(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118557737 A
(43)申请公布日 2024.08.30

(21)申请号 202410548624.0

(22)申请日 2019.01.31

(30)优先权数据
62/624,448 2018.01.31 US

(62)分案原申请数据
201980015751.1 2019.01.31

(71)申请人 德西费拉制药有限责任公司
地址 美国堪萨斯州

(72)发明人 D·L·弗林 B·D·史密斯
A·古普塔

(74)专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688
专利代理师 张红春

(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61K 31/4375(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

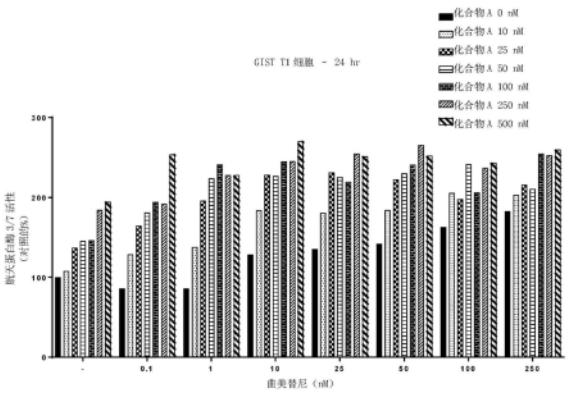
权利要求书1页 说明书37页 附图47页

(54)发明名称

治疗胃肠道间质瘤的组合疗法

(57)摘要

本公开涉及1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲、或1-(5-(7-氨基-1-乙基-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基)-4-溴-2-氟苯基)-3-苯基脲、或它们的药学上可接受的盐与MAPKAP激酶抑制剂组合用于治疗癌症,包括c-KIT介导的癌症诸如GIST的用途。



CN 118557737 A

1.一种治疗有需要的患者的具有一个或多个c-KIT突变的肿瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用:

有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;和

有效量的一种或多种MAPKAP激酶抑制剂。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述MAPKAP激酶抑制剂选自由以下组成的组:丝裂原激活蛋白激酶抑制剂(MEK抑制剂)和有效量的细胞外信号调节激酶抑制剂(ERK抑制剂)。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中所述c-KIT突变是所述c-KIT基因的外显子9、外显子11、外显子13或外显子17中的一级突变。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述肿瘤在所述c-KIT基因中具有一个或多个二级抗性突变。

5.如权利要求4所述的方法,其中所述二级抗性突变是在所述c-KIT基因的外显子13、外显子14、外显子17或外显子18中。

6.如权利要求5所述的方法,其中所述二级抗性突变是在所述c-KIT基因的外显子17中。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述c-KIT突变是缺失突变。

8.如权利要求4-6中任一项所述的方法,其中所述二级抗性突变是密码子816中天冬氨酸的取代或密码子822中天冬酰胺的取代。

9.如权利要求4-6中任一项所述的方法,其中所述二级抗性突变是D816V、D816E、D816H、D820A、T670I、或N822V中的一个。

10.如权利要求4-5中任一项所述的方法,其中所述二级抗性突变是V654A或T670I中的一个。

治疗胃肠道间质瘤的组合疗法

[0001] 本申请是申请号为201980015751.1、申请日为2019年01月31日、发明名称为“治疗胃肠道间质瘤的组合疗法”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2018年1月31日提交的U.S.S.N.62/624,448的优先权,将其全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0004] c-KIT(也称为KIT、CD117和干细胞因子受体)是一种充当III型受体的145kDa的跨膜酪氨酸激酶蛋白。位于染色体4q11-21上的c-KIT原癌基因编码c-KIT受体,其配体是干细胞因子(SCF、青灰因子、kit配体、肥大细胞生长因子)。所述受体具有酪氨酸蛋白激酶活性,并且配体SCF的结合导致c-KIT的自磷酸化及其与底物诸如磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)的缔合。通过蛋白酪氨酸激酶的酪氨酸磷酸化在细胞信号传导中特别重要,并且可以介导主要细胞过程(诸如增殖、存活、分化、凋亡、附着、侵袭性和迁移)的信号。

[0005] 已经在血液瘤和实体瘤(诸如急性白血病和胃肠道间质瘤(GIST))中研究了c-KIT表达和活性的作用。大多数GIST在编码密切相关的RTK c-KIT(75-80%的GIST)或PDGFRα(8%的非c-KIT突变的GIST)的基因中具有一级激活突变,并且在许多GIST中发现了c-KIT基因的功能获得性突变和组成型磷酸化c-KIT的表达。大多数引起GIST的一级c-KIT突变影响由外显子11编码的蛋白质的近膜(JM)区,并且由框内缺失或插入或错义突变(即V560D)组成。在大约65%的GIST中,c-KIT外显子11突变已被鉴定为一级突变。此类JM结构域突变破坏了c-KIT激酶的自抑制机制,从而导致引起GIST的组成型激酶活性和细胞转化事件。其他引起GIST的一级c-KIT突变位于外显子9(AY501-502重复/插入,8%)、外显子13(突变,1%)和外显子17(突变,1%)。

[0006] c-KIT表达在恶性肿瘤中的临床重要性已在特异性地抑制酪氨酸激酶受体的Gleevec®(甲磺酸伊马替尼,STI571(信号转导抑制剂编号571),Novartis Pharma AG Basel,Switzerland)的研究中得到证明。此外,临床上相关的突破是发现了该化合物在GIST中的抗肿瘤作用,GIST是通常被认为对常规化学疗法具有耐受性的一类肿瘤。然而,尽管在用c-KIT抑制剂Gleevec®对GIST进行一线治疗之后观察到初级反应,并且大量具有转移性和/或无法手术的GIST的患者从Gleevec®治疗中受益,但是很少有完全的肿瘤缓解,并且约50%的患者在治疗的两年内会经历疾病复发。还已经报道,与用任一种药剂治疗相比,c-KIT抑制剂伊马替尼和MEK激酶抑制剂MEK162的组合导致在各种GIST癌细胞系中体外生长抑制增加和体内肿瘤消退。

[0007] GIST最常变成具有Gleevec®抗性,并且靶向c-KIT二级突变的分子靶向性小分子疗法仍然不太现实。在用Gleevec®或Sutent®治疗之后复发的GIST患者仍由c-KIT突变驱动疾病。这些二级突变与一级JM区突变发生在相同的等位基因上,因此与原始一级突变相比代表了c-KIT的更具攻击性的激活形式。在GIST中鉴定的c-KIT的这些二级突变体导

致获得性耐药性。在ATP结合口袋(外显子13,即K642E、V654A;外显子14,即T670I)和激活环(外显子17,即N822K、D816H、D816V、D820A;外显子18,A829P)中发现了二级突变。这些各种二级c-KIT突变已有报道。苹果酸舒尼替尼(Sutent™,Pfizer)是多种RTK(在这种情境下,尤其是c-KIT和PDGFRα)的抑制剂,并且已证明对某些抗伊马替尼的c-KIT突变体(诸如ATP结合口袋突变体V654A和T670I)有效。某些Gleevec®抗性突变体也对舒尼替尼具有抗性,诸如位于由外显子17编码的c-KIT催化结构域的激活环中的D816H和D816V。由于Gleevec®抗性导致进展后的中位数存活期仍然相对较短。

[0008] 已经证明,复杂的、多个二级c-KIT突变可以在个体患者中出现和发生变化,c-KIT突变状态的这种变化由从每个患者内不同进行性转移中获得的活检样品得到证实。个体患者中复杂的c-KIT突变异质性突显了一种尚未满足的医疗需求,即需要鉴定对广谱的c-KIT一级和二级突变均有效的c-KIT激酶抑制剂。另外,需要鉴定对c-KIT介导的GIST具有细胞毒性或杀细胞作用而不是仅具有细胞生长抑制作用的疗法,并且所述疗法导致疾病缓解和/或疾病复发减少。

发明内容

[0009] 本公开涉及c-KIT抑制剂化合物A或c-KIT抑制剂化合物B与MAPKAP激酶信号传导途径的抑制剂的组合。在本文中,MAPKAP途径被定义为通过激酶RAF MEK ERK的信号传导。出乎意料地,已经证明,与伊马替尼和MEK抑制剂的组合相比或与用化合物A、伊马替尼或MEK抑制剂的单药治疗相比,c-KIT抑制剂化合物A或化合物B与MEK抑制剂(包括曲美替尼)、ERK抑制剂(包括优立替尼(ulixertinib))或RAF抑制剂(包括LY3009120)的组合导致细胞死亡、凋亡或延长的细胞停滞、GIST细胞、体内GIST肿瘤消退增强、或在集落形成测定中GIST细胞的根除。另外,已经证明c-KIT抑制剂化合物A与MEK抑制剂的组合导致细胞死亡或细胞凋亡的增强以及对伊马替尼与MEK抑制剂的组合具有抗性的GIST癌细胞系的根除。在GIST细胞的集落生长晕研究中,与伊马替尼和MEK抑制剂的组合相比,化合物A与MEK抑制剂组合展现出更优异的协同作用。本公开部分地涉及使用如本文所述的化合物A或其药学上可接受的盐治疗患者的肿瘤的方法。

[0010] 例如,本文描述了治疗有需要的患者的具有一个或多个c-KIT突变的肿瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用:有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;以及有效量的丝裂原激活蛋白激酶抑制剂(MEK抑制剂)和/或有效量的细胞外信号调节激酶抑制剂(ERK抑制剂)。

[0011] 本公开还提供了治疗抗伊马替尼的患者的实体瘤的方法,所述方法包括:向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MEK或ERK抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼,其中所述实体瘤选自由以下组成的组:肺腺癌、鳞状细胞肺癌、胶质母细胞瘤、小儿神经胶质瘤、星形细胞瘤、肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)和黑色素瘤。

[0012] 本文还考虑了治疗有需要的患者的抗伊马替尼的胃肠道间质瘤或抗伊马替尼的

黑色素瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MEK或ERK抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼。

[0013] 本公开还提供了治疗有需要的患者的实体瘤的方法,所述方法包括:向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MEK或ERK抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼,其中所述实体瘤选自由以下组成的组:肺腺癌、鳞状细胞肺癌、胶质母细胞瘤、小儿神经胶质瘤、星形细胞瘤、肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)和黑色素瘤。

[0014] 本文还考虑了治疗有需要的患者的胃肠道间质瘤或黑色素瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;以及向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MEK或ERK抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼。

[0015] 另外,本文考虑了治疗需要的患者的实体瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的RAF抑制剂。

附图说明

[0016] 图1A示出了在GIST-T1细胞中用化合物A和曲美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0017] 图1B提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物A和曲美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0018] 图1C示出了在GIST-T1细胞中用化合物A和曲美替尼进行48小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0019] 图1D提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物A和曲美替尼进行的48小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0020] 图1E示出了在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物A和曲美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0021] 图1F提供了针对在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物A和曲美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0022] 图1G示出了在在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和曲美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0023] 图1H提供了针对在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和曲美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0024] 图2A示出了在GIST-T1细胞中用化合物B和曲美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0025] 图2B提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物B和曲美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0026] 图2C示出了在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物B和曲美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0027] 图2D提供了针对在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物B和曲美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0028] 图2E示出了在在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物B和曲美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0029] 图2F提供了针对在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物B和曲美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0030] 图3A示出了在GIST-T1细胞中用化合物A和比美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0031] 图3B提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物A和比美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0032] 图3C示出了在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物A和比美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0033] 图3D提供了针对在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物A和比美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0034] 图3E示出了在在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和比美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0035] 图3F提供了针对在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和比美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0036] 图4A示出了在GIST-T1细胞中用化合物B和比美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0037] 图4B提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物B和比美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0038] 图4C示出了在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物B和比美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0039] 图4D提供了针对在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物B和比美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引

(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0040] 图4E示出了在在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物B和比美替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0041] 图4F提供了针对在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物B和比美替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0042] 图5A示出了在GIST-T1细胞中用化合物A和考比替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0043] 图5B提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物A和考比替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0044] 图5C示出了在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物A和考比替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0045] 图5D提供了针对在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物A和考比替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0046] 图5E示出了在在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和考比替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0047] 图5F提供了针对在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和考比替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0048] 图6A示出了在GIST-T1细胞中用化合物B和考比替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0049] 图6B提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物B和考比替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0050] 图6C示出了在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物B和考比替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0051] 图6D提供了针对在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞中用化合物B和考比替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0052] 图6E示出了在在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物B和考比替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0053] 图6F提供了针对在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物B和考比替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0054] 图7A示出了在GIST-T1细胞中用化合物A和ERK抑制剂优立替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0055] 图7B提供了针对在GIST-T1细胞中用化合物A和优立替尼进行的24小时各种处理

基于组合索引方法的协同作用矩阵图,以及展示以在y轴上的组合索引(CI)和在x轴上的受影响分数(Fa)绘制的协同作用的组合索引图。

[0056] 图7C示出了在在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和优立替尼进行24小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0057] 图7D提供了针对在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中用化合物A和优立替尼进行的24小时各种处理基于组合索引方法的协同作用矩阵图。

[0058] 图8A示出了在用化合物A、伊马替尼和曲美替尼进行2周各种处理、接着有9天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1集落数的图示。

[0059] 图8B示出了在用化合物A、伊马替尼和曲美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0060] 图8C示出了在用化合物A、伊马替尼(IM)和曲美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。

[0061] 图8D示出了在用化合物A、伊马替尼和曲美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。

[0062] 图9A示出了在用化合物B和曲美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1集落数的图示。

[0063] 图9B示出了在用化合物B和曲美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0064] 图9C示出了显示在用化合物B和曲美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后计数的GIST-T1/T670I集落数的代表性培养板的图像。

[0065] 图10A示出了在用化合物A、伊马替尼和比美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0066] 图10B示出了在用化合物A、伊马替尼和比美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0067] 图10C示出了在用化合物A、伊马替尼和比美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0068] 图11A示出了在用化合物B和比美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0069] 图11B示出了在用化合物B和比美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0070] 图11C示出了显示在用化合物B和比美替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后计数的GIST-T1/D816E集落数的代表性培养板的图像。右上图示出了在恢复额外10天

后的代表性培养板。

[0071] 图12A示出了在用化合物A、伊马替尼和考比替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0072] 图12B示出了在用化合物A、伊马替尼和考比替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0073] 图12C示出了在用化合物A、伊马替尼和考比替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0074] 图13A示出了在用化合物B和考比替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0075] 图13B示出了在用化合物B和考比替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0076] 图13C示出了显示在用化合物B和考比替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后计数的GIST-T1/T670I集落数的代表性培养板的图像。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0077] 图14A示出了在用化合物A和ERK抑制剂优立替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1集落数的图示。

[0078] 图14B示出了在用化合物A和优立替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。

[0079] 图14C示出了在用化合物A和优立替尼进行2周各种处理、接着有10天的恢复期后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。右上图示出了在恢复额外10天后的代表性培养板。

[0080] 图15示出了在用化合物B和优立替尼进行2周各种处理后的代表性培养板的图像、和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。

[0081] 图16A示出了在载体对照或N-ras G12D转染的GIST-T1细胞中,用化合物A和曲美替尼进行48小时各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。

[0082] 图16B示出了在用化合物A、伊马替尼和曲美替尼进行各种处理以及随后的10天恢复期后,载体对照(图16B.1)或N-ras G12D(图16B.2)转染的GIST-T1集落的代表性培养板的图像。

[0083] 图16C示出了在用化合物A、伊马替尼和曲美替尼进行各种处理以及随后的10天恢复期后所计数的载体对照(图16C.1)或N-ras G12D(图16C.2)转染的GIST-T1集落数的图示。

[0084] 图16D示出了在用化合物A和曲美替尼进行各种处理以及随后延长的21天恢复期后的N-ras G12D转染的GIST-T1集落的代表性培养板的图像。

[0085] 图17A提供了在饱和诱变、接着用伊马替尼(左图)或化合物A(右图)进行单药处理

后,在T670I、K807E或D816V中的c-KIT二级突变的Ba/F3 V560D KIT细胞生长晕或者仅保留原始c-KIT V560D突变加上另外的非c-KIT抗性机制的细胞生长晕的图示。

[0086] 图17B提供了在饱和诱变、接着用伊马替尼加曲美替尼(左图)或化合物A加曲美替尼(右图)组合处理后,在T670I、K807E或D816V中的c-KIT二级突变的Ba/F3 V560D KIT细胞生长晕或者仅保留原始c-KIT V560D突变加上另外的非c-KIT抗性机制的细胞生长晕的图示。

[0087] 图18A提供了用单药化合物A、单药曲美替尼、或用化合物A和曲美替尼的组合处理后GIST T1异种移植肿瘤生长的图示。

[0088] 图18B是图18A的图示的放大图,示出了用单药化合物A、单药曲美替尼、或用化合物A和曲美替尼的组合处理后对肿瘤消退的作用的解析。

具体实施方式

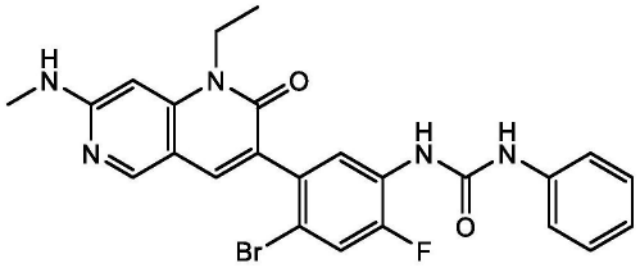
[0089] 已经发现1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲(化合物A)与MAPKAP激酶途径抑制剂(例如曲美替尼)的组合出乎意料发生协同作用,以导致GIST细胞的死亡、凋亡或延长的细胞停滞,诱导肿瘤细胞的根除,诱导肿瘤消退,减小肿瘤体积,抑制肿瘤再生长,和/或导致在随附实施例中对伊马替尼与MEK抑制剂的组合具有抗性的GIST癌症细胞系的增强的细胞死亡、凋亡、细胞停滞或根除。另外,本文公开的组合疗法方法似乎具有杀细胞作用,而不是仅具有细胞生长抑制作用。

[0090] 不希望受任何特定理论的束缚,据信许多c-KIT抑制剂仅抑制c-KIT的某些突变形式,诸如在GIST中观察到的突出的外显子11突变。c-KIT的其他突变形式似乎对许多c-KIT抑制剂具有抗性,并且通常以外显子13、14、17和18中的二级突变出现,所述二级突变使得肿瘤对c-KIT抑制剂的治疗具有抗性。本公开提供了通过使用本文公开的c-KIT抑制剂(如化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐)抑制c-KIT和MAPKAP途径激酶二者来治疗肿瘤(例如c-KIT介导的肿瘤,诸如GIST)的方法。令人惊讶地,化合物A和化合物B(及其药学上可接受的盐)与MEK抑制剂、ERK抑制剂或RAF抑制剂发生协同作用,以诱导GIST细胞的细胞死亡、凋亡或延长的细胞停滞,诱导将肿瘤细胞根除至检测极限,减小肿瘤体积,抑制肿瘤再生长,和/或导致对伊马替尼与MAPKAP激酶抑制剂的组合具有抗性的GIST癌症细胞系的增强的细胞死亡、凋亡、细胞停止、或根除至检测极限。在含有c-KIT抗性突变的GIST细胞中,与伊马替尼与MEK抑制组合相比,化合物A与MEK抑制组合展现出更优异的效力和协同作用。此外,即使在已知对伊马替尼敏感的细胞系中,化合物A与MEK抑制组合的效力和协同作用水平以及GIST肿瘤细胞延长的细胞停滞或根除的程度也优于伊马替尼与MEK抑制组合的情况。再次,不希望受任何特定理论的束缚,据信化合物A比在GIST细胞中可能通过包括抑制在肿瘤细胞(例如GIST细胞)内的药物外排泵(包括BCRP外排泵)的机制的先前c-KIT抑制剂(包括伊马替尼)能够抑制更广范围的c-KIT突变形式。伊马替尼是BCRP外排泵的底物,导致在存在该外排泵的肿瘤细胞中的细胞内浓度较低(Eechoute,K等人,Clin Cancer Res.2015,17,406-15)。已经证明,GIST肿瘤在所评估的93%(42/45)的GIST患者肿瘤中具有BCRP外排泵的过表达(Feldman,R等人J Clin Oncol.2015,33,58)。化合物A是BCRP外排转运蛋白的有效抑制剂,展现出40nM的IC_{50}值。

[0091] 因此,在某些实施方案中,本公开提供了用于诱导延长的肿瘤细胞停滞、诱导细胞死亡、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞根除、诱导肿瘤消退、减小肿瘤体积、抑制肿瘤再生长、或抑制抗性肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的:(i)1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐,或1-(5-(7-氨基-1-乙基-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基)-4-溴-2-氟苯基)-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;和(ii)MAPKAP激酶抑制剂,例如MEK抑制剂曲美替尼、比美替尼或考比替尼;ERK抑制剂优立替尼、或RAF抑制剂。在本文公开的任何方法的特定实施方案中,肿瘤是c-KIT介导的实体瘤,例如,c-KIT介导的GIST或黑色素瘤。

[0092] 定义

[0093] 如本文所用的化合物A和B分别是指1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲、和1-(5-(7-氨基-1-乙基-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基)-4-溴-2-氟苯基)-3-苯基脲。化合物A和B的药学上可接受的盐、互变异构体、水合物和溶剂化物也涵盖在本公开中。化合物A和B的结构如下所示:

[0094] 

[0095] 1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲(化合物A)

[0096] 

[0097] 1-(5-(7-氨基-1-乙基-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基)-4-溴-2-氟苯基)-3-苯基脲(化合物B)

[0098] 制备化合物A和化合物B的方法被公开在US8461179B1中,将其内容以引用方式并入本文。

[0099] 现在描述说明性方法和材料。在说明书和所附权利要求书中,除非除非上下文另有明确指示,否则单数形式也包括复数。除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0100] 在整个本公开中,引用了各种专利、专利申请和出版物。这些专利、专利申请和出版物的公开整体以引用的方式并入本公开中,以便更全面地描述截至本公开日期的本领域技术人员已知的现有技术水平。在专利、专利申请和出版物与本公开之间存在任何不一致的情况下,将以本公开为准。

[0101] 为了方便起见,这里收集了在说明书、实施例和权利要求书中使用的某些术语。除非另有定义,否则本公开中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。除非另有指示,否则为本公开中提供的组或术语提供的初始定义单独或作为另一组的一部分适用于整个本公开中的该组或术语。

[0102] "药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂"包括但不限于已获得美国食品和药物管理局(United States Food and Drug Administration)批准可接受用于在人类或家畜中使用的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等张剂、溶剂或乳化剂。

[0103] "药学上可接受的盐"包括酸加成盐。

[0104] "药学上可接受的酸加成盐"是指保留游离碱的生物有效性和特性的那些盐,其不是生物学上或其他方面不期望的,并且其是由无机酸和有机酸形成的,所述无机酸例如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,所述有机酸例如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸酸、4-乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖醛酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等。

[0105] "药物组合物"是指本文所述的化合物(例如,化合物A或其药学上可接受的盐)和本领域通常接受的用于将生物活性化合物递送至哺乳动物(例如人类)的介质的配制品。因此,这样的介质包括所有药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0106] "需要用本公开的组合疗法(例如化合物A与MEK抑制剂的组合)的治疗"的受试者或患者包括患有可以用本文公开的组合进行治疗以实现有益的治疗结果的疾病和/或病症的患者,例如GIST患者。有益的结果包括客观反应、无进展存活期增加、存活期增加、疾病稳定期延长和/或症状严重性降低或症状发作延迟。在某些实施方案中,需要治疗的患者患有肿瘤生长或肿瘤进展;所述患者患有但不限于肺腺癌、鳞状细胞肺癌、胶质母细胞瘤、小儿神经胶质瘤、星形细胞瘤、肉瘤、黑色素瘤或胃肠道间质瘤。

[0107] 当与本文公开的化合物或其他治疗剂结合使用时,术语"有效量"是指可用于治疗或预防疾病或障碍的治疗剂(例如化合物A或MEK抑制剂)单独或组合的量。组合疗法中使用的治疗剂的有效量是当在组合疗法中使用时可用于治疗或预防疾病或障碍的每种治疗剂的量,即使治疗剂中的一种或两种的量在不存在其他治疗剂的情况下对治疗或预防疾病或障碍无效也是如此。在某些实施方案中,有效量是如下的量,所述量导致GIST细胞的细胞停滞延长、杀细胞作用GIST细胞杀伤、GIST细胞的凋亡、GIST细胞的根除、GIST的消退、GIST肿瘤体积的减小、GIST再生长的抑制,和/或导致对伊马替尼与MEK抑制剂的组合具有抗性的GIST癌症细胞系的增强的细胞停滞、细胞死亡、凋亡或根除至检测极限,和/或导致与没有治疗的情况相比用所述化合物治疗的病症的有益的临床结果。"有效量"可以根据施用模式、疾病或障碍的具体位点、以及受试者的年龄、体重和总体健康状况而变化。所施用化合物的量将取决于疾病或病症的程度、严重性和类型,所需疗法的量以及一种或多种药物配

制品的释放特征。它还将取决于受试者的健康状况、尺寸、重量、年龄、性别和对药物的耐受性。通常,将化合物施用足够的时间段以实现所需的治疗效果。

[0108] 术语“治疗”(“treatment”、“treat”和“treating”)意在包括在患有“癌症”的患者中进行全范围干预,目的是诱导GIST细胞的细胞停滞延长,诱导杀细胞作用GIST细胞杀伤,诱导GIST细胞的凋亡,诱导将GIST肿瘤细胞根除至如通过5X物镜所确定的视觉检测限,导致患者中GIST肿瘤的消退,减小GIST肿瘤体积,抑制GIST再生长,和/或在给定的治疗(诸如施用本文公开的组合疗法以减轻、减缓或逆转一种或多种症状)中抑制抗性GIST细胞的生长,并且即使实际上并未消除GIST也能诱导GIST的消退。在一些实施方案中,治疗包括完全消除疾病或障碍,例如GIST。治疗可以是治愈、改善或至少部分缓解所述障碍。

[0109] 如本文所定义,“癌症”是指具有侵入周围组织、转移(扩散至其他器官)的能力并且如果不进行治疗可能最终导致患者死亡的新的生长。在某些实施方案中,“癌症”可以是实体瘤。

[0110] 如本文所用,“肿瘤”是指肿块。这是可能指代良性(通常无害)或恶性(癌性)生长的一个术语。恶性生长可以源自实体器官或骨髓。

[0111] 如本文所定义,“肿瘤生长”是指由c-KIT基因的基因组改变引起的肿块的生长,其可能改变c-KIT蛋白的表达和/或活性。

[0112] 如本文所定义,“肿瘤进展”是指现有的c-KIT依赖性肿瘤(例如GIST)的生长,其中现有肿块的这种生长可能是由对治疗具有抗性的c-KIT的进一步基因组改变引起的。

[0113] 如本文所定义,“肿瘤消退”、“完全反应”和“部分反应”是指如通过RECIST 1.1或Choi标准所确定的通过重量或体积所确定的肿瘤尺寸减小。

[0114] 现有c-KIT介导的肿瘤(例如c-KIT介导的GIST)的根除被定义为对肿瘤的“完全杀细胞作用细胞杀伤”至在体外评价中通过5X物镜所确定的检测极限,或者被定义为在体内临床前或临床评价中通过RECIST 1.1或Choi标准所确定的完全反应,而使肿瘤在临床前或临床条件下没有再生长的可能性。因此,“c-KIT介导的肿瘤的根除”表示将c-KIT介导的肿瘤的所有细胞杀伤或去除至检测极限,而使c-KIT介导的肿瘤没有再生长的可能性。

[0115] 如本文所用,“肿瘤再生长”是指在在治疗(例如,用Gleevec®或Sutent®治疗后先前已停止生长或已消退的肿瘤的生长。在某些实施方案中,由于在肿瘤细胞中引入c-Kit二级突变而发生肿瘤再生长。在其他实施方案中,由于不同信号传导途径的激活或突变而发生肿瘤再生长,包括但不限于MAPKAP信号传导途径的激活,所述MAPKAP信号传导途径包括通过MEK激酶的信号传导。

[0116] 如本文所用,“细胞停滞”指细胞停止分裂并保持在休眠的非复制状态。

[0117] 如本文所用,“凋亡”是指程序性细胞死亡。可通过组织学和组织化学方法检测到的凋亡特征包括细胞收缩;膜通透性增加;核和细胞质缩合;将核DNA内切裂解为寡核小体片段;以及最终形成被巨噬细胞吸收和去除的凋亡小体。凋亡主要由胱天蛋白酶介导,胱天蛋白酶是天冬氨酸特异性丝氨酸蛋白酶。可以通过响应于各种条件(例如DNA损伤或生长因子撤回)的内在遗传程序化诱导凋亡,或者可以通过外在因素(诸如辐射对细胞DNA的损伤和一些用于治疗癌症的细胞毒性剂)诱导凋亡。它可以被天然存在的因子(例如细胞因子)和一些药物(例如蛋白酶抑制剂)抑制。凋亡通常在恶性细胞中不发生或受损。在特定实施方案中,凋亡是指通过切割和激活的胱天蛋白酶3和胱天蛋白酶7的增加所确定的程序性细

胞死亡。

[0118] “组合疗法”是包括向患者施用两种或更多种治疗剂(例如化合物A和MEK抑制剂)的治疗。所述两种或更多种治疗剂可以例如在分开的药物组合物中或在同一药物组合物中同时递送,或者它们可以在不同的时间递送。例如,它们可以并行地或在重叠的时间段内递送,和/或一种治疗剂可以在其他一种或多种治疗剂之前或之后递送。用KIT抑制剂(诸如化合物A)和MEK抑制剂的组合进行的治疗任选地包括在用两种药剂的并行治疗期之前或之后用任一种药剂进行治疗。然而,可以预期在一段时间内,患者体内存在有效量的两种或更多种治疗剂。

[0119] “MAPKAP途径抑制剂”是MAP激酶信号传导途径的抑制剂。该途径的抑制剂包括RAS抑制剂、RAF抑制剂(例如达拉非尼、维莫非尼、LY3009120)、MEK抑制剂(例如曲美替尼、比美替尼、考比替尼)和ERK抑制剂(例如优立替尼)。术语“MAPKAP途径抑制剂”和“MAPKAP激酶抑制剂”在本文中可互换使用。

[0120] 治疗方法

[0121] 可以将本文所述的化合物和组合物用于治疗有需要的患者的肿瘤。例如,本文提供了治疗有需要的患者的具有一个或多个c-KIT突变的肿瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用:有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;以及有效量的一种或多种MAPKAP激酶抑制剂。在一个实施方案中,MAPKAP激酶抑制剂选自由以下组成的组:丝裂原激活蛋白激酶抑制剂(MEK抑制剂)和有效量的细胞外信号调节激酶抑制剂(ERK抑制剂)。

[0122] c-KIT突变可以是c-KIT基因的外显子9、外显子11、外显子13或外显子17中的一级突变。在另一个实施方案中,c-KIT突变是缺失突变。

[0123] 此外,肿瘤可以在c-KIT基因中具有一个或多个二级抗性突变。在一些实施方案中,二级抗性突变是在c-KIT基因的外显子13、外显子14、外显子17或外显子18中。在一些实施方案中,二级抗性突变是在c-KIT基因的外显子17中。在一些实施方案中,二级抗性突变是密码子816中天冬氨酸的取代或密码子822中天冬酰胺的取代。在一些实施方案中,二级抗性突变是D816V、D816E、D816H、D820A、T670I、或N822V中的一个。在一些实施方案中,二级抗性突变是在先前向患者施用伊马替尼、舒尼替尼或瑞戈非尼(regorafenib)或其药学上可接受的盐之后获得的。

[0124] 这种公开的方法还包括确定肿瘤是否具有c-KIT二级突变。在一些实施方案中,确定肿瘤是否具有c-KIT二级突变包括鉴定从肿瘤样品中提取的DNA中的突变。在一些实施方案中,确定肿瘤是否具有c-KIT二级突变包括鉴定循环肿瘤DNA中的突变。在另一个实施方案中,肿瘤已经对甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼或瑞戈非尼的治疗具有抗性。

[0125] 此外,肿瘤可以选自由以下组成的组:肺腺癌、鳞状细胞肺癌、胶质母细胞瘤、小儿神经胶质瘤、星形细胞瘤、肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)和黑色素瘤。在一些实施方案中,肿瘤是黑色素瘤。在一些实施方案中,肿瘤是GIST。

[0126] 所述方法还可以包括向患者施用癌症靶向治疗剂、癌症靶向生物免疫检查点抑制剂、和/或化学治疗剂。所述方法还可以包括向患者施用RAF抑制剂。

[0127] 在另一个实施方案中,基本上并行或依次施用1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐、和

MAPKAP激酶抑制剂。

[0128] 在该公开的方法中的MEK抑制剂可以选自由以下组成的组:曲美替尼、司美替尼(selumetinib)、考比替尼和比美替尼。在一些实施方案中,MEK抑制剂是比美替尼。在一些实施方案中,MEK抑制剂是曲美替尼。在一些实施方案中,ERK抑制剂选自由以下组成的组:优立替尼、SCH772984和LY3214996。

[0129] 按照这种公开的方法施用两周或更长时间可以导致患者具有至少30%的部分肿瘤体积减小。在一些实施方案中,治疗导致肿瘤体积的完全减小。

[0130] 所公开的方法还可以包括确定肿瘤或肿瘤细胞是否包含一级c-KIT基因突变。在一些实施方案中,一级突变是在c-KIT基因的外显子11中。在一些实施方案中,一级突变是在c-KIT基因的外显子9中。在一些实施方案中,一级突变是缺失突变。在一些实施方案中,一级突变是V560D。在其他实施方案中,存在一个或多个额外的二级突变c-KIT突变。

[0131] 本公开还提供了治疗抗伊马替尼的患者的实体瘤的方法,所述方法包括:向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MAPKAP激酶抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼,其中所述实体瘤选自由以下组成的组:肺腺癌、鳞状细胞肺癌、胶质母细胞瘤、小儿神经胶质瘤、星形细胞瘤、肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)和黑色素瘤。在一些实施方案中,所述方法还包括施用RAF抑制剂。在一些实施方案中RAF抑制剂是泛RAF抑制剂。

[0132] 本文还提供了治疗有需要的患者的抗伊马替尼的胃肠道间质瘤或抗伊马替尼的黑色素瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MAPKAP激酶抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼。

[0133] 在一些实施方案中,所述方法还包括确定肿瘤是否具有c-KIT基因的突变。在一些实施方案中,所述突变是在c-KIT基因的外显子17中。在一些实施方案中,c-KIT突变是密码子816中天冬氨酸的取代或密码子822中天冬酰胺的取代。在一些实施方案中,所述突变是D816V、D816E、D816H、D820A、T670I、或N822V中的一个。

[0134] 另外,提供了治疗需要的患者的实体瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的RAF抑制剂。

[0135] 在这种公开的方法中,实体瘤可以选自由以下组成的组:肺腺癌、鳞状细胞肺癌、GIST和黑色素瘤。在一些实施方案中,实体瘤具有c-KIT基因的一个或多个突变。

[0136] 此外,RAF抑制剂可以是泛RAF抑制剂。在另一个实施方案中,RAF抑制剂是达拉非尼、维莫非尼、LY3009120。

[0137] 本公开还提供了治疗有需要的患者的实体瘤的方法,所述方法包括:向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MAPKAP激酶抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼,其中所述实体瘤选自由以下组成的组:肺腺癌、鳞状细胞肺癌、胶质母细胞瘤、小儿神经胶质瘤、星形细胞瘤、

肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)和黑色素瘤。在一些实施方案中,所述方法还包括施用RAF抑制剂。在一些实施方案中RAF抑制剂是泛RAF抑制剂。

[0138] 本文还提供了治疗有需要的患者的胃肠道间质瘤或黑色素瘤的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的1-[4-溴-5-[1-乙基-7-(甲基氨基)-2-氧代-1,2-二氢-1,6-萘啶-3-基]-2-氟苯基]-3-苯基脲或其药学上可接受的盐;并且向所述患者施用有效量的选自由以下组成的组的MAPKAP激酶抑制剂:曲美替尼、比美替尼、考比替尼和优立替尼。

[0139] 在一些实施方案中,所述方法还包括确定肿瘤是否具有c-KIT基因的突变。在一些实施方案中,所述突变是在c-KIT基因的外显子17中。在一些实施方案中,c-KIT突变是密码子816中天冬氨酸的取代或密码子822中天冬酰胺的取代。在一些实施方案中,所述突变是D816V、D816E、D816H、D820A、T670I、或N822V中的一个。

[0140] 在一个实施方案中,本公开提供了治疗或预防患者的肿瘤(任选地c-KIT介导的肿瘤,例如GIST)的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的化合物A或其药学上可接受的盐与有效量的MEK抑制剂(例如曲美替尼)的组合。在相关实施方案中,本公开提供了治疗或预防患者的肿瘤(任选地c-KIT介导的肿瘤,例如GIST)的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的化合物B或其药学上可接受的盐与有效量的MEK抑制剂例如曲美替尼的组合。

[0141] 在具体实施方案中,这些方法包括用于以下的方法:诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的停滞延长;杀伤肿瘤细胞,例如GIST细胞;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的凋亡;诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限;诱导肿瘤消退,例如GIST消退;减小肿瘤体积,例如GIST肿瘤体积;抑制肿瘤再生长,例如GIST再生长。在另一个具体实施方案中,这些方法包括用于诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的停滞延长的方法。在另一个具体实施方案中,这些方法包括杀伤肿瘤细胞(例如GIST细胞)的方法。在另一个具体实施方案中,这些方法包括诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)凋亡的方法。在另一个具体实施方案中,这些方法包括用于诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限的方法。在另一个具体实施方案中,这些方法包括用于诱导肿瘤消退(例如GIST消退)的方法。在另一个具体实施方案中,这些方法包括用于减小肿瘤体积(例如GIST肿瘤体积)的方法。在另一个具体实施方案中,这些方法包括用于抑制肿瘤再生长(例如GIST再生长)的方法。在另一个具体实施方案中,这些方法包括用于抑制抗药性肿瘤细胞(例如抗药性GIST细胞)生长的方法。在某些实施方案中,所述方法涵盖用于将受试者的肿瘤(例如GIST)根除至检测极限的方法。在本文公开的任何方法的特定实施方案中,患者的肿瘤生长或肿瘤进展由以下引起:c-KIT过表达、c-KIT的组成型磷酸化、c-KIT活性增加、致癌的c-KIT错义突变、c-KIT突变的致癌缺失、致癌核苷酸重复/插入、导致c-KIT融合蛋白的致癌c-KIT基因重排、c-KIT基因内框内缺失、和/或致癌c-KIT基因扩增。在一个实施方案中,肿瘤生长或肿瘤进展由c-KIT的组成型磷酸化引起。在特定实施方案中,肿瘤包含本文公开的一级激活c-KIT突变和/或二级c-KIT突变中的一个或多个。在另一个特定实施方案中,肿瘤包含在除c-KIT以外的基因中的一个或多个突变,所述一个或多个突变经由通过涉及RAF、MEK或ERK激酶激活的MAPKAP途径的信号传导而引起肿瘤生长。

[0142] 在本文所述的方法涉及用化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐进行治疗的情况下,其意味着仅需要化合物A或其药学上可接受的盐、或者化

合物B或其药学上可接受的盐中的一种。然而,应当理解,这些方法涵盖向患者施用与MEK抑制剂、ERK抑制剂或RAF抑制剂组合的化合物A或其药学上可接受的盐、和化合物B或其药学上可接受的盐二者。此外,应当理解,在将化合物A与MEK抑制剂、ERK抑制剂或RAF抑制剂组合施用至受试者后,一定量的化合物A在体内被代谢为化合物B,并且化合物A和化合物B的体内混合物还可以与MEK抑制剂、ERK抑制剂或RAF抑制剂组合用于有效地治疗受试者。

[0143] 可以根据所公开的方法和组合物使用的说明性MEK抑制剂包括但不限于曲美替尼、司美替尼、考比替尼和比美替尼。

[0144] 可以根据所公开的方法和组合物使用的说明性ERK抑制剂包括但不限于优立替尼、SCH772984、LY3214996、拉伏替尼(ravoxertinib)和VX-11e。

[0145] 可以根据所公开的方法和组合物使用的说明性RAF抑制剂包括但不限于LY3009120、达拉非尼和维莫非尼。

[0146] 在一个实施方案中,向患有c-KIT介导的肿瘤(例如GIST)的患者施用化合物A或其药学上可接受的盐和MEK抑制剂(例如曲美替尼)。在另一个实施方案中,向患有c-KIT介导的肿瘤(例如GIST)的患者施用化合物B或其药学上可接受的盐和MEK抑制剂(例如曲美替尼)。

[0147] 在相关实施方案中,向患有肿瘤的患者(例如患有GIST的患者)施用化合物A或其药学上可接受的盐和MEK抑制剂(例如曲美替尼),其中肿瘤生长或肿瘤进展由一级激活c-KIT突变和/或二级c-KIT突变引起。在另一个实施方案中,向患有肿瘤的患者(例如患有GIST的患者)施用化合物B或其药学上可接受的盐和MEK抑制剂(例如曲美替尼),其中肿瘤生长或肿瘤进展由一级激活c-KIT突变和/或二级c-KIT突变引起。在某些实施方案中,一级激活c-KIT突变是外显子11突变(例如57个碱基对的外显子11缺失)。在某些实施方案中,一级激活c-KIT突变是外显子9A-Y 502-503重复。在某些实施方案中,一级激活c-KIT突变是外显子13突变。在某些实施方案中,一级激活c-KIT突变是外显子17突变。在某些实施方案中,二级c-KIT突变是本文公开的任何抗性突变,例如T670I突变或D816E突变。在某些实施方案中,多个二级c-KIT抗性突变共同存在于受试者中。

[0148] 在某些实施方案中,向癌症患者施用化合物A或其药学上可接受的盐和MEK抑制剂(例如曲美替尼)。在某些实施方案中,向癌症患者施用化合物B或其药学上可接受的盐和MEK抑制剂(例如曲美替尼)。在本文公开的任何方法的特定实施方案中,肿瘤或癌症是肺腺癌、鳞状细胞肺癌、胶质母细胞瘤、小儿神经胶质瘤、星形细胞瘤、肉瘤、黑色素瘤或胃肠道间质瘤(GIST)。在一个实施方案中,癌症是黑色素瘤。在另一个实施方案中,肿瘤或癌症是胃肠道间质瘤(GIST)。在任何这些方法的特定实施方案中,肿瘤或癌症是c-KIT介导的癌症,例如c-KIT介导的GIST或黑色素瘤。

[0149] 用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐与MEK抑制剂(例如曲美替尼)组合进行治疗涵盖在施用MEK抑制剂之前、之后、与其同时或与其重叠的时间段内施用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐。应当理解,化合物A或其药学上可接受的盐、化合物B或其药学上可接受的盐、或MEK抑制剂(例如曲美替尼)中任一种的有效量当以本文公开的组合使用时与当这些药剂中任一种本身单独用于相同目的(例如用于治疗或预防肿瘤)时相比可以是不同的。在特定实施方案中,化合物A或其药学上可接受的盐的有效量或化合物B或其药学上可接受的盐的有效量当作为与MEK

抑制剂(例如曲美替尼)的组合疗法施用时与当将其作为单一疗法(例如用于治疗或预防GIST)施用时相比是更低的量。在特定实施方案中,当作为与化合物A或其药学上可接受的盐的组合疗法施用时或当作为与化合物B或其药学上可接受的盐的组合疗法施用时(例如用于治疗或预防GIST),MEK抑制剂(例如曲美替尼)的有效量是较低的量。

[0150] 本文公开的任何方法还可以包括确定所治疗的肿瘤具有一个或多个c-KIT基因突变。可以通过用于确定从患者获得的生物样品(例如肿瘤样品、血液样品或血浆样品)中基因突变的存在的常规方法来进行这种确定。另外,可以通过回顾用于确定从患者获得的生物样品(例如肿瘤样品、血液样品或血浆样品)中一个或多个c-KIT基因突变的存在所进行的测试结果来进行这种确定。在本文公开的任何方法的某些实施方案中,对其中肿瘤已被鉴定为具有一个或多个c-KIT基因突变的患者进行所述方法。c-KIT基因突变包括但不限于本文具体描述的那些中的任何一个。

[0151] 在本文公开的任何方法的各个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐与MEK抑制剂(例如曲美替尼)组合进行治疗:诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的细胞停滞延长;诱导杀伤肿瘤细胞,例如GIST细胞;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的凋亡;诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限;诱导肿瘤(例如GIST肿瘤)消退;减小肿瘤(例如GIST肿瘤)重量或体积;抑制肿瘤(例如GIST肿瘤)再生长。在本文公开的任何方法的另一个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐与MEK抑制剂(例如曲美替尼)组合进行治疗:诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的细胞停滞延长;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的杀伤;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的凋亡;诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限;诱导肿瘤(例如GIST肿瘤)消退;减小肿瘤(例如GIST肿瘤)重量或体积;抑制抗药性肿瘤(例如抗药性GIST)中的肿瘤(例如GIST肿瘤)再生长。在本文公开的任何方法的另一个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐与MEK抑制剂(例如曲美替尼)组合进行治疗:在正在接受治疗的患者(例如GIST患者)中将肿瘤根除至检测极限。用于测量或确定肿瘤细胞停滞、肿瘤细胞死亡、肿瘤细胞凋亡、肿瘤消退、肿瘤重量或体积、肿瘤再生长、抗性肿瘤细胞的生长、和肿瘤根除的量的方法是本领域已知的,并且包括本文所述的任何方法。

[0152] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用MEK抑制剂(例如曲美替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)或用MEK抑制剂(例如曲美替尼)与c-KIT抑制剂伊马替尼的组合所治疗的相同类型或相同肿瘤类型的肿瘤细胞的停滞、细胞杀伤或凋亡的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和MEK抑制剂(例如曲美替尼),导致肿瘤细胞(例如GIST细胞)停滞、肿瘤细胞杀伤或肿瘤细胞凋亡的量增加。例如,细胞停滞、细胞杀伤或凋亡可能被增加了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少10倍或至少20倍。在某些实施方案中,通过测量肿瘤细胞的胱天蛋白酶活性来确定凋亡的量。

[0153] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用MEK抑制剂(例如曲美替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)所治疗的相同类型或相同肿瘤的肿瘤尺寸(例如重量或体积)相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和MEK抑制剂(例如曲美替尼),导致肿瘤(例如GIST)消退增加或肿瘤尺寸或体积减

小。例如,肿瘤重量或体积可能被减小了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0154] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用MEK抑制剂(例如曲美替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)所治疗的相同类型或相同肿瘤的生长或再生长的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和MEK抑制剂(例如曲美替尼),以更大的程度抑制肿瘤生长或再生量(例如GIST生长或再生长)的量。例如,肿瘤生长或再生长可能被抑制了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0155] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用MEK抑制剂(例如曲美替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)或用MEK抑制剂(例如曲美替尼)与c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)的组合所治疗的相同类型或相同肿瘤的抗性肿瘤细胞生长的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和MEK抑制剂(例如曲美替尼),以更大的程度抑制抗性肿瘤细胞(例如抗性GIST细胞)的生长。例如,抗性肿瘤细胞的生长量或数量可能被抑制了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。在特定实施方案中,抗性肿瘤细胞对用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)和/或MEK抑制剂(例如曲美替尼)的治疗具有抗性。在某些实施方案中,抗性肿瘤细胞包含c-KIT二级突变。在某些实施方案中,c-KIT二级突变是c-KIT的以下氨基酸残基中任一个的突变:V654、N655、T670、L783、D816、D820、N822、Y823、A829和/或T847,包括但不限于在附图中所描绘的任何氨基酸取代。在特定实施方案中,抗性肿瘤细胞包含激活的MAPKAP激酶途径,并且在某些实施方案中,它们包含在RAS基因(例如N-RAS或K-RAS基因)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)基因和/或神经纤维蛋白-1(NF1)基因中的突变中的突变。在某些实施方案中所述突变是N-RAS G12D突变。

[0156] 在特定实施方案中,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;与MEK抑制剂(例如曲美替尼)组合,导致将肿瘤(例如GIST)根除至检测极限。在特定实施方案中,肿瘤根除意味着患者中不再有任何可检测到的肿瘤,达到检测极限。在特定实施方案中,在通过本文公开的组合疗法根除肿瘤(例如GIST)后的至少六个月、至少一年、至少两年、至少五年或至少10年,患者中没有可检测到的肿瘤。可以通过光子发射断层扫描(PET)、CT扫描、不存在含有c-KIT突变的循环细胞游离DNA(cfDNA)、存在于受试者血管中的循环肿瘤细胞(CTC)的不存在、在受试者的循环血管内不存在癌细胞生物标记来确定肿瘤根除。

[0157] 在本文公开的任何方法的各个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐与ERK抑制剂(例如优立替尼)组合进行治疗:诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的细胞停滞延长;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的杀伤;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的凋亡;诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限;诱导肿瘤(例如GIST肿瘤)消退;减小肿瘤(例如GIST肿瘤)重量或体积;抑制肿瘤(例如GIST肿瘤)再生长。在本文公开的任何方法的另一个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐与ERK抑制剂(例如优立替尼)组合进行治疗:诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的细胞停滞延长;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的杀伤;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的凋亡;诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限;诱导肿瘤(例如GIST肿瘤)消退;

减小肿瘤(例如GIST肿瘤)重量或体积;抑制抗药性肿瘤(例如抗药性GIST)中的肿瘤(例如GIST肿瘤)再生长。在本文公开的任何方法的另一个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐与ERK抑制剂(例如优立替尼)组合进行治疗:在正在接受治疗的患者(例如GIST患者)中将肿瘤根除至检测极限。用于测量或确定肿瘤细胞停滞、肿瘤细胞死亡、肿瘤细胞凋亡、肿瘤消退、肿瘤重量或体积、肿瘤再生长、抗性肿瘤细胞的生长、和肿瘤根除的量的方法是本领域已知的,并且包括本文所述的任何方法。

[0158] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用ERK抑制剂(例如优立替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)或用ERK抑制剂(例如优立替尼)与c-KIT抑制剂伊马替尼的组合所治疗的相同类型或相同肿瘤类型的肿瘤细胞的停滞、细胞杀伤或凋亡的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和ERK抑制剂(例如优立替尼),导致肿瘤细胞(例如GIST细胞)停滞、肿瘤细胞杀伤或肿瘤细胞凋亡的量增加。例如,细胞停滞、细胞杀伤或凋亡可能被增加了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少10倍或至少20倍。在某些实施方案中,通过测量肿瘤细胞的胱天蛋白酶活性来确定凋亡的量。

[0159] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用ERK抑制剂(例如优立替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)所治疗的相同类型或相同肿瘤的肿瘤尺寸(例如重量或体积)相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和ERK抑制剂(例如优立替尼),导致肿瘤(例如GIST)消退增加或肿瘤尺寸或体积减小。例如,肿瘤重量或体积可能被减小了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0160] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用ERK抑制剂(例如优立替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)所治疗的相同类型或相同肿瘤的生长或再生长的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和ERK抑制剂(例如优立替尼),以更大的程度抑制肿瘤生长或再生量(例如GIST生长或再生长)的量。例如,肿瘤生长或再生长可能被抑制了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0161] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用ERK抑制剂(例如优立替尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)或用ERK抑制剂(例如优立替尼)与c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)的组合所治疗的相同类型或相同肿瘤的抗性肿瘤细胞生长的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和ERK抑制剂(例如优立替尼),以更大的程度抑制抗性肿瘤细胞(例如抗性GIST细胞)的生长。例如,抗性肿瘤细胞的生长量或数量可能被抑制了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。在特定实施方案中,抗性肿瘤细胞对用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)和/或ERK抑制剂(例如优立替尼)的治疗具有抗性。在某些实施方案中,抗性肿瘤细胞包含c-KIT二级突变。在某些实施方案中,c-KIT二级突变是c-KIT的以下氨基酸残基中任一个的突变:V654、N655、T670、L783、D816、D820、N822、Y823、A829和/或T847,包括但不限于在附图中所描绘的任何氨基酸取代。在特定实施方案中,抗性肿瘤细胞包含激活的MAPKAP激酶途径,并且在某些实施方案中,它们包含在RAS基因(例如N-RAS或K-

RAS基因)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)基因和/或神经纤维蛋白-1(NF1)基因中的突变中的突变。在某些实施方案中所述突变是N-RAS G12D突变。

[0162] 在特定实施方案中,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;与ERK抑制剂(例如优立替尼)组合,导致将肿瘤(例如GIST)根除至检测极限。在特定实施方案中,肿瘤根除意味着患者中不再有任何可检测到的肿瘤,达到检测极限。在特定实施方案中,在通过本文公开的组合疗法根除肿瘤(例如GIST)后的至少六个月、至少一年、至少两年、至少五年或至少10年,患者中没有可检测到的肿瘤。可以通过光子发射断层扫描(PET)、CT扫描、不存在含有c-KIT突变的循环细胞游离DNA(cfDNA)、存在于受试者血管中的循环肿瘤细胞(CTC)的不存在、在受试者的循环血管内不存在癌细胞生物标记来确定肿瘤根除。

[0163] 在本文公开的任何方法的各个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐与RAF抑制剂(例如达拉非尼)组合进行治疗:诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的细胞停滞延长;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的杀伤;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的凋亡;诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限;诱导肿瘤(例如GIST肿瘤)消退;减小肿瘤(例如GIST肿瘤)重量或体积;抑制肿瘤(例如GIST肿瘤)再生长。在本文公开的任何方法的另一个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐与RAF抑制剂(例如达拉非尼)组合进行治疗:诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的细胞停滞延长;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的杀伤;诱导肿瘤细胞(例如GIST细胞)的凋亡;诱导将肿瘤细胞(例如GIST细胞)根除至检测极限;诱导肿瘤(例如GIST肿瘤)消退;减小肿瘤(例如GIST肿瘤)重量或体积;抑制抗药性肿瘤(例如抗药性GIST)中的肿瘤(例如GIST肿瘤)再生长。在本文公开的任何方法的另一个方面,用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐与RAF抑制剂(例如达拉非尼)组合进行治疗:在正在接受治疗的患者(例如GIST患者)中将肿瘤根除至检测极限。用于测量或确定肿瘤细胞停滞、肿瘤细胞死亡、肿瘤细胞凋亡、肿瘤消退、肿瘤重量或体积、肿瘤再生长、抗性肿瘤细胞的生长、和肿瘤根除的量的方法是本领域已知的,并且包括本文所述的任何方法。

[0164] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用RAF抑制剂(例如达拉非尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)或用RAF抑制剂(例如达拉非尼)与c-KIT抑制剂伊马替尼的组合所治疗的相同类型或相同肿瘤类型的肿瘤细胞的停滞、细胞杀伤或凋亡的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和RAF抑制剂(例如达拉非尼),导致肿瘤细胞(例如GIST细胞)停滞、肿瘤细胞杀伤或肿瘤细胞凋亡的量增加。例如,细胞停滞、细胞杀伤或凋亡可能被增加了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少10倍或至少20倍。在某些实施方案中,通过测量肿瘤细胞的胱天蛋白酶活性来确定凋亡的量。

[0165] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用RAF抑制剂(例如达拉非尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)所治疗的相同类型或相同肿瘤的肿瘤尺寸(例如重量或体积)相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和RAF抑制剂(例如达拉非尼),导致肿瘤(例如GIST)消退增加或肿瘤尺寸或体积减小。例如,肿瘤重量或体积可能被减小了至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少

50％、至少60％、至少70％、至少80％或至少90％。

[0166] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用RAF抑制剂(例如达拉非尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)所治疗的相同类型或相同肿瘤的生长或再生长的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和RAF抑制剂(例如达拉非尼),以更大的程度抑制肿瘤生长或再生量(例如GIST生长或再生长)的量。例如,肿瘤生长或再生长可能被抑制了至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％或至少90％。

[0167] 在特定实施方案中,与未经治疗或者仅用RAF抑制剂(例如达拉非尼)或仅用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)或用RAF抑制剂(例如达拉非尼)与c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)的组合所治疗的相同类型或相同肿瘤的抗性肿瘤细胞生长的量相比,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;和RAF抑制剂(例如达拉非尼),以更大的程度抑制抗性肿瘤细胞(例如抗性GIST细胞)的生长。例如,抗性肿瘤细胞的生长量或数量可能被抑制了至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％或至少90％。在特定实施方案中,抗性肿瘤细胞对用c-KIT抑制剂(例如伊马替尼)和/或RAF抑制剂(例如达拉非尼)的治疗具有抗性。在某些实施方案中,抗性肿瘤细胞包含c-KIT二级突变。在某些实施方案中,c-KIT二级突变是c-KIT的以下氨基酸残基中任一个的突变:V654、N655、T670、L783、D816、D820、N822、Y823、A829和/或T847,包括但不限于在附图中所描绘的任何氨基酸取代。在特定实施方案中,抗性肿瘤细胞包含激活的MAPKAP激酶途径,并且在某些实施方案中,它们包含在RAS基因(例如N-RAS或K-RAS基因)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)基因和/或神经纤维蛋白-1(NF1)基因中的突变中的突变。在某些实施方案中所述突变是N-RAS G12D突变。

[0168] 在特定实施方案中,用以下的组合进行治疗:化合物A或其药学上可接受的盐、或者化合物B或其药学上可接受的盐;与RAF抑制剂(例如达拉非尼)组合,导致将肿瘤(例如GIST)根除至检测极限。在特定实施方案中,肿瘤根除意味着患者中不再有任何可检测到的肿瘤,达到检测极限。在特定实施方案中,在通过本文公开的组合疗法根除肿瘤(例如GIST)后的至少六个月、至少一年、至少两年、至少五年或至少10年,患者中没有可检测到的肿瘤。可以通过光子发射断层扫描(PET)、CT扫描、不存在含有c-KIT突变的循环细胞游离DNA(cfDNA)、存在于受试者血管中的循环肿瘤细胞(CTC)的不存在、在受试者的循环血管内不存在癌细胞生物标记来确定肿瘤根除。

[0169] 本公开描述了组合疗法,其涉及施用化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐和一种或多种MAPKAP激酶抑制剂(例如MEK抑制剂、ERK抑制剂、或RAF抑制剂)。本文所述的组合疗法可以它们本身单独使用,或进一步与一种或多种另外的治疗剂(例如,下文所述的一种或多种另外的治疗剂)组合使用。例如,化合物A或其药学上可接受的盐或者化合物B或其药学上可接受的盐和MEK抑制剂可以与癌症靶向治疗剂、癌症靶向生物免疫检查点抑制剂、或化学治疗剂一起施用。在另一个实施方案中,化合物A或化合物B和MEK抑制剂在没有任何其他治疗剂的情况下施用。在组合疗法中可以将治疗剂与本文所述的另一种治疗剂一起施用或与其依次施用。

[0170] 组合疗法可以通过以下方式来实现:施用两种或更多种治疗剂,每种治疗剂单独配制和施用;或者在单一配制品中施用两种或更多种治疗剂。组合疗法也涵盖其他组合。虽

然可以同时施用组合疗法中的两种或更多种药剂,但它们不一定如此施用。例如,第一药剂(或药剂的组合)的施用可以在第二药剂(或药剂的组合)的施用之前数分钟、数小时、数天或数周。因此,所述两种或更多种药剂可以在彼此的数分钟内、或在彼此的1、2、3、6、9、12、15、18或24小时内、或在彼此的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14天内、或在彼此的2、3、4、5、6、7、8、9或几周内施用。在一些情况下,甚至可能有更长的间隔。尽管在许多情况下希望在组合疗法中使用的两种或更多种药剂同时存在于患者体内,但这不是必须的。

[0171] 组合疗法还可以包括使用组分药剂的不同顺序两次或更多次施用在组合中使用的一种或多种药剂。例如,如果药剂X和药剂Y以组合使用,则人们可以按任何组合一次或多次例如以X-Y-X、X-X-Y、Y-X-Y、Y-Y-X、X-X-Y-Y等的顺序依次施用它们。

[0172] 可以根据本公开施用的一种或多种另外的治疗剂包括但不限于细胞毒性剂、顺铂、阿霉素、依托泊苷、伊立替康、托泊替康、拓扑替康、紫杉醇、多西他赛、埃博霉素、他莫昔芬、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、替莫唑胺、环磷酰胺、洛那法尼(lonafarib)、替吡法尼(tipifarnib)、4-((5-((4-(3-氯苯基)-3-氧代哌嗪-1-基)甲基)-1H-咪唑-1-基)甲基)苯甲腈盐酸盐、(R)-1-((1H-咪唑-5-基)甲基)-3-苄基-4-(噻吩-2-基磺酰基)-2,3,4,5-四氢-1H-苯并二氮杂卓-7-甲腈、西妥昔单抗、伊马替尼、干扰素α-2b、聚乙二醇化干扰素α-2b、芳香化酶组合、吉西他滨、尿嘧啶氮芥、氮芥、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、三乙烯亚胺三嗪、三乙烯硫代磷酰胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲菌素、达卡巴嗪、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、氟达拉滨磷酸盐、亚叶酸、奥沙利铂、喷司他丁、长春花碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、放线菌素、道诺霉素、表柔比星、伊达比星、光神霉素、脱氧助间型霉素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊苷17α-乙炔雌二醇、己烯雌酚、睾酮、强的松、氟甲睾酮、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲基强的松龙、甲基睾酮、泼尼松龙、去炎松(triamcinolone)、氯烯雌醚、17α-羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、醋酸亮丙瑞林、氟他米特、枸橼酸托瑞米芬、醋酸戈舍瑞林、卡铂、羟基脲、安吖啶、甲基苄肼、米托坦、米托蒽醌、左旋咪唑、长春瑞滨、阿那曲唑(anastrazole)、来曲唑、卡培他滨、雷洛昔芬、屈洛昔芬(droloxafine)、六甲三聚氰胺、贝伐单抗、曲妥珠单抗、托西莫单抗、硼替佐米、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、三氧化二砷、叶吩姆钠、西妥昔单抗、噻替派、六甲蜜胺、氟维司群、依西美坦、利妥昔单抗、阿仑单抗、地塞米松、比卡鲁胺、苯丁酸氮芥、和戊柔比星(valrubicin)。

[0173] 可以施用的一种或多种另外的治疗剂可以包括但不限于AKT抑制剂、烷化剂、全反式视黄酸、抗雄激素、阿扎胞苷、BCL2抑制剂、BCL-XL抑制剂、BCR-ABL抑制剂、BTK抑制剂、BTK/LCK/LYN抑制剂、CDK1/2/4/6/7/9抑制剂、CDK4/6抑制剂、CDK9抑制剂、CBP/p300抑制剂、EGFR抑制剂、内皮素受体拮抗剂、RAF抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、FLT3抑制剂、糖皮质激素受体激动剂、HDM2抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、IKKβ抑制剂、免疫调节药物(IMiD)、巨大戟醇、ITK抑制剂、JAK1/JAK2/JAK3/TYK2抑制剂、MTOR抑制剂、PI3激酶抑制剂、双PI3激酶/MTOR抑制剂、蛋白酶体抑制剂、蛋白激酶C激动剂、SUV39H1抑制剂、TRAIL、VEGFR2抑制剂、Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂、地西他滨、和抗CD20单克隆抗体。

[0174] 在某些实施方案中,另外的治疗剂是选自由以下组成的组的免疫调节剂:CTLA4抑制剂,例如但不限于易普利姆玛和曲美木单抗;PD1抑制剂,例如但不限于派姆单抗和纳武

单抗;PDL1抑制剂,例如但不限于阿特珠单抗(原名MPDL3280A)、德瓦鲁单抗(durvalumab)(原名MEDI4736)、阿维鲁单抗(avelumab)、PDR001;4 1BB或4 1BB配体抑制剂,例如但不限于优瑞路单抗(urelumab)和PF-05082566;OX40配体激动剂,例如但不限于MEDI6469;GITR药剂,例如但不限于TRX518;CD27抑制剂,例如但不限于varlilumab;TNFRSF25或TL1A抑制剂;CD40激动剂,例如但不限于CP-870893;HVEM或LIGHT或LTA或BTLA或CD160抑制剂;LAG3抑制剂,例如但不限于BMS-986016;TIM3抑制剂;Siglecs抑制剂;ICOS或ICOS配体激动剂;B7 H3抑制剂,例如但不限于MGA271;B7 H4抑制剂;VISTA抑制剂;HHLA2或TMIGD2抑制剂;嗜乳脂蛋白的抑制剂,包括BTNL2抑制剂;CD244或CD48抑制剂;TIGIT和PVR家族成员抑制剂;KIR抑制剂,例如但不限于lirilumab;ILT和LIR的抑制剂;NKG2D和NKG2A抑制剂,例如但不限于IPH2201;MICA和MICB的抑制剂;CD244抑制剂;CSF1R抑制剂,例如但不限于emactuzumab、卡比利珠单抗(cabiralizumab)、培西达替尼(pexidartinib)、ARRY382、BLZ945;IDO抑制剂,例如但不限于INCB024360;沙利度胺、来那度胺、TGFβ抑制剂,例如但不限于galunisertib;腺苷或CD39或CD73抑制剂;CXCR4或CXCL12抑制剂,例如但不限于优库路单抗(ulocuplumab)和(3S,6S,9S,12R,17R,20S,23S,26S,29S,34aS)-N-((S)-1-氨基-5-胍基-1-氧代戊烷-2-基)-26,29-双(4-氨基丁基)-17-((S)-2-((S)-2-((S)-2-(4-氟苯甲酰胺基)-5-胍基戊酰胺)-5-胍基戊酰胺)-3-(萘-2-基)丙酰胺)-6-(3-胍基丙基)-3,20-双(4-羟基苄基)-1,4,7,10,18,21,24,27,30-九氧代-9,23-双(3-脲基丙基)三十氢-1H,16H-吡咯并[2,1-p][1,2]二硫杂[5,8,11,14,17,20,23,26,29]九氮杂环三十二烷-12-甲酰胺BKT140;磷脂酰丝氨酸抑制剂,例如但不限于巴维昔单抗(bavituximab);SIRPA或CD47抑制剂,例如但不限于CC-90002;VEGF抑制剂,例如但不限于贝伐珠单抗(bevacizumab);一级神经毡蛋白抑制剂,例如但不限于MNRP1685A。

[0175] 药物组合物

[0176] 本公开的方面涉及治疗方法,所述治疗方法涉及施用本文公开的化合物的组合、或者包含此类化合物和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体的一种或多种药物组合物。在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用第一药物组合物和第二药物组合物,所述第一药物组合物包含化合物A或其药学上可接受的盐和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体,并且所述第二药物组合物包含MEK抑制剂(例如曲美替尼)、ERK抑制剂(例如优立替尼)、RAF抑制剂(例如LY3009120)或其药学上可接受的盐、和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用第一药物组合物和第二药物组合物,所述第一药物组合物包含化合物B或其药学上可接受的盐和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体,并且所述第二药物组合物包含MEK抑制剂(例如曲美替尼)、ERK抑制剂(例如优立替尼)、RAF抑制剂(例如LY3009120)或其药学上可接受的盐、和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用药物组合物,所述药物组合物包含化合物A或其药学上可接受的盐、MEK抑制剂(例如曲美替尼)和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用药物组合物,所述药物组合物包含化合物B或其药学上可接受的盐、MEK抑制剂(例如曲美替尼)和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0177] 在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用药物组合物,所述药物组合物包含化合物A或其药学上可接受的盐、ERK抑制剂(例如优立替尼)和药学上可接受的稀释剂、赋

形剂或载体。在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用药物组合物,所述药物组合物包含化合物B或其药学上可接受的盐、ERK抑制剂(例如优立替尼)和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0178] 在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用药物组合物,所述药物组合物包含化合物A或其药学上可接受的盐、RAF抑制剂(例如LY3009120)和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。在特定实施方案中,本文公开的方法涉及施用药物组合物,所述药物组合物包含化合物B或其药学上可接受的盐、RAF抑制剂(例如LY3001290)和药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0179] 在使用本文所述化合物的药物组合物时,药学上可接受的载体可以是固体或液体。固体形式包括散剂、片剂、可分散颗粒剂、胶囊剂、扁囊剂和栓剂。散剂和片剂可以包含从约5%至约95%的活性成分。合适的固体载体是本领域已知的,例如,碳酸镁、硬脂酸镁、滑石粉、糖或乳糖。片剂、散剂、扁囊剂和胶囊剂可以用作适合于口服施用的固体剂型。药学上可接受的载体的实例和制造各种组合物的方法可见于A.Gennaro(编辑),Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,(1990),Mack Publishing Co.,Easton,Pa,将其据此全文以引用方式并入。

[0180] 液体形式的制剂包括溶液、混悬剂和乳剂。例如,水或水-丙二醇溶液用于肠胃外注射,或添加甜味剂和遮光剂用于口服溶液、混悬剂和乳剂。液体形式的制剂还可以包括用于鼻内施用的溶液。

[0181] 液体,特别是可注射的组合物可以例如通过溶解、分散等来制备。例如,将所公开的化合物溶解于药学上可接受的溶剂(例如水、盐水、水性右旋糖、甘油、乙醇等)中或与其混合,由此形成可注射的等渗溶液或混悬剂。可以将蛋白质诸如白蛋白、乳糜微粒或血清蛋白质用于溶解所公开的化合物。

[0182] 肠胃外注射剂施用通常用于皮下、肌肉内或静脉内注射和输注。注射剂可以按常规形式制备,作为液体溶液或混悬剂或适合于在注射之前溶解于液体中的固体形式制备。

[0183] 也可以使用适合于吸入的气溶胶制剂。这些制剂可以包括溶液和呈粉末形式的固体,所述溶液和呈粉末形式的固体可以与药学上可接受的载体(诸如惰性压缩气体,例如氮气)组合。

[0184] 还考虑使用的是固体形式的制剂,所述固体形式的制剂意图在使用前不久被转变成用于口服或肠胃外施用的液体形式的制剂。此类液体形式包括溶液、混悬剂和乳剂。

[0185] 剂量

[0186] 在化合物A或化合物B(或其药学上可接受的盐)与MEK抑制剂(例如曲美替尼)组合使用用于治疗方案的一些实施方案中,两种治疗剂可以一起施用或者以其中将两种治疗剂单独给药和施用的"双重方案"施用。当将化合物A或B(或其药学上可接受的盐)和MEK抑制剂单独给药时,向需要治疗的受试者施用的化合物A或化合物B(或其药学上可接受的盐)的典型剂量通常为从每天约5mg至每天约5000mg,以及在其他实施方案中,从每天约50mg至每天约1000mg。其他剂量可以为从每天约10mmol至每天约250mmol、从每天约20mmol至每天约70mmol或甚至从每天约30mmol至每天约60mmol。当用于所示效果时,所公开化合物的有效剂量的量的范围为治疗病症所需的从约0.5mg至约5000mg的所公开化合物。用于体内或体外用途的组合物可以含有约0.5、5、20、50、75、100、150、250、500、750、1000、1250、2500、

3500、或5000mg的所公开化合物,或者,在从剂量列表中的一个量至另一个量的范围内。口服施用的典型推荐每日剂量方案可以按单一剂量或按两至四个分割剂量,在从约1mg/天至约500mg/天或1mg/天至200mg/天的范围内。在一个实施方案中,典型每日剂量方案为150mg。

[0187] 在某些实施方案中,MEK抑制剂的剂量与先前公开的剂量和/或被食品和药物管理局(Food and Drug Administration)批准使用的剂量一致。在其他实施方案中,MEK抑制剂的剂量小于先前批准的剂量,例如为批准剂量的约20%、约50%或约80%。在某些实施方案中,曲美替尼的剂量为每日口服约.5mg至20mg,例如每日约1mg或每日约2mg。在某些实施方案中,考比替尼的剂量为每日约10mg至200mg,例如每日约30mg或约60mg。在某些实施方案中,比美替尼的剂量为每日两次约10mg至约200mg,例如每日两次约25mg或约45mg。在某些实施方案中,司美替尼的剂量为每日约10mg至200mg,例如每日两次约30mg或约75mg。

[0188] 本文所述的化合物和/或其药学上可接受的盐以及其他治疗剂的施用量和频率也将考虑到诸如年龄、病情和患者尺寸以及所治疗症状的严重性等因素根据主治临床医师的判断进行调节。

[0189] 可以通过任何合适的途径施用本公开的化合物(例如,化合物A或化合物B(及其药学上可接受的盐)、MEK抑制剂和其他治疗剂)。可以以胶囊剂、混悬剂、片剂、丸剂、糖衣丸、液体、凝胶、糖浆、浆液等形式口服(例如饮食)施用化合物。包封组合物(诸如在硬明胶或环糊精的包衣中)的方法是本领域已知的(Baker等人,"Controlled Release of Biological Active Agents",John Wiley and Sons,1986,将其据此全文以引用方式并入)。可以将化合物与可接受的药物载体结合作为药物组合物的一部分施用至受试者。药物组合物的配制品将根据所选择的施用途径而变化。合适的药物载体可以含有不与化合物相互作用的惰性成分。载体是生物相容的,即无毒的、非炎性的、非免疫原性的,并且在施用部位没有其他不良反应。

[0190] 说明性药物组合物是包含本文所述的化合物和药学上可接受的载体的片剂和明胶胶囊剂、所述药学上可接受的载体为诸如:a)稀释剂,例如纯净水、甘油三酸酯油(诸如氢化或部分氢化的植物油、或其混合物)、玉米油、橄榄油、向日葵油、红花油、鱼油(诸如EPA或DHA、或它们的酯或甘油三酸酯或其混合物)、ω-3脂肪酸或其衍生物、乳糖、右旋糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、纤维素、钠、糖精、葡萄糖和/或甘氨酸;b)润滑剂,例如二氧化硅、滑石粉、硬脂酸、其镁盐或钙盐、油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠和/或聚乙二醇;也用于片剂;c)粘合剂,例如硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、碳酸镁、天然糖诸如葡萄糖或β-乳糖、玉米甜味剂、天然和合成树胶(诸如阿拉伯树胶)、黄芪胶或海藻酸钠、蜡和/或聚乙烯吡咯烷酮,如果需要的话;d)崩解剂,例如淀粉、琼脂、甲基纤维素、膨润土、黄原胶、海藻酸或其钠盐、或泡腾混合物;e)吸收剂、着色剂、香料和甜味剂;f)乳化剂或分散剂,诸如Tween 80、Labrasol、HPMC、DOSS、caproyl 909、labrafac、labrafil、peceol、transcutol、capmul MCM、capmul PG-12、captex 355、gelucire、维生素E TGPS或其他可接受的乳化剂;和/或g)增强化合物吸收的药剂,诸如环糊精、羟丙基-环糊精、PEG400、PEG200。

[0191] 如果配制为固定剂量,则此类组合产品采用在本文所述剂量范围内或如本领域技术人员已知的本文所述化合物。

[0192] 由于本文所述的化合物(例如化合物A和B和MAPKAP激酶抑制剂包括MEK抑制剂)旨在用于在药物组合物中使用,因此技术人员将理解,可以将它们以基本上纯的形式(例如至少60%的纯、至少75%纯、至少85%纯和至少98%纯(w/w))提供。药物制剂可以呈单位剂型。以这种形式,将制剂细分为适当大小的单位剂量,其含有适当量的化合物A或B,例如实现如本文所述的所需目的的有效量。

[0193] 实施例

[0194] 发现用化合物A或其药学上可接受的盐与MEK抑制剂或ERK抑制剂或RAF抑制剂组合来治疗c-KIT介导的肿瘤细胞出乎意料且协同地诱导了肿瘤细胞的凋亡。另外,这种组合疗法阻止肿瘤细胞的生长,所述肿瘤细胞包括具有赋予对其他c-KIT抑制剂和/或MEK、ERK或RAF抑制剂的抗性的二次突变的肿瘤细胞。此外,与在没有药物组合治疗的情况下快速的肿瘤再生长相反,本文公开的组合疗法似乎对肿瘤细胞停滞具有延长的作用。此外,本文公开的组合疗法似乎对肿瘤细胞具有细胞毒性作用,而不是仅具有细胞生长抑制作用。此外,本文公开的组合疗法似乎根除GIST肿瘤细胞至检测极限,在除去组合疗法之后(包括长达21天的无药物恢复期)没有肿瘤细胞集落生长晕。在生物化学测定和细胞测定(包括本文所述的那些)中,进行了这一意外发现的表征。

[0195] 因此,本公开文本通过以下实施例进一步阐明,这些实施例不应解释为将本公开文本限制在本文所述的具体程序的范围或精神内。应当理解,提供这些实施例是为了说明某些实施方案,并且因此不旨在限制本公开文本的范围。应当进一步理解,在不背离本公开文本的精神和/或所附权利要求书的范围的情况下,可能不得不对可以向本领域技术人员浮现的各种其他实施方案、修改及其等同物进行求助。

[0196] 实施例1.化合物A与曲美替尼的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0197] 进行的研究表明,用化合物A和曲美替尼的组合处理诱导了GIST-T1(57bp外显子11缺失)伊马替尼敏感细胞、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I)抗伊马替尼细胞的凋亡。在每个孔中接种有10,000个GIST-T1、GIST-T1/D816E或GIST-T1/T670I细胞的96孔板中进行测定。用运载体对照、化合物A、曲美替尼或其组合以不同的浓度处理细胞,并且在存在药物处理的情况下使细胞生长24和48小时。通过测量胱天蛋白酶3/7活性来评估凋亡。

[0198] 图1A和1C是显示对于GIST-T1细胞的各种处理所确定的胱天蛋白酶活性相对百分比(与设定为100%的运载体对照相比)的图示。图1B和1D是基于由Chou和Talalay(1984)描述的组合索引(CI)方法以及Chou和Martin(2005)的计算机软件的矩阵协同作用图和组合索引图。CI<1表示协同作用,CI=1表示加和作用,并且CI>1表示拮抗作用。用化合物A和曲美替尼组合处理24小时(图1A、1B)和48小时(图1C、1D)显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1细胞的凋亡。

[0199] 图1E是显示在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图1F是基于由Chou和Talalay(1984)描述的组合索引(CI)方法以及Chou和Martin(2005)的计算机软件的矩阵协同作用图和组合索引图。CI<1表示协同作用,CI=1表示加和作用,并且CI>1表示拮抗作用。用化合物A和曲美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0200] 图1G是显示在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图1H是基于由Chou和Talalay(1984)描述的组合索引(CI)方法以及Chou和Martin(2005)的计算机软件的矩阵协同作用图和组合索引图。CI<1表示协同作用,CI＝1表示加和作用,并且CI>1表示拮抗作用。用化合物A和曲美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0201] 实施例2.化合物B与曲美替尼的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0202] 图2A是显示对于GIST-T1细胞的各种处理所确定的胱天蛋白酶活性相对百分比(与设定为100％的运载体对照相比)的图示。图2B是如实施例1中所述的矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和曲美替尼组合处理24小时(图2A、2B)显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1细胞的凋亡。

[0203] 图2C是显示在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图2D是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和曲美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0204] 图2E是显示在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图2F是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和曲美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0205] 实施例3.化合物A与比美替尼的组合处理诱导GIST-T1和GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0206] 图3A是显示对于GIST-T1细胞的各种处理所确定的胱天蛋白酶活性相对百分比(与设定为100％的运载体对照相比)的图示。图3B示出了如实施例1中所述的基于组合索引(CI)方法的矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物A和比美替尼组合处理24小时(图3A、3B)显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1细胞的凋亡。

[0207] 图3C是显示在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图3D是如实施例1中所述的基于组合索引(CI)的矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物A和比美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0208] 图3E是显示在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图3F是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物A和比美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0209] 实施例4.化合物B与比美替尼的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0210] 图4A是显示对于GIST-T1细胞的各种处理所确定的胱天蛋白酶活性相对百分比(与设定为100％的运载体对照相比)的图示。图4B是基于由Chou和Talalay(1984)所描述的组合索引(CI)方法的矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和比美替尼组合处理24小时(图4A、4B)显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1细胞的凋亡。

[0211] 图4C是显示在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图4D是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和比美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0212] 图4E是显示在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图4F是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和比美替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0213] 实施例5.化合物A与考比替尼的组合处理诱导GIST-T1伊马替尼敏感细胞、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0214] 图5A是显示对于GIST-T1细胞的各种处理所确定的胱天蛋白酶活性相对百分比(与设定为100％的运载体对照相比)的图示。图5B示出了如实施例1中所述的基于组合索引(CI)方法的矩阵协同图和组合索引图。用化合物A和考比替尼组合处理24小时(图5A、5B)显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1细胞的凋亡。

[0215] 图5C是显示在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图5D是如实施例1中所述的基于组合索引(CI)的矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物A和考比替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0216] 图5E是显示在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图5F是如实施例1中所述的基于组合索引(CI)的矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物A和考比替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0217] 实施例6.化合物B与考比替尼的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0218] 图6A是显示对于GIST-T1细胞的各种处理所确定的胱天蛋白酶活性相对百分比(与设定为100％的运载体对照相比)的图示。图6B是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和考比替尼组合处理24小时(图6A、6B)显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1细胞的凋亡。

[0219] 图6C是显示在GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图6D是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和考比替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0220] 图6E是显示在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图6F是矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物B和考比替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0221] 实施例7.化合物A与优立替尼(BVD-523)的组合处理诱导GIST-T1和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0222] 图7A是显示对于GIST-T1细胞的各种处理所确定的胱天蛋白酶活性相对百分比(与设定为100％的运载体对照相比)的图示。图7B示出了如实施例1中所述的基于组合索引(CI)方法的矩阵协同图和组合索引图。用化合物A和优立替尼组合处理24小时(图7A、7B)在较高浓度下显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1细胞的凋亡。

[0223] 图7C是显示在GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的各种处理后的胱天蛋白酶活性的图示。图7D是如实施例1中所述的基于组合索引(CI)的矩阵协同作用图和组合索引图。用化合物A和优立替尼组合处理24小时显示出强大的协同作用以诱导GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0224] 实施例8.化合物B与优立替尼(Bvd-523)的组合处理诱导GIST-T1和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的凋亡。

[0225] 胱天蛋白酶活性的协同作用图和组合索引图可以用于显示化合物B和优立替尼组合在诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中的协同作用。

[0226] 实施例9.化合物A与SCH772984的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0227] 胱天蛋白酶活性的协同作用图和组合索引图可以用于显示化合物A和SCH772984组合在诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中的协同作用。

[0228] 实施例10.化合物B与SCH772984的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0229] 胱天蛋白酶活性的协同作用图和组合索引图可以用于显示化合物B和SCH772984组合在诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中的协同作用。

[0230] 实施例11.化合物A与LY3009120的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0231] 胱天蛋白酶活性的协同作用图和组合索引图可以用于显示化合物A和LY3009120组合在诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中的协同作用。

[0232]

[0233] 实施例12.化合物B与LY3009120的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0234] 胱天蛋白酶活性的协同作用图和组合索引图可以用于显示化合物B和LY3009120组合在诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中的协同作用。

[0235] 实施例13.化合物A与达拉非尼的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0236] 胱天蛋白酶活性的协同作用图和组合索引图可以用于显示化合物A和达拉非尼组合在诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中的协同作用。

[0237] 实施例14.化合物B与达拉非尼的组合处理诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞凋亡。

[0238] 胱天蛋白酶活性的协同作用图和组合索引图可以用于显示化合物B和达拉非尼组合在诱导GIST-T1、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞中的协同作用。

[0239] 实施例15.组合处理阻止了GIST-T1、GIST-T1/D816E和GIST-T1/T670I)抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0240] 进行的研究表明,用化合物A和曲美替尼的组合处理阻止了GIST-T1(57bp外显子

11缺失)伊马替尼敏感细胞、GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞和GIST-T1/T670I)抗伊马替尼细胞的集落生长晕。在每个孔中接种有100个细胞的6孔板中进行测定。用运载体对照、化合物A、曲美替尼、伊马替尼(IM)或其组合以不同的浓度处理细胞,并且将细胞培养2周。处理后,洗去药物,并将细胞在正常培养基中培养1-3周。将生长出的细胞集落用结晶紫染色,并计数。

[0241] 图8A示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1集落数的图示。GIST T1细胞对作为单药的伊马替尼和化合物A敏感。值得注意的是,伊马替尼和化合物A中的每一种作为单药展示出将GIST T1集落生长晕大约相似地减少至运载体对照的23-30%。用50nM化合物A和50nM或100nM曲美替尼组合处理2周出乎意料地导致细胞完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法9天之后没有可检测到的集落(注意图8A中的箭头)。相比之下,用100nM伊马替尼和50nM或100nM曲美替尼组合处理2周未导致在除去组合疗法9天之后肿瘤细胞完全停滞或根除。

[0242] 图8B示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,伊马替尼(500nM)和化合物A(100nM或250nM)中的每一种作为单药展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效的大约相似的缺乏,集落生长晕为运载体对照的61-72%(图8B)。用化合物A(100nM或250nM)和曲美替尼(100nM)组合处理2周导致在恢复十天后,在用化合物A(100nM)的情况下细胞几乎完全停滞、以及在曲美替尼(100nM)和化合物A(250nM)组合的情况下的细胞完全停滞或将GIST-T1/D816E细胞的集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限(参见箭头,图8B),然而用伊马替尼(500nM)和曲美替尼(50nM或100nM)组合处理2周不会导致细胞完全停滞或肿瘤细胞根除(参见图8B中的图表)。当细胞在没有药物的情况下培养额外10天时,这一现象尤为突出,并且约20-25个集落生长出。图8C示出了当化合物A浓度进一步降低至25nM、50nM或100nM并与50nM曲美替尼组合评估时的代表性培养板的图像。在恢复十天后,用100nM化合物A与曲美替尼组合实现了肿瘤细胞完全停滞或根除至如通过5X物镜可视化的肿瘤集落生长晕的检测极限(参见箭头,图8C),用50nM化合物A与曲美替尼组合实现了肿瘤细胞几乎完全停滞或接近根除(运载体对照的1%)(参见箭头,图8C),并且用25nM化合物A实现了显著的肿瘤细胞停滞或杀伤(运载体对照的11%)。相比之下,将100nM伊马替尼与50nM曲美替尼组合在恢复十天后不会根除肿瘤集落生长晕,实现了中等程度的肿瘤细胞停滞或杀伤(运载体对照的60%)。

[0243] 图8D示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。值得注意的是,伊马替尼(500nM)和化合物A(250nM或500nM)中的每一种作为单药展示出将GIST T1/T670I集落生长晕大约相似地减少至运载体对照的大约44-49%。用250nM或500nM化合物A与50nM或100nM曲美替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图8D中的箭头)。相比之下,用500nM伊马替尼与50nM或100nM曲美替尼组合处理2周未导致在除去组合疗法9天之后肿瘤细胞完全停滞或肿瘤细胞根除。

[0244] 实施例16.化合物B与曲美替尼的组合处理阻止了GIST-T1、GIST-T1/D816E和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0245] 还在3种GIST细胞系中用化合物B和曲美替尼组合处理进行了实施例8中解释的研究。

[0246] 图9A示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1集落数的图示。GIST T1细胞对作为单药的化合物B敏感,并且与运载体对照相比显示出GIST T1集落生长晕的42-54％减少。用50或100nM化合物B和50nM或100nM曲美替尼组合处理2周导致显著的细胞停滞,集落生长晕很少,然而用250nM化合物A与50nM或100nM曲美替尼组合处理导致细胞完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图9A中的箭头)。即使在总共20天的延长的长期恢复之后,也阻止了集落的生长晕。

[0247] 图9B示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,作为单药的化合物B(50nM、100nM或250nM)展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效,集落生长晕为运载体对照的大约59-84％(图9B)。用化合物B(250nM)和曲美替尼(50nM)或用化合物B(100nM或250nM)和曲美替尼(100nM)组合处理2周导致在恢复十天后>90％细胞停滞或将GIST-T1/D816E细胞的集落生长晕根除(如通过5X物镜所观察到)(参见箭头,图9B)。用化合物B(250nM)与曲美替尼(100nM)组合的处理即使在20天的延长的长期恢复之后细胞停滞或细胞杀伤仍得以维持。

[0248] 图9C示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。值得注意的是,作为单药的化合物B(50nM、100nM、250nM)展示出GIST T1/T670I集落生长晕为运载体对照的大约75-78％。用100nM或250nM化合物B与50nM或100nM曲美替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至检测极限(如通过5X物镜所观察到的),在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图9C中的箭头)。即使在没有药物的情况下在20天的延长期之后,生长晕的抑制仍得以维持。

[0249] 实施例17.化合物A与比美替尼的组合处理阻止了GIST-T1、GIST-T1/D816E和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0250] 进行的研究表明,如实施例15中所解释,用化合物A和比美替尼的组合处理阻止了3种GIST细胞系中的集落生长晕。

[0251] 图10A示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1集落数的图示。值得注意的是,伊马替尼和化合物A中的每一种作为单药展示出将GIST T1集落生长晕大约相似地减少至运载体对照的36-41％。评价了用100nM或250nM化合物A和500nM、1uM、2uM或3uM比美替尼组合处理2周的情况。化合物A(100nM或250nM)与比美替尼(2uM或3uM)的组合导致细胞完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图10A中的箭头)。相比之下,用甚至500nM伊马替尼和500nM、1uM、2uM或3uM比美替尼的组合处理2周不会导致在除去组合疗法10天之后肿瘤细胞完全停滞或根除。在没有药物的情况下的延长时间段的孵育之后作用更为明显,其中在用伊马替尼的情况下可见约10-15个集落,而在用化合物A的情况下未观察到集落生长晕。

[0252] 图10B示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,伊马替尼(500nM)和化合物A(100nM或250nM)中的每一种作为单药展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效的缺乏,集落生长晕为运载体对照的60-95％(图10B)。评价了用化合物A(100nM或250nM)和比美替尼(500nM、1uM、2uM或3uM)组合处理2周的情况。化合物A(100nM或250nM)与比美替尼(3uM)的组合导致在十天恢复后细胞完全停

滞或将GIST-T1/D816E细胞的集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限(参见箭头,图10B),然而用伊马替尼(500nM)和比美替尼(500nM、1uM、2uM或3uM)组合处理2周不会导致细胞完全停滞或肿瘤细胞根除。在延长时间段的孵育之后作用更为明显,其中伊马替尼处理未导致完全抑制,然而化合物A即使在20天之后仍显示出细胞停滞或细胞杀伤得以维持。

[0253] 图10C示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。值得注意的是,伊马替尼(500nM)作为单药不会显示出集落的任何减少,然而化合物A(100nM或250nM)作为单药展示出将集落生长晕剂量依赖性地减少至运载体对照的约78-89%。用250nM化合物A与1uM、2uM或3uM比美替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测的集落(注意图10C中的箭头)。用100nM化合物A与3uM比美替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图10C中的箭头)。即使在药物去除后20天的延长期之后,细胞的停滞仍得以维持。相比之下,用500nM伊马替尼与500nM、1uM、2uM或3uM比美替尼组合处理2周未导致在除去组合疗法10天之后肿瘤细胞完全停滞或肿瘤细胞根除。

[0254] 实施例18.化合物B与比美替尼的组合处理阻止了GIST-T1、GIST-T1/D816E和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0255] 进行的研究表明,如实施例15中所解释,用化合物B和比美替尼的组合处理阻止了3种GIST细胞系中的集落生长晕。

[0256] 图11A示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1集落数的图示。值得注意的是,化合物B作为单药的每个浓度都展示出将GIST T1集落生长晕大约相似地减少至运载体对照的27-31%。用250nM化合物B和2uM或3uM比美替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至检测极限(如通过5X物镜所观察到的),在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图11A中的箭头),并且即使在20天的延长的长期恢复之后仍维持显著的细胞停滞或对GIST-T1细胞的细胞杀伤(图11A右上图)。用100nM化合物B和3uM比美替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图11A中的箭头)。

[0257] 图11B示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,化合物B(100nM或250nM)作为单药展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效的大约相似的缺乏,集落生长晕为运载体对照的74-83%(图11B)。用100nM或250nM化合物B和2uM或3uM比美替尼组合处理2周导致在恢复十天后细胞完全停滞或将GIST-T1/D816E细胞的集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限(参见箭头,图11B)。即使在较高浓度的化合物B下在20天的延长期之后细胞停滞仍得以维持。

[0258] 图11C示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。值得注意的是,作为单药的化合物B(100nM或250nM)显示出GIST T1/T670I集落生长晕减少至运载体对照的约72-78%。用100nM或250nM化合物B和3uM比美替尼处理2周出乎意料地导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的

检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图11C中的箭头)。用250nM化合物B和2uM比美替尼处理2周出乎意料地导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图11C中的箭头)。即使在药物去除后20天的延长期之后,细胞的停滞仍得以维持。

[0259] 实施例19.化合物A与考比替尼的组合处理阻止了GIST-T1、GIST-T1/D816E和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0260] 进行的研究表明,如实施例15中所解释,用化合物A和考比替尼的组合处理阻止了3种GIST细胞系中的集落生长晕。

[0261] 图12A示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1集落数的图示。值得注意的是,伊马替尼和化合物A中的每一种作为单药展示出将GIST T1集落生长晕大约相似地减少至运载体对照的18-23%。用250nM化合物A和100nM、200nM或500nM考比替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图12A中的箭头)。用100nM化合物A和500nM考比替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图12A中的箭头)。相比之下,用500nM伊马替尼和100nM、200nM或500nM考比替尼组合处理2周未导致在除去组合疗法10天之后肿瘤细胞完全停滞或根除。

[0262] 在延长时间段的孵育之后效果更为明显,其中在用500nM伊马替尼的情况下中生长出约10-15个集落,并且在500nM化合物A和500nM考比替尼的情况下没有观察到集落生长晕。

[0263] 图12B示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,伊马替尼(500nM)和化合物A(100nM或250nM)中的每一种作为单药展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效的大约相似的缺乏,集落生长晕为运载体对照的65-74%(图12B)。用化合物A(250nM)和考比替尼(100nM、200nM或500nM)组合处理2周导致在十天恢复后细胞完全停滞或将GIST-T1/D816E细胞的集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限(参见箭头,图12B),然而用伊马替尼(500nM)和考比替尼(100nM、200nM或500nM)组合处理2周不会导致细胞完全停滞或肿瘤细胞根除。在延长时间段的孵育之后作用更为明显,其中伊马替尼处理未导致完全抑制,然而化合物A即使在药物去除后20天之后仍显示出显著的细胞停滞或细胞杀伤得以维持。

[0264] 图12C示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。用50nM或100nM化合物A与考比替尼(200nM或500nM)组合处理2周出乎意料地导致对GIST T1/T670I集落生长晕的抑制>99%,如通过5X物镜可视化的(注意图12C中的箭头)。即使在药物去除后20天的延长期之后,细胞的停滞仍得以维持。相比之下,用500nM伊马替尼与高达500nM考比替尼组合处理2周未导致在除去组合疗法10天之后稳健的细胞停滞或细胞根除。

[0265] 实施例20.化合物B与考比替尼的组合处理阻止了GIST-T1、GIST-T1/D816E和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0266] 进行的研究表明,如实施例15中所解释,用化合物B和考比替尼的组合处理阻止了3种GIST细胞系中的集落生长晕。

[0267] 图13A示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1集落数的图示。值得注意的是,化合物B作为单药展示出将GIST T1集落生长晕大约相似地减少至运载体对照的42-54%。用50nM、100nM或250nM化合物B和200nM或500nM考比替尼组合处理2周导致细胞完全停滞或接近完全停滞或将GIST T1集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图13A中的箭头)。用100nM或250nM化合物B和200nM或500nM考比替尼组合处理2周,即使在20天的延长的长期恢复之后,显著的细胞停滞或对GIST-T1细胞的细胞杀伤仍得以维持。

[0268] 图13B示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,作为单药的化合物B(100nM或250nM)展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效的缺乏,集落生长晕为运载体对照的大约58-84%(图13B)。用50nM、100nM或250nM化合物B和200nM或500nM考比替尼组合处理2周导致在恢复十天后GIST-T1/D816E细胞的集落生长晕的抑制>90%,如通过5X物镜可视化的(参见箭头,图13B)。即使在较高浓度的化合物B下在20天的延长期之后,细胞停滞仍得以显著维持。

[0269] 图13C示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。值得注意的是,作为单药的化合物B(100nM或250nM)显示出GIST T1/T670I集落生长晕减少至运载体对照的约75-78%。用50nM、100nM或250nM化合物B和200nM或500nM考比替尼处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图13C中的箭头)。即使在药物去除后20天的延长期之后,细胞的停滞仍得以维持。

[0270] 实施例21.化合物A与优立替尼的组合处理阻止了GIST-T1、GIST-T1/D816E和GIST-T1/T670I抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0271] 进行的研究表明,如实施例15中所解释,用化合物A和优立替尼的组合处理阻止了3种GIST细胞系中的集落生长晕。

[0272] 图14A示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1集落数的图示。值得注意的是,化合物A作为单药展示出将GIST T1集落生长晕大约相似地减少至运载体对照的37-41%。用50nM、100nM或250nM化合物A和1uM、2uM或3uM优立替尼组合处理2周导致GIST T1集落生长晕显著减少,如通过5X物镜可视化的(注意图14A中的箭头)。

[0273] 图14B示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,化合物A(50nM、100nM或250nM)作为单药展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效的大约相似的缺乏,集落生长晕为运载体对照的81-93%(图14B)。用化合物A(250nM)和优立替尼(2uM或3uM)组合处理2周导致在恢复十天后细胞完全停滞或将GIST-T1/D816E细胞的集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限(参见箭头,图14B)。

[0274] 图14C示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/T670I集落数的图示。用100nM或250nM化合物A与优立替尼(2uM或3uM)组合处理2周出乎意料地导致细胞完全停滞或将GIST T1/T670I集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图14C中的箭头)。即使在药物去除后20天的延长期之后,细胞的停滞仍得以维持。

[0275] 实施例22.化合物B与优立替尼的组合处理阻止了GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞

的集落生长晕。

[0276] 图15示出了各种处理后的代表性培养板的图像和所计数的GIST-T1/D816E集落数的图示。值得注意的是,化合物B(50nM、100nM或250nM)作为单药展示出GIST T1/D816E的杀细胞作用功效的大约相似的缺乏,集落生长晕为运载体对照的52-95%(图15)。用化合物B(250nM)和优立替尼(3uM)组合处理2周导致细胞完全停滞或将GIST T1/D816E集落生长晕根除至如通过5X物镜可视化的检测极限,在除去组合疗法10天之后没有可检测到的集落(注意图15中的箭头)。

[0277] 实施例23.化合物A和ERK抑制剂SCH772984的组合处理阻止了GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0278] 在实施例15中概述的方案可以用于显示化合物A和SCH772984组合在阻止GIST-T1、GIST-T1/T670I和GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕方面的协同作用。

[0279] 实施例24.化合物B和ERK抑制剂SCH772984的组合处理阻止了GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0280] 在实施例15中概述的方案可以用于显示化合物B和SCH772984组合在阻止GIST-T1、GIST-T1/T670I和GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕方面的协同作用。

[0281] 实施例25.化合物A和RAF抑制剂LY3009120的组合处理阻止了GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0282] 在实施例15中概述的方案可以用于显示化合物A和LY3009120组合在阻止GIST-T1、GIST-T1/T670I和GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕方面的协同作用。

[0283] 实施例26.化合物B和RAF抑制剂LY3009120的组合处理阻止了GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0284] 在实施例15中概述的方案可以用于显示化合物B和LY3009120组合在阻止GIST-T1、GIST-T1/T670I和GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕方面的协同作用。

[0285] 实施例27.化合物A和RAF抑制剂达拉非尼的组合处理阻止了GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0286] 在实施例15中概述的方案可以用于显示化合物A和达拉非尼组合在阻止GIST-T1、GIST-T1/T670I和GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕方面的协同作用。

[0287] 实施例28.化合物B和RAF抑制剂达拉非尼的组合处理阻止了GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕。

[0288] 在实施例15中概述的方案可以用于显示化合物B和达拉非尼组合在阻止GIST-T1、GIST-T1/T670I和GIST-T1/D816E抗伊马替尼细胞的集落生长晕方面的协同作用。

[0289] 实施例29.组合处理诱导N-ras G12D转染的GIST-T1细胞的凋亡

[0290] 进行的研究表明,化合物A和曲美替尼的组合处理诱导了在空载体对照(EV)和突变N-ras G12D转染的GIST-T1细胞的凋亡。对于载体对照或N-ras G12D转染的GIST-T1细胞,在每个孔中接种有10,000个细胞的96孔板中进行测定。用运载体对照、化合物A、曲美替尼或其组合以不同的浓度处理细胞,并且使细胞生长48小时。通过测量胱天蛋白酶3/7活性来评估凋亡。

[0291] 图16A提供了在各种处理之后胱天蛋白酶活性测量的图示。与用单药化合物A或曲美替尼处理的细胞相比,用50nM化合物A和曲美替尼(50nM或100nM)组合处理48小时诱导的

突变N-ras G12D转染的GIST-T1细胞的凋亡增加。

[0292] 实施例30.组合处理阻止了N-ras G12D转染的GIST-T1细胞的集落生长晕

[0293] 进行的研究表明,化合物A和曲美替尼的组合处理阻止了空载体对照和突变N-ras G12D转染的GIST-T1细胞的抗性集落生长晕。在每个孔中接种有100个细胞的6孔板中进行测定。用运载体对照、50nM化合物A、50nM或100nM曲美替尼、或其组合处理细胞,并将细胞培养2周。在同一实验中,用运载体对照、100nM伊马替尼、50nM或100nM曲美替尼、或其组合处理细胞。在2周之后,洗去药物,并将细胞在正常培养基中培养1-3周。将集落用结晶紫染色,并计数。

[0294] 图16B示出了代表性培养板的图像,并且图16C示出了在各种处理后所计数的载体对照(图16B.1)和突变N-ras G12D(图16B.2)转染的GIST-T1集落数的图示。载体对照和N-ras G12D转染的GIST T-1细胞的集落生长晕的定量分别如图16C.1和图16C.2所示。100nM伊马替尼和50nM曲美替尼的组合处理导致集落生长晕(运载体对照的35%),并且100nM伊马替尼与100nM曲美替尼的组合也导致集落生长晕(运载体的19%)。相比之下,与伊马替尼组合相比,化合物A与曲美替尼的组合出乎意料地导致更优异的细胞停滞或细胞杀伤。用50nM化合物A和50nM曲美替尼组合处理2周导致细胞几乎完全停滞或细胞杀伤(运载体对照的2%),并且50nM化合物A与100nM曲美替尼的组合导致在药物洗去和恢复十天后细胞完全停滞(运载体对照集落生长晕的0%)或细胞杀伤至如通过5X物镜可视化的检测极限(参见箭头,图16C.2)。

[0295] 图16D示出了在延长的无药物恢复期后所计数的突变N-ras G12D转染的GIST-T1集落数的代表性培养板的图像。用100nM化合物A和50nM或100nM曲美替尼组合处理2周导致在21天的延长长期恢复期之后对N-ras G12D转染的GIST-T1细胞集落生长晕的几乎完全阻断。

[0296] 实施例32.组合处理阻止了抗药性GIST细胞的集落生长晕。

[0297] 在用致癌的KIT V560D突变体转化的Ba/F3细胞中进行了饱和诱变研究。通过N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)诱导DNA切口持续18小时,以随机方式在KIT基因或其他基因中产生另外的突变。在每个孔中接种有100个细胞的6孔板中进行测定。在洗去ENU之后,将孔与100nM或250nM或500nM伊马替尼、100nM或250nM或500nM伊马替尼与10nM曲美替尼、25nM或100nM或250nM化合物A的组合、或者25nM、100nM或250nM化合物A与10nM曲美替尼的的组合一起孵育。展现出对药物处理的抗性的孔表现出Ba/F3细胞的生长晕。对这些细胞进行KIT基因的PCR和测序,以确定是否存在由ENU处理诱导的抗性二级突变。

[0298] 图17A是展示对伊马替尼具有抗性的Ba/F3集落生长的图示。通过对暴露于100nM、250nM或500nM伊马替尼(作为单药)的Ba/F3细胞中的基因组DNA进行PCR和DNA测序,鉴定出T670I、K807E和/或D816V抗伊马替尼的二级KIT突变体(图17A,左图)。图17A(右图)是使用化合物A进行Ba/F3细胞饱和诱变研究的图示。用25nM、100nM或250nM化合物A进行单药处理未导致任何新的二级抗性突变的生长晕,如通过PCR和DNA测序所确定。只有含有原始V560D(亲本)KIT突变的Ba/F3细胞在暴露于化合物A之后显示生长,这可能反映了除KIT以外的基因的突变(图17A,右图)。图17B是展示在曲美替尼的存在下用伊马替尼或者在曲美替尼的存在下用化合物A的Ba/F3细胞集落生长晕的图示。250nM或500nM的伊马替尼与10nM曲美替尼的组合未导致任何新的二级抗性突变的生长晕,但确实导致了原始KIT V560D(亲本)细

胞的生长晕,这可能反映了除KIT以外的基因的突变(图17B,左图)。重要地,并且与伊马替尼与曲美替尼的组合研究相比,25、100或250nM化合物A与10nM曲美替尼的组合导致细胞完全停滞或细胞杀伤,在任何孔中没有细胞生长晕,达到如通过视觉检查所确定的检测极限(图17B,右图)。

[0299] 实施例33.化合物A与曲美替尼组合的体内异种移植研究。

[0300] GIST T1异种移植模型的执行符合美国国立卫生研究院(NIH)的所有法律、法规和准则并且获得了AAALAC认证机构MI Bioresearch(Ann Arbor,MI)的动物护理和使用委员会的批准。所有小鼠自由进食和饮水。每天至少观察一次所有小鼠的临床体征。使用27号规格针头和注射器,向雌性Envigo裸鼠(HsdCrl:Athymic Nude-NU-Foxn1nu;6-7周龄)在右高腋窝下方皮下接种在混合有等体积Matrigel的杜尔贝克(Dulbecco)磷酸盐缓冲盐水中的五百万个细胞。当肿瘤负荷在第10天达到平均117mm^3时,将小鼠随机分配到各组,使得所有组的平均肿瘤负荷都在研究群体的总体平均肿瘤负荷的10%以内。在第10-27天如下对各组进行治疗:运载体对照饮食(n=10);将化合物A配制成小鼠饮食,以实现大约100mg/kg/天的化合物A(n=10);或将化合物A配制成小鼠饮食,以实现大约25mg/kg/天的化合物A(n=10),以0.5mg/kg BID口服给药曲美替尼并饲喂运载体对照饮食(n=10),以0.5mg/kg BID口服给药曲美替尼并饲喂化合物A配制的饮食(实现用大约100mg/kg/天的化合物进行治疗)(n=10),或以0.5mg/kg BID口服给予曲美替尼并饲喂化合物A配制的饮食(实现用大约25mg/kg/天的化合物进行治疗)(n=10)。在第27天,将所有动物置于对照饮食中以监测肿瘤再生长。每周测量三次肿瘤体积和体重。由卡尺测量通过以下公式估算肿瘤负荷(mg):肿瘤负荷(mg=mm^3)=(长度x宽度^2)/2。

[0301] 图18A和18B是展示与运载体对照相比对肿瘤生长的抑制的图示。图18B是与图18A相同的数据,但被放大以显示化合物A或化合物A/曲美替尼治疗的群组之间的差异。与运载体对照相比,用曲美替尼治疗导致轻微的肿瘤生长抑制。在高剂量的化合物A(大约100mg/kg/天)下,在给药期间10只小鼠中有6只具有完全肿瘤消退,其余4只小鼠具有部分肿瘤消退。在低剂量的化合物A(大约25mg/kg/天)下,10只小鼠中有2只具有完全肿瘤消退,并且10小鼠中有6只具有部分肿瘤消退。在高剂量的化合物A(大约100mg/kg/天)组合曲美替尼的情况下,在给药期间10只小鼠中有10只都具有完全肿瘤消退。在低剂量的化合物A(大约25mg/kg/天)组合曲美替尼的情况下,10只小鼠中有5只具有完全肿瘤消退,并且10只中有5只具有部分肿瘤消退。另外,在给药期之后,所有化合物A治疗的群组具有比运载体对照的初始肿瘤生长更慢的肿瘤再生长,表明直到第66天研究结束对肿瘤细胞生长的延长作用。在研究结束时,在高剂量的化合物A(大约100mg/kg/天)下,10只小鼠中有1只保持部分肿瘤消退。在研究结束时,在低剂量的化合物A(大约25mg/kg/天)下,10只小鼠中有2只保持部分肿瘤消退。在研究结束时,在高剂量的化合物A(大约100mg/kg/天)与曲美替尼组合的情况下,10只小鼠中有1只保持完全肿瘤消退,并且10只小鼠中有4只保持部分肿瘤消退。在研究结束时,在低剂量的化合物A(大约25mg/kg/天)与曲美替尼组合的情况下,10只小鼠中有2只保持部分肿瘤消退。这些数据表明,化合物A和曲美替尼的组合在给药完成之后至少40天诱导细胞死亡和/或细胞停滞延长。

[0302] 实施例34.化合物A是BCRP外排转运蛋白的有效抑制剂。

[0303] 为了检查化合物A对BCRP药物外排转运蛋白的抑制,使用低渗透性探针底物和由

表达BCRP的细胞在ATP的存在下制备的由内而外的膜囊泡进行了囊泡转运抑制测定。测量了化合物A改变含转运蛋白的囊泡对探针底物的摄取的潜力。

[0304] 在囊泡转运抑制测定中以7种浓度研究了化合物A与人外排转运蛋白BCRP的体外相互作用潜力。化合物A有效地抑制了BCRP的探针底物的转运,其中在最低测试浓度(0.04μM)下观察到44%的抑制。IC50值被估算为大约0.04μM。

[0305] 等同物

[0306] 仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到或能够确定本公开中具体描述的具体实施方案的许多等同物。此类等同物旨在被涵盖在以下权利要求书的范围内。

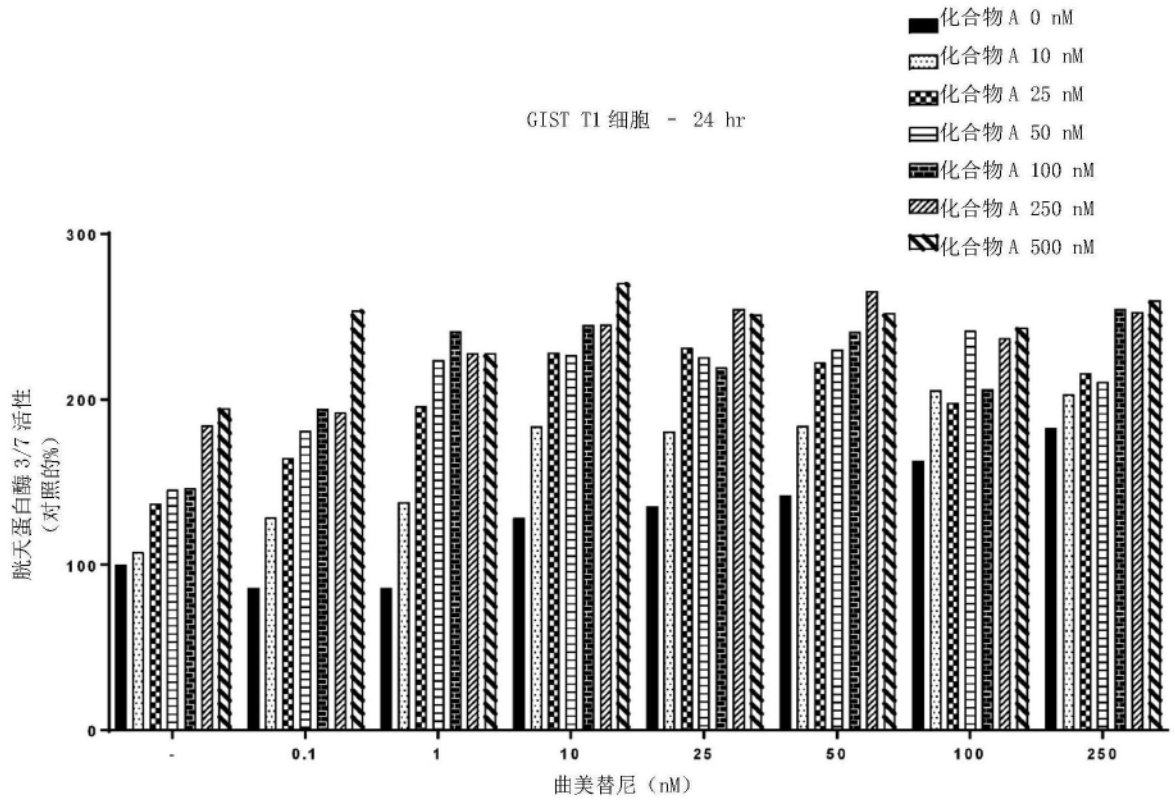


图1A

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 250nM	化合物 A 500nM
曲美替尼 0.1nM	0.41635	0.20181	0.18684	0.19377	0.53669	0.01446
曲美替尼 1nM	0.32337	0.04483	0.01746	0.00975	0.06517	0.13033
曲美替尼 10nM	0.04689	0.00672	0.01463	0.00706	0.01761	0.0012
曲美替尼 25nM	0.08445	0.00557	0.01592	0.0473	0.00679	0.01911
曲美替尼 50nM	0.1024	0.01154	0.01213	0.01019	0.00149	0.01747
曲美替尼 100nM	0.03211	0.0835	0.00501	0.12226	0.03448	0.0413
曲美替尼 250nM	0.07868	0.03424	0.07228	0.00273	0.00836	0.007

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

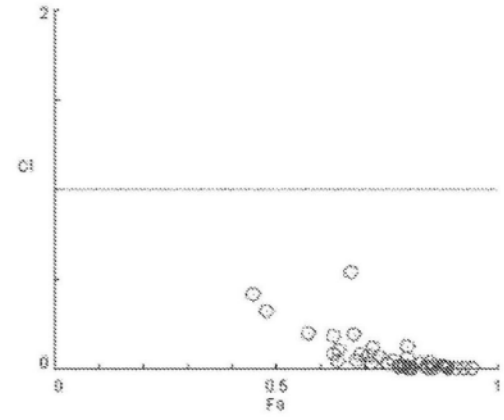


图1B

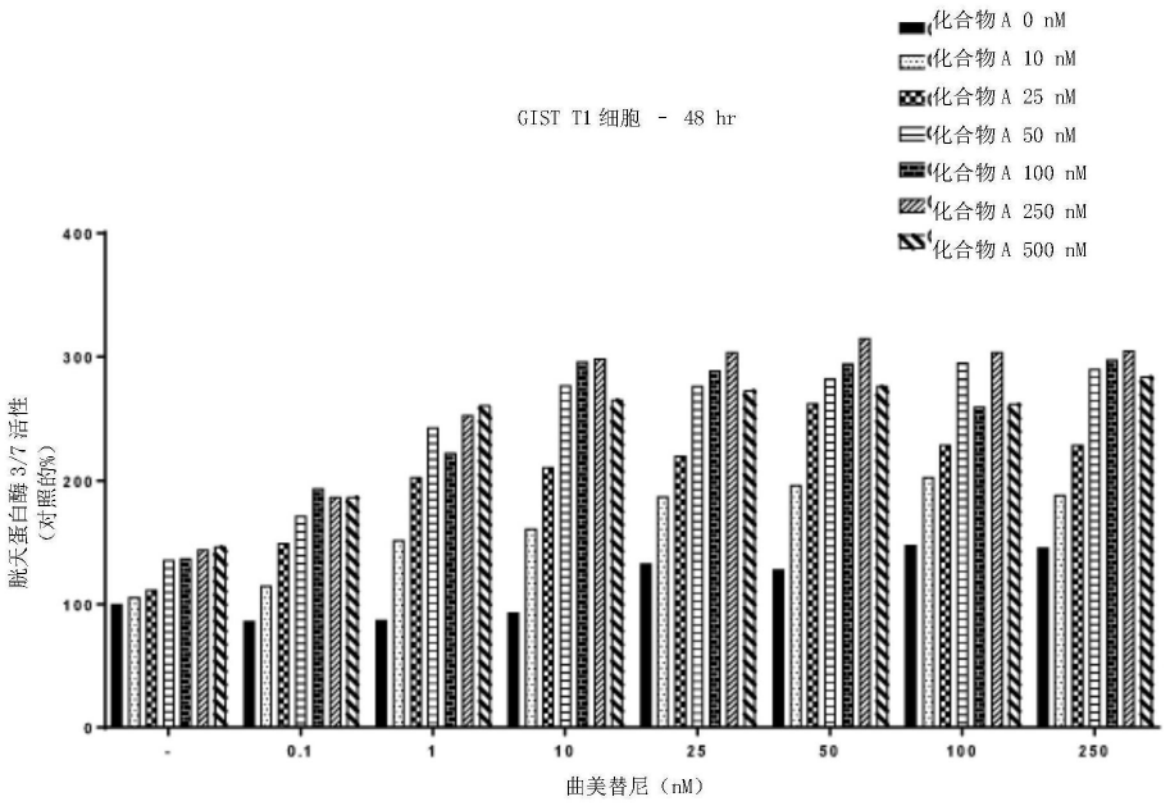


图1C

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 250nM	化合物 A 500nM
曲美替尼 0.1nM	0.544	0.06109	0.01804	0.00494	0.02246	0.04491
曲美替尼 1nM	0.02154	5.23E-04	1.55E-05	3.09E-04	2.10E-05	1.29E-05
曲美替尼 10nM	0.01666	2.97E-04	7.82E-08	9.90E-10	9.00E-10	6.44E-06
曲美替尼 25nM	0.0022	1.33E-04	8.55E-08	9.57E-09	5.70E-11	1.63E-06
曲美替尼 50nM	0.00133	6.05E-07	2.55E-08	1.79E-09	1.10E-21	8.28E-07
曲美替尼 100nM	0.00116	8.38E-05	7.50E-10	3.55E-06	5.70E-11	1.09E-05
曲美替尼 250nM	0.01223	1.51E-04	4.04E-09	5.00E-10	3.10E-11	1.69E-07

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

组合索引图

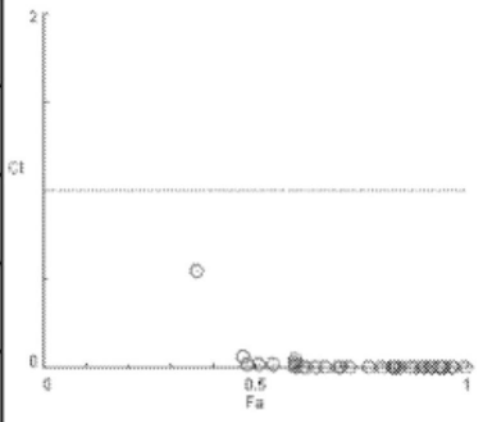


图1D

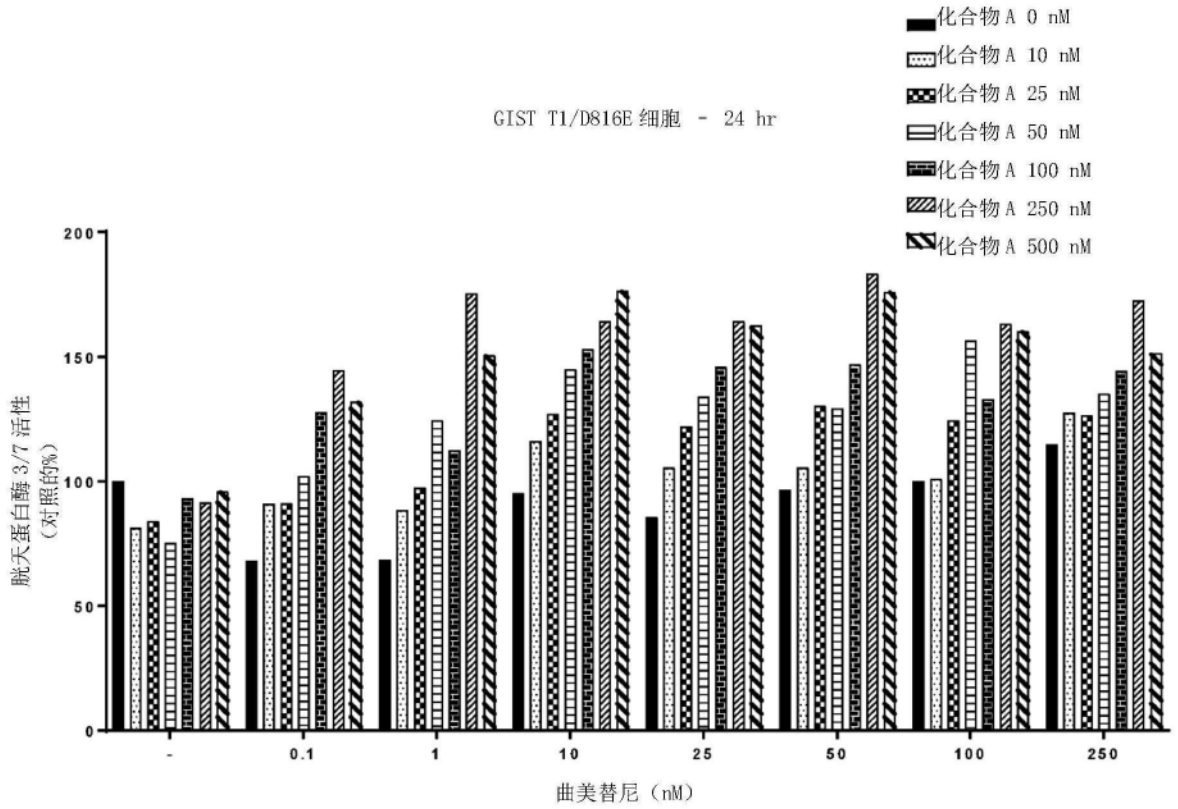


图1E

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI 索引	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 250nM	化合物 A 500nM
曲美替尼 0.1nM	0.05427	0.11928	0.0195	0.000143	8.28E-06	0.000253
曲美替尼 1nM	0.18113	0.0469	0.02853	0.00535	7.11E-08	8.34E-06
曲美替尼 10nM	0.01105	0.00199	0.000117	3.21E-05	5.07E-06	5.61E-07
曲美替尼 25nM	0.14462	0.01078	0.00166	0.000258	1.26E-05	1.64E-05
曲美替尼 50nM	0.28757	0.00592	0.00668	0.000438	7.57E-07	2.91E-06
曲美替尼 100nM	1.18272	0.02898	0.000185	0.00772	5.94E-05	9.92E-05
曲美替尼 250nM	0.04532	0.05299	0.01351	0.00313	0.000029	0.00106

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

组合索引图

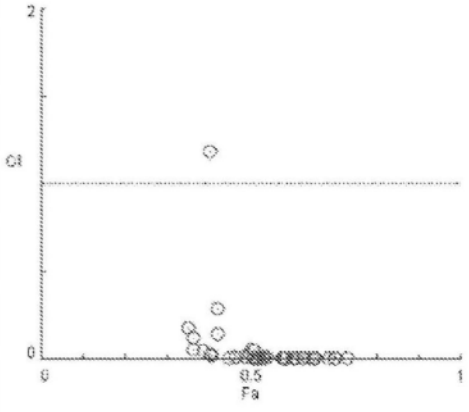


图1F

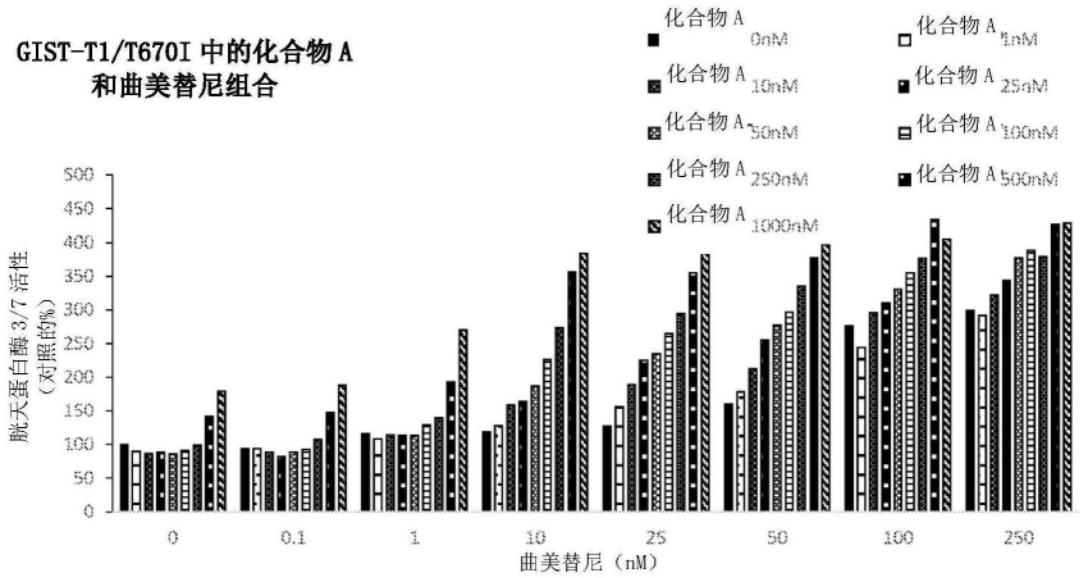


图1G

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 250nM	化合物 A 500nM	化合物 A 1000nM
曲美替尼 1 nM	0.89607	1.05715	1.20054	0.54408	0.42371	0.03244	0.00155
曲美替尼 10 nM	1.04701	0.8501	0.32966	0.07514	0.0131	5.13E-04	1.32E-04
曲美替尼 25 nM	0.74569	0.19466	0.13966	0.04476	0.01521	0.00128	3.14E-04
曲美替尼 50 nM	0.63181	0.12923	0.05747	0.02767	0.00618	8.94E-04	3.39E-04
曲美替尼 100 nM	0.0564	0.03232	0.01456	0.00513	0.00183	5.78E-05	4.17E-04
曲美替尼 250 nM	0.05133	0.02117	0.00447	0.00255	0.00425	2.46E-04	2.20E-04

组合索引图

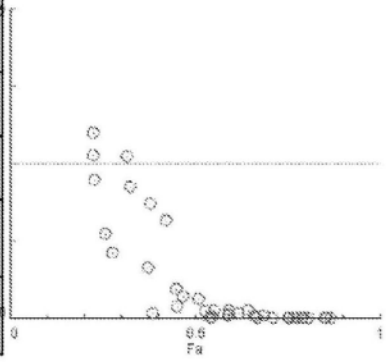


图1H

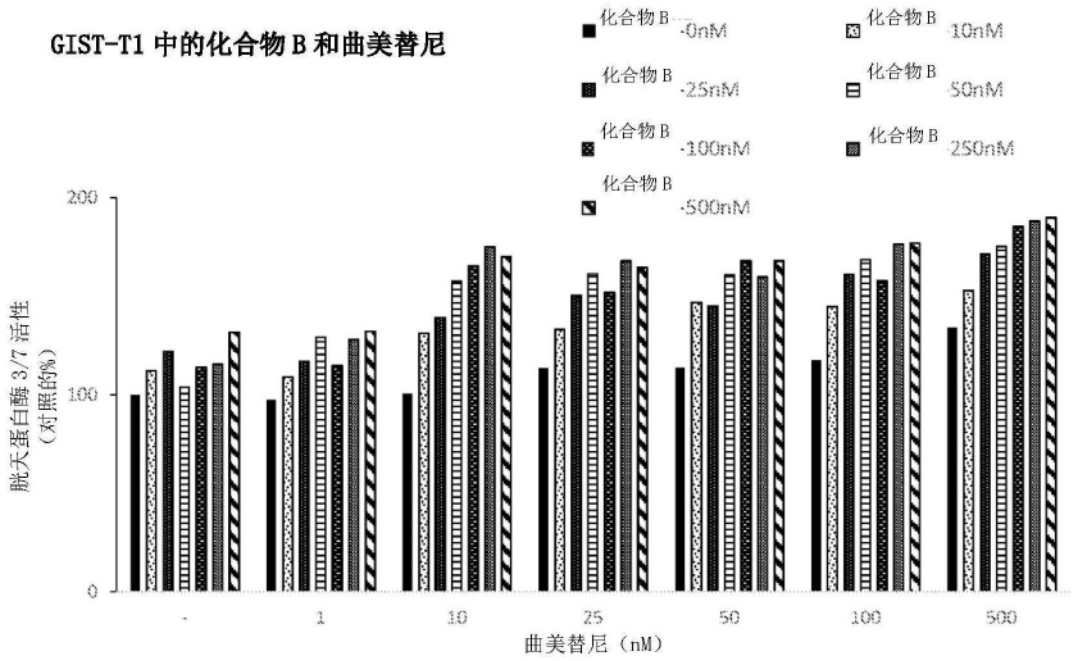


图2A

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI 索引	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 250nM	化合物 B 500nM
曲美替尼 1nm	1.39845	0.30024	0.01632	2.30138	0.10126	0.064
曲美替尼 10nm	0.02443	0.00825	6.55E-04	2.14E-04	4.87E-05	1.10E-04
曲美替尼 25nm	0.04489	0.00449	9.92E-04	0.00355	3.69E-04	5.99E-04
曲美替尼 50nm	0.014	0.0184	0.00206	7.38E-04	0.00246	7.39E-04
曲美替尼 100nm	0.03929	0.00411	0.00137	0.00631	4.00E-04	3.70E-04
曲美替尼 500nm	0.06136	0.00435	0.00244	4.54E-04	2.94E-04	2.15E-04

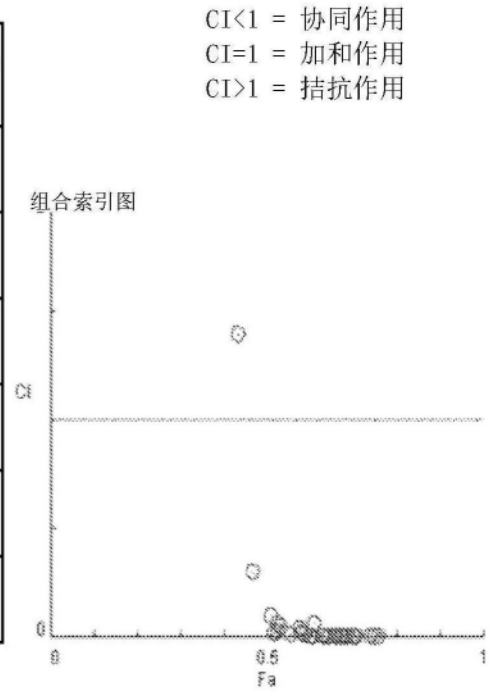


图2B

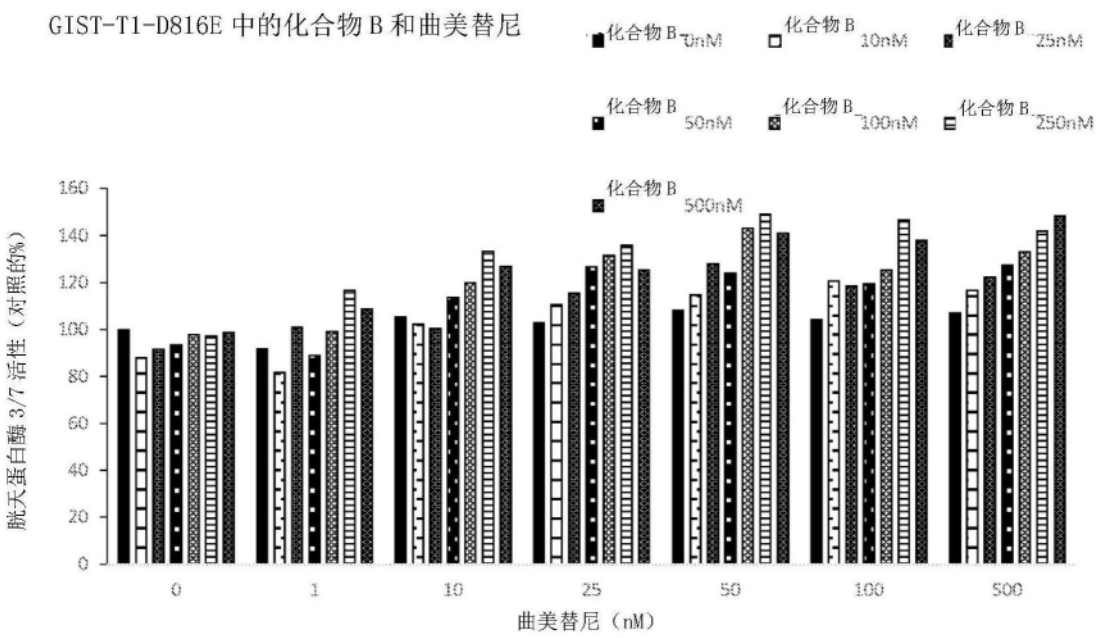


图2C

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 250nM	化合物 B 500nM
曲美替尼 1 nM	665.864	0.12785	26.2251	0.45772	0.00161	0.04969
曲美替尼 10 nM	0.54776	1.20639	0.00454	4.57E-04	6.01E-06	1.07E-04
曲美替尼 25 nM	0.03782	0.0046	4.67E-05	8.93E-06	2.92E-06	2.39E-04
曲美替尼 50 nM	0.01217	4.63E-05	2.61E-04	1.36E-07	2.74E-08	9.66E-07
曲美替尼 100 nM	0.00188	0.00445	0.0033	3.10E-04	8.20E-08	3.44E-06
曲美替尼 500 nM	0.04614	0.00446	5.99E-04	4.82E-05	1.36E-06	1.23E-07

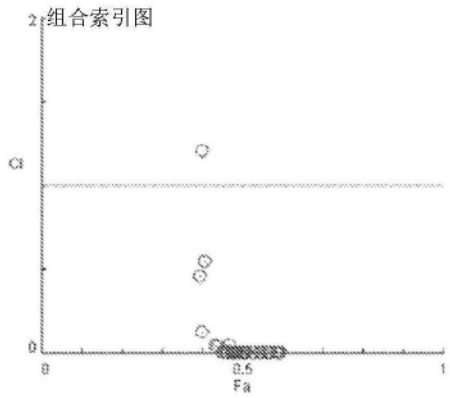


图2D

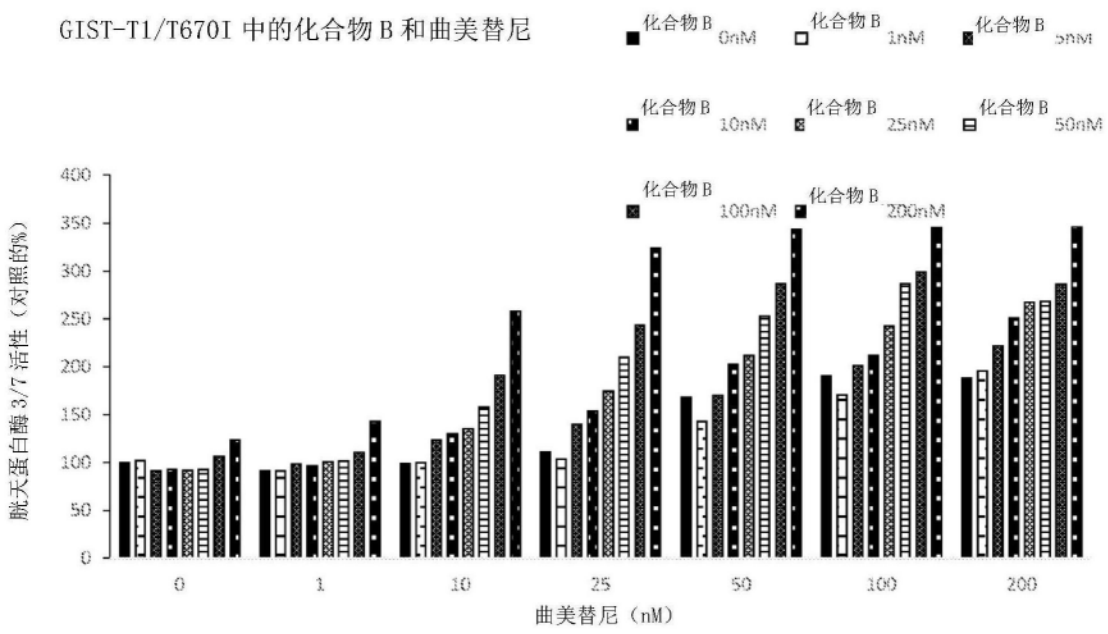


图2E

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 1nM	化合物 B 5nM	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 200nM
曲美替尼 1 nM	1.14152	0.68225	1.61409	0.98075	1.71864	0.29552	0.03118
曲美替尼 10 nM	2.69122	0.75205	0.55106	0.43683	0.16308	0.04278	0.0037
曲美替尼 25 nM	5.2964	0.89005	0.48271	0.20367	0.05226	0.01535	7.67E-04
曲美替尼 50 nM	1.55676	0.48782	0.13831	0.09887	0.02177	0.00642	6.93E-04
曲美替尼 100 nM	0.95619	0.29266	0.19773	0.06368	0.01283	0.00935	0.00127
曲美替尼 200 nM	0.72063	0.27355	0.09362	0.05242	0.04964	0.02614	0.0108

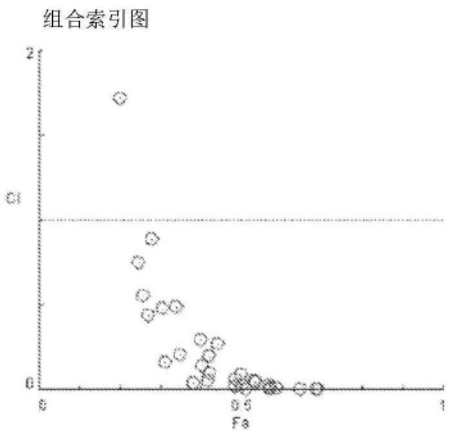


图2F

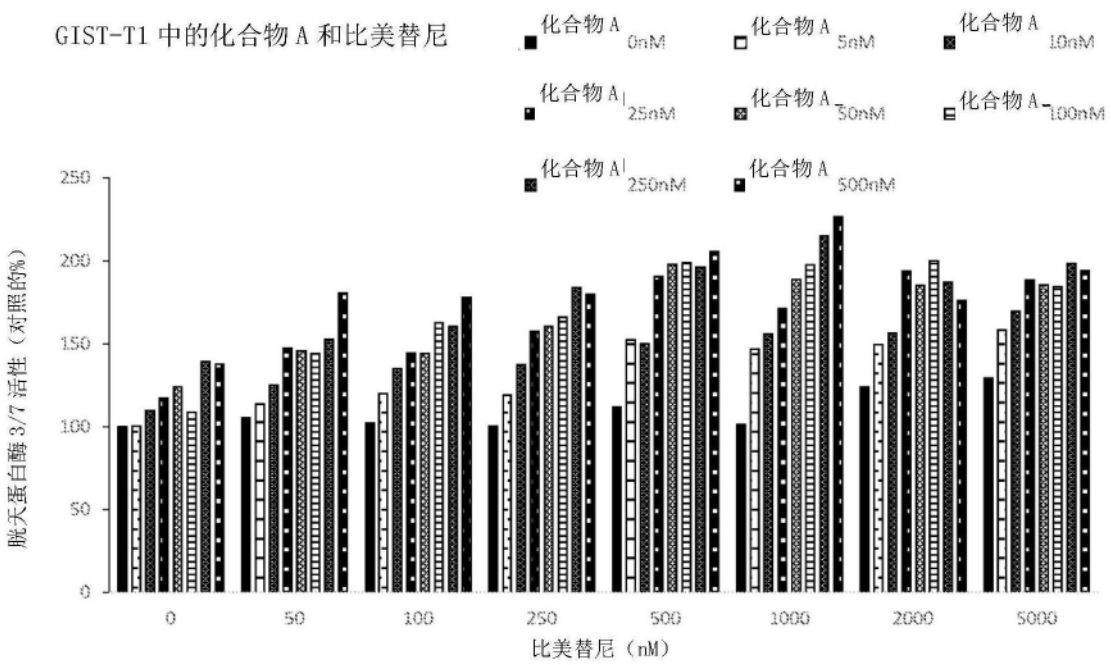


图3A

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 0nM	化合物 A 5nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 250nM
比美替尼 50 nM	0.33162	0.11367	0.01361	0.03539	0.08336	0.05317	0.0021
比美替尼 100 nM	0.13977	0.03047	0.02054	0.04202	0.00686	0.0182	0.00352
比美替尼 250 nM	0.2221	0.00601	0.00355	0.0046	0.00416	5.34E-04	0.00246
比美替尼 500 nM	0.00186	0.00463	2.11E-05	1.03E-05	1.45E-05	5.78E-05	2.16E-05
比美替尼 1000 nM	0.00584	0.0022	4.83E-04	5.74E-05	2.16E-05	9.19E-07	5.62E-08
比美替尼 2000 nM	0.00526	0.00249	1.18E-05	1.11E-04	1.39E-05	3.10E-04	0.00447
比美替尼 5000 nM	0.00224	4.19E-04	3.22E-05	1.09E-04	2.53E-04	3.75E-05	2.22E-04

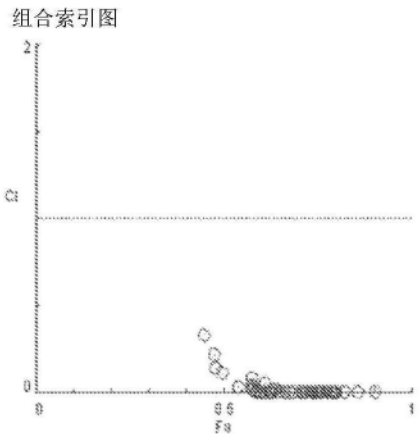


图3B

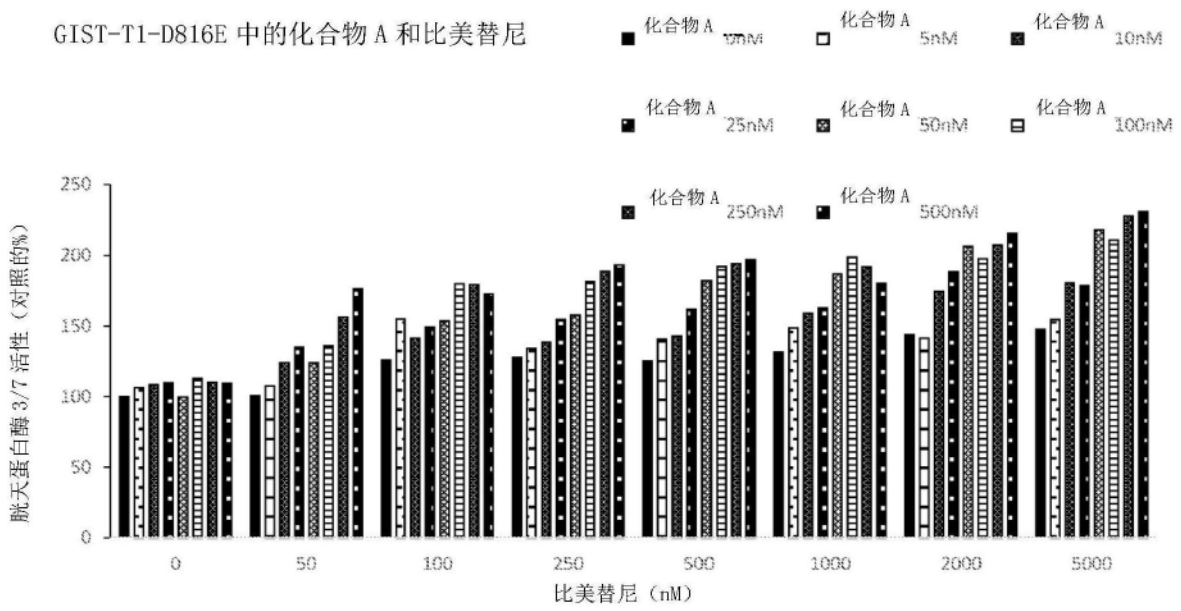


图3C

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 5nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 250nM	化合物 A 500nM
比美替尼 50 nM	1.44226	0.18041	0.04953	0.18041	0.04533	0.00368	2.70E-04
比美替尼 100 nM	0.00887	0.04581	0.018	0.01068	3.28E-04	3.65E-04	9.10E-04
比美替尼 250 nM	0.27864	0.16365	0.02359	0.01571	6.58E-04	2.18E-04	1.05E-04
比美替尼 500 nM	0.25046	0.19724	0.0189	0.00118	2.38E-04	1.70E-04	1.06E-04
比美替尼 1000 nM	0.19128	0.05539	0.03323	0.0011	1.63E-04	5.17E-04	0.00294
比美替尼 2000 nM	0.91612	0.0148	0.00181	7.43E-05	3.72E-04	5.74E-05	8.87E-06
比美替尼 5000 nM	0.4718	0.01468	0.01892	1.25E-05	7.15E-05	6.91E-07	2.20E-07

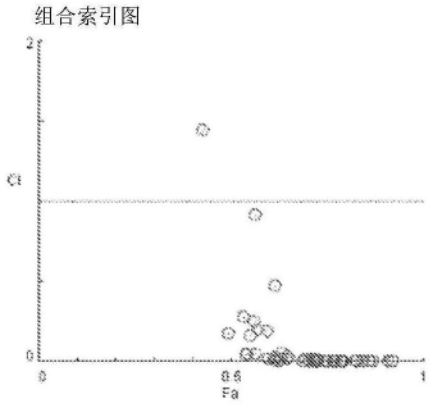


图3D

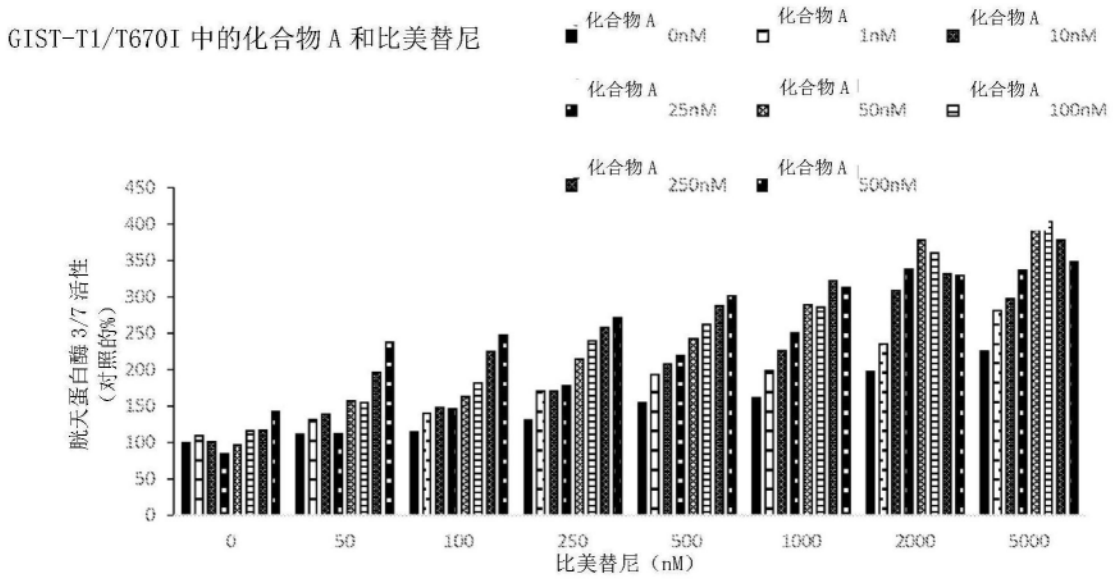


图3E

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 5nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 250nM	化合物 A 500nM
比美替尼 50nM	0.26759	0.19769	0.97922	0.09229	0.1009	0.02216	0.00492
比美替尼 100nM	0.37303	0.26335	0.28329	0.31079	0.07363	0.01588	0.00691
比美替尼 250nM	0.27979	0.27979	0.21379	0.05549	0.02307	0.0121	0.00751
比美替尼 500nM	0.2403	0.14108	0.0946	0.04058	0.02056	0.00922	0.00547
比美替尼 1000nM	0.40206	0.1466	0.06912	0.01474	0.01722	0.00394	0.00588
比美替尼 2000nM	0.21654	0.01366	0.00386	4.15E-04	0.0012	0.00506	0.00572
比美替尼 5000nM	0.10041	0.05372	0.01007	3.42E-04	1.38E-04	0.00104	0.00569

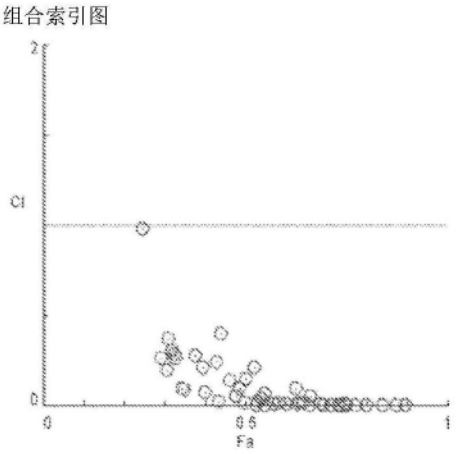


图3F

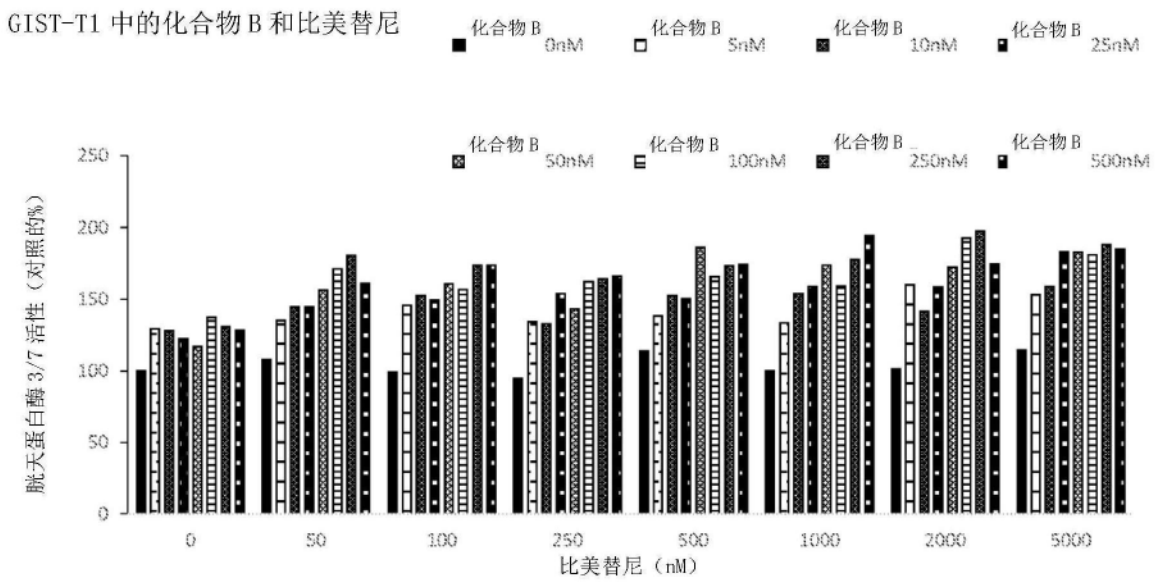


图4A

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 5nM	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 250nM	化合物 B 500nM
比美替尼 50 nM	4.65E-06	1.70E-11	3.20E-11	4.90E-19	7.80E-28	2.00E-34	5.50E-22
比美替尼 100 nM	1.40E-12	4.60E-17	1.40E-14	1.10E-21	3.70E-19	4.30E-29	5.80E-29
比美替尼 250 nM	1.39E-05	1.87E-04	1.80E-17	3.80E-10	4.30E-22	4.00E-23	5.50E-24
比美替尼 500 nM	4.02E-08	5.20E-17	2.20E-17	4.50E-39	1.40E-23	4.00E-28	8.40E-29
比美替尼 1000 nM	4.15E-05	1.80E-17	7.80E-20	5.80E-28	6.50E-20	3.80E-31	4.10E-54
比美替尼 2000 nM	5.10E-20	1.44E-09	3.00E-19	7.20E-27	3.00E-49	7.20E-68	1.80E-28
比美替尼 5000 nM	1.30E-16	4.80E-19	4.90E-35	1.20E-34	5.80E-33	7.00E-41	3.70E-37

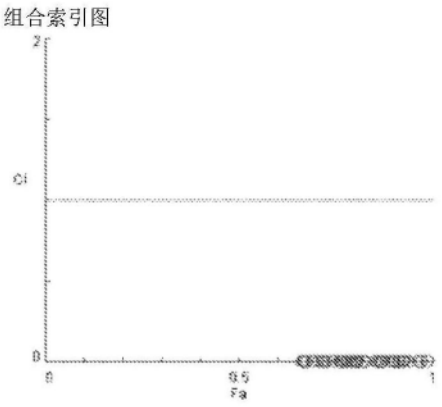


图4B

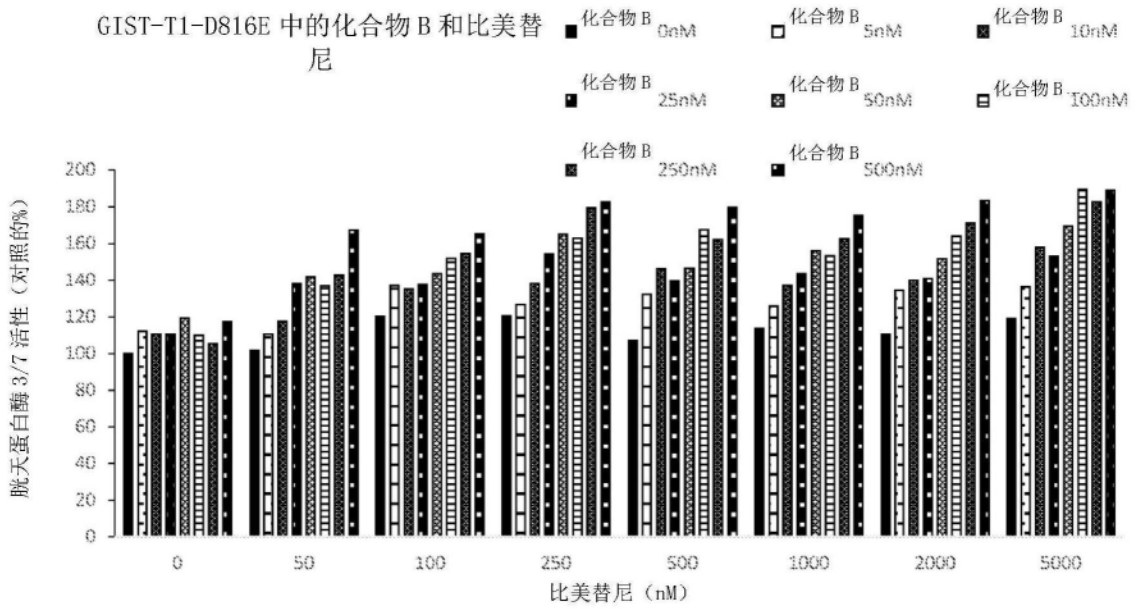


图4C

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 5nM	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 250nM	化合物 B 500nM
比美替尼 50 nM	1606.78	0.00356	9.50E-11	3.40E-12	3.40E-10	1.10E-12	9.80E-25
比美替尼 100 nM	4.70E-10	2.81E-09	2.70E-10	1.20E-12	2.60E-16	1.60E-17	3.10E-23
比美替尼 250 nM	9.63E-06	4.80E-10	3.90E-17	1.00E-22	1.80E-21	6.80E-33	3.20E-36
比美替尼 500 nM	1.64E-07	4.10E-13	3.20E-10	3.30E-13	9.80E-24	1.00E-20	5.80E-33
比美替尼 1000 nM	8.87E-05	4.71E-09	1.20E-11	3.30E-17	5.90E-16	9.50E-21	6.10E-29
比美替尼 2000 nM	9.56E-08	8.80E-10	2.90E-10	6.50E-15	4.00E-21	1.40E-25	5.70E-36
比美替尼 5000 nM	4.83E-08	1.70E-17	4.50E-15	4.00E-24	3.00E-44	6.30E-35	6.30E-43

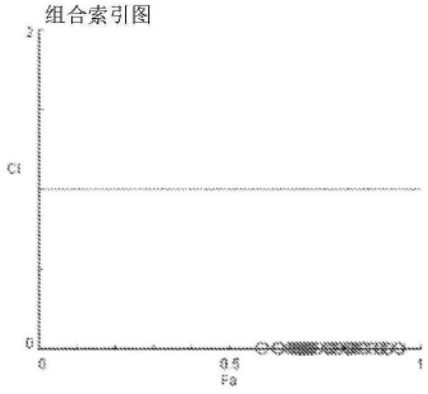


图4D

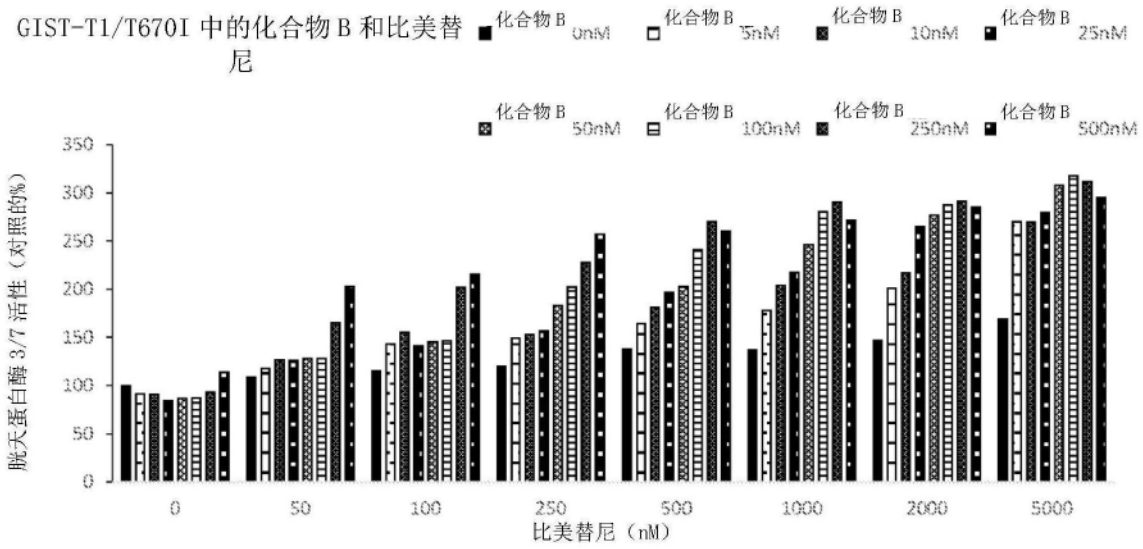


图4E

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 5nM	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 250nM	化合物 B 500nM
比美替尼 50 nM	0.34963	0.16862	0.17353	1.08713	0.15037	0.00828	4.63E-04
比美替尼 100 nM	0.0904	0.03897	0.10661	0.07671	0.06878	0.00101	3.34E-04
比美替尼 250 nM	0.13837	0.10561	0.07858	0.01969	0.00238	3.25E-04	2.35E-05
比美替尼 500 nM	0.0897	0.02509	0.00754	0.00476	1.96E-04	1.17E-05	3.46E-05
比美替尼 1000 nM	0.06371	0.00878	0.00298	2.52E-04	7.39E-06	2.35E-06	2.08E-05
比美替尼 2000 nM	0.02182	0.00631	8.43E-05	2.32E-05	6.49E-06	3.90E-06	8.47E-06
比美替尼 5000 nM	1.21E-04	1.26E-04	4.19E-05	7.69E-07	1.09E-07	3.77E-07	5.71E-06

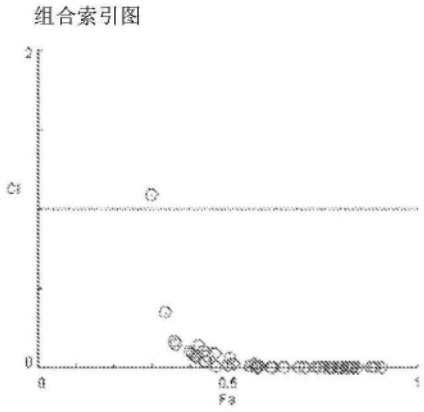


图4F

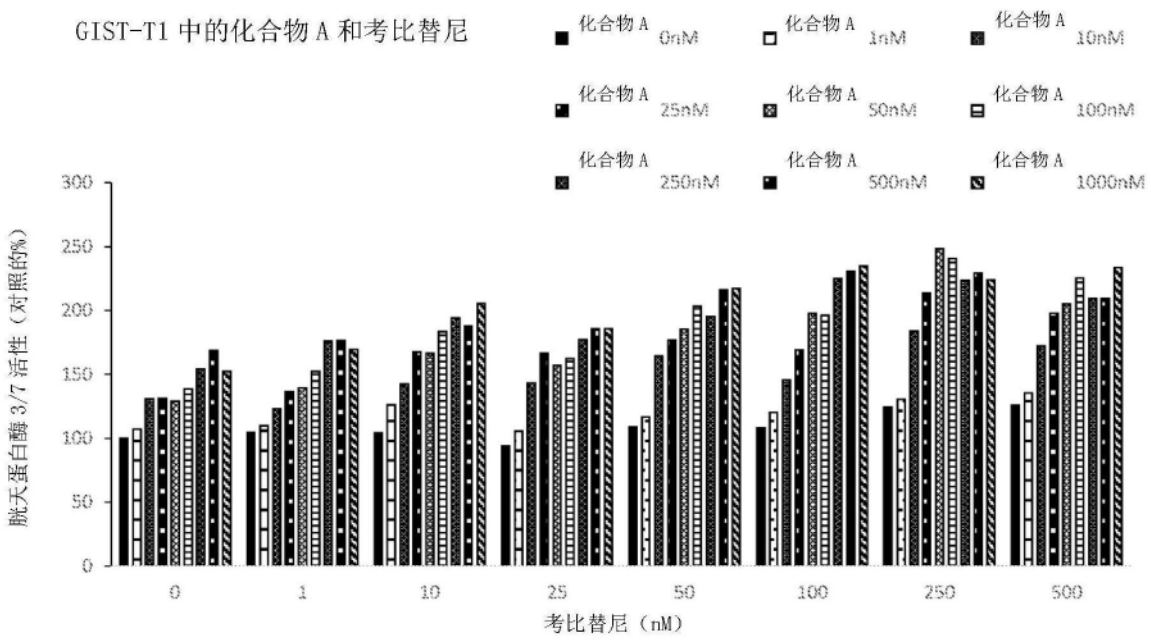


图5A

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 1nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 200nM	化合物 A 500nM	化合物 A 1000nM
考比替尼 1 nM	0.79708	1.31592	0.55315	0.75613	0.30708	0.04872	0.09745	0.42662
考比替尼 10 nM	0.0855	0.0977	0.01338	0.02833	0.00855	0.0069	0.02772	0.00822
考比替尼 25 nM	3.4939	0.09192	0.01338	0.08493	0.0949	0.04362	0.03441	0.06882
考比替尼 50 nM	0.50545	0.00754	0.00461	0.00363	0.00107	0.00621	0.00138	0.00249
考比替尼 100 nM	0.34962	0.0678	0.01067	9.52E-04	0.00223	2.74E-04	3.13E-04	4.17E-04
考比替尼 250 nM	0.08223	8.55E-04	8.95E-05	5.31E-06	2.27E-05	3.37E-04	3.47E-04	0.00122
考比替尼 500 nM	0.04575	0.00305	4.76E-04	4.33E-04	1.04E-04	0.00135	0.00271	4.62E-04

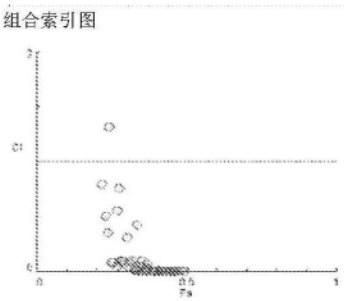


图5B

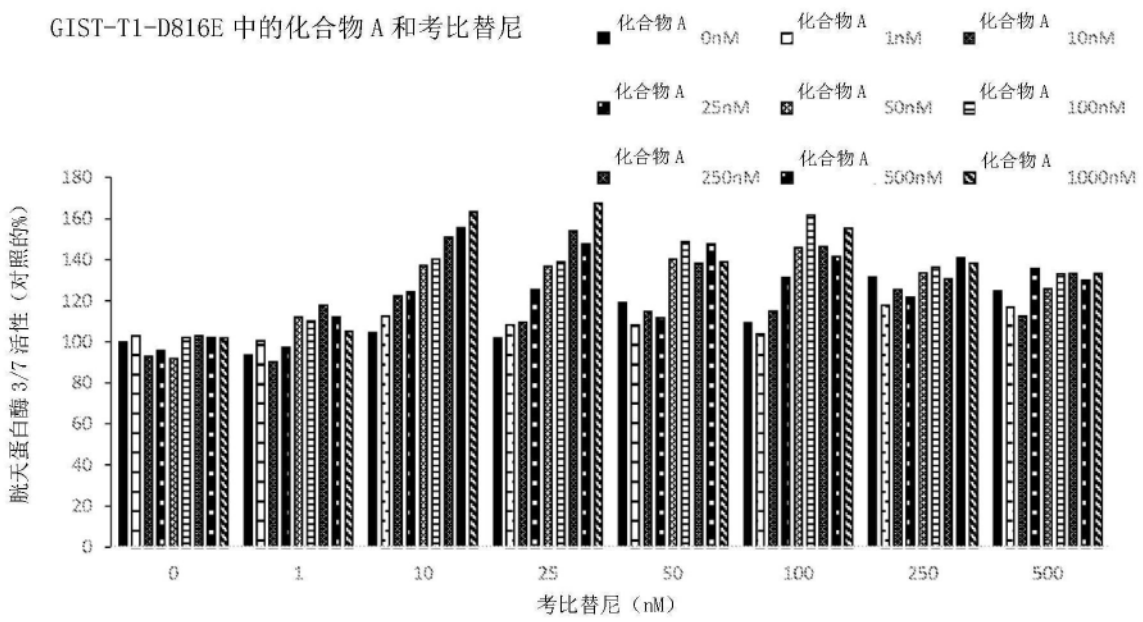


图5C

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 1nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 200nM	化合物 A 500nM	化合物 A 1000nM
考比替尼 1 nM	0.18534	438696	4.76549	0.02461	0.03479	0.00915	0.02461	0.08008
考比替尼 10 nM	0.23568	0.04233	0.03138	0.00324	0.00193	3.04E-04	1.35E-04	3.08E-05
考比替尼 25 nM	1.17886	0.94861	0.0607	0.00882	0.00598	4.44E-04	0.00129	3.77E-05
考比替尼 50 nM	2.46263	0.79943	1.28476	0.00963	0.00227	0.01361	0.00259	0.01248
考比替尼 100 nM	10.3649	1.46703	0.09078	0.00705	4.08E-04	0.00675	0.01549	0.00135
考比替尼 250 nM	2.28677	0.60705	1.15264	0.15427	0.09612	0.25807	0.04413	0.06806
考比替尼 500 nM	5.42979	11.784	0.20954	1.11463	0.33621	0.30855	0.56228	0.30855

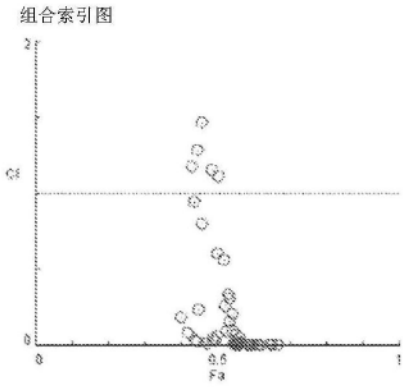


图5D

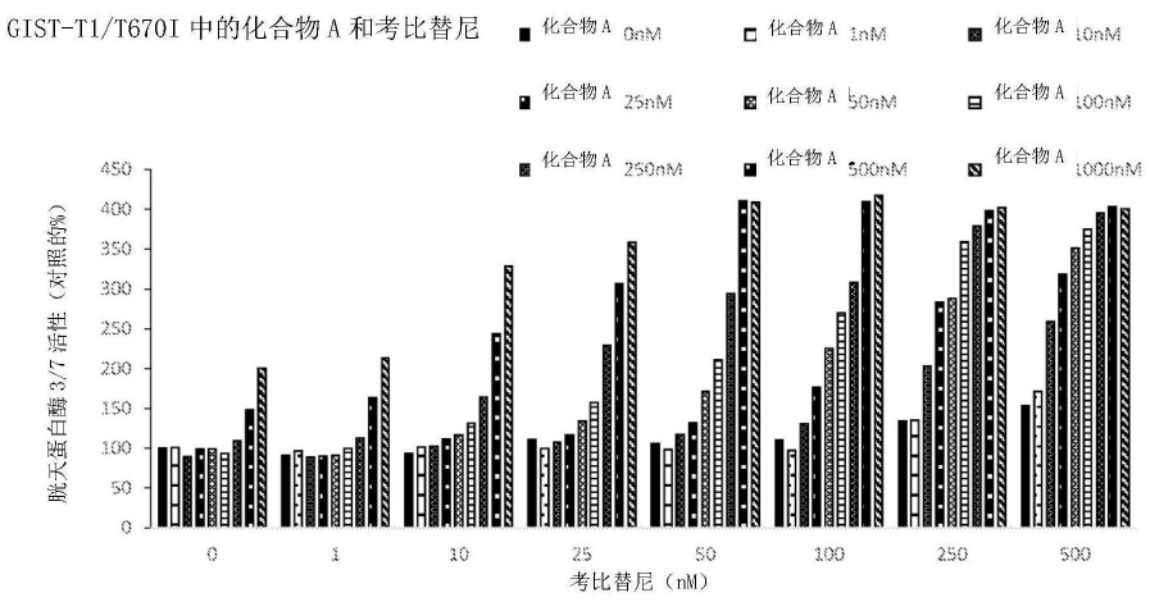


图5E

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 1nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 200nM	化合物 A 500nM	化合物 A 1000nM
考比替尼 1 nM	0.26554	2.67726	5.76653	10.5467	7.71672	4.89163	0.13285	0.0072
考比替尼 10 nM	0.9985	1.33769	0.84391	0.86036	0.39351	0.06559	4.54E-04	2.51E-06
考比替尼 25 nM	2.8673	1.43276	0.75657	0.22264	0.04996	6.46E-04	6.27E-06	2.47E-07
考比替尼 50 nM	6.77934	0.90654	0.2524	0.01232	0.00104	7.27E-06	8.00E-10	1.99E-09
考比替尼 100 nM	16.1737	0.4255	0.00853	2.79E-04	1.89E-05	3.10E-06	9.50E-10	7.40E-10
考比替尼 250 nM	0.62392	0.0019	5.23E-06	4.56E-06	3.00E-08	1.07E-08	3.20E-09	4.13E-09
考比替尼 500 nM	0.04617	5.14E-05	5.56E-07	4.53E-08	1.19E-09	2.52E-09	1.94E-09	5.19E-09

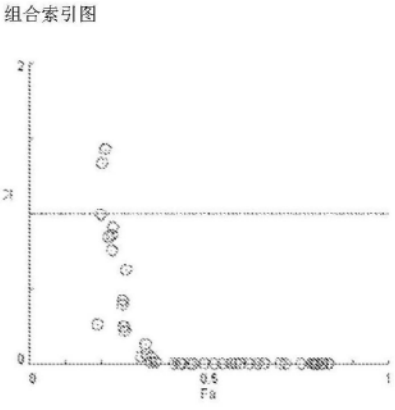


图5F

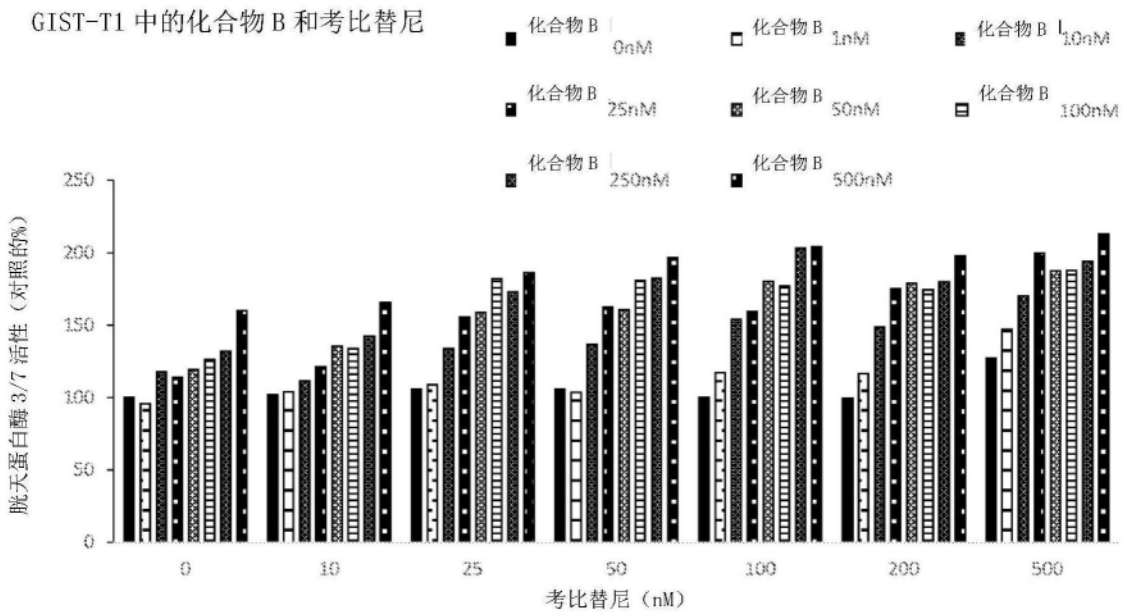


图6A

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 1nM	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 200nM	化合物 B 500nM
考比替尼 10 nM	0.56205	1.23447	0.95172	0.33923	0.8499	0.57466	0.05953
考比替尼 25 nM	0.37301	0.08307	0.01254	0.01607	0.000825	0.00764	0.00181
考比替尼 50 nM	1.76547	0.06105	0.00477	0.01282	0.000975	0.00158	0.0002
考比替尼 100 nM	0.17549	0.00644	0.0073	0.000551	0.00193	1.34E-05	2.54E-05
考比替尼 200 nM	0.3168	0.01266	0.000656	0.000703	0.00317	0.00249	0.000126
考比替尼 500 nM	0.00186	0.000613	4.14E-06	0.000144	0.000251	0.000131	8.3E-07

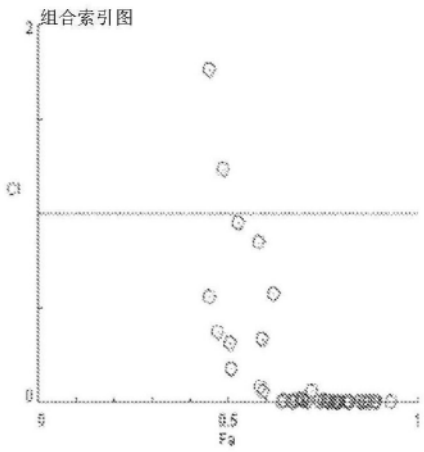


图6B

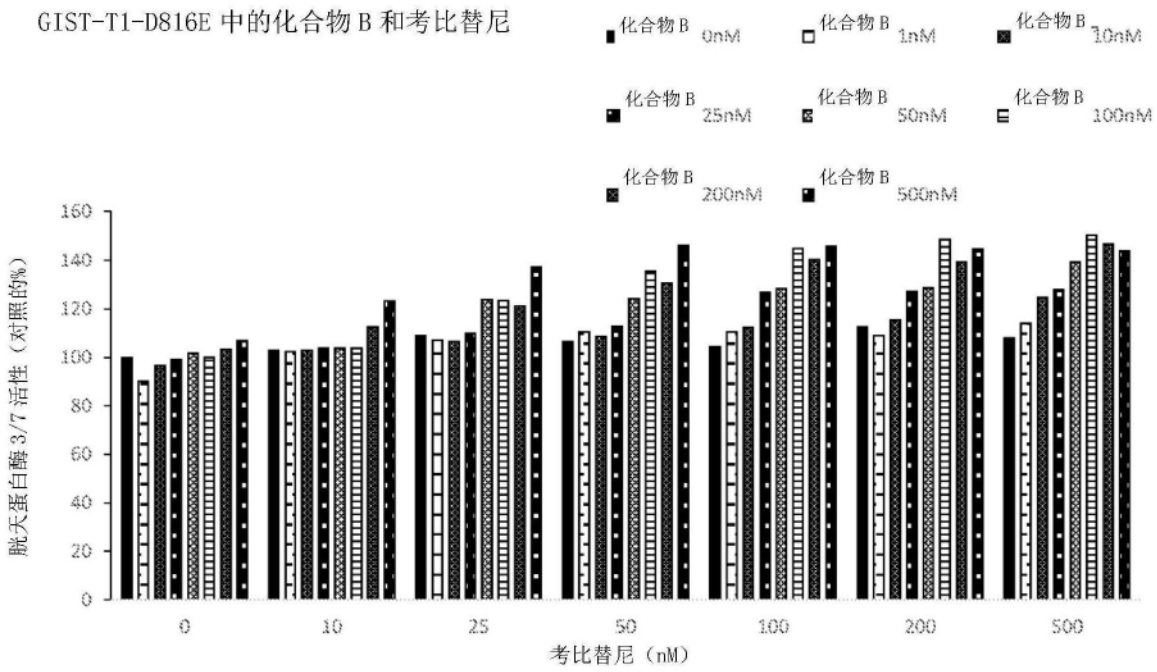


图6C

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 1nM	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 200nM	化合物 B 500nM
考比替尼 10 nM	1.78658	1.4423	33.0169	1.15037	7.15955	0.03569	0.000619
考比替尼 25 nM	0.37205	0.54877	0.09771	7.19E-05	0.000137	0.000781	3.5E-07
考比替尼 50 nM	0.12042	0.36756	0.0391	8.29E-05	2.14E-07	6.79E-06	7.2E-10
考比替尼 100 nM	0.24051	0.09661	2.61E-05	1.04E-05	4.2E-10	2.11E-08	1.07E-09
考比替尼 200 nM	1.00074	0.03502	3.02E-05	1.47E-05	1.8E-11	3.89E-08	2.34E-09
考比替尼 500 nM	0.1855	0.000379	4.48E-05	1.86E-08	4.1E-12	1.8E-10	3.97E-09

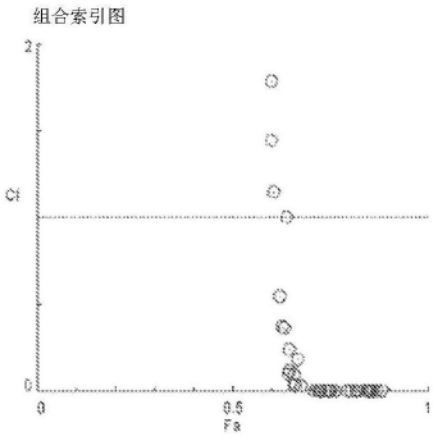


图6D

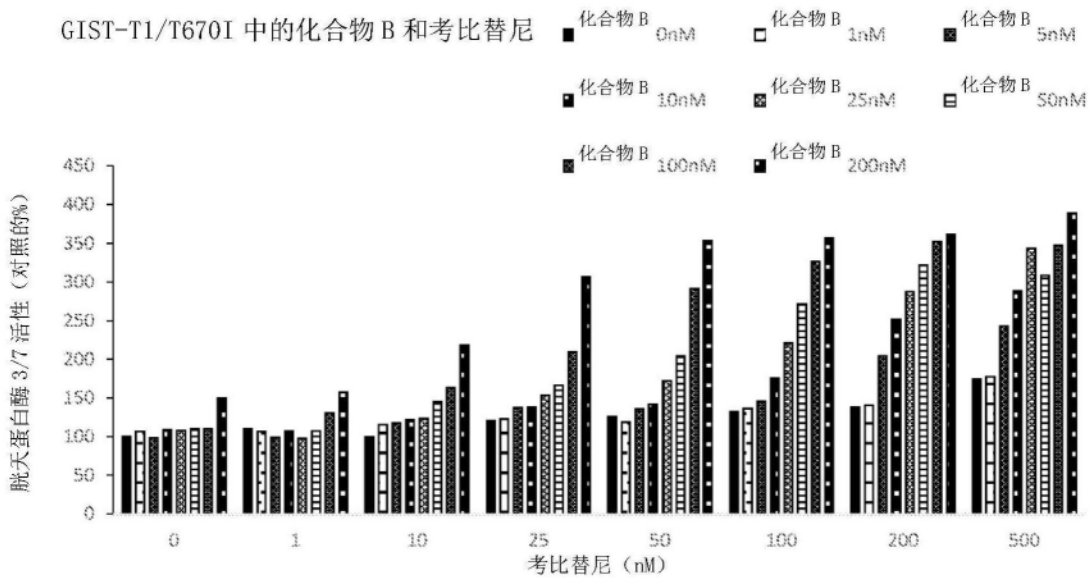


图6E

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 B 1nM	化合物 B 5nM	化合物 B 10nM	化合物 B 25nM	化合物 B 50nM	化合物 B 100nM	化合物 B 200nM
考比替尼 1 nM	0.41369	3.735	1.55347	21.4235	6.74637	0.24978	0.00783
考比替尼 10 nM	1.03215	0.85167	0.54699	0.59718	0.05047	0.00877	6.73E-05
考比替尼 25 nM	1.09419	0.2284	0.22022	0.04847	0.0152	3.62E-04	1.23E-07
考比替尼 50 nM	3.39319	0.55609	0.29001	0.01725	0.00105	8.66E-07	3.52E-09
考比替尼 100 nM	1.04878	0.40707	0.02628	5.35E-04	9.31E-06	8.64E-08	5.25E-09
考比替尼 200 nM	1.33157	0.00418	9.39E-05	5.03E-06	2.57E-07	1.63E-08	6.70E-09
考比替尼 500 nM	0.10996	4.48E-04	1.11E-05	9.15E-08	2.16E-06	5.98E-08	8.60E-10

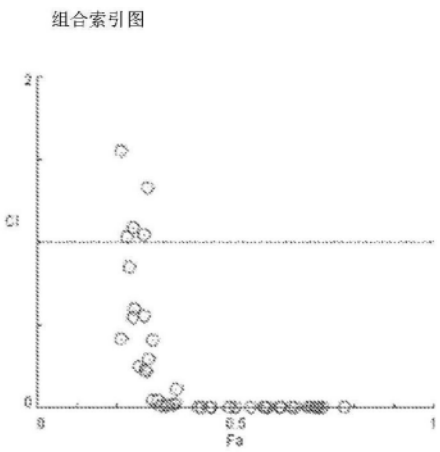


图6F

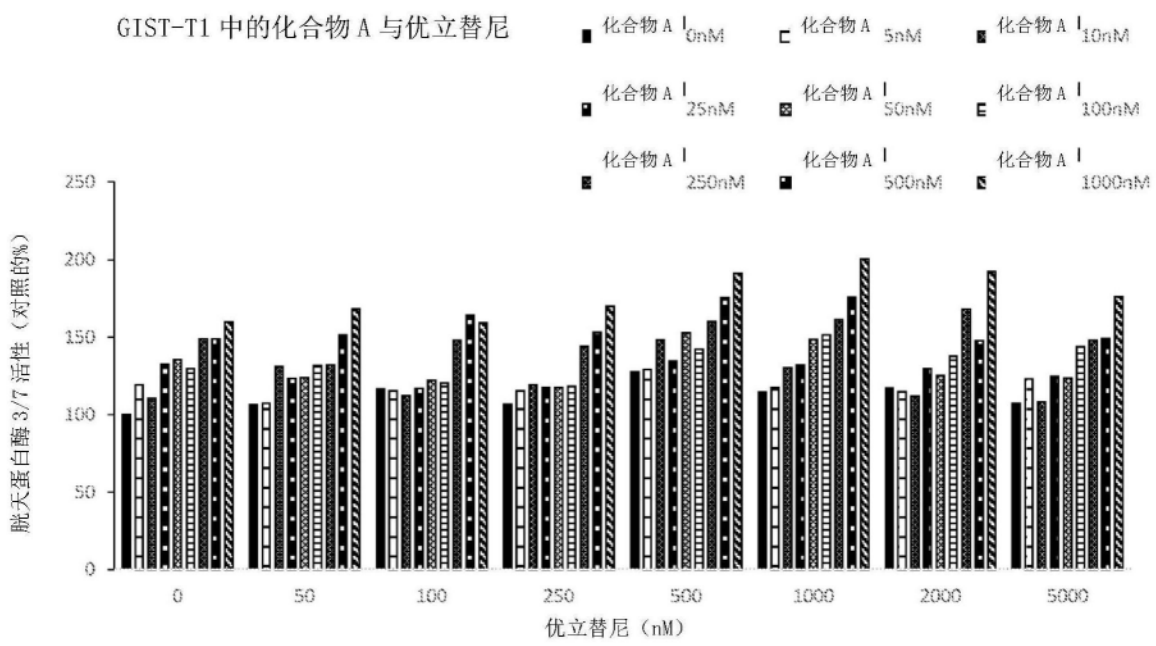


图7A

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 5nM	化合物 A 5nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 200nM	化合物 A 500nM	化合物 A 1000nM
优立替尼 50nM	397033	12152.7	0.29353	2.00594	3.73337	2.73202	6.357	0.83994	0.143
优立替尼 100nM	15.0853	1.23598	7.30524	4.9472	4.97932	12.3642	0.67675	0.13312	0.57025
优立替尼 250nM	1.3E+11	1.29932	1.48118	4.60126	9.20222	16.5094	1.16864	0.67302	0.1129
优立替尼 500nM	0.14288	0.18202	0.0261	0.44394	0.06984	0.60244	0.12257	0.0243	0.00367
优立替尼 1000nM	0.05213	0.92137	0.30425	0.6357	0.13049	0.16799	0.10139	0.02333	6.50E-04
优立替尼 2000nM	9233.7	1.87274	70.9971	0.84709	3.23328	1.15347	0.03718	1.45611	0.00291
优立替尼 5000nM	0.7266	0.43113	274131	1.73715	3.87011	0.50263	0.67675	1.12708	0.0448

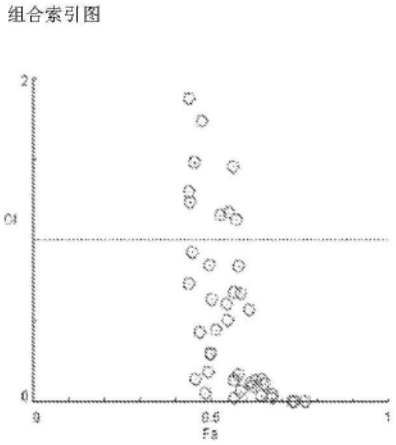


图7B

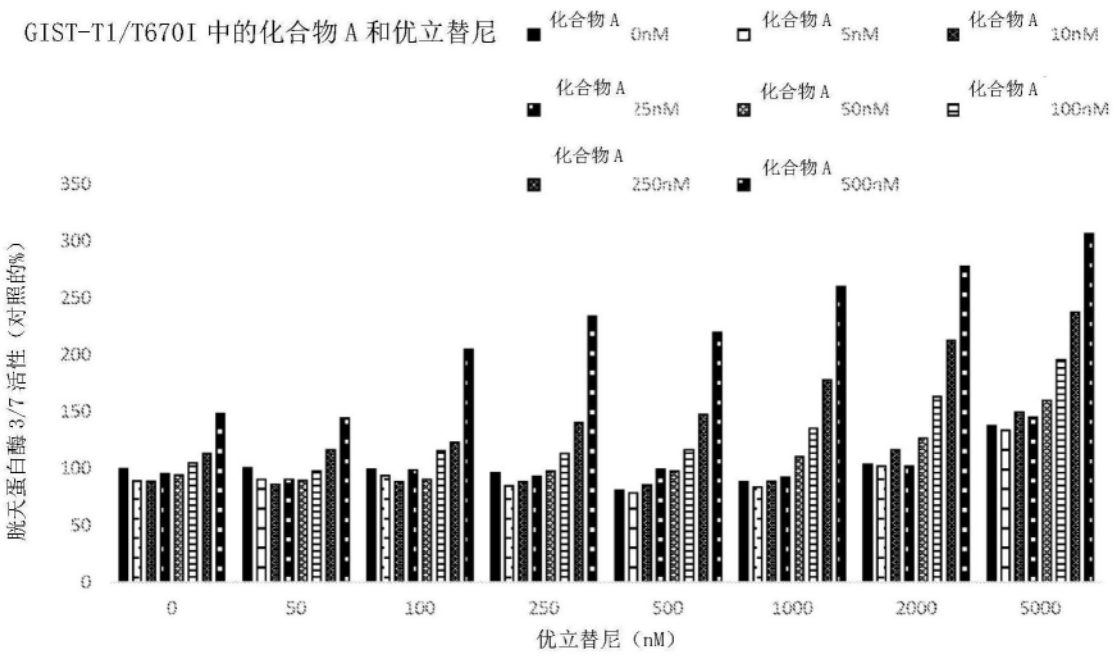


图7C

按 Chou Talalay 分析的组合索引

CI<1 = 协同作用
CI=1 = 加和作用
CI>1 = 拮抗作用

CI	化合物 A 5nM	化合物 A 10nM	化合物 A 25nM	化合物 A 50nM	化合物 A 100nM	化合物 A 200nM	化合物 A 500nM
优立替尼 50nM	1.31834	3.57672	2.90308	5.56256	3.88493	1.36233	0.3461
优立替尼 100nM	1.10711	3.91925	1.11824	5.40429	0.75024	0.75332	0.00559
优立替尼 250nM	17.7013	8.33131	4.13239	2.71447	0.87632	0.19479	9.10E-04
优立替尼 500nM	175.181	27.9521	1.87828	0.83106	0.68648	0.11088	0.00217
优立替尼 1000nM	87.5534	27.0813	11.9376	3.57	0.14557	0.013	1.83E-04
优立替尼 2000nM	2.74177	0.20886	3.54357	0.1633	0.01821	0.00135	6.21E-05
优立替尼 5000nM	0.02425	0.00614	0.01896	0.01184	0.00199	2.93E-04	9.86E-06

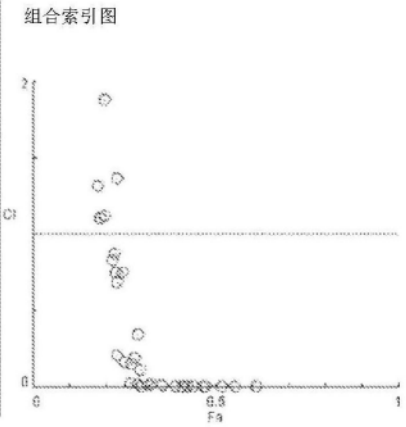


图7D

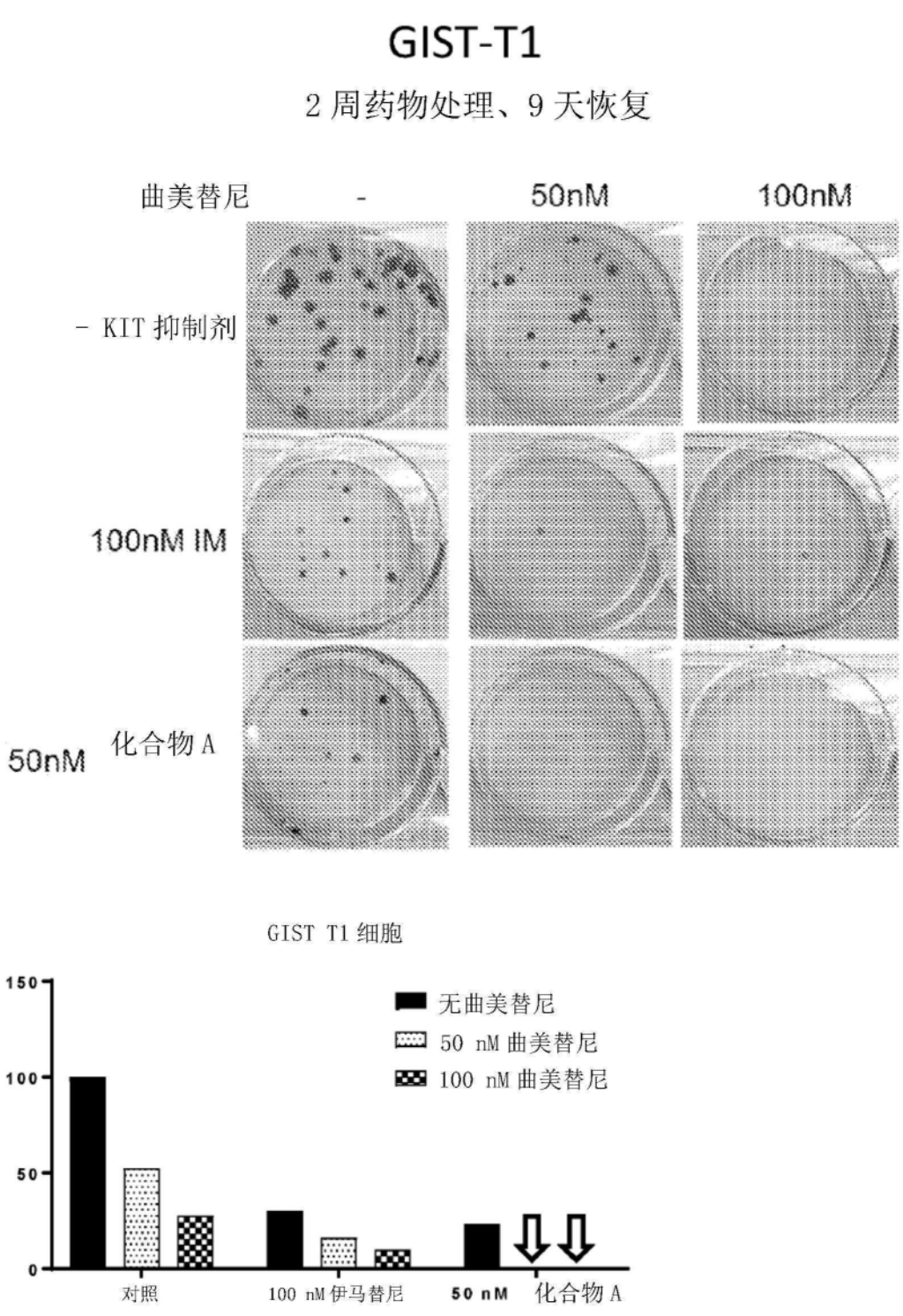
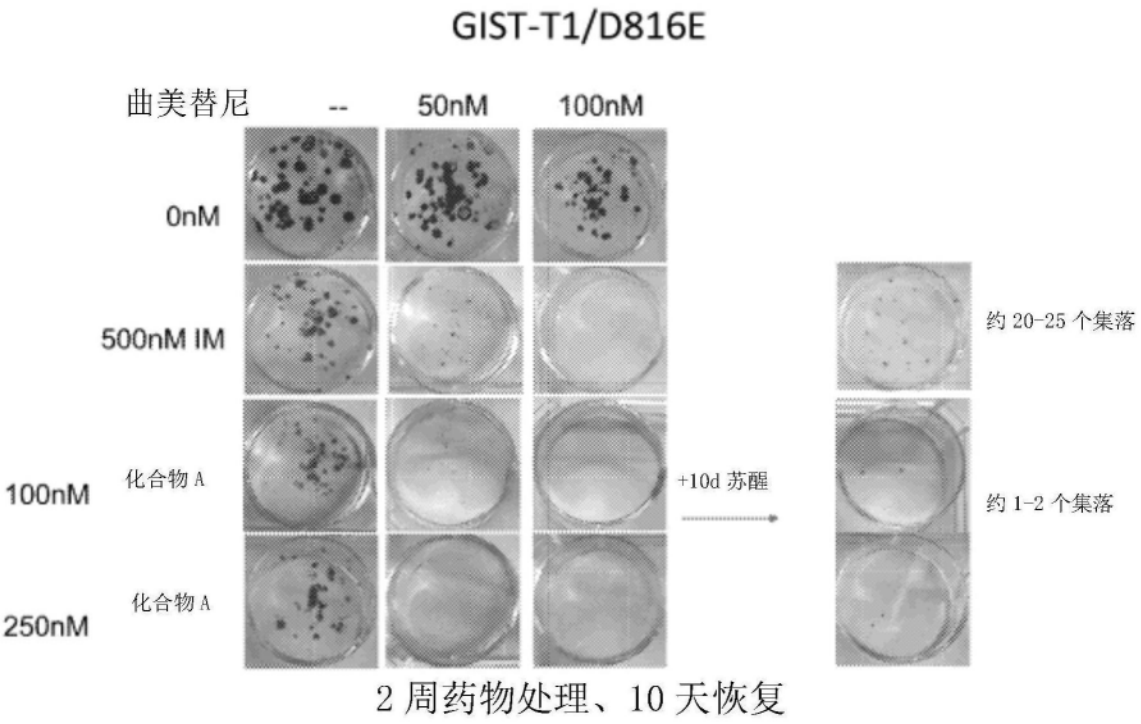

GIST-T1
2 周药物处理、9 天恢复
曲美替尼
-
50nM
100nM
- KIT 抑制剂
100nM IM
50nM
化合物 A
GIST T1 细胞
集落生长晕
（对照的%）
150
100
50
0
无曲美替尼
50 nM 曲美替尼
100 nM 曲美替尼
对照
100 nM 伊马替尼
50 nM
化合物 A

图8A


GIST-T1/D816E
曲美替尼
--
50nM
100nM
0nM
500nM IM
100nM
化合物 A
250nM
化合物 A
+10d 苏醒
约 20-25 个集落
约 1-2 个集落
2 周药物处理、10 天恢复

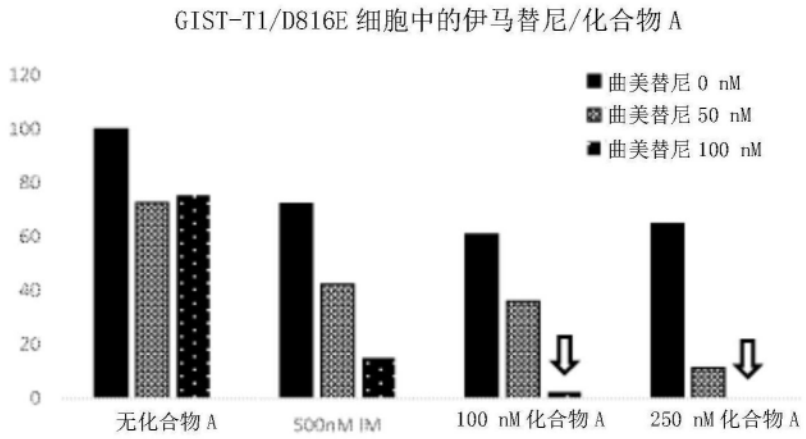

GIST-T1/D816E 细胞中的伊马替尼/化合物 A
120
100
80
60
40
20
0
曲美替尼 0 nM
曲美替尼 50 nM
曲美替尼 100 nM
无化合物 A
500nM IM
100 nM 化合物 A
250 nM 化合物 A

图8B

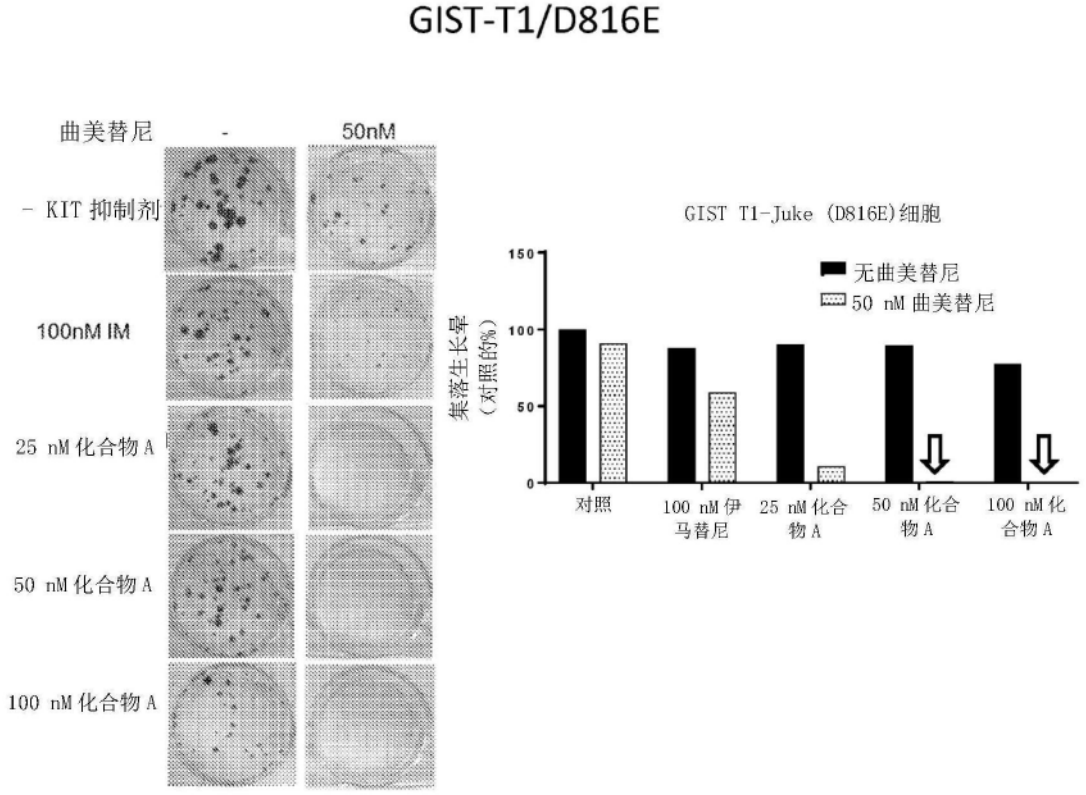

GIST-T1/D816E
曲美替尼
-
50nM
- KIT 抑制剂
100nM IM
25 nM 化合物 A
50 nM 化合物 A
100 nM 化合物 A
GIST T1-Juke (D816E)细胞
集落生长晕（对照的%）
150
100
50
0
无曲美替尼
50 nM 曲美替尼
对照
100 nM 伊马替尼
25 nM 化合物 A
50 nM 化合物 A
100 nM 化合物 A

图8C

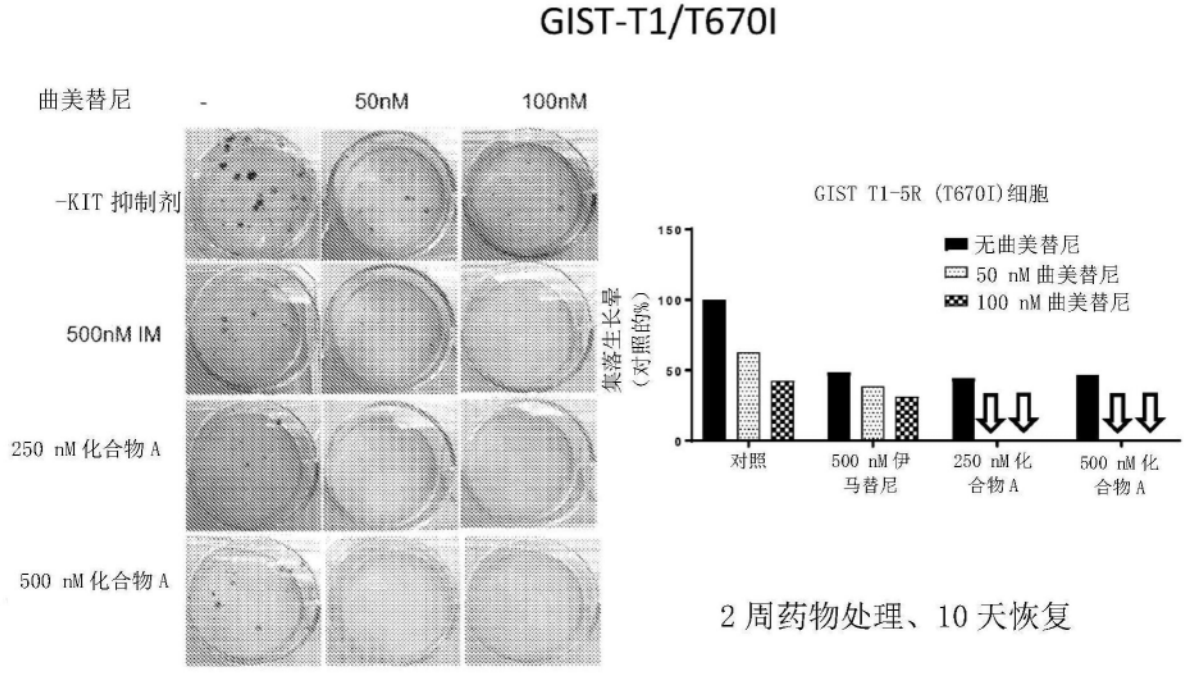
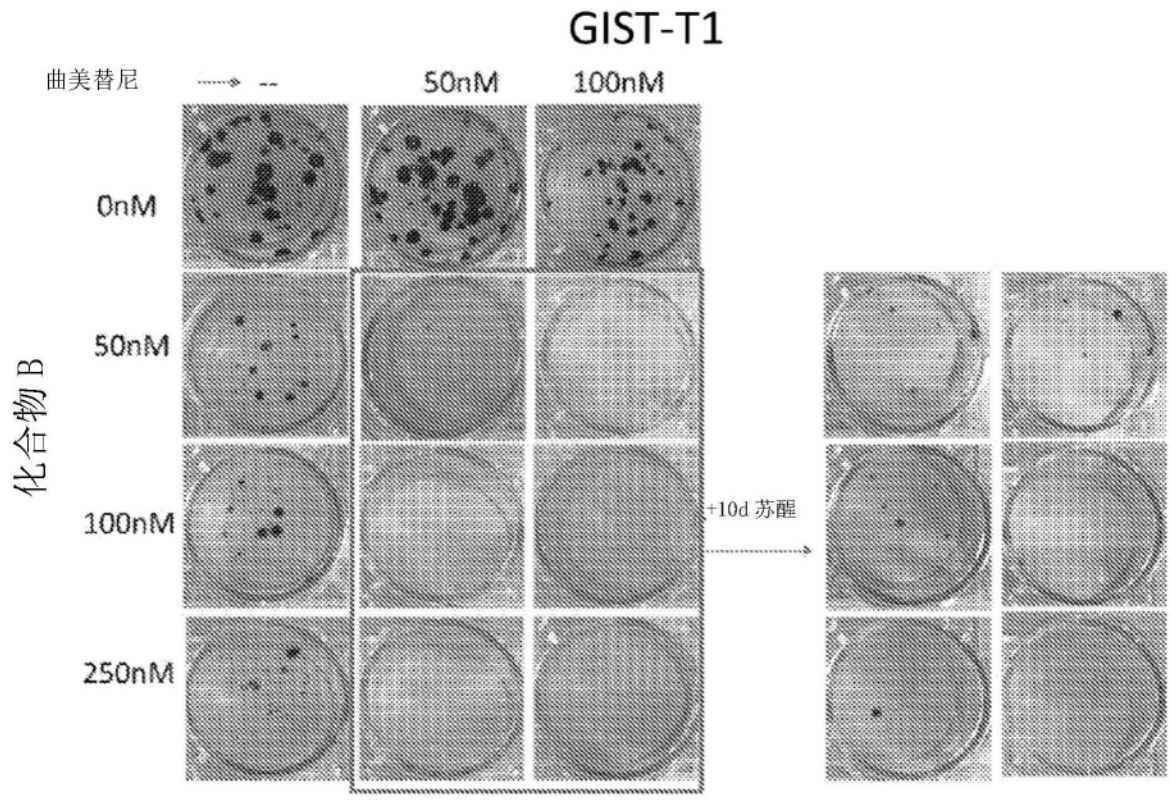

GIST-T1/T670I
曲美替尼
-
50nM
100nM
-KIT 抑制剂
500nM IM
250 nM 化合物 A
500 nM 化合物 A
GIST T1-5R (T670I)细胞
集落生长晕（对照的%）
150
100
50
0
无曲美替尼
50 nM 曲美替尼
100 nM 曲美替尼
对照
500 nM 伊马替尼
250 nM 化合物 A
500 nM 化合物 A
2 周药物处理、10 天恢复

图8D


GIST-T1
曲美替尼
--
50nM
100nM
0nM
50nM
100nM
250nM
化合物 B
+10d 苏醒

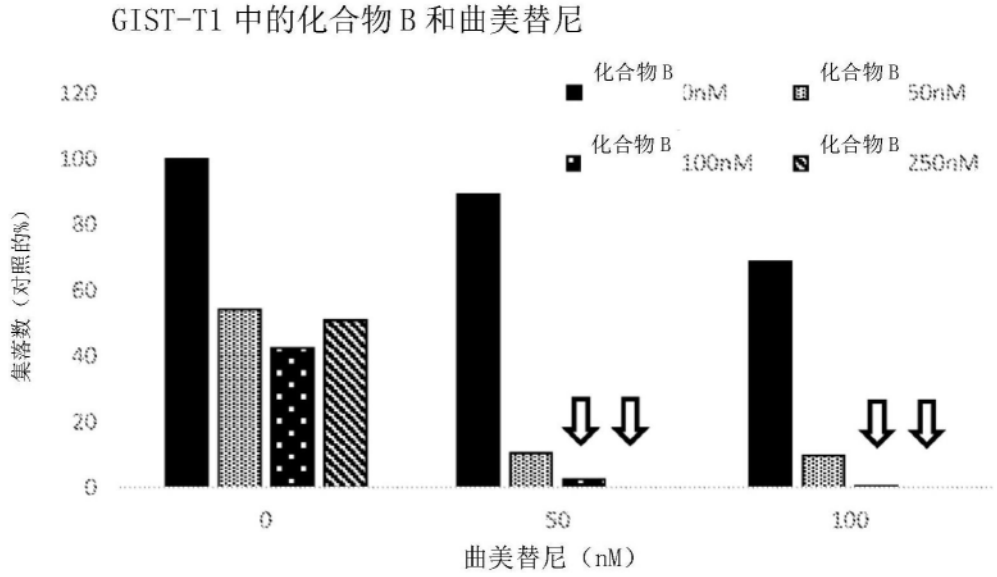
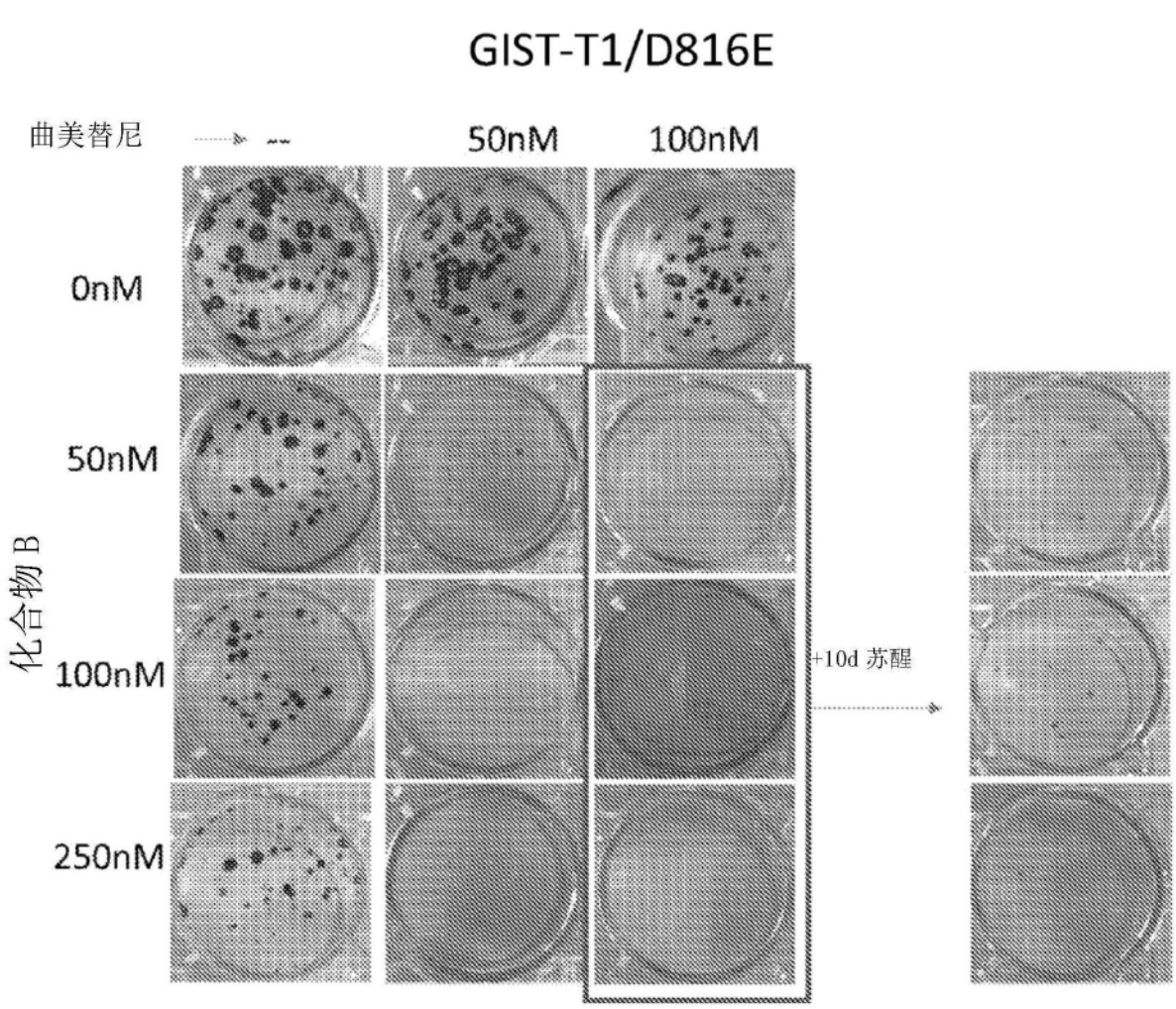

GIST-T1 中的化合物 B 和曲美替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
曲美替尼（nM）

图9A


GIST-T1/D816E
曲美替尼
50nM
100nM
0nM
50nM
100nM
250nM
化合物 B
+10d 苏醒

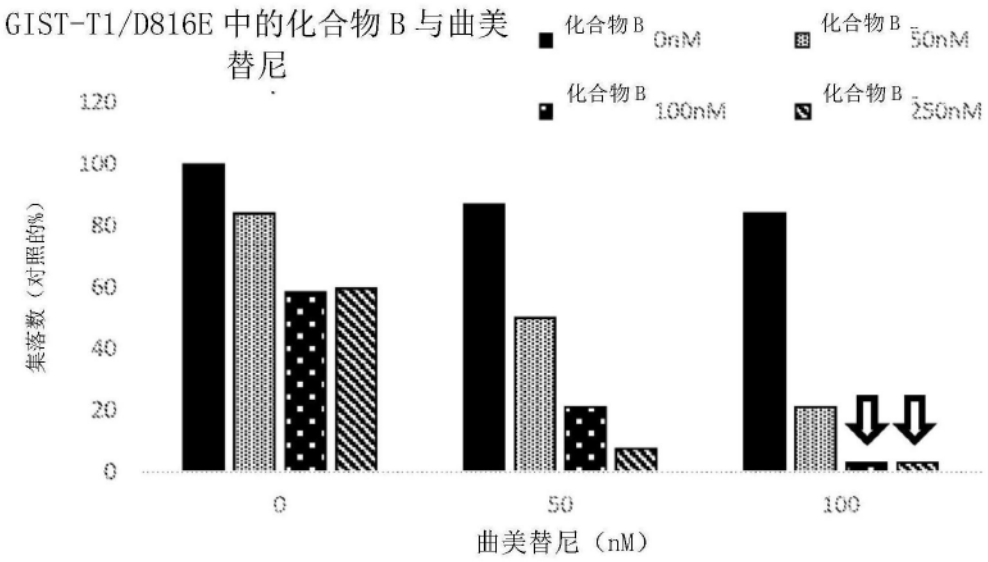
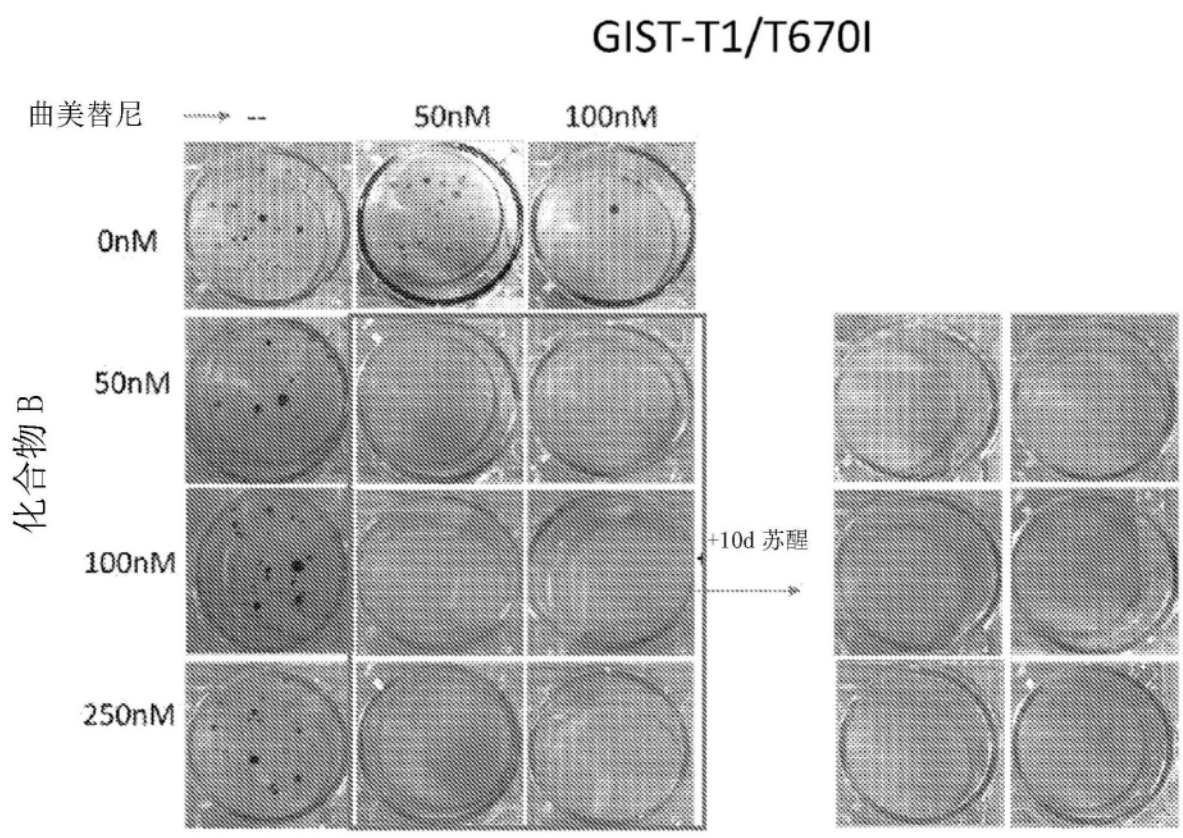

GIST-T1/D816E 中的化合物 B 与曲美替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
曲美替尼（nM）

图9B


GIST-T1/T670I
曲美替尼
--
50nM
100nM
0nM
50nM
100nM
250nM
化合物 B
+10d 苏醒

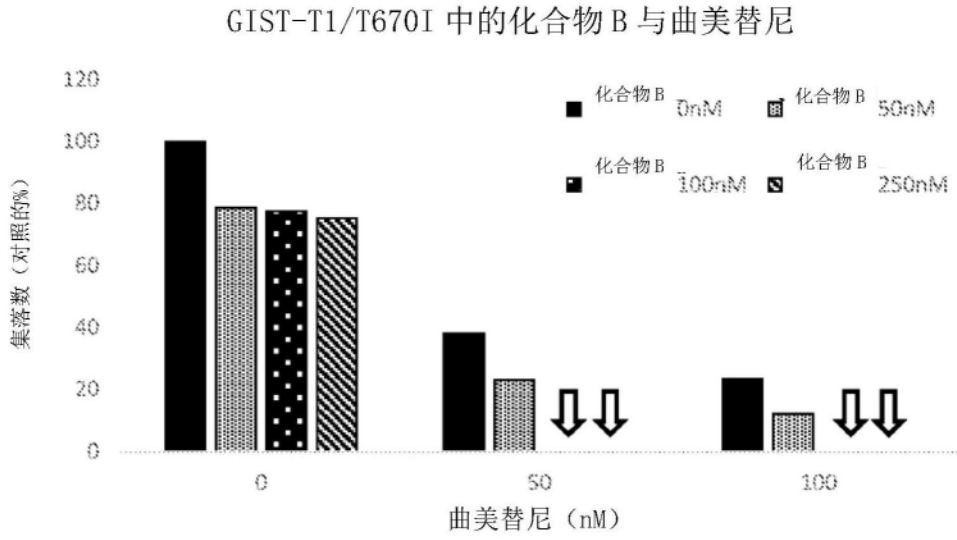
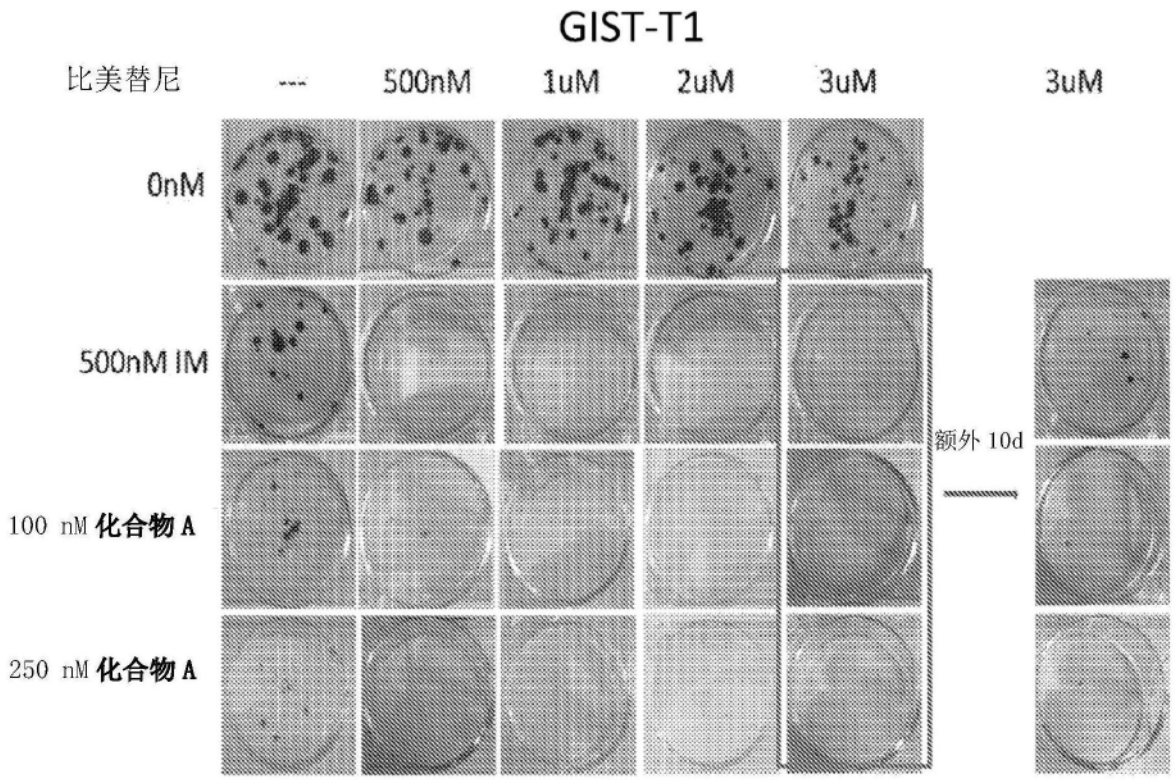

GIST-T1/T670I 中的化合物 B 与曲美替尼
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
0
50
100
曲美替尼（nM）

图9C


GIST-T1
比美替尼

500nM
1uM
2uM
3uM
3uM
0nM
500nM IM
100 nM 化合物 A
250 nM 化合物 A
额外 10d

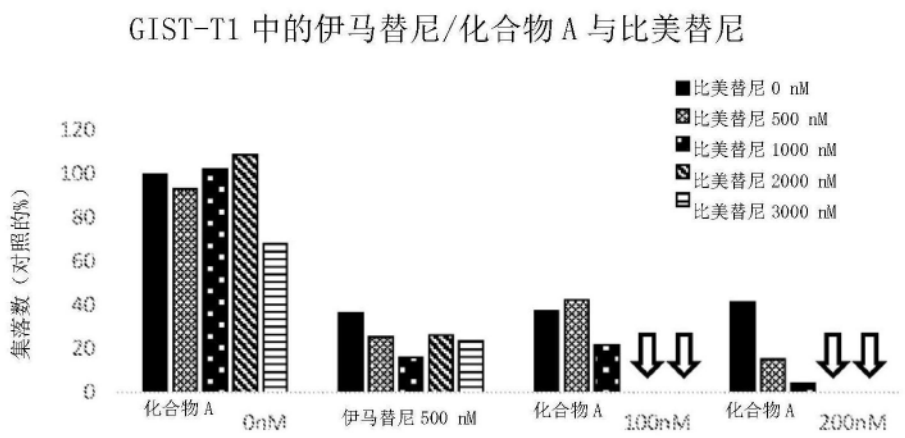
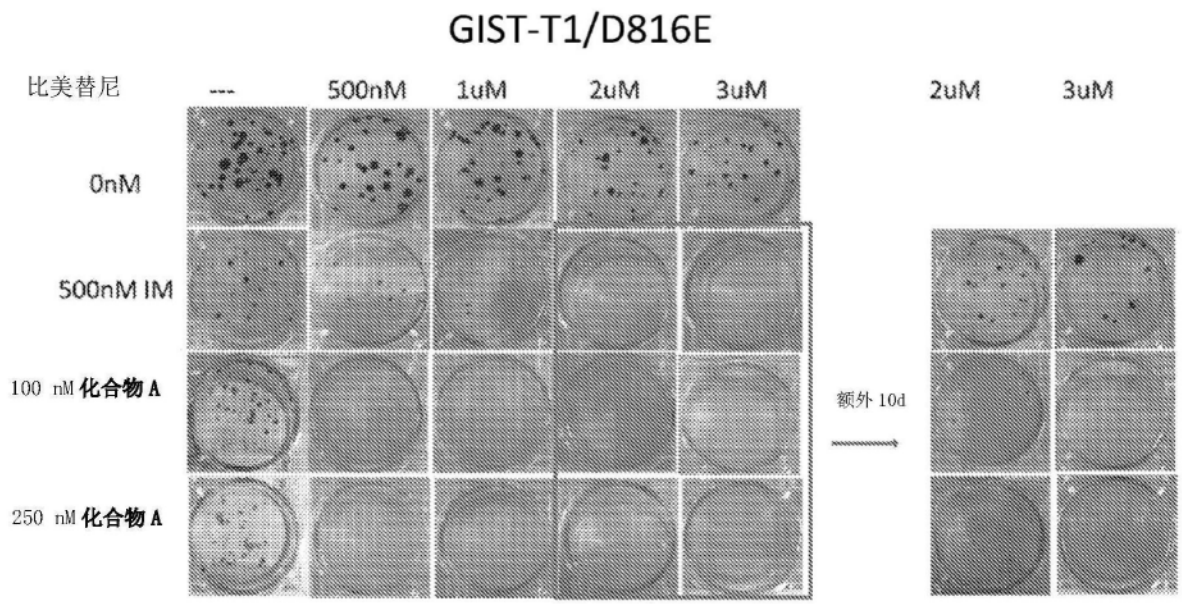

GIST-T1 中的伊马替尼/化合物 A 与比美替尼
比美替尼 0 nM
比美替尼 500 nM
比美替尼 1000 nM
比美替尼 2000 nM
比美替尼 3000 nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
化合物 A
0nM
伊马替尼 500 nM
化合物 A
100nM
化合物 A
200nM

图10A


GIST-T1/D816E
比美替尼

500nM
1uM
2uM
3uM
2uM
3uM
0nM
500nM IM
100 nM 化合物 A
250 nM 化合物 A
额外 10d

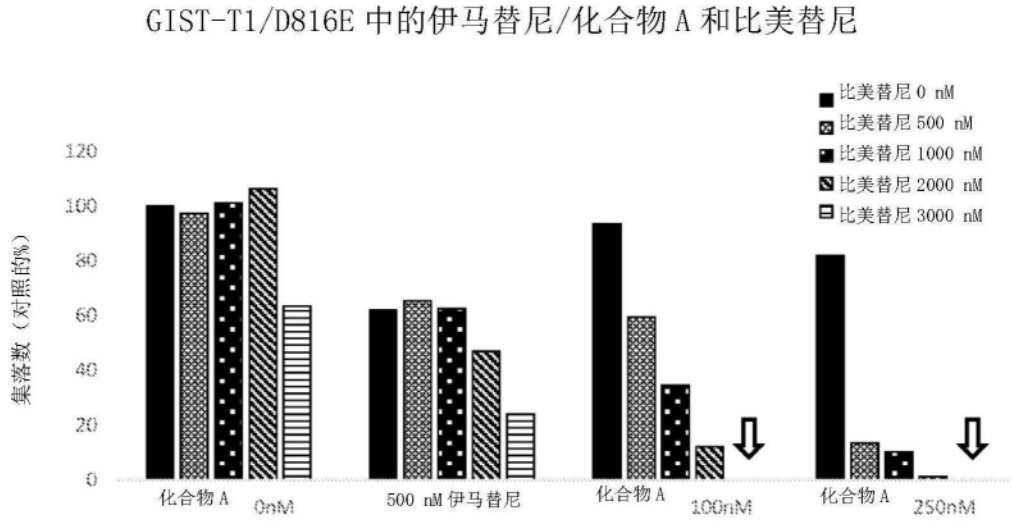
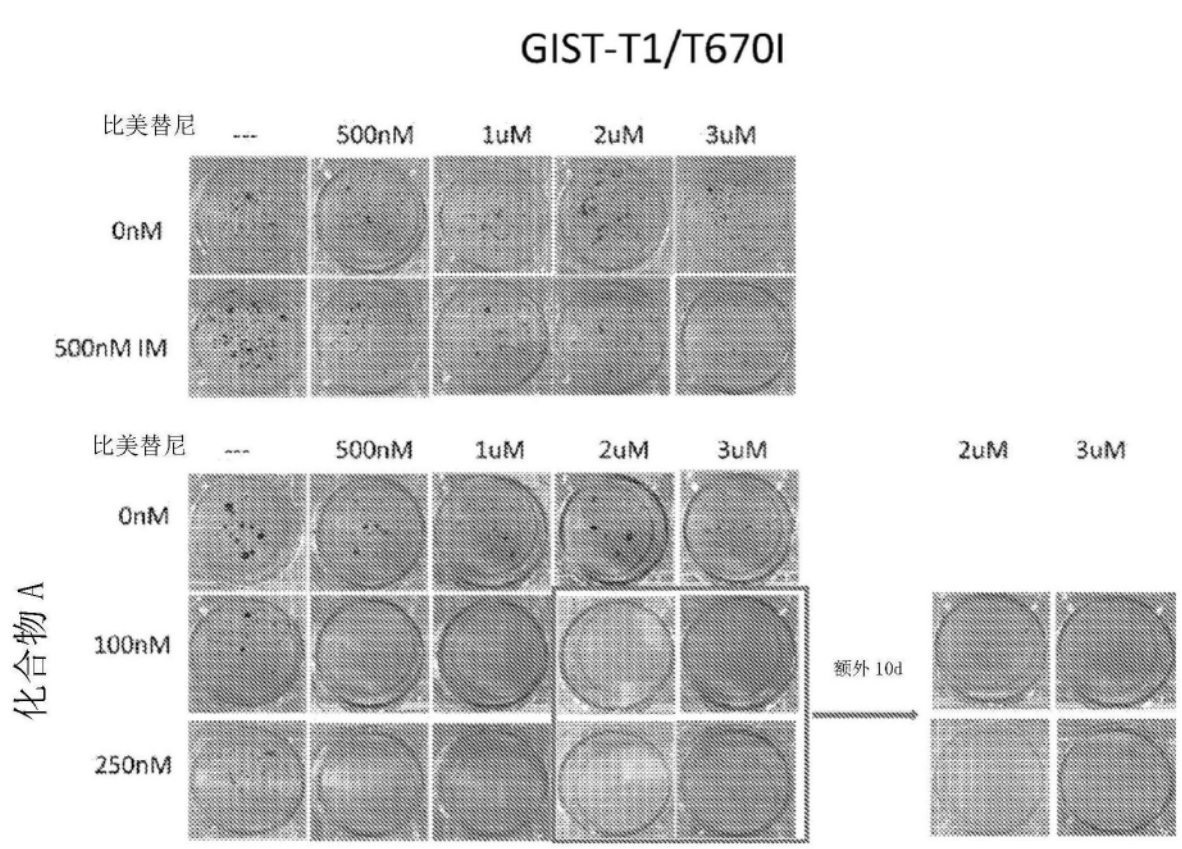

GIST-T1/D816E 中的伊马替尼/化合物 A 和比美替尼
比美替尼 0 nM
比美替尼 500 nM
比美替尼 1000 nM
比美替尼 2000 nM
比美替尼 3000 nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
化合物 A
0nM
500 nM 伊马替尼
化合物 A
100nM
化合物 A
250nM

图10B


GIST-T1/T670I
比美替尼

500nM
1uM
2uM
3uM
0nM
500nM IM
比美替尼

500nM
1uM
2uM
3uM
2uM
3uM
化合物 A
0nM
100nM
250nM
额外 10d

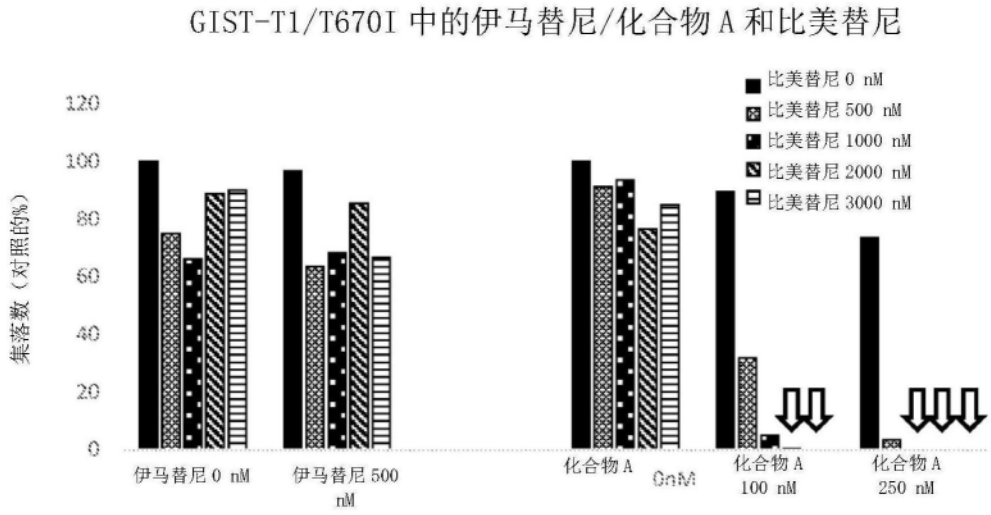
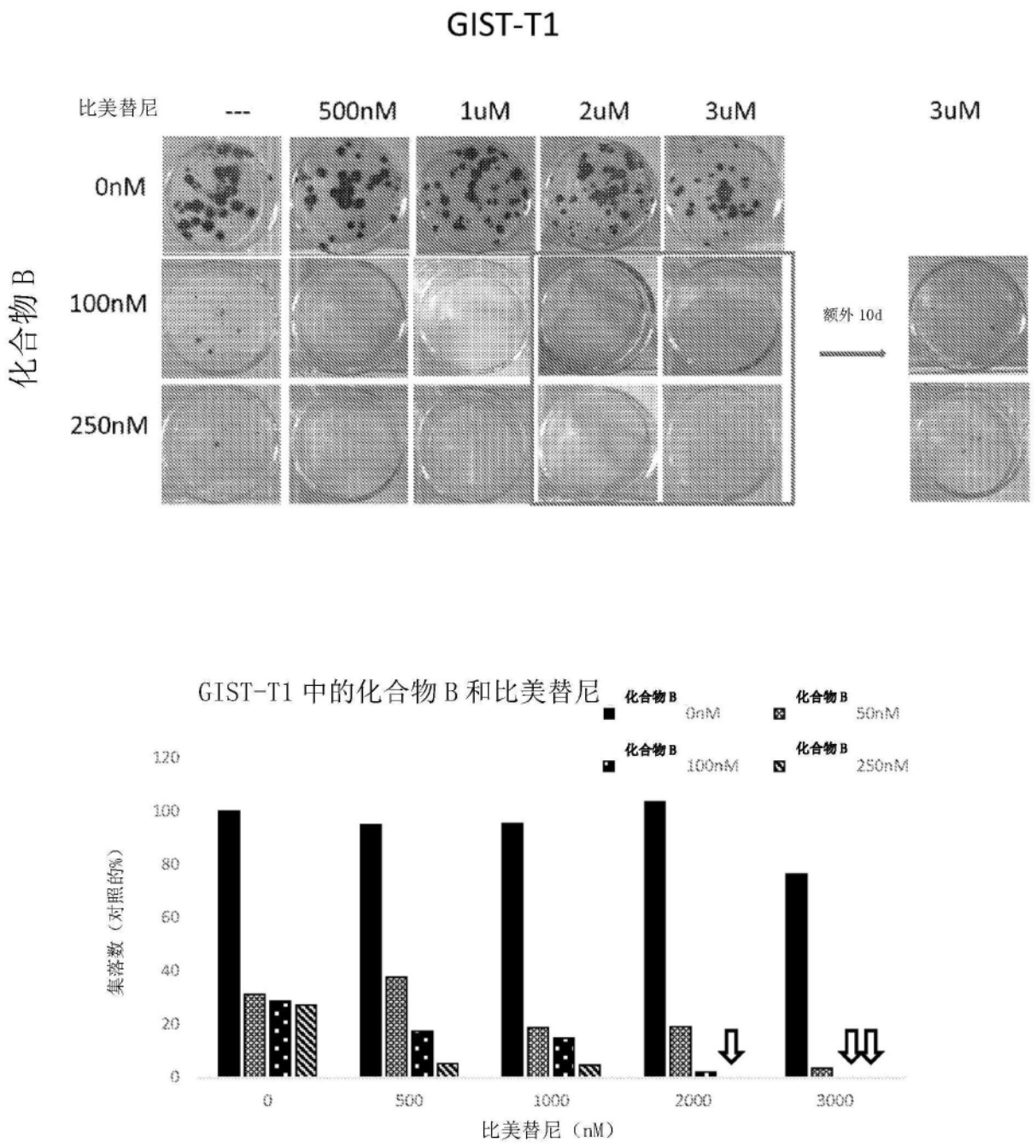
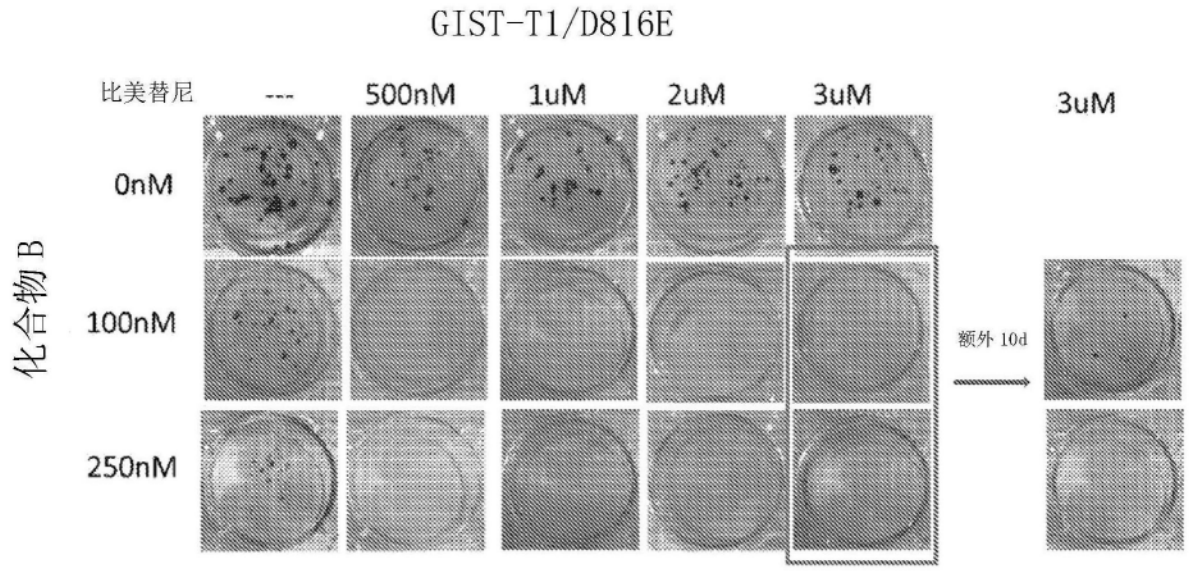

GIST-T1/T670I 中的伊马替尼/化合物 A 和比美替尼
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
比美替尼 0 nM
比美替尼 500 nM
比美替尼 1000 nM
比美替尼 2000 nM
比美替尼 3000 nM
伊马替尼 0 nM
伊马替尼 500 nM
化合物 A 0nM
化合物 A 100 nM
化合物 A 250 nM

图10C


GIST-T1
比美替尼

500nM
1uM
2uM
3uM
3uM
化合物 B
0nM
100nM
250nM
额外 10d
GIST-T1 中的化合物 B 和比美替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
500
1000
2000
3000
比美替尼（nM）

图11A


GIST-T1/D816E
比美替尼

500nM
1uM
2uM
3uM
3uM
化合物 B
0nM
100nM
250nM
额外 10d

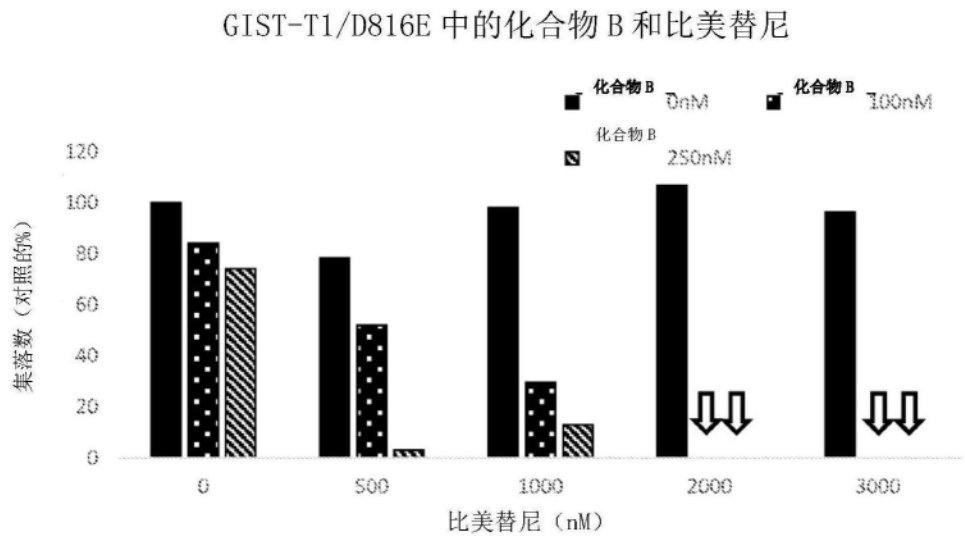
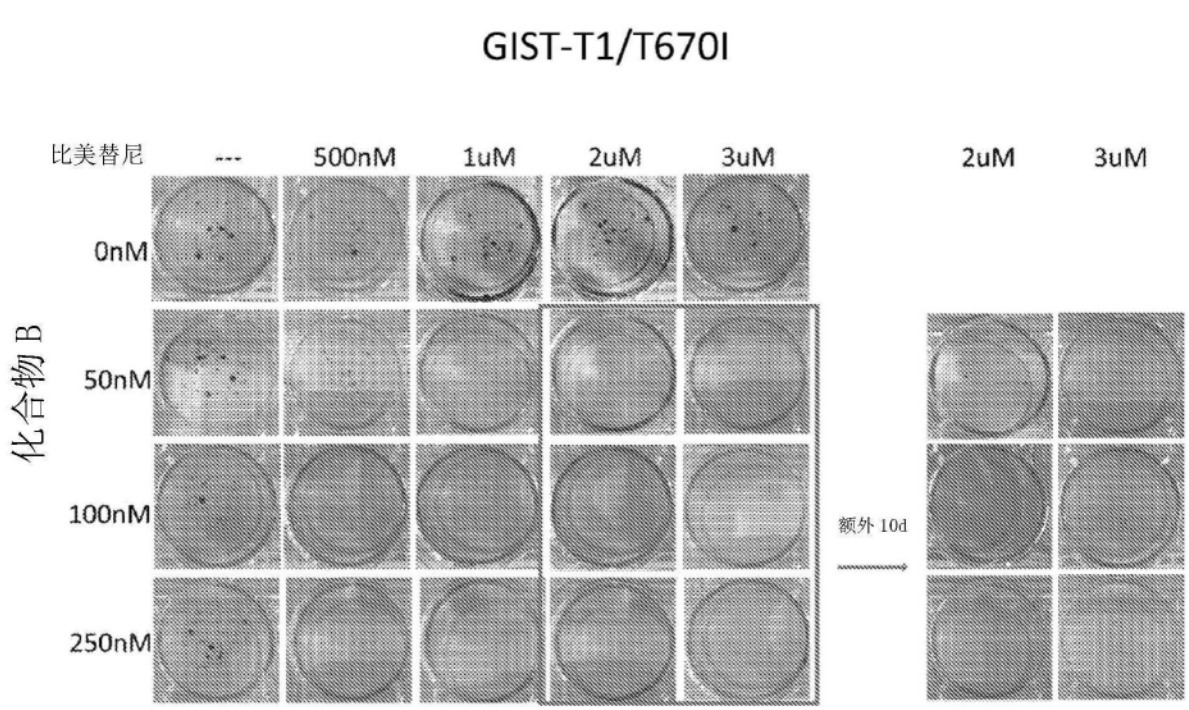

GIST-T1/D816E 中的化合物 B 和比美替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
500
1000
2000
3000
比美替尼（nM）

图11B


GIST-T1/T670I
比美替尼

500nM
1uM
2uM
3uM
2uM
3uM
化合物 B
0nM
50nM
100nM
250nM
额外 10d

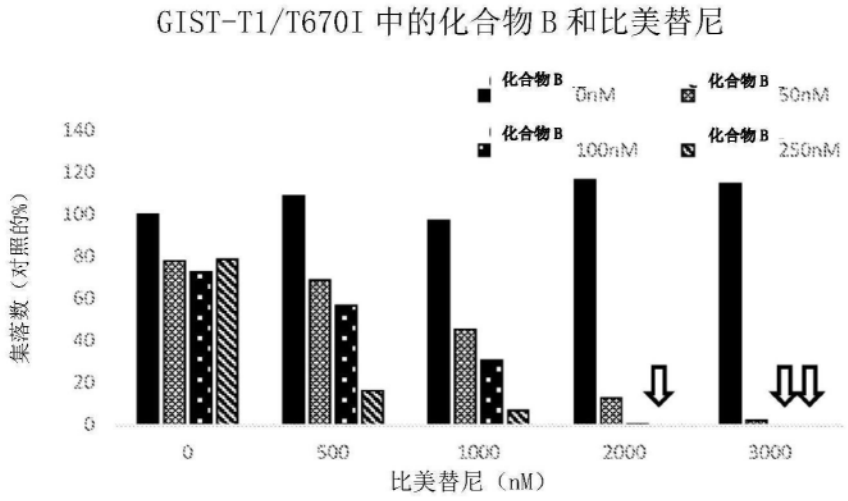
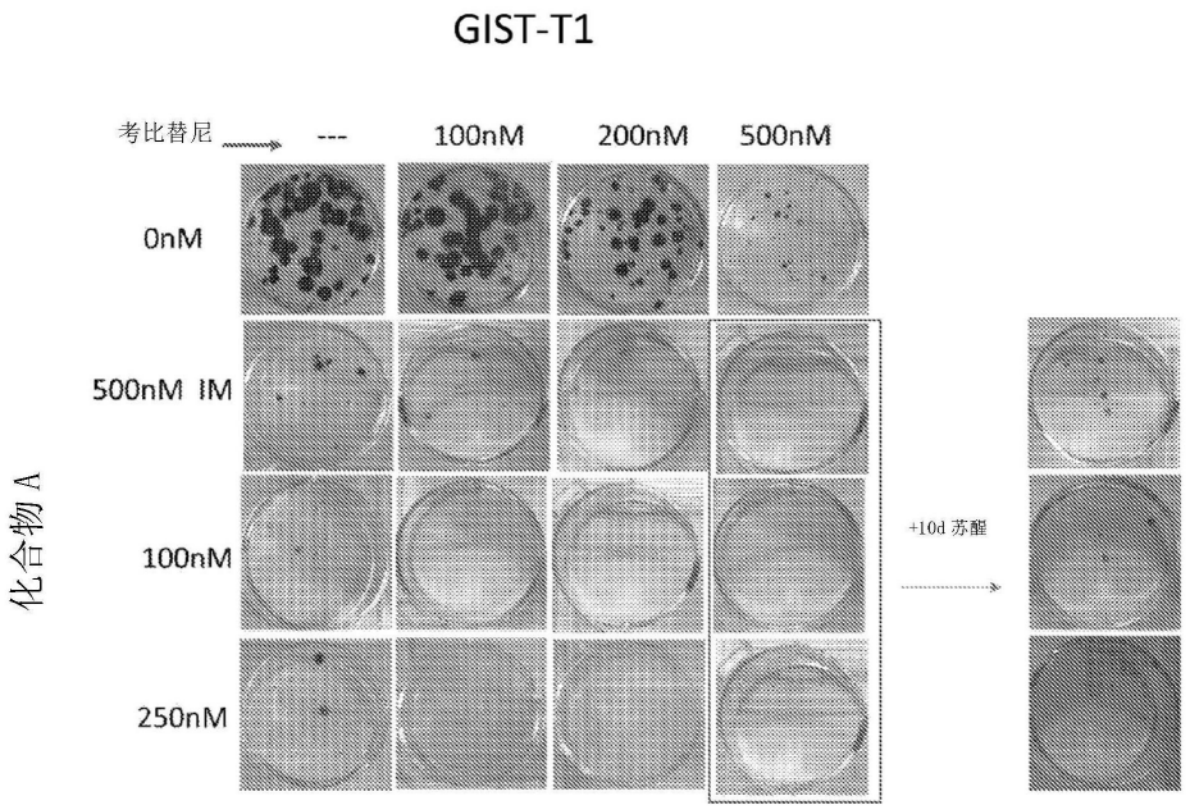

GIST-T1/T670I 中的化合物 B 和比美替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
140
120
100
80
60
40
20
0
0
500
1000
2000
3000
比美替尼（nM）

图11C


GIST-T1
考比替尼

100nM
200nM
500nM
0nM
500nM IM
100nM
250nM
化合物 A
+10d 苏醒

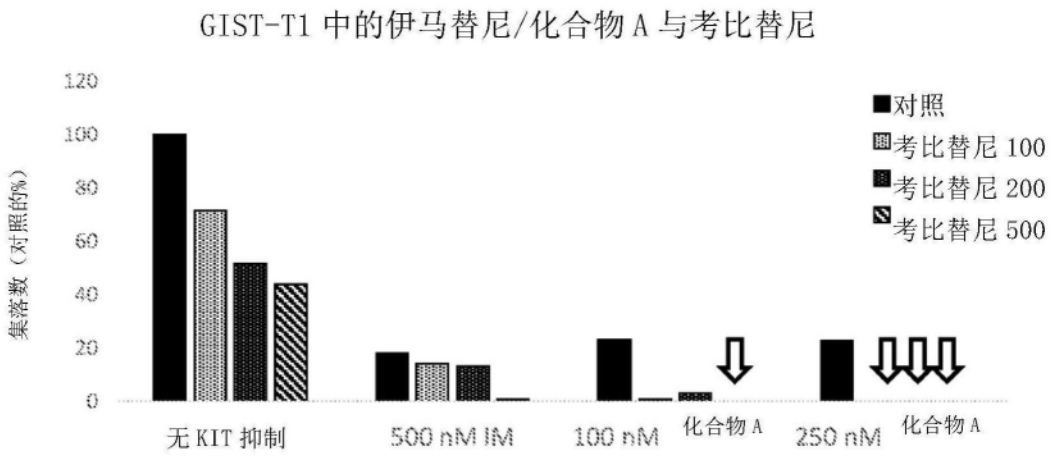
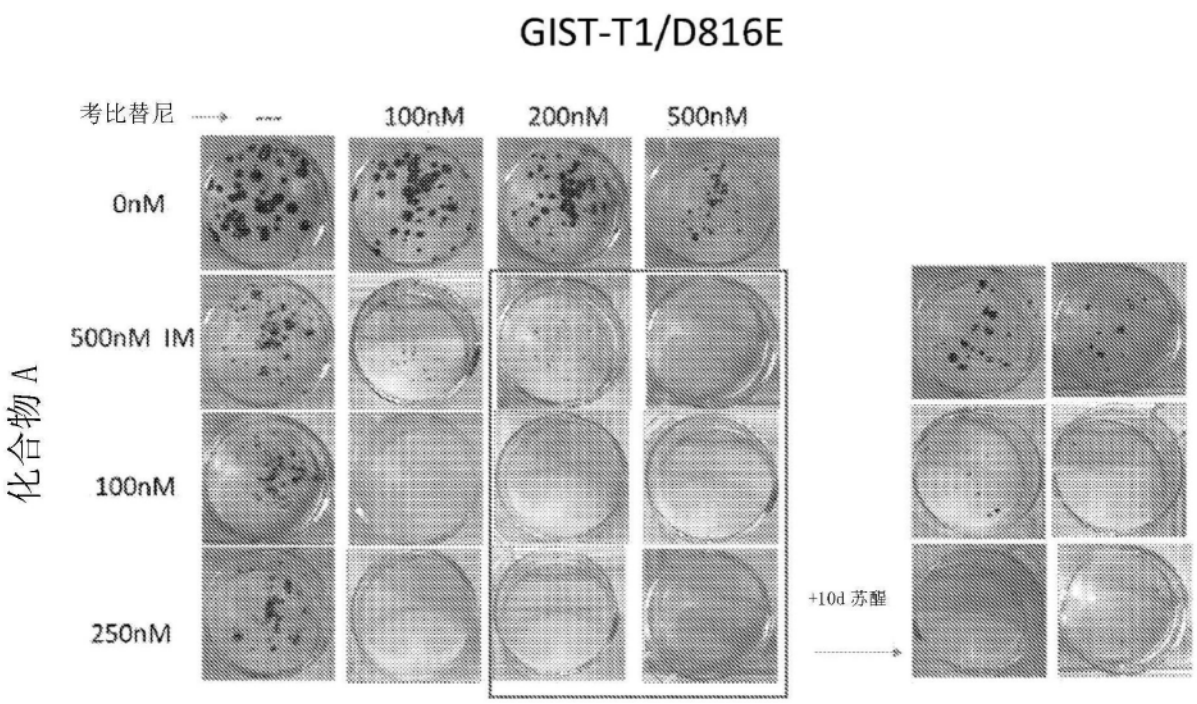

GIST-T1 中的伊马替尼/化合物 A 与考比替尼
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
对照
考比替尼 100
考比替尼 200
考比替尼 500
无 KIT 抑制
500 nM IM
100 nM
化合物 A
250 nM
化合物 A

图12A


GIST-T1/D816E
考比替尼
100nM
200nM
500nM
0nM
500nM IM
100nM
250nM
化合物 A
+10d 苏醒

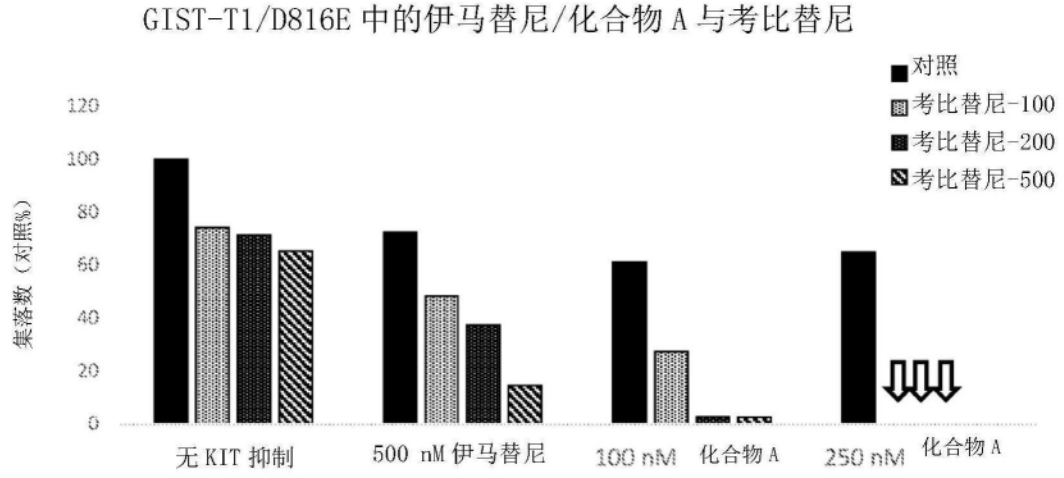
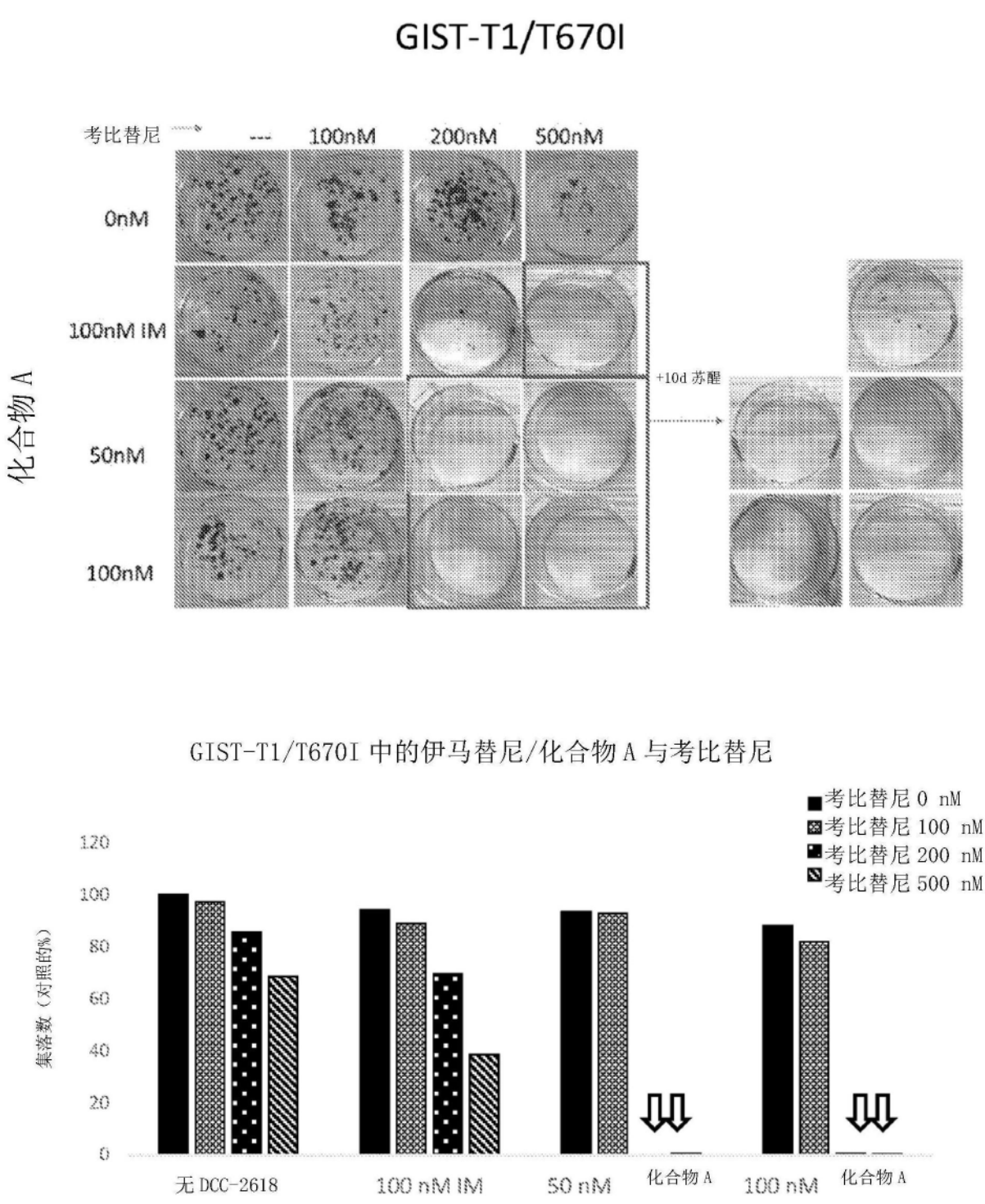
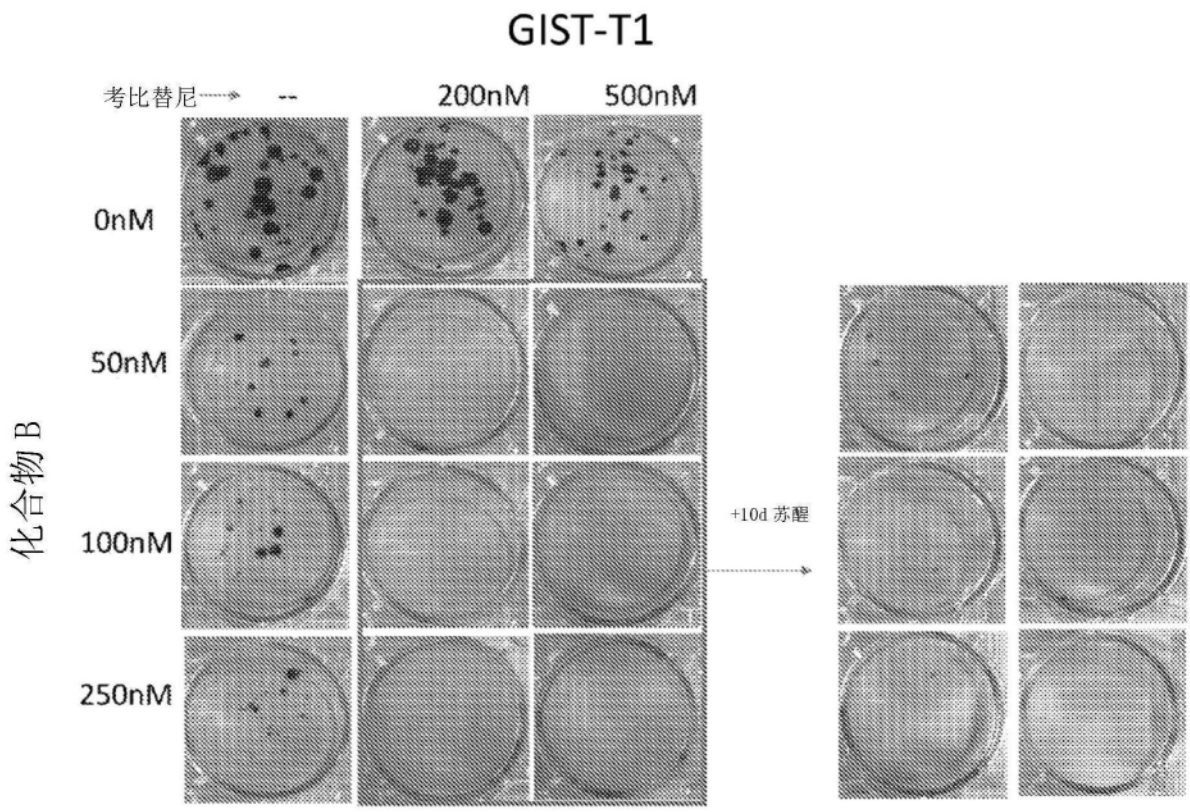

GIST-T1/D816E 中的伊马替尼/化合物 A 与考比替尼
对照
考比替尼-100
考比替尼-200
考比替尼-500
集落数（对照%）
120
100
80
60
40
20
0
无 KIT 抑制
500 nM 伊马替尼
100 nM 化合物 A
250 nM 化合物 A

图12B


GIST-T1/T670I
考比替尼

100nM
200nM
500nM
0nM
100nM IM
50nM
100nM
化合物 A
+10d 苏醒
GIST-T1/T670I 中的伊马替尼/化合物 A 与考比替尼
考比替尼 0 nM
考比替尼 100 nM
考比替尼 200 nM
考比替尼 500 nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
无 DCC-2618
100 nM IM
50 nM
化合物 A
100 nM
化合物 A

图12C


GIST-T1
考比替尼
--
200nM
500nM
0nM
50nM
100nM
250nM
化合物 B
+10d 苏醒

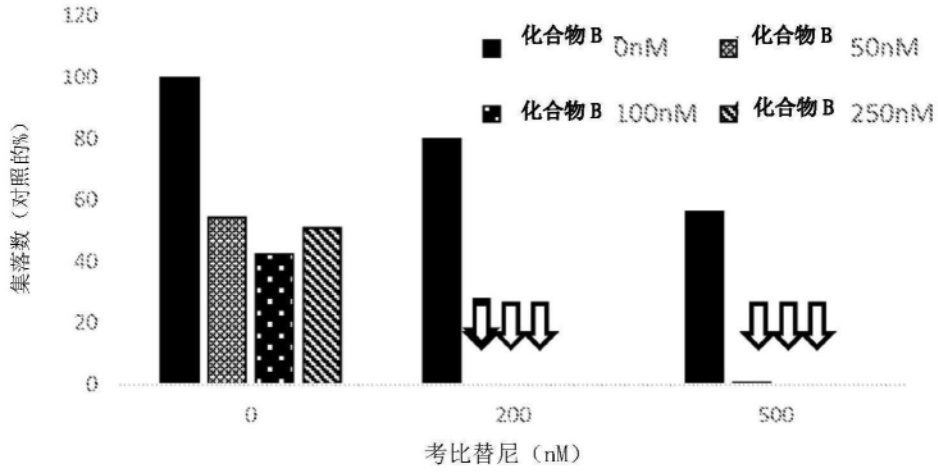

GIST-T1 中的化合物 B 和考比替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
200
500
考比替尼（nM）

图13A

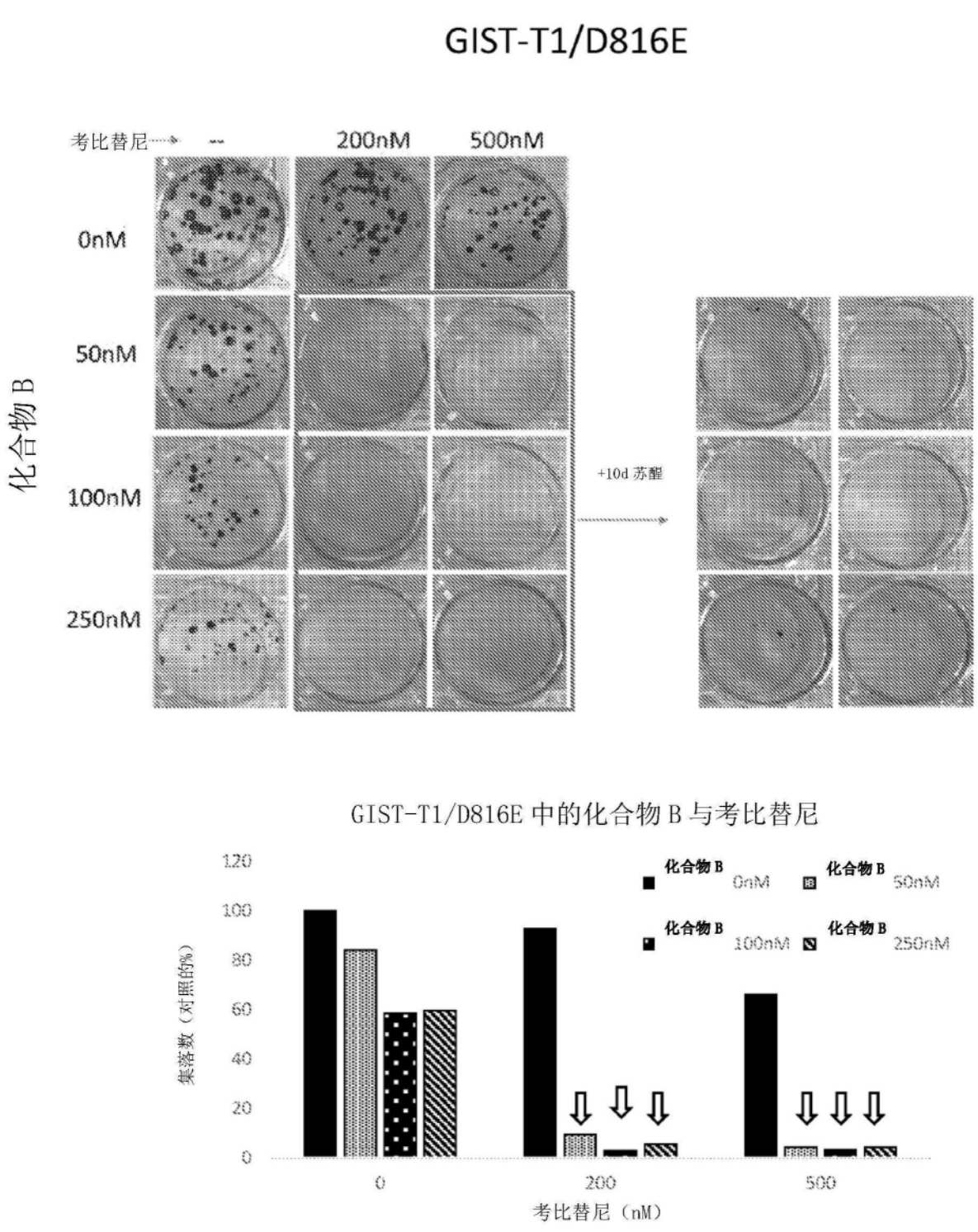
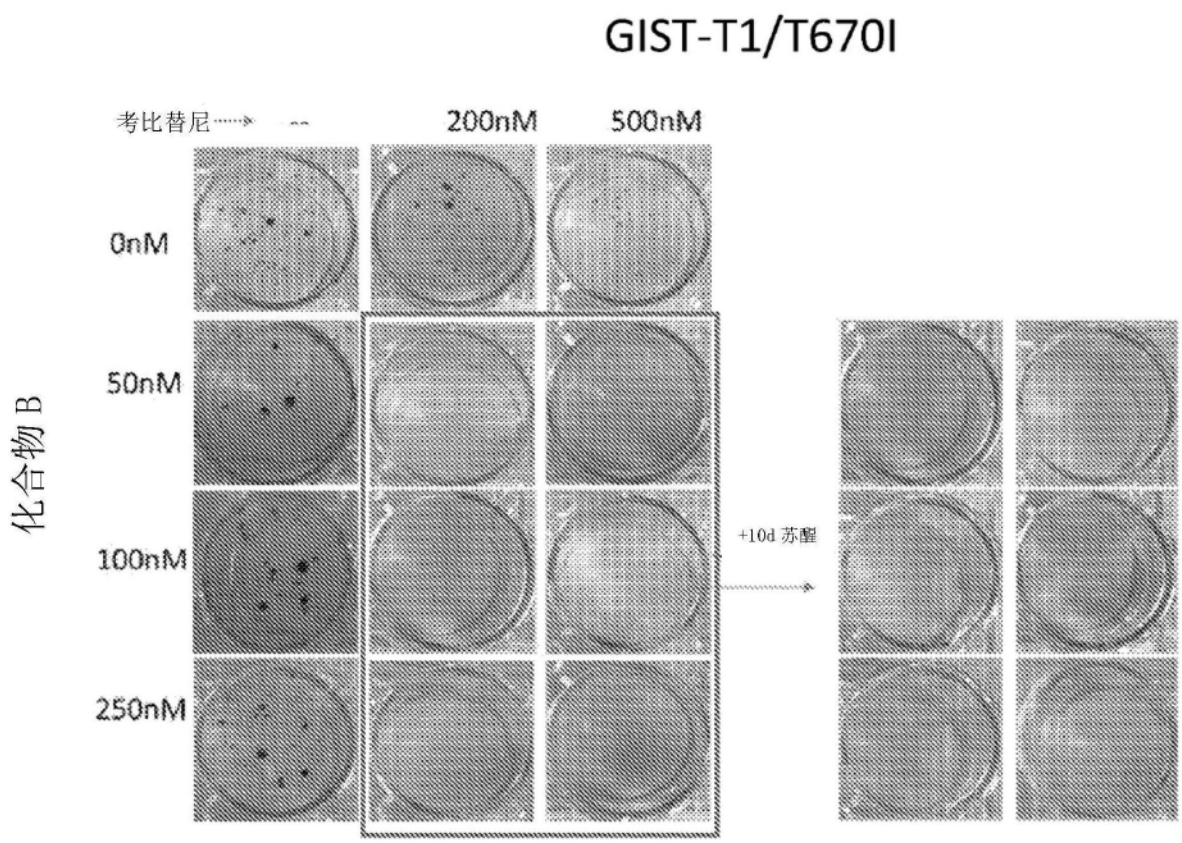

GIST-T1/D816E
考比替尼
--
200nM
500nM
化合物 B
0nM
50nM
100nM
250nM
+10d 苏醒
GIST-T1/D816E 中的化合物 B 与考比替尼
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
0
200
500
考比替尼（nM）

图13B


GIST-T1/T670I
考比替尼
--
200nM
500nM
0nM
50nM
100nM
250nM
化合物 B
+10d 苏醒

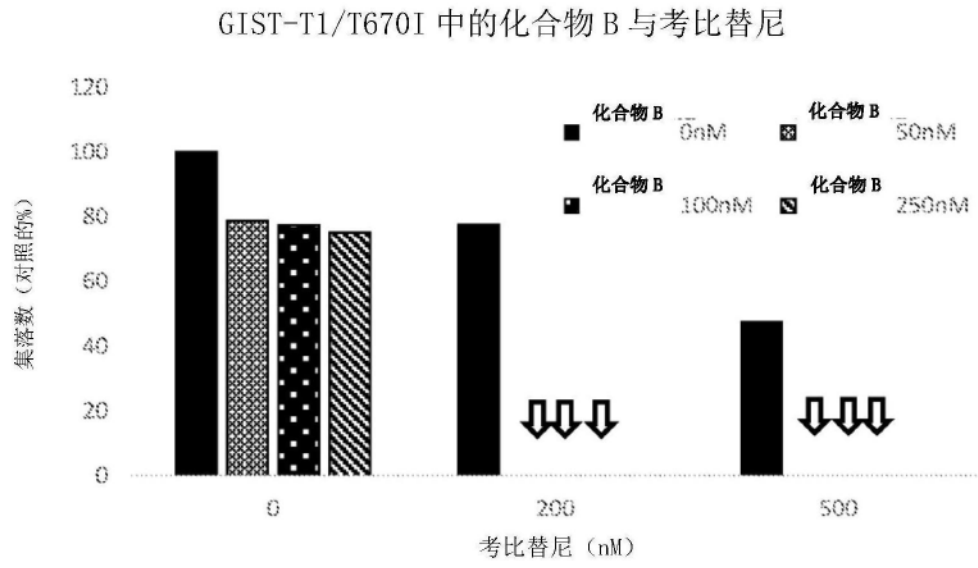
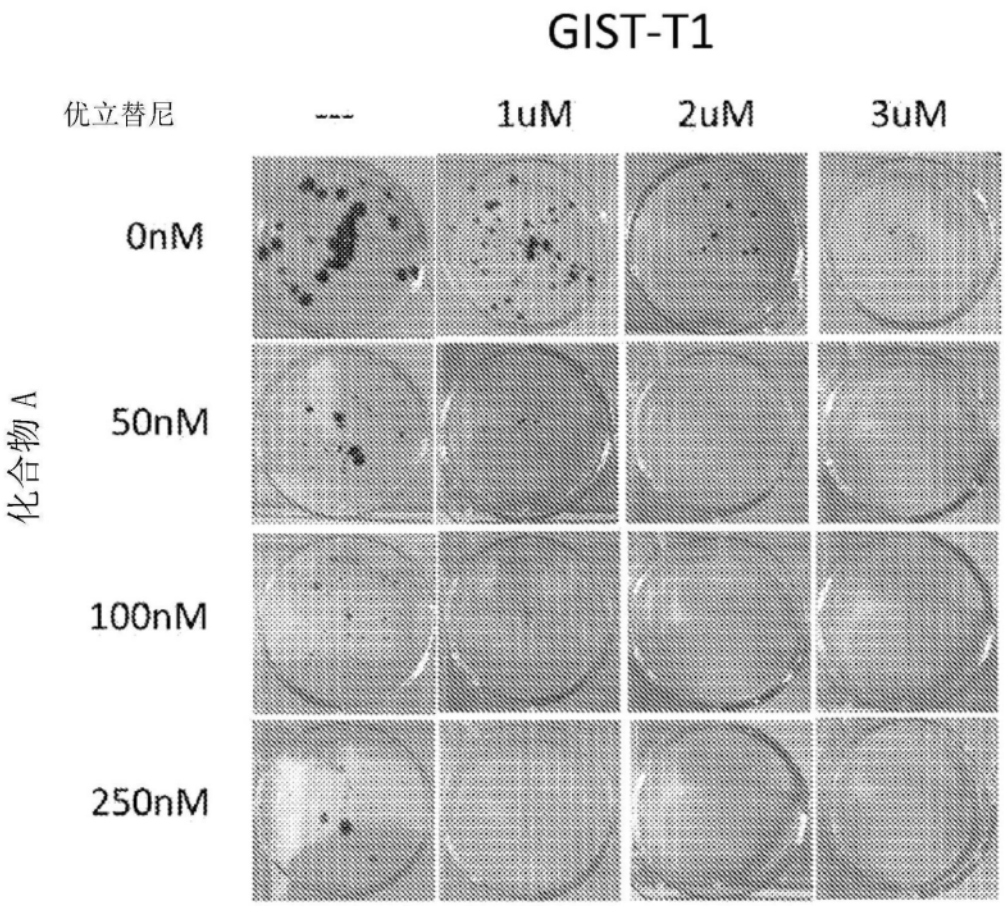

GIST-T1/T670I 中的化合物 B 与考比替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
200
500
考比替尼（nM）

图13C


GIST-T1
优立替尼

1uM
2uM
3uM
化合物 A
0nM
50nM
100nM
250nM

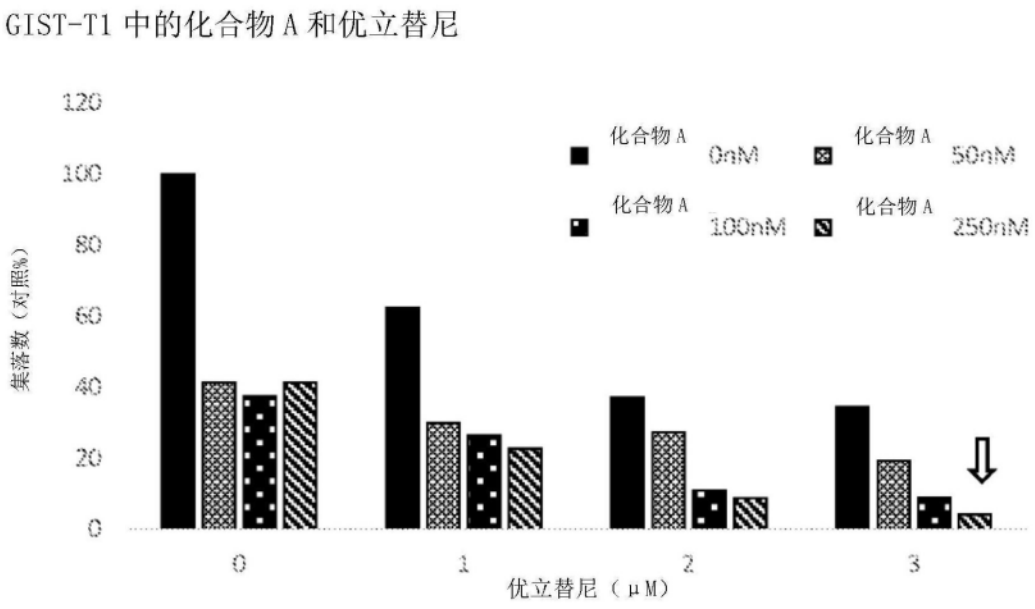
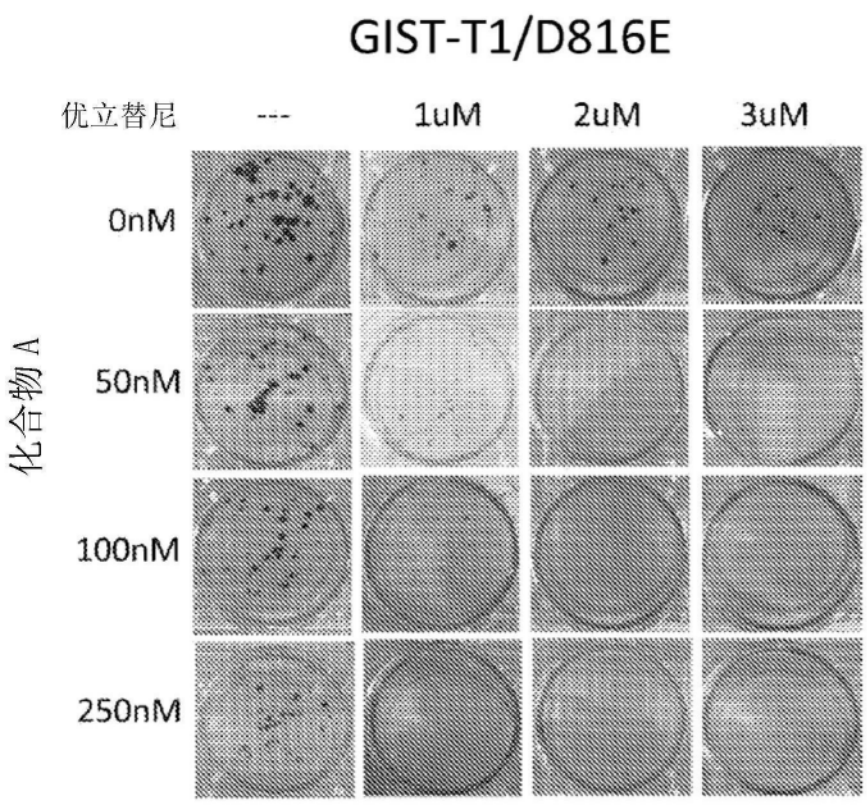

GIST-T1 中的化合物 A 和优立替尼
集落数（对照%）
120
100
80
60
40
20
0
化合物 A 0nM
化合物 A 50nM
化合物 A 100nM
化合物 A 250nM
0
1
2
3
优立替尼（μM）

图14A


GIST-T1/D816E
优立替尼

1uM
2uM
3uM
化合物 A
0nM
50nM
100nM
250nM

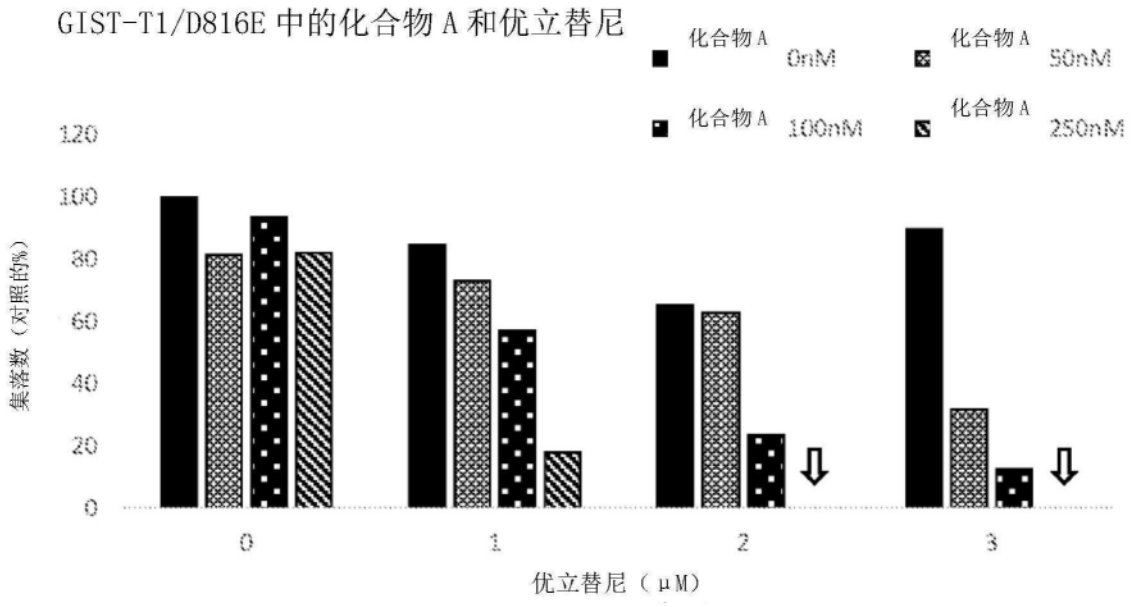
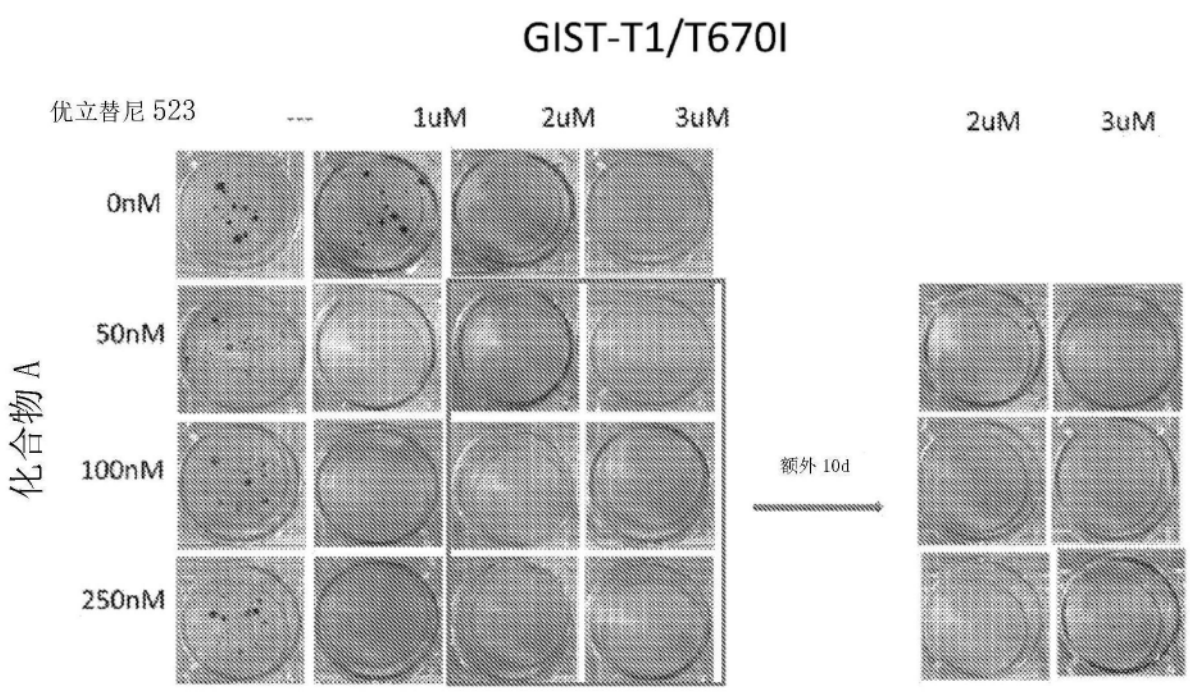

GIST-T1/D816E 中的化合物 A 和优立替尼
化合物 A 0nM
化合物 A 50nM
化合物 A 100nM
化合物 A 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
优立替尼（μM）

图14B


GIST-T1/T670I
优立替尼 523

1uM
2uM
3uM
2uM
3uM
0nM
50nM
100nM
250nM
化合物 A
额外 10d

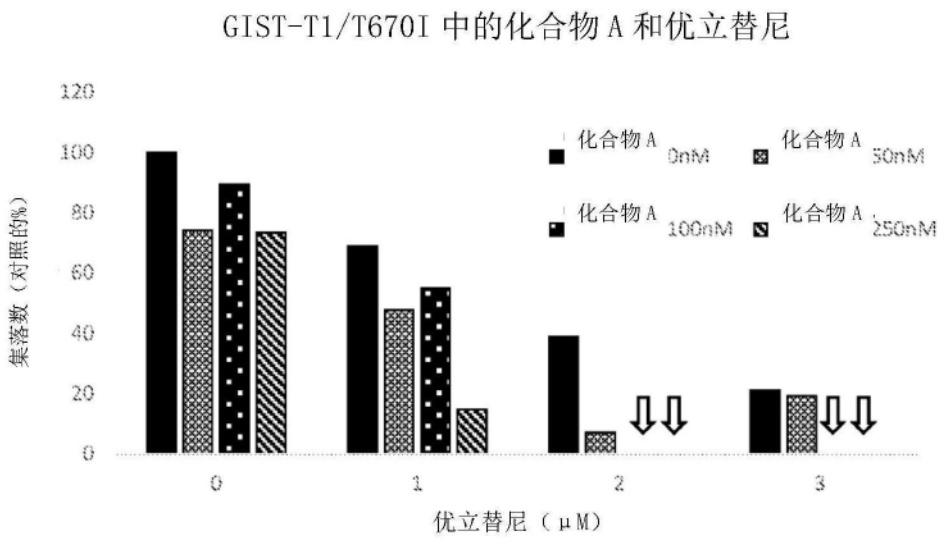
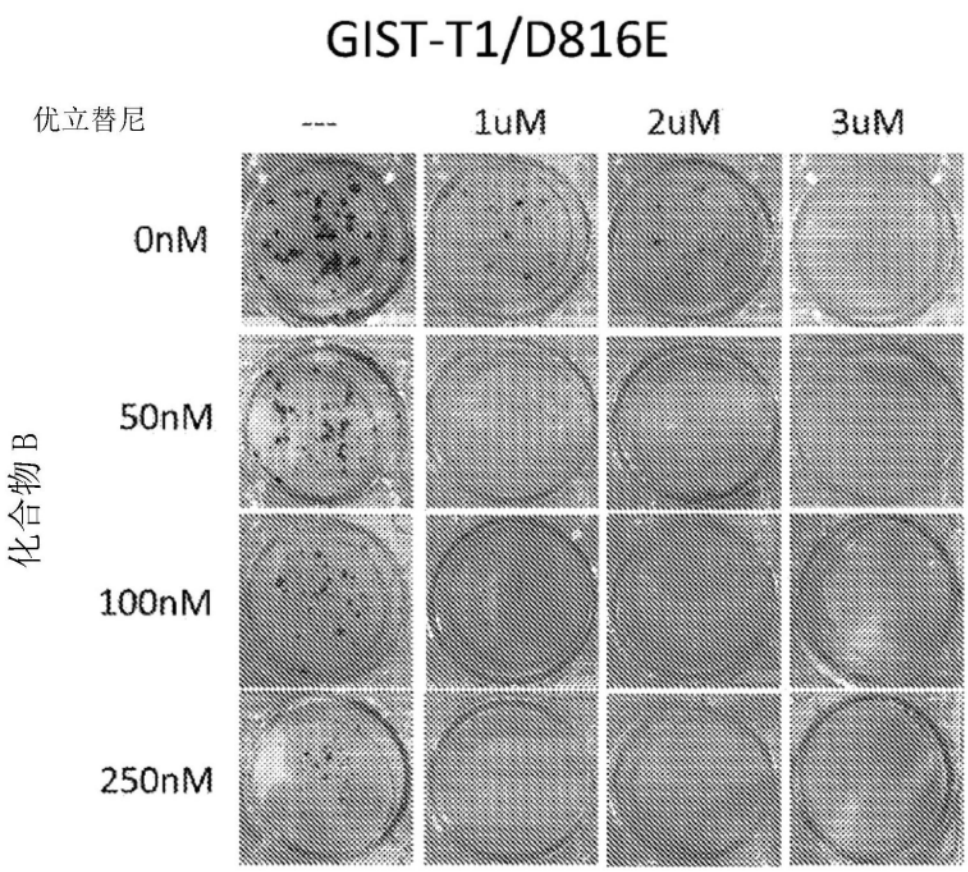

GIST-T1/T670I 中的化合物 A 和优立替尼
120
100
80
60
40
20
0
集落数（对照的%）
化合物 A 0nM
化合物 A 50nM
化合物 A 100nM
化合物 A 250nM
0
1
2
3
优立替尼（μM）

图14C


GIST-T1/D816E
优立替尼

1uM
2uM
3uM
0nM
50nM
100nM
250nM
化合物 B

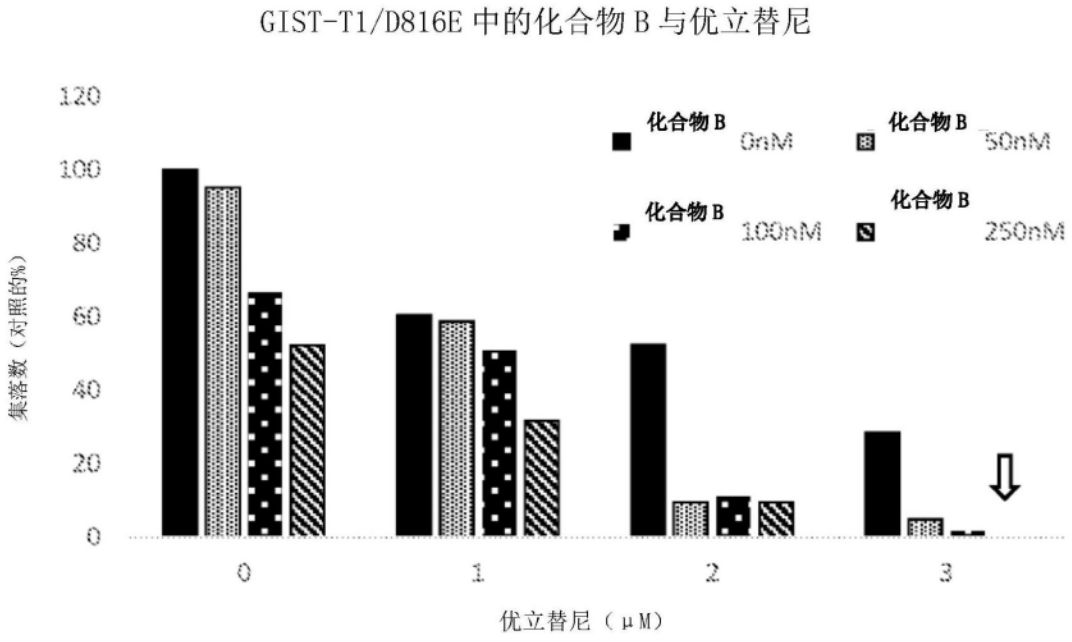

GIST-T1/D816E 中的化合物 B 与优立替尼
化合物 B 0nM
化合物 B 50nM
化合物 B 100nM
化合物 B 250nM
集落数（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
优立替尼（μM）

图15

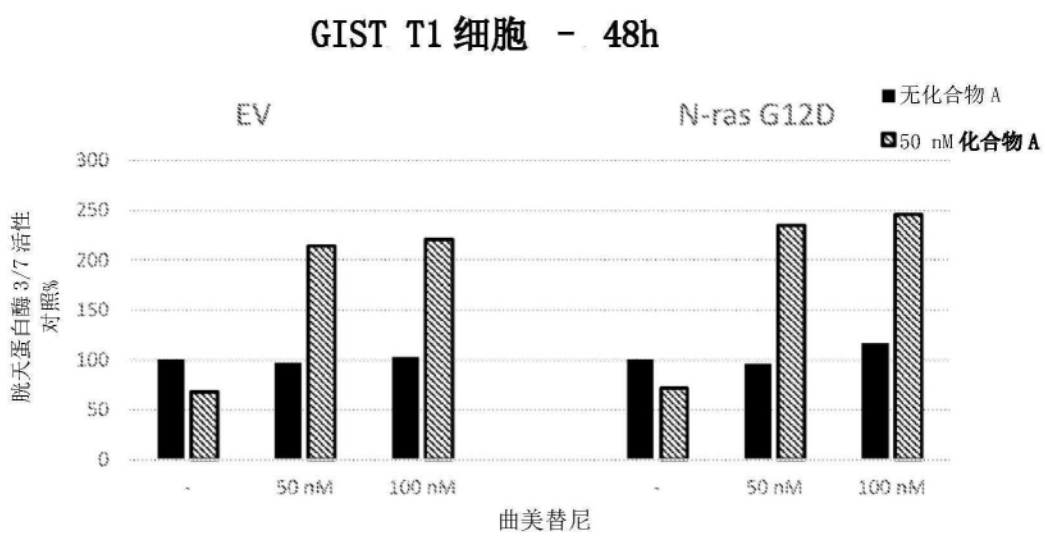


图16A

图 16B. 1

图 16B. 2

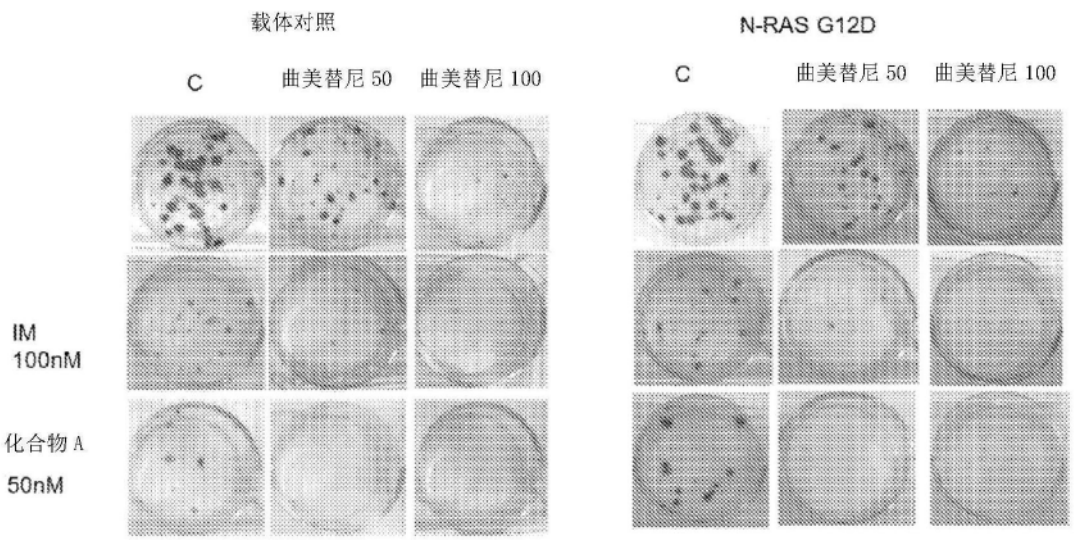
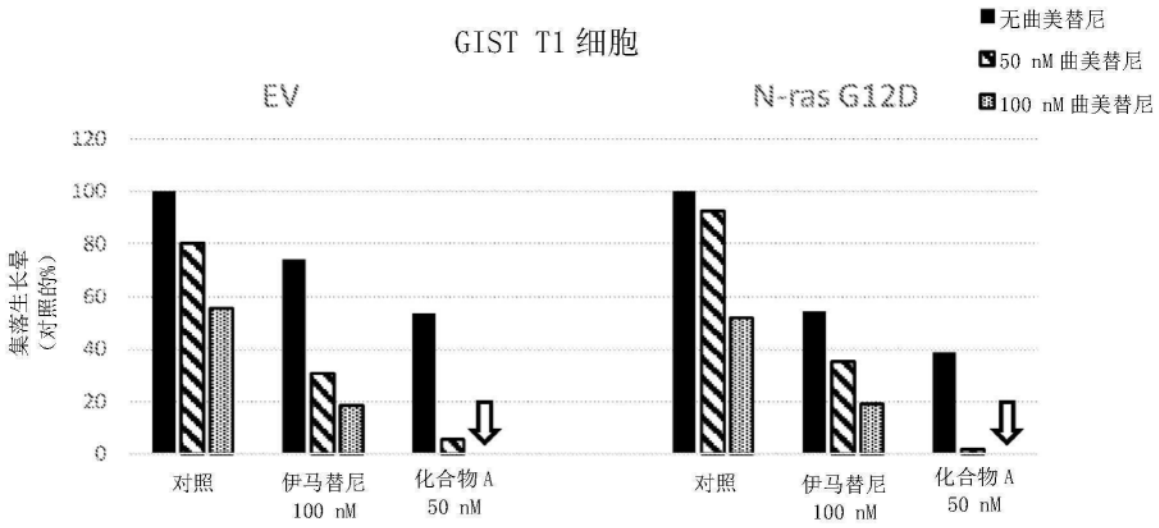


图 16C. 1

图 16C. 2



2 周药物处理、21 天恢复

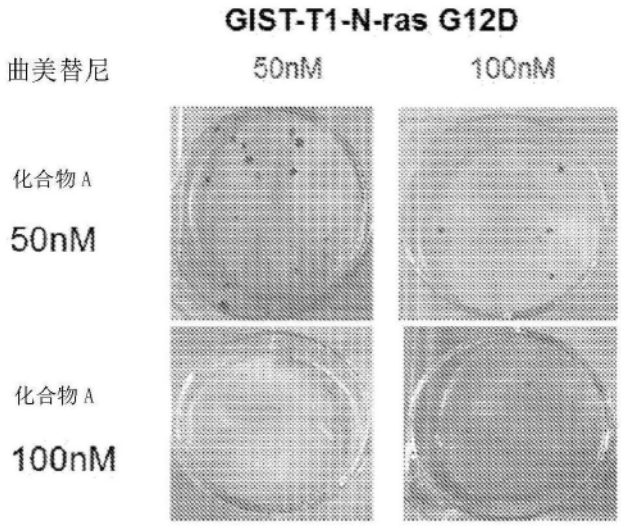


图16D

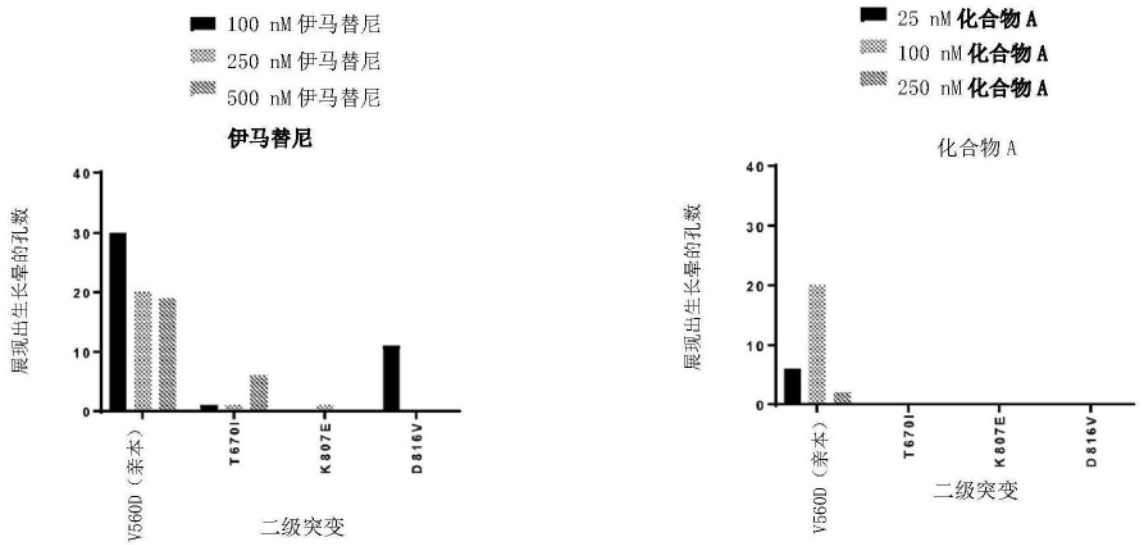

100 nM 伊马替尼
250 nM 伊马替尼
500 nM 伊马替尼
伊马替尼
展现出生长晕的孔数
40
30
20
10
0
V560D（亲本）
T670I
K807E
D816V
二级突变
25 nM 化合物 A
100 nM 化合物 A
250 nM 化合物 A
化合物 A
展现出生长晕的孔数
40
30
20
10
0
V560D（亲本）
T670I
K807E
D816V
二级突变

图17A

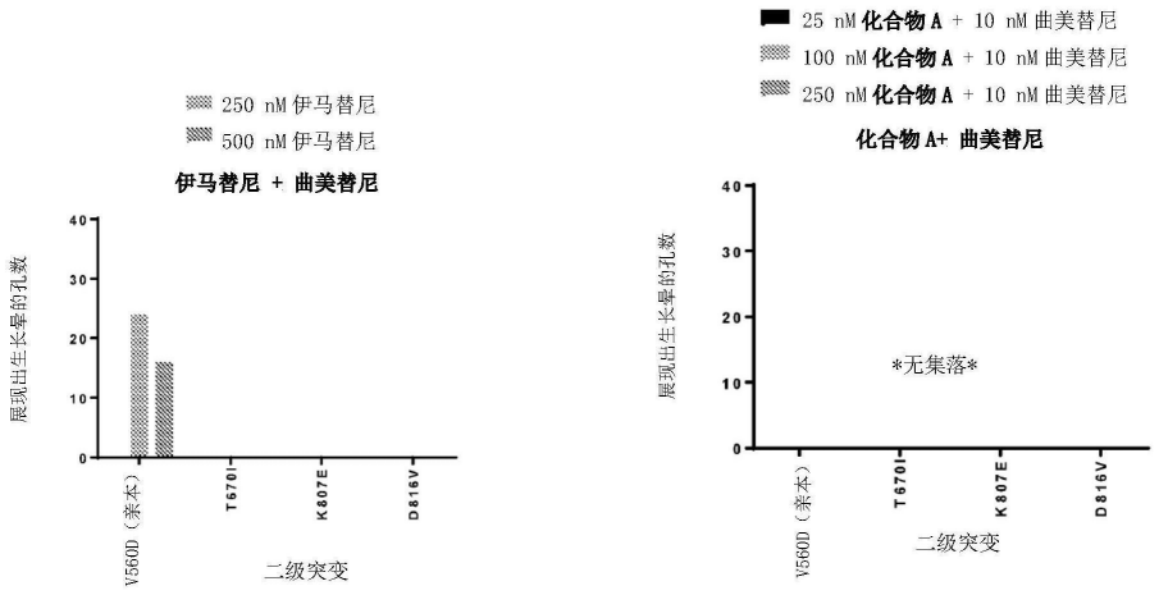

250 nM 伊马替尼
500 nM 伊马替尼
伊马替尼 + 曲美替尼
展现出生长晕的孔数
40
30
20
10
0
V560D（亲本）
T670I
K807E
D816V
二级突变
25 nM 化合物 A + 10 nM 曲美替尼
100 nM 化合物 A + 10 nM 曲美替尼
250 nM 化合物 A + 10 nM 曲美替尼
化合物 A+ 曲美替尼
展现出生长晕的孔数
40
30
20
10
0
无集落
V560D（亲本）
T670I
K807E
D816V
二级突变

图17B

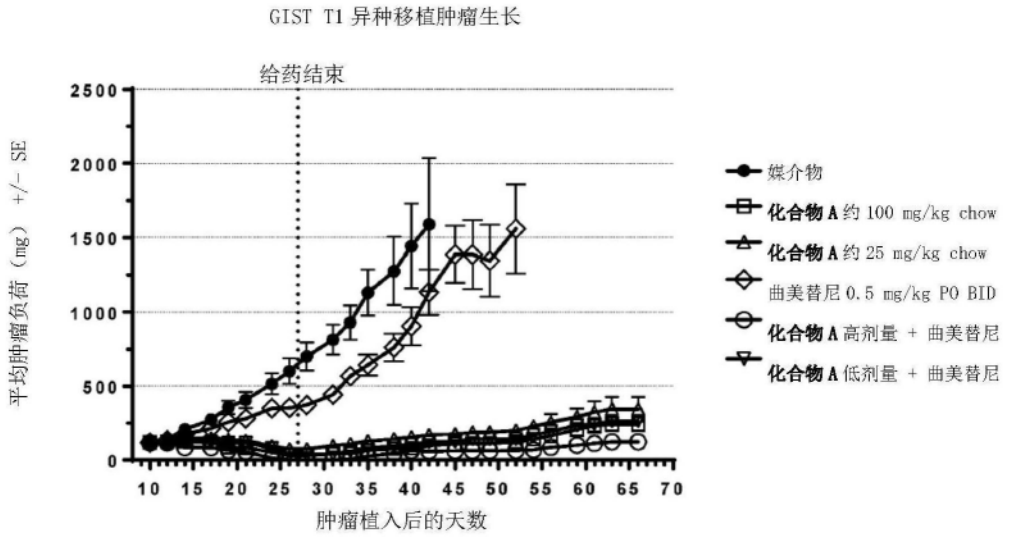

GIST T1 异种移植肿瘤生长
给药结束
平均肿瘤负荷（mg） +/- SE
2500
2000
1500
1000
500
0
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
肿瘤植入后的天数
媒介物
化合物 A 约 100 mg/kg chow
化合物 A 约 25 mg/kg chow
曲美替尼 0.5 mg/kg PO BID
化合物 A 高剂量 + 曲美替尼
化合物 A 低剂量 + 曲美替尼

图18A

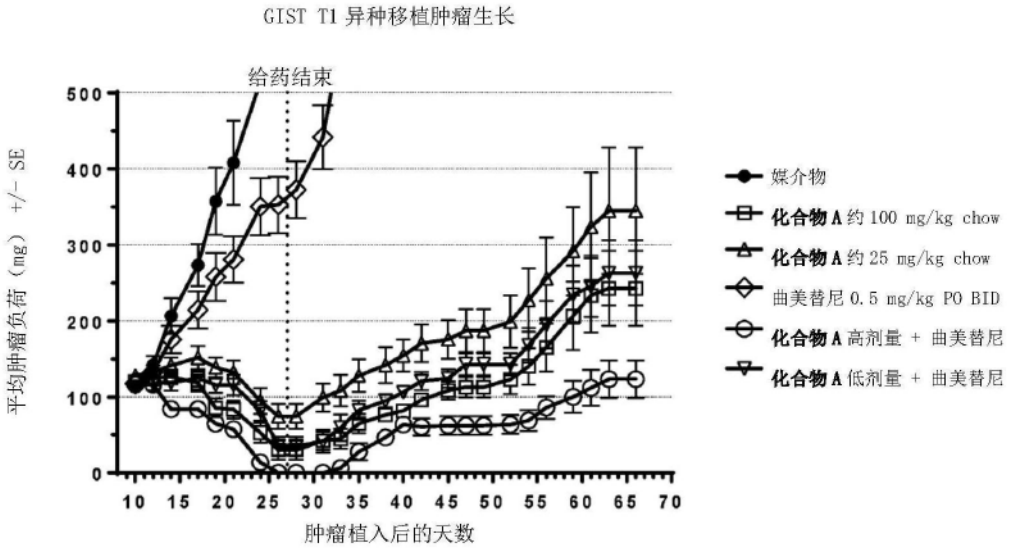

GIST T1 异种移植肿瘤生长
给药结束
平均肿瘤负荷（mg） +/- SE
500
400
300
200
100
0
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
肿瘤植入后的天数
媒介物
化合物 A 约 100 mg/kg chow
化合物 A 约 25 mg/kg chow
曲美替尼 0.5 mg/kg PO BID
化合物 A 高剂量 + 曲美替尼
化合物 A 低剂量 + 曲美替尼

图18B