FAK 抑制剂在制备用于治疗 NRAS 突变的肿瘤的药物中的用途

技术领域

本发明属于药物化学领域。具体地，本发明涉及一种 FAK 抑制剂在制备用于治疗 NRAS 突变的肿瘤的药物中的用途。

背景技术

FAK，又称为蛋白酪氨酸激酶 2（PTK2），是一种非受体酪氨酸激酶，并且是粘着斑复合体的关键组分。FAK 在介导整合素和生长因子信号以调节肿瘤细胞的侵袭、增殖和存活方面发挥着重要作用。FAK 广泛表达并且进化保守。过去二十年的研究表明，FAK 在多种实体瘤中过度表达，且表达水平与肿瘤预后呈负相关。最近的研究也表明，FAK 在调节肿瘤微环境中扮演着重要角色，提示 FAK 在免疫治疗和抗肿瘤治疗的适应性耐药中发挥着重要的作用。体外和体内临床前研究均显示阻断 FAK 具有抗肿瘤作用。但是 FAK 抑制剂对肿瘤的抑制活性差异很大。

BI853520 是一种 FAK 抑制剂，在 37 种不同瘤种的 CDX（人源肿瘤细胞系移植小鼠）模型中，BI853520 表现出不同的抗肿瘤活性，其 TGI（肿瘤生长抑制）跨度从 0-107%不等。如何更有针对性的使用它抑制肿瘤生长是本领域亟待解决的技术问题。

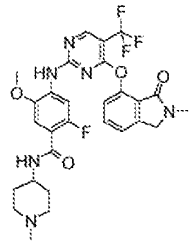
发明内容

一方面本发明提供了一种 FAK 抑制剂在制备用于治疗 NRAS 突变的肿瘤的药物中的用途。

可选的，所述 FAK 抑制剂为 BI853520、defactinib、GSK2256098、PF-00562271、VS-4718 或其药学上可接受的盐。

可选的，所述 FAK 抑制剂为 BI853520 或其药学上可接受的盐，尤其是 BI853520 酒石酸盐。

所述 BI 853520，其具有以下结构：



。

可选的，所述药物和有效量的第二治疗剂联用。

可选的，所述药物和放疗或者细胞治疗联用。

可选的，所述肿瘤为霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝细胞癌、胆管癌、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、慢性髓系白血病、甲状腺癌、神经胶质瘤、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、肾细胞癌、头颈部癌、胃癌、食管癌、胃食管结合部癌、胸腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、黑色素瘤、皮肤癌、生殖细胞癌、鼻咽癌、口咽癌或喉癌；进一步的所述肿瘤为急性髓系白血病、黑色素瘤、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肝细胞癌、卵巢癌、纤维肉瘤和胆管癌。

可选的，所述第二治疗剂选自化疗剂，靶向治疗剂和免疫治疗剂中的一种或几种。

可选的，所述第二治疗剂选自尼莫司汀、卡莫司汀、洛莫司汀、替莫唑胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、甘磷酰芥、去氧氟鸟苷、多西氟鸟啶、氟尿嘧啶、巯嘌呤、巯唑嘌呤、巯鸟嘌呤、氟鸟苷、替加氟、吉西他滨、地西他滨、卡莫氟、羟基脲、甲胺喋呤、优氟定、卡培他滨、安西他滨、塞替哌、放线菌素 D、阿霉素、脂质体阿霉素、柔红霉素、表柔比星、细裂霉素、平阳霉素、吡柔比星、戊柔比星、伊达比星、伊立替康、三尖衫酯碱、喜树碱、羟基喜树碱、托泊替康、长春瑞宾诺维本、紫杉醇、泰索帝、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春酰胺、长春花碱、替尼泊苷、依托泊苷、揽香烯、阿他美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、来曲唑、福美坦、甲他孕酮、他莫昔芬、门冬酰胺酚、卡铂、顺铂、达卡巴嗪、奥沙利铂、乐沙定、可铂奥沙、米托蒽醌、丙卡巴肼、多西他赛、吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼、克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼、拉帕替尼、依维莫司、帕博西尼、瑞博西尼、阿帕替尼、瑞戈非尼、索拉菲尼、舒尼替尼、替西罗莫司、乐伐替尼、帕唑替尼、阿雷替尼、阿希替尼、卡博替尼、曲美替尼、比美替尼、维罗非尼、达拉非尼、卡比替尼、凡德他尼、硼替佐米、帕布昔利布、来那度胺、伊沙佐米、伊马替尼、达沙替尼、博舒替尼、帕纳替尼、伊布替尼、艾代拉利司、贝利司他、罗米地辛、伏立诺他、奥拉帕尼、尼拉帕利、狄诺赛麦、维莫德吉、索尼德吉、鲁卡帕尼、布加替尼、比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、阿贝西尼、阿帕他胺、阿柏西普、阿扎胞苷、博莱霉素、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、天冬酰胺酶、埃坡霉素、氟达拉滨、氟他胺、双氯乙基甲胺、帕利他塞、培美曲塞、雷替曲塞、耐昔妥珠单抗、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、Ado-曲妥珠单抗、帕托珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、阿利库单抗、德瓦鲁单抗、尼妥珠单抗、达雷木单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、德瓦鲁单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗中的一种或几种。

可选的，所述第二治疗剂选自地西他滨、吉西他滨、顺铂、卡铂、奥沙利铂、阿霉素、脂质体阿霉素、紫杉醇、多西他赛、曲美替尼、比美替尼、考比替尼、德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗。

可选的，所述第二治疗剂多西他赛、脂质体阿霉素、考比替尼、帕博利珠单抗、地西他滨；

可选的，所述第二治疗剂为考比替尼。

另一方面，本发明还提供了一种治疗发生NRAS突变的肿瘤的方法，其包括向个体施用有效量的FAK抑制剂。

可选的，所述FAK抑制剂为BI853520或defactinib、GSK2256098、PF-00562271、VS-4718或其药学上可接受的盐，优选为BI853520或其药学上可接受的盐，尤其是BI853520酒石酸盐。

可选的，其进一步包括向个体施用有效量的第二治疗剂。

可选的，其进一步包括放疗或者细胞治疗。

可选的，所述肿瘤为霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝细胞癌、胆管癌、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、慢性髓系白血病、甲状腺癌、神经胶质瘤、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、肾细胞癌、头颈部癌、胃癌、食管癌、胃食管结合部癌、胸腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、黑色素瘤、皮肤癌、生殖细胞癌、鼻咽癌、口咽癌或喉癌；进一步的所述肿瘤为急性髓系白血病、黑色素瘤、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肝细胞癌、卵巢癌、纤维肉瘤和胆管癌。

可选的，所述第二治疗剂选自化疗剂，靶向治疗剂和免疫治疗剂中的一种或几种。

可选的，所述第二治疗剂选自尼莫司汀、卡莫司汀、洛莫司汀、替莫唑胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、甘磷酰芥、去氧氟鸟苷、多西氟鸟啶、氟尿嘧啶、巯嘌呤、巯唑嘌呤、巯鸟嘌呤、氟鸟苷、替加氟、吉西他滨、地西他滨、卡莫氟、羟基脲、甲胺喋呤、优氟定、卡培他滨、安西他滨、塞替哌、放线菌素D、阿霉素、脂质体阿霉素、柔红霉素、表柔比星、细裂霉素、平阳霉素、吡柔比星、戊柔比星、伊达比星、伊立替康、三尖衫酯碱、喜树碱、羟基喜树碱、托泊替康、长春瑞宾诺维本、紫杉醇、泰索帝、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春酰胺、长春花碱、替尼泊苷、依托泊苷、揽香烯、阿他美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、来曲唑、福美坦、甲他孕酮、他莫昔芬、门冬酰胺酚、卡铂、顺铂、达卡巴嗪、奥沙利铂、乐沙定、可铂奥沙、米托蒽醌、丙卡巴肼、多西他赛、吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼、克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼、拉帕替尼、依维莫司、帕博西尼、瑞博西尼、阿帕替尼、瑞戈非尼、索拉菲尼、舒尼替尼、替西罗莫司、乐伐替尼、帕唑替尼、阿雷替尼、阿希替尼、卡博替尼、曲美替尼、比美替尼、维罗非尼、达拉非尼、卡比替尼、凡德他尼、硼替佐米、帕布昔利布、来那度胺、伊沙佐米、伊马替尼、达沙替尼、博舒替尼、帕纳替尼、伊布替尼、艾代拉利司、贝利司他、罗米地辛、伏立诺他、奥拉帕尼、尼拉帕利、狄诺赛麦、维莫德吉、索尼德吉、鲁卡帕尼、布加替尼、比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、阿贝西尼、阿帕

他胺、阿柏西普、阿扎胞苷、博莱霉素、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、天冬酰胺酶、埃坡霉素、氟达拉滨、氟他胺、双氯乙基甲胺、帕利他塞、培美曲塞、雷替曲塞、耐昔妥珠单抗、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、Ado-曲妥珠单抗、帕托珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、阿利库单抗、德瓦鲁单抗、尼妥珠单抗、达雷木单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、德瓦鲁单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗中的一种或几种。

可选的，所述第二治疗剂选自地西他滨、吉西他滨、顺铂、卡铂、奥沙利铂、阿霉素、脂质体阿霉素、紫杉醇、多西他赛、曲美替尼、比美替尼、考比替尼、德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗。

可选的，所述第二治疗剂多西他赛、脂质体阿霉素、考比替尼、帕博利珠单抗、地西他滨；

可选的，所述第二治疗剂为考比替尼。

可选的，所述第二治疗剂同步，交替或序贯给药。

可选的，所述 FAK 抑制剂和放疗或细胞治疗同步、交替或序贯进行。

再一方面，本发明提供了一种用于治疗 NRAS 突变的肿瘤的 FAK 抑制剂。

可选的，所述 FAK 抑制剂为 BI853520、defactinib、GSK2256098、PF-00562271、VS-4718 或其药学上可接受的盐，优选为 BI853520 或其药学上可接受的盐，尤其是 BI853520 酒石酸盐。

可选的，其进一步和有效量的第二治疗剂联用。

可选的，其进一步与放疗或者细胞治疗联用。

可选的，所述肿瘤为霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝细胞癌、胆管癌、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、慢性髓系白血病、甲状腺癌、神经胶质瘤、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、肾细胞癌、头颈部癌、胃癌、食管癌、胃食管结合部癌、胸腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、黑色素瘤、皮肤癌、生殖细胞癌、鼻咽癌、口咽癌或喉癌；进一步的所述肿瘤为急性髓系白血病、黑色素瘤、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肝细胞癌、卵巢癌、纤维肉瘤和胆管癌。

可选的，所述第二治疗剂选自化疗剂，靶向治疗剂和免疫治疗剂中的一种或几种。

可选的，所述第二治疗剂选自尼莫司汀、卡莫司汀、洛莫司汀、替莫唑胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、甘磷酰芥、去氧氟鸟苷、多西氟鸟啶、氟尿嘧啶、巯嘌呤、巯唑嘌呤、巯鸟嘌呤、氟鸟苷、替加氟、吉西他滨、地西他滨、卡莫氟、羟基脲、甲胺喋呤、优氟定、卡培他滨、安西他滨、塞替哌、放线菌素 D、阿霉素、脂质体阿霉素、柔红霉素、表柔比星、细裂霉素、平阳霉素、吡柔比星、戊柔比星、伊达比星、伊立替康、三尖衫酯碱、喜树碱、羟基喜树碱、托泊替康、长春瑞宾诺维本、紫杉

醇、泰索帝、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春酰胺、长春花碱、替尼泊苷、依托泊苷、揽香烯、阿他美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、来曲唑、福美坦、甲他孕酮、他莫昔芬、门冬酰胺酚、卡铂、顺铂、达卡巴嗪、奥沙利铂、乐沙定、可铂奥沙、米托蒽醌、丙卡巴肼、多西他赛、吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼、克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼、拉帕替尼、依维莫司、帕博西尼、瑞博西尼、阿帕替尼、瑞戈非尼、索拉菲尼、舒尼替尼、替西罗莫司、乐伐替尼、帕唑替尼、阿雷替尼、阿希替尼、卡博替尼、曲美替尼、比美替尼、维罗非尼、达拉非尼、卡比替尼、凡德他尼、硼替佐米、帕布昔利布、来那度胺、伊沙佐米、伊马替尼、达沙替尼、博舒替尼、帕纳替尼、伊布替尼、艾代拉利司、贝利司他、罗米地辛、伏立诺他、奥拉帕尼、尼拉帕利、狄诺赛麦、维莫德吉、索尼德吉、鲁卡帕尼、布加替尼、比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、阿贝西尼、阿帕他胺、阿柏西普、阿扎胞苷、博莱霉素、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、天冬酰胺酶、埃坡霉素、氟达拉滨、氟他胺、双氯乙基甲胺、帕利他塞、培美曲塞、雷替曲塞、耐昔妥珠单抗、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、Ado-曲妥珠单抗、帕托珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、阿利库单抗、德瓦鲁单抗、尼妥珠单抗、达雷木单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、德瓦鲁单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗中的一种或几种。

可选的，所述第二治疗剂选自地西他滨、吉西他滨、顺铂、卡铂、奥沙利铂、阿霉素、脂质体阿霉素、紫杉醇、多西他赛、曲美替尼、比美替尼、考比替尼、德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗。

可选的，所述第二治疗剂多西他赛、脂质体阿霉素、考比替尼、帕博利珠单抗、地西他滨；

可选的，所述第二治疗剂为考比替尼。

定义

本申请中所用的下列术语和符号具有如下所述的含义，其所处的上下文中另有说明的除外。

本文所述的术语“FAK 抑制剂”是指 FAK 的有效抑制剂，可适于哺乳动物，特别是人。

本文所述的术语“NRAS”是指是一种致癌基因，是 RAS 致癌基因家族的一员，其中还包括另外两个基因：KRAS 和 HRAS。这些基因在细胞分裂、细胞分化和细胞凋亡中有着重要的作用。

本文所述的术语“NRAS 突变”是指当 NRAS 基因发生致病性突变，其所编码的 N-Ras 蛋白将处于持续激活的状态，导致细胞增殖失控，进而形成肿瘤。

本文所用的术语“治疗”是指给患有疾病或者具有所述疾病的症状的个体施用一种或多种药物物质（特别是本文所述的 FAK 抑制剂，尤其是 BI853520 或其药学上可接受的盐），用以治愈、缓解、减轻、改变、医治、改善、改进或影响所述疾病或者所述疾病的症状。在一些实施方案中，所述疾病

是肿瘤或者癌症。在进一步的实施方案中，所述疾病是发生 NRAS 突变的癌症或肿瘤。

本文所用的术语“肿瘤”是指机体在各种致瘤因素的作用下，局部组织的细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，从而导致其克隆型异常增生而形成的异常病变。实施例包括，但不限于：霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝细胞癌、胆管癌、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、慢性髓系白血病、甲状腺癌、神经胶质瘤、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、、神经母细胞瘤、肾细胞癌、头颈部癌、胃癌、食管癌、胃食管结合部癌、胸腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、黑色素瘤、皮肤癌、生殖细胞癌、鼻咽癌、口咽癌或喉癌；进一步的所述肿瘤为急性髓系白血病、黑色素瘤、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肝细胞癌、卵巢癌、纤维肉瘤和胆管癌。

本文所用的术语“个体”是指哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物是指哺乳类的任何成员，其包括但不限于：人；非人灵长类动物，如黑猩猩及其它猿类和猴类物种；农场动物，如牛、马、绵羊、山羊和猪；家畜，如兔、狗和猫；实验室动物，包括啮齿类动物，如大鼠、小鼠和豚鼠；等等。非哺乳动物的例子包括但不限于鸟等。术语“个体”并不限定特定的年龄或性别。在一些实施方案中，个体是人。

本文所用的术语“药学上可接受的”指的是无毒的、生物学上可耐受的，适合给个体施用的。

本文所用的术语“药学上可接受的盐”指的是无毒的、生物学上可耐受的适合给个体施用的 BI853520 的酸加成盐，包括但不限于：BI853520 与无机酸形成的酸加成盐，例如盐酸盐、氢溴酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硫酸盐、亚硫酸盐、硝酸盐等；以及 BI853520 与有机酸形成的酸加成盐，例如甲酸盐、乙酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐、2-羟基乙磺酸盐、苯甲酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐和与式 $HOOC-(CH_2)_n-COOH$ (其中 n 是 0-4)的链烷二羧酸形成的盐等。在一些实施方案中，所述盐为酒石酸盐。

此外，药学上可接受的酸加成盐可以按照由碱性化合物制备酸加成盐的常规操作通过将游离碱溶于合适的溶剂并且用酸处理该溶液来得到。本领域技术人员无需过多实验即可确定各种可用来制备无毒的药学上可接受的酸加成盐的合成方法。

本文所用的术语“有效量”是指通常足以对个体产生有益效果的量。可以通过常规方法(例如建模、剂量递增研究或临床试验)结合常规影响因素(例如给药方式、化合物的药代动力学、疾病的严重程度和病程、个体的病史、个体的健康状况、个体对药物的响应程度等)来确定本发明的化合物的有效量。

本文所用的术语“第二治疗剂”指的是一种或多种药物物质，用于预防和/或治疗疾病。在一些

实施方案中，所述第二治疗剂选自化疗剂，靶向治疗剂和免疫治疗剂中的一种或几种。在一些实施方案中，所述第二治疗剂选自尼莫司汀、卡莫司汀、洛莫司汀、替莫唑胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、甘磷酰芥、去氧氟鸟苷、多西氟鸟啶、氟尿嘧啶、巯嘌呤、巯唑嘌呤、巯鸟嘌呤、氟鸟苷、替加氟、吉西他滨、地西他滨、卡莫氟、羟基脲、甲胺喋呤、优氟定、卡培他滨、安西他滨、塞替哌、放线菌素 D、阿霉素、脂质体阿霉素、柔红霉素、表柔比星、细裂霉素、平阳霉素、吡柔比星、戊柔比星、伊达比星、伊立替康、三尖衫酯碱、喜树碱、羟基喜树碱、托泊替康、长春瑞宾诺维本、紫杉醇、泰索帝、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春酰胺、长春花碱、替尼泊苷、依托泊苷、揽香烯、阿他美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、来曲唑、福美坦、甲他孕酮、他莫昔芬、门冬酰胺酚、卡铂、顺铂、达卡巴嗪、奥沙利铂、乐沙定、可铂奥沙、米托蒽醌、丙卡巴肼、多西他赛、吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼、克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼、拉帕替尼、依维莫司、帕博西尼、瑞博西尼、阿帕替尼、瑞戈非尼、索拉菲尼、舒尼替尼、替西罗莫司、乐伐替尼、帕唑替尼、阿雷替尼、阿希替尼、卡博替尼、曲美替尼、比美替尼、维罗非尼、达拉非尼、卡比替尼、凡德他尼、硼替佐米、帕布昔利布、来那度胺、伊沙佐米、伊马替尼、达沙替尼、博舒替尼、帕纳替尼、伊布替尼、艾代拉利司、贝利司他、罗米地辛、伏立诺他、奥拉帕尼、尼拉帕利、狄诺赛麦、维莫德吉、索尼德吉、鲁卡帕尼、布加替尼、比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙、阿贝西尼、阿帕他胺、阿柏西普、阿扎胞苷、博莱霉素、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、天冬酰胺酶、埃坡霉素、氟达拉滨、氟他胺、双氯乙基甲胺、帕利他塞、培美曲塞、雷替曲塞、耐昔妥珠单抗、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、Ado-曲妥珠单抗、帕托珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、阿利库单抗、德瓦鲁单抗、尼妥珠单抗、达雷木单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、德瓦鲁单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗中的一种或几种。可选的、所述第二治疗剂选自地西他滨、吉西他滨、顺铂、卡铂、奥沙利铂、阿霉素、脂质体阿霉素、紫杉醇、多西他赛、曲美替尼、比美替尼、考比替尼、德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗。可选的、所述第二治疗剂多西他赛、脂质体阿霉素、考比替尼、帕博利珠单抗、地西他滨；可选的、所述第二治疗剂为考比替尼。

此外，所述第二治疗剂选自的药物物质，因翻译不同，因此说法会略有差异，但它们指代的还是一种药物物质，例如：卡比替尼(Cobimetinib)别名考比替尼。

本文所用的术语“抑制”是指生物活动或过程的基线活性的降低。

本文所用的未具体定义的技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。

附图说明

附图 1 显示了 IL-3 对 BI 853520 在 Ba/F3-$NRAS^{G12D}$ 细胞系中抗增殖作用的影响。其显示对于 BI853520，在 $NRAS^{G12D}$ 转染的 Ba/F3 细胞系中，添加 IL-3 后 IC_{50} 从 3.4 增至 15μM，IC_{50} 提高达到 4 倍以上。GraphPad Prism 6 软件和学生 t 检验用于统计数据分析。统计学显著性差异阈值设置为 P = 0.05。

附图 2 显示了体重的改变。其显示，空白对照组动物体重减轻了 1.9%，以 6 mg/kg 的 BI 853520 治疗的动物的体重中位数增加 4.9%（与对照组相比，p = 0.9966），以 12.5 mg/kg 的 BI 853520 治疗的动物的体重中位数增加 5.7%（与对照组相比，p = 0.9996），以 25 mg/kg 的 BI 853520 治疗的动物的体重中位数增加 9.4%（与对照组相比，p = 1.0000），以 50 mg/kg 的 BI 853520 治疗的动物的体重中位数增加了 8.3%（与对照组相比，p = 0.999）。

附图 3 显示了 HT-1080 肿瘤生长动力学。其显示在第 13 天，空白对照组的肿瘤体积中位数为 823 mm^3，以 6 mg / kg 的 BI 853520 治疗的肿瘤体积中位数为 322 mm^3，以 12.5 mg/kg 的 BI 853520 治疗的肿瘤体积中位数为 149 mm^3，以 25 mg/kg 的 BI 853520 治疗的肿瘤体积中位数为 15 mm^3，以 50 mg/kg 的 BI 853520 治疗的肿瘤体积中位数为 322 mm^3。

附图 4 显示了 KYSE-270 肿瘤生长动力学，其显示了对照组的肿瘤体积中位数从 179 mm^3 增长到 1032 mm^3，与对照组相比，每天用 50 mg / kg BI 853520 进行治疗的肿瘤体积中位数从 175 mm^3 下降到 126 mm^3，每周一次用 10 mg / kg 紫杉醇治疗对肿瘤生长没有影响，肿瘤体积中位数从 190 mm^3 增长到 1033 mm^3，每天一次以 50 mg / kg BI 853520 与每周一次 10 mg / kg 紫杉醇的联合治疗，显着延迟了肿瘤的生长，肿瘤体积中位数从 173 mm^3 下降到 87 mm^3。

附图 5 显示了体重的改变。其显示对照组动物的体重中位数下降了 10.3%，与对照组相比，每天用 50 mg / kg BI 853520 进行治疗的动物的体重中位数增加了 2.8%，每周一次用 10 mg / kg 紫杉醇治疗的动物的体重中位数减少了 9.7%，每天一次以 50 mg / kg BI 853520 与每周一次 10 mg / kg 紫杉醇的联合治疗，动物的体重中位数增加了 3.5%。

附图 6 显示了 GAK 肿瘤生长动力学。其显示在 GAK 模型中，与对照组相比，每天 BI 853520 进行治疗，延迟了肿瘤的生长。

附图 7 显示了 HMVII 肿瘤生长动力学。其显示在 HMVII 模型中，与对照组相比，每天 BI 853520 进行治疗，延迟了肿瘤的生长。

实施例

提供下面的实施例以进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于举例说明本发明，而不用于限制本发明的范围。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法均可以按照这类反应的常规条件进行或者按照制造厂商所建议的条件进行。

以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

实施例中所用的缩写含义如下：

ATCC	美国典型培养物保藏中心
CO_2	二氧化碳
d	天
FCS	小牛血清
FBS	胎牛血清
g	克
kg	千克
l	升
mg	毫克
ml	毫升
μl	微升
mM	毫摩
mm^3	立方毫米
GLP	药物非临床研究质量管理规范
h	小时
MCB	原始细胞库
mean	算术平均数
MTD	最大耐受剂量
n	样本量
PBS	磷酸盐缓冲盐
RPMI 1640	RPMI 1640 培养基
p.o.	经口
qd	每天
q7d	每 7 天（每周一次）
s.c.	皮下
SD	标准差

TGI	肿瘤生长抑制
WCB	工作细胞库
V_{rel}	相对肿瘤体积（相对于第 1 天）

实施例 I：BI853520 抗肿瘤作用与 NRAS 的相关性

1. 材料和方法：

1.1. DNA 构建和逆转录病毒产生

参见 Cuiffo B, Ren R. Palmitoylation of oncogenic NRAS is essential for leukemogenesis. Blood., 2010, 115: 3598–605 和 Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. Cancer Res., 2007, 67: 7139–46 所述方法产生表达 NRAS-G12D、KRAS4A-G12D、KRAS4B-G12D 和 NRAS-G12D-C181S 作为 N-端 GFP 融合蛋白的逆转录病毒构建物。用 Bosc23 细胞制备逆转录病毒，并如 Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. Cancer Res., 2007, 67: 7139–46 所述方法进行了滴度测定。

1.2. 细胞培养和逆转录病毒转导

Ba/F3 细胞系于 2009 年从 ATCC 获得，并按 Zhang X, Ren R. Bcr-abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: A novel model for chronic myelogenous leukemia. Blood., 1998, 92: 3829–40 所述方法进行培养。将生长因子依赖性 BA/F3 细胞在包括 10%FBS 的 RPMI 1640 中培养，并补充 15%WEHI-3 条件培养基或重组 IL-3（Roche）作为 IL-3 的来源，最终浓度为 1ng/ml。如 Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. Cancer Res., 2007, 67: 7139–46 和 Fredericks J, Ren R. The role of RAS effectors in BCR/ABL induced chronic myelogenous leukemia. Front Med China., 2013, 7: 452–61 所述方法用逆转录病毒转导 BA/F3 细胞。收到原始库存后，将细胞扩增并以低传代率（<3）冷冻。将冷冻的细胞解冻并用于本研究，所有实验程序的细胞传代限制为 15 次。所有细胞均定期检测，以确保支原体的自由和维持在正常状态。

1.3. 材料

BI853520：按照专利 WO2010058032 中的方法合成。

1.4. 抗增殖试验

在 100 μL 培养基中，以每孔 5000 个细胞的密度将 $NRAS^{G12D}$ 转染的 Ba/F3 (Ba/F3-N)或 $KRAS^{G12D}$ 转染的 Ba/F3 (Ba/F3-N)细胞接种到 96 孔细胞培养丛板中。将 BI853520 用 RPMI 1640 在 9 个点进行 3 倍稀释稀释，并根据各孔的体积添加，以 10 μmol/L 开始，达到 3 倍浓度梯度（最终溶剂浓度 <1/1000）。以 PD0325901 为阳性对照。孵育 48 小时后，使用 CellTiter Glo（Promega）测量细胞活力。使用 Envision 读板仪（PerkinElmer）检测发光。Z 因子的计算方法如 Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. J Biomol Screen., 1999, 4: 67–73 所述，以下分析仅使用 Z 因子>0.6 的数据。使用 GraphPad Prism 6 软件（http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/），基于非线性适应度（曲线拟合）中的相对存活细胞百分比拟合剂量-响应曲线。内置软件分析“非线性回归（曲线拟合）”和方程式“对数（抑制剂）与响应变量斜率”用于数据分析和 IC_{50} 计算。

2. 统计分析：

GraphPad Prism 6 软件和学生 t 检验用于统计数据分析。统计学显著性差异阈值设置为 P = 0.05。

3. 结果：

Ba/F3 是一种鼠骨髓来源的、依赖 IL-3 生存和增殖的细胞系，它已成功用于激酶药物发现的高通量分析。我们用致癌 RAS 测试了该系统，发现致癌 NRAS（$NRAS^{G12D}$）可以将 Ba/F3 细胞转化为独立于 IL-3。图 1 和表 1 显示 BI853520 对 Ba/F3-$NRAS^{G12D}$ 细胞系的抗增殖作用，IC_{50} 值为 3.4μM。加入 IL-3 后 IC_{50} 的增加超过 4 倍，表明抑制作用与 NRAS 有关。

表 1：是否添加 IL-3 对 BI853520 在 Ba/F3-$NRAS^{G12D}$ 细胞系中抗增殖作用的影响

细胞系	化合物	IC_{50} (μM)	
		-IL-3	+IL-3
Ba/F3-$NRAS^{G12D}$	BI853520	3.4	15

实施例 2：BI853520 在人纤维肉瘤小鼠模型中的作用（细胞系 HT-1080）

1. 材料和方法：

1.1. 研究设计

当肿瘤的中位体积在 70-130mm^3 之间时开始治疗

空白对照组 10 只，治疗组每组 7 只

每日一次口服灌胃给药

空白对照：0.5%的羟乙基纤维素

BI 853520：50mg/kg，25mg/kg，12.5mg/kg，6mg/kg，

每周测量肿瘤体积 3 次，每日监测体重

治疗结果的评估是基于单个肿瘤的绝对体积

根据体重变化评估耐受性。

1.2. 材料

BI853520：按照专利 WO2010058032 中的方法合成。将干粉悬浮在 0.5%的羟乙基纤维素中，以达到每个实验所需的浓度。该配方的 pH 值为 3.5。

HT-1080 细胞：携带 NRAS、CDKN2A 和 IDH1 基因突变的 HT-1080 细胞来自 ATCC（CRL-121）。细胞在 T175 组织培养瓶中生长，以添加 10%热灭活胎牛血清的 DMEM+Glutamax 作为培养基。细胞在 37℃和 5% CO_2 的加湿空气中培养。

鼠：无胸腺雌性 BomTac，大约 6 周龄的 NMRI-Foxn1^{nu} 小鼠购自丹麦 Taconic。在到达动物房后，老鼠在新的环境下适应至少 3 天，然后再用于实验。这些动物饲养在标准条件下（温度 21.5±1.5℃和 55±10%湿度），每组 5 个一组。标准化饮食和随意提供高压灭菌的自来水。Datamars T-IS 8010 FDX-B 皮下植入颈部区域的应答器和 LabMax II 固定式读取器被用来识别每只小鼠。笼卡上显示研究编号，动物识别号，化合物和剂量水平，给药途径以及在整个实验过程中动物的给药时间表都保留在动物身上。

1.3. 随机建立肿瘤：

为建立皮下肿瘤，用胰酶消化法采集 HT-1080 细胞，离心、洗涤并悬浮在冰冷的 PBS+1 x 10^8 细胞/ml 中。然后将含有 1 x 10^7 细胞的 100µl 细胞悬液皮下注射到裸鼠的右侧胁腹（每只小鼠 1 个位点）。当肿瘤形成并达到 5-8mm 直径（细胞注射后 7 天）时，将小鼠随机分配到治疗组和空白对照组。

1.4. 给药：

BI853520 悬浮于 0.5%的羟乙基纤维素中，每日通过灌胃针胃内给药，给药量为 10mL/Kg。

1.5. 监测肿瘤生长和副作用：

每周用卡尺测量肿瘤直径三次（周一、周三和周五）。根据公式计算每个肿瘤的体积[以 mm^3 为单位]，“肿瘤体积=长度 x 直径 ^{2} x π/6”。为了监测治疗的副作用，每日检查小鼠的异常情况，并每日测定体重。动物在研究结束时处死（大约在治疗开始后两周）；在研究期间，出于伦理原因，肿瘤坏死或肿瘤大小超过 2000 mm^3 的动物会提前被处死。

2. 统计分析：

第 13 天实验结束时，对肿瘤体积和体重参数进行统计评估。肿瘤体积绝对值和体重的变化百分比（参考第 1 天的初始重量）被使用。采用了非参数方法，计算了观察次数、中位数、最小值和最大值。为了快速了解可能的治疗效果，每个治疗组 T 的肿瘤体积中位数和对照组 C 的肿瘤体积中位数被用于计算从第 1 天到第 d 天的 TGI：

$$TGI=100 \times [(C_d - C_1) - (T_d-T_1)]/(C_d-C_1)$$

其中，C_1，T_1=在实验开始第一天对照组和治疗组的肿瘤体积中位数

C_d，C_d=第 13 天实验结束时对照组和治疗组肿瘤体积的中位数

采用单侧递减 wilcoxon 试验，将每个剂量的试验化合物与对照组进行比较，肿瘤体积减少作为治疗效果，体重减少作为副作用。根据 Bonferroni-Holm 对肿瘤体积（疗效参数）的 P 值进行了多次比较调整，而体重（耐受性参数）的 P 值未进行调整，以免忽略可能的副作用。显著性水平固定在 $\alpha=5\%$。p 值（调整后）小于 0.05 的被认为显示出组间的统计学显著性差异，当 $0.05 \leq p$ 值 <0.10 时，差异被视为指示性差异。使用软件包 SAS 版本 9.2（SAS Institute Inc.，美国卡里北卡罗来纳州）和 Proc StatXact 版本 8.0（Cytel 软件公司，美国剑桥马萨诸塞州）进行统计评估。

3. 结果：

3.1. 在试验期间，空白对照组动物体重减轻了 1.9%（图 2，表 2），在第 13 天，它们的肿瘤体积中位数达到了 823 mm^3（图 3，表 3）。

3.2. 每天一次以 50 mg/kg 的 BI 853520 治疗，TGI 为 107%（$p=0.0002$），并且在所有动物中均观察到肿瘤缩小（图 3，表 3）。动物的体重中位数增加了 8.3%（与对照组相比，$p = 0.999$）（图 2，表 2）。

3.3. 每天一次以 25 mg/kg 的 BI 853520 治疗，TGI 为 113%（$p=0.0002$），并且有 6 只动物的肿

瘤缩小（图 3，表 3）。动物的体重中位数增加 9.4%（与对照组相比，p = 1.0000）（图 2，表 2）。

3.4. 每天一次以 12.5 mg/kg 的 BI 853520 治疗，TGI 为 94%（p =0.0002）,有 2 只动物的肿瘤缩小（图 3，表 3）。动物的体重中位数增加 5.7%（与对照组相比，p = 0.9996）（图 2，表 2）。

3.5. 每天一次以 6 mg / kg 的 BI 853520 治疗，TGI 为 70%（p = 0.0004），有 1 只动物的肿瘤缩小（图 5，表 3）。动物的体重中位数增加 4.9%（与对照组相比，p = 0.9966）（图 2，表 2）。

表 2：试验结束时体重中位数改变

剂量（mg/Kg）	给药时间表	体重中位数改变（%）
对照组	qd	-1.9
50	qd	+8.3
25	qd	+9.4
12.5	qd	+5.7
6	qd	+4.7

表 3：肿瘤中位体积

剂量（mg/Kg）	给药时间表	肿瘤中位体积（mm^3）	肿瘤缩小[X/7]	TGI [%]
对照组	qd	823	-	n.a
50	qd	54	7	107
25	qd	15	6	113
12.5	qd	149	2	94
6	qd	322	1	70

4. 结论：

在人 HT-1080 纤维肉瘤模型，BI 853520 在所有剂量水平均显示出统计学显著性抗肿瘤活性，所有治疗组中均观察到消退；在最高剂量水平，所有的动物都观测到肿瘤体积缩小。在以前的研究中，每天服用的最高剂量为 100 mg/kg，没有限制性毒性。因此，以比 MTD 低至少 16 倍的剂量(6 mg/kg)获得了显着的疗效。

实施例 3：BI 853520 在 NMRI 裸鼠的人食道癌细胞系 KYSE-270 衍生的皮下异种移植小鼠模型中的抗肿瘤活性

1. 材料与方法

1.1. 模型：在 NMRI 裸鼠皮下异种移植人食道癌细胞系 KYSE-270。

1.2. 测试化合物：BI853520：按照专利 WO2010058032 中的方法合成。

1.3. 细胞：KYSE-270 是食道癌细胞系（英格兰公共卫生，目录号：94072021）。在 37℃下，将细胞放置在含 5%CO_2 的 T175 组织培养瓶中培养。所用的培养基为补充有 2%FCS 和 2mM Glutamax 的 RPMI 1640+ HAM F12（1:1）。以 1:2 的比例每周传代三次。

1.4. 老鼠：小鼠是从丹麦 Taconic 购买的 8 至 10 周大的雌鼠（BomTac：NMRI-Foxn1^{nu}）。到达动物房后，让小鼠至少适应 5 天，然后再用于实验。这些动物饲养在标准条件下（温度为 21.5±1.5℃，湿度为 55+10%），以 7 到 10 个为一组。提供标准饮食和高压灭菌的自来水供自由采食。异氟烷麻醉下植入的皮下微芯片被用来识别每只小鼠。显示研究编号，动物识别编号，化合物和剂量水平，给药途径以及在整个实验过程中动物的给药时间表都保留在动物身上。

1.5. 随机建立肿瘤：为了建立皮下肿瘤，通过离心收集 KYSE-270 细胞，洗涤并以 5×10^7 细胞 / ml 的浓度重悬于 PBS + 5%FCS 中。将含有 5×10^6 个细胞的 100 µl 细胞悬浮液皮下注射到小鼠的右侧胁腹（每只小鼠 1 个位点）。当肿瘤充分建立并且体积达到 94 至 252mm^3 时，将小鼠随机分配在治疗组和空白对照组（细胞注射后 13 天）。

1.6. 给药：将 BI 853520 悬浮在 0.5%的羟乙基纤维素中，每天通过灌胃针胃内给药，给药量为 10mL/Kg 体重。将紫杉醇（Paclitaxel）溶于盐水（0.9%NaCl）中，静脉内给药，体积为 10 ml / kg 体重。BI853520 的悬浮液最多使用 7 天。紫杉醇溶液在 6°C 的温度下保存，最多使用 14 天。

1.7. 监测肿瘤的生长和副作用：每周用卡尺测量肿瘤直径三次。根据公式“肿瘤体积＝长度×直径$^2\times\pi/6$”计算每个肿瘤的体积[mm^3]。为了监测治疗的副作用，每天检查小鼠的异常情况，且每周测量三次体重。出于伦理原因，对肿瘤直径超过 1.5 厘米，肿瘤溃烂或体重下降 20%的动物进行安乐死。

2. 统计分析：

对第 13 天的肿瘤体积和体重进行统计评估。动物编号 1（空白对照组）从统计评估中排除了，因为体重减轻，必须尽早（第 9 天）安乐死。在统计分析中将测得的肿瘤体积作为目标变量。计算了每组的动物数量，肿瘤体积的中位数，最小值和最大值。为了快速了解可能的治疗效果，将每个治疗组 T 的肿瘤体积的中位数和对照组 C 的肿瘤体积中位数用于计算 TGI：

$$TGI=100\ x\ [(C_d - C_1) - (T_d-T_1)]/(C_d-C_1)$$

其中，C_1，T_1=在实验开始第一天对照组和治疗组的肿瘤体积中位数

C_d，C_d=第 13 天实验结束时对照组和治疗组肿瘤体积的中位数

采用 wilcoxon 试验进行比较。对于体重，使用相对于第 1 天的初始体重的变化百分比用作统计

分析的目标变量。计算每组的动物数量，体重变化的中位数，最小值和最大值。

进行单方面测试以比较所有治疗组与对照组以观察

• 肿瘤体积减少（抑制肿瘤生长，功效参数）

• 减轻体重变化（体重减轻，耐受性参数）

在每个子主题内，根据 Bonferroni-Holm 对功效参数的 p 值进行多次比较调整。耐受性参数的 p 值保持不变，以免忽略可能的副作用。显着性水平固定为 α = 5%。调整后的 p 值小于 0.05 被认为在各组之间显示出统计学上的显着差异，并且当 0.05≤p 值<0.10 时，差异被认为是指示性的。统计评估是使用 SAS 9.4 版软件包（SAS Institute Inc.，美国 Cary NC）进行的。

3. 结果

肿瘤体积和体重：

直到第 13 天，对照组的肿瘤中位体积从 179 mm^3 增长到 1032 mm^3（图 4）。对照组动物的中位体重下降了 10.3%（图 5，表 4）。第 9 天，一只动物由于体重严重下降，必须对其实施安乐死。

与对照组相比，每天用 50 mg / kg BI 853520 进行治疗，显著延迟了肿瘤的生长（中位 TGI = 106%，p = 0.0003）（图 5，表 4）。在第 13 天，7 个中有 6 个肿瘤发生缩小（表 4）。动物的中位体重增加了 2.8%，与对照组无显着差异（p = 0.9999）（图 5，表 4）。

与对照相比，每周一次用 10 mg / kg 紫杉醇治疗对肿瘤生长没有影响（中位 TGI = 2%，p = 0.3788）（图 4，表 4）。在第 13 天，所有动物的肿瘤均没有发生缩小（表 4）。动物的中位数体重减少了 9.7%，与对照组无显着差异（p = 0.7320）（图 5，表 4）。

与对照组相比，每天一次以 50 mg / kg BI 853520 加上每周一次 10 mg / kg 紫杉醇的联合治疗，显着延迟了肿瘤的生长（中位 TGI = 110%，p = 0.0003）（图 4，表 4）。在第 13 天，所有动物的肿瘤均发生缩小（表 4）。动物的中位数体重增加了 3.5%，与对照组无显着差异（p = 1.0000）（图 5，表 4）。

表 4：每组 TGI，肿瘤缩小和体重变化情况(第 13 天)

化合物	剂量(给药时间表)	TGI (%)	肿瘤缩小 [x/y]	体重中位数改变 (%)
对照组	-(qd+q7d)			-10.3
BI853520	50mg/Kg (qd)	106	6/7	+2.8
Paclitaxel	10 mg/Kg (q7d)	2	0/7	-9.7
BI853520+Paclitaxel	50mg/Kg (qd) + 10 mg/Kg (q7d)	110	7/7	3.5

4. 结论

在皮下异种移植人食道癌细胞系 KYSE-270 的模型中，在使用 50 mg/ kg BI 853520 及与 10 mg / kg 紫杉醇联用的治疗组中观察到统计学上显著的肿瘤生长抑制作用，且均耐受良好。

实施例 4：BI 853520 对 HMVII 和 GAK CDX 模型（带有 NRAS 突变的黑素瘤模型）的肿瘤生长抑制作用

1. 材料与方法

1.1. 测试化合物：BI853520，按照专利 WO2010058032 中的方法合成 BI853520。BI853520 用 0.5%的羟乙基纤维素（Ashland）配制。

1.2. 细胞：黑色素瘤细胞系 GAK 购自 JCRB 细胞库，HMVII 细胞购自 Sigma。GAK 起源于阴道黑素瘤患者的腹股沟淋巴结，而 HMVII 起源于原发性阴道黑素瘤。在 37℃下，将 GAK 和 HMVII 细胞放置在含 5%CO_2 的组织培养瓶中培养，培养基分别为含有 10%热灭 FBS 的 Ham's F12，和含 15%FBS 的 Ham's F10。所有培养基均补充有 100 U / mL 青霉素，100 mg / mL 链霉素和 2 mM GlutaMAX。所有细胞培养试剂均购自 GIBCO。

HMVII 和 GAK 细胞系均在 Q61 位置携带 NRAS 突变。NRAS ^{Q61K} 的 HMVII 和 NRAS ^{Q61L} 的 GAK。

1.3. 老鼠：约 4 周龄的雌性 balb / c 裸鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司）。到达动物房后，让小鼠适应新环境至少 2 周，然后再用于实验。将动物饲养在标准条件下（温度 21.5±1.5℃和 55±10%湿度）。随意提供标准饮食和高压灭菌的自来水。所有动物护理和实验程序均按照北京肿瘤医院和研究所医学伦理委员会批准的动物护理伦理准则进行。

1.4. 随机建立肿瘤：

为了建立皮下肿瘤，通过胰蛋白酶消化收集 HMVII 和 GAK 细胞，离心，洗涤并重悬于冰冷的 PBS + 5%FCS 中。然后将 100 μl 含有 5×10^6 个细胞的细胞悬浮液皮下注射到裸鼠的右侧胁腹（每只小鼠 1 个位点）。当肿瘤被充分地建立并达到约 400-600mm^3 的中值体积时，将小鼠随机分配在治疗组和空白对照组。

1.5. 给药：将 BI 853520 配置在 0.5%的羟乙基纤维素中，每天通过灌胃针胃内给药，给药量为 10mL/Kg 体重。

1.6. 监测肿瘤的生长：

每周用卡尺测量肿瘤直径两次。根据公式“肿瘤体积＝长度×直径 2×π/6”计算每个肿瘤的体积[mm^3]。在治疗开始后约两周，研究结束时处死动物。在研究过程中，出于伦理原因，将处死具有

坏死性肿瘤或肿瘤大小超过 2000 mm^3 的动物。

2. 统计分析：

在实验结束时对肿瘤体积进行统计学评估。对于肿瘤体积，使用相对值。

计算了观察次数，肿瘤体积的中位数，最小值和最大值。为了快速观察可能的治疗效果，计算了以下指标：

相对肿瘤体积：（T/C）

$$T/C = 100 * \frac{T_d}{C_d}$$

从第一天到第 d 天的 TGI：

$$TGI=100 \text{ x } [(C_d - C_1) - (T_d-T_1)]/(C_d-C_1)$$

其中，C_1，T_1=在实验开始第一天对照组和治疗组的相对肿瘤体积平均数

C_d，C_d=第 d 天实验结束时对照组和治疗组相对肿瘤体积的平均数

统计评估是使用 Microsoft Excel 中的学生 t 检验函数，使用两尾分布和两样本等方差类型。

显著性水平固定为 α = 5%。认为（调整后的）p 值小于 0.05，表明治疗组之间存在显著差异，每当 0.05≤p 值<0.10 时，该差异即为指示性。

3. 结果

在 GAK 模型中，与对照组相比，每天 BI 853520 进行治疗，延迟了肿瘤的生长（中位 TGI =80%，p = 0.03）（图 6，表 5）。

在 HMVII 模型中，与对照组相比，每天 BI 853520 进行治疗，延迟了肿瘤的生长（中位 TGI = 60%，p = 0.17）（图 7，表 5）。

表 5：第 14 天的平均肿瘤体积，平均 TGI 和基于相对肿瘤体积的 P 值

组	**细胞系**	**方案**	**平均肿瘤体积[mm^3]**	**Mean TGI**	**P**
A	HMVII	0.5 %羟乙基纤维素	1237±733 (n=3)	-	-
B	HMVII	BI853520 50 mg/kg（第一周） 25 mg/kg（第二周）	671±606 (n=4)	60%	0.17
C	GAK	0.5 %羟乙基纤维素	1387±1180 (n=3)	-	-
D	GAK	BI853520 50 mg/kg（第一周） 25 mg/kg（第二周）	548±144 (n=3)	80%	0.03

4. 结论

BI853520 可以抑制 HMVII 和 GAK 的 CDX 模型（两种带有 NRAS 突变的黑色素瘤模型）中的肿瘤生长。

通过引用将本发明中所提及的所有参考文献均完整合并入本文，就如同每一篇文献均单独列出一样。应理解，在阅读了本发明的公开内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落入本申请所附权利要求书所限定的范围内。