



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104428001 A

(43) 申请公布日 2015.03.18

(21) 申请号 201380018595.7

代理人 路勇

(22) 申请日 2013.03.29

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/618,006 2012.03.30 US

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/428(2006.01)

A61K 31/506(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.30

A61K 31/519(2006.01)

A61K 35/00(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/052556 2013.03.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/144923 EN 2013.10.03

(71) 申请人 武田药品工业有限公司

地址 日本国大阪市中央区道修町四丁目1
番1号

(72) 发明人 有田健雄 土屋俊太郎

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限
责任公司 11287

权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂在黑素瘤治疗中的
投与

(57) 摘要

本发明揭示用于治疗需要所述治疗的患者的
非 BRAFV600E 突变体黑素瘤的方法。所述方法包含
向所述患者投与 MEK 抑制剂,例如 (R)-3-(2,3-二
羟基丙基)-6-氟-5-((2-氟-4-碘苯基)氨基)-8-甲
基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮 (TAK-733);
和 RAF 抑制剂,其选自 N-{7-氰基-6-[4-氟-3-({3-
(三氟甲基)苯基}乙酰基)氨基]苯氧基]-1,3-苯并
噻唑-2-基}环丙烷甲酰胺 (TAK-632) 和 (R)-2-(1-(6-
氨基-5-氯嘧啶-4-甲酰胺基)乙基)-N-(5-氯-4-(三
氟甲基)吡啶-2-基)噻唑-5-甲酰胺 (MLN2480)。本
发明还揭示了用于治疗所述黑素瘤的药物。

1. 一种治疗有效总量的 MEK 抑制剂和 RAF 抑制剂的用途,所述抑制剂用于治疗需要所述治疗的患者的黑素瘤,其中所述 RAF 抑制剂选自 N-{7-氰基-6-[4-氟-3-({[3-(三氟甲基)苯基]乙酰基}氨基)-苯氧基]-1,3-苯并噻唑-2-基}环丙烷甲酰胺 (TAK-632) 和 (R)-2-(1-(6-氨基-5-氯嘧啶-4-甲酰胺基)乙基)-N-(5-氯-4-(三氟甲基)吡啶-2-基)噻唑-5-甲酰胺 (MLN2480),并且其中所述黑素瘤是非 BRAFV600E 突变体。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述黑素瘤是 BRAF 野生型。

3. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述黑素瘤是 NRAS 突变体。

4. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述黑素瘤是 BRAF 野生型和 NRAS 突变体。

5. 根据权利要求 1 到 4 中任一权利要求所述的用途,其中所述 MEK 抑制剂是 (R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-((2-氟-4-碘苯基)氨基)-8-甲基吡啶并 [2,3-d] 嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮 (TAK-733)。

6. 根据权利要求 1 到 5 中任一权利要求所述的用途,其中所述 RAF 抑制剂是 TAK-632。

7. 根据权利要求 1 到 5 中任一权利要求所述的用途,其中所述 RAF 抑制剂是 MLN2480。

8. 一种 RAF 抑制剂的用途,所述抑制剂用于制造用于治疗需要所述治疗的患者的黑素瘤的药物,其中所述药物与 MEK 抑制剂组合使用,所述患者根据此接受治疗有效总量的所述 MEK 抑制剂和所述 RAF 抑制剂,其中所述 RAF 抑制剂选自 N-{7-氰基-6-[4-氟-3-({[3-(三氟甲基)苯基]乙酰基}氨基)-苯氧基]-1,3-苯并噻唑-2-基}环丙烷甲酰胺 (TAK-632) 和 (R)-2-(1-(6-氨基-5-氯嘧啶-4-甲酰胺基)乙基)-N-(5-氯-4-(三氟甲基)吡啶-2-基)噻唑-5-甲酰胺 (MLN2480),并且其中所述黑素瘤是非 BRAFV600E 突变体。

9. 根据权利要求 8 所述的用途,其中所述黑素瘤是 BRAF 野生型。

10. 根据权利要求 8 所述的用途,其中所述黑素瘤是 NRAS 突变体。

11. 根据权利要求 8 所述的用途,其中所述黑素瘤是 BRAF 野生型和 NRAS 突变体。

12. 根据权利要求 8 到 11 中任一权利要求所述的用途,其中所述 MEK 抑制剂是 (R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-((2-氟-4-碘苯基)氨基)-8-甲基吡啶并 [2,3-d] 嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮 (TAK-733)。

13. 根据权利要求 8 到 12 中任一权利要求所述的用途,其中所述 RAF 抑制剂是 TAK-632。

14. 根据权利要求 8 到 12 中任一权利要求所述的用途,其中所述 RAF 抑制剂是 MLN2480。

RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂在黑素瘤治疗中的投与

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤学领域并且提供用于治疗黑素瘤的方法。

背景技术

[0002] 存在对发现用于治疗人类疾病的新型治疗剂的持续需要。MAPK/ERK 激酶（例如 MEK1 和 MEK2）由于其在过度增生性病征、与血小管生成或血管生成相关的疾病、免疫抑制将具有价值的 T 细胞介导疾病以及其它疾病中的重要作用，是用于发现新型治疗剂的尤其具有吸引力的目标。参见例如 Q. 董 (Q. Dong) 等人，生物有机化学与药物化学快报 (Bioorg. & Med. Chem. Lett.), 2011, 21, 1315-1319；和美国专利申请第 11/958,999 号（专利第 8,030,317 号）。抑制 RAF 激酶的化合物具有抵抗由生长因子受体突变或配体刺激过度活化所引起的癌症或由 Ras 的活化型突变所引起的癌症的效用。参见例如美国专利申请第 12/628,697 号（专利第 8,143,258 号）。各种 RAF 抑制剂已经显示出抵抗具有 BRAFV600E 突变的黑素瘤的活性。参见例如 P. I. 普利卡口 (P. I. Poulikakos) 和 N. 罗森 (N. Rosen), 癌细胞 (Cancer Cell), 2011, 19, 11-15。然而，预计即使是 MEK 和 RAF 抑制剂的组合仍然不能展现抵抗除了 BRAFV600E 突变体肿瘤之外的黑素瘤的有意义的活性。参见例如普利卡口和罗森。

[0003] 通常寻求用于治疗癌症的药剂的最高可能剂量 (MTD: 最大耐受剂量)，因为治疗益处被认为随着剂量增加。参见例如 Y. 林 (Y. Lin) 和 W. J. 施 (W. J. Shih), 生物统计学 (Biostatistics), 2001, 2(2), 203-215。药剂的协同组合（即，预计比组合成分的有效性有效的药剂组合）提供了在 MTD 下传递甚至更大功效或通过传递与较低剂量相当的功效来减轻剂量相关毒性的机会。因此，需要探索抗癌剂的协同组合以便最有效地治疗癌症患者。

发明内容

[0004] 现在已经发现，投与 MEK 抑制剂和特定 RAF 抑制剂提供了抗非 BRAFV600E 突变体黑素瘤的协同效应。

[0005] 在一个方面，本发明涉及治疗非 BRAFV600E 突变体黑素瘤的方法，所述方法包含向需要所述治疗的个体投与 MEK 抑制剂和选自 TAK-632 和 MLN2480 的 RAF 抑制剂。

[0006] 在一个方面，本发明涉及一种试剂盒，其包含适用于治疗需要所述治疗的个体的非 BRAFV600E 突变体黑素瘤的药物。所述试剂盒包含含有 MEK 抑制剂的药物，和用于投与 MEK 抑制剂和 RAF 抑制剂 TAK-632 或 MLN2480 的说明书；或所述试剂盒包含含有 RAF 抑制剂 TAK-632 或 MLN2480 的药物，和用于投与 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂的说明书。所述试剂盒可以含有包含 MEK 抑制剂的药物和包含 RAF 抑制剂 TAK-632 或 MLN2480 的药物两者，以及用于投与 MEK 抑制剂和 RAF 抑制剂的说明书。

[0007] 在一个方面，本发明涉及一种药物，其适用于治疗需要所述治疗的个体的非 BRAFV600E 突变体黑素瘤。所述药物包含 MEK 抑制剂和选自 TAK-632 和 MLN2480 的 RAF 抑制剂。

附图说明

[0008] 图 1 示出了与 TAK-733 组合的 TAK-632(T-3109632) 在 SK-Me1-30 细胞系中的拟合等效线图。

[0009] 图 2 示出了与 TAK-733 组合的 TAK-632(T-3109632) 在 SK-Me1-2 细胞系中的拟合等效线图。

[0010] 图 3 示出了与 TAK-733 组合的 TAK-632(T-3109632) 在 IPC-298 细胞系中的拟合等效线图。

[0011] 图 4 示出了与 TAK-733 组合的 TAK-632(T-3109632) 在 MEL-JUS0 细胞系中的拟合等效线图。

[0012] 图 5 示出了与 TAK-733 组合的 MLN2480 在 SK-Me1-30 细胞系中的拟合等效线图。

[0013] 图 6 示出了与 TAK-733 组合的 MLN2480 在 SK-Me1-2 细胞系中的拟合等效线图。

[0014] 图 7 示出了与 TAK-733 组合的 MLN2480 在 IPC-298 细胞系中的拟合等效线图。

具体实施方式

[0015] 定义和缩写。

[0016] 如本文中所示，“治疗有效量”意指在适当投与患者后足以产生以下作用的治疗性物质的量：(a) 使所治疗的病症或疾病病况的严重性可检测的降低；(b) 改善或缓解患者的疾病或病症的症状；或 (c) 减缓或预防所治疗的病症或疾病病况的进展，或以其它方式使所治疗的病症或疾病病况稳定或延长其稳定（例如防止癌症的额外肿瘤生长）。

[0017] 当要投与一种以上治疗性物质时，“治疗有效总量”意指每一种治疗性物质的单独量的总和满足“治疗有效量”的定义，即使任何数量的单独治疗性物质的单独量不满足。举例来说，如果 10mg A 不是治疗有效量，并且 20mg B 不是治疗有效量，但是投与 10mg A+20mg B 产生针对定义“治疗有效量”所列举的结果中的至少一者，那么 10mg A+20mg B 的总和将被视为“治疗有效总量”。

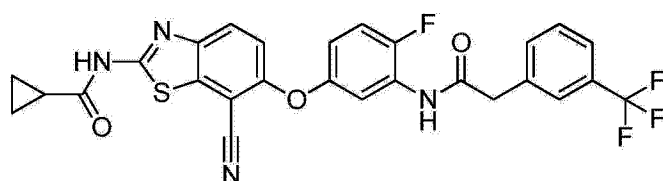
[0018] 如本文中所示，“患者”意指经诊断患有疾病、病症或病状；展现疾病、病症或病状的症状或以其它方式认为罹患疾病、病症或病状的人类。

[0019] 除非另外说明，否则如本文中所述的说明性术语“包括 (include)”、“例如 (such as)”、“例如 (for example)”等（和其变化形式，例如“包括 (includes)”和“包括 (including)”、“实例 (examples)”）打算是非限制性的。也就是说，除非另外明确规定，否则这类术语打算暗示“但不限于”，例如“包括”意指包括（但不限于）。

[0020] 治疗性物质 -RAF 抑制剂。

[0021] 化合物 N-{7-氰基-6-[4-氟-3-({[3-(三氟甲基)-苯基]-乙酰基}-氨基)-苯氧基]-1,3-苯并噻唑-2-基}环丙烷甲酰胺：

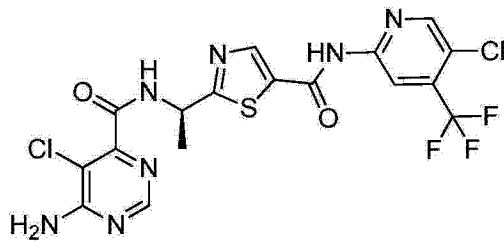
[0022]



TAK-632 (T-3109632)

[0023] 也称为 TAK-632 或 T-3109632, 是一种 Raf 激酶抑制剂。化合物 (R)-2-(1-(6-氨基-5-氯嘧啶-4-甲酰胺基)乙基)-N-(5-氯-4-(三氟甲基)吡啶-2-基)噻唑-5-甲酰胺:

[0024]



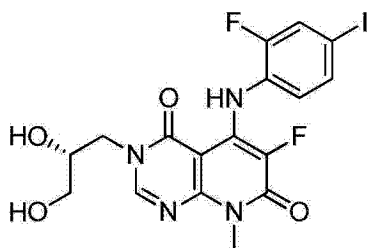
MLN2480

[0025] 也称为 MLN2480, 也是一种 Raf 激酶抑制剂。TAK-632、其药物组合物和其合成方法先前已经有所描述。参见例如美国专利申请第 12/628,697 号 (专利第 8,143,258 号), 其以全文引用的方式并入本文中。MLN2480、其药物组合物和其合成方法先前已经有所描述。参见例如美国专利申请第 12/164,762 号 (专利申请公开第 2009/0036419 号), 其以全文引用的方式并入本文中。如果这些文献中的任一者与本说明书之间存在任何差异, 那么以本说明书为准。

[0026] 治疗性物质 -MEK 抑制剂。

[0027] 化合物 (R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-((2-氟-4-碘苯基)氨基)-8-甲基吡啶并 [2,3-d] 嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮:

[0028]



TAK-733

[0029] 也称为 TAK-733, 是一种 MEK 抑制剂。参见例如 Q. 董等人, 生物有机化学与药物化学快报, 2011, 21, 1315-1319, 其以全文引用的方式并入本文中。TAK-733、其药物组合物和其合成方法先前已经有所描述。参见例如美国专利申请第 11/958,999 号 (专利第 8,030,317 号), 其以全文引用的方式并入本文中。如果这些文献中的任一者与本说明书之间存在任何差异, 那么以本说明书为准。

[0030] 协同作用。

[0031] 现在已经发现, 投与 MEK 抑制剂和特定 RAF 抑制剂提供了抗非 BRAFV600E 突变体黑素瘤的协同效应。

[0032] 体外组合实验。

[0033] 如实例 1 中所述, 使用细胞活力分析来评定两种 RAF 抑制剂 TAK-632 和 MLN2480 中的每一者与 MEK 抑制剂 TAK-733 在黑素瘤 SK-Mel-30、SK-Mel-2、IPC-298 和 MEL-JUSO 的四个 BRAF 野生型 NRAS 突变体细胞模型中的体外组合作用。下表 1 列举了每一种测定组合的组合指数 (CI) 和 P 值, 以及基于 CI 值的协同作用评定结果。如表 1 中所示, TAK-632 和 TAK-733 的所有测试组合都显示出协同作用, 而 MLN2480 和 TAK-733 的 3 个测试组合中的 2

个显示出协同作用。

[0034] 表 1. 组合指数值和协同作用评定结果。

[0035]

RAF 抑制剂	MEK 抑制剂	细胞系	组合指数	P 值	结论
TAK-632	TAK-733	SK-Me1-30	0.38	<0.001	协同作用
TAK-632	TAK-733	SK-Me1-2	0.24	<0.001	协同作用
TAK-632	TAK-733	IPC-298	0.30	<0.001	协同作用
TAK-632	TAK-733	MEL-JUS0	0.38	<0.001	协同作用
MLN2480	TAK-733	SK-Me1-30	0.54	<0.001	协同作用
MLN2480	TAK-733	SK-Me1-2	0.37	<0.001	协同作用
MLN2480	TAK-733	IPC-298	0.77	<0.001	相加作用

[0036] 表 3 (实例 2, 下文) 列举了每一种测定组合的组合指数 (CI) 值, 以及基于 CI 值的协同作用评定结果。如所述表中所示, TAK-632 和 TAK-733 的组合在 4 个所测试的黑素瘤的 NRAS 突变体细胞模型中的 4 个中显示出协同作用, 所述黑素瘤中的 3 个 (SK-Me1-2、HMCB 和 GAK) 是 BRAF 野生型, 并且其中 1 个 (HMVII) 是 BRAFG469V 突变体。

[0037] 化合物投与

[0038] RAF 抑制剂可以与 MEK 抑制剂组合以单一剂型或以分开的剂型投与。当以分开的剂型投与时, MEK 抑制剂可以在投与 RAF 抑制剂之前、与此同时或在此之后投与。如所属领域的技术人员所了解, 如本文中所用, 以 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂的“组合”形式投与不仅是指同时或连续投与两种药剂, 而且是指在单一治疗周期期间投与两种化合物。

[0039] 在不同实施例中, MEK 抑制剂是 TAK-733。

[0040] 在不同实施例中, RAF 抑制剂是 TAK-632 或 MLN2480。在不同实施例中, RAF 抑制剂是 TAK-632。在不同实施例中, RAF 抑制剂是 MLN2480。

[0041] 治疗性物质; 药物组合物。

[0042] 治疗性物质可以是药学上可接受的盐。在一些实施例中, 这类盐来源于无机或有机酸或碱。关于合适盐的综述, 参见例如伯奇 (Berge) 等人, 药物科学杂志 (J. Pharm. Sci.), 1977, 66, 1-19 和雷明顿: 医药科学和实践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy), 第 20 版, A. 根纳罗 (A. Gennaro) (编), 利平科特威廉姆斯和维尔金斯出版社 (Lippincott Williams & Wilkins) (2000)。

[0043] 合适的酸加成盐的实例包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、反丁烯二酸盐、葡糖庚酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐、乳酸盐、顺丁烯二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、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、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。

[0044] 合适的碱加成盐的实例包括铵盐；碱金属盐，例如钠盐和钾盐；碱土金属盐，例如钙盐和镁盐；与有机碱形成的盐，例如二环己胺盐、N-甲基-D-葡萄糖胺；以及与例如精氨酸、赖氨酸等氨基酸形成的盐。

[0045] 举例来说，伯奇列举了以下经 FDA 批准的市售盐：阴离子乙酸盐、苯磺酸盐 (besylate/benzenesulfonate)、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、依地酸钙（乙二胺四乙酸盐）、樟脑磺酸盐 (camsylate/camphorsulfonate)、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、二盐酸盐、依地酸盐（乙二胺四乙酸盐）、乙二磺酸盐（1,2-乙烷二磺酸盐）、依托酸盐 (estolate)（十二烷基硫酸盐）、乙磺酸盐（乙烷磺酸盐）、反丁烯二酸盐、葡庚糖酸盐（葡萄糖酸盐）、葡糖酸盐、谷氨酸盐、乙内酰胺苯胂酸盐（乙二醇酰胺苯胂酸盐）、己基间苯二酚酸盐、海卓胺 (hydrabamine) (N,N'-二(脱氢松香基)-乙二胺)、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、羟乙磺酸盐（2-羟基乙烷磺酸盐）、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、杏仁酸盐、甲磺酸酯（甲烷磺酸盐）、甲基溴、甲基硝酸盐、甲基硫酸盐、粘液酸盐、萘磺酸盐（2-萘磺酸盐）、硝酸盐、双羟萘酸盐（恩波酸盐 (embonate)）、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、丹宁酸盐 (tannate)、酒石酸盐、茶氯酸盐（8-氯茶酸盐）和三乙基碘；有机阳离子苯乍生 (benzathine) (N,N'-二苄基乙二胺)、氯普鲁卡因 (chlorprocaine)、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺（N-甲基葡萄糖胺）和普鲁卡因；和金属阳离子铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌。

[0046] 伯奇另外列举了以下未经 FDA 批准的市售（美国外部）盐：阴离子己二酸盐、海藻酸盐、氨基水杨酸盐、脱水亚甲基柠檬酸盐、槟榔碱、天冬氨酸盐、硫酸氢盐、丁基溴、樟脑酸盐、二葡萄糖酸盐、二氢溴酸盐、二琥珀酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、氢氟酸盐、氢碘酸盐、亚甲基双（水杨酸盐）、萘二磺酸盐（1,5-萘二磺酸盐）、草酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、苯乙基巴比妥酸盐、苦味酸盐、丙酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一烷酸盐；有机阳离子苄苯乙胺 (benethamine) (N-苄基苄乙基胺)、克立咪唑 (clemizole) (1-对氯-苄基-2-吡咯烷-1'-基甲基苯并咪唑)、二乙胺、哌嗪和缓血酸胺（三(羟甲基)氨基甲烷）；和金属阳离子钡和铋。

[0047] 如本文中所示，“药学上可接受的载剂”是指与接收者个体（人类）相容并且适用于将活性剂传递到目标部位而不终止药剂的活性的物质。与载剂相关的毒性或不良作用（若存在）优选与合理的活性剂预定用途的风险/效益比相称。

[0048] 适用于本发明方法的药物组合物可以通过所属领域中众所周知的方法制造，尤其例如常规粒化、混合、溶解、封装、冻干或乳化方法。组合物可以各种形式产生，包括颗粒、沉淀物或微粒、粉末（包括冷冻干燥粉末、旋转干燥粉末或喷雾干燥粉末）、非晶形粉末、片剂、胶囊、糖浆、栓剂、注射剂、乳液、酞剂、悬浮液或溶液。调配物可以含有稳定剂、pH 调节剂、表面活性剂、增溶剂、生物可用性修饰剂和这些物质的组合。

[0049] 可用于这些组合物中的药学上可接受的载剂包括离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白（例如人类血清白蛋白）、缓冲物质（例如磷酸盐或碳酸盐）、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质（例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐）、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、

聚乙二醇和羊毛脂。

[0050] 这些药物组合物经调配用于向人类投与药物。所述组合物可以经口、非经肠、通过吸入喷雾、局部、经直肠、经鼻、经颊、经阴道或通过植入式贮器投与。如本文中所述的术语“非经肠”包括皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。在一些实施例中，经口、静脉内或皮下投与组合物。在一些实施例中，经口投与组合物。在一些实施例中，静脉内投与组合物。这些调配物可以设计成短效、快速释放或长效。此外，可以局部而非全身性方式投与组合物，例如投与（例如，通过注射）在肿瘤部位。

[0051] 可以使用例如油、水、醇和这些物质的组合等液体以液体悬浮液或溶液形式制备药物调配物。可以包括例如环糊精等增溶剂。可以添加药学上合适的表面活性剂、悬浮剂或乳化剂以便经口或非经肠投药。悬浮液可以包括油，例如花生油、芝麻油、棉籽油、玉米油和橄榄油。悬浮液制剂还可以含有脂肪酸酯，例如油酸乙酯、十四烷酸异丙酯、脂肪酸甘油酯和乙酰化脂肪酸甘油酯。悬浮液调配物可以包括醇，例如乙醇、异丙醇、十六醇、甘油和丙二醇；醚，例如聚（乙二醇）；石油烃，例如矿物油和矿脂；以及水。

[0052] 这些药物组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性悬浮液。这些悬浮液可以根据所属领域中已知的技术使用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂来调配。无菌可注射制剂也可以是在无毒非经肠可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液，例如呈在 1,3-丁二醇中的溶液形式。可以采用的可接受媒剂和溶剂是水、林格氏溶液 (Ringer's solution) 和等张氯化钠溶液。此外，按惯例使用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。出于这个目的，可以采用任何温和的不挥发性油，包括合成的单酸甘油酯或二酸甘油酯。例如油酸等脂肪酸和其甘油酯衍生物如天然的药学上可接受的油（例如橄榄油或蓖麻油，尤其呈其聚氧乙基化形式）般适用于制备可注射剂。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂，例如羧甲基纤维素或通常用于调配药学上可接受的剂型（包括乳液和悬浮液）的类似分散剂。为了调配的目的，还可以使用其它常用表面活性剂（例如吐温 (Tween)、司盘 (Span)）和其它常用于制造药学上可接受的固体、液体或其它剂型的乳化剂或生物可用性增强剂。可以将化合物调配成通过注射，例如通过快速注射或连续输注进行非经肠投药。用于注射的单位剂型可以在安瓿中或在多剂量容器中。

[0053] 这些药物组合物可以按任何经口可接受剂型经口投与，所述剂型包括胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液。当为了经口用途需要水性悬浮液时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂组合。必要时，还可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。对于以胶囊形式经口投药，适用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。在用于经口使用的片剂的情况下，常用载剂包括乳糖和玉米淀粉。通常也添加例如硬脂酸镁等润滑剂。可以出于各种目的使用包衣，例如为了掩盖味道、为了影响溶解或吸收部位，或为了延长药物作用。可以向片剂或适用于胶囊的颗粒状粒子涂覆包衣。

[0054] 或者，可以用于经直肠投药的栓剂形式投与这些药物组合物。这些栓剂可以通过将药剂与合适的非刺激性赋形剂混合来制备，所述赋形剂在室温下是固体，但在直肠温度下是液体并且因此将在直肠中熔融以释放药物。所述物质包括可可脂、蜂蜡以及聚乙二醇。

[0055] 这些药物组合物还可以局部投与，尤其当治疗目标包括通过局部涂覆可容易到达的区域或器官时，所述治疗目标包括眼、皮肤或低位肠道的疾病。容易制备适合于这些区域

或器官中的每一个的局部调配物。

[0056] 可以直肠栓剂调配物（参见上文）或以合适的灌肠剂调配物实现对低位肠道的局部施用。也可以使用局部经皮贴片。关于局部施用，药物组合物可以含有悬浮或溶解于一或多种载剂中的活性组分的合适软膏形式调配。用于局部投与本发明化合物的载剂包括矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者，药物组合物可以含有悬浮或溶解于一或多种药学上可接受的载剂中的活性组分的合适洗剂或乳膏形式调配。合适的载剂包括矿物油、山梨醇酐单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苜醇和水。

[0057] 关于眼用用途，药物组合物可以经调配为于等张 pH 值调节无菌生理食盐水中的微粒化悬浮液，或优选地调配为于等张 pH 值调节无菌生理食盐水中的溶液，其具有抑或不具有防腐剂（例如氯苄烷铵）。或者，关于眼用用途，药物组合物可以软膏（例如矿脂）形式调配。

[0058] 药物组合物还可以通过经鼻气雾剂或吸入投与。所述组合物根据药物调配领域中众所周知的技术制备，并且可以采用苜醇或其它合适的防腐剂、增强生物可用性的吸收促进剂、碳氟化合物和 / 或其它常规增溶剂或分散剂，以在生理食盐水中的溶液形式制备。

[0059] 本发明方法是针对治疗以下疾病、病症和病状：其中 RAF 和 MEK 活性的抑制对患病细胞或组织的存活和 / 或扩增不利（例如，细胞对所述抑制敏感；抑制所述活性破坏了疾病机制；降低所述活性使作为疾病机制抑制剂的蛋白质稳定；降低所述活性引起作为疾病机制活化剂的蛋白质的抑制）。本发明方法尤其适用于治疗癌症。如本文中所述的术语“癌症”是指一种细胞病症，其特征为不受控制或失调的细胞增殖、降低的细胞分化、不适当地侵袭周围组织的能力和 / 或在异位位点形成新的生长的能力。术语“癌症”包括实体肿瘤和血源性肿瘤。术语“癌症”涵盖皮肤、组织、器官、骨、软骨、血液和血管的疾病。术语“癌症”还涵盖原发性和转移性癌症。

[0060] 在一些实施例中，癌症是非 BRAFV600E 黑素瘤。在一些实施例中，癌症是 NRAS 突变体黑素瘤。在一些实施例中，癌症是 BRAF 野生型黑素瘤。在一些实施例中，癌症是 BRAF 野生型 NRAS 突变体黑素瘤。

[0061] 为了更充分理解本发明，阐述以下实例。这些实例仅仅是说明性的并且并不打算以任何方式限制本发明的范围。

[0062] 实例

[0063] 实例 1. 体外细胞活力分析。

[0064] 所述分析测量细胞活力的标记 ATP 浓度。CellTiter-Glo[®] 发光细胞活力分析（普洛麦格，威斯康星州麦迪逊（Promega, Madison, WI））是用于基于所存在的 ATP 的数量确定培养物中活细胞数量的匀相测定法。实验方案使用聚-D-赖氨酸 BioCoat[™] 黑色 / 透明 384 板（百克顿 - 迪金森公司，新泽西州富兰克林湖（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ））。SK-Mel-2 株系获自 ATCC（美国典型培养物保藏中心，弗吉尼亚州马纳萨斯（American Type Culture Collection, Manassas, VA）），而 SK-Mel-30、IPC-298 和 Mel-Juso 株系获自 DSMZ（德国微生物菌种保藏中心，德国不伦瑞克（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Brunswick, Germany））。将来自所述株系中的一者的细胞悬浮液添加到每一块板的孔中（25 微升 / 孔），将板培育（37°C，6% CO₂）

过夜或最多 24 小时。将适当的抑制剂以不同浓度溶解于 DMSO 中并且使用 Echo (拉伯赛特公司, 加利福尼亚州森尼维耳 (Labcyte, Sunnyvale, CA)) 液体处置系统传递到所述孔中。培育 (37°C, 6% CO₂) 所述板 72 小时。添加在室温下平衡的 CellTiter-Glo[®] 试剂 (25 微升 / 孔)。在培育 10 分钟之后, 使用 PHERAstar (BMG 莱伯泰科公司, 德国奥滕伯格 (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany)) 测量细胞活力 (发光)。

[0065] 统计分析。

[0066] 标准化。通过按比例调整数据以使得阴性对照的中值是 0 并且阳性对照的中值是 100, 分别对每一块板的活力数据进行标准化。更正式地讲,

[0067]

$$V_i = 100 \frac{U_i - \text{中值}(U_-)}{\text{中值}(U_+) - \text{中值}(U_-)}$$

[0068] 其中 V_i 是第 i 个孔的经标准化活力, U_i 是所测量的原始活力, 中值 (U_-) 是阴性对照的中值, 并且中值 (U_+) 是阳性对照的中值。在标准化之后, 舍弃对照。

[0069] 反应表面模型和拟合。使用反应表面模型来描述标准化活力与化合物浓度之间的关系。对于指定板, 使得

$$[0070] \quad C = (C_A/I_1) + (C_B/I_2)$$

$$[0071] \quad x = (C_A/I_1)/C$$

$$[0072] \quad E_{\max} = E_1 + E_2x + E_3x^2 + E_4x^3$$

$$[0073] \quad I = 1 + I_3x(1-x)$$

$$[0074] \quad S = S_1 + S_2x + S_3x^2 + S_4x^3$$

$$[0075] \quad V = 100 - E_{\max} (1 + (I/C)^S)^{-1} + \text{误差}$$

[0076] 其中 $E_1, E_2, E_3, E_4, I_1, I_2, I_3, S_1, S_2, S_3$ 和 S_4 是参数, C_A 和 C_B 是化合物 A 和 B 的相应浓度, 并且 V 是标准化活力量度。假定误差值是独立同分布的正态随机变量。此模型是希尔方程 (Hill equation) (A. V. 希尔 (A. V. Hill), 生理学杂志 (J. Physiol.), 1910, 40, iv-vii) 的延伸, 希尔方程常用于对单一化合物的作用进行建模。使用最大似然法, 用统计软件程序 R, R 发展核心团队 (2008) (R: 一种用于统计计算的语言和环境 (R: A language and environment for statistical computing)). 用于统计计算的 R 基础 (R Foundation for Statistical Computing), 奥地利维也纳 (Vienna, Austria). ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 使所述数据与此模型拟合。

[0077] 质量检查。向所述板施加三类质量检查。首先, 据检查, 阳性对照的变化和阴性对照的平均值较小。接着, 据检查, 新数据与来自先前单一化合物实验的数据一致。最后, 分析反应表面拟合的残差以确保残差平方和足够小。

[0078] 所有这些质量检查都是基于数字阈值来做出通过 / 失败决策, 并且对于实验中的所有板使用相同阈值。如果一块板在质量检查中的任一者中失败了, 那么从所述分析中去除所述板。

[0079] 测量协同作用。使用组合指数 (M. C. 贝伦鲍姆 (M. C. Berenbaum), 理论生物学杂志 (J. Theor. Biol.), 1985, 114, 413-431) 作为化合物协同作用的量度。基于等效线图计算组合指数, 等效线图是一片具有恒定活力的剂量反应表面。关于本发明分析, 使用 50% 等效线图, 这是具有 50% 活力的剂量等值线。将 $EC50_A$ 和 $EC50_B$ 定义为具有 50% 活力的单独抑

制剂（表示为化合物 A 和 B）的相应剂量。针对沿着 50% 等效线图的一个点 (D_A, D_B)，组合指数定义为 $(D_A/EC50_A) + (D_B/EC50_B)$ 。因为 (D_A, D_B) 的选择可以是任意的，所以使用约束条件 $D_A/D_B = EC50_A/EC50_B$ 。如果组合指数小于 0.7，那么其表明 50% 等效线图曲线朝内，并且药物组合是协同的。反之，如果组合指数大于 1，那么 50% 等效线图曲线朝外，表明拮抗作用。

[0080] 实例 2. 体外细胞生长抑制分析：

[0081] 这些分析显示出组合使用 TAK-632 和 TAK-733 抵抗人类黑素瘤细胞菌株 HMCB、HMV II、GAK 和 SK-MEL-2 的作用，这些菌株据报导是 NRAS 突变。

[0082] 将 100 μ l 人类黑素瘤细胞 (HMCB、SK-MEL-2 (购自 ATCC)、GAK (购自健康科学资源库 (Health Science Research Resources Bank ;HSRRB)) 和 HMV II (购自欧洲细胞培养物保藏中心 (European Collection of Cell Culture ;ECACC))) 的细胞悬浮液接种在 96 孔板中 (接种细胞数量 :HMV II 3000 个细胞 / 孔 ;SK-MEL-2 2000 个细胞 / 孔 ;HMCB 1000 个细胞 / 孔 ;GAK 3000 个细胞 / 孔)，并且在 5% 二氧化碳气体培育箱中在 37°C 下培养。第二天，将含有测试化合物 (TAK-632 和 TAK-733) 的溶液 (经制备以使得最终浓度是表 2 中所示的浓度组合) 以 100 μ l 的量添加到 96 孔板的每一个孔中，并且将此再培养 3 天。在培养 3 天之后，从 96 孔板的孔中移出含有测试化合物的溶液，并且使用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤。在洗涤之后，向每一个孔中添加 50% 三氯乙酸盐溶液以便产生 10% (v/v) 的最终浓度，并且使其在 4°C 下静置过夜。在静置过夜之后，以 50 微升 / 孔的量添加溶解于 1% 乙酸盐中的 0.4% SRB (w/v) 溶液，并且固定并染色细胞蛋白质 (斯凯恩 (Skehan) 等人，美国国立癌症研究所杂志 (Journal of the National Cancer Institute)，第 82 卷，第 1107 页 - 第 1112 页，1990)。在染色之后，用 200 微升 / 孔的 1% 乙酸溶液将板孔洗涤 3 次，之后向每一个孔中添加 100 μ l 萃取物 (10mM tris 缓冲液)，并且获得颜色萃取物。测量所得颜色萃取物的吸光度 (波长 550nm)。每一种浓度组合在 3 个孔中进行此研究。

[0083] 使用如上所述测量的吸光度，从下式计算所测量的生长抑制率。所测量的生长抑制率 (%) = $(1 - \text{添加了测试化合物的组的吸光度} / \text{对照组吸光度}) \times 100$

[0084] 另外，通过以下方法计算理论生长抑制率。将未添加测试化合物的对照组的蛋白质质量定为 1，计算经化合物处理组的蛋白质质量，并且基于布利斯独立模型 (Bliss Independence Model) (布利斯，C. I.，细菌学评论 (Bacteriol. Rev.) 20, 243-258 (1956)) 和洛伊相加模型 (Loewe Additive Model) (洛伊，S.，药物研究进展 (Arzneimittelforschung) 3, 285-290 (1953))，从每一个蛋白质质量确定理论抑制率。

[0085] 看到了关于所有细胞菌株的当两种化合物 TAK-632 和 TAK-733 组合时，所测量的生长抑制率大于理论抑制率的情况，表明了 TAK-632 和 TAK-733 的协同生长抑制作用。

[0086] 为了判断组合的作用，使用组合指数 (CI) (周，T. C. (Chou, T. C.) 和塔拉利，P. (Talalay, P.)，生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 252, 6, 438-6442 (1977)) 进行研究。其结果是，所有细胞的 CI 值是 0.5 或 0.5 以下，并且看到了 TAK-632 和 TAK-733 的协同生长抑制作用 (表 3)。另外，当基于 CI 值对所测量的值进行双向协方差分析时，在所有细胞菌株中，当 TAK-632 和 TAK-733 组合时的生长抑制作用显著高于 ($p < 0.01$) 当每一种化合物单独使用时的生长抑制作用。

[0087] 根据这些结果，说明了当泛 RAF 抑制剂 TAK-632 和 MEK 抑制剂 TAK-733 组合用于具有 NRAS 突变的黑素瘤细胞菌株中时，获得了显著协同的细胞生长抑制作用 (表 3)。

[0088] 表 2

[0089]

细胞系	TAK-632 (nmol/L)	TAK-733 (nmol/L)
HMV II	0、3、10、30、100、300	0、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000
SK-MEL-2	0、10、30、100、300、1000	0、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000
HMCB	0、30、100、300、1000、3000	0、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000
GAK	0、30、100、300、1000、3000	0、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000

[0090] 表 3

[0091]

细胞系	混合指数	混合作用
HMVII	0.404	协同作用
SK-MEL-2	0.313	协同作用
HMCB	0.263	协同作用
GAK	0.234	协同作用

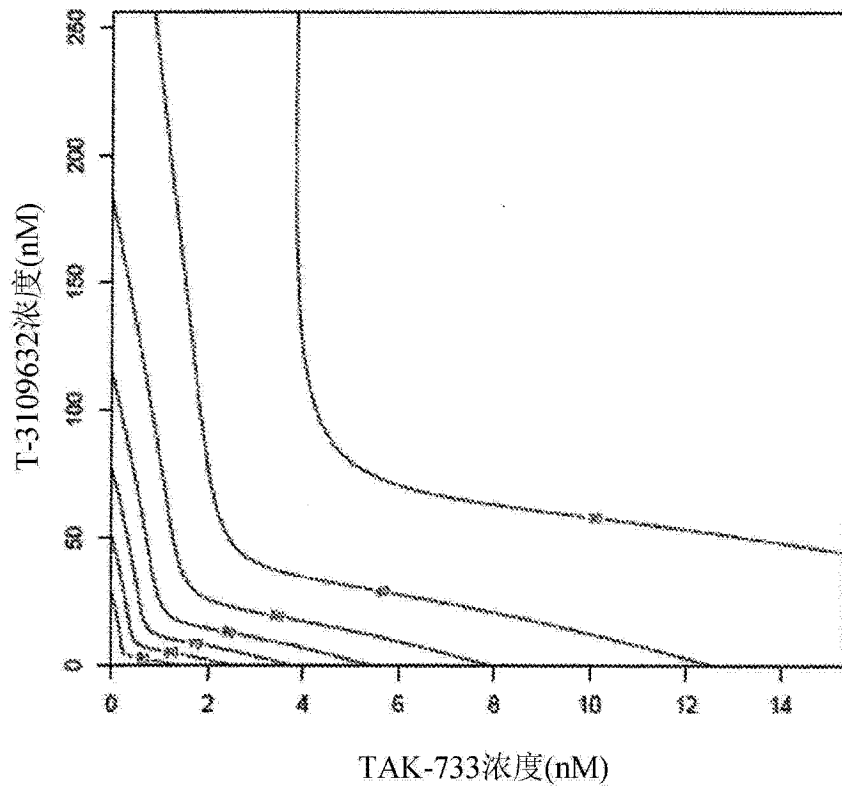


图 1. TAK-632 (T-3109632)+TAK-733 于 SK-Me1-30 中

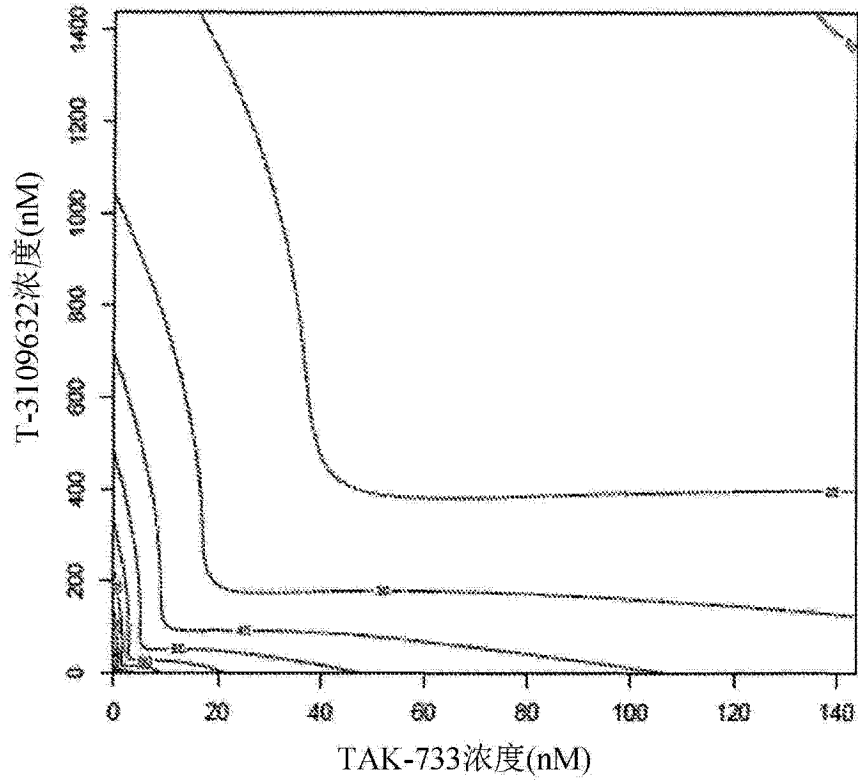


图 2. TAK-632 (T-3109632) + TAK-733 于 SK-Mel-2 中

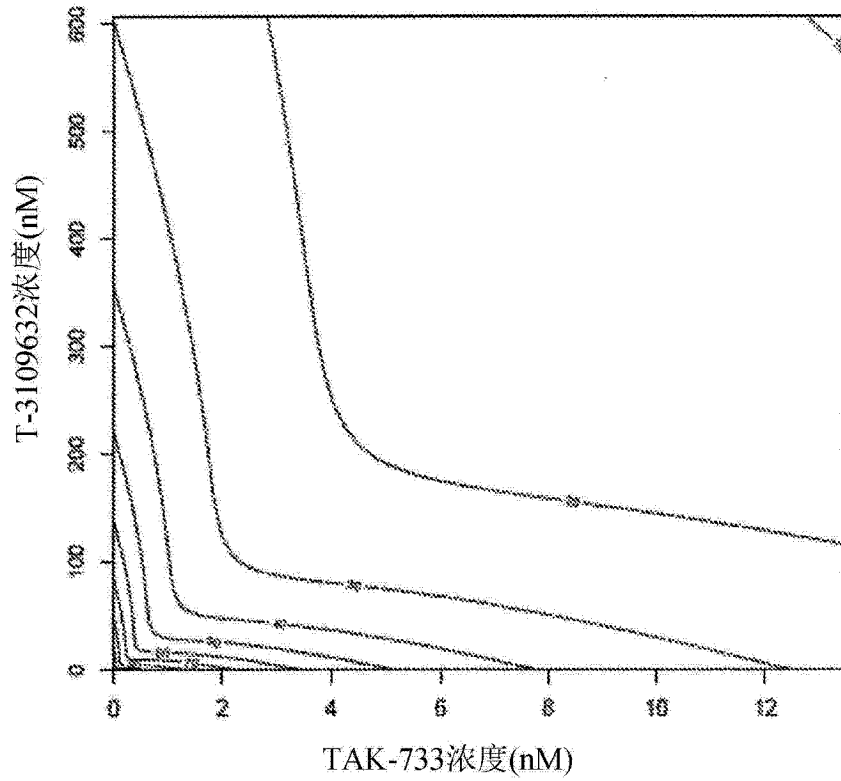


图 3. TAK-632 (T-3109632) + TAK-733 于 IPC-298 中

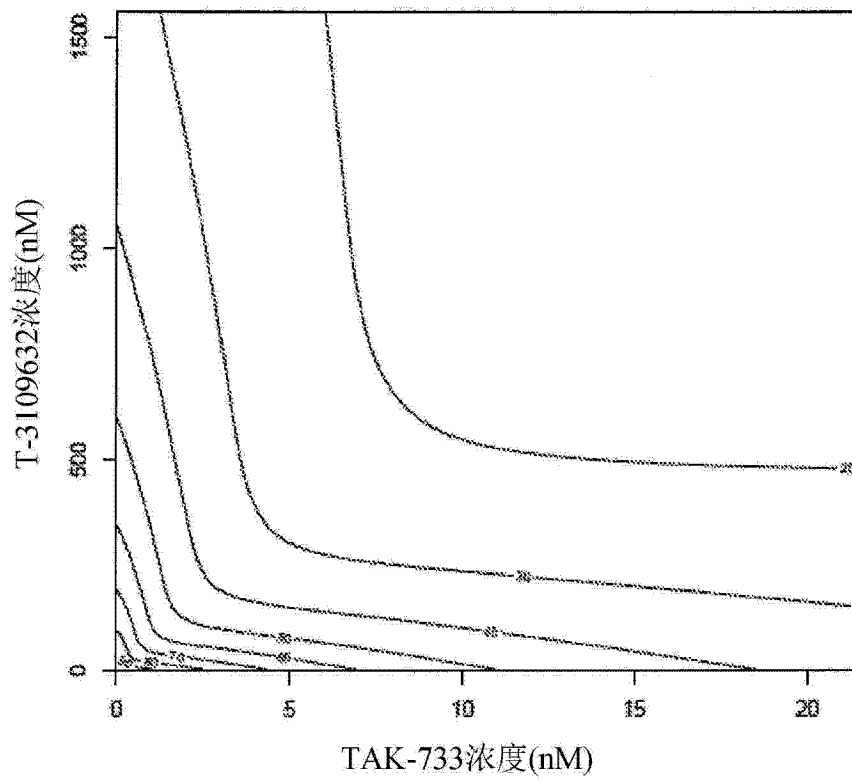


图 4. TAK-632 (T-3109632) +TAK-733 于 MEL-JUS0 中

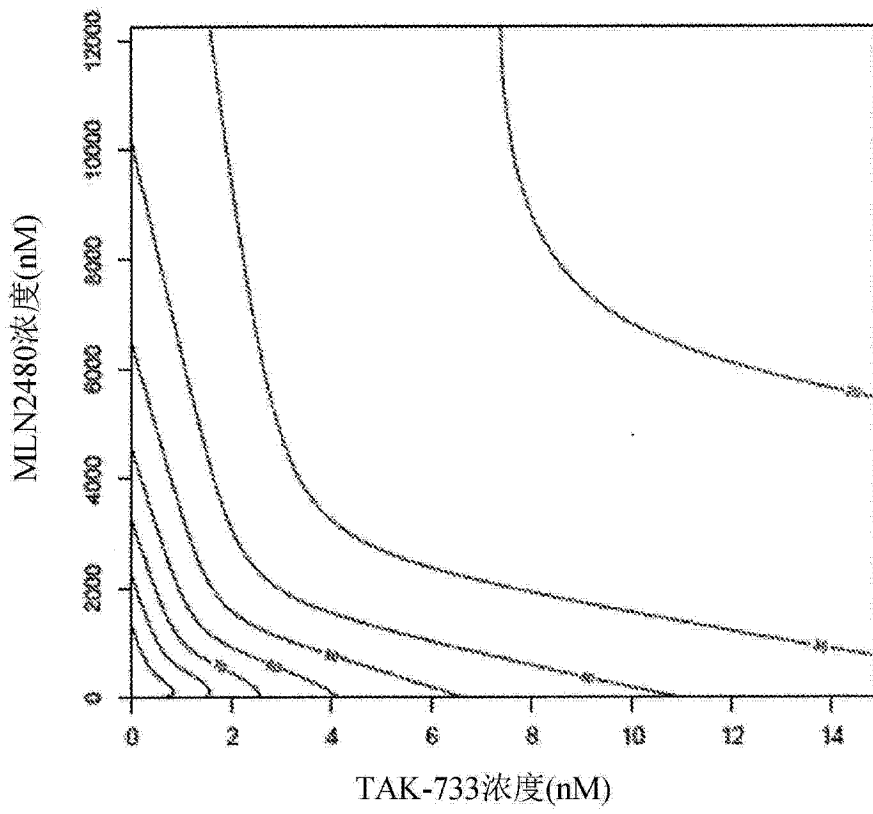


图 5. MLN2480+TAK-733 于 SK-Mel-30 中

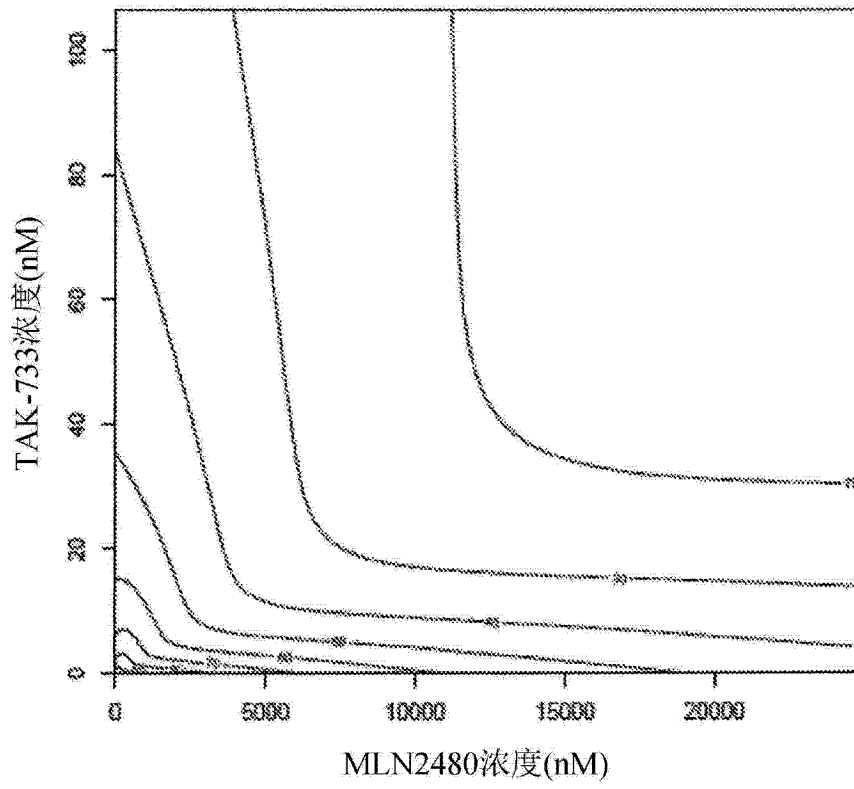


图 6. MLN2480+TAK-733 于 SK-Me1-2 中

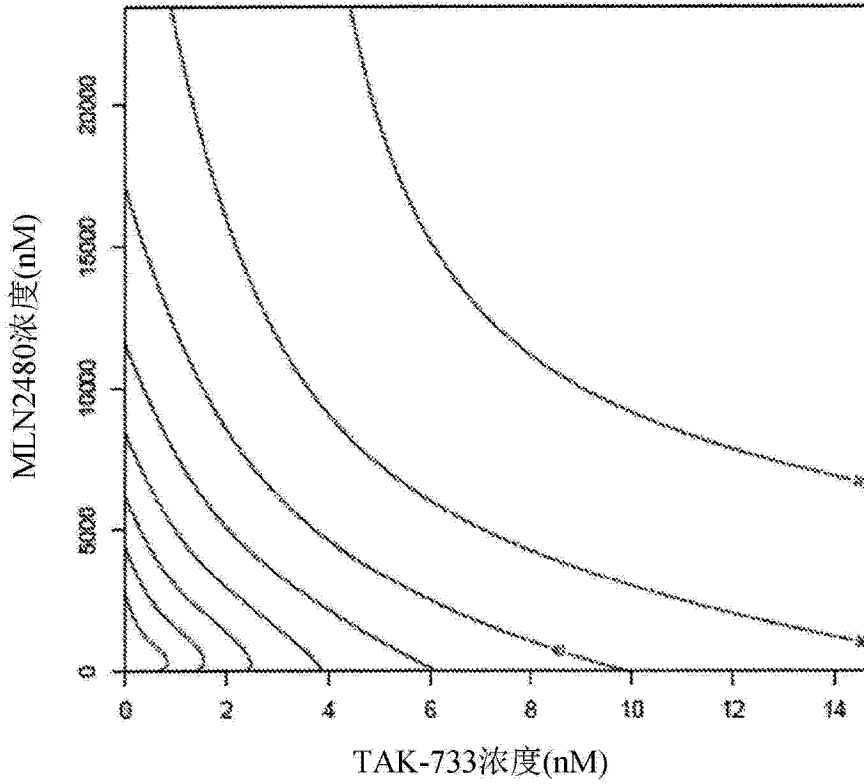


图 7. MLN2480+TAK-733 于 IPC-298 中