



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113893253 A

(43) 申请公布日 2022.01.07

(21) 申请号 202111224724.0

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理

(22) 申请日 2016.05.20

事务所(普通合伙) 44348

(30) 优先权数据

代理人 何锦标

62/165,813 2015.05.22 US

(51) Int.CI.

A61K 31/506 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 45/06 (2006.01)

201680033004.7 2016.05.20

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 普莱希科公司

A61P 35/02 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

A61P 35/04 (2006.01)

(72) 发明人 帕拉巴哈·N·易卜拉欣 张超

韦恩·斯皮维克 张嘉忠 吴国贤

林杰克 赵汉纳 马里卡·尼斯派

史松源 托德·尤英 张颖

吉迪恩·博拉格

权利要求书4页 说明书39页 附图6页

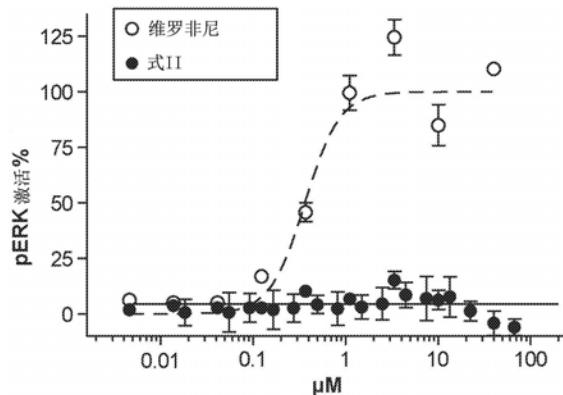
(54) 发明名称

用于治疗BRAF-V600相关的疾病的PLX-8394

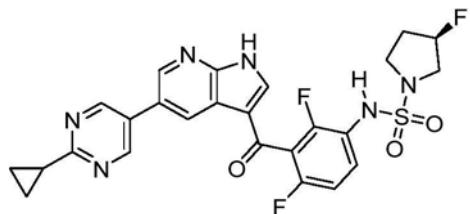
或PLX-7904

(57) 摘要

本公开提供在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法。



1. 式I化合物：



I

或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式在制备在不需要在含有野生型BRAF的细胞中激活MAPK通路或诱导MAPK通路基因的表达从而防止由于其激活而引起的疾病或病况的情况下治疗人类对象中的BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的药物中的应用，

其中所述BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况为黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌、头颈癌、肝细胞癌、兰格汉氏细胞组织细胞增多病、胃肠道间质细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、小儿星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤、慢性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、双表型B骨髓单核细胞性白血病、急性骨髓白血病、毛细胞白血病、痣、脂质肉芽肿病、恶性周围神经鞘肿瘤、发炎性和自体免疫疾病、腱鞘巨细胞瘤、色素沉着绒毛结节性滑膜炎、肌腱鞘巨细胞瘤、骨巨细胞瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、生殖细胞肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、肌周细胞瘤、后肾腺瘤、胰腺赘瘤、神经内分泌肿瘤、内分泌肿瘤、肾上腺肿瘤、肾上腺髓质肿瘤、腮腺囊腺癌、多形性胶质母细胞瘤、包括胆管腺瘤的胆管癌、肝胆管型肝癌、B细胞慢性淋巴增生病症、树突状细胞肉瘤、组织细胞肉瘤或淋巴瘤，

其中所述人类对象具有BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况，并且其中所述人类对象能够从更少的MAPK激活中受益。

2. 根据权利要求1所述的应用，其中在含有野生型BRAF的细胞中的所述MAPK通路的未激活或MAPK通路基因的表达的未诱导包含抑制在BRAF野生型细胞中的磷光体-ERK (pERK)。

3. 根据权利要求1所述的应用，其中所述MAPK通路的未激活或所述MAPK通路的表达的未诱导包含抑制在BRAF野生型细胞中的pERK和pMEK。

4. 根据权利要求1所述的应用，其中在含有野生型BRAF的细胞中的所述MAPK通路的未激活或MAPK通路基因的表达的未诱导预防刺激细胞生长。

5. 根据权利要求1所述的应用，其中在含有野生型BRAF的细胞中的所述MAPK通路的未激活或MAPK通路基因的表达的未诱导预防刺激皮肤赘瘤。

6. 根据权利要求1所述的应用，其中在含有野生型BRAF的细胞中的所述MAPK通路的未激活或MAPK通路基因的表达的未诱导预防刺激与MAPK通路的激活或MAPK通路基因的表达的诱导相关的恶性肿瘤。

7. 根据权利要求1到6中任一项所述的应用，其中所述药物以进一步包含医药学上可接受的赋形剂或载剂的医药组合物的形式施用。

8. 根据权利要求1到6中任一项所述的应用，其中所述药物以进一步包含另一种治疗剂的医药组合物的形式施用。

9. 根据权利要求1所述的应用，其中所述BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或

病况为肝细胞癌、兰格汉氏细胞组织细胞增多病、胃肠道间质细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、小儿星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤、慢性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、双表型B骨髓单核细胞性白血病、毛细胞白血病或痣。

10. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况为黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌或头颈癌。

11. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为脂质肉芽肿病。

12. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为黑色素瘤。

13. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为转移性黑色素瘤。

14. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为结直肠癌。

15. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为乳头状甲状腺癌。

16. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为未分化甲状腺癌。

17. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为卵巢癌。

18. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为非小细胞肺癌。

19. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为胃癌。

20. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为兰格汉氏细胞组织细胞增多病。

21. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为急性骨髓白血病。

22. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为多发性骨髓瘤。

23. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变相关的疾病或病况为恶性周围神经鞘肿瘤。

24. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF融合突变相关的疾病或病况为小儿星形细胞瘤。

25. 根据权利要求1所述的应用,其中所述BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况为内分泌肿瘤或肾上腺髓质肿瘤。

26. 根据权利要求10到25中任一项所述的应用,其中所述BRAF V600突变为选自V600E、V600K、V600D、V600A、V600G、V600M和V600R组成的组中的一个或多个突变。

27. 根据权利要求10到25中任一项所述的应用,其中所述BRAF V600突变包含V600E突变和V600K突变。

28. 根据权利要求10到25中任一项所述的应用,其中所述BRAF V600突变包含V600E突

变。

29. 根据权利要求1所述的应用,其中所述药物与以下药剂中的一种或多种一起施用:阿多来新、六甲蜜胺、苯达莫司汀、比折来新、白消安、卡铂、卡波醌、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、雌氮芥、依托格鲁、福莫司汀、海普法姆、异环磷酰胺、英丙舒凡、伊洛福芬、洛莫司汀、甘露舒凡、氮芥、美法仑、二溴甘露醇、奈达铂、尼莫司汀、奥沙利铂、哌泊舒凡、泼尼氮芥、丙卡巴肼、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、噻替派、曲奥舒凡、三亚胺醌、曲他胺、特瑞铂四硝酸酯、曲洛磷胺、乌拉莫司汀、阿克拉霉素、氨柔比星、博莱霉素、放线菌素、道诺霉素、阿霉素、依沙芦星、表柔比星、艾达霉素、美诺立尔、丝裂霉素、新抑癌蛋白、喷司他汀、吡柔比星、普卡霉素、伐柔比星、左柔比星、氨基喋呤、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲胺喋呤、奈拉滨、培美曲塞、硫唑嘌呤、雷替曲赛、喃氟啶-尿嘧啶、硫鸟嘌呤、甲氧苄氨嘧啶、三甲曲沙、阿糖腺苷、阿仑单抗、派立珠单抗、尼沃单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、加利昔单抗、吉妥单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、90Y-替坦异贝莫单抗、伊派利单抗、曲美木单抗、阿那曲唑、雄激素、布舍瑞林、己烯雌酚、依西美坦、氟他胺、氟维司群、戈舍瑞林、艾多昔芬、来曲唑、亮丙立德、甲地孕酮、雷诺昔酚、他莫昔芬、托瑞米芬、DJ-927、多西他赛、TPI 287、拉洛他赛、奥他赛、紫杉醇、DHA-紫杉醇、替司他赛、亚利崔托宁、贝瑟罗汀、非瑞替尼、异维甲酸、维甲酸、秋水仙碱、高三尖杉酯碱、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞宾;选自鲨癌灵、ABT-510、2-甲氧雌二醇、来那度胺、撒利多胺的抗血管生成药剂;安吖啶、艾多卡林、依托泊苷、磷酸依托泊苷、依沙替康、伊立替康、甲硫恩酮、米托蒽醌、派蒽醌、鲁比替康、替尼泊甙、拓朴替康、9-氨基喜树碱、阿西替尼、埃罗替尼、吉非替尼、夫拉平度、甲磺酸伊马替尼、卡博替尼、拉帕替尼、二磷酸莫替沙尼、尼罗替尼、塞利希布、索拉非尼、苹果酸舒尼替尼、AEE-788、BMS-599626、7-羟基星形孢菌素、凡塔蓝尼、硼替佐米、格尔德霉素、雷帕霉素、咪唑莫特、干扰素- α 、白介素-2、3-氨基-2-甲醛硫缩胺基脲、阿特森坦、氨鲁米特、阿那格雷、天冬酰胺酶、苔藓虫素-1、西仑吉肽、艾利莫尔、甲磺酸艾日布林、伊沙匹隆、氯尼达明、马索罗酚、米托胍腙、奥利默森、舒林酸、睾内酯、噻唑呋林、坦罗莫司、依维莫司、地磷莫司、PI3K抑制剂、Cdk4抑制剂、Akt抑制剂、Hsp90抑制剂、EGFR抑制剂、IDO抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、MEK抑制剂、BET抑制剂、AS703026、司美替尼、AZD8330、BIX02188、PD184352、D-87503、GS 1120212、PD0325901、PD3 18088、PD98059、PDEA1 19或TAK-733。

30. 根据权利要求8所述的应用,其中所述另一种治疗剂为阿多来新、六甲蜜胺、苯达莫司汀、比折来新、白消安、卡铂、卡波醌、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、雌氮芥、依托格鲁、福莫司汀、海普法姆、异环磷酰胺、英丙舒凡、伊洛福芬、洛莫司汀、甘露舒凡、氮芥、美法仑、二溴甘露醇、奈达铂、尼莫司汀、奥沙利铂、哌泊舒凡、泼尼氮芥、丙卡巴肼、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、噻替派、曲奥舒凡、三亚胺醌、曲他胺、特瑞铂四硝酸酯、曲洛磷胺、乌拉莫司汀、阿克拉霉素、氨柔比星、博莱霉素、放线菌素、道诺霉素、阿霉素、依沙芦星、表柔比星、艾达霉素、美诺立尔、丝裂霉素、新抑癌蛋白、喷司他汀、吡柔比星、普卡霉素、伐柔比星、左柔比星、氨基喋呤、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲胺喋呤、奈拉滨、培美曲塞、硫唑嘌呤、雷替曲赛、喃氟啶-尿嘧啶、

硫鸟嘌呤、甲氧苄氨嘧啶、三甲曲沙、阿糖腺苷、阿仑单抗、派立珠单抗、尼沃单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、加利昔单抗、吉妥单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、90Y-替坦异贝莫单抗、伊派利单抗、曲美木单抗、阿那曲唑、雄激素、布舍瑞林、己烯雌酚、依西美坦、氟他胺、氟维司群、戈舍瑞林、艾多昔芬、来曲唑、亮丙立德、甲地孕酮、雷诺昔酚、他莫昔芬、托瑞米芬、DJ-927、多西他赛、TPI 287、拉洛他赛、奥他赛、紫杉醇、DHA-紫杉醇、替司他赛、亚利崔托宁、贝瑟罗汀、非瑞替尼、异维甲酸、维甲酸、秋水仙碱、高三尖杉酯碱、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞宾；选自鲨癌灵、ABT-510、2-甲氧雌二醇、来那度胺、撒利多胺的抗血管生成药剂；安吖啶、艾多卡林、依托泊苷、磷酸依托泊苷、依沙替康、伊立替康、甲硫恩酮、米托蒽醌、派蒽醌、鲁比替康、替尼泊甙、拓朴替康、9-氨基喜树碱、阿西替尼、埃罗替尼、吉非替尼、夫拉平度、甲磺酸伊马替尼、卡博替尼、拉帕替尼、二磷酸莫替沙尼、尼罗替尼、塞利希布、索拉非尼、苹果酸舒尼替尼、AEE-788、BMS-599626、7-羟基星形孢菌素、凡塔蓝尼、硼替佐米、格列德霉素、雷帕霉素、咪唑莫特、干扰素- α 、白介素-2、3-氨基-2-甲醛硫缩胺基脲、阿特森坦、氨鲁米特、阿那格雷、天冬酰胺酶、苔藓虫素-1、西仑吉肽、艾利莫尔、甲磺酸艾日布林、伊沙匹隆、氯尼达明、马索罗酚、米托胍腙、奥利默森、舒林酸、睾内酯、噻唑呋林、坦罗莫司、依维莫司、地磷莫司、PI3K抑制剂、Cdk4抑制剂、Akt抑制剂、Hsp90抑制剂、EGFR抑制剂、IDO抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、MEK抑制剂、BET抑制剂、AS703026、司美替尼、AZD8330、BIX02188、PD184352、D-87503、GS 1 120212、PD0325901、PD3 18088、PD98059、PDEA1 19或TAK-733。

用于治疗BRAF-V600相关的疾病的PLX-8394或PLX-7904

[0001] 本申请为2017年12月6日进入中国国家阶段、申请号为201680033004.7、申请日为2016年05月20日、发明名称为“用于治疗BRAF-V600相关的疾病的PLX-8394或PLX-7904”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 主张2015年5月22日提交的美国临时申请62/165,813的权益,所述申请以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0004] 本公开大体上涉及在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法。

背景技术

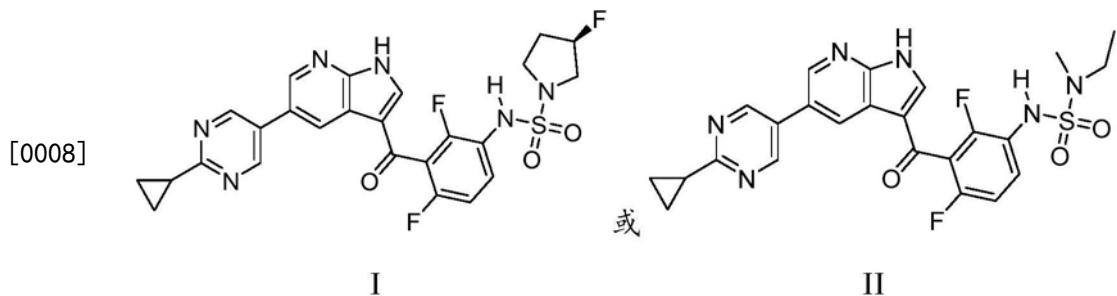
[0005] 已经作出开发这样的药剂的努力,所述药剂阻断突变的B-Raf激酶 (BRAF) 以提供在黑色素瘤的个人化医治中的实质性治疗性改善的。当前在医疗用途中的特异性BRAF抑制剂的实例包括维罗非尼和达拉菲尼。达拉菲尼经显示具有目标肿瘤反应。此外,维罗非尼对于突变BRAF^{V600}黑色素瘤具有总体存活期益处已经被显示且充分证明。对于使用BRAF抑制剂的癌症治疗的临床效果,期望实现在具有BRAF V600E突变的肿瘤中的MAPK通路输出的完全隔断。然而,这些第一代BRAF抑制剂反常地激活具有致癌RAS或增加的受体信号传递的MAPK通路。在(BRAF) 中的V600E错义突变导致MAPK通路的异常调控、不受控细胞增殖和致瘤作用的启动。虽然ATP-竞争性B-Raf抑制剂阻断在B-Raf突变细胞中的MAPK通路,但是所述抑制剂诱导野生型B-Raf激酶结构域的构象改变,引起具有C-Raf的异二聚,导致MAPK通路的反常过度激活。虽然维罗非尼有利于BRAF的突变V600E形式,但是结合到野生型BRAF可诱导引起ERK1/2激活的BRAF/CRAF异二聚体。ERK1/2的此“反常激活”的负面后果包括引起角化棘皮瘤 (KA) 和皮肤鳞状细胞癌 (cuSCC) 的发展的细胞增殖,并且此进展已经观察到在用这些BRAF抑制剂启动治疗的数周内存在。因此,需要新一代BRAF^{V600}突变抑制剂,所述抑制剂避免MAPK信号传递的反常激活,从而抑制ERK1/2通路以实现更少和更小严重副作用并且改善患者反应的安全性和持续时间。

发明内容

[0006] 公开一类BRAF抑制剂的新用途,所述BRAF抑制剂已经被发现在含有上游激活事件的细胞中以卓越和非预期水平不激活MAPK通路的情况下抑制突变RAF细胞。本公开的BRAF抑制剂可同时抑制BRAF点突变和融合突变。因此,本公开克服当前在使用中的第一代BRAF抑制剂中存在的障碍。

[0007] 具体地说,本公开涉及在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病

况的风险的受试者的方法,所述方法包含向受试者投与治疗有效量的式I或II化食物:



[0009] 或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式。

[0010] 本公开的另一个实施例涉及在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法，所述方法包含向受试者投与医药组合物，所述医药组合物包含治疗有效量的式I或式II化合物，或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式，和医药学上可接受的赋形剂或载剂。

[0011] 本公开的另一个实施例涉及在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法，所述方法包含向受试者投与医药组合物，所述医药组合物包含治疗有效量的式I或式II化合物，或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式，和另一种治疗剂。

[0012] 通过以下附图和具体实施方式并且通过权利要求书,附加实施例将显而易见。

附图说明

[0013] 图1(A)示出式II(以圆圈填充;底部线)和维罗非尼(开放性圆;虚线的顶部线)具有同样的效价以阻断在人类BRAF^{V600E}黑色素瘤细胞COL0829中的pERK信号传递。

[0014] 图1(B)示出在RAS激活人类黑色素瘤细胞系IPC-298(NRAS^{Q61L})中,维罗非尼(开放性圆圈)反常地激活MAPK信号传递,但是索拉非尼(以圆圈填充)导致可忽略的pERK增加。

[0015] 图2(A)示出与维罗非尼(用线示出的圆圈)相比,式I(方形)不激活在B9细胞系中的pERK。维罗非尼平均EC₅₀ = 0.56 μM (n=26);式I平均EC₅₀ = 10 μM (n=14)。

[0016] 图2(B)示出与维罗非尼(圆圈)相比,式I(方形)不激活在B9细胞系中的pMEK。维罗非尼平均EC₅₀ = 0.588 μM (n=26), 式I平均EC₅₀ = 10 μM (n=14)。

[0017] 图2(C)示出与维罗非尼(圆圈)相比,式I(方形)不激活在IPC-298细胞系中的pERK。维罗非尼平均EC₅₀ = 0.84μM(n=26),式I平均EC₅₀ = 10μM(n=14)。

[0018] 图2(D)示出与维罗非尼(圆圈)相比,式I(方形)不激活在IPC-298细胞系中的pMEK。维罗非尼平均EC₅₀ = 0.3 μM (n = 26), 式I平均EC₅₀ = 10 μM (n = 14)。

[0019] 图2(E)示出与维罗非尼(圆圈)相比,式I(方形)不激活在HCT116细胞系中的pERK。维罗非尼平均EC₅₀ = 0.386 μM (n = 2), 式I平均EC₅₀ = 10 μM (n = 1)。

维罗非尼尼平均EC₅₀ = 0.280μM (n = 3); 氯贝尼尼平均EC₅₀ = 1.04μM (n = 1)。

[0020] 图2(F)示出与维罗非尼(圆圈)相比,式I(方形)不激活往HCT116细胞系中的pMEK。维罗非尼平均EC₅₀=0.769μM(n=3);式I平均EC₅₀=10μM(n=1)。

[0021] 图3示出式I抑制所有三种异种移植植物(表达四个KIAA1549-BRAF融合中的三个的

NIH(美国国立卫生研究院)/3T3细胞)的生长达50%或更多。对照:圆圈;PLX4720:方形;式I:三角形。y轴表示以立方毫米为单位的肿瘤体积;x轴表示自注射起的天数。

具体实施方式

[0022] I. 定义

[0023] 如本文所使用的,除非另外清晰地指明,否则应用以下定义。

[0024] 如本文中所使用,术语“医治”(treat、treating)、“治疗”(therapy、therapies)和类似术语是指以可有效地预防、减轻或改进疾病或病况的一种或多种症状(即,适应症)和/或延长经医治受试者的存活期的量投与材料例如,例如本文所描述的任何一种或多种化合物。

[0025] 在本上下文中,术语“治疗上有效”或“有效量”表示在投与时化合物或式I或式II化合物的量足以或可有效地预防、减轻或改进经医治疾病、病症或医学病况的一种或多种症状且/或延长经医治受试者的存活期。治疗有效量将取决于化合物、疾病、病症或病况和其严重性以及待医治的哺乳动物的年龄、体重等而变化。一般来说,表明以约0.1g/kg受试者体重到约10g/kg受试者体重的日剂量获得在受试者中的令人满意结果。在一些实施例中,日剂量的范围是约0.10mg/kg体重到10.0mg/kg体重,约1.0mg/kg体重到3.0mg/kg体重,约3mg/kg体重到10mg/kg体重,约3mg/kg体重到150mg/kg体重,约3mg/kg体重到100mg/kg体重,约10mg/kg体重到100mg/kg体重,约10mg/kg体重到150mg/kg体重,或约150mg/kg体重到1000mg/kg体重。剂量可例如以至多一天四次的分次剂量或以缓释形式方便地投与。

[0026] 如本文中所使用,如应用于关于MAPK(即,在含有野生型BRAF的细胞中的MAPK通路或MAPK通路基因的表达)的式I或II化合物的术语“未刺激”、“未激活”和“未诱导”是指与在第一代BRAF V600E抑制剂如达拉菲尼和维罗非尼的情况下观察到的刺激、激活和诱导相比,更小刺激、更少激活和更少诱导。

[0027] 如本文中所使用,术语“固体形式”是指出于治疗性目的而适于向目标动物受试者投与的医药学上活性化合物的固体制剂(即既不是气体也不是液体的制剂)。本文所公开的式I或式II化合物旨在分别包括式I和式II的固体形式。固体形式包括化合物的任何络合物如盐、共结晶或非结晶络合物,以及任何多晶型物。固体形式可基本上结晶、半结晶或基本上非结晶。固体形式可直接地投与,或在具有改善的医药特性的合适组合物的制剂中使用。举例来说,固体形式可用于包含至少一种医药学上可接受的载剂或赋形剂的配制物。

[0028] 如本文中所使用,术语“半结晶”材料涵盖大于10%结晶度,但是不大于90%结晶度的材料;优选地“半结晶”材料涵盖大于20%结晶度,但是不大于80%结晶度的材料。本文所公开的式I和式II化合物旨在包括式I和式II化合物的半结晶形式。在本公开的一个实施例中,可制备化合物的固体形式的混合物(例如,非结晶和结晶固体形式的混合物)例如以提供“半结晶”固体形式。这类“半结晶”固体形式可通过本领域中已知的方法制备,例如通过将非结晶固体形式与结晶固体形式以期望比率混合。在一些例子中,与酸或碱混合的化合物形成非结晶络合物;可采用超过化合物和酸或碱在非结晶络合物中的化学计量的一定量化合物组分(从而产生一定量基于其化学计量的非结晶络合物)与以结晶形式的过量化合物制备半结晶固体。在络合物的制剂中使用的过量化合物的量可经调节以提供在固体形式的所得混合物中的非结晶络合物与结晶化合物的期望比率。举例来说,在酸或碱与化合

物具有1:1化学计量的非结晶络合物的情况下,用2:1摩尔比的化合物与酸或碱制备所述络合物将产生50%非结晶络合物和50%结晶化合物的固体形式。例如通过提供具有改善的生物医药特性的非结晶组分以及结晶组分,固体形式的这类混合物作为药物产品可为有益的。非结晶组分将更易于生物可用,而结晶组分将具有延时的生物利用率。这类混合物可提供对活性化合物的快速和延长的暴露。

[0029] 如本文中所使用,术语“络合物”是指式I或式II化合物和附加分子物质的组合,所述附加分子物质形成或产生以固体形式的新化学物质。在一些例子中,络合物可为盐,即其中附加分子物质将酸/碱反离子提供到化合物的酸/碱基,从而引起形成典型盐的酸碱相互作用。虽然这类盐形式通常基本上为结晶形式,但是它们还可为部分结晶形式、基本上非结晶形式或非结晶形式。在一些例子中,与医药学上活性化合物组合的附加分子物质形成非盐共结晶体,即化合物和分子物质不通过典型酸碱相互作用而相互作用,但是仍然形成基本上结晶结构。共结晶体还可由化合物和附加分子物质的盐形成。在一些例子中,络合物为基本上非结晶络合物,其可含有不形成典型盐晶体,但是替代地形成基本上非结晶固体(即,其X射线粉末衍射图呈现无尖峰(例如呈现非结晶卤基)的固体)的盐类酸碱相互作用。

[0030] 如本文中所使用,术语“受试者”是指用如本文所描述的化合物医治的活生物体,包括(但不限于)任何哺乳动物如人类、其它灵长类动物、体育运动动物、商业相关的动物如牛、耕畜如马、或宠物如犬和猫。

[0031] 如本文中所使用,术语“生物医药特性”是指本公开的化合物或络合物的药物代谢动力学作用,包括关于向受试者投与的化合物的溶解、吸收和分布。由此,本公开的化合物的某些固体形式如本公开的化合物的非结晶络合物旨在提供活性化合物的改善的溶解和吸收,其通常以改善的C_{最大}(即,在投与药物之后在血浆中的最大实现浓度)和改善的AUC(即,在投与药物之后,药物血浆浓度与时间的曲线下面积)反映。

[0032] 术语“医药学上可接受”表示,考虑到待医治的疾病或病况和相应投与途径,所指示的材料不具有将引起相当谨慎的医疗人员避免将所述材料投与到患者的特性。举例来说,例如,对于可注射物(injectibles),通常需要这类材料基本上无菌。

[0033] 术语“投与”是指向受试者口服投与,作为栓剂投与、局部接触、静脉内、腹膜内、肌内、病灶内、鼻内或皮下投与,或植入缓慢释放装置例如,迷你渗透泵。投与通过任何途径,包括不经肠和经粘膜(例如,经口腔、经舌下、经腭部、经齿龈、经鼻部、经阴道、经直肠或透皮)。不经肠投与包括,例如,静脉内、肌内、内微动脉、皮内、皮下、腹膜内、脑室内和颅内。递送的其它方式包括(但不限于)使用脂质体配制物、静脉内冲剂、透皮贴片等)。

[0034] 式I和式II化合物可各自以非溶剂化形式以及溶剂化形式(包括水合形式)存在。“水合物”是指由水分子与溶质的分子或离子的组合形成的络合物。“溶剂化物”是指由溶剂分子与溶质的分子或离子的组合形成的络合物。溶剂可为有机化合物、无机化合物或这两者的混合物。溶剂化物意指包括水合物。溶剂的一些实例包括(但不限于)甲醇、N,N-二甲基甲酰胺、四氢呋喃、二甲亚砜和水。一般来说,溶剂化形式等同于非溶剂化形式并且涵盖于本公开的范围内。根据本公开使用的式I和式II化合物可各自以多种结晶或非结晶形式存在。一般来说,所有物理形式都等同地用于本公开预期的用途并且旨在本公开的范围内。

[0035] 在本上下文中,术语“治疗上有效”或“有效量”表示材料或材料的量可有效地预防、减轻或改进疾病或医学病况的一种或多种症状,且/或延长经医治受试者存活期。治疗

有效量将取决于化合物、病症或病况和其严重性以及待医治的哺乳动物的年龄、体重等而变化。举例来说,有效量为足以实现有益的或期望临床结果的量。可在单次投与中全部一次提供有效量,或以在若干次投与中提供有效量的部分量提供有效量。何种将被视为有效量的精确确定可基于独立于每个受试者的因素,包括其身材、年龄、损伤、和/或经医治疾病或损伤,和自损伤发生或疾病开始起的时间量。本领域技术人员将能够基于本领域中为惯例的这些考虑因素确定用于给定受试者的有效量。

[0036] 在本上下文中,术语“协同有效”或“协同效果”表示当组合使用时,治疗上有效的两种或更多种化合物提供比基于所使用每种化合物本身的效果将预期的附加效果大的改善的治疗效果。

[0037] 如本文中所使用,术语“调节”(modulating或modulate)是指更改生物活性,尤其是与特定生物分子如蛋白激酶相关联的生物活性的效果。举例来说,特定生物分子的抑制剂通过降低生物分子如酶的活性来调节该生物分子例如酶的活性。通常根据用于抑制剂的化合物相对于例如酶的抑制浓度(IC_{50})表示这类活性。

[0038] 如本文中所使用,术语“蛋白激酶介导的疾病或病况”是指这样的疾病或病况,其中蛋白激酶(包括其任何突变体)的生物功能影响疾病或病况的发展、病程和/或症状,且/或其中蛋白激酶的调节使疾病或病况的发展、病程和/或症状更改。蛋白激酶介导的疾病或病况包括其中抑制提供治疗益处的疾病或病况,例如,其中用一种或多种蛋白激酶抑制剂(包括如本文所描述的式I或式II化合物中的一种或多种)的医治向患有或处于疾病或病况的风险的受试者提供治疗益处。

[0039] 如本文中所使用,术语“BRAF V600突变相关的疾病或病况”或“BRAF V600突变介导的疾病或病况”是指这样的疾病或病况,其中具有V600突变的BRAF激酶的生物功能影响疾病或病况的发展、病程和/或症状,和/或其中BRAF的调节使疾病或病况的发展、病程和/或症状更改。BRAF V600突变相关的疾病或病况或BRAF V600突变介导的疾病或病况包括其中抑制提供治疗益处的疾病或病况,例如,其中用一种或多种蛋白激酶抑制剂(包括如本文所描述的式I或式II化合物中的一种或多种)的医治向患有或处于疾病或病况的风险的受试者提供治疗益处。

[0040] 如本文中所使用,术语“BRAF融合突变相关的疾病或病况”或“BRAF融合突变介导的疾病或病况”是指这样的疾病或病况,其中具有融合突变的BRAF激酶的生物功能影响疾病或病况的发展、病程和/或症状,和/或其中BRAF的调节使疾病或病况的发展、病程和/或症状更改。BRAF融合突变相关的疾病或病况或BRAF融合突变介导的疾病或病况包括其中抑制提供治疗益处的疾病或病况,例如,其中用一种或多种蛋白激酶抑制剂(包括如本文所描述的式I或式II化合物中的一种或多种)的医治向患有或处于疾病或病况的风险的受试者提供治疗益处。

[0041] 此外,如本文所使用的缩写具有如下相应含义:

[0042]	BRAF	v-Raf鼠肉瘤病毒癌基因同系物B1
	C _{max}	最大观察浓度
	EC ₅₀	半数最大有效浓度
	ERK	胞外信号调控激酶
	IC ₅₀	半数最大抑制浓度

KRAS2	v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物
-------	-------------------------------

[0043] II. 第一代BRAF抑制剂的反常激活

[0044] 在癌症中的激活BRAF V600E突变(用于缬氨酸-600或BRAFV600的主要错义替代物)的鉴别(Davies 2002年)支持BRAF在这些恶性肿瘤的发病机理中的功能重要作用。包括维罗非尼(Bollag 2010年; Flaherty 2010年)和达拉菲尼(Stellwagen 2011年)的特异性BRAF抑制剂具有经显示的两种目标肿瘤反应(Sosman 2012年; Hauschid 2012年),并且在维罗非尼的情况下,具有在突变BRAFV600驱使的黑色素瘤中的总体存活期益处(Chapman, 2011年)。基于BRAF抑制剂的疗法的临床效果取决于在含有BRAF V600E突变的肿瘤中MAPK通路输出的完全隔断(Bollag 2010年)。然而,第一代BRAF抑制剂反常地激活在携带致癌RAS或较高上游受体信号传递的细胞中的MAPK通路(Hatzivassiliou 2010年; Heidorn 2010年; Poulikakos 2010年)。此激活有时可在疗法启动的数周内引起细胞增殖并且已经在临幊上与皮肤鳞状细胞癌(cuSCC)和角化棘皮瘤(KA)的出现相关联(Su 2012年; Anforth 2012年; Hauschid 2012年; Huang 2012)。这些MAPK通路激活诱导的肿瘤具有RAS突变的非同寻常高的发生率(Oberholzer 2012年; Su 2012年)。虽然在临幊测试中的BRAF抑制剂已经示出相对缺乏毒性,但是反常的激活机理可促进其它RAS驱使的癌症的发展,并且在BRAF抑制剂医治期间原发性黑色素瘤的发生率增加(Zimmer 2012年)和RAS突变白血病的发展(Callahan 2012年)的新近病例报导显示了这种情况。

[0045] 在BRAF中的激活突变通过构成性促进与RAS激活无关的MAPK通路信号传递来为癌症生长加燃料。开发阻断突变的BRAF的药剂的努力已经在转移性黑色素瘤的个人化医治中带来剧烈治疗性改善。然而,这些药剂的开发还揭示这些靶向疗法的非预期结果:刺激某些癌症的生长(反常的激活)。到目前为止,最常见副作用实例为源自角化细胞的皮肤赘瘤(Robert 2011年),其最先与索拉非尼一起被观察到(Lacouture 2006年),并且最近,与维罗非尼(Flaherty 2010年; Huang 2012年)及达拉菲尼(Hauschid 2012年)一起被观察到。在严重转移性疾病的情形下,非恶性皮肤肿瘤如角化棘皮瘤及角化棘皮瘤类cuSCC的出现是可接受的,尤其是因为多数的病灶易于鉴别和去除。然而,这些次生恶性肿瘤的出现突显RAF抑制剂的两种相反效果:所述RAF抑制剂同时治愈和导致肿瘤。根据通路是由BRAF V600E突变激活还是由上游事件(如RAS突变或受体酪氨酸激酶激活)激活,结构上不同的ATP竞争性RAF激酶抑制剂可同时抑制和反常地激活RAF/MEK/ERK通路(Hatzivassiliou 2010年; Heidorn 2010年; Poulikakos 2010)。

[0046] 还存在EGFR信号传递和BRAF抑制剂诱导的皮肤癌发生之间的联系。诱导MAPK通路反应基因的表达诱导EGFR配体。维罗非尼显著诱导在转化角化细胞中的EGFR配体(包括AREG、HB-EGF和TGF α)的表达。外源性EGFR配体再现而EGFR抑制剂拮抗维罗非尼的生长刺激效果。相应地,式I或式II化合物(其不诱导MAPK通路反应基因的表达)将不表达EGFR配体。EGFR和其它RTK(包括PDGFR、IGF-1R和MET)的补偿性激活经显示导致对在黑色素瘤中的BRAF抑制的所获取的抗性(Nazarian 2010年; Villanueva 2010年; Straussman 2012年)。BRAFV600E结直肠癌对BRAF抑制剂的无反应也归因于EGFR的反馈激活(Corcoran 2012年; Prahallad 2012年)。因此,式I或式II化合物可有利于医治患有除黑色素瘤以外的BRAF突变癌瘤如乳头状甲状腺癌、结直肠癌和其它癌症的受试者。

[0047] 如在以下实例中所展示的,式I和式II化合物满足第一代BRAF抑制剂的未满足需

要。实例显示式I在含有RAS突变或受体酪氨酸激酶激活的细胞中不激活MAPK通路的情况下抑制突变BRAF细胞。在实例中还显示,式I和式II化合物各自选择性抑制具有个位数nM IC_{50} 的突变的BRAF激酶(包括最常见的BRAFV600E),而对其它激酶的活性具有极少影响。通过将MAPK通路抑制与通路激活解离,式I化合物具有独立和改善的活性分布。

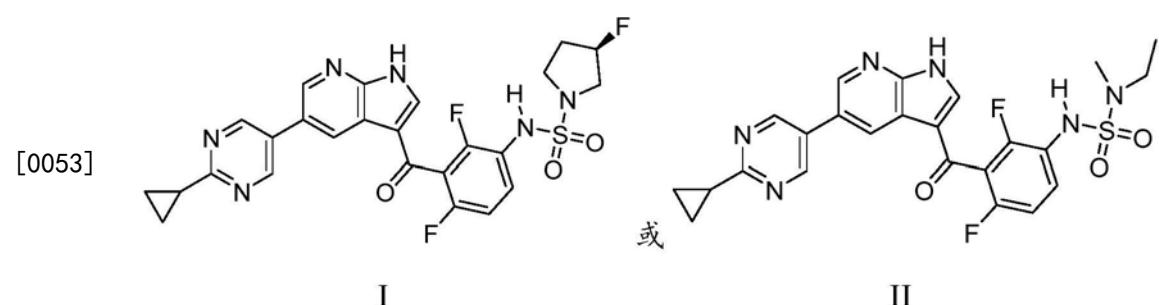
[0048] 本文所述的式I或式II化合物的方法和用途为美国专利公开案第2014/0128373号的选择发明。具体地说，式I和II化合物各自为非常强效BRAF V600E突变抑制剂并且也为特别强的反常的阻断剂，其中式I和II不激活为第一代BRAF V600E突变抑制剂的典型的MAPK通路。因此，式I化合物在这方面中为极有利的，并且其已经过测试且经证实可潜在地用于各种适应症。

[0049] 在表达在来自用RAF抑制剂医治的患者的鳞状细胞肿瘤中占优势的相同HRAS突变的细胞模型中,第一代RAF抑制剂刺激细胞的活体外和活体内生长并且诱导MAPK通路反应基因(包括EGFR配体)的表达。相比之下,式I和式II的反常的阻断剂不具有这类效果。此外,式I化合物出人意料地克服对第一代RAF抑制剂的抗性的若干已知机制。基于式I或式II中的任一个的化合物的这些有利特性,可获得增强的耐受性以及继而,增加的药物剂量。

[0050] III. 实施例

[0051] 公开一类BRAF抑制剂的新用途,所述BRAF抑制剂已经被发现在含有上游激活事件的细胞中以卓越和非预期水平在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下抑制突变RAF细胞。因此,本公开克服当前在使用中的第一代BRAF抑制剂中存在的障碍。

[0052] 具体地说,本公开涉及在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法,所述方法包含向受试者投与治疗有效量的式I或II化合物:



[0054] 或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式。

[0055] 式I化合物(或“式I”)也被称作(3R)-N-[3-[5-(2-环丙基嘧啶-5-基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-羰基]-2,4-二氟苯基]-3-氟吡咯烷-1-磺酰胺。式II化合物(或“式II”)也被称作5-(2-环丙基嘧啶-5-基)-3-[3-[[乙基(甲基)氨磺酰基]氨基]-2,6-二氟-苯甲酰基]-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶。

[0056] 在一些实施例中，在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法包含投与式I化合物。在一些实施例中，在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法包含投与式II化合物。

[0057] 在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达包含抑制在BRAF野生型细胞中的磷光体-ERK (pERK)。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达包含抑制在BRAF野生型细胞中的pERK和pMEK。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,抑制在BRAF野生型细胞中的pERK预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,抑制在BRAF野生型细胞中的pERK和pMEK预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达预防刺激皮肤赘瘤。在另一个实施例中,抑制在BRAF野生型细胞中的pERK预防刺激皮肤赘瘤。在另一个实施例中,抑制在BRAF野生型细胞中的pERK和pMEK预防刺激皮肤赘瘤。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达预防刺激其它恶性肿瘤。非限制性实例包括白血病或结直肠癌。

[0058] 本公开的另一个实施例涉及在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法,所述方法包含向受试者投与医药组合物,所述医药组合物包含治疗有效量的式I或式II化合物,或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式,和医药学上可接受的赋形剂或载剂。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达包含抑制在BRAF野生型细胞中的pERK。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达包含抑制在BRAF野生型细胞中的pERK和pMEK。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,抑制在野生型BRAF细胞中的pERK预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,抑制在野生型BRAF细胞中的pERK和pMEK预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达预防刺激皮肤赘瘤。在另一个实施例中,抑制pERK野生型细胞预防刺激皮肤赘瘤。在另一个实施例中,抑制在野生型BRAF细胞中的pERK和pMEK预防刺激皮肤赘瘤。

[0059] 本公开的另一个实施例涉及在含有野生型BRAF的细胞中不激活MAPK通路或不诱导MAPK通路基因的表达的情况下医治患有或处于BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况的风险的受试者的方法,所述方法包含向受试者投与医药组合物,所述医药组合物包含治疗有效量的式I或式II,或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式,和另一种治疗剂。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达包含抑制在野生型BRAF细胞中的-pERK。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达包含抑制在野生型BRAF细胞中的pERK和pMEK。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,抑制在野生型BRAF细胞中的pERK预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,抑制在野生型BRAF细胞中的pERK和pMEK预防刺激细胞生长。在另一个实施例中,在含有野生型BRAF的细胞中未激活MAPK通路或未诱导MAPK通路基因的表达预防刺激皮肤赘瘤。在另一个实施例中,抑制在BRAF野生型细胞中的pERK预防刺激皮肤赘瘤。在另一个实施例中,抑制在野生型BRAF细胞

中的pERK和pMEK预防刺激皮肤赘瘤。

[0060] BRAF V600突变的非限制性实例包括V600E、V600K、V600A、V600G、V600M和V600R，其中V600E和V600K为第一和第二最常见的。在使用重组酶的生物化学测试中，对于式I化合物， IC_{50} 值范围为3.5nM到14.2nM。参见实例3和表1。

[0061] BRAF融合突变相关的疾病或病况的非限制性实例包括小儿星形细胞瘤。

[0062] BRAF V600E突变发生在约二分之一的所有黑色素瘤 (Rajagopalan 2002年) 和许多其它癌症，以及其它类型的疾病或病况中。以下BRAF V600E突变相关的疾病或病况预期用于本文所述的式I化合物的方法和用途。

[0063] BRAF V600突变相关的疾病或病况的非限制性实例包括黑色素瘤(包括转移性黑色素瘤、3A期黑色素瘤、3B期黑色素瘤、3C期黑色素瘤和皮肤色素沉着黑色素瘤)、结直肠癌(包括结直肠腺癌) (Cohen 2003年)、乳头状甲状腺癌 (Fukushima 2003; Kimura 2003年; Xu 2003年)、未分化甲状腺癌 (Xu 2003年)、浆液性卵巢癌 (Nikiforova 2003年)、非小细胞肺癌 (Singer 2003年)、胃癌 (Brose 2002年)、胆管癌 (Lee 2003年)、巴雷特氏食道癌 (Tannapfel 2003年) 和头颈癌 (Sommerer 2004年; Weber 2003年)。BRAF V600突变相关的癌症的其它非限制性实例包括肝细胞癌 (Colombino 2012年)、兰格汉氏细胞组织细胞增多病 (Badalian-Very 2010年)、胃肠道间质细胞肿瘤 (Agaram 2008年)、多发性骨髓瘤 (Chapman 2011年)、小儿星形细胞瘤(其主要含有BRAF重复) (Jones 2008年; Pfister 2008年; Sievert 2009年)、多形性黄色星形细胞瘤 (Dias-Santagata 2011年; Schindler 2011年)、慢性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、双表型B骨髓单核细胞性白血病、急性骨髓白血病和毛细胞白血病 (Tiacci 2011年)。BRAF V600突变相关的癌症的其它非限制性实例包括周围 (peripheral) 神经鞘肿瘤，如良性和恶性周围神经鞘肿瘤 (Serrano 2013年)。BRAF V600突变在痣中也非常常见 (Pollock 2003年)，所述BRAF V600突变通常衍生自黑色素细胞并且为休眠性且因此为良性的发育不良病灶。BRAF V600突变也发生在脂质肉芽肿病 (Erdheim-Chester disease) 中。

[0064] 其它BRAF 600V相关的病况或病症包括发炎性和自体免疫疾病(如类风湿性关节炎) (《分子免疫学 (Mol Immunol)》, 2013年10月; 55 (3-4) : 247-52)、腱鞘巨细胞瘤、色素沉着绒毛结节性滑膜炎、肌腱鞘巨细胞瘤、骨巨细胞瘤、宫颈癌 (《妇科肿瘤学 (Gynecol Oncol)》, 2007年6月; 105 (3) : 662-6.)、子宫内膜癌 (《家族性癌症 (Fam Cancer)》, 2014年3月; 13 (1) : 1-12)、生殖细胞肿瘤 (《临床肿瘤学杂志 (J Clin Oncol)》, 2009年5月1日; 27 (13) : 2129-36)、前列腺癌 (《基因、染色体、癌症 (Genes Chromosomes Cancer)》, 2012年11月; 51 (11) : 1014-23)、膀胱癌 (《分子癌症研究 (Mol Cancer Res)》, 2015年3月12日. pii: molcanres.0689.2014)、肌周细胞瘤 (《美国国立癌症研究所杂志 (J Natl Cancer Inst)》, 2014年7月25日; 106 (8))、后肾腺瘤 (《美国外科病理学杂志 (Am J Surg Pathol)》, 2015年4月; 39 (4) : 549-57)、胰腺赘瘤 (《病理学杂志 (J Pathol)》, 2014年3月; 232 (4) : 428-35)、神经内分泌肿瘤 (《美国临床病理学杂志 (Am J Clin Pathol)》, 2005年2月; 123 (2) : 256-60)、内分泌肿瘤 (《内分泌相关癌症 (Endocr Relat Cancer)》, 2004年12月; 11 (4) : 855-60)、肾上腺肿瘤 (《内分泌相关癌症 (Endocr Relat Cancer)》, 2009年6月; 16 (2) : 565-72)、肾上腺髓质肿瘤、腮腺囊腺癌 (Springerplus, 2013年12月18日; 2:679. doi:10.1186/2193-1801-2-679)、多形性胶质母细胞瘤 (《世界外科肿瘤学杂志 (World J Surg Oncol)》, 2015年3月

11日;13:100)、包括胆管腺瘤的胆管癌(《肝脏病学(Hepatology)》,2015年1月;61(1):403-5)、肝胆管型肝癌、B细胞慢性淋巴增生病症(《血液(Blood)》,2012年1月5日;119(1):188-91)、树突状细胞肉瘤(《诊断病理学年报(Ann Diagn Pathol)》,2015年6月;19(3):113-6)、组织细胞肉瘤和淋巴瘤(例如里希特氏综合症、非霍奇金淋巴瘤)(《细胞(Cell)》,2015年4月9日;161(2):319-32)。

[0065] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病况为黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌、头颈癌、肝细胞癌、兰格汉氏细胞组织细胞增多病、胃肠道间质细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、小儿星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤、慢性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、双表型B骨髓单核细胞性白血病、急性骨髓白血病、毛细胞白血病、痣、脂质肉芽肿病、发炎性和自体免疫疾病(如类风湿性关节炎)、腱鞘巨细胞瘤、色素沉着绒毛结节性滑膜炎、肌腱鞘巨细胞瘤、骨巨细胞瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、生殖细胞肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、肌周细胞瘤、后肾腺瘤、胰腺赘瘤、神经内分泌肿瘤、内分泌肿瘤、肾上腺肿瘤、肾上腺髓质肿瘤、腮腺囊腺癌、多形性胶质母细胞瘤、包括胆管腺瘤的胆管癌、肝胆管型肝癌、B细胞慢性淋巴增生病症、树突状细胞肉瘤、组织细胞肉瘤或淋巴瘤。

[0066] 在另一个实施例中,BRAF V600突变或BRAF融合突变相关的疾病或病况为黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌、头颈癌、肝细胞癌、兰格汉氏细胞组织细胞增多病、胃肠道间质细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、小儿星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤、慢性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、双表型B骨髓单核细胞性白血病、急性骨髓白血病、毛细胞白血病、痣、脂质肉芽肿病、恶性外周神经鞘肿瘤、发炎性和自体免疫疾病(如类风湿性关节炎)、腱鞘巨细胞瘤、色素沉着绒毛结节性滑膜炎、肌腱鞘巨细胞瘤、骨巨细胞瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、生殖细胞肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、肌周细胞瘤、后肾腺瘤、胰腺赘瘤、神经内分泌肿瘤、内分泌肿瘤、肾上腺肿瘤、肾上腺髓质肿瘤、腮腺囊腺癌、多形性胶质母细胞瘤、包括胆管腺瘤的胆管癌、肝胆管型肝癌、B细胞慢性淋巴增生病症、树突状细胞肉瘤、组织细胞肉瘤或淋巴瘤。

[0067] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病况为转移性黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌、脂质肉芽肿病或头颈癌。在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病况为黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌或头颈癌。

[0068] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病症为肝细胞癌、兰格汉氏细胞组织细胞增多病、胃肠道间质细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、小儿星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤、慢性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、双表型B骨髓单核细胞性白血病、急性骨髓白血病、毛细胞白血病或痣。

[0069] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病症为发炎性和自体免疫疾病(如类风湿性关节炎)、腱鞘巨细胞瘤、色素沉着绒毛结节性滑膜炎、肌腱鞘巨细胞瘤、骨巨细胞瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、生殖细胞肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、肌周细胞瘤、后肾腺瘤、胰腺赘瘤、神经内分泌肿瘤、内分泌肿瘤、肾上腺肿瘤、肾上腺髓质肿瘤、腮腺囊腺癌、多形性胶质母细胞瘤、包括胆管腺瘤的胆管癌、肝胆管型肝癌、B细胞慢性淋巴增生病症、树突状细

胞肉瘤、组织细胞肉瘤或淋巴瘤。

[0070] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病症为癌症。在另一个实施例中,BRAF V600E突变相关的癌症为转移性黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌或头颈癌。在另一个实施例中,BRAF V600E突变相关的癌症为转移性黑色素瘤、皮肤色素沉着黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、未分化甲状腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、胆管癌、巴雷特食道癌或头颈癌。

[0071] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为肝细胞癌、兰格汉氏细胞组织细胞增多病、胃肠道间质细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、小儿星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤、慢性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、双表型B骨髓单核细胞性白血病、急性骨髓白血病、毛细胞白血病或癌。

[0072] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病况为脂质肉芽肿病。

[0073] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为黑色素瘤。

[0074] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为转移性黑色素瘤。

[0075] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为皮肤色素沉着黑色素瘤。

[0076] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为周围神经鞘肿瘤(包括恶性和良性周围神经鞘肿瘤)。

[0077] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为恶性周围神经鞘肿瘤(MPNST)。

[0078] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为结直肠癌。

[0079] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为结直肠腺癌。

[0080] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为乳头状甲状腺癌。

[0081] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为未分化甲状腺癌。

[0082] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为卵巢癌。

[0083] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为非小细胞肺癌。

[0084] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为胃癌。

[0085] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为胆管癌。

[0086] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为巴雷特食道癌。

[0087] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为头颈癌。

[0088] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为肝细胞癌。

[0089] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为兰格汉氏细胞组织细胞增多病。

[0090] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为胃肠道间质细胞肿瘤。

[0091] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为多发性骨髓瘤。

[0092] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为小儿星形细胞瘤。

[0093] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为多形性黄色星形细胞瘤。

[0094] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为慢性骨髓白血病。

[0095] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为急性骨髓单核细胞性白血病。

[0096] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为双表型B骨髓单核细胞性白血病。

[0097] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为急性骨髓白血病。

[0098] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为毛细胞白血病。

[0099] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的癌症为癌。

[0100] 在另一个实施例中,BRAF V600突变相关的疾病或病况选自以下组成的组:缺血性中风、脑血管缺血、多发梗塞性痴呆、头部损伤、脊髓损伤、阿尔茨海默病、帕金森病、肌肉萎缩性侧索硬化、痴呆、老年舞蹈症、亨廷顿病、肿瘤性疾病、肿瘤性疾病的并发症、化疗诱导的缺氧、胃肠道间质瘤、前列腺肿瘤、肥大细胞肿瘤、犬肥大细胞肿瘤、急性骨髓白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、肥大细胞增多症、神经胶瘤、神经胶母细胞瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、神经外胚层源的肉瘤、平滑肌肉瘤、肺癌、乳癌、胰腺癌、结肠癌、肝细胞癌、肾癌、雌性生殖道癌瘤、鳞状细胞癌、原位癌、淋巴瘤、组织细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、MEN2综合症、神经纤维瘤、许旺氏(Schwann)细胞瘤、骨髓发育不良综合症、白血病、肿瘤血管生成、甲状腺癌、肝癌、骨癌、皮肤癌、脑癌(包括小儿脑肿瘤和BRAF-融合脑肿瘤)、中枢神经系统的癌症、胰腺癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、乳癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、胃肠道癌、子宫内膜癌、输卵管癌、睾丸癌、卵巢癌、神经性源疼痛、发炎源疼痛、急性疼痛、慢性疼痛、偏头痛、心血管疾病、心力衰竭、心肥大、血栓、血栓性微血管病变综合症、动脉粥样硬化、再灌注损伤、缺血、脑血管缺血、肝缺血、炎症、多囊性肾病、年龄相关性黄斑变性、类风湿性关节炎、过敏性鼻炎、发炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、全身性红斑狼疮、休格连氏综合症、韦格纳氏肉芽肿病、牛皮癣、硬皮病、慢性甲状腺炎、格雷氏病、重症肌无力、多发性硬化、骨关节炎、子宫内膜异位、皮肤疤痕、组织疤痕、血管再狭窄、纤维化病症、高嗜伊红细胞增多、CNS炎症、胰腺炎、肾炎、异位性皮肤炎、肝炎、免疫缺乏疾病、重症综合性免疫缺陷、器官移植排斥反应、移植物抗宿主疾病、肾病、前列腺疾病、糖尿病性肾病、肾硬化、丝球体肾炎、间质性肾炎、狼疮肾炎、前列腺增生、慢性肾衰竭、小管坏死、糖尿病相关联的肾并发症、相关联肾肥大、1型糖尿病、2型糖尿病、代谢综合症、肥胖症、肝性脂肪变性、胰岛素抗性、高血糖症、脂肪分解肥胖症、感染、幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori)感染、流感病毒感染、发热、败血症、肺病、慢性阻塞性肺病、急性呼吸窘迫综合症、哮喘、过敏、支气管炎、肺气肿、肺纤维化、基因发育疾病、努南氏(Noonan)综合症、克鲁宗氏(Crouzon)综合症、尖头多指并指/趾(acrocephalo-syndactyly)I型、发否氏(Pfeiffer)综合症、杰克逊-魏斯(Jackson-Weiss)综合症、先天性水痘(Costello)综合症、aka卡斯特罗(faciocutaneoskeletal)综合症、豹综合症、CFC(cardio-faciocutaneous)综合症、神经脊综合症异常(导致心脏血管、骨骼、肠、皮肤、毛发或内分泌疾病)、骨结构或矿化的病症、骨质疏松、增加的骨折风险、高钙血症、骨癌转移、格雷氏病、先天性巨结肠(Hirschsprung)病、淋巴管性水肿(lymphoedema)、选择性T细胞缺陷、X连锁无丙种球蛋白血症、糖尿病性视网膜病变、秃头症、勃起功能障碍和结节性硬化症。

[0101] 在一些实施例中,BRAF V600突变可为一种或多种BRAF V600突变。在一些实施例中,BRAF V600突变为选自以下组成的一种或多种突变:V600E、V600K、V600D、V600A、V600G、V600M和V600R。在一些实施例中,BRAF V600突变包含V600E和V600K突变。在一些实施例中,BRAF V600突变包含V600E突变。在一些实施例中,BRAF V600突变包含V600K突变。在一些实施例中,BRAF V600突变包含V600D突变。在一些实施例中,BRAF V600突变包含V600A突变。在一些实施例中,BRAF V600突变包含V600G突变。在一些实施例中,BRAF V600突变为V600M突变。在一些实施例中,BRAF V600突变包含V600R突变。

[0102] IV. 替代的化合物形式或衍生物

[0103] 预期以供在本文中使用的式I或式II化合物可以许多不同形式或衍生物存在,所有均在本公开的范围内。替代的形式或衍生物包括例如(a)互变异构体、异构体(包括立体异构体和区位异构体)和外消旋混合物(b)医药学上可接受的盐和(c)固体形式(包括不同晶体形式)、多晶或非结晶固体(包括其水合物和溶剂化物)和其它形式。

[0104] A. 互变异构体、立体异构体和区位异构体

[0105] 应理解,一些化合物可展现互变异构现象。在这些情况下,本文所提供的化学式明确地描绘可能的互变异构形式中的仅一者。因此,应理解本文提供化学式旨在表示所描绘的化合物的任何互变异构的形式并且不仅仅限于通过化学式的图示描绘的具体互变异构形式。

[0106] 同样,根据本公开预期供使用的化合物可能存在为立体异构体,即具有共价键结原子的相同原子连通性,但原子的空间取向不同。举例来说,化合物可为光学立体异构体,其含有一种或多种手性中心,并因此可以两种或更多种立体异构形式(例如对映异构体或非对映异构体)存在。因此,这类化合物可作为单一立体异构体(即,基本上不含其它立体异构体)、外消旋体和/或对映异构体和/或非对映异构体的混合物存在。作为另一实例,立体异构体包括几何异构体,如在双键的邻近碳上的取代基的顺式或反式取向。所有这类单一立体异构体、外消旋体及其混合物旨在本公开的范围内。除非相反地指定,否则所有这类立体异构形式包括于本文所提供的化学式内。

[0107] 在一些实施例中,根据本公开预期供使用的手性化合物处于含有至少80%单异构体(60%对映异构体过量(“e.e.”)或非对映异构体过量(“d.e.”)),或至少85%(70%e.e.或d.e.)、90%(80%e.e.或d.e.)、95%(90%e.e.或d.e.)、97.5%(95%e.e.或d.e.)或99%(98%e.e.或d.e.)的形式。如由本领域的技术人员一般理解的,具有一个手性中心的光学纯化合物为主要由两种可能的对映异构体中的一个组成(即为对映异构纯)的化合物,并且具有超过一个手性中心的光学纯化合物为同时为非对映异构性和对映异构纯的化合物。在一些实施例中,化合物以光学纯形式存在,这类光学纯形式通过本领域中已知的方法制备且/或分离(例如通过再结晶技术、手性合成技术(包括由光学纯起始材料合成),和使用手性色谱柱的色谱分离。

[0108] B. 医药学上可接受的盐

[0109] 除非相反地指定,否则,在本文中的化合物的规格包括这类化合物的医药学上可接受的盐。因此,本文所述的化合物可呈医药学上可接受的盐的形式,或可配制为医药学上可接受的盐。预期的医药学上可接受的盐形式包括(不限于)单、双、三、四等。医药学上可接受的盐在其投与的量和浓度下为无毒的。这类盐的制剂可通过在不预防其施加其生理效果的情况下更改化合物的物理特性而有助于药理学用途。物理特性的有用更改包括降低熔点以有助于经粘膜投与和增加溶解度以有助于投与更高浓度的药物。本公开的化合物可具有足够酸性官能团、足够碱性官能团或这两种官能团,并且因此可与许多无机或有机碱和无机及有机酸中的任一种反应,以形成医药学上可接受的盐。

[0110] 医药学上可接受的盐包括酸加成盐如包含以下的那些:氯化物、溴化物、碘化物、盐酸盐、醋酸盐、苯乙酸盐、丙烯酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、2-苯氧基苯甲酸盐、2-乙酰基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、甲基苯甲酸

盐、碳酸氢盐、丁炔-1,4二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、己酸盐、辛酸盐、氯苯甲酸盐、肉桂酸盐、柠檬酸盐、癸酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、羟乙酸盐、葡糖酸盐、葡糖二酸盐、葡糖醛酸盐、葡糖-6-磷酸盐、谷氨酸盐、庚酸盐、己酸盐、羟乙磺酸盐、异丁酸盐、 γ -羟基丁酸盐、苯丁酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、羟基马来酸盐(hydroxymaleate)、甲基马来酸盐(methylmaleate)、丙二酸盐、杏仁酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、异烟酸盐、辛酸盐、油酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐、单氢磷酸盐、二氢磷酸盐、正磷酸盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、2-磷酸甘油酸盐、3-磷酸甘油酸盐、邻苯二甲酸盐、丙酸盐、苯丙酸盐、丙炔酸盐、丙酮酸盐、奎尼酸盐、水杨酸盐、4-氨基水杨酸盐、癸二酸盐、硬脂酸盐、辛二酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、氨基磺酸盐、磺酸盐、苯磺酸盐(benzenesulfonate) (即苯磺酸盐(besylate))、乙磺酸盐(ethanesulfonate) (即乙磺酸盐(esylate))、乙烷-1,2-二磺酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐 (即羟乙磺酸盐)、甲烷磺酸盐 (即甲磺酸盐)、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐 (即萘磺酸盐)、丙磺酸盐、对甲苯磺酸盐 (即甲苯磺酸盐)、二甲苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐、酒石酸盐和三氟乙酸盐。这些医药学上可接受的酸加成盐可使用适当对应的酸制备。

[0111] 在酸性官能团如羧酸或酚类存在时,医药学上可接受的盐还包括碱性加成盐如含有以下的那些:苄星、氯普鲁卡因、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、叔丁胺、二环己胺、乙二胺、N,N'-二苯甲基乙二胺、甲葡萄糖胺、羟乙基吡咯烷、哌啶、吗啉、哌嗪、普鲁卡因、铝、钙、铜、铁、锂、镁、锰、钾、钠、锌、铵和单-、二-或三-烷基胺(例如二乙胺),或衍生自氨基酸如L-组氨酸、L-甘氨酸、L-赖氨酸和L-精氨酸的盐。举例来说,参见《雷明顿氏医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第19版,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Co., Easton, PA),第2卷,第1457、1995页。这些医药学上可接受的碱加成盐可使用适当对应的碱制备。

[0112] 医药学上可接受的盐可通过标准技术制备。举例来说,化合物的游离碱形式可溶解于合适溶剂如含有适当酸的含水溶液或含水醇溶液中,并且然后通过蒸发所述溶液而被分离。在另一个实例中,盐可通过使游离碱和酸在有机溶剂中反应来制备。如果具体化合物为酸,则期望医药学上可接受的盐可通过任何合适方法制备,例如用合适无机或有机碱处理游离酸。

[0113] C. 其它化合物形式

[0114] 在作为固体的药剂的情况下,本领域的技术人员应理解,根据本公开预期供使用的化合物和盐可以不同晶体或多晶形式存在,或可配制为共结晶体,或可呈非结晶形式,或可为以上形式的任何组合(例如部分结晶、部分非结晶,或多晶型物的混合物),所有这些形式旨在在本公开和指定化学式的范围内。而盐由酸/碱加成形成,即相关化合物的游离碱或游离酸分别与对应加成碱或加成酸形成酸/碱反应,引起离子电荷相互作用,共结晶体为形成于中性化合物之间的新化学物质,从而产生呈相同晶体结构的化合物和其它分子物质。

[0115] 在一些例子中,根据本公开预期供使用的化合物与酸或碱(包括碱加成盐如铵、乙二胺、乙醇胺、乙二胺、二乙醇胺、叔丁胺、哌嗪、甲葡萄糖胺);酸加成盐(如醋酸盐、乙酰基水杨酸盐、苯磺酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、戊二酸盐、盐酸盐、顺丁烯二酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、草酸盐、磷酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸酯和甲苯磺酸盐);和氨基酸(如丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、

甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸或缬氨酸)络合。在将本公开的化合物与酸或碱组合时,优选地形成非结晶络合物,而非结晶材料如典型盐或共结晶体。在一些例子中,通过附加处理(如通过喷雾干燥、机械化学方法如辊压或微波照射与酸或碱混合的母体化合物)促进络合物的非结晶形式。这类方法还可包括将离子和/或非离子聚合物体系(包括(但不限于)醋酸羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯(HPMCAS)和甲基丙烯酸共聚物(例如Eudragit® L100-55))加成,所述体系进一步稳定络合物的非结晶性质。这类非结晶络合物提供若干优点。举例来说,降低关于游离碱的熔化温度有助于附加处理如热熔挤出,以进一步改善所述化合物的生物医药特性。另外,非结晶络合物易于破碎,这提供用于将固体装载成胶囊或片剂形式的改善的压缩。

[0116] 此外,化学式旨在涵盖所鉴别结构的水合或溶剂化以及未水合的或非溶剂化形式。举例来说,所表示的化合物同时包括水合形式和非水合形式。溶剂化物的其它实例包括与合适溶剂(如异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸或乙醇胺)组合的结构。

[0117] V. 组合疗法

[0118] 在一些实施例中,本公开提供在有需要的动物受试者中医治本文所述的疾病或病况中的任一种的方法,其中所述方法涉及向受试者投与有效量的与用于疾病或病况的一种或多种其它疗法组合的式I或II化合物。

[0119] A. 与另一种药剂组合的式I或II

[0120] 在一些实施例中,式I或式II化合物,或包含式I或式II化合物的医药组合物可与另一种治疗剂一起投与。在一些实施例中,另一种治疗剂可为烷化剂,包括(但不限于)阿多来新、六甲蜜胺、苯达莫司汀、比折来新、白消安、卡铂、卡波醌、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、雌氮芥、依托格鲁、福莫司汀、海普法姆、异环磷酰胺、英丙舒凡、伊洛福芬、洛莫司汀、甘露舒凡、氮芥、美法仑、二溴甘露醇、奈达铂、尼莫司汀、奥沙利铂、哌泊舒凡、泼尼氮芥、丙卡巴肼、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、噻替派、曲奥舒凡、三亚胺醌、曲他胺、特瑞铂四硝酸酯、曲洛磷胺和乌拉莫司汀;抗生素,包括(但不限于),阿克拉霉素、氨柔比星、博莱霉素、放线菌素、道诺霉素、阿霉素、依沙芦星、表柔比星、艾达霉素、美诺立尔、丝裂霉素、新抑癌蛋白、喷司他汀、吡柔比星、普卡霉素、伐柔比星和左柔比星;抗代谢物,包括(但不限于),氨基喋呤、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲胺喋呤、奈拉滨、培美曲塞、硫唑嘌呤、雷替曲塞、喃氟啶-尿嘧啶、硫鸟嘌呤、甲氧苄氨嘧啶、三甲曲沙和阿糖腺苷;免疫疗法,包括(但不限于),阿仑单抗、派立珠单抗、尼沃单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、加利昔单抗、吉妥单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、90Y-替坦异贝莫单抗、伊派利单抗和曲美木单抗;激素或激素拮抗剂,包括(但不限于),阿那曲唑、雄激素、布舍瑞林、己烯雌酚、依西美坦、氟他胺、氟维司群、戈舍瑞林、艾多昔芬、来曲唑、亮丙立德、甲地孕酮、雷诺昔酚、他莫昔芬和托瑞米芬;紫杉烷,包括(但不限于)DJ-927、多西他赛、TPI 287、拉洛他赛、奥他赛、紫杉醇、DHA-紫杉醇和替司他赛;类视黄醇,包括(但不限于),亚利崔托宁、贝瑟罗汀、非瑞替尼、异维甲酸和维甲酸;生物碱,包括(但不限于),秋水仙碱、高三尖杉酯碱、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞宾;抗血管生成药剂,包括(但不限于),AE-941(GW786034、鲨癌灵)、ABT-510、2-甲氧雌二醇、来那度胺和撒利多胺;拓扑异构酶抑制剂,包括(但不限于),安吖啶、贝

洛替康、艾多卡林、依托泊昔、磷酸依托泊昔、依沙替康、伊立替康(还有活性代谢物SN-38(7-乙基-10-羟基-喜树碱))、甲硫恩酮、米托蒽醌、派蒽醌、鲁比替康、替尼泊甙、拓朴替康和9-氨基喜树碱；激酶抑制剂，包括(但不限于)，阿西替尼(AG013736)、达沙替尼(BMS 354825)、埃罗替尼、吉非替尼、夫拉平度、甲磺酸伊马替尼、拉帕替尼、二磷酸莫替沙尼(AMG 706)、尼罗替尼(AMN 107)、塞利希布、索拉非尼、苹果酸舒尼替尼、AEE-788、BMS-599626、UCN-01(7-羟基星形孢菌素)和凡塔蓝尼；靶向信号转导抑制剂，包括(但不限于)硼替佐米、格列德霉素和雷帕霉素；生物应答调节剂，包括(但不限于)，咪唑莫特、干扰素- α 和白介素-2；和其它化学治疗剂，包括(但不限于)3-AP(3-氨基-2-甲醛硫缩胺基脲)、阿特森坦、氨鲁米特、阿那格雷、天冬酰胺酶、苔藓虫素-1、西仑吉肽、艾利莫尔、甲磺酸艾日布林(E7389)、伊沙匹隆、氯尼达明、马索罗酚、米托胍腙、奥利默森、舒林酸、睾内酯、噻唑呋林、mTOR抑制剂(例如坦罗莫司、依维莫司、地磷莫司)、PI3K抑制剂(例如BKM120、BEZ235、GDC-0941、XL17、XL765)、Cdk4抑制剂(例如PD-332991)、Akt抑制剂、Hsp90抑制剂(例如坦螺旋霉素)和法尼基转移酶抑制剂(例如替吡法尼)；EK抑制剂(例如，AS703026、AZD6244(司美替尼)、AZD8330、BIX02188、CI 1040(PD184352)、D-87503、GS 1 120212(JTP-74057)、PD0325901、PD3 18088、PD98059、PDEA1 19(BAY 869766)、TAK-733)。在另一个实施例中，医治癌症的方法涉及向受试者投与有效量的包括如本文所述的与选自以下的化疗剂组合的任何一种或多种化合物的组合物：卡培他滨、5-氟尿嘧啶、卡铂、达卡巴嗪、吉非替尼、奥沙利铂、紫杉醇、SN-38、替莫唑胺、长春碱、贝伐单抗、西妥昔单抗、干扰素- α 、白介素-2或埃罗替尼。

[0121] 在一些实施例中，另一种治疗剂可为以下药剂中的一种或多种：阿多来新、六甲蜜胺、苯达莫司汀、比折来新、白消安、卡铂、卡波醌、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、雌氮芥、依托格鲁、福莫司汀、海普法姆、异环磷酰胺、英丙舒凡、伊洛福芬、洛莫司汀、甘露舒凡、氮芥、美法仑、二溴甘露醇、奈达铂、尼莫司汀、奥沙利铂、哌泊舒凡、泼尼氮芥、丙卡巴肼、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、噻替派、曲奥舒凡、三亚胺醌、曲他胺、特瑞铂四硝酸酯、曲洛磷胺、乌拉莫司汀、阿克拉霉素、氨柔比星、博莱霉素、放线菌素、道诺霉素、阿霉素、依沙芦星、表柔比星、艾达霉素、美诺立尔、丝裂霉素、新抑癌蛋白、喷司他汀、吡柔比星、普卡霉素、伐柔比星、左柔比星、氨基喋呤、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲胺喋呤、奈拉滨、培美曲塞、硫唑嘌呤、雷替曲塞、喃氟啶-尿嘧啶、硫鸟嘌呤、甲氧苄氨嘧啶、三甲曲沙、阿糖腺苷、阿仑单抗、派立珠单抗、尼沃单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、加利昔单抗、吉妥单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、90Y-替坦异贝莫单抗、伊派利单抗、曲美木单抗、阿那曲唑、雄激素、布舍瑞林、己烯雌酚、依西美坦、氟他胺、氟维司群、戈舍瑞林、艾多昔芬、来曲唑、亮丙立德、甲地孕酮、雷诺昔酚、他莫昔芬、托瑞米芬、DJ-927、多西他赛、TPI 287、拉洛他赛、奥他赛、紫杉醇、DHA-紫杉醇、替司他赛、亚利崔托宁、贝瑟罗汀、非瑞替尼、异维甲酸、维甲酸、秋水仙碱、高三尖杉酯碱、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞宾、抗血管生成药剂，包括(但不限于)，鲨癌灵、ABT-510、2-甲氧雌二醇、来那度胺、撒利多胺、安吖啶、艾多卡林、依托泊昔、磷酸依托泊昔、依沙替康、伊立替康、甲硫恩酮、米托蒽醌、派蒽醌、鲁比替康、替尼泊甙、拓朴替康、9-氨基喜树碱、阿西替尼、埃罗替尼、吉非替尼、夫拉平度、甲磺酸伊马替尼、卡博替尼、拉帕替尼、二磷酸莫替沙尼、尼罗替尼、塞利希布、索拉非尼、苹果酸舒尼替

尼、AEE-788、BMS-599626、7-羟基星形孢菌素、凡塔蓝尼、硼替佐米、格尔德霉素、雷帕霉素、咪唑莫特、干扰素- α 、白介素-2、3-氨基-2-甲醛硫缩胺基脲、阿特森坦、氨鲁米特、阿那格雷、天冬酰胺酶、苔藓虫素-1、西仑吉肽、艾利莫尔、甲磺酸艾日布林、伊沙匹隆、氯尼达明、马索罗酚、米托胍腙、奥利默森、舒林酸、睾内酯、噻唑呋林、坦罗莫司、依维莫司、地磷莫司、PI3K抑制剂、Cdk4抑制剂、Akt抑制剂、Hsp90抑制剂、EGFR抑制剂、IDO抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、MEK抑制剂、BET抑制剂、AS703026、司美替尼、AZD8330、BIX02188、PD184352、D-87503、GS 1 120212、PD0325901、PD3 18088、PD98059、PDEA1 19或TAK-733。

[0122] 在另一方面中，本公开提供用于通过向受试者投与有效量的式I或II化合物与一种或多种合适化疗剂来医治有需要的受试者的癌症方法。在一些实施例中，一种或多种合适化疗剂选自：烷化剂，包括(但不限于)，阿多来新、六甲蜜胺、苯达莫司汀、比折来新、白消安、卡铂、卡波醌、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、雌氮芥、依托格鲁、福莫司汀、海普法姆、异环磷酰胺、英丙舒凡、伊洛福芬、洛莫司汀、甘露舒凡、氮芥、美法仑、二溴甘露醇、奈达铂、尼莫司汀、奥沙利铂、哌泊舒凡、泼尼氮芥、丙卡巴肼、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、噻替派、曲奥舒凡、三亚胺醌、曲他胺、特瑞铂四硝酸酯、曲洛磷胺和乌拉莫司汀；抗生素，包括(但不限于)，阿克拉霉素、氨柔比星、博莱霉素、放线菌素、道诺霉素、阿霉素、依沙芦星、表柔比星、艾达霉素、美诺立尔、丝裂霉素、新抑癌蛋白、喷司他汀、吡柔比星、普卡霉素、伐柔比星和左柔比星；抗代谢物，包括(但不限于)，氨基喋呤、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲胺喋呤、奈拉滨、培美曲塞、雷替曲赛、喃氟啶-尿嘧啶、硫鸟嘌呤、甲氧苄氨嘧啶、三甲曲沙和阿糖腺苷；包括吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂的免疫疗法、抗体疗法，包括(但不限于)免疫检查点抑制剂如PD-1抑制剂(如派立珠单抗、尼沃单抗、匹立珠单抗)或PD-L1抑制剂(如BMS-936559、MEDI4736、MPDL3280A或MSB0010718C)、阿仑单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、加利昔单抗、吉妥单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、贝伦妥单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、90Y替坦异贝莫单抗、伊派利单抗、曲美木单抗和抗CTLA-4抗体；激素或激素拮抗剂，包括(但不限于)，阿那曲唑、雄激素、布舍瑞林、己烯雌酚、依西美坦、氟他胺、氟维司群、戈舍瑞林、艾多昔芬、来曲唑、亮丙立德、甲地孕酮、雷诺昔酚、他莫昔芬和托瑞米芬；紫杉烷，包括(但不限于)DJ-927、多西他赛、TPI 287、拉洛他赛、奥他赛、紫杉醇、DHA-紫杉醇和替司他赛；类视黄醇，包括(但不限于)，亚利崔托宁、贝瑟罗汀、非瑞替尼、异维甲酸和维甲酸；生物碱，包括(但不限于)，秋水仙碱、高三尖杉酯碱、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞宾；抗血管生成药剂，包括(但不限于)，AE-941(GW786034、鲨癌灵)、ABT-510、2-甲氧雌二醇、来那度胺和撒利多胺；拓扑异构酶抑制剂，包括(但不限于)，安吖啶、贝洛替康、艾多卡林、依托泊苷、磷酸依托泊苷、依沙替康、伊立替康(还有活性代谢物SN-38(7-乙基-10-羟基-喜树碱))、甲硫恩酮、米托蒽醌、派蒽醌、鲁比替康、替尼泊甙、拓朴替康和9-氨基喜树碱；激酶抑制剂，包括(但不限于)，阿西替尼(AG 013736)、达沙替尼(BMS 354825)、埃罗替尼、吉非替尼、夫拉平度、甲磺酸伊马替尼、卡博替尼、拉帕替尼、二磷酸莫替沙尼(AMG 706)、尼罗替尼(AMN107)、塞利希布、索拉非尼、苹果酸舒尼替尼、AEE-788、BMS-599626、UCN-01(7-羟基星形孢菌素)、维罗非尼、达拉菲尼、司美替尼和凡塔蓝尼；靶向信号转导抑制剂，包括(但不限于)硼替佐米、格尔德霉素和雷帕霉素；生物反应调节剂，包括(但不限于)，咪唑莫特、干扰素- γ 和白

介素-2;和其它化学治疗剂,包括(但不限于)3-AP(3-氨基-2-甲醛硫缩胺基脲)、阿特森坦、氨鲁米特、阿那格雷、天冬酰胺酶、苔藓虫素-1、西仑吉肽、艾利莫尔、甲磺酸艾日布林(E7389)、伊沙匹隆、氯尼达明、马索罗酚、米托胍腙、奥利默森、舒林酸、睾内酯、噻唑呋林、mTOR抑制剂(例如INK28、AZD8055、西罗莫司、坦罗莫司、依维莫司、地磷莫司)、PI3K抑制剂(例如BEZ235、GDC-0941、XL147、XL765)、Cdk4抑制剂(例如PD-332991)、Akt抑制剂、Hsp90抑制剂(例如格尔德霉素、根赤壳菌素、坦螺旋霉素)、法呢基转移酶抑制剂(例如替吡法尼)和芳香酶抑制剂(阿那曲唑来曲唑依西美坦)。在本文所述的方法和用途的另一个实施例中,式I或II化合物与选自以下的化疗剂组合投与:卡培他滨、5-氟尿嘧啶、卡铂、达卡巴嗪、吉非替尼、奥沙利铂、紫杉醇、SN-38、替莫唑胺、长春碱、贝伐单抗、西妥昔单抗、干扰素- α 、白介素-2或埃罗替尼。在另一个实施例中,化疗剂为Mek抑制剂。例示性Mek抑制剂包括(但不限于)曲美替尼、考比替尼、AS703026、AZD6244(司美替尼)、AZD8330、BIX 02188、CI-1040(PD184352)、GSK1120212(JTP-74057)、PD0325901、PD318088、PD98059、RDEA119(BAY 869766)、TAK-733和U0126-EtOH。在另一个实施例中,化疗剂为酪氨酸激酶抑制剂。例示性酪氨酸激酶抑制剂包括(但不限于)AEE788、AG-1478(泰福斯汀AG-1478)、AG-490、阿帕替尼(YN968D1)、AV-412、AV-951(替沃扎尼)、阿西替尼、AZD8931、BIBF1120(瓦格特氟)、BIBW2992(阿法替尼)、BMS794833、BMS-599626、布立尼布(BMS-540215)、布立尼布丙氨酸酯(BMS-582664)、西地尼布(AZD2171)、大黄酸(大黄酚)、克诺拉尼(CP-868569)、CUDC-101、CYC116、多韦替尼二乳酸(TKI258二乳酸)、E7080、盐酸埃罗替尼(特罗凯)、CP-358774、OSI-774、NSC-718781)、弗雷替尼(GSK1363089、XL880)、吉非替尼(ZD-1839或易瑞沙)、伊马替尼(格列维克(Gleevec))、甲磺酸伊马替尼、Ki8751、KRN 633、拉帕替尼(泰克泊)、立尼法尼(ABT-869)、马赛替尼(Masivet、AB1010)、MGCD-265、莫替沙尼(AMG-706)、MP-470、木利替尼(TAK165)、来那替尼(HKI-272)、NVP-BHG712、OSI-420(去甲基埃罗替尼、CP-473420)、OSI-930、盐酸帕唑帕尼、PD-153035盐酸、PD173074、培利替尼(EKB-569)、PF299804、普纳替尼(AP24534)、PP121、RAF265(CHIR-265)、Raf265衍生物、瑞格非尼(BAY73-4506)、甲苯磺酸索拉非尼(多吉美)、苹果酸舒尼替尼(舒坦特)、特拉替尼(BAY57-9352)、TSU-68(SU6668)、凡德他尼(扎克替尼)、二氯化凡塔蓝尼(PTK787)、WZ3146、WZ4002、WZ8040、卡博替尼、XL647、EGFR siRNA、FLT4 siRNA、KDR siRNA、抗糖尿病制剂如二甲双胍、PPAR促进剂(罗格列酮、吡格列酮、苯扎贝特、环丙贝特、氯贝丁酯、吉非罗齐、非诺贝特、替格列扎)和DPP4抑制剂(西他列汀、维格列汀、沙格列汀、多格列汀、吉格列汀、阿格列汀)。在另一个实施例中,药剂为BET抑制剂(如BRD2、BRD3、BRD4和/或BRDT)。在另一个实施例中,药剂为EGFR抑制剂。例示性EGFR抑制剂包括(但不限于)AEE-788、AP-26113、BIBW-2992(Tovok)、CI-1033、GW-572016、易瑞沙、LY2874455、R0-5323441、特罗凯(埃罗替尼、OSI-774)、CUDC-101、西妥昔单抗和WZ4002。在另一个实施例中,本公开提供用于通过向受试者投与有效量的式I或II化合物与拓扑异构酶抑制剂(如伊立替康)和EGFR抑制剂(如西妥昔单抗)来医治有需要的受试者的癌症的方法。

[0123] 在一些实施例中,另一种治疗剂可为以下药剂中的一种或多种:阿多来新、六甲蜜胺、苯达莫司汀、比折来新、白消安、卡铂、卡波醌、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、雌氮芥、依托格鲁、福莫司汀、海普法姆、异环磷酰胺、英丙舒凡、伊洛福芬、洛莫司汀、甘露舒凡、氮芥、美法仑、二溴甘露醇、奈达铂、尼莫司汀、奥沙利铂、哌泊舒

凡、泼尼氮芥、丙卡巴肼、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、噻替派、曲奥舒凡、三亚胺醌、曲他胺、特瑞铂四硝酸酯、曲洛磷胺、乌拉莫司汀、阿克拉霉素、氨柔比星、博莱霉素、放线菌素、道诺霉素、阿霉素、依沙芦星、表柔比星、艾达霉素、美诺立尔、丝裂霉素、新抑癌蛋白、喷司他汀、吡柔比星、普卡霉素、伐柔比星、左柔比星、氨基喋呤、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲胺喋呤、奈拉滨、培美曲塞、雷替曲塞、喃氟啶-尿嘧啶、硫鸟嘌呤、甲氧苄氨嘧啶、三甲曲沙、阿糖腺苷、(IDO)抑制剂、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、阿仑单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、加利昔单抗、吉妥单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、贝伦妥单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、90Y替坦异贝莫单抗、伊派利单抗、曲美木单抗、抗CTLA-4抗体、阿那曲唑、雄激素、布舍瑞林、己烯雌酚、依西美坦、氟他胺、氟维司群、戈舍瑞林、艾多昔芬、来曲唑、亮丙立德、甲地孕酮、雷诺昔酚、他莫昔芬、托瑞米芬、紫杉烷、类视黄醇、生物碱、抗血管生成药剂、拓扑异构酶抑制剂、阿西替尼、达沙替尼、埃罗替尼、吉非替尼、夫拉平度、甲磺酸伊马替尼、拉帕替尼、二磷酸莫替沙尼、尼罗替尼、塞利希布、索拉非尼、苹果酸舒尼替尼、AEE-788、BMS-599626、7-羟基星形孢菌素、维罗非尼、达拉菲尼、司美替尼、凡塔蓝尼、硼替佐米、格尔德霉素、雷帕霉素、咪唑莫特、干扰素- γ 、白介素-2、3-氨基-2-甲醛硫缩胺基脲、阿特森坦、氨鲁米特、阿那格雷、天冬酰胺酶、苔藓虫素-1、西仑吉肽、艾利莫尔、甲磺酸艾日布林、伊沙匹隆、氯尼达明、马索罗酚、米托胍腙、奥利默森、舒林酸、睾内酯、噻唑呋林、INK28、AZD8055、西罗莫司、坦罗莫司、依维莫司、地磷莫司、BEZ235、GDC-0941、XL147、XL765、PD-332991、Akt抑制剂、格尔德霉素、根赤壳菌素、坦螺旋霉素、替吡法尼、阿那曲唑来曲唑依西美坦、曲美替尼、考比替尼、AS703026、司美替尼、AZD8330、BIX 02188、PD184352、GSK1120212、PD0325901、PD318088、PD98059、BAY 869766、TAK-733、U0126-EtOH、AEE788、泰福斯汀、AG-490、阿帕替尼、AV-412、替沃扎尼、阿西替尼、AZD8931、瓦格特氟、阿法替尼、BMS794833、BMS-599626、布立尼布、布立尼布丙氨酸酯、西地尼布、大黄酸、克诺拉尼、CUDC-101、CYC116、多韦替尼二乳酸、E7080、盐酸埃罗替尼、弗雷替尼、吉非替尼、伊马替尼、甲磺酸伊马替尼、Ki8751、KRN 633、拉帕替尼、立尼法尼、马赛替尼、MGCD-265、莫替沙尼、MP-470、木利替尼、来那替尼、NVP-BHG712、去甲基埃罗替尼、OSI-930、盐酸帕唑帕尼、PD-153035盐酸、PD173074、培利替尼、PF299804、普纳替尼、PP121、RAF265、瑞格非尼、甲苯磺酸索拉非尼、苹果酸舒尼替尼、特拉替尼、TSU-68、凡德他尼、二盐酸凡塔蓝尼、WZ3146、WZ4002、WZ8040、卡博替尼、XL647、EGFR siRNA、FLT4 siRNA、KDR siRNA、抗糖尿病剂、PPAR促效剂、DPP4抑制剂、BET抑制剂或EGFR抑制剂。

[0124] 在一些实施例中，另一种治疗剂可为溴结构域抑制剂。溴结构域的抑制剂(例如，BET蛋白，如BRD2、BRD3、BRD4和/或BRDT)可用于医治与溴结构域的异常表达(包括细胞增殖病症、癌症、慢性自身免疫、发炎病况等等)有关的疾病。BET抑制剂的非限制性实例包括GSK1210151A和GSK525762。

[0125] 在一些实施例中，另一种治疗剂可为组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDAC抑制剂)为细胞生长抑制剂，其通过诱导细胞周期停滞、分化和/或凋亡来抑制在培养物中和活体内的肿瘤细胞的增殖。HDAC抑制剂经由诱导癌基因或肿瘤遏制因子的表达改变，通过调节组蛋白和/或非组蛋白蛋白质如转录因子的乙酰化/去乙酰化发挥其抗肿瘤效应。组蛋白乙酰化和去乙酰化在染色质拓扑的调节和基因转录的调控中发挥重要作用。

用。HDAC抑制剂的非限制性实例包括伏立诺他、罗米地辛、西达本胺、帕比司他、贝林诺他、丙戊酸、莫塞诺他、阿贝辛他、恩替诺特、雷米诺他、吉韦诺他和奎西诺他。HDAC抑制剂已经在精神病学和神经病学中作为情绪稳定剂和抗癫痫药充分使用。HDAC抑制剂的一个实例为丙戊酸,以商品名称Depakene、Depakote和Divalproex作为药物出售。HDAC抑制剂也用作用于神经退行性疾病如阿尔茨海默病和亨廷顿病的缓解剂(mitigator)。

[0126] B. 与另一种疗法组合的式I或II

[0127] 在一些实施例中,本公开提供通过向受试者投与有效量的与在医治癌症上有效的一种或多种其它疗法或医疗程序组合的式I或II化合物,或其组合物来医治有需要的受试者的癌症的方法。其它疗法或医疗程序包括合适抗癌疗法(例如药品疗法、疫苗疗法、基因疗法、光动力疗法)或医疗程序(例如手术、辐射治疗、高温加热、骨髓或干细胞移植)。在一个实施例中,一种或多种合适抗癌疗法或医疗程序选自:借助化疗剂(例如化学治疗药物)的医治、辐射医治(例如x射线、 γ 射线或电子、质子、中子或 α 粒子束)、高温加热(例如微波、超声波、射频消融)、疫苗疗法(例如AFP基因肝细胞癌疫苗、AFP腺病毒载体疫苗、AG-858、同种异基因的GM-CSF-分泌乳癌疫苗、树突状细胞肽疫苗)、基因疗法(例如Ad5CMV-p53载体、编码MDA7的腺病毒载体、腺病毒5-肿瘤坏死因子 α)、光动力疗法(例如氨基乙酰丙酸、莫特沙芬镥)、溶瘤病毒或细菌疗法、手术或骨髓和干细胞移植。在某些实施例中,本公开提供通过独立地或同时向受试者投与有效量的本文所述的式I或式II化合物和应用如本文所描述的辐射医治来医治有需要的受试者的癌症的方法。在一个实施例中,本公开提供用于通过向受试者投与有效量的本文所述的式I或式II化合物,接着辐射医治(例如x射线、 γ 射线或电子、质子、中子或 α 粒子束)来医治有需要的受试者的癌症的方法。在另一个实施例中,本公开提供用于通过向受试者应用辐射医治(例如x射线、 γ 射线或电子、质子、中子或 α 粒子束),接着向受试者投与本文所述的有效量的式I或式II来医治有需要的受试者的癌症的方法。在另一实施例中,本公开提供用于通过向受试者同时投与本文所述的式I或式II化合物和放疗(例如x射线、 γ 射线或电子、质子、中子或 α 粒子束)医治有需要的受试者的癌症的方法。

[0128] VI. 试剂盒

[0129] 在另一方面中,本公开提供包括如本文所描述的式I或II化合物,或其组合物的试剂盒。在一些实施例中,化合物或组合物封装例如在可进一步封装例如在盒子、包封或包内的小瓶、瓶、烧瓶中;化合物或组合物由美国食品和药物管理局(U.S. Food and Drug Administration)或类似监管机构审批用于投与哺乳动物,例如人类;化合物或组合物被审批用于投与哺乳动物(例如,人类),用于BRAF蛋白激酶介导的疾病或病况;本公开试剂盒包括书面使用说明书和/或其它指示,所述指示为化合物或组合物合适或被审批用于投与哺乳动物(例如人类),用于BRAF蛋白激酶介导的疾病或病况;并且化合物或组合物以单位剂量或单剂量形式例如,单剂量药丸、胶囊等封装。

[0130] VII. 配制物和投与

[0131] 本文所述的方法和用途通常将用于针对人类受试者的疗法。然而,它们还可用于治疗在其它动物受试者中的类似或相同适应症。本文所述的式I或式II化合物可通过不同途径投与,包括注射(即不经肠,包括静脉内、腹膜内、皮下和肌内)、口服、经皮、经粘膜、经直肠或吸入。这类剂量形式应当允许化合物到达靶细胞。其它因素为本领域中众所周知的,

并且包括考虑因素如毒性和阻滞化合物或组合物施加其功效的剂量形式。技术和配制物通常可发现于《雷明顿:医药科学和实践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy)》, 第21版,宾夕法尼亚州费城的利平科特威廉姆斯和维尔金斯出版社 (Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA), 2005年(由此以引用的方式并入本文中)。

[0132] 在一些实施例中,用于本公开的方法的组合物将包含医药学上可接受的载剂或赋形剂,如填充剂、粘合剂、崩解剂、助流剂、润滑剂、络合剂、增溶剂和表面活性剂,它们可经选择以有助于通过特定途径投与所述化合物。载剂的实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖如乳糖、葡萄糖或蔗糖,若干类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、脂质、脂质体、纳米粒子等。载剂还包括作为溶剂或用于悬浮液的生理上相容性液体,包括例如,用于注射的水的无菌溶液 (WFI)、生理盐水溶液、右旋糖溶液、汉克氏溶液、林格氏溶液、蔬菜油、矿物油、动物油、聚乙二醇、液体石蜡等。赋形剂还可以包括,例如,胶态二氧化硅、硅胶、滑石、硅酸镁、硅酸钙、铝硅酸钠、三硅酸镁、粉末纤维素、粗晶纤维素、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠、苯甲酸钠、碳酸钙、碳酸镁、硬脂酸、硬脂酸铝,硬脂酸钙、硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酰反丁烯二酸钠、微粉硅胶(syloid)、stearowet C、氧化镁、淀粉、羟基乙酸淀粉钠、单硬脂酸甘油酯、二山嵛酸甘油酯、棕榈基硬脂酸甘油酯、氢化植物油、氢化棉籽油、蓖麻种子油、矿物油、聚乙二醇(例如PEG 400或PEG 4000-8000)、聚氧化乙烯二醇、泊洛沙姆、聚维酮、交联聚维酮、交联羧甲纤维素钠、褐藻酸、酪蛋白、甲基丙烯酸、二乙烯基苯共聚物、多库酯钠、环糊精(例如2-羟丙基-8-环糊精)、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)、西曲溴铵、TPGS (d- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯)、月桂基硫酸镁、月桂基硫酸钠、聚乙二醇醚、聚乙二醇的二-脂肪酸酯或聚环氧烷脱水山梨糖醇脂肪酸酯(例如,聚氧化乙烯脱水山梨糖醇酯Tween[®])、聚氧化乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、脱水山梨糖醇脂肪酸酯(例如,来自脂肪酸如油酸、硬脂酸或棕榈酸的脱水山梨糖醇脂肪酸酯)、甘露醇、木糖醇、山梨醇、麦芽糖、乳糖、单水合乳糖或喷雾干燥的乳糖、蔗糖、果糖、磷酸钙、二碱磷酸钙、磷酸三钙、硫酸钙、葡萄糖结合剂、聚葡萄糖、糊精、右旋糖、醋酸纤维素、麦芽糊精、聚二甲硅氧烷、聚右旋糖、聚葡萄糖、明胶、HPMC(羟丙基甲基纤维素)、HPC(羟丙基纤维素)、羟乙基纤维素等。

[0133] 在一些实施例中,可使用口服投与。用于口服用途的医药制剂可配制成常规口服剂型(如胶囊、片剂)和液体制剂如糖浆、酏剂和浓缩滴剂。本文所述的式I或II化合物可与固体赋形剂组合,在添加合适助剂(如果需要的话)之后,任选地研磨所得混合物和处理颗粒的混合物以获得例如,片剂、包覆包衣的片剂、硬胶囊、软胶囊、溶液(例如含水溶液、醇溶液或含油溶液)等。合适赋形剂为,具体来说,填充剂如糖,包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂,例如,玉米淀粉、麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠(CMC)和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP:聚维酮);含油赋形剂,包括蔬菜油和动物油,如葵花油、橄榄油或鳕鱼肝油。口服剂型配制物还可含有崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或褐藻酸,或其盐如海藻酸钠;润滑剂,如滑石或硬脂酸镁;塑化剂,如丙三醇或山梨醇;甜味剂如蔗糖、果糖、乳糖或阿斯巴甜;天然或人工调味剂,如胡椒薄荷、冬青油或樱桃调味剂;或色素或颜料,其可以用于鉴别或表征不同剂型或组合。还提供具有合适包衣的糖衣药丸芯。出于此目的,可使用浓缩糖溶液,其可任选地含有例如阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇和/或二氧化

化钛、漆溶液和适合的有机溶剂或溶剂混合物。

[0134] 可以经口使用的医药制剂包括由明胶制成的推入配合胶囊 (push-fit capsule) (“胶囊锭”) 以及由明胶和塑化剂如丙三醇或山梨糖醇制成的软密封胶囊。推入配合胶囊可含有活性成分与填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁以及任选的稳定剂的混杂物。在软胶囊中,活性组分如式I或式II化合物可溶解或悬浮于合适液体中,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。

[0135] 在一些实施例中,可使用注射 (不经肠投与),例如,肌内、静脉内、腹膜内和/或皮下。用于注射的本文所述的式I或II化合物可在无菌液体溶液中配制,优选地在生理上相容性缓冲液或溶液中,如生理盐水溶液、汉克氏溶液或林格氏溶液。还可在非水性溶液 (如丙三醇、丙二醇、乙醇、液体聚乙二醇、三乙酸甘油酯和蔬菜油) 中制备分散液。溶液还可含有防腐剂,如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。此外,本文所述的式I或II化合物可配制为固体形式 (包括例如冻干形式) 并且在使用之前再溶解或悬浮。

[0136] 在一些实施例中,可使用经粘膜、局部或经皮投与。在本文所述的式I或式II化合物的这类配制物中,使用适合于待渗透的阻挡层的渗透剂。这类渗透剂一般是本领域中已知的,并且包括例如用于经粘膜投与的胆盐和梭链孢酸衍生物。此外,清洁剂可被使用以有助于渗透。经粘膜投与例如可通过经鼻喷洒或栓剂 (经直肠或经阴道)。用于局部投与的本文所述的式I或式II化合物的组合物可通过选择本领域中已知的合适载剂而配制为油、乳膏、洗剂、软膏等。合适载剂包括蔬菜油或矿物油、白石蜡脂 (白软石蜡)、支链脂肪或油、动物脂肪和高分子量醇 (大于C₁₂)。在一些实施例中,载剂经选择使得活性成份溶解。还可包括乳化剂、稳定剂、保湿剂和抗氧化剂以及赋予颜色或香味的制剂 (如果需要)。优选地由矿物油、自乳化蜂蜡和水的混合物配制用于局部施用的乳膏,在该混合物中,掺合溶解于少量溶剂 (例如,油) 中的活性成份。此外,通过经皮投与意指可包含浸渍有活性成份和任选地本领域中已知的一种或多种载剂或稀释剂的经皮贴片或敷布如绷带。为了以经皮递送系统形式投与,在给药方案中,剂量投与将为连续而非间歇性。

[0137] 在一些实施例中,式I或II化合物或其组合物作为吸入剂投与。本文所述的式I或II化合物可配制为干粉或合适溶液、悬浮液或雾剂。可用本领域中已知合适添加剂配制粉末和溶液。举例来说,粉末可包括合适粉末基料如乳糖或淀粉,并且溶液可包含丙二醇、无菌水、乙醇、氯化钠和其它添加剂如酸、碱和缓冲盐。可通过经由喷雾器、泵、雾化器或喷洒器等的吸入而投与这类溶液或悬浮液。本文所述的式I或式II化合物还可与其它吸入疗法组合使用,例如皮质类固醇,如丙酸氟替卡松、倍氯米松二丙酸酯、曲安奈德、布地奈德和莫米松糠酸酯;β促进剂,如沙丁胺醇、沙美特罗和福莫特罗;抗胆碱剂药剂,如溴化异丙托铵或噻托铵;血管扩张剂如曲前列环素 (treprostinal) 和伊洛前列素;酶,如DNA酶;治疗性蛋白;免疫球蛋白抗体;寡核苷酸,如单或双链DNA或RNA、siRNA;抗生素,如托普霉素;蕈毒碱受体拮抗剂;白三烯拮抗剂;细胞因子拮抗剂;蛋白酶抑制剂;色甘酸钠;奈多罗米钠;和色甘酸钠。

[0138] 待投与的式I或II量可通过考虑因素如以下因素的标准程序确定:化合物活性 (活体外,例如,对于目标得化合物IC₅₀,或在动物疗效模型中的活体内活性)、动物模型中的药物代谢动力学结果 (例如生物半衰期或生物利用率)、受试者的年龄、身材、和体重以及与受试者

相关联的病症。这些和其它因素的重要性是本领域普通技术人员熟知的。通常,剂量将在经医治受试者的约0.01mg/kg到50mg/kg,还在约0.1mg/kg到20mg/kg的范围内。可使用多种剂量。

[0139] 本文所述的式I或II化合物还可与用于医治相同疾病的其它疗法组合使用。这类组合使用包括在不同时间投与式I或式II化合物和一种或多种其它治疗剂,或共同投与式I或式II化合物和一种或多种其它疗法。在一些实施例中,通过本领域普通技术人员熟知的方法,可针对本公开的化合物中的一种或多种或组合使用的其它治疗剂修改剂量,例如,减少关于单独使用的化合物或疗法的给药量。

[0140] 式I或II的化合物,或其医药学上可接受的盐、异构体、互变异构体或氘化形式可与用于医治相同疾病的如本文所描述的另一种化疗剂或药物或激酶抑制剂组合使用。这类组合可为固定剂量组合物或可在不同时间投与,或共同投与式I或II化合物和另一种药剂、药物或激酶抑制剂可同时或独立地。在一些实施例中,通过本领域普通技术人员熟知的方法,可针对本文所公开的式I或II化合物或组合使用的另一种药剂、药物或激酶抑制剂修改剂量,例如,减少或增加关于单独使用的化合物的给药量以改善安全性和/或效果。

[0141] 应理解,以组合方式使用包括与其它疗法、药物、医疗程序等一起使用,其中另一种疗法或程序可在不同时间(例如在短时间内,如在数小时内(例如1小时、2小时、3小时、4小时到24小时)投与,或与本文所述的式I或式II化合物相比,在更长时间(例如1天到2天、2天到4天、4天到7天、1周到4周)内投与,或与本文所述的式I或II化合物同时投与。以组合方式使用还包括与一次或不频繁地投与的疗法或医疗程序(如手术)以及在另一种疗法或程序之前或之后的短时内或更长时间内投与的本文所述的式I或式II化合物一起使用。在一些实施例中,本公开提供通过不同投与途径或通过相同投与途径递送的本文所述的式I或II化合物和一种或多种其它药物治疗剂的递送。针对任何途径的投与的以组合方式的使用包括在任何配制物中一起递送通过相同投与途径递送的本文所述的式I或式II化合物和一种或多种其它药物治疗剂,所述配制物包括其中两种化合物以使得在投与时所述两种化合物维持其治疗活性的方式化学键联的配制物。在一个方面中,另一种药物疗法可与本文所述的式I或式II化合物共同投与。通过共同投与的以组合方式的使用包括投与共同配制物或化学接合化合物的配制物,或在彼此相距短时间(例如在1小时、2小时、3小时,至多24小时内)内投与通过相同或不同途径投与的在独立配制物中的两种或更多种化合物。

[0142] 共同投与独立配制物包括通过经由一个装置(例如相同吸入性装置、相同注射器等)递送的共同投与,或由独立装置在彼此相距短时间内的投与。通过相同途径递送的本文所述的式I或II化合物和一种或多种附加药物疗法的共同配制物包括在一起使得可由一个装置投与的材料的制剂,包括组合在一个配制物中的独立化合物,或经改性使得其化学接合,但仍然维持其生物活性的化合物。这类化学接合化合物可具有基本上活体内维持的键,或键可活体内断裂从而分离两种活性组分。

[0143] VIII.参考文献

[0144] Agaram,N.P.等人,在未经伊马替尼治疗和耐伊马替尼的胃肠道间质瘤中的新颖V600E BRAF突变(Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors),《基因、染色体、癌症》,47,853-859(2008)。

[0145] Anforth RM,Blumetti TCMP,Kefford RF,Sharma R,Scolyer R a,Kossard S等人,达拉菲尼(GSK2118436)的皮肤表现:在患有转移性黑色素瘤的患者体内的突变BRAF的

选择性抑制剂(Cutaneous manifestations of dabrafenib (GSK2118436) :a selective inhibitor of mutant BRAF in patients with metastatic melanoma) ,《英国皮肤病学杂志(Br.J.Dermatol)》,2012年11月;167 (5) :1153-1160.

[0146] Badalian-Very, G.等人,在兰格汉氏细胞组织细胞增多病中的反复性BRAF突变(Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis) ,《血液(Blood)》,116,1919-1923 (2010) .

[0147] Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H等人,RAF抑制剂的临床效果需要在BRAF-突变黑色素瘤中的广泛靶向阻断(Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma) ,《自然(Nature)》,2010年9月30日;467 (7315) :596-599.

[0148] Brose, M.S.等人,在人类肺癌和黑色素瘤中的BRAF和RAS突变(BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma) ,《癌症研究(Cancer Res)》,62,6997-7000 (2002) .

[0149] Callahan MK, Rampal R, Harding JJ, Klimek VM, Chung YR, Merghoub T等人,RAS突变白血病在RAF抑制剂医治期间的发展(Progression of RAS-mutant leukemia during RAF inhibitor treatment) ,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》,2012年12月13日;367 (24) :2316-2321.

[0150] Chapman, M.A.等人,多发性骨髓瘤的初始基因组定序和分析(Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma) ,《自然》,471,467-472 (2011) .

[0151] 针对BRIM-3研究组的Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J等人,借助维罗非尼在具有BRAF V600E突变的黑色素瘤中的改善的存活期(Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation) ,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》,2011年6月30日;364 (26) :2507-2516.

[0152] Cohen, Y等人,在乳头状甲状腺癌中的BRAF突变(BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma) ,《国家癌症研究院杂志(J. Natl Cancer Inst)》,95,625-627 (2003) .

[0153] Colombino, M.等人,在来自南意大利的患者中的肝细胞癌中的BRAF基因和PIK3CA基因为体细胞突变(BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy) ,《细胞死亡与疾病(Cell Death Dis)》,3,e259 (2012) .

[0154] Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP等人,MAPK信号传递的EGFR-介导的重新激活有助于BRAF突变结直肠癌对借助维罗非尼的RAF抑制的不敏感性(EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib) ,《癌症发现(Cancer Discov)》,2012年3月;2 (3) :227-235.

[0155] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S等人,在人类癌症中的BRAF基因的突变(Mutations of the BRAF gene in human cancer) ,《自然》,2002年6月27日;417 (6892) :949-954.

[0156] Dias-Santagata, D.等人,BRAF V600E突变常见于多形态黄星形细胞瘤中:诊断和治疗性含义(BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma:

diagnostic and therapeutic implications),《科学公共图书馆综合卷 (PLoS ONE)》6, e17948 (2011) .

[0157] Flaherty KT,Puzanov I,Kim KB,Ribas A,McArthur GA,Sosman JA等人,在转移性黑色素瘤中的突变激活BRAF的抑制 (Inhibition of mutated,activated BRAF in metastatic melanoma),《新英格兰医学杂志》,2010年8月26日;363 (9) :809-819.

[0158] Fukushima,T.等人,在甲状腺的乳头状癌瘤中的BRAF突变 (BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid),《癌基因 (Oncogene)》,22,6455-6457 (2003) .

[0159] Hatzivassiliou G,Song K,Yen I,Brandhuber BJ,Anderson DJ,Alvarado R等人,RAF抑制剂起动野生型RAF激活MAPK通路和增强生长 (RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth),《自然》,自然出版集团 (Nature Publishing Group) ;2010年3月18日;464 (7287) :431-435.

[0160] Hauschild A,Grob J-J,Demidov L V,Jouary T,Gutzmer R,Millward M等人,在BRAF突变的转移性黑色素瘤中的达拉菲尼:多中心开放性标记、3相随机控制试验 (Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma:a multicentre,open-label,phase 3randomised controlled trial),《柳叶刀 (Lancet)》,埃尔塞维尔有限公司 (Elsevier Ltd) ;2012年7月28日;380 (9839) :358-365.

[0161] Heidorn SJ,Milagre C,Whittaker S,Nourry A,Niculescu-Duvas I,Dhomen N等人,激酶死亡的BRAF和致癌RAS通过CRAF协作驱动肿瘤发展 (Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF),《细胞》,埃尔塞维尔有限公司;2010年1月22日;140 (2) :209-221.

[0162] Huang V,Hepper D,Anadkat M,Cornelius L,与维罗非尼和BRAF通路的抑制相关联的皮肤毒性效果 (Cutaneous toxic effects associated with vemurafenib and inhibition of the BRAF pathway),《皮肤病学文献 (Arch.Dermatol)》,2012年5月;148 (5) :628-633.

[0163] Jones,D.T.等人,产生新颖致癌BRAF融合基因的串联复制限定大部分纤维状细胞星形细胞瘤 (Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas),《癌症研究》,68,8673-8677 (2008) .

[0164] Kimura,E.T.等人,BRAF突变在甲状腺癌中的高发生率:用于在乳头状甲状腺癌中的RET/PTC-RAS-BRAF信号传导路径的构成性激活的基因证据 (High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer:genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma),《癌症研究》,63,1454-1457 (2003) .

[0165] Lacouture ME,Desai a,Soltani K,Petronic-Rosic V,Laumann a E,Ratain MJ等人,在借助索拉非尼 (多靶点的酪氨酸激酶抑制剂) 治疗之后的光化角化病的炎症 (Inflammation of actinic keratoses subsequent to therapy with sorafenib,a multitargeted tyrosine-kinase inhibitor),《临床实验皮肤病学 (Clin.Exp.Dermatol)》,2006年11月;31 (6) :783-785.

[0166] Lee,S.H.等人,在胃癌中的BRAF和KRAS突变 (BRAF and KRAS mutations in

stomach cancer),《癌基因》22,6942-6945(2003).

[0167] Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H等人,黑色素瘤通过RTK或N-RAS上调获取对B-RAF (V600E) 抑制的抗性 (Melanomas acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation),《自然》,2010年12月16日;468 (7326):973-977.

[0168] Nikiforova, M.N.等人,在甲状腺肿瘤中的BRAF突变限于乳头状癌瘤和由乳头状癌瘤产生的退行性或不充分地差异化的癌瘤 (BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas),《临床内分泌与代谢杂志 (J.Clin.Endocrinol.Metab)》,88,5399-5404(2003).

[0169] Oberholzer P a, Kee D, Dziunycz P, Sucker A, Kamsukom N, Jones R等人,RAS突变与在用RAF抑制剂医治的患者中的皮肤鳞状细胞肿瘤的发展相关联 (RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors),《临床肿瘤学杂志 (J.Clin.Oncol)》,2012年1月20日;30 (3):316-321.

[0170] Pfister, S.等人,BRAF基因复制构成在低等级星形细胞瘤中的MAPK通路激活的机理 (BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas),《临床研究杂志 (J.Clin.Invest)》,118,1739-1749(2008).

[0171] Pollock, P. M等人,BRAF突变在痣中的高频率 (High frequency of BRAF mutations in nevi),《自然·遗传学 (Nature Genet)》,33,19-20(2003).

[0172] Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G等人,RAF抑制剂抗性由异常剪接的BRAF (V600E) 的二聚介导 (RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF (V600E)),《自然》,自然出版集团;2011年12月15日;480 (7377):387-390.

[0173] Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N, RAF抑制剂反式激活 (transactivate) 在具有野生型BRAF的细胞中的RAF二聚体和ERK信令 (RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF),《自然》,自然出版集团;2010年3月18日;464 (7287):427-430.

[0174] Prahallas A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D等人,结肠癌通过EGFR的反馈激活对BRAF (V600E) 抑制的无反应 (Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR),《自然》,2012年3月1日;483 (7387):100-103.

[0175] Rajagopalan, H.等人,致瘤作用:RAF/RAS癌基因和错配修复状态 (Tumorigenesis:RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status),《自然》,418,934 (2002).

[0176] Robert C, Arnault J-P, Mateus C.皮肤鳞状细胞癌的RAF抑制和诱导 (RAF inhibition and induction of cutaneous squamous cell carcinoma),《肿瘤学新见 (Curr.Opin.Oncol)》,2011年3月;23 (2):177-182.

[0177] Schindler, G.等人,BRAF V600E突变在1,320个神经系统肿瘤中的分析显示在多

形态黄星形细胞瘤、神经节胶质细胞瘤和小脑外毛细胞星形细胞瘤中的高突变频率 (Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma) ,《神经病理学报 (Acta Neuropathol)》,121, 397-405 (2011) .

[0178] Serrano C等人,在外周神经鞘肿瘤中的BRAF V600E和KRAS G12S突变 (BRAF V600E and KRAS G12S mutations in peripheral nerve sheath tumours) ,《组织病理学 (Histopathology)》,2013年2月;62 (3) :499-504.

[0179] Sievert,A.J.等人,通过基于高密度单核苷酸多态性的基因分型阵列检测的在小儿低等级星形细胞瘤中的7q34的复制引起新颖BRAF融合基因 (Duplication of 7q34 in pediatric low-grade astrocytomas detected by high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays results in a novel BRAF fusion gene) ,《脑病学 (Brain Pathol)》,19, 449-458 (2009) .

[0180] Singer,G.等人,在BRAF和KRAS中的突变表征低等级浆液性卵巢癌的发展 (Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma) ,《美国国立癌症研究所杂志》,95, 484-486 (2003) .

[0181] Sommerer,F.等人,在巴雷特氏腺癌的发展中的BRAF和KRAS2的突变 (Mutations of BRAF and KRAS2 in the development of Barrett's adenocarcinoma) ,《癌基因》23, 554-558 (2004) .

[0182] Sosman JA,Kim KB,Schuchter L,Gonzalez R,Pavlick AC,Weber JS等人,在用维罗非尼医治的BRAF V600突变的晚期黑色素瘤中的存活期 (Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib) ,《新英格兰医学杂志》,2012年2月23日;366 (8) :707-714.

[0183] Stellwagen JC,Adjabeng GM,Arnone MR,Dickerson SH,Han C,Hornberger KR等人,含有芳基磺酰胺头基的强效B-RafV600E抑制剂的开发 (Development of potent B-RafV600E inhibitors containing an arylsulfonamide headgroup) ,《生物有机化学与医药化学快报 (Bioorg.Med.Chem.Lett)》,埃尔塞维尔有限公司;2011年8月1日;21 (15) :4436-4440.

[0184] Straussman R,Morikawa T,Shee K,Barzily-Rokni M,Qian ZR,Du J等人,肿瘤微环境通过HGF分泌物引发对RAF抑制剂的先天性抗性 (Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion) ,《自然》,2012 487:500-504.

[0185] Su,F.,Viros,A.,Milagre,C.,Trunzer,K.,Bollag,G.,Spleiss,O.,Reis-Filho, J.S.等人, (2012) ,在用BRAF抑制剂医治的患者体内的皮肤鳞状细胞癌瘤中的RAS突变 (RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors) ,《新英格兰医学杂志 (The New England journal of medicine)》,366 (3) , 207-15.

[0186] Tannapfel,A.等人,在胆管癌中而非在肝细胞癌中的BRAF基因的突变 (Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma) ,

《胃肠病学 (Gut) 》52, 706-712 (2003) .

[0187] Tiacci, E. 等人, 在多毛细胞白血病中的BRAF突变 (BRAF mutations in hairy-cell leukemia) , 《新英格兰医学杂志》, 364, 2305-2315 (2011) .

[0188] Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R. 等人, (2008) , 具有强效抗黑色素瘤活性的致癌B-Raf激酶的选择性抑制剂的发现 (Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity) , 《美国国家科学院院刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 》, 105 (8) , 3041-6.

[0189] Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK等人, 对通过在黑色素瘤中的RAF激酶切换介导的BRAF抑制剂的所获取抗性可通过共靶向 (cotargeting) MEK和IGF-1R/PI3K来克服 (Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K) , 《癌细胞 (Cancer Cell) 》, 埃尔塞维尔公司 (Elsevier Inc.) ; 2010年12月14日; 18 (6) : 683-695.

[0190] Weber, A. 等人, 在头部和颈部的鳞状细胞癌中的BRAF基因的突变 (Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck) , 《癌基因》, 22, 4757-4759 (2003) .

[0191] Xu, X., Quiros, R.M., Gattuso, P., Ain, K.B. 和 Prinz, R.A. 在乳头状甲状腺癌瘤和甲状腺肿瘤细胞系中的BRAF基因突变的高发生率 (High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines) , 《癌症研究》, 63, 4561-4567 (2003) .

[0192] Zimmer L, Hillen U, Livingstone E, Lacouture ME, Busam K, Carvajal RD等人, 在经历选择性BRAF抑制的患有晚期黑色素瘤的患者中的非典型黑素细胞增殖和新原发性黑色素瘤 (Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition) , 《临床肿瘤学杂志》, 201230:2375-2383.

[0193] 实例

[0194] 下文描述与本公开有关的实例。在大多数情况下, 可以使用替代技术。实例旨在为说明性的并且不限制或限定本公开的范围。

[0195] 实例1: 与维罗非尼和达拉菲尼相比, 式I和式II化合物不激活在RAS突变细胞系中的pERK

[0196] 针对二氧磷基-ERK1/2 (T202/Y204, pERK) 的化合物诱导的改变, 相对于一组细胞系, 筛查化合物 (包括维罗非尼) 、式I化合物和式II化合物。对于每种化合物, pERK抑制与激活的不相联 (加倍的“ERK通路抑制指数”或“EPII”) 表述为在三个RAS突变细胞系 (鼠cuSCC细胞系B9、人类黑色素瘤细胞系IPC-298和人类结直肠癌细胞系HCT116, 表1) 中的化合物的平均pERK激活EC₅₀与在两种BRAF^{V600E}黑色素瘤细胞系 (A375和COL0829, 表1) 中的化合物的平均pERK抑制IC₅₀之间的比率。

[0197] 对于维罗非尼与达拉菲尼的EPII分别为11和4。在测试浓度 (表1与图1(B)) 下, 式I和式II化合物强力抑制在BRAF^{V600E}细胞中的pERK, 但是示出在RAS突变细胞系中基本上无

pERK激活。还在人类SCC细胞系A431和人类乳腺癌细胞系SKBR3中评估式II化合物,因为这些细胞通过馈给到RAS中的上行信号(分别通过EGFR和HER2的过表达)来实现MAPK通路激活。不同于维罗非尼,式II化合物不增加在这些细胞中的pERK水平。

[0198] 1.活体外研究和活体内研究

[0199] A.生物化学测试和激酶组选择性分布

[0200] 如由Tsai等人(2008年)描述的,通过测量生物素标记基质肽的磷酸化测定活体外RAF激酶活性。在1 μ M的浓度下相对于一组287激酶,测试式II,重复两次。抑制超过50%的激酶进行IC₅₀测定。287激酶表示激酶组系统发生树的所有主要分支。作为互补评判小组,根据合同,在英杰公司(Invitrogen)(美国威斯康星州的生命技术公司(Life Technologies, WI, USA))SelectScreenTM分析服务、迪斯科韦尔克斯公司(DiscoverX)(美国加利福尼亚州(CA, USA))KINOMEscanTM服务和Reaction生物公司(Reaction Biology Corporation)(美国宾夕法尼亚州(PA, USA))Kinase HotSpotSM服务处进行287激酶的抑制筛选。

[0201] B.细胞培养、pERK测试、生长抑制和EGFR信号传递测试

[0202] B9细胞系从Allan Balmain(美国加利福尼亚州旧金山的加利福尼亚大学(University of California, San Francisco, CA, USA))获得。SK-MEL-239细胞系和SK-MEL-239-C3细胞系从David Solit和Neal Rosen(美国纽约州纽约市的纪念斯隆-凯特琳癌症中心(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA))获得。IPC-298细胞系从DSMZ(德国不伦瑞克(Braunschweig, Germany))获得。所有其它细胞系从ATCC获得。化合物稀释在100%二甲亚砜(“DMSO”)中进行,并且这些滴定物在添加到细胞时在培养基中稀释500倍,所得为最终0.2%DMSO浓度。

[0203] 磷酸基-ERK AlphaScreen[®]测试:使用AlphaScreen[®]测试测定ERK磷酸化的程度,其中ERK1/2磷酸化在Thr202/Tyr204处的增加使得供体及受体AlphaScreen[®]珠粒极为接近,从而产生用于量化的信号。为了测定化合物医治对ERK1/2的磷酸化的效果,细胞涂覆在96孔的板中并且在裂解之前在37°C下用化合物的8-点滴定处理一小时。为了检测pERK,细胞裂解物与抗生蛋白链菌素-涂布的AlphaScreen[®]供体珠粒、抗小鼠IgG AlphaScreen[®]受体珠粒、生物素标记的抗ERK1/2兔抗体和小鼠抗体一起培育,并且小鼠抗体仅在ERK1/2在Thr202和Tyr204上磷酸化时识别ERK1/2。生物素标记的ERK1/2抗体结合到抗生蛋白链菌素-涂布的AlphaScreen[®]供体珠粒和ERK1/2(不论其磷酸化状态如何)两者,并且磷酸基-ERK1/2抗体结合到受体珠粒和在Thr202/Tyr204处磷酸化的ERK1/2。在Thr202/Tyr204处的ERK1/2磷酸化的增加使供体和受体AlphaScreen[®]珠粒极为接近,从而产生可在EnVision读数器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))上量化的信号。与DMSO控制相比,ERK磷酸化的抑制引起信号丢失。

[0204] 二氧磷基-ERK免疫印迹分析:通过标准技术执行蛋白质印迹并且在Odyssey红外扫描仪(Li-COR生物科学公司(Li-COR Biosciences))上分析。使用以下抗体:pERK1/2(T202/Y204)和ERK1/2(赛信通公司(Cell Signaling))。

[0205] 生长抑制测试:以3000细胞/孔的密度将细胞涂覆到96孔板中并且使其粘附过夜。化合物溶解于DMSO中,稀释3-倍,以形成8-点滴定物并且添加到细胞。在72小时培育之后,使用CellTiter-Glo[®](普洛麦格公司(Promega))检测细胞存活率。

[0206] 式II抑制分别以与在相同测试中同等水平维罗非尼IC₅₀(分别为0.33 μ M、0.69 μ M及

0.25 μ M) 的 IC_{50} 0.17 μ M、0.53 μ M 和 0.16 μ M 表达 $BRAF^{V600E}$ 的两种前述黑色素瘤细胞系 (A375 和 COL0829) 以及附加人类结直肠癌细胞系 COL0205 的活体外生长。

[0207]

表 1. 第一代 $BRAF$ 抑制剂与反常的阻断剂的活体外分布^a 的比较

化合物	生物化学 IC_{50} (M)		pERK 抑制 IC_{50} (M)		pERK 激活 EC_{50} (M) ^b		EPI ^c		
	$BRAF^{V600E}$	BRAF	CRAF	A375	COLO829	B9	IPC298	HCT116	
维罗非尼	0.031 (± 0.004)	0.1 (± 0.02)	0.048 (± 0.004)	0.032 (± 0.007)	0.041 (± 0.008)	0.36 (± 0.08)	0.54 (± 0.12)	0.34 (± 0.07)	11
式 I	0.0042 (± 0.0006)	0.14 (± 0.02)	0.091 (± 0.014)	0.016 (± 0.005)	0.018 (± 0.005)	>200	>200	>200	>10,000
式 II	0.0038 (± 0.0016)	0.014 (± 0.004)	0.023 (± 0.04)	0.0035 (± 0.012)	0.0021 (± 0.0012)	>200	>200	>200	>50,000
索拉非尼	0.35 (± 0.04)	0.072 (± 0.008)	0.011 (± 0.002)	4.4 (± 1.3)	2 (± 1.2)	0.025 (± 0.005)	0.019 (± 0.01)	0.086 (± 0.04)	0.01
达拉菲尼	0.0054 (± 0.0015)	0.0027 (± 0.001)	0.0015 (± 0.001)	0.001 (± 0.001)	0.005 (± 0.003)	0.01 ^d (± 0.005)	0.01 ^d (± 0.005)	0.003 (± 0.002)	~4

^a 细胞系的突变状态： A375、 $BRAF^{V600E}$ 、纯合； COLO829、 $BRAF^{V600E}$ 、杂合； B9、 $HRAS^{Q61L}$ ； IPC-298、 $NRAS^{Q61L}$ ； HCT116、 $KRAS^{G13D}$ 。每个值为多于 4 次实验的平均值。在括弧中的值表示标准误差。

^b EC_{50} ，与阳性对照相比增加 pERK 到 50% 的浓度，10 μ M PLX4720 (CAS No. 918505-84-7)。

^c ERK 通路抑制指数 (EPI)，在平均 pERK 激活 EC_{50} 与平均 pERK 抑制 IC_{50} 之间的比率。

^d 使用浓度-反应曲线的上升部分

[0208] 如图1(A)示出,式II(以圆圈填充;底部线)和维罗非尼(开放性圆;虚线的顶部线)示出具有同样的效价以阻断在人类BRAF^{V600E}黑色素瘤细胞COL0829中的pERK信号传递。

[0209] 图1(B)示出在RAS激活人类黑色素瘤细胞系IPC-298 (NRAS^{Q61L}) 中,维罗非尼(开放性圆圈)反常地激活MAPK信号传递,但是式II(以圆圈填充)导致可忽略的pERK增加。

[0210] 基于这些结果,式I和II化合物在治疗性浓度下预期不影响在正常组织中的MAPK通路(反常的激活或抑制)。使用 AlphaScreen® 测试生成pERK曲线。平均值±标准差,n=5,独立实验。

[0211] 实例2:式I化合物抑制在BRAFV600突变细胞中的MEK和ERK磷酸化并且呈现在NRAS突变细胞中的无反常的MAPK通路激活

[0212] MEK激酶和ERK激酶在生长细胞中的RAS/RAF下游起作用。它们的催化活性与在具体残基处的磷酸化密切相关。通过RAF激酶在丝氨酸217和221处磷酸化MEK,从而引起MEK酶活性增加。MEK随后在苏氨酸202和酪氨酸204处使ERK磷酸化,从而诱导ERK催化活性。表达在V600处突变的BRAF的细胞系呈现高水平的MEK和ERK磷酸化。第一代RAF抑制剂(例如达拉菲尼、维罗非尼)呈现剧烈抑制在BRAF-V600突变细胞中的MEK和ERK磷酸化和活性(Tsai 2008年, Bollag 2010年)。然而,这些抑制剂还呈现在表达突变RAS的细胞中的反常激活MEK和ERK或高水平的构成性活性生长因子接收器(Poulikakos 2010年, Hatzivassiliou 2010年)。这具体地关于在用维罗非尼医治的患者中的鳞状细胞癌的发展(Su 2012年)。据发现式I化合物作为保持抑制在BRAF-V600突变细胞中的MEK和ERK磷酸化的能力的“反常的阻断剂”化合物具有出人意料活性,而避免在RAS突变细胞中的通路的反常激活。本实例证明式I化合物的这些具体特性。

[0213] 为了测定式I化合物对在细胞中的ERK和MEK磷酸化的效果,已经建立使用 AlphaScreen® 技术的测试。在表达突变BRAF-V600的细胞(例如A375、COL0829、SK-MEL-3、HT-29)中,BRAF的构成性催化活性引起下游效应子ERK和MEK的磷酸化水平增加。BRAF-V600的抑制引起在这些细胞中的ERK和MEK磷酸化的抑制。在表达突变RAS的细胞(例如B9和IPC-298)中,借助第一代RAF抑制剂(例如维罗非尼)的医治引起ERK和MEK的磷酸化增加,但是式I不呈现此反常的激活。

[0214] 使用AlphaScreen® 技术,定量测量式I影响细胞中ERK和MEK的磷酸化的能力。在借助化合物医治之后,将细胞裂解,并且将裂解物的样品转移到测试板。裂解物与针对总ERK/MEK的抗体、识别在ERK/MEK上的特异性磷酸化位点的抗体、AlphaScreen® 抗小鼠 IgG受体珠粒和抗生蛋白链菌素供体珠粒混合。在用在680nm下的激光激发供体珠粒后,产生单态氧。此单态氧快速猝灭,除非AlphaScreen® 受体珠粒极为接近,在此情况下可在580nm下测量近似信号。在存在磷酸化的ERK/MEK的情况下,存在非常强近似信号。通过减少BRAF效应子ERK和MEK的磷酸化,BRAF-V600抑制剂影响在表达BRAF-V600E的细胞(例如A375)中的此近似信号的减少。此外,与维罗非尼相比,式I不呈现在表达突变RAS的细胞(例如B9和IPC-298)中的近似信号的增加。

[0215] 1.材料和方法

[0216] A.试剂

[0217] 1.细胞系

- [0218] A375黑色素瘤,表达纯合BRAF-V600E ATCC® CRL-1619™
- [0219] COL0829黑色素瘤,表达杂合BRAF-V600E ATCC® CRL-1974™
- [0220] HT-29结直肠腺癌,表达杂合BRAF-V600E ATCC® HTB-38™
- [0221] SK-MEL-3黑色素瘤,表达杂合BRAF-V600E ATCC® HTB-69™
- [0222] B9鳞状细胞癌,表达HRAS-Q61L,从Allan Balmain博士(旧金山加利福尼亚大学(University of California, San Francisco))接收
- [0223] IPC-298黑色素瘤,表达NRAS-Q61L DSMZ#ACC 251
- [0224] A431鳞状细胞癌,表达高水平的EGFR,野生型BRAF和RAS ATCC® CRL-1555™
- [0225] HCT116结直肠癌,表达高水平的EGFR、KRAS-G13D、野生型BRAF ATCC® CCL-247™
- [0226] 2.细胞培养基
- [0227] A375和A431杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM), ATCC#30-2002; 10%胎牛血清,英杰公司#10438-026; 1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122
- [0228] B9杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM),英杰公司#10313-039; 10%胎牛血清,英杰公司#10438-026; 1%L-谷氨酰胺,英杰公司#25030-081; 1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122
- [0229] COL0829和IPC-298RPMI培养基1640,英杰公司#11875-119; 10%胎牛血清,英杰公司#10438-026; 1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122
- [0230] SK-MEL-3麦考伊氏(McCoy's)5A(改性的)培养基,英杰公司#16600-108; 15%胎牛血清,英杰公司#10438-026; 1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122
- [0231] HCT116和HT-29麦考伊氏5A(改性的)培养基,英杰公司#16600-108; 10%胎牛血清,英杰公司#10438-026; 1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122
- [0232] 3.缓冲液
- [0233] 细胞分解缓冲液(10×),赛信通技术公司(Cell Signaling Technology) #9803,在使用之前用H₂O稀释到1×
- [0234] AlphaLISA免疫分析缓冲液(10×),珀金埃尔默公司#AL000F,在使用之前用H₂O稀释到1×
- [0235] 4.抗体
- [0236] p44/42MAPK (Erk1/2) (137F5) 兔(生物素标记的)供体抗体,赛信通技术公司#5013最终浓度=1.25nM
- [0237] 二氧磷基-p44/42MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) 小鼠受体抗体,赛信通技术公司#9106最终浓度=0.17nM
- [0238] 二氧磷基-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) 兔(生物素标记的)供体抗体,赛信通技术公司#3958最终浓度=0.625nM
- [0239] MEK1/2 (L38C12) 小鼠受体抗体,赛信通技术公司#4694,最终浓度=0.05nM
- [0240] 5.检测试剂
- [0241] AlphaScreen® 小鼠 IgG检测试剂盒,10,000测试点,珀金埃尔默公司#6760606M,最终浓度=20μg/mL

[0242] B.方法

[0243] 1. 在测试之前一天,50,000个细胞以50 μ L体积涂覆在96孔组织-培养基-处理板(康宁(Corning) #3610)的每个孔中。细胞在37°C下培育过夜。

[0244] 2. 化合物以DMSO稀释到500X最终浓度。使用在DMSO中的1:3稀释液,将每个化合物涂覆为8-点滴定物。最大浓度为约5mM。

[0245] 3. 1 μ L的化合物添加到96孔聚丙烯板(康宁#3363)的每个孔。对于A375、COL0829、SK-MEL-3、HCT116和HT-29,高对照为DMSO,而低对照为10 μ m PLX4720 (CAS No. 918505-84-7)。对于B9和IPC-298,高对照为3.33 μ M PLX4720,而低对照为DMSO。

[0246] 4. 将249 μ L生长介质添加到化合物,将其稀释250倍。

[0247] 5. 50 μ L的稀释化合物转移到50 μ L细胞中,用于500倍最终化合物稀释度(最大浓度通常为10 μ m)。化合物与细胞一起在37°C下培育一小时。

[0248] 6. 抽吸培养基,并且细胞以50 μ L的冰冷1×细胞分解缓冲液裂解。板在冰上培育5分钟以使细胞完全裂解。

[0249] 7. 制备生物素标记的供体抗体、受体抗体及抗小鼠 IgG AlphaScreen®受体珠粒在1×AlphaLISA免疫分析缓冲液中的混合物。

[0250] 8. 5 μ L裂解物转移到384孔测试板(珀金埃尔默公司#6005359)。添加5 μ L抗体和受体珠粒混合物。板经旋转。

[0251] ERK/MEK磷酸化和生长测试产生足够的数据以测定式I为在SK-MEL-239亲代和耐维罗非尼C3细胞系中的BRAF-V600E的强抑制剂。具体地说,图2(A)到图2(F)显示,与维罗非尼相比,式I不增加在RAS突变细胞系中pERK和pMEK水平。

[0252] 实例3:通过式I抑制各种BRAF V600突变蛋白

[0253] BRAF蛋白在普莱克西康公司(Plexxikon Inc.)处在昆虫细胞中产生,作为包含激酶结构域的N-端His-标记片段。使用编码含有V600A、V600G或V600M突变的BRAF(S432-R726)的构建体和含有V600E、V600K或V600R突变的构建体BRAF(D448-K723)。

[0254] BRAF

[0255] BRAF(在N端与GST标记耦合的残基L416到H766)在昆虫细胞中产生,并且BRAF购自密理博公司(Millipore)(产品目录#14-530)。

[0256] CRAF

[0257] CRAF(含有激活模拟Y340/341的双磷酸化的替代物的Y340D和Y341D的残基Q307到F648)在N端与GST标记耦合并且在昆虫细胞中产生,并且CRAF购自密理博公司(产品目录#14-352)。

[0258] 生物素标记的-MEK1

[0259] MEK1(含有激酶停用突变K97A的在N端与GST标记耦合且在C端与16氨基酸生物素化标记耦合的残基M1到V393)在普莱克西康公司处在大肠杆菌(E.coli)中产生。

[0260] 激酶缓冲液:

[0261] 50mM HEPES, pH 7.5, 50mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM DTT 0.01%NP-40

[0262] 停止/检测缓冲液:

[0263] 50mM HEPES, pH 7.5, 100mM EDTA, 0.02% BSA抗磷酸基-MEK1(赛信通技术公司(Cell Signal Technologies) #9121), AlphaScreen™供体和受体珠粒(珀金埃尔默公司

(Perkin-Elmer) #6760617)

[0264] 1.方法

[0265] 1) 在DMSO中的测试化合物连续稀释并且涂覆到处于1微升/孔的384孔测试板中。

[0266] 2) 在激酶缓冲液中添加15微升/孔的RAF酶和生物素标记的MEK1基质。

[0267] 3) 在激酶缓冲液中添加4μL的ATP (500μM)。

[0268] 4) 最终DMSO为约5%；RAF酶和MEK1的浓度在下表2中列出用于每个测试。在这些条件下,酶用基质饱和;ATP在100μM下。

[0269] 表2

测试	激酶 (nM)	基质 (nM)
BRAF_V600E	0.015	15
BRAF_V600A	0.56	28
BRAF_V600G	0.40	20
BRAF_V600K	0.21	21
BRAF_V600M	0.56	28
BRAF_V600R	0.4	20
BRAF	0.26	26
CRAF	0.15	15

[0271] 5) 在短暂离心之后,板在约室温下培育40分钟到50分钟。

[0272] 6) 在最终EDTA 20mM下添加5μL停止缓冲液;抗磷酸基-MEK1 1:2,500;供体/受体珠粒3μg/mL。

[0273] 7) 在短暂离心之后,板在室温下培育约3小时。

[0274] 8) 板在Envision多标记板读数器(珀金埃尔默公司)上读数。

[0275] IC₅₀值示出在下表3中。

[0276] 2.结果

[0277] 式I对V600E和所有其它测试的非V600E突变BRAF蛋白施加强效抑制(表3)。其还抑制野生型BRAF和激活的CRAF的激酶活性(表3)。

[0278] 表3:相对于不同形式的RAF激酶的生物化学IC₅₀

激酶	式 I IC ₅₀ (μM)
BRAF	0.0143
CRAF	0.0226
BRAF_V600E	0.0044
BRAF_V600A	0.0142
BRAF_V600G	0.0063
BRAF_V600K	0.0039
BRAF_V600M	0.0098
BRAF_V600R	0.0035

[0280] 实例4:式I化合物在表达野生型BRAF的细胞系、BRAFV600E和BRAFV600K细胞(IC₅₀, μM)细胞系中的效价

[0281] 在存在或不存在BRAF野生型等位基因下,通过式I化合物选择性抑制驱使肿瘤细

胞增殖的BRAFV600E在具有突变BRAF基因的一组细胞中测量。还包括BRAFV600E突变细胞系,其相对地耐维罗非尼抑制。为了显示通过式I化合物经由抑制激活的BRAF蛋白质的选择性作用机理,包括缺乏BRAF突变并且由KRAS突变或替代癌基因转化的肿瘤细胞。总体而言,式I化合物为具有突变激活BRAF蛋白(V600E)的细胞系的生长的强效和选择性抑制剂。式I化合物还抑制耐维罗非尼抑制的细胞(HT-29)。化学式I的选择性证实为具有突变KRAS等位基因或其它非BRAF V600E突变路径的细胞的增殖不受影响。

[0282] 为了测定式I对增殖的效果,使用各自表达BRAFV600E突变的黑色素瘤细胞(A375和COL0829)和结直肠癌细胞(COL0205、HT-29)建立生长测试。为了示出相对于野生型BRAF的选择性,还在生长测试中检测若干BRAF野生型细胞系(K562、NOMO-1、mV-4-11和ML-2)。生长测试实施Promega CellTiter-Glo发光细胞存活率测试(Promega CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay),其给出与存在于细胞样品的ATP量成比例的发光读数。因为ATP水平与活细胞数量直接相关,所以发光信号可用于测定式I阻断相关细胞系增殖的效价。

[0283] 1.材料和方法

[0284] A.试剂

[0285] 1.细胞系

[0286] A375黑色素瘤,表达纯合BRAFV600E; ATCC®CRL-1619™

[0287] COL0829黑色素瘤,表达杂合BRAFV600E; ATCC®CRL-1974™

[0288] COL0205结直肠腺癌,表达杂合BRAFV600E; ATCC®CCL-222™

[0289] HT-29结直肠腺癌,表达杂合BRAFV600E; ATCC®HTB-38™

[0290] K562慢性骨髓性白血病(CML),表达Philadelphia染色体,创建BCR-ABL的9;22染色体定位转移。其还表达野生型BRAF和KRAS; ATCC®CCL-243™

[0291] ML-2急性骨髓单核细胞性白血病,表达激活的KRAS-A146T和野生型BRAF; DSMZ#ACC 15

[0292] MV-4-11双表型B骨髓单核细胞性白血病,表达FLT-3ITD、野生型BRAF和野生型KRAS; ATCC®CRL-9591™

[0293] NOMO-1急性骨髓白血病,表达激活的KRAS-G13D,和野生型BRAF; DSMZ#ACC542

[0294] SK-MEL-3黑色素瘤,表达杂合BRAF-V600E; ATCC®HTB-69™

[0295] 2.细胞培养基

[0296] A375和COL0829杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM),ATCC#30-2002;10%胎牛血清,英杰公司#10438-026;1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122

[0297] COL0205和NOMO-1和ML-2 RPMI培养基1640,英杰公司#11875-119;10%胎牛血清,英杰公司#10438-026;1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122

[0298] HT-29麦考伊氏5A(改性的)培养基,英杰公司#16600-108;10%胎牛血清,英杰公司#10438-026;1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122

[0299] K562和MV-4-11伊思考夫改良杜尔贝可培养基(IMDM),英杰公司#16600-108;10%胎牛血清,英杰公司#10438-026;1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122

[0300] SK-MEL-3麦考伊氏5A(改性的)培养基,英杰公司#16600-108;15%胎牛血清,英杰

公司#10438-026;1%青霉素-链霉素,英杰公司#15140-122

[0301] 3. 培养板

[0302] Corning® 96孔透明V型底聚丙烯未经处理的微板,25个/包,无盖子,未灭菌(产品#3363)

[0303] Corning® 96孔平坦透明底部白色经聚苯乙烯TC-处理的微量培养板,单独包装,具有盖子,无菌(产品#3610)

[0304] 4. 检测试剂

[0305] CellTiter-Glo®发光细胞存活率测试,普洛麦格公司#G7573

[0306] B. 方法

[0307] 1. 对于细胞系A375、COL0205、COL0829、HT-29和SK-MEL-3,3,000个细胞涂覆在每个孔中。对于细胞系K562、ML-2、MV-4-11和NOMO-1,25,000个细胞以50μL体积涂覆在96孔经组织培养基处理的板(康宁#3610)的每个孔中。细胞在37°C下培育过夜。

[0308] 2. 使用在DMSO中的1:3稀释液,将每种测试化合物涂覆为8-点滴定物。最大浓度为约5mM。在生长培养基中1:250稀释DMSO和式I的测试化合物。

[0309] 3. 将50μL的经稀释化合物转移到50μL细胞中,用于500倍最终化合物稀释度(最大浓度通常为10μM并且DMSO浓度为0.2%)。在37°C下,细胞与DMSO/化合物在5%CO2中一起培育3天。

[0310] 4. 根据产品手册中的指导,使细胞Titer-Glo发光测试试剂到室温并且重建。还使细胞培养物到室温约20分钟到30分钟。将25μL体积的重建Cell Titer-Glo试剂添加到细胞,并且混合物在室温下培育约10分钟以确保细胞裂解。

[0311] 5. 在Tecan Safire板读数器上测量发光。

[0312] 2. 结果

[0313] 结果概括于下表4中。

[0314] 表4

细胞系	源肿瘤	BRAF (基因型)	RAS (基因型)	式 I (IC ₅₀ 以 μM 为单位)
K562	慢性骨髓白血病	WT	WT	> 10
ML-2	急性骨髓单核细胞性白血病	WT	KRAS-A146T	> 10
MV-4-11	双表型 B 骨髓单核细胞性白血病	WT	WT	> 10
NOMO-1	急性骨髓白血病	WT	KRAS-G13D	> 10
A375	黑色素瘤	V600E	WT	0.05
Colo205	结直肠腺癌	V600E/WT	WT	0.01
Colo829	黑色素瘤	V600E/WT	WT	0.1
HT-29	结直肠腺癌	V600E/WT	WT	0.84

[0316] 式I化合物为在杂合(COL0205、COL0829、HT-29)和纯合BRAFV600E(A375)表达细胞系中的强抑制剂。具体地说,以上结果显示,式I抑制表达BRAFV600E的两种黑色素瘤细胞系(A375和COL0829)以及附加结直肠癌细胞系COL0205和HT29的活体外生长。式I的选择性通过在BRAF野生型细胞系K562、ML-2、NOMO-1和MV-4-11中的抑制缺乏来明确地显示。

[0317] 实例5:在存在PLX4720的情况下,稳定地表达KIAA1549-BRAF融合的NIH/3T3细胞显示加速的肿瘤生长,而式I抑制BRAF融合异种移植物的生长

[0318] 将稳定表达KIAA1549-BRAF融合(融合-1、融合-2、融合-3和融合-4)的NIH/3T3(ATCC®CRL-1658™)细胞注射到balb/c nu/nu小鼠的侧腹中。用卡尺测量肿瘤生长。使用下式计算椭圆形肿瘤体积:体积=1/2 · 长度 · 宽度²。

[0319] 在注射到用PLX4720 (CAS No. 918505-84-7; PLX4720可如描述于Tsai等人(2008年)中合成)普通食物给药的免疫缺陷balb/c nu/nu小鼠的侧腹中时,表达四种KIAA1549-BRAF融合中的三种的NIH/3T3细胞显示活体内抗性和增加的肿瘤生长。式I化合物抑制所有三种异种移植物(表达四种KIAA1549-BRAF融合中的三种的NIH/3T3细胞)的生长达到50%或更多(图3;y轴表示以立方毫米为单位的肿瘤体积;x轴,自注射起的天数)。这些数据表明,式I化合物可成功地靶向表征小儿星形细胞瘤的KIAA1549-BRAF融合并且提供对于将此化合物应用在BRAF-融合介导的癌症中的支持。

[0320] 实例6:用于式I和式II的化合物的合成实例

[0321] 来自商业来源的所有溶剂和试剂原样使用。起始材料购自商业来源或根据报道在文献中的方法制备。涉及空气或对湿气敏感的试剂的反应在氮气氛围下进行。在氘化溶剂中,用配备有Oxford AS400磁体的Agilent 400MHz MR DD2光谱仪系统记录NMR光谱。化学位移表述为 δ 单位并且参考残留¹H溶剂信号。所有耦合常数(J)以赫兹为单位报告(s=单峰,d=二重峰,t=三重峰,q=四重峰,m=多重峰,br=广泛波峰,dd=二重峰中的二重峰,ddd=二重峰中的二重峰的二重峰,dm=多重峰中的二重峰)。质谱分析纯度用联接到以反向模式操作的岛津20A HPLC系统的岛津LCMS-2020光谱仪测量。对于最终化合物,分析纯度大于95%并且使用以下高效液相层析(“HPLC”)方法测定:缓冲液A:5%乙腈,95%水,0.01%甲酸,缓冲液B:95%乙腈,5%水,0.01%甲酸,SiliaChrom XDB C18,5μm,2.1mm x 50mm,5%到95%的B在6分钟内,1.0ml/min,220nm和254nm,ESI阳性,300amu到800amu。

[0322] 合成2,6-二氟-3-硝基苯甲酰氯.2,6-二氟-3-硝基苯甲酸(200g,0.985mol)添加到亚硫酰二氯(737mL,10.2mol)并且反应在80°C下搅拌16小时,并且然后使其冷却到室温。在减压下去除挥发物并且所得油溶解于甲苯中。在减压下去除甲苯。添加并且去除甲苯重复若干次以提供作为油的标题化合物,其直接地在下一步骤中使用(218g)。

[0323] 合成(2,6-二氟-3-硝基苯基)(5-碘-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)甲酮。使在硝基甲烷(1640mL)中的5-碘-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(160g,0.656mol)和氯化铝(525g,3.94mol)在室温下搅拌1小时。然后,添加在硝基甲烷(1640mL)中的2,6-二氟-3-硝基苯甲酰氯(218g,0.985mmol)并且混合物在50°C下加热4天。冷却到0°C后,用逐滴添加甲醇(1.5L)淬灭反应,从而产生沉淀。混合物用水(2L)稀释并且过滤。粗产物用甲基叔丁基醚湿润并且过滤以得到呈褐色固体的标题化合物,其直接用于下一步骤(281g)。

[0324] 合成(3-氨基-2,6-二氟苯基)(5-碘-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)甲酮。在60°C加热时,向在乙酸乙酯(10.9L)和四氢呋喃(10.9L)中的(2,6-二氟-3-硝基苯基)(5-碘-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)甲酮(281g,656mmol)逐部分地添加氯化锡(II)二水合物(517g,2.72mol)。反应混合物保持在此温度下过夜。在冷却到室温之后,反应混合物用50%饱和水溶液碳酸氢钠(1:1水和饱和水溶液碳酸氢钠)淬灭并且通过硅藻土过滤,用乙酸乙酯洗涤滤饼。分离各层并且用盐水洗涤有机层,并且然后在减压下浓缩以得到粗产物,其用甲基叔

丁基醚湿磨并且过滤以得到呈褐色固体的标题化合物(216g,541mmol,83%产率,约85%纯度)。

[0325] 合成(3-氨基-2,6-二氟苯基)(5-(2-环丙基嘧啶-5-基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)甲酮。在二恶烷(930mL)和水(465mL)中的(3-氨基-2,6-二氟苯基)(5-碘-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)甲酮(93g,233mmol)、2-环丙基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼戊-2-基)嘧啶(229g,466mmol,约50%纯度)、碳酸钾(97g,700mmol)和[1,1'-双(二苯膦基)二茂铁]二氯钯(II)(19.0g,23.3mmol)的混合物在100℃下加热若干小时。在冷却后,反应混合物用水稀释并且用四氢呋喃和乙酸乙酯的混合物萃取。有机层经分离并且在减压下浓缩以得到粗产物,其用二氯甲烷/甲基叔丁基醚湿磨并且过滤,用甲基叔丁基醚洗涤以得到呈褐色固体的标题化合物(71g,78%产率)。

[0326] 合成5-(2-环丙基嘧啶-5-基)-3-[[乙基(甲基)胺磺酰基]氨基]-2,6-二氟-苯甲酰基]-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(式II)。向在吡啶(1375mL)中的(3-氨基-2,6-二氟苯基)(5-(2-环丙基嘧啶-5-基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)甲酮(53.8g,138mmol)中添加乙基(甲基)氨基磺酰氯(65.0g,412mmol)并且反应在65℃下加热过夜。在减压下去除挥发物并且残基分隔在水和乙酸乙酯/四氢呋喃之间。有机层在减压下浓缩以得到干燥的粗产物,其装载到硅胶上并且通过用0%到10%甲醇/二氯甲烷溶离、然后(1×)乙酸乙酯洗提的硅胶管柱色谱(2X)来纯化。将含有所需产物的洗脱份合并,并在减压下浓缩。所得固体用甲基叔丁基醚湿磨并且过滤以得到呈白色固体的标题化合物(21g)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)13.07(br s,1H),9.71(br s,1H),9.03(s,2H),8.76(s,1H),8.68(s,1H),8.19(s,1H),7.59(ddd,J=5.9Hz,9.0Hz,9.0Hz,1H),7.27(dd,J=9.0Hz,9.0Hz,1H),3.12(q,J=7.0Hz,2H),2.74(s,3H),2.29(m,1H),1.09(m,4H),0.95(t,J=7.0Hz,3H)。LC/MS(ESI+)m/z:513.3(M+H⁺)。

[0327] 合成(3R)-N-[3-[5-(2-环丙基嘧啶-5-基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-羰基]-2,4-二氟-苯基]-3-氟-吡咯烷-1-磺酰胺(式I)。此材料以类似于式II的方式使用代替乙基(甲基)氨基磺酰氯的(3R)-3-氟吡咯烷-1-磺酰氯制备。通过反相HPLC纯化产物以在冻干之后提供呈白色固体的标题化合物。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)13.05(br s,1H),9.84(br s,1H),9.01(s,2H),8.73(s,1H),8.67(s,1H),8.15(s,1H),7.62(ddd,J=5.9Hz,9.0Hz,9.0Hz,1H),7.26(dd,J=9.0Hz,9.0Hz,1H),5.29(dm,J=51.6Hz(H-F),1H),3.43(dm,2H),3.33(m,2H),2.27(m,1H),2.04(m,2H),1.06(m,4H)。LC/MS(ESI+)m/z:542.9(M+H⁺)。

[0328] 在说明书中引用的所有专利和其它参考文献指示本公开所属领域的技术人员的技能的水平,并且以全文(包括任何表和图)引用的方式并入,达到如同每个参考文献已经单独地以全文引用的方式并入本文中的相同程度。

[0329] 本领域技术人员将易于理解,本公开很好适于获得提到的目的和优点,以及其中内在的那些目的和优点。本文所述的如目前代表优选实施例的方法、变化和组合物是例示性的并且预期不为对本公开的范围的限制。本领域的技术人员将想到其中的改变和其它用途,所述改变和其它用途涵盖在本公开的主旨内并且由所附权利要求书的范围限定。

[0330] 可以适合地在不存在本文未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下实践本文说明性地描述的公开内容。因此,例如,在本文中的每一种情况下,术语“包含”、“主要由…组成”和“由…组成”中的任一个可由其它两个术语中的任一个替换。因此,

对于使用术语中的一个的本公开的实施例,本公开还包括其中这些术语中的一个用这些的术语中的另一个替换的另一实施例。在每个实施例中,术语具有其已确立的含义。因此,例如,一个实施例可包涵方法“包含”一系列步骤,另一个实施例将包涵方法“主要由相同步骤组成”,并且第三实施例将包涵方法“由相同步骤组成”。所采用的术语和表达用作描述而非限制的术语,并且在这类术语和表达的使用中不意欲排除所示出和描述的任何等效特征或其部分,但应认识到在所要求的本公开的范围内的各种修改是可能的。因此,应理解,虽然已通过优选实施例和任选的特征具体地公开本公开,但本文中所公开概念的修改和变化可由本领域的技术人员采用,且认为这类修改和变化在如由所附权利要求书界定的本公开的范围内。

[0331] 此外,在根据Markush组或替代方式的其它分组描述本公开的特征或方面的情况下,本领域的技术人员将认识到,还进而根据Markush组或其它组的构件的任何单独构件或小组描述本公开。

[0332] 另外,除非相反地指示,否则在各种数值提供用于实施例的情况下,附加实施例通过采用任何2个不同值作为范围的端点来描述。这类范围也在所描述的本公开的范围内。

[0333] 因此,附加实施例在本公开的范围内并且在以下权利要求的内。

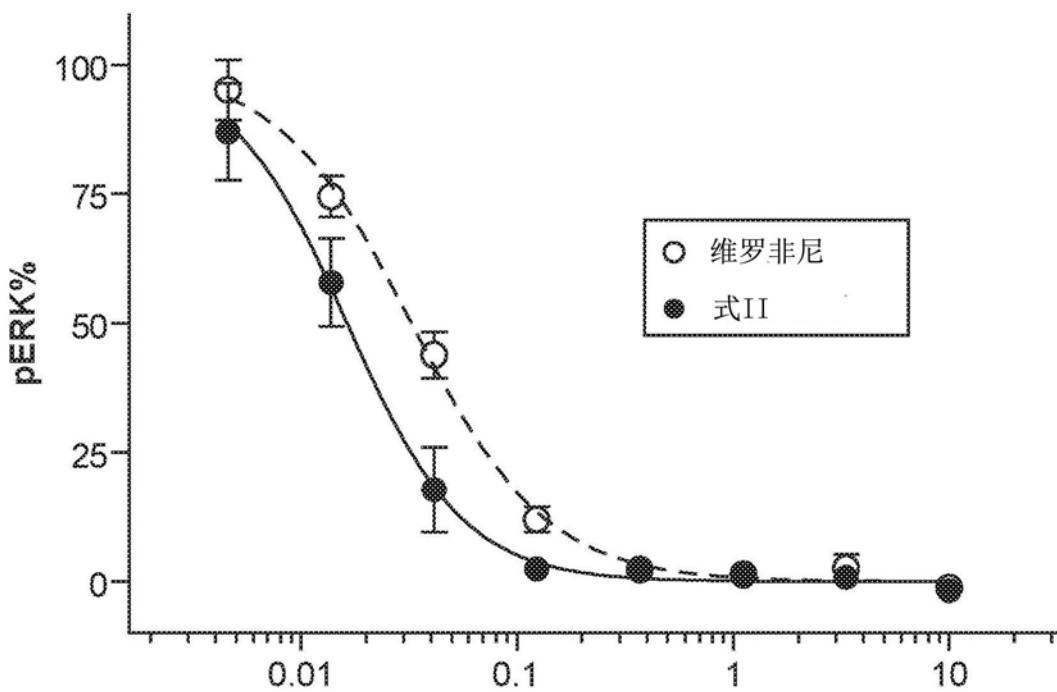


图1A

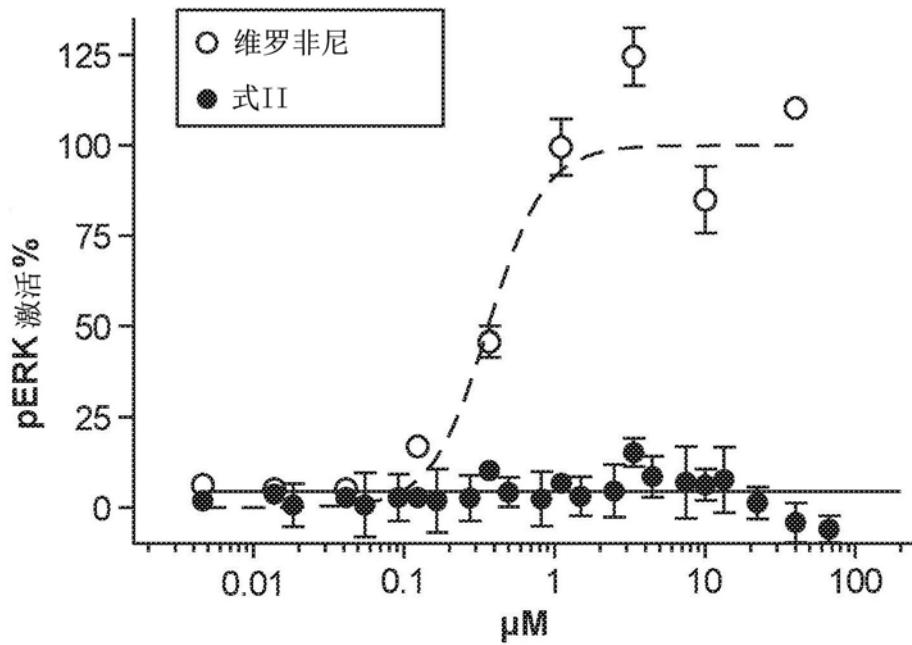


图1B

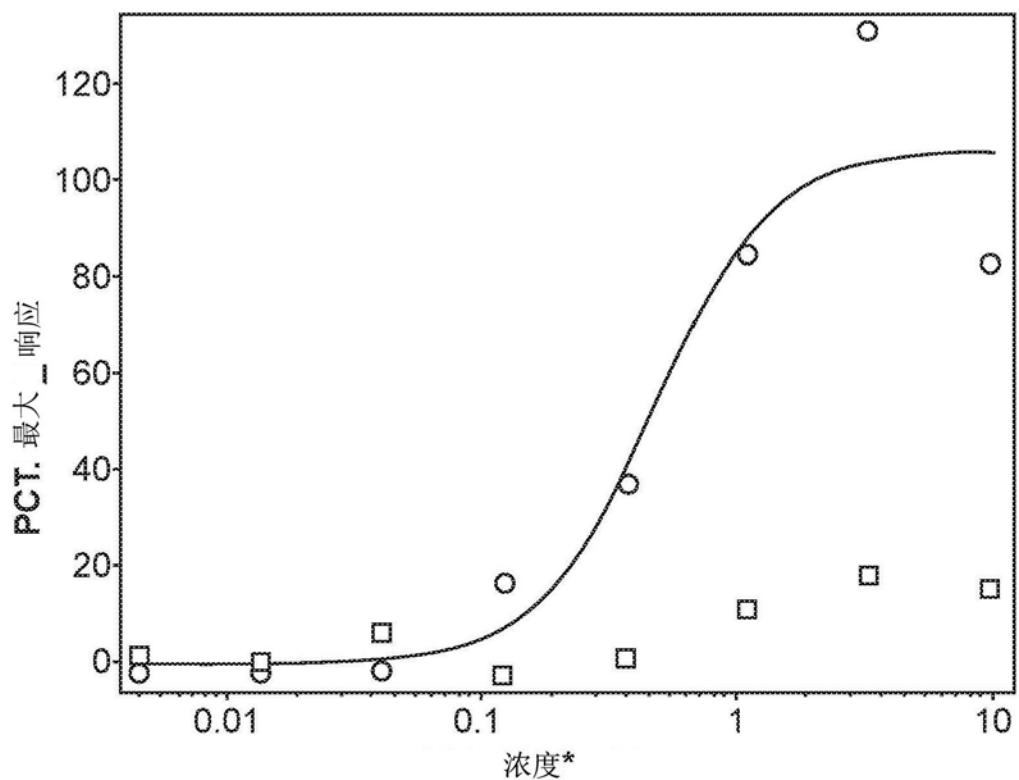


图2A

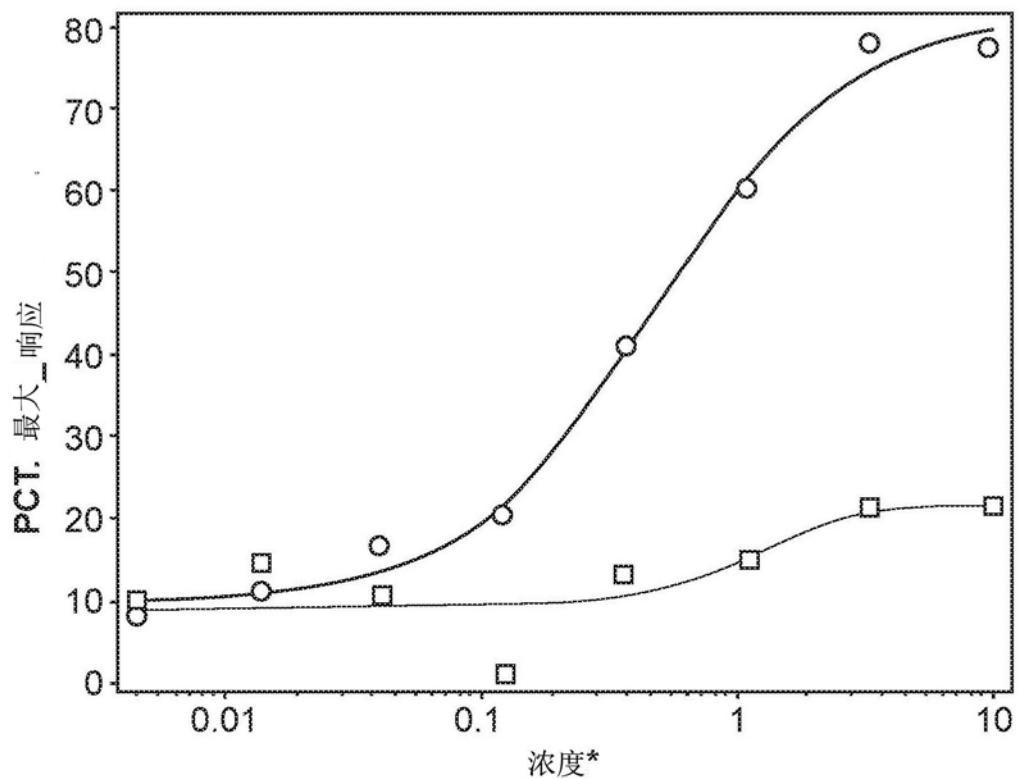


图2B

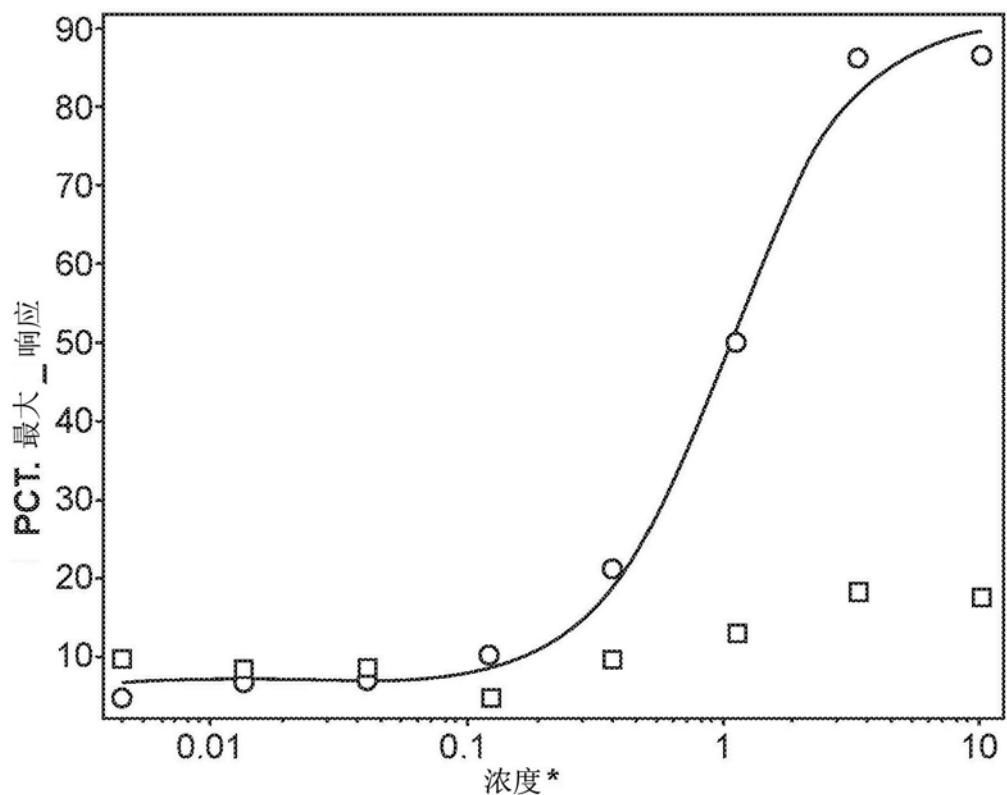


图2C

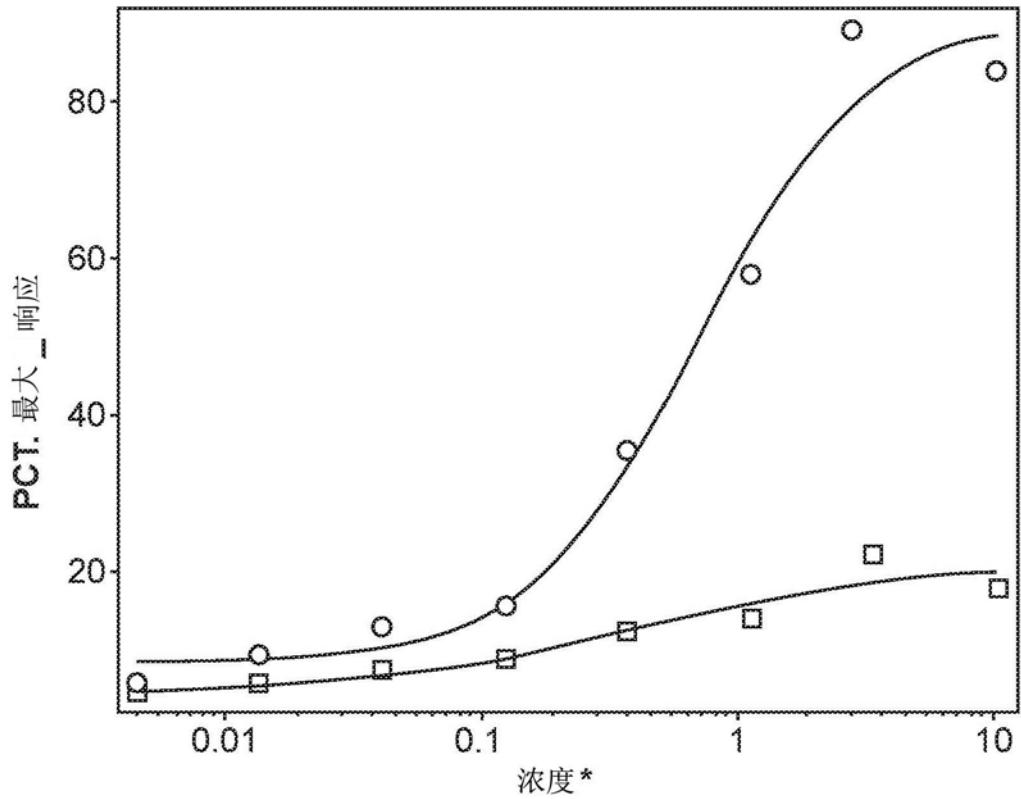


图2D

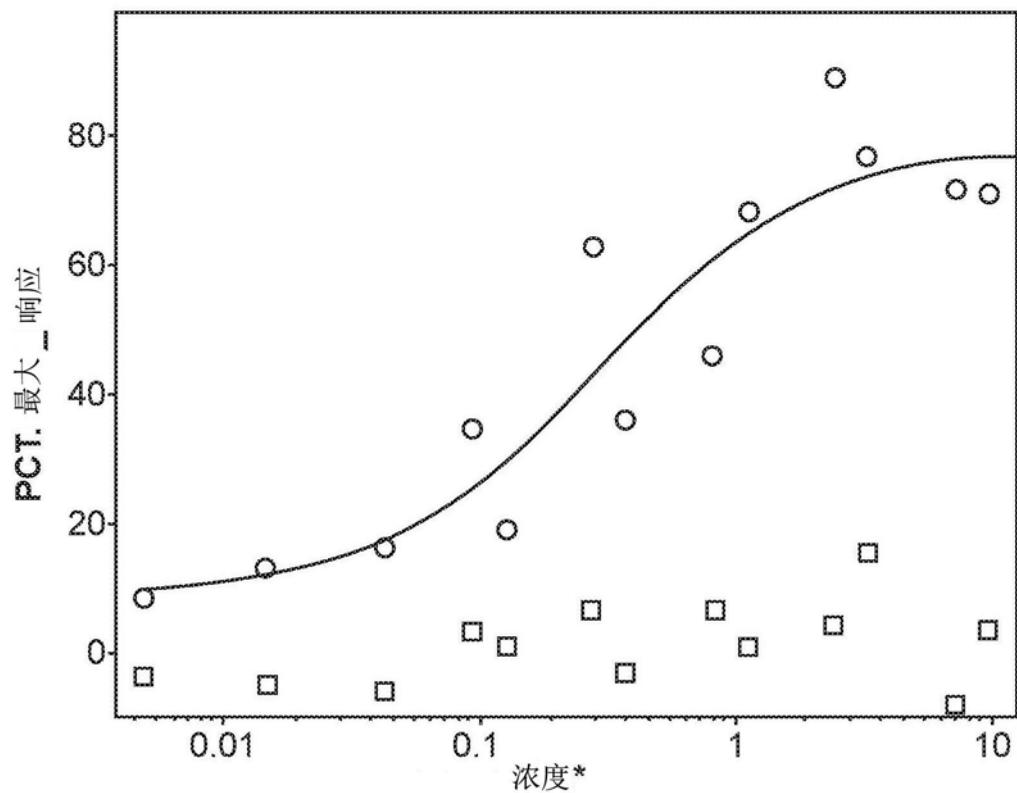


图2E

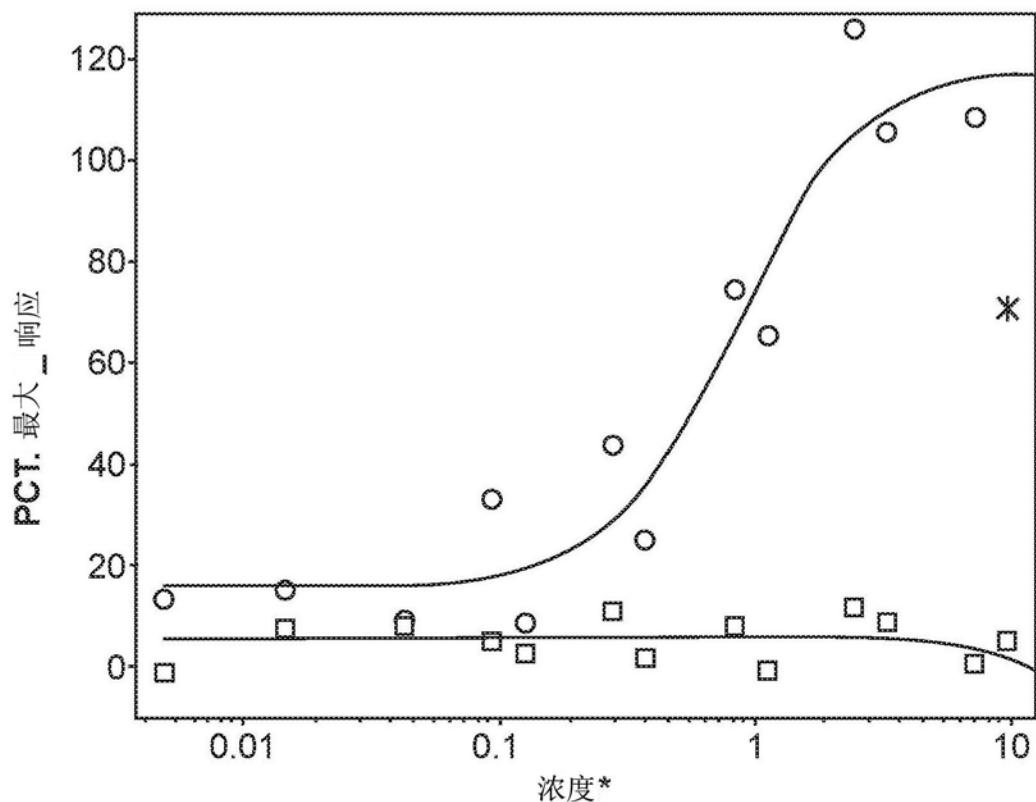


图2F

KIAA1549-BRAF 融合 NIH/3T3 细胞：侧腹肿瘤

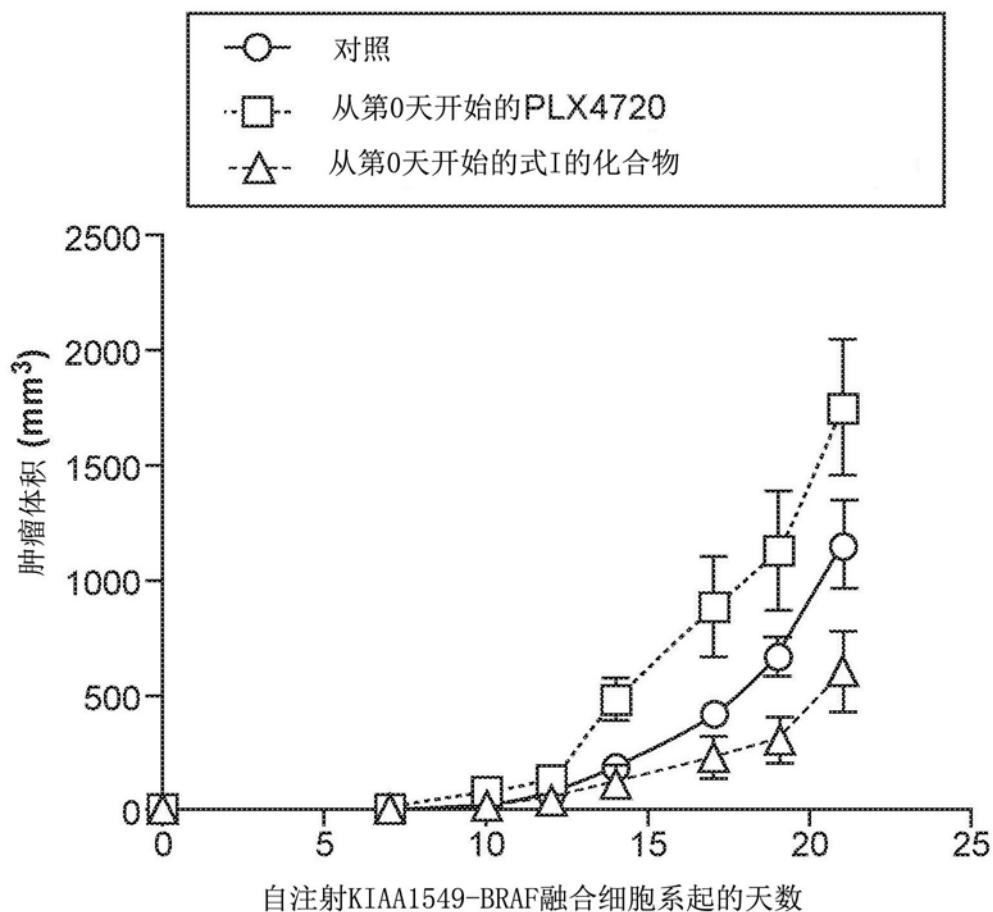


图3