

包含 PRMT5 抑制剂和 EGFR 抑制剂的药物组合物

技术领域

本发明属于医药领域,具体涉及一种保护 PRMT5 抑制剂和 EGFR 抑制剂的药物组合物。

背景技术

癌症是全世界死亡的主要原因。流行的治疗方法(例如化疗和免疫疗法)的局限性在于它们的细胞毒性作用不限于癌细胞,并且在正常组织内也可能发生不良副作用。

PRMT5 是一种 II 型精氨酸甲基转移酶,通过对称地二甲基化参与转录和信号转导的蛋白质来调节重要的细胞功能,包括调节细胞周期进程、细胞凋亡和 DNA 损伤反应。然而,使用 shRNA 进行的全基因组遗传扰动筛选的数据揭示了 MTAP 删除的癌细胞系对 PRMT5 活性的选择性要求(Krutykov 等人,2016;Marjon 等人,2016 和 Markarov 等人,2016)。这些细胞系中 MTAP 缺失引起的 MTA 积累会部分抑制 PRMT5,使这些细胞选择性地对额外的 PRMT5 抑制敏感。

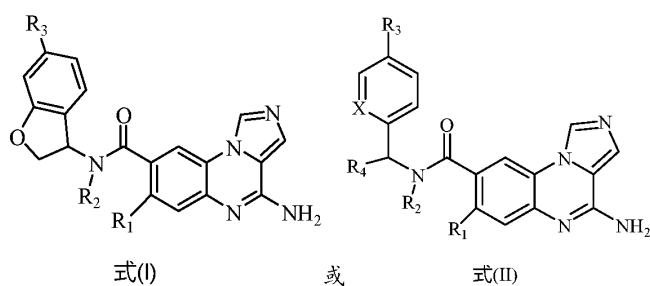
某些 PRMT5 抑制剂已被开发出来,但它们并未表现出对 MTAP 缺失的癌细胞系的选择性。这种选择性的缺乏可以通过抑制剂的作用机制来解释,因为它们要么是 SAM 非竞争性抑制剂,要么是 SAM 竞争性抑制剂,因此与 MTAP 无关(Krutykov 等人,2016;Marjon 等人,2016 和 Markarov 等人)等,2016)。

通过使用与 MTA 非竞争性/协同结合 PRMT5 的抑制剂,可以提高对 MTAP 缺失/MTA 积累细胞的选择性。以 MTA 非竞争性或 MTA 协作方式结合的 PRMT5 抑制剂在 MTA 存在下与 PRMT5 的结合将比在不存在 MTA 时相同抑制剂的结合增加。因此,这种抑制剂在高浓度 MTA 存在的情况下会以明显更大的效力结合,并因此导致相对于正常细胞在 MTA 积累细胞中 PRMT5 的优先抑制。

最近 Thierry 等人报道了一代 PRMT5 抑制剂与 EGFR 抑制剂在三阴乳腺癌细胞的抗增殖活性上,具有明显的协同作用效果。为三阴乳腺癌提供了新的、有潜力的临床治疗策略(Dovepress,2023,<https://doi.org/10.2147/BCTT.S430513>);众所周知二代 PRMT5 抑制剂相比于一代 PRMT5 抑制剂具有更好的选择性及安全性,因此二代 PRMT5 抑制剂与 EGFR 抑制剂的联合用药及适应症的研究具有非常大的价值。

发明内容

为了解决本发明的技术问题,本发明提供了一种药物组合物,包括具有第一活性物质的 PRMT5 抑制剂和具有第二活性物质的 EGFR 抑制剂化合物,其中,所述的第一活性物质的 PRMT5 抑制剂具有以下式(I)或式(II)结构:



其中，在式(I)或式(II)中，

R₁选自H、卤素、C₁-C₆烷基、卤代(C₁-C₆烷基)、CN；

R₂选自H、C₁-C₆烷基、卤代(C₁-C₆烷基)、C₃-C₆环烷基；

R₃表示H、卤素、C₁-C₆烷基、卤代(C₁-C₆烷基)、卤代(C₁-C₆烷氧基)、SF₅；

在式II中，R₄表示氢或者C₁-C₆烷基；X表示CR₅或N；

其中，R₅表示氢、卤素、C₁-C₆烷基、卤代(C₁-C₆烷基)、羟基、-NH₂、CN。

在本披露的优选技术方案中，其中，在式(I)或式(II)结构中：

R₁选自氢、卤素、C₁-C₆烷基、卤代(C₁-C₆烷基)；

R₂选自氢、C₁-C₆烷基、卤代(C₁-C₆烷基)、C₃-C₆环烷基；

R₃表示氢、卤素、卤代(C₁-C₆烷基)、卤代(C₁-C₆烷氧基)、SF₅；

R₄表示氢、甲基；

在式II中，X表示CH或N。

在本披露的优选技术方案中，其中，R₁选自氢或氟。

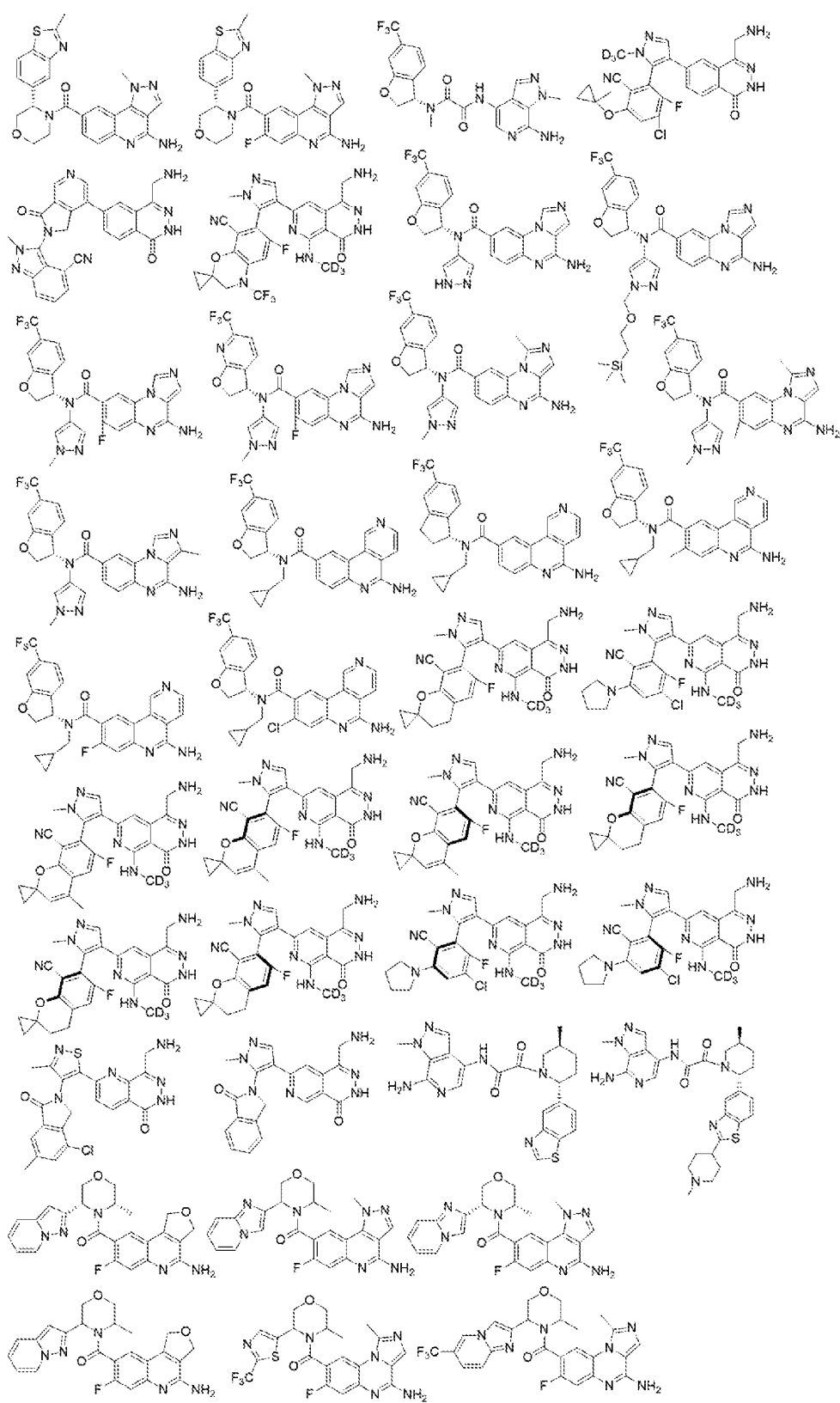
在本披露的优选技术方案中，其中，R₂选自环丙基或甲基。

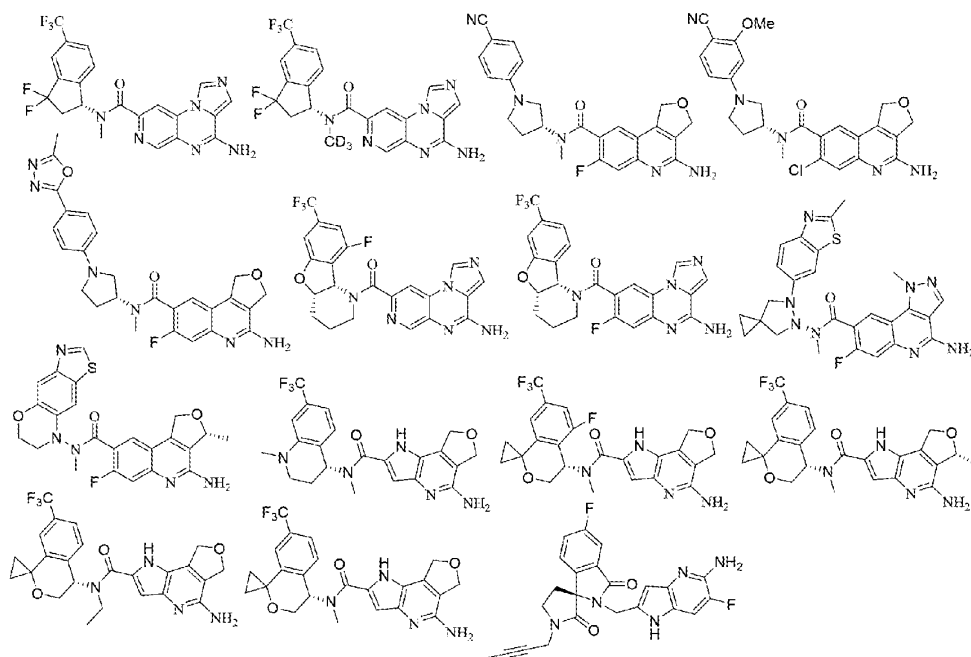
在本披露的优选技术方案中，其中，R₃表示CF₃。

在本披露的优选技术方案中，其中，R₄表示氢或甲基。

在本披露的优选技术方案中，其中，X表示N。

在本披露的优选技术方案中，其中，第一活性物质的PRMT5抑制剂选自以下化合物或其任意的组合：





在本披露的优选技术方案中，所述的第二活性物质的 EGFR 抑制剂选自以下任意一种化合物或其药学上的盐： Osimertinib(Tagrisso[®])、Almonertinib(Ameile[®])、Dacomitinib(VIZIMPRO[®])、Afatinib(Gilotrif[®])、Icotinib (Conmana[®])、Erlotinib(Tarceva[®])、Gefitinib(Iressa[®])、Zorifertinib(AZD3759)、Lazertinib、Nazartinib(EGF816)、Rociletinib(CO1686)、HM61713、Naquotinib(ASP8273)、Mavelertinib(PF-06747775)、Abivertinib(avitinib)、Alflutinib(AST2818)、Olafertinib(CX-101; RX-518)、Almonertinib(aumolertinib; HS-10296)、Rezivertinib(BPI-7711)、Mobocertinib(TAK-788)、BLU-945(Blueprint)、BLU-701(Blueprint)、BBT-176(Bridge Biotherapeutics)、TQB3804(正大天晴)、BPI-361175(贝达)、QLH11811(齐鲁)、HS10375(豪森)、H002(红云生物)、DAJH-1050766(成都地奥九泓)、BI-4020(勃林格殷格翰公司)、CH7233163(中外制药)、JBI-09-063 或其任意一种组合。

在本披露的优选技术方案中，所述的第二活性物质的 EGFR 抑制剂选自 Trastuzumab(Herceptin[®])、Pertuzumab (Perjeta[®])、Cetuximab (Erbix[®])、Amivantamab (JNJ-6372)。

在本披露的优选技术方案中，所述的第二活性物质的 EGFR 抑制剂选自 Osimertinib(Tagrisso[®])、Almonertinib(Ameile[®])、Dacomitinib(VIZIMPRO[®])、Afatinib(Gilotrif[®])、Icotinib (Conmana[®])、Erlotinib(Tarceva[®])、Gefitinib(Iressa[®])或其药学上可接受的盐及 Trastuzumab(Herceptin[®])、Pertuzumab (Perjeta[®])、Cetuximab (Erbix[®])、Amivantamab (JNJ-6372)。

除此之外，本公开还提供了一种治疗癌症或者肿瘤的方法，包括向有需要的个人施用本

发明的药物组合物。

在本披露的优选技术方案中，其中，所述的肿瘤或者癌症选自：多形性成胶质细胞瘤、脑癌、前列腺癌、胰腺癌、套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌、膀胱癌、肝细胞癌、食管癌、胆管癌、间皮瘤、喉癌、黑色素瘤、恶性外周神经鞘瘤、骨肉瘤、黏液软骨肉瘤、软组织肉瘤、口咽鳞状细胞癌、慢性髓性白血病、表皮鳞状细胞癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、子宫内膜癌、头颈癌和宫颈癌。

在本披露的优选技术方案中，其中，所述的肿瘤是非小细胞肺癌。

在本披露的优选技术方案中，其中，所述的非小细胞肺癌为奥希替尼耐药的非小细胞肺癌。

如本领域普通技术人员将理解的，在本文公开的任何实施方案中，式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药与式(II)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药的任何可行的组合都包括在本发明中，只要这种组合能够在对需要这种治疗的受试者的治疗中产生一些协同效应。

当在本发明中使用任何化合物时，它包括其任何药学上可接受的形式，包括但不限于异构体、互变异构体、盐、溶剂化物、多晶型物、前药等。应理解术语“化合物”包括任何或所有此类形式，无论是否明确说明，尽管有时仅明确说明某些术语，例如“盐”和“前药”。

除非另有明确定义，否则本文中使用的所有术语均具有本领域普通技术人员将解释或理解的普通含义。

本文所用的术语“一”、“一个”或“该”表示单数和复数形式。通常，当使用名词的单数或复数形式时，它表示该名词的单数和复数形式。

当术语“约”应用于参数时，表示该参数可以变化 $\pm 10\%$ ，优选在 $\pm 5\%$ 以内，包括从下限到上限的任意数。当术语“约”应用于范围时，它适用于范围的下限和上限。如本领域技术人员将理解的，当参数不是关键时，通常仅出于说明目的给出数字，而不是限制。

“烷氧基”是指基团-OR，其中 R 是如本文所定义的烷基。代表性实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、仲丁氧基、叔丁氧基等。

“烷基”是指通过从饱和碳之一去除氢而衍生自直链或支链饱和烃的基团。烷基优选含有 1 至 8 个碳原子，有时优选 1 至 6 个碳原子，并且有时甚至更优选 1 至 4 个碳原子。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基等。“低级烷基”、“低级烷氧基”或“低级卤代烷基”是指具有一到四个、有时优选一到三个或一到两个碳原子的烷基或烷基部分。

本文所用的术语“氰基”是指-CN。

本文所用的术语“环烷基”是指通过从饱和碳环中去除氢原子而衍生自单环饱和碳环的基团，优选具有3至8个，更优选3至6个碳原子。环烷基的代表性实例包括但不限于环丙基、环戊基和环己基。

本文所用的术语“卤素(halo)”和“卤素(halogen)”是指F、Cl、Br或I。

本文所用的术语“卤代烷基”是指被至少一个卤原子取代的烷基。卤代烷基可以是所有氢原子都被卤素取代的烷基。卤代烷基的代表性实例包括但不限于三氟甲基、氟甲基、二氟甲基、溴甲基、1-氟乙基、全氟乙基、2-氟乙基等。

本文所用的术语“杂环基”是指3至10元单环或双环非芳族基团，其在非芳族环中包含一个或多个、优选1至3个独立地选自氮(N)、氧和硫(S、S(O)或S(O)₂)的杂原子。本公开的杂环基可以通过基团中的碳原子或氮原子连接到母体分子部分。杂环基可以是饱和的或不饱和的，例如，在环中含有一个或多个双键。除非另有说明，在化合价规则允许的情况下，基团的化合价可以位于基团内任何环的任何原子上。实例可包括但不限于氮杂环丁烷基、吡咯烷基、2-氧代吡咯烷基、2,5-二氢-1H-吡咯基、吡啶基、4-吡啶基、咪唑基、嘧啶基、2-氧代嘧啶基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、2-氧代吡喃基、硫代咪唑基、吡唑烷基、咪唑基、咪唑烷基等。

当任何基团，例如“环烷基”或“杂环基”被称为“取代的或未取代的”或“任选取代的”时，除非特别定义，否则意味着该基团被或未被1至5个，有时优选1至3个或1至2个独立选自卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆卤代烷基和氨基等的取代基取代。

本文所用的术语“溶剂化物”是指本发明化合物与一种或多种，优选一至三种溶剂分子(无论是有机还是无机)的物理结合。这种物理结合包括氢键。在某些情况下，溶剂化物能够分离，例如当一种或多种，优选一至三种溶剂分子结合到结晶固体的晶格中时。示例性的溶剂化物包括但不限于水合物、乙醇化物、甲醇化物和异丙醇化物。溶剂化方法通常是本领域已知的。

“前药”是指在生理条件下，例如通过血液中的水解，可以在体内转化产生活性母体化合物的化合物。常见的例子包括但不限于具有带有羧酸部分的活性形式的化合物的酯和酰胺形式。本发明化合物的酰胺和酯可以根据常规方法制备。特别地，在本发明中，前药也可以通过酰化杂环基环结构中的氨基或氮原子来形成，该酰基可以在体内水解。这种酰基包括但不限于C₁-C₆酰基，优选C₁-C₄酰基，更优选C₁-C₂(乙酰基或乙氧基)基团，或苯甲酰基。

本文所用的术语“受试者”是指人或哺乳动物，例如猴子、狗、猫、马等。该术语旨在包含，有时可与“患者”互换。

本文所用的术语“施用”或“给药”是指向患有或处于待治疗或预防的疾病或病症风险中的受试者提供化合物或药物组合物。

任何施途径都适用于本发明。在一个实施方案中，本发明的化合物可以以固体剂型例如片剂、胶囊等施用于受试者。在一个实施方案中，本发明的化合物可以通过静脉注射施用

于受试者。在另一个实施方案中，本发明的化合物可以通过任何其他合适的全身递送方式施用于受试者，例如口服、肠胃外、鼻内、舌下、直肠或透皮施用。

本文所用的术语“治疗有效量”是指将引发医生、兽医或研究人员所寻求的受试者的期望或预期的生物或医学反应的化合物或组合物的量。化合物和具体的药学上可接受的载体的治疗有效量将根据例如受试者的年龄、体重、性别、施用方式和所治疗的疾病或病症而变化。

当在化合物、盐、前药、组合物或载体之前使用时，术语“药学上可接受的”是指这种化合物、盐、前药、组合物或载体适合施用于受试者以进行治疗，而不会对受试者产生考虑到所需治疗的不可忍受的副作用。

本文所用的术语“药学上可接受的载体”是指与本发明所用的化合物相容并可用于在本发明的方法中施用化合物的物质，其优选是无毒的，或者是惰性的和药学上可接受的。药学上可接受的载体可以是固体、液体或气体物质，包括任何和所有干粉、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂、吸收延迟剂等。这种载体的实例包括油类如玉米油，缓冲剂如磷酸盐缓冲盐水(PBS)、盐水、聚乙二醇、甘油、聚丙二醇、二甲亚砜，酰胺如二甲基乙酰胺，蛋白质如白蛋白，去污剂如吐温 80，单糖和低聚多糖如葡萄糖、乳糖、环糊精、淀粉等。

如本文所述，本发明化合物的某些实施方案可以含有碱性官能团，例如氨基或烷基氨基，因此能够与药学上可接受的酸形成药学上可接受的盐。在这方面，术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在施用载体或剂型生产过程中就地制备，或者通过将游离碱形式的纯化的本发明化合物与合适的有机或无机酸单独反应，并在随后的纯化过程中分离如此形成的盐来制备。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐。

用于本发明的制剂还可以包含稳定剂、防腐剂、缓冲剂、抗氧化剂或本领域技术人员已知的其他添加剂。这种介质和药剂用于药物活性物质的用途在本领域是众所周知的。

本文所用的术语“协同”等是指由两种或多种试剂的组合引起的效果大于两种或多种试剂单独使用的叠加效果。组合治疗的这种协同效应包括更高的功效、更低的副作用或两者兼有。在一些实施方案中，协同效应包括由于两种治疗抑制剂的剂量降低而使两种治疗抑制剂的副作用显著降低，同时总体治疗功效保持在大约相同或提高的水平。在一些实施方案中，协同效应包括显著提高抑制癌细胞增殖的功效，同时由两种药物引起的副作用保持在大约相同或更低的水平。协同效应允许使用较低剂量的单个药物有效治疗疾病。总的来说，与单一疗法相比，两种或多种药物的协同组合可导致疾病治疗的改善。

组合治疗可以允许使用较低剂量的第一种治疗剂，例如 PRMT5 抑制剂，或第二种治疗剂，例如 EGFR 抑制剂，或者比单独使用任一种药物时通常所需的更低剂量的两种治疗剂。本发明包括任何和所有这种“协同”效应。

药物组合物可以包含用于本发明方法的 PRMT5 抑制剂和 EGFR 抑制剂，其总量为总组合物重量的 0.01% 至 99%，优选总组合物重量的 0.1% 至 80%，更优选总组合物重量的 0.1% 至 50%。PRMT5 抑制剂和 EGFR 抑制剂之间的重量比可以在 1:20 至 20:1 的范围内，有时优选 1:15 至 15:1，有时更优选 1:10 至 10:1。

对于全身施用，用于成人治疗的 PRMT5 抑制剂的日剂量范围为约 0.01-约 150mg/kg，优选约 0.05-约 100mg/kg，有时更优选约 0.1-约 50mg/kg。

本公开提供的药物组合物，其可用于治疗和/或预防可包括或排除以下癌症的各种癌症：多形性成胶质细胞瘤、脑癌、前列腺癌、胰腺癌、套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌、膀胱癌、肝细胞癌、食管癌、胆管癌、间皮瘤、喉癌、黑色素瘤、恶性外周神经鞘瘤、骨肉瘤、黏液软骨肉瘤、软组织肉瘤、口咽鳞状细胞癌、慢性髓性白血病、表皮鳞状细胞癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、子宫内膜癌、头颈癌和宫颈癌。

在本公开的优选技术方案中，其中所述的肿瘤是非小细胞肺癌。

在本公开的优选技术方案中，其中所述的非小细胞肺癌为奥希替尼耐药的非小细胞肺癌。

在本公开的优选技术方案中，其中，所述的癌症是转移性癌症。

在本公开的优选技术方案中，其中，所述的转移性癌症是脑转移性癌症。

附图说明

图 1A-1B：化合物 A、Osimertinib（奥希替尼）及其组合在 NCI-H292 MTAP(-/-) 缺失型细胞模型中的抗肿瘤抑制曲线和抑制率

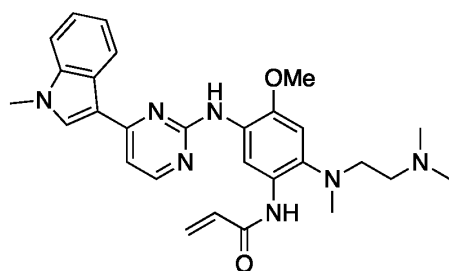
图 2A-2B：化合物 C、Osimertinib（奥希替尼）及其组合在 NCI-H292 MTAP(-/-) 缺失型细胞模型中的抗肿瘤抑制曲线和抑制率

图 3：化合物 A、Osimertinib（奥希替尼）及其组合在奥希替尼耐药非小细胞肺癌 PDX NU/NU 小鼠模型的体内抗肿瘤药效

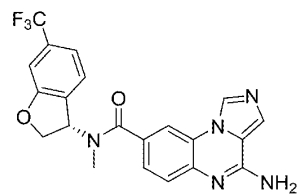
具体实施例

1. 实验用化合物

本试验用化合物 Osimertinib 为 AstraZeneca 公司研发的药物，商品名为 Tagrisso，其具有以下化学结构

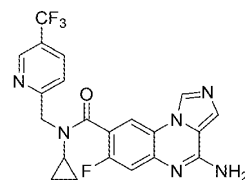


本试验用化合物 A 的化学名称为: (S)-4-氨基-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺, 其具有以下化学结构:

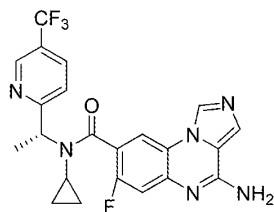


本试验用化合物 B 的化学名称为: 4-氨基-N-环丙基-7-氟-N-(5-(三氟甲基)吡啶-2-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺, 其具有以下化学结构:

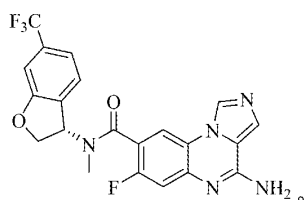
本试验用化合物 C 的化学名称为: (R)-4-氨基-N-环丙基-7-氟-N-(1-(5-(三氟甲基)吡啶-2-基)乙基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺, 其具有以下化学结构:



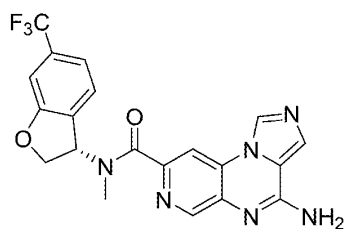
本试验用化合物 D 的化学名称为: (S)-4-氨基-7-氟-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺, 其具有以下化学结构:



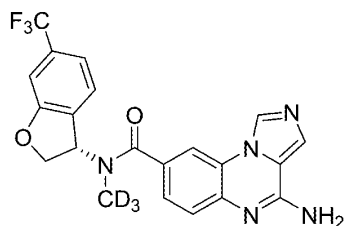
本试验用化合物 E 的化学名称为: (S)-4-氨基-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]吡啶并[3,4-c]吡嗪-8-甲酰胺, 其具有以下化学结构:



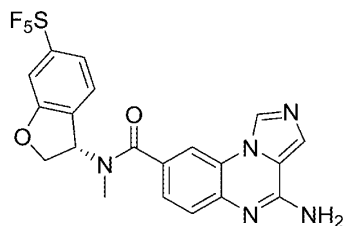
本试验用化合物 E 的化学名称为: (S)-4-氨基-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]吡啶并[3,4-c]吡嗪-8-甲酰胺, 其具有以下化学结构:



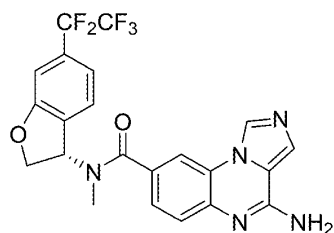
本试验用化合物 F 的化学名称为：(S)-4-氨基-N-(甲基-d3)-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



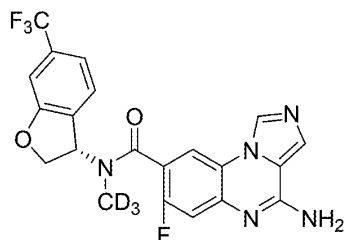
本试验用化合物 G 的化学名称为：(S)-4-氨基-N-甲基-N-(6-(五氟-λ6-硫烷)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



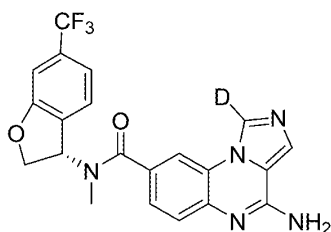
本试验用化合物 H 的化学名称为：(S)-4-氨基-N-甲基-N-(6-(全氟乙烷)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



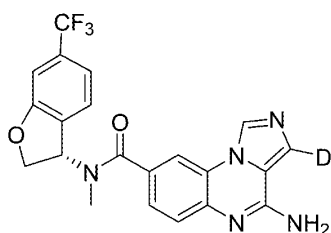
本试验用化合物 I 的化学名称为：(S)-4-氨基-7-氟-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



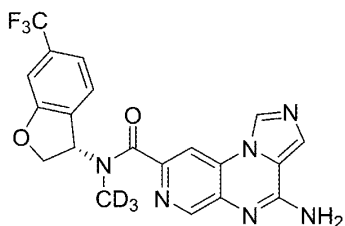
本试验用化合物 J 的化学名称为：(S)-4-氨基-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并咪唑-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺-1-d，其具有以下化学结构：



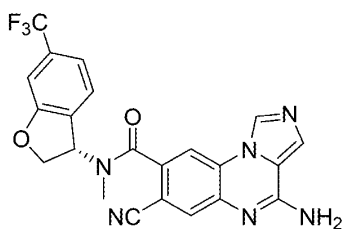
本试验用化合物 K 的化学名称为：(S)-4-氨基-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并咪唑-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺-3-d，其具有以下化学结构：



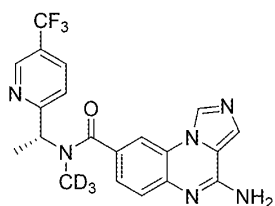
本试验用化合物 L 的化学名称为：(S)-4-氨基-N-(甲基-d3)-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并咪唑-3-基)咪唑并[1,5-a]吡啶并[3,4-c]吡嗪-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



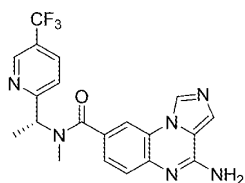
本试验用化合物 M 的化学名称为：(S)-4-氨基-7-氟基-N-甲基-N-(6-(三氟甲基)-2,3-二氢苯并咪唑-3-基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



本试验用化合物 N 的化学名称为：(R)-4-氨基-N-甲基-d3-N-(1-(5-(三氟甲基)吡啶-2-基)乙基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



本试验用化合物 O 的化学名称为：(R) -4-氨基-N-甲基-N-(1-(5-(三氟甲基)吡啶-2-基)乙基)咪唑并[1,5-a]喹喔啉-8-甲酰胺，其具有以下化学结构：



其中，化合物 A、化合物 D、化合物 E、化合物 F、化合物 G、化合物 H、化合物 I、化合物 J、化合物 K、化合物 L 和化合物 M 的制备参见国际专利申请 PCT/CN2023/120923；

其中，化合物 B、化合物 C、化合物 N 和化合物 O 的制备参见国际专利申请 PCT/CN2023/111604

通过引用整体并入本文，如同它们在本文中被完全引用一样。

2. 化合物在 NCI-H292 MTAP(-/-) 缺失型细胞模型上的联用

细胞系和细胞培养：

NCI-H292 MTAP(-/-)细胞系购自南京科佰生物科技有限公司，细胞被培养在含有 90% RPMI1640，10%胎牛血清的细胞培养基中，37°C、5% CO₂ 条件下培养，处于对数生长期细胞方能进行实验。

联合用药测试：

使用完全培养基调整细胞密度，随后接种于 96 孔细胞培养板。将 96 孔板中的细胞置于 37°C、5% CO₂ 条件下培养。使用梯度稀释将两种待测化合物分别加入细胞板中，将已加药的 96 孔板中的细胞置于 37°C、5% CO₂ 条件下继续培养 144 小时，融化 CTG 试剂并平衡细胞板至室温 30 分钟。每孔加入等体积的 CTG 溶液。在定轨摇床上振动 5 分钟使细胞裂解。将细胞板放置于室温 20 分钟以稳定冷光信号。读取冷光值，收集数据。

数据分析：

细胞抑制率(%)= 100-(Lum 待测药-Lum 培养液对照)/(Lum 溶剂对照-Lum 培养液对照)×100%

使用 Calcsyn 分析联合指数 CI 值。

实施例 1：单药化合物在 NCI-H292 MTAP(-/-)缺失型细胞模型测试研究

表 1

化合物名称	Max Inh%	IC ₂₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
化合物 A	71.2	10.7	117
化合物 C	64.6	9.60	49.9
Osimertinib	91.1	18.6	50.2

表 1 给出了各化合物在 NCI-H292 MTAP(-/-)缺失型细胞的 IC₂₀ 和 IC₅₀, 并且给出了最大抑制率。

实施例 2：化合物 A 与 Osimertinib 联合用药在 NCI-H292 MTAP(-/-)缺失型细胞模型测试研究

化合物 A 与 Osimertinib 在 NCI-H292 MTAP(-/-)细胞上的联用的试验结果, 抑制率分析见表 2, 抑制曲线见图 1A, 抑制率见图 1B:

表 2

抑制率 (%) 化合物 A + Osimertinib, NCI-H292 MTAP(-/-)							
Osimertinib (nM)	1000	97.9	94.9	94.8	93.8	91.6	91.4
	333	92.8	92.5	90.6	84.7	80.5	85.3
	111	89.6	84.2	85.0	74.2	73.6	76.5
	37	87.4	72.3	66.2	50.5	45.1	43.1
	12	78.3	61.2	59.1	43.8	34.5	14.9
	4	75.7	66.6	55.6	41.0	16.1	0.6
	0	75.1	66.6	51.8	45.6	10.8	11.4
		10000	2000	400	80.0	16.0	3.20
		化合物 A (nM)					

图 1B 中标识了化合物 A (16.0nM) 和 Osimertinib (12.3nM) 单药和联用的抑制率, 表明在该条件下, 两个化合物有协同效应。

CI 联合指数的分析见表 3:

表 3

化合物 A + Osimertinib CI 联合指数, NCI-H292 MTAP(-/-)						Osimertinib (nM)
0.33	0.63	0.63	0.74	1.02	1.05	1000.0
0.38	0.32	0.39	0.71	0.99	0.67	333.3
0.34	0.35	0.25	0.52	0.52	0.44	111.1
0.36	0.67	0.45	0.76	0.84	0.88	37.0
1.23	1.60	0.49	0.58	0.61	2.25	12.3
1.64	0.91	0.55	0.50	2.11	1341	4.1
化合物 A (nM)	10000	2000	400.0	80.0	16.0	3.20

表 3 给出了化合物 A 与 Osimertinib 的联合效应指数 CI 值。

实施例 3 化合物 C 与 Osimertinib 联合用药在 NCI-H292 MTAP(-/-)缺失型细胞模型测试研究

化合物 C 与 Osimertinib 在 NCI-H292 MTAP(-/-)缺失型细胞模型上联用的试验结果，抑制率分析见表 4、抑制曲线见图 2A，抑制率见图 2B。

表 4

		抑制率 (%) 化合物 C + Osimertinib, NCI-H292 MTAP(-/-)						
Osimertinib (nM)	1000.0	97.9	96.5	95.8	93.7	91.7	93.7	92.3
	333.3	92.3	90.1	89.4	83.5	80.8	78.7	81.4
	111.1	84.3	83.2	81.9	78.9	72.2	69.2	68.4
	37.0	70.6	66.3	63.2	52.4	40.6	40.3	34.3
	12.3	71.1	60.0	58.3	39.9	23.5	9.6	18.8
	4.1	65.7	63.8	58.4	30.3	28.7	0.3	20.5
	0.0	60.4	61.0	49.5	38.2	23.7	4.0	0.0
		10000	2000	400	80.0	16.0	3.20	0
		化合物 C (nM)						

图 2B 中标识了化合物 C（16.0nM）和 Osimertinib（12.3nM）单药和联用的抑制率，表明两个化合物在该条件下，有加和作用。

CI 联合指数的分析

表 5

化合物 C + Osimertinib CI 联合指数, NCI-H292 MTAP(-/-)							Osimertinib (nM)
化合物 C (nM)	10000	2000	400.0	80.0	16.0	3.20	1000.0
	0.28	0.40	0.47	0.70	0.95	0.70	333.3
	0.34	0.41	0.43	0.79	0.99	1.16	111.1
	0.48	0.32	0.32	0.39	0.61	0.74	37.0
	1.64	0.74	0.47	0.71	1.25	1.24	12.3
	1.42	0.99	0.35	0.66	1.50	6.00	4.1
	2.43	0.62	0.25	0.91	0.43	4024	

表 5 给出了化合物 C 与 Osimertinib 的联合效应指数 CI 值。

结论：化合物 A 和化合物 C 与 EGFR 抑制剂 Osimertinib 的联合指数从 0.32-2.23，显示出加和作用。

3. 化合物在奥希替尼耐药非小细胞肺癌 PDX NU/NU 小鼠模型上的联用

实施例 1: 化合物在奥希替尼耐药非小细胞肺癌 PDX NU/NU 小鼠模型的体内药效学研究

动物造模及分组：

NU/NU 小鼠，雌性，6-8 周龄，体重约 18-22g。将购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。所有实验小鼠均饲养在西安立迪 SPF 级动物房中，并且提前适应环境至少 3 天。取肺癌模型荷瘤鼠，当肿瘤长到 800-1000 mm³ 时，无菌条件下将肿瘤取出，并传代至 NU/NU 小鼠皮下。当肿瘤平均体积达到约 150 mm³ (100-200mm³) 时，选取 18 只荷瘤鼠，按照肿瘤体积随机进行分组，共 6 组，分组当天为第 0 天，按如下方案进行给药：

表 6. 给药及分组

组别	给药	N	剂量(mg/kg)	给药频率	给药方式
组 1	对照组	3	--	QD+QD×56 天	PO+PO
组 2	奥希替尼	3	10	QD×56 天	PO
组 3	化合物 A	3	10	QD×56 天	PO
组 4	奥希替尼 + 化合物 A	3	10+10	QD+QD×56 天	PO+PO

N：动物只数；给药体积为 10 μL/g；PO：灌胃给药。给药时先给奥希替尼或奥希替尼溶媒，间隔 1 小时后给化合物 A 或化合物 A 溶媒。

表 7. PDX 模型信息

模型编号	癌种	病人性别	年龄	病理诊断
LD1-0025-200729	肺癌	女	39	低分化腺癌

动物饲养：

所有的小鼠将饲养于 SPF 级动物房 IVC 恒温恒压系统中，其中温度为 20~26 °C，湿度为 40~70 %，光照周期 12 小时明 12 小时暗。每个饲养笼内饲养不超过 5 只小鼠，笼盒内使用垫料为高压灭菌的玉米芯，每周更换 1-2 次。整个实验过程中，所有实验小鼠均可自由饮食，饲料通过 Co60 辐照灭菌，饮用水则经过高压灭菌，饲料和饮用水均保持充足供应。所有出入动物饲养室或实验操作人员均需进行穿戴灭菌实验服、一次性医用口罩和橡胶手套。每只饲养笼均有对应的明确的详细标签，标签内容包括：动物数目、性别、品系、接收日期、项目编号、组别、目前实验阶段和实验负责人等。采用小鼠耳朵打孔器进行动物编号。所有实验动物在实验使用前将适应 3 天。

无菌操作：

受试化合物将在生物安全柜内进行配制使用。实验过程中所有操作包括给药、肿瘤体积和体重的测量等均在动物房生物安全柜内完成。

分组设计：

将所有荷瘤鼠在分组前进行肿瘤体积的测量和体重称量,根据测量的肿瘤体积大小将荷瘤鼠进行随机分组,采用随机区组设计原则,首先根据肿瘤体积将小鼠进行区组划分,之后再将各区组内小鼠随机分配到各个治疗组。使用这种方法以减少系统误差。

实验观察:

实验方案和实验中的实验动物使用等均通过立迪生物(IACUC)委员会审核、讨论、修订和批准。在整个实验过程中,对实验动物的使用和观察均按照 AAALAC 的规定执行。实验动物在接种肿瘤组织后,每天进行观察,记录其发病和死亡等。在常规实验过程中,对所有的实验动物进行行为、进食、摄水、体重改变和其他一些异常情况的监测。

评估指标:

主要是检测受试药物化合物 A 作为单药或联合奥希替尼对人源肺癌 PDX 模型 LD1-0025-200729 的生长抑制作用或完全治愈能力。

- 肿瘤体积和荷瘤鼠体重测量:使用游标卡尺每周两次测量,肿瘤体积计算公式为 $V = 0.5 a \times b^2$, a, b 分别代表肿瘤的长径和短径;
- 肿瘤生长抑制率 TGI (%) = $[1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$
 T_i 为化合物组开始给药后的平均肿瘤体积, T_0 为化合物组首次给药时的平均肿瘤体积, V_0 为溶媒对照组首次给药时的平均肿瘤体积, V_i 为溶媒对照组开始给药后的平均肿瘤体积。
- 相对肿瘤增殖率 T/C (%): 计算公式如下: $T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100 \%$ (T_{RTV} : 治疗组 RTV; C_{RTV} : 阴性对照组 RTV)。根据肿瘤测量的结果计算出相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV), 计算公式为 $RTV = V_t / V_0$, 其中 V_0 是分组给药时 (即 d_0) 测量所得平均肿瘤体积, V_t 为某一次测量时的平均肿瘤体积, T_{RTV} 与 C_{RTV} 取同一天数据。
- 所有荷瘤鼠体重每天测量一次, 每天在 2 小时窗口期内同一时间测量小鼠体重。同时计算给药后小鼠体重增长变化比率: $RCBW (\%) = (BW_i - BW_0) / BW_0 \times 100$, BW_i 为开始给药后的体重, BW_0 为首次给药时的体重。
- 实验结束后称量肿瘤块的重量, 并拍照。

实验终止:

当实验中个别荷瘤鼠出现极度消瘦濒临死亡或肿瘤体积达到 2500 mm^3 时, 荷瘤鼠将被提前进行安乐死处理。

受试药安全性评价:

在实验过程中, 当治疗小鼠体重持续下降并且 RCBW 达到 15% 以上时, 将进行给药剂量的调整, 具体调整幅度根据荷瘤鼠状态等, 需进行协商后进行。同时对治疗中荷瘤鼠行为、皮毛和其它一些异常表现进行观察和记录, 并及时与项目负责人沟通。当 RCBW 达到 20% 以上时, 考虑此治疗小鼠停药观察, 直至其状态恢复并且 $RCBW < 10\%$ 时再恢复给药。

实验数据分析:

所有数据均采用 Mean±SEM 表示,使用统计学分析软件 Graphpad10 对数据进行 one-way ANOVA 统计学分析。*P<0.05 将被认为具有统计学意义的显著性差异。实验结果如表 8 所示。

表 8 肿瘤体积数据统计

给 药 时 间 (天)	肿瘤体积 (mm ³)							
	组 1		组 2		组 3		组 4	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
0	155.2	18.9	155.7	27.2	155.2	17.9	155.2	24.8
4	186.3	22.6	185.9	33.3	179.8	19.6	179.7	28.1
7	220.2	38.3	208.3	41.6	205.2	23.6	220.6	38.6
11	253.0	42.0	232.2	51.7	228.6	42.7	252.8	47.2
14	281.6	47.7	253.6	44.1	251.0	38.9	278.1	58.0
18	316.9	44.4	288.4	45.0	274.5	32.3	284.3	68.4
21	353.0	48.3	310.4	50.8	271.3	29.9	271.8	54.3
25	452.1	52.3	369.2	73.4	315.2	32.9	268.4	59.9
28	491.0	50.2	407.1	73.6	321.2	38.2	259.8	32.8
32	549.6	56.9	439.2	83.9	318.3	29.5	216.3	14.5
35	620.7	62.4	470.2	99.1	308.3	52.2	200.9	8.5
39	700.6	82.9	501.3	125.0	288.3	45.5	186.4	14.3
42	764.6	75.1	534.5	135.5	266.9	35.6	174.2	12.5
46	810.9	96.8	589.4	179.9	278.7	40.3	147.4	21.2
49	880.5	99.7	605.3	190.3	281.0	43.6	140.2	20.7
53	981.9	109.6	633.7	181.3	283.7	48.9	126.5	24.6
56	1076.2	116.3	679.4	197.1	287.7	48.5	110.2	26.0
57	1093.4	116.0	689.6	199.1	288.1	46.8	109.4	25.9

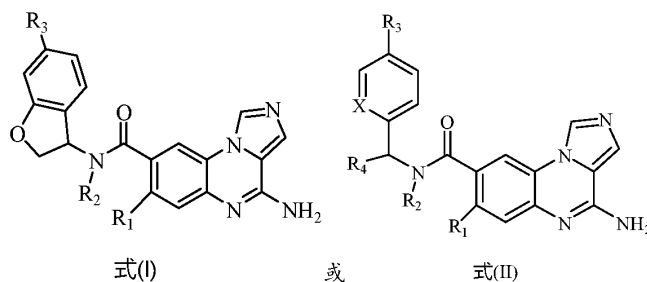
在奥希替尼耐药非小细胞肺癌 PDX NU/NU 小鼠模型的 56 天体内药效研究中, 各组动物在给药期间的肿瘤体积变化详见表 8 和图 3。奥希替尼单药组 (10 mg/kg, 口服, 每日一次) 肿瘤生长抑制率 (TGI) 为 43.1%; 化合物 A 单药组 (10 mg/kg, 口服, 每日一次) TGI 为 85.8% (**P<0.01); 化合物 A (10 mg/kg, 口服, 每日一次) 联合奥希替尼 (10 mg/kg, 口服, 每日一次) 组的肿瘤生长抑制率 (TGI) 达到 104.9% (**P<0.001)。

结果显示, 与对照组相比, 奥希替尼单药组在统计学上无显著性差异; 与对照组相比, 化合物 A 单药组在统计学上具有显著性差异; 与对照组相比, 化合物 A 与奥希替尼的联合使用在统计学上具有显著性差异。相较于单药组, 化合物 A 与奥希替尼的联合使用, 展现了更强的抗肿瘤活性。

虽然优选实施例已在上文中描述,很明显对于本领域技术人员而言可以进行修改而不脱离本发明。这样的修改被认为是包含在本发明的范围内的可能的变体。

权利要求书

1. 药物组合物，包括具有第一活性物质的 PRMT5 抑制剂和具有第二活性物质的 EGFR 抑制剂化合物，其中，所述的第一活性物质的 PRMT5 抑制剂具有以下式(I)或式(II)结构：



其中，在式(I)或式(II)中，

R₁ 选自 H、卤素、C₁-C₆ 烷基、卤代(C₁-C₆ 烷基)、CN；

R₂ 选自 H、C₁-C₆ 烷基、卤代(C₁-C₆ 烷基)、C₃-C₆ 环烷基；

R₃ 表示 H、卤素、C₁-C₆ 烷基、卤代(C₁-C₆ 烷基)、卤代(C₁-C₆ 烷氧基)、SF₅；

在式 II 中，R₄ 表示氢或者 C₁-C₆ 烷基；X 表示 CR₅ 或 N；

其中，R₅ 表示氢、卤素、C₁-C₆ 烷基、卤代(C₁-C₆ 烷基)、羟基、-NH₂、CN。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中，在式(I)或式(II)结构中：

R₁ 选自氢、卤素、C₁-C₆ 烷基、卤代(C₁-C₆ 烷基)；

R₂ 选自氢、C₁-C₆ 烷基、卤代(C₁-C₆ 烷基)、C₃-C₆ 环烷基；

R₃ 表示氢、卤素、卤代(C₁-C₆ 烷基)、卤代(C₁-C₆ 烷氧基)、SF₅；

R₄ 表示氢、甲基；

在式 II 中，X 表示 CH 或 N。

3. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中，R₁ 选自氢或氟。

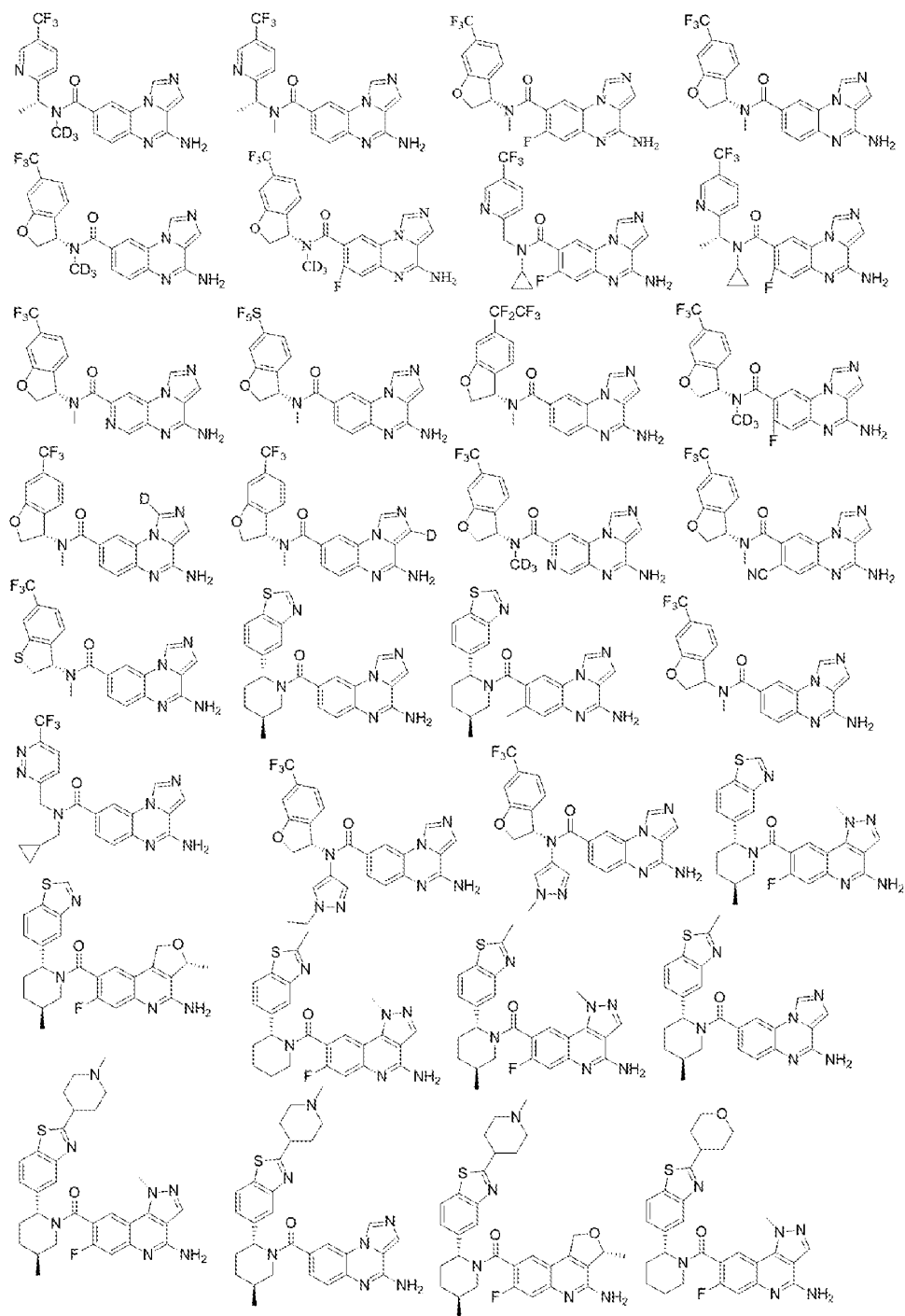
4. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中，R₂ 选自环丙基或甲基。

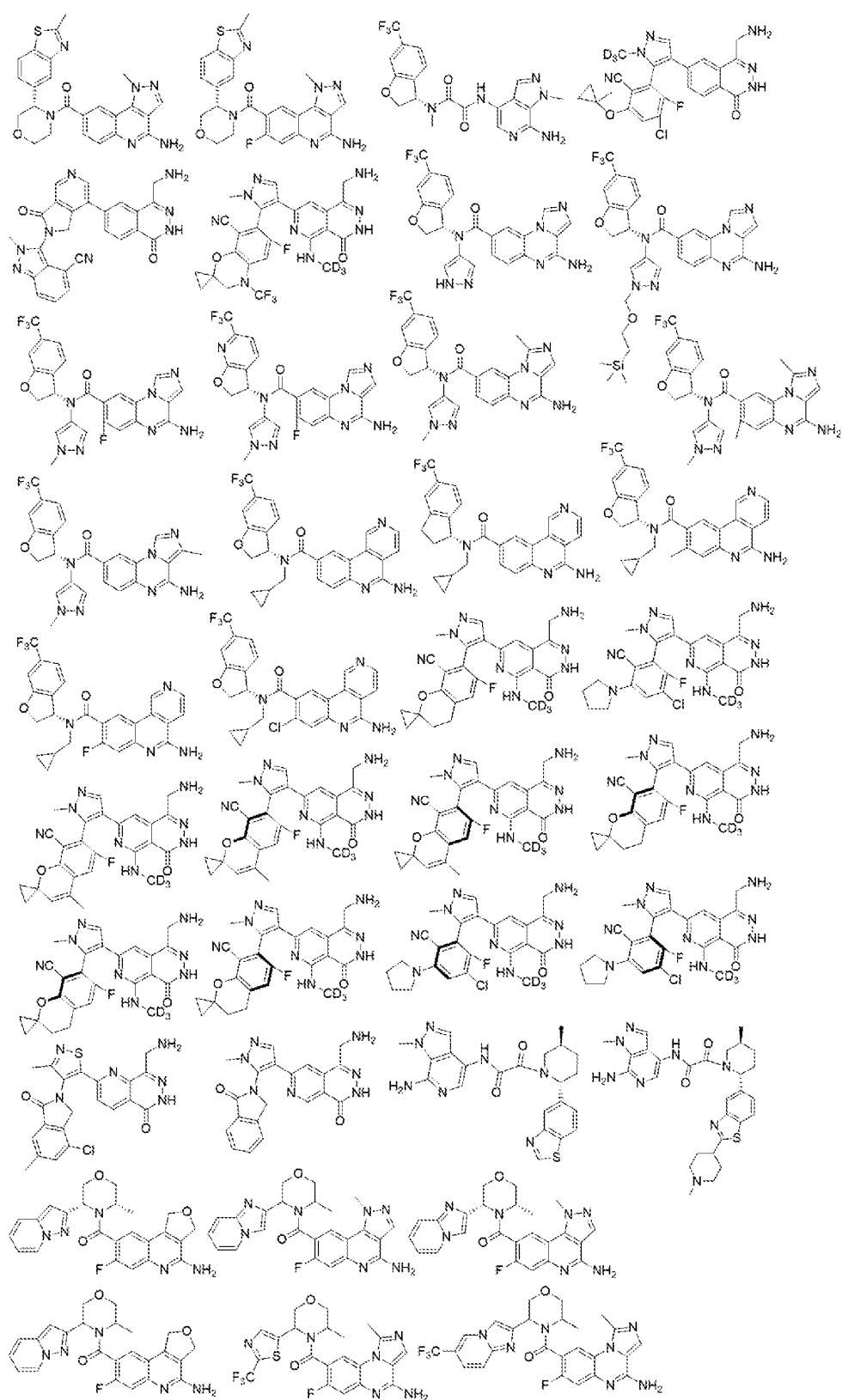
5. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中，R₃ 表示 CF₃。

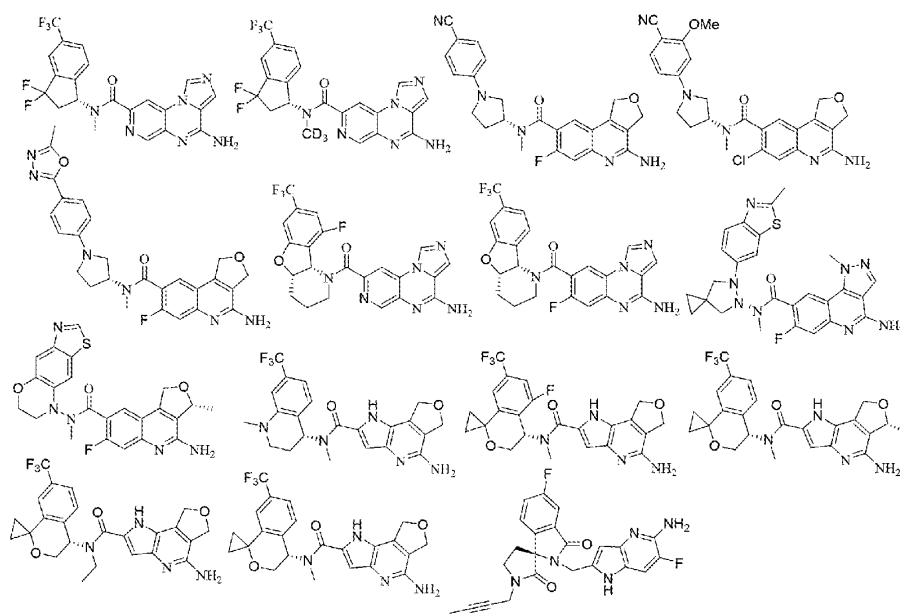
6. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中，R₄ 表示氢或甲基。

7. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中，X 表示 N。

8. 根据权利要求 1 所述的药物组合物, 其中, 第一活性物质的 PRMT5 抑制剂选自以下化合物或其任意的组合:







9. 根据权利要求 1-8 任意一项所述的药物组合物, 所述的第二活性物质的 EGFR 抑制剂选自以下任意一种化合物或其药学上的盐: Osimertinib(Tagrisso[®])、Almonertinib(Ameile[®])、Dacomitinib(VIZIMPRO[®])、Afatinib(Gilotrif[®])、Icotinib (Conmana[®])、Erlotinib(Tarceva[®])、Gefitinib(Iressa[®])、Zorifertinib(AZD3759)、Lazertinib、Nazartinib(EGF816)、Rociletinib(CO1686)、HM61713、Naquotinib(ASP8273)、Mavelertinib(PF-06747775)、Abivertinib(avitinib)、Alflutinib(AST2818)、Olafertinib(CX-101; RX-518)、Almonertinib(aumolertinib; HS-10296)、Rezivertinib(BPI-7711)、Mobocertinib(TAK-788)、BLU-945(Blueprint)、BLU-701(Blueprint)、BBT-176(Bridge Biotherapeutics)、TQB3804(正大天晴)、BPI-361175(贝达)、QLH11811(齐鲁)、HS10375(豪森)、H002(红云生物)、DAJH-1050766(成都地奥九泓)、BI-4020(勃林格殷格翰公司)、CH7233163(中外制药)、JBI-09-063 或其任意一种组合。

10. 根据权利要求 9 所述的药物组合物, 所述的第二活性物质的 EGFR 抑制剂选自 Trastuzumab(Herceptin[®])、Pertuzumab (Perjeta[®])、Cetuximab (Erbix[®])、Amivantamab (JNJ-6372)或其药学上可接受的盐。

11. 根据权利要求 9 所述的药物组合物, 所述的第二活性物质的 EGFR 抑制剂选自 Osimertinib(Tagrisso[®])、Almonertinib(Ameile[®])、Dacomitinib(VIZIMPRO[®])、Afatinib(Gilotrif[®])、Icotinib (Conmana[®])、Erlotinib(Tarceva[®])、Gefitinib(Iressa[®])或其药学上可接受的盐及 Trastuzumab(Herceptin[®])、Pertuzumab (Perjeta[®])、Cetuximab (Erbix[®])、Amivantamab (JNJ-6372)。

12.治疗癌症或者肿瘤的方法，包括向有需要的个人施用权利要求 1-11 任意一项的药物组合物。

13.根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述的肿瘤或者癌症选自：多形性成胶质细胞瘤、脑癌、前列腺癌、胰腺癌、套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌、膀胱癌、肝细胞癌、食管癌、胆管癌、间皮瘤、喉癌、黑色素瘤、恶性外周神经鞘瘤、骨肉瘤、黏液软骨肉瘤、软组织肉瘤、口咽鳞状细胞癌、慢性髓性白血病、表皮鳞状细胞癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、子宫内膜癌、头颈癌和宫颈癌。

14.根据权利要求 13 所述的方法，其中所述的肿瘤是非小细胞肺癌。

15.根据权利要求 14 所述的方法，其中所述的非小细胞肺癌为奥希替尼耐药的非小细胞肺癌。

16.根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述的癌症是转移性癌症。

17.根据权利要求 16 所述的方法，其中，所述的转移性癌症是脑转移性癌症。