



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105073197 B

(45)授权公告日 2019.06.28

(21)申请号 201380069143.1

(22)申请日 2013.11.01

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105073197 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(30)优先权数据

4595/CHE/2012 2012.11.02 IN

61/771,812 2013.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.07.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/067956 2013.11.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/071125 EN 2014.05.08

(73)专利权人 TG疗法有限公司

地址 美国纽约

专利权人 理森制药股份公司

分馏及生物技术法国实验室

(72)发明人 迈克尔·魏斯 哈里·米斯金

彼得·斯波尔泰利

斯瓦鲁普·库马尔·V·S·瓦卡拉
恩卡

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 104470923 A, 2015.03.25,

WO 2010/014595 A2, 2010.02.04,

CN 101115772 A, 2008.01.30,

CN 101437956 A, 2009.05.20,

审查员 李双双

权利要求书4页 说明书44页

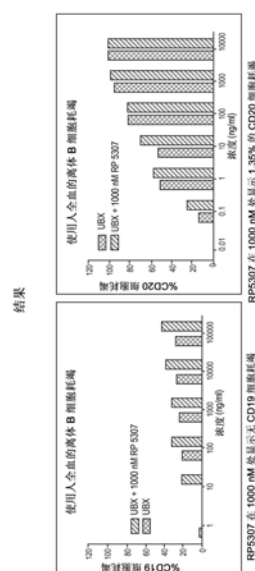
序列表5页 附图11页

(54)发明名称

抗CD20抗体和PI3K激酶选择性抑制剂的组合

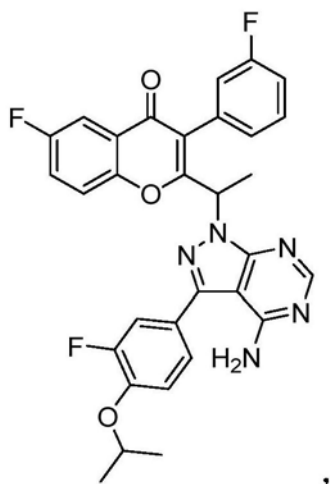
(57)摘要

在本文中提供了式A的化合物(PI3K δ 选择性抑制剂)与抗CD20抗体的高度有效的组合用于治疗和改善PI3K δ 和/或CD20介导的疾病和失调。特别是,该组合可以用于治疗癌症和自身免疫性疾病。更特别地,本发明提供了式A的化合物或其立体异构体和ublituximab的组合用于治疗 and/或改善血液系统恶性肿瘤如白血病和淋巴瘤。



1. 一种组合在制备用于抑制B细胞群体增殖的药物中的应用,所述组合包含:

(i) 式A的化合物的S-异构体,



(A)

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,和

(ii) 抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗CD20抗体是ublituximab,或结合于与ublituximab相同的表位。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述抗体或片段包括序列SEQ ID NO:1、2和3的VH CDR1、CDR2和CDR3区以及序列SEQ ID NO:6、7和8的VL CDR1、CDR2和CDR3区。

3. 根据权利要求2所述的应用,其中,所述抗CD20抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:9的VL。

4. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述式A的化合物是

(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的应用,其中,所述群体与包含以下的组合物接触:

(i) (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;以及

(ii) 抗CD20抗体。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的应用,其中,所述群体与以下接触:

(i) 第一组合物,所述第一组合物包含(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;以及

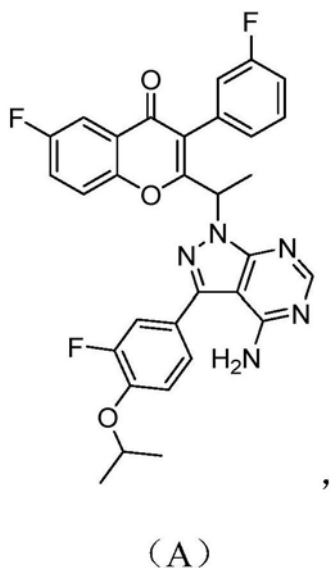
(ii) 第二组合物,所述第二组合物包含抗CD20抗体。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的应用,其中,所述抗CD20抗体是ublituximab。

8. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述化合物是(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮的对-甲苯磺酸盐。

9. 治疗组合中的以下各项在制备用于治疗与过度B细胞增殖相关的疾病或失调或用于治疗B细胞血液系统恶性肿瘤的药物中的应用:

(i) 式A的化合物的S-异构体,



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,和

(ii) 抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗CD20抗体是ublituximab,或结合于与ublituximab相同的表位。

10. 根据权利要求9所述的应用,其中,所述血液系统恶性肿瘤是淋巴瘤或白血病。

11. 根据权利要求10所述的应用,其中,所述血液系统恶性肿瘤选自由以下所组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、多发性骨髓瘤(MM)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(WM)、和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

12. 根据权利要求9-11中任一项所述的应用,其中,所述血液系统恶性肿瘤过表达CD20。

13. 根据权利要求9-11中任一项所述的应用,其中,所述血液系统恶性肿瘤是化疗难治的。

14. 根据权利要求9-11中任一项所述的应用,其中,受试者是利妥昔单抗难治的。

15. 根据权利要求9-11中任一项所述的应用,其中,先前已经用化疗、利妥昔单抗或它们的组合治疗所述受试者。

16. 根据权利要求9-11中任一项所述的应用,其中,将所述式A的化合物和所述抗CD20抗体或片段顺序地或同时地给予至受试者。

17. 根据权利要求16所述的应用,其中,所述式A的化合物和所述抗CD20抗体或片段包含于同一药物组合物或单独的药物组合物中。

18. 根据权利要求9-11中任一项所述的应用,其中,所述治疗组合包括至少一种另外的治疗剂。

19. 根据权利要求18所述的应用,其中,所述另外的治疗剂选自由以下所组成的组:蛋白酶体抑制剂、硼替佐米,卡非佐米、PR-047、双硫仑、乳胞素、PS-519、eponemycin、环氧酶素、阿克拉霉素、CEP-1612、MG-132、CVT-63417、PS-341、乙烯砒三肽抑制剂、利托那韦、PI-083、(+/-)-7-methylomuralide、(-)-7-methylomuralide、来那度胺和它们的组合。

20. 根据权利要求9-11中任一项所述的应用,所述治疗组合包含至少两种另外的治疗剂,所述两种另外的治疗剂选自以下所组成的组:

- a) CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松);
- b) R-CHOP (利妥昔单抗-CHOP);
- c) 超CV AD (超分割环磷酰胺、长春新碱、多柔比星、地塞米松、甲氨喋呤、阿糖胞苷);
- d) R-超CV AD (利妥昔单抗-超CV AD);
- e) FCM (氟达拉滨、环磷酰胺、米托蒽醌);
- f) R-FCM (利妥昔单抗、氟达拉滨、环磷酰胺、米托蒽醌);
- g) 硼替佐米和利妥昔单抗;
- h) 坦西莫司和利妥昔单抗;
- i) 坦西莫司和万珂.RTM.;
- j) 碘-131托西莫单抗 (百克沙.RTM.) 和CHOP;
- k) CVP (环磷酰胺、长春新碱、波尼松);
- l) R-CVP (利妥昔单抗-CVP);
- m) ICE (异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷);
- n) R-ICE (利妥昔单抗-ICE);
- o) FCR (氟达拉滨、环磷酰胺、利妥昔单抗);
- p) FR (氟达拉滨、利妥昔单抗); 和
- q) D.T.PACE (地塞米松、沙利度胺、顺铂、阿霉素、环磷酰胺、依托泊苷)。

21. 治疗组合中的以下各项在制备用于耗竭B细胞的药物中的应用:

(i) 化合物(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;以及

(ii) 至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗CD20抗体是ublituximab,或结合于与ublituximab相同的表位,

其中,所述耗竭B细胞包括使包含B细胞的组合物与所述药物接触。

22. 治疗组合中的以下各项在制备用于促进细胞凋亡的药物中的应用:

(i) 化合物(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;以及

(ii) 至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗CD20抗体是ublituximab,或结合于与ublituximab相同的表位,

其中,所述促进细胞凋亡包括使B细胞与所述药物接触。

23. 治疗组合中的以下各项在制备用于促进B细胞的细胞周期阻滞的药物中的应用:

(i) 化合物(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;以及

(ii) 至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗CD20抗体是ublituximab,或结合于与ublituximab相同的表位,

其中,所述促进细胞周期阻滞包括使细胞与所述药物接触。

24. 根据权利要求21-23中任一项所述的应用,其中,所述抗CD20抗体是ublituximab。

25. 根据权利要求21-23中任一项所述的应用,其中,顺序地或同时地递送所述化合物

和所述抗CD20抗体或片段。

26. 根据权利要求25所述的应用, 其中, 在同一组合物中或在单独的组合物中递送所述化合物和所述抗CD20抗体或片段。

27. 一种用于在权利要求1-26中任一项所述的应用中使用的试剂盒, 包括

(i) 式A的化合物的S-异构体、或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,

以及

(ii) 抗CD20抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗CD20抗体是ublituximab, 或结合于与ublituximab相同的表位。

28. 根据权利要求27所述的试剂盒, 其中, 所述式A的化合物是

(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮。

29. 根据权利要求27或28所述的试剂盒, 其中, 所述抗CD20抗体是ublituximab。

30. 根据权利要求29所述的试剂盒, 其中, 所述式A的化合物是(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮的对-甲苯磺酸盐。

31. 根据权利要求27-30中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述抗CD20抗体或片段和所述化合物包含在同一组合物内或在单独的组合物中。

32. 根据权利要求27-30中任一项所述的试剂盒, 进一步包括一种或多种另外的活性剂。

33. 一种药物组合物, 包含

(i) 化合物

(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮; 以及

(ii) 抗CD20抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗CD20抗体是ublituximab, 或结合于与ublituximab相同的表位。

34. 根据权利要求33所述的药物组合物, 其中, 所述抗CD20抗体是ublituximab。

35. 根据权利要求33-34中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述化合物是(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮的对-甲苯磺酸盐。

抗CD20抗体和PI3K激酶选择性抑制剂的组合

[0001] 本申请要求于2013年3月2日提交的临时申请美国序列号61/771,812的优先权,在此通过引用将其全部内容结合于此。

技术领域

[0002] 在本文中提供了式A的化合物(PI3K δ 选择性抑制剂)与抗CD20抗体的高度有效的组合用于治疗和改善PI3K δ 和/或CD20介导的疾病和失调。特别是,该组合可以用于治疗癌症和自身免疫性疾病。更特别地,本发明提供了式A的化合物或其立体异构体和ublituximab的组合用于治疗 and/或改善血液系统恶性肿瘤如白血病和淋巴瘤。

背景技术

[0003] 有大量的证据表明,在多种人类癌症、特别是在血液系统恶性肿瘤中,PI3K δ 酶和CD20均单独地促成肿瘤发生。磷酸肌醇3-激酶(PI3K)是一类酶家族,该类酶在所有细胞类型中通过产生磷酸肌醇第二信使分子调节多种生物学功能。由于这些磷酸肌醇第二信使的活性是由它们的磷酸化状态决定,起到修饰这些脂质的作用的激酶和磷酸酶对于细胞内信号转导事件的正确执行是极为重要的。PI3K在肌醇环的3-羟基残基处磷酸化脂质(Whitman et al., Nature 332:664 (1988))以产生磷酸化的磷脂(PIP3),其起到招募(recruiting)具有脂质结合结构域(包括plekstrin同源(PH)区)的激酶如Akt和磷酸肌醇依赖性激酶-1(PDK1)的第二信使的作用。使Akt与膜PIP3的结合引起Akt移位(translocation)至质膜,使Akt与PDK1(其负责活化Akt)接触。肿瘤抑制子磷酸酶PTEN(在染色体10上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物)去磷酸化PIP3并且因此起到Akt活化的负调节物的作用。PI3-激酶Akt和PDK1在许多细胞过程(包括细胞周期调节、增殖、存活、凋亡和运动性)的调节中是重要的,并且是疾病(如癌症、糖尿病和免疫炎症)的分子机制的重要组成部分(Vivanco et al., Nature Rev. Cancer 2:489 (2002); Phillips et al., Cancer 83:41 (1998))。

[0004] PI3K家族是由四种不同的类组成:I类、II类、III类和IV类。I类-III类是脂质激酶而IV类是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。

[0005] PI3K的I类家族的成员是调节和催化亚基的二聚体。I类家族由四种同种型组成,这四种同种型是由110kDa的催化亚基(α 、 β 、 γ 和 δ)决定的。参见Engelman J.A., Nat Rev Genet 7:606-619 (2006); Carnero A., Curr Cancer Drug Targets 8:187-198 (2008); 和 Vanhaesebroeck B., Trends Biochem Sci 30:194-204 (2005)。I类可分为两个亚类:Ia类,由p110 α 、 β 和 δ 和调节亚基(p85、p55或p50)的组合形成;和Ib类,由p110 γ 和p101调节亚基形成。

[0006] 由各研究小组已经公开了关于PI3K和相关蛋白激酶途径的研究,包括:Liu et al., Nature Reviews Drug Discovery 8:627-644 (2009); Nathan et al., Mol. Cancer Ther. 8(1) (2009); 和 Marone et al., Biochimica et Biophysica Acta 1784:159-185 (2008)。两种已知PI3K抑制剂LY294002和渥曼青霉素(Wortmannin)是非特异性PI3K抑制剂,因为它们不能区分I类PI3K的四个成员: α 、 β 、 γ 和 δ 。大量PI3K抑制剂已进入临床试验用

于治疗癌症,并且各种类型的癌(包括乳癌、非小细胞肺癌(NSCLC)和血液系统癌)被认为是治疗感兴趣的区域。

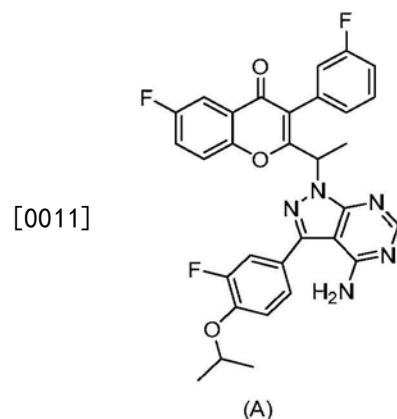
[0007] CD20是具有35-37kDa分子量的疏水性跨膜蛋白,它存在于成熟B淋巴细胞的表面上。在B淋巴细胞的发育期间,从早期B前体阶段时起直到分化至浆细胞(在此阶段该表达消失)表达CD20。CD20存在于正常B淋巴细胞和恶性B细胞,包括大多数非霍奇金氏B细胞淋巴瘤(NHL)和B型慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)。CD20抗原不在造血干细胞或浆细胞上表达。

[0008] 抗CD20抗体已经被开发、并且持续的被开发用于B细胞疾病的治疗。已经报道了抗CD20抗体利妥昔单抗的成功。然而,存在相当数量的患者,这些患者用利妥昔单抗是难以治愈的或这些患者在利妥昔单抗(作为单一药剂使用或者甚至与化疗方案联用)的长期治疗过程中发生抵抗。

[0009] 因此,需要更有效的疗法用于治疗 and/或改善与PI3K δ 酶和/或CD20蛋白质的调节有关的疾病或失调,特别是用于治疗 and/或改善B细胞疾病。

发明内容

[0010] 本发明涉及一种组合,该组合包含:式(A)的化合物,其是PI3K δ 选择性抑制剂,



[0012] 和其立体异构体、其互变异构体、其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药,以及至少一种抗CD20抗体。

[0013] 该组合适合于在与PI3K δ 酶相关的和/或CD20蛋白相关的疾病、失调或病况(condition)例如增生性疾病如癌症的治疗中使用。特别是,该组合适用于治疗和/或改善B细胞疾病(例如,血液系统恶性肿瘤)。

[0014] 因此,在一些实施方式中,提供了抑制细胞群体的增殖的方法。在一些实施方式中,该方法包括使群体与包含以下的组合接触:(i)式A的化合物、其立体异构体、其互变异构体或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,(ii)和抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,该抗CD20抗体或片段结合于与ublituximab相同的表位(抗原决定基,epitope)。

[0015] 在一些实施方式中,方法包括使细胞群体与包含以下的组合接触:(i)式A的化合物、其立体异构体、其互变异构体或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,以及(ii)抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,该抗CD20抗体或片段表现出对Fc- γ RIII(CD16)的高亲和力。

[0016] 在一些实施方式中,方法包括使细胞群体与包含以下的组合接触:(i)式A的化合物、其立体异构体、其互变异构体或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,以及(ii)抗

CD20抗体或其抗原结合片段,其中,该抗体或片段的岩藻糖含量是小于65%。

[0017] 在一些实施方式中,方法包括使细胞群体与包含以下的组合接触:(i)式A的化合物、其立体异构体、其互变异构体或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,以及(ii)抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,该抗体或片段包括序列SEQ ID NO:1、2和3的VH CDR1、CDR2和CDR3区和序列SEQ ID NO:6、7和8的VL CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施方式中,抗CD20抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:9的VL。在一些实施方式中,抗CD20抗体是ublituximab。

[0018] 在一些实施方式中,式A的化合物是

[0019] (RS)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0020] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;或

[0021] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮。

[0022] 在一些实施方式中,式A的化合物是(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮。

[0023] 在一些实施方式中,抑制细胞群体增殖的方法包括使群体与包含以下的组合接触:(i)至少一种选自由以下所组成的组中的化合物:2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和(R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及(ii)至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段。

[0024] 在一些实施方式中,抑制细胞群体增殖的方法包括使群体与包含以下的组合接触:(i)选自由以下所组成的组中的化合物:2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和(R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及(ii)至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,该抗CD20抗体或其片段是选自由结合于与以下相同的表位的抗体及其片段组成的组:ublituximab、利妥昔单抗、奥法木单抗、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、维妥珠单抗、GA101、AME-133v、PR0131921、托西莫单抗、hA20和PR070769。

[0025] 在一些实施方式中,使群体与包含以下的组合物接触:(i)选自由以下所组成的组中的化合物:

[0026] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0027] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0028] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙

基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及

[0029] (ii) 抗CD20抗体。

[0030] 在一些实施方式中,使群体与以下接触:(i) 第一组合物,该第一组合物包含选自以下所组成的组中的化合物:

[0031] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0032] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0033] 1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及

[0034] (ii) 包含抗CD20抗体的第二组合物。

[0035] 在一些实施方式中,群体包括B细胞。

[0036] 在一些实施方式中,群体是在人受试者中。

[0037] 在一些实施方式中,受试者患有与B细胞过度增殖相关的疾病或失调。

[0038] 在一些实施方式中,受试者患有癌症。在一些实施方式中,癌症是血液系统恶性肿瘤。在一些实施方式中,血液系统恶性肿瘤是淋巴瘤或白血病。在一些实施方式中,血液系统恶性肿瘤选自以下所组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、多发性骨髓瘤(MM)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(WM)、B细胞淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方式中,该癌症过量表达CD20。在一些实施方式中,该癌症是化疗难治的。

[0039] 在一些实施方式中,受试者患有自身免疫性疾病或失调。在一些实施方式中,自身免疫性疾病或失调是过敏性鼻炎、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)或类风湿性关节炎。

[0040] 在一些实施方式中,该受试者是利妥昔单抗难治的。

[0041] 在一些实施方式中,受试者先前已使用化疗、利妥昔单抗或它们组合治疗。

[0042] 在一些实施方式中,顺序给予(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮和抗CD20抗体或片段。

[0043] 在一些实施方式中,同时给予(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮和抗CD20抗体或片段。在一些实施方式中,(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮和抗CD20抗体或片段包含于同一药物组合物中。在一些实施方式中,(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮和抗CD20抗体或片段是在分离的药物组合物中。

[0044] 在一些实施方式中,方法进一步包括向受试者给予至少一种另外的治疗剂。在一些实施方式中,至少一种另外的治疗剂选自以下所组成的组:蛋白酶体抑制剂、硼替佐米(万珂®, Velcade®),卡非佐米(PR-171)、PR-047、双硫仑、乳胞素、PS-519、eponemycin、环氧霉素(epoxomycin)、阿克拉霉素、CEP-1612、MG-132、CVT-63417、PS-341、乙烯砒三肽抑

制剂、利托那韦、PI-083, (+/-)-7-methylomuralide、(-)-7-methylomuralide、来那度胺和它们的组合。

[0045] 在一些实施方式中,方法进一步包括向受试者给予至少两种另外的治疗剂,其中,至少两种另外的治疗剂选自以下所组成的组:a) CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松); b) R-CHOP (利妥昔单抗-CHOP); c) 超CV AD (超分割环磷酰胺、长春新碱、多柔比星、地塞米松、甲氨喋呤、阿糖胞苷); d) R-超CV AD (利妥昔单抗-超CV AD); e) FCM (氟达拉滨、环磷酰胺、米托蒽醌); f) R-FCM (利妥昔单抗、氟达拉滨、环磷酰胺、米托蒽醌); g) 硼替佐米和利妥昔单抗; h) 坦西莫司和利妥昔单抗; i) 坦西莫司和万珂®; j) 碘-131托西莫单抗 (百克沙 (Bexxar).RTM.) 和CHOP; k) CVP (环磷酰胺、长春新碱、泼尼松); l) R-CVP (利妥昔单抗-CVP); m) ICE (异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷); n) R-ICE (利妥昔单抗-ICE); o) FCR (氟达拉滨、环磷酰胺、利妥昔单抗); p) FR (氟达拉滨,利妥昔单抗); 和q) D.T.PACE (地塞米松、沙利度胺、顺铂、阿霉素、环磷酰胺、依托泊苷)。

[0046] 在一些实施方式中,提供了用于耗竭B细胞的方法。在一些实施方式中,方法包括使包含B细胞的组合物与以下接触: (i) 至少一种选自以下所组成的组的式A的化合物: 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮; (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮; 和 (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮, 以及 (ii) 至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段。

[0047] 在一些实施方式中,提供了用于促进细胞凋亡的方法。在一些实施方式中,方法包括使B细胞与以下接触: (i) 至少一种式A的化合物,该化合物选自以下所组成的组: 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮; (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮; 和 (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮, 以及 (ii) 至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段。

[0048] 在一些实施方式中,提供了用于促进细胞周期阻滞的方法。在一些实施方式中,方法包括使细胞与以下接触: (i) 至少一种式A的化合物,该化合物选自以下所组成的组: 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮; (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮; 和 (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮, 以及 (ii) 至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段。

[0049] 在一些实施方式中,顺序递送式A的化合物和抗CD20抗体或片段。

[0050] 在一些实施方式中,同时递送式A的化合物和抗CD20抗体或片段。在一些实施方式中,在同一组合物中递送式A的化合物和抗CD20抗体或片段。在一些实施方式中,在分离的组合物中递送式A的化合物和抗CD20抗体或片段。

[0051] 在本文中还提供了试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒包括 (i) 式A的化合物、其立体异构体、其互变异构体或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药, 以及 (ii) 使用与抗CD20

抗体或其抗原结合片段组合的化合物的说明书,其中,该抗CD20抗体或片段(a)结合于与ublituximab相同的表位,(b)表现出对Fc- γ RIII(CD16)的高亲和力或(c)或具有小于65%的岩藻糖含量。

[0052] 在一些实施方式中,试剂盒包含(i)至少一种选自由以下所组成的组中的化合物:

[0053] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0054] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0055] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及

[0056] (ii)使用与抗CD20抗体或其抗原结合片段组合的化合物的说明书。

[0057] 在一些实施方式中,试剂盒进一步包括抗CD20抗体或片段。

[0058] 在一些实施方式中,试剂盒包括(i)至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段和(ii)使用与至少一种选自由以下所组成的组的化合物组合的抗CD20抗体或片段的说明书:

[0059] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0060] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0061] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,

[0062] 其中,该抗CD20抗体或其片段(a)结合于与ublituximab相同的表位,(b)表现出对Fc- γ RIII(CD16)的高亲和力或(c)具有小于65%的岩藻糖。

[0063] 在一些实施方式中,该试剂盒包括(i)至少一种抗CD20抗体或其抗原结合片段和(ii)使用与选自由以下所组成的组的至少一种化合物组合的抗CD20抗体或片段的说明书:

[0064] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0065] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和,

[0066] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮。

[0067] 在一些实施方式中,试剂盒包括(i)选自由以下所组成的组中的化合物:

[0068] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0069] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0070] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及

[0071] (ii)抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,该抗CD20抗体或片段(a)结合于与ublituximab相同的表位,(b)表现出对Fc- γ RIII(CD16)的高亲和力或(c)具有小于65%的

岩藻糖含量。

[0072] 在一些实施方式中,试剂盒包括(i)选自由以下所组成的组中的化合物:

[0073] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0074] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0075] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及

[0076] (ii)抗CD20抗体或其抗原结合片段。

[0077] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段与化合物包含在同一组合物中。

[0078] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或片段和化合物是在分离的组合物中。

[0079] 在一些实施方式中,试剂盒另外包括一种或多种另外的活性剂。

[0080] 在本文中还提供了药物组合物。在一些实施方式中,药物组合物包含(i)选自由以下所组成的组中的化合物:

[0081] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0082] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0083] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及

[0084] (ii)抗CD20抗体或其抗原结合片段。

[0085] 在一些实施方式中,药物组合物包含(i)选自由以下所组成的组中的化合物:

[0086] 2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0087] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮;和

[0088] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮,以及

[0089] (ii)抗CD20抗体或其抗原结合片段,其中,该抗CD20抗体或片段(a)结合于与ublituximab相同的表位,(b)表现出对Fc- γ RIII(CD16)的高亲和力或(c)具有小于65%的岩藻糖含量。

附图说明

[0090] 图1:示出式A的化合物的S-异构体和Ublituximab对于来自于人全血的CD19-阳性细胞耗竭(左)和CD20-阳性细胞耗竭(右)的影响的条形图。

[0091] 图2:示出式A的化合物的S-异构体和Ublituximab对LPS诱导的CD19-阳性细胞增殖的影响的条形图。

[0092] 图3:示出式A的化合物的S-异构体和Ublituximab对LPS诱导的CD20-阳性细胞增殖的影响的条形图。

[0093] 图4:示出式A的化合物的S-异构体和Ublituximab在Daudi、RPMI-8226、Raji和U266B1细胞中对凋亡的影响的条形图。

[0094] 图5:示出式A的化合物的S-异构体在U266B1细胞中对细胞周期的影响的柱状图。

[0095] 图6:示出抗CD20抗体ublituximab在U266B1细胞中对细胞周期的影响的柱状图。

[0096] 图7:示出式A的化合物的S-异构体和抗CD20抗体ublituximab在U266B1细胞中对细胞周期的影响的柱状图。

[0097] 图8:示出式A的化合物的S-异构体在Raji细胞中对细胞周期的影响的柱状图。

[0098] 图9:示出抗CD20抗体ublituximab在Raji细胞中对细胞周期的影响的柱状图。

[0099] 图10:示出式A的化合物的S-异构体和抗CD20抗体ublituximab在Raji细胞中对细胞周期的影响的柱状图。

[0100] 图11:示出式A的化合物的S-异构体和Ublituximab在LY1细胞中对凋亡的影响的半胱天冬酶3活性示图。

[0101] 图12:示出式A的化合物的S-异构体和Ublituximab在Raji细胞中对凋亡的影响的半胱天冬酶3活性示图。。

具体实施方式

[0102] I. 限定

[0103] 为了便于理解本发明,如下限定许多术语和短语。

[0104] 除非另外指出,术语“CD20”(也被称为B淋巴细胞CD20抗原、MS4A1、B淋巴细胞表面抗原B1、Bp35、白细胞表面抗原Leu-16)是指任何天然的CD20。术语“CD20”包括由细胞内加工产生的“全长”、未加工的CD20以及任何形式的CD20。该术语还包括天然存在的CD20的变体,例如剪接变体、等位基因变体和同种型。在本文中描述的CD20多肽可以从各种来源如从人组织类型或从其他来源分离或通过重组或合成方法制备。CD20序列的实例包括但不限于NCBI参考号NP068769.2和NP690605.1。

[0105] 术语“抗体”指免疫球蛋白分子,该分子通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合于靶,如蛋白质、多肽、肽、糖、多核苷酸、脂质或上述的组合。如在本文中使用的,术语“抗体”包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体如由至少两种完整抗体产生的双特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要该抗体表现出希望的生物学活性。分别基于被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的抗体的重链恒定结构域,抗体可以是所有的5类主要的免疫球蛋白:IgA、D、IgE、IgG和IgM或其亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)的抗体。不同类的免疫球蛋白具有不同的和众所周知的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸的或结合到其他分子如毒素、放射性同位素、蛋白质,等等。

[0106] “阻断(blocking)”抗体或“拮抗剂”抗体是一种这样的抗体,其抑制或降低其结合的抗原如CD20的生物学活性。在一些实施方式中,阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物学活性。期望地,生物学活性降低了10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0107] 术语“抗CD20抗体”或“与CD20结合的抗体”是指能够以足够的亲和力结合CD20的

抗体,使得该抗体在靶向CD20方面可用作诊断和/或治疗剂。如所测量的例如,通过放射免疫测定(RIA)抗CD20抗体与不相关的,非CD20蛋白质的结合程度比该抗体与CD20的结合小约10%。在一些实施方式中,与CD20结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。

[0108] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分,并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0109] “单克隆抗体”是指在单个抗原决定簇或者表位的高度特异性识别和结合中所涉及的均一抗体群体。与之形成对比的是多克隆抗体,其通常包括不同抗原决定簇针对的不同抗体。术语“单克隆抗体”包括完整的和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包括抗体部分的融合蛋白质和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以许多方式(包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物)制造的这样的抗体。

[0110] 术语“人源化抗体”是指非人(例如,鼠科动物)抗体的形式,该抗体是特异的免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段,其包含最小的非人(例如,鼠科动物)序列。典型地,人源化抗体是人免疫球蛋白,其中,由具有期望的特异性、亲和力和能力的非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的CDR的残基取代来自互补决定区(CDR)的残基(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))。在一些实例中,用具有期望的特异性、亲和力和能力的来自于非人物种的抗体中的相应残基取代人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基。可以通过取代在Fv框架区和/或在置换的非人残基内的另外的残基进一步修饰人源化抗体以改进和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。总体上,人源化抗体将包括基本上所有的至少一种、典型是两种或三种可变区,该可变区包括所有或基本上所有的CDR区,该CDR区对应于非人免疫球蛋白,而所有的或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体也可以包括至少一部分免疫球蛋白(通常是人免疫球蛋白)的恒定区或结构域(Fc)。在美国专利US 5,225,539或US 5,639,641中描述了用于产生人源化抗体的方法的实例。

[0111] 抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区,单独地或组合地。重链和轻链的可变区各自由4个框架区(FR)组成,这4个框架区是由也称为高变区的三个互补决定区(CDR)连接的。在各链中的CDR由FR非常接近地(close proximity)保持在一起,并且连同另一条链的CDR一起,促使抗体的抗原结合位点的形成。有至少两种技术用于确定CDR:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即,Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.));和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani et al. J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997))。另外,在本领域中有时使用这两种方法的组合以确定CDR。

[0112] 当涉及在可变区中(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)的残基时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

[0113] 如在Kabat中,氨基酸位置编号是指在Kabat et al., Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 中, 用于抗体的编辑的重链可变区或轻链可变区的编号系统。使用此编号系统, 实际的线性氨基酸序列可包含较少或另外的氨基酸, 该氨基酸相应于可变区的FR或CDR的缩短或插入。例如, 重链可变区可以包括在H2的残基52后单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)以及在重链FR残基82后插入的残基(例如, 根据Kabat的残基82a、82b和82c, 等等)。对于给定的抗体, 用“标准”Kabat编号序列通过对准抗体的同源序列区域可以确定残基的Kabat编号。Chothia指的不是结构环的位置(Chothia和Lesk, 分子生物学杂志(J. Mol. : 901-917 (1987))。当使用Kabat编号惯例编号时, 取决于该环的长度, Chothia CDR-H1环的末端在H32和H34之间变化(这是因为Kabat编号方案在H35A和H35B处放置插入; 如果35A和35B都不存在时, 则环终止于32; 如果仅存在35A, 则环终止于33; 如果35A和35B均存在, 则环终止于34)。AbM高变区代表在Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷, 并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用该AbM高变区。

环	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H31-H35B	H26-H32..34
(Kabat 编号)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
(Chothia 编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0114] 术语“人抗体”是指由人产生的抗体或者使用本领域已知的任何技术制造的具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种限定包括完整抗体或全长抗体、其片段和/或包括至少一种人重和/或轻链多肽的抗体, 如, 例如, 包括鼠科动物轻链和人重链多肽的抗体。

[0115] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两种或更多种物种的抗体。通常, 轻链和重链的可变区均对应于衍生自哺乳动物(例如, 小鼠、大鼠、兔, 等等)的一个物种的具有希望的特异性、亲和力和能力的抗体的可变区, 而恒定区同源衍生自另一物种(通常是人)的抗体中的序列以避免在该物种中引发免疫应答。

[0116] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可替交地使用并且是指能够由特定抗体识别并且特异性结合的抗原的部分。当抗原是多肽时, 通过蛋白的三级折叠, 可以由并列的连续氨基酸和不连续的氨基酸形成表位。由连续氨基酸形成的表位通常在蛋白变性时保留, 而由三级折叠形成的表位在蛋白质变性时通常丢失。在独特空间构象中, 表位通常包括至

少3和更常见的,至少5个或8-10个氨基酸。

[0118] “结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单个结合位点和其结合伴侣(例如,抗原)之间非共价相互作用之和的强度。除非另有说明,如在本文中使用的,“结合亲和力”是指本征结合亲和力,这反映了结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用。分子X对其伴侣Y的亲和力通常可以由解离常数(Kd)表示。可以通过本领域已知的常用方法、包括本文中所描述的那些方法来测量亲和力。低亲和力抗体通常缓慢结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长久的结合。测量结合亲和力的多种方法在本领域中是已知的,其中任何一种方法均可用于本发明的目的。在本文中描述了具体示例性的实施方式。

[0119] 当在本文中使用“或者更好”是指结合亲和力时指的是在分子和其结合伴侣之间更强的结合。当在本文中使用“或者更好”是指更强的结合,其由较小的数值Kd值代表。例如,抗体针对抗原具有“0.6nM或更好的”的亲和力,则抗体针对该抗原的亲和力是 $<0.6\text{nM}$,即0.59nM、0.58nM、0.57nM等等或小于0.6nM的任何值。

[0120] 如在本文中使用的短语“基本上相似的”或“基本上相同的”,表示在两个数值(通常一个与本发明的抗体相关并且另一个与参考/比较抗体相关)之间足够高程度的相似性,使得本领域的技术人员将两个值之间的差异认为由所述值(例如,Kd值)测量的生物学特性的范围内几乎没有(little or no)生物学和/或统计学显著性。在所述两个值之间的差异是小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%,作为参考/比较抗体值的函数。

[0121] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是在自然界中未发现形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已经纯化到一定程度的那些,它们不再存在于在自然界中发现的形式中。在一些实施方式中,分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物基本上是纯的。

[0122] 如在本文中使用的,“基本上纯的”是指材料至少50%纯(即不含污染物)、至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或至少99%纯。

[0123] 术语“癌症”和“癌性的”是指或描述哺乳动物中的生理病况,其中,一群细胞的特征在于不受控制的细胞生长。癌症的实例包括但不限于癌(carcinoma)、淋巴瘤、母细胞瘤(blastoma)、肉瘤和白血病。这样的癌症更特别的实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤(glioblastoma)、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈部癌。

[0124] “肿瘤”及“赘生物”是指任何组织块,其起因于细胞过度生长或增殖,是或者良性(非癌性的)或恶性的(癌性的),包括癌前病变。

[0125] 术语“癌细胞”、“肿瘤细胞”和语法上的等价词是指来源于肿瘤或癌前病变的细胞的总群体,包括非致瘤性细胞,其包括大量(bulk)的肿瘤细胞群体,和致瘤性干细胞(癌症干细胞)。如在本文中使用的,当仅仅涉及那些缺乏更新和分化的能力的那些肿瘤细胞时,术语“肿瘤细胞”将由术语“非致瘤性”修饰以将那些肿瘤细胞与癌症干细胞区分开来。

[0126] 术语“受试者”是指任何动物(例如,哺乳动物),包括,但不限于人、非人灵长类、啮

齿动物,等等,其将会是特定治疗的接受者。通常,涉及人受试者,术语“受试者”和“患者”在本文中可交替地使用。

[0127] 细胞“群体”可指单个细胞或多个细胞。单个细胞或多个细胞可以是在培养物中的细胞或在生物体中的细胞。例如,细胞群体可以是在受试者或患者中。

[0128] 术语“药物制剂”是指这样的制备品,其是这样的形式以允许活性成分的生物学活性是有效的,并且其不含另外的成分,该成分对于该制剂将给予的受试者而言是不可接受的毒性的。这样的制剂可以是无菌的。

[0129] 如在本文中公开的,抗体的“有效量”是足以进行特定说明的目的量。与说明的目的有关,可以凭经验和通常方法确定“有效量”。

[0130] 术语“治疗有效量”是指在受试者或哺乳动物中抗体或其他药物有效“治疗”疾病或失调的量。在癌症的情况下,治疗有效量的药物可以减少癌细胞的数量;降低肿瘤的尺寸;抑制(即,一定程度地减缓并且在一些实施方式中,终止)癌细胞浸润至周围器官中;抑制(即,一定程度地减缓并且在一些实施方式中,终止)肿瘤转移;一定程度地抑制肿瘤生长;和/或一定程度地减轻与癌症相关的病症中的一种或多种。参见“治疗”在本文中的限定。药物可以一定程度地阻止生长和/或杀死存在的癌细胞,它可以是抑制细胞生长的和/或细胞毒性的。“预防有效量”是指在剂量上和在必需的时间阶段内有效达到希望的预防效果的量。通常但不是必须地,由于在疾病之前或在疾病的早期阶段在受试者中使用预防剂量,预防有效量将小于治疗有效量。

[0131] 术语如“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“治疗(to treat)”或“缓解(alleviating)”或“缓解(to alleviate)”是指1) 治疗措施,该措施治愈、减缓、减少诊断的病理病况或失调的症状和/或停止诊断的病理病况或失调的进展和2) 预防或预防性措施,该措施防止和/或减缓目标病理状态或失调的发展。因此,需要治疗的那些包括已患失调的那些;倾向于发生失调的那些;和待防止失调的那些。在一些实施方式中,如果患者表现出以下一种或多种,那么根据本发明的方法,受试者的癌症被成功“治疗”:恶病质降低、存活时间增加、肿瘤进展时间的延长、肿瘤块减小、肿瘤负荷减小和/或肿瘤转移时间的延长、肿瘤复发的时间、肿瘤反应、完全反应、部分反应、稳定疾病、进展的疾病、无进展生存率(PFS)、总生存率(OS),由美国国家癌研究所(National Cancer Institute)和美国食品和药品管理局(U.S.Food and Drug Administration)设置的用于批准新药的标准测量每一个。参见Johnson et al, J.Clin.Oncol.21(7):1404-1411(2003)。

[0132] 抗CD20抗体和PI3K δ 选择性抑制剂的“组合”是指抗CD20抗体或其片段和如在本文中限定的化合物A,打算将它们同时地、顺序地、或同时并且顺序地给予细胞的相同群体或相同受试者。因此,通过实例的方式,在给予化合物A之前或之后(例如,经过小时、天、周或月)给予抗CD20抗体或其片段构成给予抗CD20抗体或其片段和化合物A的组合。另外,同时给予抗CD20抗体或其片段与化合物A也构成给予抗CD20抗体或其片段与化合物A的组合,不拘于是否在单一药物制剂中一起给予抗CD20抗体或其片段和化合物A或通过相同或不同的给予途径在单独的药物制剂中同时给予抗CD20抗体或其片段和化合物A。

[0133] 一种肿瘤,该肿瘤对于用抗CD20抗体的治疗“不响应”、“响应很差”或是“难治的”,在公认的动物模型或人临床试验中,与未治疗或用安慰剂治疗相比,在该肿瘤对于抗CD20抗体治疗的响应方面未显示统计上显著的改善,或者该肿瘤响应用抗CD20抗体的初始治

疗,但是随着治疗持续继续生长。

[0134] 使用实验室细胞系如Raji或Wi12-S或患者供体细胞系可以测试肿瘤或细胞类型响应抗CD20抗体的能力。另外,例如,在来自于患者的全血中,可以使用B细胞耗竭测定测量活性。

[0135] 在本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。该核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物或由DNA或RNA聚合酶可以合并入聚合物的任何取代基。多核苷酸可以包括修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和它们的类似物。如果存在,可以在聚合物装配之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。可以在聚合后进一步修饰多核苷酸,诸如通过与标记组分的结合。其他类型的修饰包括例如“帽”,用类似物、核苷酸间修饰取代一个或多个天然存在的核苷酸,类似物、核苷酸间修饰如,例如具有不带电荷的连接(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酰胺、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的连接(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、包含侧链部分的那些,如,例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸(ply-L-lysine)等)、具有插入剂(例如吡啶、补骨脂素等)的那些、包含螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些、包含烷化剂的那些、具有修饰的连接(例如, α 异头核酸等)的那些以及未修饰形式的一个或多个多核苷酸。此外,通常存在于糖中的任何羟基基团可以被替换(例如,由磷酸酯基团,磷酸酯基团),被保护(由标准保护基团)或被活化以制备与另外核苷酸的另外连接,或者可以被结合至固体支撑物(载体, support)。可以磷酸化或用胺或1至20个碳原子的有机封端基团部分取代5'和3'末端OH。其他羟基也可衍生成标准保护基团。多核苷酸还可以包括核糖或脱氧核糖的糖的类似物形式,它们通常是本领域已知的,包括,例如,2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖(如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚糖)、无环类似物和脱碱基核苷类似物(如甲基核苷)。一个或多个磷酸二酯键可由可替代的连接基团替代。这些可替代的连接基团包括但不限于这样的实施方式:其中,磷酸酯由P(O)S(“硫代酯(thioate)”),P(S)S(“二硫代(dithioate)”),P(O)NR₂(“酰胺化物(amidate)”),P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛(formacetal)”)代替,其中,每个R或R'独立地是H或取代或未取代的烷基(1-20C),该烷基可选地包含醚(-O-)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。并非所有多核苷酸中的连接都需要是相同的。前述的描述应用于在本文中涉及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0136] 术语“载体”是指一种构建体,其能够在宿主细胞中递送并且表达感兴趣的一种或多种基因或序列。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体和某些真核细胞(如产生细胞)中的DNA或RNA表达载体。

[0137] 在本文中可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可以是直链的或支链的,它可以包括修饰的氨基酸,并且可以被非氨基酸中断。该术语还包括已经被天然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物;修饰例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,如与标记组分结合。在该限定内还包括的是,例如,包含一种或多种氨基酸类似物(包括,例如,非天然氨基酸等),以及本领域已知的其他修饰的多肽。应当理解,因为本发明的多肽是基于抗体,在某些实施例中,多肽可

以以单链或相关链的形式出现。

[0138] 在两个或更多个核酸或多肽的情况下,术语“同一的”或百分比“同一性”是指两个或更多个序列或子序列,它们是相同的或具有特定百分比的核苷酸或氨基酸残基,当比较和对齐(引入缺口,如果需要)用于最大一致性时,不考虑任何保守氨基酸取代作为序列同一性的一部分,该核苷酸或氨基酸残基是相同的。可以使用序列比较软件或算法或通过目测测量百分比同一性。各种算法和软件在本领域中是已知的,其可用于获得氨基酸或核苷酸序列的对齐。序列对齐算法的一种这样的非限制性实例是在Karlin et al., Proc.Natl.Acad.Sci.,87:2264-2268(1990)中描述的,如在Karlin et al., Proc.Natl.Acad.Sci.,90:5873-5877(1993)修改的和被合并至NBLAST和XBLAST程序(Altschul et al.,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402(1991))的算法。在一些实施方式中,可以使用Gapped BLAST,如在Altschul et al.,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402(1997)中所描述的。BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul et al.,Methods in Enzymology, 266:460-480(1996))、ALIGN、ALIGN-2(Genentech,South San Francisco,California)或Megalign(DNASTAR)是可用于对齐序列的另外的公众可获得的软件程序。在一些实施方式中,使用GCG软件中的GAP程序(例如,使用NWSgapdna.CMP矩阵,以及40、50、60、70或90的缺口权重和1、2、3、4、5或6的长度权重)测定两个核苷酸序列间的百分比同一性。在一些可替代的实施方式中,在GCG软件包中的GAP程序(其合并了Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))可用于确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性(例如,使用Blossum62矩阵或PAM250矩阵,以及16、14、12、10、8、6或4的缺口权重和1、2、3、4、5的长度权重)。可替代地,在一些实施方式中,核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性是使用Myers和Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1989))确定的。例如,可以使用ALIGN程序(版本2.0)并且使用PAM120(具有残基表,缺口长度惩罚(penalty)为12,缺口惩罚为4)确定百分比同一性。可以由本领域技术人员确定通过特定对齐软件的最大对齐的适当参数。在某些实施方式中,使用对齐软件的默认参数。在一些实施方式中,第一氨基酸序列对第二序列的氨基酸的百分比同一性“X”被计算为 $100 \times (Y/Z)$,其中Y是在第一和第二序列的对齐(如通过目测或特定序列对齐程序对齐的)中被评分为相同匹配的氨基酸残基的数量并且Z是第二序列中的残基总数。如果第一序列的长度是长于第二序列,那么第一序列对第二序列的百分比同一性将长于第二序列对第一序列的百分比同一性。

[0139] 作为非限制性的实施例,在一些实施方式中,可以使用Bestfit程序确定(Wisconsin Sequence Analysis Package,Version 8for Unix,Genetics Computer Group,University Research Park,575Science Drive,Madison,WI53711)任何特定的多核苷酸对参照序列是否具有一定百分比的序列同一性(例如,至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同,并且在一些实施方式中,至少95%、96%、97%、98%或99%相同)。Bestfit使用Smith和Waterman的局部同源性算法,Advances in Applied Mathematics 2: 482489(1981),以发现两个序列之间的最佳的同源区段。当使用Bestfit或任何其他序列对齐程序来确定特定序列是否例如,95%同一于根据本发明的参考序列时,设置参数使得在参考核苷酸序列的全长上计算同一性百分数,并且最高达参考序列中核苷酸总数的5%的同源性中的缺口是允许的。

[0140] 在一些实施方式中,如使用序列比较算法或通过目测测量的,当比较或对齐最大

对应性时,本发明的两种核酸或多肽是基本相同的,意味着它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,并且在一些实施方式中至少95%、96%、97%、98%、99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方式中,同一性存在于序列的至少约10、约20、约40-60个残基的长度或其间的任何整数值的区域,或比60-80残基更长的、至少约90-100个残基区域,或序列与正在比较的序列的全长如例如核苷酸序列的编码区基本上相同。

[0141] “保守的氨基酸取代”是指其中一个氨基酸残基由另一种具有相似侧链的氨基酸残基替代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已经限定,包括碱性侧链氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链氨基酸(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链氨基酸(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支链的侧链氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸取代酪氨酸是保守取代。在一些实施方式中,在本发明的多肽和抗体的序列中的保守取代无法取消(abrogate)包含氨基酸序列的多肽或抗体与抗原(即,FOLR1,多肽或抗体与其结合)的结合。识别核苷酸和氨基酸保守取代(该保守取代无法消除抗原结合)的方法在本领域中是众所周知的(参见,例如,Brummell et al.,*Biochem.*32:1180-1187(1993);Kobayashi et al.*Protein Eng.*12(10):879-884(1999);和Burks et al.*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:.412-417(1997))。

[0142] 除非另外明确指出,否则在本公开中表明材料的数量、比率,材料的物理性质和/或应用的所有数应理解为由“约”这个字修饰。当涉及数或数值范围时,术语“约”指的是该数或数值范围所涉及的是实验变异性内(或统计学实验误差内)的近似值,并且因此该数或数值范围可以在例如所阐明的数或数值范围的1%至15%之间变化。

[0143] 本发明的化合物可以包含一个或多个不对称中心(手性中心)并且可以因此引起对映异构体、非对映异构体和其他立体异构形式,依据绝对立体化学可以将它们限定为(R)-或(S)-。本公开旨在包括所有这些可能的形式以及它们的外消旋和拆分形式以及它们的混合物。考虑到本公开,根据在本领域中已知的方法可以分离各对映异构体。

[0144] 如在本文中使用的,术语“立体异构体”是单个分子的所有异构体的泛称,该单个分子的差别仅在于在空间中的它们的原子的取向。它包括对映异构体和具有一个以上手性中心的化合物的同分异构体,它们彼此不互呈镜像(非对映异构体)。

[0145] 术语“手性中心”是指四个不同基团与其相连的碳原子。

[0146] 术语“对映异构体”和“对映异构体的”是指在其镜像上不能重叠的分子,因此是旋光性的,其中,对映异构体使偏振光的平面朝一个方向旋转,而其镜像化合物使偏振光的平面朝相反的方向旋转。

[0147] 术语“外消旋的”是指对映异构体的等份混合物并且该混合物是不旋光的。

[0148] 术语“拆分”是指分离、富集或除去分子的两种对映异构体形式中的一种。

[0149] 本公开包括本发明的化合物的溶剂化物。溶剂化物通常不显著地改变化合物的生理学活性或毒性,因此可以作为药理学等价物发挥功能。如在本文中所用的术语“溶剂化物”是本公开的化合物与溶剂分子的组合、物理缔合和/或溶剂化,例如二溶剂化物、一溶剂化物或半溶剂化物,其中,溶剂分子与本公开的化合物的比率分别是约2:1,约1:1或约1:2。这种物理缔合涉及不同程度的离子和共价键合,包括氢键键合。在某些情况中,溶剂化物可

以被分离,如当一种或多种溶剂分子被合并至结晶固体的晶格中时。因此,“溶剂化物”包括溶液相和可分离的溶剂化物。本发明的化合物可以作为具有药学上可接受的溶剂,如水、甲醇、乙醇等的溶剂化形式存在,并且本公开意在包括本发明的化合物的溶剂化的和非溶剂化的形式。一种类型的溶剂化物是水合物。“水合物”涉及特定子群的溶剂化物,其中溶剂分子是水。溶剂化物通常可作为药理学等价物发挥功能。溶剂化物的制备在本领域是已知的。参见,例如,M.Caira et al.,*J.Pharmaceut.Sci.*,93(3):601-611(2004);E.C.van Tonder et al.,*AAPS Pharm.Sci.Tech.*5(1):Article 12(2004);和A.L.Bingham et al.,*Chem.Comm.*603-604(2001)。典型的非限制性的制备溶剂化物的方法将包括,在约20℃至约25℃的温度在希望的溶剂(有机溶剂、水或它们的混合物)中溶解本发明的化合物,随后以足以形成晶体的速度冷却该溶液,并且通过已知的方法例如,过滤分离该晶体。分析技术如红外光谱法可用于证实在溶剂化物的晶体中溶剂的存在。

[0150] 术语“前体药物”是指这样的一种化合物,其是化合物的无活性的前体,在体内通过正常的代谢过程转化为它的活性形式。在Hardma,et al. (Eds.),*Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*,9th ed.,pp.11-16(1996)中一般性地讨论了前药设计。在Higuchi,et al.,*Prodrugs as Novel Delivery Systems*,Vol.14,ASCD Symposium Series以及在Roche(ed.),*Bioreversible Carriers in Drug Design*,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press(1987)中提供了详细讨论。举例说明:通过,例如,酯或酰胺键的水解,前药可以转化至药理学上的活性形式,从而引入或暴露在所得到的产物上的官能团。可以设计前药以与内源性化合物反应以形成水溶性结合物,该结合物进一步增强该化合物的药理学特性,例如提高的循环半衰期。可替代地,可以设计前药以在具有例如葡萄糖醛酸、硫酸盐或酯、谷胱甘肽、氨基酸或乙酸盐或酯的官能团上经历共价修饰。所得到的结合物可以是无活性的并从尿中排出或者与母体化合物相比赋予更多效力(活性,potent)。高分子量结合物还可以被排泄至胆汁中,经历酶促裂解,并释放回到循环,从而有效地增加最初给予的化合物的生物半衰期。本发明化合物的前体药物意在涵盖在本发明的范围内的。

[0151] 本发明也包括这样的化合物,它们的区别仅在于存在一种或多种同位素富集的原子,例如,由氘或氚置换氢或由 ^{13}C -或 ^{14}C -富集的碳置换碳。在构成这些化合物的一种或多种原子处,本发明的化合物还可以包括非天然比例的原子同位素。例如,可用放射性同位素如例如,氚(^3H)、碘-125(^{125}I)或碳-14(^{14}C)放射性标记化合物。本发明的化合物的所有同位素变体,无论是放射性的还是非放射性的,均包括在本发明的范围内。

[0152] 本公开内容进一步包括本发明化合物的盐,包括无毒的药学可接受的盐。药学上可接受的加成盐(addition salts)的实例包括无机和有机酸加成盐和碱性盐。药学上可接受的盐包括但不限于金属盐如钠盐、钾盐、铯盐等;碱土金属如钙盐、镁盐等;有机胺盐如三乙胺盐、吡啶盐、甲基吡啶盐、乙醇胺盐、三乙醇胺盐、二环己胺盐、N,N'-联苄基乙二胺盐等;无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;有机酸盐如柠檬酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、扁桃酸盐、醋酸盐、二氯乙酸盐、三氟乙酸盐、草酸盐、甲酸盐、琥珀酸盐、棕榈酸盐、苯甲酸盐、水杨酸盐、抗坏血酸盐、甘油磷酸盐、酮戊二酸盐等;磺酸盐如甲磺酸盐、苯磺酸盐、对-甲苯磺酸盐等;天然氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、酪氨酸、胱氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、组氨酸、鸟氨酸、

赖氨酸、精氨酸和丝氨酸)的盐;和非天然氨基酸(如D-异构体或取代的氨基酸)的盐;胍的盐;和取代的胍的盐,其中,取代基选自硝基、氨基、烷基、烯基、炔基、铵盐或取代的铵盐和铝盐。

[0153] 当施加于生物学活性剂时,术语“选择性抑制剂”是指该剂的经由与靶标的直接或间接相互作用,相比于脱靶信号通路,选择性地降低靶向信号活性的能力。

[0154] 术语“PI3K δ 选择性抑制剂”是指如在本文中所限定的化合物A,其选择性地抑制PI3K δ 同种型的活性,比PI3K家族的其他同种型(α 、 β 和 γ)更有效。例如,式A的化合物可以是这样的一种化合物,相对于 δ 型PI3-激酶,该化合物表现出50%抑制浓度(IC₅₀),相对于其他PI3K同种型(即, α 、 β 和 γ)的其余部分,该浓度比该抑制剂的IC₅₀至少20倍更低。

[0155] 在不同的病症的治疗中,抑制PI3K δ 可以是治疗有益的,例如,以炎症反应为特征的病症,包括但不限于自身免疫性疾病、过敏性疾病和关节炎疾病。重要的是,抑制PI3K δ 功能似乎并不影响生物学功能如生存能力和生育能力。

[0156] 如在本文中所用的“炎症反应”的特征在于发红、发热、肿胀和疼痛(即炎症)并且通常涉及组织损伤或破坏。炎症反应通常是由组织的损伤或破坏引起的局部、保护性反应,它用于破坏、稀释或隔开(隔绝)有害的药剂和受损的组织。炎症反应与白细胞的流入和/或白细胞(例如,嗜中性粒细胞)的趋化性显著相关。炎症反应可以由致病生物和病毒的感染,非感染性的方式(如心肌梗塞或中风后损伤或再灌注)、对外来抗原的免疫应答和自身免疫性疾病引起。顺从于用根据本发明的方法和化合物治疗的炎症反应包括与特异性防御系统反应有关的病况以及与非特异性防御系统反应有关的病况。

[0157] 本发明的治疗方法包括治疗与炎症细胞活化相关病症的方法。“炎症细胞活化”是指通过增生性细胞反应的刺激(包括,但不限于细胞因子、抗原或自身抗体)的诱导、可溶性中介体(mediator)(包括但不限于细胞因子、氧自由基、酶、前列腺素类或血管活性胺)的产生或在炎症细胞(包括,但不限于单核细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、粒细胞(多形核白细胞,包括嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞)、肥大细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞和内皮细胞)中新的或增加数量的中介体(包括但不限于主要组织相容性抗原或细胞粘附分子)的细胞表面表达。本领域中熟练的技术人员将要理解的是,在这些细胞中这些表型中的一种或组合的活化可以有助于炎症病况的引发、永存或恶化。

[0158] 如在本文中所用的术语“自身免疫性疾病”是指任何一组失调,其中,组织损伤与体液或细胞介导的对身体自身成分的应答相关联。

[0159] 如在本文中所用的术语“移植排斥”是指免疫应答直接针对移植的组织(包括器官或细胞,例如,骨髓,以移植的组织 and 周围组织的功能损失、疼痛、肿胀、白细胞增多和血小板减少为特征)。

[0160] 如在本文中所用的术语“过敏性疾病”是指产生自变态反应的任何症状、组织损伤或组织功能的丧失。

[0161] 如在本文中所用的术语“关节炎疾病”是指可归因于各种病因的以关节的炎症病变为特征的任何疾病。

[0162] 如在本文中所用的术语“皮炎”是指任何一大类皮肤疾病,其以可归因于各种病因的皮肤的炎症为特征。

[0163] 如在本文中所使用的术语“协同效应,”是指一种通过化合物的组合产生的大于加和

的治疗效应,其中,用组合获得的治疗效应超过加和效应,该加和效应另外产生自单独给予单个化合物。本发明的实施方式包括在血液系统癌症中产生协同效应的方法,其中,所述效应比相应的加和效应是至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000%更高。

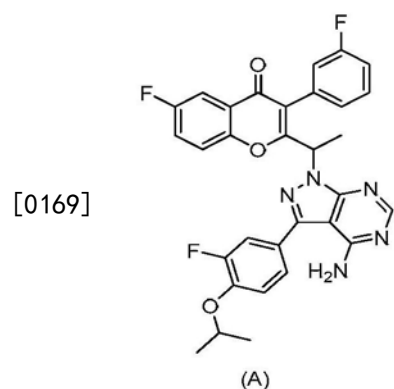
[0164] 如在本文中使用的“治疗协同,”是指在治疗中,抗CD20抗体与化合物A的组合产生治疗效果,该治疗效果大于单独使用抗CD20抗体和PI3K δ 选择性抑制剂的加和效应。

[0165] 如在本公开内容和权利要求中所使用的,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数形式,除非上下文另外清楚地规定。

[0166] 应当理解,尽管在此用语言“包括”描述了实施方式,另外还提供了根据“由...组成”和/或“基本上由...组成”描述的类似的实施方式。

[0167] II. PI3K δ 选择性抑制剂

[0168] 如在本文中提供的,与抗CD20抗体和其抗原结合片段组合使用的PI3K δ 选择性抑制剂是式A的化合物:

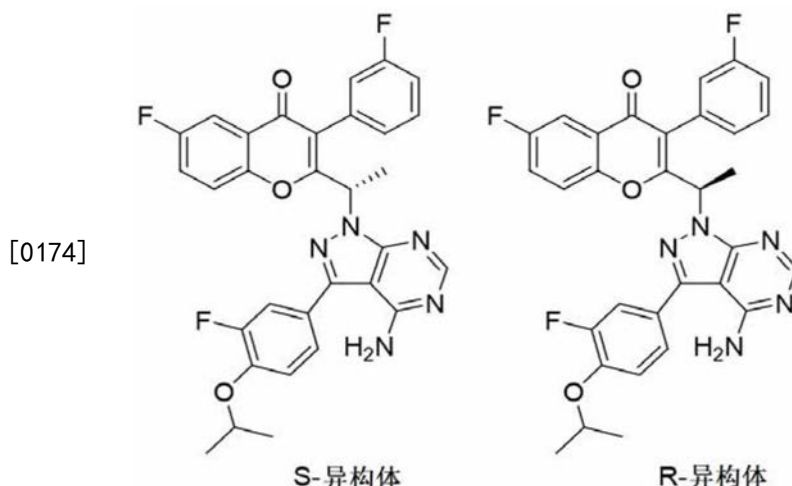


[0170] 和其立体异构体,其互变异构体,其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药。

[0171] 在一种实施方式中,与抗CD20抗体和其抗原结合片段组合使用的化合物A,是(S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮、其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药。这个立体异构体在本文中也称为“式A的化合物的S-异构体,”“S-异构体,”“TGR-1202”和“RP5307.”

[0172] 在另一种实施方式中,与抗CD20抗体和其抗原结合片段组合使用的化合物A,是(R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮、其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药。

[0173] 这些化合物的化学结构如下所示:



[0175] III. 抗CD20抗体

[0176] CD20是一种四次跨膜的跨膜磷酸-蛋白,其主要在人和小鼠中的前B细胞和成熟的外周B细胞中表达。在人中,CD20也强烈地和均一地在大多数成熟B细胞恶性肿瘤上表达。

[0177] 如在本文中提供的,抗CD20抗体和其抗原结合片段可与PI3K δ 选择性抑制剂组合使用。

[0178] 许多抗CD20抗体是已知的,包括例如,ublituximab利妥昔单抗、奥法木单抗(HuMax; Intracel)、奥瑞珠单抗、维妥珠单抗、GA101(奥奴珠单抗(obinutuzumab))、AME-133v(Applied Molecular Evolution)、ocaratuzumab(Mentrik Biotech)、PR0131921、托西莫单抗、替伊莫单抗、hA20(Immunomedics, Inc.)、BLX-301(Biolex Therapeutics)、Reditux(Dr.Reddy's Laboratories)和PR070769(在W02004/056312中描述的)。

[0179] Ublituximab(UtuxinTM、LFB-R603、TG20、EMAB603)是一种单克隆抗体,其靶向在CD20上的特异性和独特表位,并且该抗体已经被生物工程化用于增强的临床活性和效力。

[0180] 利妥昔单抗是一种针对CD20抗原的基因工程化的嵌合鼠/人单克隆抗体。利妥昔单抗在美国专利号5,736,137中被称为“C2B8”抗体。在美国专利号5,736,137中公开了利妥昔单抗抗体的氨基酸序列和在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中经由重组表达抗体生产的示例性方法,将其全部内容通过引用结合于此。

[0181] 奥法木单抗是抗CD20IgG1 κ 人单克隆抗体。研究表明,与利妥昔单抗相比,奥法木单抗以较慢的速率与CD20分离并且结合近膜的表位。Zhang et al., Mabs 1:326-331 (2009)。表位作图表明,相比于由利妥昔单抗靶向的位置,奥法木单抗结合定位更靠近于CD20的N-末端的表位并且包括抗原的胞外环。同前。

[0182] 因此,在一些实施方式中,抗CD-20抗体或其片段选自由这样的抗体组成的组:该抗体结合于与ublituximab利妥昔单抗、奥法木单抗、奥瑞珠单抗、维妥珠单抗、GA101、AME-133v、PR0131921、托西莫单抗、hA20或PR070769相同的表位。在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段是ublituximab利妥昔单抗、奥法木单抗、奥瑞珠单抗、维妥珠单抗,GA101、AME-133v、PR0131921、托西莫单抗、hA20、PR070769或其片段。

[0183] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段结合于与ublituximab相同的表位。在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段结合于包含CD20的氨基酸N153-S179的序列。在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段结合于在CD20的氨基酸N153-S179中的不连续表位。

[0184] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段以特征为小于约 10^{-7} M、小于约 10^{-8} M或小于约 10^{-9} M的解离常数KD的亲和力结合于CD20。在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段以特征为 10^{-10} 至 10^{-9} M的解离常数KD的亲和力结合于CD20。在一些实施方式中,抗CD20抗体或其片段以特征为 0.7×10^{-9} M的解离常数KD的亲和力结合于CD20。如在抗体结合解离常数的情况下使用的,术语“约”考虑到用于测量抗体亲和力的方法中固有变化的程度。例如,取决于使用的仪器的精确度水平,基于所测量的样本的数量的标准误差和舍入误差,术语“约 10^{-2} M”可以包括,例如,从0.05M至0.005M。

[0185] 在一些实施方式中,抗CD20抗体对表现出Fc- γ RIII (CD16)的高亲和力。在一些实施方式中,由于抗体的Fc区对于CD16的它们的高亲和力,这样的抗体不被IgG多克隆抗体替换,特别不被血清中存在的IgG替换。在一些实施方式中,抗体以至少 $2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ 、至少 $2 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 、 $2 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 或 $2 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 的亲和力结合于CD16 (例如,在巨噬细胞上表达的),亲和力是例如,如通过Scatchard分析或BIAcore技术(基于无标记表面等离子体共振的技术)测定的。

[0186] 在一些实施方式中,抗CD20抗体表现出特征为在该抗体的Fc区中以低岩藻糖含量的糖基化模式。例如,在一些实施方式中,组合物包含抗CD20抗体,其中,该抗体包括结合在Fc- γ 糖基化位点(Asn 297, EU编号)上的N-糖苷连接的糖链,其中,在组合物的所有抗体的N-糖苷连接的糖链中,岩藻糖含量是小于65%、小于60%、小于55%、小于50%、小于45%或小于40%。在一些实施方式中,在组合物的所有抗体的N-糖苷连接的糖链中,岩藻糖含量是15至45%或20至40%。

[0187] 在一些实施方式中,抗CD20抗体表现出有效的体外抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在一些实施方式中,使用来自于健康供体的自然杀伤(NK)细胞以50ng/ml的浓度,抗CD20抗体产生至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%或至少约30%的ADCC平台(plateau)。测量ADCC的技术在本领域中是已知的,并且在例如,de Romeauf et al., British Journal of Haematology 140:635-643 (2008)中提供。在一些实施方式中,使用来自于健康供体的自然杀伤(NK)细胞以50ng/ml的浓度,抗CD20抗体产生在约35%处的ADCC平台。

[0188] 在一些实施方式中,抗CD20抗体可以降低NF- κ -B活性。在一些实施方式中,抗CD20抗体可以降低SNAIL表达。在一些实施方式中,抗CD20抗体可以提高RKIP活性。在一些实施方式中,抗CD20抗体可以增加PTEN活性。在一些实施方式中,抗CD20抗体可以提高细胞对于TRAIL凋亡的致敏。

[0189] 在一些实施方式中,抗CD20抗体是Fc- γ -RIIIA (CD16)优化的。已经在例如美国专利号7,931,895中描述能够活化III型Fc受体并具有特定的聚糖结构的抗体,将其全部内容通过引用结合于此。因此,在一些实施方式中,如在美国专利号7,931,895中描述的,用双触角和/或寡聚甘露糖苷型的N-糖基化作用在Asn 297 (EU编号)上修饰抗CD20抗体。例如,在美国公开申请号2005/0271652中提供了制备抗体的方法,该抗体对于免疫系统的效应细胞的受体CD16具有强的亲和性,将其全部内容通过引用结合于此。

[0190] 在一些实施方式中,抗CD20抗体具有高ADCC活性。例如,在美国专利号7,713,524中提供了生产具有高ADCC活性的抗体方法,在此通过引用将其全部内容结合于此。

[0191] Ublituximab包括下面提供的抗体序列:

[0192] 可变重链CDR1:Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn(SEQ ID NO:1)

[0193] 可变重链CDR2:Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr(SEQ ID NO:2)

[0194] 可变重链CDR3:Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr(SEQ ID NO:3)

[0195] 可变重链:

[0196] Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO:4)

[0197] 恒定重链:

[0198] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys(SEQ ID NO:5)

[0199] 可变轻链CDR1:Ser Ser Val Ser Tyr(SEQ ID NO:6)

[0200] 可变轻链CDR2:Ala Thr Ser(SEQ ID NO:7)

[0201] 可变轻链CDR3:Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr(SEQ ID NO:8)

[0202] 可变轻链:

[0203] Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys (SEQ ID NO:9)

[0204] 恒定轻链:

[0205] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:10)

[0206] 因此,在一些实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)、基本上由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成或由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成,其中,VH结构域的CDR中的至少一个(即,一个、两个或三个)具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或同一于序列SEQ ID NO:1、2或3的CDR1、CDR2或CDR3区,其中,包含VH结构域的抗体或其抗原结合片段可以特异地或优先地结合于CD20。

[0207] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)、基本上由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成或由免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)组成,其中,VH结构域的CDR中的至少一个(即,一个、两个或三个)具有同一于序列SEQ ID NO:1、2或3的CDR1、CDR2或CDR3区的氨基酸序列,除了1、2、3、4或5个保守的氨基酸取代,其中,包含VH结构域的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0208] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含VH结构域、基本上由VH结构域组成或由VH结构域组成,该VH结构域具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于SEQ ID NO:4的VH氨基酸序列,其中,包含VH结构域的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0209] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含重链、基本上由重链组成或由重链组成,该重链具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于包含SEQ ID NO:4和5的重链氨基酸序列,其中,包含重链的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0210] 在一些实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)、基本上由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成或由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成,其中,VL结构域的CDR中的至少一个(即,一个、两个或三个)具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或同一于序列SEQ ID NO:6、7或8的CDR1、CDR2或CDR3区,其中,包含VL结构域的抗体或其抗原结合片段可以特异地或优先地结合于CD20。

[0211] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)、基本上由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成或由免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域)组成,其中,VL结构域的CDR中的至少一个(即,一

个、两个或三个)具有与SEQ ID NO:6、7或8的CDR1、CDR2或CDR3区同一的氨基酸序列(除了1、2、3、4或5个保守的氨基酸取代),其中,包含VL结构域的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0212] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含VL结构域、基本上由VL结构域组成或由VL结构域组成,该VL结构域具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于SEQ ID NO:9的VL氨基酸序列,其中,包含VL结构域的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0213] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含轻链、基本上由轻链组成或由轻链组成,该轻链具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于包括SEQ ID NO:9和10的重链氨基酸序列,其中,包含轻链的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0214] 在一些实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域),其中,VH结构域的CDR中的至少一个(即,一个、两个或三个)具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或同一于序列SEQ ID NO:1、2或3的CDR1、CDR2或CDR3区,其中,VL结构域的CDR中的至少一个(即,一个、两个或三个)具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或同一于序列SEQ ID NO:6、7或8的CDR1、CDR2或CDR3区,并且其中,包括VH结构域和VL的抗体或其抗原结合片段可以特异地或优先地结合于CD20。

[0215] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包括、基本上由以下组成或由以下组成:免疫球蛋白重链可变结构域(VH结构域)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL结构域),其中,VH结构域的CDR中的至少一个(即,一个、两个或三个)具有同一于序列SEQ ID NO:1、2或3的CDR1、CDR2或CDR3区的氨基酸序列(除了1、2、3、4或5个保守的氨基酸取代),其中,VL结构域的CDR中的至少一个(即,一个、两个或三个)具有同一于SEQ ID NO:6、7或8的CDR1、CDR2或CDR3区的氨基酸序列(除了1、2、3、4或5个保守的氨基酸取代),并且其中,包括VH和VL的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0216] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包括序列SEQ ID NO:1、2和3的VH CDR1、CDR2和CDR3区和序列SEQ ID NO:6、7和8的VL CDR1、CDR2和CDR3区。

[0217] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:VH结构域和VL结构域,其中,该VH具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于SEQ ID NO:4的VH氨基酸序列,其中,该VL具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于SEQ ID NO:9的VL氨基酸序列,并且其中,包括VH和VL结构域的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0218] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:9的VL。

[0219] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其抗原结合片段结合于与包括SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:9的VL的抗体相同的表位。

[0220] 在另一种实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:重链和轻链,其中,该重链具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于包括SEQ ID NO:4和5的重链氨基酸序列,其中,该轻链具有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一于包括SEQ ID NO:9和10的重链氨基酸序列,并且其中,包括重链的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以特异地或优先地结合于CD20。

[0221] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其抗原结合片段包括重链(该重链包括SEQ ID NO:4和5)和轻链(该轻链包括SEQ ID NO:9和10)。

[0222] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其抗原结合片段结合于与包括SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的抗体相同的表位。

[0223] 在一些实施方式中,抗CD20抗体是ublituximab。

[0224] 在一些实施方式中,抗体是EMAB603(参见WO2006/064121,将其全部内容通过引用结合于此),由克隆R603-12D11生产该抗体,以登录号CNCM I-3529保藏于法国微生物保藏中心(Collection Nationale des Clutures de Microorganismes)。

[0225] 在一些实施方式中,在大鼠杂交瘤YB2/0细胞系(细胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20,注册于美国典型培养物保藏中心,ATCC号CRL-1662)中产生抗CD20抗体。

[0226] 能够特异性结合CD20并且保留希望的活性的抗体的精确化学结构取决于许多因素。由于在分子中存在可电离的氨基和羧基,可以以酸式盐或碱式盐或以中性形式获得特定多肽。当在合适的环境条件中放置时保留它们的生物学活性的所有这样的制剂包括在如在本文中使用的抗CD20抗体的限定中。此外,通过使用糖组分衍生化(糖基化)或通过其他补充分子如脂质、磷酸酯、乙酰基等可以增加抗体的基本氨基酸序列。还可以通过与糖类的结合增加它。通过生产宿主的翻译后加工系统完成这种增加的某些方面;可以在体外引入其他这种修饰。无论如何,只要不破坏抗CD20抗体希望的性能,这种修饰就包括在本文中使用的抗CD20抗体的限定中。希望在各种试验中,通过提高或降低该多肽的活性,这些修饰可以定量地或定性地影响活性。此外,通过氧化、还原或者其他衍生化可以修饰链中的单个氨基酸残基,并且可以裂解该多肽以获得保留活性的片段。这种改变不破坏希望的性能(例如,对CD20的结合特异性),这种改变没有从在本文中使用的感兴趣的抗CD20抗体的限定中去除该多肽序列。

[0227] 本领域提供了关于多肽变体的制备和应用的基本指引。在抗CD20结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)的变体制备中,本领域的技术人员可以容易地确定,对于天然蛋白质的核苷酸或氨基酸序列的哪些修饰将产生变体,该变体适合用作为药物组合物的治疗活性成分。

[0228] 仅在框架区或仅在抗体分子的CDR区引入突变是可能的。引入的突变可以是沉默或中性错义突变,即,没有或者很少影响抗体结合抗原的能力。这些类型的突变可以是有用

的以优化密码子使用或提高杂交瘤的抗体产生。可替代地,非中性错义突变可以改变抗体结合抗原的能力。大多数沉默和中性错义突变的位置很可能是在框架区中,而大多数非中性错义突变的位置很可能是在CDR中,尽管这不是绝对的要求。本领域的技术人员将能够设计和测试具有希望性能的突变体分子,该希望性能如抗原结合活性没有改变或结合活性改变(例如,抗原结合活性提高或抗体特异性改变)。在突变形成后,可以常规地表达编码的蛋白质,并且使用在本文中描述的技术或通过本领域已知的常规修饰技术可以确定所编码的蛋白的功能和/或生物学活性,(例如,免疫特异性结合至少一个CD20多肽的表位的能力)。

[0229] 在一些实施方式中,抗CD20抗体包括至少一个优化的互补决定区(CDR)。“优化的CDR”意指CDR已经被修饰并且优化的序列,基于给予抗CD20抗体(包括最优化的CDR)的持续不变的或改进的结合亲和力和/或抗CD20活性选择该序列。“抗CD20活性”可以包括,例如,活性,该活性调节一种或多种与CD20有关的以下活性,例如,诱导B细胞凋亡的能力、诱导ADCC针对B细胞(例如,CLL细胞)的能力、抑制NF- κ B活性的能力、抑制Snail表达的能力、去阻遏(de-repress)RKIP的能力、去阻遏PTEN的能力、使肿瘤细胞对TRAIL-凋亡敏感的能力或与CD20相关的任何其他活性。例如,在Baritaki et al., *International Journal of Oncology* 38:1683-1694 (2011) 中描述了这样的活性,将其全部内容通过引用结合于此。该修饰可以包括CDR内氨基酸残基的取代,使得抗CD20抗体保留了对CD20抗原的特异性并且具有改进的结合亲和力和/或改进的抗CD20活性。

[0230] 在某些抗CD20抗体或其抗原结合片段中,一个或多个恒定区结构域的至少一部分已缺失或另外改变以提供希望的生物化学特征,如降低的效应器功能、非共价二聚化的能力、提高的在肿瘤部位处定位的能力、降低的血清半衰期或与大约相同免疫原性的完整的未改变的抗体相比增加的血清半衰期。例如,某些抗体是结构域缺失的抗体,该抗体包括与免疫球蛋白重链类似的多肽链,但该抗体缺少一个或多个重链结构域中的至少一部分。例如,在某些抗体中,修饰的抗体的恒定区中的一个完整结构域将缺失,例如,CH2结构域的全部或部分将缺失。

[0231] 在某些抗CD20抗体或其抗原结合片段中,使用本领域已知的技术可以突变Fc部分以降低效应器功能。例如,恒定区的修饰可用于修饰二硫键或寡糖部分,其允许由于增加的抗原特异性或抗体适应性引起的增强的定位。使用公知的免疫学技术可以容易地测量和定量该修饰的所产生的生理学轮廓、生物用度以及其他生物化学效应而无需过多实验。

[0232] 在一些实施方式中,抗CD20抗体或其抗原结合片段将不会引起待治疗的动物(例如,人)中的有害免疫应答。在一种实施方式中,可以使用本领域公认的技术修饰抗CD20抗体或其抗原结合片段以降低其免疫原性。例如,抗体可以是人源化、灵长类化、去免疫化或可以制造嵌合抗体。这些类型的抗体是来自于非人抗体,通常是小鼠或灵长类抗体,该抗体保留或基本保留亲代抗体的抗原结合性能,但该抗体在人中的免疫原性较低。这可以通过多种方法实现,包括(a)将整个非人可变结构域结合至人恒定区以生成嵌合抗体;(b)将一个或多个非人互补决定区(CDR)中的至少一部分结合至人框架区和恒定区,保留或不保留关键的框架残基;或(c)移植整个非人可变结构域,但通过替换表面残基用人样部分“掩护”它们。这样的方法公开于Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Morrison et al., *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217

(1994) 和美国专利号 5,585,089、5,693,761、5,693,762 和 6,190,370, 将其全部内容通过引用将所有这些结合于此。

[0233] 可以使用本领域已知的技术, 由完整前体或亲本抗体制成抗体或其抗原结合片段的修饰形式。

[0234] 使用本领域已知的技术可以制造或加工抗 CD20 抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中, 抗体分子或其片段是“重组产生的”, 即, 是使用重组 DNA 技术产生的。通过本领域已知的任何合适的方法包括多克隆抗体的产生或单克隆抗体的制备, 例如, 通过杂交瘤或噬菌体展示可以产生抗 CD20 抗体或其片段。

[0235] 各种宿主-表达载体系统可用于表达抗体分子。可以用两个表达载体(编码重链衍生的多肽的第一载体和编码轻链衍生的多肽的第二载体)共-转染该宿主细胞。这两个载体可包含相同的选择标志物, 该选择标志物使得能够等量表达重链和轻链多肽。可替代地, 可以使用单个载体, 该载体编码重链和轻链多肽。在这种情况下, 将轻链有利地置于重链之前以避免过量的有毒游离重链(Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:2197 (1980))。也可以用编码重链衍生的多肽和轻链衍生的多肽的单一载体转染宿主细胞。重链和轻链的编码序列可包括 cDNA 或基因组 DNA。

[0236] 可以通过常规技术将表达载体或载体转入宿主细胞并且随后通过常规技术培养转染的细胞以产生抗体。因此, 提供了包含可操作地连接至不同的启动子的编码抗体或其重链或轻链的多核苷酸的宿主细胞。在表达双链抗体的一些实施方式中, 可以在宿主中共表达编码重链和轻链的载体以表达整个免疫球蛋白分子。

[0237] 宿主-表达系统代表这样的载体, 通过该载体, 可以产生并且随后纯化感兴趣的编码序列, 而且也代表这样的细胞, 当用合适的编码序列的核苷酸转化或转染时, 该细胞可以原位表达 CD20 抗体。这些包括, 但不局限于: 微生物, 如用包含抗体编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌(例如, 大肠杆菌 (*E.coli*)、枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*)); 用包含抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如, 酵母菌属毕赤酵母 (*Saccharomyces*, *Pichia*)); 用包含抗体编码序列的重组病毒表达载体(如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统; 用重组病毒表达载体(例如, 花椰菜花叶病毒、CaMV; 烟草花叶病毒, TMV)感染的或用包含抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如 Ti 质粒)转化的植物细胞系统; 或带有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如, COS、CHO、BLK、293、3T3 细胞), 该重组表达构建体包含来自于哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如, 金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子; 牛痘病毒 7.5K 启动子)。细菌细胞如大肠杆菌或真核细胞(例如, 用于整个重组抗体分子的表达)用于重组抗体分子的表达。例如, 哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO), 连同载体如来自于人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件是抗体的有效表达系统(Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990))。在一些实施方式中, 抗 CD20 抗体在不是 CHO 细胞的宿主细胞中产生。

[0238] 一旦抗体已经被重组地表达, 可以通过领域中已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法, 例如, 通过层析(例如, 离子交换、亲和、特别是通过蛋白 A 之后特异抗原的亲和, 以及分级柱层析(sizing column chromatography))、离心、差别溶解或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术纯化该抗体。

[0239] 在一些实施方式中,抗CD20抗体是由大鼠杂交瘤细胞系产生的。在一些实施方式中,抗CD20抗体是在YB2/0(ATCC CRL-1662)中产生的。

[0240] IV. 药物组合物

[0241] 可以以任何顺序或者任何时间间隔(由本领域技术人员测定的)给予式A的化合物和抗CD20抗体。例如,可以顺序地(以任何顺序)、同时或经由顺序和同时给予的任何组合给予式A的化合物和抗CD20抗体。可以在同一药物组合物中或在单独的药物组合物中给予式A的化合物和抗CD20抗体。

[0242] 可以根据通过本领域的技术人员可以确定和测定的任何数量的希望的间隔:分钟(例如,0-60分钟)、小时(例如,0-24小时)、天(例如,0-7天)和/或周(例如,0-52周)进行组合的给予(无论是同时、顺序地(以任何顺序)或两者)。剂量还可以随着时间变化,例如,开始用每周一次的剂量一段时间(例如持续1、2、3、4、5或6周),随后剂量是每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次或每六周一次。

[0243] 可以将式A的化合物和抗CD20抗体配制为药物组合物,用于给予至包括人在内的哺乳动物。该药物组合物包含药学上可接受的载体,该载体包括例如离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(如人血清白蛋白)、缓冲物质(如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物)、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅溶胶(colloidal silica)、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素类物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂)。

[0244] 可以通过任何合适的方法,例如,肠胃外、心室内、口服、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻、颊、阴道或经由植入的贮器给予该组合物。在一些实施方式中,口服给予式A的化合物。如在本文中使用的术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和头颅内注射或输注技术。

[0245] 肠胃外的制剂可以是单次注射剂量、输注或加载(loading)注射剂量量,随后为维持剂量。可以以具体固定的或可变的间隔,例如,每天一次或者在“根据需要”的基础上给予这些组合物。在一些实施方式中,静脉内(IV)给予抗CD20抗体。

[0246] 可以以可接受的剂型(包括,例如,胶囊剂、片剂、水性混悬剂或溶液剂)口服给予某些药物组合物。也可以通过鼻气雾剂或吸入给予某些药物组合物。采用苯甲醇或其他合适的防腐剂、提高生物用度的吸收促进剂和/或其他常规增溶剂或分散剂,可以将这样的组合物制备成盐水溶液。

[0247] 对于任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于多种因素,包括使用的特定治疗剂、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食和给予时间、排泄速度、药物组合和正在被治疗的特定疾病的严重性。医学护理者对这些因素的判断是在本领域普通技术人员的范围内。该剂量也取决于待治疗的个体患者、给予途径、制剂类型、使用的化合物的特性、疾病的严重性和希望的效果。可以通过本领域众所周知的药理学和药物动力学原理确定使用的量。

[0248] 在一些实施方式中,以低于 $187.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $37.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $7.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $3.75\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量给予抗CD20抗体。在一些实施方式中,给予的剂量可以是 $187.5\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $37.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $7.5\text{mg}/\text{m}^2$ 或 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $3.75\text{mg}/\text{m}^2$ 。

m²。

[0249] 在一些实施方式中,以每天10至2500mg/天、10至1500mg/天、50至1000mg/天、100至750mg/天、150至500mg/天的剂量范围给予式A的化合物。在一些实施方式中,给予的剂量可以是200至400mg/天。在一些实施方式中,给予的剂量可以是500、1000、1500、2000或2500mg/天。

[0250] 增补的活性化合物也可以掺入至组合物中。例如,可以用一种或多种另外的治疗剂如抗癌剂共同配制和/或共同给予抗CD20抗体和式A的化合物。

[0251] V. 试剂盒

[0252] 本发明提供了试剂盒,该试剂盒包含式A的化合物、抗CD20抗体、其他试剂,并且该试剂盒可用于执行在本文中描述的方法和它们的组合。在某些实施方式中,试剂盒在一个或多个容器(container)中包含至少一种针对CD20的纯化的抗体以及与式A的化合物组合使用该抗体的说明书。在一些实施方式中,试剂盒包含式A的化合物以及与抗CD20抗体组合使用抑制剂的说明书。在一些实施方式中,试剂盒包含至少一种抗CD20抗体和式A的化合物。

[0253] 在本文中还提供了包含一个或多个容器的药物试剂盒,容器填充有一种或多种本发明的药物化合物和组合物中的组分,包括,式A的化合物和/或一种或多种抗CD20抗体。这种试剂盒还可以包括,例如,其他化合物和/或组合物,用于给予化合物和/或组合物的装置和以调节药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式书面的说明书。

[0254] 本领域技术人员将容易认识到,本公开的抗体和在本文中描述的式A的化合物可以容易地结合至一种现有的试剂盒形式中,该试剂盒形式在本领域中是众所周知的。

[0255] 进一步提供的是这样的试剂盒,该试剂盒包含(a)式A的化合物、抗CD20抗体或其组合和(b)另外的抗癌剂。在一些实施方式中,另外的抗癌剂是化疗剂。

[0256] VI. 使用式A的化合物和抗CD20抗体的组合的方法

[0257] 在治疗受试者中的疾病或失调的方法中可以使用式A的化合物和抗CD20抗体的组合。

[0258] 因此,提供了式A的化合物在制备用于治疗增生性失调的药物中的应用,其中,将与抗CD20抗体组合(例如,顺序地或同时地)给予式A的化合物。另外,还提供了抗CD20抗体在制备用于治疗增生性失调的药物中的应用,其中,将与式A的化合物组合(例如,顺序地或同时地)给予抗CD20抗体。

[0259] 本发明进一步提供了通过给予患者有效量的本发明的组合从而在患者中抑制PI3K δ 同种型和/或CD20的方法。

[0260] 本发明进一步提供了通过给予患者有效量的本发明的组合从而在患者中治疗、预防和/或抑制PI3K δ 介导的疾病、失调或病症和/或CD20介导的疾病、病症或病症(如癌或其他增生性疾病或失调)的方法。

[0261] 本发明进一步提供了通过给予患者有效量的本发明的组合从而在患者中治疗PI3K δ 同种型和/或CD20相关的疾病、失调或病症的方法。在一种实施方式中,通过选择性抑制PI3K δ 和/或CD20,在组合中给予的化合物的量足以治疗PI3K δ 同种型和/或CD20相关的疾病、失调或病症。

[0262] 本发明进一步提供了一种通过给予需要这种治疗的患者有效量的本发明的至少

式A的化合物和抗体从而治疗增生性疾病的方法。在一种实施方式中,在组合中给予的化合物的量足以通过选择性抑制PI3K δ 和/或抑制CD20治疗增生性疾病。

[0263] 本发明进一步提供了通过给予需要这种治疗的患者有效量的本发明的组合,与至少一种其他抗癌剂进一步组合(同时地或顺序地),从而治疗增生性疾病的方法。在一种实施方式中,给予的化合物A的量足以通过选择性抑制PI3K δ 治疗增生性疾病或促进增生性疾病的治疗。

[0264] 本发明的组合在包括但不限于以下的各种癌症的治疗中是有用的:

[0265] • 癌,包括膀胱癌、乳癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌(包括小细胞肺癌)、食道癌、胆囊癌、子宫癌、卵巢癌、睾丸癌、喉癌、口腔癌、胃肠道癌(例如,食道癌、胃癌、胰腺癌)、脑癌、宫颈癌、甲状腺癌、前列腺癌、血癌和皮肤癌(包括鳞状细胞癌);

[0266] • 淋巴世系的造血肿瘤,包括白血病、急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、毛细胞性淋巴瘤和伯基特淋巴瘤;

[0267] • 骨髓世系的造血肿瘤,包括急性和慢性粒细胞白血病、骨髓增生异常综合征和早幼粒细胞白血病;

[0268] • 起源于间充质的肿瘤,包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;

[0269] • 中枢和外周神经系统的肿瘤,包括星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤;和

[0270] • 其他肿瘤,包括黑素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、甲状腺滤泡癌和卡波济肉瘤。

[0271] 本发明的组合作为细胞凋亡的调节剂,在癌症(包括但不限于上面在本文中提及的那些类型)的治疗、预防和抑制中是有用的。

[0272] 本发明的组合在癌症的化学预防中是有用的。化学预防包括通过阻断初始化致突变事件、阻断已经遭受损伤的前恶性细胞的进展或抑制肿瘤复发来抑制侵入性癌症的发展。这些化合物在抑制肿瘤血管生成和转移中也是有用的。本发明的一种实施方式是通过给予有效量的一种或多种本发明的化合物从而在患者中抑制肿瘤血管生成或转移的方法。

[0273] 本发明进一步提供了治疗免疫系统相关疾病(例如自身免疫性疾病)、涉及炎症的疾病或失调(例如,哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎、炎性肠病、肾小球肾炎、神经炎性疾病、多发性硬化、葡萄膜炎和免疫系统的失调)、癌或其他增生性疾病、肝脏疾病或失调或肾疾病或失调的方法。该方法包括给予有效量的本发明的组合。

[0274] 可以由本发明的化合物治疗的免疫失调的实例包括但不限于牛皮癣、类风湿性关节炎、脉管炎、炎性肠道疾病、皮炎、骨关节炎、哮喘、炎性肌病、过敏性鼻炎、阴道炎、间质性膀胱炎、硬皮病、骨质疏松症、湿疹、同种异体或异种移植(器官、骨髓、干细胞和其他细胞和组织)移植排斥、移植物抗宿主病、红斑狼疮、炎症性疾病、I型糖尿病、肺纤维化、皮炎、干燥综合征、甲状腺炎(例如桥本氏和自身免疫性甲状腺炎)、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、多发性硬化、囊性纤维化、慢性复发肝炎、原发性胆汁性肝硬化、过敏性结膜炎和特应性皮炎。

[0275] 本发明进一步提供了通过给予治疗有效量的本发明的组合从而在患者中治疗白血病的方法。例如,本发明的方法可有效用于治疗慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金

氏淋巴瘤 (NHL)、急性粒细胞白血病 (AML)、多发性骨髓瘤 (MM)、小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 或无痛性非霍奇金氏淋巴瘤 (I-NHL)。

[0276] 在上述治疗方法中,可以连同本发明的组合给予一种或多种另外的活性剂。例如,在与已知的抗癌治疗如放射疗法或与一种或多种细胞抑制剂、细胞毒性剂或抗癌剂的组合(同时地或顺序地给予)中,本发明的组合是有用的,细胞抑制剂、细胞毒性剂或抗癌剂如,例如,DNA相互作用剂,如顺铂或多柔比星;拓扑异构酶II抑制剂,如依托泊苷;拓扑异构酶I抑制剂如CPT-11或拓扑替康;微管蛋白相互作用剂,如紫杉醇、多西他赛或埃博霉素(例如伊沙匹隆),天然存在的或合成的;激素剂,如他莫昔芬;胸苷酸合成酶抑制剂,如5-氟尿嘧啶;和抗代谢物,例如甲氨蝶呤;其他酪氨酸激酶抑制剂,例如易瑞沙和OSI-774;血管生成抑制剂;EGF抑制剂;VEGF抑制剂;CDK抑制剂;SRC抑制剂;c-Kit抑制剂;Her1/2抑制剂以及针对生长因子受体的单克隆抗体,例如爱必妥(EGF)和赫赛汀(Her2);和其他蛋白激酶调节剂。另外的活性剂也可以是蛋白酶体抑制剂,硼替佐米(万珂®)、卡非佐米(PR-171)、PR-047、双硫仑、乳胞素、PS-519、eponemycin、环氧霉素、阿克拉霉素、CEP-1612、MG-132、CVT-63417、PS-341、乙烯基砒三肽抑制剂、利托那韦、PI-083, (+/-)-7-methylomuralide, (-)-7-methylomuralide、来那度胺(雷利米得®)或它们的组合。

[0277] 本发明的组合在与一种或多种类固醇抗炎药、非类固醇抗炎药(NSAID)或免疫选择性抗炎衍生物(ImSAID)的组合(同时或顺序地给予)中也是有用的。

[0278] 在一种特定的实施方式中,癌症是恶性血液病和/或实体瘤。在另一种特定的实施方式中,恶性血液病是白血病或淋巴瘤。

[0279] 在一些实施方式中,淋巴瘤是一种成熟的(外周)B细胞瘤。在具体的实施方式中,成熟的B细胞瘤选自由以下各项组成的组:B细胞慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤;B细胞前淋巴细胞性白血病;淋巴浆细胞性淋巴瘤;边缘区淋巴瘤,如脾边缘区B细胞淋巴瘤(+/-绒毛状淋巴细胞)、结边缘区淋巴瘤(+/-单核细胞样B细胞)和粘膜相关的淋巴组织(MALT)类型的结外边缘区B细胞淋巴瘤;毛细胞白血病;浆细胞骨髓瘤/浆细胞瘤;滤泡性淋巴瘤,滤泡中心;套细胞淋巴瘤;弥漫性大细胞B细胞淋巴瘤(包括纵膈大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤);和伯基特淋巴瘤/伯基特细胞白血病。

[0280] 在一些实施方式中,淋巴瘤选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤(MM)和非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(WM)或B细胞淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

[0281] 在进一步特定的实施方式中,白血病选自由以下各项组成的组:急性淋巴细胞性白血病/急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)。在一些实施方式中,非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)是侵袭性NHL或无痛性NHL。侵袭性NHL的实例包括B细胞瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、T-/NK细胞瘤、间变性大细胞淋巴瘤、外周T-细胞淋巴瘤、前体B成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤、前体T成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、成人T-细胞淋巴瘤/白血病(HTLV1+)、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、多态性移植后淋巴增生性失调(PTLD)、AIDS-相关的淋巴瘤、真性组织细胞性淋巴瘤和母细胞性NK-细胞淋巴瘤。侵袭性NHL最常见的类型是弥漫性大细胞淋巴瘤。无痛性NHL非限制性实例包括滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、边缘区

淋巴瘤(如结外边缘区淋巴瘤(也称为粘膜相关的淋巴组织--MALT淋巴瘤)、结边缘区B细胞淋巴瘤(单核细胞样B细胞淋巴瘤),脾边缘区域淋巴瘤)和淋巴浆细胞性淋巴瘤(瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症)。在一些实施方式中,受试者患有侵略性NHL或无痛性NHL。

[0282] 在一些实施方式中,受试者患有选自以下组成的组的病症:套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、多发性骨髓瘤(MM)和边缘区淋巴瘤。

[0283] 在一些实施方式中,患者患有复发的或难治性的病症。在特定的实施方式中,该受试者是化学疗法治疗难治的或在化学疗法治疗后复发。

[0284] 在一些实施方式中,癌症对于利妥昔单抗的治疗有抗性。在一些实施方式中,癌症表现出对于利妥昔单抗的治疗减弱的响应。在一些实施方式中,该受试者先前曾用利妥昔单抗治疗。

[0285] 在一种特定的实施方式中,方法包括在受试者中降低NF- κ B活性的水平、降低SNAIL表达、增加RKIP活性、增加PTEN活性、增加肿瘤对TRAIL-细胞凋亡的敏感性、降低PI3K δ 活性的水平,或它们的组合。

[0286] 在一种特定实施方式中,式A的化合物和抗CD20抗体的组合耗竭来自于人全血的B细胞。在一些实施方式中,与式A的化合物或抗CD20抗体单独耗竭来自于人全血的B细胞相比,式A的化合物与抗CD20抗体的组合更大程度耗竭来自于人全血的B细胞。在一些实施方式中,式A的化合物与抗CD20抗体的组合耗竭来自于人全血的B细胞的程度大于通过式A的化合物的耗竭和通过抗CD20抗体的耗竭的总和。

[0287] 在一些实施方式中,式A的化合物和抗CD20抗体用于治疗与B细胞过度增殖有关的疾病或失调的方法,其中,该方法包括将式A的化合物和抗CD20抗体给予至需要其的受试者。在一些实施方式中,式A的化合物和抗CD20抗体用于在治疗与过度的B细胞活性有关的疾病或失调的方法中使用,其中,该方法包括将化合物A和抗CD20抗体给予至需要其的受试者。在一些实施方式中,式A的化合物和抗CD20抗体用于在治疗与过量的B细胞数目有关的疾病或失调的方法中使用,其中,该方法包括将化合物A和抗CD20抗体给予至需要其的受试者。

[0288] 可以使用如在国际专利申请公开号W02011/055215A2和美国专利申请号2011/0118257A1中公开的通用合成方法制备式A的化合物,并且具体的化合物制备是如在2012年7月4日提交的印度临时专利申请2693/CHE/2012,2012年8月21提交的美国临时专利申请美国序列号61/691,586,2013和7月2日提交的PCT/US2013/055434和2013年7月2日提交的美国序列号13/933,856中公开的。通过引用将这些申请和出版物中的每一个的全部内容结合于此。

[0289] 实施例

[0290] 式A的化合物的合成

[0291] 除非另有说明,纯化意味着柱层析,该柱层析使用硅胶作为固定相并且使用石油醚(沸点为60-80℃)和乙酸乙酯的混合物或合适极性的二氯甲烷和甲醇作为流动相。术语“RT”是指室温(25-28℃)。

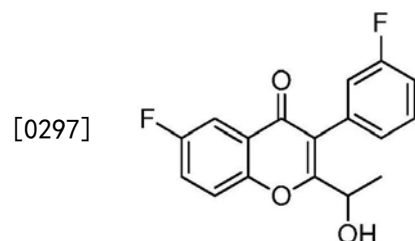
[0292] 中间体1:2-(1-溴乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮

[0293] 步骤-1 [1-(5-氟-2-羟苯基)-2-(3-氟苯基)乙酮]: 将3-氟苯基乙酸(7.33g, 47.56mmol)溶解在25ml二氯甲烷中。在0℃下向该混合物添加草酰氯(7.54g, 59.46mmol)和DMF(3滴)并搅拌30分钟。蒸发出溶剂并且溶解在25ml二氯甲烷中。向该混合物添加4-氟苯甲醚(5.00g, 39.64mmol)并冷却至0℃。在0℃下添加AlCl₃(7.95g, 59.46mmol)并将反应混合物加热至RT并搅拌12小时。该反应混合物通过添加2N HCl淬灭、用乙酸乙酯萃取、经硫酸钠干燥并且浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物,得到无色固体状的标题化合物(4.5g, 45%产率)。¹H-NMR (δppm, DMSO-D₆, 400MHz): δ11.34 (s, 1H), 7.75 (dd, J=9.4, 3.1Hz, 1H), 7.42 (m, 2H), 7.12 (m, 3H), 7.05 (dd, J=9.0, 4.5Hz, 1H), 4.47 (s, 2H)。

[0294] 步骤-2 [2-乙基-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮]: 将从步骤-1获得的1-(5-氟-2-羟苯基)-2-(3-氟苯基)乙酮(3.00g, 12.08mmol)置于圆底烧瓶中,向其中添加三乙胺(25ml)和丙酸酐(4.92g, 37.82mmol),随后将该混合物回流24小时。在冷却至RT后,该反应混合物通过添加1N HCl溶液酸化、用乙酸乙酯萃取、用碳酸氢钠溶液洗涤、用硫酸钠干燥并浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物,得到浅黄色固体状的标题化合物(1.80g, 52%产率)。¹H-NMR (δppm, DMSO-D₆, 400MHz): δ7.80 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.51 (dd, J=8.0, 6.4Hz), 7.22 (m, 1H), 7.18 (m, 2H), 2.56 (q, J=7.6Hz, 2H), 1.20 (t, J=7.6Hz, 3H)。

[0295] 步骤-3: 向获得自步骤-2的2-乙基-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮(1.80g, 6.28mmol)在四氯化碳(20ml)中的溶液添加N-溴琥珀酰亚胺(1.11g, 6.28mmol)溶液,并加热至80℃。在80℃下,添加偶氮二异丁腈(10mg)至反应混合物中。12小时后,将反应混合物冷却至RT,用二氯甲烷稀释,并用水洗涤。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩,得到黄色固体状的粗的标题化合物(1.25g, 55%产率)。¹H-NMR (δppm, DMSO-D₆, 400MHz): δ7.91 (dd, J=9.2, 4.3Hz, 1H), 7.81 (dt, J=8.2, 2.8Hz, 1H), 7.74 (dd, J=8.3, 3.1Hz, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.32 (dt, J=8.5, 2.4Hz, 1H), 7.19 (m, 2H), 5.00 (q, J=6.8Hz, 1H), 1.97 (d, J=6.8Hz, 3H)。

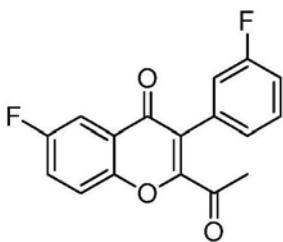
[0296] 中间体2: 6-氟-3-(3-氟苯基)-2-(1-羟乙基)-4H-色烯-4-酮



[0298] 向中间体1(15.0g, 40.84mmol)在DMSO(150ml)中的溶液添加正丁醇(7.5ml),并将其加热至120℃持续3小时。将反应混合物冷却至RT,用水淬灭并用乙酸乙酯萃取。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物,得到灰白色固体状的标题化合物(7.90g, 64%)。¹H-NMR (δppm, CDCl₃, 400MHz): δ7.85 (dd, J=8.1, 3Hz, 1H), 7.54 (dd, J=9.2, 4.2Hz, 1H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.15-6.98 (m, 3H), 4.74 (五重峰, J=6.8Hz, 1H), 2.23 (d, J=7.4Hz, 1H), 1.54 (d, J=6.6Hz, 3H)。

[0299] 中间体3: 2-乙酰基-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮

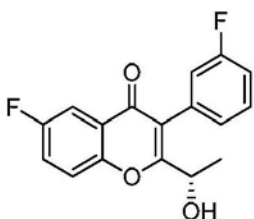
[0300]



[0301] 将DMSO (5.60ml, 79.14mmol) 添加至二氯甲烷 (40ml) 中, 并冷却至 -78°C , 然后添加草酰氯 (3.40ml, 39.57mmol)。10分钟后, 逐滴滴加二氯甲烷 (54ml) 中的中间体2 (6.00g, 19.78mmol) 并且搅拌20分钟。添加三乙胺 (12ml) 并搅拌1小时。将反应混合物用水淬灭并用二氯甲烷萃取。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物, 得到黄色固体状的标题化合物 (4.2g, 71%), 将其原样用于下一步骤。

[0302] 中间体4: (S)-6-氟-3-(3-氟苯基)-2-(1-羟乙基)-4H-色烯-4-酮

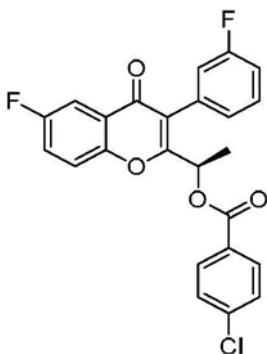
[0303]



[0304] 向中间体3 (2.00g, 6.66mmol) 添加R-Alpine硼烷 (0.5M在THF中, 20ml) 并将其加热至 60°C 持续20小时。将反应混合物用2N HCl淬灭并用乙酸乙酯萃取。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物, 得到灰白色固体状的标题化合物 (1.51g, 75%)。对映异构体过量: 94.2%, 在快速洗脱异构体中富集 (保留时间: 8.78分钟), 如在手性 (chiralpak) AD-H柱上通过HPLC测定的。

[0305] 中间体5: (R)-4-氯苯甲酸1-(6-氟-3-(3-氟苯基)-4-氧代-4H-色烯-2-基) 乙基酯 ((R)-1-(6-fluoro-3-(3-fluorophenyl)-4-oxo-4H-chromen-2-yl) ethyl 4-chlorobenzoate)

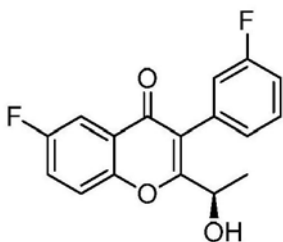
[0306]



[0307] 向中间体4 (1.45g, 4.78mmol) 在THF (15ml) 中的溶液添加4-氯苯甲酸 (0.748g, 4.78mmol) 和三苯基膦 (1.88g, 7.17mmol) 并且加热至 45°C , 紧接着添加偶氮二甲酸二异丙酯 (1.4ml, 7.17mmol)。1小时后, 将反应混合物浓缩并用乙酸乙酯:石油醚洗脱通过柱层析纯化残余物, 得到灰白色固体状的标题化合物 (1.81g, 86%), 其不经纯化用于下一步骤。

[0308] 中间体6: (R)-6-氟-3-(3-氟苯基)-2-(1-羟乙基)-4H-色烯-4-酮

[0309]



[0310] 方法A

[0311] 将在甲醇(17ml)中的中间体5(1.75g, 3.96mmol)冷却至10℃, 添加碳酸钾(0.273g, 1.98mmol)并搅拌30分钟。浓缩反应混合物, 用2N HCl溶液酸化, 用乙酸乙酯萃取, 经硫酸钠干燥并减压浓缩该反应混合物。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物, 得到黄色固体状的标题化合物(1.05g, 87%产率)。对映异构体过量:93.6%, 在迟洗脱异构体(保留时间:11.12分钟)中富集, 如在手性AD-H柱上通过HPLC测定的。

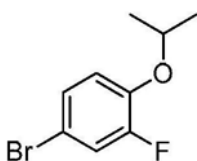
[0312] 方法B

[0313] 步骤-1[(R)-2-(1-(苄氧基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮]:向二氯甲烷中的1-(5-氟-2-羟苯基)-2-(3-氟苯基)乙酮(11.00g, 44.31mmol)添加HATU(33.7g, 88.63mmol)和R-(+)-2-苄氧基丙酸(9.58g, 53.17mmol)并搅拌10分钟。逐滴滴加三乙胺(66.7ml, 0.47mol)并在RT下搅拌24小时。反应混合物用水淬灭并用二氯甲烷萃取, 经硫酸钠干燥并减压浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物, 得到黄色固体状的标题化合物(10.5g, 60%产率)。¹H-NMR(δppm, CDCl₃, 400MHz):7.85(dd, J=8.1, 3Hz, 1H), 7.58(dd, J=9.1, 4.1Hz, 1H), 7.47-7.39(m, 1H), 7.39-7.34(m, 1H), 7.28-7.20(m, 3H), 7.20-7.14(m, 2H), 7.16-7.07(m, 1H), 6.99-6.89(m, 2H), 4.50-4.31(m, 3H), 1.56(d, J=6.4Hz, 3H)。

[0314] 步骤-2:在二氯甲烷(110ml)中的在步骤-1中获得的(R)-2-(1-(苄氧基)基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮(10.5g, 26.69mmol)被冷却至0℃、分批加入氯化铝(5.35g, 40.03mmol)并在RT下搅拌6小时。反应混合物用2N HCl溶液淬灭, 用二氯甲烷萃取, 经硫酸钠干燥并减压浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物, 得到黄色固体的中间体6(6.1g, 76%产率)。对映异构体过量:97.7%, 在迟洗脱异构体(保留时间:11.12分钟)中富集, 如在手性AD-H柱上通过HPLC测定的。

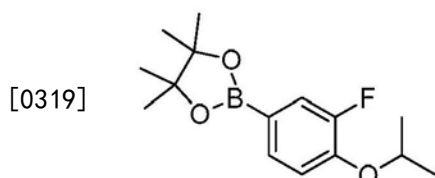
[0315] 中间体7:4-溴-2-氟-1-异丙氧基苯

[0316]



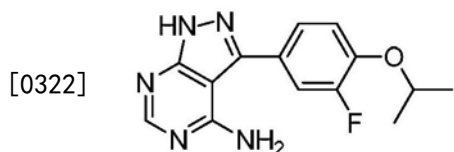
[0317] 向4-溴-3-氟苯酚(10g, 52.35mmol)在THF(100ml)中的溶液添加异丙醇(4.8ml, 62.62mmol)和三苯基膦(20.6g, 78.52mmol)并加热至45℃, 随后(添加)偶氮二甲酸二异丙酯(15.4ml, 78.52mmol)。将混合物回流1小时, 浓缩该混合物并用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化残余物, 得到无色液体状的标题化合物(13.1g, 99%产率), 其不经纯化用于下一步骤。

[0318] 中间体8:2-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷(2-(3-fluoro-4-isopropoxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane)



[0320] 向中间体7 (10.52g, 107.2mmol) 在二氧六环 (二噁烷) (125ml) 中的溶液添加醋酸钾 (10.52g, 107.2mmol) 和双 (频哪醇合) 二硼 (15g, 58.96mmol), 并将溶液脱气30分钟。在氮气气氛下添加[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II) CH_2Cl_2 (4.4g, 5.36mmol) 并加热至80℃。12小时后,经硅藻土过滤并浓缩该反应混合物。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物,得到黄色油状的标题化合物 (13.9g, 99%), 其不经纯化用于下一步骤。

[0321] 中间体9: 3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[0323] 向3-碘-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (11.0g, 42.14mmol) 在DMF (110ml) 中的溶液添加乙醇 (55ml) 和水 (55ml)、中间体8 (23.4g, 84.28mmol) 和碳酸钠 (13.3g, 126.42mmol) 并脱气30分钟。在氮气气氛下添加四(三苯基膦)钯(0) (2.4g, 2.10mmol) 并加热至80℃。12小时后,经硅藻土过滤,浓缩并用乙酸乙酯萃取该反应混合物。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩。用乙醚磨碎粗产物,过滤并在真空下干燥,得到浅棕色固体状的标题化合物 (3.2g, 26%产率), 其原样用于下一步骤。

[0324] (RS)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮

[0325] 向中间体9 (0.080g, 0.293mmol) 在DMF (2ml) 中的溶液添加碳酸钾 (0.081g, 0.587mmol) 并在RT下搅拌10分钟。向该混合物添加中间体1 (0.215g, 0.587mmol) 并搅拌12小时。将反应混合物用水稀释并用乙酸乙酯萃取。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩。用甲醇:二氯甲烷通过柱层析纯化粗产物,得到淡黄色固体状的标题化合物 (0.045g)。MP: 175-177℃。 $^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, $\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 8.20 (s, 1H), 7.85 (dd, $J=8.1, 3.0\text{Hz}$, 1H), 7.48-7.33 (m, 5H), 7.14 (t, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 7.02 (m, 2H), 6.90 (m, 1H), 6.10 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.64 (五重峰, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 1.99 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.42 (d, $J=6.1\text{Hz}$, 6H)。

[0326] (S)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮 ("S-异构体")

[0327] 向中间体9 (0.134g, 0.494mmol) 在THF (2.0ml) 中的溶液添加中间体6 (0.150g, 0.494mmol) 和三苯基膦 (0.194g, 0.741mmol) 并在RT下搅拌5分钟。添加偶氮二甲酸二异丙酯 (0.15ml, 0.749mmol) 并加热至45℃。2小时后,用水淬灭反应混合物,并用乙酸乙酯萃取。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩。用乙酸乙酯:石油醚通过柱层析纯化粗产物,得到灰白色固体状的标题化合物 (0.049g, 20%产率)。MP: 139-142℃。质量: 571.7 (M^+)。对映异构体过量: 如在手性AD-H柱上通过HPLC测定的89.8%, 在快速洗脱异构体 (保留时间=10.64分钟) 中富集。

[0328] (R)-2-(1-(4-氨基-3-(3-氟-4-异丙氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)乙基)-6-氟-3-(3-氟苯基)-4H-色烯-4-酮

[0329] 向中间体8 (0.284g, 0.989mmol) 在THF (5.0ml) 中的溶液添加中间体4 (0.250g, 0.824mmol) 和三(4-甲氧基)苯基膦 (0.435g, 1.23mmol) 并在RT下搅拌5分钟。添加偶氮二碳酸二异丙酯 (0.25ml, 1.23mmol) 并在RT下搅拌。12小时后, 用水淬灭反应混合物并用乙酸乙酯萃取。经硫酸钠干燥有机层并在减压下浓缩。用乙酸乙酯: 石油醚通过柱层析纯化粗产物, 得到灰白色固体状的标题化合物 (0.105g, 22% 产率)。MP: 145-148°C。质量: 571.7 (M⁺)。对映异构体过量: 如在手性AD-H柱上通过HPLC测定的95.4%, 在迟洗脱的异构体 (保留时间 = 14.83min) 中富集。

[0330] 生物学评价

[0331] 式A的化合物和抗CD20抗体的组合

[0332] 实施例1: 式A的化合物的S-异构体和Ublituximab的组合耗竭来自于全血的B细胞

[0333] 流式细胞仪检测用于比较式A的化合物的S-异构体、Ublituximab (Ubx) 和它们的组合耗竭来自于人全血 (HWP) 的B细胞的能力。在该检测中, 分别用式A的化合物的S-异构体 (1000nM), UBX (100μg/ml 至 0.1μg/ml) 或UBX与式A的化合物的S-异构体 (1000nM) 组合处理50μl的HWP样品并在37°C和5%CO₂下孵育24hrs。将20μl处理过的样品放入1.5ml离心管中并用CD45FITC和CD19PE或CD20FITC抗体标记并在RT下在暗处孵育1小时。添加1ml红血细胞 (RBC) 裂解溶液, 并且在3000rpm下离心试管10分钟。吸去上清, 添加250μl的PBS至沉淀 (pellet)。将该试管涡旋, 并且在Guava[®] easyCyte[™]流式细胞仪上获取5000个事件, 并用Incyte软件分析它们。

[0334] 对于CD19, 进一步分析CD45-阳性细胞的选通的群体 (gated population)。计算CD45和CD19阳性的细胞数, 并且该数据表示为在群体中的CD19阳性细胞的百分比。用荧光阳性减去未标记的细胞选通的CD20-阳性群体, 并且该数据表示为在群体中CD20-阳性细胞的百分比。计算CD19/CD20群体由对照的减少 (loss), 并且将其表示为相对于对照的%耗竭。

[0335] 结果如图1所示。式A的化合物的S-异构体在最高达10μM的浓度下对于B细胞没有细胞毒性。因此, 用1μM的式A的化合物的S-异构体没有观察到CD19-阳性或CD20-阳性HWP B细胞的降低。UBX抗CD20抗体以1至100,000ng/ml的剂量仅仅产生B细胞的20-30%耗竭, 但是它引起了CD20+B细胞中的剂量依赖性减少。1000nM的式A的化合物的S-异构体与10ng/ml的UBX的组合产生CD19+细胞耗竭的增强, 并且1000nM的式A的化合物的S-异构体与0.1-10ng/ml浓度的UBX的组合产生对CD20+细胞耗竭的适度的加和效应。这些结果证明, 式A的化合物的S-异构体 (1000nM) 与UBX (10ng/ml) 的组合显示CD19-阳性细胞耗竭的增强和对CD20-阳性细胞耗竭适度的效应。

[0336] 实施例2: 式A的化合物的S-异构体和UBX组合影响LPS诱导的B细胞增殖

[0337] 流式细胞仪用于研究式A的化合物的S-异构体, Ubx及其组合对于在HWP中LPS诱导的CD19和CD20细胞增殖的影响。在这些实验中, 分别用式A的化合物的S-异构体 (10μM至0.1μM)、UBX (100μg/ml至0.1μg/ml) 或UBX与式A的化合物的S-异构体 (1000nM) 处理250μl稀释的 (用RPMI-HG培养基1:3.5) HWP样品15分钟, 随后通过20μg/ml的LPS诱导并且在37°C和5%CO₂下培养72小时。将20μl处理过的样品放入1.5ml离心管并用CD20FITC和CD19PE抗体标记

并在RT下在暗处培养1小时。添加1ml的RBC裂解液并在3000rpm下离心试管10分钟。吸出上清液,并且添加250 μ l的PBS至沉淀。将试管涡旋,并且在Guava®easyCyte™流式细胞仪上获取5000个事件,并用Incyte软件分析它们。

[0338] 对于CD19和CD20,进一步分析淋巴细胞阳性细胞的选通的群体。计算CD19和/或CD20阳性的细胞,并且数据表示为在群体中的百分比阳性细胞。计算阳性群体由具有LPS诱导的对照的减少,并且将其表示为相对于对照的%抑制。

[0339] 结果如图2和图3所示。式A的化合物的S-异构体(1 μ M)引起LPS诱导的使用HWB(~60%)的CD19+B细胞增殖的剂量依赖性抑制。由于UBX对于CD19+细胞最小效应,将1 μ M的式A的化合物的S-异构体添加至不同浓度的UBX不会增加响应超过~60%。然而,以100ng/ml浓度的UBX注意到组合对于CD19+细胞增殖的加和效应。

[0340] 与它对CD19+细胞增殖的效应相反,式A的化合物的S-异构体以1 μ M显示出CD20+细胞的~40%的抑制。1 μ M的式A的化合物的S-异构体与UBX的组合的加和效应是明显的,特别是对于0.1ng/ml的剂量。

[0341] 实施例3:式A的化合物的S-异构体与UBX组合增加在癌细胞中的细胞凋亡

[0342] 为了确定式A的化合物的S-异构体、UBX和其组合在癌细胞中对于细胞凋亡的影响,使用原位半胱天冬酶-3试剂盒(Millipore)。以 0.5×10^6 细胞/ml的浓度将细胞铺于6孔板中,分别用式A的化合物的S-异构体(1000nM)、UBX(100 μ g/ml至0.1 μ g/ml)或UBX与式A的化合物的S-异构体(1000nM)处理并在37℃和5%CO₂下孵育24小时。随后将细胞转移至微量离心管中以接收10 μ l的新鲜制备的FLICA™试剂并且在37℃和5%CO₂下避光孵育1小时。在用洗涤缓冲液充分洗涤后,调整测试样品以平衡PBS中的细胞数量。将100 μ l各细胞悬浮液转移至黑色96-孔培养板,一式两份,并在酶标仪中在490nm的激发波长和520nm的发射波长处读取荧光。从测试化合物的荧光强度中减去DMSO对照的荧光强度。数据表示为最大响应(100%)的百分比并相应地作图。

[0343] 结果如图4所示。UBX在测试的细胞系中显示出有限的诱导半胱天冬酶-3活性的能力。通过用1 μ M的式A的化合物的S-异构体孵育细胞系,半胱天冬酶-3活性增加40-75%。在Daudi细胞中,在100ng/ml的UBX浓度处注意到组合的协同效应,而在UBX的较高浓度(10&100ng/ml)处在RPMI-8226、Raji和U226B1细胞系中观察到加和效应。

[0344] 实施例4:式A的化合物的S-异构体和UBX的组合引起细胞周期阻滞

[0345] 将细胞周期检测试剂(Millipore)用于测定式A的化合物的S-异构体、UBX、及其组合在癌细胞中对于细胞周期的影响。在这些实验中,将细胞以 0.5×10^6 细胞/ml的浓度铺于6孔平板中,分别用式A的化合物的S-异构体(10 μ M至0.1 μ M)、UBX(100 μ g/ml至0.1 μ g/ml)或UBX与式A的化合物的S-异构体(1000nM)处理,并在37℃和5%CO₂下孵育72小时。将细胞转移至微量离心管中以接受50 μ l的细胞周期试剂并在RT下避光孵育30分钟。随后用300-400 μ l的PBS稀释细胞,并且在Guava®easyCyte™流式细胞仪上获取最少10,000个事件。用Express Pro软件分析数据,并在直方图中呈现出相对于对照的细胞群体在不同的细胞周期阶段中的百分比。

[0346] 图5-图10示出用U266B1和Raji细胞获得的结果。另外,以下表1-表12提供了使用U266B1、DB、Raji和Daudi细胞获得的定量结果。

[0347] 表1:U266B1细胞-用式A的化合物孵育72h

[0348]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	60.22	4.29	31.72	3.01
10,000nM	2.00	0.94	64.31	28.88
1000nM	47.80	4.69	47.13	0.88

[0349]

100nM	48.69	5.49	45.76	0.75
10nM	55.33	5.38	39.28	0.76
1nM	57.73	4.87	36.19	0.94
0.1nM	59.26	6.55	30.71	2.75

[0350] 表2:U266B1细胞-用UBX抗CD20抗体孵育72h

[0351]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	60.22	4.29	31.72	3.01
100ng/ml	52.95	7.91	39.65	1.95
10ng/ml	56.85	6.34	37.86	0.78
1ng/ml	58.81	7.07	36.07	0.51
0.1ng/ml	57.53	7.63	35.64	1.35
0.01ng/ml	59.32	6.57	35.48	0.74
0.001ng/ml	60.79	6.00	30.49	1.34

[0352] 表3:U266B1细胞-用UBX+式A的化合物(1000nM)孵育72h

[0353]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	60.22	4.29	31.72	3.01
100ng/ml+化合物A	1.25	0.68	84.46	12.76
10ng/ml+化合物A	1.68	1.20	84.97	11.70
1ng/ml+化合物A	47.97	3.81	46.37	0.63
0.1ng/ml+化合物A	47.31	4.28	46.47	0.50
0.01ng/ml+化合物A	47.48	3.84	46.51	0.56
0.001ng/ml+化合物A	47.09	3.97	47.05	0.59

[0354] 表4:DB细胞-用式A的化合物孵育72h

[0355]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	54.30	8.00	36.38	0.48
10,000nM	1.40	0.89	94.87	2.06
1000nM	0.75	0.42	92.79	5.36
100nM	41.21	6.96	50.22	0.43
10nM	47.22	4.98	46.85	0.55
1nM	50.61	6.53	41.44	0.54

0.1nM	54.37	4.84	39.41	0.84
-------	-------	------	-------	------

[0356] 表5:DB细胞-用UBX抗CD20抗体孵育72h

[0357]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	54.30	8.00	36.38	0.48

[0358]

100ng/ml	45.98	7.66	46.55	0.67
10ng/ml	49.52	10.07	40.56	0.56
1ng/ml	51.36	6.46	40.07	0.52
0.1ng/ml	56.34	12.34	38.40	1.10
0.01ng/ml	54.99	7.73	34.79	0.73
0.001ng/ml	54.38	9.45	34.02	0.59

[0359] 表6:DB细胞-用UBX+式A的化合物孵育72h

[0360]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	54.30	8.00	36.38	0.48
100ng/ml+化合物A	0.48	0.32	93.78	5.91
10ng/ml+化合物A	0.70	0.99	93.34	4.79
1ng/ml+化合物A	0.31	0.74	92.65	6.00
0.1ng/ml+化合物A	0.44	0.63	92.84	5.83
0.01ng/ml+化合物A	0.09	0.84	93.97	4.30
0.001ng/ml+化合物A	0.06	0.17	94.48	5.31

[0361] 表7:Raji细胞-用式A的化合物孵育72h

[0362]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	54.10	9.08	33.54	2.14
10,000nM	10.12	23.17	58.09	4.90
1000nM	52.04	3.92	41.21	1.29
100nM	52.81	6.72	37.80	1.04
10nM	55.96	5.80	34.81	1.06
1nM	56.93	5.51	34.13	1.89
0.1nM	56.54	8.38	33.63	1.32

[0363] 表8:Raji细胞-用UBX抗CD20抗体孵育72h

[0364]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	54.10	9.08	33.54	2.14
100ng/ml	22.19	11.05	33.74	34.78
10ng/ml	45.01	8.15	12.90	31.86
1ng/ml	39.72	14.82	15.35	27.32

0.1ng/ml	41.11	8.93	22.00	23.73
0.01ng/ml	54.54	12.65	25.08	5.51
0.001ng/ml	50.52	10.61	33.66	4.35

[0365] 表9:Raji细胞-用UBX+式A的化合物(1000nM) 孵育72h

[0366]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	54.10	9.08	33.54	2.14
100ng/ml+化合物A	44.19	3.20	0.21	51.17
10ng/ml+化合物A	46.93	5.98	3.20	42.80
1ng/ml+化合物A	46.35	6.75	5.98	40.10
0.1ng/ml+化合物A	44.85	9.72	13.00	30.88
0.01ng/ml+化合物A	50.11	12.22	24.04	13.51
0.001ng/ml+化合物A	49.23	5.16	38.21	4.73

[0367] 表10:Daudi细胞-用式A的化合物孵育72h

[0368]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	50.91	11.10	28.51	10.81
10,000nM	2.53	21.92	65.03	5.01
1000nM	48.27	7.91	40.10	2.22
100nM	47.39	11.33	38.05	1.30
10nM	46.84	12.55	37.79	1.68
1nM	48.11	13.27	36.75	0.74
0.1nM	49.56	14.13	33.23	0.34

[0369] 表11:Daudi细胞-用UBX抗CD20抗体孵育72h

[0370]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	50.91	11.10	28.51	10.81
100ng/ml	43.66	9.28	28.55	19.55
10ng/ml	40.92	13.23	28.08	17.77
1ng/ml	40.52	17.54	26.99	14.95
0.1ng/ml	37.40	17.06	32.42	13.42
0.01ng/ml	36.24	19.15	37.83	6.77
0.001ng/ml	38.12	17.90	41.95	2.03

[0371] 表12:Daudi细胞-用UBX+式A的化合物(1000nM) 孵育72h

[0372]

处理	G0/G1	S	G2/M	亚G0
对照	50.91	11.10	28.51	10.81
100ng/ml+化合物A	38.37	8.43	12.95	40.24
10ng/ml+化合物A	49.56	8.47	9.80	32.17

1ng/ml+化合物A	51.73	8.75	11.81	26.26
0.1ng/ml+化合物A	56.23	7.25	11.60	24.80
0.01ng/ml+化合物A	55.87	6.17	17.00	22.02
0.001ng/ml+化合物A	36.58	17.03	35.74	10.64

[0373] 这些结果证明那些细胞接触式A的化合物的S-异构体,导致剂量依赖性G2/M停滞。另外,用UBX处理72小时在弥散大B细胞淋巴瘤(DB)和U266B1细胞中引起适度的G2/M停滞,而它在Raji和Daudi细胞中增加了亚G0细胞的数量。与1 μ M的式A的化合物的S-异构体的组合跨(across)受检细胞系加强了UBX响应。

[0374] 实施例5:式A的化合物的S-异构体和UBX组合在癌细胞中协同增加细胞凋亡

[0375] 为了确定式A的化合物的S-异构体、UBX和其组合在癌细胞中对于细胞凋亡的影响,使用原位半胱天冬酶-3试剂盒(Millipore)。以 0.5×10^6 细胞/ml的浓度将细胞铺于6孔板中,分别用式A的化合物的S-异构体(200–5000nM)、UBX(10,000ng/ml至10ng/ml)或UBX与式A的化合物的S-异构体(如所示)处理,并在37°C和5%CO₂下孵育24小时。随后将细胞转移至微量离心管中以接收10 μ l的新鲜制备的FLICA™试剂并且在37°C和5%CO₂下避光孵育1小时。在用洗涤缓冲液充分洗涤后,调整测试样品以平衡PBS中的细胞数量。将100 μ l各细胞悬浮液转移至黑色96-孔培养板,一式两份,并在酶标仪中在490nm的激发波长和520nm的发射波长处读取荧光。从测试化合物的荧光强度中减去DMSO对照的荧光强度。数据表示为计算的半胱天冬酶-3活性组合指数(C.I.)。C.I.小于1表示协同,等于1表示加和效应并且大于1表示拮抗。

[0376] 在图11和表13–表15中示出DBCL细胞系LY1的结果。UBX在LY1中诱导半胱天冬酶-3活性。在UBX(所有浓度)和式A的化合物的S-异构体(1000nM)存在下,半胱天冬酶-3活性是协同增加的。

[0377] 在图12和表16–表18中示出伯基特淋巴瘤细胞系Raji的结果。UBX在Raji LY1中诱导半胱天冬酶-3活性。在UBX(所有浓度)和式A的化合物的S-异构体(200nM)存在下,半胱天冬酶-3活性是协同增加的。

[0378] 表13:用S-异构体孵育的LY1细胞

[0379]	S-异构体	
	浓度(nM)	半胱天冬酶 3 活性
	200	0.06
	1000	0.17
	5000	0.61

[0380] 表14:用UBX孵育的LY1细胞

[0381]	UBX	
	浓度(ng/ml)	半胱天冬酶 3 活性
	10	0.23
	100	0.32
	1000	0.53
	10,000	0.59

[0382] 表15:用S-异构体和UBX孵育的LY1细胞

[0383]	组合			
	S-异构体(nM)	UBX(ng/ml)	半胱天冬酶 3 活性	C.I.
	200	10	0.2715	0.6
	200	100	0.3404	1.2
	200	1000	0.5902	0.2
	200	10000	0.6317	0.8
	1000	10	0.3811	0.5
	1000	100	0.5523	0.2
	1000	1000	0.743	0.1
	1000	10000	0.8181	0.1
	5000	10	0.7359	0.5
	5000	100	0.8339	0.3
	5000	1000	0.999	0.0
	5000	10000	0.999	0.0

[0384] 表16:用S-异构体孵育的Raji细胞

[0385]	S-异构体	
	浓度(nM)	半胱天冬酶 3 活性
	200	0.36
	1000	0.56
	5000	0.80

[0386] 表17:用UBX孵育的Raji细胞

[0387]	UBX	
	浓度(ng/ml)	半胱天冬酶 3 活性
	10	0.18
	100	0.31
	1000	0.51
	10,000	0.60

[0388] 表18:用S-异构体和UBX孵育的Raji细胞

[0389]	组合			
	S-异构体(nM)	UBX(ng/ml)	半胱天冬酶 3 活性	C.I.
	200	10	0.696	0.20

[0390]	200	100	0.895	0.04
	200	1000	0.999	0.00
	200	10000	0.993	0.00
	1000	10	0.805	0.49
	1000	100	0.939	0.11
	1000	1000	0.928	0.13
	1000	10000	0.866	0.30
	5000	10	0.901	0.97
	5000	100	0.829	2.03
	5000	1000	0.861	1.52
	5000	10000	0.844	1.80

[0391] 如上所述,针对式A的化合物的S-异构体和UBX的组合对半胱天冬酶3活性的影响,评估三种另外的细胞系(LY10 (DLBCL)、Toledo (DLBCL) 和Daudi (伯基特淋巴瘤))。结果如表19-21所示。该组合也证明了半胱天冬酶3的协同活化。

[0392] 表19:用S-异构体和UBX孵育的LY10细胞 (DLBCL)

[0393]

S-异构体 (nM)	UBX (ng/mL)	半胱天冬酶3活性	C.I.
5000	50	0.999	0.021
1000	10	0.421	0.560
200	2	0.119	0.440

[0394] 表20:用S-异构体和UBX孵育的Toledo细胞 (DLBCL)

[0395]

S-异构体 (nM)	UBX (ng/mL)	半胱天冬酶3活性	C.I.
5000	50	0.988	0.336
1000	10	0.685	0.548
200	2	0.136	0.576

[0396] 表21:用S-异构体和UBX孵育的Daudi细胞 (伯基特淋巴瘤)

[0397]

S-异构体 (nM)	UBX (ng/mL)	半胱天冬酶3活性	C.I.
5000	50	0.999	0.004
1000	10	0.594	0.582
200	2	0.296	0.393

[0398] 如上所述,针对式A的化合物的S-异构体和UBX的组合对半胱天冬酶3活性的影响,评估三种套细胞淋巴瘤 (MCL) 细胞系Jeko、Maver和Rec-1。结果如表22-表24所示。该组合也证明半胱天冬酶3的协同活化,其中在较高的S-异构体和UBX浓度处优化的协同效应。

[0399] 表22:用S-异构体和UBX孵育的Jeko细胞

[0400]

S-异构体 (nM)	UBX (ng/mL)	半胱天冬酶3活性	C.I.
5000	50	0.999	0.000
1000	10	0.655	0.274

200	2	0.335	0.506
-----	---	-------	-------

[0401] 表23:用S-异构体和UBX孵育的Maver细胞

[0402]

S-异构体 (nM)	UBX (ng/mL)	半胱天冬酶3活性	C.I.
5000	50	0.999	0.000
1000	10	0.437	0.603
200	2	0.213	0.648

[0403] 表24:用S-异构体和UBX孵育的Rec-1细胞

[0404]

S-异构体 (nM)	UBX (ng/mL)	半胱天冬酶3活性	C.I.
5000	50	0.999	0.000
1000	10	0.484	0.303
200	2	0.403	0.132

[0405] 总之,这些结果示出,在B细胞淋巴瘤模型中,式A的化合物的S-异构体和UBX在半胱天冬酶3(凋亡的标记物)的活化中发挥强有力的协同作用。

[0406] 上面借助于图示特定功能及其关系的实施的功能结构单元已经描述了本发明。为了便于描述,已经任意地限定这些功能结构单元的界限。只要特定功能和其关系得到适当地执行,可以限定替代的界限。

[0407] 具体实施方式的前述的描述将如此充分地揭示本发明的一般性质以至于其他人可以通过应用本领域技术内的知识容易地修改这些具体实施方式和/或使这些具体实施方式适应各种应用,没有过度的实验、没有偏离本发明的总体概念。因此,基于在本文中提供的教导和指导,这些改进和修改都应属于所公开实施方式的等价物的意义和范围内。将要理解的是,在本文中的用语或术语是为了描述的目的而不是限制的目的,使得技术人员将根据教学和解释本说明书的术语或用语。在此通过引用将在本文中引用的参考文献结合于此。

[0001]

<110> TG疗法有限公司(TG Therapeutics, Inc.)
理森制药股份公司(Rhizen Pharmaceuticals SA)
LFB生物技术(LFB Biotechnologies)

<120> 抗CD20抗体和PI3激酶选择性抑制剂的组合

<130> 43-101wo1

<150> IN 4595/CHE/2012

<151> 2012-11-02

<150> US 61/771,812

<151> 2013-03-02

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 2

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 3

Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 4

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

[0002]

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 [0003] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 6

Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5

<210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 7

Ala Thr Ser
 1

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 8

Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 9

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

[0004]

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 10

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

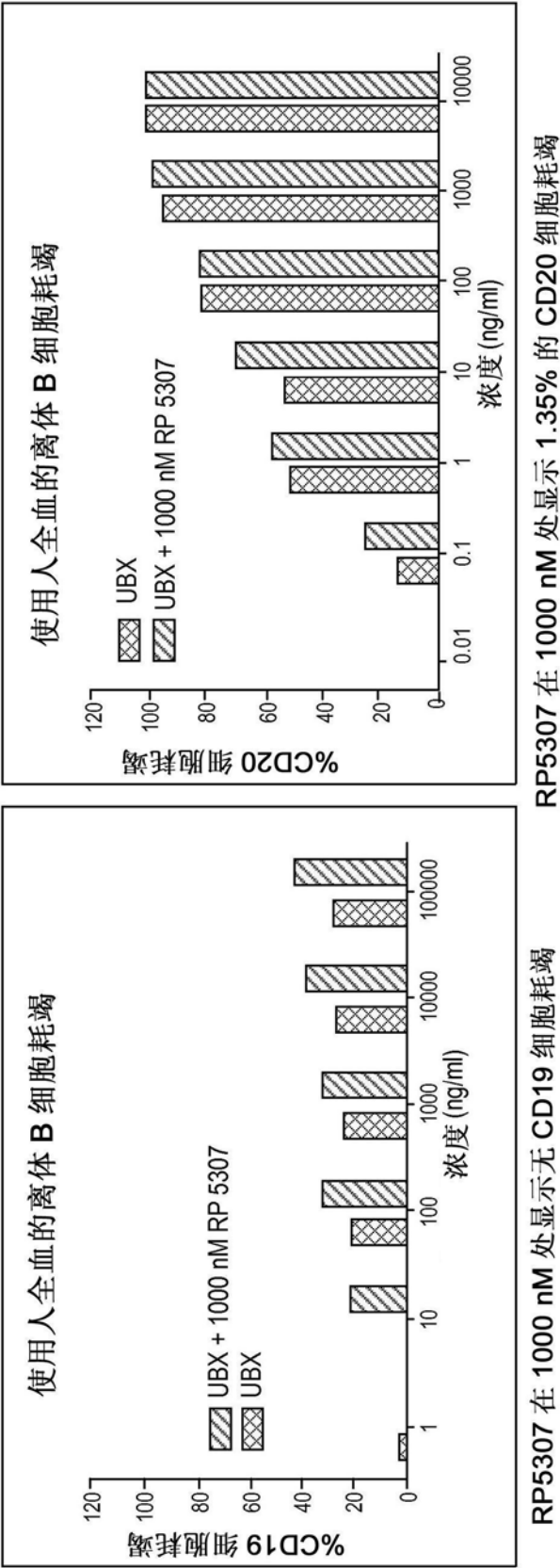
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

[0005]

Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
50						55					60				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
65					70					75				80	
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
				85					90					95	
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
			100					105							

结果



RP5307 在 1000 nM 处显示 1.35% 的 CD20 细胞耗竭

RP5307 在 1000 nM 处显示无 CD19 细胞耗竭

图1

结果

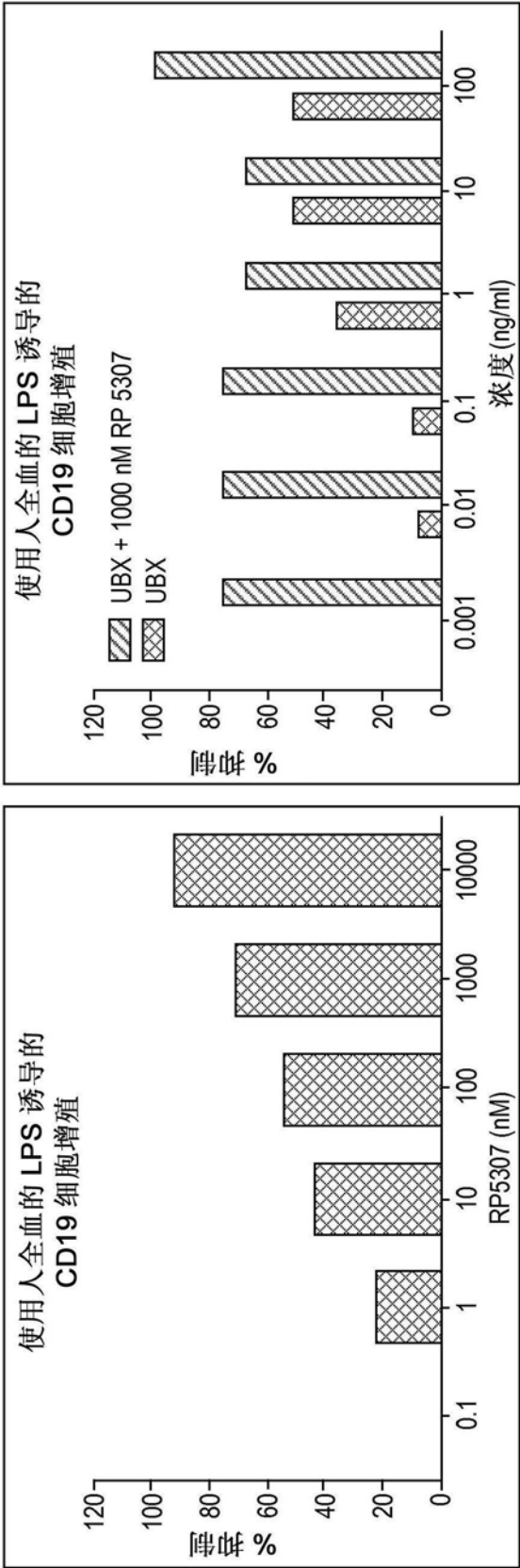


图2

结果

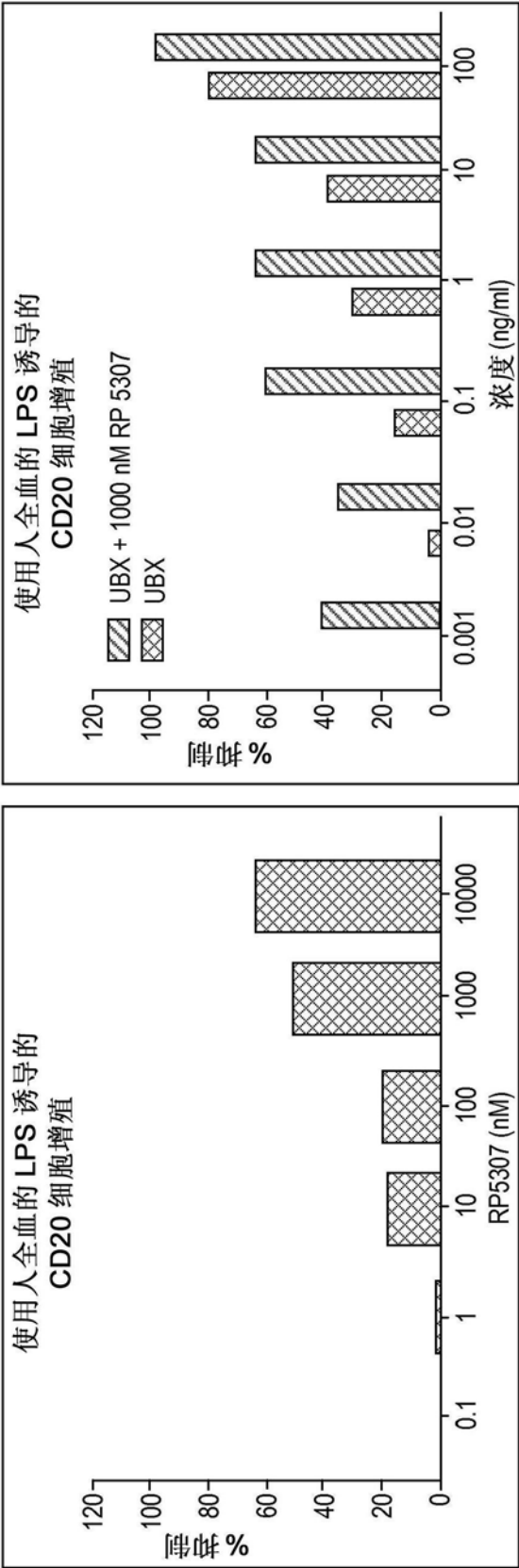


图3

结果

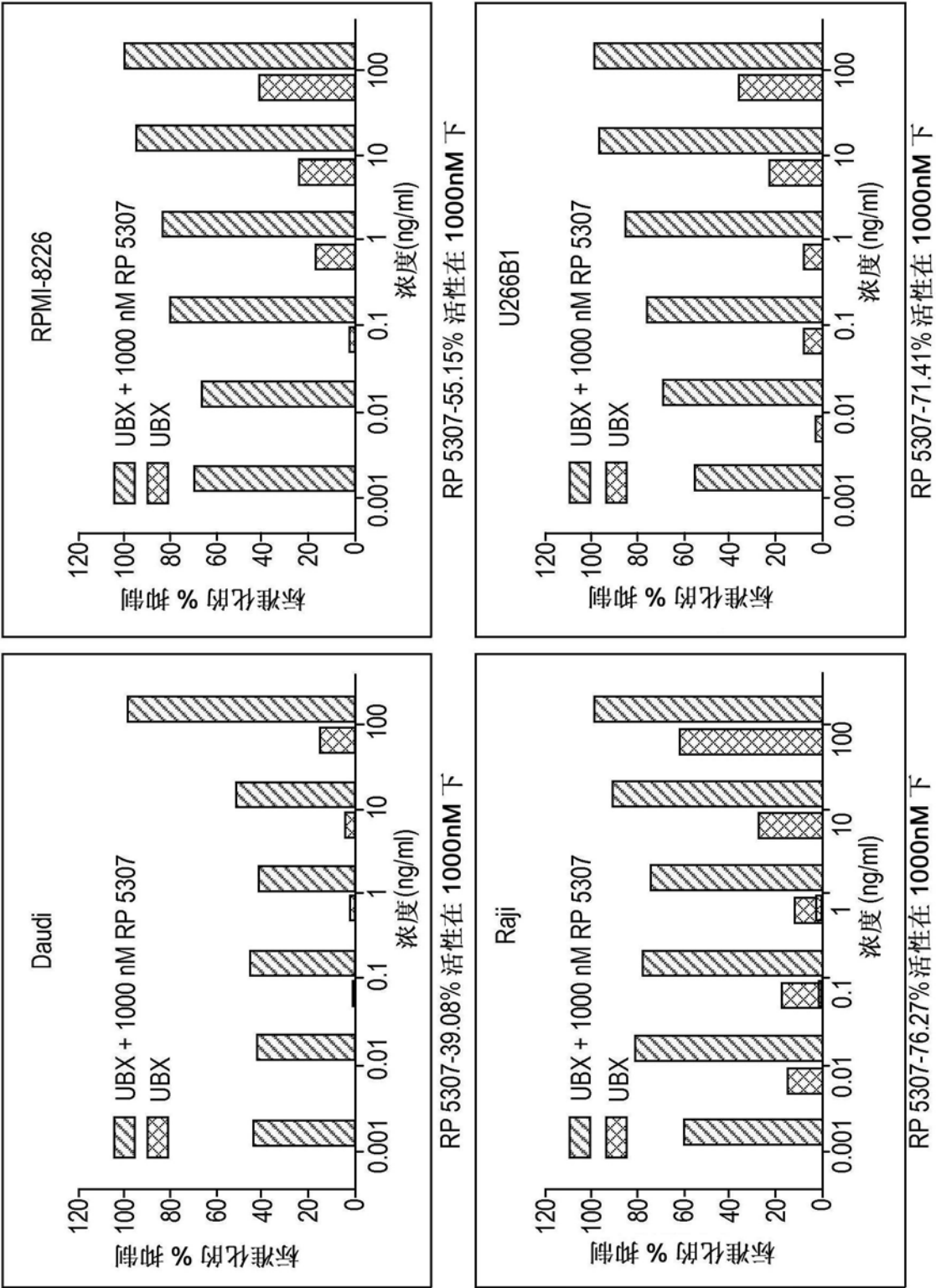


图4

U266B1-72 h 孵育-RP 5307

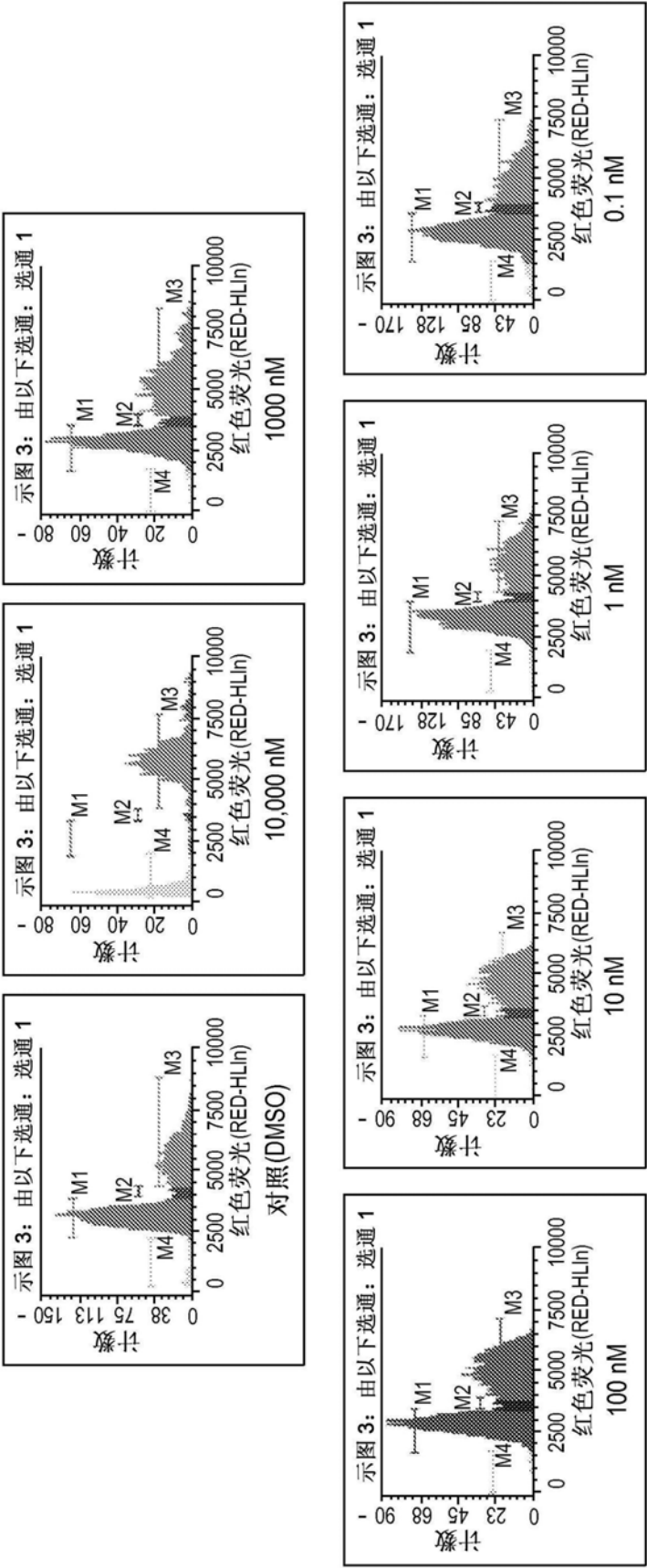


图5

U266B1-72 h UBX 抗 CD20 抗体

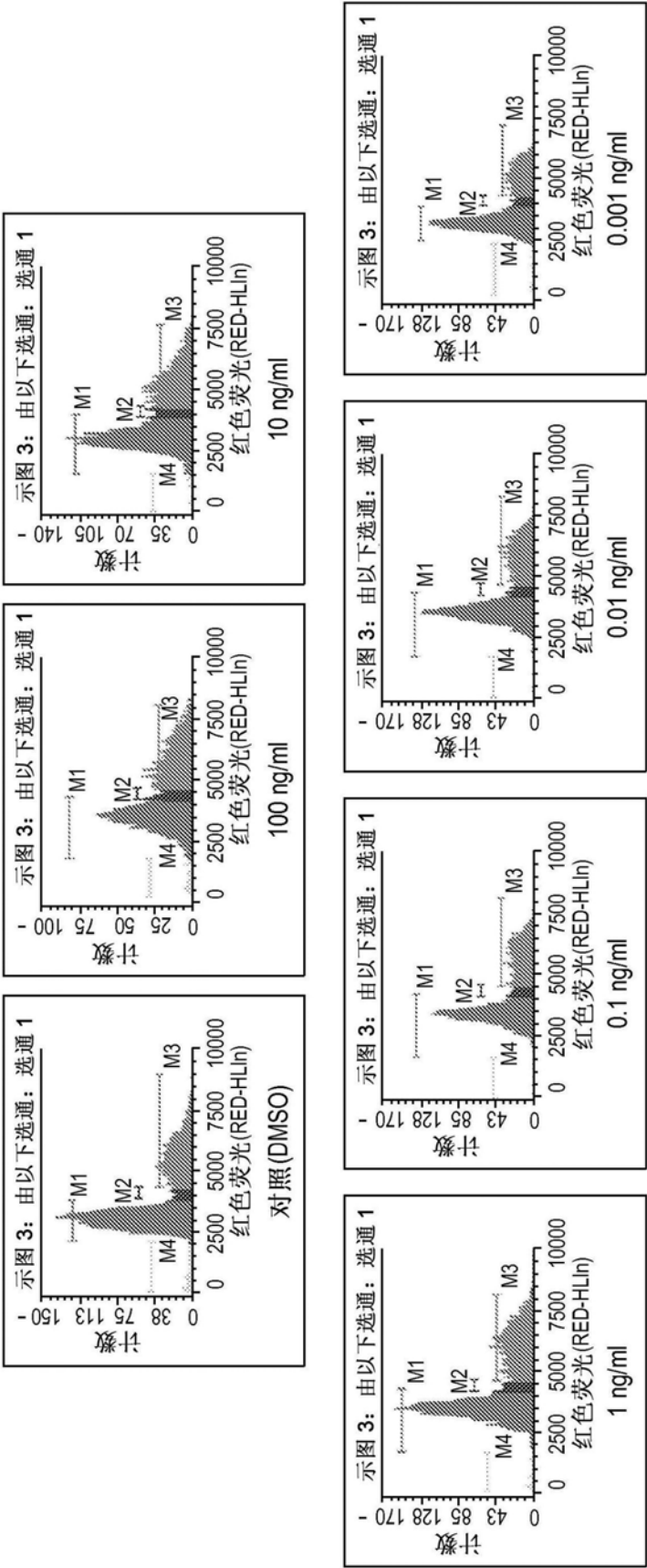


图6

U266B1-72 h UB_X + RP 5307(1000 nM)

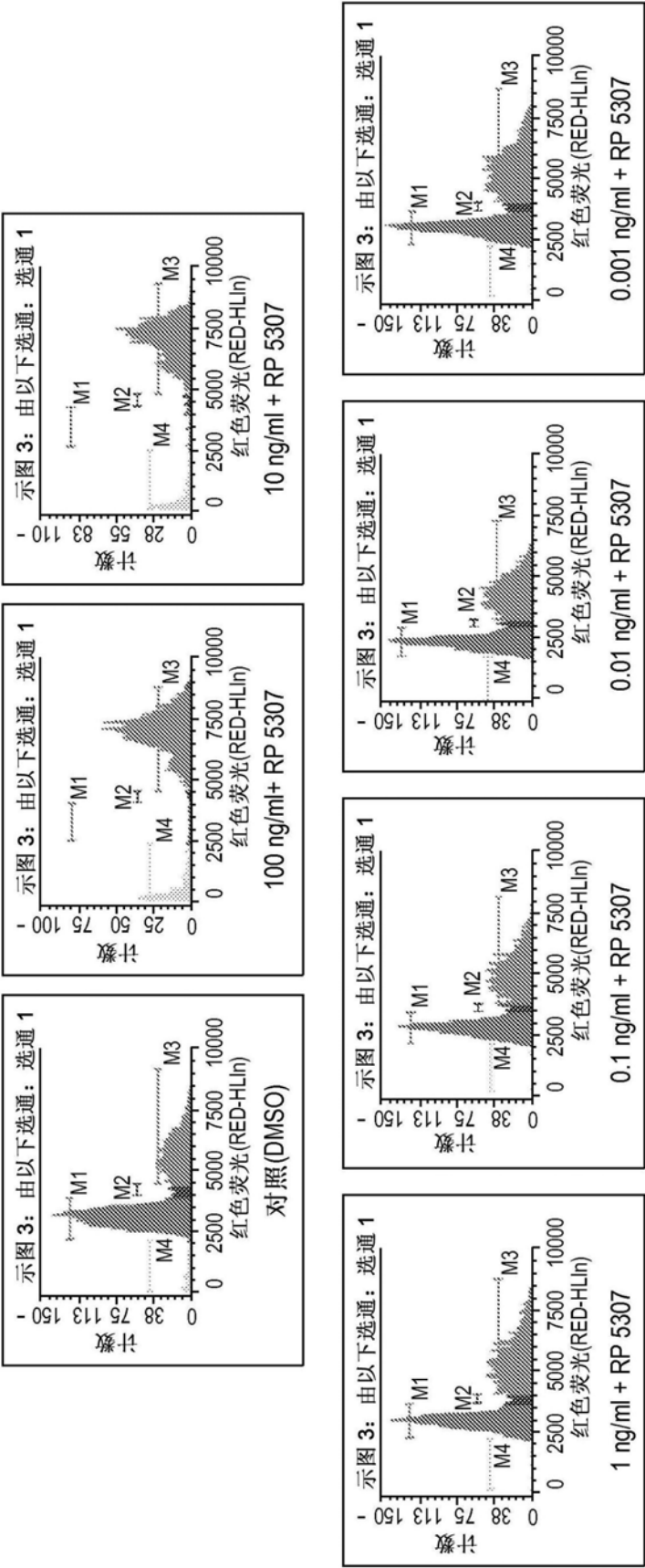


图7

Raji- 72 h 孵育-RP 5307

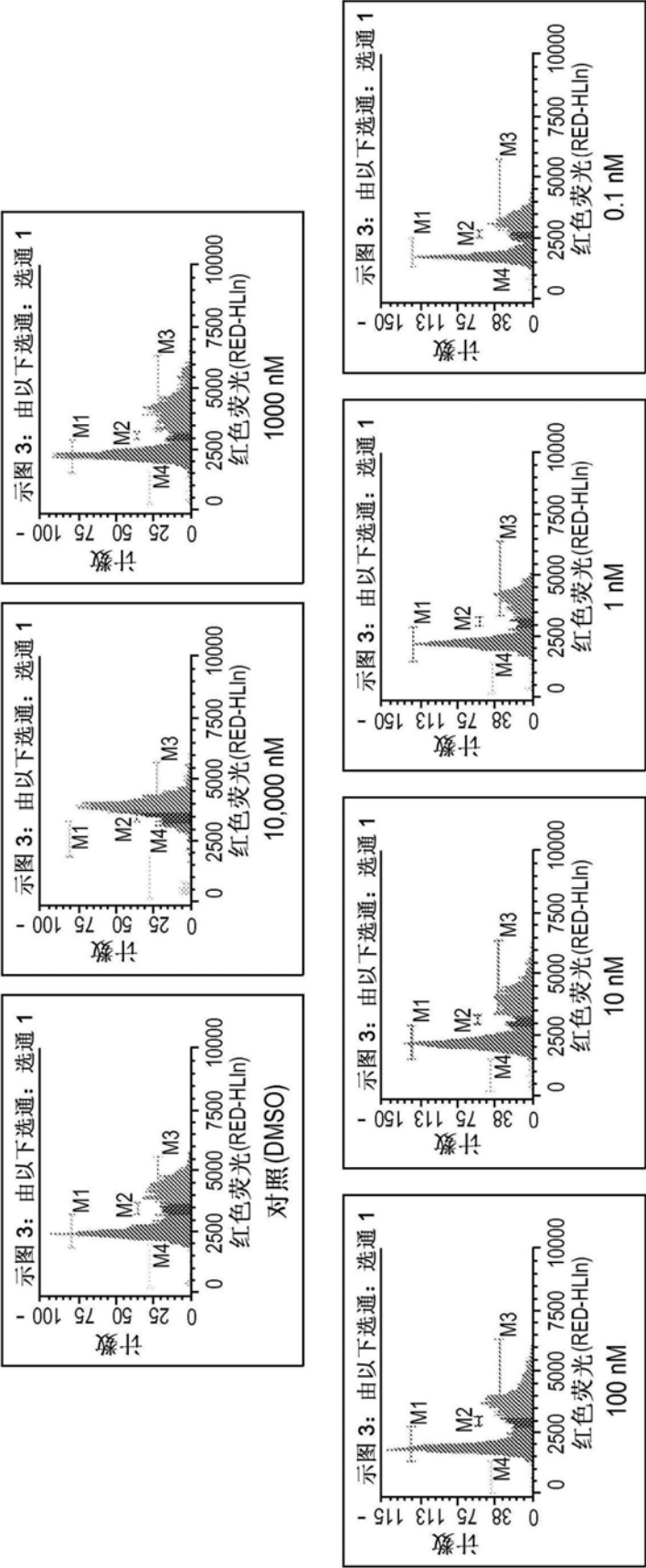


图8

Raji-72 h UBX 抗 CD20 抗体

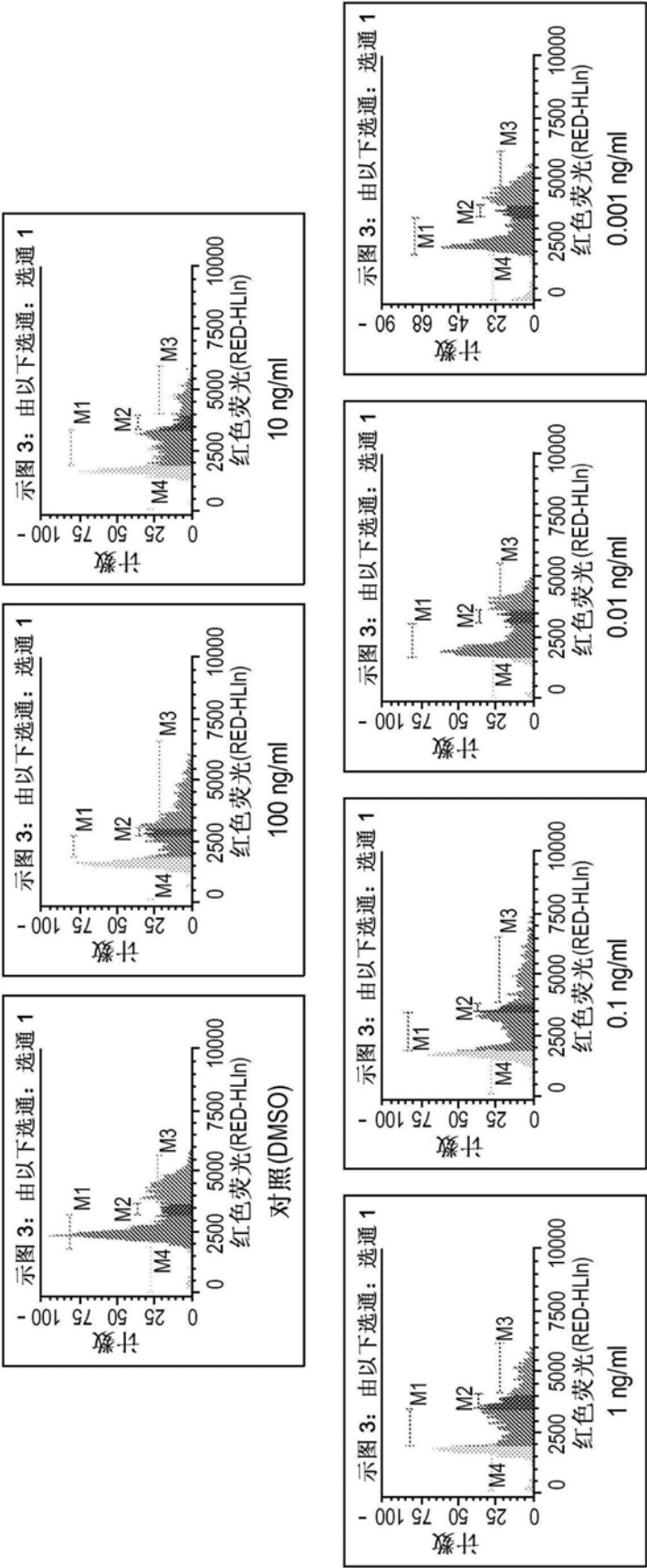


图9

Raji- 72 h UBX + RP 5307(1000 nM)

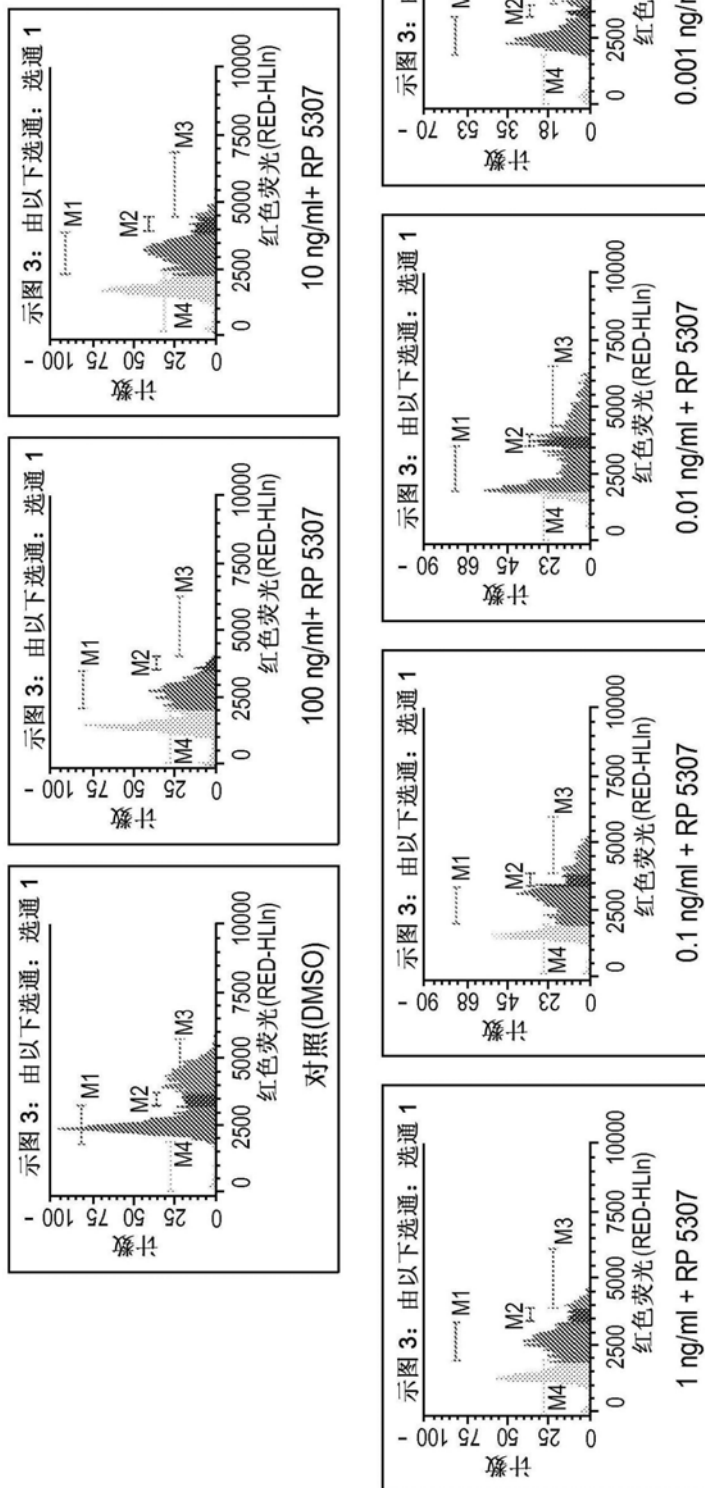


图10

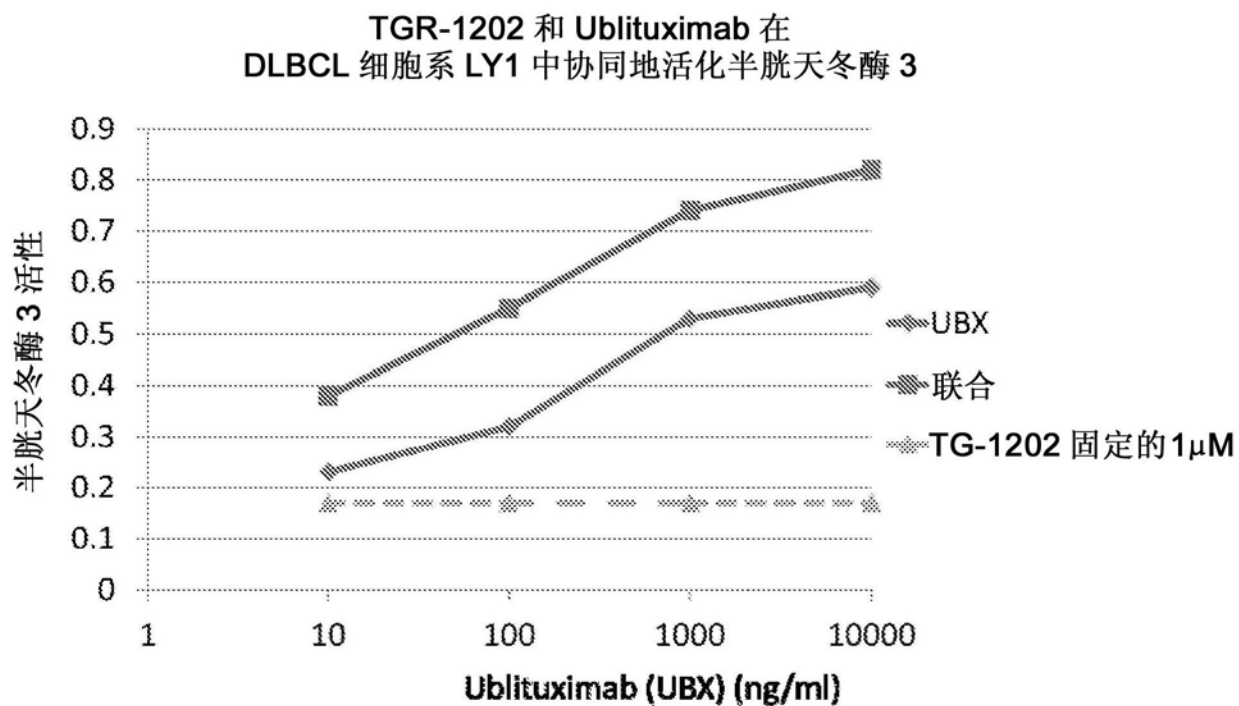


图11

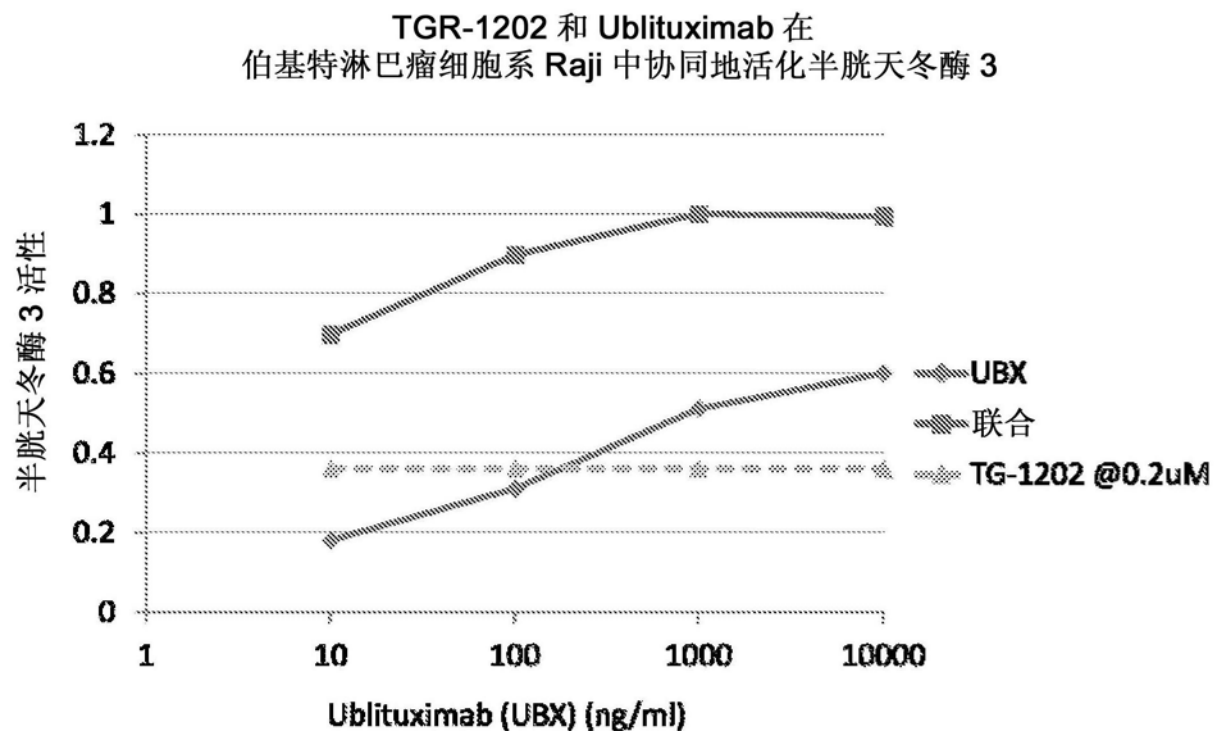


图12