

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780047537.1

[51] Int. Cl.

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/4412 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月28日

[11] 公开号 CN 101568337A

[22] 申请日 2007.12.20

[21] 申请号 200780047537.1

[30] 优先权

[32] 2006.12.22 [33] GB [31] 0625691.1

[86] 国际申请 PCT/GB2007/004927 2007.12.20

[87] 国际公布 WO2008/078086 英 2008.7.3

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.22

[71] 申请人 阿斯利康(瑞典)有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 N·O·卡拉格尔 T·P·格伦

P·D·史密斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李进 李炳爱

权利要求书1页 说明书16页 附图4页

[54] 发明名称

用于治疗癌症的 MEK 抑制剂和 SRC 激酶抑制剂
AZD0530 的组合

[57] 摘要

本发明涉及包含 MEK 抑制剂和 Src 激酶抑制剂
AZD0530 的组合在治疗癌症中的用途。

1. 一种包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的组合，其适用于治疗癌症。

2. 一种包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的组合，其用于癌症的协同治疗。

3. 包含与药学上可接受的赋形剂或载体混合的、根据权利要求 1 的组的药用组合物，其适用于治疗癌症。

4. 根据权利要求 3 的药用组合物，它包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐、Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的赋形剂或载体。

5. 根据权利要求 3 的药用组合物，它包含含有 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体的第一种组合物，和含有 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的赋形剂或载体的第二种组合物。

6. 根据权利要求 1 的组合在制备用于给予温血动物以提供癌症治疗的药物中的用途。

7. 包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的组合，其适用于癌症的协同治疗。

8. 包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的组合，其用于治疗癌症。

9. 一种在需要这样的治疗的患者中治疗癌症的方法，该方法包括给予所述患者治疗有效量的 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和给予有效量的 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的组合。

10. 一种根据权利要求 1 的组合，其中的 MEK 抑制剂选自 MEK 抑制剂 1 或 MEK 抑制剂 2。

11. 一种根据权利要求 3-5 中任一项的药用组合物，其中的 MEK 抑制剂选自 MEK 抑制剂 1 或 MEK 抑制剂 2。

用于治疗癌症的 MEK 抑制剂和 SRC 激酶抑制剂 AZD0530 的组合

在第一方面，本发明涉及包含 MEK 抑制剂和非受体酪氨酸激酶 Src 家族的特定抑制剂的组合。本发明的组合用于癌症的治疗方法。本发明还涉及包含这样的组合的药用组合物，并涉及它们在制备用于治疗癌症的药物方面和在制备用于延缓癌症的发展的药物方面的用途。

当前治疗癌症的选择包括手术切除、外部电子束辐射治疗和/或全身化疗。这些在某些形式的癌症中获得部分的成功，但对其它形式癌症较少成功。治疗癌症明显需要新的治疗处理。

近年来，已经发现，通过其部分 DNA 转化为癌基因，即，一活化就能导致恶性肿瘤细胞形成的基因，细胞可变成癌细胞(Bradshaw, Mutagenesis, 1986, 1, 91)。恶性细胞的一个关键属性是迁移和侵袭的能力，并迁移至周围组织，导致宿主组织破坏和形成继发转移病灶。作为多个信号通路组分的致癌活化的结果，为实现此种转移，肿瘤细胞必须获得运动和侵袭表型。癌基因导致作为生长因子受体的肽的生成。生长因子受体复合物的激活随后导致细胞增殖、能动性和侵袭性的增加。癌基因往往编码异常形式的信号通道组分，例如受体酪氨酸激酶、丝氨酸-苏氨酸激酶或下游信号分子，例如，ras 基因。ras 基因对密切相关的小鸟嘌呤核苷酸结合蛋白编码，后者将结合的三磷酸鸟苷(GTP)水解为二磷酸鸟苷(GDP)。当 Ras 蛋白被结合到 GTP 时，它们在促进细胞生长、转化和侵袭方面 Ras 蛋白是活性的，而当它们被结合到 GDP 时，是非活性的。p21ras 的转化突变体在其 GTP 酶活性方面是有缺陷的，并因而保持于活化 GTP 束缚态。已知 ras 癌基因在某些癌症中起到不可缺少的作用，并已经发现是形成超过 20%的全部人癌病例的主要原因。

当被配体，例如生长因子激活时，被偶合到丝裂原反应的细胞表面受体可启动连锁反应，这导致鸟嘌呤核苷酸对 ras 蛋白交换活性的活化。当 ras 蛋白处于其活化 GTP-束缚态时，大量其它蛋白直接与在血浆膜的 ras 相互作用，导致通过几种不同的通道的信号传送。最具特征的效应蛋白是 raf 原癌基因(proto-oncogene)的产物。在细胞增殖控制中，raf 和 ras 的相互作用是关键调节步骤。raf 丝氨酸-苏氨酸激酶的 ras 介导的活化依次激活双重特异性的 MEK (MEK1 和 MEK2)，它是丝裂原活化的蛋白激酶(MAPKs 称为细胞外信号调节的蛋白激酶或 ERK1 和 ERK2)的直接的上游活化剂。到目前为止，未鉴别出非 MAPK 的 MEK 底物，虽然近来的报告表明，MEK 也可被其它上游信号蛋白例如 MEKK1 和 Cot/Tpl-2 活化。活化的 MAPK 改变位置并聚集在核中，在那里它可磷酸化和活化转录因子，例如 Elk-1 和 Sap1a，导致基因，例如 c-fos 的增强的表达。此外，被活化 MAPK 还磷酸化其它激酶，例如 p90RSK 和细胞骨架蛋白。

ras-依赖的 raf-MEK-MAPK 级联是负责从细胞表面向核传送有丝分裂和侵袭信号，导致基因表达和细胞命运改变的关键信号通道之一。p21ras 的转化突变体为组成性活性的，产生 raf、MEK 和 MAPK 活性和细胞转化。已经表明，采用反义 raf、显性负 MEK 突变体或选择性抑制剂 PD098059 抑制 MEK 活性，能阻止 ras-转化的成纤维细胞的生长和形态转化、细胞能动性和侵袭性。

raf、MEK 和 MAPK 的活化机理是通过特定丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的磷酸化。活化的 raf 和其它激酶磷酸化 S218 和 S222 上的 MEK1 和 S222 和 S226 上的 MEK2。这导致 MEK 活化和后继的磷酸化，和通过双重特异性 MEKs 活化 T190 和 Y192 上的 ERK1 和 T183 和 Y185 上的 ERK2。当 MEK 可被大量蛋白激酶活化，和活性 MAPKs 磷酸化和活化大量底物蛋白，包括转录因子、其它蛋白激酶和胞浆蛋白(它们中的某些涉及侵袭过程)时，MEKs 似乎为 MAPKs 的特异性的和单一的活化剂，并能起到交叉级联调节的聚焦作用。

MEK1 和 MEK2 同种型表现出不寻常的特异性，还在不存在于任何其它已知 MEK 家族成员中的催化子域 IX 和 X 间含有脯氨酸富集的插入片段。在 MEK 和其它蛋白激酶间的这些区别连同 MEK (MEK 1、MEK 2)，更加近期的 MEK 5 在增殖和侵袭信号中的已知作用一起表明，发现和采用选择性 MEK 抑制剂作为用于增殖和侵袭疾病的治疗药物是可能的。

因此，已经认识到，MAPK 激酶通道的抑制剂将具有用于遏制和/或治疗实体肿瘤疾病的抗增殖和抗侵袭药物的价值。

例如，还知道，几种癌基因编码酪氨酸激酶，某些生长因子受体也是酪氨酸激酶。要鉴别的第一组酪氨酸激酶源自这类病毒癌基因，例如，pp60^{v-Src} 酪氨酸激酶(另称为 v-Src)和正常细胞中相应的酪氨酸激酶，例如，pp60^{c-Src} 酪氨酸激酶(另称为 c-Src)。

非受体酪氨酸激酶的 Src 家族位于细胞内，并涉及传送生物化学信号，例如影响肿瘤细胞运动、播散和侵袭及后继的转移瘤生长的那些信号。Src 家族的成员尤其包括 c-Src、c-Yes、c-lck 和 c-Fyn。

还已知 Src 家族的非受体酪氨酸激酶在正常细胞中被高度调节，以致在无细胞外刺激的情况下，激酶保持失活构型。然而，Src 家族的某些成员，例如，c-Src 酪氨酸激酶在普通人癌中频繁地被显著活化(当与正常细胞水平比较时)。

因此，已经认识到，这类非受体酪氨酸激酶的抑制剂应该具有作为肿瘤细胞的能动性的选择性抑制剂和作为哺乳动物癌细胞的播散和侵袭的选择性抑制剂价值，导致对转移瘤生长的抑制。因此，c-Src 非受体酪氨酸激酶的主要作用是调节细胞能动性，能动性是局限性肿瘤通过各播散步骤发展进入血流、侵袭其它组织和引起转移瘤生长所必须的。c-Src 激酶涉及信号转导步骤，它们产生转移性肿瘤细胞的侵袭和迁移能力。

因此，Src 激酶抑制剂具有作为抗肿瘤药物，尤其是作为哺乳动物癌细胞的能动性、播散和侵袭的选择性抑制剂的价值，导致转移瘤

生长的抑制。尤其是，Src 激酶抑制剂具有作为遏制和/或治疗实体肿瘤疾病的抗侵袭药的价值。尤其是，期望这类化合物用于预防或治疗对抑制对一种或多种复合非受体酪氨酸激酶，例如 c-Src 激酶(它们涉及产生转移性肿瘤细胞的侵袭和迁移能力的信号转导步骤)敏感的那些肿瘤。而且，期望这类化合物用于预防或治疗单独或部分通过抑制酶 c-Src 而介导的那些肿瘤，即，这些化合物可用于在需要这样的治疗的温血动物中产生 c-Src 酶抑制效果。特别是，期望将这类化合物用于预防或治疗实体肿瘤疾病。

因此，已经认识到，这类非受体酪氨酸激酶的抑制剂将具有作为肿瘤细胞能动性的选择性抑制剂和作为哺乳动物癌细胞的播散和侵袭的选择性抑制剂的价值，导致转移瘤生长的抑制。尤其是，这类非受体酪氨酸激酶的抑制剂将具有作为用于遏制和/或治疗实体肿瘤疾病的抗侵袭药物的价值。

从国际公开专利申请 WO 01/94341 已知，某些 5-位取代的喹唑啉衍生物具有 Src 激酶抑制活性，是用于治疗多种癌症的抗侵袭药物。其中的实施例 14 中公开为第 73 号化合物的化合物 4-(6-氯-2,3-亚甲基二氧基苯胺基)-7-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙氧基]-5-四氢吡喃-4-基羟喹唑啉。该化合物是有效的 Src 激酶抑制剂，其中通过编码 AZD0530 鉴定它。

本发明的组合通过使特定的 Src 激酶抑制剂 AZD0530 与 MEK 抑制剂组合，寻求向癌症控制提供改良的治疗。

本发明还利用描述于国际专利申请公布号 WO 03/077914、WO 05/051301 和 WO07/044084 的特定的 N3 烷基化苯并咪唑；吡啶酮；反向吡啶酮和咪嗪 MEK 抑制剂。

国际专利申请公布号 WO 03/077914 中指出，可作为单一疗法给予其中公开的 MEK 抑制剂，或者除该发明的化合物外，还可包括一种或多种其它抗肿瘤物质。然而，既未公开本发明的特殊组合，也未公开任何这样的组合产生惊人效果。

国际专利申请公布号 WO 05/051301 中还指出, 可作为单一疗法给予其中公开的 MEK 抑制剂, 或者除该发明的化合物外, 还可包括常规的手术或放疗或化疗。所指出的这样的化疗包括一种或多种大量不同种类的抗肿瘤药物, 例如其它抗侵袭药物(例如, 金属蛋白酶抑制剂, 如司立马司他, 和尿激酶纤溶酶原活化剂受体功能的抑制剂)。然而, 既未公开本发明的特殊组合, 也未公开任何这样的组合产生惊人效果。

国际专利申请公布号 WO 01/94341 中还指出, 可作为单一疗法给予其中公开的 Src 激酶抑制剂, 或者除这些发明的喹唑啉衍生物外还可包括常规手术或放疗或化疗。所指出的这样的化疗包括一种或多种大量不同种类的抗肿瘤药物, 例如其它抗侵袭药物(例如, 金属蛋白酶抑制剂, 如司立马司他和尿激酶纤溶酶原活化剂受体功能的抑制剂)。然而, 既未公开本发明的特殊组合, 也未公开任何这类组合产生惊人效果。

在本发明中, 已经表明, 对 Src 激酶和 MEK 激酶两者的抑制导致细胞侵袭的降低。出乎意料地, 已经发现, 对国际专利申请公布号 WO 01/94341、WO 02/16352、WO 03/077914、WO 05/051301 和 WO2007/044084 中介绍的组合治疗的一般公开的特定选择是非常有效的。尤其是, MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的组合产生令人惊讶的效果。更明确地, MEK 抑制剂和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 的组合产生比单独给予 MEK 抑制剂或 Src 激酶抑制剂 AZD0530 所得到的效果更大。

尽管国际专利申请公布号 WO 05/051301 中公开其中所公开的 MEK 抑制剂可用来与抗侵袭药物组合, 但既未明确公开组合用途, 也未公开任何这样的组合产生的令人惊讶的效果。

尽管国际专利申请公布号 WO 01/94341 中公开其中所公开的 Src 激酶抑制剂可用来与其它抗侵袭药物或抗增殖药物组合, 但既未明确公开 MEK 抑制剂和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 的组合用途, 也未公开

任何这样的组合产生令人惊讶的效果。

根据本发明，提供适合用于治疗癌症的组合，其包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐。

应理解，术语“组合”考虑到同时、相继或分开给予组合的各种组分。在本发明的一方面，“组合”考虑到同时给予 MEK 抑制剂和 Src 抑制剂。在本发明的又一方面，“组合”考虑到相继给予那些药物。在本发明的另一方面，“组合”考虑到分开给予这些药物。在相继或分开给予那些药物的情况下，给予第二种组分的延缓应不至于丧失组合疗法的协同作用的益处。因此，为避免怀疑，针对同时、相继或分开用于治疗癌症，或者，针对同时、相继或分开用于延缓癌症的发展，本发明提供包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的组合。

为同时、相继或分开用于治疗癌症，本发明进一步提供适用于治疗癌症的组合，其包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐。

适用的 MEK 抑制剂包括公开于国际专利申请公布号 WO 99/01426, WO 02/06213、WO 03/077914、WO 05/051301 和 WO2007/044084 中的那些化合物。

特别的 MEK 抑制剂包括以下化合物：

6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2,3-二羟基-丙氧基)-酰胺；

6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-(四氢-吡喃-2-基甲基)-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺，

1-[6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-基]-2-羟基-乙酮，

6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-1,1-二甲基-乙氧基)-酰胺，

6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-(四氢-呋喃-2-基甲基)-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺,

6-(4-溴-2-氟-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺和

6-(2,4-二氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺。

更特别的MEK抑制剂包括:

6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺, 下文中称为 MEK 抑制剂 1;

2-[(2-氟-4-碘代苯基)氨基]-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺; 下文中称为 MEK 抑制剂 2; 和

4-(4-溴-2-氟苯基氨基)-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡嗪-3-甲酰胺或其药学上可接受的盐。

因此, 在本发明的又一方面, 提供适用于治疗癌症的组合, 其包含MEK抑制剂1或其药学上可接受的盐或MEK抑制剂2或药学上可接受的盐和Src激酶抑制剂AZD0530或其药学上可接受的盐。

MEK 抑制剂或 AZD0530 的适用的药学上可接受的盐是, 例如, 药学上可接受的酸加成盐, 例如, 与无机酸或有机酸, 例如盐酸、氢溴酸、硫酸、三氟乙酸、柠檬酸、马来酸或富马酸所成的酸加成盐, 例如, 单或双富马酸盐。

当 MEK 抑制剂是 MEK 抑制剂 1 时, 优选的盐是硫酸氢盐。可根据 WO07/076245 中描述的方法合成 MEK 抑制剂 1 的硫酸氢盐。

本发明的癌症治疗包括可用常规方法评价的抗肿瘤效果, 例如响应速度、疾病发展的时间和/或存活率。本发明的抗肿瘤效果包括, 但不限于, 抑制肿瘤生长、延缓肿瘤生长、肿瘤消退、肿瘤收缩、停止治疗肿瘤再生长的时间增加和疾病发展的延缓。例如, 希望当给予需要治疗包括实体肿瘤的癌症的温血动物, 例如人本发明组合时, 如通过, 例如, 对一种或多种抗肿瘤效果程度、响应速度、疾病发展时间

和存活率所测量的那样，治疗将产生有益的效果。如前所述的那样，认为本发明的组合将对治疗或预防癌症提供有益或协同的效果，或者，它将提供对癌症的“协同治疗”。根据本发明，如果通过对例如，响应程度、响应速度、疾病发展时间或存活期所测量的那样，该效果治疗上优于以其常规剂量给予组合治疗的一种或其它多种组分可达到的效果，则组合治疗被定义为提供“协同效果”或“协同治疗”。例如，如果该作用在治疗上超过单独用 MEK 抑制剂或 Src 激酶抑制剂 AZD0530 实现的作用，组合治疗的作用是协同的。进一步地，如果对单独的 MEK 抑制剂或 Src 激酶抑制剂 AZD0530 不响应(或响应差)的一组患者得到有益的作用，则组合的作用就是协同的。此外，组合治疗的作用被定义为，如果以其常规剂量给予一种组分而以减少的剂量给予另一组分，并经例如响应程度、响应速度、疾病发展时间或存活期的测量，疗效等于或好于给予常规量的组合治疗的任一种组分可达到的疗效，则提供协同效果。尤其是，如果可减少 MEK 抑制剂或 Src 激酶抑制剂 AZD0530 的常规剂量，除了所发生的讨厌的副作用比采用常规剂量的各种组分所发生的更少和/或更小外，并不损害响应程度、响应速度、疾病发展时间和存活数据中的一个或多个，尤其是不损害响应持续时间，就认为存在协同作用。

因此，在又一方面，本发明提供用于协同治疗癌症的组合，所述组合包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐以及 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐。在又一方面，本发明提供用于协同治疗癌症的组合，其包含 MEK 抑制剂 1 或其药学上可接受的盐或 MEK 抑制剂 2 或药学上可接受的盐或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐。

可以适用的药用组合物的形式给予本发明的治疗组合。根据本发明的这个方面，提供适用于治疗癌症的药用组合物，它包含与药学上可接受的赋形剂或载体混合的如前定义的组合。

本文所述的组合物可呈适于口服的形式，例如，呈片剂或胶囊剂，

适于经鼻给药或经吸入给药的形式，例如，呈散剂或溶液剂，适于经胃肠外注射(包括静脉、皮下、肌内、血管内或输注)的形式，例如，呈灭菌溶液剂、混悬剂或乳剂，适于局部给药的形式，例如，呈软膏剂或乳膏剂，适于直肠给药的形式，例如，呈栓剂，或者，给药途径可为通过直接注射进肿瘤或通过区域递药或通过局部递药。在本发明的其它实施方案中，组合治疗的 MEK 抑制剂和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 可经内窥镜、气管内、病灶内、透皮、静脉内、皮下、腹膜内或肿瘤内递药。MEK 抑制剂优选口服。Src 激酶抑制剂 AZD0530 优选口服。一般说来，可采用常规赋形剂按照常规方式，制备本文所述的组合物。本发明的组合物有利地以单位剂型呈现。

通常所给予的 MEK 抑制剂的日剂量介于，例如，每 kg 体重接受 0.1 mg-75 mg 的范围，假如需要按分开的剂量给予。

通常所给予的 Src 激酶抑制剂 AZD0530 的日剂量介于，例如，每公斤体重接受 0.1 mg-75 mg 的范围，假如需要按分开的剂量给予。一般说来，采用胃肠外途径时，会给予更低的剂量。因此，例如，对于静脉给药，通常会采用介于，例如，每公斤体重 0.1 mg-30 mg 范围的剂量。同样地，对于吸入给药，会采用介于，例如，每公斤体重 0.05 mg-25 mg 的剂量范围。

可根据特定疾病状态和患者的总体情况，改变前述剂量和方案。例如，可能需要或希望减少组合治疗的各组分的上述剂量，以减少毒性。可由利用其专业技能和知识治疗任何特定患者的执业医师确定剂量方案。

应认识到，根据本发明的药用组合物包括含有 MEK 抑制剂和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 和药学上可接受的赋形剂或载体的组合物。这类组合物方便地提供同时给药治疗癌症的本发明的治疗性组合产物。

根据本发明的这个方面，提供适用于治疗癌症的药用组合物，它包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐、Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂或载体。

根据本发明的药用组合物还包括包含第一种组合物和第二种组合物的各分开的组合物，第一种组合物含有 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂或载体，而第二种组合物包含 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂或载体。这样的组合物便利地提供相继或分开给药治疗癌症的本发明的治疗组合，但也可同时给予各单独的组合物。

本发明的这类药用组合物便利地包括药剂盒，它包括装有包含 MEK 抑制剂的适用组合物的第一个容器和装有含有 Src 激酶抑制剂 AZD0530 的适用组合物的第二个容器。根据本发明的该方面，提供用于治疗癌症的药剂盒，其包含：

- a) 与药学上可接受的赋形剂或载体在一起的 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐，呈第一单位剂型(例如片剂或胶囊剂)；
- b) 与药学上可接受的赋形剂或载体在一起的 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐，呈第二单位剂型；和
- c) 含有所述第一和第二单位剂型的容器。

根据本发明的又一方面，提供如前定义的组合在制备用于给予温血动物以治疗癌症的药物中的用途。

根据本发明的又一方面，提供适用于协同治疗癌症的组合，其包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐。

根据本发明的又一方面，提供治疗癌症的方法，它包括给予需要这类治疗的温血动物有效量的如前定义的组合的各种组分。

根据本发明的该方面，还提供治疗癌症的方法，它包括在给予有效量的 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐的之前、同时或之后，给予需要这类治疗的温血动物有效量的如前定义的 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐。

根据本发明的该方面，还提供治疗癌症的方法，它包括同时、相继或分开给予需要这类治疗的温血动物有效量的如前定义的组合的

各组分。

根据本发明的该方面，还提供治疗癌症的方法，它包括给予需要这类治疗的温血动物有效量的如前定义的 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐，和同时、相继或单独给予有效量的 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐。

根据本发明的又一方面，提供治疗温血动物，例如，人的恶性或转移性黑素瘤的方法，它包括在给予有效量的 Src 激酶抑制剂 AZD 0530 或其药学上可接受的盐之前、同时或之后，给予所述动物有效量的如前定义的 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐。

根据本发明的又一方面，提供治疗温血动物，例如，人的非小细胞肺癌(NSCLC)的方法，它包括在给予有效量的 Src 激酶抑制剂 AZD 0530 或其药学上可接受的盐之前、同时或之后，给予所述动物有效量的如前定义的 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐。

根据本发明的又一方面，提供治疗温血动物，例如，人的癌症的方法，它包括在给予有效量的 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐之前、同时或之后，给予所述动物有效量的 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐；其中 MEK 抑制剂和 AZD0530 可任选各自与药学上可接受的赋形剂或载体一起给予。

根据本发明的又一方面，提供用于治疗癌症的组合，其包含 MEK 抑制剂或其药学上可接受的盐和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 或其药学上可接受的盐。

期望本发明的组合治疗特别用于预防和治疗疾病，例如癌症和卡波西肉瘤。尤其是，期望这样的本发明组合治疗用于治疗癌症，例如，肺、头和颈、脑、结肠、直肠、食管、胃、肝、胆管、甲状腺、肾、颈、卵巢、子宫、皮肤、乳房、膀胱、前列腺、胰腺的癌，并包括血液学恶性疾病，例如白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。尤其是，期望这样的本发明组合治疗能有利地减慢，例如，结肠、直肠、胰腺、脑、膀胱、卵巢、乳房、前列腺、肺、肝和皮肤的原发性或复发性实体肿

瘤的生长。期望本发明的组合治疗能有利地减慢恶性或转移性黑素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、肝细胞癌和包括非小细胞肺癌(NSCLC)的肺癌中的肿瘤的生长。期望本发明的组合治疗能有利地减慢恶性或转移性黑素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌和包括非小细胞肺癌(NSCLC)的肺癌中的肿瘤的生长。更特别地,期望本发明的组合治疗能有利地减慢恶性或转移性黑素瘤中的肿瘤生长。更特别地,期望本发明的组合治疗能有利地减慢非小细胞肺癌(NSCLC)中的肿瘤的生长。更特别地,期望本发明的组合治疗能有利地减慢肝细胞癌中肿瘤的生长。

可作为单独的治疗给予如前定义的本发明的组合治疗,或者可除此之外还包括手术或放疗或给予化疗药物。任选与本发明的组合治疗一起使用的其它化疗药物包括描述于 WO 07/076245 中的那些药物,它通过引用结合于本文。这类化疗可包括来自以下各类的药物:

- (i) 抗血管形成药
- (ii) 血管靶向药
- (iii) 细胞生长抑制药
- (iv) 其它抗侵袭药
- (v) 生长因子功能的抑制剂
- (vi) 抗增殖/抗肿瘤药
- (vii) 生物反应调节剂
- (viii) 抗体
- (ix) 反义治疗剂
- (x) 基因治疗途径 和
- (xi) 免疫治疗途径。

图 1 和 2 表明 60-200 μ m 深度之间的 3D 基质胶的 HT1080 细胞侵袭百分率

图 3 和 4 表明 60-200 μ m 深度之间的 3D 胶原的 HT1080 细胞侵袭百分率。

MEK 抑制剂 1 (图中称为 MEK 1) 是 6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺。化合物被描述于国际专利公开号 WO03/077914 的实施例 10 中。

MEK 抑制剂 2 (在图中称为 MEK 2) 是 2-[(2-氟-4-碘代苯基)氨基]-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺。通过以下方法制备该化合物:

步骤 a: 2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-羧酸甲酯的制备: 于 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, N_2 下, 向 2-氟-4-碘苯胺(0.058 g, 0.31 mmol) 的 THF (2 mL) 溶液逐滴加入双(三甲基甲硅烷基)氯化锂(0.56 mL, 0.56 mmol, 1 M 己烷溶液)。于 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 搅拌反应混合物 1 小时。再逐滴加入 2-氯-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-羧酸甲酯(0.060 g, 0.28 mmol) 的 THF (1 mL) 溶液, 于 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应混合物 25 分钟。加入 H_2O 猝灭反应混合物, 用 0.1M HCl 调节 pH, 再用 EtOAc 和饱和 NaCl 稀释, 分离各层。含水层经 EtOAc (1x) 反萃取。干燥(Na_2SO_4) 经合并的 EtOAc 层, 降压浓缩。经快速柱层析纯化(二氯甲烷/EtOAc, 20:1), 得到 0.086 g (84%) 呈白色晶状固体的纯的所需产物。MS ESI (+) m/z 417 (M+1) 检测; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.56 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.49 (d, 1H), 7.36 (d, 1H), 6.43 (t, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.15 (s, 3H).

步骤 b: 2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-1,5-二甲基-6-氧代-N-(2-(乙烯基氧基)乙氧基)-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺的制备: 向 2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-羧酸甲酯(0.500 g, 1.20 mmol) 的 THF (60 mL) 溶液加入 O-(2-乙烯基氧基-乙基)-羟基胺(0.149 g, 1.44 mmol)。冷却溶液至 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 逐滴加入双(三甲基甲硅烷基)氯化锂(4.81 mL, 4.81 mmol) (1 M 己烷溶液)。加热反应混合物至室温。搅拌 10 分钟后, 加入 1 M HCl 猝灭反应混合物, 分配于 EtOAc 和饱和 NaCl 之间。分离各层, 干燥(Na_2SO_4) 有机层, 降压浓缩, 生成粗制黄色固体, 无需纯化用于下一步骤。

步骤 c: 2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺的制备: 向粗品 2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-1,5-二甲基-6-氧代-N-(2-(乙烯基氧基)乙氧基)-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺(0.585 g, 1.20 mmol)的乙醇(10 mL)溶液加入含水 2 M HCl (3 mL)。室温下搅拌反应混合物 45 分钟。用 1 M NaOH 调节反应混合物的 pH 至 pH 7。用 EtOAc 和 H₂O 稀释反应混合物。分离有机层, 用饱和 NaCl 洗涤。用 EtOAc (1x)反萃取经合并的各含水层。干燥(Na₂SO₄)经合并的各有机层, 降压浓缩。经硅胶快速柱层析(二氯甲烷/MeOH, 15:1)纯化, 得到呈浅黄色固体的 2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺(0.421 g; 经两个步骤 76%)。MS ESI (+) *m/z* 462 (M+1)检测图; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 7.36 (d, 1H), 6.43 (t, 1H), 4.04 (br s, 2H), 3.85 (br s, 1H), 3.74 (br s, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.14 (s, 3H)。

实施例

生物试验程序

可用以下试验方法证明当与 Src 激酶抑制剂 AZD0530 组合使用时 MEK 抑制剂的活性。

细胞侵袭

用以下方法, 测定 Src 激酶抑制剂 AZD0530、MEK 抑制剂 1、MEK 抑制剂 2 和 Src 激酶抑制剂 AZD0530 与或者 MEK 抑制剂 1 或者 MEK 抑制剂 2 的组合经由 3D 基质胶和 3D 胶原底物抑制 HT1080 细胞侵袭的能力。

HT1080 细胞是 1971 年自 35 岁男性白种人分离出的人纤维肉瘤细胞系。我们的 HT1080 细胞由 Alderley Park 的组织培养单位提供。该细胞按惯例培养于补充有 10% FCS (胎牛血清)和 2mM L-谷氨酰胺的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)中。

如下制备由纤维胶原或 Matrigel™ 基底膜组成的、用于侵袭试验的基质底物:

i) 纤维胶原

室温下轻轻混合以下各组分，制备胶原溶液

Vitrogen 100 (I 型胶原)	2ml
10 x Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)	0.525 ml
无菌水	2.9ml
0.1N NaOH	0.5ml

轻轻混合胶原溶液，加 80 μ l 至 transwell 小室(insert)的上室。

transwell 小室(Corning Incorporated)为"24 孔"培养格式板。各室由有 8 μ m 大的孔的聚碳酸酯膜组成，膜直径为 6.5mm。再于 37°C、无菌环境下将它放置 24 小时。

ii) Matrigel™

在冰箱中将结冰的基质胶解冻过夜。将 80 μ l 加至 transwell 小室(24 孔培养格式板)的上室。再于 37°C、无菌环境下，孵化 90 分钟。

细胞附着试验

用 DMEM (0.2%胎牛血清(FCS) + L-谷氨酰胺)介质中的细胞解离液(Sigma)以 1×10^5 个细胞/ml 使 HT1080 细胞再悬浮。将各化合物剂量(适当的 0.1 μ M MEK1、0.01 μ M MEK2 和 1 μ M AZD0530)加至 1ml 细胞悬液的等份试样中。将二甲亚砜(DMSO) (0.1%)加至 1ml 等份细胞悬液中，提供对照物。

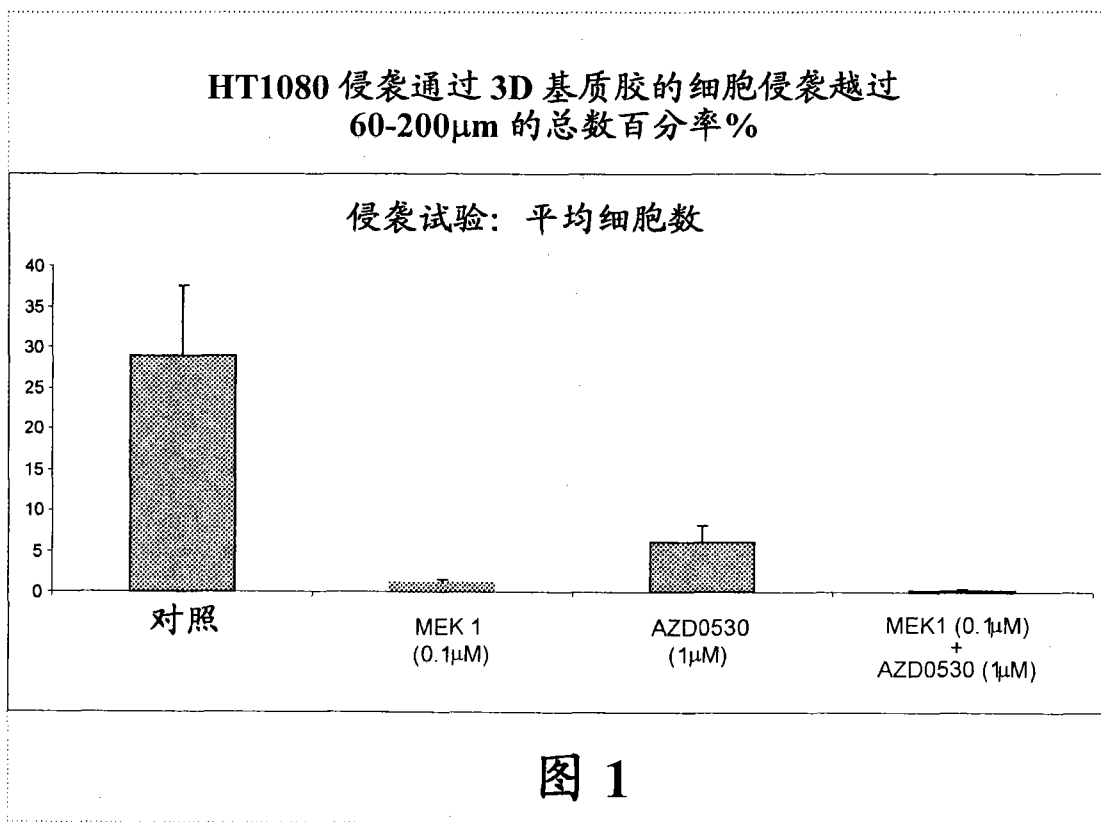
将补充有多种化合物剂量(0.01、0.1 和 1 μ M)或 0.1% DMSO (对照物)的 750 μ l DMEM (10% FCS + L-谷氨酰胺)加至 transwell 小室的较低室中。将处理细胞悬液的等份的 100 μ l (1×10^4 个细胞)对照物和化合物加至含有基质胶和胶原的 transwell 小室的上室中。再于 37°C 孵化 transwell 小室 72 小时。

通过将 transwell 小室浸入含有 0.5ml DMEM (10%FCS + L-谷氨酰胺) + 10 μ M Hoechst 33342 (Invitrogen 提供)的 24 孔培养皿中，标记细胞核。再将 0.5ml DMEM (10%FCS + L-谷氨酰胺) + 10 μ M Hoechst 加

至上室。然后于 37°C、无菌条件下，孵化含有 transwell 小室的培养皿 30 分钟。室温下通过将培养皿浸入 -20°C 甲醇 10 分钟，固定 transwells。倾斜并吸干 transwells，用磷酸盐缓冲血清(PBS)洗涤两次。4°C 下，将它们贮存于 PBS 中，直到经共聚焦显微镜系统分析。

共聚焦和图像分析

采用 Bio-Rad Radiance 2000 多光子共聚焦显微镜上的 20 倍物镜，得到胶原(或基质胶)凝胶顶部的细胞和通过胶原(或基质胶)凝胶的连续 20 μ m 截面上的侵袭细胞的光学图像。将图像输入 Image-Pro-Plus 图像分析软件，计算各光学截面上的像素，得到在各截面上的细胞数量的相对值。输出数据至微软 Excel 表上，表示为已经侵袭超过特定距离(例如 60-200 μ m)或在特定距离(例如 60 μ m)的每个试样的所有光学截面中所计算出的细胞总数的百分率。计算三份重复试样的平均值 + 和 - 标准偏差。当 Src 激酶抑制剂 AZD0530 与 MEK 抑制剂 1 或 2 组合使用时，表现出增加的活性超过单独的 MEK 抑制剂 1 或 2 或 AZD0530 所观察到的活性。



HT1080 侵袭通过 3D 基质胶的细胞侵袭越过
60-200 μm 的总数百分率%

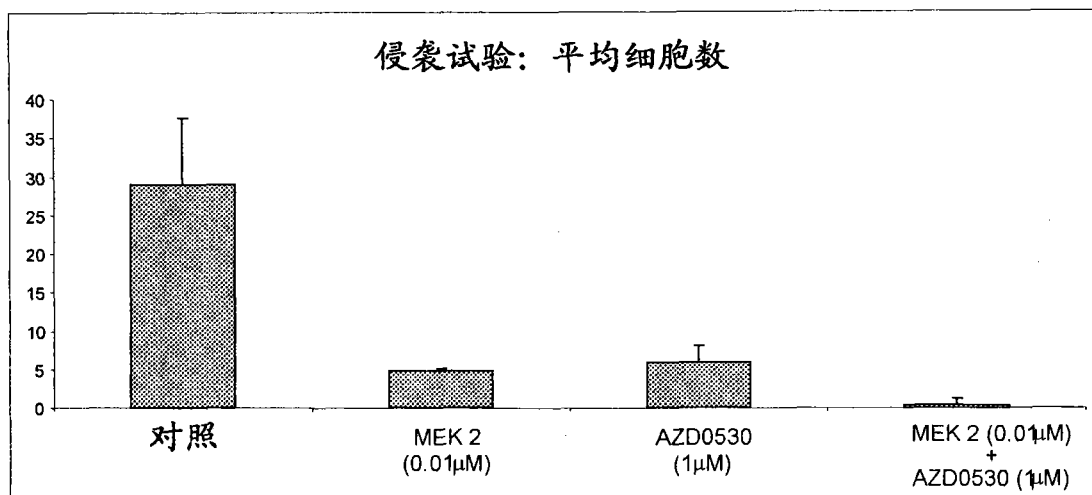


图 2

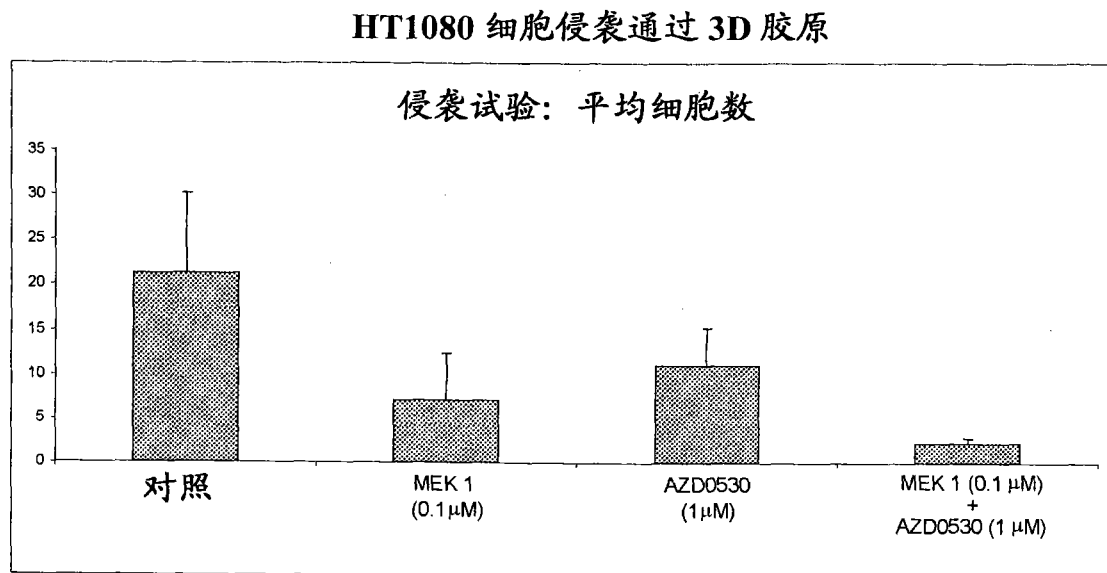


图 3

HT1080 细胞侵袭通过 3D 胶原

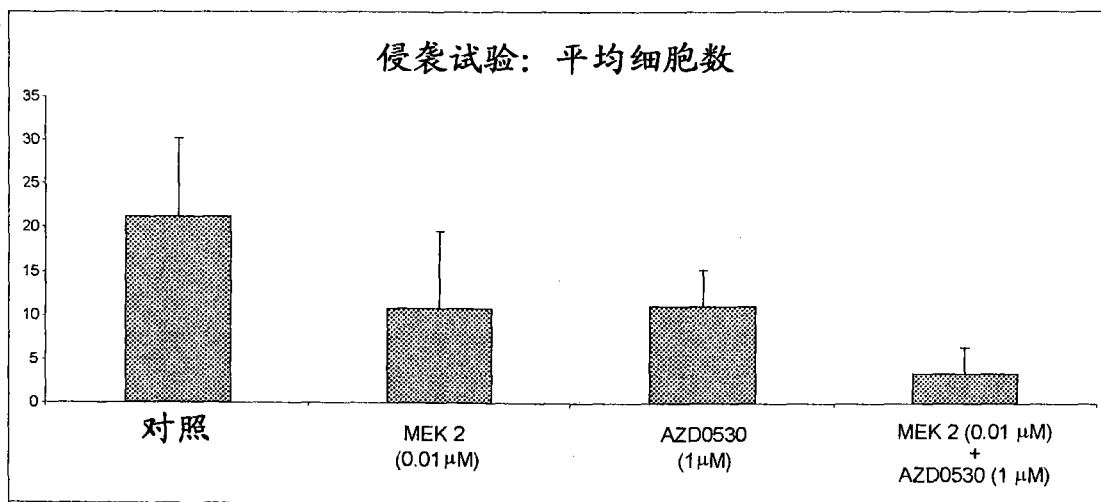


图 4