



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104244982 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201380018928. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 04. 01

A61K 45/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/5025 (2006. 01)

61/619, 502 2012. 04. 03 US

A61K 31/506 (2006. 01)

A61K 31/53 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/034759 2013. 04. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/151913 EN 2013. 10. 10

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 R·提耶德 A·博克勒

F·哈宾斯基 S·桑哈维

D·杰弗里 C·威尔森

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 沈端

权利要求书2页 说明书23页 附图14页

(54) 发明名称

酪氨酸激酶抑制剂组合及其用途

(57) 摘要

本发明涉及包含 (i) MET 抑制剂和 (ii) FGFR 抑制剂或者其各自药学上可接受盐或其各自前药、及至少一种药学上可接受载体的药物组合产品。

1. 一种药物组合, 包含 (i) MET 抑制剂和 (ii) FGFR 抑制剂或者其各自药学上可接受盐或其前药、及至少一种药学上可接受载体。

2. 如权利要求 1 所述的药物组合, 其特征在于: 用于组分 (i) 和 (ii) 的同时、分开或序贯使用。

3. 如权利要求 1 所述的药物组合, 其特征在于: 采用固定组合的形式。

4. 如权利要求 1 所述的药物组合, 其特征在于: 采用用于组合给药的多组分试剂盒的形式, 其中所述 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和所述 MET 酪氨酸激酶抑制剂可以在相同时间独立地给药或者在时间间隔内分开地给药, 特别是其中这些时间间隔允许所述组合伴侣具有联合活性。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的药物组合, 其特征在于: 所述 MET 酪氨酸激酶抑制剂是选自由以下组成的组: (E)-2-(1-(3-((7- 氟喹啉 -6- 基) 甲基) 咪唑并 [1, 2-b] 哒嗪 -6- 基) 亚乙基) 肼甲酰胺和 2- 氟 -N- 甲基 -4-[(7- 喹啉 -6- 基 - 甲基) - 咪唑并 [1, 2-b] 三嗪 -2- 基] 苯甲酰胺、或者其各自药学上可接受盐或前药; 并且

所述 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂是 3-(2, 6- 二氯 -3, 5- 二甲氧基 - 苯基) -1-{6-[4-(4- 乙基哌嗪 -1- 基) - 苯基氨基] - 嘧啶 -4- 基} -1- 甲基脒、或者其药学上可接受盐或前药。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的药物组合, 其特征在于: 还包含助剂、或者其药学上可接受盐或前药。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的药物组合, 其特征在于: 包含联合有效治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病的量, 以用于治疗癌症。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物组合, 其特征在于: 采用组合产品的形式。

9. 一种 MET 抑制剂和 FGFR 抑制剂或者其药学上可接受盐, 用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症的方法中的组合应用。

10. 如权利要求 9 所述的 MET 抑制剂和 FGFR 抑制剂, 其特征在于: 所述 MET 酪氨酸激酶抑制剂是选自由以下组成的组: (E)-2-(1-(3-((7- 氟喹啉 -6- 基) 甲基) 咪唑并 [1, 2-b] 哒嗪 -6- 基) 亚乙基) 肼甲酰胺和 2- 氟 -N- 甲基 -4-[(7- 喹啉 -6- 基 - 甲基) - 咪唑并 [1, 2-b] 三嗪 -2- 基] 苯甲酰胺、或者其各自药学上可接受盐或前药; 并且

所述 FGFR 抑制剂是 3-(2, 6- 二氯 -3, 5- 二甲氧基 - 苯基) -1-{6-[4-(4- 乙基哌嗪 -1- 基) - 苯基氨基] - 嘧啶 -4- 基} -1- 甲基脒、或者其药学上可接受盐或前药。

11. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的组合或组合产品用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症的用途。

12. 一种 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂与 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或其各自药学上可接受盐的组合, 其是用于药剂或药物产品特别是如权利要求 1 至 8 中任一项所述的组合或组合产品的制造, 用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症。

13. 一种治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症的方法, 包括向需要的患者给予 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或其各自药学上可接受盐的组合。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其特征在于: 所述 MET 抑制剂是选自由以下组成的组: (E)-2-(1-(3-((7- 氟喹啉 -6- 基) 甲基) 咪唑并 [1, 2-b] 哒嗪 -6- 基) 亚乙基) 肼甲酰胺

和 2- 氟 -N- 甲基 -4-[(7- 喹啉 -6- 基 - 甲基) - 咪唑并 [1, 2-b] 三嗪 -2- 基] 苯甲酰胺或者其药学上可接受盐或其前药, 并且

所述 FGFR 抑制剂是 3-(2, 6- 二氯 -3, 5- 二甲氧基 - 苯基) -1-{6-[4-(4- 乙基哌嗪 -1- 基) - 苯基氨基] - 嘧啶 -4- 基} -1- 甲基脒、或者其药学上可接受盐或前药。

15. 一种用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症的方法, 所述方法包括向需要的受试对象, 如温血动物尤其是人给予有效量的如权利要求 1 至 8 中任一项所述的包含 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂的组合或组合产品。

16. 一种药物产品或商业包装物, 其包含如权利要求 1 至 8 中任一项所述的组合, 尤其连同用于在 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症的治疗中同时、分开或序贯使用的使用说明书, 所述药物组合尤其是用于 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症的治疗。

17. (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或者其各自药学上可接受盐在制备组合特别是如权利要求 1 至 8 中任一项所述的组合中的用途, 所述组合是用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病特别是癌症。

酪氨酸激酶抑制剂组合及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及包含分别在增生性疾病治疗中具有联合活性的 (i) MET 抑制剂和 (ii) FGFR 抑制剂或者其各自的药学上可接受盐或其前药的药物组合、相应的药物制剂、用途、方法、工艺、商业包装物、及相关的本发明实施方式。

背景技术

[0002] 原癌基因 cMET (MET) 编码蛋白质肝细胞生长因子受体 (HGFR), 该受体具有酪氨酸激酶活性并且对于胚胎发育和伤口愈合是必不可少的。当肝细胞生长因子 (HGF) 刺激时, MET 引起若干生物反应, 从而导致侵袭性生长。在各种类型的恶性肿瘤 (包括肾癌、肝癌、胃癌、乳腺癌和脑癌) 中, 异常的 MET 激活引发肿瘤生长、新血管形成 (血管生成) 和转移。一些 MET 激酶抑制剂是 HGF 诱发的 MET (= HGFR) 激活的已知且可替代的抑制剂。关于 c-MET (或者 c-MET 信号转导通路) 在正常组织和人恶性肿瘤 (例如癌症) 中的生物学功能已有大量的文献记载 (Christensen, J. G. 等人, Cancer Lett. 2005, 225(1) :1-26 ;Corso, S. 等人, Trends in Mol. Med. 2005, 11(6) :284-292)。

[0003] 迄今为止, 已在脊椎动物中鉴定了若干个具有酪氨酸激酶活性的不同的细胞膜成纤维细胞生长因子受体 (FGFR), 所有这些受体均属于酪氨酸激酶超家族 :FGFR1 (= CD331, 也称为成纤维细胞生长因子受体 1) ;FGFR2 (= CD332, 也称为成纤维细胞生长因子受体 2) ;FGFR3 (= CD333, 也称为成纤维细胞生长因子受体 3) ;FGFR4 (= CD334, 也称为成纤维细胞生长因子受体 4) ;和 FGFR6。

[0004] 流行病学研究已报道了在人类癌症中 FGF/FGFR 的基因变异和 / 或异常表达 :导致 FGFR1 激酶组成性激活的 FGFR1 向其它基因的易位和融合是 8p11 骨髓增生性疾病的原因 (MacDonald D&Cross NC, Pathobiology 74 :81-8(2007))。已有人报道了乳腺肿瘤中 FGFR1、FGFR2 和 FGFR4 的基因扩增和蛋白质过表达 (Adnane J 等人, Oncogene 6 :659-63(1991) ;Jaakkola S 等人, Int. J. Cancer 54 :378-82(1993) ;Penault-Llorca F 等人, Int. J. Cancer 61 :170-6(1995) ;Reis-Filho JS 等人, Clin. Cancer Res. 12 :6652-62(2006))。已知在胃癌 (Jang JH 等人, Cancer Res. 61 :3541-3(2001)) 和子宫内膜癌 (Pollock PM 等人, Oncogene (May 21, 2007)) 中存在 FGFR2 的体细胞激活突变。复发的 4p16 染色体易位入在 14q32 处的免疫球蛋白重链转换区导致多发性骨髓瘤中 FGFR3 的失调的过表达 (Chesi M 等人, Nature Genetics 16 :260-264(1997) ;Chesi M 等人, Blood 97 :729-736(2001)), 并且已在膀胱癌和多发性骨髓瘤中鉴定出导致受体的配体非依赖性组成性激活的 FGFR3 特定结构域中的体细胞突变 (Cappellen D 等人, Nature Genetics 23 :18-20(1999) ;Billerey C 等人, Am. J. Pathol. 158(6) :1955-9(2001) ;van Rhijn BWG 等人, Eur. J. Hum. Genet. 10 :819-824(2002) ;Ronchetti C 等人, Oncogene 20 :3553-3562(2001))。

发明内容

[0005] 利用最初依赖于 MET 或 FGFR 的癌细胞, 出人意料地观察到通过替代的受体酪氨酸

激酶 (RTK) 的配体介导的激活的依赖性的旁路。当用相应的选择性抑制剂处理 MET 或 FGFR 依赖性细胞系 (亦即, 用 MET 抑制剂处理 MET 依赖性细胞系并且用 FGFR 抑制剂处理 FGFR 依赖性细胞系) 并同时添加取自用编码各种分泌蛋白质的 cDNA 转染细胞的上清液时, 发现了旁路机制。这可以证明 MET 和 FGFR RTK 可以补偿由于抑制所造成的其它的功能损失, 如果这些 RTK 中仅的一个 PTK 被适当药物抑制则导致对增殖细胞的“挽救”。这允许演绎出一般性概念并且表明 FGFR 与 MET 抑制剂的组合将能够实现对疾病 (其中 MET 的活性补偿了 FGFR 的抑制并且 / 或者 FGFR 的活性补偿了 MET 抑制) 的有效治疗。

[0006] 因此, 发现了这些 RTK 的联合抑制可以导致协同的抗癌活性, 特别是当 MET 和 FGFR RTK 两者均具有活性, 然后根据本发明可以同时地或者共同地顺序地被抑制时。

[0007] 本发明的详细说明

[0008] 根据第一实施方式, 本发明涉及一种药物组合, 该药物组合包含 (i) MET 抑制剂和 (ii) FGFR 抑制剂或者其各自的药学上可接受盐或其各自的前药、及至少一种药学上可接受载体。

[0009] 本发明的另一个实施方式提供一种组合, 该组合包含共同地有效治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病 (特别是癌症) 的量的 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或其各自的药学上可接受盐、及至少一种药学上可接受载体。

[0010] 本发明的又一个实施方式涉及本发明组合用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病 (特别是癌症) 的用途。

[0011] 本发明的再一个实施方式涉及 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或者其各自的药学上可接受盐的组合在治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病 (特别是癌症) 的药剂或药物产品的制造中的用途。

[0012] 本发明的又一个实施方式涉及一种用 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或者其各自的药学上可接受盐的组合来治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病 (特别是癌症) 的方法。

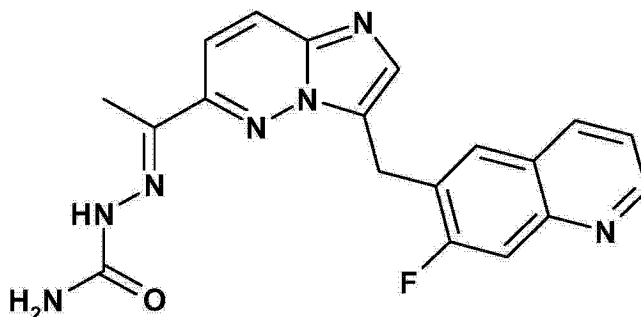
[0013] 本发明的又一个实施方式涉及一种用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病 (特别是癌症) 的方法, 所述方法包括向需要的受试对象例如温血动物 (尤其是人) 给予有效量的包含 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂的组合或组合产品。

[0014] 本发明的又一个实施方式涉及一种包含本文中所描述的本发明组合的药物产品或商业包装物, 尤其是连同用于在 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病 (特别是癌症) 的治疗中同时、分开或序贯使用 (特别是用于具有联合活性) 的使用说明书, 其尤其是用于 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病 (特别是癌症) 治疗。

[0015] 本发明的又一个实施方式涉及 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或其各自的药学上可接受盐用于本发明组合产品的制备的用途。

[0016] WO 2011/018454 公开了 MET 酪氨酸激酶抑制剂, 特别是有用的是具有以下结构式的名称为 (E)-2-(1-(3-((7-氟喹啉-6-基) 甲基) 咪唑并 [1, 2-b] 哒嗪-6-基) 亚乙基) 肼甲酰胺 (hydrazinecarboxamide) (在下文中也称为化合物 A) 的化合物:

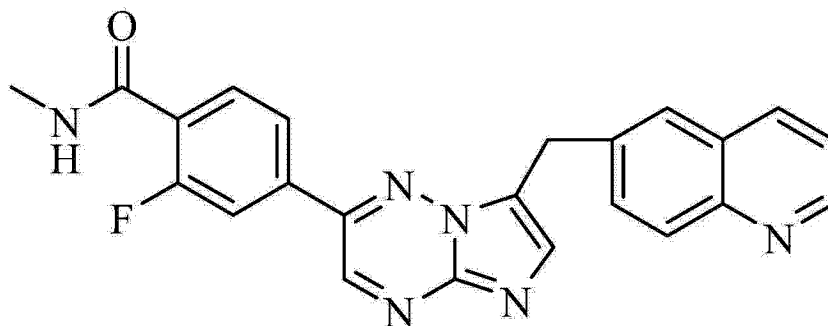
[0017]



[0018] 参见 WO 11 018454 的实施例 1。

[0019] WO 2008/064157 公开了 MET 酪氨酸激酶抑制剂,特别有用的是具有以下结构式的名称为 2-氟-N-甲基-4-[(7-喹啉-6-基-甲基)-咪唑并[1,2-b]三嗪-2-基]苯甲酰胺(在下文中也称为化合物 B)的化合物:

[0020]

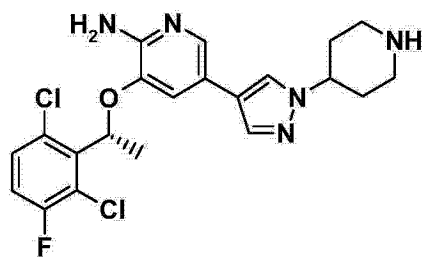


[0021] 参见 WO 2008/064157 的实施例 7。

[0022] 其它的 MET 抑制剂、其药学上可接受盐、及其前药(还包括针对 HGF 有活性的化合物或抗体)的实例如下:

[0023] 具有以下结构式的克唑替尼(crizotinib)(Pfizer 公司)(aka PF02341066)

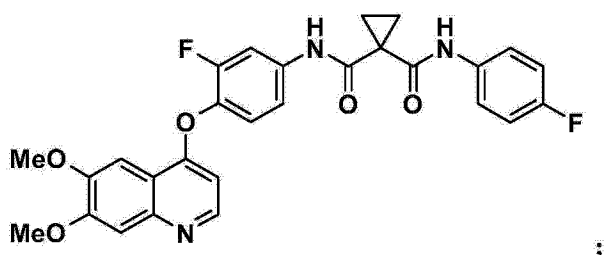
[0024]



;

[0025] 具有以下结构式的卡博替尼(cabozantinib)(Exelixis 公司)(aka XL-184)

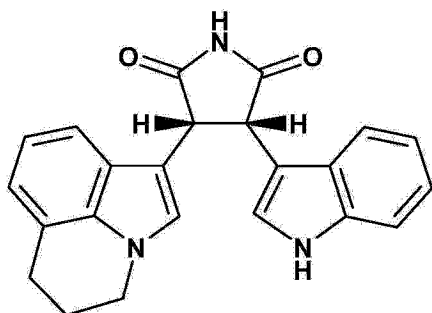
[0026]



;

[0027] 具有以下结构式的 tivantinib(ArQule,第一制药 (daiichi),协和 (Kyowa)) (aka ARQ-197)

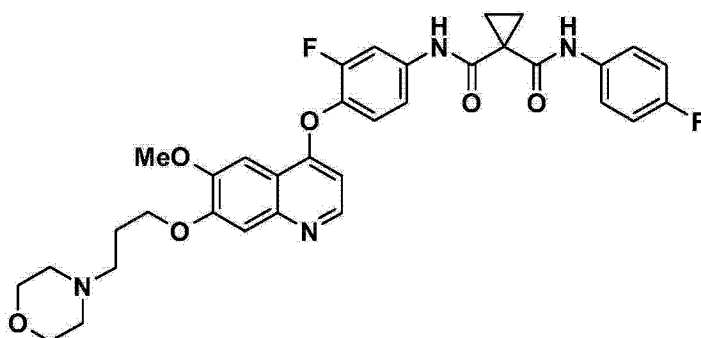
[0028]



;

[0029] 具有以下结构式的 foretinib(Exelixis 公司, Glaxo-SmithKline 公司) (aka XL-880)

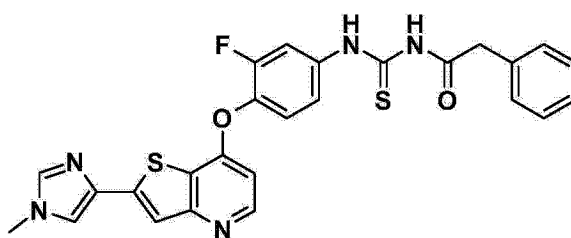
[0030]



;

[0031] 具有以下结构式的 MGCD-265(MethylGene 公司) :

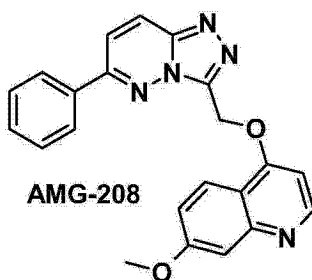
[0032]



;

[0033] 具有以下结构式的 AMG-208(Amgen 公司) (也参见 WO 2008/008539) :

[0034]



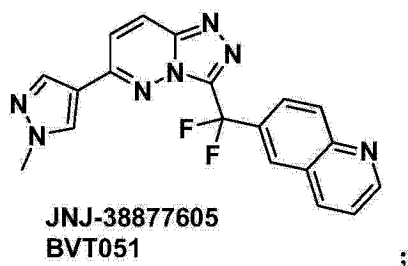
;

[0035] AMG-337(Amgen) ;

[0036] 具有以下结构式的 JNJ-38877605(Johnson&Johnson 公司) (aka BVT051,也参见

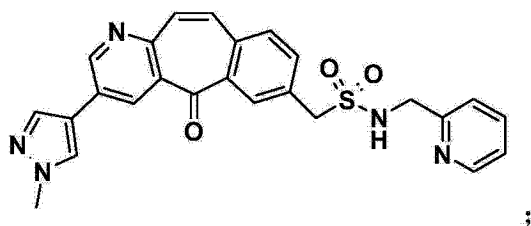
WO 2007/075567) :

[0037]



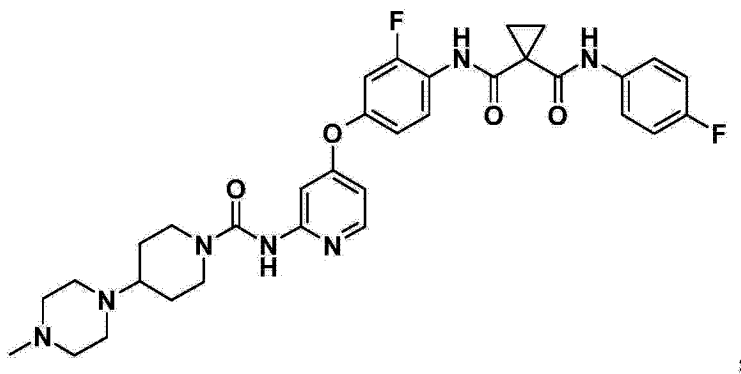
[0038] 具有以下结构式的 MK-8033 (Merck 公司) :

[0039]



[0040] 具有以下结构式的 E-7050 (卫材公司 (Eisai)):

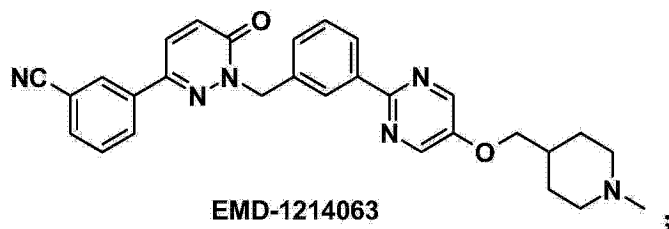
[0041]



[0042] EMD-1204831 (Merck Serono 公司) ;

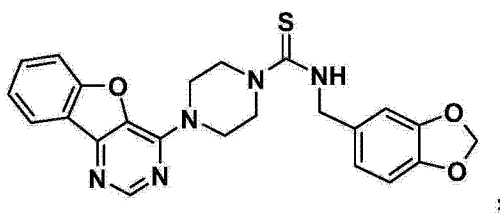
[0043] 具有以下结构式的 EMD-1214063 (Merck Serono 公司, 也参见 W02007/019933) :

[0044]



[0045] 具有以下结构式的 amuvatinib (SuperGen 公司, aka MP-470) :

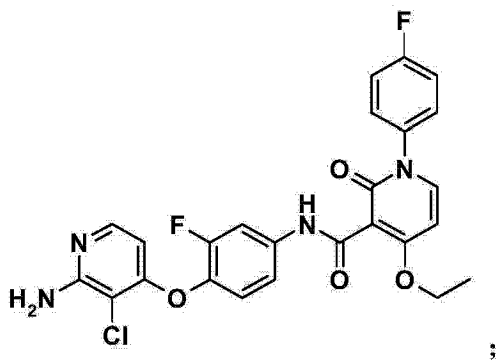
[0046]



[0047] LY-2875358 (Eli Lilly 公司) ;

[0048] 具有以下结构式的 BMS-817378 (BristolMyersSquibb 公司, Simcere 公司) ;

[0049]



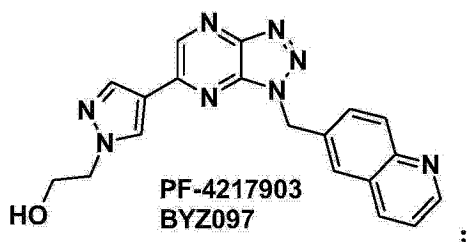
[0050] DP-3590 (Deciphera 公司) ;

[0051] ASP-08001 (Suzhou Ascepcion Pharmaceuticals 公司) ;

[0052] HM-5016504 (Hutchison Medipharma 公司) ;

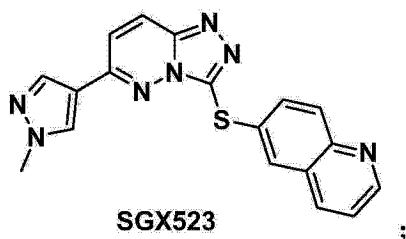
[0053] 具有以下结构式的 PF-4217903 (Pfizer 公司, 也参见 US 2007/0265272) ;

[0054] 或者



[0055] 具有以下结构式的 SGX523 (SGX, 也参见 WO 2008/051808) ;

[0056]



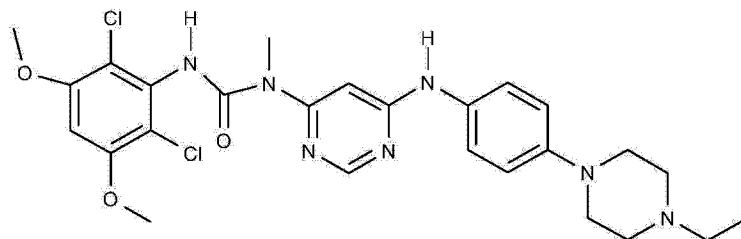
[0057] 或者抗体或相关分子, 例如针对 HGF 的 ficlatuzumab (AVEO) 单克隆抗体 ; 针对 MET 的 onartuzumab (Roche) 单克隆抗体 ; 针对 HGF 的 rilotuzumab (Amgen) 单克隆抗体 ; 针对 HGF 的 Tak-701 (武田) 单克隆抗体 ; 针对 MET 的 LA-480 (Eli Lilly 公司) 单克隆抗体 ; 和 / 或针对 MET 的 LY. 2875358 (Eli Lilly 公司) 单克隆抗体。

[0058] WO 2006/000420 公开了 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂, 特别是结构式 (ii) 的化合物及其盐、酯、N-氧化物或前药是具体实施方式。

[0059] 特别优选的是具有以下结构式的 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯

基)-1-{6-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲 (BGJ398, 也称为化合物 C) :

[0060]

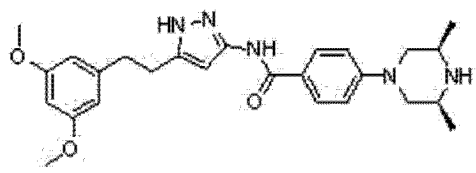


[0061] 参见 W02006/000420 的实施例 145。

[0062] 其它 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂或者其药学上可接受盐或前药包括但不限于 :

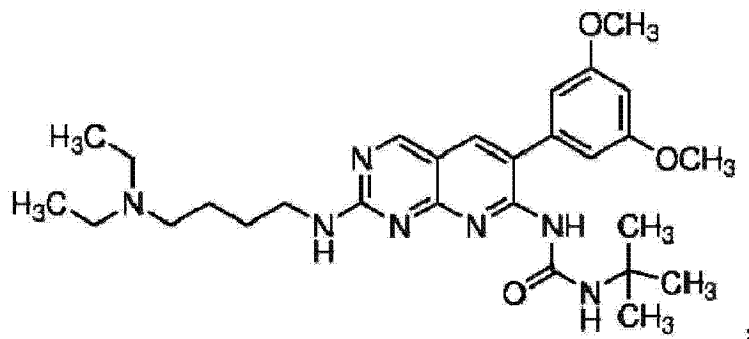
[0063] 具有以下结构式的 AZD-4547 (AstraZeneca 公司) :

[0064]



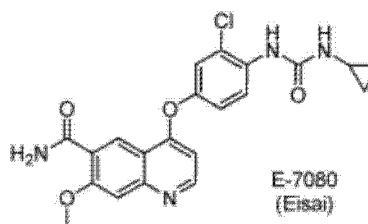
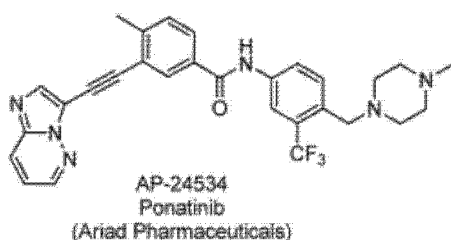
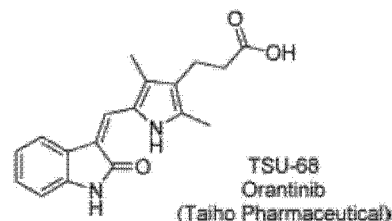
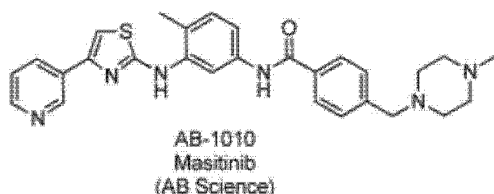
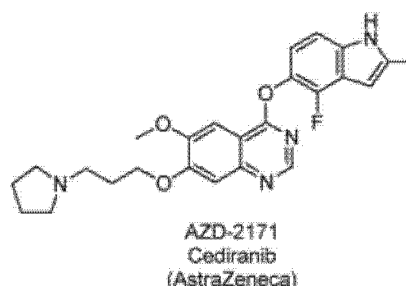
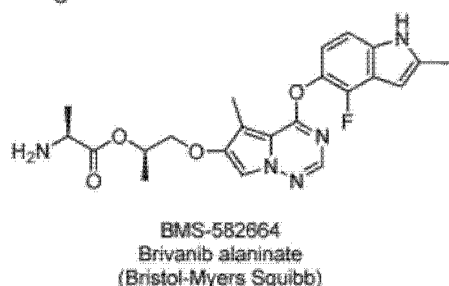
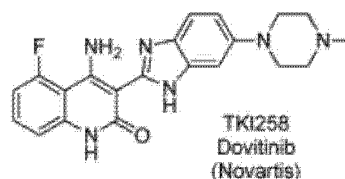
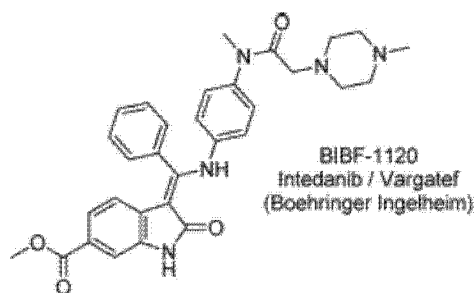
[0065] 具有以下结构式的 PD173074 (帝国理工学院, 伦敦) (N-[2-[[4-(二乙基氨基)丁基]氨基]-6-(3,5-二甲氧基苯基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-N'-(1,1-二甲基乙基)脲 :

[0066]



[0067] 或者特异性较低的 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂, 例如具有以下结构式的 intedanib、多韦替尼 (dovitinib)、布立尼布 (brivanib) (特别是丙氨酸盐)、西地尼布 (cediranib)、马赛替尼 (masitinib)、orantinib、帕纳替尼 (ponatinib) 和 E-7080 :

[0068]



[0069] 或者抗体或相关分子,例如选自:

[0070] HGS1036/FP-1039 (Human Genome Science/Five Prime 公司) (也参见 J. Clin. Oncol. 28:15s, 2010): 由连接到人免疫球蛋白 G1 (IgG1) Fc 区的人 FGFR1 的细胞外域所组成的可溶性融合蛋白, 其被设计用来隔绝并结合多个 FGF 配体并且锁闭多个 FGF 受体的激活; MFGR1877S (Genentech/Roche 公司): 单克隆抗体; AV-370 (AVEO): 人源化抗体; GP369/AV-396b (AVEO): FGFR-IIIb- 特异性抗体; 和 HuGAL-FR21 (Galaxy Biotech 公司): 单克隆抗体 (FGFR2)。

[0071] 根据本发明有用的化合物还可以包括存在于中间体或最终化合物中的原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子序数但具有不同质量数的原子。可以结合入本发明化合物中的同位素的实例包括: 氢、碳、氮、氧、磷、氟、和氯的同位素, 例如分别是 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{125}I 。

[0072] 本发明实施方式还包括本文中所描述的根据发明有用的化合物的药学上可接受盐。本文所使用的“药学上可接受盐”是指本文中公开的化合物的衍生物, 其中通过将所存在的酸或碱基团转变成其盐形式而对母体化合物进行修饰。药学上可接受盐的实例包括但

不限于：碱性残基（诸如胺类）的无机酸或有机酸盐；酸性残基（诸如羧酸类）的碱盐或有机盐；等。本发明的药学上可接受盐包括，例如，由无毒的无机酸或有机酸所形成的母体化合物的常规无毒盐。本发明的药学上可接受盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性基团的母体化合物而合成。通常，这种盐可以通过使游离酸或碱形式的这些化合物与化学计算量的适当碱或酸在水中或者在有机溶剂中、或者在水与有机溶剂的混合物中发生反应而制备；通常，非水介质（如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇、或乙腈）是优选的。合适盐的列表可见雷明登氏药学科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)，第 17 版，Mack 出版公司，Easton, Pa.，1985，第 1418 页和 Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2(1977)，每个文献的全部内容以参考的方式并入本文中。

[0073] 本文中使用的词组“药学上可接受的”是指在合理医学判断范围内适合于与人和动物的组织接触且没有过度的毒性、刺激、过敏反应或者其它问题或并发症，并且与合理的获益 / 风险比相称的化合物、材料、组合物、和 / 或剂型。

[0074] 本发明还包括根据本发明有用的化合物的前药。本文中使用的“前药”是指任何给予哺乳动物受试对象时释放出活性母体药物的共价结合载体。前药可以通过这样的方式修饰存在于化合物中的官能团而制备：所述修饰在常规操作中或者在体内裂解成母体化合物。前药包括其中羟基、氨基、巯基或羧基连接到给予哺乳动物受试对象时发生裂解从而分别形成游离的羟基、氨基、巯基或羧基的任何基团的化合物。前药的实例包括但不限于：本发明化合物中的醇和胺官能团的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物。前药的制备和用途描述于 T. Higuchi 和 V. Stella 的“作为新型递送系统的前药 (Pro-drugs as Novel Delivery Systems)”A. C. S. 讨论会丛书第 14 卷，以及药物设计中的生物可逆性载体 (Bioreversible Carriers in Drug Design)，由 Edward B 编著，Roche，美国药学会和 Pergamon 出版公司 (1987) 中，这两篇文献的全部内容以参考的方式并入本文中。

[0075] 根据本发明有用的化合物、以及其药学上可接受盐或前药也可以以互变异构体、N-氧化物或溶剂化物（例如水合物）的形式而存在。所有这些变体以及其中的任何单个或者两个以上到少于所有这种变体的组合均包括在本文中，其中提及了本发明组合产品中所包含的一个化合物（例如 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 / 或 MET 酪氨酸激酶抑制剂）。

[0076] 根据上面和下面所描述的第一实施方式，本发明涉及一种药物组合，特别是一种药物组合产品，其包含所述组合伴侣和至少一种药学上可接受载体。

[0077] “组合”是指有或没有说明书的、用于合并使用的单独组合伴侣的制剂或组合产品。因此，这些组合伴侣可以是完全单独的药物剂型或药物组合物，它们也是彼此独立地销售并且其中仅用于它们合并使用的说明书以包装配件的形式（例如传单等），或者以例如提供给医生和医护人员的其它信息形式（例如口头表达、采用书面形式的信息等）提供，该说明书是用于同时使用或序贯使用以具有联合活性，特别是如下所述。

[0078] “组合产品”尤其是指在一个剂量单位形式中的固定组合，或者用于组合给药的多组分的试剂盒，其中 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂与 MET 酪氨酸激酶抑制剂（和任选地另一个组合伴侣（例如如下所述的另一种药物，也被称为“助剂”）可以在相同时间独立地给药或者在时间间隔内分开地给药，特别是其中这些时间间隔允许组合伴侣显示合作（=联合）的作用（例如协同作用）。本文中使用的术语“联合给药”或“组合给药”等意图包括将所选择的组合伴侣向需要的单独受试对象（例如患者）的给药，并且意图包括其中各药物不必

经由相同给药途径给药和 / 或同时给药的治疗方案。

[0079] 因此,本文中使用的术语“组合产品”表示将多于一种的活性成分加以混合或组合而形成的药物产品,并且包括活性成分的固定和非固定组合(也可以加以合并)。

[0080] 术语“固定组合”表示同时地以单一实体或剂量形式向患者给药活性成分,例如 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 MET 酪氨酸激酶抑制剂二者。换句话说,活性成分存在于一个剂型中,例如存在于一个片剂或一个胶囊中。

[0081] 术语“非固定组合”表示以分开的实体形式将两者活性成分向患者同时地、并行地或者在没有特定时间限制情况下顺序地给药,其中这种给药在患者身体中提供治疗有效水平的这两种化合物。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如三种以上活性成分的给药。因此,术语“非固定组合”尤其是指“多组分试剂盒”,亦即如本文中定义的组合伴侣(i)FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和(ii)MET 酪氨酸激酶抑制剂(和,如果存在,其它的一种或多种助剂)可以彼此独立的给药或者通过使用具有不同量的组合伴侣的不同固定组合的(即同时或者在不同的时间点)给药,其中组合伴侣也可作为完全分开的药物剂型或药物制剂使用,这些组合伴侣彼此独立地销售并且仅关于它们的联合使用可能性的说明书以包装配件(例如传单等)或者以例如提供给医生和医护人员的其它信息的形式提供。然后,可以将独立的制剂或者多组分试剂盒的各组分例如同时地给药或者按时间顺序错开给药,亦即对于多组分试剂盒的任何组分在不同的时间点并且采用相同或不同的时间间隔给药。非常优选地,将这些时间间隔选择成使得在各组分的联合使用中对被治疗疾病的作用大于通过仅使用组合伴侣(i)和(ii)中的任一个将会获得的作用,因此是具有联合活性的。可以改变在组合制剂中给药的组合伴侣(i)与组合伴侣(ii)的总量比,例如以应对被治疗患者亚群的需要或者单独患者的需要,这些患者的不同需要可以是由于这些患者的年龄、性别、体重等的不同所造成。

[0082] 本发明还涉及(i)MET 抑制剂和(ii)FGFR 抑制剂或其药学上可接受盐,它们联合用于治疗 FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病(特别是癌症)的方法中。

[0083] 在又一个实施方式中,按如下方式选择用于根据前面段中所描述的使用的 MET 抑制剂和 FGFR 抑制剂:MET 酪氨酸激酶抑制剂是选自(E)-2-(1-(3-((7-氟喹啉-6-基)甲基)咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)亚乙基)肼甲酰胺和 2-氟-N-甲基-4-[(7-喹啉-6-基-甲基)-咪唑并[1,2-b]三嗪-2-基]苯甲酰胺、或者其各自的药学上可接受盐或前药;FGFR 酪氨酸激酶抑制剂是 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲、或者其药学上可接受盐或前药。

[0084] 在任何本发明实施方式中,优选地将组合伴侣(i)和(ii)进行配制或者使用以便具有联合(预防性地或者特别地治疗性)活性。这表明尤其存在着至少一个有利效果,例如组合伴侣(i)与(ii)的作用的相互增加,尤其是协同作用,例如大于相加作用、附加的有利效果(例如任一单独化合物中未发现的其它治疗效果)、较少的副作用、在组合伴侣(i)和(ii)中的一个或两个的非有效剂量下联合的治疗效果;非常优选地是组合伴侣(i)与(ii)的明显协同作用。

[0085] 例如,术语“联合(治疗性地)活性的”可表示这些化合物可以在优选地在被治疗温血动物(特别是人)中仍然显示(优选协同的)相互作用(联合治疗效果)的时间间隔

中分开地或顺序地（以按时间顺序错开的方式，特别是以特定顺序的方式）给药。联合治疗效果尤其可以通过监测血液水平来确定，其显示两种化合物至少在某些时间间隔中存在于被治疗人的血液中，但这不应排除这些化合物尽管不同时存在于血液中，具有联合活性的情况。

[0086] 因此，本发明是关于一种用于同时、分开或序贯使用的组合产品，例如组合制剂或者药物固定组合、或者这种制剂和组合的组合。

[0087] 在本发明的联合治疗中，根据本发明有用的化合物可由相同或不同的生产商所制造和/或配制。此外，可将组合伴侣共同地引入联合治疗：(i) 在将组合产品提供给医生之前（例如在包含本发明化合物和其它治疗剂的试剂盒的情况下）引入；(ii) 在即将给药前由医生自己（或者在医生的指导下）引入；(iii) 由患者自身引入，例如在本发明化合物与其它治疗剂的序贯给药期间。

[0088] 在某些实施方式中，任何上述方法均涉及到进一步给予一个或多个其它（例如第三个）助剂，特别是化学治疗剂。

[0089] 因此，在另一个实施方式中，本发明涉及一种组合产品，具体地涉及一种药物组合物，该药物组合物包含治疗有效量的 (i) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 (ii) MET 酪氨酸激酶抑制剂或其各自的药学上可接受盐、及至少一个第三治疗活性剂（助剂）例如另一种化合物 (i) 和/或 (ii) 或者不同的助剂。该其它助剂优选地是选自抗癌剂、和抗炎剂。

[0090] 也在此情况下，可根据本发明的构成相应产品的组合伴侣加以混合以形成固定的药物组合物，或者它们可以分开地或成对地（即在其它药物之前、同时、或之后）给药。

[0091] 此外或另外，根据本发明的组合产品可以尤其与化学治疗、放射治疗、免疫治疗、手术干预、或这些的组合结合用于癌症治疗。长期治疗与在如上所述其它治疗策略的情况下的辅助治疗同样地是可能的。其它可能的治疗是在肿瘤衰退或者甚至化学预防性治疗（例如在处于危险的患者中）之后用于维持患者状态的治疗。

[0092] 可能的作为助剂的抗癌剂（例如用于化学治疗）包括但不限于：芳香酶抑制剂；抗雌激素类药；拓扑异构酶 I 抑制剂；拓扑异构酶 II 抑制剂；微管活性化合物；烷化化合物；组蛋白脱乙酰酶抑制剂；引起细胞分化过程的化合物；环氧合酶抑制剂；MMP 抑制剂；mTOR 抑制剂；抗肿瘤的抗代谢药；铂类化合物；靶向/降低蛋白质或脂质激酶活性的化合物；抗血管生成化合物；靶向、降低或抑制蛋白质或脂质磷酸酶活性的化合物；促性腺激素释放激素激动剂；抗雄激素类药；甲硫氨酸氨肽酶抑制剂；二膦酸盐类；生物反应调节剂；抗增生抗体；类肝素酶抑制剂；Ras 致癌基因亚型的抑制剂；端粒酶抑制剂；蛋白酶体抑制剂；用于治疗血液恶性肿瘤的化合物；靶向、降低或抑制 Flt-3 活性的化合物；Hsp90 抑制剂；纺锤体驱动蛋白抑制剂；MEK 抑制剂；亚叶酸；EDG 结合剂；抗白血病化合物；核糖核苷酸还原酶抑制剂；S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶抑制剂；血管抑制类固醇（angiostatic steroids）；皮质类固醇；其它化学治疗化合物（如下定义）；光敏化化合物。

[0093] 此外，可替代地或者另外，根据本发明的组合产品可以结合其它肿瘤治疗方法（包括手术、电离辐射、光动力学疗法、植入）而使用，例如结合皮质类固醇、激素而使用，或者可将它们用作放射增敏剂。

[0094] 本文中使用的术语“商业包装物”尤其表示“多组分试剂盒”；也就是说如上面和下面所定义的组分 (a) MET 酪氨酸激酶抑制剂和 (b) FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和任选地其它助

剂,可以独立地给药,或者通过使用具有不同量的组分 (a) 和 (b) 的不同的固定组合,即同时地或者在不同的时间点给药。而且,这些术语包括商业包装物,该商业包装物包含(特别是进行组合)作为活性成分的组分 (a) 和 (b) 连同用于在增生性疾病的发展延缓或治疗中同时、序贯(按时间顺序错开,按特定时间顺序)或分开给药的使用说明书。然后,可以将多组分试剂盒的组分例如同时地给药或者按时间顺序错开给药,亦即关于多组分试剂盒的任一组分在不同时间点以及以相同或不同的时间间隔给药。非常优选地,将时间间隔选择成使得各组分的联合使用对被治疗疾病的效果大于通过仅使用组合伴侣 (a) 和 (b) 中的一个将会获得的效果(正如可以按照标准方法所确定的)。可以改变组合制剂中给药的组合伴侣 (a) 与组合伴侣 (b) 的总量比,例如以应对被治疗患者亚群的需要或者单独患者的需求,他们的不同需要可以是由于患者的特定疾病、年龄、性别、体重等而造成。优选地,存在至少一个有利效果,例如组合伴侣 (a) 和 (b) 的作用的相互增强,尤其是大于相加作用,其可以分别用在没有组合的仅用单独药物治疗情况下可耐受的更低剂量的各助剂获得,产生附加的有利效果,例如较少的副作用或者在组合伴侣(组分) (a) 和 (b) 中一个或两个的非有效剂量下联合的治疗效果,以及非常优选地组合伴侣 (a) 和 (b) 的强协同作用。

[0095] 在使用组分 (a) 和 (b) 的组合与商业包装物的情况下,同时、序贯和分开给药的任意组合也是可能的,这意味着组分 (a) 和 (b) 可以在一个时间点同时地给药,接着在后面的时间点给予仅一个具有较低宿主毒性的组分,长期地(例如多于 3-4 周)每日给药,和随后在更后面的时间点给予其它组分或者两个组分的组合(在后继的药物联合治疗过程中用于获得最佳效果)等。

[0096] 根据本发明的组合产品适合于分别由 FGFR 和 / 或 MET 酪氨酸激酶的活性介导的,尤其是分别依赖于 FGFR 和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性的多种疾病的治疗。因此,它们可以用于可以用 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 MET 酪氨酸激酶抑制剂治疗的任何疾病的治疗。

[0097] 术语“FGFR 酪氨酸激酶活性和 / 或 MET 酪氨酸激酶活性介导的疾病”特别是指如下的疾病:其中一个或两个激酶的活性导致调控路径(包括两个激酶中的一个)的异常活性,特别是其中一个或两个激酶是过度活跃的,例如由于过表达、突变或细胞中其它调控路径的活性的相对缺乏,例如其中存在前述或后述的调控因素的扩增、组成性激活和 / 或过度激活。

[0098] FGFR 抑制剂可用于例如一种或多种对 FGFR 活性抑制产生反应的疾病的治疗,尤其是肿瘤性或肿瘤疾病,特别是实体瘤,更特别是其中与 FGFR 激酶有关的癌症,包括乳腺癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌和子宫内膜癌。其它癌症包括:肾癌、肝癌、肾上腺癌、胃癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、阴道癌或甲状腺癌、肉瘤、胶质母细胞瘤和许多头颈部肿瘤、以及白血病和多发性骨髓瘤。FGFR 抑制剂也可用于对患有由成纤维细胞生长因子受体所介导疾病的温血动物的治疗,尤其是 8p11 骨髓增殖性综合征 (EMS)、垂体瘤、视网膜母细胞瘤、滑膜肉瘤、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、脂溢性角化病、肥胖症、糖尿病和相关疾病、常染色体显性遗传低磷性佝偻病 (ADHR)、X 连锁遗传性低磷酸盐佝偻症 (XLH)、肿瘤引起的骨软化症 (TIO) 和骨纤维异常增殖症 (FD) 以及一种促进局部新软骨形成 (neochondrogenesis) 的方法、以及一种治疗肝细胞癌、肺癌(特别是肺腺癌)、口腔鳞状细胞癌或食道鳞状细胞癌、或者这些疾病中两个或更多个的任意组合的方法。

[0099] MET 抑制剂例如可用于 MET 相关疾病(特别是显示 MET 和 FGFR 的同时激活的证

据,包括基因扩增、激活突变、同族 RTK 配体的表达、在是激活标识物的残基处的 RTK 的磷酸化)的治疗,例如其中癌症是选自脑癌、胃癌、生殖器癌症、尿道癌、前列腺癌、膀胱癌(浅表性和侵入肌肉的)、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、胶质瘤(包括胶质母细胞瘤、间变性星形细胞瘤、少突星形细胞瘤(oligoastrocytoma)、少突胶质细胞瘤)、食道癌、胃癌、胃肠道癌、肝癌、肝细胞癌(HCC)包括儿童 HCC、头颈部癌(包括头颈部鳞状细胞癌、鼻咽癌)、嗜酸性细胞肿瘤、上皮癌、皮肤癌、黑色素瘤(包括恶性黑色素瘤)、间皮瘤、淋巴瘤、骨髓瘤(包括多发性骨髓瘤)、白血病、肺癌(包括非小细胞肺癌(包括所有的组织学亚型:腺癌、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、大细胞肺癌、和混合型腺鳞状细胞肺癌(adenosquamous mixed type)、小细胞肺癌)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌(包括但不限于乳头状肾细胞癌)、肠癌、肾细胞癌(包括遗传性和散发性乳头状肾细胞癌、I 型和 II 型,和透明细胞肾细胞癌);肉瘤,尤其是骨肉瘤、透明细胞肉瘤、软组织肉瘤(包括泡状软组织肉瘤和(例如胚胎性)横纹肌肉瘤、泡状软组织肉瘤);甲状腺癌(乳头状和其它亚型)。

[0100] MET 抑制剂也可用于例如癌症的治疗,其中癌症是胃癌、结肠癌、肝癌、生殖器癌、膀胱癌、黑色素瘤、或前列腺癌。在一个具体实施方式中,癌症是肝癌或食道癌。

[0101] MET 抑制剂也可用于例如结肠癌,包括转移(例如在肝中)以及非小细胞肺癌的治疗。

[0102] MET 抑制剂例如也可用于遗传性乳头状肾癌(Schmidt, L. 等人, Nat. Genet. 16, 68-73, 1997) 和其它增生性疾病的治疗,在所述增生性疾病中 c-MET 被过表达或者由于突变(Jeffers 和 Vande Woude. Oncogene 18, 5120-5125, 1999 ;和其中引用的参考文献)或者染色体重排(例如 TPR-MET ;Cooper 等人, Nature 311, 29-33, 1984 ;Park. 等人 ;Cell 45, 895-904, 1986) 而被组成性激活。

[0103] 本发明的组合产品尤其适合于可对 FGFR 或 Met 抑制剂治疗产生反应的任何上述癌症的治疗,特别是选自腺癌(特别是乳腺或者更特别是肺)、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、膀胱癌和胶质瘤的癌症。

[0104] 本发明化合物的“治疗有效量”的术语是指将引起受试对象的生物学或医学反应(例如降低或抑制酶或蛋白质活性、或减轻症状、缓解病情、减慢或延缓疾病进展、或者预防疾病等)的本发明化合物的量。在一个非限制性实施方式中,术语“治疗有效量”是指这样的本发明化合物的量,其在给予受试对象时可有效地(1)至少部分地缓解、抑制、预防 / 或减轻(i)由 cMet 介导的和 / 或由 FGFR 活性介导的、或者(ii)特征是 cMet 和 / 或 FGFR 的活性(正常或异常)的病情或病症或疾病;或者(2)降低或抑制 cMet 和 / 或 FGFR 的活性;或者(3)降低或抑制 cMet 和 / 或 FGFR 的表达。在另一个非限制性实施方式中,术语“治疗有效量”是指这样的本发明化合物的量,其在给予细胞、或组织、或非细胞生物材料、或介质时可有效地至少部分地降低或抑制 cMet 和 / 或 FGFR 的活性;或者至少部分地降低或抑制 MET 和 / 或 FGFR 的表达。

[0105] 本文中使用的术语“受试对象”是指动物。通常动物是哺乳动物。受试对象还是指例如灵长类动物(例如,人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、鸟类等。在某些实施方式中,受试对象是灵长类动物。在其它实施方式中,受试对象是人。

[0106] “和 / 或”表示列表中的组分或特征的一个或两个或全部是可能的变体,特别是采用替代或累积方式的其中的两个或更多个。

[0107] 本文中使用的术语“抑制 (inhibit)”、“抑制 (inhibition)”或“抑制 (inhibiting)”是指对给定的病情、症状、病症、或疾病的降低或抑制,或者生物活性或生物过程的基线活性中的显著降低。

[0108] 在一个实施方式中,本文中使用的术语任何疾病或病症的“治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”是指减轻疾病或病症 (即,减慢或阻止或降低疾病或者至少一个其临床症状的发展)。在另一个实施方式中,“治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”是指缓解或减轻至少一个身体参数,包括不可被患者辨别的身体参数。在又一个实施方式中,“治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”是指调节疾病或病症,从身体上 (例如,可辨别症状的稳定化)、生理上 (例如,身体参数的稳定化) 或者两者。在再一个实施方式中,“治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”是指预防或延缓疾病或病症的发病或发展或进展。

[0109] 术语“治疗”包括例如预防性或者特别是治疗性将组合伴侣向需要这种治疗的温血动物 (优选人) 给药,目的是治愈疾病或者对疾病发展或者延缓疾病进展具有影响。

[0110] 本文中使用的,如果受试对象将会在生物学、医学或者生活质量上从这种治疗中获益,那么该受试对象“需要”治疗。

[0111] 本文中使用的术语“一个”、“一种”、“该”及本发明上下文中 (特别是在权利要求的上下文中) 所使用的类似术语应被理解成包括单数和复数的两种情况,除非本文中指定或者清楚地与上下文相矛盾。

[0112] 根据本发明的组合可以以已知方式制备并且适合于向包括人的哺乳动物 (温血动物) 的肠内给药 (例如口服给药或直肠给药) 和胃肠外给药,该组合包含治疗有效量的单独的至少一个具有药理学活性的组合伴侣或者连同一种或多种药学上可接受载体,尤其适合于肠内或胃肠外给药的药学上可接受载体。在本发明的一个实施方式中,将一种或多种的活性成分口服给药。

[0113] 本文中使用的术语“载体”或“药学上可接受载体”包括任意的和所有的溶剂、分散介质、涂层、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂 (例如,抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐类、防腐剂、药物、药物稳定剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、着色剂等、及其组合,正如本领域技术人员所知的 (参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 Mack Printing 公司, 1990, 第 1289-1329 页)。除了任何常规载体与活性成分不相容外,可设想其治疗性组合物或药物组合物中的用途。

[0114] 根据本发明的药物组合物产品 (作为固定组合,或者作为试剂盒,例如作为用于一个或两个组合伴侣的固定组合和单独制剂的组合或者作为组合伴侣的单独制剂的试剂盒) 包含本发明的组合伴侣 (至少一个 MET 酪氨酸激酶抑制剂、至少一个 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂、和任选地一个或多个其它助剂) 以及一种或多种药学上可接受的载体材料 (载体、赋形剂)。这些组合产品或构成该组合产品的组合伴侣可以被配制成用于特定的给药途径,例如口服给药、胃肠外给药、和直肠给药等。另外,本发明的组合产品可以采用固体形式 (包括但不限于胶囊、片剂、丸剂、颗粒剂、粉剂或栓剂) 来制备,或者采用液体形式 (包括但不限于溶液、悬浮液或乳剂) 来制备。该组合产品和 / 或它们的组合伴侣可以经历常规的制药生产操作 (例如灭菌), 并且 / 或者可以含有常规的惰性稀释剂、润滑剂、或缓冲剂、以及辅助剂 (例如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂和缓冲剂等)。

[0115] 在所有制剂中,构成本发明组合产品一部分的活性成分可以各自以相应制剂(关于这种制剂,亦即没有包装和传单)的 0.5 至 95 重量%,例如 1 至 90、5 至 95、10 至 98 或者 10 至 60 或者 40 至 80 重量%的相对含量而存在。

[0116] 对于约 50-70kg 的受试对象,本发明的药物组合物产品可以例如分别以约 1-1000mg、或约 1-500mg、或约 1-250mg、或约 1-150mg、或约 0.5-100mg、或约 1-50mg、或 50 至 900、60 至 850、75 至 800 或者 100 至 600mg 的任何一个活性成分或者尤其是活性成分的总和而存在于单位剂量中。化合物、药物组合物、或者其组合的治疗有效剂量取决于受试对象的种属、体重、年龄和个体的病情、被治疗病症或疾病或者其严重程度。具有一般技能的医生、临床医生或兽医可以容易地决定预防、治疗或抑制病症或疾病进展所必需的各活性成分的有效量。

附图说明

[0117] 图 1:在 MET 抑制剂 (E)-2-(1-(3-((7- 氟喹啉 -6- 基) 甲基) 咪唑并 [1, 2-b] 哒嗪 -6- 基) 亚乙基) 肼甲酰胺 (化合物 A) 的存在下,对具有 cMET 扩增和 MET 依赖性生长的 MKN-45 细胞的初级分泌蛋白质组挽救。

[0118] 图 2:在 FGFR 抑制剂 3-(2, 6- 二氯 -3, 5- 二甲氧基 - 苯基)-1-{6-[4-(4- 乙基哌嗪 -1- 基)- 苯基氨基]- 嘧啶 -4- 基}-1- 甲基脲一磷酸盐 (BGJ398) 存在下,对具有 FGFR3 基因扩增和 FGFR3 依赖性生长的 RT-112 细胞的初级分泌蛋白质组挽救。

[0119] 图 3:在 MET 依赖性 MKN-45 细胞中利用选择性抑制剂对挽救的反转表明 MET 抑制剂化合物 B 与 BGJ398 (FGFR 抑制剂) 组合时是有活性的,而 BGJ398 和 (双重 Erb2 和) EGFR 抑制剂拉帕替尼是不充分的。化合物 B = 2- 氟 -N- 甲基 -4-[(7- 喹啉 -6- 基 - 甲基) - 咪唑并 [1, 2-b] 三嗪 -2- 基] 苯甲酰胺 (MET 抑制剂), FGF7 = 成纤维细胞生长因子 7 (FGFR 的激活剂)、拉帕替尼 = (ErbB2 和) EGFR 抑制剂, NRG1 = 神经调节蛋白 1 (增加 ERBB2 酪氨酸磷酸化)。

[0120] 图 4:在 MET 依赖性 MKN-45 细胞中利用选择性抑制剂对挽救的反转表明 MET 抑制剂化合物 A 与 BGJ398 (FGFR 抑制剂) 组合时是有活性的,而 BGJ398 和 (双重 Erb2 和) EGFR 抑制剂拉帕替尼是不充分的。FGF7 = 成纤维细胞生长因子 7 (FGFR 的激活剂)、拉帕替尼 = (ErbB2 和) EGFR 抑制剂, NRG1 = 神经调节蛋白 1 (EGFR 的激活剂)。

[0121] 图 5:在 EGFR 依赖性 RT-112 细胞中利用选择性抑制剂对挽救的反转表明 EGFR 抑制剂 BGJ398 与化合物 B 组合时是有活性的,而单独的化合物 B 以及 (双重 ErbB2 和) EGFR 抑制剂拉帕替尼是不充分的。HGF 和 NRG1 是如图 3 中所示。

[0122] 图 6:在 EGFR 依赖性 RT-112 细胞中利用选择性抑制剂对挽救的反转表明 EGFR- 抑制剂 BGJ398 与化合物 A 组合时是有活性的,而单独的化合物 A 以及 (双重 ErbB2 和) EGFR 抑制剂拉帕替尼是不充分的。HGF 和 NRG1 是如图 3 中所示。

[0123] 图 7:显示不同组合的协同作用(用实线框标示的区域表示协同作用):

[0124] A) 在 KYM-1 单层培养物中化合物 B 与 BGJ398;

[0125] B) 在 KYM-1 非粘附培养物中化合物 B 与 BGJ298;

[0126] C) 在 KYM-1 软琼脂培养物中化合物 B 与 BGJ398;

[0127] D) 在 MG-63 单层培养物中化合物 B 与 BGJ298;

[0128] E) 在 M-63 软琼脂培养物中化合物 B 与 BGJ298 ;

[0129] F) 在 Hs 683 单层培养物中化合物 B 与 BGJ398。

[0130] 图 8 :显示在基于 Loewe 模型相对于药物自身组合的总有效水平方面的协同作用。化合物浓度处于微摩尔等级,设计是如图 7 中所示。

[0131] 图 9 :FGFR 和 MET 抑制剂组合在原发性肺癌异种移植模型中的抗肿瘤活性。(A) 在用指定方案治疗的荷瘤小鼠组群中的肿瘤生长曲线。箭头标示化合物 B 的给药频率从每日 2 次降低至 1 次。1 = 赋形剂对照 (圆圈)、2 = 10mg/kg 化合物 B (一日两次)/(一日一次), 3 = 40mg/kg BGK398 (一日一次), 4 = 组合。(B) 在最后一次化合物 B 给药后 2 小时或 12 小时利用 ELISA 对肿瘤中 MET 磷酸化的分析。1 = 赋形剂对照 (圆圈), 0 = 10mg/kg 化合物 B (一日两次), 3 = 40mg/kg BGJ398 (一日一次), 4 = 组合。

[0132] 对附图的描述也是本发明公开内容的一部分。

具体实施方式

[0133] 实施例

[0134] 下面的实施例是用来说明本发明并提供具体实施方式,然而它们并不限制本发明的范围:

[0135] BCA 蛋白质测定 = 基于双缩脲反应的测定 (利用碱溶液中的蛋白质将 Cu (II) 还原成 Cu (I) 阳离子,并且二辛可宁酸用作显色剂,该显色剂将螯合被还原铜因而产生在 562nm 处具有强吸收的紫色络合物)。

[0136] ECL = 增强的化学发光 (在发光氨的辣根过氧化物酶和过氧化氢催化氧化期间的发光)。

[0137] 细胞培养和试剂

[0138] MET 依赖性腺癌细胞系 MKN-45、KYM-1 横纹肌肉瘤细胞系和 MG-63 骨肉瘤细胞系是从 Health Science Research Resources Bank (日本 Health Sciences Foundation) 获得。FGFR 依赖性膀胱癌 RT-112 是从 Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 获得。Hs-683 胶质瘤细胞系和 HEK 293T/17 细胞、表达 SV40 大 T 抗原的人肾细胞系是从“美国典型培养物收藏中心”购得。化合物 A、化合物 B 和 BGJ398 是在 Novartis 公司内部合成。

[0139] 分泌蛋白质组库的生成

[0140] 建立生物信息学管道来鉴定分泌的和单一的跨膜蛋白;类似于前述方法 (Gonzalez, R. 等人, PNAS, 2010 ; Lin, H. 等人, Science, 2008)。简言之,将所有的人 RefSeq 蛋白质序列 (含有 27959 个蛋白质的 2004 年 6 月版本) 经过数据库 SWISSPROT 和 INTERPRO 进行过滤,用于以前的标注如分泌的或跨膜蛋白 (Hunter, S. 等人, Nucleic Acids Res, 2009 ; O' Donovan, C. 等人, Brief Bioinform, 2002)。然后用确定信号序列和跨膜螺旋的算法来分析蛋白质序列: TMHMM、信号 P、和 PHOBIUS (Bendtsen, J. D. 等人, J Mol Biol, 2004 ; Kall, L. 等人, J Mol Biol, 2004 ; Krogh, A. 等人, J Mol Biol, 2001)。选择 2803 个唯一的基因标识符并且定位到 3432 个克隆;所有的是从 Invitrogen Ultimate ORF 收藏 (Invitrogen Ultimate ORF collection) 获得并且利用标准技术分离出 DNA。pcDNA-DEST40 是用于所有克隆的质粒载体,并且通过全测序来确认全部的克隆插入物。

[0141] 实施例(A) 分泌蛋白质组学筛选(图1和图2)

[0142] 上清液的制备:以4u1/孔的量和7.5ng/u1的浓度将来自前述克隆的DNA标记于(stamped)澄清的经组织培养物处理的384孔板中。将标记物(Stamps)在-20℃下冷冻保存直到使用。在实验这天,将标记的cDNA板解冻并且平衡到室温。以如下方式将HEK293T/17细胞反转染:将Fugene HD稀释于Optimem以获得4:1的最终比率(n1 Fugene HD:ng DNA)。以10u1/孔将稀释的转染试剂添加到标记的DNA板中,使其在室温下温育30分钟。然后以7,000细胞/50u1/孔添加HEK293T/17细胞并在标准组织培养条件下温育4天,以便允许分泌的蛋白质在培养基上清液中蓄积。

[0143] MKN-45分泌蛋白质组筛选:以3000细胞/20u1 DMEM+10% FBS/孔将MKN-45细胞涂布在白色的、经组织培养物处理的384孔板(Greiner公司)中,使其附着过夜。然后,利用Biomek FX液体处理装置(Beckman Coulter公司)以降低的移液速度将取自库转染的HEK293T/17细胞的上清液以30u1/孔转移至MKN-45细胞,以使HEK293T/17单层的分布最小化。作为阳性对照,将纯化的蛋白质rhEGF和rhNRG1-β1(R&D Systems公司)添加到各板上的分离的孔中以获得150ng/ml的最终浓度;将取自模拟转染的HEK293T/17孔的上清液转移,作为中性对照。在添加上清液和纯化的蛋白质对照之后,以10u1/孔添加稀释于DMEM中的化合物A以便获得100nM的最终测定浓度。在96小时的温育后,利用细胞Titer-Glo发光细胞生存力测定系统(Promega公司)来测量生长。简言之,将30u1细胞Titer-Glo试剂添加到所有孔中,然后在室温下温育15分钟,然后在Viewlux板阅读器(Perkin Elmer公司)上读出发光性(图1)。

[0144] RT-112分泌蛋白质组筛选:基本形式等同于MKN-45分泌蛋白质组筛选且有稍微修改。以1000细胞/20u1/孔将RT-11细胞涂布在白色的经组织培养物处理的384孔板中的EMEM+10%上,使其附着过夜。按上述关于MKN-45分泌蛋白质组筛选所述,将取自库转染的HEK293T/17细胞的上清液转移。以150ng/ml的最终浓度添加纯化的蛋白质rhNRG1-β1和rhTGFα,作为阳性对照。在添加上清液和纯化的蛋白质对照之后,以10u1/孔添加稀释于DMEM中的BGJ398,以获得100nM的最终测定浓度。72小时后,以如上所述方式利用细胞Titer-Glo测量细胞生存力(图2)。

[0145] 在这两个筛选中,利用以下公式将测定数据针对仅有载体的对照进行标准化:

[0146]

$$\text{标准化活性} = 100 \times \left(\frac{X - \text{载体}_{\text{中间值}}}{\text{载体}_{\text{中间值}}} \right)$$

[0147] 其中X是原始数值,载体_{中间值}是给定板的载体对照孔的中间值。

[0148] 对纯化蛋白质的确认:除了以30u1/孔添加纯化的蛋白质来代替HEK293T/17上清液以获得100ng/ml的最终浓度外,纯化蛋白质确认的测定形式等同于用于初步筛选的形式。

[0149] 实施例(B):利用选择性抑制剂对挽救的反转(图3、图4、图5、图6)

[0150] MKN-45双重抑制:以3000细胞/20u1/孔将MKN-45细胞播种于384孔板中并温育过夜。在DMEM+10% FBS中制备rhFGF7和rhNRG-1的溶液,然后以30u1/孔添加该溶液以获得250ng/ml的最终浓度(每次处理一个纯化的蛋白质)。在DMEM中制备以下的单一和双重抑制处理剂并且以10μL/孔添加该处理剂:化合物A、化合物B、BGJ398、拉帕替尼、

化合物 A 和 BGJ398、化合物 B 和 BGJ398、化合物 A 和拉帕替尼、化合物 B 和拉帕替尼。各化合物的最终浓度（无论是单独的或者组合的）如下：化合物 A 和化合物 B 为 100nM、BGJ398 为 500nM、拉帕替尼为 1.5 μ M。96 小时后，以如前所述方式用细胞 Titer-Glo 测量细胞生存力（图 3、图 4）。

[0151] RT-112 双重抑制：RT-112 双重抑制实验的形式类似于 MKN-45 中所描述的形式且具有以下修改。以 1000 细胞/20 μ l/孔，涂布 RT-112 细胞。添加 rhHGF 和 rhNRG-1 的溶液，以获得 250ng/ml 的最终浓度。以如下方式准备单一和双重抑制条件：BGJ398、化合物 A、化合物 B、拉帕替尼、BGJ398 和化合物 A、BGJ398 和化合物 B、BGJ398 和拉帕替尼。各化合物的最终浓度（无论是单独还是组合）如下：BGJ398 为 100nM、化合物 A 和化合物 B 为 500nM、拉帕替尼为 1.5 μ M。96 小时后，以如前述方式利用细胞 Titer-Glo 测量细胞生存力（图 5、图 6）。

[0152] Western 印迹法（图示未示出）

[0153] 在纯化蛋白质（rhFGF7、rhNRG1- β 1、或 rhHGF）和 / 或抑制剂（化合物 B、化合物 A、BGJ398）存在或不存在下，将 MKN-45 和 RT-112 细胞在 6 孔板中处理 2 小时和 18 小时。在用冰冷却的 PBS 清洗后，用含有磷酸酯酶（Thermo 公司）和蛋白酶（Roche 公司）抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液（Thermo 公司）使细胞溶解。利用二辛可宁酸蛋白质测定（Pierce 公司）对总蛋白质进行定量。利用在 NuPAGE SDS-PAGE 4-12% BIS-Tris 凝胶上的电泳分解 20 μ g 的等分试样，然后转移到硝酸纤维素膜。在室温下对膜进行 1 小时阻断，然后在 4 $^{\circ}$ C 下利用以下的一级抗体（来源于兔，1:1000 最终稀释）温育过夜：抗磷酸化 Akt (Ser473) 抗体、抗 - 磷酸化 -MET (Tyr1234/1235) 抗体、抗磷酸化 MAPK/ERK (1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体、抗 -AKT 抗体、抗 -MAPK/Erk (1/2) 抗体、和抗 α / β -微管蛋白抗体。以 1:800 最终稀释测定抗 MET 抗体。将内部抗体用于磷酸化 -FRS2 (Y346) (1:1500 稀释)。然后在添加二级抗体之前将膜在 PBS+0.1% Tween 中清洗 3 次，IRDye 680LT 羊抗兔 IgG，稀释 1:15000。1 小时后在室温下清洗膜，利用 Odyssey 红外成像仪使各带可视化。

[0154] 结果和讨论：因为我们没有证据表明利用 cDNA 转染产生足够量的活性蛋白质，所以我们试图以正交方法来验证在筛选期间所观察到的挽救作用确实是由预期的分泌蛋白质所介导。为此目的，我们在相同的细胞增殖测定中对从商业来源获得的重组蛋白质进行了测试。我们最初测试了在 MET 抑制剂化合物 B 存在下重组 FGFs 的组件以及 EGF 和 NRG1- β 挽救 MKN-45 的潜能（数据未示出）。可以用数个 FGF 和 EGF 家族成员确认挽救。作为另一个验证步骤，我们试图证明配体的作用是通过将它们同源 RTKs 激活而介导。为此目的，我们使用特定的用于 FGFR1/2/3 的抑制剂 BGJ398 和用于 HER1/2 的拉帕替尼来反转挽救（图 3、图 4）。这些实验是用化合物 A（图 4）和同样地选择性 MET 抑制剂化合物 B（图 3）这两者而完成。正如预计的，BGJ398 可以选择性地反转由 FGF7 介导的挽救，而拉帕替尼反转由 NRG1 介导的挽救。为了研究共同的下游信号是否导致所观察到的挽救作用，我们利用 Western 印迹法分析了 MET 抑制的结果、由配体介导的挽救、和由抑制剂介导的对蛋白质磷酸化水平的反转。在添加的配体不存在的情况下，仅化合物 A 和化合物 B 但并非 BGJ398 或拉帕替尼对 MET 扩增的细胞系 MKN-45 中的若干蛋白质（MET、ERK1/2、AKT、FRS2）的磷酸化具有明显的作用。FGF7 的添加重新激活 FRS2 磷酸化（是特定的 FGFR 的下游标记物）并且同时部分地重新激活 ERK1/2 磷酸化并且对 AKT 磷酸化没有作用或者具有极小的作用。此

挽救作用可以被 BGJ398 而不是拉帕替尼所反转。NRG1 利用对拉帕替尼特别敏感的更明显的磷酸化 AKT 重激活而诱发类似的效果。总之,所观察到的对蛋白质磷酸化的作用与对细胞增殖的作用是一致的。ERK 磷酸化的重激活更加一致地被 FGF7 和 NRG1 重激活,因此似乎在维持此细胞系中的细胞生长中发挥主导性作用。然后我们转向最初的 FGFR 依赖性癌细胞系 RT-112 并进行了类似的验证实验。发现重组 HER 配体以及 HGF 重现了在分泌蛋白质组筛选中所观察到的挽救作用。而且,对同源 RTKs 的选择性抑制可以反转由 HGF 或 NRG1 所介导的挽救(图 5、图 6)。最后,利用 Western 印迹法来评估对所选择蛋白质的磷酸化的作用。在 RT-112 细胞中,我们未观察到基础 AKT 磷酸化。在配体不存在的情况下,化合物 A 和 B 特异性地抑制 MET 磷酸化,而 BGJ398 降低 FRS2 和 ERK 这两者的磷酸化。在 BGJ398 存在下添加 HGF 恢复 ERK 磷酸化,而化合物 A 或 B 的同时添加阻止此挽救作用。同样地,NGR1 导致 ERK 磷酸化的拉帕替尼敏感性恢复而且还刺激 AKT 的磷酸化。此外,ERK 的磷酸化似乎与细胞生长比与 AKT 磷酸化具有更好的相关性。

[0155] 共同地,这些结果表明:如果利用基因变化或者由同源配体同时地将这些 RTK 中的两个激活,那么 HER、MET 和 FGFR 抑制剂的成对组合对于疗效是必需的。虽然在目前为止所描述的实验中从外部来源添加配体,但癌症患者中的配体也可来源于肿瘤自身(自分泌刺激)或其它来源例如肿瘤相关基质(旁分泌刺激)。

[0156] 实施例 (C):组合测定(参见图 7)

[0157] 在 96 孔板中采用下面所描述的浓度矩阵,在 KYM-1、MG-63 和 Hs-683 细胞中测量了化合物 B(在下表中“B”)与 BGJ398(在下表中“C”)的组合性抗增殖作用:

[0158]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b	-	DMSO	C1	C1+B6	C1+B5	C1+B4	C1+B3	C1+B2	C1+B1	B1	-	-
c	-	DMSO	C2	C2+B6	C2+B5	C2+B4	C2+B3	C2+B2	C2+B1	B2	-	-
d	-	DMSO	C3	C3+B6	C3+B5	C3+B4	C3+B3	C3+B2	C3+B1	B3	-	-

[0159]

e	-	DMSO	C4	C4+B6	C4+B5	C4+B4	C4+B3	C4+B2	C4+B1	B4	-	-
f	-	DMSO	C5	C5+B6	C5+B5	C5+B4	C5+B3	C5+B2	C5+B1	B5	-	-
g	-	DMSO	C6	C6+B6	C6+B5	C6+B4	C6+B3	C6+B2	C6+B1	B6	-	-
h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0160] 所采用的浓度:

[0161]

化合物 B	μM	BGJ398
B1	1.0000	C1
B2	0.2500	C2
B3	0.0625	C3
B4	0.0155	C4
B5	0.0039	C5
B6	0.0010	C6

[0162] 用相应体积的生长培养基填充用连字符标记的孔。在一些实验中,化合物 A 的最大浓度 10 倍更低,但稀释步骤仍然与上述的相同。

[0163] 使细胞在三种不同条件下生长(见图 7):在普通的组织培养板中进行标记为“单层”的实验,允许细胞粘附并最终形成单层。如上所述,在每次实验中以 5000 细胞/孔的密度将细胞播种于在 3 个板上(一式三份)的标准生长培养基中。将细胞播种于单独板上的 6 到 8 个孔中,对添加化合物的时间点的活细胞量进行定量。24 小时后,以开始于 10mM DMSO 储备液,以 10 倍的最终浓度,在生长培养基中制备各化合物的单独稀释系列。按指示的方式包括仅有 DMSO 的对照。按照上面示出的矩阵,添加各化合物稀释物的 10 μL 等分试样,形成 100 μL 的最终体积。与此同时,利用刃天青钠盐染料还原读数对在上述单独板上的活细胞进行定量。具体地,向每个孔中添加 10mL 的 0.13mg/mL 储备液,将各板在细胞培养温育箱中温育 2 小时,然后测量吸收值(激发 560nm,发射 590nm)。将经化合物处理的细胞温育 72 小时,接着以如上所述方式进行刃天青测定。通过以下方式计算抑制百分比:(a) 减去添加化合物时播种细胞的读数;和 (b) 将仅用 DMSO 处理的细胞设定为 0%抑制且将播种细胞的读数设定为 100%抑制。因此,超过 100%的值表明在与化合物共同温育的过程中细胞死亡。利用 G. R. Zimmermann 等人, Drug Discovery Today, 第 12 卷,第 1/2 期,2007,第 34 至第 42 页,特别是 J. Lehár 等人, Nature Biotechnology 第 27 卷,第 7 期,2009,第 659 至 666 页中所描述的方法来完成对协同作用的定量分析;简言之通过反复由单药反应曲线计算在各剂量矩阵点处的 Loewe 相加反应 $I_{\text{Loewe}}(X,Y)$,然后求出 I_{Loewe} 与实验数据之间的差值的总和。如果该和值大于来自仅添加 I_{Loewe} 数据的和值,那么提供协同作用(X、Y 分别是在 X 轴和 Y 轴上的药物 X 和药物 Y 的药物浓度)。

[0164] 除了使用 Costar® 超低粘附 96 孔板外,以同样方式在标记为“非粘附”的 KYM-1 细胞中进行实验。在这些板上细胞不能附着到塑料且以二维聚集体的形式生长。其它两个细胞系在这些条件下不生长。

[0165] 就标记为“软琼脂”的实验而言:将细胞埋入半固体培养基中以允许三维聚集体的形成。具体地,将 VII 型琼脂糖以 2.7% 的浓度溶解于 PBS。然后将该溶液保持于 50°C 直到即将进行涂布,和以如上所述方式用 2 倍体积的细胞系特异性生长培养基进行稀释。然后,将稀释的琼脂糖与含有各自细胞的 2 倍体积混合,150 μL 含有 3000 细胞的等分试样快速分布于 Costar 超低粘附 96 孔板上。因此,最终琼脂糖浓度为 0.3%。再次,对单独板上的孔中播种,以便在添加化合物的时间点对细胞的量进行定量。24 小时后制备化合物稀释系

列,使得总共 80 μ L 的稀释化合物在生长培养基中的覆盖将会导致在上述方案中的指定最终浓度,从而形成 230 μ L 的总体积。通过添加 20 μ L 刃天青溶液并温育培养 5 小时,而对播种的细胞进行定量。将经化合物处理的细胞温育培养 7 至 10 天,用刃天青对集落进行定量。以如上所述方式计算抑制百分比和协同作用。

[0166] Western 印迹法(数据未示出)

[0167] 以 500000 细胞/孔的密度将指定的细胞系播种于 6 孔板上,放置 24 小时以便附着,然后用 1 μ M 最终浓度的指定化合物处理另外的 24 小时。然后取出生长培养基,将细胞用冰冷却的 PBS 清洗二次并且在 50mmol/L Tris pH 7.5、120mmol/L NaCl、20mmol/L NaF、1mmol/L EDTA、6mmol/L EGTA、1mmol/L Benzamidin、0.2mmol/L PMSF、100mmol/L 钒酸钠、1% NP-40 中使细胞溶解。用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定澄清细胞溶解物的蛋白质浓度。利用在 NuPage 4-12% Tris-Bis Midi 凝胶上的 SDS-PAGE 将 80 μ g 各样品的蛋白质分离,转移到 PVDF 膜上,用如上面所列出的抗体进行测定。在清洗和与二级 HRP 连接的抗体进行温育后,利用 ECL 检测试剂使各带可视化。

[0168] 结果是:基因表达谱表明了 MET 和 FGFR1 的自分泌激活。

[0169] 两种 RTK 的同时激活可以是对选择性激酶抑制剂的原发性或获得性耐药性的原因。为了研究在确立的癌细胞系中是否发现通过自分泌环或者利用其它基因改变对各 RTK 的共同激活以及这是否调节对选择性 RTK 抑制剂的反应,我们基于名称为 Broad-Novartis 癌细胞系百科全书的一大组的癌细胞系分析了有效表达和拷贝数特征 (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>)。我们将我们的分析集中在 MET(由于相对的简单性——一个受体、一个配体)并且集中于 FGFR 家族(由于与 MET 的交叉效应的新发现)。由于发现 MET 的高水平扩增(如 MKN-45 中)与任何的 FGFR(as in RT-112)是相互排斥的,因而我们把注意力转向潜在的自分泌环。通过应用使用 MET、HGF、FGFR 和 FGF 的表达值的简单秩-序算法,我们确定了具有双重自分泌 RTK 激活潜能的细胞系。然后选择三个有前途且易于通过实验处理的候选者,用于组合研究(图 7)。已发现 KYM-1 横纹肌肉瘤细胞系表达高 MET 和 HGF 水平以及高 FGFR1 和 FGF20。在若干个实验设置中我们对这些细胞进行了体外测试:首先,我们使细胞在粘附板上在单层中生长。作为下一步骤,我们使用在半固体培养基存在或者不存在下的非粘附板。在这些条件下,特别是在半固体培养基中,细胞以更集中的方式生长,潜在地支持自分泌刺激并且更接近地类似于体内肿瘤。我们利用“棋盘格”布置对细胞与若干浓度的化合物 B 和 BGJ398 进行温育(图 7)。虽然 MET 抑制自身没有作用,但 FGFR 抑制导致部分的生长抑制。重要地,两种 RTK 的联合抑制比任一单药更强地抑制生长。当细胞以集聚体方式生长时此表现更加明显并且支持如下的假说:对 RTK 的共同激活可以减小对单个 RTK 的依赖性。在骨肉瘤细胞系 MG-63(高 MET/HGF、高 FGFR1/FGF18)中,我们在单层增殖测定中观察到类似的联合作用。出乎意料地,在半固体培养基中观察到使用单独 BGJ398 的强生长抑制并且在低浓度的 BGJ398 下(其中 FGFR1 的抑制会是不完全)化合物 B 的组合是相当有利的。虽然此结果仍然证明了 MG-63 细胞中对 FGFR1 和 MET 的同时激活,但 FGFR1 似乎是生长的主导性驱动因子。最后,我们对胶质瘤细胞系 Hs 683(高 MET/HGF,高 FGFR1/FGF7)进行了测试并且在单层测定中当同时抑制两种 RTK 时观察到明显增强的生长抑制(图 7F)。我们发现各化合物作为单药有效抑制其自身的标靶,但对下游信号转导蛋白 AKT 和 MAPK 的作用较不明显。重要地,在 ERK 磷酸化抑制的水平下组合作用在

各细胞系中是明显的,而 AKT 磷酸化并未受到影响。当在非粘附板中生长的 KYM-1 细胞中进行相同的分析时,我们观察到使用药物组合明显得多的对 ERK 磷酸化的联合作用和 AKT 磷酸化的轻微降低(数据未示出)。

[0170] 图 8 显示了基于 Loewe 模型相对于药物自身组合附加的(或降低的)作用水平(以百分比表示)。化合物浓度处于微摩尔等级。设计是如图 7 中所示。

[0171] 实施例(D):体内小鼠研究(图 8)

[0172] 在来源于患者的非小细胞肺癌异种移植植物 LXFL 1121 中,进行了体内抗肿瘤疗效研究。使异种移植植物在裸小鼠的皮下生长。使用赋形剂对照物、单独的化合物 B、单独的 BGJ398 或者这两种药物的联合,以指定的剂量和频率分别对八只荷瘤小鼠进行处理。应注意,在研究第 14 天在联合治疗组中观察到体重减轻之后,将化合物 B 的给药频率从每日二次减小到每日一次。在联合治疗组,在研究第 7 天后一只动物死亡,一只动物在研究第 18 天后死亡,原因未知。在指定日测量肿瘤体积,利用 Clarke, R, Breast Cancer Res. Treat., 41997 的方法来评估该联合治疗的协同作用。

[0173] 就药代动力学/药效动力学分析而言,在研究的第 21 天后将赋形剂组和仅化合物 B 组的动物处死,各一半的动物是在最后一次给药的 2 小时或 12 小时后处死的。采集血浆和肿瘤样品。在第 21 天后停止两个剩余组中的治疗并允许肿瘤重新生长以便获得足够的用于药效动力学分析的材料。在第 61 天,给予最后剂量的 BGJ398 或 BGJ398/ 化合物 B 组合,在 2 小时后将一半的剩余小鼠处死。在第一次给药的 12 小时后将第二剂量的化合物 B 给予联合治疗组,在 BGJ398 给药 24 小时后(亦即在最后一次化合物 B 给药的 12 小时后)将剩余的动物处死。

[0174] 在使用液氮冷却的钢钵体中手动将速冻的肿瘤样品粉碎。然后制备蛋白提取物。按照生产商的说明书使用 MSD 96 孔 MULTI-SPOT 磷酸化 (Tyr1349)/ 总 MET 测定 (Meso Scale Discovery 公司),对磷酸化 MET/ 总 MET 水平进行定量。

[0175] 同时地通过 UPLC/MS-MS 测定确定化合物 B 和 BGJ398 在血浆和肿瘤匀浆中的浓度。在将 25 μ l 内标混合物 (1 μ g/ml) 添加到分析等分试样的 (25 μ l) 血浆或 (100 μ l) 肿瘤匀浆中之后,通过添加 200 μ l 乙腈而使蛋白质沉淀。将上清液转移入新鲜的小玻璃瓶中。在蒸发至干后,将这些样品重新溶解于 60 μ l 乙腈/水 (1/1v/v) 中。在 ACQUITY UPLC BEH C18 柱中,用由 0.1% 甲酸溶解于水 (溶剂 A) 与 0.1% 甲酸溶解于乙腈 (溶剂 B) 的混合物所组成的流动相对一个等分试样 (5 μ l) 的此溶液进行分离。采用梯度程序以及 600 μ l/min 的流量。在用 95% 溶剂 A 进行平衡后,注入 5 μ l 的样品。在 0.25 分钟的潜伏期后,用 5-100% 溶剂 B 的线性梯度在 0.65 分钟的时间段内将样品洗脱,接着是 0.35 分钟的保持。通过在 0.25 分钟内重新平衡到初始条件而准备用于下一个样品的柱。将柱洗脱液直接导入由 Masslynx™4.1 软件所控制的三重四极杆质谱仪 TQD™ 的离子源。利用正离子电喷雾电离 (ESI+) 多反应监测对分析物进行 MS/MS 检测。分别将两种化合物的定量限 (LOQ) 设定为用于血浆和肿瘤匀浆的 2ng/mL 和 1ng/g (CV 和总偏倚小于 30%)。利用 QuanLynx™4.1 和 Excel™2007 进行回归分析和进一步的计算。基于来自校准曲线中的分析物/IS 的峰面积比回算出未知样品的浓度,所述校准曲线利用在从用赋形剂治疗动物中获得的空白血浆或组织中剧增的校准样品制成。

[0176] 结果:我们确定了显示异常高 FGFR1 表达连同高 MET 和 HGF 表达的肺癌模型。将

来源于此模型的携带异种移植物的老鼠随机分组入 4 个组,然后用赋形剂对照物、作为单药的化合物 B、作为单药的 BGJ398 或者这两种药物的组合进行处理。化合物 B 是以 10mg/kg 每日二次的剂量开始。以 40mg/kg 每日一次的剂量口服给予 BGJ398,两种药物在联合使用中采用相同的方案。由于组合组中的体重减轻,因而在 2 周后将化合物 B 的给药频率随意地减小到每日一次。在此设置下继续进行该研究直到第 18 天。

[0177] 与赋形剂对照相比,单独的化合物 B 仅具有非常轻微的、不具有统计学意义的抗肿瘤作用(图 8A)。相反,用作为单药的 BGJ398 进行治疗导致强肿瘤生长抑制,在 18 天的期间中导致稳定的疾病(停滞或稍微的进展)。两种 RTK 抑制剂的组合能够使肿瘤显著地消退。采用 Clarke 方法的统计分析表明协同作用。

[0178] 表. 对抗肿瘤作用和协同作用的评估

[0179]

	C	A(INC280)	B(BGJ398)	AB(组合)	A/C	B/C	A/C×B/C	A×B/C	差值	结果
肿瘤体积变化	309.6	333.6	-16.6	-67.8	1.078	-0.054	-0.058	-0.219	-0.16	协同作用

[0180] 利用由 Clark(2) 所提供的方法对组合数据的统计学意义进行评估,该方法可以基于有限的数据来估计相互作用。就化合物 A、B 或者组合 AB(与对照组 C)而言,采集最终值。当计算出 $AB/C > A/C \times B/C$ 时预测具有拮抗的相互作用,当计算出 $AB/C = A/C \times B/C$ 时预测具有相加的作用,当计算出 $A \times B/C < A/C \times B/C$ 时预测具有协同的相互作用。

[0181] 在细胞系 MG-63 中,获得类似的体外结果。

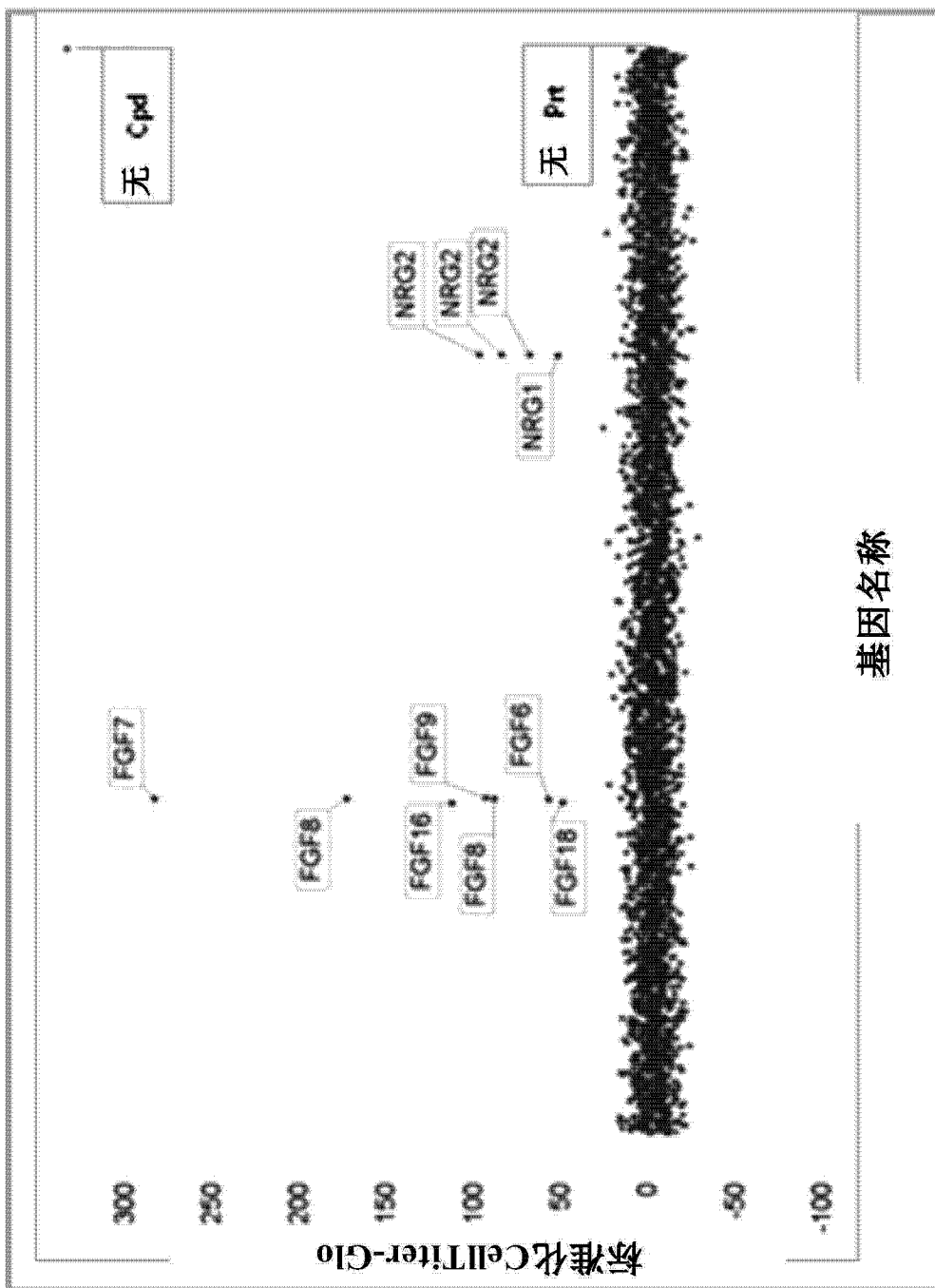


图 1

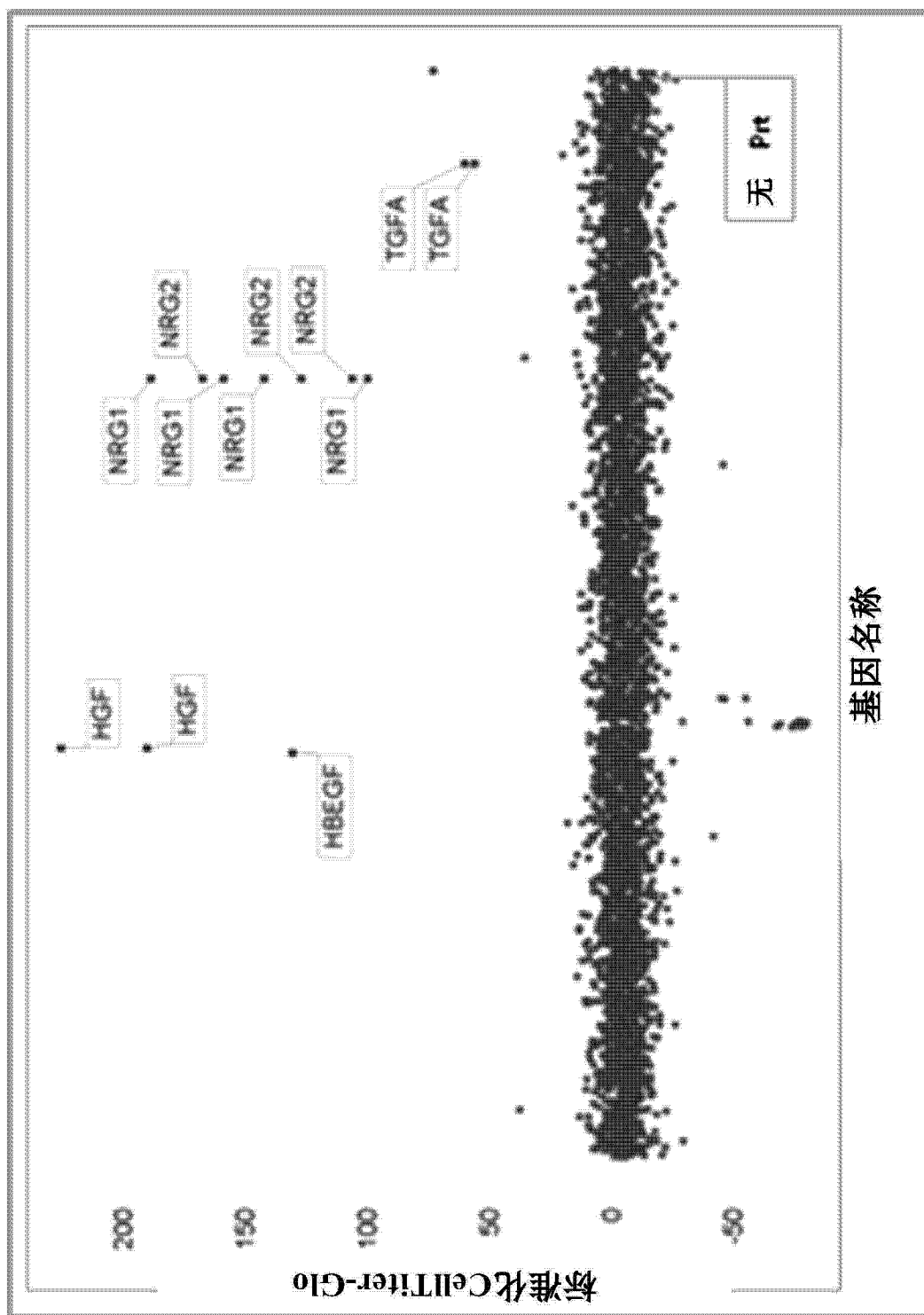


图 2

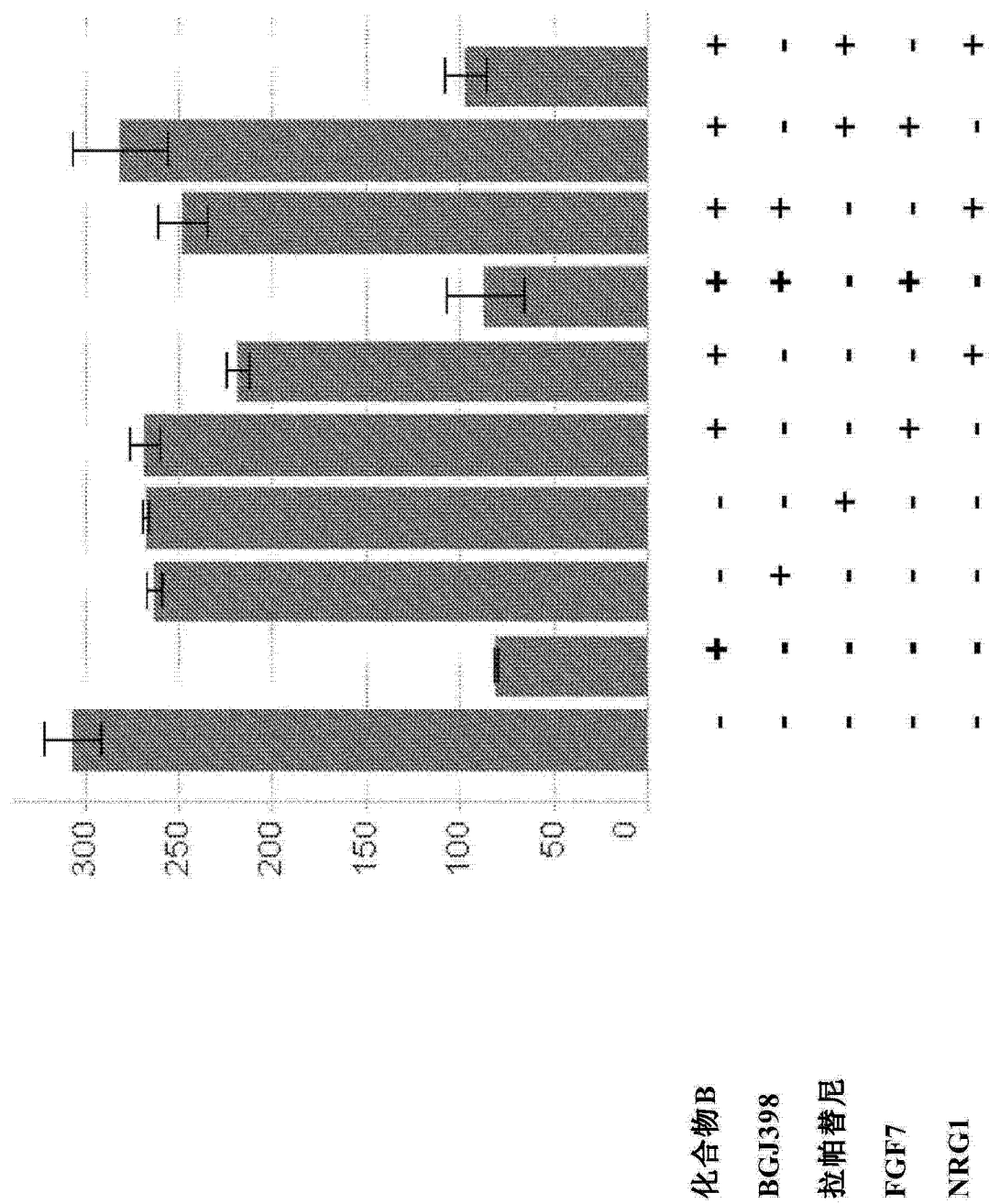


图 3

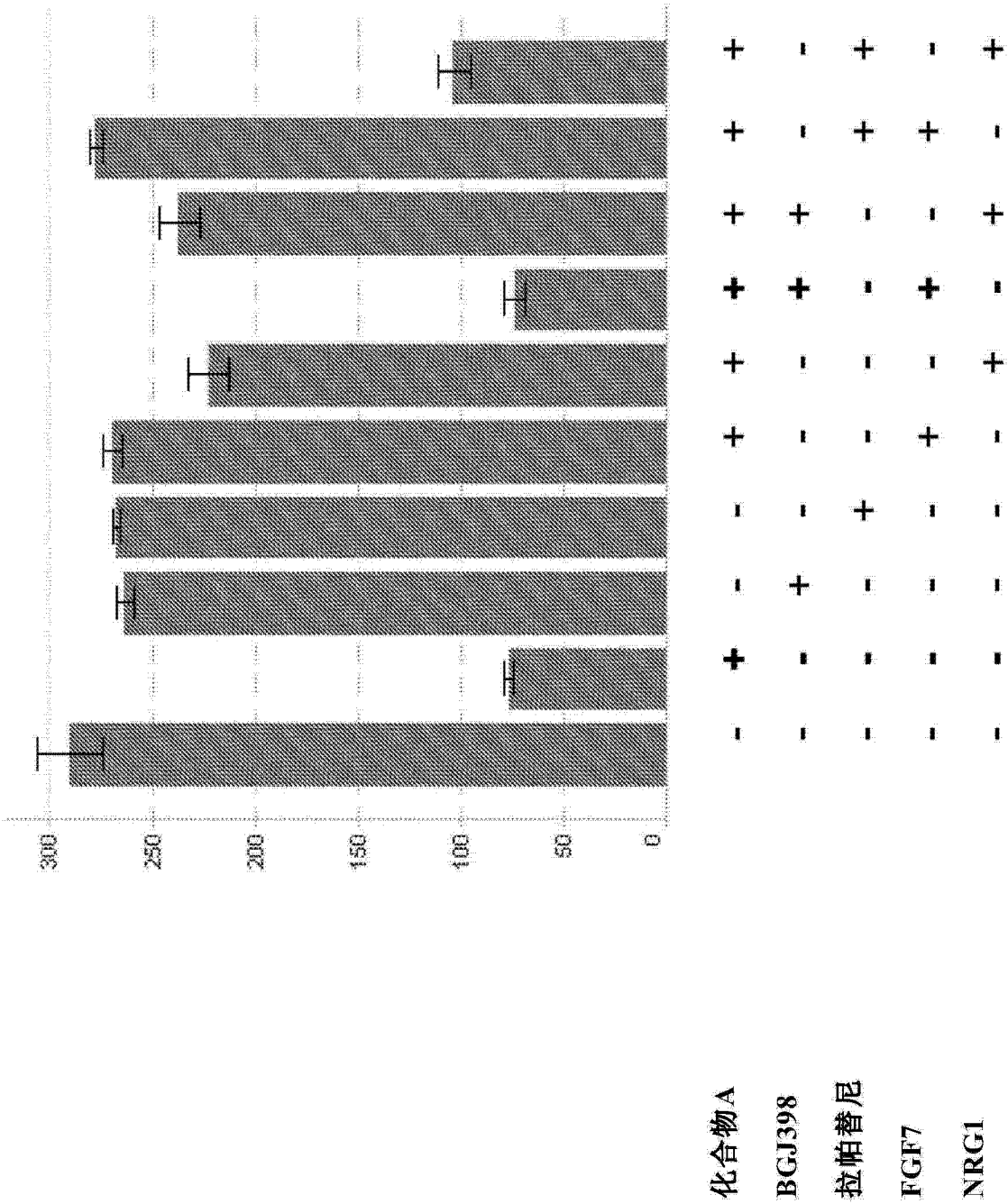


图 4

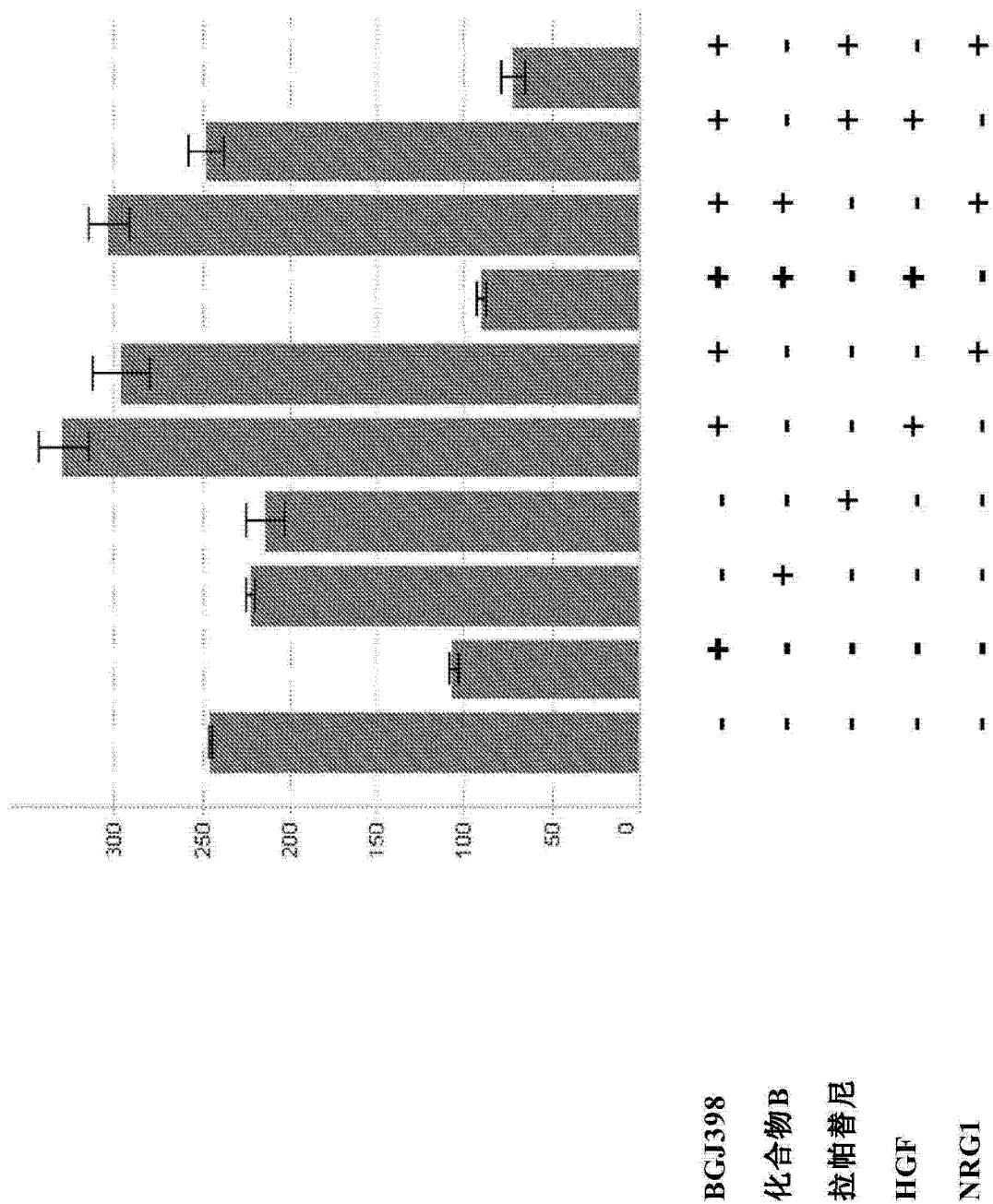


图 5

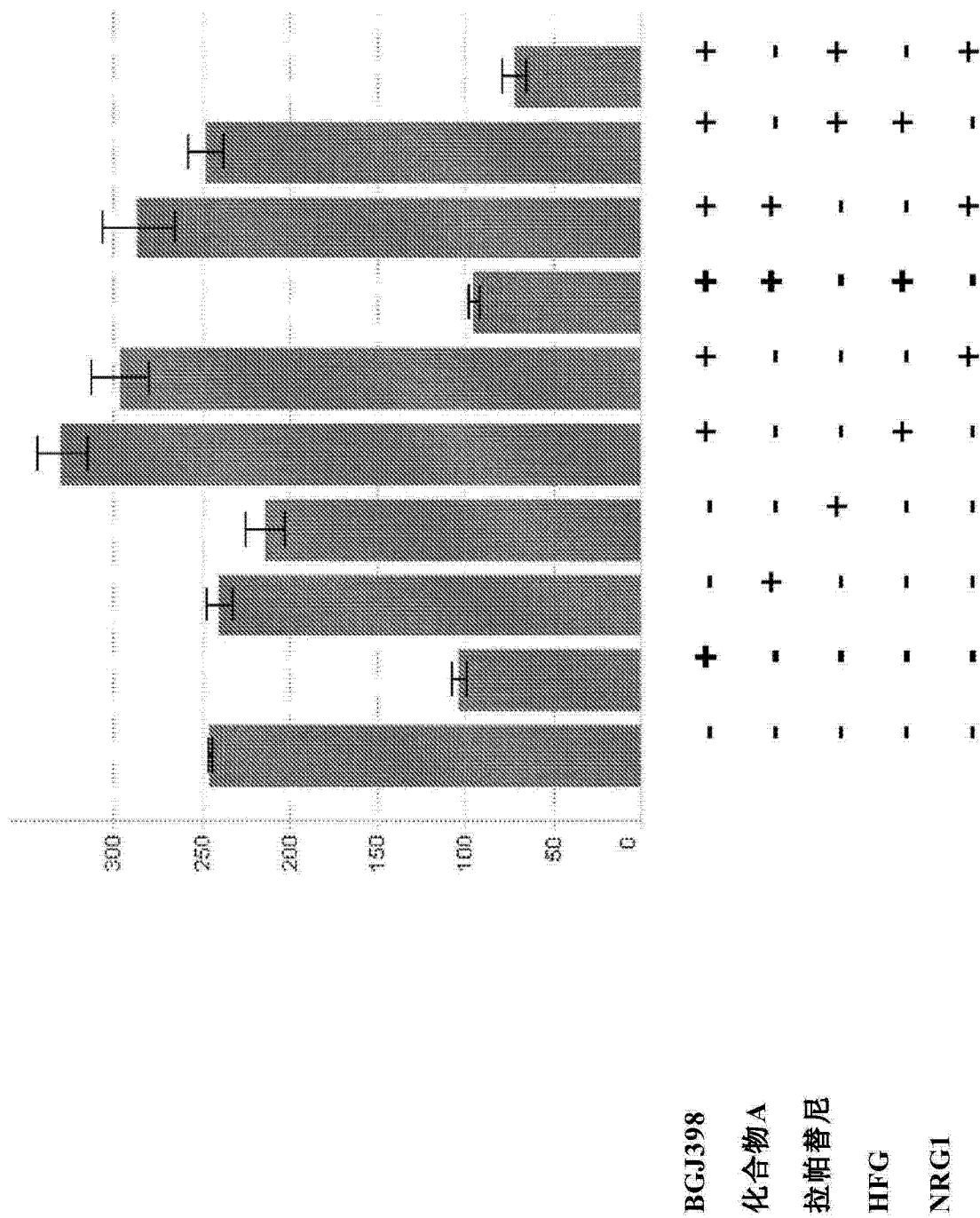


图 6

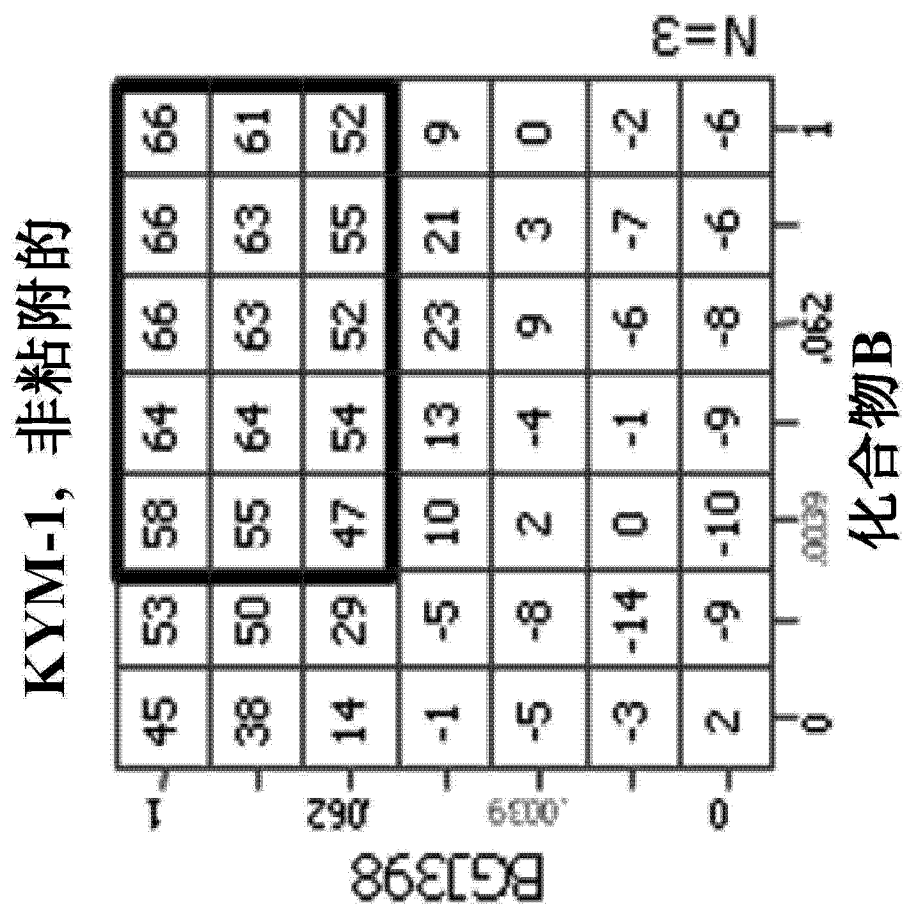


图 7B

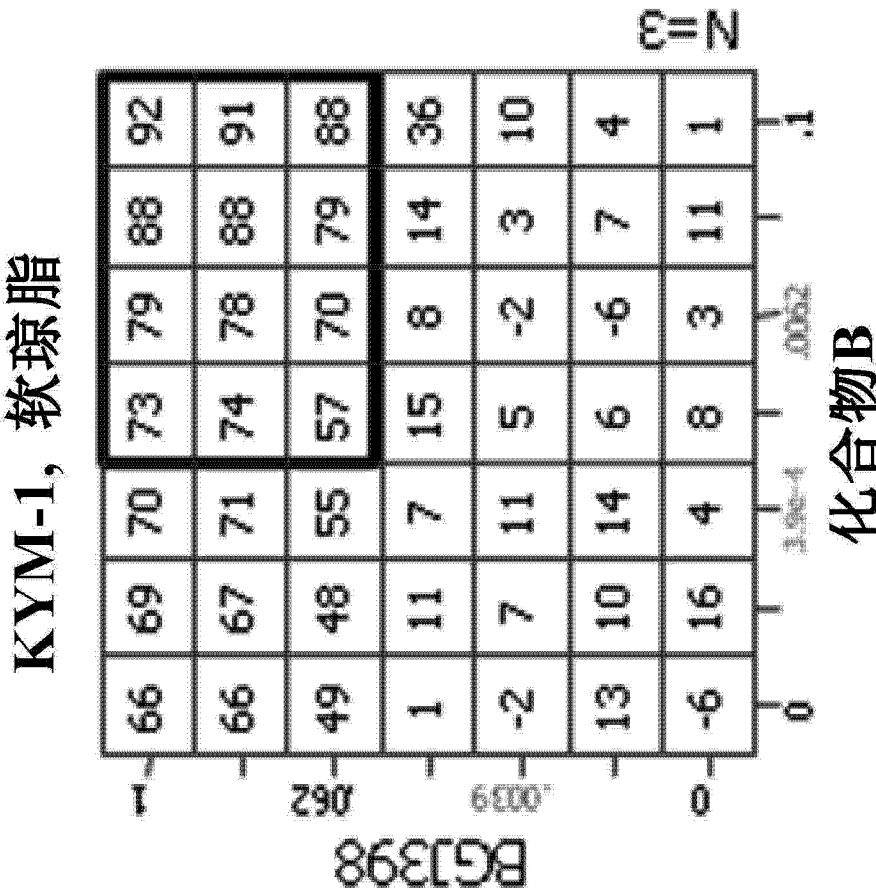


图 7C

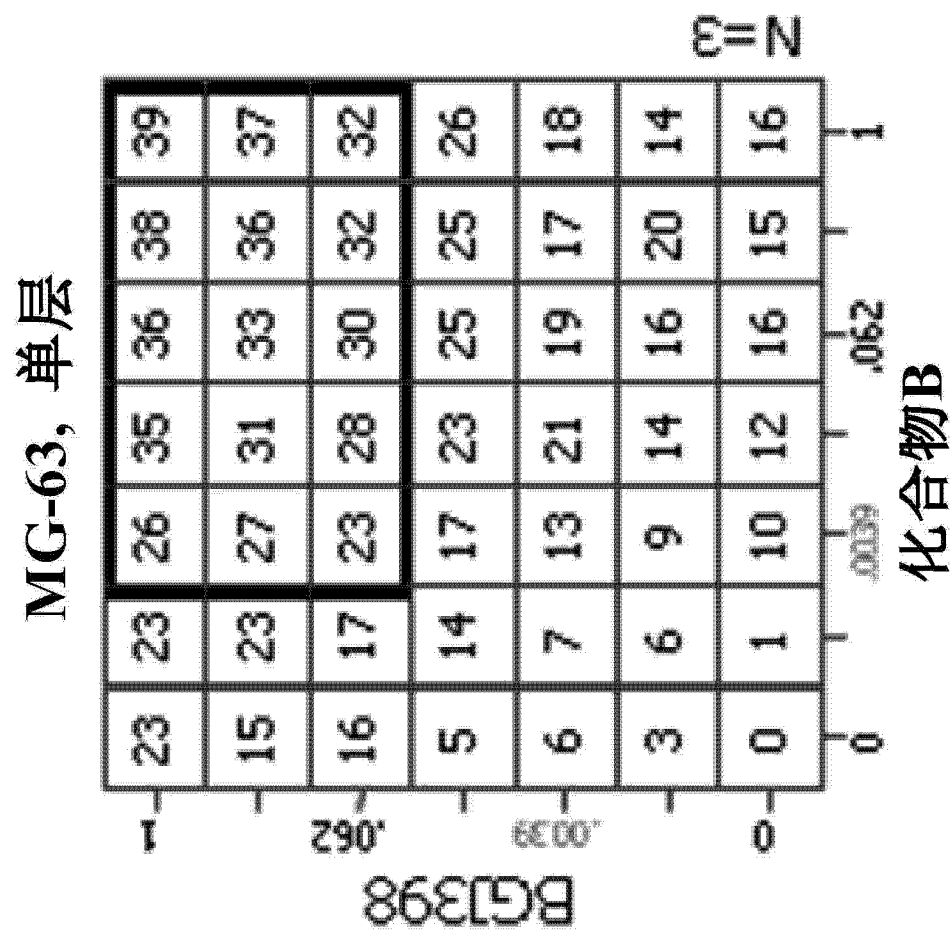


图 7D

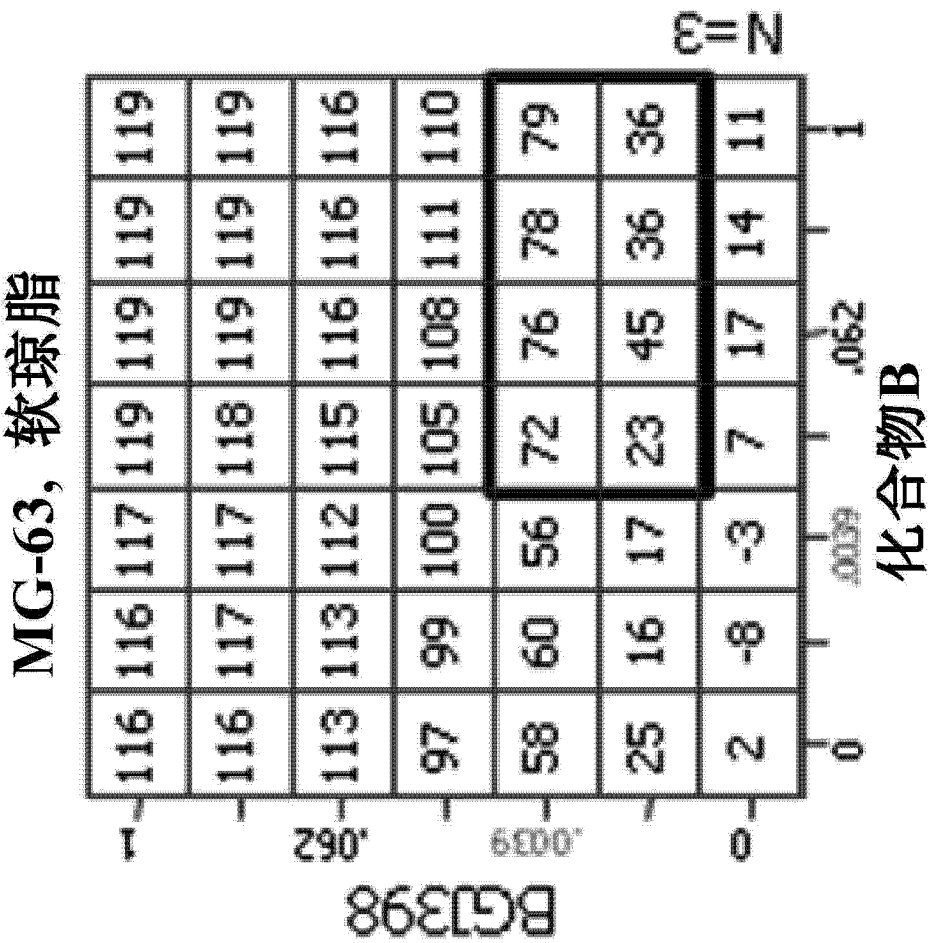


图 7E

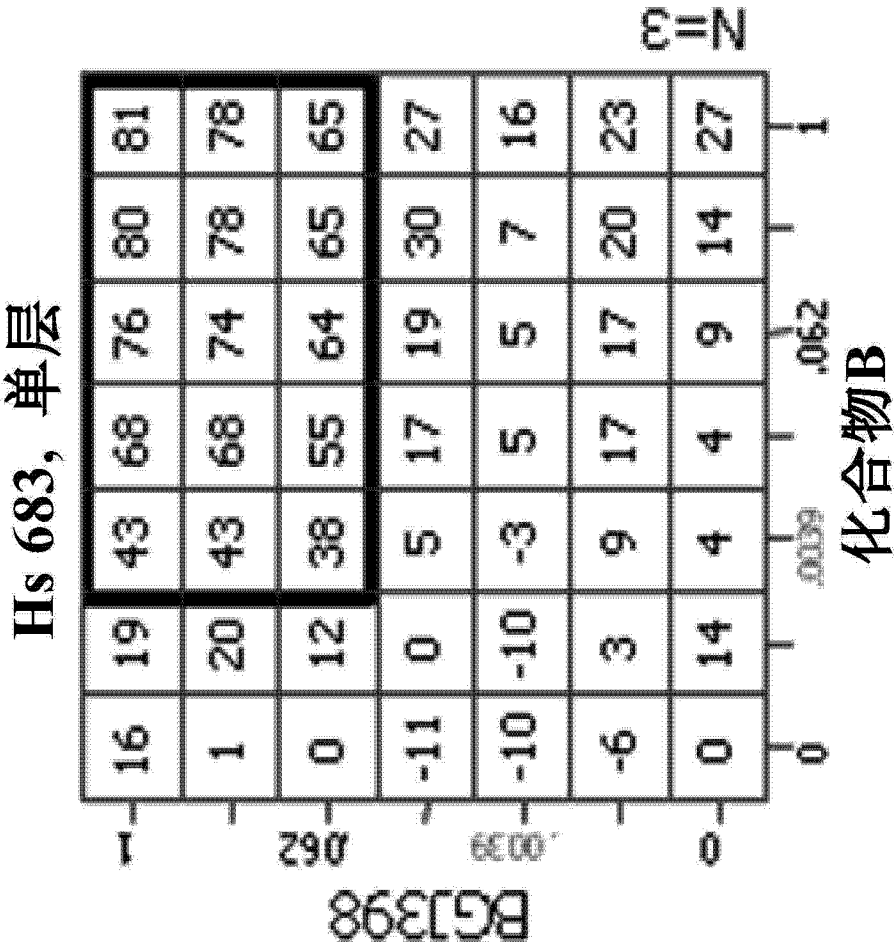


图 7F

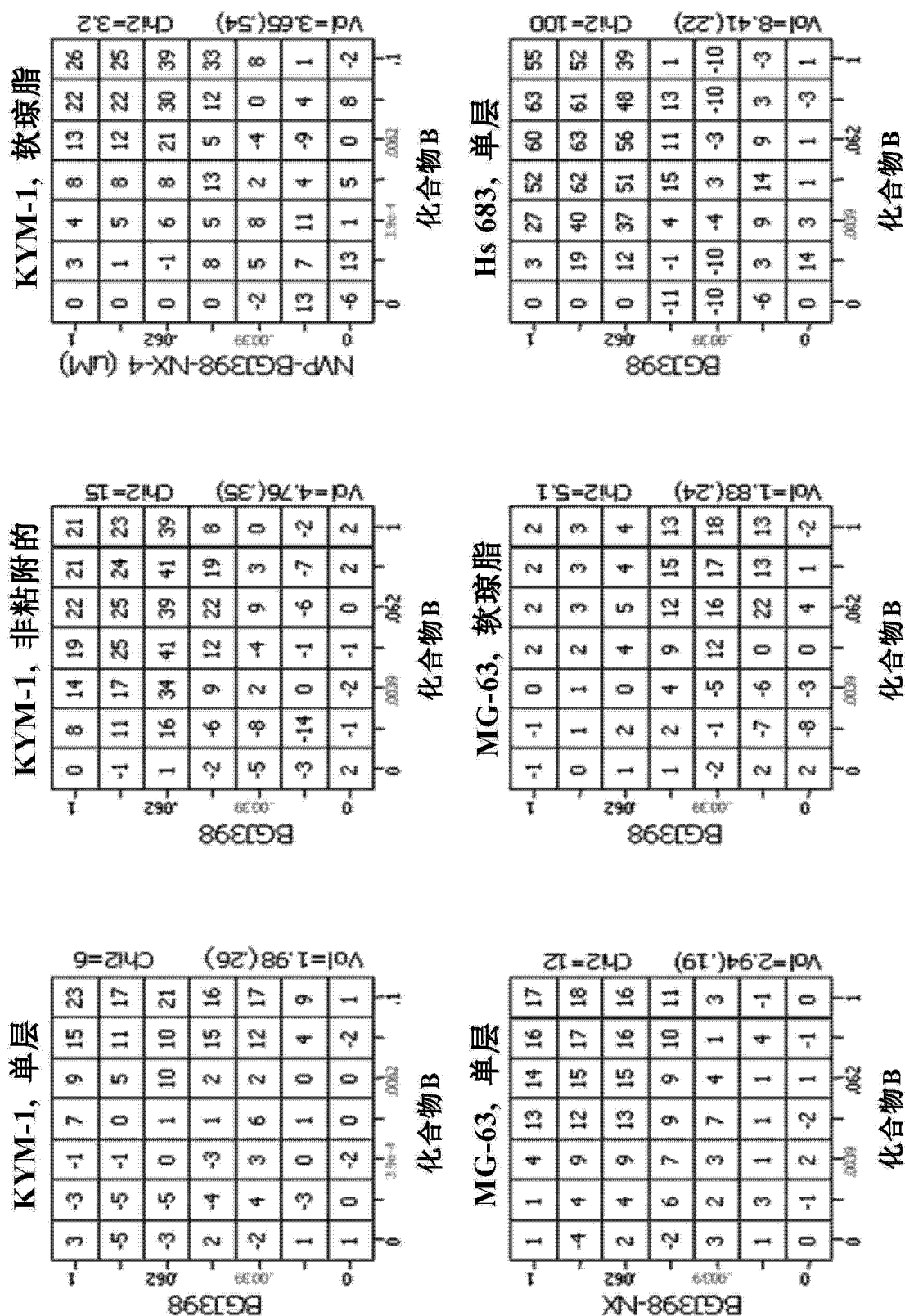


图 8

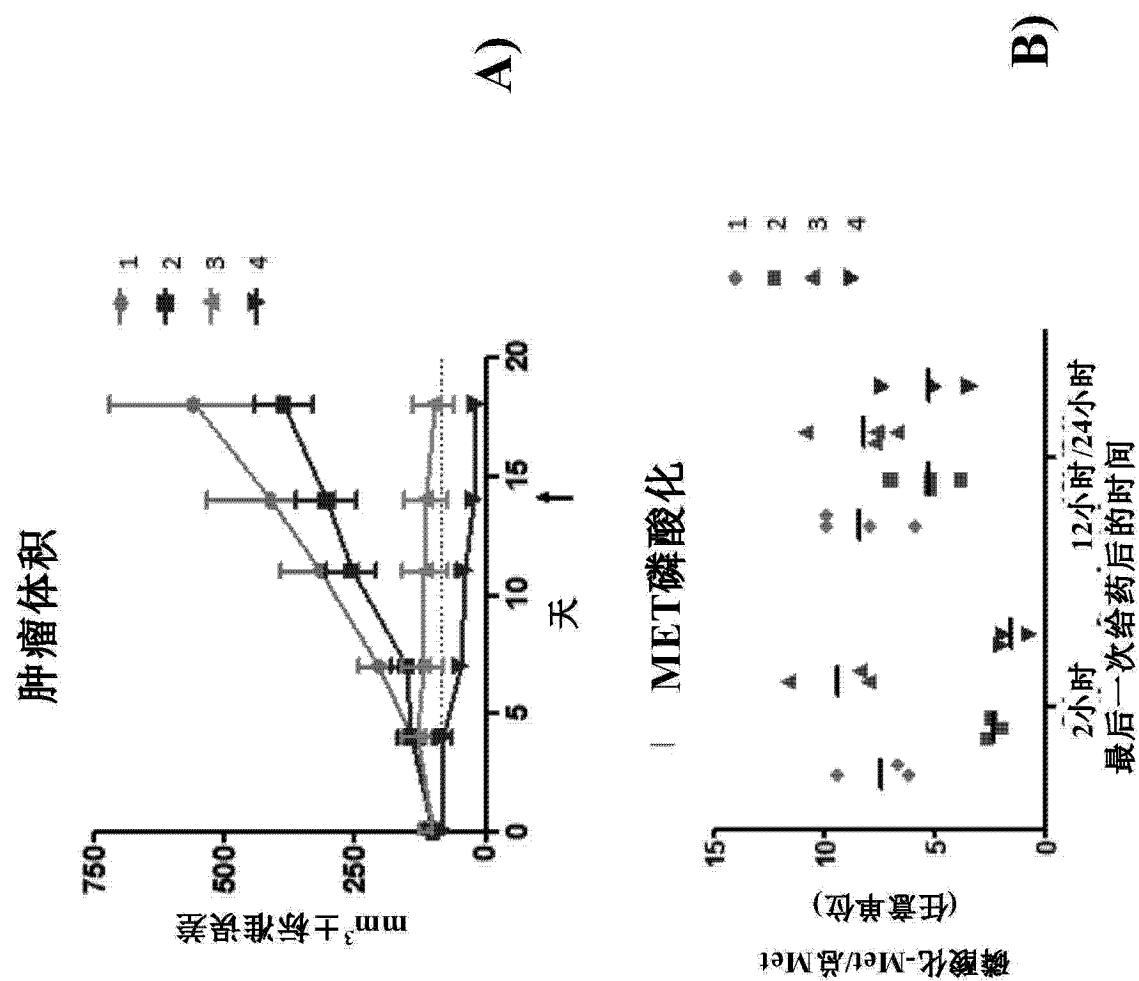


图 9