kasumi-1、TF-1、Nomo-1、KG-1a)具有在 $0.05\mu\text{M}$ 和 $0.2\mu\text{M}$ 之间的 $EC_{50_{48\text{小时}}}$ (范围为 0.081 至 $0.145\mu\text{M}$);这些细胞系归类为中等敏感的,具有 $0.114\mu\text{M}$ 的平均 $EC_{50_{48\text{小时}}}$ 。

[0463] • 四种细胞系(UT-7、F36-P、MOLM-13、OCI-AML3)具有在 $0.2\mu\text{M}$ 和 $1\mu\text{M}$ 之间的 $EC_{50_{48\text{小时}}}$ (范围为 0.231 至 $0.896\mu\text{M}$),具有 $0.458\mu\text{M}$ 的平均 $EC_{50_{48\text{小时}}}$ 。一种细胞系(THP-1)具有大于 $10\mu\text{M}$ 的 $EC_{50_{48\text{小时}}}$ 。这些细胞系归类为低敏感的。

[0464] 观察所有AML细胞组的化合物1活化半胱天冬酶3/7的不同时间动力学(细胞凋亡诱导)。

[0465] • 在8种最敏感的细胞系中最早12小时观察到细胞凋亡反应($EC_{50_{12\text{小时}}}$ 的范围为 0.053 至 $0.227\mu\text{M}$)。虽然由于缺乏“良好曲线拟合”,在HNT-34、HL-60和MUTZ-8细胞系中未观察到 $EC_{50_{12\text{小时}}}$,但是观察到半胱天冬酶3/7活化。

[0466] • 在24小时,20种细胞系中的14种具有成功的曲线拟合($EC_{50_{24\text{小时}}}$ 的围范为 0.007 至 $0.916\mu\text{M}$)。两种细胞系(HNT-34和Kasumi-3)具有小于 $0.05\mu\text{M}$ 的 $EC_{50_{24\text{小时}}}$,七种细胞系(HL-60、ML-2、MV-4-11、KG-1、MUTZ-8、SIG-M5和NOMO-1)具有在 $0.05\mu\text{M}$ 和 $0.2\mu\text{M}$ 之间的 $EC_{50_{24\text{小时}}}$,五种细胞系(KG-1a、AML-193、GDM-1、OCI-AML2和MOLM-13)具有大于 $0.2\mu\text{M}$ 的 $EC_{50_{24\text{小时}}}$ 。

[0467] • 在其后的时间点,通常观察到所有AML细胞组的化合物1效力增加。 $EC_{50_{72\text{小时}}}$ 和 $EC_{50_{96\text{小时}}}$ 的范围分别为 0.003 至 $0.971\mu\text{M}$ 和 0.001 至 $0.418\mu\text{M}$ 。在72小时,20种细胞系中的11种(包括HNT-34)具有 $\leq 0.05\mu\text{M}$ 的 $EC_{50_{72\text{小时}}}$;20种细胞系中的4种具有在 0.05 至 $0.20\mu\text{M}$ 之间的 $EC_{50_{72\text{小时}}}$;20种细胞系中的4种具有在 0.2 至 $1\mu\text{M}$ 之间的 $EC_{50_{72\text{小时}}}$ 。在96小时时间点观察到相似的结果。

[0468] 表9:急性骨髓性白血病细胞系中化合物1诱导的细胞凋亡的平均 EC_{50} 值

[0469]

AML 细胞系	化合物 1 诱导的细胞凋亡 EC ₅₀ (μM)						
	12h	24h	48h	72h	96h	24 小时的 排序	48 小时的 排序
HNT-34	NF	0.007	0.004	NF	0.002	1	1
Kasumi-3	0.054	0.010	0.004	0.003	0.001	2	2
HL-60	NF	0.073	0.015	0.008	NF	5	3
ML-2	0.179	0.062	0.031	0.021	0.025	3	4
MV-4-11	0.227	0.167	0.032	0.016	0.017	9	5
KG-1	0.053	0.108	0.039	0.026	0.025	7	6
MUTZ-8	NF	0.088	0.040	0.018	0.015	6	7
GDM-1	0.110	0.313	0.049	0.033	0.025	12	8
OCI-AML2	NF	0.436	0.081	0.041	0.038	13	9
AML-193	NF	0.254	0.089	0.047	0.060	11	10
SIG-M5	NF	0.148	0.097	0.050	0.033	8	11
Kasumi-1	NF	NF	0.124	0.254	0.055	15	12
TF-1	NF	NF	0.129	0.065	0.064	16	13
Nomo-1	NF	0.063	0.133	0.084	0.066	4	14
KG-1a	NF	0.226	0.145	0.186	NF	10	15
UT-7	NF	NF	0.231	0.218	0.168	17	16
F36-P	NF	NF	0.335	0.252	0.229	18	17
MOLM-13	NF	0.916	0.368	0.156	0.079	14	18
OCI-AML3	NF	NF	0.896	0.971	0.418	19	19
THP-1	NF	NF	NF	NF	NF	20	20

[0470] 用一定剂量范围 (0至10μM) 的化合物1温育二十种人AML细胞系,如上文所述,对绿色对象 (经历凋亡的细胞) 随时间推移进行成像。如上文所述,从时间点12、24、48、72和96小时的计算AUC (曲线下面积) 确定平均EC₅₀值。显示了24和48小时时间点的根据EC₅₀值的细胞系排序。

[0471] 用化合物1温育的红色标记的急性骨髓性白血病细胞系组的细胞活力定量:使用IncuCyte Zoom活细胞成像评价十二种红色标记的细胞系亚组的化合物1对细胞活力随时间推移的作用。表10示出了时间点24、48、72和96小时的化合物1介导的AML细胞系的细胞活力减少的平均EC₅₀值。

[0472] 观察所有AML细胞系中化合物1引起的不同敏感性的细胞活力减少。由于除THP-1之外的所有细胞系在96小时具有至少一个成功的曲线拟合,因此该时间用于定义细胞系的相对敏感性。

[0473] ○七种细胞系 (AML-193、ML-2、HL-60、KG-1、NOMO-1、MV-4-11、OCI-AML2) 具有小于0.05μM的EC₅₀_{96小时} (范围为0.002至0.040); 这些细胞系归类为高敏感的,具有0.015μM的平均EC₅₀_{96小时}。AML-193是最敏感的细胞系,EC₅₀_{96小时}为0.002μM。

[0474] ○四种细胞系 (TF-1、THP-1、SIG-M5、OCI-AML3) 具有在0.05和0.20μM之间的EC₅₀_{96小时} (范围为0.058至0.186μM); 这些细胞系归类为中等敏感的,具有0.121μM的平均EC₅₀_{96小时}。

[0475] ○只有一种细胞系 (MOLM-13) 具有大于0.2μM的EC₅₀_{96小时} (EC₅₀_{96小时}为0.248μM)。该细胞系归类为低敏感的。

[0476] 表10: 化合物1对红色标记的急性骨髓性白血病细胞系中的细胞活力的作用的平

均 EC_{50} 值

[0477]

红色标记的 AML 细胞系	细胞活力的抑制 EC_{50} (μM)						
	24h	48h	72h	96h	48 小时的 排序	72 小时的 排序	96 小时的 排序
AML-193	0.010	0.004	0.003	0.002	1	1	1
ML-2	NF	NF	0.004	0.004	NR	2	2
HL-60	NF	0.009	0.007	0.006	3	3	3
KG-1	NF	0.007	0.007	0.007	2	3	4
NOMO-1	NF	0.019	0.017	0.017	4	5	5
MV4-11	NF	0.040	0.027	0.026	6	6	6
OCI-AML2	0.387	0.083	0.042	0.040	7	8	7
TF-1	NF	0.030	0.036	0.058	5	7	8
THP-1	NF	NF	NF	0.061	NR	NR	9
SIG-M5	NF	NF	0.156	0.178	NR	9	10
OCI-AML3	NF	NF	0.180	0.186	NR	10	11
MOLM-13	NF	0.143	0.208	0.248	8	11	12

[0478] 用一定剂量范围 (0至 $10\mu M$) 的化合物1温育十二种如上文所述建立的红色标记的人AML细胞系,如上文所述,对红色荧光或对象计数随时间推移进行成像。如上文所述,在时间点24、48、72和96小时确定细胞活力的 EC_{50} 。显示了48、72和96小时时间点的细胞系排序。

[0479] 结论.使用IncuCyte™动力学半胱天冬酶-3/7细胞凋亡测定进行评价化合物1对二十种急性骨髓性白血病 (AML) 细胞系组的细胞凋亡的作用的研究。另外,建立十三种红色标记的AML细胞系,以便使用IncuCyte™System定量总活细胞来评价化合物1对细胞活力的作用。研究的结论包括:

[0480] • 观察二十种AML细胞系中化合物1诱导的不同敏感性的细胞凋亡

[0481] ○八种细胞系 (HNT-34、Kasumi-3、HL-60、ML-2、MV4-11、KG-1、MUTZ-8、GDM-1) 定义为高敏感的,48小时的平均 EC_{50} 为 $0.027\mu M$ (范围为 0.004 至 $0.049\mu M$)。

[0482] ○七种细胞系 (OCI-AML-2、AML-193、SIG-M5、Kasumi-1、TF-1、Nomo-1、KG-1a) 定义为中等敏感的,48小时平均 EC_{50} 为 $0.114\mu M$ (范围为 0.081 至 $0.145\mu M$)。

[0483] ○五种细胞系 (UT-7、F36-P、MOLM-13、OCI-AML3、THP-1) 定义为低敏感的,UT-7、F36-P、MOLM-13和OCI-AML3的 EC_{50} 值在 0.231 至 $0.896\mu M$ 的范围内 (THP-1的 EC_{50} 大于 $10\mu M$)。

[0484] • 观察到所有AML细胞组中化合物1诱导的细胞凋亡的不同动力学。

[0485] ○在8种最敏感的细胞系中最早12小时观察到细胞凋亡反应 (对于具有曲线拟合的5种细胞系, $EC_{50_{12\text{小时}}}$ 的范围为 0.053 至 $0.227\mu M$)。

[0486] ○在72小时,20种细胞系中的19种对化合物1产生响应, $EC_{50_{72\text{小时}}}$ 和 $EC_{50_{96\text{小时}}}$ 分别在 0.003 至 $0.971\mu M$ 和 0.001 至 $0.418\mu M$ 的范围内。

[0487] ○只有THP-1细胞系在所有时间点具有大于 $10\mu M$ 的 EC_{50} 。

[0488] • 如通过细胞活力所测定,在十二种红色标记的AML细胞系亚组中还观察到对化合物1的不同敏感性。

[0489] ○七种细胞系 (AML-193、ML-2、HL-60、KG-1、NOMO-1、MV-4-11、OCI-AML2) 具有小于 $0.05\mu M$ 的 $EC_{50_{96\text{小时}}}$ (范围为 0.002 至 0.040);这些细胞系归类为高敏感的,具有 $0.015\mu M$ 的平均 $EC_{50_{96\text{小时}}}$ 。

[0490] o四种细胞系(TF-1、THP-1、SIG-M5、OCI-AML3)具有在0.05和0.20 μ M之间的EC50_{96小时}(范围为0.058至0.186 μ M);这些细胞系归类为中等敏感的,具有0.121 μ M的平均EC50_{96小时}。

[0491] o只有一种细胞系(MOLM-13)具有大于0.2 μ M的EC50_{96小时}(EC50_{96小时}为0.248 μ M)。该细胞系归类为低敏感的。

[0492] 实施例4:患有急性骨髓性白血病的供体的骨髓样品中的抗肿瘤活性

[0493] 患者样品:研究包括诊断为AML的18岁以上成年患者的骨髓(BM)样品。在两个不同批次中分析样品,第一批含有10名患者(给供体分配含有CG1的鉴别码),第二批包含其余20名供体(分配含有CG3的鉴别码)。第一批供体的临床数据提供于表11中。在撰写时未获得第二批20名患者样品的对应临床数据。

[0494] 表11:供体临床数据(CG1供体)

[0495]

	适应症	年龄	性别	治疗线	处理	临床反应
PM_CG1-001	AML	48	男	1	阿糖胞苷和伊达比星	未知
PM_CG1-002	AML	63	男	1	阿糖胞苷和伊达比星	部分反应
PM_CG1-003	AML	75	女	1	阿糖胞苷和氟达拉滨	耐受性
PM_CG1-004	AML	74	女	1	Hydrea	诱导疗法期间死亡

[0496]

	适应症	年龄	性别	治疗线	处理	临床反应
PM_CG1-005	AML	55	女	1	阿糖胞苷和伊达比星	未知
PM_CG1-006	AML	69	男	1	阿糖胞苷和氟达拉滨	未知
PM_CG1-007	AML	83	男	1	阿糖胞苷和氟达拉滨	诱导疗法期间死亡
	适应症	年龄	性别	治疗线	处理	临床反应
PM_CG1-009	AML	33	男	1	阿糖胞苷和伊达比星	未知
PM_CG1-010	AML	70	女	1	Ara-C+(伏拉塞替(Volasertib)与安慰剂)	未知
PM_CG1-013	AML	55	男	1	阿糖胞苷和伊达比星	未知

[0497] 实验研究设计:使用基于流式细胞术的平台(ExviTech)来评价和表征化合物1在三十名急性骨髓性白血病供体的骨髓样品的恶性细胞和正常淋巴细胞中的离体药理学(Bennett等人,Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2014年8月;14(4):305-318)。

[0498] 在第1天,接受供体样品。分离一小部分用于验证,大部分用培养基(罗斯威尔公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute,RPMI)1640)稀释,并接种于此以前以一定

范围的化合物1浓度制备的96孔板中。每个孔中接种的活白血病细胞数固定在8000和32,000之间,这取决于每个样品的白血病细胞的百分比。温育板24、48或96小时。根据正向散射(FSC)或侧向散射(SSC)以及不同表面标志物的表达或缺乏表达使用门控策略添加抗体抗D34、抗CD117、抗HLA-DR、抗CD45、抗CD14、抗CD64、抗CD13、抗CD11b)或膜联蛋白V以鉴定白血病细胞。进行单克隆抗体选择以优化每个样品中的白血病细胞鉴定。该分析的目的不是表型表征,而仅仅是鉴定这些细胞。因此,Euroflow (van Dongen等人,Leukemia 2012年9月;26(9):1908-1975)称为AML的“主要标志物”(CD34、CD45、CD117)和人白细胞抗原-DR(HLA-DR)的标志物包括在组合中。它们允许鉴定几乎90%AML患者中的白血病细胞。另外的组,CD34/CD14/CD64/CD45和CD34/CD11b/CD13/CD45,也用于完成骨髓白血病群体的鉴定。这允许选择用于明确鉴定每个特定样品中的病理细胞群体的两种最佳抗体。

[0499] 在不进行膜联蛋白V异硫氰酸荧光素(FITC)染色的情况下,通过它们被归类为高、中或低(例如, $FSC^{int/hi}/SSC^{int}$)的光散射性质来鉴定活白血病细胞。进行正向散射/侧向散射选择以排除碎片。在接受样品后细胞活力的平均百分比大于50%(如果活力大于50%,则仅处理样品)。在一些AML供体样品,可以对足够的正常、非肿瘤淋巴细胞计数,并且测定该细胞群体中化合物1的作用。通过CD45的明亮表达、 FSC^{low}/SSC^{low} 以及不存在骨髓标志物(CD117、CD11b和CD13)来鉴定非肿瘤淋巴细胞。

[0500] 所用的方法的详细描述此前已有所公开(Bennett等人,Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2014年8月;14(4):305-318)。简而言之,在来源医院在无菌条件下提取BM样品,并在提取的24小时内接受。初始分析评价病理细胞数及其活力。将不同体积的样品(1 μ L、3 μ L、5 μ L和7 μ L)一式两份转移到96孔板中。为了裂解红细胞,将180 μ L氯化铵裂解溶液(2g $KHCO_3$ 、16.58g NH_4Cl 、0.074g乙二胺四乙酸二钠 $2H_2O$ 和 H_2O ,调整至1L)加入每个孔。在4 $^{\circ}C$ 、10分钟温育期后,以1200rpm离心每个板5分钟,除去上清液。裂解步骤进行两次。为了分析,将20 μ L膜联蛋白V-FITC(Immunostep, Salamanca, Spain)、结合缓冲剂(BB;2.4g 4-[2-羟乙基]-1-哌嗪乙磺酸[HEPES]、8.19g $NaCl$ 、0.37g $CaCl_2$ 和 H_2O ,调整至1L)以及以下单克隆抗体(MoAb)的组合加入每个孔:CD117(克隆104D2)-PE(Becton Dickinson, San Jose, CA)、CD34(克隆581)-PerCP(BioLegend, San Diego, CA)、HLA-DR(克隆L243)-PB(BioLegend)和CD45(HI30)-PO(Life Technologies, Carlsbad, CA)(van Dongen等人,Leukemia 2012b9月;26(9):1899-1907)。在黑暗中室温下温育15分钟后,使用BB溶液进行洗涤步骤。将沉淀重悬于30 μ L BB中,用于在ExviTech平台中分析。然后计算细胞计数和活力,确定每孔使用的最佳样品体积。

[0501] 测定制备:用补充有20%(体积/体积)胎牛血清(Thermo Scientific, Waltham, MA)、2%HEPES、1%抗生素(Zell Shield, Labclinics, Barcelona, Spain)和2 μ M L-谷氨酰胺(Lonza, Hopkinton, MA)的RPMI 1640培养基稀释整个样品,得到60 μ L/孔的最终体积。使用Multidrop Combi Smart(Thermo Scientific, Waltham, MA)将混合物分配到含有化合物1的96孔板中。使用Echo 550移液器(LabCyte, Sunnyvale, CA)预先制备含有化合物1的板。对于化合物1,使用12个调整浓度(0.0016至40 μ M),以覆盖所有供体的活性范围。在30个供体样品中分析化合物1。在37 $^{\circ}C$ 下含有5% CO_2 的潮湿空气中温育板24、48和96小时。

[0502] 分离白细胞群体:为了在温育结束时制备分析样品,如上文所述,在相同的程序后裂解红细胞群体。然后,将20 μ L用于鉴定样品的白血病细胞群体的2个最佳MoAb(如此前所

确定)和膜联蛋白V-FITC的组合加入每个孔,并且在黑暗中室温下温育板15分钟。使用BB进行洗涤步骤,将沉淀重悬于20 μ L BB中,用于在ExviTech平台中分析。

[0503] ExviTech平台:这种新型基于流式细胞术的系统包括CyAn高级数字处理细胞仪(Beckman Coulter,Brea,CA)和终点采样器(EPS)板处理器(Saryna Technologies, San Diego,CA)。EPS吸出测定板的每个孔的内容物,并将内容物递送至细胞仪的流动池中。每个96孔测定板以单个流式细胞术标准(.fcs)文件从CyAn细胞仪收集。在与细胞仪相同的计算机运行EPS,记录每个板的第二文件。通过专有软件程序FCS Analyzer(Saryna Technologies)将该计时文件与用于数据分析的.fcs文件整合。该程序设计为将从细胞仪获得数据分离到特定的组,并将孔数分配给每个组。然后以单个文件分析每个96孔板,每个孔可根据需要单独检验。

[0504] 流式细胞术数据分析:使用Summit软件(Beckman Coulter)进行初始分析。根据FSC/SSC和不同MoAb标志物的表达或缺乏表达使用门控策略进行病理细胞的鉴定。以具有化合物的孔中活细胞数与具有单独媒介物的对照孔的差异测定剔除。因此,一旦鉴定病理细胞亚组,即可将膜联蛋白V和适当的FSC/SSC用于排除垂死细胞,以及仅测定与对照孔相比,药物孔中的活细胞数(Koopman等人,Blood 1994年9月1日;84(5):1415-1420)。另外,FSC和SSC的变化有助于鉴定和废弃坏死细胞,因此认为碘化丙啶的使用是不必要的。一旦获得上述参数,即可使用FCS分析仪定量每个单独浓度对样品的影响。

[0505] 数据分析:获得单个数据点并用于计算 EC_{50} 和 E_{max} 。使用四参数逻辑模型(S形剂量响应模型,IDBS XLfit)确定拟合参数:

[0506] $y = (A + ((B - A) / (1 + ((x/C)^D))))$

[0507] $A = Y_{min}$

[0508] $B = Y_{max}$

[0509] $C = EC_{50}$

[0510] $D = \text{斜率因子}$

[0511] $Y = \text{细胞计数相对于阳性对照的百分比}$

[0512] 使用Activity Base XE(IDBS)处理和评价所有抑制曲线。在不能通过实验确定平台的情况下,将Activity Base XE返回的推导 EC_{50} 值更改为NC(未计算)。在原始数据噪声太大而不符合预期S形几何图形的情况下,将Activity Base XE返回的拟合参数更改为NC。

[0513] 活性面积通过曲线下面积(AUC;从XLfit公式计算: $xf4_AreaXStartXEnd(<fit\ cell>,<min\ conc>,<max\ conc>)$)除以总理论面积(浓度范围和最大理论抑制围绕的矩形: $Max\ Inhibition * (max\ conc - min\ conc)$)的百分比来计算。因此,无活性化合物的活性面积大(其中所有点接近100),而活性化合物的小。

[0514] 通过从100%减去拟合参数 Y_{min} 来计算 E_{max} ,据此最大功效(完全剔除白血病细胞)为100%(例如, $Y_{min} = \text{零}$)。

[0515] 利用R统计学程序(<http://www.R-project.org>)生成AUC数据的热图的分级群聚。使用平均连锁法生成柱侧树状图,根据每个时间点内的标准化AUC数据计算样品之间的欧几里德(Euclidean)距离。热图以原始比例显示AUC数据并以红色/绿色方案着色;即,红色表示AUC较大,绿色表示AUC较小。

[0516] 使用配对双尾Student t检验确定肿瘤与淋巴细胞的AUC之间的差异的统计学显

著性。

[0517] 结果

[0518] 评价30个新鲜(从骨髓提取的培养时间<24小时)AML骨髓样品中化合物1在24、48和96小时的作用(表12)。对于这些测定,在不分离的情况下离体培养骨髓样品以维持骨髓微环境(基质、红细胞、免疫细胞、血清蛋白等),而不是培养分离的白细胞。当已经发生化合物1诱导的抗增殖作用时,仅在温育后分离白细胞。此时,使用AML的“主要”抗体标志物通过流式细胞术鉴定白血病和正常细胞群体(van Dongen等人,Leukemia 2012年9月;26(9):1908-1975),使用这些细胞的光散射性质和膜联蛋白V染色建立这些群体的百分比活力。有趣的是,30个患者样品中的26个对化合物1敏感,其中化合物显示出仅在4个供体中功效降低,其中大部分白血病细胞在24和48小时后仍然存活。敏感患者样品组中化合物1的平均 EC_{50} 在全部三个时间点为21nM(范围为2至160nM)(表12),化合物1的离体功效是时间和浓度依赖性的(表12)。四个归类为不敏感的患者样品中的三个显示出 EC_{50} 值大于敏感样品,并且全部四个样品一致地显示出功效降低,如在24和48小时不能剔除超过68%的白血病母细胞所测定。在敏感患者样品中,快速和高效地杀死白血病细胞;化合物1在24小时能够剔除平均>82%的白血病细胞,在48小时能够剔除>92%,在96小时能够剔除>98%。值得注意的是,在全部时间点,与肿瘤细胞中观察到的作用相比,化合物1对正常淋巴细胞的抗增殖作用显著降低(2至5倍),表明化合物1具有肿瘤特异性活性(图31)。在足够的正常淋巴细胞可以计数的患者样品中,从24至96小时 E_{max} 的平均值为46%至76%。

[0519] 表12

[0520]

供体 ID	细胞系 (活)	温育时间 (小时)	活性面积	EC_{50}	E_{max}	曲线斜率	r^2
PM_CG1_001	白血病	24	11.4	0.003	88.6	-1.159	0.991
		48	0.0	<0.00168	100.0	-3.235	0.995
		96	0.1	0.006	100.0	-1.231	0.977
	淋巴	24	41.5	0.020	58.6	-1.324	0.953
PM_CG1_002	白血病	24	19.3	0.076	81.0	-1.662	0.956
		48	3.1	0.021	97.0	-3.239	0.988
		96	0.1	0.006	100.0	-1.231	0.977
	淋巴	24	39.0	NC	82.5	-0.267	0.888
		48	20.6	0.033	79.5	-1.564	0.985
		96	10.2	0.019	89.9	-1.499	0.986
PM_CG1_003	白血病	24	16.4	0.013	83.7	-1.308	0.969
		48	0.1	<0.00168	99.9	-2.990	0.885
		96	0.0	<0.00168	100.0	-5.030	1.000
PM_CG1_004	白血病	24	18.3	0.013	81.8	-5.375	0.959
		48	7.3	0.002	92.7	-2.025	0.986
		96	2.0	0.009	98.0	-15.474	0.869
	淋巴	24	36.3	0.019	63.7	-1.640	0.936

[0521]

供体 ID	细胞系 (活)	温育时间 (小时)	活性面 积	EC ₅₀	E _{max}	曲线斜率	r ²
		48	34.3	0.031	66.0	-1.136	0.958
		96	22.2	0.031	77.9	-1.568	0.951
PM_CG1_005	白血病	24	2.9	0.019	97.1	-3.170	0.926
		48	0.3	0.007	99.8	-5.116	0.996
		96	0.1	0.006	99.9	-5.522	0.986
	淋巴	24	60.8	0.089	39.5	-1.166	0.901
		48	42.3	0.032	58.4	-0.778	0.933
		96	19.0	0.033	81.5	-1.016	0.988
PM_CG1_006	白血病	24	10.2	0.095	90.3	-1.504	0.926
		48	4.1	0.045	96.0	-2.219	0.996
		96	0.1	0.018	100.0	-2.709	0.977
	淋巴	24	52.3	0.149	48.8	-0.996	0.843
		48	31.1	0.061	69.1	-1.621	0.988
		96	17.3	0.045	83.0	-1.524	0.977
PM_CG1_007	白血病	24	5.3	0.033	94.8	-2.382	0.988
		48	0.3	0.014	99.8	-2.033	0.997
		96	0.0	0.008	100.0	-3.035	0.996
PM_CG1_009	白血病	24	5.1	0.036	95.0	-2.170	0.916
		48	0.7	0.012	99.3	-3.125	0.997
		96	0.2	0.011	99.9	-77.488	0.910
	淋巴	24	92.8	>40.00000	7.2	-18.660	0.055
		48	59.7	0.125	40.5	-1.834	0.863
		96	54.1	0.037	46.0	-1.549	0.849
PM_CG1_010	白血病	24	7.3	0.016	92.7	-2.446	0.960
		48	2.2	0.010	97.8	-2.554	0.995
		96	0.0	0.006	100.0	-2.090	0.924
	淋巴	24	35.7	0.060	64.7	-1.255	0.933
		48	24.2	0.043	76.0	-1.509	0.988
		96	18.2	0.046	82.0	-1.619	0.900
PM_CG1_013	白血病	24	72.7	0.236	28.1	-1.018	0.654
		48	43.7	0.010	56.3	-2.127	0.903
	淋巴	24	53.8	0.142	47.9	-0.809	0.821
		48	31.0	0.046	69.4	-1.108	0.972
		96	29.3	0.024	70.9	-1.266	0.981
PM_CG3_001	白血病	24	49.8	0.162	64.3	-2.142	0.835
		48	9.9	0.028	96.1	-1.456	0.920
		96	2.1	0.010	98.8	-24.306	0.855
	淋巴	24	74.7	>1.00000	25.9	-8.855	0.745
		48	50.3	0.005	50.1	-1.974	0.878
		96	9.6	0.006	91.5	-1.610	0.950
PM_CG3_002	白血病	24	37.3	0.140	86.7	-1.117	0.982
		48	15.6	0.047	95.3	-1.255	0.954
		96	14.8	0.034	89.7	-1.961	0.916
	淋巴	24	59.5	0.069	47.5	-1.304	0.974

[0522]

供体 ID	细胞系 (活)	温育时间 (小时)	活性面 积	EC ₅₀	E _{max}	曲线斜率	r ²
		48	37.3	0.055	69.4	-1.668	0.979
		96	13.1	0.019	94.5	-0.961	0.983
PM_CG3_003	白血病	24	17.3	0.010	83.9	-2.358	0.987
		48	6.7	0.006	94.2	-1.961	0.892
		96	1.5	0.003	98.9	-3.149	0.970
	淋巴	24	31.4	0.007	69.5	-1.630	0.871
		48	48.5	0.054	58.6	-1.294	0.954
		96	44.3	0.043	58.6	-2.915	0.940
PM_CG3_004	白血病	24	31.5	0.074	78.2	-1.727	0.950
		48	32.9	0.024	68.7	-12.529	0.886
		96	7.4	0.004	93.0	-3.768	0.990
	淋巴	24	76.4	0.514	52.5	-0.815	0.278
		48	89.9	>1.00000	10.1	-10.634	0.096
		96	50.6	0.085	56.5	-2.000	0.889
PM_CG3_005	白血病	24	97.5	>1.00000	2.5	-10.354	0.095
		48	77.6	>1.00000	24.4	-3.125	0.837
		96	35.5	0.158	98.3	-0.804	0.923
	淋巴	24	98.4	>1.00000	14.4	-0.789	0.008
		48	63.3	0.043	38.7	-3.025	0.963
		96	41.8	0.079	69.5	-1.324	0.873
PM_CG3_006	白血病	24	20.7	0.038	83.1	-2.907	0.961
		48	8.9	0.013	92.4	-3.571	0.982
		96	0.0	0.009	100.0	-2.476	0.900
	淋巴	24	56.6	0.058	46.1	-11.538	0.877
		48	39.0	0.026	63.4	-2.100	0.935
PM_CG3_007	白血病	24	21.5	0.054	83.4	-3.334	0.817
		48	11.5	0.016	89.9	-5.729	0.913
		96	1.4	0.010	99.6	-17.270	0.947
PM_CG3_008	白血病	24	62.7	0.003	37.5	-3.305	0.626
		48	35.0	0.002	65.2	-15.864	0.671
		96	6.6	0.002	93.6	-11.949	0.954
PM_CG3_009	白血病	24	44.1	0.012	60.8	-0.788	0.615
		48	20.5	0.008	80.3	-2.763	0.895
		96	2.5	0.005	98.0	-3.071	0.887
	淋巴	24	60.4	NC	39.9	-0.675	0.404
		48	33.2	0.028	69.4	-2.430	0.848
		96	27.9	0.011	98.1	-0.071	0.735
PM_CG3_010	白血病	24	19.6	0.019	83.1	-1.760	0.723
		48	2.0	0.010	99.2	-3.798	0.958
		96	0.8	0.005	99.7	-4.131	0.943
	淋巴	96	36.7	0.041	67.9	-1.725	0.784
PM_CG3_011	白血病	24	22.4	0.020	79.4	-2.601	0.763
		48	16.5	0.006	84.0	-6.595	0.914
		96	0.4	0.003	100.0	-2.354	0.978

[0523]

供体 ID	细胞系 (活)	温育时间 (小时)	活性面 积	EC ₅₀	E _{max}	曲线斜率	r ²
PM_CG3_012	白血病	24	20.0	0.006	80.6	-2.043	0.942
		48	3.8	0.004	96.5	-14.201	0.953
		96	0.6	0.003	99.8	-5.893	0.972
PM_CG3_013	白血病	24	24.3	0.029	88.2	-0.496	0.844
		48	31.8	0.013	69.3	-3.620	0.902
		96	5.7	0.005	95.2	-1.717	0.894
	淋巴	24	85.6	0.001	14.5	-3.108	0.798
PM_CG3_014	白血病	24	59.1	0.083	46.9	-1.518	0.487
		48	50.4	NC	67.7	-0.343	0.806
PM_CG3_015	白血病	24	42.1	0.017	59.2	-2.563	0.940
		48	19.2	0.010	81.8	-3.262	0.988
		96	4.9	0.003	95.5	-3.611	0.985
	淋巴	24	48.4	0.009	55.0	-0.820	0.873
		48	62.5	0.025	38.5	-58.188	0.753
		96	43.4	0.042	72.9	-0.608	0.859
PM_CG3_016	白血病	24	41.5	0.114	71.4	-1.739	0.713
		48	19.4	0.037	91.2	-0.975	0.805
	淋巴	24	48.5	0.039	54.1	-2.748	0.930
PM_CG3_017	白血病	24	36.0	0.004	64.3	-2.073	0.596
		48	7.0	0.004	93.4	-8.659	0.851
		96	1.0	0.004	99.4	-19.697	0.784
	淋巴	24	63.7	0.017	36.9	-5.102	0.595
		48	32.8	0.025	94.7	-0.334	0.741
		96	24.4	0.015	81.4	-0.910	0.702
PM_CG3_018	白血病	24	2.6	0.007	98.1	-4.420	0.989
		48	0.7	0.004	99.7	-28.795	0.968
		96	0.6	0.002	99.6	-5.245	0.947
PM_CG3_019	白血病	24	5.3	0.010	95.7	-58.957	0.926
		48	1.3	0.008	99.6	-3.825	0.934
		96	1.1	0.004	99.3	-19.174	0.901
PM_CG3_020	白血病	24	13.4	0.006	87.3	-2.826	0.975
		48	3.3	0.003	97.1	-4.320	0.965
		96	1.5	0.003	98.7	-7.081	0.932

[0524] 图31提供了急性骨髓性白血病骨髓样品中肿瘤与正常淋巴细胞的活性面积的比较分析。在图中,活性面积值整合了效力(EC₅₀)和功效(E_{max}):活性面积越小,治疗的效力和功效越大。使用配对双尾Student t检验确定肿瘤与淋巴细胞的AUC之间的差异的统计学显著性。误差棒表示标准偏差。

[0525] 结论.在从30名AML患者获得的样品组中测试化合物1。将患者诊断期间获得的骨髓(BM)抽吸物在不分离组成细胞的情况下接种,并根据公开的程序在24、48和96小时测试敏感性(Bennett等人,Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2014年8月;14(4):305-318)。对于护理剂标准,该测试显示出与临床敏感性非常相关。化合物1的离体功效是时间和浓度依赖性的,显示出在30个患者样品中的26个具有强大活性,所述样品使用在全部三个时间点诱导21nM的50%的最大反应(EC₅₀) (范围为2至160nM)所需的平均浓度进行测试。四个归类为不

敏感的患者样品中的三个显示出 EC_{50} 值大于敏感样品,并且全部四个样品一致地显示出功效降低,如在24和48小时不能剔除超过68%的白血病母细胞所测定。在敏感患者样品中,快速和高效地杀死白血病细胞,因为在24小时剔除平均大于82%的白血病细胞;在48小时剔除>92%的白血病细胞,在96小时剔除>98%的白血病细胞。在足够的正常淋巴细胞可以计数的患者样品中,化合物1的活性显著较小,仅对正常细胞具有中等功效(从24至96小时, E_{max} [最大可能效果]平均值为46%至76%),并且显示出白血病和正常细胞之间的效力差异为2至5倍。

[0526] 实施例5:化合物1对造血祖细胞的作用的体外评价

[0527] 实验设计:使用人骨髓(BM) CD34+细胞来评价化合物1诱导的BM毒性的潜力。为了测试化合物1对造血祖细胞的功能的作用,通过将BM CD34+细胞接种于MethoCult培养基上来进行集落形成测定。将细胞直接用化合物1接种于MethoCult中或在具有化合物1的液体培养基中培养2、4或8小时,然后接种于无化合物的MethoCult中,以评价不同暴露时间的作用。通过流式细胞术分析化合物1诱导的HSC的早期细胞凋亡。

[0528] 结果.在STEMvision上对暴露于化合物1或DMSO的培养物中的常见粒细胞/红细胞/单核细胞/巨核细胞的集落形成单位(CFU) (CFU-GEMM)、粒细胞/单核细胞的CFU (CFU-GM)、红细胞的爆发型集落形成单位(BFU-E)和红细胞的CFU (CFU-E) 评分。四个正常BM供体中的每个的每种病症的绝对数如表13-16所示。

[0529] 表13:在供体HD10的集落形成测定中化合物1对粒细胞、单核细胞和/或红细胞祖细胞的作用

	集落数											
	DMSO		7.4 nM 化合物 1		22.2 nM 化合物 1		67 nM 化合物 1		200 nM 化合物 1		600 nM 化合物 1	
[0530] CFU-GEMM	2	4	4	2	2	0	5	1	0	0	0	0
CFU-GM	81	77	82	74	71	80	48	61	0	2	0	0
BFU-E	33	35	40	36	24	24	26	20	5	1	2	0
CFU-E	0	0	2	2	0	0	0	0	3	1	0	0

[0531] 表14:在供体HD14的集落形成测定中化合物1对粒细胞、单核细胞和/或红细胞祖细胞的作用

	集落数											
	DMSO		7.4 nM 化合物 1		22.2 nM 化合物 1		67 nM 化合物 1		200 nM 化合物 1		600 nM 化合物 1	
[0532] CFU-GEMM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CFU-GM	20	10	15	12	16	15	6	4	0	0	0	0
BFU-E	22	9	23	18	14	18	3	6	3	1	0	2
CFU-E	3	0	6	0	7	0	4	4	2	1	2	0

[0533] 表15:在供体HD18的集落形成测定中化合物1对粒细胞、单核细胞和/或红细胞祖细胞的作用

	集落数											
	DMSO		7.4 nM 化合物 1		22.2 nM 化合物 1		67 nM 化合物 1		200 nM 化合物 1		600 nM 化合物 1	
[0534] CFU-GEMM	4	2	2	4	1	1	0	0	0	0	0	0
CFU-GM	57	57	59	73	55	62	2	6	0	0	0	0
BFU-E	34	27	22	31	12	13	8	6	1	1	0	2
CFU-E	6	5	0	2	7	1	3	0	2	3	1	1

[0535] 表16:在供体HD19的集落形成测定中化合物1对粒细胞、单核细胞和/或红细胞祖细胞的作用

	集落数											
	DMSO		7.4 nM 化合物 1		22.2 nM 化合物 1		67 nM 化合物 1		200 nM 化合物 1		600 nM 化合物 1	
[0536] CFU-GEMM	4	2	4	4	0	1	0	1	0	0	0	0
CFU-GM	47	46	44	70	34	35	4	5	0	0	0	0
BFU-E	40	35	34	42	50	38	4	9	1	3	6	0
CFU-E	2	4	9	4	4	5	6	3	1	3	1	1

[0537] 正如预期的那样,CFU-GEMM和CFU-E集落数非常小,只有CFU-GM和BFU-E的百分比可用于 IC_{50} 计算(图32)。CFU-GM的抑制的 IC_{50} 值的幅度在供体中具有可比性。BFU-E的抑制的 IC_{50} 值的幅度在供体中具有可比性,但供体D19的BFU-E的 IC_{50} 例外,对于其他三个供体,该值非常小。

[0538] 将正常供体的骨髓CD34+细胞与化合物1一起在MethoCult培养基中温育。使用STEMVision自动化集落计数仪和软件对CFU-GM和BFU-E祖细胞的集落数计数,并归一化为DMSO对照的集落数。结果以DMSO对照的百分比与化合物1的浓度绘制,用于确定 IC_{50} 值。数据以n=3次技术重复的平均值±平均值的标准误差显示。供体为HD10、HD14、HD18和HD19。

[0539] 通过流式细胞术测定2、4和8小时的化合物1暴露后的早期细胞凋亡。在这些早期时间点化合物1诱导的细胞凋亡的标志,通过膜联蛋白V阴性细胞的百分比来测定,在最高600nM的化合物1浓度下不明显。在HSC (CD34+/CD38-) 和HPC (CD34+/CD38+) 中观察到类似的趋势(表17-20)。该研究中未评价长期暴露对HSC和HPC群体的潜在作用。

[0540] 表17:供体HD8的CD34阳性/CD38阴性活细胞的百分比

化合物 1 的浓度 (nM)	CD34 阳性/CD38 阴性活细胞(供体 8)的百分比			
	暴露时间			
	2 小时		4 小时	
[0541] 0	92.23		89.75	
7.4	90.76		86.62	
22.2	91.58		85.25	
67	89.08		86.7	
200	87.54		87.28	
[0542] 600	88.53		87.28	
			76.52	

[0543] 表18:供体HD8的CD34阳性/CD38阳性活细胞的百分比

化合物 1 的浓度 (nM)	CD34 阳性/CD38 阳性活细胞(供体 8)的百分比		
	暴露时间		
	2 小时	4 小时	8 小时
0	94.74	96.82	88.39
7.4	93.97	95.2	86.63
22.2	94.59	90.58	87.98
67	91.28	92.96	84.53
200	89.66	92.97	86.63
600	89.83	91.4	84.28

[0545] 表19: 供体HD9的CD34阳性/CD38阴性活细胞的百分比

化合物 1 的浓度 (nM)	CD34 阳性/CD38 阴性活细胞(供体 9)的百分比		
	暴露时间		
	2 小时	4 小时	8 小时
0	88.68	87.31	83.93
7.4	90.39	88.17	77.71
22.2	89.97	88.84	75.31
67	89.34	88.3	71.7
200	88.75	89.04	70.69
600	88.83	88.33	70.81

[0547] 表20: 供体HD9的CD34阳性/CD38阳性活细胞的百分比

化合物 1 的浓度 (nM)	CD34 阳性/CD38 阳性活细胞(供体 9)的百分比		
	暴露时间		
	2 小时	4 小时	8 小时
0	92.48	92.38	92.4
7.4	92	92.52	87.38
22.2	90.41	94.48	87.5
67	90.17	93.34	83.86
200	89.24	93.44	84.26
600	88.98	91.69	82.42

[0549] 虽然在2、4或8小时时间点未检测到早期细胞凋亡,但是相同细胞的集落形成测定显示在8小时的化合物1暴露后BFU-E和CFU-GM生长受损。在大于80nM的浓度下,集落数减少超过50%。然而,效果小于当化合物1在整个14天温育期维持在MethoCult培养基中,不进行化合物冲洗(连续条件)时观察的那些。

[0550] 使用供体HD46、HD47、HD48和HD50的样品进一步研究化合物1对造血祖细胞的作用。在 ≥ 111 nM的化合物1浓度下8小时暴露后BFU-E集落数减少超过50% ($p < 0.01$ 和 0.001),单独IC₅₀值在30至150nM的范围内。对于四个供体,8小时的1000nM化合物1暴露所形成的CFU-GM集落数的减少在31%至46%的范围内 ($p < 0.01$),对于333nM化合物1在22%至46%的范围内 ($p < 0.05$) (图33A-C)。结果示出了四个供体的平均值;误差棒表示(SEM)的标准误差。

[0551] 图33A和33B提供了分别用化合物1在Iscove培养基中预温育骨髓CD34⁺细胞4或8小时后,然后在无化合物1的MethoCult培养基中温育14天的集落数。图33C提供了骨髓CD34⁺细胞在MethoCult培养基中在持续存在化合物1的情况下温育14天后的集落数。在暴露于化合物1整个14天温育期的样品中在 ≥ 111 nM的浓度下骨髓和红细胞集落数明显减少。

[0552] 结论. AML的诱导疗法的目的是实现完全缓解(CR)。CR的定义是外周血中的中性粒细胞大于 1×10^9 个细胞/L,骨髓母细胞小于5%,且不存在髓外病的迹象。施用化学疗法以“清空”所有造血细胞(良性和恶性)的骨髓,允许存活的造血干细胞(HSC)用正常细胞重新填充骨髓,从而得到缓解。

[0553] 在四个健康供体的CD34+细胞中,使用标准化集落形成测定进行造血祖细胞中化合物1的毒性评价。观察粒细胞-单核细胞和红细胞祖细胞的抑制, IC_{50} 值分别为82nM至135nM和32nM至131nM。

[0554] 使用四种不同供体的细胞,还分析了化合物1的不同暴露时间的反应。当暴露于该化合物的时间长度减少时,化合物1的毒性也减弱。在8小时,效果的强度降低,但在4小时,无效果。在连续单剂量暴露后毒性最大。细胞凋亡的标志,通过膜联蛋白V流式细胞术测定,在CD34+/CD38-造血干细胞(HSC)或CD34+/CD38+造血祖细胞(HPC)中化合物1的测试浓度下(最高600nM)在2、4或8小时不明显。

[0555] 这些数据表明,当暴露的剂量和时间减少时,可有效控制化合物1对造血祖细胞的毒性。

[0556] 实施例6:化合物1对中性粒细胞成熟的作用-离体健康骨髓祖细胞

[0557] 由于这些祖细胞在药物诱导的中性粒细胞减少症中的作用,化合物1对CFU-GM祖细胞增殖的作用是特别相关的。中性粒细胞来源于CFU-GM祖细胞,其出现在不同的阶段,从祖细胞至原粒细胞(I期)、早幼粒细胞(II期)和中幼粒细胞(III期),最终成熟为具有分带或分段细胞核的中性粒细胞。通过使用祖细胞的二维培养然后是流式细胞术来确定化合物1对中性粒细胞成熟的作用。将从健康志愿者获得的骨髓CD34+细胞转移到组织培养基,通过添加干细胞因子(SCF)、Fms相关酪氨酸激酶3配体(Flt-3配体)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)来离体诱导骨髓分化。选择最多30nM的化合物1浓度和从第0天开始8、24和72小时的暴露时间来评价该系统中化合物1的作用。在暴露至化合物1后,洗涤细胞,然后在不存在化合物1的情况下在培养基中温育直到第14天。在培养的第3、7、10和14天通过基于流式细胞术的方法测定细胞分化和细胞凋亡,细胞凋亡和死细胞鉴定为膜联蛋白V阳性和7-氨基放线菌素D阳性。结果显示,当细胞暴露于化合物24小时和72小时时,活力仅在测试的最高化合物1浓度(30nM)下降低(图34)。

[0558] 在图34中,用30nM化合物1或DMSO温育健康供体的骨髓C34+细胞。在8、24或72小时后冲洗化合物1,更换培养基,在不存在化合物1或DMSO的情况下温育培养物直到第14天。细胞根据它们的CD34、CD33和CD11b表达从最不成熟至最成熟归类为HPC、I期、II期、III期和IV期。然后将各期凋亡细胞鉴定为膜联蛋白V阳性,并标记为AV+HPC、AV+I期、AV+II期、AV+III期和AV+IV期。对于每个化合物1暴露期(8小时、24小时和72小时), $N=1$ 。示出了两个评价健康供体之一的骨髓祖细胞的代表性结果。在24小时和72小时暴露组中在 ≤ 3 nM化合物1的浓度下,或0.03至30nM的任何浓度的化合物1在8小时的暴露时间内活力不降低。在除去化合物1后,培养物中的细胞活力增加,达到暴露于化合物1达24小时的培养物在第10天的对照值。在暴露于化合物1达72小时的培养物中,细胞活力从9.6%增加至30%(供体1)以及从13%增加至44%(供体2)。在24或72小时暴露后30nM化合物1下的细胞凋亡影响骨髓分化的所有期,但存活细胞能够增殖并完全成熟为正常中性粒细胞(图34)。

[0559] 血细胞生成研究汇总:总之,这些数据表明,化合物1加入健康供体骨髓的离体培

养物通过诱导细胞生长延缓或停滞来引起粒细胞-单核细胞和红细胞集落的形成减少/延缓。在最多8小时处理后冲洗化合物1时,对祖细胞的抑制性生长大大减少,表明化合物1处理的剂量计划策略应允许造血干细胞和祖细胞存活,减少体内产生血液毒性的可能性。通过分析中性粒细胞发育期间的祖细胞群体进一步研究化合物1对祖细胞分化的作用。化合物1的长期处理(最多72小时)通过诱导一部分细胞的凋亡来影响中性粒细胞分化的所有期;然而,存活的细胞能够增殖和完全成熟为正常中性粒细胞。这些结果表明了设计化合物1的给药策略的可能性,化合物1是在AML细胞系和AML患者母细胞中诱导强烈细胞凋亡、消除肿瘤细胞的化合物,但容许一部分正常造血干/祖细胞,并允许中性粒细胞减少症逆转。

[0560] 实施例7:化合物1对MDS样品的体外活力的作用

[0561] 方法.在体外液体培养基中以及通过集落测定来测定化合物1对高风险MDS样品的作用,以便更好地定义其对干/祖细胞的作用。在补充有hLDL (40 μ g/mL)、SCF (50ng/mL)、FLT3L (50ng/mL)、IL-3 (10ng/mL)、IL-6 (25ng/mL)和TPO (100ng/mL) (所有均购自Peprotech)的细胞Gro培养基(GellGenix)中体外培养高风险MDS患者的骨髓单个核细胞(BMMC)。在培养期间,使细胞暴露于不同浓度的化合物1 (37、111、333和1000nM)或DMSO对照。在24小时后,洗涤细胞两次以除去化合物,并维持培养物最多一周,在第1、3和7天进行活细胞计数。在化合物冲洗后,根据情况收集105个细胞用于集落形成测定,并对另外105个细胞染色,用于胞内流式细胞术。

[0562] 对于集落形成测定,将细胞接种于Methocult培养基(Stem Cell Technologies)中,在37 $^{\circ}$ C下温育14天,使用StemVision(Stem Cell Technologies)通过自动计数评分。

[0563] 对于细胞凋亡的胞内流式细胞术测定,将细胞固定在1.6%多聚甲醛中,在冰冷的甲醇中透化,使用FITC缀合的抗活性半胱天冬酶3抗体(Becton Dickinson)进行染色。使用FACSCanto II流式细胞仪(Becton Dickinson)进行流式细胞术数据获取。使用Infinicyt软件(Cytognos)分析流式细胞术标准(FCS)文件。

[0564] 结果.如图35A所示,在暴露于化合物1的浓度24小时后,活细胞数以剂量依赖性方式显著减少,该作用维持至少一周。如半胱天冬酶3活化所确认,对MDS细胞的该作用通过细胞凋亡的诱导来介导(图35B)。如集落形成分析所测定,化合物1的作用在MDS祖细胞中更强烈(图35C)。

[0565] 结论.化合物1在MDS样品中诱导细胞数减少。该作用由半胱天冬酶3的活化介导。化合物1也可有效地减少MDS祖细胞。该数据显示化合物1对MDS样品具有抗增殖和细胞凋亡作用。

[0566] 实施例8:化合物1对MDS患者样品的细胞存活和自我更新的作用

[0567] 方法.将稳定表达人白介素-3(IL-3)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和干细胞因子(SCF)的小鼠基质细胞SL/M2培养至汇合,然后进行 γ -照射。然后,将从3名高风险MDS患者(HR-MDS)、3名MDS产生的继发性AML患者(sAML)和5名年龄匹配健康供体分离的人CD34+骨髓细胞与失活的SL/M2细胞一起培养一周。然后,通过FACS定量人祖细胞,将细胞接种于甲基纤维素中,用于集落形成测定(细胞存活测定)。在两周后,从每种疾病挑取20-25个集落,重悬和再接种于新鲜甲基纤维素中,用于第2轮集落形成测定(细胞自我更新测定)。

[0568] 结果.在集落形成测定中(图36A),化合物1在HR-MDS、sAML和正常骨髓祖细胞中诱导显著的细胞毒性。与正常骨髓祖细胞相比,10nM和100nM的化合物1往往更特异性地抑制

HR-MDS和AML祖细胞的细胞存活。在集落再接种测定中(图36B),与正常骨髓祖细胞相比,1nM和10nM的化合物1更显著地减少sAML和HR-MDS祖细胞的自我更新。

[0569] 结论. 化合物1抑制sAML和HR-MDS细胞的生长。示出了对正常骨髓祖细胞的作用减少的治疗窗口。

[0570] 实施例9:急性骨髓性白血病异种移植小鼠模型中化合物1的抗肿瘤活性

[0571] 在本研究中,研究化合物1在HL-60IV AML异种移植模型中的抗肿瘤活性。在该模型中,将HL-60人AML细胞移植到宿主BM和内部器官(例如,脾脏、肝脏),动物患上进行性外周白细胞增多症。通过尾静脉注射给雌性严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠接种HL-60细胞。为了理解化合物1对异种移植的HL-60细胞的作用,在移植后第3周和第4周之间给动物腹腔注射(IP)媒介物或化合物1(0.5、1、2.5和5mg/kg)每日一次(QD) x5 (AP6516,存活研究),或在移植后第6周和第8周之间给动物IP注射媒介物或化合物1每日两次(BID)持续5或10个连续天(5mg/kg BIDx5或2.5mg/kg BIDx10)(研究AP6982,BM中的%人CD33+[hCD33+]细胞)。

[0572] 存活研究

[0573] 在肿瘤细胞接种后第7周通过荧光活化细胞分选(FACS)评估具有HL-60的动物的外周血的肿瘤负荷。与媒介物对照组相比,未观察到任何化合物1治疗组的对肿瘤负荷的影响。媒介物对照组从第54天开始,而化合物1治疗组在第51天和第57天之间开始,媒介物对照和化合物1治疗组的小鼠死于疾病负荷。未观察到化合物1治疗组的总体存活有益效果。2.5mg/kg化合物1治疗组的一只小鼠(1/8)存活至第162天研究结束。阳性对照氟达拉滨显著延长了存活期(中位数存活期76天,而媒介物对照组为67.5天; $p<0.05$)。

[0574] 骨髓中的HL-60肿瘤细胞

[0575] 由于在第3周治疗的5个连续天后的HL-60存活研究中未观察到化合物1治疗的活性,因此将实验设计为考察更接近治疗时间的终点。在本研究中,研究不同的化合物1给药计划(5mg/kg BIDx5个连续天,与2.5mg/kg BIDx10个连续天),同时维持施用药物的总量恒定。用5%N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)/45%PEG 400/50%盐水治疗媒介物对照动物。在接种后6周开始治疗。媒介物和化合物1治疗组在治疗开始后第7天(在5mg/kg每天两次[BID]化合物1的5个连续天后)或第11天(在2.5mg/kg BID化合物1的10个连续天后)终止。研究的主要终点是通过FACS分析BM中hCD33+/CD45+细胞的百分比。另外的终点包括细胞活力、体重和BM组织学。

[0576] 使用人特异性抗体通过FACS分析将股骨骨髓样品的HL-60细胞鉴定为CD33+/CD45+。BIDx5和BIDx10组的媒介物治疗的动物的BM中人CD33+/CD45+细胞的百分比分别为 $47.5 \pm 6\%$ 和 $55.2 \pm 6\%$ 。与媒介物对照组相比,5mg/kg化合物1BIDx5治疗的结果是BM中人CD33+/CD45+肿瘤细胞的百分比显著减少54.0% ($p=0.0013$) (媒介物对照和化合物1治疗组分别为47.5%与21.9%人CD33+/CD45+细胞)。与媒介物对照组相比,2.5mg/kg化合物1BIDx10治疗的结果是BM中人CD33+/CD45+肿瘤细胞的百分比显著减少71.5% ($p<0.0001$) (媒介物对照和化合物1治疗组分别为55.2%与15.7%人CD33+/CD45+细胞)。如FACS分析所确定,未观察到化合物1治疗对骨髓细胞活力具有显著影响,但应注意该测量不区分小鼠和人骨髓细胞。观察到在媒介物和化合物治疗组中体重损失与疾病进展一致;未记录到化合物1治疗存在差异。

[0577] 将媒介物和化合物1治疗动物的另一个股骨固定于福尔马林中,包埋在石蜡中,切

片以进行苏木精和伊红染色。将单个组织切片/动物用于组织学分析,根据肿瘤细胞占有的面积估算活骨髓中肿瘤的百分比。在化合物1 (5mg/kg) BIDx5治疗的骨髓中,活肿瘤的百分比显著减少35% ($p<0.006$,相对于媒介物对照)。2.5mg/kg化合物1BIDx10治疗显示出骨髓中活肿瘤的百分比减少的趋势(相对于媒介物对照减少23.5%),但该减少无统计学显著性。这些数据与化合物1治疗后FACS数据中观察到的减少一致;然而,组织学分析的变化幅度较小。这可能是由于与整个骨髓细胞群体的FACS分析相比,组织学评估中样品面积较小(一个切片/小鼠)。

[0578] 实施例10:新型Cereblon E3连接酶调节药物化合物1在复发性或难治性急性骨髓性白血病对象中的1期、开放标签、剂量发现研究

[0579] 适应症:治疗复发性或难治性急性骨髓性白血病(AML)。

[0580] 目标

[0581] 主要目标:

[0582] 确定化合物1的安全性和耐受性。

[0583] 定义化合物1的非耐受剂量(NTD)、最大耐受剂量(MTD)和/或推荐2期剂量(RP2D)。

[0584] 次要目标:

[0585] 提供关于化合物1的初步功效的信息。

[0586] 表征化合物1的药代动力学(PK)。

[0587] 研究设计

[0588] 这是化合物1在复发性或难治性AML对象中的开放标签、1期、剂量递增和扩大、先入人类临床研究。研究的剂量递增部分(部分A)将评价静脉内施用的化合物1的递增剂量的安全性和耐受性,并确定化合物1的MTD。扩大部分(部分B)将进一步评价所选的扩大群组中以等于或小于MTD施用化合物1的安全性和功效,以确定RP2D,其中每个群组包括最多大约20名可评价对象。可以选择一个或多个给药方案和/或疾病亚组用于群组扩大。部分A和部分B将由3期构成:筛选期、治疗期和随访期。白血病反应由研究者确定。疾病评估根据国际工作组AML反应标准(International Working Group Response Criteria in AML)进行(Cheson等人Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2003;21(24):4642-9)。

[0589] 筛选期

[0590] 筛选期在第一剂量化合物1之后28天开始。在开始任何其他研究程序之前,对象和管理人员必须签署知情同意文件并注明日期。所有筛选测试和程序必须在第一剂量化合物1之前28天内完成。

[0591] 治疗期

[0592] 在治疗期中,在不存在疾病进展、复发、不可接受的毒性,或者对象/内科医生决定退出的情况下,在每个28天周期的第1天-第5天静脉内施用化合物1最多4个周期。在部分A期间,如果对象显示出临床有益效果(稳定疾病或PR)并且耐受研究药物,无不可接受的毒性,可以允许在第4周期之外再进行2个治疗周期。如果需要,可以在另外的群组中根据毒性、PK特征和PD结果评价修改的给药计划(例如,给药从5天增加至最多10天)。

[0593] 所有对象必须在每个周期的第1天之前开始钙、骨化三醇和维生素D补充剂至少3天,并且继续直到每个周期中化合物1的最后剂量之后 ≥ 3 天(例如,在第1天-第5天施用化合物1时, \geq 第8天)。

[0594] 在周期1中,骨髓评价将在第28天(± 3 天)进行。根据第28天骨髓评价,跟踪骨髓发育不全、无持续性白血病迹象、中性粒细胞减少症 ≥ 3 级的对象另外2周,进行周期1的安全性监测(总持续时间42天;参见图1)。在血液恢复时或第42天(± 3 天)进行另外的骨髓评估。因此,在部分A中,周期1中的剂量限制性毒性(DLT)评价窗口将为最多42天(28或42天)。

[0595] 周期2至4的长度将为28天。

[0596] 随访期

[0597] 在随访期中,在化合物1的最后剂量之后,将跟踪所有对象28天(± 3 天),以评估安全性。

[0598] 未记录疾病进展(或复发)的对象将在第1年的之后每8周(± 1 周)和第2年的每12周(± 2 周)进行全血计数和外周血涂片的功效评价,或者直到疾病进展(或复发)、开始新抗癌疗法、同意退出研究、死亡或试验结束,以先出现者为准。在第1年结束时完成骨髓评价,在随访期期间根据临床状况进行。

[0599] 根据功效长期随访计划,跟踪所有对象以进行生存随访,持续最多2年或直到死亡、失访或试验结束,以先出现者为准。生存随访可以通过记录查阅(包括公开记录)和/或与对象、家庭或对象的主治医生电话联系进行。

[0600] 部分A-剂量递增

[0601] 在递增期(部分A)期间,使用修改的加速滴定设计(Simon等人,J Natl Cancer Inst 1997;89(15):1138-47)来建立初始毒性。给每个一名或多名对象的群组施用化合物1,每个群组的剂量以100%递增的方式增加,直到DLT窗口中 ≥ 2 名对象经历化合物1相关的 ≥ 2 级不良事件(可以是不同的群组),或者DLT窗口中 ≥ 1 名对象经历DLT。此时,当前群组 and 所有后续群组将扩大招募3至6名对象。同时开始剂量递增不超过50%的剂量递增计划,以建立NTD和MTD。初始剂量将为0.3mg。样品剂量递增方案如图2所示。化合物1制剂中的N,N-二甲基乙酰胺(DMA)残留溶剂必须不超过ICH Q3C Impurities:Residual Solvents(ICH Q3C杂质:残留溶剂)设定的允许每日暴露(PDE)限值,以使用剂量递增群组进行大于每日化合物1剂量2.4mg。

[0602] 剂量递增的决定将根据安全性审查委员会(Safety Review Committee, SRC)的判断作出,该委员会将包括研究者(和/或指定代表)、发起人的研究医生、安全医生和研究管理人员。临时参与者可能包括研究药代动力学者、研究统计员和另外的研究临床科学家。SRC可以根据需要咨询其他内部和外部专家。

[0603] SRC可以决定评价较高剂量群组、剂量群组内的其他对象、中等剂量群组、较小的剂量递增、替代给药计划(例如,化合物1施用从5天增加至最多10天),和/或根据可用的临床和实验室安全性数据、PK特征和PD结果的综述发布MTD。在评价替代给药计划的事件中,开始剂量和计划不超过此前达到的剂量递增标准的剂量群组的剂量强度。

[0604] 在剂量递增期间任何群组施用第一剂量之后,观察每个群组中的对象至少28天和最多42天(周期1, DLT窗口),然后可以开始下一个更高剂量群组。在给定剂量递增群组中每天招募不超过一名对象。可评价DLT的对象的定义为:

[0605] 在周期1期间已接受化合物1的总计划周期1剂量的至少80% (例如, 5天剂量计划的4个完整化合物1剂量; 在剂量缺失的情况下, 在第7天或之前完成 ≥ 4 个剂量), 不经历DLT, 或

[0606] 在接受化合物1的至少一个剂量 (或其部分) 之后经历DLT。

[0607] 在部分A中的评价替代剂量计划 (例如, 给药从5天增加至最多10天) 的事件中, 适用确定可评价DLT的对象的相同标准。不可评价DLT的对象将被替换。

[0608] 如果剂量群组中 $>33\%$ 的可评价对象在周期1期间经历DLT, 则剂量将被认为是不可容忍的。MTD将定义为小于NTD的最后剂量, 其中在周期1期间 $\leq 33\%$ 的可评价对象经历DLT。如果在第一剂量群组中6名可评价对象中的2名或更多名经历DLT, 则可以根据SRC的判断研究更低剂量的群组 (即, 0.1mg化合物1)。可以评价中等剂量的化合物1 (在NTD和NTD之前的最后剂量水平之间的剂量), 以准确确定MTD。

[0609] 在DLT评估期期间不允许对象内剂量递增; 然而, 在 ≥ 2 周期中, 无疾病进展迹象、耐受化合物1的分配剂量的对象可以 (根据研究者的判断) 递增至在本研究中至少一个群组的对象显示出适当耐受的剂量水平 (即, $\leq 33\%$ 的可评价对象在该剂量水平经历DLT)。

[0610] 部分B-群组扩大

[0611] 在完成剂量递增 (部分A) 之后, 可以招募另外的对象进入扩大期 (部分B), 每个群组最多大约20名可评价对象。扩大可以根据部分A的安全性、PK和PD数据的综述, 在MTD和剂量递增期建立的计划, 和/或在替代可耐受剂量和计划进行。SRC将选择所关注的剂量和计划进行群组扩大。可以选择一个或多个给药方案用于群组扩大。SRC将在整个研究中继续定期查阅安全性数据, 并适当作出关于研究继续和剂量修改的建议。

[0612] 研究人群

[0613] 不适用于其他已建立疗法的世界卫生组织 (World Health Organization) 标准定义的具有复发性或难治性AML的18岁或更年长男性和女性 (Lowenberg, Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. Hematology ASH Education Program 2008; 2008 (1): 1-11) 将招募于本研究中。

[0614] 研究的长度

[0615] 预期招募需要大约18至24个月来完成 (12至15个月剂量递增, 6至9个月扩大)。预期完成积极治疗和治疗后随访还需要6至24个月。预期整个研究持续最多大约3至4年。

[0616] 根据方案所预先确定, 试验结束定义为最后一名对象完成治疗后随访的最后一次访问的日期, 或者主要、次要和/或探索性分析所需的最后一名对象的最后一个数据点的接收日期, 以较晚的日期为准。

[0617] 研究性治疗

[0618] 标记为适合研究用途的IV注射用化合物1根据相关国家卫生管理机构的规定提供。研究药物将根据上文治疗期部分的概述施用。

[0619] 如果存在具有临床意义的疾病进展 (或复发) 的迹象、不可接受的毒性或对象/内科医生决定退出, 研究治疗可以停止。除疾病进展之外, 根据研究者的判断, 对象可以继续接受研究药物。

[0620] 关键功效评估概述

[0621] 主要功效变量是白血病反应率。

[0622] 所有治疗对象都包括在功效分析中。白血病反应由研究者确定。评估根据国际工作组AML反应标准(International Working Group Response Criteria in AML)进行(Cheson, J Clin Oncol 2003;21(24):4642-9)。

[0623] 抗白血病活性证据的描述性分析将由研究者根据临床、实验室、分子和细胞遗传学评估来提供,包括骨髓母细胞百分比、骨髓细胞遗传学、评价分子反应的分子遗传学研究、骨髓流式细胞术、血小板计数和绝对中性粒细胞计数评估。

[0624] 反应标准以最佳总体反应类别汇总:完全缓解率(CRR)和客观反应率(ORR)。ORR包括完全缓解(CR)(即,形态学无白血病状态、形态学CR、细胞遗传学CR、分子CR和具有不完全血液恢复的形态学CR)和部分缓解的所有反应。

[0625] 所关注的功效变量将为ORR和CRR。将汇总其他临床活性度量,包括总体存活期(OS)、无复发存活期(RFS)、无进展存活期(PFS)、无事件存活期、缓解持续时间、反应持续时间和缓解/反应的时间。

[0626] 关键安全性评估概述

[0627] 该研究的安全性变量包括不良事件、安全性临床实验室变量、12导程心电图、美国东部肿瘤协作组行为状态、左心室射血分数评估、体格检查、生命体征、研究治疗暴露、伴随药物评估以及育龄期妇女怀孕测试。

[0628] 关键药代动力学评估概述

[0629] 所确定的化合物1的血浆PK参数将为最大观察血浆浓度(C_{max})、给药后0至24小时时间的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC₂₄)、末期消除半衰期(t_{1/2})、总血浆清除率(CL)、达到峰值(最大)血浆浓度的时间(t_{max})、稳态时的分布体积(V_{ss})。将适当估算化合物1的R-和S-对映异构体的所选的PK参数(例如,C_{max}、AUC₂₄、t_{1/2})。

[0630] 统计学方法

[0631] 根据需要或适用,通过剂量水平(部分A)和群组(部分B)进行统计学分析。所有分析在本质上是描述性的,

[0632] 使用接受任何化合物1的对象(治疗群体)进行所有安全性数据的汇总。

[0633] 主要关注的功效变量为ORR和CRR。将汇总其他初步功效变量,包括OS、RFS、PFS、无事件存活期、缓解持续时间、反应持续时间和缓解/反应的时间。对治疗群体和功效可评价群体(接受基线白血病评估,至少一个研究治疗周期或周期1中至少80%的计划剂量,以及一次研究白血病评估)重复功效分析,使用治疗群体的结果被认为是主要的。

[0634] 除非另有说明,否则所有生物标志物相关数据呈现将基于具有至少一种生物标志物评估的受治疗对象。通过给药方案和/或疾病亚组以及总体提供连续生物标志物终点的基线和从基线的变化的描述性统计。

[0635] 将评估PK、PD、安全性和活性关系的研究。

[0636] 研究的进行遵守人类使用/良好临床实践的药物注册技术要求国际协调会议(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use/Good Clinical Practice)以及适用的法规要求。

[0637] 纳入标准

[0638] 对象必须满足以下本研究的剂量递增(部分A)或剂量扩大(部分B)招募标准。

- [0639] 1. 在签署ICD时,男性和女性 ≥ 18 岁。
- [0640] 2. 对象在进行任何研究相关评估/程序之前必须理解并自愿签署ICD。
- [0641] 3. 对象愿意并且能够遵守研究访问计划和其他方案要求。
- [0642] 4. 不适合其他已建立疗法的世界卫生组织 (World Health Organization) 标准定义的复发性或难治性AML (Lowenberg, Hematology ASH Education Program 2008; (1):1-11)。
- [0643] 5. 美国东部肿瘤协作组行为状态 (ECOG PS) 为0至2。
- [0644] 6. 供体淋巴细胞输注 (DLI) 已过去至少4周 (从第一剂量开始), 但无改善。
- [0645] 7. 对象必须具有以下筛选实验室值:
- [0646] 校正血清Ca或游离 (离子化) 血清Ca在正常限值内 (WNL)。
- [0647] 校正Ca (mg/dL) = 总Ca (mg/dL) - 0.8 (白蛋白 [g/dL] - 4)
- [0648] 在第一次输注之前总白细胞计数 (WBC) $< 25 \times 10^9/L$ 。允许使用羟基脲前期或同时治疗来实现该水平。
- [0649] 钾和镁在正常限值内或可用补充剂校正。
- [0650] 天冬氨酸氨基转移酶/血清谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (AST/SGOT) 或丙氨酸氨基转移酶/血清谷氨酸丙酮酸转氨酶 (ALT/SGPT) $\leq 2.5 \times$ 正常值上限 (ULN)。
- [0651] 尿酸 $\leq 7.5 \text{ mg/dL}$ ($446 \mu\text{mol/L}$)。允许使用低尿剂 (例如, 别嘌呤醇、拉布立酶) 前期和/或同时治疗。
- [0652] 血清胆红素 $\leq 1.5 \times$ ULN。
- [0653] 使用Cockcroft-Gault公式估算血清肌酸酐清除率 $\geq 60 \text{ mL/min}$ 。
- [0654] INR $< 1.5 \times$ ULN, 并且PTT $< 1.5 \times$ ULN。
- [0655] 8. 根据化合物1的怀孕预防计划 (PPP):
- [0656] a). 育龄期妇女 (FCBP) 必须根据PPP中概述的频率经过怀孕测试, 并且怀孕结果必须为阴性。
- [0657] b). 除非实施完全杜绝异性性交, 否则性活跃的FCBP必须同意使用PPP指定的适当避孕方法。
- [0658] FCBP必须同意在开始化合物1之前28天、在化合物1治疗的整个持续时间中、在剂量中断期间和在化合物1的最后剂量之后至少28天, 同时不间断使用两种可信赖的避孕形式 (或实施完全禁欲)。
- [0659] 在异性性交是对象的优选和通常生活方式的情况下, 完全禁欲是唯一可接受的。
- [0660] 周期性杜绝 (日历排卵、自然生育、排卵后方法) 和戒除是不可接受的。
- [0661] c). 除非实施完全杜绝异性性交, 否则性活跃的男性 (包括已进行输精管切除术的那些男性) 在与PPP指定的FCBP发现性活动时必须使用工具避孕 (避孕套)。
- [0662] 在异性性交是对象的优选和通常生活方式的情况下, 完全禁欲是唯一可接受的。
- [0663] d). 女性必须同意在PPP指定的持续时间内放弃母乳喂养或放弃提供母乳。
- [0664] e). 男性必须同意在PPP指定的持续时间内不捐献精液或精子。
- [0665] f). 所有对象必须:
- [0666] 理解化合物1可能具有潜在致畸风险。
- [0667] 同意在PPP指定的持续时间内放弃献血。

- [0668] 被告知可能怀孕和具有胚胎暴露风险。
- [0669] 排除标准
- [0670] 存在任何一种以下情况将排除对象的纳入：
- [0671] 1. 患有急性早幼粒细胞白血病 (APL) 的对象
- [0672] 2. 具有提示活动性中枢神经系统 (CNS) 白血病或已知的CNS白血病的临床症状的对象。只有在筛查期间临床怀疑白血病伴随有CNS的情况下才需要进行脑脊液的评价。
- [0673] 3. 立即受到生命威胁、白血病的严重并发症, 诸如弥散性/难以控制的感染、难以控制的出血和/或难以控制的弥散性血管内凝血的对象。
- [0674] 4. 具有破坏正常钙稳态或阻止钙补充的病状或病症, 包括:
- [0675] 破坏钙吸收的任何已知病症。
- [0676] 甲状旁腺功能减退或甲状旁腺功能亢进的临床证据。
- [0677] 在开始化合物1之前最后4周内实施双磷酸盐或地诺单抗 (denosumab) 疗法。
- [0678] 活动性或近期发生过肾结石 (在开始化合物1之前 ≤ 1 年)。
- [0679] 血清25-羟维生素D水平 $< 12\text{ng/mL}$ (30nmol/L)。
- [0680] 5. 患有损害心脏功能或具有临床意义的心脏疾病, 包括以下任何一种:
- [0681] 如多门控采集 (MUGA) 扫描或超声心动图 (ECHO) 所确定左心室射血分数 (LVEF) $< 45\%$ 。
- [0682] 左束支传导或双分支传导完全阻滞。
- [0683] 先天性长QT综合征。
- [0684] 持续性或具有临床意义的室性心律失常。
- [0685] 心电图 (ECG) 筛查时QTcF ≥ 470 毫秒 (在第1天前 ≥ 72 小时进行, 取三次记录的平均值)。
- [0686] 在开始化合物1之前 ≤ 3 个月具有不稳定型心绞痛或心肌梗塞。
- [0687] 6. 进行前期自体移植的造血干细胞移植的患者, 根据研究者的判断, 未完全从最后一次移植的影响恢复 (例如, 移植相关副作用)。
- [0688] 7. 在开始化合物1之前 ≤ 6 个月, 进行前期同种异体造血干细胞移植 (HSCT), 具有标准或减少强度改善。
- [0689] 8. 在筛查时进行HSCT后全身免疫抑制疗法或具有临床意义的移植物抗宿主病 (GVHD) 的对象。允许外用类固醇治疗未愈的皮肤或眼部GVHD。
- [0690] 9. 在开始化合物1之前 ≤ 5 个半衰期或4周 (以较短者为准) 进行前期全身癌症定向治疗或研究方式。允许使用羟基脲来控制外周白血病母细胞。
- [0691] 10. 在开始化合物1之前 ≤ 2 周进行白细胞单采术。
- [0692] 11. 在开始化合物1之前 ≤ 2 周进行大手术。对象必须从任何具有临床意义影响的最近手术恢复。
- [0693] 12. 怀孕或哺乳女性。
- [0694] 13. 已知的人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染。
- [0695] 14. 已知的慢性、活动性乙肝或丙肝病毒 (HBV/HCV) 感染。
- [0696] 15. 进行持续的抗凝血剂 (例如, 华法林、低分子量肝素、因子Xa抑制剂) 的慢性、治疗性给药治疗。

[0697] 16. 具有需要积极、持续的全身治疗的第二并发癌症史。

[0698] 17. 对象对于钙、骨化三醇和/或维生素D补充剂或任何其成分具有已知的过敏性/超敏性。

[0699] 18. 对象具有阻止对象参与研究的任何显著医学病症、实验室异常或精神疾病。

[0700] 19. 对象具有的任何病症, 包括存在实验室异常, 如果对象参与研究, 这些疾病会使他/她处于不可接受的风险中。

[0701] 20. 对象具有会破坏解释研究数据的能力的任何病症。

[0702] 提供上文所述的实施例, 以向本领域的普通技术人员提供如何制造和使用权利要求保护的实施方案的完整公开内容和描述, 并且不旨在限制本文公开的内容的范围。对于本领域的技术人员显而易见的修改旨在落入以下权利要求的范围内。本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请以引用的方式并入本文, 如同每个这样的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出以引用的方式并入本文。

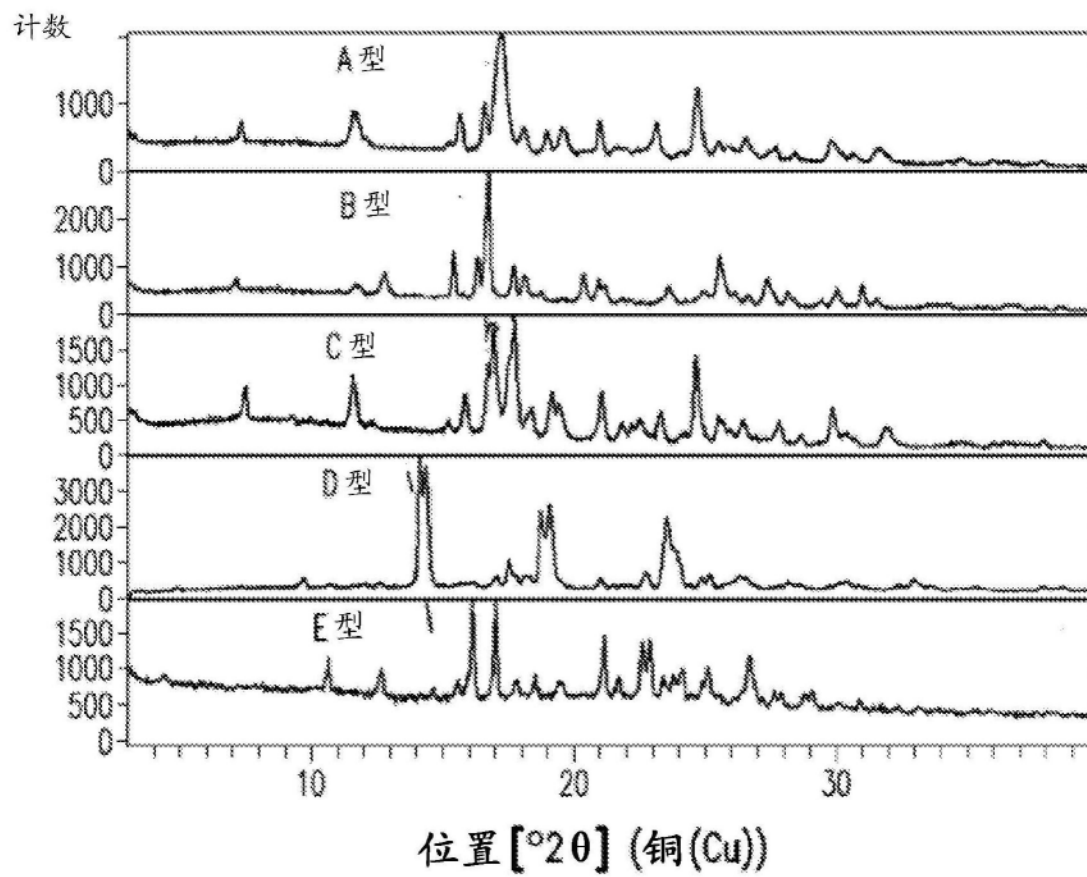


图1

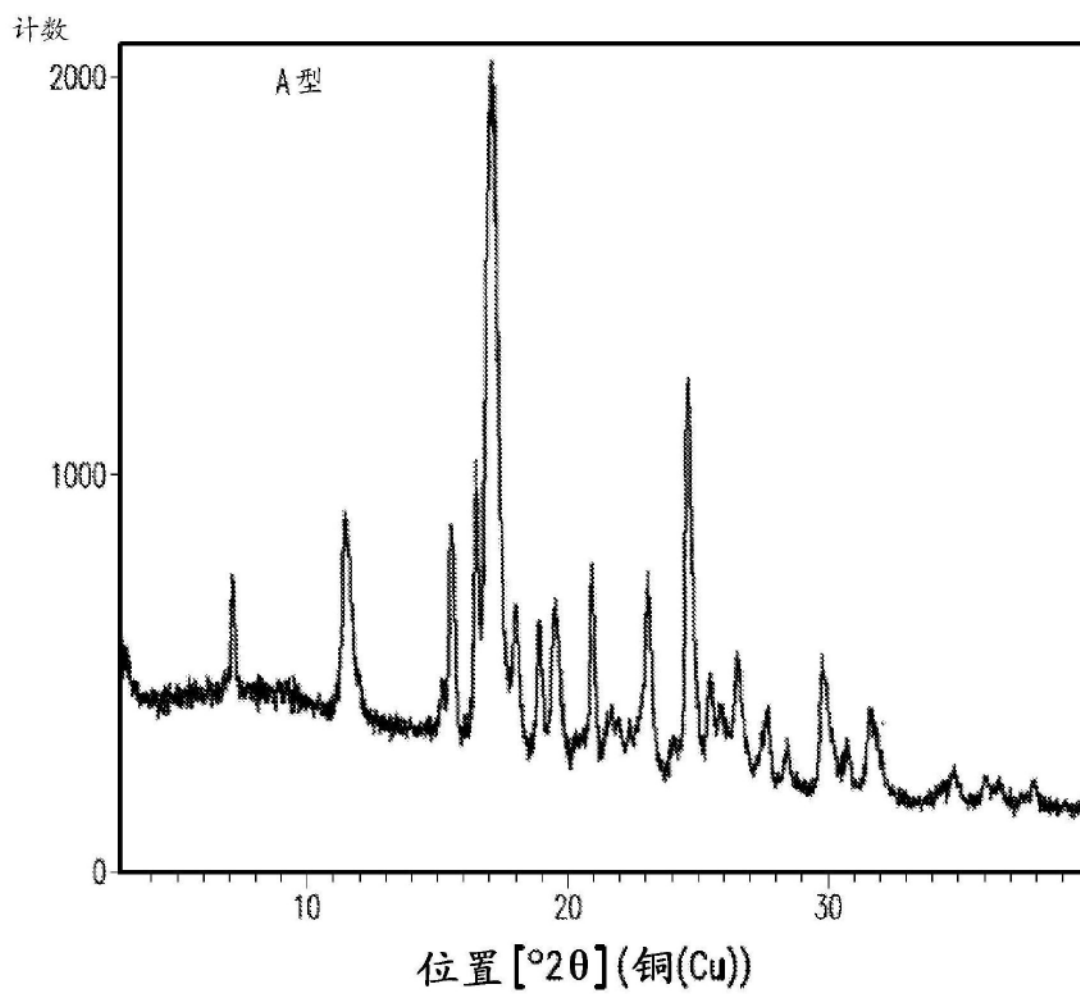


图2

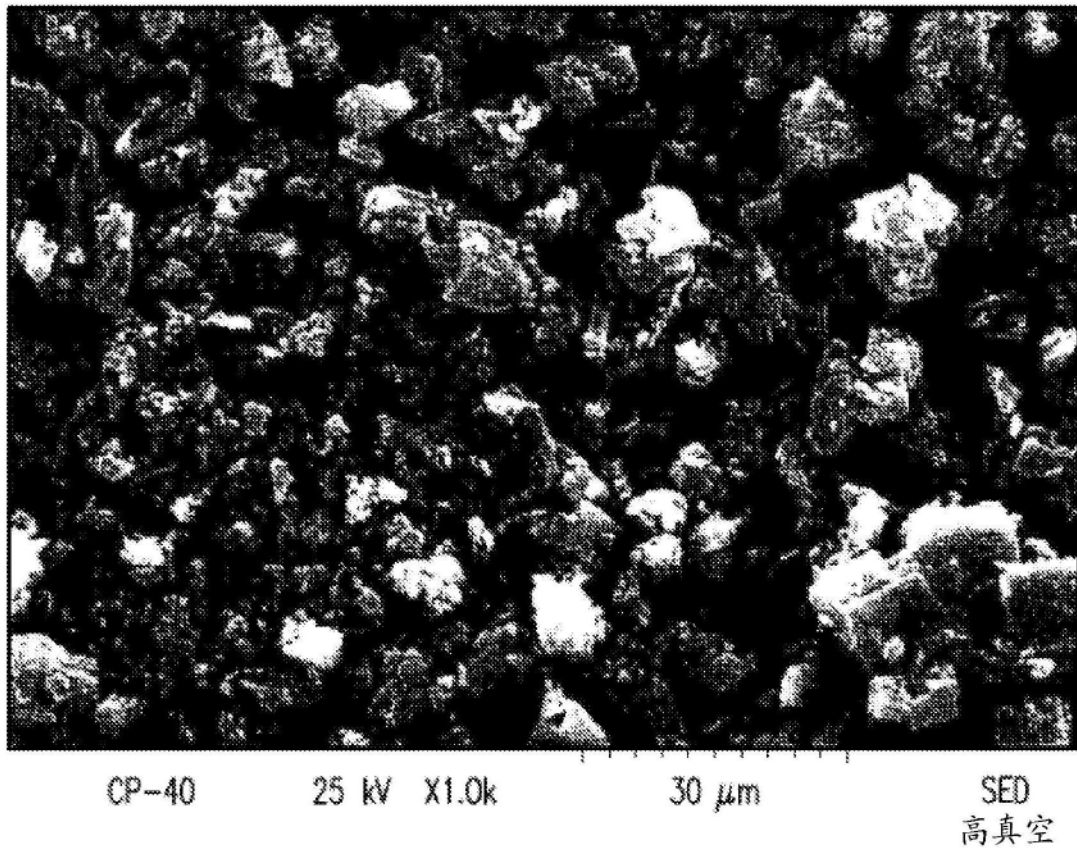


图3

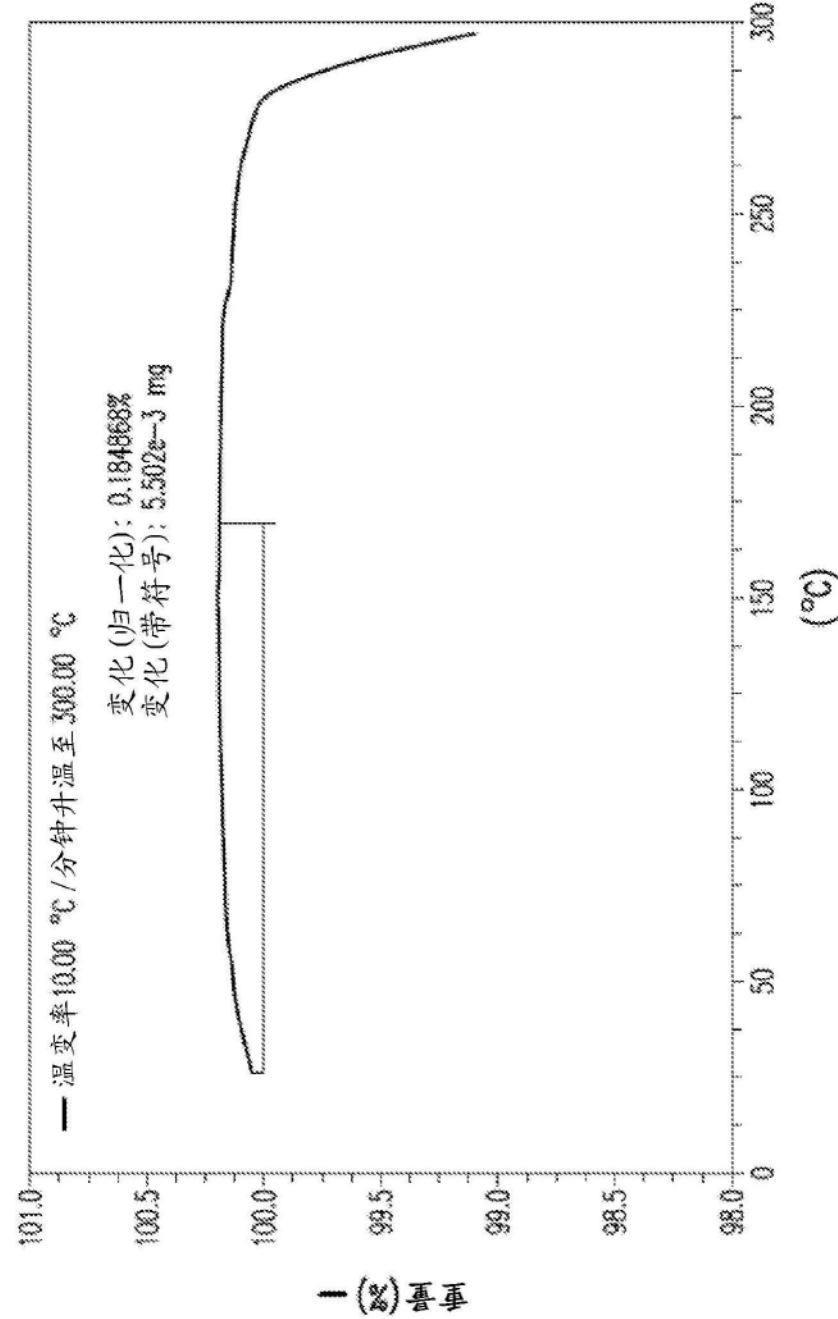


图4

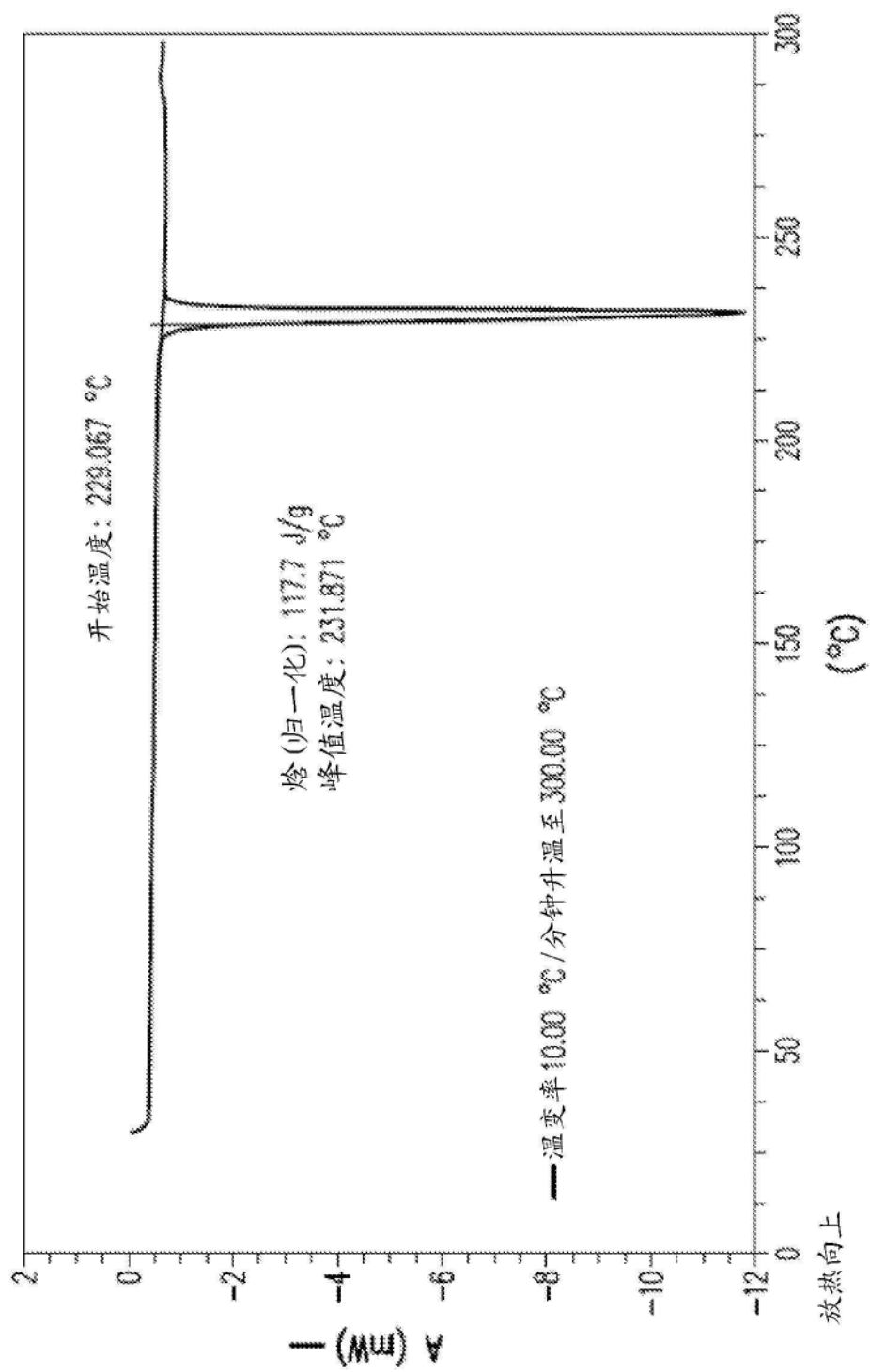
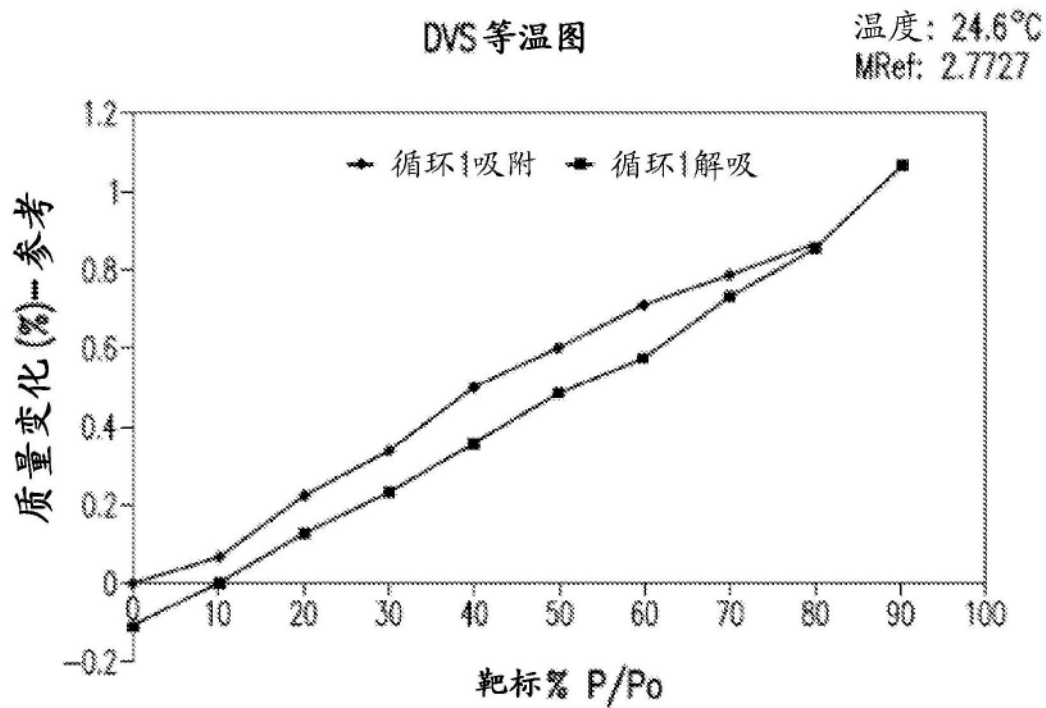


图5



循环1	靶标 % P/P ₀	质量变化 (%)—参考		
		吸附	解吸	迟滞
	0.0	-0.004	-0.111	
	10.0	0.063	-0.002	-0.066
	20.0	0.221	0.126	-0.094
	30.0	0.339	0.231	-0.108
	40.0	0.509	0.360	-0.149
	50.0	0.614	0.496	-0.118
	60.0	0.726	0.586	-0.139
	70.0	0.808	0.751	-0.057
	80.0	0.887	0.880	-0.007
	90.0	1.099	1.099	

图6

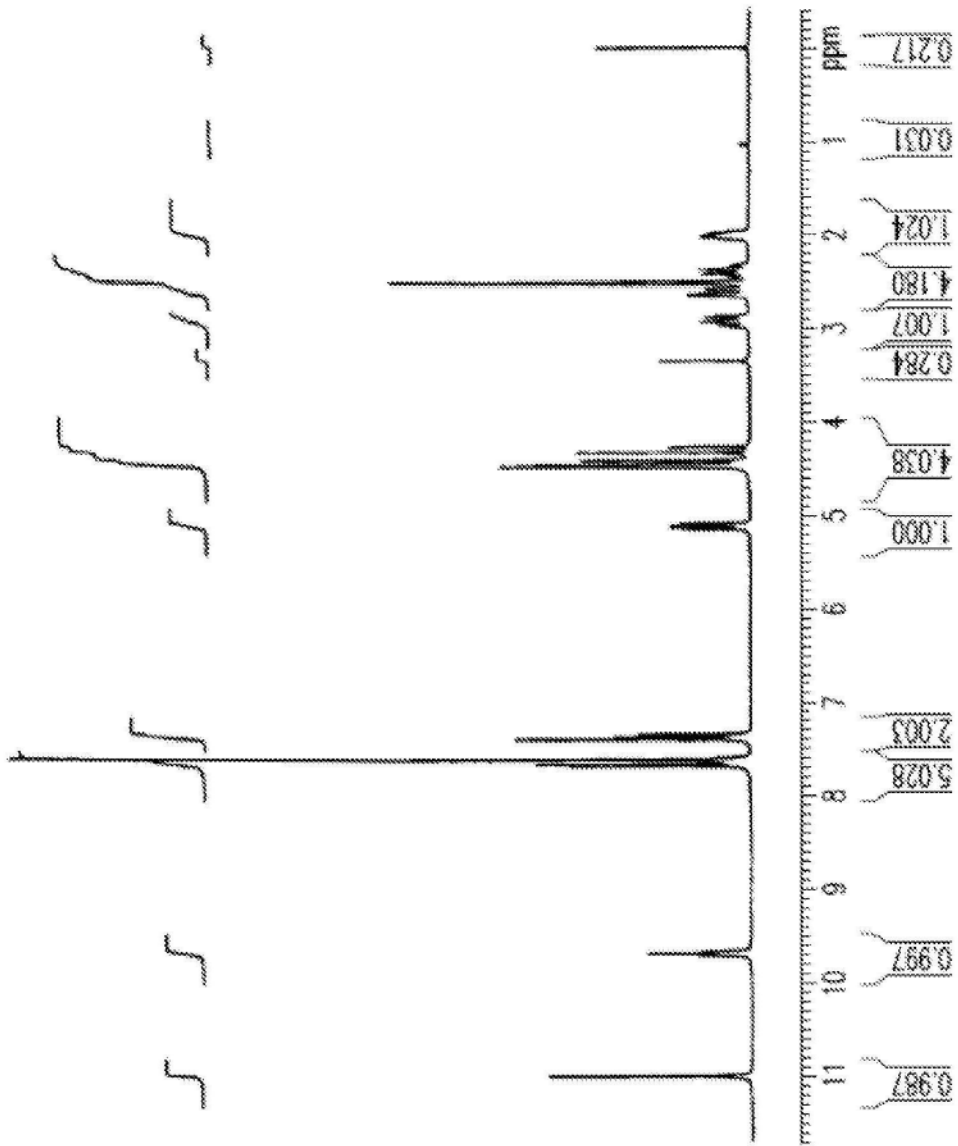


图7

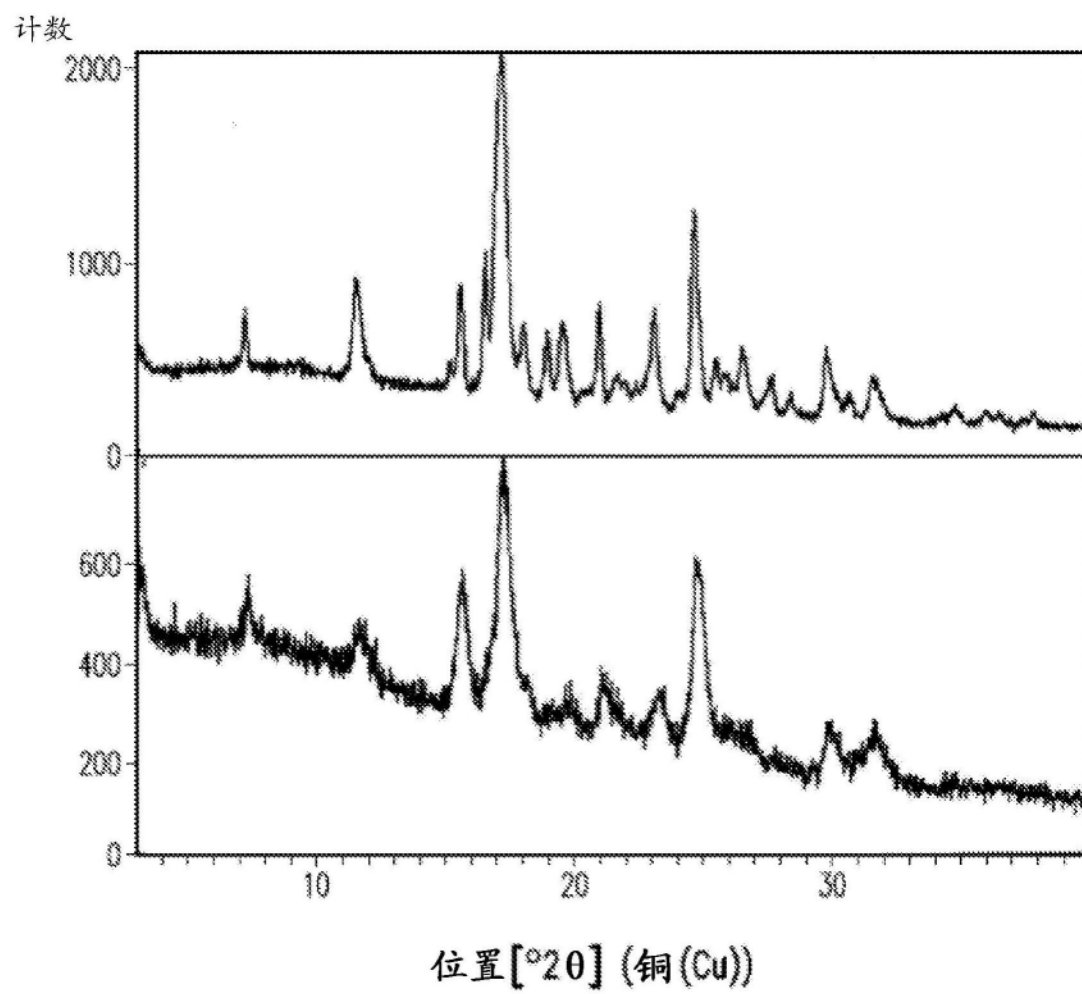


图8

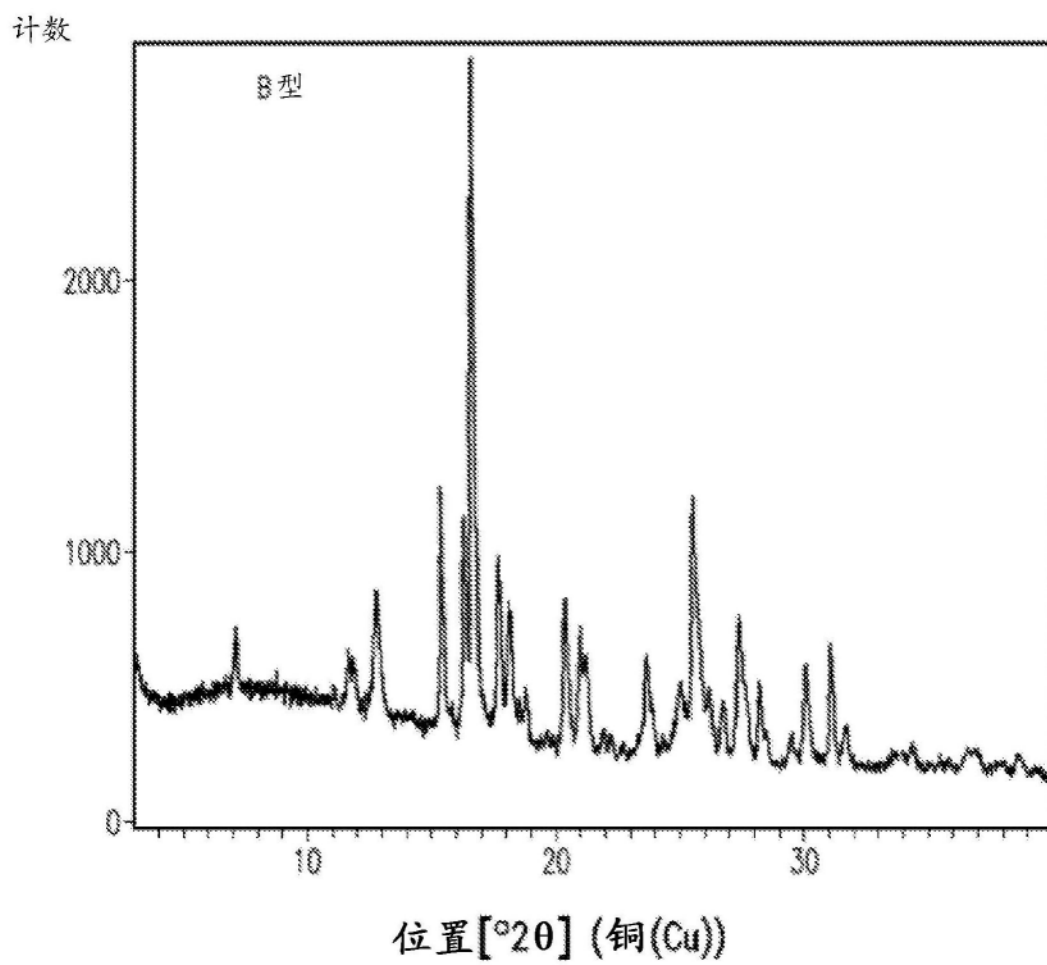


图9

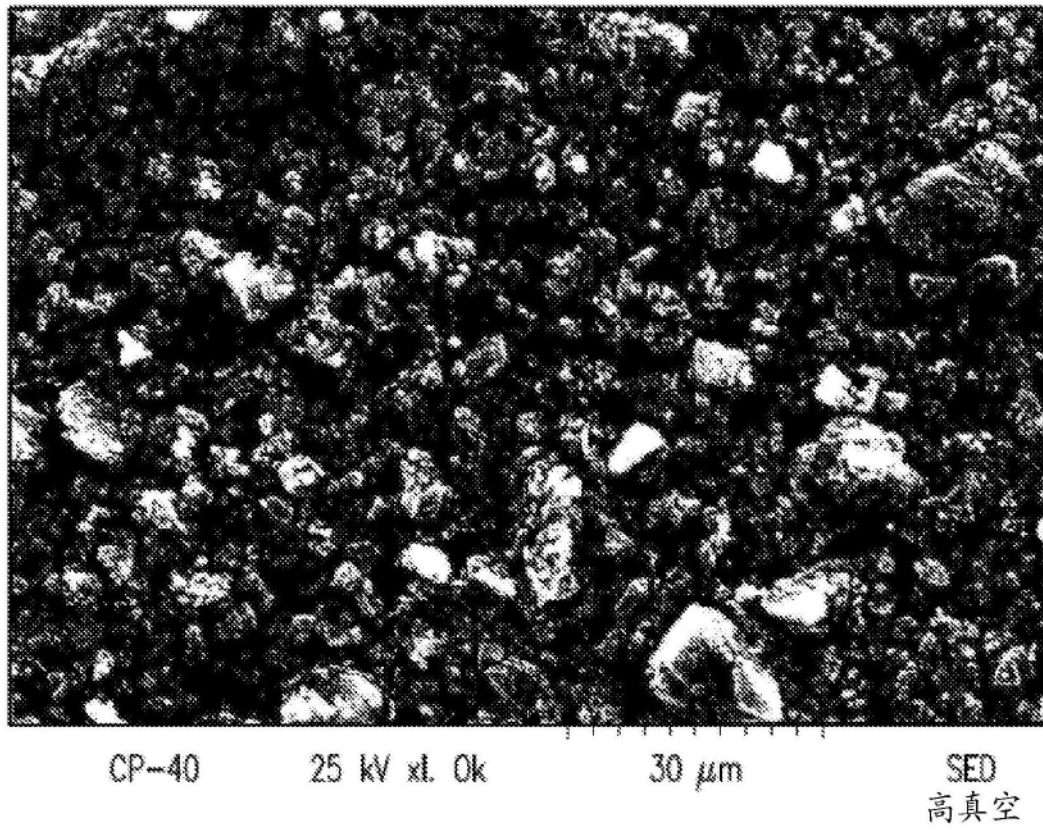


图10

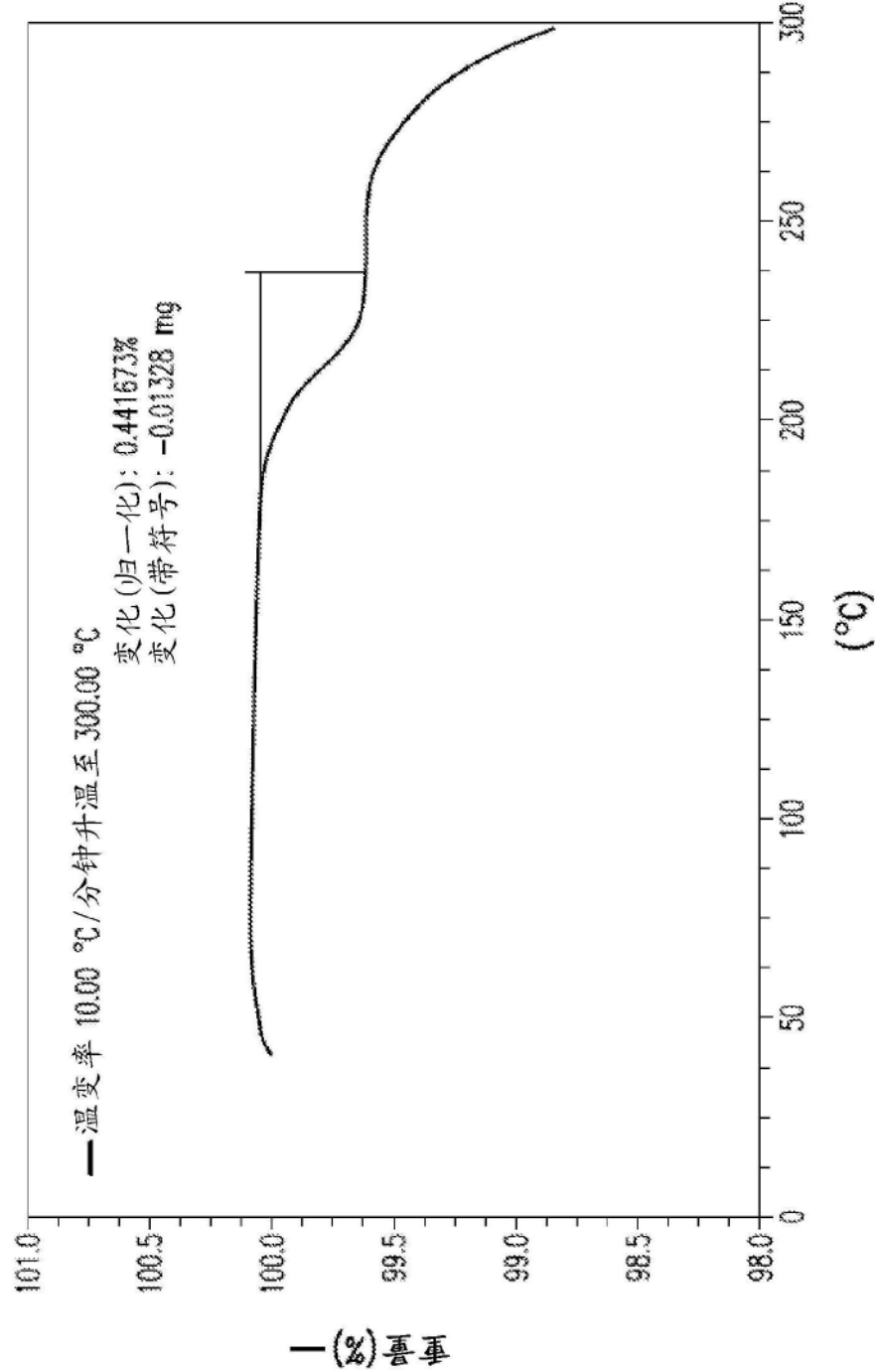


图11

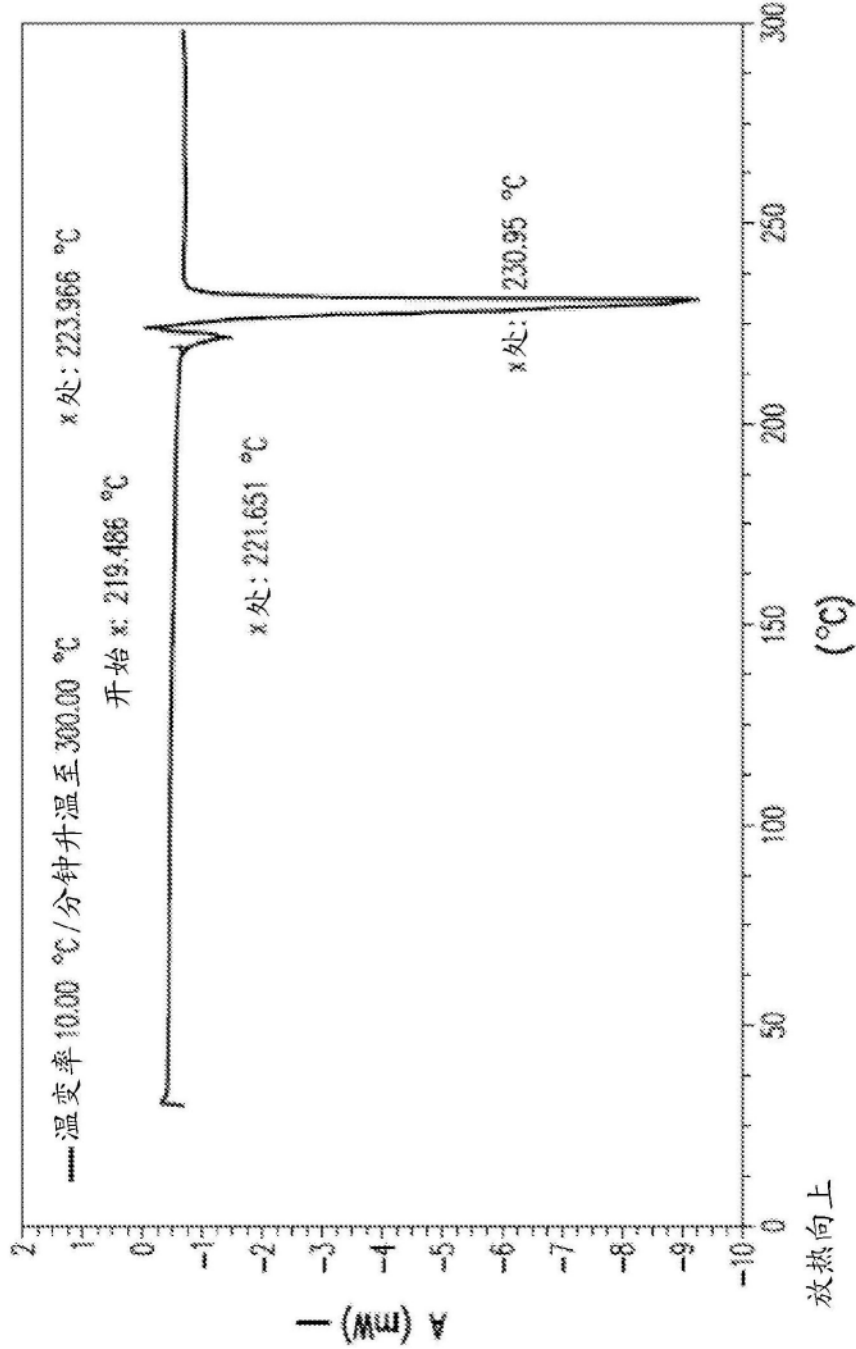
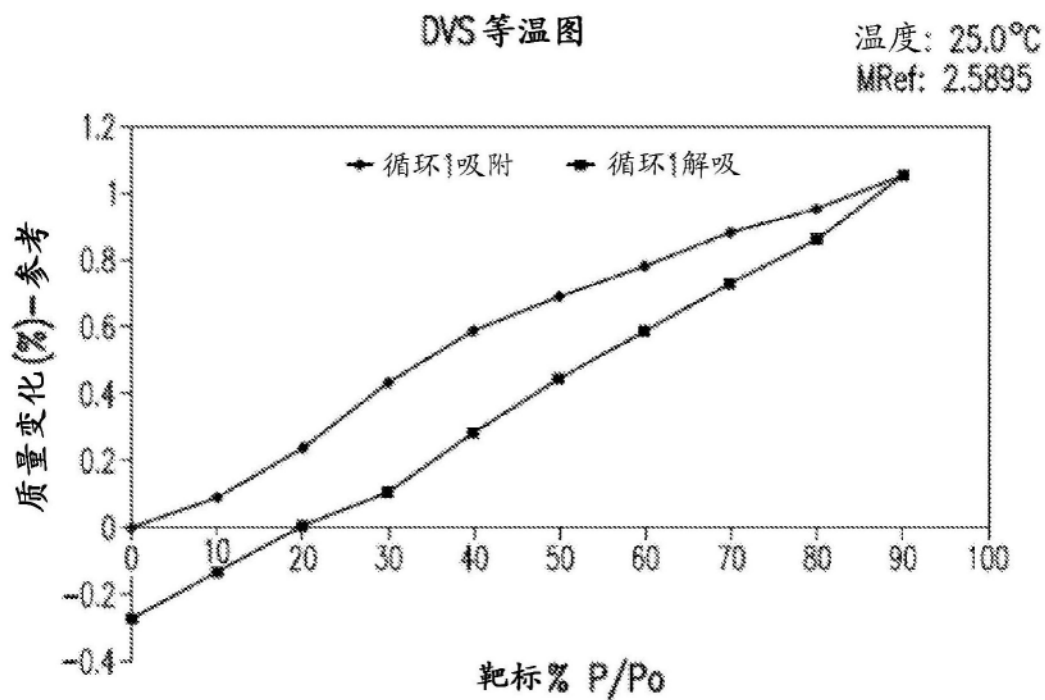


图12



循环1	靶标 % P/P ₀	质量变化(%)—参考		
		吸附	解吸	迟滞
	0.0	0.000	-0.270	
	10.0	0.093	-0.120	-0.213
	20.0	0.241	0.009	-0.232
	30.0	0.439	0.112	-0.327
	40.0	0.595	0.292	-0.303
	50.0	0.700	0.456	-0.244
	60.0	0.798	0.599	-0.198
	70.0	0.903	0.748	-0.154
	80.0	0.977	0.886	-0.091
	90.0	1.085	1.085	

图13

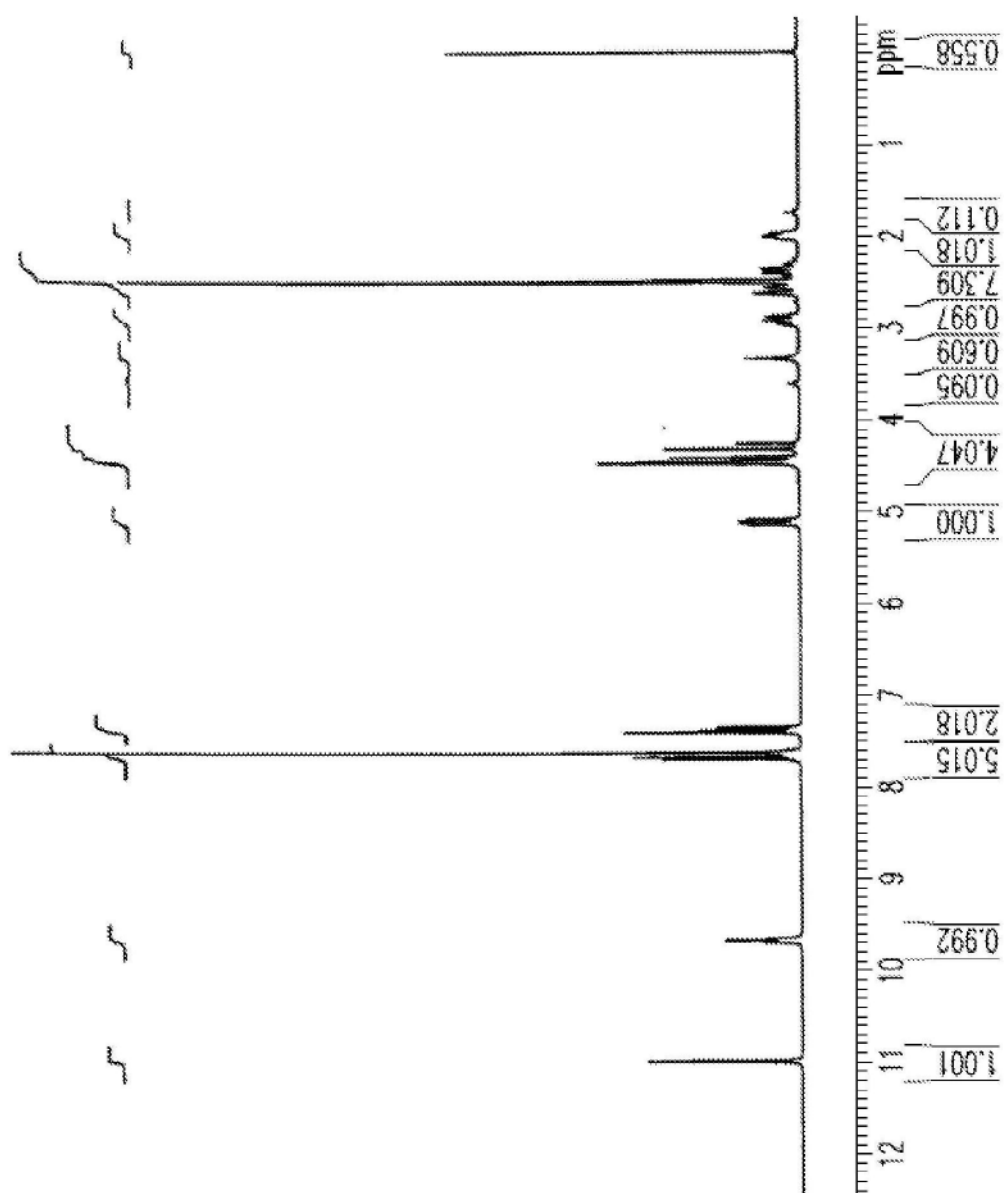


图14

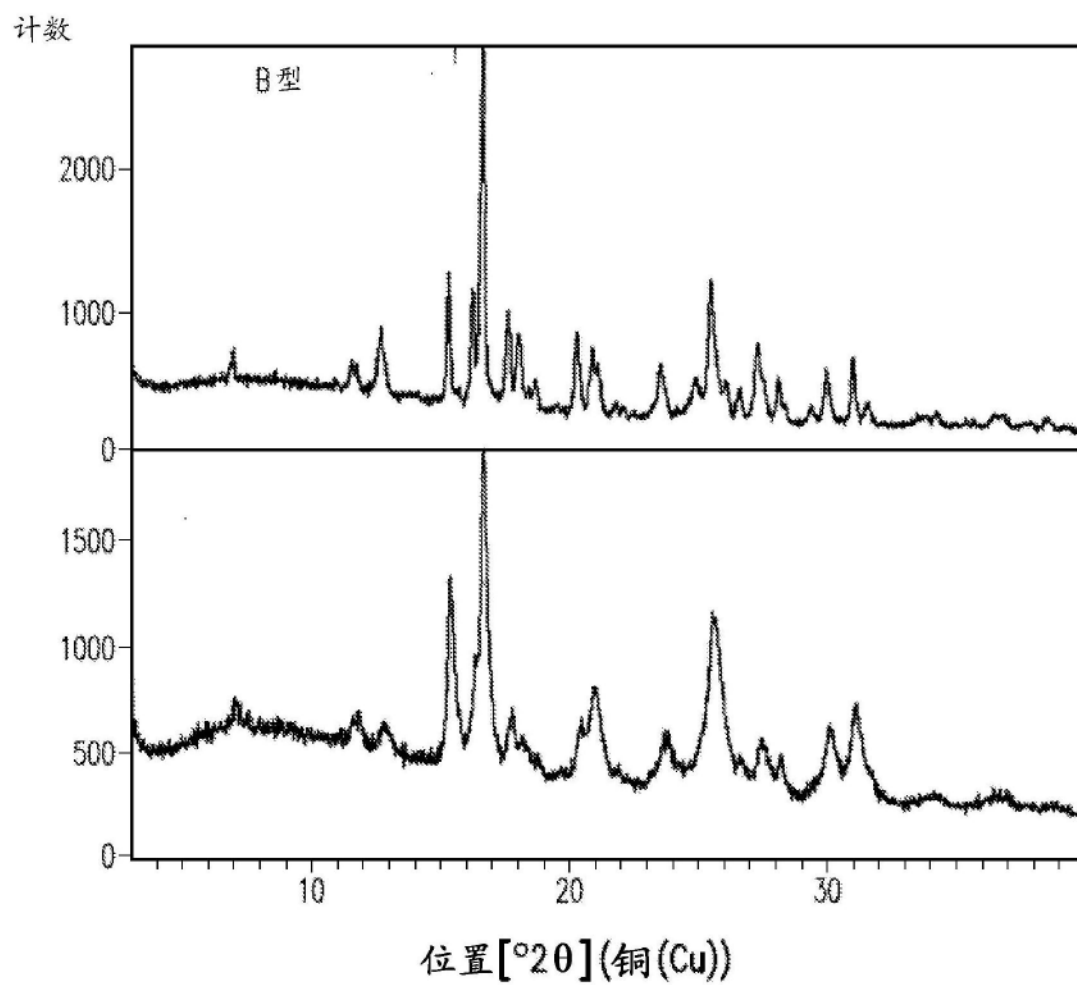


图15

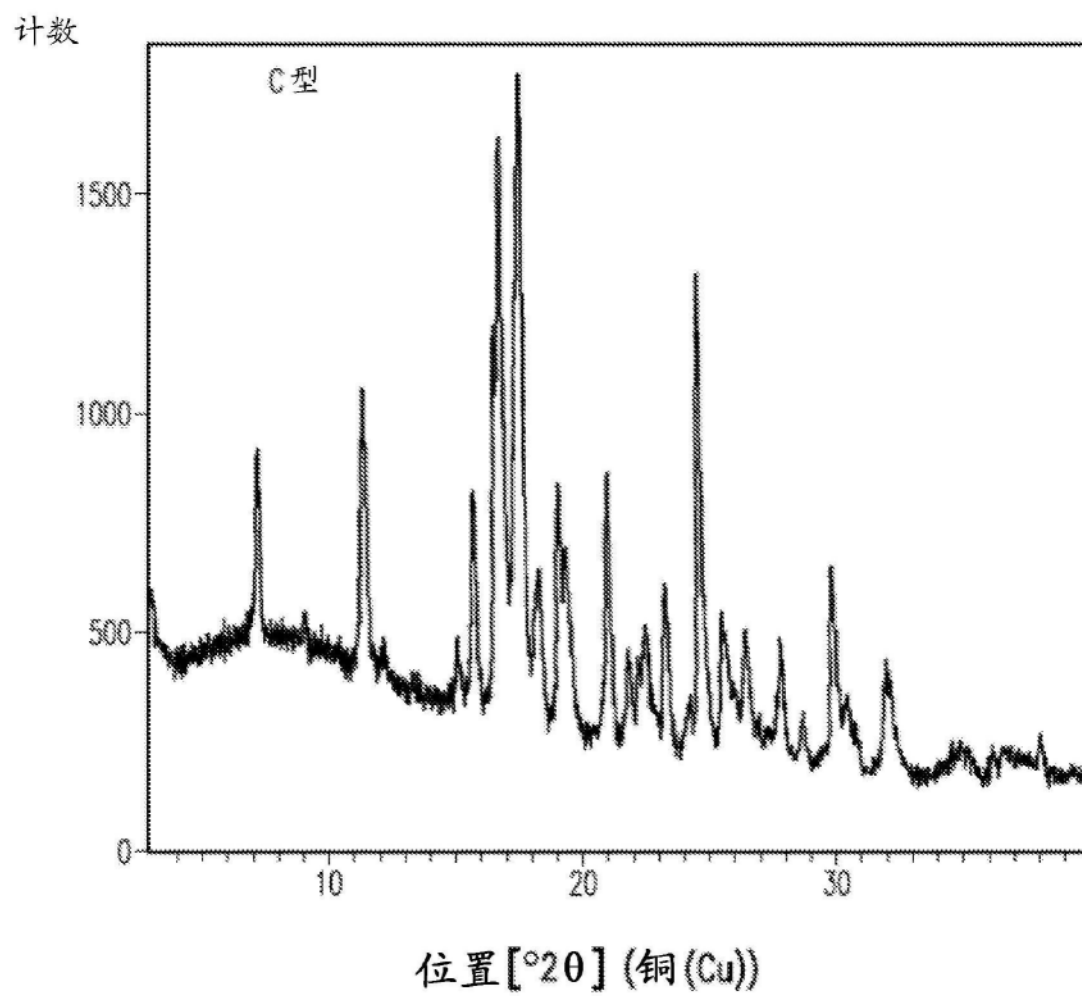


图16

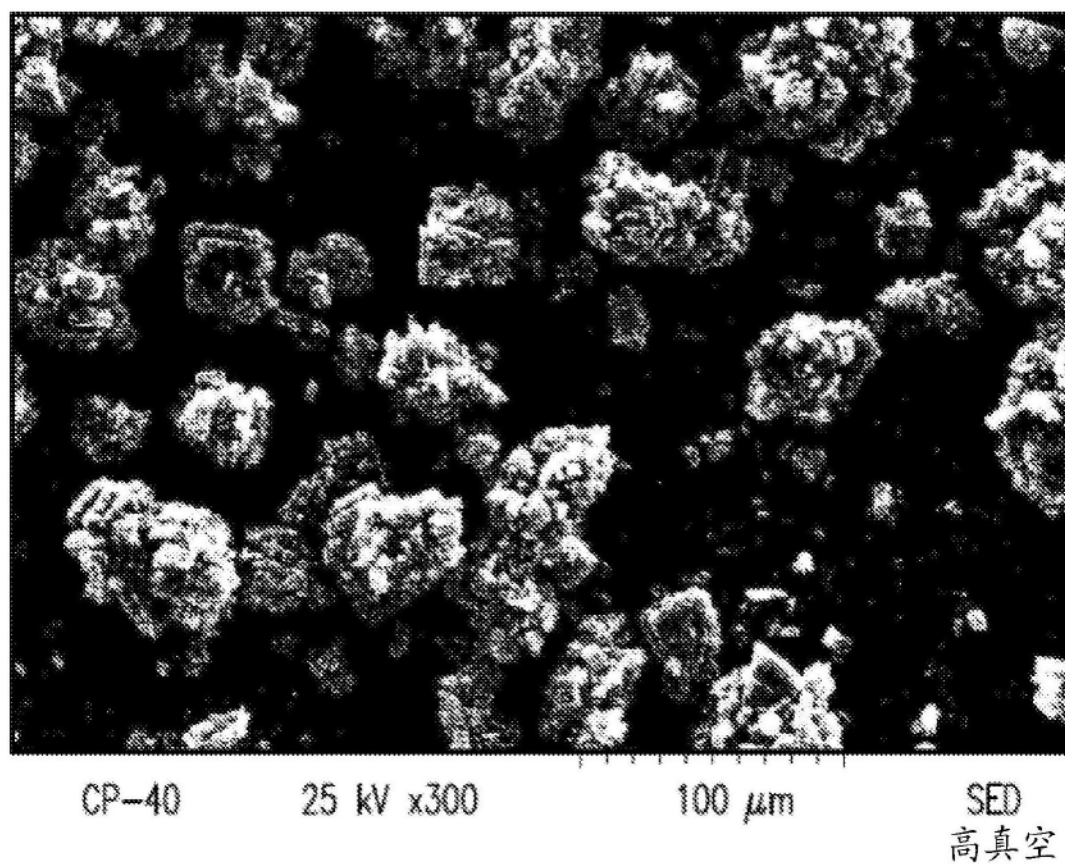


图17

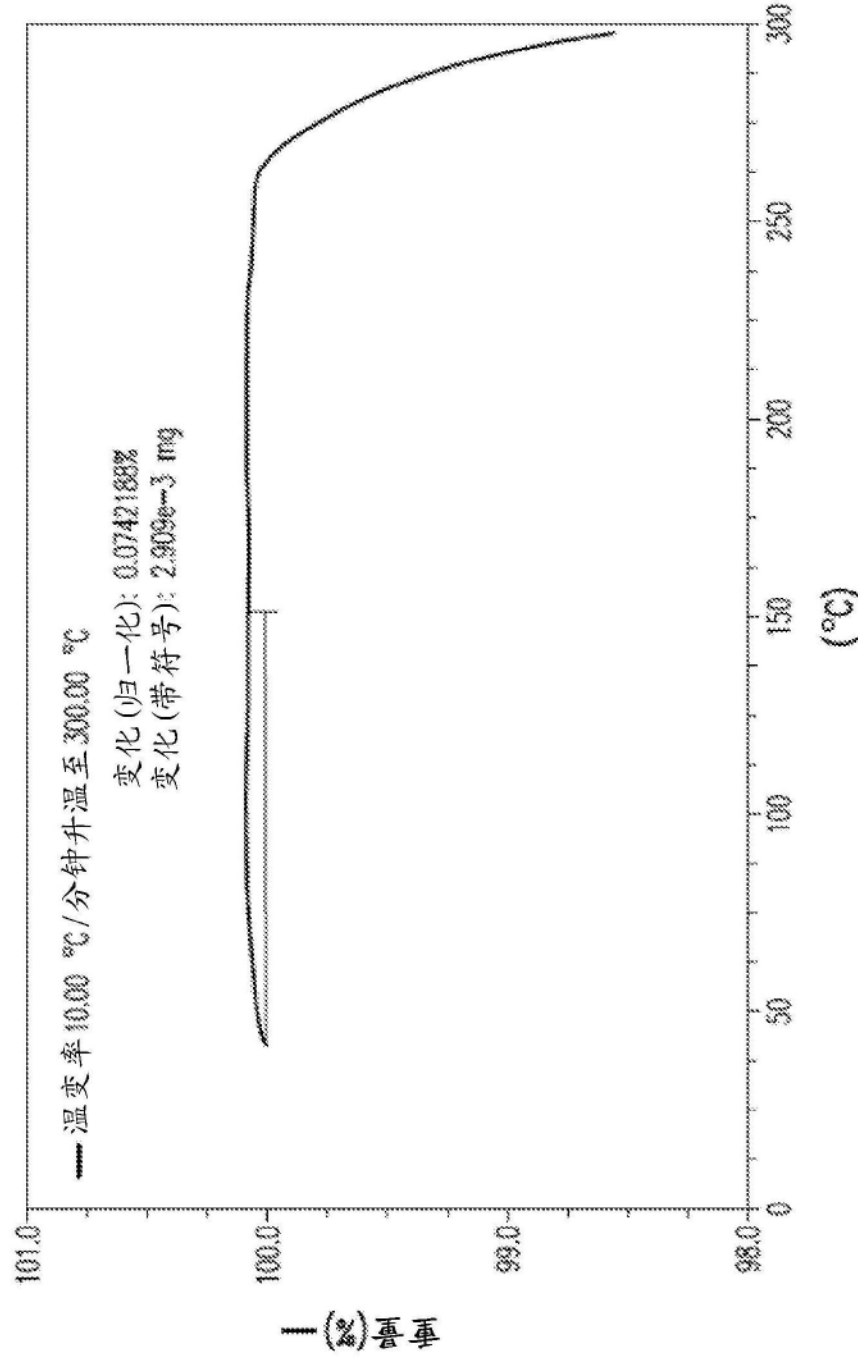


图18

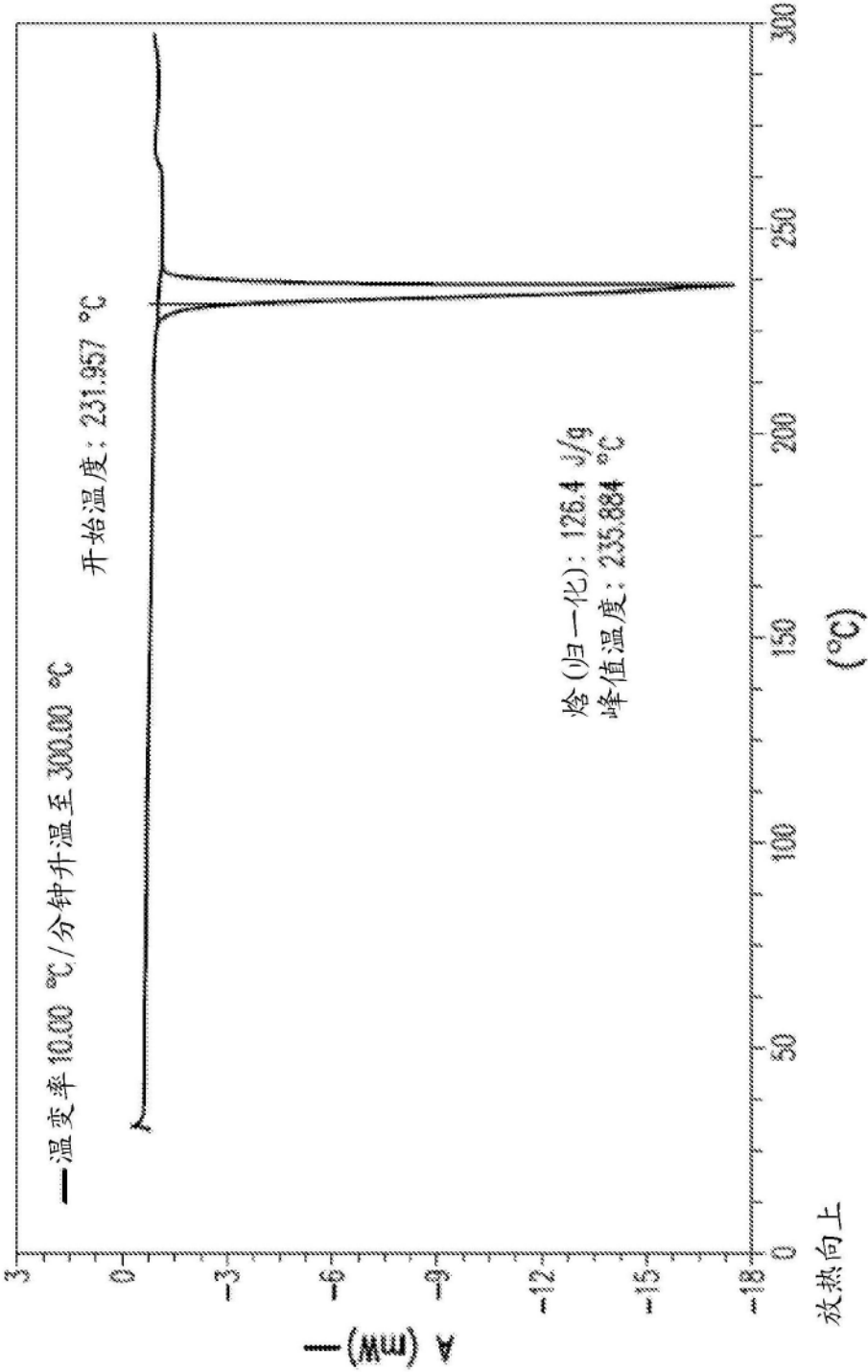
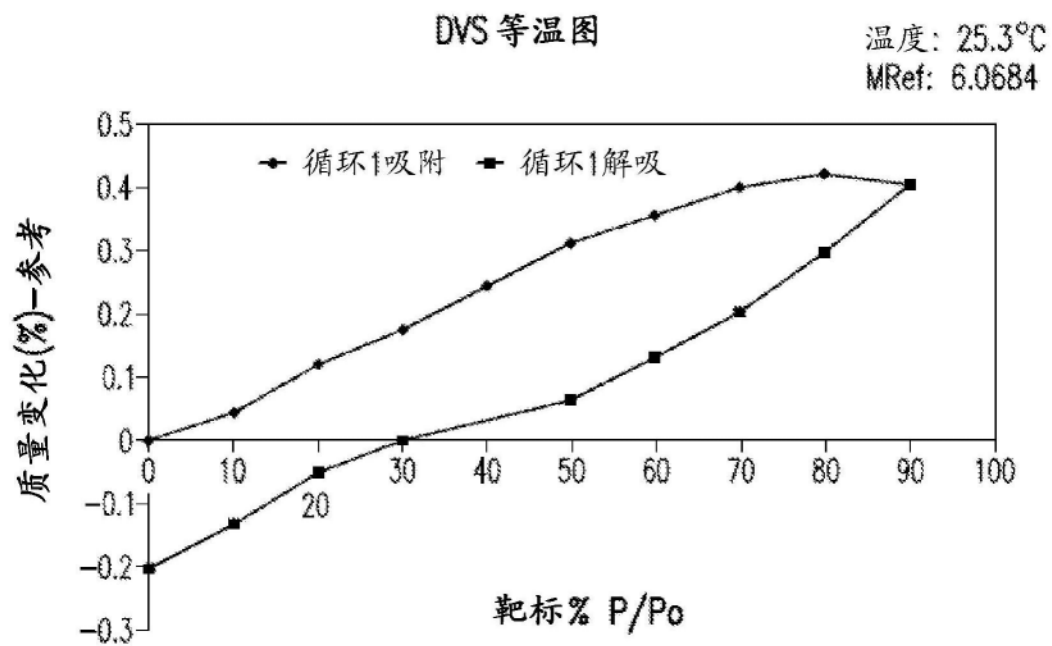


图19



	靶标 % P/P ₀	质量变化(%)—参考		
		吸附	解吸	迟滞
循环1	0.0	-0.0020	-0.2070	
	10.0	0.0409	-0.1368	-0.1776
	20.0	0.1186	0.0547	-0.1734
	30.0	0.1730	0.0049	-0.1780
	40.0	0.2409	0.0395	-0.2805
	50.0	0.3114	0.0606	-0.2508
	60.0	0.3559	0.1305	-0.2254
	70.0	0.4014	0.2027	-0.1987
	80.0	0.4235	0.2983	-0.1252
	90.0	0.4087	0.4087	

图20

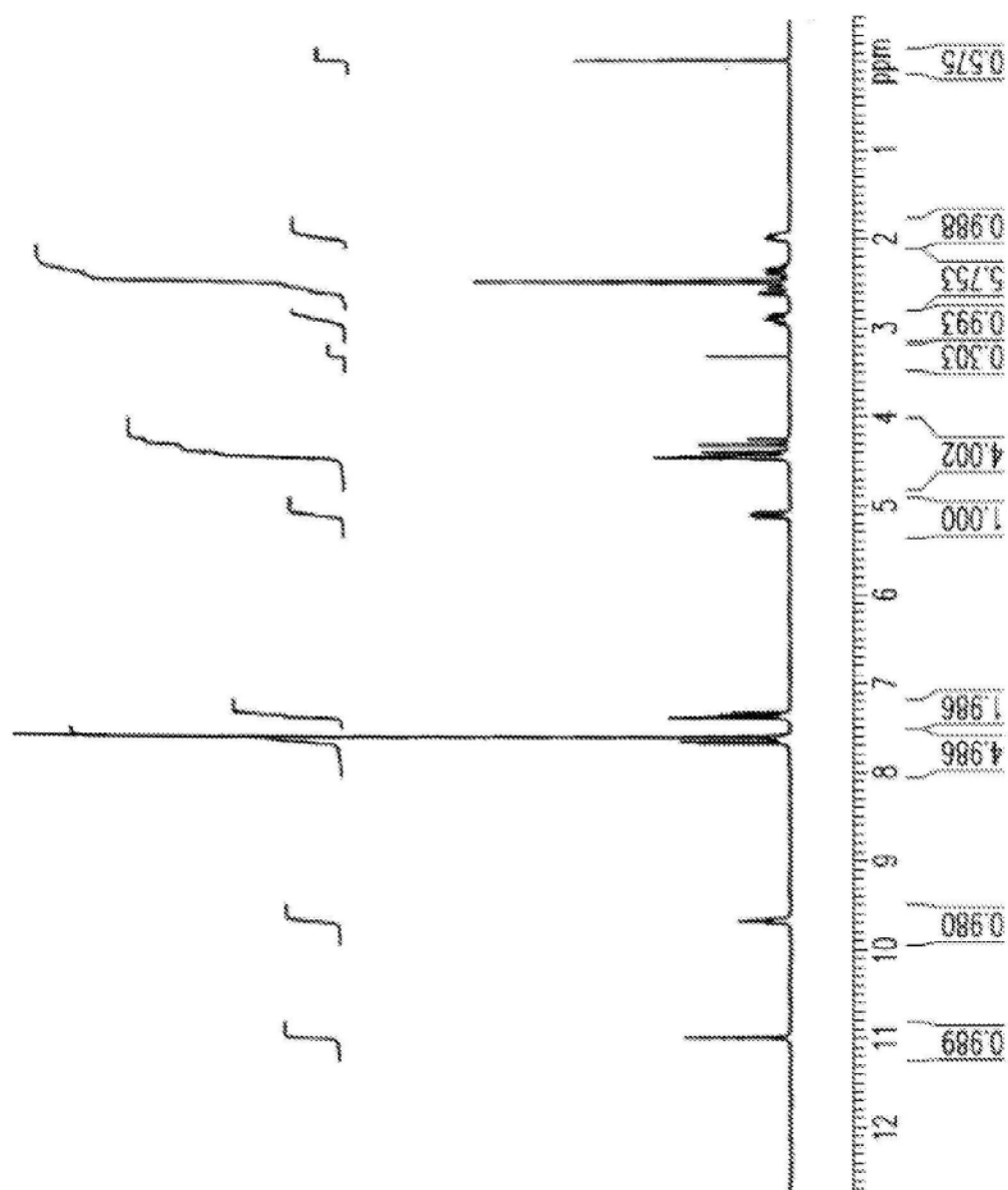


图21

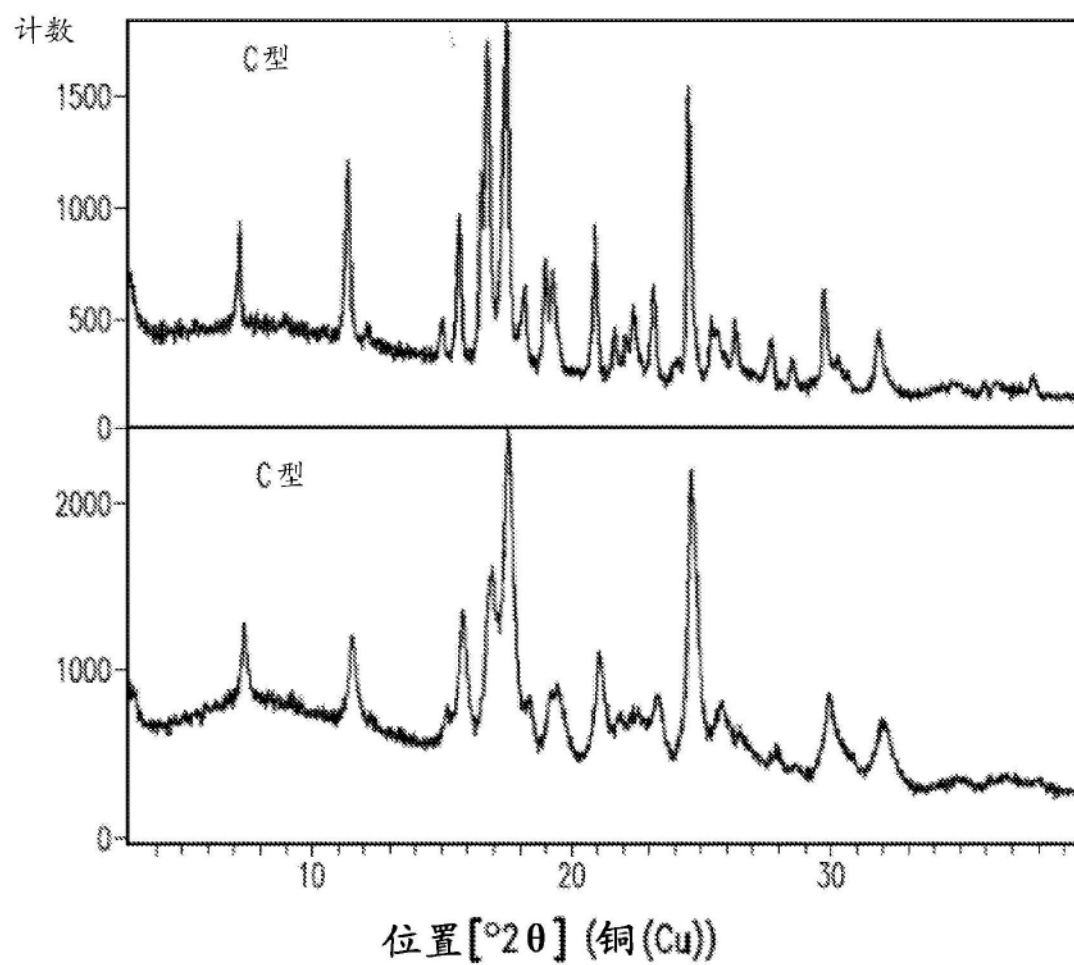


图22

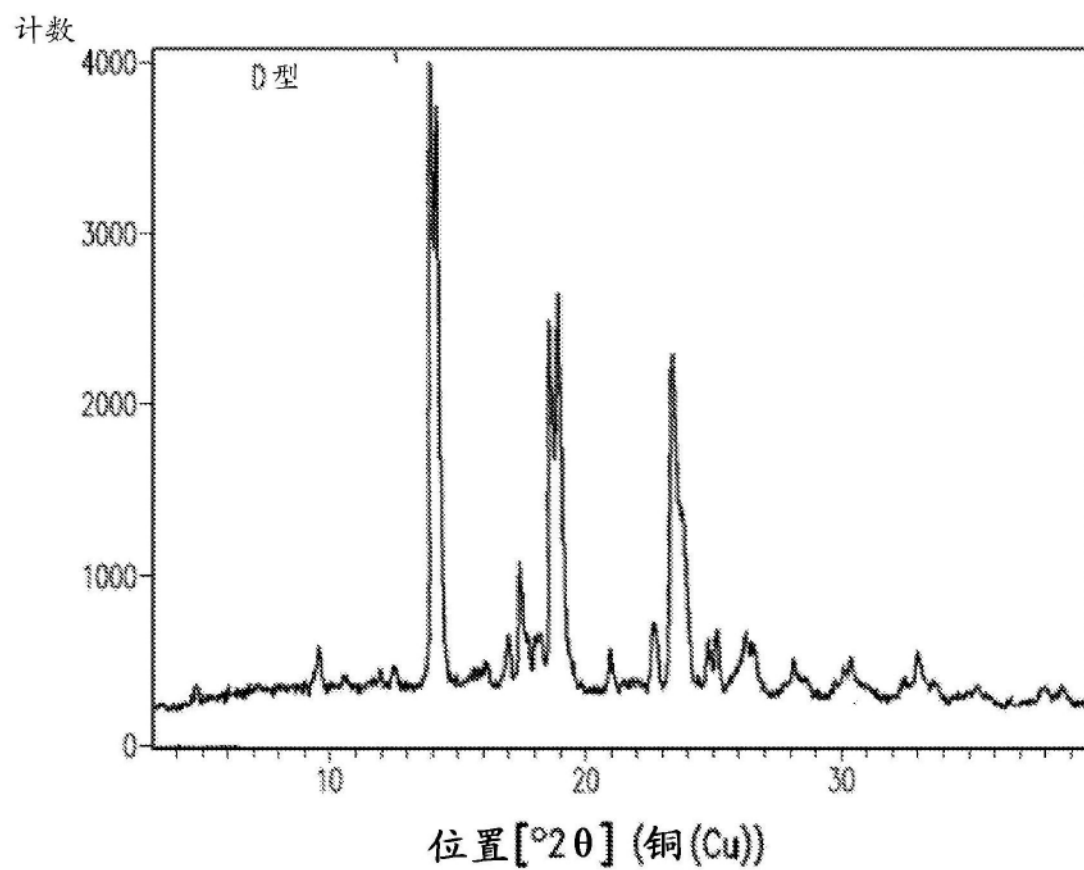


图23

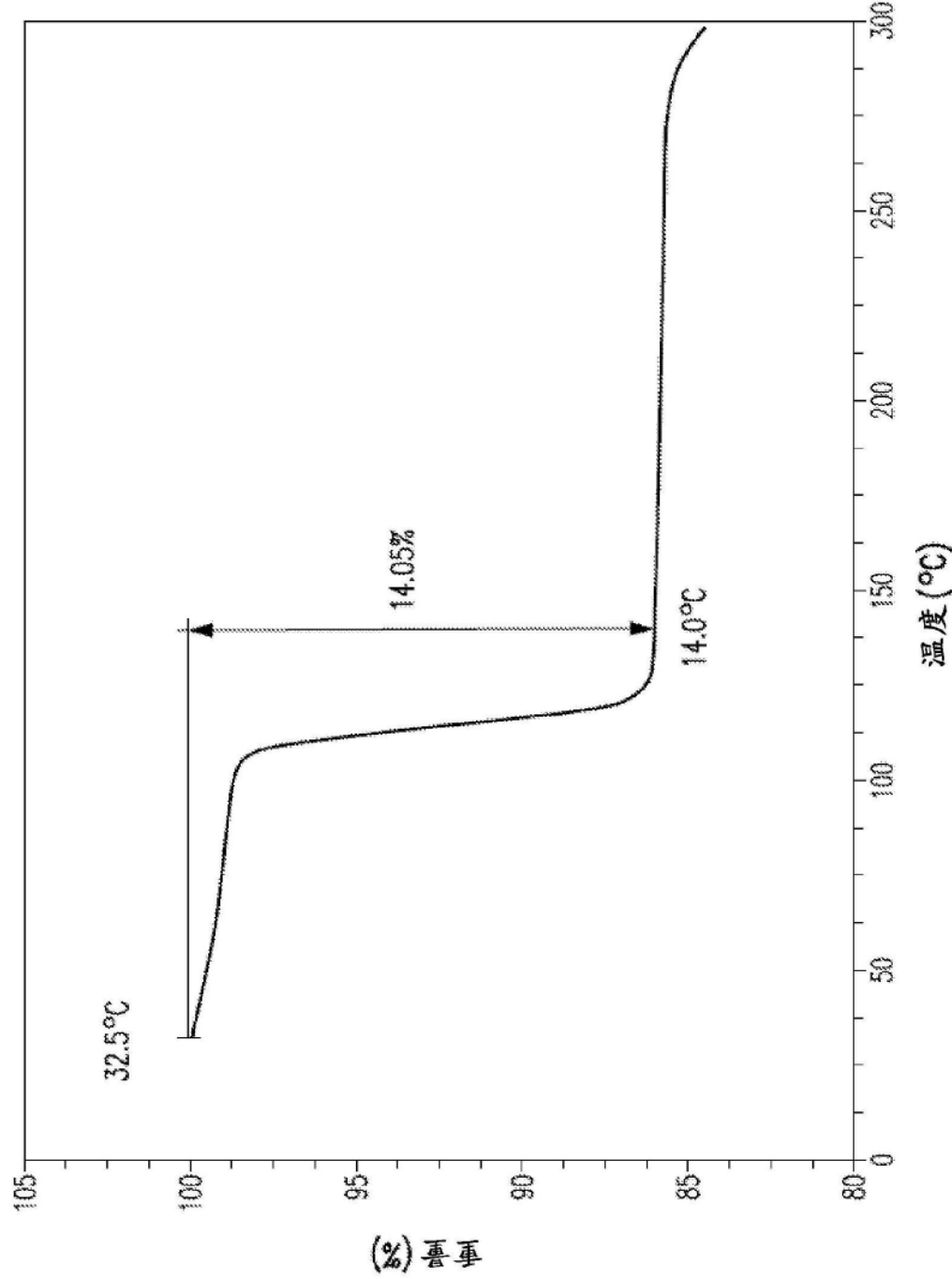


图24

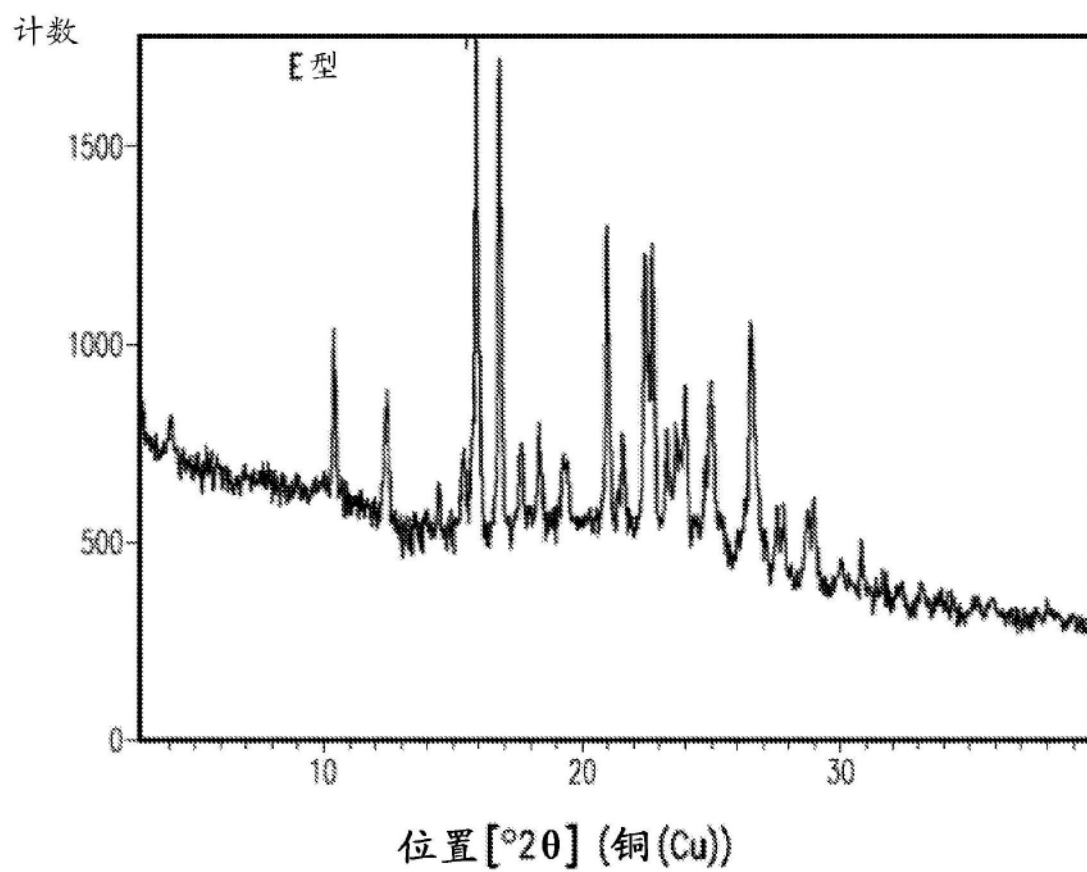


图25

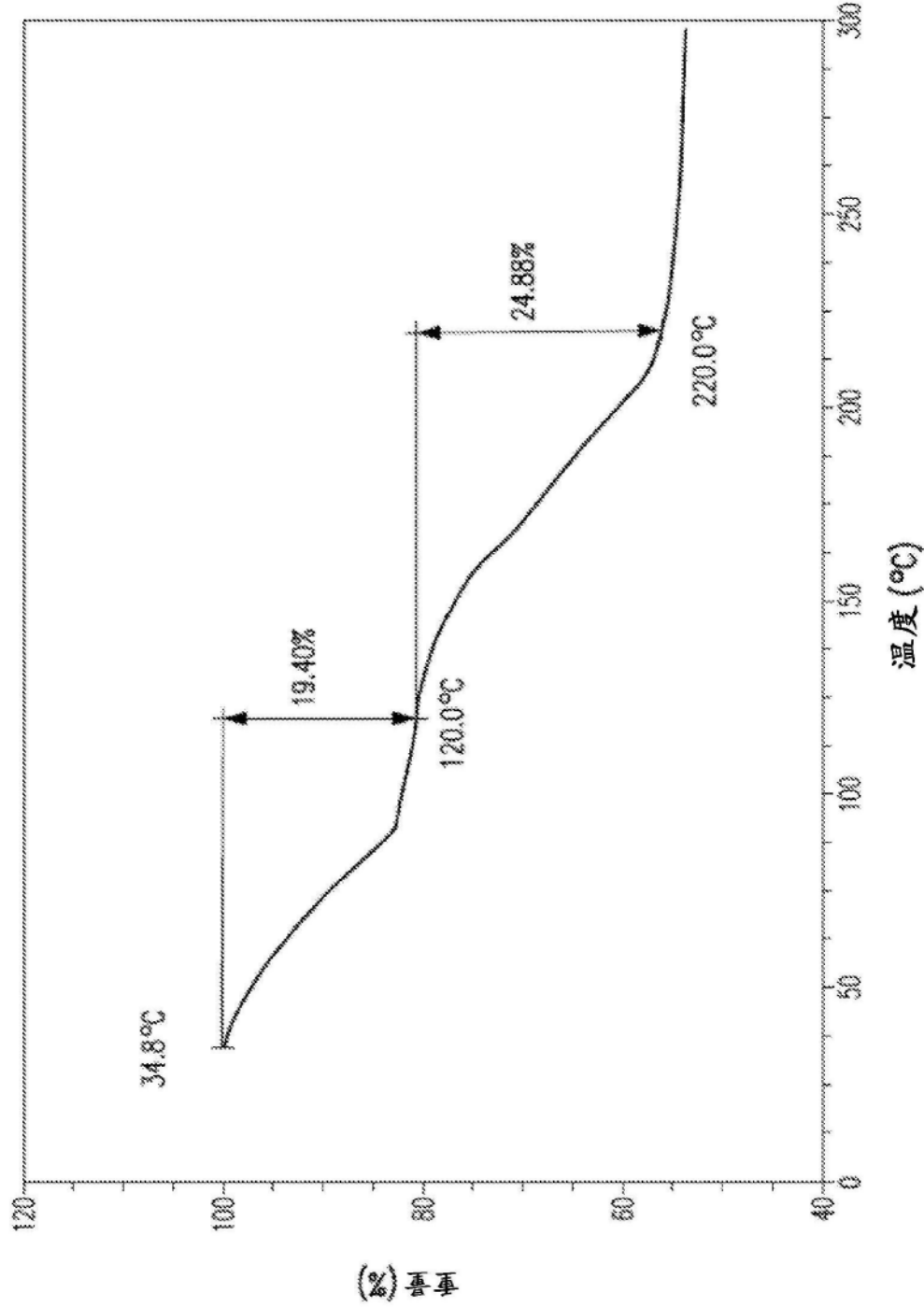


图26

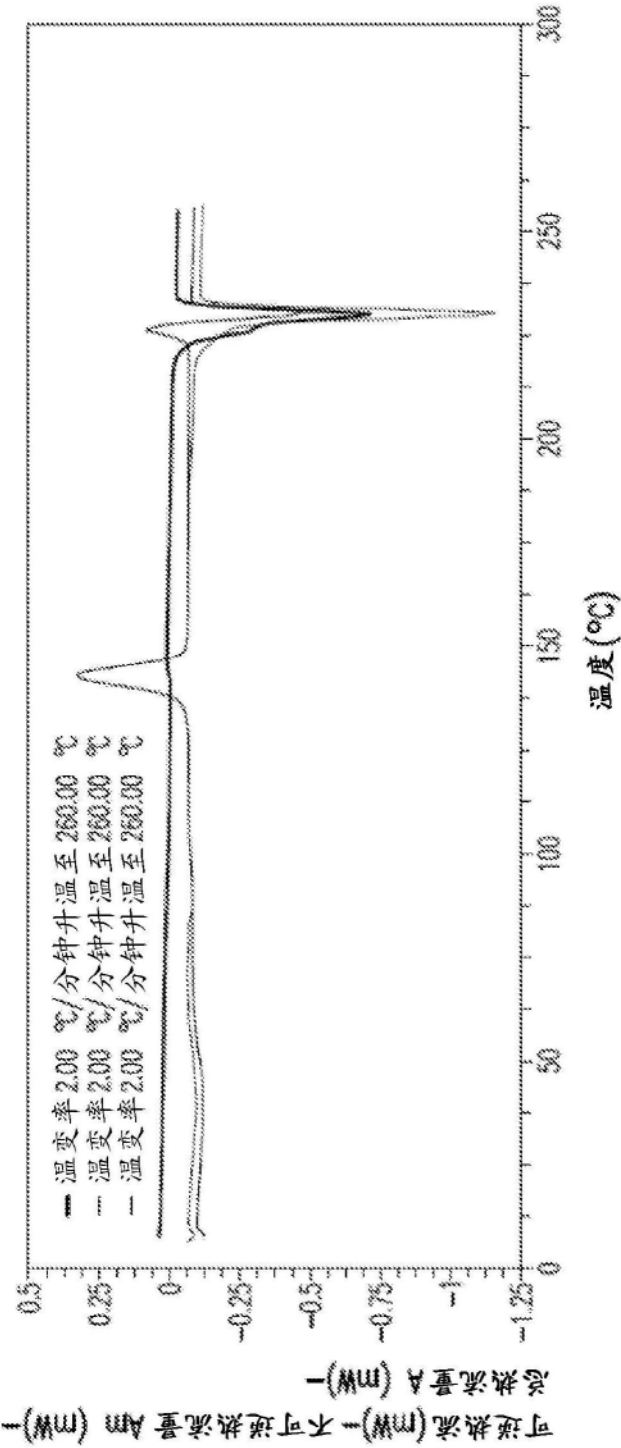


图27

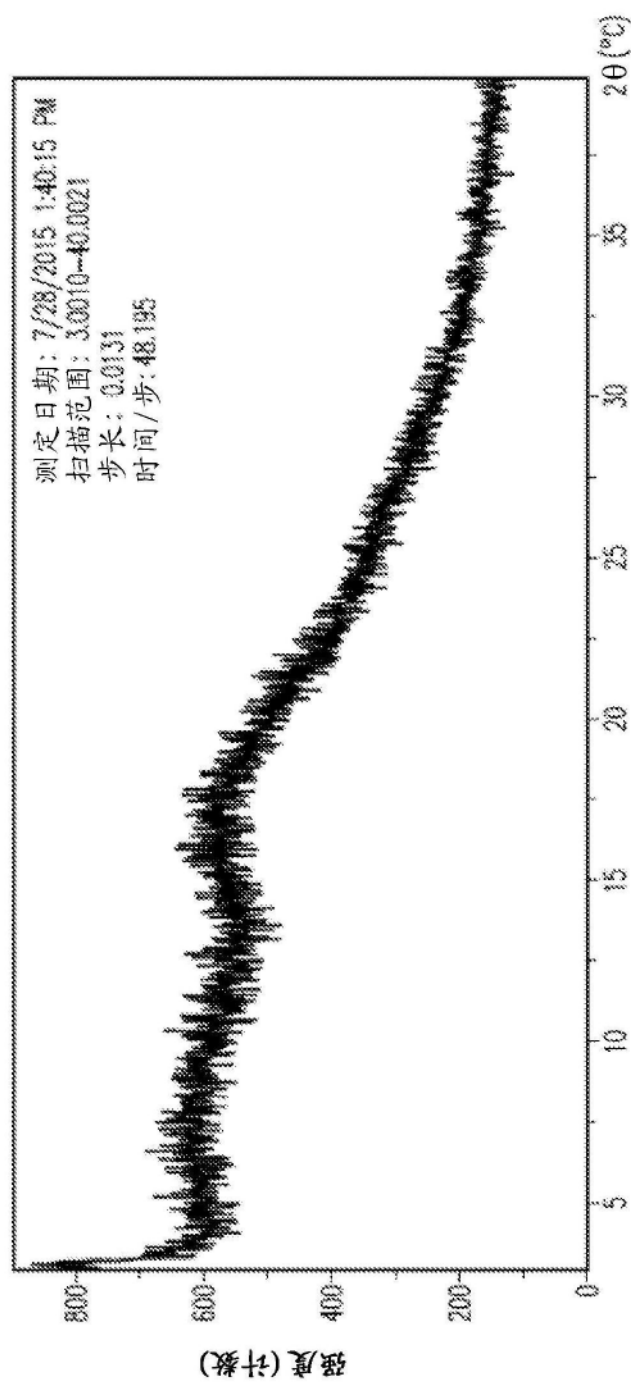


图28

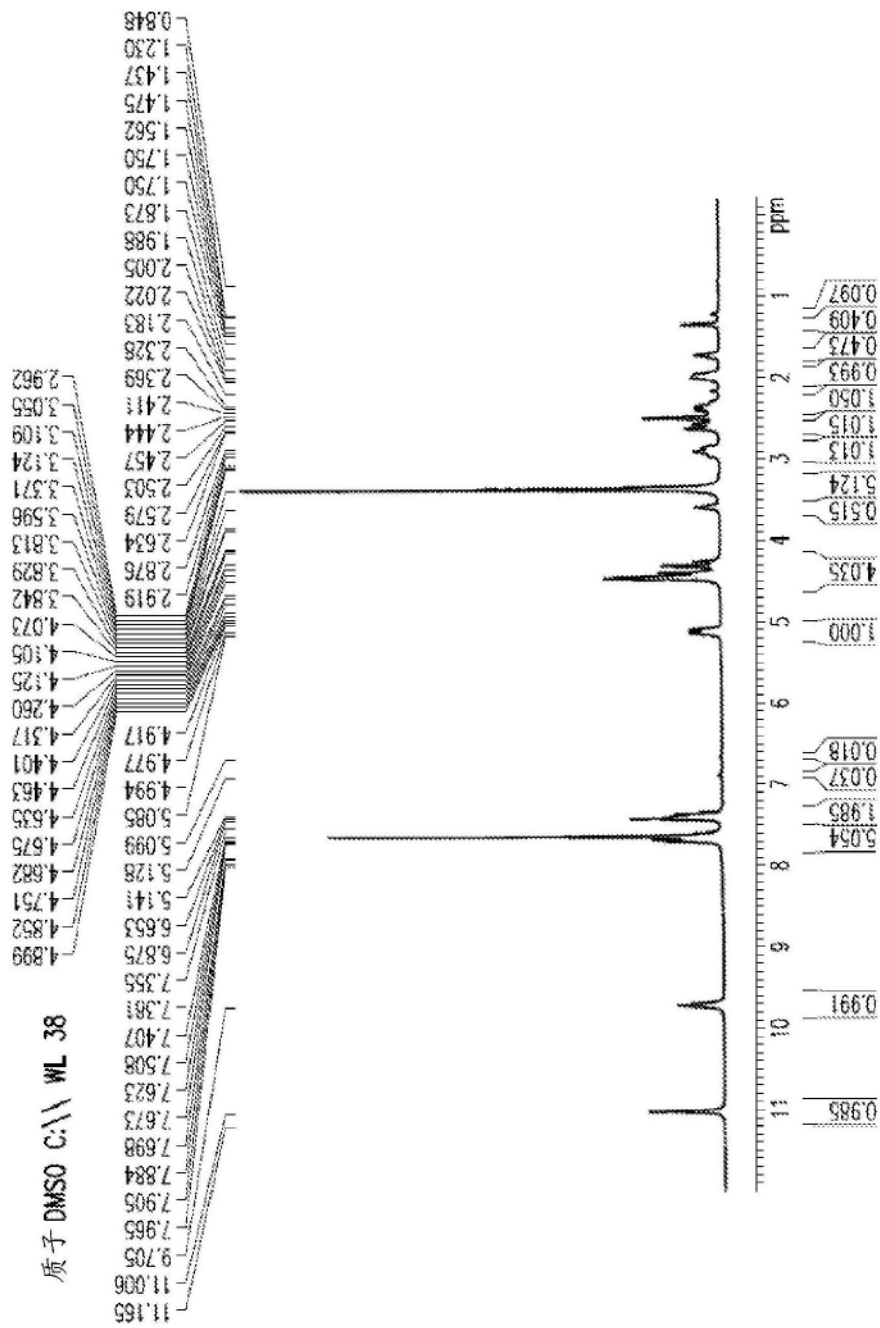


图29

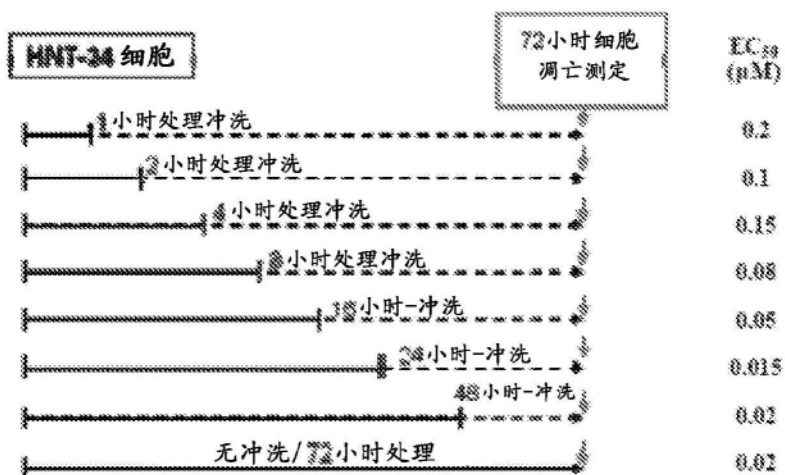


图30A

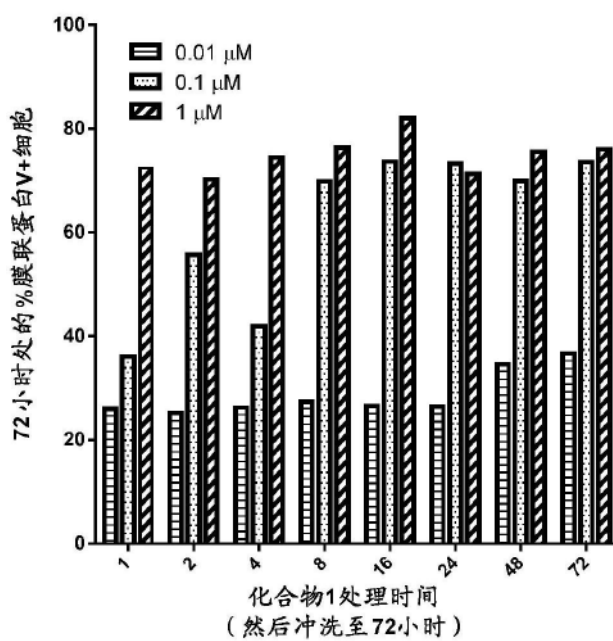


图30B

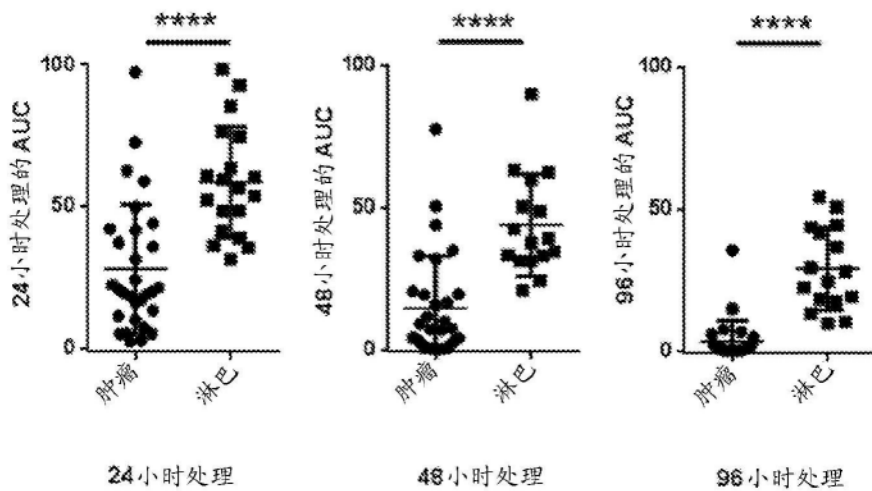


图31

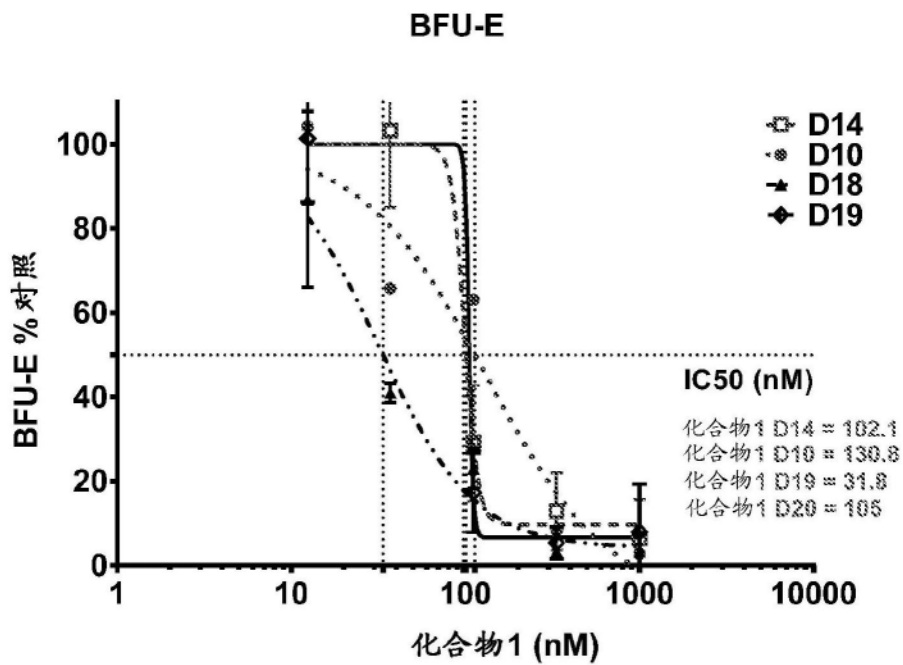


图32

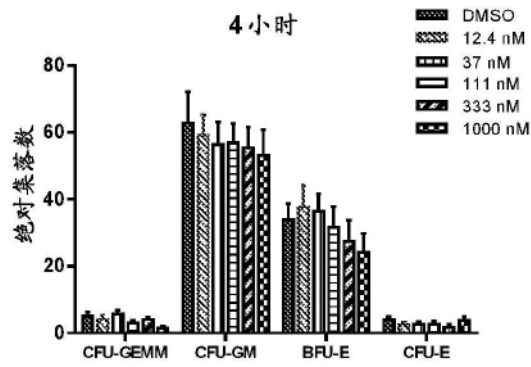


图33A

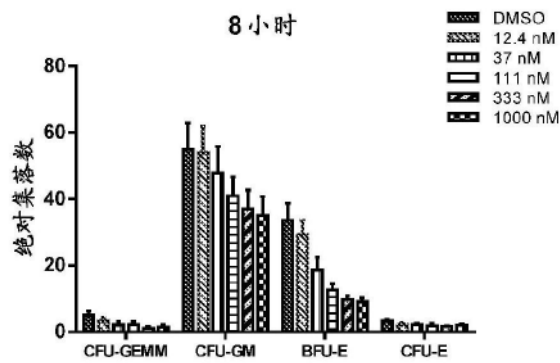


图33B

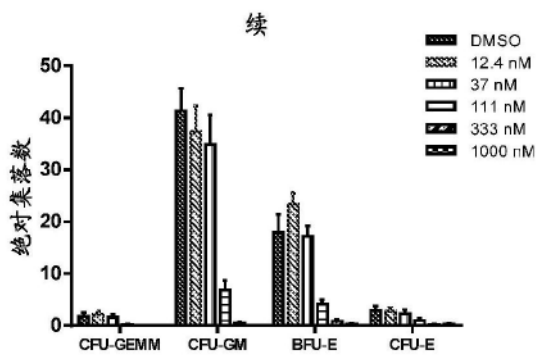


图33C

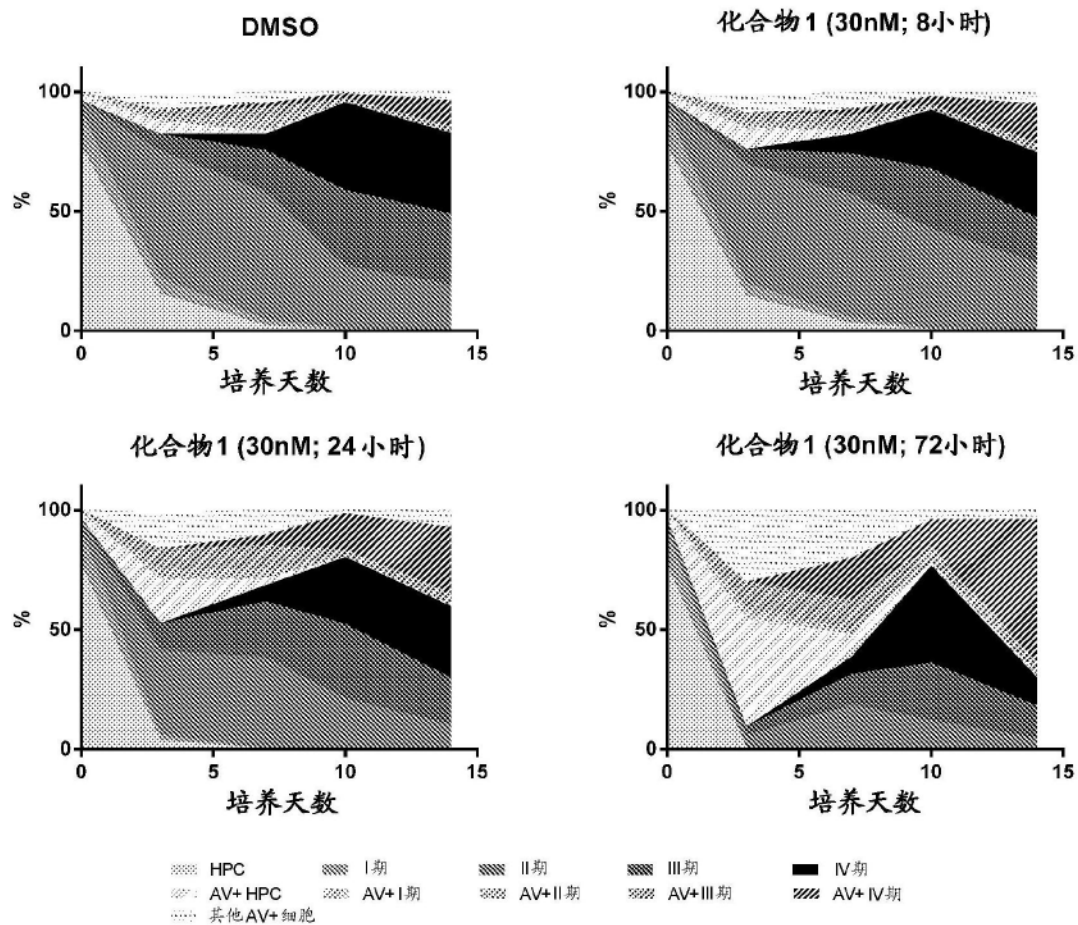


图34

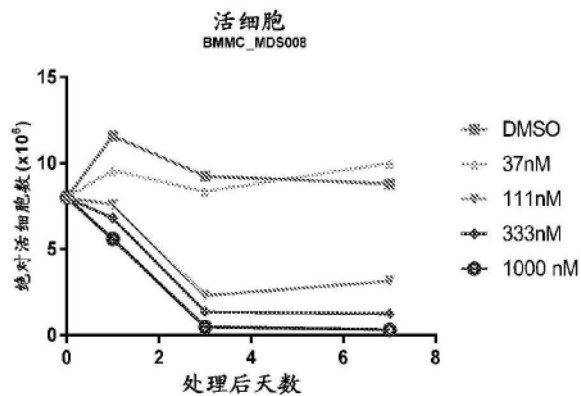


图35A

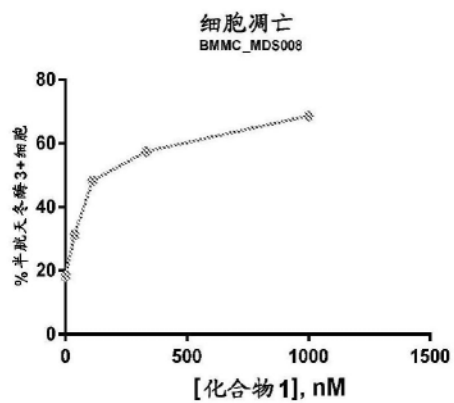


图35B

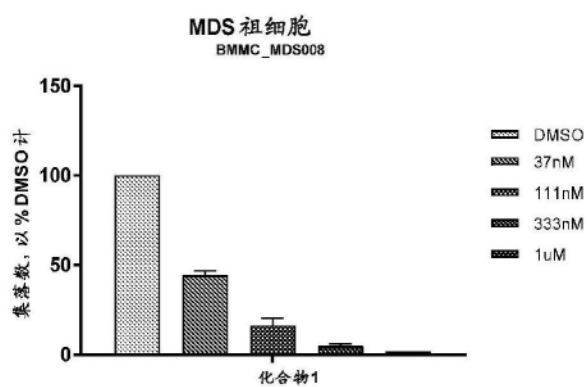


图35C

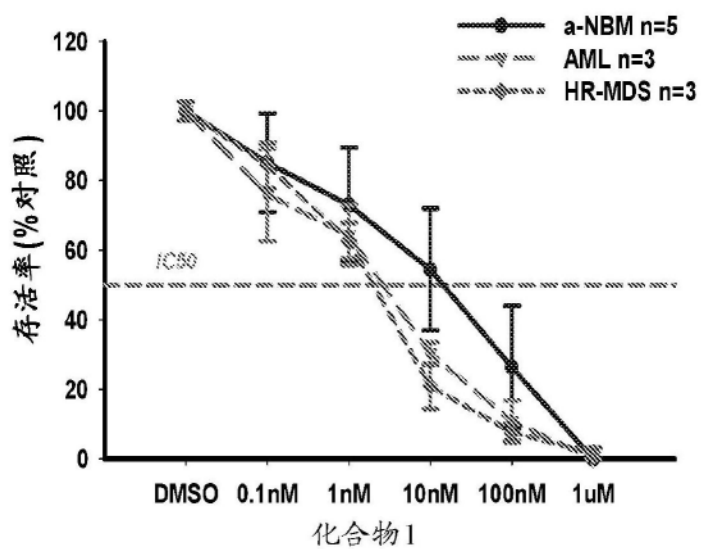


图36A

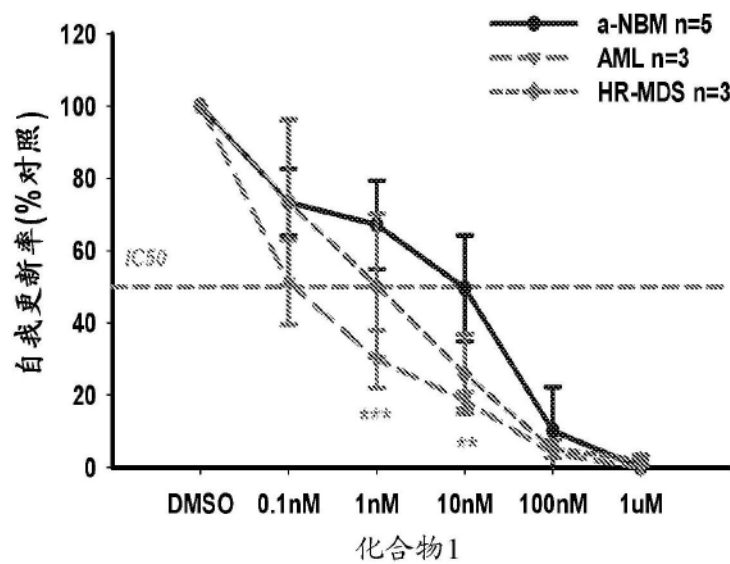


图36B