



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202428305 A

(43)公開日：中華民國 113 (2024) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：112147521 (22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 07 日

(51)Int. Cl. : *A61K45/06 (2006.01)* *A61K31/517 (2006.01)*
A61K31/5377(2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*
G01N33/574 (2006.01) *C12Q1/6886 (2018.01)*

(30)優先權：2017/09/08 美國 62/556,277

(71)申請人：美商建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)
美國

(72)發明人：克林 克里斯蒂安 尼可拉斯 KLIJN, CHRISTIAAN NICOLAAS (NL) ；馬利克
習瓦 MALEK, SHIVA (US) ；張 茵茵 YEN, IVANA (US)

(74)代理人：陳長文；朱淑尹

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：8 共 156 頁

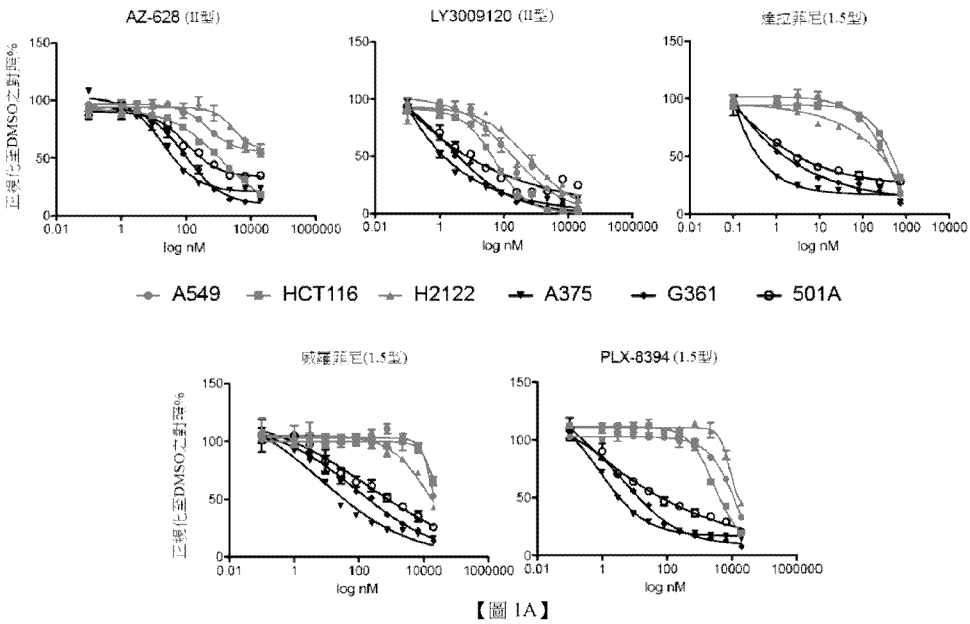
(54)名稱
癌症之診斷及治療方法

(57)摘要

本發明提供用於癌症之診斷及治療方法及組合物。本發明提供確定患有癌症之個體是否可能對包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療有反應之方法、預測患有癌症之個體對包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療之反應性之方法、為患有癌症之個體選擇療法之方法，以及基於本發明之生物標記物(例如 KRAS 活化突變，例如 KRAS-G13D 突變，或 NRAS 活化突變)之存在治療患有癌症之個體之方法。

The present invention provides diagnostic and therapeutic methods and compositions for cancer. The invention provides methods of determining whether an individual having a cancer is likely to respond to treatment comprising a pan-RAF dimer inhibitor and a MEK or PI3K inhibitor, methods of predicting responsiveness of an individual having a cancer to treatment comprising a pan-RAF dimer inhibitor and a MEK or PI3K inhibitor, methods of selecting a therapy for an individual having a cancer, and methods of treating an individual having cancer based on the presence of a biomarker of the invention (e.g., a KRAS activating mutation, e.g., a KRAS-G13D mutation, or an NRAS activating mutation).

指定代表圖：



【發明摘要】

【中文發明名稱】癌症之診斷及治療方法

【英文發明名稱】DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC METHODS FOR
CANCER

【中文】

本發明提供用於癌症之診斷及治療方法及組合物。本發明提供確定患有癌症之個體是否可能對包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療有反應之方法、預測患有癌症之個體對包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療之反應性之方法、為患有癌症之個體選擇療法之方法，以及基於本發明之生物標記物(例如 KRAS 活化突變，例如 KRAS-G13D 突變，或 NRAS 活化突變)之存在治療患有癌症之個體之方法。

【英文】

The present invention provides diagnostic and therapeutic methods and compositions for cancer. The invention provides methods of determining whether an individual having a cancer is likely to respond to treatment comprising a pan-RAF dimer inhibitor and a MEK or PI3K inhibitor, methods of predicting responsiveness of an individual having a cancer to treatment comprising a pan-RAF dimer inhibitor and a MEK or PI3K inhibitor, methods of selecting a therapy for an individual having a cancer, and methods of treating an individual having cancer based on the presence of a biomarker of the invention (e.g., a KRAS activating mutation, e.g., a KRAS-G13D mutation, or an NRAS activating mutation).

【指定代表圖】

圖 1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 癌症之診斷及治療方法

【英文發明名稱】 DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC METHODS FOR
CANCER

【技術領域】

【0001】 本發明係關於使用 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑治療增殖性細胞病症(例如癌症)之診斷及治療方法。本發明亦提供相關套組及組合物。

【先前技術】

【0002】 癌症仍然係對人類健康最致命的威脅之一。某些癌症可以不受控制方式迅速轉移及生長，使得及時偵測及治療變得極其困難。在美國，癌症每年影響近 130 萬名新患者且係僅次於心臟病之第二大死亡原因，約佔死亡人數的四分之一。促分裂原活化型蛋白激酶(MAPK)信號傳導路徑在超過 30%的人類癌症中經活化，最常見的係在該路徑之 MEK/ERK 臂中經由致癌性突變活化。

【0003】 因此，業內仍然需要研發用於診斷及治療患有 MAPK 失調型腫瘤之患者群體之經改良替代方法，該等方法可能最適合於靶向 MAPK 信號傳導路徑之治療。

【發明內容】

【0004】 本發明提供用於治療增殖性細胞病症(例如癌症)之診斷及治療方法、套組及組合物。

【0005】 在第一態樣中，本發明係關於鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的方法，該方法包括對來自個體之試樣進行 KRAS-G13D 突變篩選，其中試樣中存在 KRAS-G13D 突變則將該個體鑑別為可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體。

【0006】 在第二態樣中，本發明係關於用於為患有癌症之個體選擇治療之方法，該方法包括對來自個體之試樣進行 KRAS-G13D 突變篩選，其中試樣中存在 KRAS-G13D 突變則將該個體鑑別為可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體。

【0007】 在第一態樣或第二態樣之一些實施例中，該個體具有 KRAS-G13D 突變，且該方法進一步包括向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑。

【0008】 在第三態樣中，本發明係關於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括：(a)對來自個體之試樣進行 KRAS-G13D 突變篩選，其中已確定該個體具有 KRAS-G13D 突變，及(b)基於步驟(a)中確定之 KRAS-G13D 突變之存在，向個體投與治療有效量之 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑。

【0009】 在第四態樣中，本發明係關於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括向個體投與治療有效量之 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑，其中在治療之前，已經對來自個體之試樣進行 KRAS-G13D 突變篩選，並且已經確定試樣中存在 KRAS-G13D 突變。

【0010】 在任一前述態樣之一些實施例中，篩選包括對 *KRAS* 基因之全部或一部分進行擴增及測序。在一些實施例中，*KRAS* 基因之部分係 *KRAS* 基因之外顯子 2。在一些實施例中，*KRAS* 基因外顯子 2 之密碼子 13 處之 *KRAS* c.38G>A 核苷酸取代突變指示 KRAS-G13D 突變。

【0011】 在第五態樣中，本發明係關於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之組合物，其用於治療性治療以 KRAS-G13D 突變為特徵之癌症。

【0012】 在第六態樣中，本發明係關於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之組合物，之用途，其用於製備用以治療以 KRAS-G13D 突變為特徵之癌症之藥劑。

【0013】 在第七態樣中，本發明係關於鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的方法，該方法包括對來自個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，其中試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體。

【0014】 在第八態樣中，本發明係關於為患有癌症之個體選擇治療之方法，該方法包括對來自個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，其中試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體。

【0015】 在第七態樣或第八態樣之一些實施例中，該個體具有 NRAS 活化突變，且該方法進一步包括向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑。

【0016】 在第九態樣中，本發明係關於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括：(a)對來自個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，其中已確定該個體具有 NRAS 活化突變，及(b)基於步驟(a)中確定之 NRAS 活化突變之存在，向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑。

【0017】 在第十態樣中，本發明係關於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑，其中在治療之前，已對來自該個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，且已確定試樣中存在 NRAS 活化突變。

【0018】 在第七、第八、第九及第十態樣中之任一者之一些實施例中，篩選包括對 NRAS 基因之全部或一部分進行擴增及測序。

【0019】 在第一、第二、第三、第四、第七、第八、第九及第十態樣中之任一者之一些實施例中，MEK 抑制劑係小分子抑制劑。在一些實施例中，小分子抑制劑係選自由以下各項組成之群：考比替尼(cobimetinib) (GDC-0973)、司美替

尼(selumetinib) (AZD6244)、匹塞替尼(pimasertib) (AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(refametinib) (BAY86-9766)、比美替尼(binimetinib) (MEK162)、BI-847325、曲美替尼(trametinib)、GDC-0623、G-573及CH5126766(RO5126766)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，小分子抑制劑係考比替尼(GDC-0973)、司美替尼(AZD6244)、匹塞替尼(AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(BAY86-9766)或比美替尼(MEK162)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，小分子抑制劑係考比替尼(GDC-0973)，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0020】 在第十一態樣中，本發明係關於治療患有包括 **KRAS** 活化突變之癌症之個體之方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之 **pan-RAF** 二聚體抑制劑及 **PI3K** 抑制劑。在一些實施例中，**PI3K** 抑制劑係小分子抑制劑。在一些實施例中，小分子抑制劑係選自由以下各項組成之群：匹利昔布(GDC-0941)、他利昔布(GDC-0032)及阿利昔布(BYL719)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，**PI3K** 抑制劑係 **pan-PI3K** 抑制劑。在一些實施例中，**pan-PI3K** 抑制劑係匹利昔布(GDC-0941)或他利昔布(GDC-0032)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，個體不具有 **BRAF** 活化突變。

【0021】 在第一、第二、第三、第四、第七、第八、第九、第十及第十一態樣中之任一者之一些實施例中，該方法進一步包括向個體投與另一治療劑。在一些實施例中，該另一治療劑係選自由以下各項組成之群：免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑。

【0022】 在第十二態樣中，本發明係關於包含 **pan-RAF** 二聚體抑制劑及 **PI3K** 抑制劑之組合物，其用於治療性治療以 **KRAS** 活化突變為特徵之癌症。

【0023】 在第十三態樣中，本發明係關於包含 **pan-RAF** 二聚體抑制劑及 **PI3K** 抑制劑之組合物之用途，其用於製備用以治療以 **KRAS** 活化突變為特徵之癌症之藥劑。

【0024】 在第十四態樣中，本發明係關於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 pan-PI3K 抑制劑之組合物。在一些實施例中，pan-PI3K 抑制劑係匹利昔布 (GDC-0941) 或他利昔布 (GDC-0032) 或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，pan-RAF 二聚體抑制劑係選自由以下各項組成之群：HM95573、LY-3009120、AZ-628、LXH-254、MLN2480、BeiGene-283、RXDX-105、BAL3833、瑞格菲尼及索拉菲尼或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，該組合物包含選自由以下各項組成之群之組合：HM95573 及匹利昔布 (GDC-0941)、LY-3009120 及匹利昔布 (GDC-0941)、AZ-628 及匹利昔布 (GDC-0941)、LXH-254 及匹利昔布 (GDC-0941)、MLN2480 及匹利昔布 (GDC-0941)、BeiGene-283 及匹利昔布 (GDC-0941)、RXDX-105 及匹利昔布 (GDC-0941)、BAL3833 及匹利昔布 (GDC-0941)、瑞格菲尼及匹利昔布 (GDC-0941)、索拉菲尼及匹利昔布 (GDC-0941)、HM95573 及他利昔布 (GDC-0032)、LY-3009120 及他利昔布 (GDC-0032)、AZ-628 及他利昔布 (GDC-0032)、LXH-254 及他利昔布 (GDC-0032)、MLN2480 及他利昔布 (GDC-0032)、BeiGene-283 及他利昔布 (GDC-0032)、RXDX-105 及他利昔布 (GDC-0032)、BAL3833 及他利昔布 (GDC-0032)、瑞格菲尼及他利昔布 (GDC-0032) 及索拉菲尼及他利昔布 (GDC-0032) 或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，該組合物用於治療性治療癌症。在一些實施例中，該癌症係選自由以下各項組成之群：結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、皮膚癌、腎癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈狀肉芽腫、默克爾細胞癌及血液惡性病。

【0025】 在第十五態樣中，本發明係關於包含根據第十六態樣之組合物之醫藥組合物。

【0026】 在第十六態樣中，本發明係關於根據第十六態樣之組合物之用途，其用於製備用以治療性治療癌症之藥劑。在一些實施例中，該癌症係選自由以下各項組成之群：結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、皮膚癌、腎癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈狀肉芽腫、默克爾細胞癌及血液惡性病。

【0027】 在第十七態樣中，本發明係關於用於鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的套組，該套組包括：(a) 用於確定來自該個體之試樣中 KRAS-G13D 突變之存在之試劑，及視情況，(b) 使用該等試劑鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的說明書。在一些實施例中，該等試劑包括用於使 KRAS 基因之全部或一部分擴增之第一寡核苷酸及第二寡核苷酸。

【0028】 在第十八態樣中，本發明係關於用於鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的套組，該套組包括：(a) 用於確定來自該個體之試樣中 NRAS 活化突變之存在之試劑，及視情況，(b) 使用該等試劑鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的說明書。在一些實施例中，該等試劑包括用於使 NRAS 基因之全部或一部分擴增之第一寡核苷酸及第二寡核苷酸。

【0029】 在第十七態樣或第十八態樣之一些實施例中，MEK 抑制劑係小分子抑制劑。在一些實施例中，小分子抑制劑係選自由以下各項組成之群：考比替尼(GDC-0973)、司美替尼(AZD6244)、匹塞替尼(AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(BAY86-9766)、比美替尼(MEK162)、BI-847325、曲美替尼、GDC-0623、G-573 及 CH5126766 (RO5126766)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，小分子抑制劑係考比替尼(GDC-0973)、司美替尼(AZD6244)、匹塞替尼

(AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(BAY86-9766)或比美替尼(MEK162)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，小分子抑制劑係考比替尼(GDC-0973)，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0030】 在第十九態樣中，本發明係關於用於鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 PI3K 抑制劑之治療之患有癌症之個體之套組，該套組包括：(a) 用於確定來自該個體之試樣中 KRAS 活化突變之存在之試劑，及視情況，(b) 使用該等試劑鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 PI3K 抑制劑之治療之患有癌症之個體之說明書。在一些實施例中，該等試劑包括用於使 KRAS 基因之全部或一部分擴增之第一寡核苷酸及第二寡核苷酸。在一些實施例中，PI3K 抑制劑係小分子抑制劑。在一些實施例中，小分子抑制劑係選自由以下各項組成之群：匹利昔布(GDC-0941)、他利昔布(GDC-0032)及阿利昔布(BYL719)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，PI3K 抑制劑係 pan-PI3K 抑制劑。在一些實施例中，pan-PI3K 抑制劑係匹利昔布(GDC-0941)或他利昔布(GDC-0032)，或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，個體不具有 BRAF 活化突變。

【0031】 在任一前述態樣之一些實施例中，pan-RAF 二聚體抑制劑係選自由以下各項組成之群：HM95573、LY-3009120、AZ-628、LXH-254、MLN2480、BeiGene-283、RXDX-105、BAL3833、瑞格菲尼(regorafenib)及索拉菲尼(sorafenib)，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0032】 在任一前述態樣之一些實施例中，試樣係組織試樣、細胞試樣、全血試樣、血漿試樣、血清試樣或其組合。在一些實施例中，試樣係組織試樣。在一些實施例中，組織試樣係腫瘤組織試樣。在一些實施例中，腫瘤組織試樣係福馬林(formalin)固定且石蠟包埋(FFPE)試樣、檔案試樣、新鮮試樣或冷凍試樣。

【0033】 在任一前述態樣之一些實施例中，癌症係選自由以下各項組成之

群：結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、皮膚癌、腎癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈狀肉芽腫、默克爾細胞癌(Merkel cell cancer)或血液惡性病。在一些實施例中，癌症係結腸直腸癌。在一些實施例中，癌症係卵巢癌。在一些實施例中，癌症係肺癌。在一些實施例中，癌症係胰腺癌。在一些實施例中，癌症係皮膚癌。

【0034】 在任一前述態樣之一些實施例中，個體係人類。

【圖式簡單說明】

【0035】 圖 1A 係一系列圖形，其顯示在 3 天的 CELLTITER-GLO®存活率分析中 KRAS 突變細胞系(紅色)及 BRAF^{V600E}細胞系(黑色)針對所指示 RAF 抑制劑之剖析。曲線係利用四參數 S 形曲線擬合來確定。

【0036】 圖 1B 係一系列圖形，其顯示針對各個濃度之 1.5 型及 2 型 RAF 抑制劑繪製之 P-MEK 與總 MEK 之比率。

【0037】 圖 1C 係一系列圖形，其顯示在 3 天的細胞存活率研究中，結腸癌、肺癌及皮膚癌症細胞系對三種 II 型 pan-RAF 抑制劑(AZ-628、LY-3009120 及 MLN-2480)及 1.5 型「反常破壞劑」RAF 抑制劑 PLX-8394 之敏感性之剖析。IC₅₀ 值(μM)係用使用非線性回歸分析之四參數擬合來確定。

【0038】 圖 1D 係顯示 A549 KRAS-G12S 突變系在用 1μM AZ-628 +/-來自 430 種工具化合物之小分子庫之工具化合物處理後之平均存活率差異的圖形。A549 KRAS-G12S 突變系中之細胞存活率係在用 1μM AZ-628 +/-工具化合物處理 3 天之後測得的。平均存活率係針對每一處理來計算，且平均存活率差異之圖形係在正規化至 DMSO 處理之細胞之情況下來繪製。彩色豎條指示抑制劑種類。

【0039】 圖 1E 係來自在 A549 細胞中在利用或未利用 1 μM AZ-628 之情況下實施之化合物篩選之所指示 MEK 抑制劑的一系列代表性劑量-反應曲線。

【0040】 圖 1F 係顯示在用 1 μ M 之所指示分子將 A549 細胞處理 24 小時之後，總 BRAF 及 CRAF 以及磷酸化 MEK 及總 MEK 相對於對照(肌動蛋白)之免疫墨點。

【0041】 圖 1G 係顯示針對 AZ-628 及所指示 MEK 抑制劑之 12 $\times$ 12 矩陣劑量遞增計算之 Bliss 過量分值之一組影像。用 AZ-628 及各種 MEK 抑制劑之 12 $\times$ 12 矩陣劑量遞增將 A549 細胞處理 3 天。藉由 CELLTITER-GLO®評估細胞存活率，並計算 Bliss 過量分值。

【0042】 圖 2A 係顯示針對考比替尼及所指示 RAF 抑制劑之 12 $\times$ 12 矩陣劑量遞增計算之 Bliss 過量分值之一組影像。在用考比替尼及所指示 RAF 抑制劑處理 3 天之 A549 細胞中藉由 CELLTITER-GLO®評估細胞存活率。

【0043】 圖 2B 係顯示在將 A549 細胞用 50 nM 考比替尼及/或 RAF 抑制劑如所指示處理 24 小時之後，磷酸化的及總的 CRAF、MEK、ERK、RSK 及 AKT 相對於對照(肌動蛋白)之免疫墨點。

【0044】 圖 2C 係一組圖形，其顯示相對於 DMSO 對照處理之細胞，用 0.1 μ M 考比替尼、0.1 μ M AZ-628 或二者處理 6 小時之四種 KRAS 突變肺癌細胞系中 *DUSP6* 及 *SPRY4* 之 RNA-seq 倍數變化表現數據。

【0045】 圖 2D 係免疫墨點，其顯示相對於對照(肌動蛋白)，在所指示濃度下用與考比替尼組合之 AZ-628 對用或不用考比替尼之威羅菲尼(vemurafenib)處理 48 小時之 A549 細胞中，裂解之 PARP 增加。

【0046】 圖 2E 係顯示用所指示濃度之 AZ-628、考比替尼或二者處理之 A549 細胞之流式細胞術細胞週期/細胞凋亡分析(碘化丙啶及膜聯蛋白 V)之一組圖形。

【0047】 圖 2F 係群落生長分析之一組影像，其顯示 II 型 RAF 抑制劑展現與考比替尼之協同活性，並且即使在次有效之單一藥劑濃度下亦增強細胞死亡。用所指示濃度之 RAF 抑制劑或考比替尼處理 A549 細胞，且用所指示濃度之 RAF

抑制劑 LY-3009120 或考比替尼處理 NCI-H2122 細胞。每 72 小時補充具有適當化合物之培養基。將細胞培養 8 天，然後用結晶紫染色。

【0048】 圖 3A 係一組圖形，其分別顯示 NCI-H2122 及 HCT 116 異種移植腫瘤模型中，MEK 抑制劑考比替尼(5 mg/kg，經口(PO)，每日(QD))與 pan-RAF 抑制劑 AZ-628 (25 mg/kg，腹膜內(IP)，QD)或 LY-3009120 (25 mg/kg，IP，QD) 隨時間流逝之腫瘤體積($n = 10$ 隻/組，平均腫瘤體積 $\pm$ SEM)。

【0049】 圖 3B 係一組圖形，其顯示 NCI-H2122 及 HCT-116 異種移植小鼠中單一藥劑 MEK 抑制劑考比替尼(GDC-0973)、pan-RAF 抑制劑 AZ-628 或 LY-3009120 或所指示組合之小鼠體重數據($n = 10$ 隻/組，平均腫瘤體積 $\pm$ SEM)。

【0050】 圖 3C 係一組條形圖，其顯示在治療 4 天後在最後一次劑量後的所指示時間點(2 小時、8 小時、16 小時及 24 小時)，NCI-H2122 及 HCT 116 帶瘤小鼠中之腫瘤藥效學研究。條形圖指示所指示蛋白質(裂解之 PARP (西方墨點(Western blot))、pMEK/總 MEK (ECLA)、pRSK/總 RSK (西方墨點))或正規化至媒劑對照之下游 RNA 轉錄本 *DUSP6* (RT-PCR)的定量值($n = 4$ 隻/組，平均值 $\pm$ SD)。

【0051】 圖 3D 係顯示 x 軸上指示之時間後之血漿中化合物濃度的一組條形圖。

【0052】 圖 4A 係免疫墨點，其顯示 MEK 抑制在 KRAS 突變細胞系中更大程度地誘導路徑反饋再活化，從而引起增加之 RAS-GTP 含量。用 DMSO 或 250 nM 考比替尼將所指示之癌症細胞系處理 24 小時，並相對於對照(肌動蛋白)，藉由西方墨點分析蛋白質溶解物之磷酸化的或總的 BRAF、CRAF 或 MEK。使 CRAF、RBD-RAF1 及 BRAF 自相同溶解物發生免疫沈澱(IP)，並藉由西方墨點進行分析。利用無活性 MEK 作為受質分析 CRAF 免疫沈澱物之激酶活性。

【0053】 圖 4B 係一系列免疫墨點，其顯示在協同及非協同 KRAS 突變及野生

型結腸癌細胞系中由考比替尼引起之 MEK 抑制。用 DMSO 或 250 nM 考比替尼將所指示之癌症細胞系處理 24 小時，並相對於對照(肌動蛋白)，藉由西方墨點分析蛋白質溶解物之磷酸化的或總的 MEK。

【0054】 圖 4C 係一系列免疫墨點，其顯示在協同及非協同 KRAS 突變及野生型肺癌細胞系中由考比替尼引起之 MEK 抑制。用 DMSO 或 250 nM 考比替尼將所指示之癌症細胞系處理 24 小時，並相對於對照(肌動蛋白)，藉由西方墨點分析蛋白質溶解物之磷酸化的或總的 MEK。

【0055】 圖 4D 係顯示在正規化至 DMSO 處理之對照細胞系之於圖 4B 及圖 4C 中之協同及非協同 KRAS 突變及野生型肺癌細胞系中考比替尼誘導之 pMEK 含量之相對倍數增加之圖形。P 值係藉由威爾科克森秩和測試來測定。

【0056】 圖 4E 係免疫墨點，其顯示 CRAF 及 BRAF IP 實驗及後續激酶活性分析之結果。用增加濃度之 MEK 抑制劑 GDC-0973 處理 A549 細胞，使相同溶解物中之 CRAF 及 BRAF 發生免疫沈澱，並藉由西方墨點進行分析。利用無活性之 MEK 作為受質分析 CRAF 免疫沈澱物之激酶活性。

【0057】 圖 4F 係免疫墨點，其顯示 II 型 pan-RAF 抑制劑(而非 legacy 之 1.5 型 RAF 抑制劑)可使 KRAS 突變細胞中 MEK 抑制劑誘導之 MEK 過磷酸化逆轉。藉由西方墨點對用 250 nM 考比替尼處理 24 小時之 A549 細胞中之 MEK 磷酸化進行評估，隨後以增加之濃度添加所指示 RAF 抑制劑並保持 24 小時。

【0058】 圖 4G 係免疫墨點，其顯示 KRAS 減弱阻抑 MEK 抑制後之 MAPK 再活化。根據製造商之說明，在 lipofectamine RNAiMAX®試劑(Life Technologies)存在下，用 20 nM si-KRAS (L-005069-00-0020)或 si-NTC (D-001810-10-20) (Dharmacon On-TARGETplus® pool)反向轉染所指示細胞系。轉染後第二天更換培養基，且在第 4 天藉由西方墨點評估減弱效率。將 250 nM 考比替尼添加至細胞中並保持 24 小時。

【0059】 圖 5A 係顯示 pan-RAF 及 MEK 抑制劑之組合導致相對於 BRAF-V600 細胞系在 RAS 突變(G12/G13/Q61)細胞系及 RAS/RAF 野生型細胞系之子集中具有更大協同之圖形。在用 10 μ M AZ-628、1 μ M 考比替尼之 9 步 3 倍連續稀釋液或該等之共稀釋液處理 3 天之一組 322 種結腸癌、肺癌及胰腺癌之細胞系中，使用 CELLTITER-GLO®評估細胞存活率。協同分值係超過所量測濃度組合之正 Bliss 過量之總和。條形圖顯示四種協同狀態：無協同(淺灰色)、低協同(深灰色)、中協同(藍色)及高協同(橙色)。協同之程度係藉由對正 Bliss 過量及該等狀態於各種組織上之分佈進行混合建模來確定的。

【0060】 圖 5B 係一組免疫墨點，其顯示 KRAS 突變及野生型癌症細胞系代表所指示協同狀態，且證實反應與 MAPK 信號傳導之基線水準及經由 KRAS、RAF 二聚體及激酶活性之反饋再活化相關。根據製造商之說明，在 Lipofectamine RNAiMAX® 試劑 (Life Technologies) 存在下，用 20 nM si-KRAS (L-005069-00-0020)或 si-NTC (D-001810-10-20) (Dharmacon On-TARGETplus® pool)反向轉染細胞。轉染後第二天更換培養基，在第 4 天評估減弱效率。將 250 nM 考比替尼添加至細胞中並保持 24 小時。相對於對照(肌動蛋白)，藉由西方墨點法分析蛋白質溶解物之磷酸化的及/或總的 KRAS、BRAF、CRAF、MEK、ERK 及 RSK。使 CRAF 及 RAF1-RBD 自相同溶解物發生免疫沈澱並藉由西方墨點進行分析。利用無活性 MEK 作為受質分析 CRAF 免疫沈澱物之激酶活性。

【0061】 圖 5C 係顯示未經協同地抑制之 KRAS 野生型細胞系之免疫墨點。根據製造商之說明，在 Lipofectamine RNAiMAX®試劑(Life Technologies)存在下，用 20 nM si-KRAS (L-005069-00-0020)或 si-NTC (D-001810-10-20) (Dharmacon On-TARGETplus® pool)反向轉染細胞。轉染後第二天更換培養基，在第 4 天評估減弱效率。將 250 nM 考比替尼添加至細胞中並保持 24 小時。相對於對照(肌動蛋白)，藉由西方墨點法分析蛋白質溶解物之磷酸化的及/或總的 KRAS、

BRAF、CRAF、MEK、ERK 及 RSK。使 CRAF 及 RAF1-RBD 自相同溶解物發生免疫沈澱並藉由西方墨點進行分析。利用無活性 MEK 作為受質分析 CRAF 免疫沈澱物之激酶活性。

【0062】 圖 5D 係一組免疫墨點，其顯示在 A549 KRAS 突變細胞系中觀察到 HM95573 (GDC-5573) (II 型 pan-RAF 抑制劑)及考比替尼(MEK 抑制劑)之組合活性，如在用 1 μ M HM95573 (GDC-5573)、250 nM 考比替尼或 1 μ M HM95573 (GDC-5573)與 250 nM 考比替尼處理之後在所指示時間點之 MAPK 路徑標記物 (pMEK、pERK 及 pRSK)之含量所評價。

【0063】 圖 5E 係群落生長分析之一組影像，其顯示 II 型 RAF 抑制劑展現與考比替尼之協同活性並且即使在次有效之單一藥劑濃度下亦增強細胞死亡事件。用所指示濃度之 RAF 抑制劑 HM95573 (GDC-5573)、考比替尼或 HM95573 (GDC-5573)與考比替尼處理 A549 細胞(左)及 HCT-116 細胞(右)。每 72 小時補充具有適當化合物之培養基。將細胞培養 8 天，且然後用結晶紫染色。

【0064】 圖 5F 係一組圖形，其顯示在 KRAS 突變同基因結腸直腸癌(CRC)異種移植物模型 CT26 中 HM95573 (GDC-5573)及考比替尼之治療改良腫瘤生長抑制(TGI)。用以下各項將動物(n=10 隻/組)治療 21 天：媒劑；5 mg/kg 之 HM95573 (GDC-5573) (經口，一天一次)；5 mg/kg 之考比替尼(經口，一天一次)；或兩種藥劑。每一組中個別動物之腫瘤生長連同加粗趨勢線一起顯示，其表示為隨時間(天數)流逝之腫瘤體積(mm³)。

【0065】 圖 5G 係顯示圖 5F 中所闡述之每一治療組之經擬合腫瘤體積曲線之圖形。

【0066】 圖 5H 係顯示相對於 BRAF-V600 細胞系，pan-RAF 及 MEK 抑制劑之組合在 RAS 突變細胞系及 RAS/RAF 野生型細胞系之子集中引起更大協同之圖形。在用 HM95573 (GDC-5573)、考比替尼或 HM95573 (GDC-5573)與考比替

尼之共稀釋液處理三天之一組 196 種結腸癌、肺癌、皮膚癌及卵巢癌細胞系中使用 CELLTITER-GLO® 評價細胞存活率。協同分數係超過所量測濃度組合之正 Bliss 過量之總和。藉由雙側 t 測試來評價顯著性。

【0067】 圖 5I 係一組免疫墨點，其顯示在一組結腸直腸癌細胞系中 pan-RAF 及 MEK 抑制之組合活性與 MEK 抑制劑誘導之 RAS-GTP 含量相關。在用 DMSO 媒劑或考比替尼處理之所指示之結腸直腸癌細胞系中利用 RAF1-RBD 使活性 RAS 發生免疫沈澱。

【0068】 圖 6A 係顯示 KRAS-G13D 突變細胞系對 RAF 及 MEK 抑制之組合更敏感之圖形。顯示在含有不同 RAS 突變密碼子之細胞系中在 AZ-628/考比替尼組合之情況下為正 Bliss 過量(P 值係雙側威爾科克森秩和測試(Wilcoxon rank sum test))。

【0069】 圖 6B 係顯示 KRAS-G13D KRAS^{G13D} 突變細胞系對 RAF 及 MEK 抑制之組合更敏感之圖形。顯示在含有不同 RAS 突變密碼子之細胞系中在 AZ-628/考比替尼組合之情況下為正 Bliss 過量(P 值係雙側威爾科克森秩和測試(Wilcoxon rank sum test))。

【0070】 圖 6C 係顯示肺細胞系之過量 Bliss 分數之條形圖及盒形圖(P 值係雙側威爾科克森秩和測試)。

【0071】 圖 6D 係一組盒形圖，其顯示在用 HM95573 (GDC-5573)及考比替尼藉由共稀釋處理三天之後，與攜載非 KRAS-G13D 突變之其他細胞系相比，KRAS-G13D 結腸直腸癌細胞系(左)及肺癌細胞系(右)之過量 Bliss 分數。協同分數係超過所量測濃度組合之正 Bliss 過量之總和。藉由雙側 t 測試評價顯著性。

【0072】 圖 6E 係一組免疫墨點，其顯示相對於其他 KRAS 突變體，KRAS-G13D 突變結腸直腸細胞系在 MEK 抑制後顯示更增強之 pMEK 誘導。用 DMSO 或考比替尼(250 nM)將所指示之結腸直腸細胞系處理 24 小時，隨後相對

於對照(肌動蛋白),藉由西方墨點評估磷酸化的及總的 MEK、ERK、RSK 及 AKT 之含量。

【0073】 圖 6F 係群落生長分析之一組影像,其顯示在 KRAS-G13D 突變 SW48 細胞中 II 型 RAF 抑制劑及考比替尼之協同活性大於 KRAS-G12D 或 KRAS-G12C 突變 SW48 細胞。用 AZ-628、考比替尼或 AZ-628 與考比替尼處理具有 KRAS-G13D (左)、KRAS-G12D (中)或 KRAS-G12C (右)敲入之同基因型 SW48 細胞。每 72 小時補充具有適當化合物之培養基。將細胞培養 8 天且然後用結晶紫染色。

【0074】 圖 6G 係一組免疫墨點,其顯示相對於對照(肌動蛋白),在用 AZ-628、考比替尼或兩種藥劑以所指示濃度處理之後,具有 KRAS-G13D (左)、KRAS-G12D (中)或 KRAS-G12C (右)敲入之同基因型 SW48 細胞中之 ERK 及 pERK 含量。

【0075】 圖 6H 係顯示 322 種結腸、肺、胰腺、卵巢、血液及皮膚細胞系中 AZ-628 之相對 IC50 值(μ M)之圖形,如藉由 3 天之 CELLTITER-GLO®分析所測定。使用非線性回歸、四參數擬合分析來擬合 IC50 曲線。圖 6I 係免疫墨點,其顯示在三種同基因型結腸直腸細胞系之溶解物中利用 RAF1-RBD 發生免疫沈澱之活性 RAS:具有野生型 KRAS 之親代 SW48、引入異型接合 KRAS G12D 突變之 SW48 及引入異型接合 KRAS G13D 突變之 SW48。

【0076】 圖 6J 係顯示 SW48 KRAS-G13D 中之 KRAS-GTP 含量大於 SW48 KRAS-G12D 及 SW48 KRAS 野生型細胞之圖形,如使用核苷酸交換反應藉由時間解析螢光能量轉移(TR-FRET)所評價。在抗 FLAG-Tb 抗體及抗 6xHis-d2 抗體存在下將負載有 GDP 之帶 6x His 標籤之 KRAS 野生型、KRAS-G12D 及 KRAS-G13D 與帶 FLAG 標籤之 RAF1-RBD 一起培育。添加 GTP 以開始核苷酸交換反應並量測 TR-FRET。

【0077】 圖 6K 係免疫墨點，其顯示在用 DMSO 或 250 nM 之考比替尼將所指示細胞系處理 24 小時後之 MAPK 路徑蛋白質含量(包括 Y1068 基因座處之總 EGFR 及 P-EGFR)。

【0078】 圖 6L 係免疫墨點，其顯示根據製造商之說明，在 lipofectamine RNAiMAX 試劑(Life Technologies)存在時，用 si-SOS1 或 si-NTC 反向轉染 HCT 116 及 DLD-1 細胞，且用 DMSO 或 250 nM 考比替尼處理 24 小時之後，來自細胞溶解物之 KRAS、SOS1、MEK、pMEK 及肌動蛋白含量。RAS-GTP 係藉由來自溶解物之 RAF1-RBD 自溶解物免疫沈澱，且與其他蛋白質一起進行分析。

【0079】 圖 7A 係顯示 pan-RAF 抑制劑(AZ-628)與 pan-PI3K 抑制劑匹利昔布(GDC-0941)協同之圖形。3 天後在用 AZ-628/匹利昔布、考比替尼/匹利昔布之共稀釋劑量或單一藥劑劑量處理之一組 213 種腫瘤細胞系中，藉由 CELLTITER-GLO®評估細胞存活率。繪製代表超過所測濃度組合之正 Bliss 過量之總和之協同分值的圖形。

【0080】 圖 7B 係免疫墨點，其顯示用多種 PI3K 抑制劑抑制 KRAS-G12S A549 細胞引起 MAPK 路徑活性之誘導。用所指示濃度之 PI3K 抑制劑或考比替尼將 A549 處理 24 小時，然後加以處理以相對於對照(肌動蛋白)對磷酸化的及總的 MEK 含量進行西方墨點分析。亦藉由免疫沈澱(IP) (針對 CRAF)及免疫墨點(針對 CRAF 及 BRAF)評估溶解物，並針對 RAF 激酶活性進行處理，如前文所述。

【0081】 圖 7C 係來自源自用所指示濃度之 PI3K 抑制劑或 GDC-0973 處理 24 小時之 HCT116 細胞之溶解物之所指示蛋白質的免疫墨點。

【0082】 圖 7D 係免疫墨點，其顯示 PI3K 抑制引起 pMEK 之劑量依賴性誘導。用所指示濃度之匹利昔布將 A549 細胞處理 24 小時，然後加以處理以相對於對照(肌動蛋白)對磷酸化的及總的 MEK、ERK 及 RSK 含量進行西方墨點分析。

【0083】 圖 7E 係免疫墨點，其顯示 PI3K 抑制引起 RAS-GTP 含量之劑量依賴

性誘導。用所指示濃度之匹利昔布及考比替尼將 A549 細胞處理 24 小時，並利用 RAF1-RBD 使活性 RAS 發生免疫沈澱。

【0084】 圖 7F 係一組影像，其顯示針對考比替尼或 AZ-628 pan-RAF 抑制劑與 PI3K/AKT 抑制劑組合之 12×12 矩陣劑量遞增計算出的 Bliss 過量分值，顯示在 KRAS 突變細胞系中 II 型 pan-RAF 抑制劑 AZ-628 與多種 PI3K/AKT 抑制劑協同。在用考比替尼或 AZ-628 pan-RAF 抑制劑與 PI3K/AKT 抑制劑組合之 12×12 矩陣劑量遞增處理 3 天之 A549 及 HCT116 細胞中藉由 CELLTITER-GLO®評估細胞存活率。

【0085】 圖 7G 係免疫墨點，其顯示 II 型 pan-RAF 抑制劑與 pan-PI3K 抑制劑之組合阻斷由 PI3K 抑制介導之 MAPK 路徑再活化。用所指示濃度之匹利昔布及/或 AZ-628 將 A549 細胞處理 24 小時，然後加以處理以相對於對照(肌動蛋白)對磷酸化的及總的 MEK、ERK、RSK 及 AKT 含量進行西方墨點分析。

【0086】 圖 8A 及圖 8B 係一系列圖形，其剖析存活率研究中如與 BRAF-V600E 及 NRAS/BRAF 野生型細胞系相比，對三種 II 型 pan-RAF 抑制劑(AZ-628、LY-3009120 及 MLN-2480)及 1.5 型「反常破壞劑」RAF 抑制劑 PLX-8394 具有敏感性之 NRAS 突變黑色素瘤細胞系，其顯示各別平均存活率(圖 8A)及用使用非線性回歸分析之四參數擬合確定之計算之 IC₅₀ 值(μM) (圖 8B)。

【0087】 圖 8C 及圖 8D 係一系列圖形，其剖析存活率研究中如與 BRAF-V600E 及 NRAS/BRAF 野生型細胞系相比，對 II 型 pan-RAF 抑制劑 AZ-628 及 MEK 抑制劑考比替尼具有敏感性之 NRAS 突變黑色素瘤細胞系，其顯示各別平均存活率(圖 8C)及用使用非線性回歸分析之四參數擬合確定之計算之 IC₅₀ 值(μM) (圖 8D)。

【實施方式】

I. 引言

【0088】 本發明提供用於治療增殖性細胞病症(例如癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之診斷方法、治療方法及組合物。本發明至少部分地基於如下發現：在攜帶 NRAS 活化突變或 KRAS 活化突變、特別係 KRAS-G13D 突變之癌症中，藉助 RAS-GTP 依賴性機制，MEK 及 PI3K 抑制劑展現與 pan-RAF 二聚體抑制劑之協同活性。因此，KRAS-G13D 及 NRAS 活化突變可用作如下方法中之生物標記物(例如，預測性生物標記物)：鑑別可受益於包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療之患有癌症之個體；為患有癌症之個體選擇包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療，以及利用包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之療法來治療患有癌症之個體。

II. 定義

【0089】 應當理解，本文所闡述之本發明之態樣及實施例包括「包含」態樣及實施例、由「該等態樣及實施例組成」及「基本上由該等態樣及實施例組成」。除非另有指示，否則如本文所用單數形式「一(a、an)」及「該」包括複數個指示物。

【0090】 本文所用術語「約」係指熟悉此項技術者容易知曉之各別值之常見誤差範圍。本文所提及之「約」值或參數包括(且闡述)關於該值或參數本身之實施例。例如，提及「約 X」之闡述包括「X」之闡述。

【0091】 術語「MAPK 信號傳導路徑」係指促分裂原活化之蛋白激酶信號傳導路徑(例如 RAS/RAF/MEK/ERK 信號傳導路徑)且涵蓋保守絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶之家族(例如促分裂原活化之蛋白激酶(MAPK))。MAPK 路徑之異常調節導致增殖、侵襲、轉移、血管生成不受控制及細胞凋亡減少。GTPase 之 RAS 家族包括 KRAS、HRAS 及 NRAS。絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶之 RAF 家族包括 ARAF、BRAF 及 CRAF (RAF1)。例示性 MAPK 包括細胞外信號調節激酶 1 及 2 (亦即

ERK1 及 ERK2)、c-Jun N 末端激酶 1-3 (亦即 JNK1、JNK2 及 JNK3)、p38 同種型(亦即 p38 α 、p38 β 、p38 γ 及 p38 δ)及 Erk5。其他 MAPK 包括 Nemo 樣激酶(NLK)、Erk3/4 (亦即 ERK3 及 ERK4)及 Erk7/8 (亦即 ERK7 及 ERK8)。

【0092】 術語「MAPK 信號傳導抑制劑」或「MAPK 路徑信號傳導抑制劑」係指減少、阻斷、抑制、廢除或干擾藉助 MAPK 路徑(例如 RAS/RAF/MEK/ERK 路徑)之信號轉導的分子。在一些實施例中，MAPK 信號傳導抑制劑可抑制一或多種參與活化 MAPK 信號傳導之蛋白質之活性。在一些實施例中，MAPK 信號傳導抑制劑可增加一或多種參與抑制 MAPK 信號傳導之蛋白質之活性。MAPK 信號傳導抑制劑包括(但不限於)MEK 抑制劑(例如，MEK1 抑制劑、MEK2 抑制劑及 MEK1 及 MEK2 二者之抑制劑)、RAF 抑制劑(例如，ARAF 抑制劑、BRAF 抑制劑、CRAF 抑制劑及 pan-RAF 抑制劑(亦即，抑制 RAF 家族之一個以上成員(亦即，ARAF、BRAF 及 CRAF 中之兩者或全部三者)之 RAF 抑制劑，例如，pan-RAF 二聚體抑制劑(亦即，可結合且抑制 RAF 二聚體(例如，RAF 異二聚體)之 pan-RAF 抑制劑))，及 ERK 抑制劑(例如，ERK1 抑制劑及 ERK2 抑制劑)。

【0093】 術語「BRAF 抑制劑」或「BRAF 拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、廢除或干擾 BRAF 活化或功能之分子。在特定實施例中，BRAF 抑制劑對 BRAF 之結合親和力(解離常數)為約 1,000 nM 或更小。在另一實施例中，BRAF 抑制劑對 BRAF 之結合親和力為約 100 nM 或更小。在另一實施例中，BRAF 抑制劑對 BRAF 之結合親和力為約 50 nM 或更小。在另一實施例中，BRAF 抑制劑對 BRAF 之結合親和力為約 10 nM 或更小。在另一實施例中，BRAF 抑制劑對 BRAF 之結合親和力為約 1 nM 或更小。在特定實施例中，BRAF 抑制劑以 1,000 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 BRAF 信號傳導。在另一實施例中，BRAF 抑制劑以 500 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 BRAF 信號傳導。在另一實施例中，BRAF 抑制劑以 50 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 BRAF 信號傳導。在另一實施例中，BRAF 抑制劑以 10 nM 或更

小之 IC₅₀ 抑制 BRAF 信號傳導。在另一實施例中，BRAF 抑制劑以 1 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 BRAF 信號傳導。可根據本發明使用之 BRAF 抑制劑之實例包括(但不限於)威羅菲尼(ZELBORAF®)、達拉菲尼(dabrafenib)、恩拉菲尼(encorafenib) (LGX818)、GDC-0879、XL281、ARQ736、PLX3603、RAF265 及索拉菲尼，或其醫藥學上可接受之鹽。BRAF 抑制劑可僅抑制 BRAF，或者可抑制 BRAF 及一或多種其他靶標。較佳 BRAF 抑制劑闡述於 PCT 申請公開案第 WO 2005/062795 號、第 WO 2007/002325 號、第 WO 2007/002433 號、第 WO 2008/079903 號及第 WO 2008/079906 號中，該等公開案中之每一者以全文引用方式併入本文中。

【0094】 術語「ERK 抑制劑」或「ERK 拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、廢除或干擾 ERK (例如，ERK1 及/或 ERK2)活化或功能之分子。在特定實施例中，ERK 抑制劑對 ERK 之結合親和力(解離常數)為約 1,000 nM 或更小。在另一實施例中，ERK 抑制劑對 ERK 之結合親和力為約 100 nM 或更小。在另一實施例中，ERK 抑制劑對 ERK 之結合親和力為約 50 nM 或更小。在另一實施例中，ERK 抑制劑對 ERK 之結合親和力為約 10 nM 或更小。在另一實施例中，ERK 抑制劑對 ERK 之結合親和力為約 1 nM 或更小。在特定實施例中，ERK 抑制劑以 1,000 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ERK 信號傳導。在另一實施例中，ERK 抑制劑以 500 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ERK 信號傳導。在另一實施例中，ERK 抑制劑以 50 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ERK 信號傳導。在另一實施例中，ERK 抑制劑以 10 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ERK 信號傳導。在另一實施例中，ERK 抑制劑以 1 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ERK 信號傳導。可根據本發明使用之 ERK 抑制劑之實例包括(但不限於)拉沃替尼(ravoxertinib) (GDC-0994)及烏利替尼(ulixertinib) (BVD-523)，或其醫藥學上可接受之鹽(例如苯磺酸鹽(例如拉沃替尼之苯磺酸鹽))。ERK 抑制劑可僅抑制 ERK 或可抑制 ERK 及一或多種其他靶標。較佳 ERK 抑制劑闡述於 PCT 申請公開案第 WO 2013/130976 號、第 WO 2012/118850 號、第 WO 2013/020062

號、第 WO 2015/154674 號、第 WO 2015/085007 號、第 WO 2015/032840 號、第 WO 2014/036015 號、第 WO 2014/060395 號、第 WO 2015/103137 號及第 WO 2015/103133 號中，該等申請公開案中之每一者以全文引用方式併入本文中。

【0095】 術語「MEK 抑制劑」或「MEK 拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、廢除或干擾 MEK (例如，MEK1 及/或 MEK2)活化或功能之分子。在特定實施例中，MEK 抑制劑對 MEK 之結合親和力(解離常數)為約 1,000 nM 或更小。在另一實施例中，MEK 抑制劑對 MEK 之結合親和力為約 100 nM 或更小。在另一實施例中，MEK 抑制劑對 MEK 之結合親和力為約 50 nM 或更小。在另一實施例中，MEK 抑制劑對 MEK 之結合親和力為約 10 nM 或更小。在另一實施例中，MEK 抑制劑對 MEK 之結合親和力為約 1 nM 或更小。在特定實施例中，MEK 抑制劑以 1,000 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 MEK 信號傳導。在另一實施例中，MEK 抑制劑以 500 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 MEK 信號傳導。在另一實施例中，MEK 抑制劑以 50 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 MEK 信號傳導。在另一實施例中，MEK 抑制劑以 10 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 MEK 信號傳導。在另一實施例中，MEK 抑制劑以 1 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 MEK 信號傳導。可根據本發明使用之 MEK 抑制劑之實例包括(但不限於)考比替尼(例如，考比替尼半富馬酸鹽；COTELLIC®)、曲美替尼、比美替尼、司美替尼、匹色替尼(pimasertinib)、瑞法替尼、GDC-0623、PD-0325901 及 BI-847325，或其醫藥學上可接受之鹽。MEK 抑制劑可僅抑制 MEK 或可抑制 MEK 及一或多種其他靶標。較佳 MEK 抑制劑闡述於 PCT 申請公開案第 WO 2007/044515 號、第 WO 2008/024725 號、第 WO 2008/024724 號、第 WO 2008/067481 號、第 WO 2008/157179 號、第 WO 2009/085983 號、第 WO 2009/085980 號、第 WO 2009/082687 號、第 WO 2010/003025 號及第 WO 2010/003022 號中，該等申請公開案中之每一者以全文引用方式併入本文中。

【0096】 術語「CRAF 抑制劑」或「CRAF 拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、

廢除或干擾 CRAF 活化或功能之分子。在特定實施例中，CRAF 抑制劑對 CRAF 之結合親和力(解離常數)為約 1,000 nM 或更小。在另一實施例中，CRAF 抑制劑對 CRAF 之結合親和力為約 100 nM 或更小。在另一實施例中，CRAF 抑制劑對 CRAF 之結合親和力為約 50 nM 或更小。在另一實施例中，CRAF 抑制劑對 CRAF 之結合親和力為約 10 nM 或更小。在另一實施例中，CRAF 抑制劑對 CRAF 之結合親和力為約 1 nM 或更小。在特定實施例中，CRAF 抑制劑以 1,000 nM 或更小之 IC50 抑制 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，CRAF 抑制劑以 500 nM 或更小之 IC50 抑制 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，CRAF 抑制劑以 50 nM 或更小之 IC50 抑制 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，CRAF 抑制劑以 10 nM 或更小之 IC50 抑制 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，CRAF 抑制劑以 1 nM 或更小之 IC50 抑制 CRAF 信號傳導。可根據本發明使用之 CRAF 抑制劑之實例包括(但不限於)索拉菲尼或其醫藥學上可接受之鹽。CRAF 抑制劑可僅抑制 CRAF，或者可抑制 CRAF 及一或多種其他靶標。

【0097】術語「pan-RAF 抑制劑」或「pan-RAF 拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、廢除或干擾兩個或更多個 RAF 家族成員(例如 ARAF、BRAF 及 CRAF 中之兩者或更多者)之活化或功能之分子。在一個實施例中，pan-RAF 抑制劑在一定程度上抑制所有三個 RAF 家族成員(亦即 ARAF、BRAF 及 CRAF)。在特定實施例中，pan-RAF 抑制劑對 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 中之一者、兩者或三者之結合親和力(解離常數)為約 1,000 nM 或更小。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑對 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 中之一者、兩者或三者之結合親和力為約 100 nM 或更小。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑對 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 中之一者、兩者或三者之結合親和力為約 50 nM 或更小。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑對 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 中之一者、兩者或三者之結合親和力為約 10 nM 或更小。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑對 ARAF、BRAF 及/或 CRAF

中之一者、兩者或三者之結合親和力為約 1 nM 或更小。在特定實施例中，pan-RAF 抑制劑以 1,000 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑以 500 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑以 50 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑以 10 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 信號傳導。在另一實施例中，pan-RAF 抑制劑以 1 nM 或更小之 IC₅₀ 抑制 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 信號傳導。可根據本發明使用之 pan-RAF 抑制劑之實例包括(但不限於) LY-3009120、HM95573 (GDC-5573)、LXH-254、MLN2480、BeiGene-283、RXDX-105、BAL3833、瑞格菲尼及索拉菲尼，或其醫藥學上可接受之鹽。pan-RAF 抑制劑可抑制 ARAF、BRAF 及/或 CRAF 及一或多種其他靶標。較佳 pan-RAF 抑制劑闡述於 PCT 申請公開案第 WO2013/100632 號、第 WO2014/151616 號及第 WO2015/075483 號中，該等申請公開案中之每一者以全文引用方式併入本文中。

【0098】 在一些實施例中，pan-RAF 抑制劑係可結合並抑制 RAF 二聚體(例如，RAF 異二聚體，例如，BRAF-CRAF 異二聚體)之「pan-RAF 二聚體抑制劑」。除 RAF 二聚體(例如 RAF 異二聚體，例如 BRAF-CRAF 異二聚體)以外，pan-RAF 二聚體抑制劑亦可結合並抑制 RAF 單體。pan-RAF 二聚體抑制劑包括(例如) II 型 RAF 抑制劑，該等 II 型 RAF 抑制劑能夠減少、阻斷、抑制、廢除或干擾兩個或更多個 RAF 家族成員之活化或功能。

【0099】 術語「PI3K 抑制劑」係指減少、阻斷、抑制、廢除或干擾一或多類磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K) (包括 I 類、II 類、III 類及 IV 類 PI3K)之活化或功能之分子。該四類 PI3K 係基於結構及受質特異性來分類。I 類 PI3K 與諸如癌症等人類疾病關係最密切。I 類 PI3K 可進一步分為四種不同的同種型，PI3K α 、PI3K β 、

PI3K γ 及 PI3K δ 。

【0100】 在一些實施例中，PI3K 抑制劑係「pan-PI3K 抑制劑」，其意指能夠優先於任何其他激酶抑制 I 類 PI3K 之任何化合物。例如，pan-I 類 PI3K 抑制劑對 I 類 PI3K 之效力比對其他激酶(包括相關磷脂酰肌醇 3 激酶相關激酶(PIKK)，雷帕黴素(rapamycin) (mTOR)之哺乳動物靶)之效力高至少兩倍，較佳高至少 5 倍，且更佳高至少 10 倍。特定而言，PI3K 抑制劑可為小分子或者可為生物巨分子。通常，PI3K 抑制劑係小分子、較佳合成化合物，例如闡述於美國專利申請公開案第 2010/0249126 號中之彼等。

【0101】 在其他實施例中，PI3K 抑制劑可特異性針對特定的 PI3K 同種型。例如，「PI3K α 特異性抑制劑」意指能夠優先於至少一種(例如一種、兩種或三種)其他 PI3K I 類同種型(PI3K β 、PI3K δ 及/或 PI3K γ)抑制 PI3K α 之任何化合物。例如，PI3K α 特異性抑制劑對 PI3K α 之效力比對 PI3K β 之效力高至少兩倍，較佳高至少 5 倍，且更佳高至少 10 倍，但對 PI3K δ 及/或 PI3K γ 或其他非 I 類 PI3K(例如 II 類 PI3K (例如 PI3K-C2 α)、III 類 PI3K (例如 Vps34)或 IV 類 PI3K (例如，mTOR 或 DNA-PK))之效力可高或可不高至少兩倍、至少 5 倍或至少 10 倍。同樣，「PI3K δ 特異性抑制劑」意指能夠優先於至少一種(例如一種、兩種或三種)其他 PI3K I 類同種型(PI3K α 、PI3K β 及/或 PI3K γ)抑制 PI3K δ 之任何化合物。

【0102】 「KRAS 活化突變」係 *KRAS* 基因(亦即核酸突變)或 *Kras* 蛋白(亦即胺基酸突變)中因有利於 *Kras* 蛋白之活性 GTP 結合狀態而導致與增加及/或組成型活性相關之異常的 *Kras* 蛋白功能之任何突變。突變可能位於有利於 GTP 結合及組成型活性 *Kras* 蛋白之保守位點。在一些情況下，突變係在 *KRAS* 基因之密碼子 12、13 及 16 中之一或多者處(例如，導致在胺基酸位置 13 處具有天冬胺酸(D)而非甘胺酸(G)之 *KRAS* 蛋白(亦即 *KRAS*-G13D 突變蛋白)之 *KRAS* c.38G>A 轉位突變)。其他例示性 *KRAS* 活化突變包括(例如) *KRAS*-G12D、*KRAS*-G12C、

KRAS-G12V、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P 及 KRAS-Q61R，以及編碼 Kras 蛋白之所表示胺基酸變化之 *KRAS* 基因中的相應核酸突變。

【0103】 「NRAS 活化突變」係 *NRAS* 基因(亦即核酸突變)或 Nras 蛋白(亦即胺基酸突變)中因有利於 Nras 蛋白之活性 GTP 結合狀態而導致與增加及/或組成型活性相關之異常 Nras 蛋白功能之任何突變。突變可能位於有利於 GTP 結合及組成型活性 Nras 蛋白之保守位點。在一些情況下，突變位於 *NRAS* 基因之密碼子 12、13 及 16 中之一或多者處。例示性 *NRAS* 活化突變包括(例如) NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 及 NRAS-Q61P，以及編碼 Nras 蛋白之所表示胺基酸改變之 *NRAS* 基因中之相應核酸突變。

【0104】 「BRAF 活化突變」係 *BRAF* 基因(亦即核酸突變)或 B-Raf 蛋白(亦即胺基酸突變)中因有利於 B-Raf 蛋白之活性狀態而導致與增加及/或組成型活性相關之異常 B-Raf 蛋白功能之任何突變。突變可能位於有利於 RAS-GTP 結合及組成型活性 B-Raf 蛋白之保守位點。在某些情況下，突變位於 *BRAF* 基因之密碼子 600。例示性 *BRAF* 活化突變包括(例如) BRAF-V600E、BRAF-V600K、BRAF-V600R 及 BRAF-V600D，以及編碼 B-Raf 蛋白之所表示胺基酸改變之 *BRAF* 基因中之相應核酸突變。

【0105】 本文中之「個體(individual)」、「患者」或「個體(subject)」係指正在經歷、已經歷細胞增殖性疾病或病症(例如癌症)之一或多種體征、症狀或其他適應症、具有發展其風險或具有其家族史之適於治療的動物(包括(例如)哺乳動

物，例如狗、貓、馬、兔、動物園動物、牛、豬、綿羊、非人類靈長類動物及人類)。意欲作為患者納入者係指參與臨床研究試驗但未顯示疾病之任何臨床體征、參與流行病學研究或曾經用作對照之任何患者。患者可能先前已用 MAPK 信號傳導抑制劑、額外藥物(例如 PI3K 抑制劑)治療過，或者先前未經治療過。當開始治療時，患者可能未經正在使用之額外藥物治療，亦即，患者先前在「基線」(亦即，在本文之治療方法中投與第一劑量之一或多種 MAPK 路徑及/或 PI3K 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑)之前設定的時間點，例如在開始治療前在篩選個體當天)時可能未利用(例如)除包括 MAPK 信號傳導抑制劑(例如 MEK 抑制劑、BRAF 抑制劑、ERK 抑制劑、CRAF 抑制劑或 RAF 抑制劑)或 PI3K 抑制劑之療法以外的療法進行治療。此一「未經治療之」患者或個體通常視為利用該等額外藥物治療之候選者。

【0106】 本文中之術語「抗體」係以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現期望之抗原結合活性即可。

【0107】 「突變」係一或多個核苷酸或一或多個胺基酸分別相對於參考核苷酸序列或參考胺基酸序列(例如野生型序列)之缺失、插入或取代。

【0108】 「多核苷酸」或「核酸」在本文可互換使用，其係指任何長度之核苷酸之聚合物且包括 DNA 及 RNA。核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基及/或其類似物，或可藉由 DNA 或 RNA 聚合酶或藉由合成反應納入聚合物中之任何受質。因此，例如，本文定義之多核苷酸包括(但不限於)單鏈及雙鏈 DNA、包括單鏈及雙鏈區域之 DNA、單鏈及雙鏈 RNA 及包括單鏈及雙鏈區域之 RNA、包含可為單鏈或更通常為雙鏈或包括單鏈及雙鏈區域之 DNA 及 RNA 之雜交分子。另外，本文所用術語「多核苷酸」係指包含 RNA 或 DNA 或 RNA 及 DNA 二者之三鏈區域。該等區域中之鏈可來自同一分子或不同

的分子。該等區域可包括該等分子中之一或多者之全部，但更通常僅涉及該等分子中之一部分之區域。三螺旋區域之分子之一通常係寡核苷酸。術語「多核苷酸」特定地包括 cDNA。

【0109】 多核苷酸可包含經修飾核苷酸，例如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，核苷酸結構之修飾可以在聚合物組裝之前或之後進行。核苷酸序列可間雜有非核苷酸組分。多核苷酸可在合成後藉由(例如)與標記偶聯來進一步修飾。其他類型之修飾包括(例如)「加帽」，利用類似物取代一或多個天然核苷酸，核苷酸間修飾，例如具有不帶電鍵聯(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、磷醯胺酯、胺基甲酸酯及諸如此類)及帶電鍵聯(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯及諸如此類)之彼等、含有懸掛部分(例如蛋白質(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚-L-離胺酸及諸如此類))之彼等、具有嵌入劑(例如，吡啶、補骨脂素及諸如此類)之彼等、含有螯合劑(例如，金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬及諸如此類)之彼等、含有烷基化劑之彼等、具有經修飾鍵聯(例如， α 變旋異構核酸)之彼等，以及多核苷酸之未經修飾形式。此外，通常存在於糖中之任何羥基可經(例如)磷酸根基團、磷酸根基團置換，經標準保護基團保護，或經活化以製備至其他核苷酸之其他鍵聯，或可偶聯至固體或半固體載劑。5'及 3'末端 OH 可經磷酸化或經胺或 1 至 20 個碳原子之有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生成標準保護基團。多核苷酸亦可含有業內通常已知之核糖或去氧核糖之類似形式，包括(例如) 2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基-核糖、2'-氟-或 2'-疊氨基-核糖、碳環糖類似物、 α -變旋異構糖、差向異構糖(例如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖、吡喃糖、呋喃糖、景天酮庚糖)、無環類似物及無鹼基核苷類似物(例如甲基核糖苷)。一或多個磷酸二酯鍵聯可經替代連接基團置換。該等替代連接基團包括(但不限於)其中磷酸根經 $P(O)S$ (「硫代酸根」)、 $P(S)S$ (「二硫代酸根」)、 $(O)NR_2$ (「醯胺酸根(amidate)」)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、CO 或 CH_2 (「甲縮醛」)取代之實施例，其中各 R 或 R'獨立地

為 H 或視情況含有醚(-O-)鍵聯之經取代或未經取代之烷基(1-20 個 C)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基。並非多核苷酸中之所有鍵聯皆需要相同。多核苷酸可含有一或多種如本文所述之不同類型之修飾及/或多種相同類型之修飾。前述闡述適用於本文所提及之所有多核苷酸(包括 RNA 及 DNA)。

【0110】 本文所用之「寡核苷酸」通常係指長度通常但不一定小於約 250 個核苷酸之短單鏈多核苷酸。寡核苷酸可為合成的。術語「寡核苷酸」及「多核苷酸」不相互排斥。多核苷酸之上文闡述同樣且完全適用於寡核苷酸。

【0111】 術語「引子」係指能夠與核酸雜交並允許互補核酸聚合之單鏈多核苷酸，通常藉由提供游離 3'-OH 基團進行。

【0112】 術語「小分子」係指分子量為約 2,000 道爾頓(dalton)或更小、較佳約 500 道爾頓或更小之任何分子。

【0113】 術語「檢測」包括任何檢測手段，包括直接及間接檢測。

【0114】 本文所用術語「生物標記物」係指可在試樣中檢測到之指示物分子或分子組(例如，預測性、診斷性及/或預後性指示物)，且包括(例如)蛋白質之 *KRAS*-G13D 突變或 *NRAS* 活化突變及/或核苷酸層面之相應活化突變(例如，*KRAS* 或 *NRAS* 基因之核苷酸突變，例如 *KRAS* c.38G>A 核苷酸取代突變)。生物標記物可為預測性生物標記物，且用作患有特定疾病或病症(例如增殖性細胞病症(例如癌症))之患者對利用(例如)pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之治療之敏感性或益處之可能性的指示物。生物標記物包括(但不限於)多核苷酸(例如 DNA 及/或 RNA (例如 mRNA))、多核苷酸拷貝數改變(例如 DNA 拷貝數)、多肽、多肽及多核苷酸修飾(例如轉譯後修飾)、碳水化合物及/或基於醣脂之分子標記物。在一些實施例中，如上所提及，生物標記物係基因(例如，*KRAS* 或 *NRAS* 基因)。

【0115】 本文所用生物標記物之「存在」係生物試樣中之可檢測量。該等可

藉由熟悉此項技術者已知且在本文中揭示之方法來量測。

【0116】 本文所用之「擴增(amplifying 或 amplification)」通常係指產生期望序列之多個拷貝之過程。「多個拷貝」意指至少兩個拷貝。「拷貝」不一定意味著與模板序列之完全序列互補性或同一性。例如，拷貝可包括核苷酸類似物，例如去氧肌苷、有意的序列改變(如藉助包含可雜交但與模板不互補之序列之引子引入之序列改變)及/或在擴增期間發生之序列錯誤。

【0117】 術語「多重 PCR」係指出於在單次反應中擴增兩條或更多條 DNA 序列之目的，使用一個以上引子集對自單一來源(例如個體)獲得之核酸實施之單次 PCR 反應。

【0118】 本文所用之「聚合酶鏈式反應」或「PCR」之技術通常係指其中擴增微量之特定核酸、RNA 及/或 DNA 片段之程序，如例如美國專利第 4,683,195 號中所述。通常，需要獲得感興趣區域末端或以外之序列資訊，從而可設計寡核苷酸引子；該等引子之序列與欲擴增模板之相反鏈相同或相似。兩個引子之 5'末端核苷酸可能與擴增材料之末端一致。PCR 可用於擴增特定 RNA 序列、來自總基因體 DNA 之特定 DNA 序列以及自總細胞 RNA、噬菌體或質體序列轉錄之 cDNA 等。通常參見 Mullis 等人，*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263 (1987)及 Erlich 編輯之 *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989)。如本文所用，PCR 被視為用於擴增核酸測試試樣之核酸聚合酶反應方法之一但並非唯一的實例，其包含使用已知核酸(DNA 或 RNA)作為引子，及利用核酸聚合酶擴增或生成特定核酸片段或擴增或生成與具體核酸互補之特定核酸片段。

【0119】 「定量即時聚合酶鏈式反應」或「qRT-PCR」係指 PCR 之一種形式，其中在 PCR 反應之每一步驟中量測 PCR 產物之量。此技術已闡述於各種出版物中，包括(例如)Cronin 等人，*Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004)及 Ma 等人，*Cancer Cell* 5:607-616 (2004)。

【0120】 術語「微陣列」係指可雜交陣列元件、較佳多核苷酸探針在基板上之有序排列。

【0121】 本文所用術語「試樣」係指自個體(例如，感興趣之個體)獲得或衍生之組合物，其含有欲基於(例如)物理、生物化學、化學及/或生理特徵表徵及/或鑑別之細胞及/或其他分子實體。例如，片語「疾病試樣」及其變化形式係指自感興趣之個體獲得之任何試樣，預計或已知該任何試樣含有欲表徵之細胞及/或分子實體。試樣包括(但不限於)組織試樣(例如腫瘤組織試樣)、原代或培養之細胞或細胞系、細胞上清液、細胞溶解物、血小板、血清、血漿、玻璃體液、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、羊水、奶水、全血、血液源性細胞、尿液、腦脊髓液、唾液、痰液、淚液、汗液、黏液、腫瘤溶解物及組織培養基、組織提取物(例如均質組織)、腫瘤組織、細胞提取物及其組合。

【0122】 「組織試樣」意指自個體(subject 或 individual)之組織獲得之類似細胞之集合。組織試樣之來源可為來自新鮮、冷凍及/或保存之器官、組織試樣、活組織檢查及/或抽吸物之實體組織；血液或任何血液成分，例如血漿；體液，例如腦脊液、羊水、腹膜液或間隙液；及來自個體妊娠或發育中任何時間之細胞。組織試樣亦可為原代或培養之細胞或細胞系。視情況，自疾病組織/器官獲得組織試樣。例如，「腫瘤組織試樣」係自腫瘤或其他癌組織獲得之組織試樣。組織試樣可含有混合之細胞類型群體(例如，腫瘤細胞及非腫瘤細胞、癌細胞及非癌細胞)。組織試樣可含有本質上天然不與組織混雜之化合物，例如防腐劑、抗凝劑、緩衝劑、固定劑、營養劑、抗生素或諸如此類。

【0123】 本文所用之「參考試樣」、「參考細胞」、「參考組織」、「對照試樣」、「對照細胞」或「對照組織」係指用於比較目的之試樣、細胞、組織、標準或水準。在一個實施例中，參考水準、參考試樣、參考細胞、參考組織、對照試樣、對照細胞或對照組織係自同一個體(subject 或 individual)身體之健康

及/或非患病部分(例如，組織或細胞)獲得。例如，參考水準、參考試樣、參考細胞、參考組織、對照試樣、對照細胞或對照組織可為與患病細胞或組織毗鄰之健康及/或非患病細胞或組織(例如，與腫瘤毗鄰之細胞或組織)。在另一實施例中，參考試樣係自同一個體(subject 或 individual)身體之未處理組織及/或細胞獲得。在又一實施例中，參考水準、參考試樣、參考細胞、參考組織、對照試樣、對照細胞或對照組織係自不為個體(subject 或 individual)之個體之身體健康及/或非患病部分(例如，組織或細胞)獲得。在甚至另一實施例中，參考水準、參考試樣、參考細胞、參考組織、對照試樣、對照細胞或對照組織係自不為個體(subject 或 individual)之個體之身體未處理組織及/或細胞獲得。

【0124】 出於本文之目的，組織試樣之「切片」意指組織試樣之單一部分或片段，例如自組織試樣(例如腫瘤試樣)裂解之組織或細胞之薄片。應理解可以獲取組織試樣之多個切片並進行分析，條件係應理解可以在形態學及分子層面上對組織試樣之同一切片進行分析，或者針對多肽(例如，藉由免疫組織化學)及/或多核苷酸(例如，藉由原位雜交)進行分析。

【0125】 「相關(correlate 或 correlating)」意指以任一方式將第一分析或方案之性能及/或結果與第二分析或方案之性能及/或結果進行比較。例如，可在實施第二方案時使用第一分析或方案之結果，及/或可使用第一分析或方案之結果來確定是否應實施第二分析或方案。關於多肽分析或方案之實施例，可使用多肽表現分析或方案之結果來確定是否應實施特定治療方案。關於多核苷酸分析或方案之實施例，可使用多核苷酸表現分析或方案之結果來確定是否應實施特定治療方案。

【0126】 「個體反應」或「反應」可使用指示對個體有益之任何終點來評估，該終點包括(但不限於)：(1)在一定程度上抑制疾病進展(例如癌症進展)，包括減慢或完全停止；(2)腫瘤大小減小；(3)抑制(亦即，減少、減慢或完全停止)癌細

胞浸潤至毗鄰外周器官及/或組織中；(4)抑制(亦即減少、減慢或完全停止)轉移；(5)在一定程度上緩解與疾病或病症(例如癌症)相關之一或多種症狀；(6)增加或延長存活時間，包括整體存活及無進展存活；及/或(7)治療後給定時間點之死亡率降低。

【0127】 個體對治療之「有效反應」或個體對治療之「反應性」係指賦予具有疾病或病症(例如癌症)風險或患有疾病或病症之患者之臨床或治療益處。在一個實施例中，該益處包括以下各項中之任一者或多者：延長存活(包括整體存活及/或無進展存活)；導致客觀反應(包括完全反應或部分反應)；或改良癌症之體征或症狀。在一個實施例中，使用至少一種生物標記物(例如，KRAS-G13D 突變或 NRAS 活化突變)來鑑別經預測對包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑) (單獨或與 MEK 抑制劑、PI3K 抑制劑(例如，pan-PI3K 抑制劑)及/或額外治療劑(例如，免疫治療劑、細胞毒劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合)之治療之反應之可能性增加的患者。在一個實施例中，使用至少一種生物標記物(例如，KRAS-G13D 突變或 NRAS 活化突變)來鑑別經預測對包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑) (單獨或與 MEK 抑制劑、PI3K 抑制劑(例如，pan-PI3K 抑制劑)及/或額外治療劑(例如，免疫治療劑、細胞毒劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合)之治療之反應之可能性增加的患者。

【0128】 「客觀反應」係指可量測之反應，包括完全反應(CR)或部分反應(PR)。在一些實施例中，「客觀反應率(ORR)」係指完全反應(CR)率及部分反應(PR)率之總和。

【0129】 「完全反應」或「CR」意指因應治療增殖性細胞病症(例如癌症)之所有體征皆消失(例如，所有靶病灶皆消失)。此並不總是意味著疾病(例如癌症)已經治癒。

【0130】 「持續反應」係指停止治療後對減少腫瘤生長之持續效應。例如，與藥劑投與階段開始時之大小相比，腫瘤大小可以相同或更小。在一些實施例中，持續反應之持續時間至少與治療持續時間相同，至少為治療持續時間之 1.5 倍、2.0 倍、2.5 倍或 3.0 倍長或更長。

【0131】 本文所用之「減少或抑制癌症復發」係指減少或抑制腫瘤或癌症復發或腫瘤或癌症進展。如本文所揭示，癌症復發及/或癌症進展包括(但不限於)癌症轉移。

【0132】 本文所用之「部分反應」或「PR」係指一或多種腫瘤或病灶之大小或體內癌症之程度因應治療而減小。例如，在一些實施例中，PR 係指以基線 SLD 作為參考，靶標病灶之最長直徑(SLD)之總和至少減少 30%。

【0133】 術語「存活」係指患者保持活著，且包括整體存活以及無進展存活。

【0134】 本文所用之「無進展存活」或「PFS」係指治療期間及治療之後所治療之疾病(例如癌症)不惡化之時間長度。無進展存活可包括患者已經歷完全反應或部分反應之時間之量以及患者已經歷穩定疾病之時間之量。

【0135】 本文所用之「整體存活」或「OS」係指群中在具體持續時間之後可能活著之個體之百分比。

【0136】 「延長存活」意指相對於未治療之患者(亦即相對於未用藥劑治療之患者)，或相對於未以指定水準表現生物標記物之患者，及/或相對於用抗腫瘤劑治療之患者，增加經治療患者之整體存活或無進展存活。

【0137】 「治療有效量」係指用於治療或預防哺乳動物之疾病或病症之治療劑的量。在癌症之情況下，治療有效量之治療劑可以減少癌細胞之數量；減小原發性腫瘤之大小；抑制(亦即，在一定程度上減緩且較佳停止)癌細胞浸潤至外周器官中；抑制(亦即，在一定程度上減緩並且較佳停止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上減輕與病症相關之一或多種症狀。就藥物

可阻止生長及/或殺死現有癌細胞之程度而言，該藥物可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。對於癌症療法，活體內功效可藉由(例如)評估存活持續時間、疾病進展時間(TTP)、反應率(例如 CR 及 PR)、反應持續時間及/或生活品質來量測。

【0138】 「病症」係指可受益於治療之任何病況，包括(但不限於)慢性及急性病症或疾病，包括彼等使哺乳動物易患所述病症之病理病況。

【0139】 術語「癌症」及「癌性」係指或闡述哺乳動物之通常以細胞生長不受調節為特徵之生理病況。此定義包括良性及惡性癌症。癌症之實例包括(但不限於)癌；淋巴瘤；母細胞瘤(包括髓母細胞瘤及視網膜母細胞瘤)；肉瘤(包括脂肪肉瘤及滑膜細胞肉瘤)；神經內分泌腫瘤(包括類癌瘤、胃泌素瘤及胰島細胞癌)；間皮瘤；神經鞘瘤(包括聽神經瘤)；腦脊髓膜瘤；腺癌；黑色素瘤；及白血病或淋巴惡性病。該等癌症之更具體實例包括膀胱癌(例如，尿路膀胱癌(例如，移行細胞癌或尿路上皮癌、非肌肉侵襲性膀胱癌、肌肉侵襲性膀胱癌及轉移性膀胱癌)及非尿路膀胱癌)；鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)；肺癌，包括小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌及肺鱗狀癌；腹膜癌；肝細胞癌；胃癌(gastric 或 stomach cancer)，包括胃腸癌；胰腺癌；神經膠母細胞瘤；子宮頸癌；卵巢癌；肝癌；肝細胞瘤；乳癌(包括轉移性乳癌)；結腸癌；直腸癌；結腸直腸癌；子宮內膜癌或子宮癌；唾液腺癌；腎癌(kidney 或 renal cancer)；前列腺癌；外陰癌；甲狀腺癌；肝癌；肛門癌；陰莖癌；默克爾細胞癌；蕈狀肉芽腫；睪丸癌；食道癌；膽道腫瘤；頭頸癌；及血液惡性病。在一些實施例中，癌症係三陰性轉移性乳癌，包括具有局部復發或轉移性疾病(其中局部復發之疾病不適合治癒意圖之切除術)之任何組織學證實之三陰性(ER-、PR-、HER2-)乳房腺癌。在一些實施例中，癌症係皮膚癌，包括黑色素瘤，例如具有局部復發或轉移性疾病之黑色素瘤(其中局部復發疾病不適合治癒意圖之切除術)。任何癌症可處於早期或晚期。「早期癌症」或「早期腫瘤」意指沒有侵襲性或轉移

性之癌症，或者經分類為 0 期、1 期或 2 期癌症。

【0140】 本文所用之術語「腫瘤」係指所有贅瘤細胞生長及增殖(無論惡性抑或良性)，以及所有癌前及癌性細胞及組織。術語「癌症」、「癌性」及「腫瘤」在本文中提及時並不相互排斥。

【0141】 術語「醫藥調配物」係指如下製劑：其形式允許其中所含活性成分之生物活性有效，並且不含對可投與調配物之個體具有不可接受之毒性之額外組分。

【0142】 「醫藥學上可接受之賦形劑」係指醫藥調配物中除活性成分以外之對個體無毒之成分。醫藥學上可接受之賦形劑包括(但不限於)緩衝劑、載劑、穩定劑或防腐劑。

【0143】 術語「醫藥學上可接受之鹽」表示在生物學上或其他方面並非不合意之鹽。醫藥學上可接受之鹽包括酸及鹼加成鹽。片語「醫藥學上可接受」指示物質或組合物在化學及/或毒物學上必須與組成調配物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物相容。

【0144】 術語「醫藥學上可接受之酸加成鹽」表示彼等用下列酸形成之醫藥學上可接受之鹽：無機酸，例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、碳酸、磷酸；及選自脂肪族、環脂肪族、芳族、芳脂族、雜環、羧酸及磺酸類有機酸之有機酸，例如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、葡萄糖酸、乳酸、丙酮酸、草酸、蘋果酸、馬來酸、丙二酸、琥珀酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、天冬胺酸、抗壞血酸、麩胺酸、鄰胺苯甲酸、苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、撲酸、苯乙酸、甲磺酸「甲磺酸鹽」、乙磺酸、對甲苯磺酸及水楊酸。

【0145】 術語「醫藥學上可接受之鹼加成鹽」表示彼等用有機或無機鹼形成之醫藥學上可接受之鹽。可接受之無機鹼之實例包括鈉、鉀、銨、鈣、鎂、鐵、鋅、銅、錳及鋁鹽。衍生自醫藥學上可接受之有機無毒鹼之鹽包括以下各項之

鹽：一級胺、二級胺及三級胺、經取代胺(包括天然存在之經取代胺)、環胺及鹼性離子交換樹脂，例如異丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二乙基胺基乙醇、三甲胺、二環己胺、離胺酸、精胺酸、組胺酸、咖啡因、普魯卡因(procaine)、哈胺(hydrabamine)、膽鹼、甜菜鹼、乙二胺、葡糖胺、葡甲胺、可可鹼、嘌呤、六氫吡嗪、六氫吡啶、N-乙基六氫吡啶及多胺樹脂。

【0146】 本文所用之「治療(treatment)」(及其語法變化形式，例如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指嘗試改變所治療個體之自然病程之臨床介入，並且可針對預防或在臨床病理學過程期間實施。合意之治療效應包括(但不限於)預防疾病之發生或復發、緩和症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理後果、預防轉移、降低疾病進展速率、改善或環節疾病狀態、以及緩解或改良預後。在一些實施例中，pan-RAF 二聚體抑制劑用於延遲疾病之發展或減慢疾病之進展。在一些實施例中，pan-RAF 二聚體抑制劑與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑(例如，pan-PI3K 抑制劑)組合使用，以延遲疾病之發展或減慢疾病之進展。

【0147】 術語「抗癌療法」係指可用於治療癌症之療法。抗癌治療劑之實例包括(但不限於)細胞毒性劑、化學治療劑、生長抑制劑、放射療法中使用之藥劑、抗血管生成劑、細胞凋亡劑、抗微管蛋白劑及治療癌症之其他藥劑，例如抗 CD20 抗體、血小板源性生長因子抑制劑(例如 GLEEVEC® (甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)))、COX-2 抑制劑(例如塞來昔布(celecoxib))、干擾素、細胞介素、結合至以下靶標 PDGFR- β 、BlyS、APRIL、BCMA 受體、TRAIL/Apo2 中之一或多者之拮抗劑(例如中和抗體)，其他生物活性及有機化學劑，及諸如此類。其組合亦包括在本發明中。

【0148】 本文所用術語「細胞毒劑」係指抑制或防止細胞功能及/或導致細胞破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如，At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 及 Lu 之放射性同位素)；化學治療劑，例如胺甲喋呤

(methotrexate)、阿黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素 C (mitomycin C)、氮芥苯丁酸(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他嵌入劑；酶及其片段，例如核溶解酶；抗生素；及細菌、真菌、植物或動物起源之毒素，例如小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段及/或變體，及下文所揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。其他細胞毒劑如下文所闡述。殺瘤劑引起腫瘤細胞之破壞。

【0149】 「化學治療劑」係可用於治療癌症之化學化合物。化學治療劑之實例包括烷基化劑，例如噻替派(thiotepa)及 CYTOXAN® (環磷醯胺)；磺酸烷基酯，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)，例如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、甲脲多巴(meturedopa)及脲多巴；伸乙亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷醯胺、三乙烯硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺；番荔枝內酯(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚(dronabinol)、MARINOL®)； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼；樺木酸；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓泊替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康(irinotecan)、CAMPTOSAR®)、乙醯喜樹鹼、東莨菪素(scopolectin)及 9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素；卡利斯他汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；念珠藻素(cryptophycin)(特別係念珠藻素 1 及念珠藻素 8)；尾海兔素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)(包括合成類似物 KW-2189 及 CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥，如氮芥苯丁酸、氮芥

(chlornaphazine)、環磷醯胺、雌氯芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲基二氯乙基胺(mechlorethamine)、鹽酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖、新氮芥(novembichin)、膽甾醇對苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥；亞硝脲類，例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，例如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ 1I 及刺孢黴素 ω 1I) (例如參見 Nicolaou 等人，*Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))，達內黴素(dynemicin) (包括達內黴素 A)、埃斯波黴素(esperamicin)，以及新制癌菌素(neocarzinostatin)發色團及相關之色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、安麴黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸、博萊黴素(bleomycin)、放線菌素 C (cactinomycin)、卡柔比星(carubicin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素 D (dactinomycin)、道諾黴素、地拖比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN® (多柔比星) (包括嗎啉基-多柔比星、氰基嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及去氧多柔比星)、泛艾黴素(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin) (例如絲裂黴素 C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、泊非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他汀(zinostatin)及佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，例如胺甲蝶呤及 5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，例如二甲葉酸(denopterin)、胺甲蝶呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似

物，例如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-阿紮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷；雄激素，例如卡普甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitioanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯；抗腎上腺藥，例如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，例如亞葉酸；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺醣苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；倍曲布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；依氟鳥胺酸(eflornithine)；依利醋胺(elliptinium acetate)；埃博黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂(gallium nitrate)；羥基脲；香菇多醣(lentinan)；氯尼達明(lonidamine)；類美登素(maytansinoid)，例如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidanmol)；二胺硝吡啶(nitracrine)；噴司他汀(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；利索新(rhizoxin)；西左非蘭(sizofiran)；鎳螺胺(spirogermanium)；替奴佐酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(trichothecene)(尤其 T-2 毒素)、疣孢菌素 A (verracurin A)、桿孢菌素 A (roridin A)及蛇形菌素(anguidine)；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)(ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加賽特辛(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside)(「Ara-C」)；噻替派；類紫杉醇(taxoids)，例如紫杉烷(taxane)，

包括 TAXOL® (太平洋紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™ (太平洋紫杉醇之無克列莫佛(Cremophor)之白蛋白改造之奈米粒子調配物) (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及 TAXOTERE® (多西他賽(docetaxel)) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；氮芥苯丁酸；吉西他濱(gemcitabine) (GEMZAR®)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；胺甲嘌呤；鉑(platinum)或基於鉑之化學治療劑及鉑類似物，例如順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin) (ELOXATIN™)、沙鉑(satraplatin)、吡鉑(picoplatin)、奈達鉑(nedaplatin)、三鉑(triplatin)及利泊鉑(lipoplatin)；長春鹼(VELBAN®)；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼(ONCOVIN®)；奧沙利鉑；甲醯四氫葉酸(leucovorin)；長春瑞濱(vinorelbine) (NAVELBINE®)；能滅瘤(novantrone)；依達曲沙；道諾黴素；胺嘌呤(aminopterin)；伊班膦酸(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視色素，例如視黃酸；卡培他濱(capecitabine) (XELODA®)；上述各項中任一者之醫藥學上可接受之鹽或酸；以及上述各項中之兩者或更多者之組合，例如 CHOP(環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及波尼松龍(prednisolone)之組合療法之縮寫)及 FOLFOX (奧沙利鉑(ELOXATIN™)與 5-FU 及甲醯四氫葉酸組合之治療方案之縮寫)。額外化學治療劑包括可用作抗體藥物偶聯物之細胞毒性劑，例如類美登素(例如 DM1)及奧里斯他汀(例如 MMAE 及 MMAF)。

【0150】 「化學治療劑」亦包括「抗激素劑」或「內分泌治療劑」，其用於調節、減少、阻斷或抑制可促進癌症生長之激素之效應，並且通常呈系統或全身治療之形式。其可能係激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括(例如)他莫昔芬(tamoxifen) (包括 NOLVADEX®他莫昔芬)、EVISTA®雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃

昔芬(trioxifene)、可莫昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及 FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗助孕素；雌激素受體下調因子(ERD)；用於阻抑或關閉卵巢之藥劑，例如促黃體素釋放激素(LHRH)激動劑，例如 LUPRON®及 ELIGARD®乙酸柳培林(leuprolide acetate)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acterate)、乙酸布舍瑞林(buserelin acterate)及曲普瑞林(tripterelin)；其他抗雄激素，例如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及抑制調節腎上腺雌激素生成之芳香酶之芳香酶抑制劑，例如 4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE®乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美坦(formestane)、法曲唑(fadrozole)、RIVISOR®伏氯唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及 ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole)。另外，化學治療劑之該定義包括雙膦酸鹽，例如氯膦酸鹽(例如，BONEFOS®或 OSTAC®)、DIDROCAL®依替膦酸鹽(etidronate)、NE-58095、ZOMETA®唑來膦酸/唑來膦酸鹽、FOSAMAX®阿倫膦酸鹽(alendronate)、AREDIA®帕米膦酸鹽(pamidronate)、SKELID®替魯膦酸鹽(tiludronate)或 ACTONEL®利塞膦酸鹽(risedronate)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，特別係抑制信號傳導路徑中參與異常細胞增殖之基因(例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 及表皮生長因子受體(EGFR))之表現之彼等，；疫苗，例如 THERATOPE®疫苗及基因治療疫苗，例如 ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及 VAXID®疫苗；LURTOTECAN®拓撲異構酶 1 抑制劑；ABARELIX®rmRH；二對甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)(ErbB-2 及 EGFR 雙酪氨酸激酶小分子抑制劑，亦稱為 GW572016)；及上述各項中之任一者之醫藥學上可接受之鹽或酸。

【0151】 化學治療劑亦包括抗體，例如阿倫單抗(alemtuzumab)(Campath®)、貝伐珠單抗(bevacizumab)(AVASTIN®, Genentech)；西妥昔單抗(cetuximab)

(ERBITUX®, Imclone)；帕尼單抗(panitumumab) (VECTIBIX®, Amgen)、利妥昔單抗(rituximab) (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec)、帕妥珠單抗(pertuzumab) (OMNITARG®, 2C4, Genentech)、曲妥珠單抗(trastuzumab) (HERCEPTIN®, Genentech)、托西莫單抗(tositumomab) (Bexxar®, Corixa)，及抗體藥物偶聯物吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin) (MYLOTARG®, Wyeth)。作為藥劑與本發明化合物組合具有治療潛力之其他人類化單株抗體包括：阿泊珠單抗(apolizumab)、阿塞珠單抗(aselizumab)、阿利珠單抗(atlizumab)、巴匹珠單抗(bapineuzumab)、比伐單抗莫登素(bivatuzumab mertansine)、坎妥珠單抗莫登素(cantuzumab mertansine)、西利珠單抗(cedelizumab)、聚乙二醇化賽妥珠單抗(certolizumab pegol)、西夫妥珠單抗(cidfusituzumab)、西妥珠單抗(cidtuzumab)、達克珠單抗(daclizumab)、依庫珠單抗(eculizumab)、依法利珠單抗(efalizumab)、依帕珠單抗(epratuzumab)、厄利珠單抗(erlizumab)、非維珠單抗(felvizumab)、芳妥珠單抗(fontolizumab)、吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)、伊珠單抗奧唑米星(inotuzumab ozogamicin)、伊匹單抗(ipilimumab)、拉貝珠單抗(labetuzumab)、林妥珠單抗(lintuzumab)、馬妥珠單抗(matuzumab)、美泊利單抗(mepolizumab)、莫維珠單抗(motavizumab)、莫妥維珠單抗(motovizumab)、那他珠單抗(natalizumab)、尼妥珠單抗(nimotuzumab)、諾維珠單抗(nolovizumab)、奴馬珠單抗(numavizumab)、歐瑞珠單抗(ocrelizumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、帕利珠單抗(palivizumab)、帕考珠單抗(pascolizumab)、泊夫妥珠單抗(pecfusituzumab)、泊妥珠單抗(pectuzumab)、培克珠單抗(pexelizumab)、拉維珠單抗(ralivizumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、瑞利維珠單抗(reslivizumab)、瑞利珠單抗(reslizumab)、瑞維珠單抗(resyvizumab)、羅維珠單抗(rovelizumab)、魯利珠單抗(ruplizumab)、西羅珠單抗(sibrotuzumab)、西利珠單抗(siplizumab)、索土珠單抗(sontuzumab)、他妥珠單抗替曲坦(tacatuzumab tetraxetan)、他度珠單抗

(tadocizumab)、他利珠單抗(talizumab)、替非珠單抗(tefibazumab)、托珠單抗(tocilizumab)、托利珠單抗(toralizumab)、托卡珠單抗西莫介白素(tucotuzumab celmoleukin)、土庫妥珠單抗(tucosituzumab)、烏維珠單抗(umavizumab)、烏珠單抗(urtoxazumab)、優特克單抗(ustekinumab)、維西珠單抗(visilizumab)及抗介白素-12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories)，其係經遺傳修飾以識別介白素-12 p40 蛋白之重組的人類所特有序列的全長 IgG1 λ 抗體。

【0152】 化學治療劑亦包括「EGFR 抑制劑」，其係指與 EGFR 結合或以其他方式直接相互作用並防止或降低其信號傳導活性之化合物，且或者稱作「EGFR 拮抗劑」。該等藥劑之實例包括結合至 EGFR 之抗體及小分子。結合至 EGFR 之抗體之實例包括 MAbs 579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb 455 (ATCC CRL HB8507)、MAb 225 (ATCC CRL 8508)、MAb 528 (ATCC CRL 8509) (參見美國專利第 4,943,533 號，Mendelsohn 等人)及其變體，例如嵌合 225 (C225 或西妥昔單抗；ERBUTIX®)及重塑人類 225 (H225) (參見 WO 96/40210，Imclone Systems Inc.)；IMC-11F8，一種全人類之 EGFR 靶向抗體(Imclone)；結合 II 型突變 EGFR 之抗體(美國專利第 5,212,290 號)；結合 EGFR 之人類化及嵌合抗體，如美國專利第 5,891,996 號所闡述；及結合 EGFR 之人類抗體，例如 ABX-EGF 或帕尼單抗(參見 WO98/50433，Abgenix/Amgen)；EMD 55900 (Stragliotto 等人，*Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996))；EMD7200 (馬妥珠單抗)，一種與 EGF 及 TGF- α 競爭 EGFR 結合之針對 EGFR 之人類化 EGFR 抗體(EMD/Merck)；人類 EGFR 抗體，HuMax-EGFR (GenMab)；作為 E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3 及 E7.6.3 已知並闡述於 US 6,235,883 中之全人類抗體；MDX-447 (Medarex Inc)；及 mAb 806 或人類化 mAb 806 (Johns 等人，*J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004))。抗 EGFR 抗體可與細胞毒劑偶聯，從而生成免疫偶聯物(例如參見 EP 659,439A2, Merck Patent GmbH)。EGFR 拮抗劑包括小分子，例如闡述於以下美

國專利中之化合物：第 5,616,582 號、第 5,457,105 號、第 5,475,001 號、第 5,654,307 號、第 5,679,683 號、第 6,084,095 號、第 6,265,410 號、第 6,455,534 號、第 6,521,620 號、第 6,596,726 號、第 6,713,484 號、第 5,770,599 號、第 6,140,332 號、第 5,866,572 號、第 6,399,602 號、第 6,344,459 號、第 6,602,863 號、第 6,391,874 號、第 6,344,455 號、第 5,760,041 號、第 6,002,008 號及第 5,747,498 號，以及以下 PCT 公開案：WO 98/14451、WO 98/50038、WO 99/09016 及 WO 99/24037。具體的小分子 EGFR 拮抗劑包括 OSI-774 (CP-358774，埃羅替尼 (erlotinib)，TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals)；PD 183805 (CI 1033，2-丙烯醯胺，N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-7-[3-(4-嗎啉基)丙氧基]-6-喹唑啉基]-，二鹽酸鹽，Pfizer Inc.)；ZD1839，吉非替尼 (gefitinib) (IRESSA®) 4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-嗎啉丙氧基)喹唑啉，AstraZeneca)；ZM 105180 ((6-胺基-4-(3-甲基苯基-胺基)-喹唑啉，Zeneca)；BIBX-1382 (N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-六氫吡啶-4-基)-嘧啶基[5,4-d]嘧啶-2,8-二胺，Boehringer Ingelheim)；PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-苯乙基)胺基]-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚)；(R)-6-(4-羥基苯基)-4-[(1-苯乙基)胺基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶；CL-387785 (N-[4-[(3-溴苯基)胺基]-6-喹唑啉基]-2-丁炔醯胺)；EKB-569 (N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-3-氰基-7-乙氧基-6-喹啉基]-4-(二甲胺基)-2-丁烯醯胺) (Wyeth)；AG1478 (Pfizer)；AG1571 (SU 5271; Pfizer)；及雙 EGFR/HER2 酪胺酸激酶抑制劑，例如拉帕替尼 (TYKERB®，GSK572016 或 N-[3-氯-4-[(3 氟苯基)甲氧基]苯基]-6[5[[[2 甲基磺醯基)乙基]胺基]甲基]-2-呋喃基]-4-喹唑啉胺)。

【0153】 化學治療劑亦包括「酪胺酸激酶抑制劑」，包括前述段落提及之 EGFR 靶向藥物；小分子 HER2 酪胺酸激酶抑制劑，例如獲自 Takeda 之 TAK165；CP-724,714，ErbB2 受體酪胺酸激酶之經口選擇性抑制劑 (Pfizer 及 OSI)；雙 HER 抑制劑，例如 EKB-569 (獲自 Wyeth)，其優先結合 EGFR，但抑制 HER2 及 EGFR

過表現細胞；拉帕替尼(GSK572016；獲自 Glaxo-SmithKline)，口服 HER2 及 EGFR 酪胺酸激酶抑制劑；PKI-166 (獲自 Novartis)；pan-HER 抑制劑，例如卡奈替尼 (canertinib) (CI-1033；Pharmacia)；Raf-1 抑制劑，例如獲自 ISIS Pharmaceuticals 之反義劑 ISIS-5132，其抑制 Raf-1 信號傳導；非 HER 靶向 TK 抑制劑，例如甲磺酸伊馬替尼(GLEEVEC®，獲自 Glaxo SmithKline)；多靶酪胺酸激酶抑制劑，例如舒尼替尼(sunitinib) (SUTENT®，獲自 Pfizer)；VEGF 受體酪胺酸激酶抑制劑，例如瓦拉他尼(vatalanib) (PTK787/ZK222584，獲自 Novartis/Schering AG)；MAPK 胞外調節激酶 I 抑制劑 CI-1040 (獲自 Pharmacia)；喹唑啉，例如 PD 153035 及 4-(3-氯苯胺基)喹唑啉；吡啶并嘧啶；嘧啶并嘧啶；吡咯并嘧啶，例如 CGP 59326、CGP 60261 及 CGP 62706；吡啶并嘧啶；4-(苯胺基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶；薑黃素(二阿魏醯基甲烷)；4,5-雙(4-氟苯胺基)鄰苯二甲醯亞胺；含硝基噻吩部分之酪胺酸磷酸化抑制劑(tyrphostin)；PD-0183805 (Warner-Lambers)；反義分子(例如結合至 HER 編碼核酸之彼等)；喹啉(美國專利第 5,804,396 號)；酪胺酸磷酸化抑制劑(美國專利第 5,804,396 號)；ZD6474 (Astra Zeneca)；PTK-787 (Novartis/Schering AG)；pan-HER 抑制劑，例如 CI-1033 (Pfizer)；Affinitac™ (ISIS 3521；Isis/Lilly)；甲磺酸伊馬替尼(GLEEVEC®)；PKI 166 (Novartis)；GW2016 (Glaxo SmithKline)；CI-1033 (Pfizer)；EKB-569 (Wyeth)；賽馬西尼(semaxinib) (Pfizer)；ZD6474 (AstraZeneca)；PTK-787 (Novartis/Schering AG)；INC-1C11 (Imclone)，雷帕黴素(西羅莫司(sirolimus)，RAPAMUNE®)；或者如以下專利公開案之任一者中所闡述：美國專利第 5,804,396 號；WO 1999/09016 (American Cyanamid)；WO 1998/43960 (American Cyanamid)；WO 1997/38983 (Warner Lambert)；WO 1999/06378 (Warner Lambert)；WO 1999/06396 (Warner Lambert)；WO 1996/30347 (Pfizer, Inc)；WO 1996/33978 (Zeneca)；WO 1996/3397 (Zeneca) 及 WO 1996/33980 (Zeneca)。

【0154】 化學治療劑亦包括地塞米松(dexamethasone)、干擾素、秋水仙鹼、美托普林(metoprine)、環孢素(cyclosporine)、兩性黴素(amphotericin)、甲硝唑(metronidazole)、阿侖單抗、阿曲諾英(alitretinoin)、異噻呤醇、阿米福汀(amifostine)、三氧化二砷、天冬醯胺酶、BCG live、貝伐珠單抗、貝沙羅汀(bexarotene)、克拉屈濱(cladribine)、氯法拉濱(clofarabine)、阿法達貝泊汀(darbepoetin alfa)、他尼白介素(denileukin)、右雷佐生(dexrazoxane)、阿法依泊汀(epoetin alfa)、厄洛替尼(elotinib)、非格司亭(filgrastim)、乙酸組胺瑞林、替伊莫單抗(ibritumab)、干擾素 α -2a、干擾素 α -2b、雷利寶邁(lenalidomide)、左旋咪唑(levamisole)、美司鈉(mesna)、甲氯沙林(methoxsalen)、諾龍(nandrolone)、奈拉濱(nelarabine)、諾非單抗(nofetumomab)、奧普瑞白介素(oprelvekin)、帕利夫明(palifermin)、帕米膦酸鹽、培加酶(pegademase)、培門冬酶(pegaspargase)、聚乙二醇非格司亭(pegfilgrastim)、培美曲塞二鈉(pemetrexed disodium)、普卡黴素(plicamycin)、卟吩姆鈉(porfimer sodium)、奎納克林(quinacrine)、拉布立酶(rasburicase)、沙格司亭(sargramostim)、替莫唑胺(temozolomide)、VM-26、6-TG、托瑞米芬(toremifene)、維甲酸(tretinoin)、ATRA、戊柔比星(valrubicin)、唑來膦酸鹽及唑來膦酸，及其醫藥學上可接受之鹽。

【0155】 化學治療劑亦包括氫化可體松(hydrocortisone)、乙酸氫化可體松、乙酸可體松、新戊酸替可的松(tixocortol pivalate)、曲安奈德、曲安奈德(triamcinolone)縮丙酮化合物、曲安奈德醇、莫米松(mometasone)、安西奈德(amcinonide)、布地奈德(budesonide)、地奈德(desonide)、氟輕鬆(flucinonide)、氟西奈德(flucinolone acetonide)、倍他米松(betamethasone)、倍他米松磷酸鈉、地塞米松、地塞米松磷酸鈉、氟考龍(flucortolone)、氫化可體松-17-丁酸酯、氫化可體松-17-戊酸酯、二丙酸阿氯米松(aclometasone dipropionate)、戊酸倍他米松、潑尼卡酯(prednicarbate)、氯倍他松(clobetasone)-17-丁酸酯、氯培他索

(clobetasol)-17-丙酸酯、己酸氟考龍(flucortolone caproate)、新戊酸氟考龍及乙酸氟潑尼定(fluprednidene acetate)；免疫選擇性抗發炎肽(ImSAID)，例如苯丙胺酸-麩醯胺酸-甘胺酸(FEG)及其 D-異構形式(feG) (IMULAN BioTherapeutics、LLC)；抗風濕藥物，例如硫唑嘌呤(azathioprine)、環孢素(ciclosporin) (環孢素 A)、D-青黴胺(D-penicillamine)、金鹽、羥氯喹、來氟米特米諾環素、磺胺塞拉金(sulfasalazine)、腫瘤壞死因子 α (TNF α)阻斷劑，例如依那西普(etanercept) (ENBREL®)、英利昔單抗(infliximab) (REMICADE®)、阿達木單抗(adalimumab) (HUMIRA®)、聚乙二化賽妥珠單抗(CIMZIA®)、戈利木單抗(golimumab) (SIMPONI®)、介白素 1 (IL-1)阻斷劑如阿那白滯素(anakinra) (KINERET®)、T 細胞共刺激阻斷劑如阿巴西普(abatacept) (ORENCIA®)、介白素 6 (IL-6)阻斷劑如托珠單抗(ACTEMERA®)；介白素 13 (IL-13)阻斷劑，例如來金珠單抗(lebrikizumab)；干擾素 α (IFN)阻斷劑，例如羅利珠單抗(rontalizumab)； β 7 整聯蛋白阻斷劑，例如 rhuMAb Beta7；IgE 路徑阻斷劑如抗 M1 一級抗體(Anti-M1 prime)；分泌之同三聚體 LTa3 及膜結合之異三聚體 LTa1/ β 2 阻斷劑，例如抗淋巴毒素 α (LTa)；各種各樣的試驗藥，例如硫鉑(thioplatin)、PS-341、苯基丁酸酯、ET-18-OCH₃ 及法尼基轉移酶抑制劑(L-739749、L-744832)；多酚類，例如槲皮素、白藜蘆醇、白皮杉醇、表沒食子兒茶素沒食子酸酯、茶黃素、黃烷醇、原花青素、樺木酸；自體吞噬抑制劑，例如氯喹； δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚，MARINOL®)； β -拉帕酮；拉帕醇；秋水仙鹼；樺木酸；乙醯喜樹鹼、東莨菪素、9-胺基喜樹鹼)；鬼臼毒素；替加氟(tegafur) (UFTORAL®)；貝沙羅汀(TARGRETIN®)；雙膦酸鹽，例如氯膦酸鹽(例如 BONEFOS®或 OSTAC®)、羥乙膦酸鹽(DIDROCAL®)、NE-58095、唑來膦酸/唑來膦酸鹽(ZOMETA®)、阿侖膦酸鹽(FOSAMAX®)、帕米膦酸鹽(AREDIA®)、替魯膦酸鹽(SKELID®)或利塞膦酸鹽(ACTONEL®)；表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，例如 THERATOPE®

疫苗；哌立福辛(perifosine)；COX-2 抑制劑(例如塞來昔布或依託昔布(etoricoxib))；蛋白酶體抑制劑(例如 PS341)；CCI-779；替吡法尼(tipifarnib) (R11577)；索拉菲尼；ABT510；Bcl-2 抑制劑，例如奧利默森鈉(oblimersen sodium) (GENASENSE®)；匹杉瓊(pixantrone)；法尼基轉移酶抑制劑，例如洛那法尼(lonafarnib) (SCH 6636, SARASAR™)；及上述各項中之任一者之醫藥學上可接受之鹽或酸；以及上述各項中之兩者或更多者之組合。

【0156】 本文所用術語「前藥」係指醫藥活性物質之前體形式，與母體藥物相比，其對腫瘤細胞之細胞毒性更小，並且能夠經酶促活化或轉化成活性更強之母體形式。例如參加 Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」 *Biochemical Society Transactions*, 14, 第 375-382 頁, 第 615 次會議 Belfast (1986) 及 Stella 等人, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,」 *Directed Drug Delivery*, Borchardt 等人(編輯), 第 247-267 頁, Humana Press (1985)。本發明之前藥包括(但不限於)含磷酸酯之前藥、含硫代磷酸酯之前藥、含硫酸酯之前藥、含肽之前藥、D-胺基酸修飾之前藥、醣基化之前藥、含 β -內醯胺之前藥、視情況取代之含苯氧乙醯胺之前藥或視情況取代之含苯乙醯胺之前藥、5-氟胞嘧啶及其他 5-氟尿苷前藥，其可轉化為活性更強之無細胞毒性藥物。可衍生成用於本發明之前藥形式之細胞毒性藥物之實例包括(但不限於)上文所闡述之彼等化學治療劑。

【0157】 「生長抑制劑」在本文中使用时係指在活體外或活體內抑制細胞(例如，其生長依賴於 MAPK 路徑信號傳導之細胞)生長及/或增殖之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低 S 期細胞百分比之生長抑制劑。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進展(在 S 期以外之地方)之藥劑，例如誘導 G1 期阻滯及 M 期阻滯之藥劑。經典之 M 期阻斷劑包括長春花(長春新鹼及長春鹼)、紫杉烷及拓撲異構酶 II 抑制劑，例如蔥環抗生素多柔比星((8S-順式)-10-[(3-胺基

-2,3,6-三去氧- α -L-來蘇-吡喃己醯基)氧基)-7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-8-(羥基乙醯基)-1-甲氧基-5,12-稠四苯二酮)、泛艾黴素、道諾黴素、依託泊苷及博來黴素。彼等阻滯 G1 之藥劑亦溢出至 S 期阻滯中，例如 DNA 烷基化劑，例如他莫昔芬、普賴松(prednisone)、達卡巴嗪、甲基二氯乙基胺、順鉑、胺甲蝶呤、5-氟尿嘧啶及 ara-C。其他資訊可參見「*The Molecular Basis of Cancer,*」 Mendelsohn 及 Israel 編輯，第 1 章，標題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」，Murakami 等人(WB Saunders: Philadelphia, 1995)，尤其第 13 頁。紫杉烷(太平洋紫杉醇及多西他賽)係均來源於紫杉樹之抗癌藥物。多西他賽(TAXOTERE®、Rhone-Poulenc Rorer)源自歐洲紫杉，係太平洋紫杉醇之半合成類似物(TAXOL®、Bristol-Myers Squibb)。紫杉醇及多西他賽促進自微管蛋白二聚體組裝微管，並藉由防止解聚來使微管穩定，從而抑制細胞有絲分裂。

【0158】 「放射療法」係指使用定向 γ 射線或 β 射線對細胞誘導足夠的損害，以限制該細胞正常地起作用之能力或完全破壞該細胞。應瞭解業內已知有許多方法來確定治療之劑量及持續時間。典型治療係以一次性投與來給予，且典型劑量在 10 至 200 單位(戈瑞(Gray))/天之範圍內。

【0159】 本文所用之「投與」意指將一定劑量之化合物(例如抑制劑或拮抗劑)或醫藥組合物(例如包括抑制劑或拮抗劑之醫藥組合物)給予個體(例如患者)之方法。投與可藉由任何合適之方式(包括非經腸、肺內及鼻內)進行，且若期望，對於局部治療，可藉由病灶內投與進行。非經腸輸注包括(例如)肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。給藥可藉由任何合適之途徑進行，例如藉由注射(例如靜脈內或皮下注射)進行，部分地取決於投與係短期抑或長期。本文考慮了各種給藥時間表，包括(但不限於)在各個時間點之單次或多次投與、濃注投與及脈衝輸注。

【0160】 術語「共投與」在本文中用於指投與兩種或更多種治療劑，其中至

少部分投與之時間重疊。因此，同時投與包括當一或多種藥劑之投與在中斷一或多種其他藥劑之投與後繼續進行時的給藥方案。

【0161】 「減少或抑制」意指導致總體降低 20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更大之能力。減少或抑制可指例如 MAPK 信號傳導路徑/ PI3K 路徑(例如 RAF、MEK 及/或 PI3K)中蛋白質之活性及/或功能的水準。另外，減少或抑制可指例如所治療之病症(例如癌症)之症狀、轉移之存在或大小或原發性腫瘤之大小。

【0162】 術語「包裝插頁」用於指通常包括在治療產品之商業包裝中之說明，其含有關於適應症、用法、劑量、投與、組合療法、禁忌及/或關於使用該等治療產品之警告之資訊。

【0163】 「製造物品(article of manufacture)」係包含至少一種試劑之任何製品(例如包裝或容器)或套組，該至少一種試劑係例如用於治療疾病或病症(例如癌症)之藥劑，或用於特異性檢測本文所闡述之生物標記物(例如 KRAS-G13D 突變或 NRAS 活化突變)之探針。在某些實施例中，該製品或套組係作為用於實施本文所述方法之單元來促銷、分發或出售。

【0164】 片語「基於」在本文中使用时意指關於一或多種生物標記物之資訊用於告知診斷決策、治療決策、包裝插頁上提供之資訊或營銷/促銷指導等。

III. 方法

A. 診斷方法

【0165】 本發明提供用於鑑別可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之治療之患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體的方法。該等方法包括對來自個體之試樣(例如，組織試樣(例如，腫瘤組織試樣))進行 KRAS 活化突變(例如 KRAS-G13D 突變)篩選，其中試樣中存在 KRAS 活化突變(例如，

KRAS-G13D 突變)將個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療之個體。本文明亦提供為患有癌症之個體選擇治療之方法。該等方法類似地包括對來自個體之試樣進行 KRAS 活化突變(例如，KRAS-G13D 突變)篩選之步驟，其中試樣中存在 KRAS 活化突變(例如，KRAS-G13D 突變)將個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療之個體。本文亦提供最佳化患有癌症之個體之治療之治療功效之方法，其中該治療包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑。本文進一步提供用於預測患有癌症之個體對包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之治療之反應性的方法。該等方法中之任一者可進一步包括(例如)基於 KRAS 活化突變(例如 KRAS-G13D 突變)之存在，向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑。另外，該等方法中之任一者可進一步包括向個體投與治療有效量之額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)。

【0166】 在一些情況下，本發明提供基於對來自個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 KRAS-G13D 突變篩選來鑑別可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體的方法，其中試樣中存在 KRAS-G13D 突變指示個體受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之可能性增加。篩選可包括例如對 KRAS 基因之全部或一部分進行擴增及測序，以確定個體之具體基因型。因此，篩選可包括對 KRAS 基因外顯子 2 之全部或一部分進行特異性擴增及測序，其中 KRAS 基因外顯子 2 之密碼子 13 處之 KRAS c.38G>A 核苷酸取代突變指示 KRAS-G13D

突變。在其他情況下，篩選可包括例如對 *KRAS* 蛋白之全部或一部分進行測序，以確定個體是否具有 *KRAS*-G13D 胺基酸突變。在個體具有 *KRAS*-G13D 突變之情況下，該等方法可進一步包括視情況與一或多種額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑的步驟。

【0167】 在一些情況下，本發明亦提供為患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體選擇治療之方法，其中該方法包括對來自個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 *KRAS*-G13D 突變篩選，其中試樣中存在 *KRAS*-G13D 突變則將該個體鑑別為可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之個體。篩選可包括例如對 *KRAS* 基因之全部或一部分進行擴增及測序，以確定個體之具體基因型。因此，篩選可包括對 *KRAS* 基因外顯子 2 之全部或一部分進行特異性擴增及測序，其中 *KRAS* 基因外顯子 2 之密碼子 13 處之 *KRAS* c.38G>A 核苷酸取代突變指示 *KRAS*-G13D 突變。在其他情況下，篩選可包括例如對 *KRAS* 蛋白之全部或一部分進行測序，以確定個體是否具有 *KRAS*-G13D 胺基酸突變。在個體具有 *KRAS*-G13D 突變之情況下，該等方法可進一步包括視情況與一或多種額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑的步驟。

【0168】 在一些情況下，本發明提供基於對來自個體之試樣(例如，組織試樣(例如，腫瘤組織試樣))進行 *KRAS* 活化突變(例如，*KRAS*-G12D、*KRAS*-G12C、*KRAS*-G12V、*KRAS*-G13D、*KRAS*-G12A、*KRAS*-G12R、*KRAS*-G12S、*KRAS*-G13C、*KRAS*-G13A、*KRAS*-G13R、*KRAS*-G13S、*KRAS*-G13V、

KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P 或 KRAS-Q61R)的篩選來鑑別可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑(例如，pan-PI3K 抑制劑)之治療之患有癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤))之個體的方法，其中試樣中存在 KRAS 活化突變指示個體受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑(例如，pan-PI3K 抑制劑)之治療之可能性增加。篩選可包括例如對 *KRAS* 基因之全部或一部分進行擴增及測序，以確定個體之具體基因型。因此，篩選可包括對 *KRAS* 基因之密碼子 12、13 及/或 61 進行特異性擴增及測序。在其他情況下，篩選可包括例如對 *KRAS* 蛋白之全部或一部分進行測序，以確定個體是否具有 *KRAS* 活化胺基酸突變。在個體具有 *KRAS* 活化突變之情況下，該等方法可進一步包括視情況與一或多種額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑(例如 pan-PI3K 抑制劑)的步驟。在一些情況下，個體沒有 *BRAF* 活化突變。

【0169】 在一些情況下，本發明亦提供為患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體選擇治療之方法，其中該方法包括對來自個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 *KRAS* 活化突變(例如，KRAS-G12D、KRAS-G12C、KRAS-G12V、KRAS-G13D、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P 或 KRAS-Q61R)的篩選，其中試樣中存在 *KRAS* 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑(例如，pan-PI3K 抑制劑)之治療的個體。篩選可包括例如對 *KRAS* 基因之全部或一部分進行擴增及測序，以確定個體之具體基因型。因此，

篩選可包括對 *KRAS* 基因之密碼子 12、13 及/或 61 進行特異性擴增及測序。在其他情況下，篩選可包括例如對 *KRAS* 蛋白之全部或一部分進行測序，以確定個體是否具有 *KRAS* 活化胺基酸突變。在個體具有 *KRAS* 活化突變之情況下，該等方法可進一步包括視情況與一或多種額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑(例如 pan-PI3K 抑制劑)的步驟。在一些情況下，個體沒有 *BRAF* 活化突變。

【0170】 本發明亦提供鑑別可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤))之個體的方法，其中該等方法包括對來自個體之試樣(例如，組織試樣(例如，腫瘤組織試樣))進行 NRAS 活化突變(例如，NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P)的篩選，其中試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之個體。本文明亦提供為患有癌症之個體選擇治療之方法。該等方法類似地包括對來自個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選之步驟，其中試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之個體。本發明亦提供最佳化患有癌症之個體之治療之治療功效的方法，其中該治療包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑。本文亦提供預測患有癌症之個體對包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之反應性的方法。該等方法中之任一者可進一步包括(例如)基於 NRAS 活

化突變之存在，向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑。另外，該等方法中之任一者可進一步包括向個體投與治療有效量之額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)。

【0171】 在一些情況下，本發明提供基於對來自個體之試樣(例如，組織試樣(例如，腫瘤組織試樣))進行 NRAS 活化突變(例如，NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P)的篩選來鑑別可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤))之個體的方法，其中試樣中存在 NRAS 活化突變指示個體受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之可能性增加。篩選可包括(例如)對 NRAS 基因之全部或一部分進行擴增及測序，以確定個體之具體基因型。因此，篩選可包括對 NRAS 基因之密碼子 12、13 及/或 61 進行特異性擴增及測序。在其他情況下，篩選可包括(例如)對 NRAS 蛋白之全部或一部分進行測序，以確定個體是否具有 NRAS 活化胺基酸突變。在個體具有 NRAS 活化突變之情況下，該等方法可進一步包括視情況與一或多種額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑的步驟。

【0172】 在一些情況下，本發明亦提供為患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體選擇治療之方法，其中該方法包括對來自個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 NRAS 活化突

變(例如, NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P)的篩選, 其中試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如, pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之治療之個體。篩選可包括(例如)對 NRAS 基因之全部或一部分進行擴增及測序, 以確定個體之具體基因型。因此, 篩選可包括對 NRAS 基因之密碼子 12、13 及/或 61 進行特異性擴增及測序。在其他情況下, 篩選可包括(例如)對 NRAS 蛋白之全部或一部分進行測序, 以確定個體是否具有 NRAS 活化突變。在個體具有 NRAS 活化突變之情況下, 該等方法可進一步包括視情況與一或多種額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)組合向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑的步驟。

【0173】 在其中 MEK 抑制劑係治療組分之前述方法中之任一者中, MEK 抑制劑可為小分子抑制劑, 其可為前藥或生物活性形式。例如, MEK 抑制劑可為選自由以下各項組成之群之小分子抑制劑: 考比替尼(GDC-0973)、司美替尼(AZD6244)、匹塞替尼(AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(BAY86-9766)、比美替尼(MEK162)、BI-847325、曲美替尼、GDC-0623、G-573 及 CH5126766(RO5126766), 或其醫藥學上可接受之鹽。在特定情況下, 小分子抑制劑係考比替尼(GDC-0973)、司美替尼(AZD6244)、匹塞替尼(AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(BAY86-9766)或比美替尼(MEK162), 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0174】 在其中 PI3K 抑制劑係治療組分之前述方法中之任一者中, PI3K 抑制劑可為小分子抑制劑, 其可為前藥或生物活性形式。例如, 小分子抑制劑係選自由以下各項組成之群: 匹利昔布(GDC-0941)、他利昔布(GDC-0032)及阿利

昔布(BYL719)，或其醫藥學上可接受之鹽。PI3K 抑制劑可為 pan-PI3K 抑制劑(例如匹利昔布(GDC-0941)或他利昔布(GDC-0032)，或其醫藥學上可接受之鹽)，或 PI3K α 特異性抑制劑及/或 PI3K δ 特異性抑制劑。

【0175】 在前述方法中之任一者中，pan-RAF 抑制劑可為 pan-RAF 二聚體抑制劑。在某些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)可為小分子抑制劑，其可為前藥或生物活性形式。在某些情況下，pan-RAF 二聚體抑制劑可為 HM95573、LY-3009120、AZ-628、LXH-254、MLN2480、BeiGene-283、RXDX-105、BAL3833、瑞格菲尼或索拉菲尼，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0176】 所揭示之方法及分析提供方便、有效且潛在成本效益之手段，以獲得可用於評估治療患者之適當或有效療法之數據及資訊。例如，患者可在用 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑治療之前及/或之後提供組織試樣(例如，腫瘤活檢或血液試樣)，並且可以借助各種活體外分析來檢查試樣，以確定患者之細胞是否對 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑敏感。

【0177】 在前述方法中之任一者中，鑑別自個體獲得之試樣中之 *KRAS* 及/或 *NRAS* 基因、mRNA 或蛋白質產物之具體突變狀態可藉由熟悉此項技術者熟知之許多方法中之任一者實施。例如，突變之鑑別可藉由選殖 *KRAS* 及/或 *NRAS* 基因或其一部分並使用業內熟知之技術對其進行測序來完成。或者，可使用例如 PCR 自基因體 DNA 擴增基因序列，並對產物進行測序。下文闡述用於分析患者給定基因座處 DNA 突變之若干非限制性方法。

【0178】 可使用 DNA 微陣列技術，例如用於高通量篩選應用之 DNA 晶片裝置及高密度微陣列以及低密度微陣列。微陣列製作方法係業內已知的，且包括各種噴墨及微噴射沈積或點樣技術及工藝，原位或晶片上光微影寡核苷酸合成工藝，以及電子 DNA 探針定址工藝。DNA 微陣列雜交應用已成功地應用於基

因表現分析及點突變、單核苷酸多型性(SNP)及短串聯重複序列(STR)之基因分型領域。其他方法包括干擾 RNA 微陣列及微陣列之組合以及其他方法，例如雷射捕獲顯微解剖(LCM)、比較基因體雜交(CGH)及染色質免疫沈澱(ChiP)。例如參見 He 等人(2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593:117-133 及 Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:129-153。其他方法包括 PCR、xMAP、侵入分析、質譜及焦磷酸測序(Wang 等人(2007) 593:105-106)。

【0179】 另一檢測方法係對偶基因特異性雜交，其使用與多型性位點重疊且在多型性區域周圍具有約 5 個、或者 10 個、或者 20 個、或者 25 個、或者 30 個核苷酸之探針。例如，將能夠與特定突變變體(例如，對應於 *KRAS* c.38G>A 核苷酸取代突變之 *KRAS*-G13D)特異性雜交之若干探針附接至固相載體，例如「晶片」。寡核苷酸可藉由各種工藝(包括微影)結合至固體載體。使用該等包含寡核苷酸之晶片(亦稱為「DNA 探針陣列」)之突變檢測分析闡述於(例如) Cronin 等人(1996) *Human Mutation* 7:244 中。

【0180】 在其他檢測方法中，在鑑別突變變體之前，必須首先擴增基因之至少一部分。擴增可藉由(例如) PCR 及/或 LCR 或業內熟知之其他方法來實施。

【0181】 在一些情況下，個體 DNA 中特異性突變之存在可藉由限制酶分析來顯示。例如，特異性突變可產生包含限制位點之核苷酸序列，該限制位點不存在於另一突變變體或基因之野生型型式之核苷酸序列中。

【0182】 在另一實施例中，可使用免受裂解劑(例如核酸酶、脛胺或四氧化鐵及六氫吡啶)之保護來檢測 RNA/RNA、DNA/DNA 或 RNA/DNA 異源雙鏈體中之失配鹼基(例如參見 Myers 等人(1985) *Science* 230:1242)。通常，「失配裂解」之技術始於提供藉由使視情況經標記之對照核酸(例如 RNA 或 DNA) (包含基因對偶基因變體之核苷酸序列)與自組織試樣獲得之試樣核酸(例如 RNA 或 DNA)雜交而形成之異源雙鏈體。用裂解雙鏈體(例如基於在對照鏈與試樣鏈之間之鹼基

對失配形成之雙鏈體)之單鏈區域之物質處理雙鏈雙鏈體。例如，可用 RNase 處理 RNA/DNA 雙鏈體且可用 S1 核酸酶處理 DNA/DNA 雜交體，以酶促消化失配區域。或者，可用羥胺或四氧化鐵且可用六氫吡啶處理 DNA/DNA 或 RNA/DNA 雙鏈體，以便消化失配區域。在消化失配區域之後，然後在變性聚丙烯醯胺凝膠上按大小分離所得物質，以確定對照核酸及試樣核酸是否具有相同的核苷酸序列或其哪些核苷酸不同。例如參見美國專利第 6,455,249 號、Cotton 等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397；Saleeba 等人(1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295。

【0183】 電泳遷移率之改變亦可用於鑑別具體對偶基因變體。例如，單鏈構形多型性(SSCP)可用於檢測突變與野生型核酸之間電泳遷移率之差異(Orita 等人(1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766；Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 及 Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79)。試樣及對照核酸之單鏈 DNA 片段可變性且允許複性。單鏈核酸之二級結構隨序列而變化，所得到的電泳遷移率改變使得甚至能夠檢測單一鹼基變化。DNA 片段可用標記之探針來標記或檢測。可藉由使用 RNA (而非 DNA)來增強分析之靈敏度，其中二級結構對序列變化更為敏感。在另一實施例中，本發明方法基於電泳遷移率之變化利用異雙鏈體分析來分離雙鏈異雙鏈體分子(Keen 等人(1991) *Trends Genet.* 7:5)。

【0184】 突變變體之同一性亦可藉由分析在含有變性劑梯度之聚丙烯醯胺凝膠中包含多型性區域之核酸之移動來獲得，此係使用變性梯度凝膠電泳(DGGE)來分析(Myers 等人(1985) *Nature* 313:495)。當使用 DGGE 作為分析方法時，DNA 將經修飾以確保其不完全地變性，例如藉由 PCR 添加大約 40 bp 之高熔點富 GC 之 DNA 之 GC 夾來修飾。在另一實施例中，使用溫度梯度代替變性劑梯度來鑑別對照及試樣 DNA 遷移率之差異(Rosenbaum 及 Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:1275)。

【0185】 用於檢測兩個核酸分子(例如，DNA 或 RNA 分子)間之至少一個核苷酸差異之技術之實例包括(但不限於)選擇性寡核苷酸雜交、選擇性擴增或選擇性引子延伸。例如，可製備寡核苷酸探針，其中將已知之多型性核苷酸置於中心(對偶基因特異性探針)，然後在允許雜交之條件下與靶 DNA 雜交(僅在發現完全匹配時才實施)(Saiki 等人(1986) *Nature* 324:163)；Saiki 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230)。該等對偶基因特異性寡核苷酸雜交技術可用於檢測基因多型性區域中之核苷酸變化。例如，將具有特定對偶基因變體之核苷酸序列之寡核苷酸附接至雜交膜，然後將此膜與標記之試樣核酸雜交。然後雜交信號之分析將揭露試樣核酸之核苷酸之同一性。

【0186】 或者，對偶基因特異性擴增技術依賴於選擇性 PCR 擴增，其可結合本發明使用。用作特異性擴增之引子之寡核苷酸可在分子中心攜載感興趣之對偶基因變體(因而擴增依賴於差異雜交)(Gibbs 等人(1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2437-2448)或在一個引子之 3'末端攜載，其中在適當條件下，失配可防止或減少聚合酶延伸(Prossner (1993) *Tibtech* 11:238 及 Newton 等人(1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2503)。此技術亦稱為探針寡鹼基延伸「PROBE」。另外，可能希望在突變區域引入新的限制性位點，以產生基於裂解之檢測(Gasparini 等人(1992) *Mol. Cell. Probes* 6:1)。

【0187】 在另一實施例中，突變變體之鑑別係使用寡核苷酸連接分析(OLA)來實施，如例如美國專利第 4,998,617 號及 Laridegren, U.等人 *Science* 241:1077-1080 (1988)中所闡述。OLA 方案使用兩種寡核苷酸，該兩種寡核苷酸經設計成以能夠與靶標之單鏈之鄰接序列雜交。一種寡核苷酸連接至分離標記物(例如生物素化的)，且另一者經可檢測地標記，若在靶標分子中發現精確的互補序列，則寡核苷酸將雜交，使得其末端鄰接，並產生連接受質。然後連接允許使用抗生物素蛋白或另一生物素配體回收標記之寡核苷酸。Nickerson 等人已

闡述組合 PCR 及 OLA 之屬性之核酸檢測分析(Nickerson, D. A.等人(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-8927)。在此方法中，使用 PCR 來達成靶標 DNA 之指數擴增，然後使用 OLA 對其進行檢測。

【0188】 闡述了檢測給定基因(例如 *RAS* 基因，例如 *KRAS* 基因或 *NRAS* 基因)中之單核苷酸突變之方法。由於單一核苷酸變化之兩側係不變序列之區域，其分析只需要確定單一變體核苷酸之同一性，且沒有必要確定每名患者之完整基因序列。已研發出若干方法來促進該等突變之分析。

【0189】 單一鹼基突變可藉由使用專門的外核酸酶抗性核苷酸來檢測，如美國專利第 4,656,127 號中所揭示。根據該方法，允許與 3'緊接突變位點之突變序列互補之引子與自具體動物或人類獲得之靶標分子雜交。若靶標分子上之多型性位點含有與存在之特定外核酸酶抗性核苷酸衍生物互補之核苷酸，則該衍生物將納入雜交引子之末端上。該納入使得引子對外核酸酶具有抗性，從而允許其檢測。由於試樣之外核酸酶抗性衍生物之屬性係已知的，故引子已對外核酸酶產生抗性之該發現揭露，存在於靶標分子突變位點中之核苷酸與反應中使用之核苷酸衍生物之核苷酸互補。此方法具有不需要確定大量無關序列數據之優點。

【0190】 亦可使用基於溶液之方法來確定突變位點之核苷酸之同一性(WO 91/02087)。如上所述，採用與 3'緊接突變位點之突變序列互補之引子。該方法使用經標記雙去氧核苷酸衍生物確定該位點之核苷酸之同一性，該等衍生物若與突變位點之核苷酸互補則將被納入引子之末端上。

【0191】 WO 92/15712 中闡述了替代方法。此方法使用經標記終止子及與突變或多型性位點 3'-序列互補之引子的混合物。因此，所納入之經標記終止子取決於存在於所評估靶標分子突變位點中之核苷酸且與之互補。該方法通常係非均相測定，其中引子或靶標分子係固定至固相。

【0192】 已闡述用於分析 DNA 中突變位點之許多其他引子引導之核苷酸納入過程(Komher, J. S.等人(1989) *Nucl. Acids. Res.* 17:7779-7784 ; Sokolov, B. P. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:3671 ; Syvanen, A.-C.等人(1990) *Genomics* 8:684-692 ; Kuppaswamy, M. N.等人(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147 ; Prezant, T. R.等人(1992) *Hum. Mutat.* 1: 159-164 ; Ugozzoli, L.等人(1992) *GATA* 9:107-112 ; Nyren, P.等人(1993) *Anal. Biochem.* 208:171-175)。該等方法皆依賴於經標記去氧核苷酸之納入來區分突變位點之鹼基。

【0193】 通常，本文闡述之生物標記基因之存在及/或量可藉由多種方法來分析，包括上文所闡述之彼等，以及業內已知且為熟悉此項技術者瞭解之許多其他方法，例如南方分析、北方分析、全基因體測序、聚合酶鏈式反應(PCR) (包括定量即時 PCR (qRT-PCR)及其他擴增類型檢測方法，例如分支 DNA、SISBA、TMA 及諸如此類)、RNA-Seq、微陣列分析、Nanostring、基因表現剖析及/或基因表現系列分析(「SAGE」)，以及可藉由蛋白質、基因及/或組織陣列分析實施之眾多種分析中之任一者。用於評估基因及基因產物狀態之典型方案可參見(例如) Ausubel 等人編輯，1995, *Current Protocols In Molecular Biology*, 第 2 單元(Northern Blotting)、第 4 單元(Southern Blotting)、第 15 單元(Immunoblotting)及第 18 單元(PCR Analysis)。亦可使用多工免疫分析，例如自 Rules Based Medicine 或 Meso Scale Discovery (「MSD」)獲得之彼等。

【0194】 另外，本文闡述之生物標記物蛋白(亦即基因產物)之存在及/或量可藉由多種方法來分析，包括免疫組織化學(「IHC」)、西方墨點分析、免疫沈澱、光譜術、分子結合分析、HPLC、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、酶聯免疫過濾分析(ELIFA)、螢光活化細胞分選(「FACS」)、MassARRAY、蛋白質體學、基於血液之定量分析(例如血清 ELISA)、生物化學酶活性分析、原位雜交、螢光原位雜交(FISH)及蛋白質測序。在某些情況下，該方法包含在允許結合生物標記物之

條件下，使來自個體之生物試樣與特異性結合至本文所述蛋白質生物標記物之抗體接觸，及檢測在抗體與生物標記物之間是否形成複合物。此一方法可為活體外或活體內方法。在一些情況下，在腫瘤細胞(例如，來自活檢)中測定生物標記物(例如，KRAS-G13D 蛋白或具有活化突變之 NRAS 蛋白，例如上文所闡述者)之蛋白質表現程度。

【0195】 此外，將瞭解，上述用於檢測基因或基因產物中之突變之任何方法亦可用於監測治療或療法(例如，包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療)之進程。

【0196】 本文所闡述之方法可藉由(例如)利用預包裝之診斷套組(例如下文所闡述之彼等)來實施，該等預包裝之診斷套組包含至少一種探針或引子核酸，其可便捷地用於(例如)確定個體是否可能受益於包括 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療。

【0197】 用於上述診斷方法中之試樣核酸可自個體之任何細胞類型或組織(包括腫瘤組織或血液)獲得。

【0198】 在上文所闡述或本文所提及之所有篩選方法中，一或多種 RAS 基因(例如 KRAS 或 NRAS)或其蛋白質產物中之突變通常可藉由以下來鑑別：測定自個體獲得之試樣中之核酸序列(例如 DNA 或 RNA 序列)或蛋白質序列(亦即胺基酸序列)，並將該序列與參考序列(例如野生型序列)進行比較。在某些情況下，參考水準、參考試樣、參考細胞、參考組織、對照試樣、對照細胞或對照組織係在與獲得測試試樣不同之一或多個時間點獲得之來自同一個體(subject 或 individual)之單個試樣或多個試樣之組合。例如，參考水準、參考試樣、參考細胞、參考組織、對照試樣、對照細胞或對照組織係在較獲得測試試樣更早之時間點自同一個體(subject 或 individual)獲得。若在癌症之初始診斷期間獲得參考試樣，並且稍後在癌症變得轉移時獲得測試試樣，則該參考水準、參考試樣、

參考細胞、參考組織、對照試樣、對照細胞或對照組織可能係有用的。

B. 治療方法

【0199】 本發明提供藉由基於 KRAS 活化突變(例如, KRAS-G13D 突變)之存在向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如, pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑來治療患有癌症(例如, 結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如, 黑色素瘤))之個體的方法。在一些情況下, 該方法包括對來自個體之試樣(例如, 組織試樣(例如, 腫瘤組織試樣))進行 KRAS 活化突變篩選之步驟, 其中已確定該個體具有 KRAS 活化突變。在其他情況下, 在治療之前, 已對來自個體之試樣(例如, 組織試樣(例如, 腫瘤組織試樣))進行 KRAS 活化突變之篩選, 且已確定存在 KRAS 活化突變。

【0200】 在一些情況下, 本發明提供治療患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體之方法, 該方法包括(a)對來自個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 KRAS-G13D 突變篩選, 其中已確定該個體具有 KRAS-G13D 突變, 及(b)基於藉由篩選步驟確定之 KRAS-G13D 突變之存在向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑。

【0201】 在一些情況下, 本發明提供治療患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體之方法, 該方法包括向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑, 其中在治療之前, 已對來自該個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 KRAS-G13D 突變之篩選, 且已確定存在 KRAS-G13D 突變。

【0202】 在一些情況下, 本發明提供治療患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體之方法, 該方法包括(a)對來自個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 KRAS 活化突變(例如,

KRAS-G12D、KRAS-G12C、KRAS-G12V、KRAS-G13D、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P或KRAS-Q61R)的篩選,其中已確定該個體具有 KRAS 活化突變,及(b)基於藉由篩選步驟確定之 KRAS 活化突變之存在向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如, pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑。在一些情況下,個體沒有 *BRAF* 活化突變。

【0203】 在一些情況下,本發明提供治療患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體之方法,該方法包括向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑,其中在治療之前,已對來自該個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 KRAS 活化突變(例如, KRAS-G12D、KRAS-G12C、KRAS-G12V、KRAS-G13D、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P或KRAS-Q61R)的篩選,且已確定存在 KRAS 活化突變。在一些情況下,個體沒有 *BRAF* 活化突變。

【0204】 本發明亦提供藉由基於 NRAS 活化突變之存在向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑來治療患有癌症(例如皮膚癌(例如黑色素瘤)、結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌及胰腺癌)之個體之方法。在一些情況下,該方法包括對來自個體之試樣(例如,組織試樣(例如,腫瘤組織試樣))進行 NRAS 活化突變篩選之步驟,其中已確定該個體具有 NRAS 活化突變。在其他情況下,在治療之前,已對來自個體之試樣(例如,組織試樣(例如,腫瘤組織試樣))進行 NRAS 活化突變之篩選,且已確定存在 NRAS 活化突變。

【0205】 在一些情況下,本發明提供治療患有癌症(例如皮膚癌(例如黑色素

瘤)、結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌及胰腺癌)之個體之方法，該方法包括(a)對來自個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行 NRAS 活化突變(例如，NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P)的篩選，及(b)基於藉由篩選步驟確定之 NRAS 活化突變之存在向個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑。

【0206】 在一些情況下，本發明提供治療患有癌症(例如皮膚癌(例如黑色素瘤)、結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌及胰腺癌)之個體之方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑，其中在治療之前，已對來自該個體之試樣(例如組織試樣(例如腫瘤組織試樣))進行了 NRAS 活化突變(例如，NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P)之篩選，且已確定存在 NRAS 活化突變。

【0207】 對於任何上述治療方法，可使用或已使用上文第 III 章節 A 部分中所闡述之任何一或多種方法篩選來自個體之一或多個試樣。

【0208】 同樣如上文所闡述，所投與之 MEK 抑制劑可為小分子抑制劑，其可為前藥或生物活性形式。例如，MEK 抑制劑可為選自由以下各項組成之群之小分子抑制劑：考比替尼(GDC-0973)、司美替尼(AZD6244)、匹塞替尼(AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(BAY86-9766)、比美替尼(MEK162)、BI-847325、曲美替尼、GDC-0623、G-573 及 CH5126766 (RO5126766)，或其醫

藥學上可接受之鹽。在特定情況下，小分子抑制劑係考比替尼(GDC-0973)、司美替尼(AZD6244)、匹塞替尼(AS-703026)、PD0325901、瑞法替尼(BAY86-9766)或比美替尼(MEK162)，或其醫藥學上可接受之鹽。所投與之 PI3K 抑制劑可為小分子抑制劑，其可為前藥或生物活性形式。例如，小分子抑制劑係選自由以下各項組成之群：匹利昔布(GDC-0941)、他利昔布(GDC-0032)及阿利昔布(BYL719)，或其醫藥學上可接受之鹽。PI3K 抑制劑可為 pan-PI3K 抑制劑(例如匹利昔布(GDC-0941)或他利昔布(GDC-0032)，或其醫藥學上可接受之鹽)，或 PI3K α 特異性抑制劑及/或 PI3K δ 特異性抑制劑。且所投與之 pan-RAF 抑制劑可為 pan-RAF 二聚體抑制劑。在某些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)可為小分子抑制劑，其可為前藥或生物活性形式。在某些情況下，pan-RAF 二聚體抑制劑可為 HM95573、LY-3009120、AZ-628、LXH-254、MLN2480、BeiGene-283、RXDX-105、BAL3833、瑞格菲尼或索拉菲尼，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0209】 在某些實施例中，治療方法亦包括向個體投與一或多種額外治療劑(例如免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑及抗血管生成劑)。

【0210】 在上述任何一種方法中，投與 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可具有以下各項之治療效應(亦即益處)：細胞或生物反應、完全反應、部分反應、穩定疾病(無進展或復發)或由於用 pan-RAF 抑制劑與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之組合治療使得患者較晚復發之反應。例如，在具有 KRAS 活化突變(例如，KRAS-G12D、KRAS-G12C、KRAS-G12V、KRAS-G13D、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P 或 KRAS-Q61R)或 NRAS 活化突變(例如，NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、

NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P)之個體中，有效反應可為與沒有 KRAS 活化突變或 NRAS 活化突變之個體相比，腫瘤大小(體積)減小、無進展存活(PFS)增加及/或整體存活(OS)增加。在一些情況下，投與 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑具有腫瘤大小(體積)減小 1%或更多(例如，2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或 90%或更多)之治療效應。一或多種 KRAS 活化突變(例如 KRAS-G13D)或 NRAS 活化突變之存在預測了該治療功效。在一些情況下，投與 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑具有無進展存活(PFS)延長 1 天或更長時間(例如，2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、1 週、2 週、3 週、1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、7 個月、8 個月、9 個月、10 個月、11 個月或 1 年或更長時間)之治療效應。

劑量及投與

【0211】 一旦鑑別患者對 pan-RAF 抑制劑與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑組合之治療有反應或敏感，該組合療法可單獨或與其他治療劑結合來實施。如上所述，該治療可使得(例如)腫瘤大小減小或無進展存活(PFS)及/或整體存活(OS)延長。此外，pan-RAF 抑制劑與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑組合之治療較佳對患者產生協同(或大於加性)的治療益處。較佳地，在此組合方法中，至少一次與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑組合之 pan-RAF 抑制劑投與之間之定時為約一個月或更短，且更佳為約兩週或更短。

【0212】 熟悉此項技術者將瞭解，在診斷患者可能對組合療法有反應性之後，向患者投與治療有效量之 pan-RAF 抑制劑與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之組合之確切方式將由主治醫師決定。投與方式(包括劑量、與其他藥劑組合、投

與之定時及頻率及諸如此類)可能受患者可能對該組合療法之反應性之診斷以及患者之狀況及病史的影響。因此，即便經預測對 pan-RAF 抑制劑與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之組合相對不敏感之患有癌症之患者仍可受益於利用該組合(特別係與其他藥劑(包括可能改變患者對一或兩種抑制劑之反應性之藥劑)組合)之治療。

【0213】 包含 pan-RAF 抑制劑及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之組合物將以符合良好醫學實踐之方式調配、給藥及投與。在此情況下考慮之因素包括所治療癌症之具體類型(例如肺癌、乳癌、皮膚癌、結腸直腸癌、胃癌、淋巴癌、胰腺癌、卵巢癌及子宮頸癌)、所治療之具體哺乳動物(例如人類)、個體患者之臨床狀況、癌症之原因、藥劑之遞送位點、可能的副作用、抑制劑之類型、投與方法、投與排程以及開業醫師已知之其他因素。欲投與之 pan-RAF 抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之有效量將由該等考慮因素決定。

【0214】 熟悉此項技術之醫師可端視諸如具體拮抗劑類型等因素容易地確定所需醫藥組合物之有效量並開具處方。例如，醫師可以醫藥組合物中所使用之與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑組合之此一 pan-RAF 抑制劑之劑量開始，該劑量低於為了達成期望治療效應所需之劑量，並逐漸增加劑量直至達成期望效應為止。拮抗劑之給定劑量或治療方案之有效性可藉由(例如)使用標準功效量測來評估患者之體征及症狀來確定。

【0215】 在某些實施例中，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)可為投與個體之唯一藥劑(亦即，作為單一療法)，例如在個體具有 NRAS 活化突變之情況下。在其他情況下，可將 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑投與個體(亦即，作為組合療法)。

【0216】 在某些實例中，至少兩次用同一療法來治療患者。因此，初始及第二次暴露較佳利用相同的抑制劑或相同的抑制劑組合，且更佳所有暴露皆利用

相同的抑制劑或相同的抑制劑組合，亦即，前兩次暴露之治療且較佳所有暴露利用相同的抑制劑(例如，相同的 pan-RAF 二聚體抑制劑)或相同的抑制劑組合(例如，相同的 pan-RAF 二聚體抑制劑及相同的 MEK 或 PI3K 抑制劑)。

【0217】 利用 MAPK 信號傳導抑制劑或 PI3K 抑制劑或其醫藥學上可接受之鹽之治療可根據標準方法來實施。例如，投與 MEK 抑制劑考比替尼(例如考比替尼富馬酸鹽(COTELLIC®))之例示性方法闡述於美國 Genentech, Inc.中考比替尼富馬酸鹽(COTELLIC®)之處方資訊(2015 年 11 月 10 日)中，該處方資訊之全部內容以引用方式併入本文中。投與威羅菲尼(ZELBORAF®)之例示性方法闡述於美國 United States, Hoffmann La Roche, Inc.中威羅菲尼(ZELBORAF®)之處方資訊(2015 年 8 月 11 日)中，該處方資訊之全部內容以引用方式併入本文中。

【0218】 若提供 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑之多次暴露，則可使用相同或不同的投與方式提供每次暴露。在一個實施例中，每次暴露係藉由經口投與來給出。在一個實施例中，每次暴露係藉由靜脈內投與進行。在另一實施例中，每次暴露藉由皮下投與進行。在又一實施例中，暴露係藉由靜脈內及皮下投與給出。

【0219】 療法之持續時間可以持續醫學指示之時間，或者直至達成期望之治療效應(例如，本文所述之彼等)。在某些實施例中，療法持續 1 個月、2 個月、4 個月、6 個月、8 個月、10 個月、1 年、2 年、3 年、4 年、5 年或持續幾年時間段直至個體壽命為止。

【0220】 然而，如上所述，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑之該等建議量受到很大的治療酌處權。選擇適當劑量及排程之關鍵因素係所獲得之結果，如上文所指示。在一些實施例中，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑係儘可能接近增殖性細胞病症(例如，癌症)之最初體征、診斷、出現或發生來投與。

投與途徑

【0221】 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑以及視情況任何額外治療劑之組合可以符合良好醫學實踐之方式來調配、給藥及投與。在此情況下需要考慮之因素包括所治療之具體病症(例如癌症)、所治療之具體哺乳動物、個體患者之臨床狀況、病症之原因、藥劑之遞送位點、投與方法、投與排程以及開業醫師已知之其他因素。例如，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)不需要、但視情況與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑一起調配及/或同時投與，其視情況與目前用於預防或治療病症(例如癌症)之一或多種藥劑進一步組合。

【0222】 對於癌症之預防或治療，本文所述之 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑(在單獨使用或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)之適當劑量將取決於欲治療之疾病類型(例如，癌症)、疾病之嚴重程度及病程、抑制劑係用於預防抑或治療目的、先前療法、患者之病史及對抑制劑之反應，以及主治醫師之判斷。pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑適於一次性或在一系列治療中投與患者。對於幾天或更長時間(視病況而定)之重複投與，治療通常將持續至發生期望之疾病症狀阻抑為止。該等劑量可間歇地投與，例如每週或每三週投與(例如，使得患者接受(例如)約 2 至約 20 個劑量或(例如)約 6 個劑量之 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑)。可初始投與較高負荷之劑量，隨後投與一或多個較低劑量。然而，其他劑量方案可能有用。此療法之進展易於藉由習用技術及分析來監測。

【0223】 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可藉由任何合適的方式來投與，包括經口、非經腸、局部、皮下、腹膜內、肺內、鼻內及/或病灶內投與。非經腸輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內

或皮下投與。亦涵蓋鞘內投與。另外，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可適當地藉由脈衝輸注、例如利用降低劑量之一或兩種抑制劑來投與。視情況，藉由經口投與來給藥。

【0224】 若提供 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)與 MEK 或 PI3K 抑制劑之組合之多次暴露，則每次暴露可使用相同或不同的投與方式來提供。在另一實施例中，每次暴露係靜脈內(i.v.)給出。在另一實施例中，每次暴露係藉由皮下(s.c.)投與給出。在又一實施例中，暴露係藉由 i.v.及 s.c.投與給出。

組合療法

【0225】 本文所述之治療方法通常包括投與一種以上治療劑(例如，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)與 MEK 或 PI3K 抑制劑之組合)。

【0226】 組合療法可提供「協同」並證明「有協同性」，亦即當活性成分一起使用時達成之效應大於分開使用該等化合物所產生之效應之總和。當活性成分(亦即 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑)為以下時，可達成協同效應：(1)以組合之單位劑量調配物同時共調配及投與或遞送；(2)藉由交替或以平行方式作為單獨調配物遞送；或(3)藉由一些其他方案。當以交替療法遞送時，當依序投與或遞送化合物時可達成協同效應。通常，在交替療法期間，每種活性成分之有效劑量係依序地(亦即，連續地)投與，而在組合療法中，兩種或更多種活性成分之有效劑量係一起投與。

【0227】 在一些情況下，該方法包括進一步投與抗癌劑，例如化學治療劑、生長抑制劑、生物療法、免疫療法或放射治療劑。另外，細胞毒性劑、抗血管生成劑及抗增殖劑可與 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑組合使用。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑係與抗癌療法(例如外科手術)組合使用。

【0228】 在其他情況下，治療方法可包括投與兩種或更多種(例如三種或更多

種) MAPK 信號傳導抑制劑(例如兩種或更多種 RAF、MEK 或 ERK 抑制劑)及/或 PI3K 抑制劑之組合。

【0229】 該等方法亦可涉及與化學治療劑(例如多西他賽、多柔比星及環磷醯胺)組合向患者投與有效量之 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑。

【0230】 在其他情況下，該方法包括與免疫治療劑(例如治療性抗體)組合投與 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑。在一個實施例中，治療性抗體係結合癌細胞表面標記物或腫瘤相關抗原(TAA)之抗體。在一個實施例中，治療性抗體係抗 HER2 抗體曲妥珠單抗(例如 HERCEPTIN®)。在一個實施例中，治療性抗體係抗 HER2 抗體帕妥珠單抗(OMNITARG™)。在另一實施例中，治療性抗體為裸抗體或抗體-藥物偶聯物(ADC)。

【0231】 不希望受限於理論，認為藉由促進活化共刺激分子或藉由抑制負共刺激分子來增強 T 細胞刺激可促進腫瘤細胞死亡，從而治療或延遲癌症之進展。因此，在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對活化共刺激分子之激動劑聯合投與。在一些情況下，活化共刺激分子可包括 CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM 或 CD127。在一些情況下，針對活化共刺激分子之激動劑係結合至 CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM 或 CD127 之激動劑抗體。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對抑制性共刺激分子之拮抗劑聯合投與。在一些情況下，抑制性共刺激分子可包括 CTLA-4 (亦稱為 CD152)、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICA/B 或精胺酸酶。在一些情況下，針對抑制性共刺激分子之拮抗劑係結合至 CTLA-4、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICA/B 或精胺酸酶之拮抗劑

抗體。

【0232】 在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 CTLA-4 (亦稱為 CD152)之拮抗劑(例如阻斷抗體)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與伊匹單抗(亦稱為 MDX-010、MDX-101 或 YERVOY®)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與曲美目單抗(亦稱為替西木單抗(ticilimumab)或 CP-675,206)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 B7-H3 (亦稱為 CD276)之拮抗劑(例如阻斷抗體)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 MGA271 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 TGF- β 之拮抗劑(例如，美替木單抗(metelimumab) (亦稱為 CAT-192)、夫蘇木單抗(fresolimumab) (亦稱為 GC1008)或 LY2157299)聯合投與。

【0233】 在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與包括過繼性轉移表現嵌合抗原受體(CAR)之 T 細胞(例如，細胞毒性 T 細胞或細胞毒性淋巴球(CTL))之治療聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與過繼性轉移包括顯性負性 TGF- β 受體(例如，顯性負性 TGF- β II 型受體)之 T 細胞之治療聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與包括 HERCREEM 方案之治療聯合投與(例如參見，ClinicalTrials.gov Identifier NCT00889954)。

【0234】 在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 CD137 (亦稱為 TNFRSF9、4-1BB 或 ILA)之激動

劑(例如活化抗體)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與烏瑞魯單抗(urelumab) (亦稱為 BMS-663513)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 CD40 之激動劑(例如活化抗體)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 CP-870893 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 OX40 (亦稱為 CD134) 之激動劑(例如活化抗體)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與抗 OX40 抗體(例如，AgonOX)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 CD27 之激動劑(例如活化抗體)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 CDX-1127 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對吡咯胺-2,3-雙加氧酶(IDO)之拮抗劑聯合投與。在一些情況下，IDO 拮抗劑係 1-甲基-D-色胺酸(亦稱為 1-D-MT)。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 PD-1 軸結合拮抗劑聯合投與。在一些情況下，PD-1 軸結合拮抗劑係 PD-L1 抗體。

【0235】 在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與抗體-藥物偶聯物聯合投與。在一些情況下，抗體-藥物偶聯物包含莫登素或單甲基奧裡斯他汀 E (MMAE)。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與抗 NaPi2b 抗體-MMAE 偶聯物(亦稱為 DNIB0600A 或 RG7599)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與曲妥

珠單抗艾坦辛(亦稱為 T-DM1，阿多-曲妥珠單抗艾坦辛或 KADCYLA®, Genentech)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 DMUC5754A 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向內皮素 B 受體(EDNBR)之抗體-藥物偶聯物(例如針對 EDNBR 之與 MMAE 偶聯之抗體)聯合投與。

【0236】 在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與抗血管生成劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對 VEGF 之抗體(例如，VEGF-A)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與貝伐珠單抗(亦稱為 AVASTIN®, Genentech)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與針對血管生成素 2 (亦稱為 Ang2)之抗體聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 MEDI3617 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與抗瘤劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向 CSF-1R (亦稱為 M-CSFR 或 CD115)之藥劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與抗 CSF-1R (亦稱為 IMC-CS4)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與干擾素(例如干擾素 α 或干擾素 γ)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 Roferon-A (亦稱為重組干擾素 α -2a)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制

劑可與 GM-CSF (亦稱為重組人類顆粒球巨噬細胞群落刺激因子、rhu GM-CSF、沙格司亭或 LEUKINE®)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 IL-2 (亦稱為阿地介白素 (aldesleukin)或 PROLEUKIN®)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 IL-12 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向 CD20 之抗體聯合投與。在一些情況下，靶向 CD20 之抗體係奧妥珠單抗 (亦稱為 GA101 或 GAZYVA®)或利妥昔單抗。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向 GITR 之抗體聯合投與。在一些情況下，靶向 GITR 之抗體係 TRX518。

【0237】 在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與癌症疫苗聯合投與。在一些情況下，癌症疫苗係肽癌症疫苗，其在一些情況下係個人化之肽疫苗。在一些情況下，肽癌症疫苗係多價長肽、多肽、肽混合劑、雜交肽或肽脈衝樹突細胞疫苗(例如參見 Yamada 等人, *Cancer Sci.* 104:14-21, 2013)。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與佐劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與包括 TLR 激動劑(例如 Poly-ICLC (亦稱為 HILTONOL®)、LPS、MPL 或 CpG ODN)之治療聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與腫瘤壞死因子(TNF) α 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 IL-1 (例如，IL-1 β)聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 HMGB1 聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 IL-10

拮抗劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 IL-4 拮抗劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 IL-13 拮抗劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 HVEM 拮抗劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 ICOS 激動劑聯合投與，例如藉由投與 ICOS-L 或針對 ICOS 之激動劑抗體進行。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向 CX3CL1 之治療聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向 CXCL9 之治療聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向 CXCL10 之治療聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與靶向 CCL5 之治療聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與 LFA-1 或 ICAM1 激動劑聯合投與。在一些情況下，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑可與選擇素激動劑聯合投與。

【0238】 通常，為預防或治療疾病，pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑適於一次性或在一系列治療中投與患者。pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 或 PI3K 抑制劑通常如上所述來投與。端視疾病之類型及嚴重程度，約 20 mg/m² 至 600 mg/m² 之額外治療劑係用於投與患者之初始候選劑量，無論藉由(例如)一或多次分開投與抑或藉由連續輸注進行。治療方案中任何治療劑之一個典型日劑量可為約 20 mg/m²、85 mg/m²、90 mg/m²、125 mg/m²、200 mg/m²、400 mg/m²、500 mg/m² 或更多，此端視上述

因素而定。對於幾天或更長時間(視病況而定)之重複投與，治療持續至發生期望之疾病症狀阻抑為止。因此，可向患者投與約 20 mg/m²、85 mg/m²、90 mg/m²、125 mg/m²、200 mg/m²、400 mg/m²、500 mg/m²、600 mg/m²(或其任一組合)中之一或多個劑量。該等劑量可間歇地投與，例如每週或每兩週、三週、四週、五週或六週投與(例如，使得患者接受約 2 至約 20 個劑量，例如約 6 個劑量之額外藥劑)。可初始投與較高負荷之劑量，隨後投與一或多個較低劑量。然而，其他劑量方案可能有用。此療法之進展易於藉由習用技術及分析來監測。

【0239】 在一個實施例中，個體先前未曾投與任何治療癌症之藥物。在另一實施例中，個體或患者先前已投與一或多種治療癌症之藥劑。在另一實施例中，個體或患者對先前已投與之一或多種藥劑沒有反應。個體可能沒有反應之該等藥物包括(例如)抗瘤劑、化學治療劑、細胞毒性劑及/或生長抑制劑。

IV. 組合物及其用途

【0240】 本發明部分地基於以下發現：包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑之組合可用於治療具有以下突變之罹患癌症之個體：KRAS 活化突變(例如，KRAS-G12D、KRAS-G12C、KRAS-G12V、KRAS-G13D、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P 或 KRAS-Q61R 突變)或 NRAS 活化突變(例如，NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P)。

【0241】 因此，在一些情況下，本發明提供包括 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF

二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之組合物，其用於治療患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體之方法中，其中已對來自該個體之試樣進行 KRAS-G13D 篩選，且已確定試樣中存在 KRAS-G13D 突變。在一些情況下，本發明提供包括 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之組合物，其用於治療性治療以 KRAS-G13D 突變為特徵之癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤))。在一些情況下，本發明提供包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之組合物之用途，其用於製備用以治療性治療以 KRAS-G13D 突變為特徵之癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤))之藥劑。

【0242】 在一些情況下，本發明提供包括 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 MEK 抑制劑之組合物，其用於治療患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如黑色素瘤))之個體之方法中，其中已對來自該個體之試樣進行 NRAS 活化突變之篩選，並且已確定試樣中存在 NRAS 活化突變。在一些情況下，本發明提供包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之組合物，其用於治療性治療以 NRAS 活化突變為特徵之癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤))。在一些情況下，本發明提供包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之組合物之用途，其用於製備用以治療性治療以 NRAS 活化突變為特徵之癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤))之藥劑。

【0243】 在其他情況下，本發明提供組合物，其包括 pan-RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑(例如 pan-PI3K 抑制劑(例如匹利昔布(GDC-0941)或他利昔布(GDC-0032)或其醫藥學上可接受之鹽)或 PI3K α 特異性抑制劑及/或 PI3K δ 特異性抑制劑)，其用於治療患有癌症(例如結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(黑色素瘤))之個體之方法中，其中已對來自該個體

之試樣進行 KRAS 活化突變(例如, KRAS-G12D、KRAS-G12C、KRAS-G12V、KRAS-G13D、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P 或 KRAS-Q61R 突變)之篩選,並且已確定試樣中存在 KRAS 活化突變。在一些情況下,本發明提供包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 PI3K 抑制劑之組合物,其用於治療性治療以 KRAS 活化突變為特徵之癌症。在一些情況下,本發明提供包括 pan-RAF 二聚體抑制劑及 PI3K 抑制劑之組合物之用途,其用於製備用以治療性治療以 KRAS 活化突變為特徵之癌症之藥劑。

【0244】 本發明亦提供組合物,其包括 RAF 抑制劑(例如 pan-RAF 二聚體抑制劑)及 PI3K 抑制劑(例如 pan-PI3K 抑制劑(例如匹利昔布(GDC-0941)或他利昔布(GDC-0032)或其醫藥學上可接受之鹽)或 PI3K α 特異性抑制劑及/或 PI3K δ 特異性抑制劑)。在一些情況下,本發明提供組合物,其中 pan-PI3K 抑制劑係匹利昔布(GDC-0941)或他利昔布(GDC-0032)或其醫藥學上可接受之鹽。在一些情況下,本發明提供組合物,其中 pan-RAF 二聚體抑制劑係選自由以下各項組成之群: HM95573、LY-3009120、AZ-628、LXH-254、MLN2480、BeiGene-283、RXDX-105、BAL3833、瑞格菲尼及索拉菲尼或其醫藥學上可接受之鹽。在一些情況下,該組合物包含選自由以下各項組成之群之組合: HM95573 及匹利昔布(GDC-0941)、LY-3009120 及匹利昔布(GDC-0941)、AZ-628 及匹利昔布(GDC-0941)、LXH-254 及匹利昔布(GDC-0941)、MLN2480 及匹利昔布(GDC-0941)、BeiGene-283 及匹利昔布(GDC-0941)、RXDX-105 及匹利昔布(GDC-0941)、BAL3833 及匹利昔布(GDC-0941)、瑞格菲尼及匹利昔布(GDC-0941)、索拉菲尼及匹利昔布(GDC-0941)、HM95573 及他利昔布(GDC-0032)、LY-3009120 及他利昔布(GDC-0032)、AZ-628 及他利昔布

(GDC-0032)、LXH-254 及他利昔布(GDC-0032)、MLN2480 及他利昔布(GDC-0032)、BeiGene-283 及他利昔布(GDC-0032)、RXDX-105 及他利昔布(GDC-0032)、BAL3833 及他利昔布(GDC-0032)、瑞格菲尼及他利昔布(GDC-0032)及索拉菲尼及他利昔布(GDC-0032)或其醫藥學上可接受之鹽。

【0245】 在一些情況下，本發明提供包含上文所闡述組合物之醫藥組合物。

【0246】 在一些情況下，本發明提供組合物，例如本文上文所闡述之組合物，其用於治療性治療癌症。

【0247】 在一些情況下，本發明提供本文上文所闡述之組合物之用途，其用於製備用以治療性治療癌症之藥劑。

【0248】 在任何上文情況下，該癌症可選自由以下各項組成之群：結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、皮膚癌、腎癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈狀肉芽腫、默克爾細胞癌及血液惡性病。

V. 診斷套組

【0249】 本文提供診斷套組，其包括用於確定患有疾病或病症(例如，增殖性細胞病症(例如，癌症(例如，結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌及皮膚癌(例如，黑色素瘤)))之個體或患者之試樣中生物標記物(例如，KRAS 活化突變(例如，KRAS-G12D、KRAS-G12C、KRAS-G12V、KRAS-G13D、KRAS-G12A、KRAS-G12R、KRAS-G12S、KRAS-G13C、KRAS-G13A、KRAS-G13R、KRAS-G13S、KRAS-G13V、KRAS-Q61H、KRAS-Q61K、KRAS-Q61E、KRAS-Q61L、KRAS-Q61P 或 KRAS-Q61R 突變)或 NRAS 活化突變(例如，NRAS-Q61R、NRAS-Q61K、NRAS-G12D、NRAS-G13D、NRAS-G12S、NRAS-G12C、NRAS-G12V、NRAS-G12A、NRAS-G12R、NRAS-G13C、

NRAS-G13A、NRAS-G13R、NRAS-G13S、NRAS-G13V、NRAS-Q61H、NRAS-Q61E、NRAS-Q61L 或 NRAS-Q61P))之存在的一或多種試劑(例如多肽或多核苷酸)。

【0250】 在一些情況下，當與 MEK 抑制劑或 PI3K 抑制劑組合用 pan-RAF 抑制劑(例如，pan-RAF 二聚體抑制劑)治療個體時，試樣中生物標記之存在指示更高之功效可能性。視情況，該套組可進一步包括使用該等試劑鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 或 PI3K 抑制劑之治療之患有癌症之患者之說明書。

【0251】 例如，在一些情況下，本發明係關於用於鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的套組，該套組包括用於確定該個體之試樣中 KRAS-G13D 突變之存在之試劑，以及視情況，使用該等試劑鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的說明書。在一些情況下，該等試劑包括用於使 KRAS 基因之全部或一部分擴增之第一寡核苷酸及第二寡核苷酸。

【0252】 例如，在一些情況下，本發明係關於用於鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的套組，該套組包括用於確定來自該個體之試樣中 NRAS 活化突變之存在之試劑，以及視情況，使用該等試劑鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的說明書。在一些情況下，該等試劑包括用於使 NRAS 基因之全部或一部分擴增之第一寡核苷酸及第二寡核苷酸。

【0253】 例如，在一些情況下，本發明係關於用於鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 PI3K 抑制劑之治療之患有癌症之個體的套組，該套組包括用於確定來自該個體之試樣中 KRAS 活化突變之存在之試劑，以及視情況，使用該等試劑鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 PI3K 抑制劑之治療之患有癌

症之個體的說明書。在一些情況下，該等試劑包括用於使 *KRAS* 基因之全部或部分擴增之第一寡核苷酸及第二寡核苷酸。

實例

【0254】 提供以下實例以說明而非限制目前主張之發明。

實例 1：材料及方法

活體外方法

細胞系及試劑

【0255】 抗 BRAF (sc-5284)及抗 CRAF (sc-133)抗體係購自 Santa Cruz Biotechnology。抗 MEK1 (610122)及抗 CRAF (610152)抗體係購自 BD Biosciences。抗 pMEK (S217/S221) (9121)、抗 ERK (9107)、抗 pERK (T202/Y204) (9101)、抗 pCRAF (S338) (9427)、抗 pEGFR (Y1068) (3777)、AKT (9272)、pAKT (T308) (13038)、裂解 PARP (9521)及抗 β 肌動蛋白(4970)係購自 Cell Signaling Technology。IR 偶聯之二級抗體山羊抗小鼠 680LT (926-68020)、山羊抗人類 680LT (926-68032)及山羊抗兔 800CW (926-32211)係購自 Li-Cor。所有西方墨點皆在 Li-Cor CLX 上使用雙工 IR 偶聯之二級抗體進行掃描。所有細胞系皆獲自美國模式培養物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC)且維持在推薦培養基中，且補充有 10%熱不活化之 FBS (HyClone, SH3007003HI)、1× GlutaMAX (Gibco, 35050-061)及 1× Pen Strep (Gibco, 15140-122)。A549 shCRAF 及 HCT116 shCRAF 細胞系係在 Genentech 生成。

穩定細胞系生成

【0256】 HCT116 結腸癌細胞系係購自 ATCC (美國典型培養物保藏中心, Manassas, VA)。HCT116 細胞係在含有 10%胎牛血清之 RPMI 1640 中培養。利用髮夾寡核苷酸製備穩定表現螢光素酶及 CRAF shRNA 之 HCT116 細胞(螢光素酶 shRNA：有義：5'-GAT CCC CCT TAC GCT GAG TAC TTC GAT TCA AGA

GAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT TTT GGA AA-3' (SEQ ID NO: 1) , 反義 : 5'-AGC TTT TCC AAA AAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATC TCT TGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGG GG-3' (SEQ ID NO: 2)及 CRAF shRNA : 有義 : 5'-GAT CCC CGA CAT GAA ATC CAA CAA TAT TCA AGA GAT ATT GTT GGA TTT CAT GTC TTT TTT GGA AA-3' (SEQ ID NO: 3) , 反義 : 5'-AGC TTT TCC AAA AAA GAC ATG AAA TCC AAC AAT ATC TCT TGA ATA TTG TTG GAT TTC ATG TCG GG-3' (SEQ ID NO: 4)。

基於先前闡述之方法(Gray 等人 *BMC Biotechnol.* 7:61, 2007 ; Jaiswal 等人 *PLoS One.* 4: e5717, 2009)藉由以下來製備攜帶可誘導 shRNA 之慢病毒構築體 : 使用 Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) 在 HEK293T 細胞中將含有螢光素酶或 CRAF shRNA 之 pHUSH-Lenti-puro 構築體與表現水疱性口炎病毒(VSV-G)包膜糖蛋白及 HIV-1 包裝蛋白(GAG-POL)之質體一起共轉染。用該等病毒轉導靶細胞 , 然後在嘌呤黴素中選擇。在使用含有 500 ng/ml 去氧羥四環素(doxycycline) (Clontech , CA)之培養基誘導 shRNA 之後 , 藉由西方墨點分析表徵細胞之減弱 , 如先前所闡述(Jaiswal 等人 , *PLoS One.* 4: e5717, 2009)。

【0257】 A549 肺癌細胞系係自 ATCC 獲得。將細胞在 RPMI 1640 +10%胎牛血清中培養。使用髮夾寡核苷酸製備穩定表現非靶向對照(NTC)或 CRAF shRNA 之 A549 細胞 : NTC shRNA 靶向序列 : 5' TCC TGC GTC TAG AGG TTC CCA 3' (SEQ ID NO: 5)及 CRAF shRNA 靶向序列 : 5' TAG GAG TAG ACA TCC GAC TGG 3' (SEQ ID NO: 6)。

所使用之載體係 pINDUCER 10 , 其經修飾以表現最佳化之基於 miR-30 之髮夾(Meerbrey 等人 , *PNAS.* 108(9): 3665-3670, 2011 ; Fellmann 等人 , *Cell Rep.* 5: 1704-1713, 2013)。

藉由以下來製備攜帶可誘導 shRNA 之慢病毒構築體 : 利用 lipofectamine 2000 (Invitrogen)在 293T 細胞中將含有 NTC 或 CRAF shRNA 之 pINDUCER10-miRE 構築體與表現水疱性口炎病毒(VSV-G)包

膜醣蛋白及 HIV-1 包裝蛋白(GAG-POL)之質體一起共轉染。使用 Lenti-X 濃縮器 (Clontech)濃縮病毒上清液。用該等病毒上清液轉導靶細胞，並用嘌呤黴素(2 $\mu\text{g/ml}$)進行選擇。在使用含有 2 $\mu\text{g/ml}$ 去氧羥四環素(Sigma)之培養基誘導 shRNA 之後，藉由西方墨點分析評估細胞之減弱。

細胞存活率分析

RAS 突變、BRAF 突變細胞篩選

【0258】 對每種細胞系之接種密度進行最佳化，4 天後獲得 70-80%鋪滿。將細胞平鋪至 384 孔板(Griener, 781091)中，然後第二天用化合物進行處理，最終 DMSO 濃度為 0.1%。使用 CellTiter-Glo (Promega, G7573)藉由發光量測活細胞之相對數量。在 GraphPad Prism 6 中使用四參數擬合生成存活率曲線。

工具化合物組合篩選

【0259】 在 A549 細胞中不存在或存在固定劑量之 AZ-628 或 DMSO 時，篩選包含 480 種以 9 點劑量反應排列之化合物之化合物庫。將 A549 細胞接種至 384 孔板中，且在 24 小時後添加化合物。在化合物添加後 120 小時測定細胞存活率 (CellTiter Glo)。擬合曲線，且計算 IC50 及平均存活率度量。IC50 係相對於未處理之孔抑制為 50%之劑量。平均存活率係每一測試劑量下之擬合存活率之平均值。平均存活率等於對數劑量/存活率曲線下面積除以測試劑量之總數。所有數據皆使用 Genedata Screener (GDS)軟體進行擬合。組合度量係每一化合物之情況下 AZ-628 處理之臂與 DMSO 處理之臂之間平均存活率的差異。

高通量細胞存活率分析

【0260】 使用三倍稀釋法以 9 點劑量反應篩選化合物。在化合物添加前 24 小時將細胞接種至 384 孔板中。然後將細胞與化合物一起培育 72 小時或 120 小時，之後分析存活率(CellTiter-Glo, Promega)。分析係以生物學一式三份來實施。將細胞在 RPMI-1640、2.5% FBS (72 小時分析)或 5% FBS (120 小時分析)及 2 mM

麩醯胺酸(貫穿整個分析)中培育(37°C，5% CO₂)。所報告之 IC₅₀ 及平均存活率度量如下：IC₅₀ 係相對於未處理之孔估計之抑制為 50%之劑量(亦即絕對 IC₅₀)。平均存活率等於對數劑量/存活率曲線下面積除以測試劑量之總數。

磷酸化(*Ser 217/221*) /總 *MEK1/2* 分析

【0261】 以每 96 孔 20,000 個細胞之密度平鋪細胞，且第二天用化合物處理 2 小時，最終 DMSO 濃度為 0.2%。2 小時後，根據製造商之方案(Meso Scale Discovery, K15129D)溶解細胞，並將溶解物添加至 BSA 封閉之板中用於在 4°C 下過夜捕獲。第二天，用 TBST 將分析板洗滌三次，並添加檢測抗體並在 RT 下持續 1 小時然後將該等板用 TBST 洗滌三次。將 1×讀取緩衝液添加至板中，且立即在 Meso Scale Discovery SECTOR Imager 6000 上讀取。使用 GraphPad Prism 6 生成曲線。

藥物組合分析

【0262】 對於組合協同研究，將細胞平鋪於 384 孔板(Corning)中，並用不同濃度之化合物單獨或組合處理 72 小時。使用 CellTiter-Glo 發光細胞存活率分析(Promega, G7573)測定細胞存活率。使用 Bliss 獨立性分析方法確定協同效應(Greco 等人 *Pharmacol. Rev.* 47: 331-385, 1995; Chou 及 Talalay. *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55, 1984 ; Chou. *Cancer Res.* 70: 440-446, 2010 ; Bliss. *Ann. Appl. Biol.* 25: 31, 1939)。

RNA 測序實驗

【0263】 將細胞接種過夜，並用 AZ-628 及考比替尼單獨地(0.1 μM)或組合(各 0.1 μM)處理 6 小時。用 DMSO (0.2%最終濃度)處理對照細胞。按照製造商之方案使用帶有柱上 DNase 消化之 RNEasy 迷你套組(Qiagen 編號 74106 及編號 79254)提取總 RNA。對試樣進行品質控制，以確定 RNA 之數量及品質，之後藉由 RNA-seq 處理該等試樣。使用 NanoDrop 8000 (Thermo Scientific)測定 RNA 試

樣之濃度，並藉由片段分析儀(Advanced Analytical Technologies)確定 RNA 之完整性。將 0.5 µg 總 RNA 用作使用 TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina) 製備庫之輸入材料。使用 2200 TapeStation 及 High Sensitivity D1000 screen tape (Agilent Technologies)測定庫之大小，並使用庫定量套組(KAPA)藉由基於 qPCR 之方法測定該等庫之濃度。將該等庫多工化，然後在 Illumina HiSeq2500 (Illumina)上進行測序以生成 30M 之單端 50 鹼基對之讀段。

【0264】 使用 RefSeq 基因模型及比對器 GSNAP 將讀段映射至 *hg19* 基因體。根據 *limma* 用戶手冊，利用如 R 程式語言中執行之 *limma* 及 *edgeR* 軟體，使用每基因計數來評估差異基因表現。在細胞系屬性、AZ-628 及考比替尼治療以及治療相互作用項之項目方面在基因表現上擬合線性模型。藉由如 *limma* 軟體中執行之調節型 t 測試確定線性模型項之顯著性。

純系形成分析

【0265】 將細胞以 10,000 個細胞/孔一式兩份地平鋪於 6 孔板中，使其附著過夜，並用所指示化合物處理 8 天。每 72 小時補充具有適當化合物之培養基。8 天時，用 PBS 將細胞沖洗一次，固定並用結晶紫溶液(Sigma Aldrich，HT90132)染色 20 分鐘，並用水洗滌。

免疫墨點

【0266】 在溶解緩衝液(0.5% NP40, 20 mM Tris, pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% 甘油, 1 mM EDTA)加蛋白酶抑制劑混合物-complete mini (Roche Applied Science, 11836170001)及磷酸酶抑制劑混合物(Thermo, 78426)中溶解細胞。將溶解物以 15,000 rpm 離心 10 分鐘，並使用 BCA (Thermo, 23227)測定蛋白質濃度。使等量之蛋白質經受 SDS-PAGE NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝膠(Novex, WG-1403)並轉移至硝化纖維素膜(BioRad，170 - 4159)。在封閉緩衝液(Li-Cor, 927-40000)中封閉後，將膜與所指示之一級抗體一起培育，並藉由添加二級抗體 IRDye 680LT 山

羊抗小鼠 IgG (H + L) (Li-Cor, 926-68050)或 IRDye 800CW 山羊抗兔 IgG (H + L) (Li-Cor, 926-32211)進行分析。將膜在 LiCor Odyssey CLx 掃描儀上可視化。

活體外激酶分析

【0267】 如免疫墨點法中所闡述，對細胞進行平鋪及溶解。將細胞溶解物與抗 CRAF (Millipore 07-396)或抗 BRAF 抗體(Millipore 07-453)及 50 μ l 蛋白質 A 瓊脂糖珠粒(Millipore 16-125)一起在 4°C 培育 2 小時。在用溶解緩衝液加蛋白酶及磷酸酶抑制劑混合物洗滌之後，在 30°C 將蛋白質 A 珠粒與 0.4 μ g 無活性 MEK1 (Millipore 14-420)在 40 μ l 激酶緩衝液(20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β 甘油磷酸鹽, 5 mM EGTA, 1 mM 正鈣酸鈉, 1 mM DTT, 120 μ M ATP, 18 mM $MgCl_2$)中培育 30 min。然後藉由西方墨點分析試樣。

Ras 活性分析

【0268】 藉由 GST-Raf-RBD 拉下分析(Thermo Scientific, 16117)測定活性 GTP 負荷之 Ras 之含量。簡言之，將 GST-Raf-RBD 融合蛋白與麩胱甘肽珠粒一起培育，並如製造商所推薦將細胞收集在溶解緩衝液中。將細胞溶解物與 GST-Raf-RBD 固定化珠粒一起在 4°C 培育 1.5 小時。用 SDS 試樣緩衝液溶析結合蛋白並藉由西方墨點進行分析。

siRNA 轉染

【0269】 根據製造商之說明，在 lipofectamine RNAiMAX 試劑 (Life Technologies) 存在時，用 20 nM siKRAS (L-005069-00-0020) 或 siNTC (D-001810-10-20) (Dharmacon On-TARGETplus® pool)反向轉染細胞。轉染後第二天更換培養基，且在第 4 天評估減弱效率。

活體內方法

腫瘤蛋白及 RNA 分離

【0270】 收集 GEM 模型腫瘤試樣並儲存在 RNALater (Qiagen, Valencia, CA)

中。遵循製造商之說明用 RNeasy Plus 迷你套組(Qiagen)提取總 RNA。使用 Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA)測定 RNA 量。

RT-PCR 分析

【0271】 使用 Fluidigm 儀器或標準 RT-PCR 分析根據製造商之推薦評估轉錄讀出。使用 Applied Biosystems High Capacity cDNA RT 套組及 TaqMan PreAmp Master Mix 按照製造商之方案(Life Technologies, Carlsbad, CA)使 RNA (100 ng) 經受 cDNA 合成/預擴增反應。擴增後，用 TE 將試樣 1:4 稀釋，並使用 BIOMARK™ HD 系統根據製造商之方案在 Fluidigm 96.96 Dynamic Arrays 上進行 qPCR。藉由自每一靶標基因之平均值減去三個參考基因之平均值，隨後自平均試樣 dCt 減去平均媒劑 dCt，將循環臨限值(Ct)值轉換成相對表現值($2^{-(ddCt)}$)之倍數變化。

免疫墨點

【0272】 為製備蛋白質溶解物，用冰冷的 PBS 將細胞洗滌一次，並在補充有蛋白酶抑制劑錠劑(Roche)及磷酸酶抑制劑(Sigma)之 1×細胞提取緩衝液(Invitrogen)中溶解。使用 BCA 蛋白質分析(Pierce)測定蛋白質濃度。在 1×MOPS 運行緩衝液(Invitrogen)中藉由 10% Bis-Tris 凝膠拆分等量之蛋白質，並轉移至硝化纖維素膜(Invitrogen)。使用針對以下蛋白質之抗體：CRAF、p-ERK、ERK1/2、p-MEK-1/2、MEK-1/2、裂解 PARP (Cell Signaling)、p-p90RSK、GAPDH (EMD Millipore)、p90RSK (Invitrogen)。使用增強之化學發光檢測試劑(Pierce)檢測與 HRP 偶聯之山羊抗兔及山羊抗小鼠抗體(Jackson ImmunoResearch)之抗原-抗體相互作用，或者使用 Odyssey 紅外成像系統(LI-COR Biosciences)檢測與 IRDye 800 偶聯之親和純化之抗兔 IgG (LI-COR Biosciences)及 Alexa Fluor 680 山羊抗小鼠 IgG (Life Technologies)二級抗體之抗原-抗體相互作用。

活體內模型

【0273】 所有腫瘤異種移植物模型之建立及監測皆如先前所顯示來實施，且

闡述於 Hoeflich 等人 *Cancer Res.* 72(1): 210-219, 2012 中。

測試材料

【0274】 在 Genentech 以不同濃度之甲基纖維素吐溫(methyl-cellulose tween，MCT)懸浮液之形式製備考比替尼(GDC-0973)。在 Genentech 合成 AZ-628 及 LY3009120，並以 MCT 奈米懸浮液形式製備。每週一次持續三週製備考比替尼、AZ-628、LY3009120 及媒劑對照給藥溶液。在給藥前藉由渦旋使調配物充分混合。將測試物品儲存在冰箱中，該冰箱經設定以維持 4°C-7°C 之溫度範圍。

皮下腫瘤模型

【0275】 如 Hoeflich 等人(*Cancer Res.* 72(1): 210-219, 2012)先前所闡述進行異種移植物研究。簡言之，將 5×10^6 個 HCT116 或 10^7 個 NCI-H2122 細胞皮下植入自 Taconic (Cambridge City, IN) 獲得之平均重量為 24-26 g 之雌性 NCR 裸鼠(6-8 週齡)之右腹側中。將小鼠圈養在 Genentech 之標準嚙齒類動物微隔離籠中，並使其在腫瘤細胞植入前至少 3 天適應研究條件。每項研究僅使用看起來健康且沒有明顯異常之動物。使用數位卡尺(Fred V. Fowler Company, Inc.)使用公式 $(L \times W \times W)/2$ 測定腫瘤體積。腫瘤生長抑制(TGI%)計算為各別劑量組每天擬合曲線下面積(AUC)相對於媒劑之百分比，使得 $TGI\% = 100 \times [1 - (AUC_{\text{治療}}/\text{天})/(AUC_{\text{媒劑}}/\text{天})]$ 。使用線性混合效應模型使用 R v2.12.0 中之 R 包 nlme, 3.1-97 版(Pinheiro 等人 *R Package Version 3.1-89*, 2008)將曲線擬合應用於 Log_2 轉變之個體腫瘤體積數據。每週兩次使用標準天平對小鼠進行稱重。

實例 2：RAF 激酶抑制劑在 KRAS 突變細胞系中缺乏有效的單一藥劑功效

【0276】 為確定 RAF 激酶抑制劑是否可在 KRAS 突變細胞系中治療性地使用，在 KRAS 突變細胞系對 BRAF-V600E 細胞系中在一組 RAF 抑制劑中評估細胞存活率，此係利用 1.5 型 RAF 抑制劑達拉菲尼、威羅菲尼及「反常破壞劑」PLX-8394 以及 II 型 RAF 抑制劑 AZ-628 及 LY3009120 進行。臨床批准之 1.5 型

BRAF 抑制劑威羅菲尼及達拉菲尼以及 PLX-8394 在 BRAF-V600E 突變細胞系中顯示活性(如黑色所示)，但在 KRAS 突變細胞系中不顯示活性(如紅色所示) (圖 1A)。如所預計，1.5 型抑制劑威羅菲尼及達拉菲尼而非 PLX-8394，導致 KRAS 突變腫瘤中下游 pMEK 之反常活化(圖 1B)。與 1.5 型抑制劑相比，II 型 pan-RAF 抑制劑顯示更好的 KRAS 突變細胞系抑制，但其在 KRAS 突變細胞系中之效能弱於在 BRAF-V600E 突變背景中觀察到之活性(圖 1A)。與此活性一致，II 型 RAF 抑制劑以及最近報導之反常破壞劑 PLX-8394 不誘導反常活化(圖 1B)。為擴展該等結果，接下來在一組 161 種肺、皮膚及結腸直腸細胞系中篩選三種 II 型 RAF 抑制劑(LY-3009120、MNL-2480 及 AZ-628)及 PLX-8394 (圖 1C)。儘管與 BRAF/RAS 野生型細胞系相比，在 RAS 突變細胞系中該等抑制劑之活性略有增加，但 BRAF-V600 細胞系最為敏感(圖 1C)。該等數據表明，缺乏反常活化不足以預示 RAS 突變背景中之敏感性，且 RAF 激酶活性可能不為突變 KRAS 介導之生長所必需。

【0277】 為確定第二藥理學藥劑是否能使 KRAS 突變細胞系對 RAF 激酶抑制敏感，在 A549 KRAS 突變肺癌細胞系中篩選與 DMSO 或 1 μ M II 型 RAF 抑制劑 AZ-628 組合之由 480 種小分子工具化合物組成之庫。此篩選中之最高命中係 MEK 抑制劑考比替尼(GDC-0973)。AZ-628 與其他 MAPK 路徑抑制劑組合良好，該等其他 MAPK 路徑抑制劑包括前 20 名命中中之 4 種不同的 MEK 抑制劑及 2 種 ERK 抑制劑(圖 1D 及補充表 1)。其他值得注意的命中包括若干微管抑制劑，以及 PI3K 抑制劑匹利昔布(GDC-0941)及他利昔布(GDC-0032)。為驗證來自初級篩選之命中，重新篩選 HCT-116 (KRAS-G13D/PIK3CA 突變體)細胞系中之最高命中，此證實 MEK 抑制劑為與 II 型 RAF 抑制劑 AZ-628 組合之最強藥劑。

實例 3：構形特異性 RAF 及 MEK 抑制劑在 RAS 突變細胞系中展現協同

【0278】 儘管來自篩選之最高命中係 MEK 抑制劑，但並非所有 MEK 抑制劑

皆具有同等的協同性。儘管在所測試之化合物中，考比替尼、匹塞替尼、瑞法替尼及 PD901 得分最高，但曲美替尼及 GDC-0623 在平均存活率方面未顯示差異，但其均為有效的 MEK 抑制劑(圖 1E)。先前報導 MEK 抑制劑端視其陷獲無活性 RAF-MEK 複合物之能力而具有不同的作用機制(Hatzivassiliou 等人, *Nature* 501:232-236 (2013))。此藥物穩定之複合物阻止 RAF 磷酸化 MEK。為確定 MEK 抑制劑之作用機制是否影響與 AZ-628 之協同，測試具有不同分子機制之若干種 MEK 抑制劑，且發現在全劑量 Bliss 矩陣分析中，陷獲無活性 RAF-MEK 複合物且不誘導 pMEK (例如，曲美替尼、GDC-0623、G-573 及 CH-6766) (圖 1F)之 MEK 抑制劑與 AZ-628 之協同亦較小(圖 1G)。

【0279】 基於上述觀察，假設正如 MEK 抑制劑並非皆與 RAF 抑制劑等同地協同一樣，與 MEK 抑制劑組合之不同 RAF 抑制劑間之協同亦存在差異。儘管發現 II 型 RAF 抑制劑容易與考比替尼結合，但 1.5 型 RAF 抑制劑(包括反常破壞劑 PLX-8394)在 KRAS 突變細胞系中未與 MEK 抑制劑協同(圖 2A)。此表明反常活化並非 1.5 型 BRAF 抑制劑在此突變環境中不與 MEK 抑制劑協同之主要原因。

【0280】 為測試該等敏感性變化是否與所預料之路徑信號傳導變化相關，用增加濃度之 RAF 抑制劑威羅菲尼及 AZ-628 (0.1-10 μ M)及固定劑量之考比替尼處理 A549 及 HCT 116 細胞。儘管威羅菲尼在 A549 KRAS 突變系中在存在或不存在考比替尼時不能減少路徑信號傳導，但僅與考比替尼組合之 AZ-628 在 pMEK、pERK 及 pRSK 含量上有效抑制 MAPK 路徑輸出(圖 2B)。路徑抑制限於 MAPK 路徑，因為觀察到對 pAKT 含量之影響極小。使用 MAPK 信號傳導之 RNA-Seq 典型下游轉錄靶，在四種 KRAS 突變肺癌細胞系中用 0.1 μ M AZ-628、0.1 μ M 考比替尼或組合處理後 6 小時，檢查 DUSP6 及 SPRY4 (圖 2C)。在處理之間觀察到顯著相互作用($P < 0.01$ ，調節型 T 測試)，其中若組合兩種單一藥劑

之效應僅為加性的，則該等基因之下調較所預計的更為顯著。該等數據表明，該等化合物亦引起 MAPK 路徑之協同轉錄阻抑。該組合亦可在處理 48 小時後顯著誘導細胞凋亡，如藉由西方墨點檢測之裂解 PARP 之染色增加(圖 2D)及如亞 G1 及 G1 群體中藉由流式細胞術評估之膜聯蛋白 V 及碘化丙啶之顯著增加(圖 2E)所證明。為測試該等組合效應是否導致細胞生長之持久阻抑，亦測試群落形成分析中 MEK/RAF 抑制劑組合之長期生長效應。在與 II 型抑制劑 AZ-628 或 LY3009120 而非與 I.5 型抑制劑威羅菲尼組合之考比替尼與 PLX-8394 之間觀察到顯著協同(圖 2F)。

實例 4：RAF 及 MEK 抑制劑之組合治療展現活體內功效

【0281】 為確定活體外觀察到之組合效應是否轉化為活體內功效，在 NCI-H2122 肺(AZ-628+GDC-0973)及 HCT116 結腸(LY3009120+GDC-0973)異種移植物腫瘤模型中，與考比替尼組合測試 II 型 pan-RAF 抑制劑 LY3009120 及 AZ-628。與活體外數據一致，活體內數據指示當與單獨的任一分子之功效相比時，II 型 RAF 抑制劑加 MEK 抑制劑之穩健組合效應(圖 3A)。儘管 LY3009120 或考比替尼作為單一藥劑略微抑制腫瘤生長，但該組合能夠使腫瘤有效地退化。重要地，該組合在小鼠中耐受性良好，導致治療後體重變化極小或最小(圖 3B)。為評估該組合對 MAPK 信號傳導之影響有多大，在治療後 4 天之各個時間點收集腫瘤試樣。MAPK 路徑信號傳導之定量證實，在所有測試時間點，與單獨的任一抑制劑相比，LY3009120 及 GDC-0973 之組合對 pERK 及 pRSK 之阻抑更好，從而使得對下游 MAPK 靶基因 DUSP6 及 SPRY4 之阻抑更強(圖 3C)。血漿及腫瘤藥物濃度證實，改良之抑制活性並非歸因於增加之藥物暴露而是歸因於藥物間相互作用(圖 3D)。綜上所述，RAF 及 MEK 抑制之組合在活體內展現顯著組合功效。

實例 5：MEK 抑制劑治療以 RAS 依賴性方式誘導 RAF 激酶活性

【0282】 為研究在考比替尼與 II 型 RAF 抑制劑 AZ-628 之間觀察到之協同機制，用考比替尼將一組 KRAS 突變及野生型細胞系處理 24 小時，並檢查對 MAPK 路徑信號傳導之效應。在用考比替尼處理後，觀察到 KRAS 突變細胞中之 pMEK 含量增加，而在 KRAS 野生型細胞中未增加，從而指示經由 MAPK 路徑之通量增加(圖 4A)。在其中一組 KRAS 突變及野生型結腸癌及肺癌細胞系在用考比替尼處理 24 小時之後檢查對 pMEK 之誘導之一組單獨實驗中，觀察到 KRAS 突變及野生型協同細胞而非 KRAS 突變及野生型非協同細胞中之 pMEK 含量增加(圖 4B-4D)。為進一步瞭解考比替尼治療如何改變路徑，藉助 CRAF 之免疫沈澱評估 RAF 二聚化。在用考比替尼處理之 KRAS 突變細胞系(A549、H2122 及 HCT116)中，BRAF 與 CRAF 強烈共免疫沈澱(圖 4A)。此在所測試之 KRAS 野生型(293T)或 BRAFV600E (A375)細胞系中未觀察到。隨後藉助外源添加 MEK 及 ATP 來分析 RAF 二聚體之活體外激酶活性。該等結果指示，在添加考比替尼後，存在於 KRAS 突變細胞系中之 RAF 二聚體高度有活性(圖 4A)，且能夠以顯著高於用 DMSO 對照處理之水準來磷酸化 MEK。為進一步研究機制，對 KRAS 突變及野生型細胞系中用 GDC-0973 處理後之 RAS-GTP 含量進行評估。KRAS 突變細胞系在基線及考比替尼治療後顯示升高之 RAS-GTP 含量，可能解釋 RAF 二聚體及 RAF 激酶活化之誘導(圖 4A)。BRAF-CRAF 異二聚體之形成以及異二聚體激酶活性之增加均劑量依賴於 50-100 nM 考比替尼之添加(圖 4E)。此結果解釋在 8 天選殖形成分析中觀察到之協同效應，其中在 50-100 nM 考比替尼濃度及 100 nM AZ-628 濃度下，其自身對細胞生長有極少效應(圖 2F)。

【0283】 接下來檢查 RAF 抑制劑抑制考比替尼誘導之 RAF 二聚體之能力。自 A549 細胞使考比替尼誘導之 RAF 二聚體免疫沈澱，然後用 AZ-628、LY3009120 或威羅菲尼處理。僅可結合至 RAF 二聚體之 II 型 RAF 抑制劑能夠抑制激酶活性，如藉由 IP 激酶分析中降低之 pMEK 含量所證實(圖 4F)，且與此

細胞系中觀察到之所觀察協同一致(圖 2A)。

【0284】 考比替尼治療引起反饋喪失及穩健的路徑「再活化」，如藉由 RAS-GTP 含量、RAF 二聚體及 pMEK 之增加所證實，此效應在 KRAS 突變細胞系中更為顯著。為測試此活性是否需要突變 KRAS，利用靶向 KRAS 之 siRNA，並在存在或不存在考比替尼時觀察其對 MAPK 信號傳導之效應。在所測試之每一 KRAS 突變細胞系中，KRAS 減弱阻抑考比替尼誘導之 pMEK 含量，以及 RAF 二聚體之形成及活體外激酶活性(圖 4G)。總而言之，該等數據指示突變 KRAS 在介導 MAPK 路徑之再活化中起重要作用，此歸因於在單一藥劑 MEK 抑制後增加之 RAS-GTP 含量。

實例 6：在 KRAS 突變及野生型細胞系之子集中 II 型 RAF 抑制劑與 MEK 抑制劑協同

【0285】 為確定具體基因型是否對 II 型 pan-RAF 抑制劑與 MEK 抑制劑之組合更敏感，用兩種單一藥劑(AZ-628 (以 20 μ M 開始)及考比替尼(以 1 μ M 開始))以及兩種化合物之共稀釋液，篩選 322 種細胞系，包括 RAS 突變顯著且頻繁發現之細胞系(胰腺、肺、結腸直腸、皮膚、卵巢及血液)。根據該等數據，計算作為協同量度之超過共稀釋系列之正 Bliss 過量。與 BRAF-V600 突變體或野生型(非 RAS/BRAF-V600 突變體)細胞系相比，在 KRAS 及 NRAS 突變細胞系中觀察到顯著更高的協同分值(圖 5A) ($p<0.001$ ，雙側 t 測試)。然後使用混合建模方法將來自每一組織類型之細胞系分成以下類別：無協同、低協同、中等協同或高協同。當檢查該等類別在所有適應症上之分佈時，觀察到與野生型或 BRAF-V600 細胞系相比，在 RAS 突變體組中在中等協同反應者與高協同反應者之間存在強關聯(圖 5A)。

【0286】 儘管觀察到 RAS 突變細胞系中存在強協同，但發現未經協同抑制之 RAS 突變細胞系。相反，若干 RAS/BRAFV600 野生型細胞系顯示強協同。選擇

代表 RAS 突變狀態及存在或不存在協同之結腸直腸癌細胞系，並評估在使用或不使用考比替尼治療之情況下 KRAS 減弱時之 MAPK 信號傳導(圖 5B)。有趣地，觀察到在該組合無協同性之 KRAS 突變細胞系中 MAPK 信號傳導之總體水準較低，如藉由 MAPK 路徑中多個節點處總蛋白質含量及磷酸化較低所證實。相反，在該組合顯示協同之 KRAS 突變或野生型細胞系中，觀察到顯著更高之 MAPK 信號傳導。藉由 KRAS 減弱結合考比替尼，廢除了由該組合協同抑制之細胞系中之 MAPK 信號傳導，如較低之 pMEK、pERK 及 pRSK 含量所指示(圖 5B)。由該組合協同抑制之細胞系顯示獨立於 RAS 突變狀態之 BRAF/CRAF 異二聚體形成增加，如藉由 CRAF 免疫沈澱及後續針對 CRAF 及 BRAF 之染色所證實(圖 5B)。使用活體外 RAF 激酶分析，觀察到考比替尼處理後 pMEK 含量大量增加，主要是在顯示協同之細胞系中(圖 5B)，而非在未經協同抑制之 KRAS 野生型細胞系中(圖 5C)。

【0287】 在一組單獨實驗中，在 KRAS 突變非小細胞肺癌(NSCLC)細胞(A549)與 KRAS 突變結腸直腸癌(CRC)細胞(HCT-116)中亦觀察到 HM95573 (GDC-5573) (不同的 II 型 pan-RAF 抑制劑)與考比替尼之組合活性，如藉由用 HM95573、考比替尼或兩種藥劑處理後之 pMEK、pERK 及 pRSK 含量所評價(圖 5D-5E)。與用任一單獨藥劑之處理相比，在 KRAS 突變同基因 CRC 異種移植模型 CT26 中 HM95573 (GDC-5573)及考比替尼之組合亦改良活體內腫瘤生長抑制(TGI) (圖 5F-5G)。

【0288】 為確定 HM95573 (GDC-5573)及考比替尼之組合在細胞系之間是否顯示類似的協同，用 HM95573 (GDC-5573)、考比替尼或兩種化合物之共稀釋液篩選 196 種肺癌、結腸癌、皮膚癌及卵巢癌細胞系。根據該等資料，計算作為協同量度之超過共稀釋系列之正 Bliss 過量，且藉由雙側 t 測試評價顯著性。類似於 AZ-628 及考比替尼之組合，與 BRAF-V600 突變體或野生型(非

RAS/BRAF-V600 突變體)細胞系相比，在 RAS 突變細胞系中觀察到顯著更高之協同分值(圖 5H)。

【0289】 鑒於觀察到在用考比替尼處理後展現增加之 RAF 二聚體形成之 RAS 突變及野生型細胞系中存在更大的協同，訊問該等細胞系在用考比替尼處理後是否亦展現增加之 RAS-GTP 含量。無論 RAS 突變狀態如何，僅顯示協同之細胞系因應考比替尼處理而顯示增加之活性 RAS-GTP (圖 5I)，此與在由 RAF 及 MEK 抑制劑組合協同抑制之細胞系中觀察到之 KRAS 依賴性效應一致。

【0290】 由於端視位置 12 或 13 處之改變，不同 RAS 突變同種型之間之固有核苷酸交換存在已知之生物化學差異(Hunter 等人 *Molecular Cancer Research*. 13:1325-1335 (2015))，因此利用最少 5 種代表性細胞系檢查在 G12 或 G13 處具有突變之細胞系中協同之差異。有趣地，觀察到在對 RAF 加 MEK 抑制劑組合之敏感性與 G13D 突變之存在之間存在顯著關聯(圖 6A)。對於 AZ-628 及考比替尼(圖 6B-6C)及 HM95573 (GDC-5573)及考比替尼(圖 6D)之兩種測試組合，此趨勢在 KRAS-G13D 突變最盛行之結腸直腸癌細胞系中最為明顯，並且在盛行率較低之肺腺癌中有相同的趨勢。KRAS-G13D 突變結腸直腸細胞系對非 KRAS-G13D 中之路徑信號傳導之分析揭露 G13D 細胞系中 pMEK 之誘導更強(圖 6E)。在使用 SW48 同基因型細胞系之一組單獨實驗中，與用 AZ-628 (始於 0.1 μM)及考比替尼(250 nM)處理之 KRAS-G12D 及 KRAS-G12C 敲入細胞相比，用相同的 AZ-628 及考比替尼組合處理之 KRAS-G13D 敲入細胞展現更大之協同，如藉由結晶紫染色(圖 6F)及 pERK 誘導之西方墨點分析(圖 6G)所評價。如與 KRAS-G12C、KRAS-G12D 及 KRAS-G12V 細胞相比，針對 AZ-628 剖析 322 種細胞系之另一實驗顯示在 KRAS-G13D 細胞中具有升高之單一藥劑活性(圖 6H)。

【0291】 該等效應可直接歸因於 RAS-G13D 同種型，因為攜帶 KRAS-WT、

KRAS-G12V 或 KRAS-G13D 之 SW48 同基因型細胞系在 KRAS-G13D 純系中顯示高得多的 RAS-GTP 含量(圖 6I)。針對 KRAS-G13D 報導之升高之核苷酸交換率(Hunter 等人 *Molecular Cancer Research*. 13:1325-1335 (2015))可誘導對 RAF-異二聚體信號傳導之更大依賴性，此藉由 MEK 及 II 型 RAF 抑制劑之組合治療可有效地廢除。在 SW48 KRAS-G13D 細胞中證實 KRAS-G13D 之固有核苷酸交換更大，如使用核苷酸交換反應藉由時間解析之螢光能量轉移(TR-FRET)所評價(圖 6J)。

【0292】 RAS-GTP 含量增加之替代解釋係，在 RAS 上游經由 EGFR 或在下游經由 SOS1 活化用 MEK 抑制劑處理後，由於適應性再程式化而誘導。為直接測試此，對考比替尼治療後之 pEGFR 含量進行估計，但在觀察到升高之 RAS-GTP 含量之條件下，觀察到極少 EGFR 活化之證據(圖 6K)。類似地，SOS1 之靶向減弱對 RAS-GTP 含量沒有效應(圖 6L)，此表明該等機制皆不是造成 RAS-GTP 含量升高之原因。

實例 7：Pan-RAF 抑制劑亦與 Pan-PI3K 抑制協同

【0293】 上述資料強烈表明 MEK 激酶抑制誘導之反饋，此在 KRAS-G13D 突變腫瘤中特別有效。鑒於該等結果，對初始化合物篩選進行重新檢查，在該初始化合物篩選中利用 AZ-628 及 430 種不同小分子抑制劑庫之組合篩選 A549 細胞。注意到篩選之最高命中中存在 pan-PI3K 抑制劑匹利昔布。由於 A549 細胞係 PIK3CA 野生型，因此假設在此情況下野生型 PI3K 抑制可藉助抑制負反饋環及後續的 RAF 活化來驅動 RAS 活化。為更廣泛地檢查此，用 AZ-628 及匹利昔布之組合篩選一組 213 種細胞系(圖 7A)。有趣地，觀察到與考比替尼/匹利昔布組合相比，AZ-628/匹利昔布組合之協同作用普遍大幅增加，此係獨立於 RAS/RAF 突變狀態。接下來，用一組 PI3K 抑制劑處理 A549 及 HCT116 細胞，並在處理後檢查 pMEK 含量。在 A549 (KRAS-G12S) 及 HCT116

(KRAS-G13D/PIK3CA-H1047R)細胞中，發現所有測試之 PI3K 抑制劑皆使 pMEK 增加(圖 7B 及圖 7C)，且匹利昔布及他利昔布在較低濃度下如此。此表明 PI3K 抑制後經由 MAPK 路徑之通量增加係獨立於 PI3K 突變狀態。此提高之通量導致更大之下游信號傳導(如藉由增加之 pERK 及 pRSK 含量所證明)且劑量依賴於 PI3K 抑制劑匹利昔布之濃度(圖 7D)。為研究抑制 PI3K 之效應是否導致增加之 RAS 依賴性及增加之 RAS-GTP 含量，在用匹利昔布或考比替尼處理之細胞中進行活性 RAS-GTP 之 RAF1-RBD 拉下。發現匹利昔布類似於考比替尼所誘導的使 RAS-GTP 之含量增加(儘管在較高濃度下) (圖 7E)。

【0294】 使用全劑量矩陣 Bliss 分析證實 PI3K 與 pan-RAF 抑制劑之協同。一組 PI3K 抑制劑顯示與 pan-RAF 抑制劑 AZ-628 協同，生成類似於 AZ-628/考比替尼組合(圖 7F)之過量 Bliss 分值，其中高度特異性 PIK3CA 抑制劑阿利昔布 (BYL-719)及 AKT 抑制劑帕他色替(ipatasertib) (GDC-0068)顯示低 2-3 倍之協同。此指示廣泛野生型 PI3K 抑制可驅動 RAS 活化，且可引起後續對 RAF 抑制之敏化。當檢查 AZ-628 或匹利昔布在單獨或組合時對 MAPK 信號傳導之效應時，觀察到 PI3K 抑制本身穩健地抑制 pAKT，同時觀察到該兩種藥劑之組合阻止 pMEK 之累積並廢除下游信號傳導至 ERK (圖 7G)。

實例 8：II 型 RAF 抑制劑在 NRAS 突變細胞系中係有效的

【0295】 為研究 RAF 抑制劑(具體而言 II 型 pan-RAF 二聚體抑制劑)在其他 RAS 基因突變之情況下是否亦有效，在一組 RAF 抑制劑中在 NRAS 突變黑色素瘤細胞系對 BRAF-V600E 突變及 NRAS/BRAF 野生型細胞系中，利用 II 型 RAF 抑制劑 AZ-628、LY-3009120 及 MNL-2480 以及「反常破壞劑」PLX-8394 評估細胞存活率。與測試之 BRAF-V600E 突變細胞系相比，II 型 RAF 抑制劑 AZ-628 及 LY-3009120 在測試之 NRAS 突變黑色素瘤中顯示對平均存活率(圖 8A)及抑制功效(如藉由 IC50 (圖 8B)測得)大約等效之效應。該等結果指示，II 型 pan-RAF

二聚體抑制劑(例如 AZ-628 及 LY-3009120)在單獨或與 MEK 抑制劑(如考比替尼)組合時對於治療具有 NRAS 活化突變之癌症(如黑色素瘤)可能非常有效。藉由評估用 AZ-628 或考比替尼(GDC-0973)處理之 NRAS 突變、BRAF-V600E 及 NRAS/BRAF 野生型細胞系之細胞存活率及 IC50 之單獨研究進一步證實 II 型 pan-RAF 二聚體抑制劑(例如 AZ-628 及 LY-3009120)治療 NRAS 突變癌症之效能。結果顯示，AZ-628 在 NRAS 突變及 BRAF-V600E 突變細胞系中具有與考比替尼等效之效應，其在 BRAF-V600E 細胞系中顯示相對於 NRAS 突變細胞系更大之功效(圖 8C 及圖 8D)。

其他實施例

【0296】 儘管出於清楚理解之目的，已藉助說明及實例詳細闡述了前述發明，但該等闡述及實例不應解釋為限制本發明之範圍。本文引用之所有專利及科學文獻之揭示內容皆以全文引用方式明確地併入。

【序列表】

<110> 美商建南德克公司 (Genentech, Inc.)

<120> 癌症之診斷及治療方法

<130> 50474-171TW2

<140>

<141> 2018-09-07

<150> US 62/556,277

<151> 2017-09-08

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

gatcccccctt acgctgagta cttcgattca agagatcgaa gtactcagcg taagtttttt 60

ggaaa 65

<210> 2

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 2

agcttttcca aaaaacttac gctgagtact tcgatctctt gaatcgaagt actcagcgta 60

agggg 65

<210> 3

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 3

gatccccgac atgaaatcca acaatatcca agagatatgg ttggatttca tgtctttttt 60

ggaaa 65

<210> 4

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 4

agctttttcca aaaaagacat gaaatccaac aatatctctt gaatatgtt ggatttcattg 60

tcggg 65

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 5

tcctgcgtct agaggttccc a 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 6

taggagtaga catccgactg g 21

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】

一種鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體的方法，該方法包含對來自該個體之試樣(sample)進行 NRAS 活化突變篩選，其中該試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且該其中 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 2】

一種為患有癌症之個體選擇治療之方法，該方法包含對來自該個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，其中該試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 3】

如請求項 1 或 2 之方法，其中該個體具有 NRAS 活化突變。

【請求項 4】

一種 pan-RAF 二聚體抑制劑之用途，其係用於製備用於與 MEK 抑制劑併用以治療患有癌症之個體之藥劑，該個體根據如請求項 1 或 2 之方法經鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 5】

一種 MEK 抑制劑之用途，其係用於製備用於與 pan-RAF 二聚體抑制劑併用

以治療患有癌症之個體之藥劑，該個體根據如請求項 1 或 2 之方法經鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 6】

一種 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之用途，其係用於製備治療患有癌症之個體之藥劑，該個體根據如請求項 1 或 2 之方法經鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 7】

一種 pan-RAF 二聚體抑制劑之用途，其係用於製備用於與 MEK 抑制劑併用以治療患有癌症之個體之藥劑，其中在治療前，已對來自該個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，且已確定該試樣中存在 NRAS 活化突變，由此將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 8】

一種 MEK 抑制劑之用途，其係用於製備用於與 pan-RAF 二聚體抑制劑併用以治療患有癌症之個體之藥劑，其中在治療前，已對來自該個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，且已確定該試樣中存在 NRAS 活化突變，由此將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 9】

一種 pan-RAF 二聚體抑制劑與 MEK 抑制劑之用途，其係用於製備治療患有癌症之個體之藥劑，其中在治療前，已對來自該個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，且已確定該試樣中存在 NRAS 活化突變，由此將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 10】

如請求項 1 或 2 之方法或請求項 7 至 9 中任一項之用途，其中篩選包含對 NRAS 基因之全部或一部分進行擴增及測序。

【請求項 11】

如請求項請求項 4 至 9 中任一項之用途，其中該藥劑與額外治療劑投與至該個體。

【請求項 12】

如請求項 11 之用途，其中該額外治療劑係免疫治療劑、細胞毒性劑、生長抑制劑、放射治療劑或抗血管生成劑。

【請求項 13】

如請求項 1 或 2 之方法或請求項 7 至 9 中任一項之用途，其中該試樣係組織試樣、細胞試樣、全血試樣、血漿試樣、血清試樣或其組合。

【請求項 14】

如請求項 13 之方法或用途，其中該試樣係組織試樣、全血試樣、血漿試樣、血清試樣或其組合。

【請求項 15】

如請求項 14 之方法或用途，其中該試樣係組織試樣。

【請求項 16】

如請求項 15 之方法或用途，其中該組織試樣係腫瘤組織試樣。

【請求項 17】

如請求項 16 之方法或用途，其中該腫瘤組織試樣係福馬林(formalin)固定且石蠟包埋(FFPE)試樣、檔案(archival)試樣、新鮮試樣或冷凍試樣。

【請求項 18】

如請求項 1 或 2 之方法或請求項 7 至 9 中任一項之用途，其中該癌症係結腸直腸癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、皮膚癌、腎癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈狀肉芽腫、默克爾細胞癌(Merkel cell cancer)或血液惡性病。

【請求項 19】

如請求項 18 之方法或用途，其中該癌症係結腸直腸癌。

【請求項 20】

如請求項 18 之方法或用途，其中該癌症係卵巢癌。

【請求項 21】

如請求項 18 之方法或用途，其中該癌症係肺癌。

【請求項 22】

如請求項 18 之方法或用途，其中該癌症係胰腺癌。

【請求項 23】

如請求項 18 之方法或用途，其中該癌症係皮膚癌。

【請求項 24】

如請求項 1 或 2 之方法或請求項 7 至 9 中任一項之用途，其中該個體係人類。

【請求項 25】

一種套組，其用於鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體，該套組包含：

(a) 用於確定該個體之試樣中 NRAS 活化突變之存在之試劑；及視情況，

(b) 使用該等試劑鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體之說明書，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 26】

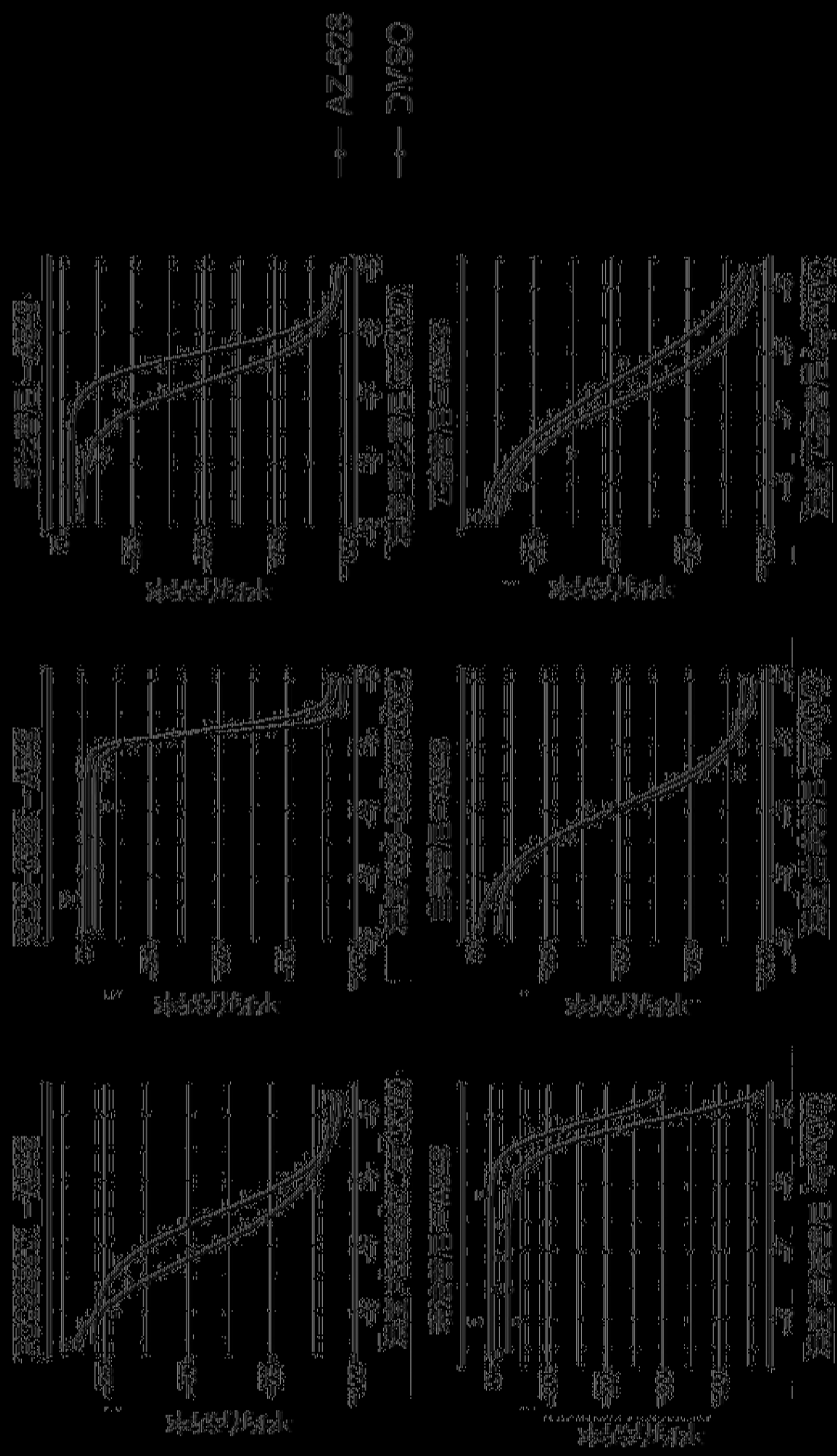
如請求項 25 之套組，其中該等試劑包含用於使 NRAS 基因之全部或一部分擴增之第一寡核苷酸及第二寡核苷酸。

【請求項 27】

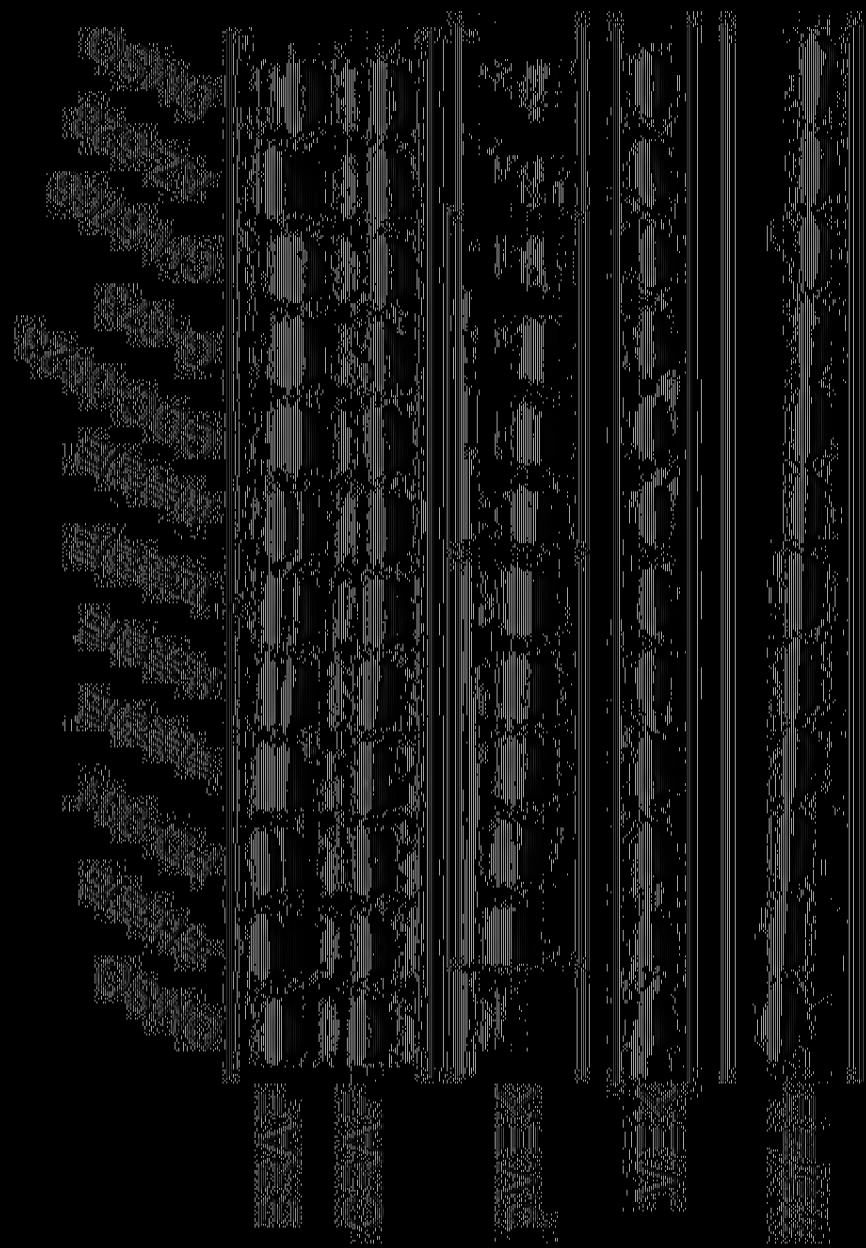
一種分析(assay)，其用於鑑別可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之患有癌症之個體，該分析包含對來自該個體之試樣進行 NRAS 活化突變篩選，其中該試樣中存在 NRAS 活化突變則將該個體鑑別為可受益於包含 pan-RAF 二聚體抑制劑及 MEK 抑制劑之治療之個體，其中該 pan-RAF 二聚體抑制劑為 HM95573 (GDC-5573)或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該 MEK 抑制劑為考比替尼(cobimetinib)或其醫藥學上可接受之鹽。



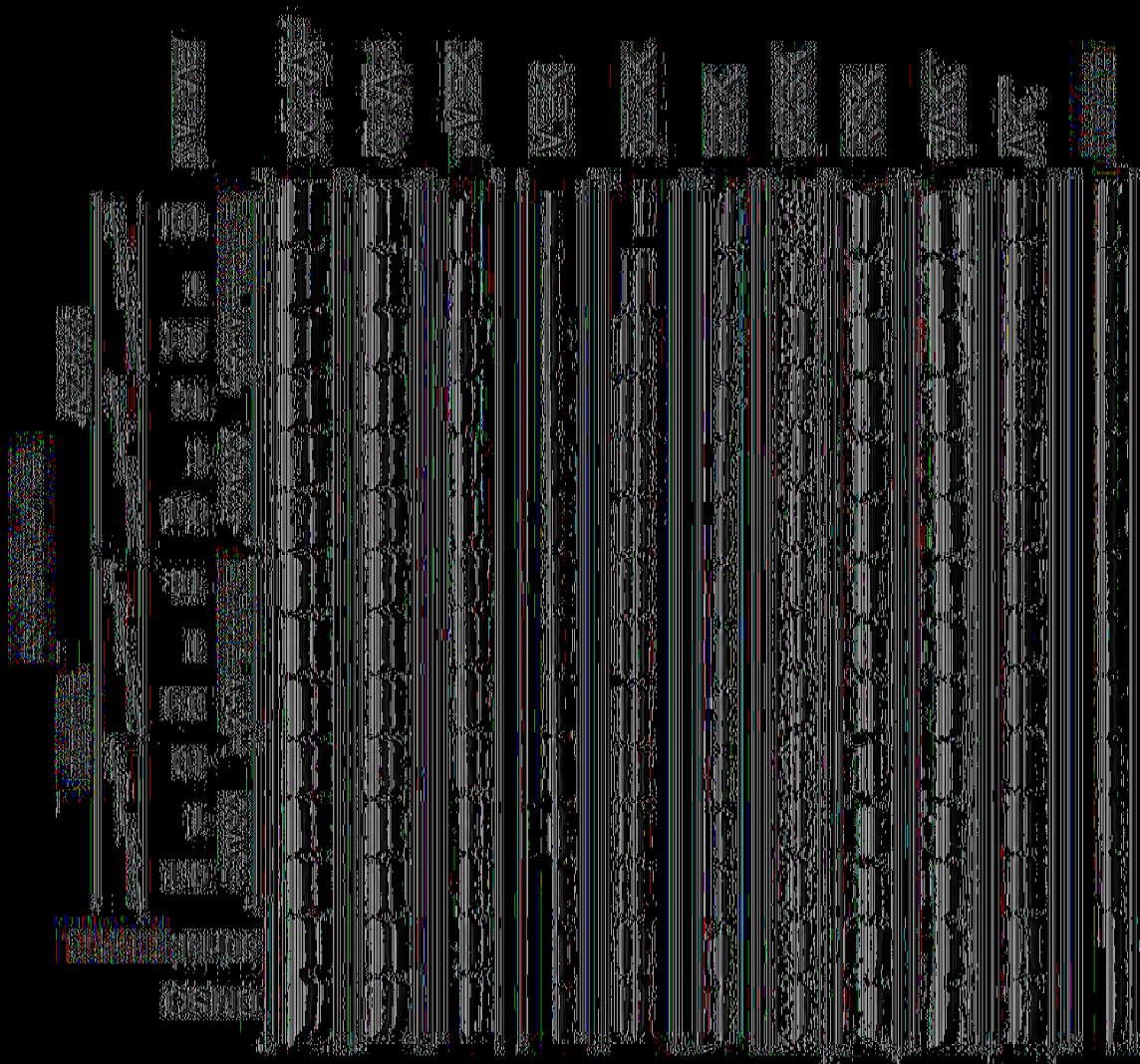
【圖 13】



【圖 12】

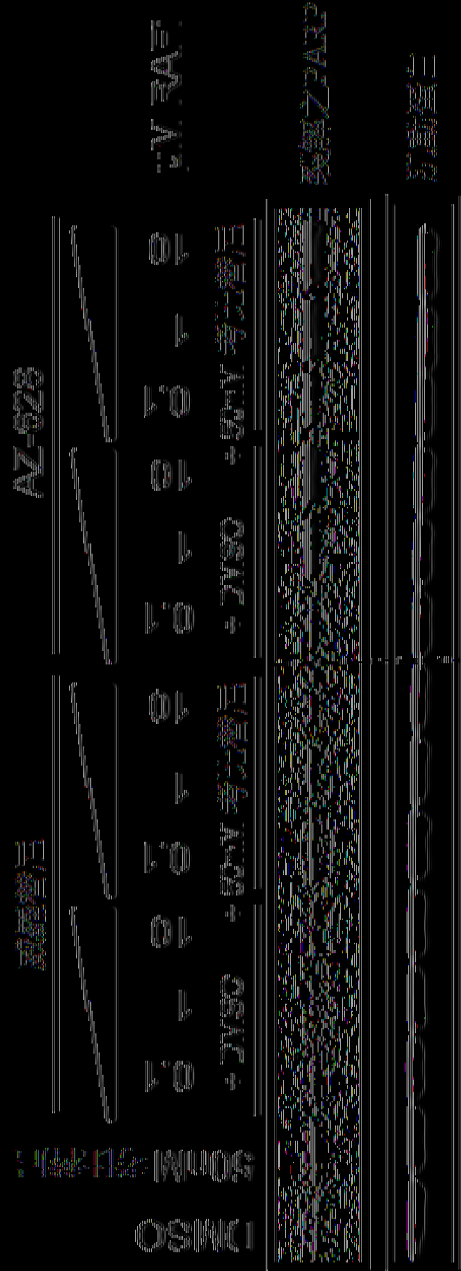


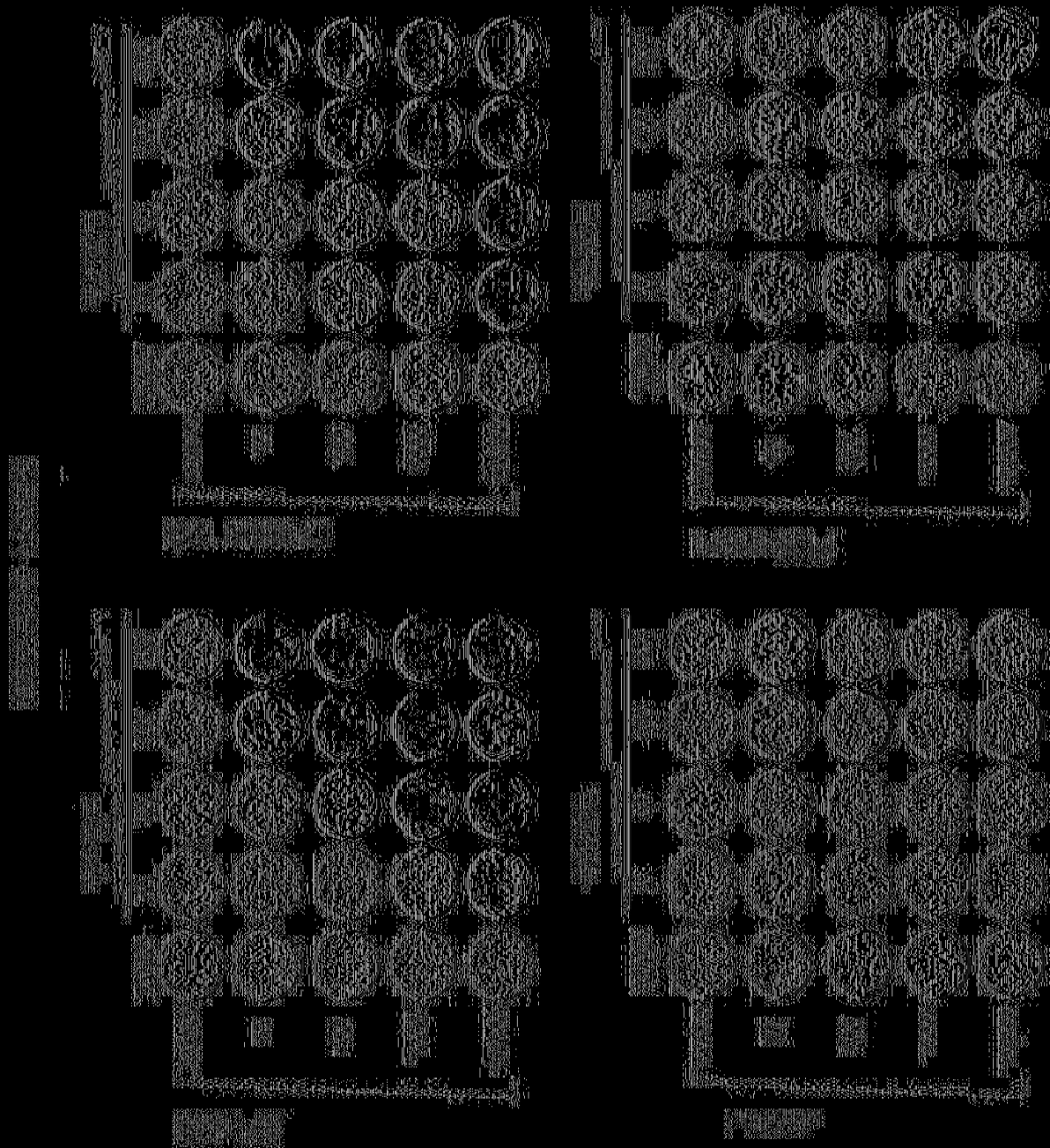
【圖 1】



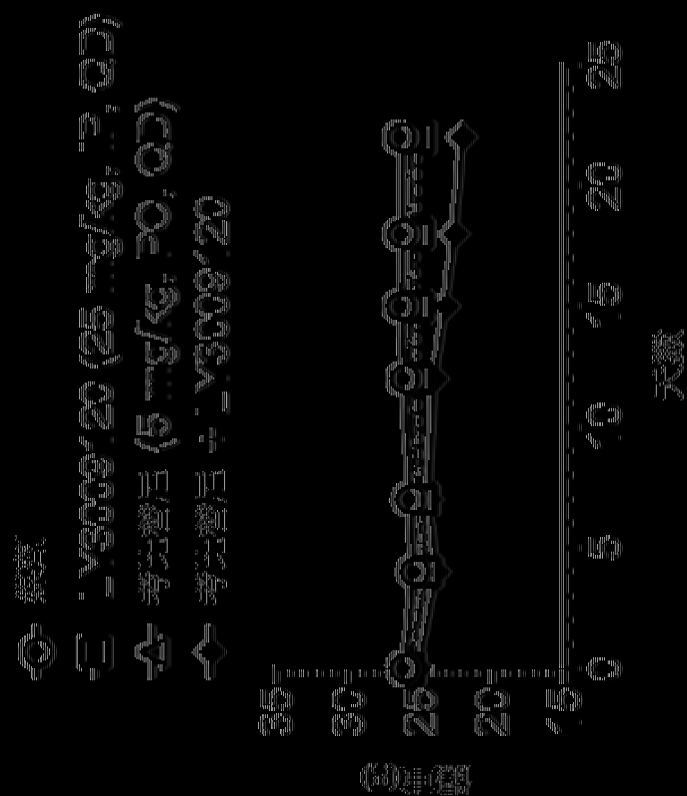
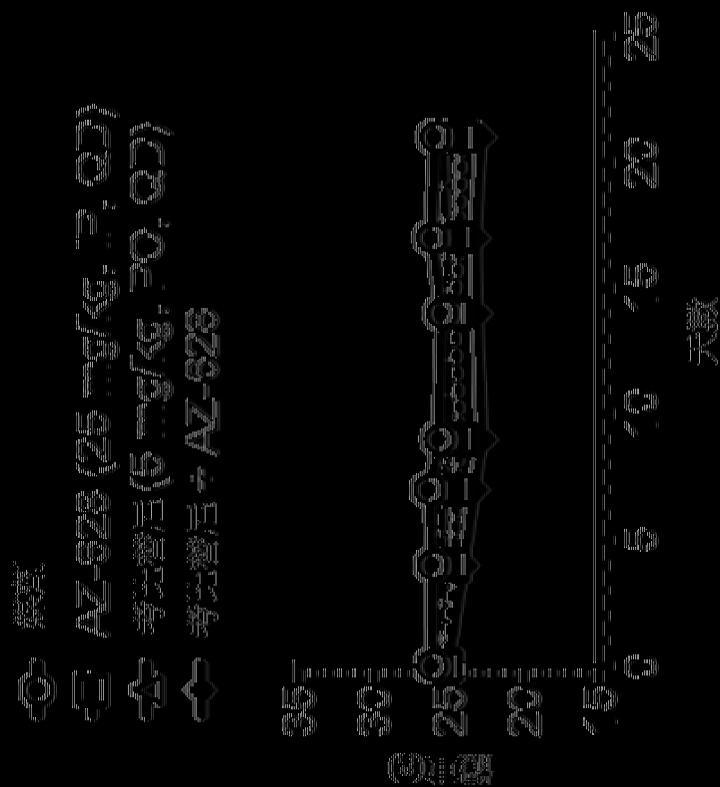
【圖 23】

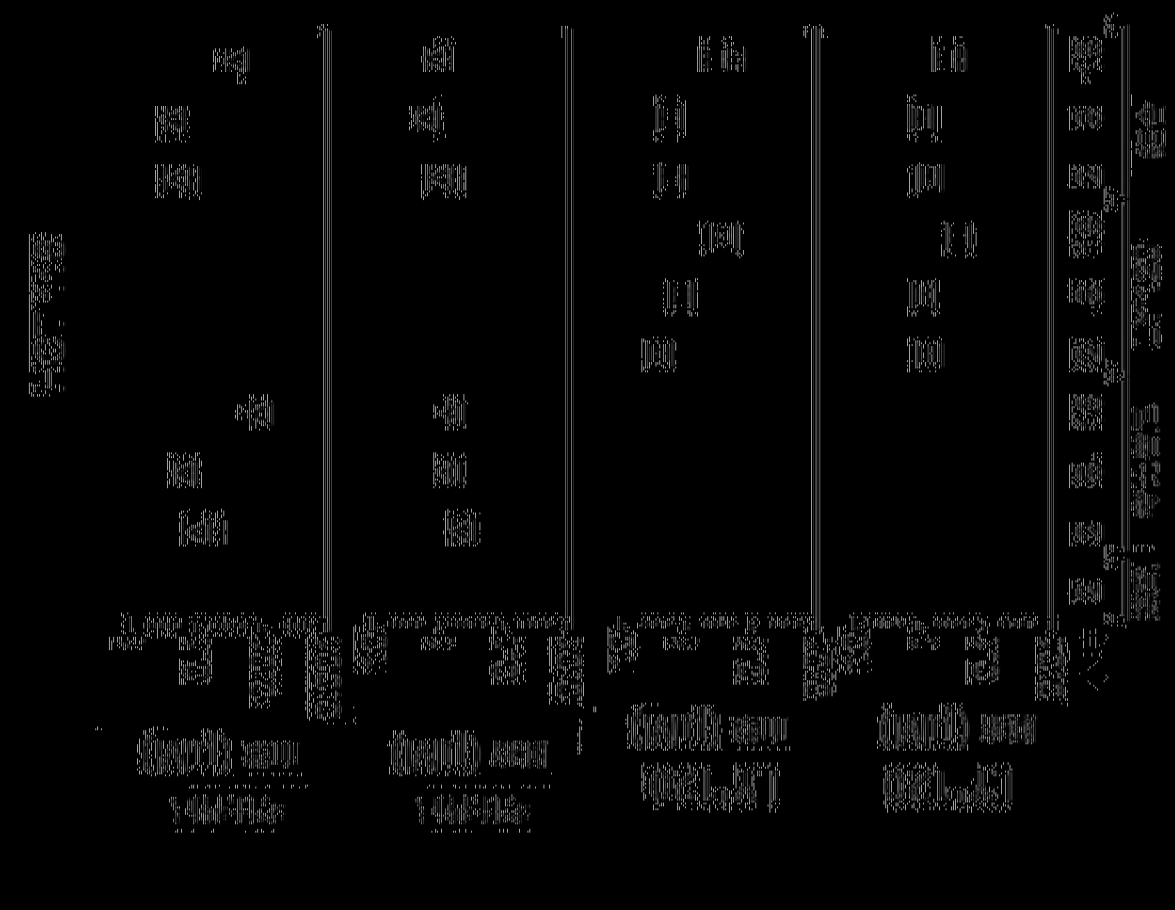
A5496細胞(48人試)



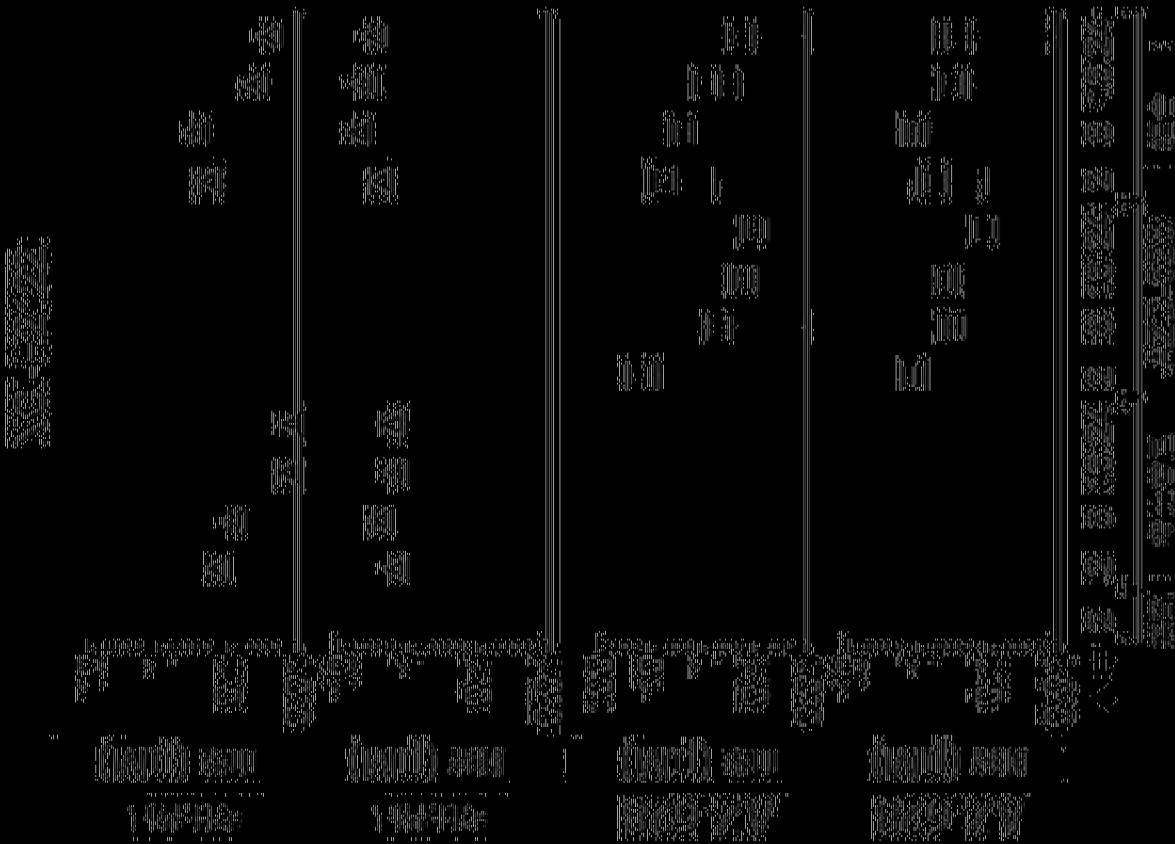


【圖 23】

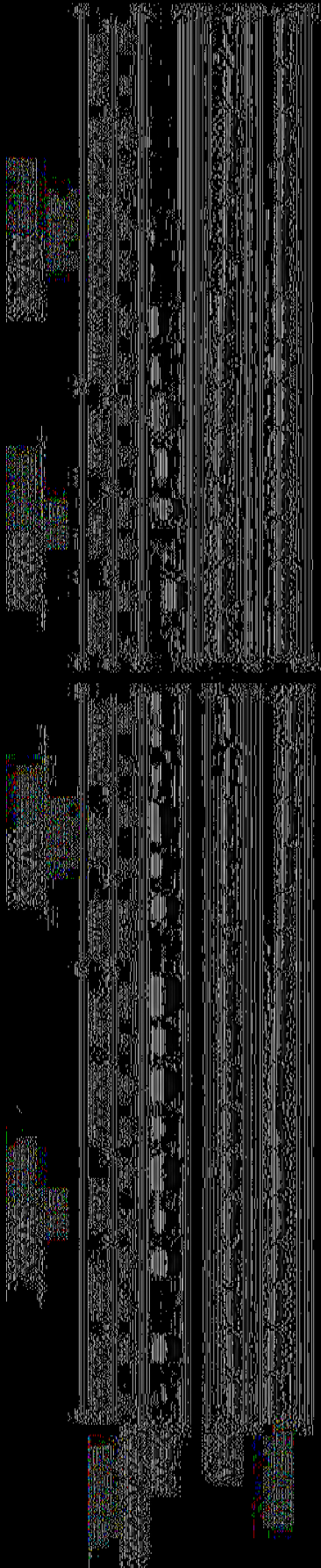




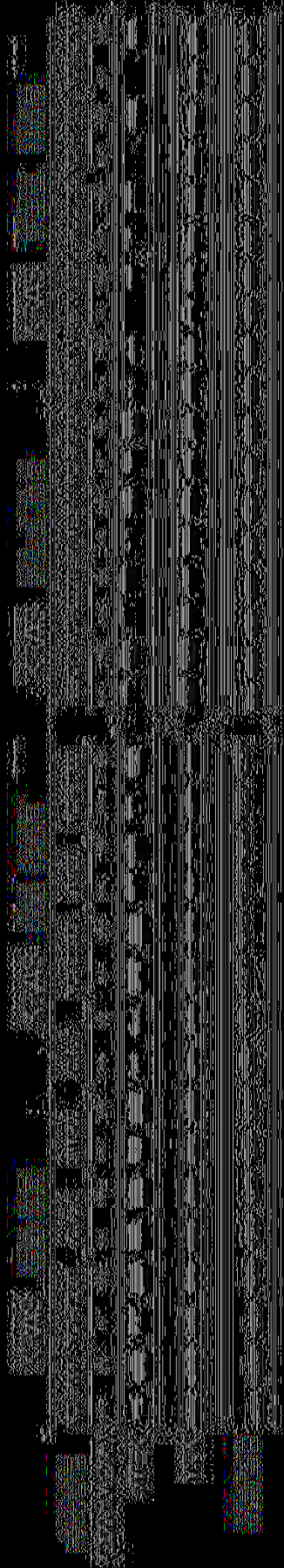
【圖3D】



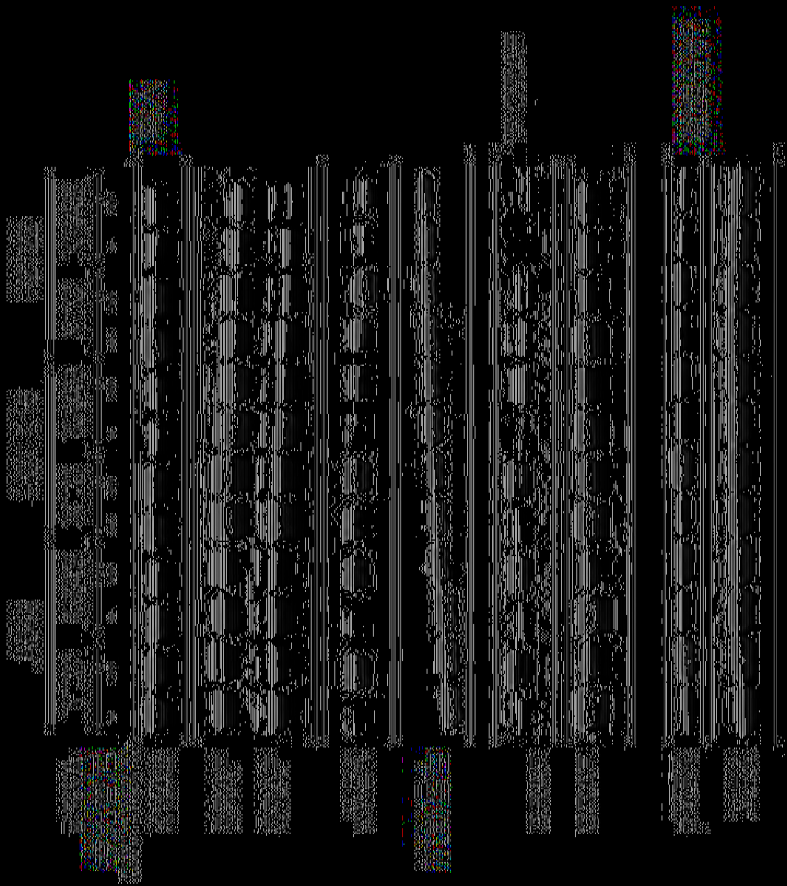




【圖 43】



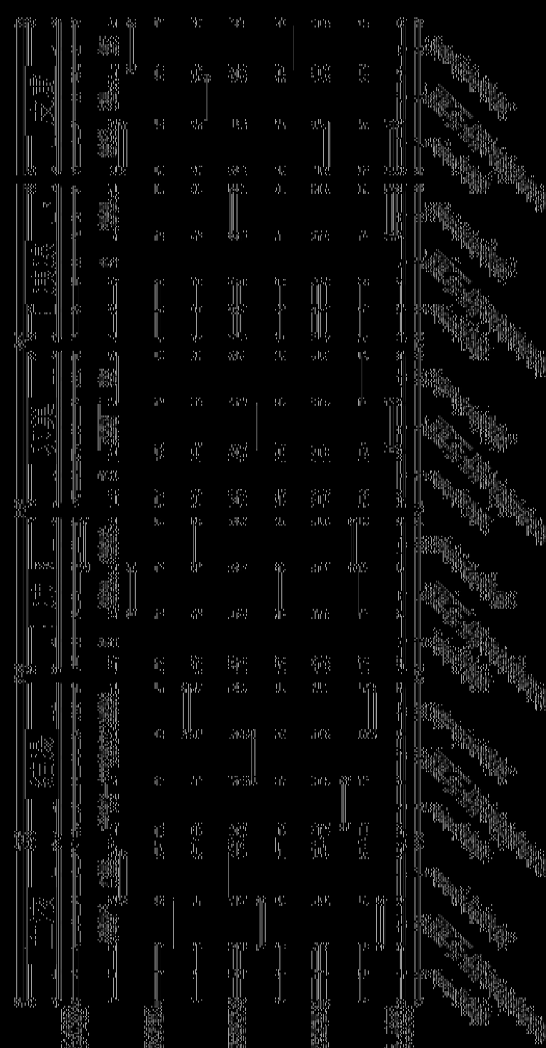
【圖 44】



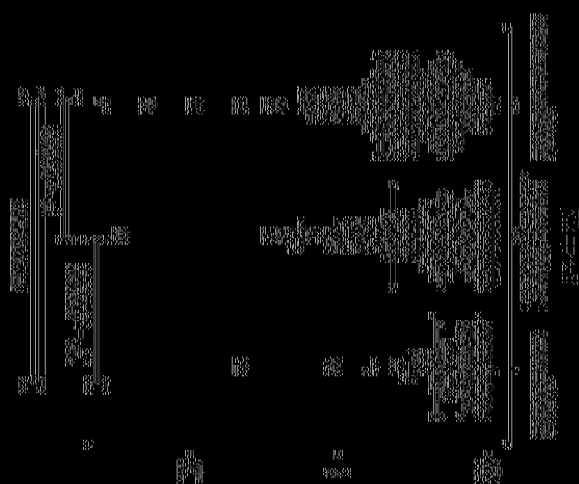
【圖 27】

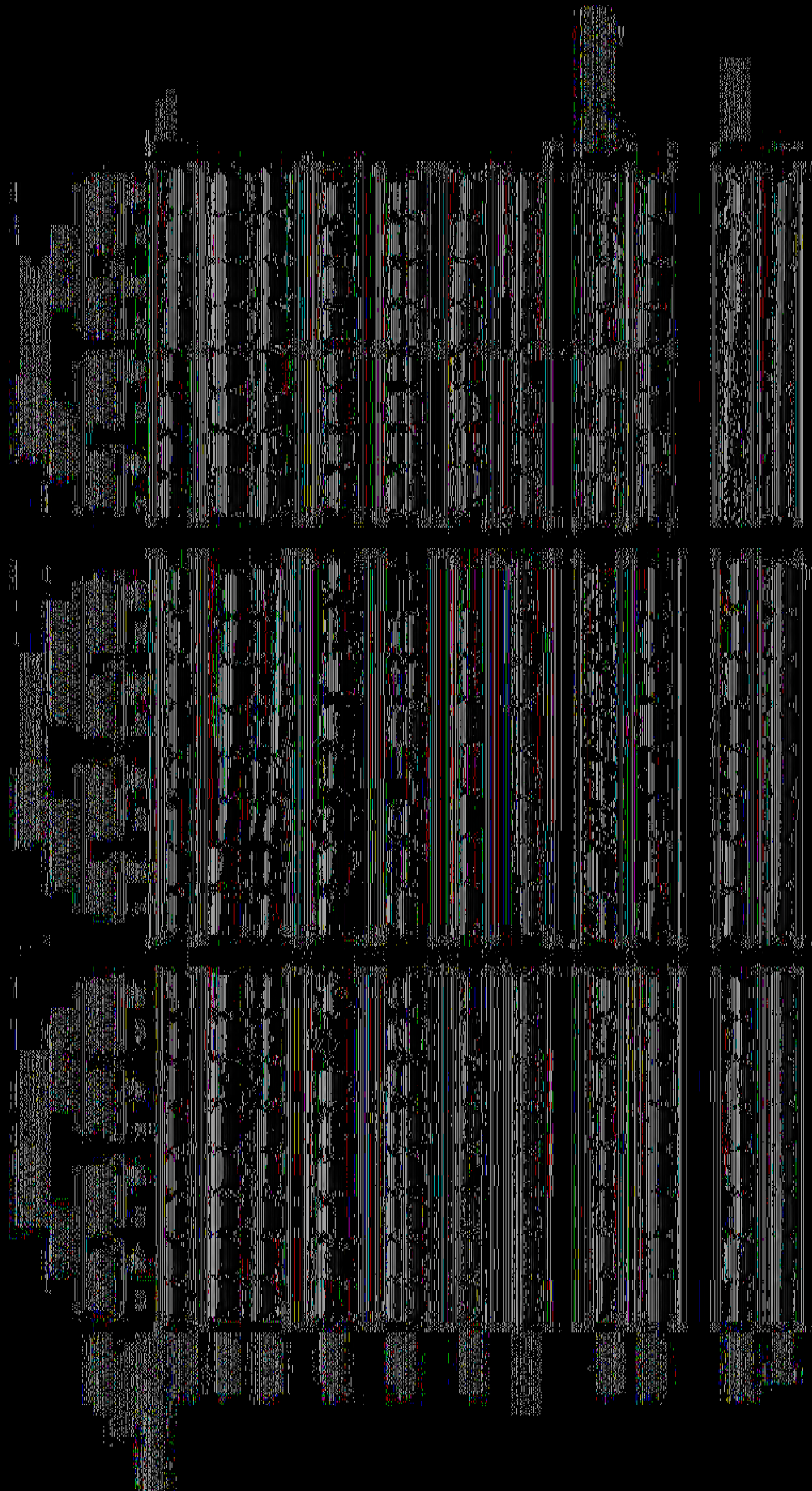


【圖 28】

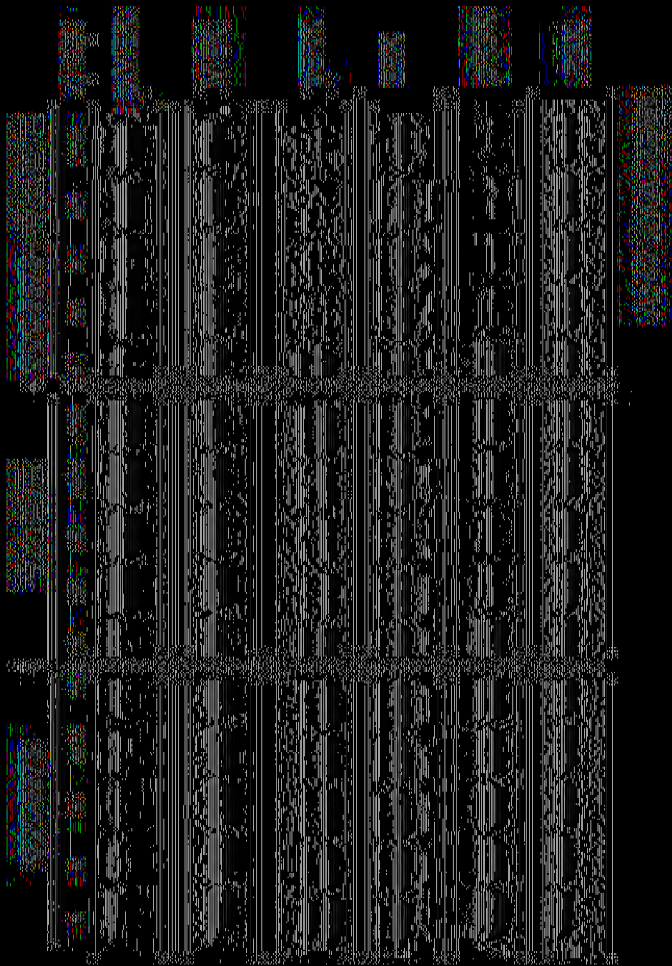


[5A]





【圖 53】



[圖 5C]



[圖 5D]

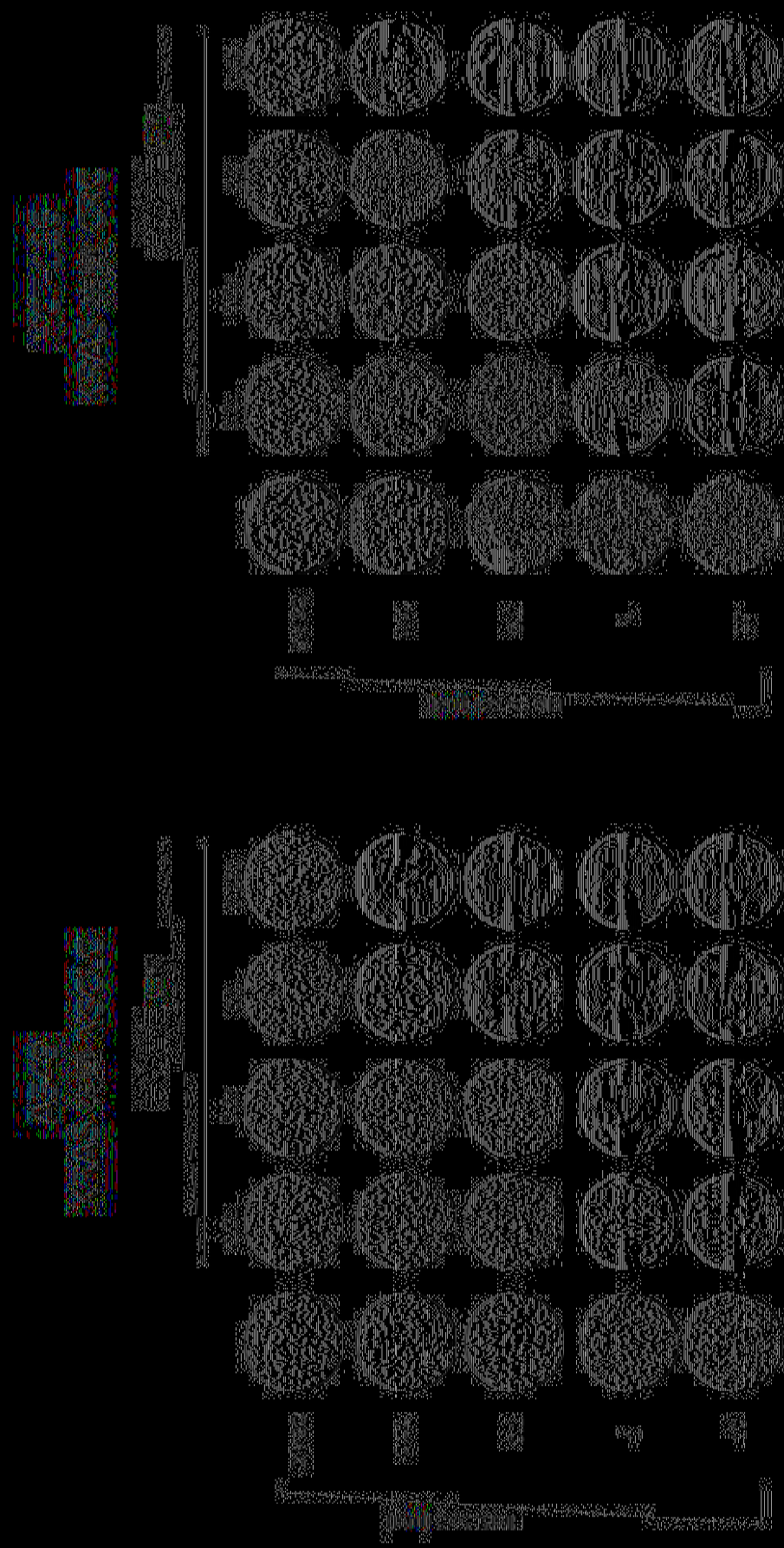
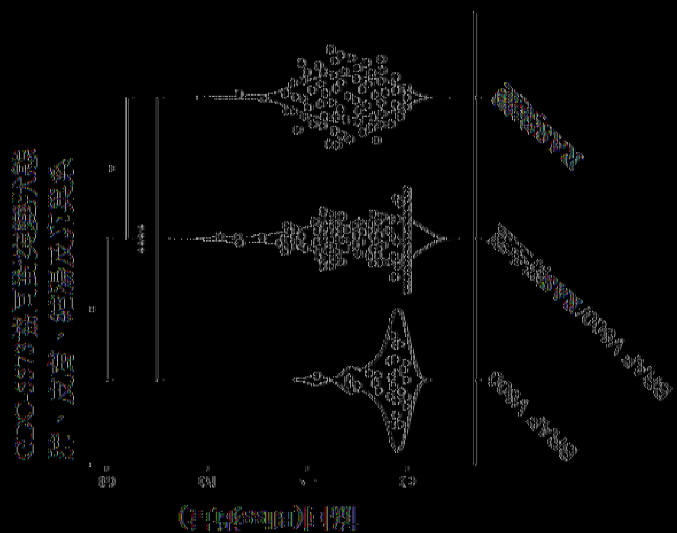


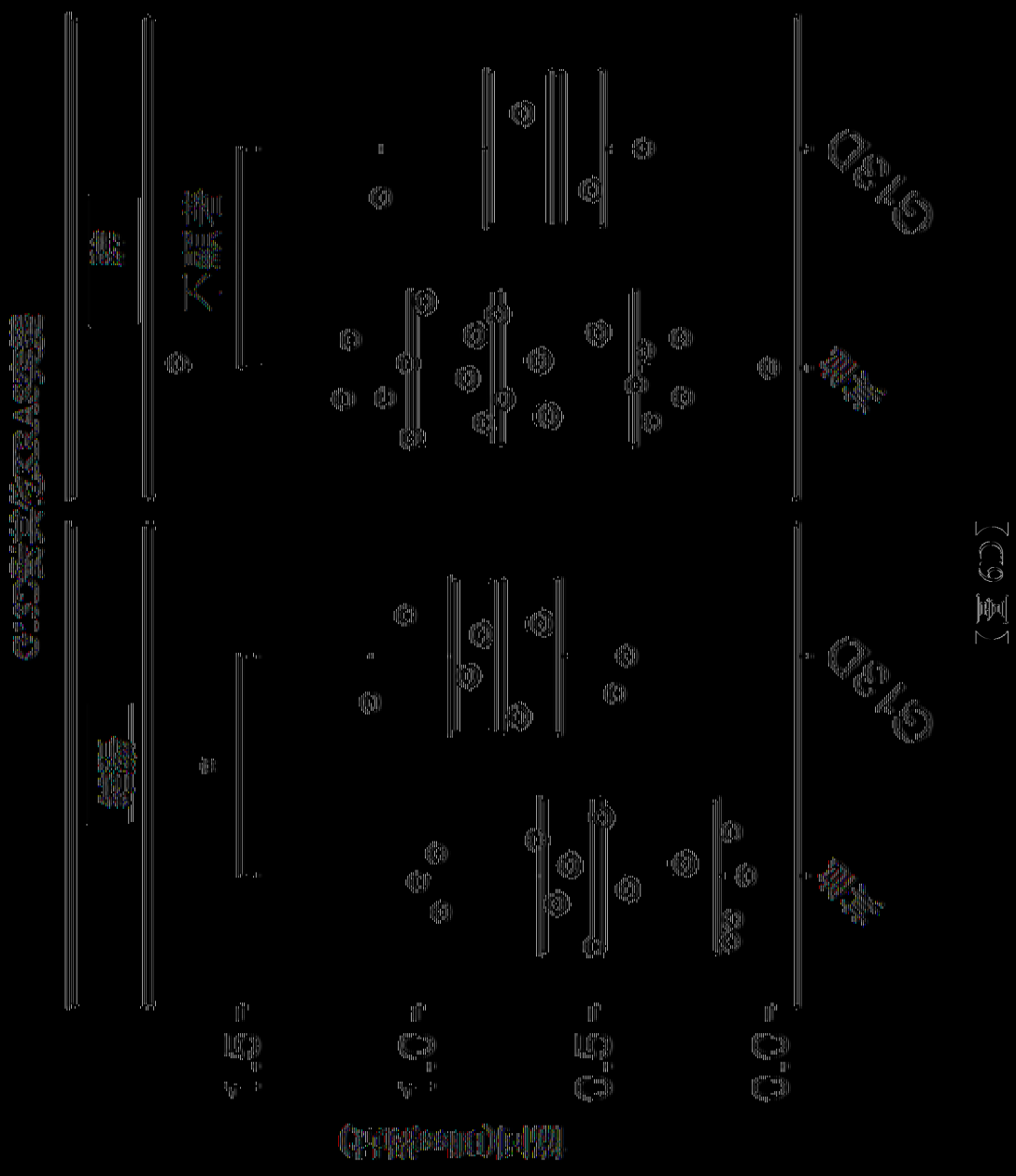
FIG 53



【参考文献】

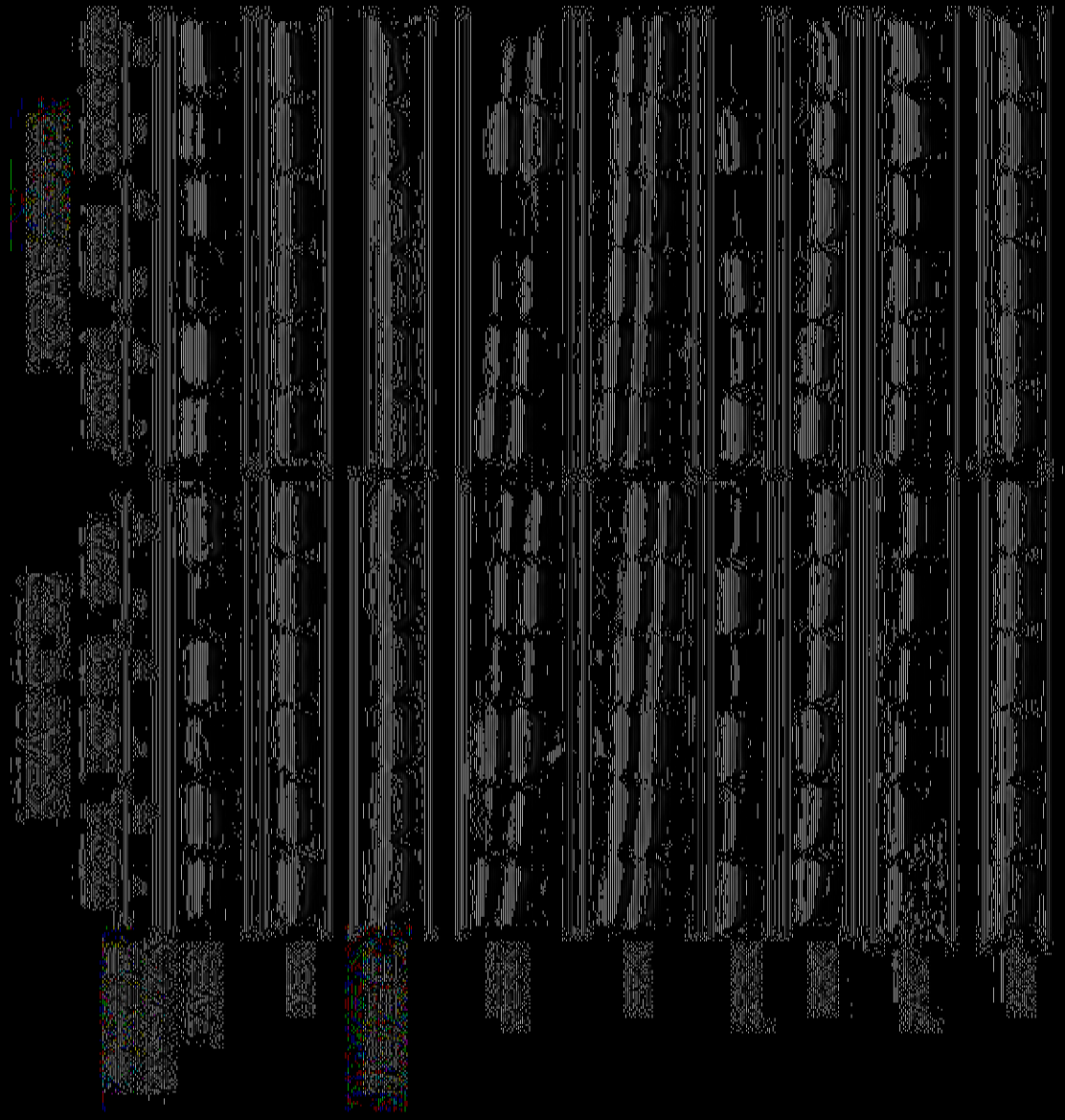
[illegible]

5

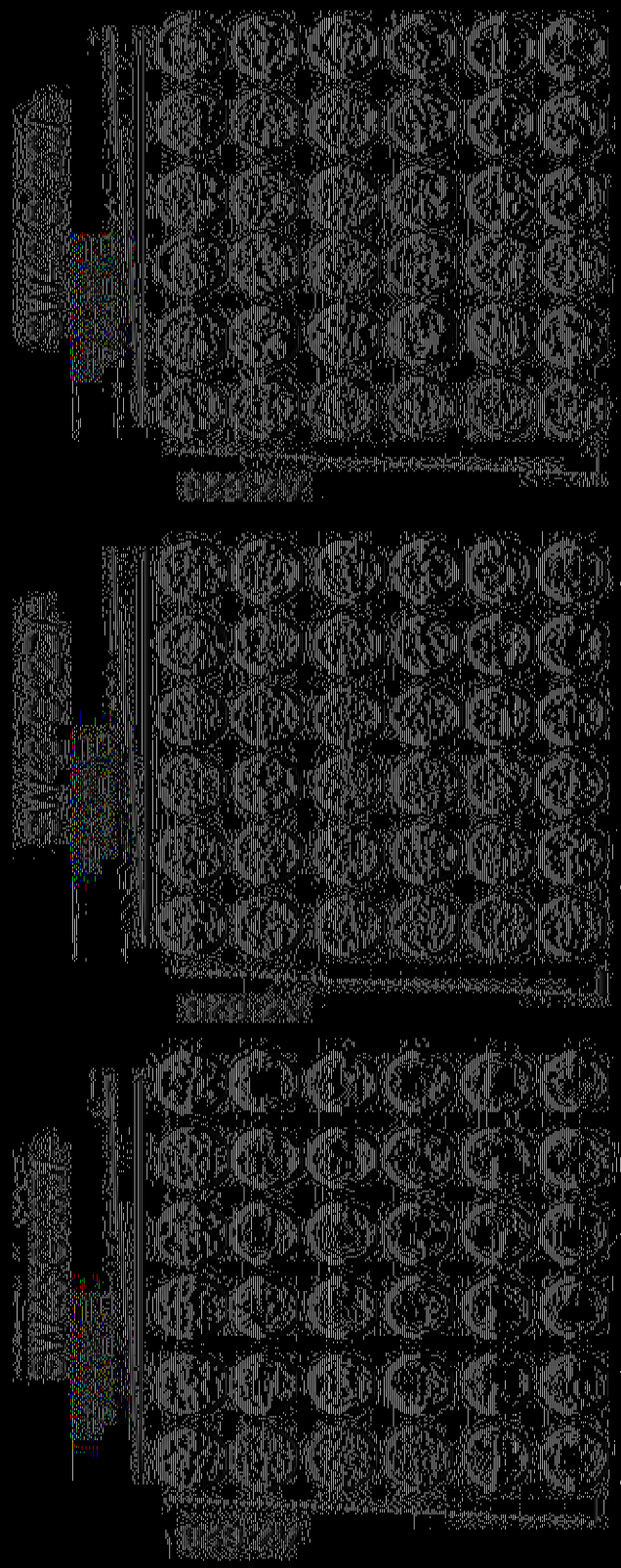


(發明實施例)

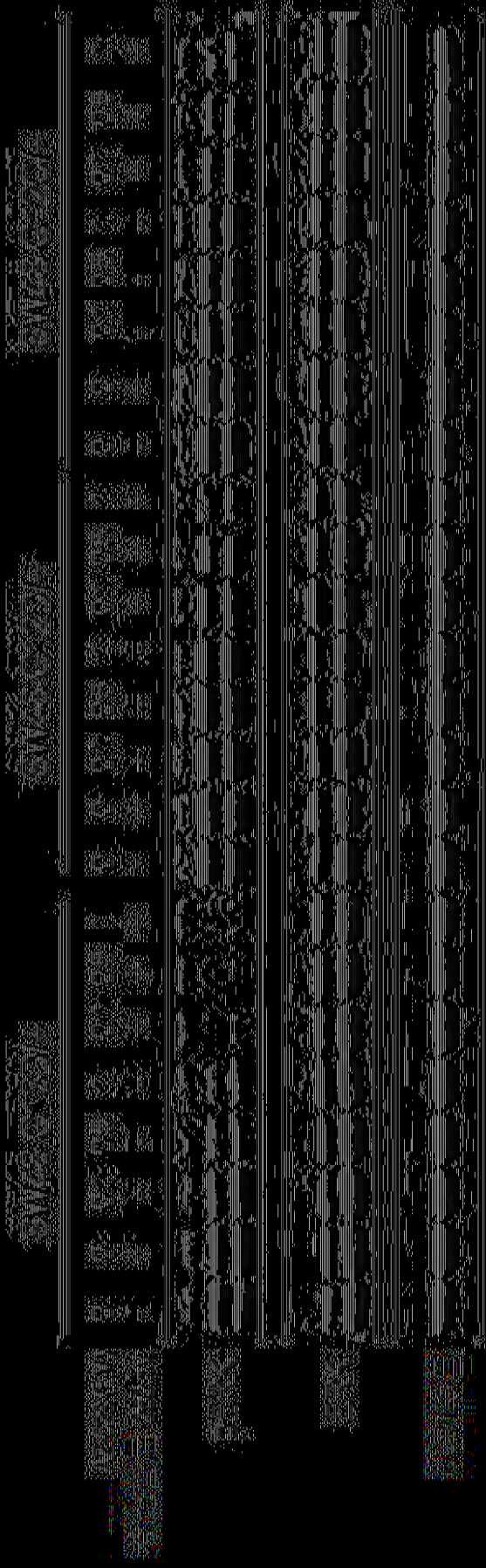
【圖 6C】



【圖 63】



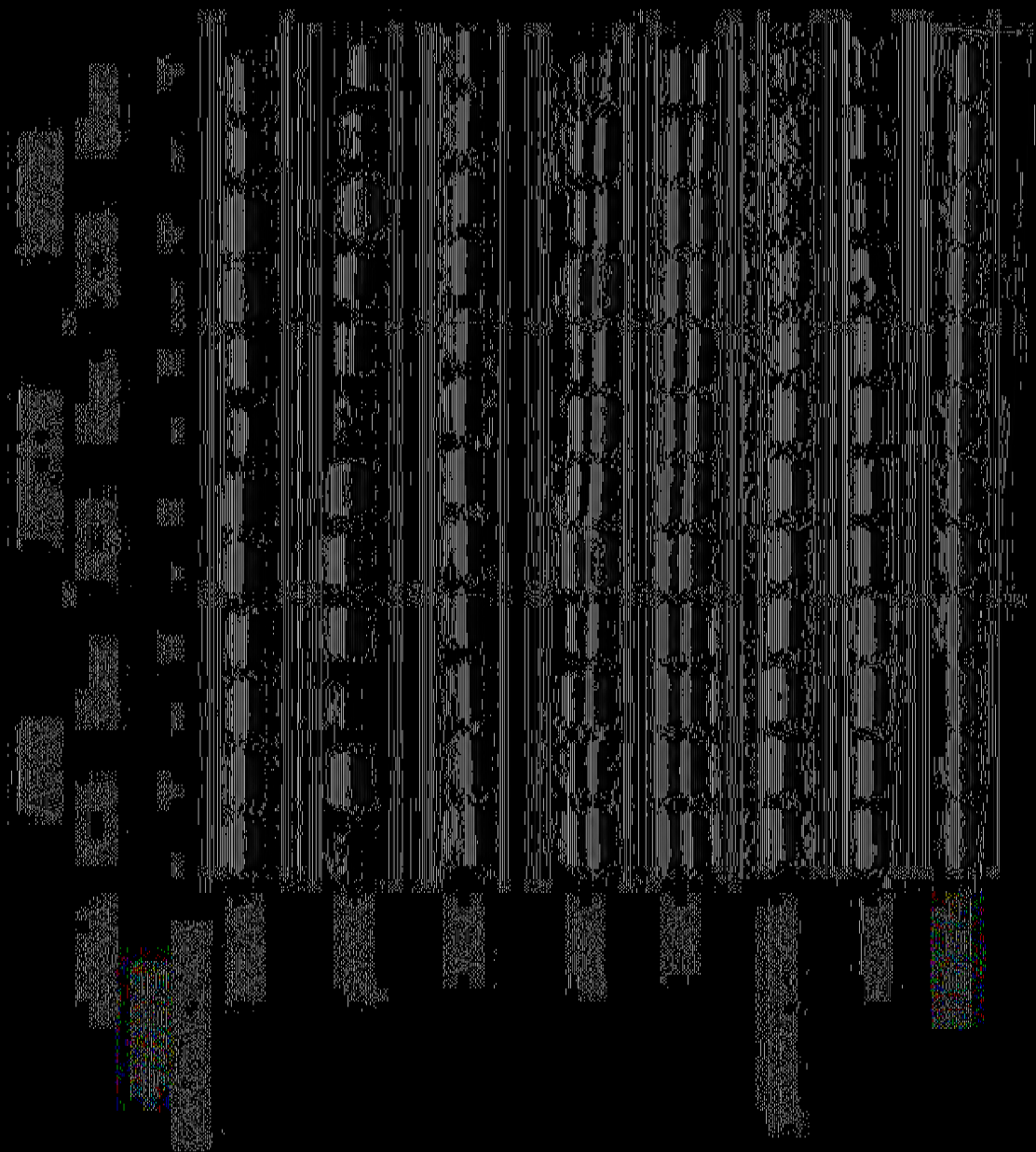
【 图 62 】



【圖 6C】



611



【圖 6X】



【 79 図 】



[圖 73]



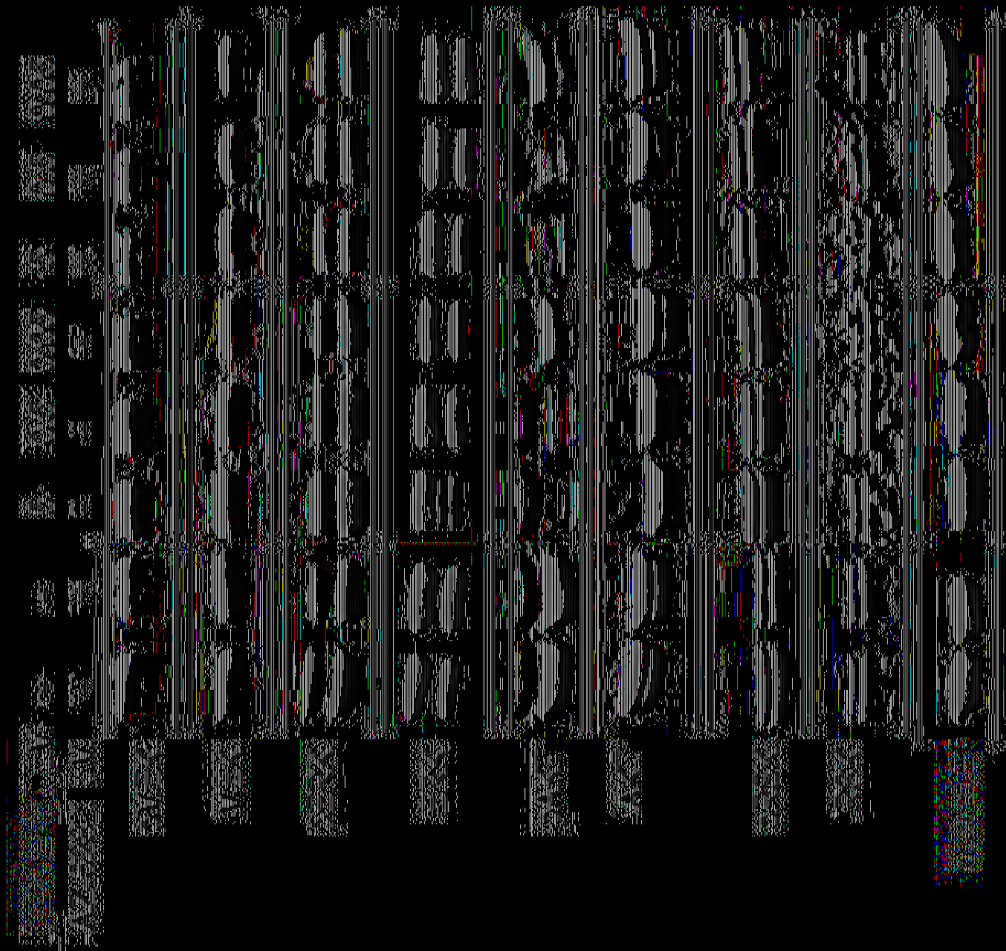
【圖7C】



(a)

(b)

電圧値					電圧値				
10	5	1	0.5	0.1	0	5	0.5	0.1	0.01
RAS-GTP									
RAS									



【圖 7C】

