



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117940130 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 26

(21) 申请号 202280019974.7

(22) 申请日 2022.03.08

(30) 优先权数据

63/158,798 2021.03.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/019273 2022.03.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/192202 EN 2022.09.15

(71) 申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

韩美药品株式会社

(72) 发明人 J·阿达姆凯维奇 M·J·道尔顿

权利要求书4页 说明书26页 附图2页

(54) 发明名称

用于脑癌治疗的贝伐拉非尼

(57) 摘要

本发明提供了用于使用贝伐拉非尼来治疗脑癌的方法,所述脑癌包括携带BRAF突变、NRAS突变、KRAS突变或它们的组合的转移性脑癌。

S·马利克 P·托马斯 J·恩王
颜宜彬 金永勋 安永吉 金惟软

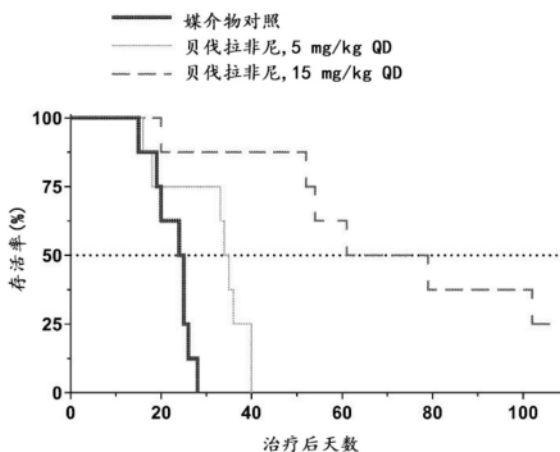
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 31/4523 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)



1. 一种治疗转移性黑素瘤的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用对治疗所述转移性黑素瘤有效的量的贝伐拉非尼,其中转移的部位在所述受试者的脑内。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述黑素瘤携带RAF突变。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述黑素瘤携带BRAF^{V600E}突变。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述黑素瘤携带NRAS突变或KRAS突变。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述黑素瘤携带NRAS突变。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述黑素瘤携带NRAS^{G12D}突变、NRAS^{Q61K}突变、NRAS^{Q61R}突变、NRAS^{G12C}突变、NRAS^{Q61H}突变、NRAS^{Q61L}突变以及它们的组合。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中每天用每kg体重约2.5mg至每kg体重约25mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中每天用约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约650mg、约700mg、约750mg、约800mg、约850mg、约900mg、约950mg、约1000mg、约1050mg、约1100mg、约1150mg、约1200mg、约1250mg、约1300mg、约1350mg、约1400mg、约1450mg或约1500mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

9. 根据权利要求7或权利要求8所述的方法,其中每天两次用约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg或约500mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

10. 根据权利要求7至9中任一项所述的方法,其中在28天治疗周期的连续28天每天施用贝伐拉非尼。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中口服施用贝伐拉非尼。

12. 一种治疗脑癌的方法,所述方法包括:

(i) 向有此需要的受试者施用治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐,以治疗所述脑癌;

(ii) 其中所述贝伐拉非尼的施用抑制所述受试者中脑癌细胞的生长和活力;并且

(iii) 其中所述脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述癌症选自胶质母细胞瘤和转移性癌症,所述转移性癌症选自黑素瘤、肺癌、乳腺癌、结直肠癌(CRC)、膀胱癌、胆囊癌、肾母细胞瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、前列腺癌、骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、胆管癌、腺癌、绒毛膜癌、肉瘤、鳞状细胞癌以及它们的组合。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述转移性癌症选自黑素瘤、肾母细胞瘤、GIST、CRC、肉瘤、胆囊癌、膀胱癌以及它们的组合。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的方法,其中所述癌症携带RAF突变。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述癌症携带BRAF^{V600E}突变。

17. 根据权利要求15或权利要求16所述的方法,其中所述癌症选自携带BRAF^{V600E}突变的肾母细胞瘤、携带BRAF^{V600E}突变的黑素瘤、携带BRAF^{V600E}突变的GIST、携带BRAF^{V600E}突变的CRC以及它们的组合。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述癌症为携带BRAF^{V600E}突变的黑素瘤、携带BRAF^{V600E}突变的肾母细胞瘤、携带BRAF^{V600E}突变的GIST以及它们的组合。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症选自携带BRAF^{V600E}突变的黑素瘤、携带

BRAF^{V600E}突变的GIST以及它们的组合。

20. 根据权利要求16至19中任一项所述的方法,其中所述黑素瘤是转移性的或不可切除的。

21. 根据权利要求12至20中任一项所述的方法,其中所述所述癌症携带NRAS突变或KRAS突变。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述癌症具有选自以下的至少一种突变: BRAF^{V600E}突变、KRAS^{G12V}突变、KRAS^{G12D}突变、KRAS^{G12C}突变、KRAS^{Q61H}突变、NRAS^{G12D}突变、NRAS^{Q61K}突变、NRAS^{Q61R}突变、NRAS^{Q61L}突变、NRAS^{Q61I}突变和NRAS^{G12C}突变。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述癌症选自携带KRAS^{G12V}突变的肉瘤、携带NRAS^{G12D}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61K}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61L}突变的黑素瘤、携带NRAS^{G12C}突变的黑素瘤、携带KRAS^{G12D}突变的胆囊癌、携带KRAS^{G12C}突变的CRC、携带KRAS^{G12V}突变的CRC、携带KRAS^{Q61H}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的膀胱癌、携带KRAS^{G12V}突变的膀胱癌以及它们的组合。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述癌症为携带KRAS^{G12V}突变的肉瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑素瘤、携带KRAS^{G12D}突变的胆囊癌、携带KRAS^{G12C}突变的CRC、携带KRAS^{G12V}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的膀胱癌、携带KRAS^{G12V}突变的膀胱癌以及它们的组合。

25. 根据权利要求22所述的方法,其中所述癌症选自携带NRAS^{Q61L}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61K}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑素瘤以及它们的组合。

26. 根据权利要求21至25中任一项所述的方法,其中所述癌症为携带NRAS突变的黑素瘤。

27. 根据权利要求12至26中任一项所述的方法,其中每天用每kg体重约2.5mg至每kg体重约25mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中每天用约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约650mg、约700mg、约750mg、约800mg、约850mg、约900mg、约950mg、约1000mg、约1050mg、约1100mg、约1150mg、约1200mg、约1250mg、约1300mg、约1350mg、约1400mg、约1450mg或约1500mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

29. 根据权利要求27或权利要求28所述的方法,其中每天两次用约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg或约500mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

30. 根据权利要求27至29中任一项所述的方法,其中在28天治疗周期的连续28天每天施用贝伐拉非尼。

31. 根据权利要求12至30中任一项所述的方法,其中口服施用贝伐拉非尼。

32. 根据权利要求12至31中任一项所述的方法,其中所述受试者为人。

33. 根据权利要求12至32中任一项所述的方法,其进一步包括施用至少一种附加疗法。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述至少一种附加疗法为化疗剂。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述至少一种附加疗法为MEK抑制剂。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述MEK抑制剂为考比替尼。

37. 根据权利要求12至36中任一项所述的方法,其中所述施用引起以下中的一者或多者: (i) 脑癌转移的抑制; (ii) 脑癌转移尺寸的减小; (iii) 脑癌转移数量的减少; (iv) 脑癌细胞的数量减少; (v) 脑癌细胞活力的降低; 以及 (vi) 脑癌细胞生长的抑制。

38. 一种治疗脑癌的方法,所述方法包括:

(i) 向有此需要的受试者施用治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐;

(ii) 向所述受试者施用有效量的MEK抑制剂或其药用盐;

(iii) 其中所述贝伐拉非尼和所述MEK抑制剂的施用抑制所述受试者中脑癌细胞的生长和活力; 并且

(iv) 其中所述脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述癌症选自胶质母细胞瘤和转移性癌症,所述转移性癌症选自黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、结直肠癌(CRC)、膀胱癌、胆囊癌、肾母细胞瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、前列腺癌、骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、胆管癌、腺癌、绒毛膜癌、肉瘤、鳞状细胞癌以及它们的组合。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述转移性癌症选自黑色素瘤、肾母细胞瘤、GIST、CRC、肉瘤、胆囊癌、膀胱癌以及它们的组合。

41. 根据权利要求38至40中任一项所述的方法,其中所述癌症携带RAF突变。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述癌症携带BRAF^{V600E}突变。

43. 根据权利要求41或权利要求42所述的方法,其中所述癌症选自携带BRAF^{V600E}的肾母细胞瘤、携带BRAF^{V600E}突变的黑色素瘤、携带BRAF^{V600E}突变的GIST、携带BRAF^{V600E}突变的CRC以及它们的组合。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述癌症为携带BRAF^{V600E}突变的黑色素瘤、携带BRAF^{V600E}突变的肾母细胞瘤、携带BRAF^{V600E}突变的GIST以及它们的组合。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述癌症选自携带BRAF^{V600E}突变的黑色素瘤、携带BRAF^{V600E}突变的GIST以及它们的组合。

46. 根据权利要求42至45中任一项所述的方法,其中所述黑色素瘤是转移性的或不可切除的。

47. 根据权利要求38至46中任一项所述的方法,其中所述癌症携带NRAS突变或KRAS突变。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述癌症具有选自以下的至少一种突变: BRAF^{V600E}突变、KRAS^{G12V}突变、KRAS^{G12D}突变、KRAS^{G12C}突变、KRAS^{Q61H}突变、NRAS^{G12D}突变、NRAS^{Q61K}突变、NRAS^{Q61R}突变、NRAS^{Q61L}突变、NRAS^{Q61L}突变和NRAS^{G12C}突变。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述癌症选自携带KRAS^{G12V}突变的肉瘤、携带NRAS^{G12D}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61K}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61L}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{G12C}突变的黑色素瘤、携带KRAS^{G12D}突变的胆囊癌、携带KRAS^{G12C}突变的CRC、携带KRAS^{G12V}突变的CRC、携带KRAS^{Q61H}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的膀胱癌、携带KRAS^{G12V}突变的膀胱癌以及它们的组合。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述癌症为携带KRAS^{G12V}突变的肉瘤、携带

NRAS^{G61R}突变的黑素瘤、携带NRAS^{G61H}突变的黑素瘤、携带KRAS^{G12D}突变的胆囊癌、携带KRAS^{G12C}突变的CRC、携带KRAS^{G12V}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的膀胱癌、携带KRAS^{G12V}突变的膀胱癌以及它们的组合。

51. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述癌症选自携带NRAS^{G61L}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61K}突变的黑素瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑素瘤以及它们的组合。

52. 根据权利要求47至51中任一项所述的方法, 其中所述癌症为携带NRAS突变的黑素瘤。

53. 根据权利要求38至52中任一项所述的方法, 其中每天用每kg体重约2.5mg至每kg体重约25mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中每天用约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约650mg、约700mg、约750mg、约800mg、约850mg、约900mg、约950mg、约1000mg、约1050mg、约1100mg、约1150mg、约1200mg、约1250mg、约1300mg、约1350mg、约1400mg、约1450mg或约1500mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

55. 根据权利要求53或权利要求54所述的方法, 其中每天两次用约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg或约500mg的贝伐拉非尼或其药用盐来治疗所述受试者。

56. 根据权利要求53至55中任一项所述的方法, 其中在28天治疗周期的连续28天每天施用贝伐拉非尼。

57. 根据权利要求38至56中任一项所述的方法, 其中口服施用贝伐拉非尼。

58. 根据权利要求38至57中任一项所述的方法, 其中每天用约20mg至约100mg、约40mg至约80mg、或约60mg的MEK抑制剂来治疗所述受试者。

59. 根据权利要求38至58中任一项所述的方法, 其中所述MEK抑制剂为考比替尼或其药用盐, 并且进一步地, 其中用每天约60mg、约40mg或约20mg的考比替尼来治疗所述受试者。

60. 根据权利要求38至59中任一项所述的方法, 其中在28天治疗周期的连续21天每天一次施用所述MEK抑制剂。

61. 根据权利要求38至60中任一项所述的方法, 其中所述受试者为人。

62. 根据权利要求38至61中任一项所述的方法, 其中所述施用引起以下中的一者或多者: (i) 脑癌转移的抑制; (ii) 脑癌转移尺寸的减小; (iii) 脑癌转移数量的减少; (iv) 脑癌细胞的数量减少; (v) 脑癌细胞活力的降低; 以及 (vi) 脑癌细胞生长的抑制。

用于脑癌治疗的贝伐拉非尼

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年3月9日提交的美国临时申请第63/158,798号的优先权。该临时申请的全文通过引用并入本申请中。

技术领域

[0003] 本公开的领域总体上涉及脑癌的治疗,并且更具体地涉及其中RAF激酶抑制有效的癌症的治疗。

背景技术

[0004] 基于NIH的数据,2017年脑癌和其他神经系统癌症的新病例发病率为6.4/100,000,死亡率为4.4/100,000,并且约有0.6%的人口将在其一生中的某一时刻被诊断出患有脑癌和其他神经系统癌症。进一步地,2010年至2016年期间的5年存活率仅为约33%。

[0005] 有问题的是,脑癌治疗药物的疗效取决于该药物穿过形成血脑屏障(BBB)的脑毛细血管壁并且以治疗有效量进入脑部的能力。据一些估计,仅不到2%的小分子药物真正以任意显著的量穿过BBB(Pardridge, The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development, NeuroRx. 2005 Jan 2(1):3-14)。

[0006] 胶质母细胞瘤是最常见的源自脑的脑肿瘤,每年诊断出约15,000例新病例,并且平均存活率为约11至15个月。

[0007] 源自身体其他部位所形成的癌症的转移性脑肿瘤是成年人中最常见的脑肿瘤,每年估计诊断出200,000和300,000例新病例。许多此类脑肿瘤是由癌症(诸如黑素瘤,其由BRAF和NRAS突变引起的MAPK信号传导通路的功能障碍所导致)的扩散引起的。某些小儿脑肿瘤,诸如毛细细胞型星形细胞瘤,也被认为是由MAPK蛋白诸如BRAF的突变引起的(参见例如,Faulkner等人,J. Neuropathol. Exp. Neurol., 74:867-872, (2015); Penman等人, Frontiers in Oncology, 5:54, 2015; 和Kurani, Child's Nervous System, 35:1525-1536, (2019))。

[0008] 过去十年来,BRAF抑制剂无论是单独使用还是与MEK抑制剂组合使用,都为BRAF V600突变黑素瘤(占黑素瘤的约50%)患者的治疗树立了新的里程碑。然而,高侵袭性脑转移与黑素瘤患者的不良结果相关联,因此仍需要更好的治疗。另外,迄今为止,尚未开发出针对NRAS突变(占黑素瘤的约20%)患者的靶向疗法。

[0009] 因此,需要改进针对脑癌(包括具有NRAS和RAF突变的转移性脑癌)的化学疗法。

发明内容

[0010] 在一些方面,本公开涉及一种治疗转移性黑素瘤的方法,其包括向有此需要的受试者施用治疗该转移性黑素瘤有效的量的贝伐拉非尼(belvarafenib),其中转移的部位是在该受试者的脑内。

[0011] 在一些方面,本公开涉及一种治疗脑癌的方法。该方法包括:(i)向有此需要的受

试者施用治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐,以治疗该脑癌;(ii)其中该贝伐拉非尼的施用抑制该受试者中的脑癌细胞的生长和活力;并且(iii)其中该脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。

[0012] 在一些其他方面,本公开涉及一种治疗脑癌的方法,该方法涉及组合疗法。该方法包括:(i)向有此需要的受试者施用治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐;(ii)向该受试者施用有效量的MEK抑制剂或其药用盐;(iii)其中该贝伐拉非尼和该MEK抑制剂的施用抑制该受试者中的脑癌细胞的生长和活力;并且(iv)其中该脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。

[0013] 发现贝伐拉非尼在经口施用后能够在小鼠和大鼠的脑中累积。贝伐拉非尼在脑中的暴露量与在血浆中相似(脑与血浆的比率为约100%)。贝伐拉非尼的这一脑渗透水平与目前批准的已知脑渗透水平低的BRAF抑制剂显著不同。贝伐拉非尼在使用黑素瘤细胞的原位脑肿瘤模型中表现出优异的抗肿瘤活性。贝伐拉非尼显著增加了颅内植入BRAF^{V600E}A375SM黑素瘤的小鼠的总存活。此外,本文提供的数据也表明,贝伐拉非尼具有治疗NRAS突变黑素瘤患者的治疗潜力。

[0014] 由于贝伐拉非尼是泛Raf抑制剂,因此可治疗任何源自Raf恶性肿瘤的脑转移肿瘤。

附图说明

[0015] 图1是在本公开的A375SM_Luc细胞脑转移小鼠模型中评估的小鼠的一组代表性生物发光图像。

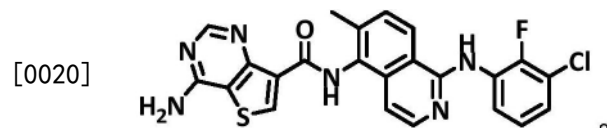
[0016] 图2是在本公开的A375SM_Luc细胞脑转移小鼠模型中评估的小鼠的卡普兰-麦尔(Kaplan-Meier)存活曲线图。

具体实施方式

[0017] 贝伐拉非尼

[0018] 贝伐拉非尼是有效的选择性泛RAF激酶抑制剂,对BRAF WT、BRAF^{V600E}和CRAF表现出强抑制活性。先前有报道称贝伐拉非尼强烈抑制携带BRAF、NRAS或KRAS突变的各种癌细胞系的生长,并在临床前动物模型中表现出显著的抗癌疗效。

[0019] 在PCT申请W0 2013/100632中公开了贝伐拉非尼,其化学名称为4-氨基-N-(1-((3-氯-2-氟苯基)氨基)-6-甲基异喹啉-5-基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-7-甲酰胺(本文中称为式(I)),并且具有以下化学结构:



[0021] 贝伐拉非尼是高效的选择性II型RAF二聚体抑制剂(泛RAF抑制剂),可选择性抑制BRAF和CRAF异构体。与BRAF^{V600}-选择性单体抑制剂相比,已经发现贝伐拉非尼不激活非BRAF^{V600}突变型细胞中的MAPK通路,而是通过抑制BRAF与CRAF二聚体来维持对MAPK信号传导的抑制,并且导致在BRAF^{V600}-和RAS-突变型肿瘤中的细胞增殖作用减弱以及抗肿瘤活性增加。

[0022] RAF激酶家族由三个亚型(A-RAF、B-RAF、C-RAF)组成,其为RAS下游MAPK信号传导通路的关键组成部分。在RAF基因的突变,特别是在密码子V600的BRAF,已在各种癌症中发现,包括恶性黑色素瘤、结直肠癌、甲状腺癌和肺癌。参见Davies H、Bignell GR、Cox C等人,“Mutations of the BRAF gene in human cancer”,*Nature* 417:949-54,200。BRAF^{V600}突变使得BRAF作为单体以发出信号,从而持续性地激活下游MAPK信号传导通路。

[0023] RAS基因是人类癌症中最常发生突变的癌基因。在RAS异构体中,KRAS突变最频繁(86%),其次是NRAS(11%),其主要在皮肤黑色素瘤中突变(28%)。参见:Cox AD、Fesik SW、Kimmelman AC等人,“Drugging the undruggable RAS:Mission possible?”,*Nat Rev Drug Discov* 13:828-51,2014;Hilmi Kodaz、Osman Kostek、Muhammet Bekir、Hacioglu等人,“Frequency of RAS Mutations(KRAS,NRAS,HRAS)in Human Solid Cancer”,*EJMO* 1:1-7,2017;以及Cancer Genome Atlas N,“Genomic Classification of Cutaneous Melanoma”,*Cell* 161:1681-96,2015。

[0024] 由于BRAF单体抑制剂诸如维罗非尼(vemurafenib)、达拉非尼(dabrafenib)和康奈非尼(encorafenib)的发现,使得对于BRAF^{V600}-突变型肿瘤患者的治疗取得显著进展;然而,由于各种耐药机制(包括BRAF扩增、BRAF剪接变异体和RAS突变)主要集中在BRAF二聚化和对于BRAF^{V600}单体疗法的耐药性,治疗反应的持久性受到限制。参见SullivanRJ、Flaherty KT,“Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma”*Eur J Cancer* 49:1297-304,2013。

[0025] 贝伐拉非尼抑制BRAF突变型或RAS突变型黑色素瘤、NSCLC和CRC细胞系中MAPK通路中的MEK和ERK的磷酸化。贝伐拉非尼已被证明可在体外抑制BRAF突变型或RAS突变型黑色素瘤、NSCLC、CRC和甲状腺癌细胞系的生长。

[0026] 贝伐拉非尼在体外是有效的选择性RAF激酶(包括BRAF^{V600E}突变体(IC₅₀=7nM)、BRAF野生型(IC₅₀=41nM)和RAF-1(CRAF)(IC₅₀=2nM)抑制剂。在一组189种激酶测定中进行试验时,贝伐拉非尼表现出对7种其他受体酪氨酸激酶(RTK)的抑制活性(集落刺激因子1受体(CSF1R),原McDonough猫肉瘤(FMS)同源物;盘状结构域受体酪氨酸激酶1(DDR1);盘状结构域受体酪氨酸激酶2(DDR2);EPHA2;EPHA7;EPHA8;和EPHB2),在1μM下具有>90%的抑制率。

[0027] 贝伐拉非尼的体外抗肿瘤作用已转化为在各种小鼠异种移植模型中的疗效。贝伐拉非尼在小鼠异种移植模型中作为针对BRAF突变型和NRAS突变型黑色素瘤、KRAS突变非小细胞肺癌(NSCLC)和BRAF突变型结直肠癌(CRC)小鼠异种移植模型的单一疗法,表现出剂量依赖性肿瘤生长抑制作用。

[0028] 贝伐拉非尼临床资料

[0029] 迄今为止,贝伐拉非尼已在临床试验中显示,可提供针对多种癌症的安全有效的治疗。

[0030] 例如,一项已完成的开放标签Ia期剂量递增研究在携带BRAF、KRAS或NRAS基因突变的实体瘤患者中研究了贝伐拉非尼的几种剂量和方案。对72名受试者中的67名进行了疗效分析,这些受试者经过至少1次基线后肿瘤评估。最佳总缓解率(BORR)为8.96%(6/67名受试者),客观缓解率(ORR)为4.48%(3/67名受试者),其中部分缓解(PR)被确认为最佳总缓解(2名患有黑色素瘤的受试者和1名患有胃肠道间质瘤的受试者)。在50.57%(34/67)的接

受贝伐拉非尼100mg QD剂量或更高剂量治疗的受试者中观察到疾病控制。59名(88.06%)受试者发生了事件(疾病进展或死亡),所有这些都报告为进行性疾病(PD)。此外,中位无恶化存活期为11.53周,并且该中位数的95%信赖区间为[7.12周,13.38周]。在更新的结果中,BORR为10.45%(7/67名受试者),95%精准信赖区间为[4.30%,20.35%];ORR保持在4.48%(3/67名受试者)。此外,对BRAF突变型黑素瘤受试者的亚组再分析显示,全部受试者中7.69%(1/13名受试者)的BORR、DCR、中位PFS和进展时间不变。800mg BID组中的中位DOR升高至30.18周,在全部组中为23.99周(包括受试者的DOR为100.29周)。

[0031] 在另一项开放标签Ib期剂量扩展研究中,在携带BRAF、KRAS或NRAS基因突变的实体瘤患者中对剂量为450mg BID贝伐拉非尼进行了评估。对63名受试者中的59名进行了疗效分析,这些受试者在入组后至少接受了1剂贝伐拉非尼并且经过至少1次基线后肿瘤评估。BORR为11.86%(7/59名受试者),ORR为6.78%(4/59名受试者),其中PR被确认为最佳总缓解(3名患有黑素瘤的受试者和1名患有CRC的受试者)。在35.59%(21/59)的受试者中观察到疾病控制。59名受试者中的50名(84.75%)受试者发生了事件(疾病进展或死亡),除1例死亡病例外,所有这些都报告为PD。此外,中位无恶化存活期(PFS)为7.83周,并且该中位数的95%信赖区间为[7.26周,8.26周]。本研究中来自7名缓解者的总缓解的中位缓解持续时间(DOR)为15.66周。其中,2名BRAF突变型黑素瘤缓解者表现出22.49周的中位DOR。

[0032] 在另一项健康受试者中的I期、单一剂量、随机、交叉相对生体可用率和食物影响研究中,评估了从I期片剂到II期片剂的配方变化对贝伐拉非尼暴露量的影响。共有18名健康受试者入组该研究,并且接受了以下随机治疗:一个150mg和一个50mg I期片剂,进食状态下;两个100mg II期片剂,进食状态下;或两个100mg II期片剂,空腹状态下;治疗之间包括18天的清除期。与空腹状态相比,进食状态下食物对贝伐拉非尼的暴露量具有正面影响。与在健康受试者处于空腹状态时施用200mg单一剂量的贝伐拉非尼相比,当贝伐拉非尼在进食状态下施用时,其暴露量 C_{max} 和 AUC_{0-inf} 分别增加了约2.2倍和2.8倍。研究中未报告严重不良事件、特别关注的不良事件或死亡。

[0033] 贝伐拉非尼对脑癌有效

[0034] 根据本公开,已经发现贝伐拉非尼有效穿过BBB并且为用于治疗脑癌的有效化疗药物。

[0035] 如本文所用,“血脑屏障”或“BBB”是指内皮细胞的高选择性半透性边界,其防止循环血液中的溶质非选择性地穿入中枢神经系统的细胞外液。参见Daneman “The blood-brain barrier”, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 7(1)2015。

[0036] 根据迄今为止的实验证据,认为贝伐拉非尼有效穿透到脑中(如动物研究中所示),并且贝伐拉非尼并非两种表达最多的流出抑制剂P-gp和BCRP的底物。如本领域中所知,若药物是这些流出抑制剂中的一种或两种的底物,则该药物通常流出回到血液中且通常将具有低的或无相关的脑穿透。例如,RAF抑制剂药物康奈非尼是P-gp和BCRP流出底物,并提供仅约0.004的脑与血浆比率(参见Pharmacol Res 2018;129:414-23)。进一步地,RAF抑制剂药物维罗非尼是P-gp和BCRP流出底物,并提供仅约0.004至约0.01的脑与血浆比率(参见Pharmacol Exp Ther 2012;342:33-40)。又进一步地,RAF抑制剂药物达拉非尼是P-gp和BCRP流出底物,并且提供仅约0.02至约0.04的脑与血浆比率(参见Pharmacol Exp Ther 2013;344:655-64)。相比之下,贝伐拉非尼并非P-gp和BCRP流出底物,并且提供约0.8

至约1.2的脑与血浆比率。贝伐拉非尼的高脑穿透性的发现可以为带有MAPK突变的脑癌和转移性脑癌提供治疗选择。

[0037] 成年人脑转移的最常见原因和其近似频率如下：

适应症	癌症亚型	频率 (%)
黑素瘤 ¹		44%
NSCLC ²	I/II期	27.5
	III期	19.7
	IV期	47.1
乳腺癌 ³	HR ⁺ /HER2 ⁻	38.8
	HR ⁺ /HER2 ⁺	15.7
	HR ⁻ /HER2 ⁻	10.7
	TNBC	18.7
结直肠癌 ⁴	-	4.4
HCC ⁵	-	37.1 ~ 90.0

[0039] 缩写NSCLC:非小细胞肺癌,HER2:人上皮生长因子受体2,HR:激素受体,+:表示阳性,-:表示阴性,TNBC:三阴性乳腺癌,HCC:肝细胞癌

[0040] 参考文献

[0041] 1.Cancer 2011,117(8),pp1687-96(doi.org/10.1002/cncr.25634)

[0042] 2.Neuro Oncol.2015,17(1),pp122-128.(doi:10.1093/neuonc/nou099)

[0043] 3.Cancer Manag Res,2018,10,pp5329-5338(doi:10.2147/CMAR.S176763)

[0044] 4.Tumori Journal,2019,105(5),427-433(doi.org/10.1177/0300891618765541)

[0045] 5.Oncotarget,2017,8,pp25814-25829(doi.org/10.18632/oncotarget.15730)

[0046] 根据本公开,已在动物研究中发现贝伐拉非尼有效穿过BBB。本领域已知并且接受本公开的实验的啮齿动物模型能可靠地预测人体中的效果。因此,认为贝伐拉非尼将有效地穿过人体中的BBB。进一步地,认为将人肿瘤细胞移植到裸小鼠脑以及利用荧光素酶测定表明肿瘤响应于口服贝伐拉非尼疗法而消退的本发明的实例表明了转换为人类疗法的可能性。

[0047] 转移性脑肿瘤可能是由一种在检测时已进展至IIIb期或更高分期的癌症形式引起。

[0048] 本发明可适用于脑特异性癌症以及一些依赖于MAPK通路的癌症。在后一种情况下,脑转移是导致死亡的主要原因,意味着有效靶向转移性脑肿瘤的方法可有效延长存活期。在脑转移的情况下,尝试化学疗法和/或放射疗法是正常的,如果不成功,可使用靶向性更强的疗法(诸如RAF与MEK抑制剂的组合)。

[0049] 基于本公开的脑药物动力学实验,认为以临床试验中已显示安全且耐受性良好的剂量施用的贝伐拉非尼以治疗量有效穿过BBB。一种此类指示性药物动力学特性为脑与血浆比率(B/P)。贝伐拉非尼B/P比率可由脑的曲线下面积(AUC_{last}) (以ng·小时/g脑组织)和血浆的AUC_{last} (以ng·小时/mL为单位) 计算得出。根据本公开,贝伐拉非尼B/P为约0.3、约0.4、约0.5、约0.6、约0.7、约0.8、约0.9、约1.0、约1.1、约1.2、约1.3、约1.4、约1.5、约1.6或

约1.7或更多,以及由此构建的任何范围,例如约0.3至约1.7、约0.7至约1.6或约0.8至约1.5。达到最大贝伐拉非尼脑浓度的时间($T_{\max}$)为约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时或约10小时,以及由此构建的任何范围,例如约4小时至约10小时、约5小时至约9小时或约6小时至约8小时。脑中贝伐拉非尼的半衰期($t_{1/2}$)为约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时或约12小时,以及由此构建的任何范围,例如约3小时至约12小时、约4小时至约11小时或约5小时至约10小时。脑中的平均停留时间(MRT_{last})为约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时或约20小时,以及由此构建的任何范围,例如约7小时至约20小时、约9小时至约18小时或约10小时至约17小时。

[0050] 贝伐拉非尼脑 AUC_{last} 和峰值脑浓度($C_{\max}$)随剂量而变化。在每kg体重15mg的剂量下, AUC_{last} (以ng·小时/g脑组织为单位)为约25,000、约30,000、约35,000、约40,000、约45,000、约50,000、约55,000、约60,000、约65,000、约70,000、约75,000、约80,000、约85,000、约90,000、约95,000或约100,000或更多,以及由此构建的任何范围,例如约25,000至约100,000、约50,000至约90,000或约65,000至约80,000。在每kg体重15mg的剂量下,脑组织的 $C_{\max}$ (以ng贝伐拉非尼/g脑组织为单位)为约1,000、约1,500、约2,000、约2,500、约3000、约3,500、约4,000、约4,500、约5,000、约5,500、约6,000、约6,500、约7,000、约7,500或约8,000或更多,以及由此构建的任何范围,例如约1,000至约8,000、约2,000至约7,000或约3,000至约6,000。

[0051] 可治疗的癌症

[0052] 在一些方面,癌症为转移性黑素瘤,并且该转移性黑素瘤通过向有此需要的受试者施用包含治疗该转移性黑素瘤有效的量的贝伐拉非尼的疗法来治疗,其中转移的部位是在该受试者的脑内。

[0053] 在一些方面,癌症为脑癌,并且该脑癌通过以下方法来治疗:(i)向有此需要的受试者施用治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐,以治疗该脑癌;(ii)其中该贝伐拉非尼的施用抑制该受试者中的脑癌细胞的生长和活力;以及(iii)其中该脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。

[0054] 在一些方面,癌症为脑癌,且该脑癌通过以下方法来治疗:(i)向有此需要的受试者施用治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐;(ii)向该受试者施用有效量的MEK抑制剂或其药用盐;(iii)其中该贝伐拉非尼和该MEK抑制剂的施用抑制该受试者中的脑癌细胞的生长和活力;以及(iv)其中该脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。

[0055] 在一些方面,癌症为脑癌,并且提供一种用于该脑癌的治疗中的药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐。在一些此类方面,脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。在此类方面的任一方面,贝伐拉非尼的施用抑制脑癌细胞的生长和活力。

[0056] 在一些方面,癌症为脑癌,并且提供一种用于该脑癌的治疗中的药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的贝伐拉非尼或其药用盐。在此类方面,将药物组合物与治疗有效量的MEK抑制剂或其药用盐组合施用,如本文其他地方所描述的。在一些此类方面,脑癌的特征在于经突变的MAPK信号传导通路。在此类方面的任一方面,贝伐拉非尼与MEK抑制剂的组合的施用抑制脑癌细胞的生长和活力。

[0057] 在本公开的各个方面的任一方面,脑癌可以是(i)源自脑的癌症,诸如但不限于胶质母细胞瘤;(ii)在小儿患者中出现的脑肿瘤;或(iii)已转移至脑的RAS突变型癌症,其包括但不限于黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、结直肠癌(CRC)诸如结直肠腺癌、肺腺癌、头颈部鳞状细胞癌和胰管腺癌。其他此类癌症可包括乳腺癌、膀胱尿路上皮癌、胆囊癌、肾胚胎细胞瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、前列腺癌、骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、胆道癌、腺癌、绒毛膜癌和肉瘤。患上述任一者的组合的患者也可能是可治疗的。

[0058] 在一些方面,癌症携带RAF突变。

[0059] 在一些方面,癌症携带BRAF^{V600E}突变。

[0060] 在一些方面,癌症携带非典型BRAF突变,诸如RAF二聚体2类/融合突变或3类突变。

[0061] 在一些方面,癌症携带G13、G12或Q61 NRAS突变中的一者或多者。

[0062] 在一些方面,癌症具有选自NRAS^{G12D}突变、NRAS^{Q61K}突变、NRAS^{Q61R}突变、NRAS^{G12R}突变和NRAS^{G12C}突变中的至少一种突变,并且已经转移至脑。在一些方面,癌症是携带选自Q61R、Q61H、Q61K、Q61L和它们的组合的NRAS突变的黑色素瘤。

[0063] 在一些方面,癌症携带选自KRAS^{G12V}突变、KRAS^{G12D}突变、KRAS^{G12C}突变、KRAS^{G12R}突变和KRAS^{Q61H}突变中的至少一种突变,并且已经转移至脑。在一些方面,癌症是具有选自G12V、G12C、G12D和它们的组合的KRAS突变的结直肠腺癌。在一些方面,癌症是具有选自G12V、G12R、G12D和它们的组合的KRAS突变的胰管腺癌。在一些方面,癌症是具有选自G12V、G12C、G12D和它们的组合的KRAS突变的肺腺癌。

[0064] 在一些此类方面,脑癌具有两种突变,诸如BRAF突变和NRAS突变或者BRAF突变和KRAS突变。在一个方面,癌症携带BRAF^{V600E}突变和NRAS^{Q61L}突变。

[0065] 在一些方面,癌症具有选自BRAF^{V600E}突变、KRAS^{G12V}突变、KRAS^{G12D}突变、KRAS^{G12C}突变、KRAS^{Q61H}突变、NRAS^{G12D}突变、NRAS^{Q61K}突变、NRAS^{Q61R}突变、NRAS^{Q61H}突变、NRAS^{Q61L}突变和NRAS^{G12C}突变中的至少一种突变。

[0066] 在一些方面,癌症是选自携带KRAS^{G12V}突变的肉瘤、携带NRAS^{G12D}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61K}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61L}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{G12C}突变的黑色素瘤、携带KRAS^{G12D}突变的胆囊癌、携带KRAS^{G12C}突变的CRC、携带KRAS^{G12V}突变的CRC、携带KRAS^{Q61H}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的膀胱癌、携带KRAS^{G12V}突变的膀胱癌和它们的组合。

[0067] 在一些方面,癌症为携带KRAS^{G12V}突变的肉瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑色素瘤、携带KRAS^{G12D}突变的胆囊癌、携带KRAS^{G12C}突变的CRC、携带KRAS^{G12V}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的CRC、携带KRAS^{G12D}突变的膀胱癌、携带KRAS^{G12V}突变的膀胱癌和它们的组合。

[0068] 在一些方面,癌症是选自携带NRAS^{Q61L}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61H}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61K}突变的黑色素瘤、携带NRAS^{Q61R}突变的黑色素瘤和它们的组合。

[0069] 在一些方面,脑癌存在于小儿患者中,并且选自具有BRAF^{V600E}突变或KIAA1549-BRAF融合致癌基因的肿瘤。在一个方面,肿瘤为胶质瘤,诸如毛细胞型星形细胞瘤。具有一种或多种此类BRAF突变的其他胶质瘤包括:毛细胞型星形细胞瘤、未分化星形细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、弥漫性原纤维性星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤、婴儿促纤维增生型星形细胞瘤和神经节胶质瘤。

[0070] 给药

[0071] 受试者可适于接受每天每kg体重约2.5mg、每天约5mg/kg、每天约7.5mg/kg、每天约10mg/kg、每天约12.5mg/kg、每天约15mg/kg、每天约17.5mg/kg、每天约20mg/kg、每天约22.5mg/kg或每天约25mg/kg以及由此构建的任何范围诸如每天约2.5mg/kg至每天约25mg/kg、每天约7.5mg/kg至每天约20mg/kg或每天约10mg/kg至每天约15mg/kg的贝伐拉非尼或其药用盐的治疗。

[0072] 贝伐拉非尼的剂量范围可以从足以引起反应的剂量至最大耐受剂量。例如,并且不限于任何特定剂量,每日剂量可适当地为100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1050mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、约1350mg、约1400mg、约1450mg或约1500mg以及由此构建的任何范围,诸如100mg至1300mg、200mg至1300mg、600mg至1300mg、700mg至1200mg或800mg至1000mg。贝伐拉非尼可以上述每日剂量范围向受试者每天给药一次、每天给药两次、每天给药三次或每天给药四次。

[0073] 在一些方面,贝伐拉非尼每天给药两次。在一个此类方面,贝伐拉非尼可以250mg BID、300mg BID、350mg BID、400mg BID、450mg BID或500mg BID的方式给药。给药可以在进食或不进食的情况下进行。给药时间表可以适当地为28天时间表中的每一天或28天时间表中的21天或更多天。

[0074] 贝伐拉非尼的形式

[0075] 贝伐拉非尼可适当地呈现其立体异构体、几何异构体和互变异构体以及溶剂化物、代谢物、同位素、药用盐或前药的形式。在一些特定方面,贝伐拉非尼为其药用盐。

[0076] 如本文所用,术语“药用盐类”意指保有自由碱或自由酸的生物有效性和特性,并且并非在生物上或在其他方面有不利之处的盐类。贝伐拉非尼的示例性酸性盐类包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸柠檬酸盐、酒石酸盐、酒石酸盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐(methanesulfonate或mesylate)、乙磺酸盐、苯磺酸盐以及对甲苯磺酸盐。在一些方面,该盐类选自自由双盐酸盐、双硫酸氢盐、双对甲苯磺酸盐、双乙磺酸盐以及双甲磺酸盐组成的组。在一些方面,该盐类为双盐酸盐或双甲磺酸盐。在一方面,该盐类为双甲磺酸盐。

[0077] 贝伐拉非尼可以适当地为非晶形或结晶形式。在一些方面,该盐类为结晶。在一个此类方面,该盐类为双甲磺酸盐。在一些特定方面,双甲磺酸盐的特征在于当以Cu-K α 光源照射时X射线粉末衍射(PXRD)图谱中具有一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个峰、三个或更多个峰或五个或更多个峰,这些峰选自衍射角 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 值为 5.6° 、 7.1° 、 7.6° 、 11.4° 、 15.1° 、 15.4° 、 16.6° 、 18.2° 、 20.4° 、 21.5° 、 22.3° 、 22.7° 、 23.1° 、 24.4° 、 24.9° 和 25.6° 时的峰。在一些方面该盐类为双盐酸盐。在一些特定方面,双盐酸盐为多晶型I并且其特征在于当以Cu-K α 光源照射时X射线粉末衍射图谱中具有三个或多个峰,这些峰选自衍射角 2θ 值为 $5.89^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $7.77^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $8.31^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $11.80^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $16.68^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $23.22^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $23.69^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $26.89^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $27.51^\circ \pm 0.2^\circ$ 和 $29.53^\circ \pm 0.2^\circ$ 时的峰。固体形式(结晶或非晶形)可以适当地通过在德国BRUKER AXS制造的D8 ADVANCE中所记录的PXRD测定,在25°C和40.0KV以及100mA下操作,使用Cu K α (1.54056 Å)线与旋转。

[0078] 贝伐拉非尼和本公开的范围内的其他活性剂可适当地与一种或多种药用载体、佐剂和/或赋形剂一起配制成胶囊、片剂(丸剂)、粉末、糖浆、分散液、悬浮液、乳化液、溶液等形式。合适的液体载体的非限制性实例包括水;生理食盐水;右旋糖水溶液;乙二醇;乙醇;油包括石油、动物、植物或合成来源的油;以及它们的组合。合适的医药佐剂/赋形剂的非限制性实例包括淀粉、纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、滑石粉、葡萄糖、乳糖、滑石粉、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、二氧化硅、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。贝伐拉非尼也可适当地与其他常规药物添加剂一起配制,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、用于调节渗透压的盐类、缓冲液等。在任何情况下,这类组合物都将含有有效量的贝伐拉非尼,得以制备适当的剂型以适当地施用于受试者。

[0079] 贝伐拉非尼可适当地经口施用于受试者。

[0080] 贝伐拉非尼的功能和作用

[0081] 在本公开的各个方面的任一方面,贝伐拉非尼疗法可导致以下各项中的一项或多项:(i) 脑癌转移的抑制;(ii) 脑癌转移尺寸的减小;(iii) 脑癌转移数量的减少;(iv) 脑癌细胞的数量减少;(v) 脑癌细胞活力的降低;以及(vi) 脑癌细胞生长的抑制。

[0082] 如本文所用,“抑制”和“抑制作用”是指靶酶的活性与不存在抑制剂时该酶的活性相比有所降低。在一些方面,术语“抑制”和“抑制作用”意指活性降低至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%。在其他方面,术语“抑制”和“抑制作用”意指活性降低5%至约25%、约25%至约50%、约50%至约75%或约75%至100%。在一些方面,术语“抑制”和“抑制作用”意指活性降低约95%至100%,例如,活性降低95%、96%、97%、98%、99%或100%。这些降低可使用本领域技术人员所能够认识的多种技术来测量。

[0083] 如本文所用,“减小”和“减少”是指所指示的指标(诸如尺寸、数量和活力)与不存在化学疗法时的指针相比有所降低。在一些方面,术语“减小”和“减少”意指指标降低至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%。在其他方面,术语“减小”和“减少”意指指标降低5%至约25%、约25%至约50%、约50%至约75%或约75%至100%。在一些方面,术语“减小”和“减少”意指指标降低约95%至100%,例如,活性降低95%、96%、97%、98%、99%或100%。这些降低可使用本领域技术人员所能够认识的多种技术来测量。

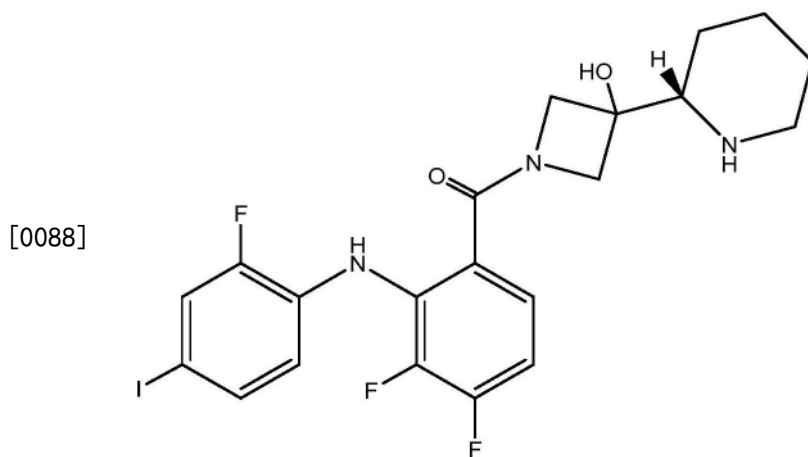
[0084] 与MEK抑制剂的组合疗法

[0085] 在一些方面,至少一种附加疗法可以与贝伐拉非尼疗法共同施用。在一些此类方面,该至少一种附加疗法为化学治疗剂。

[0086] 在一些此类方面,该附加疗法为MEK抑制剂药物。本公开的范围内的MEK抑制剂的实例包括考比替尼(cobimetinib)、曲美替尼(trametinib)、比美替尼(binimetinib)、司美替尼(selumetinib)、匹马西替尼(Pimasertinib)、瑞美替尼(refametinib)、PD-0325901和BI-847325和它们的药用盐。

[0087] 在本公开的一些特定方面,MEK抑制剂为考比替尼或其药用盐(例如, **Cotellic®**)。考比替尼是可逆、有效的高选择性MEK1和MEK2(RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) 的核心组分)通路抑制剂,并且在多种人类癌症模型中具有单药抗肿瘤活性。考比替尼的CAS登记号为1168091-68-6,化学名称为S-[3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯基]-3-羟基-3-(哌啶-

2-基]四氢吡啶-1-基)甲酮,具有以下结构:



[0089] **Cotellic®** 为考比替尼的延胡索酸盐。考比替尼描述于美国专利第7,803,839号和第8,362,002号中,其各自内容通过引用全文并入本文中。

[0090] 考比替尼透过抑制MEK1和MEK2来抑制多种人肿瘤细胞系的增殖。此外,考比替尼在异种移植肿瘤模型中抑制ERK磷酸化并且刺激细胞凋亡。考比替尼在肿瘤异种移植瘤中累积,并在血浆浓度降低后在肿瘤中保持高浓度。考比替尼抑制ERK1磷酸化的活性与其在肿瘤组织中的浓度比在血浆中的浓度更密切相关;一般而言,ERK1磷酸化降低与肿瘤异种移植模型的疗效之间存在良好的相关性。已在几种人肿瘤异种移植模型中观察到肿瘤消退。该消退依赖于剂量,在测试的最高剂量下得到高达100%的消退。所研究的模型包括CRC、恶性黑素瘤、乳腺癌和肺癌。

[0091] 在MEK4592g研究中,在癌症患者口服施用后表征考比替尼作为单药经单次和多次给药后的药物动力学,该研究包括在携带BRAF、NRAS或KRAS突变的患者中评估剂量为每天60mg的考比替尼。共有6例患者(全部患黑素瘤;6.2%)获得经确认的部分缓解(PR),28例患者(28.9%)疾病稳定(SD),40例患者(41.2%)发生进行性疾病。在14例结直肠癌(CRC)患者中,所有患者皆经历了进行性疾病(PD)。在MEK4592g研究的III期中,18例患者入组,并对18例患者中的14例的最佳总缓解进行了评估。4例患者(22.2%)的最佳总缓解为SD,并且2例患者(11.1%)发生未经确认的肿瘤缓解。

[0092] 考比替尼具有中等吸收速率(达到最大浓度的中位时间 $[t_{\max}]$ 为1至3小时),并且平均终末半衰期($t_{1/2}$)为48.8小时(范围为23.1至80小时)。考比替尼以与浓度无关的方式与血浆蛋白(95%)结合。在健康受试者中的研究MEK4952g中,考比替尼在0.05mg/kg(对于70kg成年人,为约3.5mg/kg)至80mg的剂量范围内表现出线性药物动力学,并且绝对生物利用度经确定为45.9%(90% CI:39.74%,53.06%)。在健康受试者中,在空腹状态下施用相比,考比替尼在进食状态下施用时的药物动力学不变。由于食物不改变考比替尼药物动力学,因此考比替尼可在进食或不进食的情况下施用。与在禁食状态下单独施用考比替尼相比,氢离子泵抑制剂雷贝拉唑(rabeprazole)似乎对考比替尼药物动力学的影响极小,无论在存在或不存在高脂膳食的情况下施用均如此。因此,胃pH的增加不影响考比替尼药物动力学,表明其对胃pH的改变不敏感。

[0093] 考比替尼盐、结晶形式和前药在本公开的范围。考比替尼、制备方法和治疗用途公开于国际公开号W0 2007/044515、W0 2014/027056和W0 2014/059422中,其各自通过引

用并入本文中。例如,在本公开的一些方面,MEK抑制剂为结晶半延胡索酸考比替尼多晶型A。

[0094] 本公开的范围内的MEK抑制剂(例如,考比替尼)剂量为每天约20mg至约100mg、约40mg至约80mg或约60mg的MEK抑制剂。在特定实施例中,MEK抑制剂为考比替尼,并且以约60mg、约40mg或约20mg的剂量给药。

[0095] MEK抑制剂适于每天施用一次。在一些方面,MEK抑制剂在28天治疗周期的连续21天每天施用一次。在一些方面,MEK抑制剂在28天治疗周期的第1天至第21天或第3天至第23天每天施用一次。

[0096] 实例

[0097] Hanmi Research Center的机构动物护理和使用委员会批准了实例1至实例3的动物研究方案。

[0098] 实例1:贝伐拉非尼在小鼠中的脑分布。

[0099] 实例1评估了经口施用后贝伐拉非尼在小鼠中的药物动力学特征和脑分布。

[0100] 小鼠品系为韩国Orient Bio Inc.所提供的ICR(CD-1®)。小鼠为雄性,开始给药时为8周龄,并且体重范围为 30 ± 1 克。

[0101] 实验开始前,将小鼠在常规动物实验室笼中饲养5天以适应环境。动物笼为聚砜1291H(W425×D266×H185 mm,Techniplast,意大利)。每个笼子里饲养12只小鼠,温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 $50 \pm 20\%$,通风频率为10-15次/小时,采用12小时暗/光循环,光照强度为150-300勒克司,至少每周更换一次笼子。用充足的自来水给小鼠喂饲Picolab啮齿动物动物饲料(5053,Lab Diet,美国)。

[0102] 向小鼠施用贝伐拉非尼二盐酸盐,其纯度为99.6%并且储存于室温下。剂量基于活性成分游离碱并且针对测定和水含量进行了校正。给药媒介物为DMSO(5%)、cremophore EL(5%)和去离子水(90%)。将用于给药的贝伐拉非尼(28.08mg)溶解于14.40mL媒介物中,最终浓度为1.950mg/mL。

[0103] 在单个一天给药方案中,小鼠经禁食过夜。在治疗当天测量小鼠的体重,依据该体重设定给药体积。然后向小鼠施用10mL/kg贝伐拉非尼溶液,从而提供15mg/kg的活性剂量。在给药后4小时喂饲小鼠。

[0104] 在给药前和给药后期间观察到一般临床体征。未观察到临床症状。

[0105] 在贝伐拉非尼施用后0.5、1、2、4、7、24、48和72小时从眶后神经丛采集血液(0.3mL)。通过以12,000rpm离心2分钟(Eppendorf)以获得血浆,然后收获并且储存于 -20°C 下(Panasonic,MDF-U334-PK)直至分析。

[0106] 在各时间点对小鼠放血后,立即采集脑样本而不进行灌注。将脑组织用盐水洗涤一至两次以去除表面血液。然后修整脑组织。将采集的脑组织准确称重,并与基于脑重量的4倍盐水混合(最终稀释系数为5倍)。然后将各脑样本均质化并且置于1.5mL管中,储存于 -20°C 下(Panasonic,MDF-U334-PK)直至分析。

[0107] 类似地获得未经治疗的动物的血浆和脑,以用作空白基质。

[0108] 通过使用LC-MS/MS(Waters UPLC H-Class/Xevo TQ(Waters USA))进行分析,确定贝伐拉非尼的血浆和脑浓度。

[0109] 使用Phoenix™ WinNonlin 8.1(Certara,美国),通过非房室方法依据血浆和脑

浓度-时间数据计算贝伐拉非尼的药物动力学参数。直接由原始数据获得峰值血浆和脑浓度 ($C_{\max}$) 以及相应的时间 ($T_{\max}$)。通过线性对数梯形求和, 获得血浆曲线下面积 (AUC_{last})。使用WinNonlin计算其他PK参数, 诸如从给药时间外推至无穷大的AUC (AUC_{inf})、半衰期 ($t_{1/2}$) 和平均停留时间 (MTR_{last})。贝伐拉非尼的血浆和脑浓度表示为平均值 $\pm$ S.D.。通过将脑中的 AUC_{last} 除以血浆中的 AUC_{last} 来计算贝伐拉非尼的脑与血浆比率 (B/P)。

[0110] 以15mg/kg的剂量经口施用后, 小鼠中贝伐拉非尼的平均 ($\pm$ S.D.) 血浆和脑浓度-时间曲线 (AUC)、 $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、MRT和B/P比率呈现于表1中。

[0111] 表1: 经口施用15mg/kg贝伐拉非尼后, 小鼠中贝伐拉非尼的药物动力学参数 (3个数据/时间点)

[0112]	参数	血浆	脑
	AUC_{last}	84264.0 ng·h/mL	78259.6 ng·h/g
	AUC_{inf}	84347.9 ng·h/mL	78297.5 ng·h/g
	$C_{\max}$	4782.1 ng/mL	5238.8 ng/g
	$T_{\max}$ (h)	4.0	7.0
	$T_{1/2}$ (h)	6.6	6.3
	MRT_{last} (h)	14.3	11.8
	B/P 比率	0.929	

[0113] 以30mg/kg的剂量经口施用后, 小鼠中贝伐拉非尼的平均 ($\pm$ S.D.) 血浆和脑浓度-时间曲线 (AUC)、 $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 和B/P比率呈现于表2中。

[0114] 表2: 经口施用30mg/kg贝伐拉非尼后, 小鼠中贝伐拉非尼的药物动力学参数 (3个数据/时间点)

[0115]	参数	血浆	脑
	AUC_{last}	132721.0 ng·h/mL	100735.8 ng·h/g
	AUC_{inf}	133431.0 ng·h/mL	100848.0 ng·h/g
	$C_{\max}$	6211.4 ng/mL	6099.0 ng/g
	$T_{\max}$ (h)	7.0	7.0
	B/P 比率	0.8	

[0116] 实例1的结果表明, 经口施用剂量为15mg/kg的贝伐拉非尼后, 血浆中的 AUC_{last} 和 $C_{\max}$ 分别为84264.0ng·h/mL和4782.1ng/mL。血浆 $T_{\max}$ 和半衰期分别为4.0小时和6.6小时。脑中的 AUC_{last} 和 $C_{\max}$ 分别为78259.6ng·h/g和5238.8ng/g。脑 $T_{\max}$ 和半衰期分别为7.0小时和6.3小时。实例1的结果表明, 经口施用剂量为30mg/kg的贝伐拉非尼后, 血浆中的 AUC_{last} 和 $C_{\max}$ 分别为132731.0ng·h/mL和6211.4ng/mL。血浆 $T_{\max}$ 为7.0小时。脑中的 AUC_{last} 和 $C_{\max}$ 分别为100735.8ng·h/g和6099.0ng/g。脑 $T_{\max}$ 为7.0小时。数据显示, 贝伐拉非尼缓慢分布至脑部, $T_{\max}$ 稍晚于血浆中的结果。贝伐拉非尼在脑和血浆中的暴露量与 AUC_{last} 和 $C_{\max}$ 相似, 相差约1倍。在小鼠中, 基于15.0mg/kg和30.0mg/kg的贝伐拉非尼的 AUC_{last} 的B/P比率分别为0.929和0.8, 表明其高度分布于小鼠脑中。因此, 该实例显示了贝伐拉非尼透过血脑屏障的高穿透性。

[0117] 实例2: 贝伐拉非尼在大鼠中的脑分布。

[0118] 实例2评估了经口施用后贝伐拉非尼在大鼠中的药物动力学特征和脑分布。

[0119] 大鼠品系为韩国Orient Bio Inc.所提供的SD。大鼠为雄性,开始给药时为7周龄,并且体重范围为 230.1 ± 6.4 克。

[0120] 实验开始前,将大鼠在常规动物实验室笼中饲养5天以适应环境。动物笼为聚砜1291H(W425×D266×H185 mm,Techniplast,意大利)。每个笼子里饲养3只大鼠,温度 22 ± 2 °C,相对湿度 $50 \pm 20\%$,通风频率为10-15次/小时,采用12小时暗/光循环,光照强度为150-300勒克司,至少每周更换一次笼子。用充足的自来水给小鼠喂饲Picolab啮齿动物动物饲料(5053,Lab Diet,美国)。

[0121] 向大鼠施用贝伐拉非尼二盐酸盐,其纯度为99.6%并且储存于室温下。剂量基于活性成分游离碱并且针对测定和水含量进行了校正。给药媒介物为DMSO(10%)、PEG 400(50%)和去离子水(40%)。将用于给药的贝伐拉非尼(169.51mg)溶解于86.93mL媒介物中,最终浓度为1.950mg/mL。

[0122] 在单个一天给药方案中,大鼠经禁食过夜。在治疗当天测量大鼠的体重,依据该体重设定给药体积。然后向大鼠施用10mL/kg贝伐拉非尼溶液,从而提供15mg/kg的活性剂量。在给药后4小时喂饲大鼠。

[0123] 在给药前和给药后期间观察到一般临床体征。未观察到临床症状。

[0124] 在贝伐拉非尼施用后0.5、1、2、4、7、24、48和72小时从腹动脉采集血液(0.3mL)。通过以12,000rpm离心2分钟(Eppendorf)以获得血浆,然后收获并且储存于-20°C下(Panasonic,MDF-U334-PK)直至分析。

[0125] 在各时间点对大鼠放血后,立即采集脑样本而不进行灌注。将脑组织用盐水洗涤一至两次以去除表面血液。然后修整脑组织。将采集的脑组织准确称重,并与基于脑重量的4倍盐水混合(最终稀释系数为5倍)。然后将各脑样本均质化并且置于1.5mL管中,储存于-20°C下(Panasonic,MDF-U334-PK)直至分析。

[0126] 类似地获得未经治疗的动物的血浆和脑,以用作空白基质。

[0127] 通过使用LC-MS/MS(Waters UPLC H-Class/Xevo TQ(Waters USA))进行分析,确定贝伐拉非尼的血浆和脑浓度。

[0128] 使用Phoenix™ WinNonlin 8.1(Certara,美国),通过非房室方法依据血浆和脑浓度-时间数据计算贝伐拉非尼的药物动力学参数。直接由原始数据获得峰值血浆和脑浓度(C_{max})以及相应的时间(T_{max})。通过线性对数梯形求和,获得血浆曲线下面积(AUC_{last})。使用WinNonlin计算其他PK参数,诸如从给药时间外推至无穷大的AUC(AUC_{inf})、半衰期($t_{1/2}$)和平均停留时间(MTR_{last})。贝伐拉非尼的血浆和脑浓度表示为平均值±S.D.。通过将脑中的 AUC_{last} 除以血浆中的 AUC_{last} 来计算贝伐拉非尼的脑与血浆比率(B/P)。

[0129] 以15mg/kg的剂量经口施用后,小鼠中贝伐拉非尼的平均(±S.D.)血浆和脑浓度-时间曲线(AUC)、 T_{max} 、 $t_{1/2}$ 、MRT和B/P比率呈现于表3中。

[0130] 表3:经口施用15mg/kg贝伐拉非尼后,大鼠中贝伐拉非尼的药物动力学参数(3个数据/时间点)

[0131]

参数	血浆	脑
AUC _{last}	49418.4 ng·h/mL	67954.7 ng·h/g
AUC _{inf}	50614.3 ng·h/mL	68350.0 ng·h/g
C _{max}	2132.9 ng/mL	3914.3 ng/g
T _{max} (h)	4.0	7.0
T _{1/2} (h)	12.5	9.0
MRT _{last} (h)	18.0	15.5
B/P 比率	1.375	

[0132] 以30mg/kg的剂量经口施用后,大鼠中贝伐拉非尼的平均(±S.D.)血浆和脑浓度-时间曲线(AUC)、C_{max}、T_{max}和B/P比率呈现于表4中。

[0133] 表4:经口施用30mg/kg贝伐拉非尼后,大鼠中贝伐拉非尼的药物动力学参数(3个数据/时间点)

[0134]

参数	血浆	脑
AUC _{last}	97988.0 ng·h/mL	113670.1 ng·h/g
AUC _{inf}	100034.5 ng·h/mL	115222.3 ng·h/g
C _{max}	4151.7 ng/mL	4876.0 ng/g
T _{max} (h)	7.0	4.0
B/P 比率	1.2	

[0135] 实例2的结果表明,经口施用剂量为15mg/kg的贝伐拉非尼后,血浆中的AUC_{last}和C_{max}分别为49418.4ng·h/mL和2132.9ng/mL。血浆T_{max}和半衰期分别为4.0小时和12.5小时。脑中的AUC_{last}和C_{max}分别为67954.7ng·h/g和3914.3ng/g。脑T_{max}和半衰期分别为7.0小时和9.0小时。实例2的结果表明,经口施用剂量为30mg/kg的贝伐拉非尼后,血浆中的AUC_{last}和C_{max}分别为97988.0ng·h/mL和4151.7ng/mL。血浆T_{max}为7.0小时。脑中AUC_{last}和C_{max}分别为113670.1ng·h/g和4876.0ng/g。脑T_{max}为7.0小时。脑中的暴露量高于血浆中的暴露量。在大鼠中,基于15mg/kg和30mg/kg的剂量的贝伐拉非尼的AUC_{last}的B/P比率分别为1.375和1.2,表明其高度分布于大鼠脑中。因此,该实例显示了贝伐拉非尼透过血脑屏障的高穿透性。

[0136] 实例3:贝伐拉非尼与人BCRP和MDR1 ABC(流出)转运蛋白的相互作用

[0137] 开展实验以确定贝伐拉非尼是否是在血脑屏障上表达的流出转运蛋白P-gp和BCRP的底物。

[0138] 用DMSO制备贝伐拉非尼2HCl的储备溶液(10mM、1.33mM、1mM和0.1mM)。用DMSO制备系列稀释液(7步,3倍),并且将其用作抑制测定中的测试溶液(稀释100倍)。底物实验中的稀释系数为100倍。在该测定中,测定缓冲液中的溶剂浓度不超过1.5%(v/v)。

[0139] 用于检测的仪器包括配备Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max三重四极MS的Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000系列UHPLC(Thermo Scientific, San Jose, CA); Perkin Elmer MicroBeta2液体闪烁计数器(Perkin Elmer, Waltham MA)和BMG Labtech FluoStar Omega多功能酶标仪(BMG Labtech, Offenburg, 德国)。

[0140] 使用由过表达人ABC转运蛋白的细胞所制得的内外膜囊泡进行囊泡转运测定。转

运蛋白已由SOLVO Biotechnology通过化学选择在哺乳动物(K和M)细胞中表达。

[0141] 囊泡转运测定的参数列于表6中,其中:“BCRP”是指乳腺癌抗性蛋白;“MDR1”是指多药耐药蛋白1;“E3S”是指雌酮-3-硫酸盐;“NMQ”是指N-甲基奎尼丁。

[0142] 表5.囊泡转运测定参数

[0143]	转运蛋白	蛋白含量/ 孔 (μg)	孵育 时间 (min)	探针 底物	参考 抑制剂
	人 BCRP (ABCG2)	25	1	E3S (1 μM)	Ko134 (1 μM)
	人 MDR1 (ABCB1/P-gp)	50	3	NMQ (2 μM)	维拉帕米 (verapamil) (100 μM)

[0144] 将贝伐拉非尼2HCl与膜囊泡制剂(总蛋白:MDR1为50μg/孔,并且BCRP为25μg/孔)和探针底物共孵育。在4mM ATP或AMP存在下进行孵育,以区分转运蛋白所介导的摄取与被动扩散至囊泡中。将贝伐拉非尼2HCl添加至0.75μL溶剂(最终孵育体积的1%)中的反应混合物中。将反应混合物于37±1℃(或对于BCRP为32±1℃)下预孵育15分钟。通过添加25μL的12mM MgATP(或作为背景对照的测定缓冲液中的12mM AMP)引发反应,单独预孵育。通过添加200μL冰冷的洗涤缓冲液并且经由安装在96孔板(滤板)上的玻璃纤维过滤器立即过滤来淬灭反应。洗涤过滤器(5×200μL冰冷的洗涤缓冲液)、干燥,并且通过液体闪烁计数来确定经过滤的囊泡内底物的量。治疗组列于表6中。

[0145] 表6:96孔板形式的治疗组孔数

[0146]	96 孔板形式的治疗组		孔数
	相应的囊泡转运 (VT) 缓冲液中的贝伐拉非尼 2HCl, 含 1% DMSO (0.02、0.05、0.16、0.49、1.48、4.43 和 13.3 μM) 和 ATP		3
	相应的 VT 缓冲液中的贝伐拉非尼 2HCl, 含 1% DMSO (0.02、0.05、0.16、0.49、1.48、4.43 和 13.3 μM) 和 AMP		3
	含 ATP 的 1% DMSO 对照		3
[0147]	含 AMP 的 1% DMSO 对照		3
	相应的 VT 缓冲液中的参考抑制剂, 含 1% DMSO 和 ATP		3
	相应的 VT 缓冲液中的参考抑制剂, 含 1% DMSO 和 AMP		3

[0148] 对照如下。用AMP孵育为所有数据点提供了背景活性值。用探针底物(仅溶剂)孵育提供了100%活性值。参考抑制剂用作抑制的阳性对照。

[0149] 用于囊泡转运底物测定的实验方法。使用由过表达BCRP或MDR1ABC转运蛋白的细胞以及对照细胞所制得的由内而外的膜囊泡(总蛋白:MDR1为50μg/孔,或BCRP为25μg/孔)确定贝伐拉非尼2HCl摄取到膜囊泡中的情况。在ATP或AMP存在下测试两个孵育时间点(2分钟和20分钟)和两种浓度(1μM和10μM)的贝伐拉非尼2HCl,以确定贝伐拉非尼2HCl是否被有效转运到囊泡中。将反应混合物以及起始试剂(MgATP和AMP溶液)于32℃(用于BCRP)和37℃(用于MDR1测定)预孵育15分钟。通过将起始试剂(MgATP或AMP)添加至适当的孔中以引发反应。通过添加200μL冰冷的洗涤缓冲液并且经由安装在96孔板(滤板)上的玻璃纤维过滤器立即过滤来淬灭反应。将过滤器用5×200μL冰冷的洗涤缓冲液洗涤并且干燥。用100μL

MeOH:H₂O (2:1) 将囊泡洗涤2次后,通过LC-MS/MS检测以确定保留在囊泡内的累积贝伐拉非尼2HCl的量。可行性试验的条件和实验组列于表7中。

[0150] 表7

[0151]	96 孔板形式的治疗组	孔数
	表达转运蛋白的囊泡中的 1 μ M 和 10 μ M 贝伐拉非尼 2HCl 以及两种孵育时间 (2 分钟和 20 分钟), 三重复方式, 包含 ATP 或 AMP	24
	对照囊泡中的 1 μ M 和 10 μ M 贝伐拉非尼 2HCl 以及两种孵育时间 (2 分钟和 20 分钟), 三重复方式, 包含 ATP 或 AMP	24
	用于表达转运蛋白的囊泡和对照囊泡的初始浓度值, 三重复方式	12

[0152] 对于所有孔,易位探针底物的量以cpm为单位确定。使用以下公式计算相对活性: 相对活性% = (A-B)/(C-D) × 100。A是在TA和ATP存在下易位底物的量。B是在TA和AMP存在下易位底物的量。C是在溶剂和ATP存在下易位底物的量。D是在溶剂和AMP存在下易位底物的量。

[0153] 在囊泡转运底物测定中,使用以下公式计算含有转运蛋白的囊泡和对照囊泡中,每个浓度和时间点的TA的ATP依赖性转运以及ATP依赖性倍数累积:

[0154] $\text{ATP-依赖性转运} = n_{\text{ATP}} - n_{\text{AMP}}$

[0155] $\text{倍数累积} = n_{\text{ATP}} / n_{\text{AMP}}$ n_{ATP} 是在4mM ATP存在下易位TA的量,以pmol/mg为单位。 n_{AMP} 是在4mM AMP存在下易位TA的量,以pmol/mg为单位。

[0156] 若含有转运蛋白的囊泡中ATP依赖性倍数累积值>2且可能被已知的转运蛋白抑制剂抑制,则TA可以被视为所研究的转运蛋白的底物。此外,在对照囊泡中未观察到类似的ATP依赖性倍数累积。

[0157] 使用Microsoft Excel 2010(Microsoft Corporation,Redmond,WA)进行基本数据处理,并且使用GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software Inc.,San Diego,CA)进行曲线拟合和反应参数的确定。在囊泡转运抑制测定中,在适用的情况下计算IC₅₀ (μ M)。IC₅₀被定义为将最大活性抑制50%所需的TA浓度。IC₅₀值源自四参数逻辑斯谛方程式[log(抑制剂) vs. 反应-可变斜率];使用非线性回归将曲线拟合至相对活性vs.TA浓度图。除非另有说明,否则顶部(最大反应)值和底部(经最大抑制的反应)值分别不限于100和0的恒定值。

[0158] 结果表明,贝伐拉非尼2HCl在所应用的浓度下以剂量依赖性方式抑制BCRP所介导的E3S累积。即使在所研究的最低浓度(0.02 μ M)下,也检测到70%的抑制率。将曲线顶部限制在100%,估计IC₅₀值为0.011 μ M。

[0159] 结果进一步表明,贝伐拉非尼2HCl在所应用的浓度下以剂量依赖性方式抑制MDR1所介导的NMJ累积,最大抑制率为32%。即使抑制率未达到50%,估计相互作用的IC₅₀值为29.64 μ M。在估计时,应用底部约束(0%)。

[0160] 在囊泡转运底物测定中,在ATP和AMP存在下,贝伐拉非尼2HCl的ATP依赖性累积类似(ATP依赖性倍数累积<2),表明在测试的所有条件下,贝伐拉非尼2HCl在表达转运蛋白的囊泡或对照囊泡中未发生有效累积(对于BCRP和MDR1两者)。阳性对照实验确认了转运蛋白在所应用的囊泡中的功能。结果总结呈现于表8中。

[0161] 表8

[0162]	抑制结果			底物结果	
	转运蛋白和测定类型	最大抑制 (占对照的百分比)	IC ₅₀ (μM)	表达转运蛋白的囊泡中的最大 ATP 依赖性倍数累积	底物
	BCRP VT	99.8%	0.011	1.51	不太可能
	MDR1 VT	32%	29.64	1.23	不太可能

[0163] 数据显示,贝伐拉非尼2HC1抑制BCRP,估计IC₅₀值为0.011μM。数据进一步显示,贝伐拉非尼2HC1在最高应用浓度(13.3μM)下对MDR1的抑制率为32%,估计IC₅₀值为29.64μM。总之,贝伐拉非尼2HC1可能并非MDR1或BCRP的底物,因为在所应用的实验条件下未检测到ATP或转运蛋白依赖性累积。

[0164] 实例4:贝伐拉非尼在异种脑转移小鼠模型中的抗肿瘤疗效评估。

[0165] 小鼠品系由韩国Orient Bio Inc.所饲养和提供的BALB/c裸小鼠(nu/nu)。小鼠为雄性,开始给药时为7周龄,并且体重范围为13.9g至20.4g。

[0166] 实验开始前,将小鼠在常规动物实验室笼中饲养至少一周以适应环境。动物笼为聚砜1291H(W425×D266×H185 mm,Techniplast,意大利)。每个笼子里饲养8只小鼠,温度22±2℃,相对湿度50±20%,通风频率为10-15次/小时,采用12小时暗/光循环,光照强度为150-300勒克司,至少每周更换一次笼子。向小鼠随意喂饲Picolab啮齿动物动物饲料(5053,Lab Diet,美国)。随意给予经UV照射和过滤的自来水。

[0167] 癌细胞系为携带BRAF^{V600}突变的A375SM-Luc。该细胞系被认为适于RAF抑制剂在黑素瘤中对BRAF^{V600}的疗效研究。

[0168] 建立A375SM-Luc细胞系的方法如下。将A375SM细胞以2.5×10⁵个细胞/孔的密度接种到24孔透明平底板中的补充有10% FBS(Gibco,USA)的MEM培养基(Gibco,USA)中。次日,将CMV-Firefly荧光素酶慢病毒(Cellomics Inc.,美国)用含有8μg/mL聚凝胺(Sigma Aldrich,St.Louis MO,美国)的完全培养基稀释。将细胞在所制得的培养基中以800xg离心90分钟,然后在新鲜培养基中孵育2至3天。使用嘌呤霉素选择稳定的克隆株,并且通过在添加10μL(15mg/mL)D-荧光素(Gold Biotechnology,美国)后使用IVIS®Lumina III系列体内成像系统(PerkinElmer Inc.,美国)测量其发光,筛选单个克隆株的荧光素酶活性。体外培养基为MEM 10% FBS。体外培养条件为在5% CO₂中于37℃孵育。

[0169] 体内细胞接种方法如下。通过腹膜内(i.p.)注射30mg/kg Zoletil 50(Virbac,法国)和10mg/kg Rompun(Bayer Korea,韩国),将小鼠麻醉。使用立体定向固定装置(David Kopf Instruments,美国)将悬浮于10μL磷酸盐缓冲生理食盐水中的5000个细胞颅内注射到右额半球中(AP+2.0,ML-1.0,DV+2.0,来自前囟)。在两天内产生小鼠模型。

[0170] 在接种(植入)后6-7天,通过BLI(每组8只小鼠)按肿瘤负荷将小鼠随机分组。然后向小鼠施用贝伐拉非尼二盐酸盐,其纯度为99.6%并且储存于室温下。剂量基于活性成分游离碱并且针对测定和水含量进行了校正。给药媒介物为DMSO(5%)、cremophore EL(5%)和去离子水(90%)。用于给药的贝伐拉非尼溶于媒介物中。

[0171] 贝伐拉非尼(第2组和第3组)和媒介物(第1组)以10mL/kg(p.o.)的剂量每天一次(QD)给药,持续102天。研究组设计和剂量如下表9所示。

[0172] 表9

[0173]	组	个体	贝伐拉非尼剂量 (mg/kg)
	1	1至8	媒介物 (0mg/kg)
	2	9至16	5mg/kg
	3	17至24	15mg/kg

[0174] 在试验期间每天至少观察一次一般临床体征。在给药期间每周进行两次体重测量。相对体重 (%) 通过以下方式计算: 第X天体重 (g) / 初始体重 (g) × 100 (第X天 = 体重测量日)。每周使用 **IVIS® Lumina III** 系列体内成像系统 (PerkinElmer Inc., 美国) 通过生物发光成像 (BLI) 测量肿瘤负荷。在 **Living Image®** 软件中对曝光时间和像素聚类进行了优化, 并且将生物发光信号显示为强度图。从药物施用日期开始绘制显示第1组至第3组小鼠存活期延长的卡普兰-麦尔生存曲线。中位总存活率 (mOS) 为 50% 的小鼠死亡并且 50% 的小鼠存活的时间量。

[0175] 数据表示为平均值 ± 平均值的标准误差 (SEM)。使用 **GraphPad PRISM®** 第6版 (GraphPad Software, 美国) 进行统计分析。进行长期试验以评估组间显著差异。p 值小于 0.05 被视为具有统计学显著性。

[0176] 临床体征、体重减轻和临床体征报告于下表10中。在贝伐拉非尼第2组和第3组中, 从施用第7天开始出现毛发生长, 并且在11天内未发现其他临床体征或体重减轻。第11天后, 媒介物表现出体重减轻和多种临床体征, 诸如消瘦、体温过低、苍白、瘀点、结痂、虚弱和腹胀, 其是由肿瘤生长所导致的虚弱引起。第2组 (5mg/kg 贝伐拉非尼) 从第14天开始, 并且第3组 (15mg/kg 贝伐拉非尼) 从第16天开始, 发生类似的临床体征。第2组和第3组中的效应是由于肿瘤而非药物所导致的效应。表10中: “belv.” 是指贝伐拉非尼; “----” 是指无明显发现; “EM” 是指消瘦; “H” 是指体温过低; “HG” 是指毛发生长; “PA” 是指苍白; “W” 是指虚弱; “D” 是指死亡; “P” 是指瘀点; “S” 是指结痂; 并且括号中的资料是指出现症状的动物数量/存活的动物总数。

[0177] 表10: A375SM_Luc 细胞脑转移模型中的临床体征。

[0178]

天数	媒介物 (第 1 组)	5 mg/kg belv. (第 2 组)	15 mg/kg belv. (第 3 组)
1	----	----	----
2	----	----	----
3	----	----	----
4	----	----	----
5	----	----	----
6	----	----	----
7	----	HG (5/8)	HG (4/8)
8	----	HG (8/8)	HG (8/8)
9	----	HG (8/8)	HG (8/8)
10	----	HG (8/8)	HG (8/8)
11	----	HG (8/8)	HG (8/8)
12	EM (1/8)	HG (8/8)	HG (8/8)
13	EM (2/8); PA (1/8)	HG (8/8)	HG (8/8)
14	EM (2/8); PA (1/8); H (1/8); W (1/8)	HG (8/8); EM (1/8)	HG (8/8)
15	D (1/8); EM (1/8); W (1/8)	HG (8/8); EM (1/8)	HG (8/8)
16	P (1/7); EM (1/7);	HG (7/8); EM (1/8);	HG (8/8); EM (1/8)

[0179]

天数	媒介物 (第 1 组)	5 mg/kg belv. (第 2 组)	15 mg/kg belv. (第 3 组)
	W (1/7)	D (1/8)	
17	P (1/7); EM (1/7); W (1/7); S (1/7)	HG (7/7); EM (1/7); W (1/7); H (1/7)	HG (8/8); EM (1/8)
18	P (1/7); EM (1/7); W (1/7); S (1/7); AD (1/7); H (1/7)	HG (6/7); D (1/7)	HG (8/8); EM (1/8); W (1/8)
19	P (1/7); S (4/7); AD (1/7); D (1/7)	HG (6/6)	HG (8/8); EM (1/8); W (1/8)
20	EM (4/6); S (5/6); D (1/6)	HG (6/6)	HG (7/8); D (1/8)
21	S (5/5); EM (4/5)	HG (6/6)	HG (7/7)
22	S (5/5); EM (4/5); W (3/5)	HG (6/6)	HG (7/7)
23	S (5/5); EM (5/5); W (4/5); H (1/5)	HG (6/6); EM (1/6)	HG (7/7)
24	S (4/5); EM (4/5); W (4/5); H (2/5); D (1/5)	HG (6/6); EM (1/6)	HG (7/7)
25	S (2/4); EM (2/4); W (2/4); H (2/4); D (2/4)	HG (6/6); EM (1/6)	HG (7/7)
26	S (1/2); EM (1/2); W (1/2); H (1/2); D (1/2)	HG (6/6); EM (1/6)	HG (7/7)
27	S (1/1); EM (1/1); W (1/1); H (1/1)	HG (6/6); EM (1/6)	HG (7/7)
28	D (1/1)	HG (6/6); EM (2/6)	HG (7/7)
29	N/A	HG (6/6); EM (4/6)	HG (7/7)
30	N/A	HG (6/6); EM (4/6)	HG (7/7)
31	N/A	HG (6/6); EM (4/6); W (2/6)	HG (7/7)
32	N/A	HG (6/6); EM (4/6); W (2/6); H (1/6); PA (1/6)	HG (7/7)
33	N/A	HG (5/6); EM (5/6);	HG (7/7)

[0180]

天数	媒介物 (第 1 组)	5 mg/kg belv. (第 2 组)	15 mg/kg belv. (第 3 组)
		W (2/6); H (1/6); PA (1/6); D (1/6)	
34	N/A	HG (4/5); EM (4/5); W (2/5); PA (1/5); D (1/5)	HG (7/7)
35	N/A	HG (3/4); EM (3/4); W (1/4); PA (1/4); D (1/4)	HG (7/7)
36	N/A	HG (2/3); EM (2/3); D (1/3)	HG (7/7)
37	N/A	HG (2/2); EM (2/2); W (1/2)	HG (7/7)
38	N/A	HG (2/2); EM (2/2); W (2/2)	HG (7/7)
39	N/A	HG (2/2); EM (2/2); W (2/2); PA (1/2)	HG (7/7)
40	N/A	D (2/2)	HG (7/7)
41	N/A	N/A	HG (7/7)
42	N/A	N/A	HG (7/7)
43	N/A	N/A	HG (7/7)
44	N/A	N/A	HG (7/7)
45	N/A	N/A	HG (7/7)
46	N/A	N/A	HG (7/7)
47	N/A	N/A	HG (7/7)
48	N/A	N/A	HG (7/7); EM (1/7)
49	N/A	N/A	HG (7/7); EM (1/7)
50	N/A	N/A	HG (7/7); EM (1/7)
51	N/A	N/A	HG (7/7); EM (2/7); W (1/7)
52	N/A	N/A	HG (6/7); EM (1/7); W (1/7); D (1/7)
53	N/A	N/A	HG (6/6); EM (2/6); W (1/6)
54	N/A	N/A	HG (5/6); EM (1/6); D (1/6)
55	N/A	N/A	HG (5/5); EM (1/5)

[0181]

天数	媒介物 (第 1 组)	5 mg/kg belv. (第 2 组)	15 mg/kg belv. (第 3 组)
56	N/A	N/A	HG (5/5); EM (1/5); W (1/5)
57	N/A	N/A	HG (5/5); EM (1/5); W (1/5)
58	N/A	N/A	HG (5/5); EM (1/5); W (1/5)
59	N/A	N/A	HG (5/5); EM (1/5); W (1/5)
60	N/A	N/A	HG (5/5); EM (1/5); W (1/5)
61	N/A	N/A	HG (4/5); D (1/5)
62	N/A	N/A	HG (4/4)
63	N/A	N/A	HG (4/4)
64	N/A	N/A	HG (4/4)
65	N/A	N/A	HG (4/4)
66	N/A	N/A	HG (4/4)
67	N/A	N/A	HG (4/4)
68	N/A	N/A	HG (4/4)
69	N/A	N/A	HG (4/4)
70	N/A	N/A	HG (4/4)
71	N/A	N/A	HG (4/4)
72	N/A	N/A	HG (4/4)
73	N/A	N/A	HG (4/4)
74	N/A	N/A	HG (4/4)
75	N/A	N/A	HG (4/4); AD (1/4)
76	N/A	N/A	HG (4/4); AD (1/4)
77	N/A	N/A	HG (4/4); AD (1/4)
78	N/A	N/A	HG (4/4); AD (1/4); S (1/4)
79	N/A	N/A	HG (3/4); D (1/4)
80	N/A	N/A	HG (3/3)
81	N/A	N/A	HG (3/3)
82	N/A	N/A	HG (3/3)
83	N/A	N/A	HG (3/3)
84	N/A	N/A	HG (3/3)
85	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3)
86	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3)

[0182]

天数	媒介物 (第 1 组)	5 mg/kg belv. (第 2 组)	15 mg/kg belv. (第 3 组)
87	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3)
88	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3); H (1/3)
89	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3); H (1/3)
90	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3); H (1/3)
91	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3); H (1/3)
92	N/A	N/A	HG (3/3); EM (1/3); H (1/3)
93	N/A	N/A	HG (2/3); EM (1/3); H (1/3); W (1/3)
94	N/A	N/A	HG (2/3); EM (1/3); H (1/3); W (1/3)
95	N/A	N/A	HG (2/3); EM (1/3); H (1/3); W (1/3)
96	N/A	N/A	HG (2/3); EM (1/3); H (1/3); W (1/3)
97	N/A	N/A	HG (2/3); EM (1/3); H (1/3); W (1/3)
98	N/A	N/A	HG (2/3); EM (1/3); H (1/3); W (1/3)
99	N/A	N/A	HG (2/3); D (1/3)
100	N/A	N/A	HG (2/2)
101	N/A	N/A	HG (2/2)
102	N/A	N/A	HG (2/2)
103	N/A	N/A	HG (2/2)

[0183] 在第1、5、12、19、26、33、40、47、54、61、68、75、82、89、96和103天中的每一天,向小鼠腹膜内注射15mg/mL D-荧光素,并且使用IVIS® Lumina III系列体内成像系统(PerkinElmer Inc.,美国)进行BLI成像评估。结果呈现于图1中。

[0184] BLI用于量化纵向脑生长。以5mg/kg给药的贝伐拉非尼表现出比媒介物更有效的肿瘤抑制作用,并且以15mg/kg给药的贝伐拉非尼相比于媒介物导致肿瘤生长显著延迟。更特定而言,与媒介物(mOS24.5天)相比,以5mg/kg和15mg/kg给药的贝伐拉非尼相比导致存活期显著延长,中位数存活时间(mOS)分别达到34.5天($p < 0.05$)和70.0天($p < 0.001$)。见图2和表11。表11中:“mOS”是指中位总存活;并且最大体重减轻是通过 $(1 - \text{受试者相对体重的平均值}) \times 100$ 计算。在该实例中,第Y天具有最大的体重减轻。

[0185] 表11

[0186]	治疗	mOS (天)	最大体重减轻 (%)
--------	----	---------	------------

媒介物	24.5	22.2 (第25天)
贝伐拉非尼 (5mg/kg)	34.5	33.0 (第39天)
贝伐拉非尼 (15mg/kg)	70.0	----

[0187] 表11中的媒介物(表12)、5mg/kg贝伐拉非尼(表13)和15mg/kg贝伐拉非尼(表14)的原始资料呈现于表12至表14中。

[0188] 表12:接受媒介物的A375SM_Luc细胞脑转移小鼠模型的受试者体重(克)

[0189]	动物/ 天数	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	SEM
	0	17.3	18.2	17.3	20.3	17.1	17.8	19.6	13.9	17.7	0.7
	4	18.0	19.2	17.9	20.3	17.3	18.3	19.4	13.6	18.0	0.7
	8	17.9	19.1	18.2	20.4	18.0	19.4	20.4	12.8	18.3	0.9
	11	17.2	18.5	17.9	20.0	18.0	19.0	20.5	12.0	17.9	0.9
	15	15.9	17.3	17.2	20.0	16.8	18.5	18.9	10.5	16.9	1.0
	18	----	16.0	16.7	18.7	15.7	17.9	18.0	9.8	16.1	1.1
	22	----	13.0	15.3	----	14.3	14.7	16.5	----	14.8	0.6
	25	----	----	15.0	----	----	----	13.5	----	14.3	0.8

[0190] 表13:接受5mg/kg贝伐拉非尼的A375SM_Luc细胞脑转移小鼠模型的受试者体重(克)

[0191]	动物/ 天数	9	10	11	12	13	14	15	16	平均值	SEM
	0	15.6	17.1	18.1	18.7	17.8	17.4	17.9	19.6	17.8	0.4
	4	14.9	17.6	15.8	19.3	18.3	17.5	18.2	19.6	17.7	0.6
	8	15.1	17.4	16.2	19.6	18.6	17.5	18.6	20.3	17.9	0.6
	11	15.0	18.0	17.7	19.4	18.7	17.6	18.6	20.5	18.2	0.6
	15	15.6	13.5	12.6	19.2	18.8	17.8	19.3	21.1	17.2	1.1
	18	16.6	----	----	19.4	19.2	19.1	19.4	21.6	19.2	0.6
	22	16.1	----	----	18.4	19.0	19.4	19.3	21.6	19.0	0.7
	25	16.6	----	----	16.8	12.6	19.4	19.5	21.0	17.7	1.2
[0192]	29	15.8	----	----	14.3	15.3	18.7	17.7	18.2	16.7	0.7
	32	14.9	----	----	13.0	13.6	13.2	15.5	15.8	14.3	0.5
	36	13.9	----	----	----	----	----	----	14.4	14.2	0.3
[0193]	39	11.2	----	----	----	----	----	----	12.2	11.7	0.5

[0193] 表14:接受5mg/kg贝伐拉非尼的A375SM_Luc细胞脑转移小鼠模型的受试者体重(克)

[0194]

动物/ 天数	17	18	19	20	21	22	23	24	平均值	SEM
0	17.1	19.5	20.4	16.7	17.4	17.9	17.1	19.8	18.2	0.5
4	17.4	19.3	20.3	17.1	17.4	18.3	17.5	19.8	18.4	0.4
8	17.8	19.8	20.8	18.6	18.0	18.7	17.8	20.3	19.0	0.4
11	17.9	20.2	20.9	18.4	17.8	18.3	18.0	20.8	19.0	0.5
15	16.8	20.2	21.5	18.3	17.9	19.0	18.0	20.6	19.0	0.6
18	12.9	20.9	21.9	18.9	18.5	19.1	18.9	21.5	19.1	1.0
22	----	21.0	22.1	18.7	18.5	20.1	19.3	21.0	20.1	0.5
25	----	21.7	22.6	19.2	19.6	20.3	19.4	21.4	20.6	0.5
29	----	21.3	22.2	19.9	19.6	20.3	19.5	21.9	20.7	0.4
32	----	21.6	23.0	19.8	19.5	20.2	19.1	22.0	20.7	0.6
36	----	21.1	23.3	19.9	19.8	20.5	19.5	21.6	20.8	0.5
39	----	21.6	23.4	20.0	19.5	20.6	19.8	21.9	21.0	0.5
42	----	21.1	22.8	19.7	19.4	20.6	19.3	20.7	20.5	0.5
46	----	21.9	23.1	20.5	19.7	21.1	19.4	18.4	20.6	0.6
50	----	21.8	23.1	20.1	20.3	21.0	18.4	14.0	19.8	1.1
53	----	22.0	23.1	20.6	20.5	21.3	16.3	----	20.6	1.0
57	----	21.3	23.2	19.8	----	20.6	12.1	----	19.4	1.9
60	----	20.9	23.4	19.8	----	20.3	11.5	----	19.2	2.0
64	----	21.4	23.1	20.6	----	21.0	----	----	21.5	0.5
68	----	22.1	24.1	20.8	----	21.7	----	----	22.2	0.7
71	----	21.9	23.9	20.4	----	20.5	----	----	21.7	0.8
74	----	22.2	24.4	20.2	----	21.0	----	----	22.0	0.9
78	----	22.0	24.2	19.8	----	21.6	----	----	21.9	0.9
81	----	22.4	24.3	19.8	----	----	----	----	22.2	1.3
85	----	22.1	24.1	17.6	----	----	----	----	21.3	1.9
88	----	22.5	24.7	16.6	----	----	----	----	21.3	2.4
92	----	21.6	24.1	14.5	----	----	----	----	20.1	2.9
95	----	21.5	24.2	13.3	----	----	----	----	19.7	3.3
99	----	21.3	23.8	----	----	----	----	----	22.6	1.3
102	----	21.1	25.3	----	----	----	----	----	23.2	2.1

[0195] 实例5:与现有技术泛RAF、BRAF V600E和MEK抑制剂相比,贝伐拉非尼的脑与血浆比率。

[0196] 将泛RAF抑制剂贝伐拉非尼的脑与血浆比率与以下各项比较:泛RAF抑制剂DAY101 (tovorafenib,MLN2480);BRAF V^{600E}抑制剂达拉非尼、维罗非尼和康奈非尼;和MEK抑制剂考比替尼、曲美替尼和司美替尼。结果见下表15。脑与血浆比率以B/P(非临床)表示,其定义为脑暴露量相对于血浆的百分比。贝伐拉非尼的B/P根据本公开由实验确定,其中小鼠中的B/P为93%,大鼠中的B/P为138%。DAY101的B/P是针对小鼠并且引自Gampa等人,“Brain Distribution and Active Efflux of Three pan-RAF Inhibitors:Considerations in the Treatment of Melanoma Brain Metastases”,JPharmacol Exp Ther 368:446-461, 2019年3月。达拉非尼的B/P是针对小鼠并且引自Mittapalli等人,“Mechanisms Limiting Distribution of the Threonine-Protein Kinase B-RaFV600E Inhibitor Dabrafenib to the Brain:Implications for the Treatment of Melanoma Brain Metastases”,J

Pharmacol Exp Ther 344:655-364,2013。维罗非尼的B/P是针对小鼠并且引自Mittapalli等人,“Impact of P-glycoprotein(ABCB1)and breast cancer resistance protein (ABCG2)on the brain distribution of a novel BRAF inhibitor:vemurafenib (PLX4032)”,J Pharmacol Exp Ther 342:33-40,2013。康奈非尼的B/P是针对小鼠并且引自Wang等人,“P-glycoprotein(MDR1/ABCB1)and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)affect brain accumulation and intestinal disposition of encorafenib in mice”,Pharmacol Res.2018年3月;414-423。考比替尼的B/P是针对小鼠且引自Choo等人,“Role of P-glycoprotein on the brain penetration and brain pharmacodynamic activity of the MEK inhibitor cobimetinib”,Mol Pharm.2014年11月3日;11(11):4199-207。曲美替尼的B/P是针对小鼠并且引自Vaidhyathan等人,“Factors Influencing the CNS Distribution of a Novel MEK-1/2 Inhibitor: Implications for Combination Therapy for Melanoma Brain Metastases”,Drug Metab Dispos.2104年8月;42(8):1292-1300。司美替尼的B/P是针对小鼠且引自Gooijer等人,“The impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain pharmacokinetics and pharmacodynamics of a panel of MEK inhibitors”,Int J Cancer.2018年1月15日;142(2):381-391。在表15中,“P-gp”是指P-糖蛋白(MDR1, ABDB1),“BCRP”是指乳腺癌抗性蛋白(ABCG2)。

[0197] 表15

	MEK 抑制剂	B/P	P-gp/BCRP 流出底物?
[0198]	贝伐拉非尼	93-138%	否
	DAY101	20-34%	是 (BCRP)
[0199]	达拉非尼	2-4%	是 (P-gp + BCRP)
	维莫非尼	0.4-1%	是 (P-gp + BCRP)
	康奈非尼	0.4%	是 (P-gp + BCRP)
	考比替尼	30%	是 (P-gp)
	曲美替尼	15%	是 (P-gp + BCRP)
	司美替尼	2%	是 (P-gp + BCRP)

[0200] 本书面说明使用实例公开本发明,包括最佳模式,并且也使本领域的任何技术人员能够实践本发明,包括制备并使用任何装置或系统以及执行任何并入的方法。本发明的可授予专利的范围由权利要求书限定,并且可包括本领域技术人员想到的其他实例。如果此类其他实例具有与权利要求书的字面语言没有区别的结构要素,或者如果它们包括与申请专利范围的字面语言没有实质性差异的等效结构要素,则此类其他实例旨在属于权利要求书的范围内。

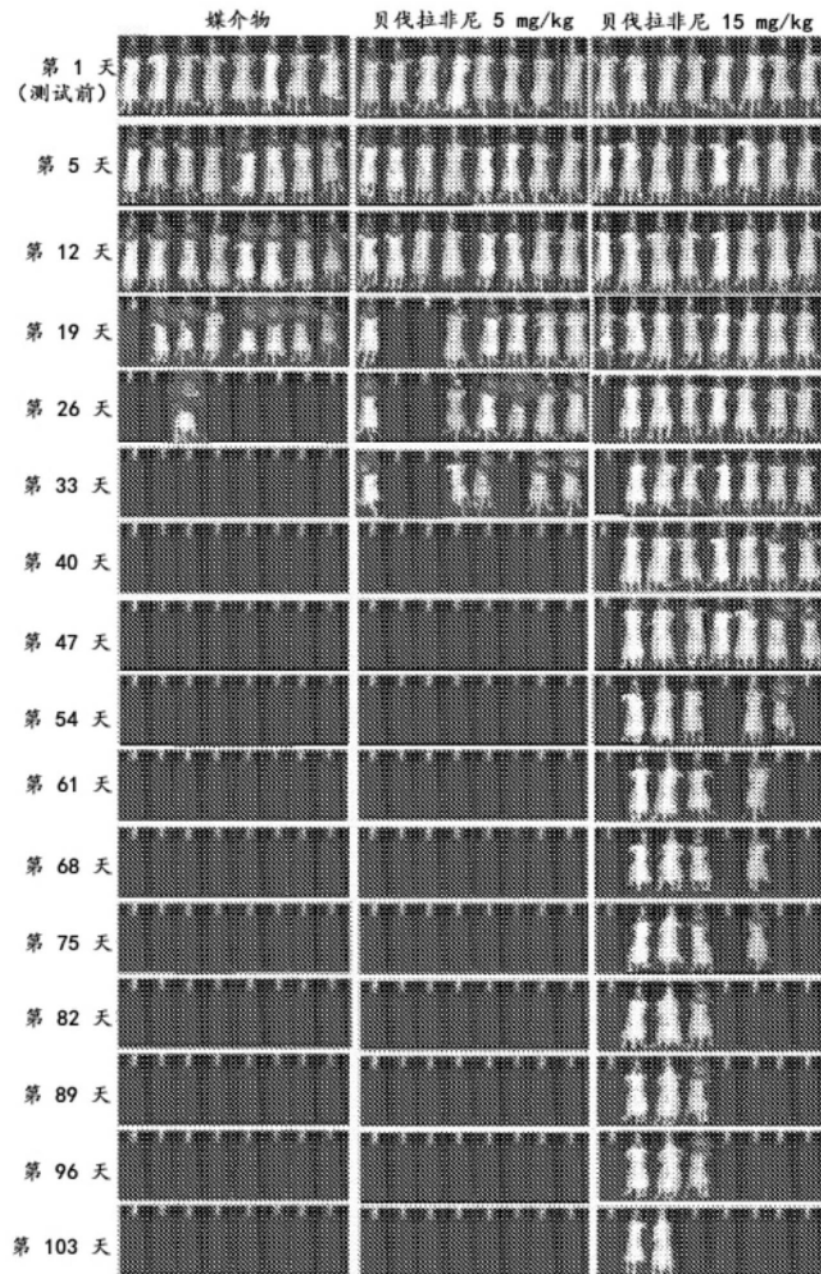


图1

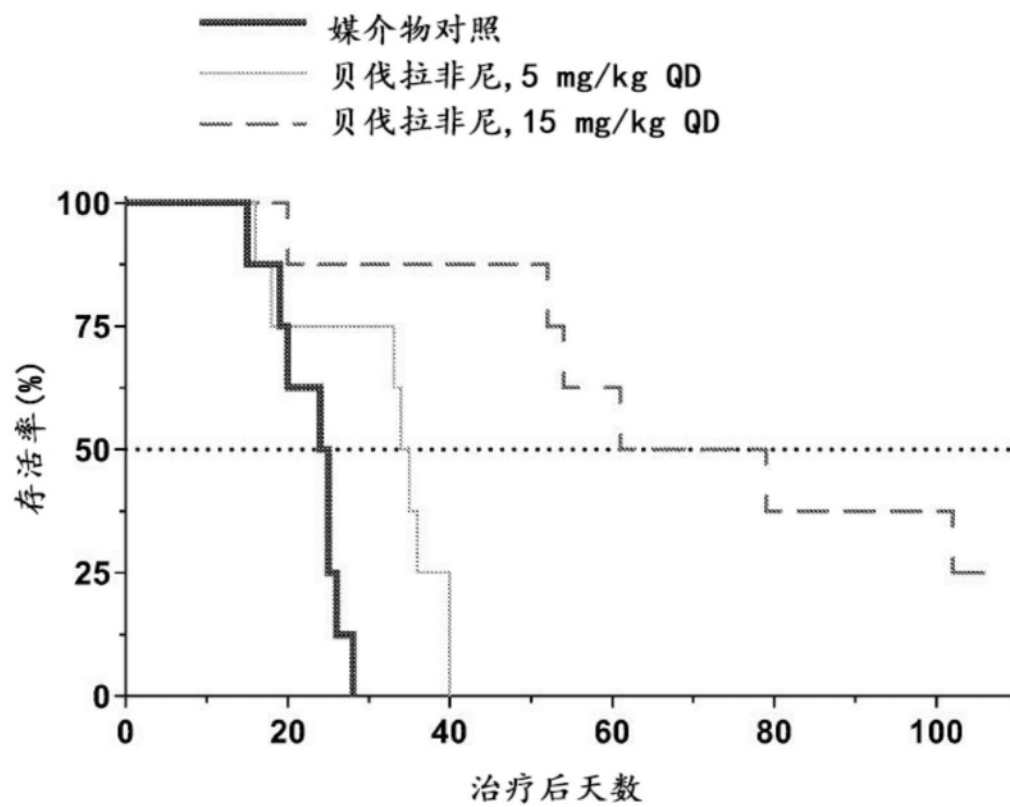


图2