



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102958523 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201180030568. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 06. 23

A61K 31/4427(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/4545(2006. 01)

2010-145030 2010. 06. 25 JP

A61K 31/47(2006. 01)

2010-273921 2010. 12. 08 JP

A61K 31/496(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 耿胜燕

2012. 12. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/064430 2011. 06. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/162343 JA 2011. 12. 29

(73) 专利权人 卫材 R&D 管理有限公司

地址 日本东京都

(72) 发明人 中川学之 松嶋知广 船桥泰博

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军 王大方

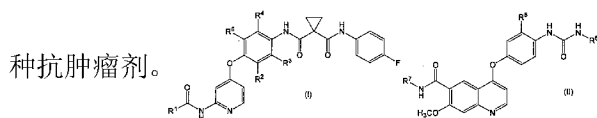
权利要求书2页 说明书14页 附图3页

(54) 发明名称

使用具有激酶抑制作用的组合的抗肿瘤剂

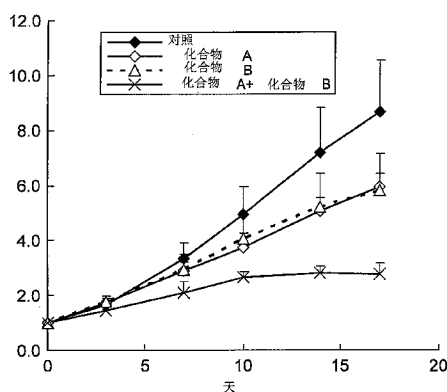
(57) 摘要

在此披露了一种用于联合使用化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐以及化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐的一种抗肿瘤剂。



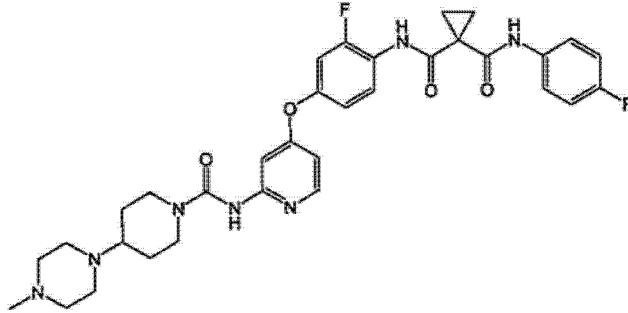
该抗肿瘤剂与上述化合物中的每一个单独使用的情况相比表现出优异的抗肿瘤效果。此外该抗肿瘤剂表现出针对不同癌症类型的抗肿瘤效果。

(在这些化学式中, R¹表示氮杂环丁烷基或类似物, R²至 R⁵各自表示一个氢原子或卤素原子, R⁶表示 C₃₋₈环烷基或类似物, R⁷表示一个氢原子或类似物, 并且 R⁸表示一个卤素原子或类似物)。



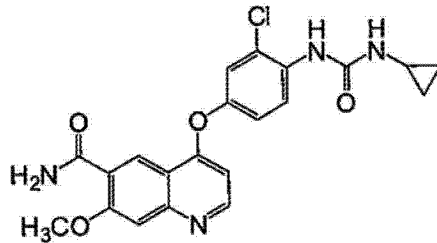
1. 一种用于联合使用以下项的抗肿瘤剂：

N-(2-氟-4-{{2-({[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基}氨基)吡啶-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺或其药学上可接受的盐：



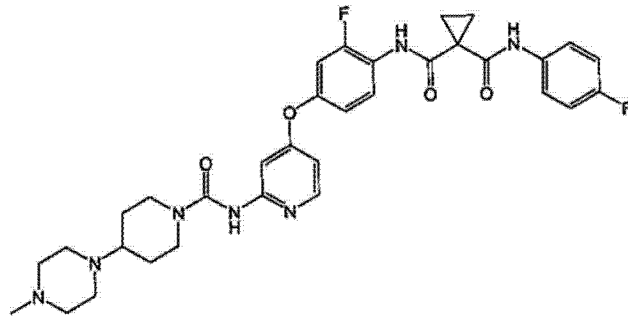
和

4-[3-氯-4-(环丙基氨基羰基)氨基苯氧基]-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺或其药学上可接受的盐：



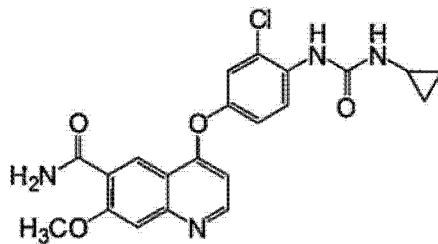
2. 一种用于同时或分开给予以下项的抗肿瘤剂：

N-(2-氟-4-{{2-({[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基}氨基)吡啶-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺或其药学上可接受的盐：



和

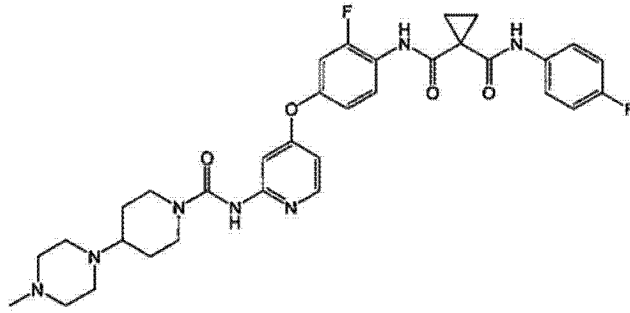
4-[3-氯-4-(环丙基氨基羰基)氨基苯氧基]-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺或其药学上可接受的盐：



3. 一种抗肿瘤剂,包含：

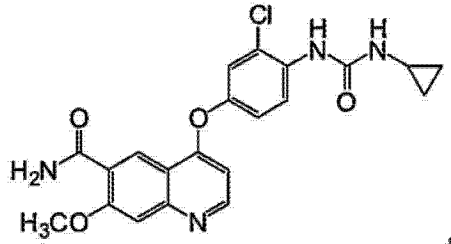
N-(2-氟-4-{{2-({[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基}氨基)吡啶-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺或其药学上可接受的盐：

氧基 } 苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺或其药学上可接受的盐:



和

4-[3-氯-4-(环丙基氨基羰基)氨基苯氧基]-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺或其药学上可接受的盐:



使用具有激酶抑制作用的组合的抗肿瘤剂

[0001] 发明名称

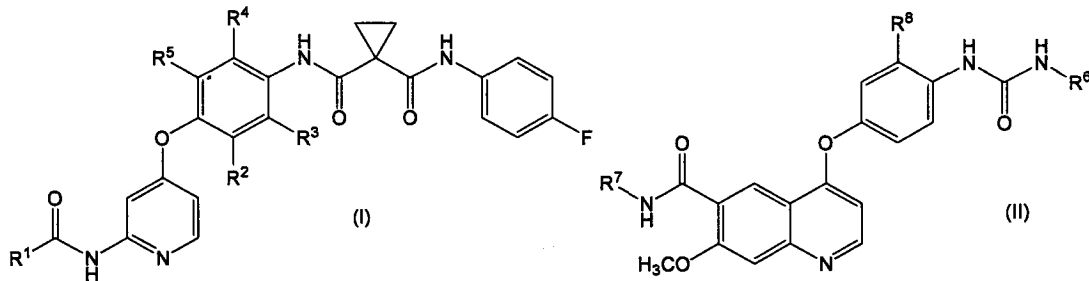
[0002] 使用具有激酶抑制作用的组合的抗肿瘤剂

技术领域

[0003] 本发明涉及一种用于联合使用具有激酶抑制作用的多种化合物的抗肿瘤剂。特别地,本发明涉及一种用于联合使用具有 HGFR 激酶抑制作用的化合物以及一种具有多酪氨酸激酶抑制剂作用的抗肿瘤剂。

背景技术

[0004]



[0005] 其中 R¹ 是氮杂环丁烷基以及类似物, R² 至 R⁵ 是一个氢原子或卤素原子, R⁶ 是 C₃₋₈ 环烷基以及类似物, R⁷ 是一个氢原子以及类似物, 并且 R⁸ 是一个卤素原子以及类似物。

[0006] 由化学式 (I) 表示的化合物具有潜在的针对肝细胞生长因子受体 (HGFR) 的抑制作用, 并且因此作为一种抗肿瘤剂, 一种血管生成抑制剂, 以及一种肿瘤转移抑制剂 (专利文献 1) 是有用的。已知 HGFR 在大量肿瘤细胞中被过量表达 (非专利文献 1) 并且涉及肿瘤的恶变。此外, HGFR 在血管的内皮细胞中表达, 并且被认为通过促进血管发生而引起了肿瘤的增殖。

[0007] 另一个方面, 由化学式 (II) 表示的化合物具有抗血管形成的作用 (专利文献 2), 针对许多被报告涉及肿瘤的恶变的酪氨酸激酶 (非专利文献 3 至 5) 的抑制作用 (专利文献 3 至 6), 等作用; 并且已知是不同肿瘤的治疗剂, 这些肿瘤例如甲状腺癌、肺癌、黑色素瘤、子宫内膜癌、胃癌以及膀胱癌。

[0008] 总体而言, 抗肿瘤剂在它们单独施用时常并非对于所有的患者都有效。因此, 到目前为止已经进行了尝试来通过组合多种抗肿瘤剂增加治愈率 (专利文献 7 至 9)。

[0009] 引用清单

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献 1 :WO 2007/023768

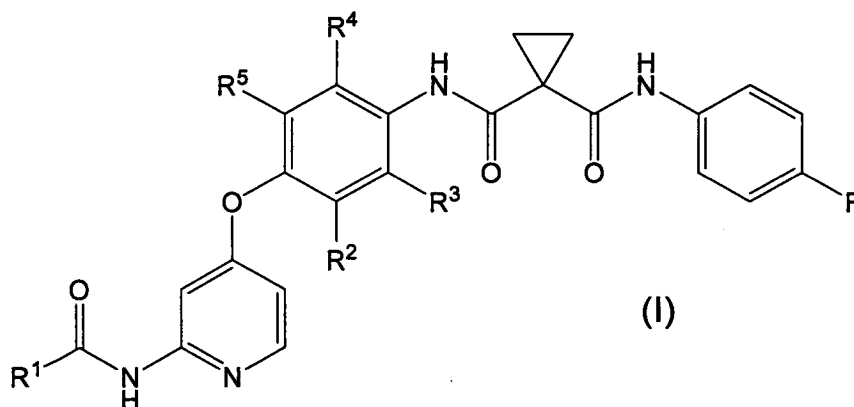
[0012] 专利文献 2 :WO 2002/032872

[0013] 专利文献 3 :WO 2004/080462

[0014] 专利文献 4 :WO 2007/061130

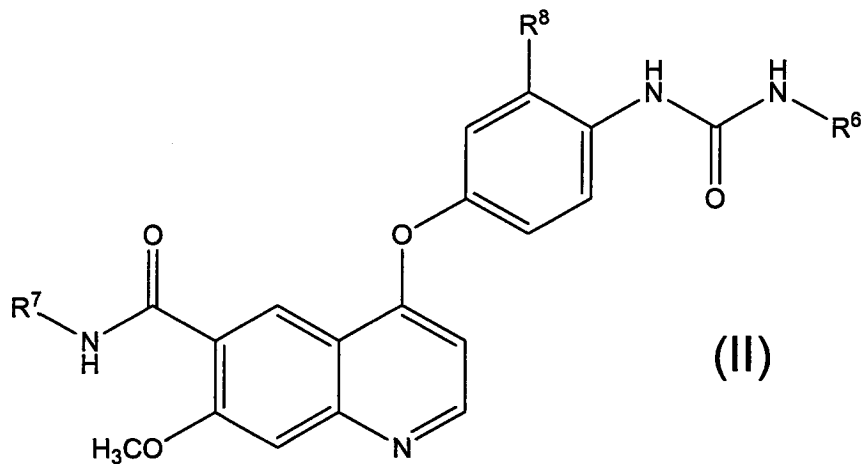
[0015] 专利文献 5 :WO 2007/136103

- [0016] 专利文献 6 :WO 2008/026748
 [0017] 专利文献 7 :WO 2009/140549
 [0018] 专利文献 8 :美国专利申请号 2004-259834
 [0019] 专利文献 9 :美国专利号 6217866
 [0020] 非专利文献
 [0021] 非专利文献 1 :肿瘤学报告 (Oncology Reports), 5, 1013-1024, 1998。
 [0022] 非专利文献 2 :癌症研究进展 (Advances in Cancer Research), 67, 257-279, 1995。
 [0023] 非专利文献 3 :癌症药靶研究最新进展 (Current Cancer Drug Targets), 6, 65-75, 2006。
 [0024] 非专利文献 4 :自然综述, 癌症 (Nature Reviews, Cancer), 10, 116-129, 2010。
 [0025] 非专利文献 5 :临床癌症研究 (Clinical Cancer Research), 15, 7119-7123, 2009。
 [0026] 发明概述
 [0027] 技术问题
 [0028] 然而, 目前已经报告的通过组合多种抗肿瘤剂获得的疗效是不够的, 并且因此期望一种使用多种抗肿瘤剂的新颖的联合疗法的发展。
 [0029] 问题的解决方案
 [0030] 鉴于此类情况, 本发明的诸位发明人集中研究发现了对于一位患有肿瘤的患者给予由化学式 (I) 和化学式 (II) 表示的化合物的一种组合获得了出人意料地优异抗肿瘤效果, 由此完成了本发明。
 [0031] 即, 本发明提供了以下 [1] 至 [8]。
 [0032] [1] 一种用于联合使用以下项的抗肿瘤剂:
 [0033] 一种由化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐:
 [0034]



- [0035] 其中 R^1 是氮杂环丁烷基、哌啶基、或一个化学式 $-NR^{11a}R^{11b}$, 它们各自任选地具有一个选自取代基组 A 的取代基, 其中 R^{11a} 和 R^{11b} 是相同或不同的并且各自是一个氢原子, C_{1-6} 烷基或任选地具有 C_{1-6} 烷基的哌啶基,
 [0036] 取代基组 A 由羟基、任选地具有甲基的哌嗪基、以及任选地具有二甲氨基的氮杂环丁烷基组成, 并且
 [0037] R^2 至 R^5 是相同或不同的并且各自是一个氢原子或氟原子; 以及
 [0038] 一种由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐:

[0039]



[0040] 其中 R^6 是 C_{1-6} 烷基或 C_{3-8} 环烷基,

[0041] R^7 是一个氢原子、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷氧基;并且

[0042] R^8 是一个氢原子、或一个卤素原子。

[0043] [2] 一种用于同时或分开给予由以上化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐以及由以上化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐的抗肿瘤剂。

[0044] [3] 一种抗肿瘤剂,包括由以上化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐以及由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0045] [4] 与一种由以上化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐联合使用的一种由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐用于治疗一种肿瘤。

[0046] [5] 与一种由以上化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐联合使用的一种由化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐用于治疗一种肿瘤。

[0047] [6] 一种治疗肿瘤的方法,其中对一种由以上化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐以及一种由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐联合使用。

[0048] [7] 一种药用组合物,包括一种由以上化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐,一种由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐,以及一种载体。

[0049] [8] 一种药盒,包括:

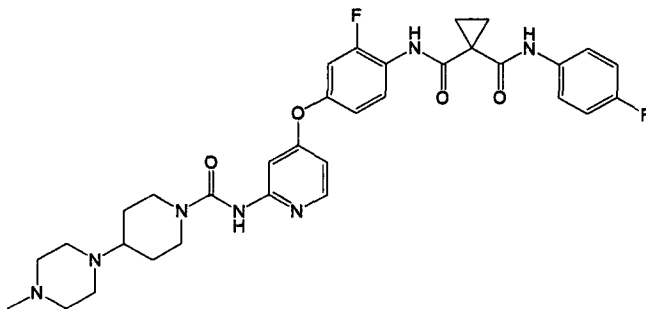
[0050] 一种药用组合物,该药用组合物包括一种由以上化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐以及一种载体;以及

[0051] 一种药用组合物,该药用组合物包括一种由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐;以及一种载体。

[0052] 由以上化学式 (I) 表示的化合物优选是选自下组的一种或多种化合物,该组由以下各项组成:

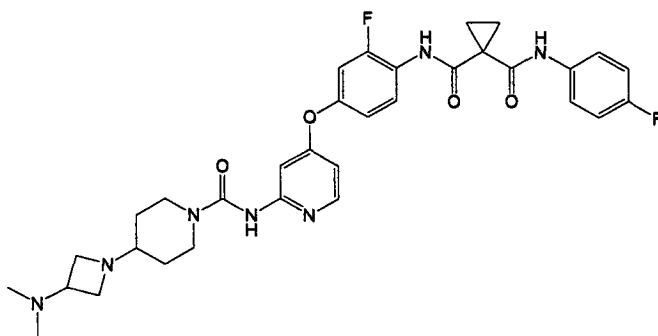
[0053] N-(2-氟-4-[[2-([4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基)氨基]吡啶-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺:

[0054]



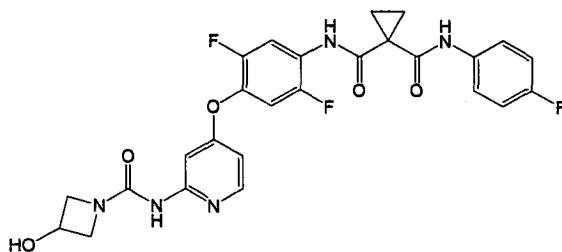
[0055] N-[4-({2-[(4-[3-(二甲基氨基)氮杂环丁烷-1-基]哌啶-1-基)羰基]氨基}吡啶-4-基)氧基)-2-氟苯基]-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺:

[0056]



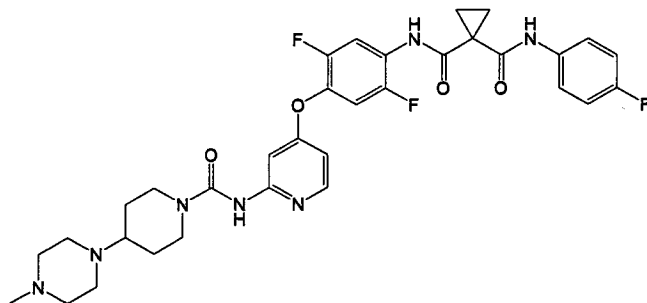
[0057] N-{2,5-二氟-4-[(2-[(3-羟基氮杂环丁烷-1-基)羰基]氨基}吡啶-4-基)氧基}苯基}-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺:

[0058]



[0059] N-{2,5-二氟-4-[(2-[[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基]氨基}吡啶-4-基)氧基}苯基}-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺:

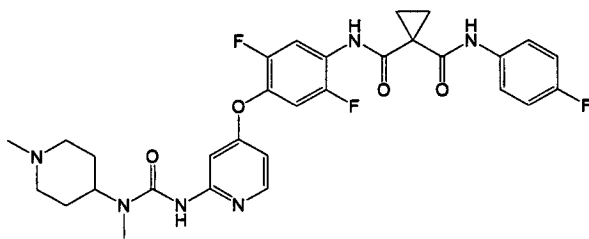
[0060]



[0061] 以及

[0062] N-(2,5-二氟-4-[[2-[(1-甲基哌啶-4-基)氨基]羰基]氨基}吡啶-4-基)氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺:

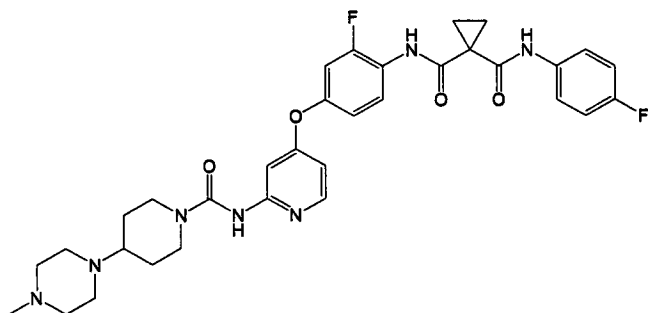
[0063]



[0064] 并且更优选地

[0065] N-(2-氟-4-[[2-([4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基)氨基]吡啶-4-基]氧基)苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺:

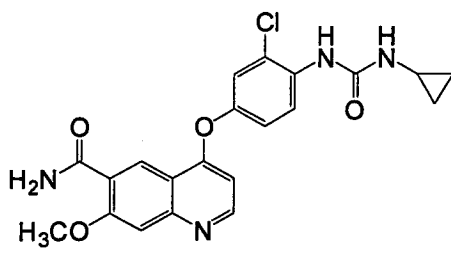
[0066]



[0067] 由以上化学式 (II) 表示的化合物优选是选自下组的一种或多种化合物, 该组由以下各项组成:

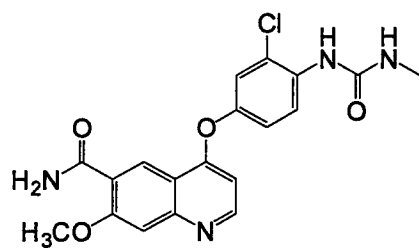
[0068] 4-[3-氯-4-(环丙基氨基羰基)氨基苯氧基]-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺:

[0069]



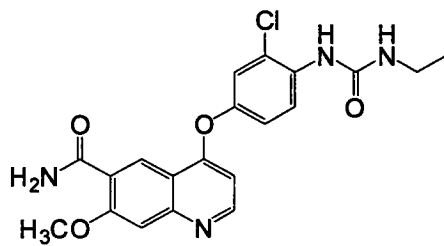
[0070] 4-[3-氯-4-(甲基氨基羰基)氨基苯氧基]-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺:

[0071]



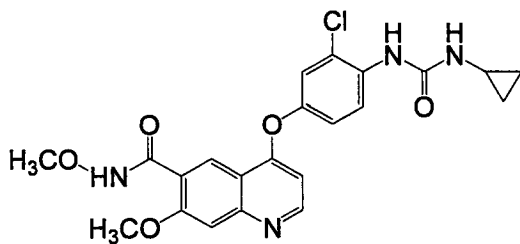
[0072] 4-[3-氯-4-(乙基氨基羰基)氨基苯氧基]-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺:

[0073]



[0074] N6-甲氧基-4-(3-氯-4-[[环丙基氨基]羰基]氨基)苯氧基-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺：

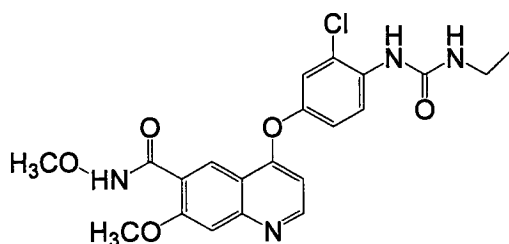
[0075]



[0076] 以及

[0077] N6-甲氧基-4-(3-氯-4-[[乙基氨基]羰基]氨基)苯氧基-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺：

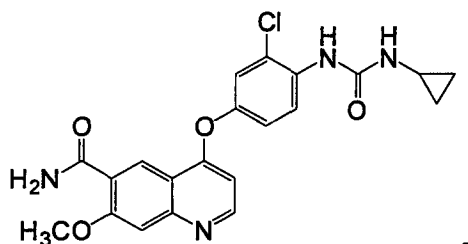
[0078]



[0079] 并且更优选地

[0080] 4-[3-氯-4-(环丙基氨基羰基)氨基苯氧基]-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺：

[0081]



[0082] 发明的有利效果

[0083] 本发明提供了一种用于联合使用具有 HGFR 激酶抑制作用的化合物以及一种具有多酪氨酸激酶抑制剂作用的化合物的抗肿瘤剂。此种抗肿瘤剂与它们单独使用的情况相比,表现出优异的抗肿瘤效果,并且表现出针对不同癌症类型的抗肿瘤效果。

[0084] 附图简要说明

[0085] 图 1 是展示了化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人恶性黑色素瘤细胞系 (SEKI) 的模型动物中的联合效果的图。

[0086] 图 2 是展示了化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人胰腺癌细胞系 (KP-4) 的模型动物中的联合效果的图。

[0087] 图 3 是展示了化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人胃癌细胞系 (IM95m) 的模型动物中的联合效果的图。

[0088] 图 4 是展示了化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人卵巢细胞系 (A2780) 的模型动物中的联合效果的图。

[0089] 图 5 是展示了化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人恶性胶质瘤细胞系 (U87MG) 的模型动物中的联合效果的图。

[0090] 实施方案的说明

[0091] 根据本发明由化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐可以通过专利文献 1 中说说明的方法来生产。此外,根据本发明由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐可以通过专利文献 2 中说说明的方法来生产。

[0092] 药学上可接受的盐的实例包括无机酸的盐、有机酸的盐、无机碱的盐、有机碱的盐以及酸性或碱性氨基酸的盐。

[0093] 无机酸的盐的优选实例包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸以及类似物的盐。有机酸的盐的优选实例包括乙酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、硬脂酸、苯甲酸、甲基磺酸、乙基磺酸、对甲苯磺酸、以及类似物的盐。

[0094] 有机碱的盐的优选实例包括碱金属盐,例如钠盐、钾盐;碱土金属盐,例如钙盐以及镁盐;铝盐;以及铵盐。优选的有机碱盐的实例包括二乙胺、二乙醇胺、甲基葡胺、N,N-二苄基乙二胺以及类似物的盐。

[0095] 酸性氨基酸盐的优选实例包括天冬氨酸盐、谷氨酸盐以及类似物的盐。碱性氨基酸盐的优选实例包括精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸以及类似物的盐。

[0096] 尤其优选的药学上可接受的盐是有机酸的盐。

[0097] 本发明的抗肿瘤剂可以口服给予,以固体配制品的形式,例如片剂、料粒、精细料粒、粉末或胶囊,或以液体的形式,例如果冻、糖浆或类似物。

[0098] 此外,本发明的抗肿瘤剂可以胃肠外给予,以注射、栓剂、软膏、泥敷剂或类似方法的形式。

[0099] 可以对由化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐的剂量进行适当地选择,取决于症状的程度、患者的年龄、性别以及体重、给药的敏感性、途径、时间以及间隔的差异、药物配制品的类型、和 / 或类似物。通常,在对于成人进行口服给药的情况下 (60kg 体重),该剂量是每天 10 至 6000mg,优选 50 至 4000mg。这可以同时给予,或分开地每天 2 或 3 次给予。

[0100] 由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐的剂量可以如在以上情况中描述适当地选择。通常,在对于成人进行口服给药的情况下 (60kg 体重),该剂量是每天 1 至 600mg,优选 4 至 400mg,更优选 4 至 200mg。这可以同时给予,或这分开地每天 2 或 3 次给予。

[0101] 在其中制备一种口服固体配制品的情况下,根据一种常规的方法,将一种载体,以及如所要求的,一种粘合剂、粉碎剂、润滑剂、着色剂、调味剂和 / 或类似物可以添加到该主要组分 (即,一种由化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐,以及一种由化学式

(II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐) 中, 来随后制备一种片剂、料粒、精细料粒、粉末、胶囊或类似物。

[0102] 载体的实例包括乳糖、玉米淀粉、绵白糖、葡萄糖、山梨糖醇、结晶纤维素以及二氧化硅。粘合剂的例子包括聚乙烯醇、乙基纤维素、甲基纤维素、阿拉伯树胶、羟丙基纤维素以及羟丙基甲基纤维素。润滑剂的实例包括硬脂酸镁、滑石以及硅石。着色剂的实例包括氧化钛、三氧化二铁、黄色三氧化二铁、胭脂红、洋红以及核黄素。调味剂的实例包括可可粉、抗坏血酸、酒石酸、薄荷油、冰片以及肉桂粉。这些片剂和料粒可以如所要求被包衣。

[0103] 在其中制备一种注射剂的情况下, 可以如所要求的将一种 pH 调节剂、缓冲剂、悬浮剂、增溶剂、稳定剂、等渗剂、防腐剂和 / 或类似物添加到主要组分中, 来制备静脉内、皮下或肌肉注射剂或静脉内滴注剂。如所要求的, 这些可以通过常规的方法制备成冻干的产品。

[0104] 悬浮剂的实例包括甲基纤维素、聚山梨酯 80、羟乙基纤维素、阿拉伯树胶、西黄蓍胶粉、羧基甲基纤维素钠以及聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯。

[0105] 增溶剂的实例包括聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚山梨酯 80、烟酰胺、聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯、聚乙二醇以及甘油脂肪酸酯。

[0106] 稳定剂的实例包括亚硫酸钠以及焦亚硫酸钠。防腐剂的实例包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、山梨酸、苯酚、苯甲酚以及氯甲酚。

[0107] 本发明的抗肿瘤剂可以通过分开地配制一种由化学式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐以及一种由化学式 (II) 表示的化合物或其药学上可接受的盐来制备, 并且这两者可以同时的亦或分开给予。此外, 这两种配制品可以置于一个单一包装中, 来提供所谓的药盒配制品。此外, 这两种化合物可以包含在一个单一配制品中。

[0108] 有待用根据本发明的抗肿瘤剂治疗的肿瘤类型不受限制, 并且其实例包括纤维瘤、脂瘤、粘液瘤、软骨瘤、骨瘤、血管瘤、淋巴瘤、骨髓瘤、黑色素瘤、肌瘤、神经瘤、神经胶质瘤、骨肉瘤、肌肉瘤、纤维肉瘤、乳头瘤、腺瘤、脑肿瘤, 以及癌症, 例如宫颈癌、食道癌、舌癌、肺癌、乳癌、胰癌、胃癌、十二指肠、空肠、回肠以及类似物中的小肠癌、结肠、盲肠、直肠以及类似物中的大肠癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、胆囊癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌、甲状腺癌以及鼻咽癌; 以及其混合瘤。

[0109] 实例

[0110] 本发明在下文中通过以下实例更详细地说明。

[0111] [缩写清单]

[0112] FBS : 胎牛血清

[0113] EDTA : 乙二胺四乙酸

[0114] TV : 肿瘤体积

[0115] RTV : 相对肿瘤体积

[0116] 化合物 A : 4-(3-氯-4-(环丙基氨基羰基)氨基苯氧基)-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺甲磺酸盐

[0117] 化合物 B : N-(2-氟-4-{{[2-({[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基}氨基)吡啶-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺酒石酸盐

[0118] 实例 1 : 化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人恶性黑色素瘤细胞系 (SEKI) 的模

型动物中的联合效果

[0119] 对于人恶性黑色素瘤细胞系 SEKI (JCRB 细胞库), 使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基 (SIGMA 公司), 在 5% CO₂ 的培养箱中, 在 37°C 条件下进行培养。当细胞达到约 80% 的融合度的状态时, 使用胰蛋白酶-EDTA 收集这些细胞。向这些细胞中加入含 50% 的基质的汉克斯 (Hanks) 平衡盐溶液来制备一种 5.0×10^7 细胞/mL 的悬浮液。将如此获得的细胞悬浮液以 0.1 mL 的量皮下移植到一只裸小鼠的外侧 (CAnN. Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 日本查尔斯河实验室公司 (Charles River Laboratories Japan, Inc.)), 其中每个组包含六只小鼠。从移植后的第 11 天, 口服给予化合物 A (10mg/kg, 每天一次, 持续 17 天) 以及化合物 B (100mg/kg, 每天一次, 持续 17 天), 单独地亦或这二者以一个顺序。

[0120] 设定最初给药当天为第 0 天, 随后在第 3、7、10、14 和 17 天使用电子数显卡尺 (Mitsutoyo 公司) 测量每个小鼠中发育的肿瘤的长轴和短轴。

[0121] 根据以下方程计算肿瘤体积和相对肿瘤体积。

[0122] $TV = \text{长轴 (mm)} \times \text{短轴}^2 (\text{mm}^2) / 2$

[0123] $RTV = \text{测量当天的 TV} / \text{最初给药当天的 TV}$

[0124] RTV 结果归纳在表 1 和图 1 中。下表中的数指示平均值 \pm 标准差 (这同样将适用于以下表格)。与化合物 A 和化合物 B 各自单独给予的情况相比, 联合使用化合物 A 和化合物 B 表现了显著优异的抗肿瘤效果。而且, 发现了通过设定化合物 A 和化合物 B 作为因子, 作为相对于 log 变换的 RTV 进行两因素方差分析的结果, 在第 17 天的 RTV 是统计上显著的 ($p < 0.05$), 由此确认了化合物 A 和化合物 B 的协同效果。

[0125] [表 1]

	第 3 天	第 7 天	第 10 天
对照组	1.63 \pm 0.10	3.35 \pm 0.56	4.95 \pm 1.00
化合物 A 组	1.71 \pm 0.19	2.88 \pm 0.35	3.74 \pm 0.53
化合物 B 组	1.76 \pm 0.22	2.93 \pm 0.57	4.06 \pm 0.85
化合物 A 和化合物 B 联合组	1.43 \pm 0.06	2.10 \pm 0.38	2.66 \pm 0.19
	第 14 天	第 17 天	
对照组	7.18 \pm 1.66	8.65 \pm 1.89	
化合物 A 组	5.06 \pm 0.49	5.92 \pm 0.50	
化合物 B 组	5.23 \pm 0.20	5.80 \pm 1.35	
化合物 A 和化合物 B 联合组	2.80 \pm 0.27	2.77 \pm 0.38	

[0126]

[0127]

合组			
----	--	--	--

[0128] 实例 2: 化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人胰腺癌细胞系 (KP-4) 的模型动物中的联合效果

[0129] 对于人胰腺癌细胞系 KP-4 (从国立病院机构九州癌症中心 (National Hospital Organization Kyushu Cancer Center) 获得), 使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基 (SIGMA 公司), 在 5% CO₂ 的培养箱中, 在 37°C 条件下进行培养。当细胞达到约 80% 的融合度的状态时, 使用胰蛋白酶-EDTA 收集这些细胞。向这些细胞中加入含 50% 的基质胶的汉克斯 (Hanks) 平衡盐溶液来制备一种 5.0×10^7 细胞/mL 的悬浮液。将如此获得的细胞悬浮液以 0.1 mL 的量皮下移植到一只裸小鼠的外侧 (CAnN. Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 日本查尔斯河实验室公司 (Charles River Laboratories Japan, Inc.)), 其中每个组包括六只小鼠。从移植后的第 11 天, 口服给予化合物 A (10mg/kg, 每天一次, 持续 17 天) 以及化合物 B (100mg/kg, 每天一次, 持续 17 天), 单独地亦或这二者以一个顺序。

[0130] 设定最初给药当天为第 0 天, 随后在第 3、7、10、14 和 17 天使用电子数显卡尺 (Mitsutoyo 公司) 测量每个小鼠中发育的肿瘤的长轴和短轴。

[0131] 根据以下方程计算肿瘤体积和相对肿瘤体积。

[0132] $TV = \text{长轴 (mm)} \times \text{短轴}^2 (\text{mm}^2) / 2$

[0133] $RTV = \text{测量当天的 TV} / \text{最初给药当天的 TV}$

[0134] RTV 结果归纳在表 2 和图 2 中。与化合物 A 和化合物 B 各自单独给予的情况相比, 联合使用化合物 A 和化合物 B 表现了显著优异的抗肿瘤效果。而且, 发现了通过设定化合物 A 和化合物 B 作为因子, 作为相对于 log 变换的 RTV 进行两因素方差分析的结果, 在第 17 天的 RTV 是统计上显著的 ($p < 0.05$), 由此确认了化合物 A 和化合物 B 的协同效果。

[0135] [表 2]

[0136]

	第 3 天	第 7 天	第 10 天
对照组	2.27±0.25	4.68±0.70	7.12±1.35

	化合物 A 组	1.67±0.16	2.89±0.74	3.77±1.26
	化合物 B 组	1.71±0.26	3.33±1.06	4.72±1.55
	化合物 A 和化合物 B 联合组	1.40±0.14	1.54±0.24	1.64±0.23
		第 14 天	第 17 天	
[0137]	对照组	9.65±2.61	9.92±3.07	
	化合物 A 组	4.83±1.75	5.81±2.17	
	化合物 B 组	6.53±2.19	9.05±3.71	
	化合物 A 和化合物 B 联合组	1.79±0.32	2.13±0.52	

[0138] 实例 3: 化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人胃癌细胞系 (IM95m) 的模型动物中的联合效果

[0139] 对于人胃癌细胞系 IM95m(健康科学研究资源库 (Health Science Research Resources Bank)), 使用含 4500mg/mL 的葡萄糖、10% 的 FBS 以及 10 μg/mL 胰岛素的 DMEM 培养基 (光纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd)), 在 5% CO₂ 的培养箱中, 在 37°C 条件下进行培养。当细胞达到约 80% 的融合度的状态时, 使用胰蛋白酶-EDTA 收集这些细胞。向这些细胞中加入含 50% 的基质胶的汉克斯 (Hanks) 平衡盐溶液来制备一种 1.0×10⁸ 细胞/mL 的悬浮液。将如此获得的细胞悬浮液以 0.1mL 的量皮下移植到一只裸小鼠的外侧 (CAnN. Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 日本查尔斯河实验室公司 (Charles River Laboratories Japan, Inc.)), 其中每个组包括六只小鼠。从移植后的第 13 天, 口服给予化合物 A (10mg/kg, 每天一次, 持续 21 天) 以及化合物 B (100mg/kg, 每天一次, 持续 21 天), 持续地, 单独地亦或这二者以一个顺序。

[0140] 设定最初给药当天为第 0 天, 随后在第 4、7、11、14、18 和 21 天使用电子数显卡尺 (Mitsutoyo 公司) 测量每个小鼠中发育的肿瘤的长轴和短轴。

[0141] 根据以下方程计算肿瘤体积和相对肿瘤体积。

[0142] $TV = \text{长轴 (mm)} \times \text{短轴}^2 (\text{mm}^2) / 2$

[0143] $RTV = \text{测量当天的 TV} / \text{最初给药当天的 TV}$

[0144] RTV 结果归纳在表 3 和图 3 中。与化合物 A 和化合物 B 各自单独给予的情况相比, 联合使用化合物 A 和化合物 B 表现了显著优异的抗肿瘤效果。尽管通过两因素方差分析没有显示出统计上的显著性, 但是通过联合使用化合物 A 和化合物 B 确认了完全抑制肿瘤增殖的效果。

[0145] [表 3]

	第 4 天	第 7 天	第 11 天
对照组	1.97±0.16	2.87±0.20	4.91±0.64
化合物 A 组	1.53±0.12	2.10±0.18	2.65±0.37
化合物 B 组	1.12±0.08	1.24±0.15	1.75±0.17
化合物 A 和化合物 B 联合组	0.92±0.12	0.89±0.22	0.76±0.09
	第 14 天	第 18 天	第 21 天
对照组	6.27±0.83	8.38±1.41	10.36±1.74
化合物 A 组	2.65±0.49	2.80±0.47	3.18±0.57
化合物 B 组	1.85±0.16	3.09±0.48	4.02±1.05
化合物 A 和化合物 B 联合组	0.73±0.15	0.91±0.14	1.00±0.25

[0146]

[0147] 实例 4: 化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人卵巢癌细胞系 (A2780) 的模型动物中的联合效果

[0148] 对于人卵巢癌细胞系 A2780 (ATCC), 使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基 (SIGMA 公司), 在 5% CO₂ 的培养箱中, 在 37°C 条件下进行培养。当细胞达到约 80% 的融合度的状态时, 使用胰蛋白酶-EDTA 收集这些细胞。向这些细胞中加入含 50% 的基质胶的汉克斯 (Hanks) 平衡盐溶液来制备一种 5.0×10^7 细胞/mL 浓度的悬浮液。将如此获得的细胞悬浮液以 0.1 mL 的量皮下移植到一只裸小鼠的外侧 (CAnN. Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 日本查尔斯河实验室公司 (Charles River Laboratories Japan, Inc.)), 其中每个组包括六只小鼠。口服给予化合物 A (10mg/kg, 每天一次, 持续 10 天) 以及化合物 B (100mg/kg, 每天一次, 持续 10 天), 单独地亦或这二者以一个顺序。

[0149] 设定最初给药当天为第 0 天, 随后在第 3、5、8、和 10 天使用电子数显卡尺 (Mitsutoyo 公司) 测量每个小鼠中发育的肿瘤的长轴和短轴。

[0150] 根据以下方程计算肿瘤体积和相对肿瘤体积。

$$[0151] \quad TV = \text{长轴 (mm)} \times \text{短轴}^2 (\text{mm}^2) / 2$$

$$[0152] \quad RTV = \text{测量当天的 TV} / \text{最初给药当天的 TV}$$

[0153] RTV 结果归纳在表 4 和图 4 中。与化合物 A 和化合物 B 各自单独给予的情况相比, 联合使用化合物 A 和化合物 B 表现了显著优异的抗肿瘤效果。而且, 发现了通过设定化合物 A 和化合物 B 作为因子, 作为相对于 log 变换的 RTV 进行两因素方差分析的结果, 在第 10 天的 RTV 是统计上显著的 ($p < 0.05$), 由此确认了化合物 A 和化合物 B 的协同效果。

[0154] [表 4]

[0155]

	第 3 天	第 5 天
对照组	2.37±0.60	7.52±1.45
化合物 A 组	1.92±0.17	4.77±0.85
化合物 B 组	2.23±0.42	7.01±1.54
化合物 A 和化合物 B 联合组	1.38±0.12	1.95±0.27
	第 8 天	第 10 天
对照组	17.47±3.75	20.41±6.02
化合物 A 组	9.51±2.44	12.37±3.53
化合物 B 组	15.70±2.27	21.29±2.76
化合物 A 和化合物 B 联合组	2.50±0.76	3.34±1.30

[0156] 实例 5 : 化合物 A 以及化合物 B 在一种移植了人恶性胶质瘤细胞系 (U87MG) 的模型动物中的联合效果

[0157] 对于人恶性胶质瘤细胞系 (U87MG) (ATCC), 使用含 10% FBS 的 E-MEM 培养基 (SIGMA 公司), 在 5% CO₂ 的培养箱中, 在 37°C 条件下进行培养。当细胞达到约 80% 的融合度的状态时, 使用胰蛋白酶-EDTA 收集这些细胞。向这些细胞中加入含 50% 的基质胶的汉克斯 (Hanks) 平衡盐溶液来制备一种 5.0×10^7 细胞/mL 浓度的悬浮液。将如此获得的细胞悬浮液以 0.1mL 的量皮下移植到一只裸小鼠的外侧 (CAnN. Cg-FOXn1nu/Cr1Cr1j, 日本查尔斯河实验室公司), 其中每个组包括六只小鼠。口服给予化合物 A (10mg/kg, 每天一次, 持续 21 天) 以及化合物 B (100mg/kg, 每天一次, 持续 21 天), 单独地亦或这二者以一个顺序。

[0158] 设定最初给药当天为第 0 天, 随后在第 2、5、7、9、12、14、16、19、和 21 天使用电子数显卡尺 (Mitsutoyo 公司) 测量每个小鼠中发育的肿瘤的长轴和短轴。

[0159] 根据以下方程计算肿瘤体积和相对肿瘤体积。

$$[0160] \quad TV = \text{长轴 (mm)} \times \text{短轴}^2 (\text{mm}^2) / 2$$

$$[0161] \quad RTV = \text{测量当天的 TV} / \text{最初给药当天的 TV}$$

[0162] RTV 结果归纳在表 5 和图 5 中。与化合物 A 和化合物 B 各自单独给予的情况相比, 联合使用化合物 A 和化合物 B 表现了显著优异的抗肿瘤效果。而且, 尽管通过使用设定化合物 A 和化合物 B 作为因子相对于 log 变换的 RTV 进行的两因素方差分析没有显示出统计上的显著性, 但是通过联合使用化合物 A 和化合物 B 确认了完全抑制肿瘤增殖的效果。

[0163] [表 5]

	第 2 天	第 5 天	第 7 天	
[0164]	对照组	1.30±0.19	1.86±0.45	2.45±0.71
	化合物 A 组	0.95±0.08	1.27±0.07	1.59±0.16
	化合物 B 组	0.69±0.05	0.61±0.05	0.56±0.10
	化合物 A 和化合物 B 联合组	0.59±0.05	0.49±0.10	0.44±0.09
	第 9 天	第 12 天	第 14 天	
	对照组	3.19±0.89	5.71±1.58	8.88±2.26
	化合物 A 组	1.85±0.13	3.29±0.32	4.76±0.49
	化合物 B 组	0.57±0.07	0.65±0.08	0.73±0.12
[0165]	化合物 A 和化合物 B 联合组	0.36±0.11	0.48±0.16	0.46±0.17
	Day 16	Day 19	Day 21	
	对照组	12.13±3.46	18.47±6.88	23.08±8.72
	化合物 A 组	6.19±0.95	9.60±1.99	11.53±2.57
	化合物 B 组	0.93±0.13	1.65±0.37	2.23±0.51
	化合物 A 和化合物 B 联合组	0.59±0.20	0.78±0.26	0.95±0.38

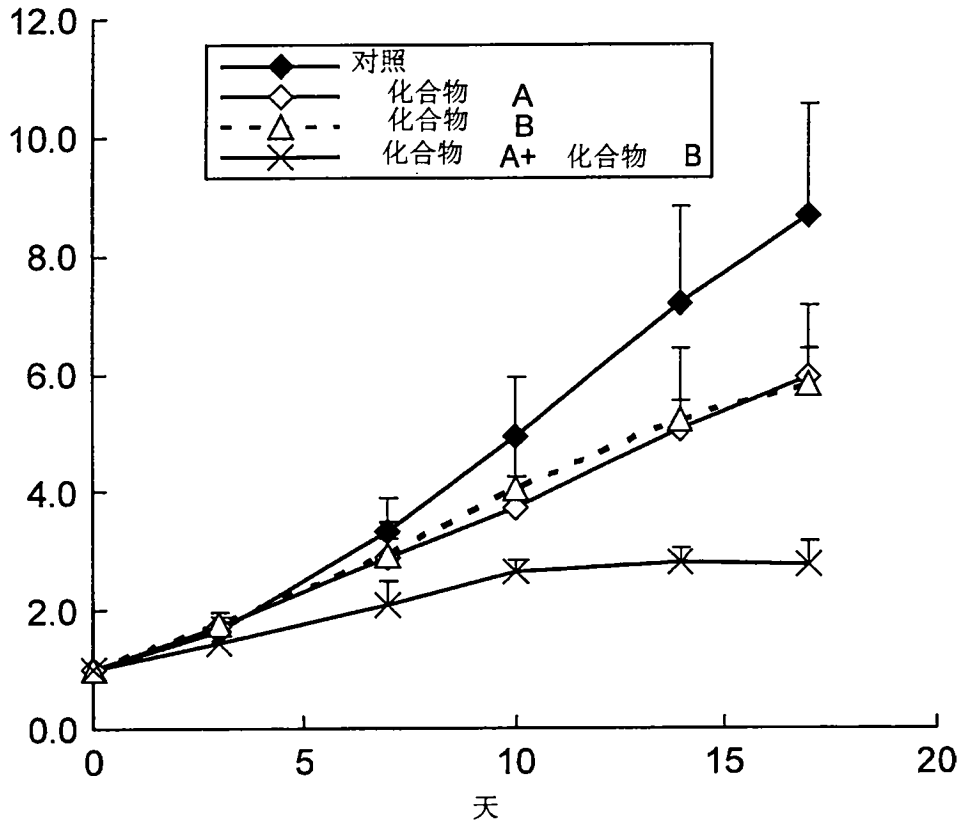


图 1

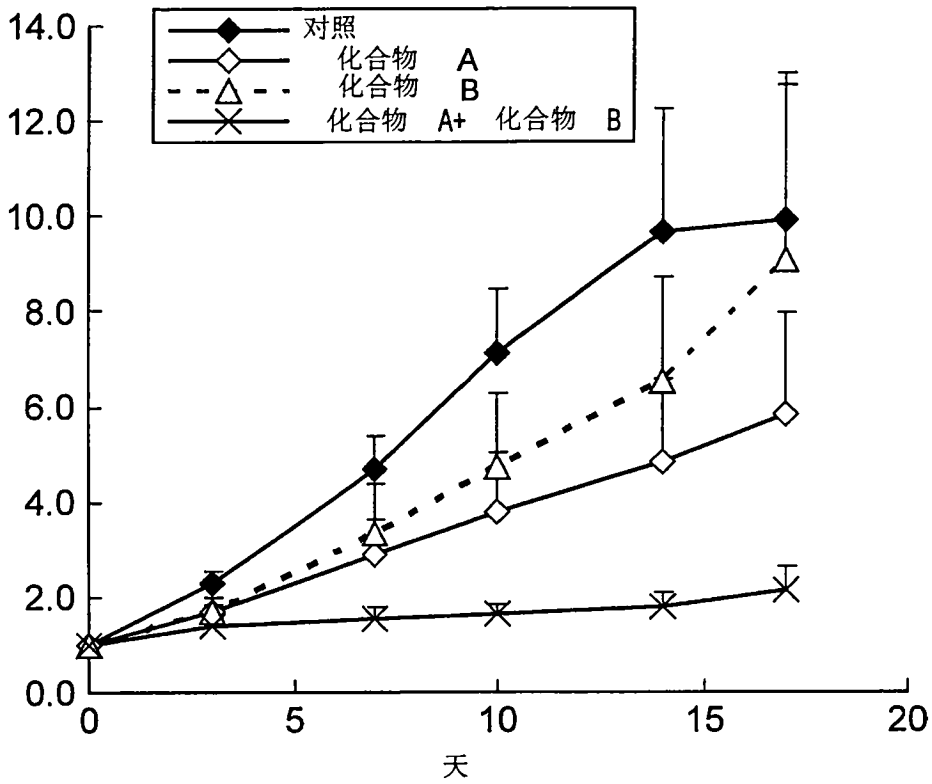


图 2

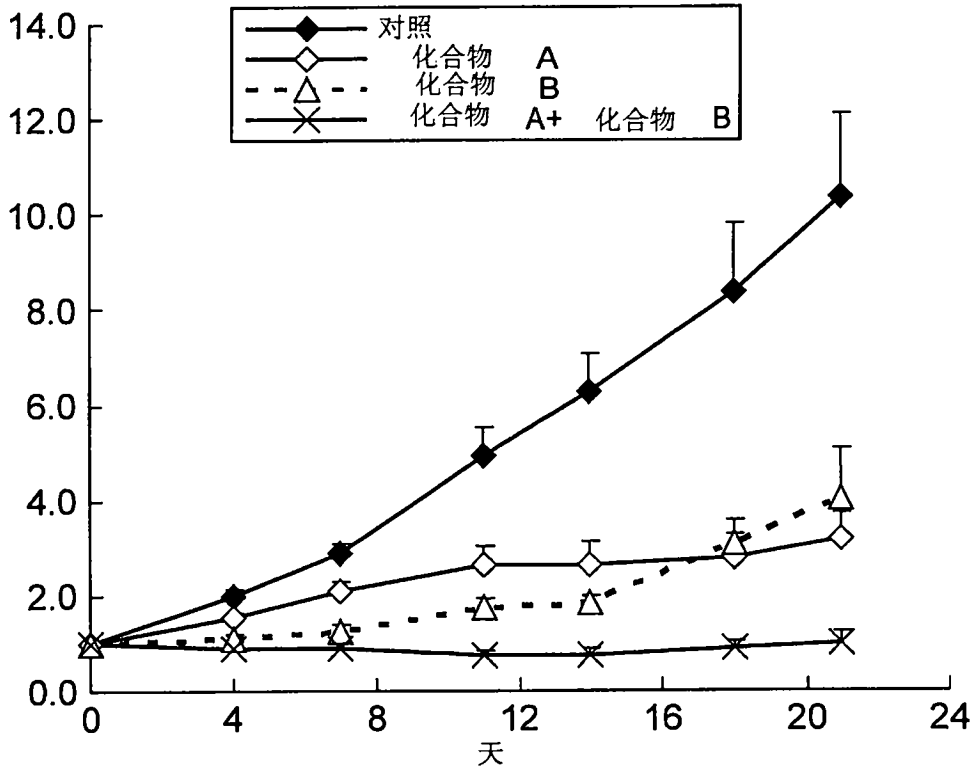


图 3

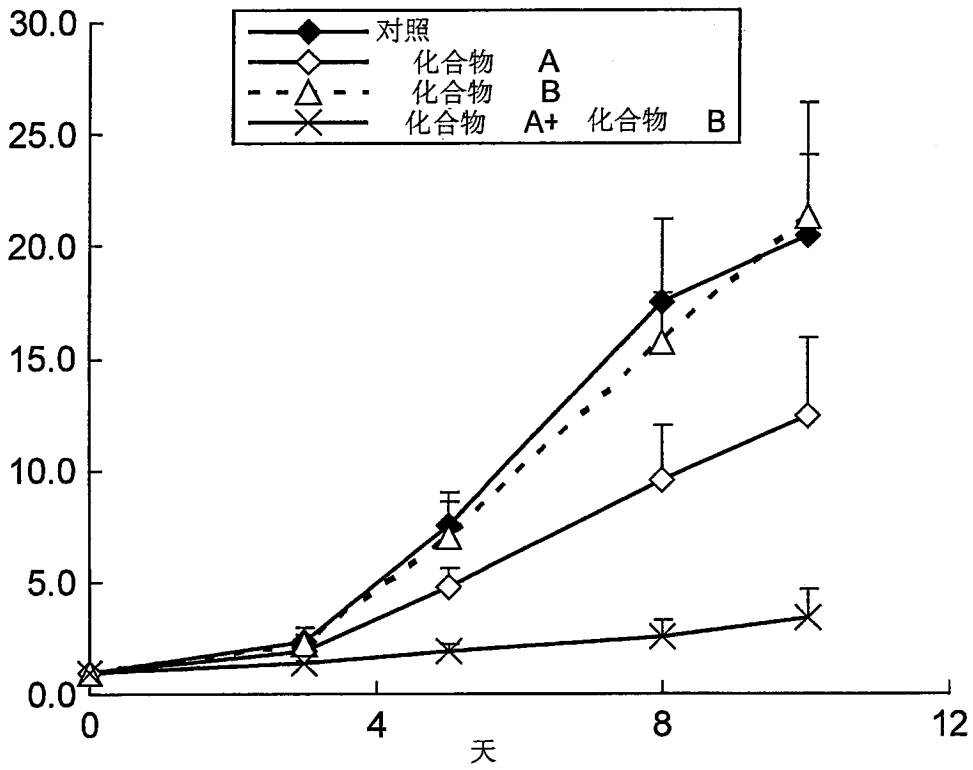


图 4

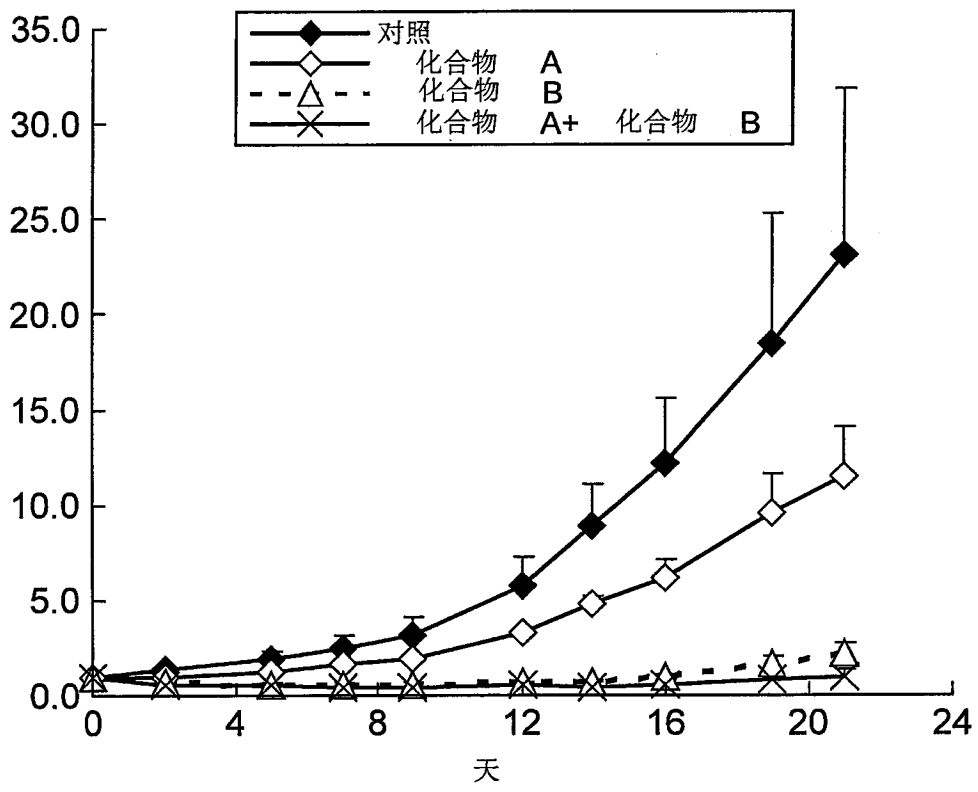


图 5