201924683

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201924683 A

(43)公開日： 中華民國 108 (2019) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：107144094 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 12 月 07 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/4545 (2006.01)* *A61K31/519 (2006.01)*
A61P35/02 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/08 美國 62/596,553

(71)申請人：美商英塞特公司 (美國) INCYTE CORPORATION (US)
美國
美商H李莫菲特癌症中心及研究協會公司 (美國) H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE, INC. (US)
美國

(72)發明人：克畢思 荷莉 KOBLISH, HOLLY (US)；魯瑟 蓋瑞 REUTHER, GARY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：5 共 38 頁

(54)名稱

用於治療骨髓增生性贅瘤的低劑量組合療法

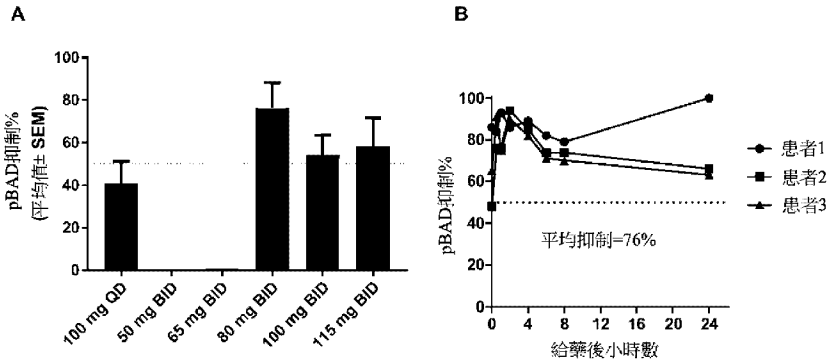
LOW DOSE COMBINATION THERAPY FOR TREATMENT OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

(57)摘要

本申請案係關於使用與低劑量 Pim 抑制劑 N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺組合之 JAK1/JAK2 抑制劑魯索替尼治療骨髓增生性贅瘤，其中該組合在低劑量 Pim 抑制劑下出乎意料地具有協同作用。

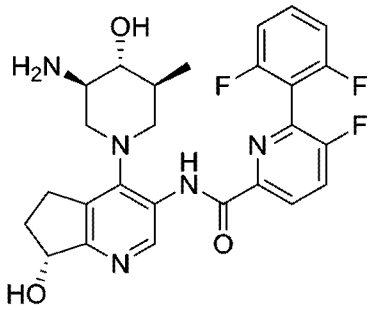
The present application relates to treatment of myeloproliferative neoplasms using the JAK1/JAK2 inhibitor, ruxolitinib, in combination with a low dose of a Pim inhibitor, N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-amino-4-hydroxy-5-methylpiperidin-1-yl]-7-hydroxy-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]pyridin-3-yl}-6-(2,6-difluorophenyl)-5-fluoropyridine-2-carboxamide, wherein the combination is unexpectedly synergistic at a very low dose of the Pim inhibitor.

指定代表圖：



【圖 5(A-B)】

特徵化學式：



化合物1

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於治療骨髓增生性贅瘤的低劑量組合療法

【英文發明名稱】LOW DOSE COMBINATION THERAPY FOR TREATMENT OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於使用與低劑量Pim抑制劑N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺組合之JAK1/JAK2抑制劑魯索替尼(ruxolitinib)治療骨髓增生性贅瘤，其中該組合在低劑量Pim抑制劑下出乎意料地具有協同作用。

【先前技術】

【0002】 在患有經典費城染色體陰性(Ph-) 骨髓增生性贅瘤 (MPN)之大部分患者中發現Janus激酶2 (JAK2)中之活化的V617F突變為開發JAK2之醫藥抑制劑提供了強大的推動力，以2011年監管批准JAK1/2抑制劑魯索替尼用於患有骨髓纖維化(MF)之患者及2014年用於患有羥基尿素 (HU)抗性/耐受性真性紅血球增多症 (PV) 之患者達到高潮。魯索替尼在患有與JAK2突變狀態無關之MF之患者中的活性係一個重大觀察結果，該結果由MPN中JAK-信號轉導子及轉錄活化因子(STAT)路徑之普遍活化的發現證明是正確的。

【0003】 然而，因為JAK2信號傳導未受到長期抑制且在以JAK2抑制劑治療之患者中沒有觀察到分子緩解，所以需要新穎療法來改善患者治療結果。本申請案係有關於此需要及其他需要。

【發明內容】

【0004】 本申請案尤其提供治療有需要之患者的骨髓增生性贅瘤的方法，其包含投與該患者N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-

6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽，及魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽。

【0005】 本申請案進一步提供治療有需要之患者的骨髓增生性贅瘤的方法，其包含投與該患者約5毫克/天至約100毫克/天劑量之N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽，及治療有效量之魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽。

【0006】 本申請案亦提供治療有需要之患者的骨髓增生性贅瘤的方法，其包含投與該患者約5毫克/天至約100毫克/天劑量之N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽，及約10毫克/天至約50毫克/天劑量之魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽。

【0007】 本申請案進一步提供本文所述之劑量的化合物的用途，其用於製造用以治療骨髓增生性贅瘤的藥劑。

【0008】 本申請案亦提供用於治療骨髓增生性贅瘤的本文所述劑量之化合物。

【0009】 一或多個實施例之詳情在以下說明中闡述。其他特徵、目的及優勢將自說明書及申請專利範圍顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0010】 圖1(A、B及C) 分別針對未經處理之細胞或以魯索替尼(Rux)或化合物1(PIMi)，及以此等兩者一起(Rux+PIMi)處理之細胞描繪BaF3/EpoR/JAK2-V617F、UKE1及SET2細胞中的生長%。

【0011】 圖2 (A及B) 描繪以媒劑(DMSO)、魯索替尼、化合物1(PIMi)或兩種

藥物一起處理之UKE1及SET2細胞中膜聯蛋白V+%。

【0012】 圖3描繪在DMSO-媒劑、50 nM 魯索替尼(Rux)、20 nM或5 nM化合物1(PIMi)或組合之兩種藥物存在下MPN患者(PV，JAK2-V617F +)的外周血單核細胞中之生長%。12天后對Epo獨立性紅血球系群落進行計分。結果展示於圖3中。使用Bliss獨立模型之組合的預期生長%由具有點線之透明條狀物指示。更低的生長%量測值指示協同作用。

【0013】 圖4描繪未經處理(僅DMSO)或以所指示濃度之化合物1(PIMi)或魯索替尼處理之MPN患者粒細胞的免疫印跡分析。

【0014】 圖5(A) 描繪給予化合物1後第24小時患者血漿樣本的pBAD抑制%。

【0015】 圖5(B)描繪對於80 mg BID化合物1而言第1週期第8天患者血漿樣本的pBAD抑制%。

【實施方式】

【0016】 對於術語「例如」及「諸如」及其語法等效物而言，除非另外明確說明，否則片語「但不限於」應理解為跟隨。

【0017】 如本文所用，除非上下文另外明確說明，否則單數形式「一個/種(a/an)」、及「該/該等(the)」包括複數指示物。

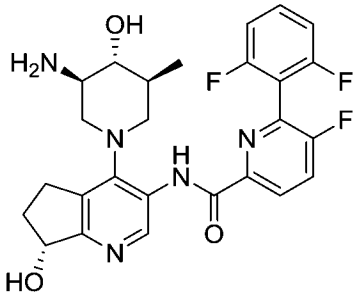
【0018】 如本文所用，術語「約」意謂「近似」(例如，所指示值加或減約10%)。

【0019】 本發明係關於與PIM抑制劑組合之JAK1/JAK2抑制劑魯索替尼的用途，其用於治療骨髓增生性贅瘤。已經出人意料地發現極低劑量之PIM抑制劑與低於IC_{50}且遠低於PIM抑制劑的含量之魯索替尼具有協同作用。

【0020】 魯索替尼，即 (3R)-3-環戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈為JAK1及JAK2之抑制劑 。魯索替尼之IC_{50}藉由在1 mM ATP時

下文之檢定A量測且發現在JAK1及JAK2時小於10 nM。魯索替尼可以藉由2006年12月12日申請之US 7,598,257 (實例67)中所述之程序製得，其全文以引用的方式併入本文中。魯索替尼磷酸鹽可以如US 2008/0312259中所述製備，其全文以引用的方式併入本文中。

【0021】 N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊二烯并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺(下文之化合物1)為Pim1、Pim2及Pim3之抑制劑。化合物1可以如美國專利9,200,004或US 2017/0121310中所述製備，該等專利中每一者之全文以引用的方式併入本文中。化合物1之IC_{50}藉由下文檢定B中之程序量測且發現在Pim1、Pim2及Pim3時為≤ 100 nM。化合物1之磷酸鹽、二鹽酸鹽、鹽酸鹽、順丁烯二酸鹽、己二酸鹽、氫溴酸鹽、(R)-(-)-杏仁酸鹽、水楊酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、L-焦麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、(1S)-(+)-10-樟腦磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、硫酸鹽、L-酒石酸鹽及D-酒石酸鹽可以如US 2017/0121310中所述製備，其全文以引用的方式併入本文中。化合物1之二鹽酸鹽及磷酸鹽之IC_{50}藉由下文檢定B中之程序量測且發現在Pim1、Pim2及Pim3時為< 35 nM。



化合物1

【0022】 因此，本申請案提供一種治療有需要之患者的骨髓增生性贅瘤的方法，其包含投與該患者N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽，及魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽。

毫克/天至約30毫克/天。

【0044】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約10毫克/天至約50毫克/天。

【0045】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約10毫克/天至約30毫克/天。

【0046】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約10毫克/天。

【0047】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約20毫克/天。

【0048】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約30毫克/天。

【0049】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約5 mg BID至約25 mg BID。

【0050】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約5 mg BID至約15 mg BID。

【0051】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約5 mg BID。

【0052】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約10 mg BID。

【0053】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為約15 mg BID。

【0054】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之劑量為魯索替尼磷酸鹽。

【0055】 在一些實施例中，N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽選自N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺之磷酸鹽、二鹽酸鹽、鹽酸鹽、順丁烯二酸鹽、己二酸鹽、氫溴酸鹽、(R)-(-)-杏仁酸鹽、水楊酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、L-焦麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、(1S)-(+)-10-樟腦磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、硫酸鹽、L-酒石酸鹽及D-酒石酸鹽。

【0056】 在一些實施例中，N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽為N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺之磷酸鹽。

【0057】 在一些實施例中，骨髓增生性贅瘤選自真性紅血球增多症 (PV)、原發性血小板增多症(ET)、原發性骨髓纖維化、慢性骨髓性白血病 (CML)、慢性骨髓單核細胞性白血病 (CMML)、嗜伊紅血球增多症候群(HES)、系統性肥大細胞病 (SMCD)、慢性嗜中性粒細胞性白血病(CNL)及慢性嗜伊紅血球性白血病。

【0058】 在一些實施例中，骨髓增生性贅瘤選自真性紅血球增多症 (PV)。

【0059】 在一些實施例中，骨髓增生性贅瘤選自原發性血小板增多症(ET)。

【0060】 在一些實施例中，骨髓增生性贅瘤選自原發性骨髓纖維化。

【0061】 在一些實施例中，骨髓增生性贅瘤为骨髓纖維化。

【0062】 在一些實施例中，魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽及N-{(7R)-4-

低發展該疾病、病狀或病症之風險。術語「BID」意謂每日兩次。

其他組合

【0071】 癌細胞生長及存活可受多個信號傳導路徑影響。因此，組合在激酶中展現不同偏好之不同激酶抑制劑(其調節該等激酶之活性)來治療此等病狀係適用的。靶向一個以上信號傳導路徑(或既定信號傳導路徑中所涉及之一個以上生物分子)可降低細胞群中出現抗藥性之可能性及/或降低治療之毒性。

【0072】 因此，該等方法可以進一步包含投與一或多種其他激酶。例如，本發明化合物可與以下激酶之一或多種抑制劑組合用於治療癌症：Akt1、Akt2、Akt3、TGF-βR、PKA、PKG、PKC、CaM-激酶、磷酸化酶激酶、MEKK、ERK、MAPK、mTOR、EGFR、HER2、HER3、HER4、INS-R、IGF-1R、IR-R、PDGFαR、PDGFβR、CSFIR、KIT、FLK-II、KDR/FLK-1、FLK-4、flt-1、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、c-Met、Ron、Sea、TRKA、TRKB、TRKC、FLT3、VEGFR/Flt2、Flt4、EphA1、EphA2、EphA3、EphB2、EphB4、Tie2、Src、Fyn、Lck、Fgr、Btk、Fak、SYK、FRK、JAK、ABL、ALK及B-Raf。此外，本發明之Pim抑制劑可與和PIK3/Akt/mTOR信號傳導路徑相關之激酶的抑制劑組合，該等激酶諸如PI3K、Akt (包括Akt1、Akt2及Akt3)及mTOR激酶。

【0073】 該等方法可以進一步用於與其他治療方法組合使用，例如化學療法、輻射或手術。該等化合物可與一或多種抗癌藥物(諸如化學治療劑)組合投與。例示性化學治療劑包括以下中之任一者：阿巴瑞克(abarelix)、阿地白介素(aldesleukin)、阿侖單抗(alemtuzumab)、阿利維A酸(alitretinoin)、別嘌呤醇(allopurinol)、六甲蜜胺(altretamine)、阿那曲唑(anastrozole)、三氧化二砷(arsenic trioxide)、天冬醯胺酸酶(asparaginase)、阿紮胞苷(azacitidine)、貝伐單

抗(bevacizumab)、貝沙羅汀(bexarotene)、博萊黴素(bleomycin)、bortezombi、硼替佐米(bortezomib)、靜脈劑型白消安(busulfan intravenous)、口服劑型白消安(busulfan oral)、卡普睪酮(calusterone)、卡培他濱(capecitabine)、卡鉑(carboplatin)、卡莫司汀(carmustine)、西妥昔單抗(cetuximab)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、順鉑(cisplatin)、克拉屈濱(cladribine)、氯法拉濱(clofarabine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、達卡巴嗪(dacarbazine)、放線菌素D (dactinomycin)、達肝素鈉(dalteparin sodium)、達沙替尼(dasatinib)、柔紅黴素(daunorubicin)、地西他濱(decitabine)、地尼白介素(denileukin)、地尼白介素-毒素連接物(denileukin diftitox)、右雷佐生(dexrazoxane)、多西他賽(docetaxel)、多柔比星(doxorubicin)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、依庫珠單抗(eculizumab)、表柔比星(epirubicin)、埃羅替尼(erlotinib)、雌莫司汀(estramustine)、磷酸依託泊苷(etoposide phosphate)、依託泊苷(etoposide)、依西美坦(exemestane)、檸檬酸芬太尼(fentanyl citrate)、非格司亭(filgrastim)、氟尿苷(floxuridine)、氟達拉濱(fludarabine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)、氟維司群(fulvestrant)、吉非替尼(gefitinib)、吉西他濱(gemcitabine)、吉妥珠單抗奧佐米星(gemtuzumab ozogamicin)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸組氨瑞林(histrelin acetate)、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、伊達比星(idarubicin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)、干擾素α 2a (interferon alfa 2a)、伊立替康(irinotecan)、二甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)、來那度胺(lenalidomide)、來曲唑(letrozole)、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、左旋咪唑(levamisole)、洛莫司汀(lomustine)、氮芥(mecloretha mine)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、美法侖(melphalan)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、甲氨蝶呤

(methotrexate)、甲氧沙林(methoxsalen)、絲裂黴素C (mitomycin C)、米托坦(mitotane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、苯丙酸南諾龍(nandrolone phenpropionate)、奈拉濱(nelarabine)、諾菲單抗(nofetumomab)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、紫杉醇(paclitaxel)、帕米膦酸鹽(pamidronate)、帕尼單抗(panitumumab)、培門冬酶(pegaspargase)、聚乙二醇非格司亭(pegfilgrastim)、培美曲塞二鈉(pemetrexed disodium)、噴司他丁(pentostatin)、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡黴素(plicamycin)、丙卡巴肼(procarbazine)、奎納克林(quinacrine)、拉布立酶(rasburicase)、利妥昔單抗(rituximab)、魯索替尼、索拉非尼(sorafenib)、鏈佐星(streptozocin)、舒尼替尼(sunitinib)、蘋果酸舒尼替尼(sunitinib maleate)、他莫昔芬(tamoxifen)、替莫唑胺(temozolomide)、替尼泊苷(teniposide)、睾內酯(testolactone)、沙利度胺(thalidomide)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、硫替派(thiotepa)、托泊替康(topotecan)、托瑞米芬(toremifene)、托西莫單抗(tositumomab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、維甲酸(tretinoin)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、戊柔比星(valrubicin)、長春鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)、長春瑞濱(vinorelbine)、伏立諾他(vorinostat)及唑來膦酸鹽(zoledronate)。

【0074】 本發明之Pim抑制劑可進一步與一或多種消炎劑、類固醇、免疫抑制劑或治療性抗體組合使用。

【0075】 當向患者投與一種以上醫藥劑時，其可同時、順序或組合(例如，對於兩種以上藥劑而言)投與。

組合物

【0076】 該等化合物可以醫藥組合物形式投與。此等組合物可以醫藥技術中熟知之方式製備，且可視指示局部治療抑或全身治療及欲治療之區域而定，藉

如防治或治療)、患者狀態、投藥方式及其類似因素而變化。在治療應用中，組合物可以足以治癒或至少部分遏制疾病及其併發症之症狀的量投與已罹患該疾病之患者。有效劑量將視以下而定：所治療之疾病病況，以及主治醫師根據諸如疾病嚴重程度，患者之年齡、體重及一般狀況及其類似因素之因素所作的判斷。

【0092】 投與患者之組合物可呈上述醫藥組合物形式。此等組合物可藉由習知滅菌技術來滅菌，或可無菌過濾。水溶液可經封裝以原樣使用，或凍乾，經凍乾製劑在投與之前與無菌水性載劑組合。化合物製劑之pH通常將在3與11之間、更佳為5至9且最佳為7至8。應瞭解，使用某些前述賦形劑、載劑或穩定劑將引起形成醫藥鹽。

套組

【0093】 本申請案亦包括適用的醫藥套組，該等套組包括一或多個容器，其含有包含治療有效量之化合物或其任一實施例的醫藥組合物。該等套組可進一步包括一或多種各種習知醫藥套組組分，諸如具有一或多種醫藥學上可接受載劑的容器，其他容器等，如熟習此項技術者顯而易見。指示欲投與組分之數量、投藥準則及/或混合該等組分之準則的呈插頁或者標籤形式之說明書亦包括於套組中。

【0094】 本發明將藉助於特定實例更詳細地加以描述。提供以下實例以達成說明性目的，且不欲以任何方式限制本發明。熟習此項技術者應容易瞭解可改變或修改以生成基本上相同結果之多種非關鍵性參數。根據本文所描述之至少一種檢定，發現實例之化合物為Pim激酶抑制劑。

實例

實例A：活體外JAK激酶檢定

【0095】 根據Park等人, Analytical Biochemistry **1999**, 269, 94-104中所述之以下活體外檢定測試本文化合物對JAK目標之抑制活性。使用桿狀病毒在昆蟲細胞中表現人類JAK1 (a.a. 837-1142)、JAK2 (a.a. 828-1132)及JAK3 (a.a. 781-1124)之催化域且加以純化。藉由量測生物素化肽之磷酸化來分析JAK1、JAK2或JAK3之催化活性。藉由均質時間解析螢光(homogenous time resolved fluorescence；HTRF)偵測磷酸化肽。在含有於具有100 mM NaCl、5 mM DTT及0.1 mg/mL(0.01%)BSA之50 mM Tris(pH 7.8)緩衝液中之酶、ATP及500 nM肽的40 μL反應中量測化合物針對各激酶之IC_{50}。 對於1 mM IC_{50}量測值，反應中之ATP濃度為1 mM。反應在室溫下進行1小時，接著以檢定緩衝液(Perkin Elmer, Boston, MA)中之20 μL 45 mM EDTA, 300 nM SA-APC, 6 nM Eu-Py20停止。與經銪標記抗體結合40分鐘且在PHERA star盤讀取器(BMG, Cary, NC)上量測HTRF信號。藉由在實例A檢定中以1 mM ATP測試化合物獲得JAK1及/或JAK2抑制劑之資料。

實例B. Pim酶檢定

【0096】 Pim-1及Pim-3激酶檢定：在25℃下在白色384孔聚苯乙烯板中進行20 μL反應持續1小時，該等板點漬有存於檢定緩衝液(50 mM Tris，pH 7.5，0.01% Tween-20，5 mM $MgCl_2$，0.01% BSA，5 mM DTT)中之0.8 μL化合物/DMSO，含有0.05 μM經生物素標記之BAD肽受質(AnaSpec 62269)、1 mM ATP及2.5 pM (Pim-1，Invitrogen PV3503)或1.25 pM (Pim-3，Millipore 14-738)酶。藉由添加10 μL STOP緩衝液(150 mM Tris，pH=7.5，150 mM NaCl，75 mM EDTA，0.01% Tween-20，0.3% BSA)終止反應，該緩衝液補充有稀釋666倍之磷酸化-Bad (Ser112)抗體(細胞信號傳導9291)及各自15 μg/mL之抗生蛋白鏈菌素供體珠粒(PerkinElmer 6760002)連同蛋白質-A受體珠粒(PerkinElmer 6760137)。

在減少光照下進行STOP緩衝液補充珠粒及終止反應。在終止反應之前，將具有珠粒之STOP緩衝液在黑暗中在室溫下預培育1小時。在終止反應之後，將板在黑暗中在室溫下培育1小時，隨後在減少光照下於PHERAstar FS板讀取器(BMG Labtech)上讀取。

【0097】 Pim-2激酶檢定：在25℃下在白色384孔聚苯乙烯板中進行20 μL反應持續2小時，該等板點漬有於檢定緩衝液(50 mM Tris，pH 7.5，0.01% Tween-20，5 mM $MgCl_2$，0.01% BSA，5 mM DTT)中之0.8 μL化合物/DMSO，含有0.05 μM經螢光素標記之CREBtide肽受質(Invitrogen PV3508)、1 mM ATP及1 nM酶(Invitrogen PV3649)。藉由添加具有30 mM EDTA及1.5 nM LanthaScreen Tb-CREB pSer133 抗體(Invitrogen PV3566)之10 μL TR-FRET稀釋緩衝液(Invitrogen PV3574)來終止反應。在室溫下培育30分鐘之後，在PHERAstar FS板讀取器(BMG Labtech)上讀取板。

【0098】 當在以上所公開之檢定條件下針對PIM激酶活性進行測試時，認為具有2 μM或更小之IC_{50}之本發明化合物具有活性。

【0099】 雖然以上活體外檢定係在1 mM ATP下進行，但亦可利用K_m條件針對效力及對抗PIM標靶之活體外活性來評價化合物，其中ATP濃度設定為K_m值且該檢定對PIM抑制活性更敏感。

實例C. Pim細胞檢定

【0100】 根據以下細胞檢定中之至少一者針對PIM之抑制活性測試一或多種本發明化合物。當在以下所公開之細胞檢定條件下針對PIM激酶活性進行測試時，具有10 μM或更小之IC_{50}之本發明化合物將且被認為具有活性。

Pim細胞增殖檢定

【0101】 KG-1A細胞係購自ATCC (Manassas, VA)且KMS.12.BM細胞係購自

Danver, MA, Sigma, St Louis MO, EMD, USA)添加至該等球粒料，充分混合且置於冰上30分鐘。溶菌液在-80℃下冷凍隔夜。為了量測pBAD活性，利用細胞信號傳導ELISA (酶聯免疫吸附檢定)套組(細胞信號傳導路徑掃描磷光體pBAD ELISA)。根據ELISA方案測試50 μL溶菌液且在SpectraMax® M5板讀取器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上藉由軟體進行資料分析。藉由使用GraphPad Prism® 5.0軟體擬合抑制百分比相對於抑制劑濃度對數的曲線進行IC_{50}測定。

實例1：Pim抑制劑-化合物1與魯索替尼協同以抑制MPN模型細胞生長

【0103】 BaF3/EpoR/JAK2-V617F、UKE1及SET2細胞未經處理(僅DMSO-媒劑)或以魯索替尼(Rux)或化合物1及此等兩者一起 (Rux+PIMi)處理。BaF3/EpoR/JAK2-V617F細胞之結果展示於圖1(A)中；UKE1細胞之結果展示於圖1(B)中；且SET2細胞之結果展示於圖1(C)中。在72小時藉由CellTiter-Glo進行協同研究。使用Bliss獨立模型之組合的預期生長%由點線指示：更低的生長%量測值指示協同作用。

實例2：化合物1與魯索替尼協同誘發細胞凋亡。

【0104】 以DMSO、魯索替尼、化合物1(PIMi)或此等兩者一起處理UKE1及SET2細胞。使用FITC 膜聯蛋白V及PI對細胞進行染色且藉由流動式細胞測量術進行分析。誤差條指示標準偏差(s.d.)。使用Prism (GraphPad Software, Inc.)藉由單因素ANOVA計算p值。UKE1細胞之結果展示於圖2(A)中；且SET2細胞之結果展示於圖2(B)中。

實例3：藉由化合物1抑制JAK2-V617F(+) MPN造血祖細胞之贅瘤紅血球系群落形成及魯索替尼與極低劑量PIMi 之組合的協同抑制

【0105】 在DMSO-媒劑、50 nM 魯索替尼(Rux)、20 nM 或5 nM 化合物

1(PIMi)或組合之兩種藥物存在下，將來自MPN患者之外周血單核細胞(PV, JAK2-V617F +)塗於含有細胞因子但不具有紅血球生成素(Epo)的甲基纖維素中。12天后對Epo獨立性紅血球系群落計分。結果展示於圖3中。使用Bliss獨立模型之組合的預期生長%由具有點線之透明條狀物指示。更低的生長%量測值指示協同作用。

【0106】 未經處理(僅DMSO)或以所指示濃度之化合物1(PIMi)或魯索替尼處理之MPN患者粒細胞的免疫印跡分析。結果展示於圖4中。

【0107】 此等結果指示化合物1與魯索替尼在1 nM、5 nM及20 nM 化合物1時具有協同作用是出人意料的。

實例4：協同作用轉換為人類劑量

【0108】 在37℃下將來自患者之血漿樣本與KMS12BM細胞株一起離體培育2.5小時。自該等細胞製備全細胞溶菌液且使用ELISA確定pBAD之水準。呈現在80 mg BID 化合物1之第一週期第8天給藥後第24小時(圖5(A))及時程(圖5(B))中之資料(76%的平均抑制)。圖5(A) 中之結果指示在65 mg BID時達到化合物1之低谷IC_{50}。依次，在外加以化合物1離體處理之KMS-12-BM細胞的全血樣本中量測到BAD磷酸化作用時，化合物1 具有134 nM之IC_{50}。因此，65 mg BID化合物1 導致在此全血檢定中134 nM之IC_{50}。因為此等全血檢定中之結果不同於實例3中之檢定，因此必須在全血檢定中調整化合物1之蛋白質結合。

【0109】 因此，在0.3 μM至10 μM範圍內之人類血清(活體外)中確定化合物1之蛋白質結合。化合物1展現高蛋白質結合。對於人類，平均活體外血清未結合部分(fu)為7.0%。對於蛋白質結合判定，利用來自Harvard Apparatus (Holliston, MA) 之Multi-Equilibrium Dialyzer System™及diachema膜。使樣本蛋白質沉澱，矩陣匹配，接著離心分離。轉移上清液且使用LC-MS/MS分析。將

透析後緩衝液中最終峰面積比除以透析後血清中最終峰面積比，對體積位移進行校正，計算得到活體外樣本之未結合部分百分比。

【0110】 實例3中之檢定涉及將來自血液之細胞塗於培養基中。由於培養基中之蛋白質含量，培養基中化合物1之游離部分為58%。假定線性劑量反應曲線，使用7%及58%之血清游離部分及培養基游離部分將實例3中之結果轉換為人類劑量。此舉可藉由如下進行：計算蛋白質結合經調整之活性為(培養基中游離之細胞活性*%)/血清中游離%—例如，對於IC_{50}為1 nM之細胞活性，則(1 nM* 58%) / 7% = 8.3 nM —活性的8.3倍位移。

表1

細胞活性 – 實例3	蛋白質結合經調整之活性	人類劑量BID	每日人類劑量
1 nM	8.3 nM	4 mg BID	8毫克/天
5 nM	41 nM	20 mg BID	40毫克/天
20 nM	166 nM	80 mg BID	160毫克/天

【0111】 實例3中之50 nM 魯索替尼對應於約15 mg BID 之劑量的魯索替尼。通常，5-25 mg BID範圍內之劑量的魯索替尼將期望具有協同作用。

【0112】 因此，41 nM及8.3 nM之蛋白質結合經調整之活性對應於化合物1之IC_{23}及$IC_{5.7}$。出人意料地在化合物1之如此低劑量下—充分低於IC_{50}的MPN細胞中觀察到與魯索替尼之協同作用。

【0113】 除本文所述之彼等修改之外，本發明之各種修改亦將為熟習此項技術者根據以上描述顯而易知。該等修改亦意欲落入所附申請專利範圍的範圍內。在本申請案中引用之各參考文獻(包括但不限於所有專利、專利申請案及揭示案)係以引用的方式全部併入本文中。

201924683
專利案號：107144094

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於治療骨髓增生性贅瘤的低劑量組合療法

【英文發明名稱】LOW DOSE COMBINATION THERAPY FOR TREATMENT OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

【中文】

本申請案係關於使用與低劑量Pim抑制劑N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺組合之JAK1/JAK2抑制劑魯索替尼治療骨髓增生性贅瘤，其中該組合在低劑量Pim抑制劑下出乎意料地具有協同作用。

【英文】

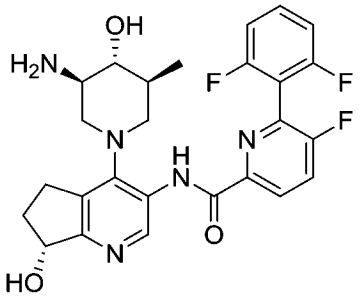
The present application relates to treatment of myeloproliferative neoplasms using the JAK1/JAK2 inhibitor, ruxolitinib, in combination with a low dose of a Pim inhibitor, N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-amino-4-hydroxy-5-methylpiperidin-1-yl]-7-hydroxy-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]pyridin-3-yl}-6-(2,6-difluorophenyl)-5-fluoropyridine-2-carboxamide, wherein the combination is unexpectedly synergistic at a very low dose of the Pim inhibitor.

【指定代表圖】圖5B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



化合物1

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種治療有需要之患者之骨髓增生性贅瘤的方法，包含向該患者投與約5毫克/天至約100毫克/天劑量之N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽，及治療有效量之魯索替尼(ruxolitinib)或其醫藥學上可接受之鹽。

【第2項】 如申請專利範圍第1項之方法，其中該魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽為魯索替尼磷酸鹽。

【第3項】 如申請專利範圍第1項或第2項之方法，其中該N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽選自N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺之磷酸鹽、二鹽酸鹽、鹽酸鹽、順丁烯二酸鹽、己二酸鹽、氫溴酸鹽、(R)-(-)-杏仁酸鹽、水楊酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、L-焦麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、(1S)-(+)-10-樟腦磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、硫酸鹽、L-酒石酸鹽及D-酒石酸鹽。

【第4項】 如申請專利範圍第1項或第2項之方法，其中該N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽為N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺之磷酸鹽。

【第5項】 如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]

吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約8毫克/天至約80毫克/天。

【第6項】 如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約8毫克/天至約60毫克/天。

【第7項】 如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約8毫克/天至約50毫克/天。

【第8項】 如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約8毫克/天至約40毫克/天。

【第9項】 如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約8毫克/天至約20毫克/天。

【第10項】如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約2 mg BID至約50 BID。

【第11項】如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-

[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約4 mg BID至約40 BID。

【第12項】如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約4 mg BID 至約30 mg BID。

【第13項】如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約4 mg BID 至約25 mg BID。

【第14項】如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約4 mg BID 至約20 mg BID。

【第15項】如申請專利範圍第1項至第4項中任一項之方法，其中N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約4 mg BID 至約10 mg BID。

【第16項】如申請專利範圍第1項至第15項中任一項之方法，其中魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約10毫克/天至約50毫克/天。

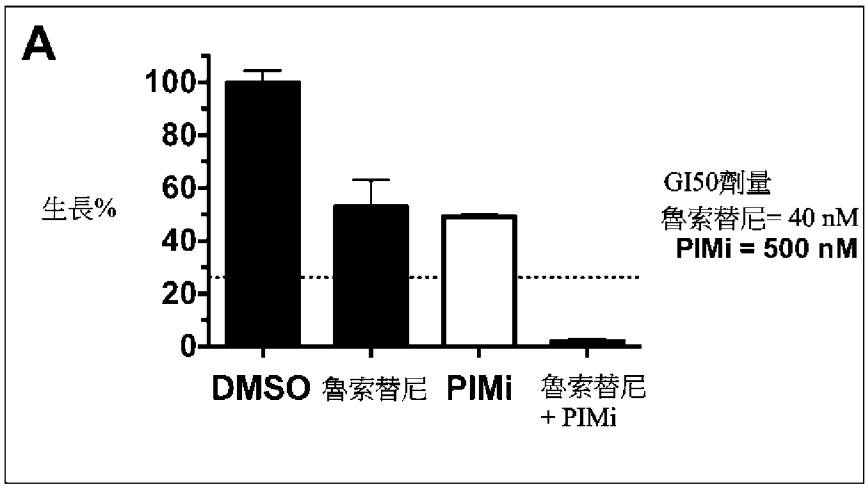
【第17項】如申請專利範圍第1項至第15項中任一項之方法，其中魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽之該劑量為約10毫克/天至約30毫克/天。

【第28項】如申請專利範圍第1項至第25項中任一項之方法，其中該骨髓增生性贅瘤選自原發性血小板增多症(ET)。

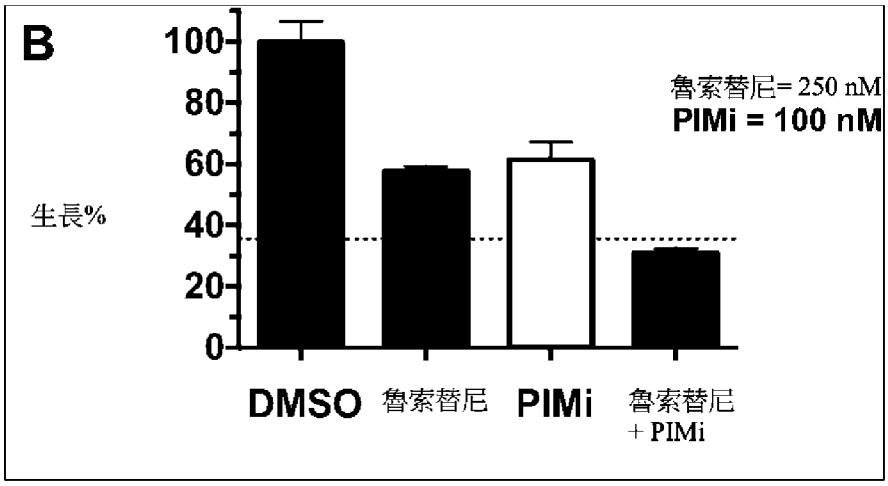
【第29項】如申請專利範圍第1項至第25項中任一項之方法，其中該骨髓增生性贅瘤選自原發性骨髓纖維化。

【第30項】如申請專利範圍第1項至第29項中任一項之方法，其中該魯索替尼或其醫藥學上可接受之鹽，及該N-{(7R)-4-[(3R,4R,5S)-3-胺基-4-羥基-5-甲基哌啶-1-基]-7-羥基-6,7-二氫-5H-環戊并[b]吡啶-3-基}-6-(2,6-二氟苯基)-5-氟吡啶-2-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽係經口投與。

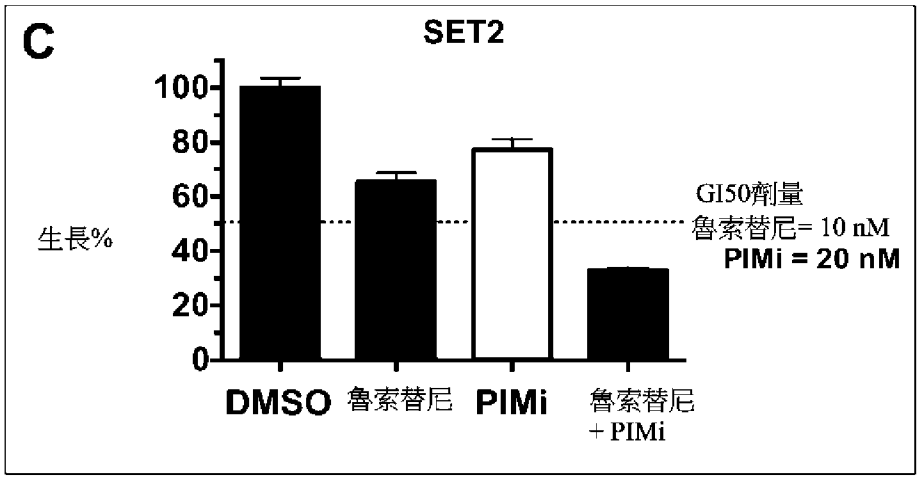
【發明圖式】


A
100
80
60
40
20
0
生長%
GI50劑量
魯索替尼= 40 nM
PIMi = 500 nM
DMSO
魯索替尼
PIMi
魯索替尼
+ PIMi

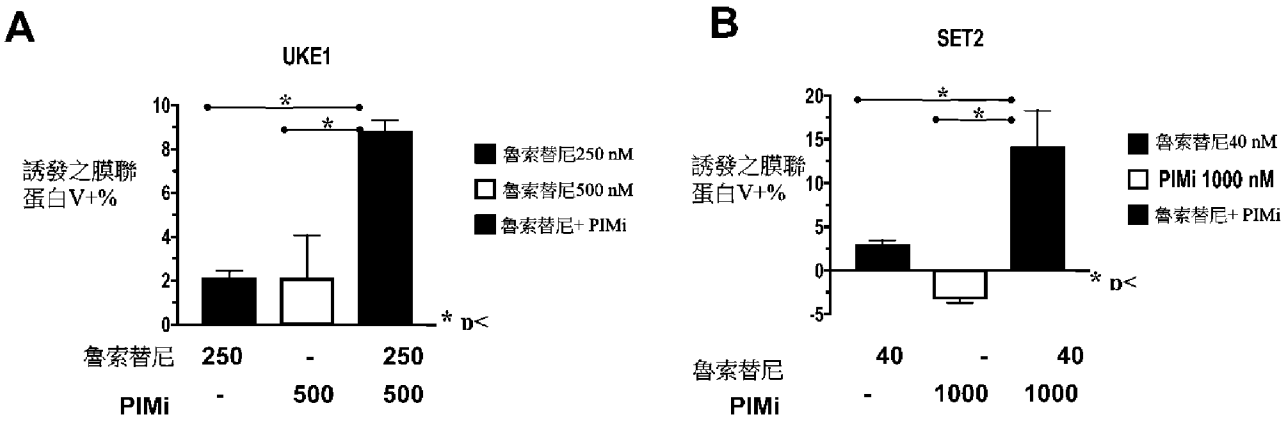
【圖 1(A)】


B
100
80
60
40
20
0
生長%
魯索替尼= 250 nM
PIMi = 100 nM
DMSO
魯索替尼
PIMi
魯索替尼
+ PIMi

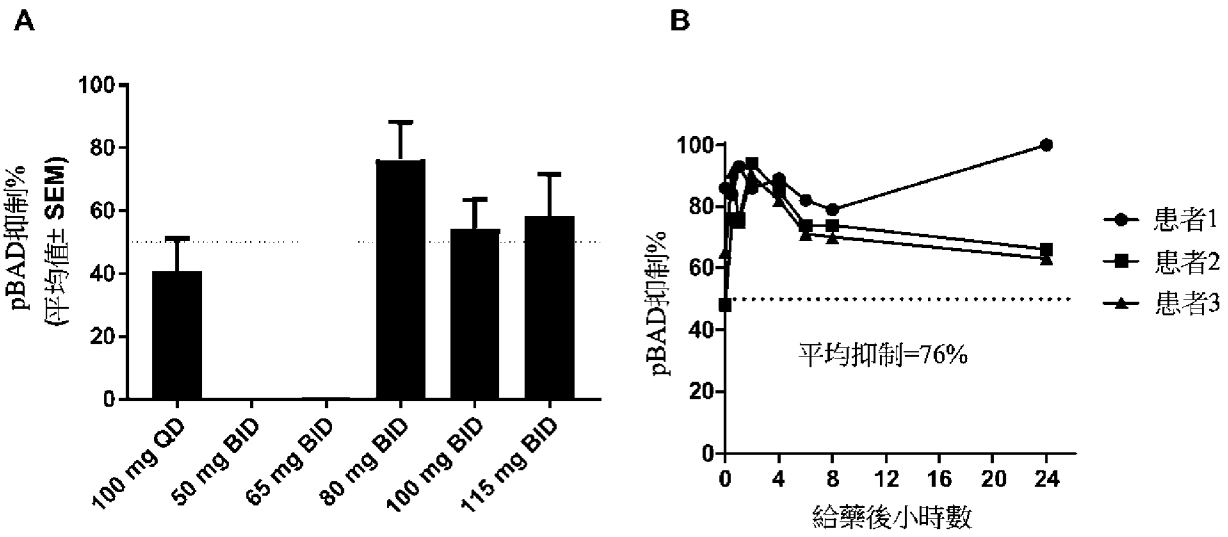
【圖 1(B)】


C
SET2
100
80
60
40
20
0
生長%
GI50劑量
魯索替尼= 10 nM
PIMi = 20 nM
DMSO
魯索替尼
PIMi
魯索替尼
+ PIMi

【圖 1(C)】


A
UKE1
誘發之膜聯蛋白V+%
10
8
6
4
2
0
*
*
* D<
魯索替尼250 nM
魯索替尼500 nM
魯索替尼+ PIMi
魯索替尼 250 - 250
PIMi - 500 500
B
SET2
誘發之膜聯蛋白V+%
20
15
10
5
0
-5
*
*
* D<
魯索替尼40 nM
PIMi 1000 nM
魯索替尼+ PIMi
魯索替尼 40 - 40
PIMi - 1000 1000

【圖 2(A-B)】


A
pBAD抑制%
(平均值± SEM)
100
80
60
40
20
0
100 mg QD
50 mg BID
65 mg BID
80 mg BID
100 mg BID
115 mg BID
B
pBAD抑制%
100
80
60
40
20
0
0
4
8
12
16
20
24
給藥後小時數
平均抑制=76%
患者1
患者2
患者3

【圖 5(A-B)】