



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103732226 B

(45) 授权公告日 2016.01.06

(21) 申请号 201280009417.3

*A61K 31/519*(2006.01)

(22) 申请日 2012.02.17

*A61K 45/06*(2006.01)

(30) 优先权数据

*A61P 35/00*(2006.01)

61/444, 581 2011.02.18 US

*A61P 35/02*(2006.01)

61/503, 789 2011.07.01 US

61/503, 785 2011.07.01 US

(56) 对比文件

CN 101932585 A, 2010.12.29, 权利要求 27.

WO 2007047754 A2, 2007.04.26, 全文.

Matthew R Janes 等. Effective and

selective targeting of leukemia cells

using a TORC1/2 kinase inhibitor. 《nature

medicine》. 2010, 第 16 卷 (第 2 期), 205-214.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.08.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/025581 2012.02.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/112847 EN 2012.08.23

审查员 王鑫

(73) 专利权人 诺瓦提斯药物公司

地址 瑞士巴塞尔

专利权人 因西特公司

(72) 发明人 A·M·万努基 C·博加尼

P·古列尔梅利

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

*A61K 31/436*(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页 附图2页

(54) 发明名称

mTOR/JAK 抑制剂组合疗法

(57) 摘要

本文提供包含 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂的组合疗法。所述组合疗法用于治疗多种癌症, 包括 MPN。所述组合疗法也用于治疗多种 JAK- 相关疾病。

1. mTOR 抑制剂和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈或其药学可接受的盐的组合在制备治疗有需要的受试者中癌症的药物中的用途, 其中所述癌症为 JAK2V617F 突变癌症, 和其中所述 mTOR 抑制剂为依维莫司 (RAD001) 或 2-(4- 氨基 -1- 异丙基 -1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶 -3- 基 )-1H- 吡啶 -5- 醇 (PP242)。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述 mTOR 抑制剂和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈在单一的制剂或单位剂量形式中。

3. 权利要求 2 的用途, 其中所述药物还包括药学可接受的载体。

4. 权利要求 1 的用途, 其中所述 mTOR 抑制剂和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈在不同的制剂或单位剂量形式中。

5. 权利要求 1 的用途, 其中所述癌症为骨髓增生性肿瘤。

6. 权利要求 5 的用途, 其中所述骨髓增生性肿瘤选自慢性髓细胞性白血病 (CML)、真性红细胞增多症 (PV)、特发性血小板增多症 (ET)、原发性或特发性骨髓纤维化 (PMF)、慢性中性粒细胞白血病、慢性嗜酸粒细胞性白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、青少年骨髓单核细胞性白血病、嗜酸细胞过多综合征、系统性肥大细胞增多症、和非典型慢性髓性白血病。

7. 权利要求 5 的用途, 其中所述骨髓增生性肿瘤为原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化或特发性血小板增多症后的骨髓纤维化。

8. 权利要求 4-7 中任一项的用途, 其中所述受试者为人类。

9. 权利要求 5-7 中任一项的用途, 其中所述 mTOR 抑制剂和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈或其药学可接受的盐在单一的制剂或单位剂量形式中。

10. 权利要求 5-7 中任一项的用途, 其中所述 mTOR 抑制剂和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈或其药学可接受的盐在不同的制剂或单位剂量形式中。

11. 权利要求 4-7 中任一项的用途, 其中所述 mTOR 抑制剂和 / 或 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈为当所述 mTOR 抑制剂和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈中之一或两者单独给药时不会有效但组合时为有效量的剂量。

12. 依维莫司和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈或其药学可接受的盐的组合在制备治疗有需要的受试者中骨髓增生性肿瘤的药物中的用途。

13. PP242 和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈或其药学可接受的盐的组合在制备治疗有需要的受试者中骨髓增生性肿瘤的药物中的用途。

14. 包含 mTOR 抑制剂和 (3R)-3- 环戊基 -3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶 -4- 基 )-1H- 吡唑 -1- 基 ] 丙腈或其药学可接受的盐的组合物, 其中所述 mTOR 抑制剂为依维莫司 (RAD001) 或 2-(4- 氨基 -1- 异丙基 -1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶 -3- 基 )-1H- 吡啶 -5- 醇 (PP242)。

15. 权利要求 14 的组合物, 还包含药学可接受的载体。

16. 权利要求 14 的组合物在制备治疗有需要的受试者中癌症的药物中的用途, 其中所

述癌症为 JAK2V617F 突变癌症。

17. 权利要求 16 的用途,其中所述癌症为 JAK2V617F 突变骨髓增生性肿瘤。

## mTOR/JAK 抑制剂组合疗法

## [0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2011 年 2 月 18 日提交的美国临时专利申请 61/444, 581、2011 年 7 月 1 日提交的美国临时专利申请 61/503, 789 和 2011 年 7 月 1 日提交的美国临时专利申请 61/503, 785 的优先权, 将其内容以其全部通过引用并入本文。在整个说明书中引用的任何专利、专利申请和参考文献的内容以其全部通过并入本文。

## 背景技术

[0003] 骨髓增生性肿瘤 (MPN) 是一组引起骨髓中血细胞 (血小板、白血细胞和红细胞) 过量生成的病症。MPN 包括真性红细胞增多症 (PV)、原发性或特发性血小板增多症 (ET)、原发性或特发性骨髓纤维化、慢性髓性 (髓细胞性) 白血病 (CML)、慢性中性粒细胞白血病 (CNL)、青少年骨髓单核细胞性白血病 (JML) 和慢性嗜酸粒细胞性白血病 (CEL)/嗜酸性粒细胞增多症 (HES)。将这些病症分类在一起, 因为它们共有下列要素的一些或全部: 涉及多能造血祖细胞, 相对于非转化的造血祖细胞而言主导转化克隆, 在不存在可定义的刺激物下过量生成一种或多种造血谱系, 在体外生长因子-非依赖性集落形成, 髓细胞过多, 巨核细胞增生且发育异常, 主要涉及染色体 1、8、9、13 和 20 的异常, 血栓形成和出血性疾病 (diatheses)、骨髓外造血旺盛 (exuberant) 和自发转化为急性白血病或与 CML 中的比率相比但在低比率下产生髓纤维化。MPN 的发病率变化范围很大, 从对 CML 而言每年每 100, 000 名 60 岁以上的个体中约 3 例到对 JML 而言每年每 100, 000 名出生到 14 岁的儿童中 0.13 例 (Vardiman JW et al., Blood 100 (7): 2292-302, 2002)。

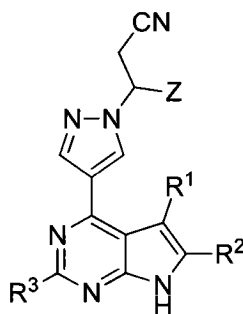
[0004] 因此, 对 MPN 以及其它癌症的新疗法仍然存在需求。

## [0005] 发明简述

[0006] 本文提供一种包括 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂的组合疗法。所述组合疗法可用于治疗多种癌症, 包括 MPN。所述组合疗法也可用于治疗多种 JAK- 相关疾病。

[0007] 因此, 在一个方面, 本文提供一种包括 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂的组合疗法。在一个实施方式中, JAK 抑制剂具有式 I 列出的通式或其立体异构体、互变异构体、消旋体、溶剂化物、代谢物或药学可接受的盐:

[0008]



(I)

[0009] 在另一个方面, 本文提供包含 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂的组合物。在一个特定实

施方式中,式 I 的化合物为 (3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-1H-吡啶-1-基]丙腈(化合物 A)或其药学可接受的盐。

[0010] 在另一个实施方式中, JAK 抑制剂为 5-氯-N<sup>2</sup>-[(1S)-1-(5-氟咪啉-2-基)乙基]-N<sup>4</sup>-(5-甲基-1H-吡啶-3-基)-咪啉-2,4-二胺(AZD1480)或其药学可接受的盐。

[0011] 在另一个实施方式中, mTOR 抑制剂为依维莫司(RAD001)或 2-(4-氨基-1-异丙基-1H-吡啶并[3,4-d]咪啉-3-基)-1H-吡啶-5-醇(PP242)。

[0012] 在一个特定的实施方式中,所述组合疗法包括依维莫司、和化合物 A 或其药学可接受的盐。在另一个特定实施方式中,组合疗法包括 PP242、和化合物 A 或其药学可接受的盐。

[0013] 在本文提供的组合疗法的一个实施方式中, mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂(例如式 I 的化合物(例如化合物 A 或其药学可接受的盐))在单一的剂型或单位剂量形式中。单一的剂型或单位剂量形式可以进一步包含药学可接受的载体。在另一个实施方式中,将 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂分开给药。

[0014] 本文提供的组合疗法可用于治疗受试者中 JAK-相关疾病。因此,在一个方面,本文提供一种治疗有需要的受试者中癌症的方法,其包括向受试者给药有效量的 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂(式 I 的化合物(例如,化合物 A 或其药学可接受的盐))。在一个实施方式中,癌症为骨髓增生性肿瘤。可以使用本发明的组合疗法来治疗骨髓增生性肿瘤的非限制性实例包括,但不限于慢性髓细胞性白血病(CML)、真性红细胞增多症(PV)、特发性血小板增多症(ET)(essential thrombocythemia)、原发性或特发性骨髓纤维化(PMF)、慢性中性粒细胞白血病、慢性嗜酸粒细胞性白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、青少年骨髓单核细胞性白血病、嗜酸细胞过多综合征、系统性肥大细胞增多症、和非典型慢性髓性白血病。在另一个实施方式中,所述组合疗法可用于治疗中等或高危险的骨髓纤维化,包括原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的(post-polycythemia vera)骨髓纤维化或特发性血小板增多症后的(post-essential thrombocythemia)骨髓纤维化。

[0015] 在这些治疗方法的一个实施方式中,受试者为人类。在另一个实施方式中,治疗包括共同给药 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂(例如式 I 的化合物(例如,化合物 A 或其药学可接受的盐))。在另一个实施方式中, mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂(例如式 I 的化合物(例如化合物 A 或其药学可接受的盐))在单一的剂型或单位剂量形式中。mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂(例如式 I 的化合物(例如化合物 A 或其药学可接受的盐))可以在分开的剂型或单位剂量形式中。在还另一个实施方式中,治疗包括基本上同时或不同时给药 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂(例如式 I 的化合物(例如,化合物 A 或其药学可接受的盐))。在所述方法的另一个实施方式中,向受试者给药 mTOR 抑制剂,接着给药 JAK 抑制剂(例如式 I 的化合物(例如化合物 A 或其药学可接受的盐))。在还另一个实施方式中,向受试者给药 JAK 抑制剂(例如式 I 的化合物(例如化合物 A 或其药学可接受的盐)),接着给药 mTOR 抑制剂。在所述方法的另一个实施方式中, mTOR 抑制剂和/或 JAK 抑制剂(式 I 的化合物(例如化合物 A 或其药学可接受的盐))以如下量给药:当单独给药 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂(式 I 的化合物(例如化合物 A 或其药学可接受的盐))中之一或两者时不会有效的量,但该量在组合时有效。

[0016] 本文提供的组合疗法也可用于抑制 STAT5 磷酸化。可以在有需要的受试者中抑制

STAT5 磷酸化。在一个实施方式中,抑制受试者中的 STAT5 磷酸化治疗受试者中的骨髓增生性肿瘤。骨髓增生性肿瘤可以选自慢性髓细胞性白血病 (CML)、真性红细胞增多症 (PV)、特发性血小板增多症 (ET)、原发性或特发性骨髓纤维化 (PMF)、慢性中性粒细胞白血病、慢性嗜酸粒细胞性白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、青少年骨髓单核细胞性白血病、嗜酸细胞过多综合征、系统性肥大细胞增多症、和非典型慢性髓性白血病。

[0017] 在另一个方面,本文提供一种治疗骨髓增生性肿瘤的方法,其包括向有需要的受试者给药依维莫司、和化合物 A 或其药学可接受的盐。在另一个方面,本文提供一种治疗骨髓增生性肿瘤的方法,其包括向有需要的受试者给药 PP242、和化合物 A 或其药学可接受的盐。在这些方面的一个实施方式中,骨髓增生性肿瘤为原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化或特发性血小板增多症后的骨髓纤维化。

#### [0018] 附图简要说明

[0019] 图 1A-1E 显示在 SET2 或 HEL 细胞中所选择的 mTOR 抑制剂、JAK1/JAK2 抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂和羟基脲对细胞凋亡和细胞周期的效果。

[0020] 图 2 显示在 SET2 细胞中所选择的 mTOR 抑制剂、JAK1/JAK2 抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂和羟基脲对 mTOR 和 JAK/STAT 信号传导的效果。

#### [0021] 详细说明

[0022] 已经发现给药 mTOR 抑制剂和 JAK 激酶抑制剂 (例如式 I 的 JAK 激酶抑制剂 (例如,化合物 A 或其药学可接受的盐)) 的组合对于治疗受试者中的癌症 (例如骨髓增生性肿瘤 (MPNs)) 提供了令人惊奇的协同作用。这样的方法——两种类型的试剂的组合或共同给药——可以用于治疗患有对目前可获得的疗法没有应答或有抗性的癌症的个体。对于目前可获得的癌症疗法有应答的个体而言,本文提供的组合疗法也可用于改善这种疗法的功效和 / 或降低其副作用。

[0023] 本文使用的一些术语描述如下。本发明的化合物使用标准命名来描述。除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科技术语具有与如本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。

#### [0024] mTOR 抑制剂 / JAK 抑制剂组合

[0025] 本文提供了治疗癌症例如 MPN 的治疗试剂组合及该试剂组合的给药方法。如本文使用的“试剂组合”及类似术语指两类试剂的组合:(1)mTOR 抑制剂和 (2) JAK 抑制剂 (例如式 I 的 JAK 激酶抑制剂 (例如,化合物 A 或其药学可接受的盐))。

[0026] 雷帕霉素的哺乳动物靶点 (通常称为 mTOR) 为调节细胞生长、细胞增殖、细胞运动性、细胞存活、蛋白质合成和转录的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶。mTOR 是多种促有丝分裂信号传导途径的关键媒介物 (intermediary),且在调节正常组织和肿瘤形成过程中的增殖和血管生成中起着重要作用。mTOR 信号传导的过度活跃与肿瘤发生有关,并且在一些肿瘤类型中的研究表明 mTOR 抑制剂的抗增殖和抗血管生成性质可用于癌症治疗。mTOR 存在两种复合物,mTORC1 和 mTORC2。mTORC1 对雷帕霉素类似物 (比如坦罗莫司 (temsirolimus) 或依维莫司) 敏感,而 mTORC2 是极为雷帕霉素 - 不敏感的。在癌症治疗的临床试验中已经或正在评价一些 mTOR 抑制剂。

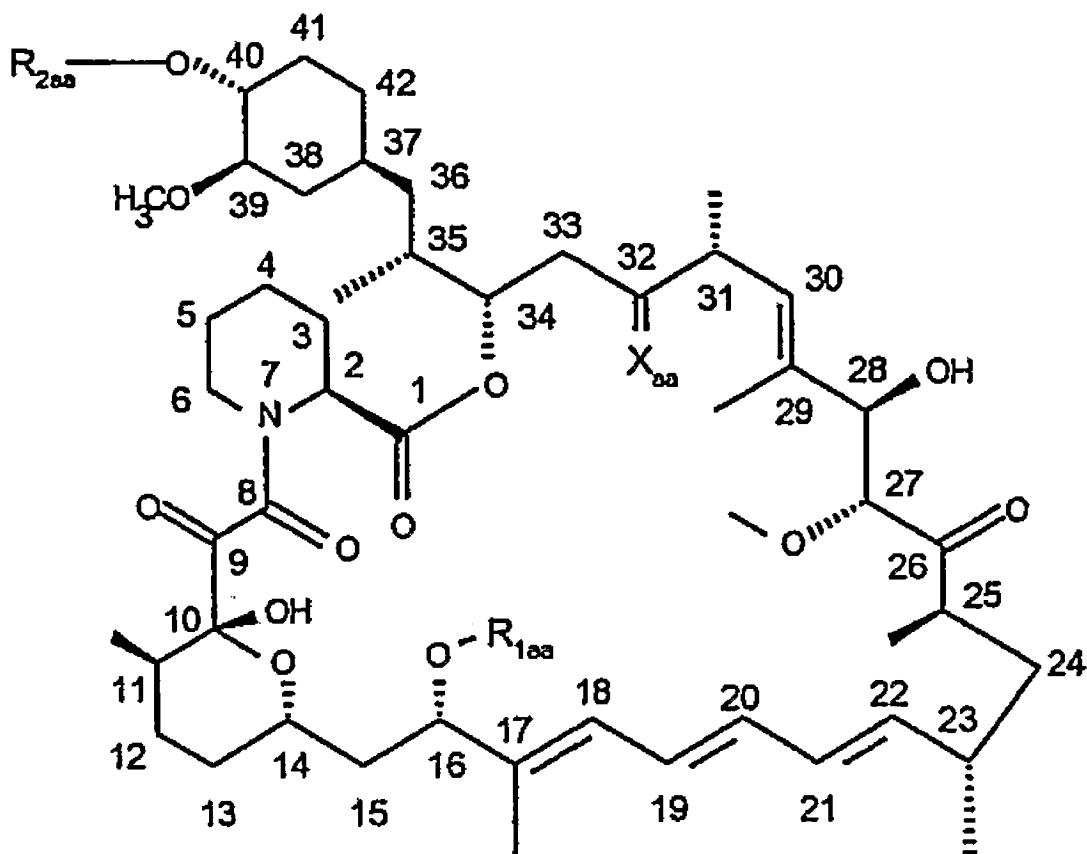
[0027] 如本文使用的术语“mTOR 抑制剂”指抑制 mTOR 的至少一种活性,例如丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶对至少一种其底物 (例如 p70S6 激酶 1、4E-BP1、AKT/PKB 和 eEF2) 的活性的

化合物或配体。本领域技术人员可以容易地确定化合物例如雷帕霉素或其类似物或衍生物是否是 mTOR 抑制剂。鉴定这样的化合物或配体的方法是本领域已知的。mTOR 抑制剂的实例包括,不限于雷帕霉素(西罗莫司)、雷帕霉素衍生物、CI-779、依维莫司(Certican™)、ABT-578、他克莫司(FK506)、ABT-578、AP-23675、BEZ-235、OSI-027、QLT-0447、ABI-009、BC-210、salirasib、TAF A-93、deforolimus(AP-23573)、坦罗莫司(Torisel™)、2-(4-氨基-1-异丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基)-1H-吡啶-5-醇(PP242)和 AP-23841。

[0028] 如本文使用的术语“选择性 mTOR 抑制剂”指抑制 mTOR 活性但不抑制 P13K 活性的化合物或配体。合适的选择性 mTOR 抑制剂包括 RAD001。因此,在一个方面,本文提供包括选择性 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂的组合疗法。

[0029] 雷帕霉素是已知的由吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)生成的大环内脂类抗菌素。合适的雷帕霉素衍生物包括例如式 II 的化合物或其当  $R_{2aa}$  为  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$  时的前药,例如其生理学可水解的醚:

[0030]



## II

[0031] 其中

[0032]  $R_{1aa}$  为  $\text{CH}_3$  或  $\text{C}_3$  炔基,

[0033]  $R_{2aa}$  为 H 或  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基-丙酰基或四唑基,和

[0034]  $X_{aa}$  为  $=\text{O}$ 、(H, H) 或 (H, OH)。

[0035] 式 II 的化合物公开在例如 W094/09010、W095/16691、W096/41807、U. S. 专利号为 5,362,718 和 W099/15530 中,将其通过引用并入本文。它们可以使用在这些参考文献中描

述的方法来制备。

[0036] 代表性的式 II 的雷帕霉素衍生物为例如 32- 去氧雷帕霉素、16- 戊 -2- 炔基氧基 -32- 去氧雷帕霉素、16- 戊 -2- 炔基氧基 -32(S 或 R)- 二氢雷帕霉素、16- 戊 -2- 炔基氧基 -32(S 或 R)- 二氢 -40-0-(2- 羟基乙基)- 雷帕霉素、40-[3- 羟基 -2-( 羟基甲基)-2- 甲基丙酸酯]- 雷帕霉素 (也称为 CCI779) 或 40- 表-(四唑基)- 雷帕霉素 (也称为 ABT578)。雷帕霉素衍生物也可包括所谓的 rapalogs, 例如在 W098/02441 和 W001/14387 中公开的, 例如 AP23573、AP23464、AP23675 或 AP23841。雷帕霉素衍生物的进一步实例为以名称 TAF A-93(雷帕霉素前药)、biolimus-7 或 biolimus-9 公开的那些。

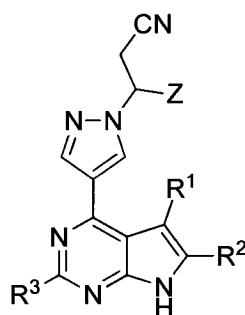
[0037] 在一个优选的实施方式中, 在本文提供的组合疗法中使用的 mTOR 抑制剂为依维莫司 (RAD001) 或 2-(4- 氨基 -1- 异丙基 -1H- 吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 -3- 基 -1H- 咪唑 -5- 醇 (PP242) (参见, 例如 Apsel et al., Nature Chemical Biology 4, 691-699(2008))。

[0038] JAK 家族在参与免疫应答的细胞的增殖和功能的细胞因子 - 依赖性调节中起作用。目前, 存在四种已知的哺乳动物 JAK 家族成员: JAK1 (也称为 Janus 激酶 -1)、JAK2 (也称为 Janus 激酶 -2)、JAK3 (也称为 Janus 激酶, 白细胞; JAKL; L-JAK 和 Janus 激酶 -3) 和 TYK2 (也称为蛋白质 - 酪氨酸激酶 2)。JAK 蛋白质的大小范围为 120 至 140kDa, 且包括 7 种保守的 JAK 同源性 (JH) 结构域; 这些之一是功能性催化激酶结构域, 且另一种是可能提供调节功能和 / 或充当 STATs 的对接位点 (docking site) 的假性激酶结构域 (pseudokinase domain) (Scott, M. J., C. J. Godshall, et al. (2002) Clin Diagn Lab Immunol 9 (6): 1153-9)。

[0039] 如本文使用的“JAK 抑制剂”指抑制 JAK 激酶的至少一种活性的化合物或配体。“JAK 抑制剂”也可以为“JAK1/JAK2 抑制剂”。在某些实施方式中, JAK 抑制剂诱导 JAK- 抑制状态。JAK 抑制剂的实例包括式 I 的化合物和 AZD1480。

[0040] 式 I 的化合物如下定义:

[0041]



(I)

[0042] 或其立体异构体、互变异构体、消旋体、溶剂化物、代谢物或药学可接受的盐,

[0043] 其中

[0044]  $R^1$ 、 $R^2$  和  $R^3$  独立地选自 H、卤素和  $C_{1-4}$  烷基; 和

[0045] Z 为  $C_{3-6}$  环烷基 (例如, 环戊基)。

[0046] 式 I 的化合物的实例包括在美国专利号 7, 598, 257 中描述的化合物, 将其以其全部通过引用并入本文。制备式 I 的化合物 (包括化合物 A) 的方法可以在美国专利号 7, 598, 257 和 PCT 公开 W0/2010/083283 (PCT/US2010/021003) 中找到, 将这两篇以其全部通

过引用并入本文。

[0047] 在一个特定实施方式中,式 I 的化合物为 3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈或其药学可接受的盐。在另一个实施方式中,式 I 的化合物为 (3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(化合物 A)或其药学可接受的盐。在还另一个实施方式中,式 I 的化合物为 (3S)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈或其药学可接受的盐。这些化合物的合成描述在例如美国专利号 7,598,257 和 PCT 公开 WO/2010/083283(PCT/US2010/021003) 中。

[0048] 在另一个实施方式中,式 I 的化合物为 (3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈马来酸盐。在还另一个实施方式中,式 I 的化合物为 (3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈硫酸盐。在再另一个实施方式中,所述化合物具有式 I,为 (3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈磷酸盐(“化合物 A 的磷酸盐”)。这些化合物的合成描述在例如美国专利申请号 12/137,892 中,其以全部通过引用并入本文。

[0049] 在一个实施方式中,本文提供一种组合疗法,其包括化合物 A 的磷酸盐和 mTOR 抑制剂例如依维莫司或 PP242。

[0050] 如本文使用的表述“C<sub>x</sub>-C<sub>y</sub>烷基”(其中 x 为 1-5 且 y 为 2-10) 表示特定碳范围的特定烷基(直链或支链)。例如,表述 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基包括,但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、叔丁基和异丁基。

[0051] 如本文使用的术语“C<sub>3-6</sub>环烷基”指 3-6 个碳原子、优选 5 个碳原子的饱和或不饱和单环或二环烷基。示例性的单环烷基包括,但不限于环丙基、环丁基和环戊基。

[0052] 术语“卤素”或“卤代”指氯、溴、氟和碘基团。

[0053] 试剂可以包含一种或多种不对称元素,比如立体中心或立体轴,例如不对称的碳原子,使得该化合物可以以不同的立体异构形式存在。这些化合物可以为例如消旋体或光学活性形式。对于具有两个或更多个不对称元素的化合物,这些化合物还可以为非对映异构体的混合物。对于具有不对称中心的化合物,应当理解涵盖了所有的光学异构体及其混合物。此外,具有碳-碳双键的化合物可以以 Z- 和 E- 形式存在;该化合物的所有异构形式都包括在本发明中。在这些情形中,可以通过不对称合成、从光学纯前体合成或消旋体的拆分获得单一对映异构体(光学活性形式)。消旋体的拆分也可以通过例如常规方法,比如在拆分试剂的存在下结晶,或使用例如手性 HPLC 柱的色谱法来实现。

[0054] 除非另有说明或本文明确地指示,提及可用于本发明的组合疗法中的化合物包括化合物的游离碱和化合物的所有药学可接受的盐二者。

[0055] 如本文使用的术语“药学可接受的盐”指本发明嘧啶化合物的无毒性酸或碱土金属盐。这些盐可以在嘧啶化合物的最后分离和纯化期间原位制备,或者单独地通过碱或酸官能分别与合适的有机或无机酸或碱反应制备。代表性的盐包括,但不限于下述:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、柠檬酸盐,天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、环戊烷丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、葡庚酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐

(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对-甲苯磺酸盐和十一酸盐。而且,碱性含氮基团可以用如下这样的试剂季铵化,如卤代烷,例如甲基、乙基、丙基和丁基的氯化物、溴化物和碘化物,二烷基硫酸盐如二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐,长链卤化物例如癸基、月桂基、肉豆蔻基和十八烷酰基的氯化物、溴化物和碘化物,芳烷基卤化物如苄基和苯乙基溴化物等。由此获得水或油-可溶性或可分散性产物。

[0056] 可用于形成药学可接受的酸加成盐的酸的实例包括这类无机酸,如盐酸、氢硼酸、硝酸、硫酸和磷酸,以及这类有机酸,如甲酸、乙酸、三氟乙酸、富马酸、酒石酸、草酸、马来酸、甲磺酸、琥珀酸、苹果酸、甲磺酸、苯磺酸和对-甲苯磺酸、柠檬酸,和酸性氨基酸,比如天门冬氨酸和谷氨酸。

[0057] 本文提供一种组合疗法,其包括mTOR抑制剂和JAK抑制剂(例如,式I的JAK抑制剂(例如,化合物A或其药学可接受的盐))。给药所述组合(即,mTOR抑制剂和JAK抑制剂(例如,式I的JAK抑制剂(例如,化合物A或其药学可接受的盐))的组合)包括通过任何合适的途径给药在单一的剂型或单位剂量形式中的组合、同时但分开给药组合中的单独试剂、或顺次给药组合中的单独试剂。组合中单独试剂的剂量可能要求与组合中其他试剂相比更频繁地给药一种试剂。因此,为了允许适当的剂量给药,包装的药物产品可以包含:包含所述试剂的组合的一种或多种剂量形式,和包含所述试剂组合中的一种而非所述组合中的其他试剂的一种或多种剂量形式。

[0058] 如本文使用的术语“单一的剂型”指配制以向患者递送有效量的两种治疗剂的单一的载体(carrier)或媒介(vehicle)。单一的媒介设计成与任何药学可接受的载体或赋形剂一起递送有效量每种试剂。在一些实施方式中,媒介为片剂、胶囊剂、丸剂或贴剂。在其它的实施方式中,媒介为溶液或悬浮液。

[0059] 术语“单位剂量”在本文中用于指在一个剂量形式中将两种试剂一起向待治疗的患者同时给药。在一些实施方式中,单位剂量为单一的剂型。在某些实施方式中,单位剂量包括一个或多个媒介,使得每个媒介包括有效量的至少一种试剂以及药学可接受的载体和赋形剂。在一些实施方式中,单位剂量为同时向患者给药的一个或多个片剂、胶囊剂、丸剂或贴剂。

[0060] 术语“治疗”在本文中用于指缓解、减少或减轻受试者中的疾病的至少一个症状。在本发明的含义之内,术语“治疗”也指阻止、延迟发病(即,在疾病或疾病症状的临床显现之前的时期)和/或降低疾病症状发展或恶化的风险。

[0061] 术语“受试者”旨在包括动物。受试者的实例包括哺乳动物,例如人、狗、牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因非人类动物。在某些实施方式中,受试者为人类,例如患有癌症、处于患有癌症的风险中、或潜在地能患有癌症的人类,所述癌症例如骨髓增生性肿瘤。

[0062] 术语“约”或“接近”通常指在给定值或范围的20%之内,更优选地在10%之内,且最优选仍然在5%之内。或者,尤其是在生物系统中,术语“约”指在给定值的约一个log(即,一个数量级)之内,优选地在给定值的二分之一(a factor of two)。

[0063] 术语“组合疗法”指给药两个或更多个治疗剂以治疗在本文说明书中描述的治疗状况或病症。这样的给药涵盖以基本上同时的方式共同给药这些治疗剂,比如以具有固定

比例活性成分的单一胶囊或对每种活性成分以多个容器或分开的容器（例如胶囊）。此外，这样的给药也涵盖在接近同时或不同时以顺次方式使用每种类型的治疗剂。在任一的情形中，治疗方案将在治疗本文描述的状况或病症中提供药物组合的有益作用。

[0064] 本文描述的试剂的组合显示出协同作用。如本文使用的术语“协同作用”指两种试剂例如 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂（例如式 I 的 JAK 抑制剂）的作用，产生例如减缓癌症或其症状的症状进展的效果，该效果大于给药每种药物本身的效果的简单加合。可以例如使用合适的方法计算协同作用，比如 Sigmoid-Emax 方程式 (Holford, N. H. G. and Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6 :429-453(1981))、Loewe 加合性方程式 (Loewe, S. and Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114 :313-326(1926)) 和中值作用方程式 (Chou, T. C. and Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22 :27-55(1984))。上述指出的各方程式可应用于试验数据，以产生相应曲线，从而帮助评价药物组合的效果。与上述方程式相关的相应曲线分别是浓度 - 效果曲线、等效效应图曲线和组合指数曲线。

[0065] 在一个实施方式中，本文提供包括有效量的 JAK 抑制剂和 mTOR 抑制剂的组合疗法。试剂组合（即，mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂（例如，式 I 的 JAK 抑制剂））的“有效量”为相对于用该组合治疗的病症的临床可观察到的体征和症状的基线，足以提供可观察到的改善的量。

[0066] “口服剂型”包括为规定用于或计划用于口服给药的单位剂量形式。

[0067] 使用 mTOR 抑制剂 / JAK 抑制剂组合的治疗方法

[0068] 本发明提供一种通过向个体给药 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂（例如，式 I 的 JAK 抑制剂）的组合来治疗个体中 JAK- 相关疾病例如癌症，例如骨髓增生性肿瘤的方法。

[0069] 在一个实施方式中，本文提供通过向需要这种治疗的个体给药治疗有效量或治疗有效剂量的本发明的组合或其药物组合物来治疗受试者（例如患者）中 JAK- 相关疾病或病症的方法。JAK- 相关疾病可以包括与 JAK 的表达或活性（包括过表达和 / 或异常的活性水平）直接或间接有关的任何疾病、病症或状况。JAK- 相关疾病也可以包括可以通过调节 JAK 活性预防、改善或治愈的任何疾病、病症或状况。

[0070] JAK- 相关疾病的实例包括涉及免疫系统的疾病，包括例如器官移植排斥反应（例如同种异体移植排斥和移植抗宿主病）。

[0071] JAK- 相关疾病的进一步实例包括自身免疫疾病，比如多发性硬化症、类风湿性关节炎、幼年型关节炎、I 型糖尿病、狼疮、银屑病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、重症肌无力、免疫球蛋白型肾病、自身免疫甲状腺病症等。在一些实施方式中，自身免疫疾病为自身免疫大疱性皮肤病，比如寻常天疱疮 (PV) 或大疱性类天疱疮 (BP)。

[0072] JAK- 相关疾病的进一步实例包括过敏病症，比如哮喘、食物过敏、特应性皮炎和鼻炎。JAK- 相关疾病的进一步实例包括病毒性疾病，比如 Epstein Barr 病毒 (EBV)、乙型肝炎、丙型肝炎、HIV、HTLV1、水痘 - 带状疱疹病毒 (VZV) 和人乳头状瘤病毒 (HPV)。

[0073] JAK- 相关疾病或病症的进一步实例包括皮肤病症，比如银屑病（例如寻常银屑病）、特应性皮炎、皮疹、皮肤刺激、皮肤敏化（例如接触性皮炎或变应性接触性皮炎）。例如，某些物质包括当局部施用时可以引起皮肤敏化的某些药物。在一些实施方式中，通过局部给药所述组合疗法来治疗皮肤病症。

[0074] 在进一步的实施方式中，JAK- 相关疾病为癌症，包括特征如下的那些：实体瘤（例

如前列腺癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、头和颈的癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、卡波济氏肉瘤、Castleman's 病、黑素瘤等)、血液学癌症(例如淋巴瘤、白血病比如急性成淋巴细胞性白血病或多发性骨髓瘤)、以及皮肤癌比如皮肤 T- 细胞淋巴瘤 (CTCL) 和皮肤 B- 细胞淋巴瘤。皮肤 T- 细胞淋巴瘤的实例包括塞扎里综合征和蕈样肉芽肿病。

[0075] JAK- 相关疾病可以进一步包括特征在于突变体 JAK2 的表达的那些, 比如在假性激酶结构域中具有至少一个突变的那些(例如 JAK2V617F)。

[0076] JAK- 相关疾病可以进一步包括骨髓增生性疾病 (MPD), 比如真性红细胞增多症 (PV)、特发性血小板增多症 (ET)、伴有骨髓纤维化的骨髓外化生 (MMM)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病 (CMML)、嗜酸细胞过多综合征 (HES)、系统肥大细胞病 (SMCD) 等。

[0077] 进一步 JAK- 相关疾病包括炎症和炎性疾病。炎性疾病的实例包括眼部的炎性疾病(例如虹膜炎、葡萄膜炎、巩膜炎、结膜炎或相关疾病)、呼吸道的炎性疾病(例如包括鼻和窦的上呼吸道炎性疾病, 比如鼻炎或鼻窦炎, 或下呼吸道炎性疾病, 比如支气管炎、慢性阻塞性肺病等)、炎性肌病比如心肌炎、及其它炎性疾病。

[0078] 本文描述的组合法可以进一步用于治疗缺血再灌注损伤或涉及炎性缺血性事件的疾病或状况, 比如中风或心脏停搏。本文描述的组合法可以进一步用于治疗厌食、恶病质或疲劳, 比如由于癌症产生的或与癌症相关的那些。本文描述的组合法可以进一步用于治疗再狭窄、硬化性皮炎 (sclerodermitis) 或纤维化。本文描述的组合法可以进一步用于治疗与缺氧或星形细胞胶质化 (astrogliosis) 相关的病症, 比如例如糖尿病性视网膜病、癌症或神经退行性疾病。参见, 例如 Dudley, A. C. et al. *Biochem. J.* 2005, 390(Pt2):427-36 and Sriram, K. et al. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(19):19936-47. Epub 2004 Mar 2.

[0079] 慢性骨髓增生性肿瘤 (MPN), 其包括真性红细胞增多症 (PV)、特发性血小板增多症 (ET) 和原发性骨髓纤维化 (PMF), 其特征是在超过 95% 的 PV 和 60% 的 ET 或 PMF 患者中出现 Janus 激酶 2 (JAK2) 外显子 14 中 V617F 点突变。在很少患有 PV 的患者中检测到其它 JAK2 外显子 12 突变, 而在 5-10% 的 ET 或 PMF 患者中已经报道了 MPL 突变 (Vannucchi AM, Guglielmelli, P, Tefferi, A. *Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. AC-A Cancer Journal for Clinicians.* 2009;59:171-191)。这些分子异常全都与 JAK/ 信号传感器组成性活化和转录 (STAT) 激活子信号传导途径有关, 且对于突变体细胞的细胞因子超敏反应和细胞因子非依赖性生长有贡献, 如通过促红细胞生成素 - 非依赖性红细胞集落 (EEC) 所证实的。小鼠中 JAK2V617F- 过表达造血细胞的移植足以概括 PV 表型, 其在某些模型中衍变成骨髓纤维化。也已经在条件敲入小鼠 (conditional knock-in mice) 中获得具有 PV 或 ET 表型的 MPN 病症。JAK/STAT 途径的失调与实体癌和血液学癌症的发展有关, 且组成性活化的 STAT5A 或 STAT5B 突变体 (caSTAT5) 在体外和体内显示出致癌性质。总体来说, JAK2 代表一种潜在有用的 MPN 患者 (同上) 中的治疗靶点, 如在 MPN 鼠科动物模型中的作用和在临床试验中的当前证据所证实的。

[0080] 在 JAK2V617F 突变细胞中也已经证实了通过磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 和胞外信号调节激酶 (ERK) 的其它下游途径的活化。丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 B/Akt 位于 PI3K 的

下游;其是包括细胞存活、增殖和分化的许多细胞过程的关键调节子且通常在癌细胞中失调。尽管 Akt 引起在体外 JAK2V617F 突变细胞和在 V617F 转基因或敲入小鼠中的组成性活化 (Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*. 2010 ;115 :3589-3597), 但是仍然难于表征 PI3K/Akt 信号传导对 MPN 发病机制的贡献。Akt 是响应促红细胞生成素 (EPO) 受体的配体-接触 (ligand-engagement) 而经由 PI3K 磷酸化和活化的,且在正常红细胞分化中具有作用。特别地, Akt 能够通过 EpoR 的下游机制且至少部分地涉及 GATA-1 磷酸化而支持在 JAK2- 缺乏的胎肝祖细胞中的红细胞分化。Akt 引起来自具有有条件的 JAK2V617F 敲入等位基因的小鼠尤其是在 V617F 纯合动物中的骨髓或脾的成红细胞活化。通过 MPN 患者的骨髓尤其在巨核细胞中的免疫细胞化学证实 STAT5 和 Akt 磷酸化可比较地增加。巨核细胞中 Akt 的优先活化可能与在雷帕霉素阻断 mTOR 信号传导之后人巨核细胞祖细胞增殖的强抑制一致。而且, JAK/STAT 或 PI3K/Akt 途径的小分子抑制剂引起培养的 PV 祖细胞中自发和 EPO- 诱发的红细胞分化的可比较的抑制。

[0081] 因此,在某些实施方式中,可以使用本文提供的组合疗法的癌症是骨髓增生性疾病。骨髓增生性疾病 (MPDs), 现在通常称为骨髓增生性肿瘤 (MPN), 属于造血祖细胞的克隆疾病的血液学恶性肿瘤种类。Tefferi, A. 和 Vardiman, J. W., Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms, *Leukemia*, September 2007, 22 : 14-22, 其从而通过引用并入。它们的特征在于改善一个或多个成熟髓系细胞类型的增殖和存活率。该种类包括但不限于慢性髓细胞性白血病 (CML)、真性红细胞增多症 (PV)、特发性血小板增多症 (ET)、原发性或特发性骨髓纤维化 (PMF)、慢性中性粒细胞白血病、慢性嗜酸粒细胞性白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、青少年骨髓单核细胞性白血病、嗜酸细胞过多综合征、系统性肥大细胞增多症、和非典型慢性髓性白血病。Tefferi, A. and Gilliland, D. G., Oncogenes in myeloproliferative disorders, *Cell Cycle*. March 2007, 6 (5) : 550-566, 其从而出于所有目的以其全部通过引用完全并入。

[0082] 在另一个实施方式中,本文提供的组合疗法可用于治疗原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症之后的骨髓纤维化、特发性血小板增多症之后的骨髓纤维化和继发性急性髓性白血病。

[0083] 在另一个实施方式中,本文提供的组合疗法可用于治疗具有中等危险和高危险的骨髓纤维化,包括原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化和特发性血小板增多症后的骨髓纤维化的患者。

[0084] 在一些实施方式中,确定待治疗的受试者(例如人类)对骨髓增生性疾病的一种或多种治疗剂是非应答性或具有抗性的。

[0085] 在一个特定实施方式中,本文提供一种治疗有需要的受试者中骨髓增生性肿瘤的方法,其包括向受试者给药有效量的包括依维莫司、和化合物 A 或其药学可接受的盐的组合物。

[0086] 在一个实施方式中,本文提供 mTor 抑制剂和 JAK 抑制剂在制备治疗癌症的药物中的用途,所述癌症例如骨髓增生性疾病,例如中等危险或高危险的骨髓纤维化,包括原发性

骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化和特发性血小板增多症后的骨髓纤维化。

[0087] 在另一个实施方式中,本文提供一种治疗有需要的受试者中骨髓增生性肿瘤的方法,其包括向受试者给药有效量的包括 PP242 和化合物 A 或其药学可接受的盐的组合物。

[0088] 本文提供通过向患有疾病的个体给药有效量的 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂的复合物来治疗疾病例如骨髓增生性疾病的方法。试剂组合的量是对于治疗疾病有效的。重要的是注意到试剂组合的协同作用:即使以特定剂量单独给药一种或多种试剂可能无效,但是当以各试剂相同剂量组合给药时,治疗是有效的。因此,组合中一种或多种试剂的剂量可以小于各试剂的 FDA 批准剂量。

#### [0089] 剂量

[0090] 对于每位个体,治疗疾病的试剂组合的最佳剂量可以使用已知的方法凭经验确定,并且其取决于多种因素,包括但不限于疾病发展的程度;个体的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药时间和给药途径;及个体服用的其它药物。可以使用本领域熟知的常规测试和方法确定最佳剂量。

[0091] 可与载体物质组合生成单一的剂量形式的试剂组合的量可根据治疗的个体和具体的给药方式改变。在一些实施方式中,包含如本文描述的试剂组合的单位剂量形式将包含当组合中每种试剂单独给药试剂时通常给药的量。

[0092] 剂量频率可以根据使用的化合物和待治疗或预防的具体状况而变化。通常,使用足够提供有效治疗的最小剂量是优选的。通常使用本领域普通技术人员熟知的适用于待治疗或预防状况的化验来监测患者的治疗功效。

[0093] 可以通过药物制剂化学领域技术人员显而易见的常规混合、粉碎和制造技术制备剂量形式。

[0094] 包含试剂组合或试剂组合中独立试剂的口服剂量形式可以为包封在胶囊例如明胶胶囊内的微片剂形式。为此,可以使用应用于药物制剂中的明胶胶囊,比如可以从 Pfizer 获得的称为 CAPSUGEL 的硬明胶胶囊。

[0095] 可用于本文的许多口服剂量形式包含微粒形式的试剂组合或试剂组合的单独试剂。这样的微粒可以压制成片剂,存在于包衣剂量形式比如掩味的剂量形式的核心成分中、压制包衣的剂型或肠溶包衣剂量形式,或者可以包含在胶囊、渗透泵剂量形式或其它剂量形式中。

[0096] 本发明的药物化合物(例如 mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂)以在 100 : 1 至 1 : 100 范围内的比例存在于本文公开的组合、剂量形式、药物组合物和药物制剂中。例如,式 I 的化合物:mTOR 抑制剂的比例可以在 1 : 100 至 1 : 1 范围之内,例如 1 : 100、1 : 90、1 : 80、1 : 70、1 : 60、1 : 50、1 : 40、1 : 30、1 : 20、1 : 10、1 : 5、1 : 2、或 1 : 1 的式 I 的化合物:mTOR 抑制剂。在另一个实例中,mTOR 抑制剂:式 I 的化合物的比例可以在 1 : 100 至 1 : 1 范围内,例如 1 : 100、1 : 90、1 : 80、1 : 70、1 : 60、1 : 50、1 : 40、1 : 30、1 : 20、1 : 10、1 : 5、1 : 2、或 1 : 1 的 mTOR 抑制剂:式 I 的化合物。

[0097] 产生功效而没有毒性的药物化合物的最佳比例、单独的和混合的剂量及浓度是基于活性成分可达到目标位点的动力学,并且使用本领域技术人员已知的方法测定。

[0098] 可以在临床研究中测定本文提供的药物组合物或组合(即,抑制剂和 JAK 抑制剂(例如式 I 的 JAK 抑制剂))。合适的临床研究可以是例如在患有增殖性疾病患者中的开放

标记、剂量递增的研究。这样的研究特别地证实了本发明组合的活性成分的协同作用。可以直接地通过本领域技术人员已知的这些研究结果确定对增殖性疾病的有益效果。这样的研究可以特别地适于比较使用活性成分和本发明组合的单一疗法的效果。在一个实施方式中，mTOR 抑制剂的化合物例如依维莫司 (RAD001) 或 PP242 的剂量递增直到达到最大耐受剂量，并且给药固定剂量的 JAK 抑制剂 (例如，式 I 的 JAK 抑制剂)。或者，可以给药固定剂量的 JAK 抑制剂 (例如，式 I 的 JAK 抑制剂)，并且可以递增 mTOR 抑制剂的剂量。每位患者可以每日或周期性接受化合物的剂量。可以在这样的研究中在例如在 12、18 或 24 周之后通过每 6 周评价症状得分确定治疗功效。

[0099] 与仅仅施用在本发明组合中使用的一种药学活性成分的单一疗法相比，给药本发明的组合疗法不仅可获得有益效果，例如协同治疗效果，例如在减缓症状、延迟症状进展或抑制症状方面，而且可获得其它令人惊奇的有益效果，例如副作用较少、生活质量改善或发病率降低。

[0100] 其他益处可以是可以使用较低剂量的本发明组合的活性成分，例如，剂量通常不仅较小，而且也可施用更少频率，其可减少副作用的出现或严重程度。这与待治疗患者的期望和要求一致。

[0101] 本发明的一个目的是提供一种药物组合物，包含可以是结合靶向或预防癌症例如骨髓增生性疾病的治疗有效的量。在该组合物中，mTOR 抑制剂和 JAK 抑制剂 (例如，式 I 的 JAK 抑制剂) 可以以一个联合单位剂量形式或两个独立单位剂量形式一起、相继或分开给药。单位剂量形式也可以是固定组合。

[0102] 用于分开给药两种化合物或用于以固定组合给药的药物组合物，即含有根据本发明的两种化合物的单一盖仑组合物，可以以本身已知的方式制备，并且是适于肠内比如口服或直肠和肠胃外给药哺乳动物 (恒温动物)、包括人类的组合物，其包含治疗有效量的单独的至少一种例如如上所述的药理学活性组合组分，或同时含有一种或多种药学可接受的载体或稀释剂，尤其是适于肠内或肠胃外应用的载体或稀释剂。

#### [0103] 剂型

[0104] 本文提供的药物组合可以通过对药物制剂领域技术人员显而易见的各种方法配制。上述各种释放性质可以以不同的方式实现。合适的剂型包括例如片剂、胶囊、压制包衣剂型及其它容易给药的剂型。

[0105] 合适的药物剂型可以包含例如约 0.1% 至约 99.9%、优选地约 1% 到约 60% 的活性成分。用于肠内或肠胃外给药的组合疗法的药物剂型为例如单位剂量形式的剂型，比如糖衣片、片剂、胶囊或栓剂、或安瓿剂。如果没有另外指出，这些以本身已知的方式制备，例如，利用常规的混合、造粒、糖包衣、溶解或冻干过程。应当了解包含在各个剂量形式的单独剂量内的组合组分的单位含量本身不必构成有效量，因为可以通过给药多个剂量单位获得所需有效量。

[0106] 特别地，可以同时或顺次且以任何顺序给药治疗有效量的本发明组合中每种组合组分，并且可以分开或以固定组合给药所述组分。例如，根据本发明治疗疾病的方法可以包括同时或以任何顺序顺次、以结合治疗有效量优选协同有效量、例如以对应于本文描述量的每日或间歇性剂量，(i) 给药游离或药学可接受的盐形式的第一种试剂，和 (ii) 给药游离或药学可接受的盐形式的第二种试剂。本发明组合的单个组合组分可以以分开的或单一

的组合形式,在治疗期间的不同时间分开给药或者同时给药。而且,术语给药还涵盖使用如此在体内转化成组合组分本身的组合组分前药。因此,本发明应当理解为涵盖所有这种同时或交替治疗的方案,并且术语“给药”应当依此解释。

[0107] 在本发明的组合中使用的每种组合组分的有效剂量可以根据使用的具体化合物或药物组合物、给药方式、待治疗的状况、待治疗的状况的严重程度而变化。因此,根据包括给药途径和患者的肾脏功能和肝脏功能的各种因素选择本发明组合的剂量方案。具有普通技术的临床医生或医师可以容易地对减缓、对抗或阻止疾病的发展所需的单一活性成分的有效量进行确定和开处方。

[0108] 在本文描述的治疗中使用的化合物的优选的合适剂量为约 1mg 至约 600mg 的量,优选总共约 3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、95、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580 至约 600mg。在一个实施方式中, JAK 抑制剂的给药剂量为 5mg、10mg、15mg、20mg 或 25mg。

[0109] 因此,在一个实施方式中,本文提供包含 mTOR 抑制剂和式 I 的化合物的组合物。在一个实施方式中,式 I 的化合物为 (3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈或其药学可接受的盐。在另一个实施方式中,mTOR 抑制剂为依维莫司 (RAD001) 或 2-(4-氨基-1-异丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基)-1H-吡唑-5-醇 (PP242)。在还另一个实施方式中,组合物进一步包含药学可接受的载体。

## 实施例

[0110] 本发明进一步通过下述实施例来阐述。实施例不应当被看作是进一步限制。

[0111] 从如下的叙述可以看出:靶向 mTOR 信号传导的药物预防各种 MPN 细胞模型中细胞因子诱发的和细胞因子非依赖性细胞增殖,并且采用 JAK1/JAK2 抑制剂或干扰素- $\alpha$  的同时治疗产生协同活性。这些发现提供了研究在治疗骨髓增生性肿瘤中靶向 Akt/mTOR 的有效性的原理。

[0112] 方法和材料

[0113] 试剂

[0114] RAD001(一种 mTOR 特异变构抑制剂)、PP242(一种 mTOR 的 ATP 结构域抑制剂)和羟基脲均从 Sigma-Aldrich(St. Louis, Germany) 获得。干扰素- $\alpha$  是从 Pegasys 获得。抗磷酸(p)-STAT5(Tyr694)、STAT5、p-4EBP1(Thr70)、4EBP1、mTOR、p-JAK2(Tyr1007/1008)和 JAK2 的抗体来自 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, US)。抗人微管蛋白抗体来自 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, US)。重组人 IL-3、GM-CSF、SCF 和 EPO 购自 Miltenyi Biotec(Gladbach, Germany)。抗 mTOR 的 siRNA 来自 Dharmacon siGENOME Smart pool(Thermo Scientific, Waltham, MA, US);使用 siGENOME Non-Targeting siRNA Pool#\_1(Thermo Scientific) 作为阴性对照。

[0115] 细胞系和细胞培养

[0116] HEL、SET2 和 K562 人细胞系购自 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures(DSMZ, Braunschweig, Germany)。表达 JAK2 野生型(wt) 或 JAK2V617F 的鼠科动物 BaF/3 和 BaF/3-EPOR 细胞由 R. Skoda(Basel, Switzerland) 捐赠。在补充有 10% 胎

牛血清 (FBS ;Lonza, Belgium) (对于 SET2 细胞, 20%)、抗生素和 L- 谷氨酰胺的 RPMI1640 中培养细胞系。将 mIL-3 和 EPO 分别加入到 JAK2WT BaF/3 和 BaF/3-EPOR 细胞的培养基中。

[0117] 人细胞

[0118] 周围血液 (PB) 或骨髓 (BM) 的样品是在 Institutional Review Board of Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi 批准的方案下且在获得知情同意之后, 从诊断患有 PV 或 PMF (2008WHO 标准) 的患者处获得的。造血干细胞的健康供体知情同意提供捐赠过量 CD34<sup>+</sup> 细胞。根据 Helsinki. 声明的原理进行研究。如所描述对 CD34<sup>+</sup> 细胞进行免疫磁性选择。通过在粒细胞中定量实时 PCR 测定来确定 JAK2V617F 突变状态。

[0119] 增殖抑制测定、克隆源性测定和细胞凋亡或细胞周期分析

[0120] 将细胞铺板在具有递增浓度药物的 96-孔组织培养板中, 一式三份; 使用 WST-1 测定 (Roche, USA) 评价活细胞, 并且标准化为仅包含一当量体积的媒介 (DMSO) 的孔。使用 Origin 软件 (V7.5, OriginLab Northampton, MA) 计算出现增殖抑制 50% 的浓度 (IC<sub>50</sub>)。在一些实验中, 也使用克隆源性测试。将细胞 (5x10<sup>3</sup>) 铺板在补充有 FBS 的培养基中的 0.5% 琼脂上, 并且在培养开始时一次性加入多种量的药物 (或一当量体积的对照板中的媒介)。在 7 天培养之后, 通过倒置显微镜对集落计数。通过流式细胞仪, 使用 Annexin-V-FLUOS Staining 试剂盒 (Roche) 完成细胞凋亡细胞的定量; 获得至少 20,000 个事件。对于通过流式细胞仪进行细胞周期分布分析, 用乙醇 95%、RNase 10 μg/ml 和碘化丙啶 50mg/mL 处理 1x10<sup>6</sup> 个细胞。

[0121] 人造血祖细胞的集落测定和克隆基因分型

[0122] 将来自 MPN 患者或对照受试者的 BM 单核细胞以 1x10<sup>5</sup>/mL 铺板在补充有 SCF50ng/mL、IL-310ng/mL、IL-610ng/mL、GM-CSF10ng/mL、G-CSF10ng/mL 和 EPO3U/mL 的甲基纤维素 (MethoCult ;StemCell Technologies, Vancouver, Canada) 中, 用于 BFU-E 和 CFU-GM 的生长。通过将来自 PV 患者的 PB 单核细胞以 2.5x10<sup>5</sup>/mL 铺板在包含白细胞-条件培养基而不含 EPO 的甲基纤维素中 (StemCell Technol., cat.No.#\_04531) 进行 EEC 测定。对于 CFU-Mk 的生长, 将 5x10<sup>4</sup>/mL CD34<sup>+</sup> 细胞铺板在 24-孔板的补充有血小板生成素 50ng/mL、IL-3 10ng/mL、IL-6 10ng/mL 的含有脂质培养基 Megacult Collagen and Medium with Lipids (StemCell Technol.) 中。在第 14 天, 根据标准条件对集落计数。

[0123] 对于 JAK2V617F 单一集落基因分型, 使用等位基因特异性测定。从孔分离的集落 (每个点至少 40 个集落) 在 5 μL 不含 DNase/RNase 的水中单个地从半固体培养基中挑出, 在 95°C 下裂解 5 分钟, 且进行 PCR 扩增和凝胶电泳。

[0124] 细胞溶解和 SDS-PAGE 蛋白质印迹

[0125] 根据标准试验方案, 将细胞再悬浮在包含蛋白酶抑制因子混合物 (Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit, PIERCE, Rockford, IL, US) 的 RIPA 裂解缓冲液 (50mM pH7.4 Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1mMEDTA) 中, 并且进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和在免疫印迹 PVDF 膜 (BioRad, Hercules, CA, US) 上的蛋白质印迹。先用第一抗体、接着用在兔子中生成的辣根过氧化酶偶联的抗-Ig 抗体探测膜; 使用 Image Quant350 装置 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 显示免疫活性蛋白质。

[0126] RNA 分离和实时定量 PCR (RTQ-PCR)

[0127] 使用 Trizol (Invitrogen-Life Technologies, Paisley, UK) 纯化总 RNA, 并且采

用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (NanoDrop Techn., Wilmington, DE, USA) 测定 RNA 浓度和纯度 / 完整性。使用 High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) 将 1 微克的 RNA 进行逆转录。采用 TaqMan Universal PCR Master Mix, 使用 ABI PRISM7300HT 和 **TaqMan®** Gene Expression Assays (Applied Biosystems) 进行 RT-QPCR 反应, 一式三份。使用相对定量的可比较的循环阈值 ( $C_T$ ) 方法, 利用 VIC- 标记的 RNaseP 探针作为管家基因 ( $\Delta C_T$ ) 获得基因表达曲线。

#### [0128] 细胞转染

[0129] 使用 Amaxa 试剂盒 R, 采用 Amaxa Nucleofector (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD, USA) 中的 siRNA 对指数生长的 HEL 细胞进行电穿孔。简而言之, 用  $1 \mu\text{M}$  siRNA 转染 0.1 mL 体积中  $2-5 \times 10^6$  个细胞, 且立即转移到包含预热培养基的 24- 孔板中。通过流式细胞仪, 采用 **pmaxGFP®** (Amaxa Biosystems) 评价转染效率和细胞生存力, 结果一直大于 85%。

#### [0130] 统计方法

[0131] 根据需要, 通过 Mann-Whitney U 或 Fisher 测试, 使用 SPSS (StatSoft, Inc., Tulsa, OK) 或 Origin 软件进行各组之间的比较。双侧检验的显著性水平为  $P < 0.05$ 。根据 Chou 和 Talalay 方法的中效原理, 使用 CalcuSyn 软件, 计算两种药物之间相互作用量度的组合指数 (CI)。根据该公式, 当  $CI < 1$  时, 两种药物的相互作用被认为是协同作用, 当  $CI = 1$  时相互作用为叠加作用, 且当  $CI > 1$  时, 相互作用为拮抗作用。

#### [0132] 结果

##### [0133] mTOR 抑制剂消除 JAK2V617F 突变体细胞系的增殖

[0134] 为了确定 JAK2V617F 突变人白血病细胞系是否对 mTOR 抑制敏感, 使用选择性变构 mTOR 抑制剂 RAD001 和 mTOR 活性部位的 ATP 竞争性抑制剂 PP242。据发现 JAK2V617F 突变 HEL 和 SET2 细胞至少与用作对照的 BCR/ABL 阳性 K562 细胞一样对 mTOR 抑制敏感。IC<sub>50</sub> 值显示在表 1 中。研究了 mTOR 抑制剂在 JAK2 野生型鼠科动物 IL-3- 依赖性 (Ba/F3) 或 EPO- 依赖性 (Ba/F3-EPOR) 细胞或细胞因子 - 非依赖性 JAK2V617F 对应物中的效果。发现在培养基中不存在或存在 IL-3 下, V617F Ba/F3 细胞对于 RAD001 比对于 JAK2wt 对应物更敏感。类似地, 在 Ba/F3-EPOR 细胞中, 在不存在和存在 EPO 下, V617F 突变细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 651nM 和 1213nM, 与之比较, 在 JAK2wt 细胞中的 IC<sub>50</sub>  $> 10,000\text{nM}$ 。PP242 同样有效; 在 V617F Ba/F3 细胞中, 在不存在或存在 IL-3 下, IC<sub>50</sub> 分别为 800nM 和 1,600nM, 与之相对, 在野生细胞中 IC<sub>50</sub> 为 3,400nM; 在野生 Ba/F3-EPOR 细胞中, IC<sub>50</sub> 为 5,931nM, 与之相对, 在补充或未补充 EPO 的 V617F 细胞中, IC<sub>50</sub> 分别为 500nM 和 750nM (表 1)。在其 IC<sub>50</sub> 浓度下, RAD001 和 PP242 (没有显示) 引起细胞周期的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期中 SET2 和 HEL 细胞的细胞周期停止 (图 1A)。另一方面, 用 RAD001 处理在诱发细胞死亡方面基本无效, 而 PP242 在最高浓度下引起 SET2 (图 1B) 或 HEL (没有显示) 中中等、仍然剂量 - 依赖性细胞凋亡。除了抑制细胞增殖之外, 据发现 RAD001 也比 K562 更有效地损害 JAK2V617F 突变 HEL、SET2 和 UKE-1 细胞的克隆源性潜能 (clonogenic potential)。而且, 与野生对应物 (数据没有显示) 相比, 在显著较低的 RAD001 浓度下 (不考虑培养基中的细胞因子), V617F Ba/F3 细胞的集落形成受到抑制。总之, 这些数据表明 JAK2V617F 突变细胞对 mTOR 抑制一致地敏感, 且表明消除

细胞增殖主要反映出细胞抑制而不是细胞凋亡效果。

[0135] 其次,比较 mTOR 抑制剂与 JAK1/JAK2 抑制剂化合物 A 和组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂帕比司他诱发的细胞增殖的抑制机制。在显著地低于在 K562 细胞系中测量的  $IC_{50}$  浓度下,那些分子在 HEL 和 SET2 细胞中全部是生长抑制的 (表 1)。然而,与 mTOR 抑制剂不同,它们是细胞凋亡的剂量 - 依赖性高效诱导物 (图 1C,D)。HEL ( $IC_{50} = 410 \mu M$ ) 和 SET2 ( $IC_{50} = 330 \mu M$ ) 细胞对核糖核苷二磷酸还原酶抑制剂羟基脲比 K562 细胞 ( $IC_{50} = 4,910 \mu M$ ) 更敏感 (表 1);羟基脲诱导剂量依赖性细胞凋亡 (图 1E)。

[0136] 在 Ba/F3 细胞中也评价 JAK1/JAK2 抑制剂的效果,以研究细胞因子暴露对药物敏感性的作用。据发现 V617F Ba/F3 和 Ba/F3-EPOR 细胞对化合物 A ( $IC_{50}$  分别 = 34nM 和 220nM) 比其野生对应物 (相当于化合物 A 的  $IC_{50}$  分别为 1,600nM 或 457nM) 更敏感。然而,向培养基中加入合适的细胞因子消除了 JAK1/JAK2 抑制剂对 V617F 突变细胞的优先生长抑制作用 (在 Ba/F3 细胞中,化合物 A 的  $IC_{50} = 1600nM$ ;在 Ba/F3-EPOR 细胞中,化合物 A 的  $IC_{50} = 521nM$ ) (表 1)。

[0137] 总之,这些数据指示 JAK1/JAK2 和 HDAC 抑制剂在 JAK2V617F 白血病细胞系中的生长抑制活性主要由细胞凋亡介导。而且,已证实细胞因子显著地降低对 JAK1/JAK2 抑制剂的细胞敏感性。

[0138] 图 1 显示所选择的 mTOR 抑制剂、JAK1/JAK2 抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂和羟基脲对 SET2 或 HEL 细胞中细胞凋亡和细胞周期的影响。在 (B) 至 (E) 组中,通过流式细胞仪测量已经暴露于可变量的 mTOR 抑制剂 RAD001 或 PP242 (B)、JAK1/JAK2 抑制剂化合物 A (C)、HDAC 抑制剂帕比司他 (D) 或羟基脲 (E) 48 小时的 SET2 细胞中膜联蛋白 - 阳性凋亡细胞的百分数。结果表示为相对于仅包含媒介 (DMSO) 的对照孔的活细胞 %。坏死的细胞级分确定为双阳性膜联蛋白 / 碘化丙啶细胞。三个类似试验的一个代表。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ 。

[0139] 表 4 显示 mTOR 抑制剂 RAD001 或 PP242 和 JAK1/JAK2 抑制剂化合物 A 对 JAK2V617F 突变细胞系的克隆源性生长的抑制。将 JAK2V617F 突变人源细胞系,杂合的 (SET-2) 或纯合的 (HEL), 及 BCR/ABL 突变 K562 细胞系 (用作对照) 暴露于递增浓度的 RAD001、PP242 或化合物 A。将  $10^3$  细胞在可变量的药物存在下铺板于琼脂中;在第 7 天计数细胞,且表示为在包含媒介的对照板中生长的集落数量的百分数。将过表达 JAK2V617F 的鼠科动物 BaF/3 细胞类似地暴露于 RAD001、PP242 或化合物 A,并且与野生型细胞 (wt) 进行比较。向培养基中加入或不加入白细胞介素 -3 (10ng/mL)。  $IC_{50}$  值显示至少三个独立实验的平均值  $\pm$  SD。

[0140] mTOR 抑制剂在 JAK2V617F 突变细胞系中缓解 mTOR 途径的下游信号传导,且降低 STAT5 磷酸化。

[0141] 接下来,使用 SET2 细胞作为模型研究 JAK2V617F 突变细胞中 mTOR 抑制对信号转导的作用 (图 2)。观察到采用 RAD001 和 PP242 处理剂量依赖性地降低 mTOR 靶点 4E-BP1 的磷酸化,且出人意料地降低 STAT5 的磷酸化,而磷酸化的 JAK2 和所有的 JAK2 都不受影响。与之比较,JAK1/JAK2 抑制剂化合物 A 显著地且剂量依赖性地降低 JAK2 和 STAT5 的磷酸化,而 4EBP1 不受影响。HDAC 抑制剂帕比司他剂量依赖性地减少磷酸化的 JAK2 和所有的 JAK2、磷酸化的 STAT5,且显示出对磷酸化的 4E-BP1 的温和作用。相反,羟基脲不会影响 4EBP1 或 STAT5 的水平或磷酸化状态。

[0142] 为了更好地表征 JAK2V617F 突变和 mTOR 活化之间的相关性,以及 mTOR 抑制对 STAT5 磷酸化的结果,使用 Ba/F3 和 Ba/F3-EPOR 细胞。首先,观察到在不含细胞因子的 JAK2wt Ba/F3 和 Ba/F3-EPOR 细胞中 4E-BP1 的磷酸化最小,而其在 V617F 细胞中过度磷酸化,证实了关于 JAK2V617F- 突变细胞中 Akt 组成型活化的前述数据。在 JAK2wt 和 V617F 突变的 Ba/F3 及 Ba/F3-EPOR 细胞(数据没有显示)中,加入细胞因子引起 4E-BP1 磷酸化增加。在用 RAD001 培养的细胞中,出现 4E-BP1 磷酸化的显著抑制(数据没有显示),且持续直至至少 24 小时(数据没有显示)。与不含 IL-3 或 EPO 的 JAK2wt Ba/F3 或 Ba/F3-EPOR 细胞相比,V617F 细胞中的 STAT5 磷酸化更大,并且其在细胞因子暴露之后大量增加。STAT5 磷酸化显著地下调,反映对 4EBP1 的作用;在 60 分钟时抑制已经很明显,保持至多 24 小时(没有显示)。

[0143] 为了证实 STAT5 磷酸化的减少实际上是 mTOR 抑制介导的,而不是由 RAD001 对 STAT5 磷酸化的直接作用导致的,用 HEL 细胞中的特定 siRNA 使 mTOR 沉默。尽管 siRNA 处理在 24 小时降低 mTOR 水平仅 50-60%,但是与采用无关的对照 siRNA 处理的细胞相比,磷酸化的 4E-BP1 的水平显著地降低;总 4E-BP1 蛋白质含量完全没有变化(数据没有显示)。在 48 小时,mTOR 和磷酸化的 4E-BP1 都几乎不可检测到。同时,与对照相比,在已经采用 mTOR 特异性 siRNA 核染(nucleofected)的细胞中,在第 24-48 小时,磷酸化的 STAT5 的水平出现显著地降低;全部 STAT5 含量没有变化。

[0144] 图 2 显示在 SET2 细胞中所选择的 mTOR 抑制剂、JAK1/JAK2 抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂和羟基脲对 mTOR 和 JAK/STAT 信号传导的影响。采用递增浓度的药物培养 SET2 细胞 24 小时,并且通过蛋白质印迹分析总的和磷酸化的 JAK2、STAT5 和 4EBP1 的水平。使用微管蛋白进行负载归一化。显示的结果为对于不同药物的两个至四个类似的实验的代表。

[0145] RAD001 或 PP242 与化合物 A 的组合引起 JAK2V617F 白血病细胞系增殖和集落形成的协同抑制

[0146] 通过测量增殖抑制作用来评价 SET2 和 V617F Ba/F3-EPOR 细胞中 mTOR 和 JAK1/JAK2 共同抑制的作用。用不同浓度的 RAD001 或 PP242 培养细胞;通过使用这些药物组合,测量出组合指数(CI)范围为 0.12 至 0.44,表明对两种药物的强协同活性(表 3)。

[0147] 在克隆源性琼脂测定中进行使用 SET2 和 Ba/F3epoR V617F 细胞的进一步实验;在这些培养物中测量出 CI 范围为 0.22 到 0.81 的,再次表明药物协同作用。

[0148] 在 EEC 集落形成测定中,RAD001 或 PP242 与化合物 A 的组合引起对来自患有 MPN 的患者的造血祖细胞的协同抑制。

[0149] 为了测定来自 MPN 患者的白血病细胞的增殖是否可能受到同时靶向 mTOR 和 JAK 途径的影响,在 EEC 测定中,用递增浓度的 RAD001、PP242、化合物 A 或 RAD001 或 PP242 和化合物 A 的组合培养来自患有 PV 的患者的 PBMC。在不存在或存在固定量的 RAD001、PP242 和 / 或化合物 A 中,在不含 EPO 的甲基纤维素培养基中,培养来自 PV 患者的外周血液来源的单核细胞进行 EEC 生长。在第 12 天对 EEC 评分,且表示为在仅包含媒介的对照板中测量的集落数的百分数。\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ 。表 6 中所列的结果显示在这些培养物中 CI 为 0.2 和 0.26,进一步证实了 mTOR 和 JAK 抑制剂在 JAK2V617F 细胞生长的抑制方面的协同作用。

[0150] 讨论

[0151] MPN- 相关的 JAK2V617F 突变决定了 JAK2/STAT 途径的组成型活化;JAK2 抑制剂降低了 JAK2V617F 突变细胞的体外增殖,缓解了 JAK2V617F 转基因动物的髓增殖 (Liu PC, Caulder E, Li J, et al. Combined inhibition of Janus kinase1/2 for the treatment of JAK2V617F-driven neoplasms: selective effects on mutant cells and improvements in measures of disease severity. Clin Cancer Res. 2009; 15: 6891-6900), 并且在患有骨髓纤维 (Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. N Engl J Med. 2010; 363: 1117-1127) 或羟基脲 - 抗性的 PV 或 ET 的患者中产生了可测量的临床改善。然而, JAK2V617F 负荷的变化是适度的,且还没有报道分子缓解。而且,在 JAK2V617F 敲入小鼠中引发疾病的细胞群不受 JAK2 抑制剂 TG101348 处理的影响。总之,这些观察结果呈现出有效地靶向 MPN 克隆可能采用现有的 JAK2 抑制剂不能完成的可能性。因此,为了设计更有效的治疗策略,期望更详细地认识参与突变体细胞的增殖失调的细胞信号。在这点上,已经表明在人和鼠科动物 JAK2V617F 突变的细胞中,与单独的药物相比,HDACi 帕比司他和 JAK2 抑制剂 TG101209 的共处理决定了 JAK/STAT 信号传导的减少更大,且抗 MPN CD34<sup>+</sup> 细胞的细胞毒性增加。

[0152] 该研究集中于雷帕霉素的哺乳动物靶点 (mTOR), 其是 PI3k/Akt 途径的关键下游靶点。丝氨酸 - 苏氨酸激酶 mTOR 起着细胞代谢、存活、生长、增殖和自体吞噬的主要调节剂作用。mTOR 受按照其创始成员雷帕霉素命名为 rapalogs 的分子家族的抑制,最近该分子家族用于癌症的临床试验。mTOR 存在两种复合物 TORC1 和 TORC2。TORC1, 由 raptor 形成,控制帽 - 依赖性 mRNA 翻译的水平,以及磷酸化效应物比如真核起始因子 4E- 结合蛋白 1 (4E-BP1) 和 S6 激酶 1 (S6K1)。依次,磷酸化的 4E-BP1 导致对真核起始因子 4E (eIF4E) 的结合抑制,且阻止一些基因包括细胞周期蛋白 D1、Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 和血管内皮生长因子的翻译活化。另一方面, S6K1 通过磷酸化关键靶点比如 eIF4E、mTOR、真核起始因子 4B 和延伸 -2 激酶 (elongation-2) 而调节细胞生长。eIF4E 和 SK1 都参与细胞转化,且在一些预后较差的癌症中过表达。TORC1 的另外的组分包括哺乳动物 LST8/G 蛋白  $\beta$  - 亚基类蛋白质 (mLST8/G  $\beta$  L) 和最近鉴定的成员 PRAS40 和 DEPTOR。mTOR 也结合 mTORC2 中的 Rictor, 其基本上是雷帕霉素不敏感的,且由 G  $\beta$  L 和哺乳动物应激激活蛋白激酶相互作用蛋白质 1 (mSIN1) 组成; TORC2 参与位于 Ser473 的 Akt 磷酸化。在一些情况下,从 mTORC2 到 Akt 的这一负反馈环路导致严重的肿瘤发展,尽管报道 RAD001 经由抑制 mTORC1 和 mTORC2 二者而高效地抑制白血病细胞中 Akt 活性。为了克服变构 mTOR 抑制剂比如 RAD001 的可能局限性和缺点,开发了充当 mTOR ATP 活性部位竞争性抑制剂的新分子; 这些分子之一 PP242 强烈抑制 TORC1 和 TORC2 二者介导的活性且发挥抗白血病细胞的高效细胞毒性。使用 RAD001 和 PP242 在体外研究 mTOR 作为 MPN 治疗靶点的假定作用。

[0153] 首次证实 mTOR 抑制剂在显著低于对照细胞的药物浓度下快速阻止 JAK2V617F 突变的人类和鼠科动物白血病细胞系的细胞增殖 (表 1)。相反,在最高浓度下, RAD001 不会诱发细胞死亡,而 PP242 引起一些细胞凋亡; 因此,在这些试验设置中, mTOR 抑制剂是主要抑制细胞生长的。该作用方式与全部都强效地诱发细胞凋亡的 JAK1/JAK2 抑制剂化合物 A 和 HDAC 抑制剂帕比司他不同 (图 1)。另一方面,证实与 JAK1/JAK2 抑制剂的情形不同,由 mTOR 抑制剂引起的细胞增殖抑制不受 Ba/FE 和 Ba/F3-EPOR 细胞的细胞因子暴露之后 JAK/

STAT 途径的最大活化的影响。后者的观察结果一致于证实的通过向培养基中加入 EPO 抑制对来自 PV 患者的红细胞祖细胞的 JAK2 抑制剂的敏感性,并且间接地表明 RAD001 对细胞增殖抑制的机制至少部分地与细胞因子-诱导的 JAK/STAT 活化无关。据证实 RAD001 对突变的 JAK2V617F 的选择性比患有 PV 的患者中野生型祖细胞的选择性更强,因为 V617F 集落的数量比野生型集落的数量平均减少 39% (表 2)。

[0154] 已经在一些其它癌细胞中证实了 RAD001 的普遍抗增殖活性而不是促凋亡作用,其表示采用试剂的组合疗法的基本原理是优先诱导细胞凋亡。记住这点,研究了体外 mTOR 和 JAK1/JAK2 抑制剂组合的作用,并且证实了关于抑制白血病细胞系的增殖(表 3)、克隆源性潜能(表 5)的显著协同作用。此外,通过结合 RAD001 或 PP242 与 JAK1/JAK2 抑制剂化合物 A 协同抑制来自 MPN 患者的祖细胞的造血集落形成(表 6)。

[0155] 关键信号分子的分析表明 RAD001 和 PP242 抑制下游靶点 4EBP1 的磷酸化,而 JAK1/JAK2 抑制剂和 HDAC 抑制剂降低 JAK2 和 STAT 的磷酸化,值得注意的是,HDAC 抑制剂也减少总 JAK2 的表达(图 2)。一个有趣的观察结果是由 RAD001 和 PP242 引起的 mTOR 抑制与 STAT5 磷酸化的明显降低有关,其不能通过总 STAT5 蛋白质含量降低来解释。mTOR 和 STAT5 之间的正反馈通过证明使用抗 mTOR 的特异性抑制 RNA(siRNA) 同时减少 4E-BP1 和 STAT5 磷酸化来证实(数据没有显示)。RAD001 介导的 STAT5 磷酸化的抑制程度远小于不会影响 4E-BP1 磷酸化的采用 JAK1/JAK2 抑制剂的抑制程度,表明在 MPN 细胞中的 mTOR 活化可能主要是 JAK2-非依赖性的。另一方面,HDAC 抑制剂表现出对 4EBP1 磷酸化的适度抑制,尽管最新数据不能得出该作用是否是直接作用或非直接作用的结论。总的来说,这些观察结果表明 STAT5 磷酸化可能受到靶向 JAK2-和 mTOR-引发的信号传导的影响。关于这点,已经在一些癌细胞和小鼠或人肿瘤中证实了经由受体酪氨酸激酶/PI3K/Akt 信号传导进行 STAT3 的雷帕霉素敏感性活化。

[0156] 表 1。在人类和鼠科动物中 JAK2V617F 突变的和 JAK2 野生型对照细胞系中,使用增殖抑制测定来测定 mTOR 抑制剂、JAK1/JAK2 抑制剂、HDAC 抑制剂和羟基脲的  $IC_{50}$ 。\*,  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.00$ . N. D., 没有进行

[0157]

药物	BaF/3 -IL3					
	K562	HEL	SET2	WT	V617F	V617F +IL3
RAD001 (nM)	16,000 ± 2,500	14,000 ± 2,800	17,000 ± 3,000 **	2,600 ± 1,200	10 ± 4 **	10 ± 5 **
PP242 (nM)	8,300 ± 1000	1,500 ± 113 **	285 ± 11 **	3,400 ± 300	800 ± 200 **	1,600 ± 200 **
化合物 A (nM)	>20,000	790 ± 150 **	160 ± 24 **	1,600 ± 500	34 ± 2 **	1,700 ± 300
帕比司他 (nM)	31 ± 8	8 ± 3 *	7 ± 2 *	N.D.	N.D.	N.D.

[0158]

<b>HuOH (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	4,910 $\pm$ 15	410 $\pm$ 20 *	330 $\pm$ 11 *	N.D.	N.D.	N.D.
----------------------------------------	-------------------	----------------	----------------	------	------	------

药物	BaF/3 -EPOR		
	WT	V617F	V617F +EPO
<b>RAD001 (nM)</b>	>10,000	651 $\pm$ 50 **	1,231 $\pm$ 100 **
<b>PP242 (nM)</b>	5,931 $\pm$ 1,000	500 $\pm$ 100 **	750 $\pm$ 100 **
<b>化合物 A (nM)</b>	457 $\pm$ 15	220 $\pm$ 20 **	521 $\pm$ 45
<b>帕比司他 (nM)</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>HuOH (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	N.D.	N.D.	N.D.

[0159] 表 2. 在来自 MPN 患者的 CD34<sup>+</sup>细胞的克隆源性测定中, RAD001 对 JAK2 野生型和 V617F 集落的比例的影响。

#### JAK2 基因型

[0160]

病人 #	RAD001 (50 nM)	野生型 (%)	V617F (%)	V617F 减 少%
1	-	80	20	70
	+	94	6	
2	-	53	47	15

[0161]

	+	60	40	
3	-	28	72	21
	+	43	57	
4	-	52	48	17
	+	58	40	
5	-	68	32	72
	+	91	9	
平均值 $\pm$ SD				39 $\pm$ 29

[0162] 表 3. mTOR 抑制剂和 JAK1/JAK2 抑制剂的组合在 SET2 细胞系和 JAK2V617F Ba/F3-EPOR 细胞的增殖抑制方面产生协同活性。

[0163]

细胞系	IC <sub>50</sub> (nM)		药物组合 (IC <sub>50</sub> , nM)		CI 指数
	RAD001	化合物 A	RAD001	化合物 A	
SET2	17,000 $\pm$ 3000	160 $\pm$ 24	3,0983	29	0.20
	PP242 285 $\pm$ 11	化合物 A 160 $\pm$ 24	PP242 66	化合物 A 47	0.43
JAK2V167F Ba/F3-EPOR	RAD001 651 $\pm$ 50	化合物 A 220 $\pm$ 20	RAD001 363	化合物 A 125	CI 指数 0.44

[0164]

PP242	化合物 A	PP242	化合物 A	
500 ± 100	220 ± 20	400	121	0.98

[0165] 在增殖抑制测定中,在不同药物组合存在下计算 IC<sub>50</sub>值。报道的是来自组合使用的药物的至少 3 个实验的中间 IC<sub>50</sub>值。根据如在材料和方法中描述的 Chou 和 Talaly 方法计算组合指数 (CI)。CI < 1 指示两种药物的相互作用是协同作用。为方便起见,前两栏 (灰色) 报道如从表 1 的数据计算的单独药物的 IC<sub>50</sub>值。

[0166] 表 4. 使用克隆源性测定来测定在人类和鼠科动物 JAK2V617F 突变的细胞系和对照中 RAD001、PP242 和 INC242 的 IC<sub>50</sub>。

[0167]

细胞系	IC <sub>50</sub> (nM)		
	RAD001	PP242	化合物 A
K562	10,000 ± 3,500	3,800 ± 200	>15,000
HEL	85 ± 30 **	172 ± 59 **	374 ± 177 **
SET2	130 ± 30 **	62 ± 19 **	27 ± 9 **
Ba/F3 JAK2 野生型	120 ± 13	100 ± 10	380 ± 120
Ba/F3 JAK2 V167F	6 ± 2 **	18 ± 7**	15 ± 10**
Ba/F3 epoR JAK2 野生型	22 ± 10	308 ± 100	740 ± 100
Ba/F3 epoR JAK2 V167F	4 ± 2**	47 ± 12**	20 ± 15**

[0168] 在琼脂克隆源性测定中,通过在不同药物浓度的存在下,在第 7 天计数集落来计算 IC<sub>50</sub>值 (即,在仅含媒介的对照皿中测量时集落数减少至 50% 的药物浓度)。在人类细胞系的情况下,对照细胞系为 K562,而在鼠科动物细胞的情况下,参照为在 IL-3 的存在下保持的 Ba/F3 野生型细胞。\*\*, P < 0.01。

[0169] 表 5. RAD001 或 PP242 和 INC242 的组合在抑制人类和鼠科动物 JAK2V617F 突变的细胞系的克隆源性潜能方面产生协同活性。

[0170]

IC <sub>50</sub> (nM)					
药物组合					
细胞系	RAD001	化合物 A	RAD001	化合物 A	CI 指数
SET2	44 ± 15	27 ± 9	7	4	0.22
	PP242	化合物 A	PP242	化合物 A	
	62 ± 19	27 ± 9	17	7.6	0.81
Ba/F3 epoR JAK2 V617F	RAD001	化合物 A	RAD001	化合物 A	CI 指数
	4 ± 2	20 ± 15	1.1 (1.3-1)	5.9 (6.8-5.1)	0.59 (0.85-0.34)
	PP242	化合物 A	PP242	化合物 A	
	47 ± 12	20 ± 15	6.3 (10-2.5)	2.7 4.4-1.1)	0.24(0.38-0.1)

[0171] 在琼脂中的克隆源性测定中,通过在不同药物组合的存在下建立的培养第 7 天,计数生长的集落来计算 IC<sub>50</sub>值。报道的是来自以组合使用的两种药物的至少 3 个实验的 IC<sub>50</sub>的中间值。如在材料和方法中描述的计算组合指数 (CI)。CI < 1 指示两种药物的相互作用是协同作用。为方便起见,前两栏 (灰色) 显示对单独药物计算的 IC<sub>50</sub>值,且此处报道来自表 4。

[0172] 表 6. RAD001 或 PP242 和 INC242 的组合在抑制来自 PV 患者的人类外周血单核细胞的克隆源性潜能方面产生协同活性。

[0173]

IC <sub>50</sub> (nM)					
药物组合					
细胞	RAD001	化合物 A	RAD001	化合物 A	CI 指数
来自 PV 患者的 PBMC	15 ± 10	1.8 ± 1	1.9	0.2	0.26
	PP242	化合物 A	PP242	化合物 A	
	1 ± 0.7	1.8 ± 1	0.05	0.1	0.2

[0174] 在琼脂中的克隆源性测定中,通过在不同药物组合的存在下建立的培养第 7 天,计数生长的集落来计算 IC<sub>50</sub>值。如在材料和方法中描述的计算组合指数 (CI)。CI < 1 指示两种药物的相互作用是协同作用。

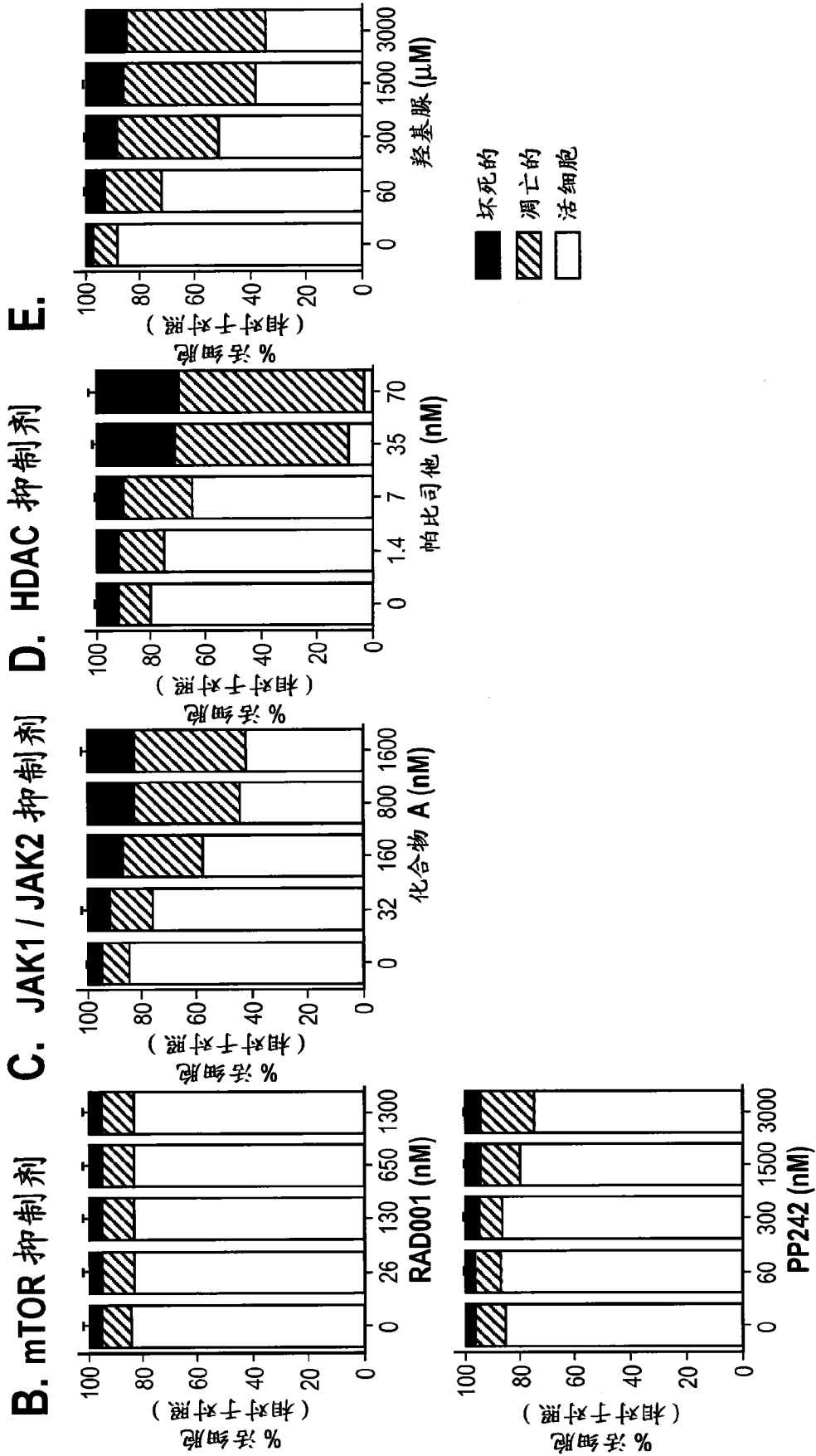


图 1

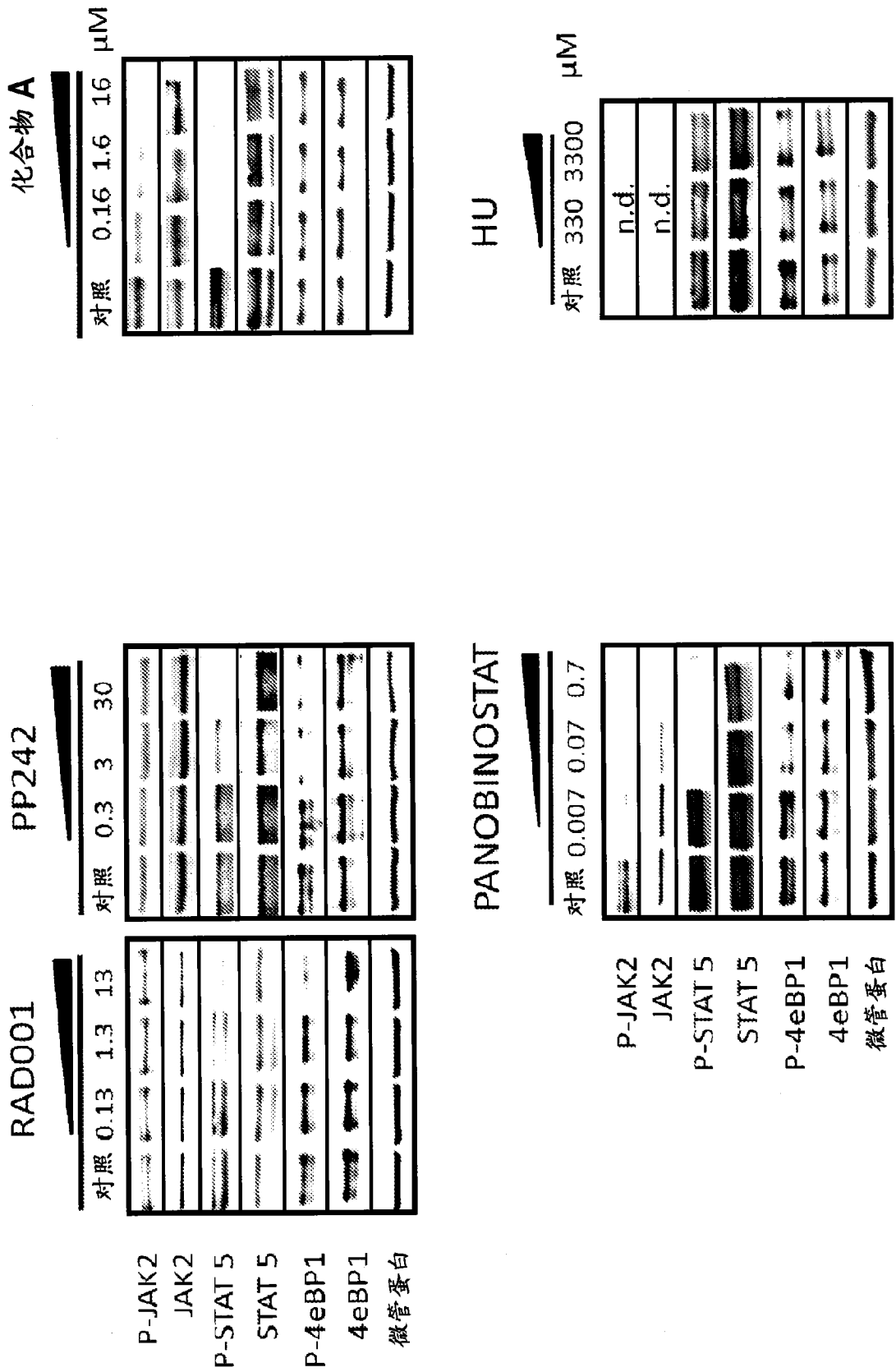


图 2