I851405

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I851405 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：112134414 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 11 月 18 日

(51)Int. Cl.： ***A61K31/519 (2006.01)*** ***A61K39/395 (2006.01)***
A61K31/5377(2006.01) ***A61K31/53 (2006.01)***
A61K31/436 (2006.01) ***A61K31/506 (2006.01)***
A61K31/496 (2006.01) ***A61P35/00 (2006.01)***

(30)優先權：2018/11/19 美國 62/769,355
2019/03/20 美國 62/821,376
2019/06/24 美國 62/865,819

(71)申請人：美商安進公司 (美國) AMGEN INC. (US)
美國

(72)發明人：利普芙德 詹姆士 羅素 LIPFORD, JAMES RUSSELL (US)；佳能 裘德 羅伯特 CANON, JUDE ROBERT (US)；齊木 安 Y SAIKI, ANNE Y. (US)；雷克斯 凱倫 路易斯 REX, KAREN LOUISE (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；姚金梅

(56)參考文獻：

WO 2016/044772A1

網路文獻 ClinicalTrials.gov, "A Phase 1, Study Evaluating the Safety, Tolerability, PK, and Efficacy of AMG 510 in Subjects With Solid Tumors With a Specific KRAS Mutation.", Last Update Posted:October 31, 2018, 網址: https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT03600883?V_4=View#StudyPageTop (網頁下載日期: 2023/5/16)

審查人員：唐韶璞

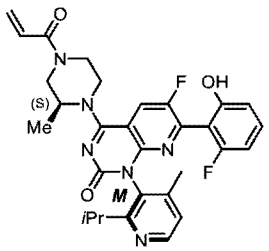
申請專利範圍項數：27 項 圖式數：50 共 238 頁

(54)名稱

用於治療癌症的包括 KRAS^{G12C} 抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑之組合療法

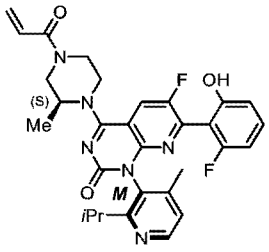
(57)摘要

本發明提供了包括 KRAS ^{G12C} 抑制劑（例如



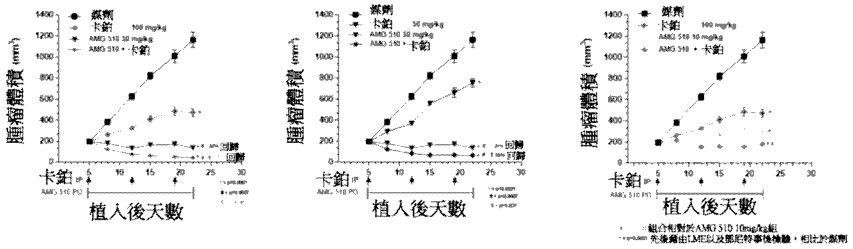
）或其藥學上可接受的鹽和一種或多種其他藥學活性藥劑之組合療法，特別是用於治療癌症。本發明還關於用於治療癌症的含有 KRAS ^{G12C} 抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑之藥物組成物。

The present invention provides combination therapy that includes an KRAS ^{G12C}inhibitor, such as



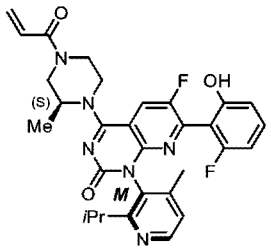
, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and one or more additional pharmaceutically active agents, particularly for the treatment of cancers. The invention also relates to pharmaceutical compositions that contain an KRAS ^{G12C}inhibitor and one or more additional pharmaceutically active agents for the treatment of cancers.

指定代表圖：



【圖 1】

特徵化學式：



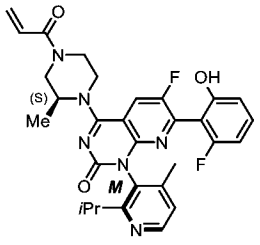
專利案號：112134414
原申請案號：108141784
公告本
I851405

【發明摘要】

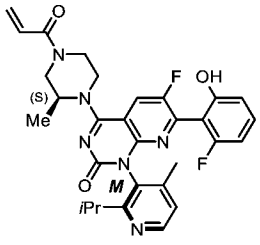
【中文發明名稱】　用於治療癌症的包括KRAS^{G12C}抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑之組合療法

【英文發明名稱】　COMBINATION THERAPY INCLUDING A KRAS^{G12C} INHIBITOR AND ONE OR MORE ADDITIONAL PHARMACEUTICALLY ACTIVE AGENTS FOR THE TREATMENT OF CANCERS

【中文】

本發明提供了包括KRAS^{G12C}抑制劑（例如  ）或其藥學上可接受的鹽和一種或多種其他藥學活性藥劑之組合療法，特別是用於治療癌症。本發明還關於用於治療癌症的含有KRAS^{G12C}抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑之藥物組成物。

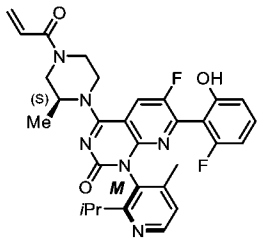
【英文】

The present invention provides combination therapy that includes an KRAS^{G12C} inhibitor, such as  , or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and one or more additional pharmaceutically active agents, particularly for the treatment of cancers. The invention also relates to pharmaceutical compositions that contain an KRAS^{G12C} inhibitor and one or more additional pharmaceutically active agents for the treatment of cancers.

【指定代表圖】　　圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】　用於治療癌症的包括$KRAS^{G12C}$抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑之組合療法

【英文發明名稱】　COMBINATION THERAPY INCLUDING A $KRAS^{G12C}$ INHIBITOR AND ONE OR MORE ADDITIONAL PHARMACEUTICALLY ACTIVE AGENTS FOR THE TREATMENT OF CANCERS

【技術領域】

【0001】 本發明提供了包括$KRAS^{G12C}$抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑之組合療法，特別是用於治療癌症。本發明還關於用於治療癌症的含有$KRAS^{G12C}$抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑之藥物組成物。

【先前技術】

【0002】 *KRAS*基因突變在胰臟癌、肺腺癌、結直腸癌、膽囊癌、甲狀腺癌和膽管癌中係常見的。在約25%的NSCLC患者中也觀察到*KRAS*突變，並且一些研究已指示，*KRAS*突變在NSCLC患者中係陰性預後因子。最近，已發現V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（*KRAS*）突變在結直腸癌中賦予對表皮生長因子受體（EGFR）靶向療法的抗性；因此，*KRAS*的突變狀態可以在開具TKI療法之前提供重要資訊。總體而言，需要針對胰臟癌、肺腺癌或結直腸癌的患者的新的醫學治療，特別是那些已被診斷出患有以*KRAS*突變表徵的此類癌症的患者並且包括那些化療後進展的患者。殘基G12、G13和Q61的致癌性*KRAS*突變代表了實體惡性腫瘤中最常見的RAS突變。最近已經證明，$KRAS^{G12C}$

可以被共價小分子抑制劑靶向，該抑制劑與鄰近開關II口袋（switch II pocket，SIIP）的突變半胱胺酸反應，將*KRAS*鎖定在其非活性GDP結合狀態。

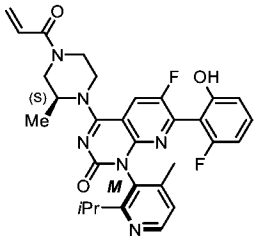
【0003】 *KRAS*係人類癌症中最頻繁突變的癌基因，並編碼腫瘤中的關鍵傳訊蛋白。$KRAS^{G12C}$突變體帶有一個半胱胺酸，其已被用於設計具有有前景的臨床前活性的共價抑制劑。我們優化了一系列具有新穎結合相互作用與顯著增強的效力和選擇性的抑制劑。該等努力導致了AMG 510的發現，AMG 510係臨床開發中的首款$KRAS^{G12C}$抑制劑。臨床前AMG 510治療消退了*KRAS p.G12C*腫瘤，並顯著改善化學療法和靶向藥劑的抗腫瘤功效。在免疫活性的小鼠中，AMG 510治療產生促炎性腫瘤微環境，並結合免疫檢查點抑制產生持久治癒。治癒的小鼠排斥等基因*KRAS p.G12D*腫瘤的生長，這表明對共有抗原的適應性免疫。AMG 510在首次給藥佇列中證明了臨床抗腫瘤活性的初步證據，並且代表了對缺乏有效治療的患者的潛在轉化療法。

【0004】 KRAS癌蛋白係一種GTP酶，其係參與腫瘤細胞生長和存活的細胞內傳訊通路的重要介質。在正常細胞中，KRAS充當分子開關，在非活性GDP結合狀態與活性GTP結合狀態之間交替。載入GTP並活化KRAS的鳥嘌呤核苷酸交換因子（GEF）和GTP水解促進了該等狀態之間的轉換，GTP水解藉由GTP酶激活蛋白（GAP）催化而使KRAS失活。GTP與KRAS的結合促進了效應子的結合以觸發訊息傳導通路，包括RAF-MEK-ERK（MAPK）。KRAS中的體細胞激活突變係癌症的標誌並防止GAP締合，從而穩定效應子結合並增強KRAS傳訊。患有*KRAS*突變腫瘤的患者的結果顯著更不良，並且預後更差。儘管臨床上批准的若干種MAPK通路蛋白（例如MEK、BRAF、EGFR）的抑制劑針對一小組腫瘤類型，但迄今為止尚無對*KRAS*突變型腫瘤具有選擇性的臨床分子。此外，由

於缺乏臨床功效，因此禁止使用若干種MAPK通路靶向療法來治療*KRAS*突變腫瘤。此外，由於抑制了正常細胞中的MAPK傳訊，因此非腫瘤或非突變的選擇性療法可能會引入中靶（on-target）毒性。這可能會限制將此類藥劑與護理標準或免疫療法結合使用的效用。因此，對開發未引入對正常細胞的負擔的腫瘤選擇性療法存在明顯未滿足的需求。

【0005】 *KRAS p.G12C*存在於約13%的肺腺癌，3%的結直腸癌和2%的其他實體瘤中。$KRAS^{G12C}$的突變半胱胺酸與非活性GDP結合形式的KRAS中存在的口袋（P2）相鄰。P2和突變半胱胺酸的接近導致對共價抑制劑的廣泛搜索。首次報導的對$KRAS^{G12C}$的親電篩選最終鑒定出ARS-1620，這在臨床前*KRAS p.G12C*模型中顯示了體內功效。儘管Araxes Pharma公司的ARS-1620係概念驗證突變選擇性KRAS抑制的里程碑，但其已被定位為臨床前研究的工具化合物。美商安進公司（Amgen, Inc.）的科學家們鑒定了一系列新穎的基於丙烯醯胺的分子，該等分子利用了$KRAS^{G12C}$中以前未被利用的表面凹槽，從而實質上提高了效能和選擇性。密集型親電篩選和基於結構的設計最終導致了AMG 510的發現，AMG 510係首款在人體中進行臨床測試的$KRAS^{G12C}$抑制劑（參見www.clinicaltrials.gov NCT03600883）。本發明包括AMG 510的令人信服的臨床前活性，其作為單一療法或與其他療法組合時增強腫瘤細胞殺傷的能力，以及對免疫細胞浸潤的顯著影響，這使得腫瘤微環境對免疫療法非常敏感。本文還提供了臨床功效的初步證據。

【發明內容】

【0006】 本發明包括一種藥物組成物，其包含  AMG 510或其藥學上可接受的鹽；和一種或多種治療劑或藥學活性藥劑；和藥學上可接受的賦形劑。

【0007】 本發明進一步包括一種用AMG 510或藥學上可接受的鹽和至少一種治療劑的組合治療癌症（例如實體瘤，包括但不限於肺癌、結腸癌和胰臟癌）之方法，其中該治療劑選自抗PD-1抗體、化學治療劑、MEK抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑、PI3K抑制劑和AKT抑制劑。

【0008】 本發明進一步包括分離的細胞系，其包含兩個$KRAS^{G12C}$等位基因，其中該細胞系係CT-26 *KRAS p.G12C*。

【0009】 本發明進一步包括一種產生包含兩個$KRAS^{G12C}$等位基因的細胞系之方法，該方法包括：

a) 將包含兩個$KRAS^{G12D}$等位基因的細胞系與CRISPR構建體一起孵育，該CRISPR構建體誘導兩個KRAS等位基因上的核苷酸替代，從而形成兩個$KRAS^{G12C}$等位基因；以及

b) 分離包含兩個$KRAS^{G12C}$等位基因的細胞系。

第一組實施方式

1. 在本發明的一個實施方式中，本發明包括一種治療胰臟癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和至少一種化學治療劑。

2. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療結腸癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和至少一種化學治療劑。

3. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式2所述之方法，其中該結腸癌具有*KRAS p.G12C*突變。

4. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療肺癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和化學治療劑。

在一些這樣的實施方式中，該肺癌係非小細胞肺癌。

5. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式1所述之方法，其中該胰臟癌具有*KRAS p.G12C*突變。

6. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式1-5中任一項所述之方法，其中該化學治療劑係卡鉑。

7. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療胰臟癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和MEK抑制劑。

8. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療結腸癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和MEK抑制劑。

9. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療肺癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和MEK抑制劑。

10. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式9所述之方法，其中該肺癌具有*p.KRAS G12C*突變。

11. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式7-10中任一項所述之方法，其中該MEK抑制劑係曲美替尼（trametinib）。

12. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式7-10中任一項所述之方法，其中該MEK抑制劑係匹馬塞替尼（pimasertib）、PD-325901、MEK162、TAK-733、GDC-0973或AZD8330。

13. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療胰臟癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和EGFR抑制劑。

14. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療結腸癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和EGFR抑制劑。

15. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療肺癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和EGFR抑制劑。

16. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式13-15中任一項所述之方法，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼（afatinib）。

17. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式13和15中任一項所述之方法，其中該EGFR抑制劑係厄洛替尼（erlotinib）。

18. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式15所述之方法，其中該EGFR抑制劑係拉帕替尼（lapatinib）。

19. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療胰臟癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和SHP2抑制劑。

20. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療結腸癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和SHP2抑制劑。

21. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療肺癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和SHP2抑制劑。

22. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式19-21中任一項所述之方法，其中該SHP2抑制劑選自RMC-4550。

23. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式22所述之方法，其中該SHP2抑制劑係RMC 4550。

24. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療胰臟癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和PI3K抑制劑。

25. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療結腸癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和PI3K抑制劑。

26. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療肺癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和PI3K抑制劑。

27. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式24-26中任一項所述之方法，其中該PI3K抑制劑係AMG 511。

28. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式26所述之方法，其中該PI3K抑制劑係布帕尼西（buparlisib）。

29. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療胰臟癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和AKT抑制劑。

30. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療肺癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和AKT抑制劑。

31. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式29-30中任一項所述之方法，其中該AKT抑制劑係AZD5363。

32. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療結腸癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和EGFR抗體。

33. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式32所述之方法，其中該EGFR抗體係西妥昔單抗（cetuximab）。

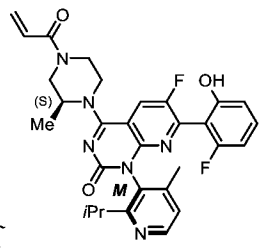
32. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療結腸癌之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和抗PD-1抗體。

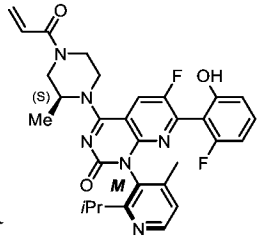
33. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式32所述之方法，其中該抗PD-1抗體選自AMG 404、派姆單抗（pembrolizumab）和納武單抗（nivolumab）。

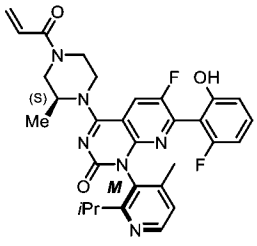
34. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式33所述之方法，其中該抗PD-1抗體係派姆單抗。

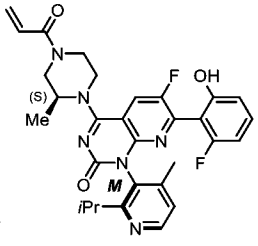
35. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式33所述之方法，其中該抗PD-1抗體係AMG 404。

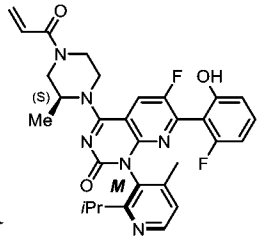
36. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式33所述之方法，其中該抗PD-1抗體係納武單抗。

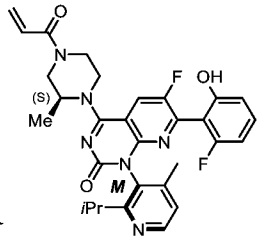
37. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；卡鉑；和藥學上可接受的賦形劑。

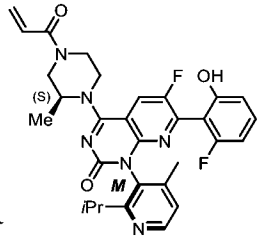
38. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；曲美替尼；和藥學上可接受的賦形劑。

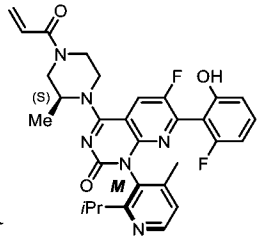
39. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含：  或其藥學上可接受的鹽；阿法替尼；和藥學上可接受的賦形劑。

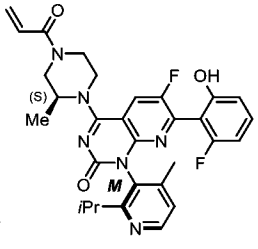
40. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；厄洛替尼；和藥學上可接受的賦形劑。

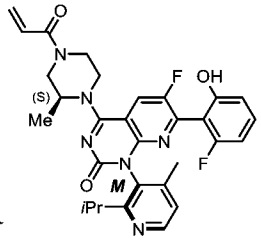
41. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；拉帕替尼；和藥學上可接受的賦形劑。

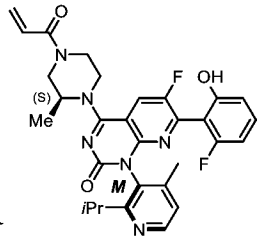
42. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；RMC-4550；和藥學上可接受的賦形劑。

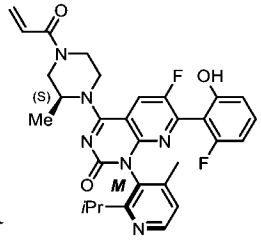
43. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；AMG 511；和藥學上可接受的賦形劑。

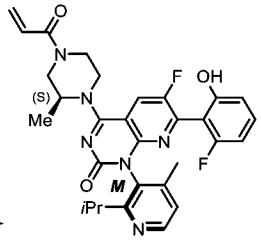
44. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽;布帕尼西;和藥學上可接受的賦形劑。

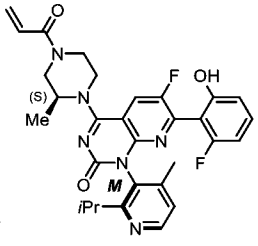
45. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽;AZD5363;和藥學上可接受的賦形劑。

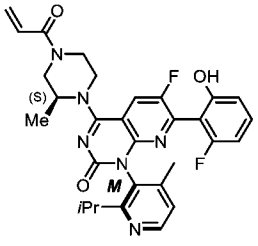
46. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；西妥昔單抗；和藥學上可接受的賦形劑。

47. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；抗PD-1抗體；和藥學上可接受的賦形劑。

48. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；AMG 404；和藥學上可接受的賦形劑。

49. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽;派姆單抗;和藥學上可接受的賦形劑。

50. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽;納武單抗;和藥學上可接受的賦形劑。

51. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式1-4或7-36中任一項所述之方法，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係  或其藥學上可接受的鹽。

52. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療實體瘤的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和MEK抑制劑藥物的組合。

53. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療肺癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和MEK抑制劑藥物的組合。

54. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療結腸癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和MEK抑制劑藥物的組合。

55. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療胰臟癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和MEK抑制劑藥物的組合。

56. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療實體瘤的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和化學治療劑藥物的組合。

57. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療肺癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和化學治療劑藥物的組合。

58. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療結腸癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和化學治療劑藥物的組合。

59. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療胰臟癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和化學治療劑藥物的組合。

60. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療實體瘤的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和EGFR抑制劑藥物的組合。

61. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療肺癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和EGFR抑制劑藥物的組合。

62. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療結腸癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和EGFR抑制劑藥物的組合。

63. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療胰臟癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和EGFR抑制劑藥物的組合。

64. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療實體瘤的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和抗PD-1抗體藥物的組合。

65. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療肺癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和抗PD-1抗體藥物的組合。

66. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療結腸癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和抗PD-1抗體藥物的組合。

67. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療胰臟癌的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和抗PD-1抗體藥物的組合。

68. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括$KRAS^{G12C}$抑制劑與化學治療劑組合在製造用於管理或治療受試者的胰臟癌、肺癌或結腸癌的藥物中之用途。

69. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括$KRAS^{G12C}$抑制劑與MEK抑制劑組合在製造用於管理或治療受試者的胰臟癌、肺癌或結腸癌的藥物中之用途。

70. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括$KRAS^{G12C}$抑制劑與EGFR抑制劑組合在製造用於管理或治療受試者的胰臟癌、肺癌或結腸癌的藥物中之用途。

71. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括$KRAS^{G12C}$抑制劑與抗PD-1抗體組合在製造用於管理或治療受試者的胰臟癌、肺癌或結腸癌的藥物中之用途。

72. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括包含兩個$KRAS^{G12C}$等位基因的分離的細胞系。

73. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式68所述的細胞系，其中該細胞系係CT-26 *KRAS p.G12C*。

74. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種產生包含兩個$KRAS^{G12C}$等位基因的細胞系之方法，該方法包括：

a) 將包含兩個KRAS G12D等位基因的細胞系與CRISPR構建體一起孵育，該CRISPR構建體誘導兩個KRAS等位基因上的核苷酸替代，從而形成兩個$KRAS^{G12C}$等位基因；以及

b) 分離包含兩個$KRAS^{G12C}$等位基因的細胞系。

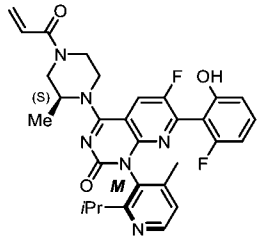
75. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式70所述之方法，其中該CRISPR構建體包含序列CTTGTGATGGTTGGAGCTGA（SEQ ID NO: 21）。

76. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括一種治療癌症之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和至少一種其他化學治療劑。

77. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括用於治療實體瘤的$KRAS^{G12C}$抑制劑藥物和抗PD-1抗體藥物的組合。

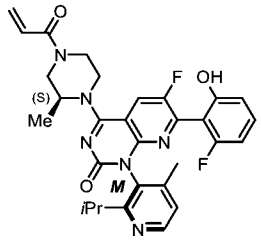
78. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括$KRAS^{G12C}$抑制劑與至少一種其他化學治療劑組合在製造用於管理或治療受試者的胰臟癌、肺癌或結腸癌的藥物中之用途。

79. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式76所述之方法，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係



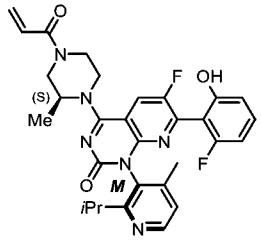
或其藥學上可接受的鹽。

80. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式77所述的組合，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係



或其藥學上可接受的鹽。

81. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式78所述之用途，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係



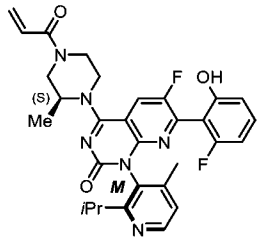
或其藥學上可接受的鹽。

82. 在本發明的另一個實施方式中，本發明包括如實施方式78所述之用途，其中該肺癌係非小細胞肺癌（NSCLC）。

第二組實施方式

1. 在本發明的另一個實施方式中，本發明關於一種治療癌症之方法，該方法包括向有需要的患者投與治療有效量的$KRAS^{G12C}$抑制劑和至少一種其他藥學活性藥劑。

2. 在另一個實施方式中，如實施方式1所述之方法，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係



或其藥學上可接受的鹽。

3. 在另一個實施方式中，如實施方式1所述之方法，其中該癌症為*KRAS p.G12C*突變。

4. 在另一個實施方式中，如實施方式1所述之方法，其中該癌症係胰臟癌、結腸直腸癌、肺癌、闌尾癌、子宮內膜癌或小腸癌。

5. 在另一個實施方式中，如實施方式4所述之方法，其中該癌症係胰臟癌。

6. 在另一個實施方式中，如實施方式4所述之方法，其中該癌症係結腸直腸癌。

7. 在另一個實施方式中，如實施方式4所述之方法，其中該癌症係肺癌。

8. 在另一個實施方式中，如實施方式7所述之方法，其中該肺癌係非小細胞肺癌（NSCLC）。

9. 在另一個實施方式中，如實施方式4所述之方法，其中該癌症係闌尾癌。

10. 在另一個實施方式中，如實施方式4所述之方法，其中該癌症係子宮內膜癌。

11. 在另一個實施方式中，如實施方式4所述之方法，其中該癌症係小腸癌。

12. 在另一個實施方式中，如實施方式1所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑、抗PD-1抑制劑、MEK抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。

13. 在另一個實施方式中，如實施方式12所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑。

14. 在另一個實施方式中，如實施方式12所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係抗PD-1抑制劑。

15. 在另一個實施方式中，如實施方式14所述之方法，其中該抗PD-1抑制劑選自AMG 404、派姆單抗和納武單抗。

16. 在另一個實施方式中，如實施方式15所述之方法，其中該抗PD-1抑制劑係派姆單抗。

17. 在另一個實施方式中，如實施方式15所述之方法，其中該抗PD-1抑制劑係AMG 404。

18. 在另一個實施方式中，如實施方式15所述之方法，其中該抗PD-1抑制劑係納武單抗。

19. 在另一個實施方式中，如實施方式12所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係MEK抑制劑。

20. 在另一個實施方式中，如實施方式19所述之方法，其中該MEK抑制劑係曲美替尼、匹馬塞替尼、PD-325901、MEK162、TAK-733、GDC-0973或AZD8330。

21. 在另一個實施方式中，如實施方式20所述之方法，其中該MEK抑制劑係曲美替尼。

22. 在另一個實施方式中，如實施方式12所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係EGFR抑制劑。

23. 在另一個實施方式中，如實施方式22所述之方法，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼、厄洛替尼、拉帕替尼或西妥昔單抗。

24. 在另一個實施方式中，如實施方式23所述之方法，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼。

25. 在另一個實施方式中，如實施方式23所述之方法，其中該EGFR抑制劑係西妥昔單抗。

26. 在另一個實施方式中，如實施方式12所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係SHP2抑制劑。

27. 在另一個實施方式中，如實施方式26所述之方法，其中該SHP2抑制劑係RMC 4550。

28. 在另一個實施方式中，如實施方式26所述之方法，其中該SHP2抑制劑係RMC 4630。

29. 在另一個實施方式中，如實施方式12所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係PI3K抑制劑。

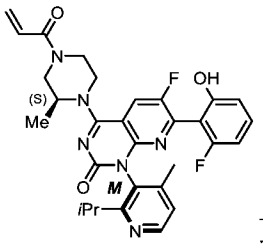
30. 在另一個實施方式中，如實施方式29所述之方法，其中該PI3K抑制劑係AMG 511或布帕尼西。

31. 在另一個實施方式中，如實施方式30所述之方法，其中該PI3K抑制劑係AMG 511。

32. 在另一個實施方式中，如實施方式30所述之方法，其中該PI3K抑制劑係布帕尼西。

33. 在另一個實施方式中，如實施方式12所述之方法，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係AKT抑制劑。

34. 在另一個實施方式中，如實施方式33所述之方法，其中該AKT抑制劑係AZD5363。

35. 在另一個實施方式中，一種藥物組成物，其包含  或其藥學上可接受的鹽；至少一種其他藥學活性藥劑；和藥學上可接受的賦形劑。

36. 在另一個實施方式中，如實施方式35所述之組成物，其中至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑、抗PD-1抑制劑、MEK抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。

37. 在另一個實施方式中，如實施方式36所述之組成物，其中至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑。

38. 在另一個實施方式中，如實施方式36所述之組成物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係抗PD-1抑制劑。

39. 在另一個實施方式中，如實施方式38所述之組成物，其中該抗PD-1抑制劑選自AMG 404、派姆單抗和納武單抗。

40. 在另一個實施方式中，如實施方式39所述之組成物，其中該抗PD-1抑制劑係派姆單抗。

41. 在另一個實施方式中，如實施方式39所述之組成物，其中該抗PD-1抑制劑係AMG 404。

42. 在另一個實施方式中，如實施方式39所述之組成物，其中該抗PD-1抑制劑係納武單抗。

43. 在另一個實施方式中，如實施方式36所述之組成物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係MEK抑制劑。

44. 在另一個實施方式中，如實施方式43所述之組成物，其中該MEK抑制劑係曲美替尼、匹馬塞替尼、PD-325901、MEK162、TAK-733、GDC-0973或AZD8330。

45. 在另一個實施方式中，如實施方式44所述之組成物，其中該MEK抑制劑係曲美替尼。

46. 在另一個實施方式中，如實施方式36所述之組成物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係EGFR抑制劑。

47. 在另一個實施方式中，如實施方式46所述之組成物，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼、厄洛替尼、拉帕替尼或西妥昔單抗。

48. 在另一個實施方式中，如實施方式47所述之組成物，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼。

49. 在另一個實施方式中，如實施方式47所述之組成物，其中該EGFR抑制劑係西妥昔單抗。

50. 在另一個實施方式中，如實施方式36所述之組成物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係SHP2抑制劑。

51. 在另一個實施方式中，如實施方式50所述之組成物，其中該SHP2抑制劑係RMC 4550。

52. 在另一個實施方式中，如實施方式50所述之組成物，其中該SHP2抑制劑係RMC 4630。

53. 在另一個實施方式中，如實施方式36所述之組成物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係PI3K抑制劑。

54. 在另一個實施方式中，如實施方式53所述之組成物，其中該PI3K抑制劑係AMG 511或布帕尼西。

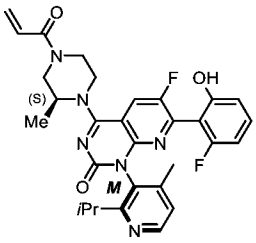
55. 在另一個實施方式中，如實施方式54所述之組成物，其中該PI3K抑制劑係AMG 511。

56. 在另一個實施方式中，如實施方式54所述之組成物，其中該PI3K抑制劑係布帕尼西。

57. 在另一個實施方式中，如實施方式36所述之組成物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係AKT抑制劑。

58. 在另一個實施方式中，如實施方式57所述之組成物，其中該AKT抑制劑係AZD5363。

59. 在另一個實施方式中，一種套組（kit），其包含：$KRAS^{G12C}$抑制劑或其藥學上可接受的鹽；和至少一種其他藥學活性藥劑。

60. 在另一個實施方式中，如實施方式59所述之套組，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係  或其藥學上可接受的鹽。

61. 在另一個實施方式中，如實施方式59所述之套組，其中至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑、抗PD-1抑制劑、MEK抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。

62. 在另一個實施方式中，如實施方式59所述之套組，其中至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑。

63. 在另一個實施方式中，如實施方式59所述之套組，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係抗PD-1抑制劑。

64. 在另一個實施方式中，如實施方式63所述之套組，其中該抗PD-1抑制劑選自AMG 404、派姆單抗和納武單抗。

65. 在另一個實施方式中，如實施方式64所述之套組，其中該抗PD-1抑制劑係派姆單抗。

66. 在另一個實施方式中，如實施方式64所述之套組，其中該抗PD-1抑制劑係AMG 404。

67. 在另一個實施方式中，如實施方式64所述之套組，其中該抗PD-1抑制劑係納武單抗。

68. 在另一個實施方式中，如實施方式61所述之套組，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係MEK抑制劑。

69. 在另一個實施方式中，如實施方式68所述之套組，其中該MEK抑制劑係曲美替尼、匹馬塞替尼、PD-325901、MEK162、TAK-733、GDC-0973或AZD8330。

70. 在另一個實施方式中，如實施方式69所述之套組，其中該MEK抑制劑係曲美替尼。

71. 在另一個實施方式中，如實施方式61所述之套組，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係EGFR抑制劑。

72. 在另一個實施方式中，如實施方式61所述之套組，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼、厄洛替尼、拉帕替尼或西妥昔單抗。

73. 在另一個實施方式中，如實施方式62所述之套組，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼。

74. 在另一個實施方式中，如實施方式62所述之套組，其中該EGFR抑制劑係西妥昔單抗。

75. 在另一個實施方式中，如實施方式61所述之套組，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係SHP2抑制劑。

76. 在另一個實施方式中，如實施方式75所述之套組，其中該SHP2抑制劑係RMC 4550。

77. 在另一個實施方式中，如實施方式75所述之套組，其中該SHP2抑制劑係RMC 4630。

78. 在另一個實施方式中，如實施方式61所述之套組，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係PI3K抑制劑。

79. 在另一個實施方式中，如實施方式78所述之套組，其中該PI3K抑制劑係AMG 511或布帕尼西。

80. 在另一個實施方式中，如實施方式79所述之套組，其中該PI3K抑制劑係AMG 511。

81. 在另一個實施方式中，如實施方式79所述之套組，其中該PI3K抑制劑係布帕尼西。

82. 在另一個實施方式中，如實施方式61所述之套組，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係AKT抑制劑。

83. 在另一個實施方式中，如實施方式82所述之套組，其中該AKT抑制劑係AZD5363。

84. 在另一個實施方式中，如實施方式59所述之套組，其中該套組用於治療癌症。

85. 在另一個實施方式中，如實施方式84所述之套組，其中該癌症為*KRAS p.G12C*突變。

86. 在另一個實施方式中，如實施方式84所述之套組，其中該癌症係胰臟癌、結腸直腸癌、肺癌、闌尾癌、子宮內膜癌或小腸癌。

87. 在另一個實施方式中，如實施方式86所述之套組，其中該癌症係胰臟癌。

88. 在另一個實施方式中，如實施方式86所述之套組，其中該癌症係結腸直腸癌。

89. 在另一個實施方式中，如實施方式86所述之套組，其中該癌症係肺癌。

90. 在另一個實施方式中，如實施方式89所述之套組，其中該肺癌係非小細胞肺癌（NSCLC）。

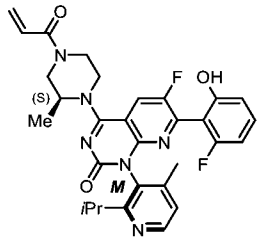
91. 在另一個實施方式中，如實施方式86所述之套組，其中該癌症係闌尾癌。

92. 在另一個實施方式中，如實施方式86所述之套組，其中該癌症係子宮內膜癌。

93. 在另一個實施方式中，如實施方式86所述之套組，其中該癌症係小腸癌。

94. 在另一個實施方式中，$KRAS^{G12C}$抑制劑與至少一種其他化學治療劑組合用於製造用於管理或治療受試者的癌症的藥物之用途。

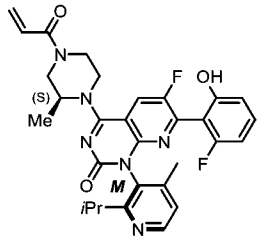
95. 在另一個實施方式中，如實施方式94所述之用途，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係



或其藥學上可接受的鹽。

96. 在另一個實施方式中，一種化合物，其為$KRAS^{G12C}$抑制劑，用於與至少一種其他藥學活性藥劑一起在治療癌症中使用。

97. 在另一個實施方式中，如實施方式96所述之化合物，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑係



或其藥學上可接受的鹽。

98. 在另一個實施方式中，如實施方式96所述之化合物，其中該癌症為*KRAS p.G12C*突變。

99. 在另一個實施方式中，如實施方式96所述之化合物，其中該癌症係胰臟癌、結腸直腸癌、肺癌、闌尾癌、子宮內膜癌或小腸癌。

100. 在另一個實施方式中，如實施方式99所述之化合物，其中該癌症係胰臟癌。

101. 在另一個實施方式中，如實施方式99所述之化合物，其中該癌症係結腸直腸癌。

102. 在另一個實施方式中，如實施方式99所述之化合物，其中該癌症係肺癌。

103. 在另一個實施方式中，如實施方式102所述之化合物，其中該肺癌係非小細胞肺癌（NSCLC）。

104. 在另一個實施方式中，如實施方式99所述之化合物，其中該癌症係闌尾癌。

105. 在另一個實施方式中，如實施方式99所述之化合物，其中該癌症係子宮內膜癌。

106. 在另一個實施方式中，如實施方式99所述之化合物，其中該癌症係小腸癌。

107. 在另一個實施方式中，如實施方式96所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑、抗PD-1抑制劑、MEK抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。

108. 在另一個實施方式中，如實施方式107所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係卡鉑。

109. 在另一個實施方式中，如實施方式107所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係抗PD-1抑制劑。

110. 在另一個實施方式中，如實施方式109所述之化合物，其中該抗PD-1抑制劑選自AMG 404、派姆單抗和納武單抗。

111. 在另一個實施方式中，如實施方式110所述之化合物，其中該抗PD-1抑制劑係派姆單抗。

112. 在另一個實施方式中，如實施方式110所述之化合物，其中該抗PD-1抑制劑係AMG 404。

113. 在另一個實施方式中，如實施方式110所述之化合物，其中該抗PD-1抑制劑係納武單抗。

114. 在另一個實施方式中，如實施方式107所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係MEK抑制劑。

115. 在另一個實施方式中，如實施方式114所述之化合物，其中該MEK抑制劑係曲美替尼、匹馬塞替尼、PD-325901、MEK162、TAK-733、GDC-0973或AZD8330。

116. 在另一個實施方式中，如實施方式115所述之化合物，其中該MEK抑制劑係曲美替尼。

117. 在另一個實施方式中，如實施方式107所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係EGFR抑制劑。

118. 在另一個實施方式中，如實施方式117所述之化合物，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼、厄洛替尼、拉帕替尼或西妥昔單抗。

119. 在另一個實施方式中，如實施方式118所述之化合物，其中該EGFR抑制劑係阿法替尼。

120. 在另一個實施方式中，如實施方式118所述之化合物，其中該EGFR抑制劑係西妥昔單抗。

121. 在另一個實施方式中，如實施方式107所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係SHP2抑制劑。

122. 在另一個實施方式中，如實施方式121所述之化合物，其中該SHP2抑制劑係RMC 4550。

123. 在另一個實施方式中，如實施方式121所述之化合物，其中該SHP2抑制劑係RMC 4630。

124. 在另一個實施方式中，如實施方式107所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係PI3K抑制劑。

125. 在另一個實施方式中，如實施方式124所述之化合物，其中該PI3K抑制劑係AMG 511或布帕尼西。

126. 在另一個實施方式中，如實施方式125所述之化合物，其中該PI3K抑制劑係AMG 511。

127. 在另一個實施方式中，如實施方式125所述之化合物，其中該PI3K抑制劑係布帕尼西。

128. 在另一個實施方式中，如實施方式107所述之化合物，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係AKT抑制劑。

129. 在另一個實施方式中，如實施方式128所述之化合物，其中該AKT抑制劑係AZD5363。

130. 在另一個實施方式中，如實施方式1所述之方法，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑和該至少一種其他藥學活性藥劑同時投與。

131. 在另一個實施方式中，如實施方式1所述之方法，其中該$KRAS^{G12C}$抑制劑和該至少一種其他藥學活性藥劑分開投與。

【0010】 本發明的另一個實施方式包括使用包含$KRAS^{G12C}$抑制劑和另一種治療劑的組合，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑。

本發明的另一實施方式包括組合在治療癌症中之用途，該組合包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑。本發明的另一個實施方式包括一種使用組合用於治療癌症之方法，該組合包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑。本發明的另一個實施方式包括組合在治療癌症中之用途，該組合包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑的，其中該用途包括自我投與該組合。

【0011】 本發明的另一個實施方式包括一種治療癌症之方法，該方法包括開具進一步包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑的組合，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑的。本發明的另一個實施方式包括一種治療癌症之方法，該方法包括向有此需要的受試者開具進一步包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑的組合，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑。

【0012】 本發明的另一個實施方式包括一種使用組合治療癌症之方法，該組合包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑，其中該方法進一步包括在處方中列出所述組合並指導需要這種癌症治療的患者。

【0013】 本發明的另一個實施方式包括一種使用組合用於治療癌症之方法，該組合包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑，其中該方法包括購買所述組合以由需要這種癌症治療的患者自行投與。

【0014】 本發明的另一個實施方式包括一種治療癌症之方法，該方法包括指示需要這種治療的受試者投與組合，該組合包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑，該另一種治療劑選自化學治療劑、抗PD-1抑制劑、MEK抑制劑、Pi3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑。

【0015】 本發明的另一個實施方式包括一種治療癌症之方法，該方法包括

A] 開處方

B] 銷售或廣告銷售，

C] 購買，

D] 指示自我投與，或

E] 投與

【0016】 本文描述的組合，其中該組合已被管理機構批准用於需要癌症治療的受試者的癌症治療。

【0017】 本發明的另一個實施方式包括一種提供組合用於治療癌症之方法，該組合包含$KRAS^{G12C}$抑制劑與另一種治療劑，該另一種治療劑選自化學治療劑、PD-1抑制劑、MEK抑制劑、PI3K選擇性抑制劑、EGFR抑制劑、TOR抑制劑、SHP2抑制劑或AKT抑制劑，所述方法包括就所述組合的銷售向醫師、處方師、患者或保險公司補償。

【0018】 為了清楚起見，「指示」一詞的含義係除通常理解的定義外，還包括監管機構批准的標籤上的資訊。

【圖式簡單說明】

【0019】 [圖1]顯示了AMG 510與卡鉑的組合增強對NCI-H358 NSCLC腫瘤生長的抑制作用。

【0020】 [圖2]顯示了AMG 510與MEK抑制劑PD-325901的組合在NSCLC NCI-H358異種移植模型中導致增強的功效。

【0021】 [圖3]顯示了AMG 510抑制CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的體內生長。

【0022】 [圖4]顯示了AMG 510與抗PD-1抗體的組合在*KRAS p.G12C*突變癌症小鼠模型中導致提高的存活率和持久治癒。

【0023】 [圖5]顯示了AMG 510治療導致CT-26 G12C-H10腫瘤中CD8+和CD4+T細胞浸潤的增加。

【0024】 [圖6]顯示了AMG 510治療導致CT-26 G12C-H10腫瘤中PD-L1陽性嗜中性粒細胞的增加。

【0025】 [圖7]顯示了加和性過量矩陣標識了協同相互作用的區域。

【0026】 [圖8]顯示了自交叉矩陣模型的實驗加和性。

【0027】 [圖9]示出了AMG 510與RMC-4550（SHP2i）和曲美替尼（MEKi）兩者協同作用以在NCI-H358細胞系中實現細胞殺傷。

【0028】 [圖10]顯示了缺乏與阿法替尼或RMC-4550的單一藥劑活性在MIA PaCA-2細胞系中可導致更弱的協同作用。

【0029】 [圖11]顯示了3D培養中的組合可能揭示出增強的協同作用。

【0030】 [圖12]顯示了AMG 510 X曲美替尼在NCI-H358中具有協同作用。

【0031】 [圖13]顯示了NCI-H358細胞系中的AMG自交。

【0032】 [圖14]顯示了NCI-H358細胞系中的曲美替尼自交。

【0033】 [圖15]顯示了AMG 510 X曲美替尼在MIA PaCa-2細胞系中表現出弱協同作用。

【0034】 [圖16]顯示了3D培養改善AMG 510 X曲美替尼在MIA PaCa-2中的協同作用。

【0035】 [圖17]顯示了NCI-H1373細胞系中的AMG 510 X曲美替尼(3D)。

【0036】 [圖18]顯示了AMG 510 X曲美替尼由於每種單一藥劑在CT-26 *KRAS p.G12C*中的高功效而表現出弱協同作用。

【0037】 [圖19]顯示了AMG 510 X PD-325901在MIA PaCa-2中表現出弱協同作用。

【0038】 [圖20]顯示了AMG 510 X阿法替尼在NCI-H358細胞系中具有協同作用。

【0039】 [圖21]顯示了AMG 510 X阿法替尼在MIA PaCa-2細胞系中具有弱協同作用。

【0040】 [圖22]顯示了3D培養不能改善AMG 510 X阿法替尼在MIA PaCa-2細胞系中的協同作用。

【0041】 [圖23]顯示了NCI-H1373細胞系中的AMG 510 X阿法替尼(3D)。

【0042】 [圖24]顯示了AMG 510 X阿法替尼在CT-26 *KRAS p.G12C*中具有適度協同作用。

【0043】 [圖25]顯示了AMG 510 X拉帕替尼在NCI-H358細胞系中具有協同作用。

【0044】 [圖26]顯示了AMG X厄洛替尼在NCI-H358細胞系中具有適度協同作用。

【0045】 [圖27]顯示了由於缺乏厄洛替尼活性而在MIA PaCa-2細胞系中未觀察到AMG 510 X厄洛替尼的協同作用。

【0046】 [圖28]顯示了由於缺乏西妥昔單抗體內活性而在SW837中未觀察到AMG 510 X西妥昔單抗的協同作用。

【0047】 [圖29]顯示了AMG 510 X RMC-4550在NCI-H358細胞系中具有協同作用。

【0048】 [圖30]顯示了AMG 510 X RMC-4550在MIA PaCa-2細胞系中具有弱協同作用。

【0049】 [圖31]顯示了AMG 510 X RMC-4550在CT-26 *KRAS p.G12C*中具有適度協同作用。

【0050】 [圖32]顯示了AMG 510 X AMG 511在NCI-H358細胞系中具有適度協同作用。

【0051】 [圖33]顯示了AMG 510 X AMG 511在MIA PaCa-2細胞系中具有弱協同作用。

【0052】 [圖34]顯示了AMG 510 X AMG 511在CT-26 *KRAS p.G12C*中具有適度協同作用。

【0053】 [圖35]顯示了AMG 510 X布帕尼西（BKM120）在NCI-H358細胞系中具有適度協同作用。

【0054】 [圖36]顯示了AMG 510 X AZD5363在NCI-H358細胞系中具有弱協同作用。

【0055】 [圖37]顯示了AMG 5120 X AZD5363在MIA PaCa-2中具有弱協同作用。

【0056】 [圖38]顯示了AMG 510在2D培養中抑制在CT-26 *KRAS p.G12C*中的KRAS傳訊。

【0057】 [圖39]顯示了小鼠CT-26 *KRAS p.G12C*細胞在3D培養中對AMG 510敏感。

【0058】 [圖40a]顯示了與GDP和ARS-1620結合的$KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$的X射線共晶結構（PDB ID：5V9U）。

【0059】 [圖40b]顯示了1.65 Å解析度下與GDP和AMG 510結合的$KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$的X射線共晶結構（PDB ID：尚未指定）。

【0060】 [圖40c]顯示了在用純化的$KRAS^{G12C/C118A}$或$KRAS^{C118A}$蛋白進行SOS1催化的核苷酸交換測定中測量的AMG 510和ARS-1620的生化活性，$n = 4$。

【0061】 [圖40d]顯示了如藉由質譜法確定的AMG 510和ARS-1620的動力學特性（$n \geq 2$）。

【0062】 [圖40e]顯示了在2小時處理後藉由抑制ERK1/2磷酸化測量的AMG 510和ARS-1620在NCI-H358和MIA PaCa-2中的細胞活性（$n = 2$）。

【0063】 [圖40f]顯示了在2小時處理後在NCI-H358和MIA PaCa-2細胞中AMG 510對ERK磷酸化的抑制作用和對$KRAS^{G12C}$的佔用率（$n = 3$）。

【0064】 [圖40g]顯示了在72小時處理後如藉由對細胞活力的影響所測量的AMG 510和ARS-1620在NCI-H358和MIA PaCa-2中的細胞活性（$n = 3$）。

【0065】 [圖40h]顯示了如藉由抑制ERK磷酸化確定的AMG 510和ARS-1620的動力學特性（$n \geq 2$）。

【0066】 [圖41a]顯示了用AMG 510的劑量反應處理4或24小時後對NCI-H358或MIA PaCa-2中細胞傳訊的影響。

【0067】 [圖41b]顯示了在長達24小時的時間點用0.1 μM AMG 510處理後對NCI-H358或MIA PaCa-2中細胞傳訊的影響。

【0068】 [圖41c]顯示了在2小時處理後如藉由抑制ERK1/2磷酸化所測量的AMG 510在一組*KRAS p.G12C*和非*KRAS p.G12C*突變細胞系中的細胞活性（$n \geq 2$）。

【0069】 [圖41d]顯示了在72小時處理後如藉由對細胞活力的影響所測量的AMG 510在一組*KRAS p.G12C*和非*KRAS p.G12C*突變細胞系中的細胞活性。

【0070】 [圖41e]顯示了活力劑量響應曲線係至少n = 2個實驗的代表性實例。在黏附的單層或球狀體培養條件下，用AMG 510處理72小時對細胞活力的影響（n = 2）。

【0071】 [圖41f]顯示了用1 μM AMG 510處理4小時後NCI-H358全細胞裂解物的半胱胺酸蛋白質組分析（n = 5）。

【0072】 [圖42a-d]顯示了AMG 510在體內抑制在*KRAS p.G12C*突變腫瘤中的ERK 1/2磷酸化。對攜帶MIA PaCa-2 T2（圖42a、c、d）或NCI-H358（圖42b）的小鼠進行單劑口服媒劑或口服AMG 510（所有其他條），並在2小時後收穫（圖42a、b）或按指示隨時間收穫（圖42c、d），並如藉由MSD免疫測定法測量評估p-ERK水平。收集血漿和腫瘤樣本，並分析AMG 510濃度（分別為紅色三角形，黑色空心圓圈）。將數據表示為相對於媒劑的對照百分比。數據代表平均腫瘤體積 ± SEM（n = 3/組）。圖42a-d，****P < 0.0001；*P < 0.05，藉由鄧尼特法（Dunnett's）。

【0073】 [圖42e]顯示了在攜帶MIA PaCa-2 T2的小鼠中，與p-ERK抑制相關，使用質譜，在共價修飾$KRAS^{G12C}$的給藥方案中的AMG 510治療結果。

【0074】 [圖42f]顯示了在攜帶NCI-H358的小鼠中，與p-ERK抑制相關，使用質譜，在共價修飾$KRAS^{G12C}$的給藥方案中的AMG 510治療結果。

【0075】 [圖42g]顯示了在攜帶MIA PaCa-2 T2的小鼠中，與p-ERK抑制相關，使用質譜，在共價修飾$KRAS^{G12C}$中隨時間的AMG 510治療結果。

【0076】 [圖43a]顯示了向患有已確立的MIA PaCa-2 T2 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠給藥媒劑或AMG510。AMG 510選擇性抑制*KRAS p.G12C*突變腫瘤的體內生長。

【0077】 [圖43b]顯示了向患有已確立的NCI-H358 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠給藥媒劑或AMG510。AMG 510選擇性抑制*KRAS p.G12C*突變腫瘤的體內生長。

【0078】 [圖43c]顯示了向患有已確立的CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠給藥媒劑或AMG510。AMG 510選擇性抑制*KRAS p.G12C*突變腫瘤的體內生長。

【0079】 [圖43d]顯示了在用媒劑或AMG 510治療的小鼠的$KRAS^{G12C}$ NSCLC PDX模型中腫瘤生長的影響。AMG 510選擇性抑制*KRAS p.G12C*突變腫瘤的體內生長。

【0080】 在圖43a、b、c和d中，數據代表平均腫瘤體積 ± SEM（n = 10/組）。圖43a、b和c，****P < 0.0001，*P < 0.05，用於藉由鄧尼特法比較媒劑與治療組，#P < 0.05回歸配對t檢驗，和****P < 0.0001，藉由RM雙向ANOVA。

【0081】 [圖43e]顯示了用AMG 510治療的兩名*KRAS p.G12C*肺癌患者的CT掃描。代表性的治療前（「基線」）和治療後（R_x）掃描。最左端：頂圖代表肺左上葉，底圖代表肺右下葉。最右端：頂圖代表肺左上葉；底圖代表胸膜。AMG 510選擇性抑制*KRAS p.G12C*突變腫瘤的體內生長。

【0082】 [圖43f]向攜帶CT-26 KRAS p.G12C腫瘤的小鼠給藥媒劑或AMG 510。來自AMG 510治療的小鼠（100 mg/kg）的單個CT-26 KRAS p.G12C腫瘤圖。

【0083】 [圖43g]向攜帶CT-26 KRAS p.G12C腫瘤的小鼠給藥媒劑或AMG 510。來自AMG 510治療的小鼠（200 mg/kg）的單個CT-26 KRAS p.G12C腫瘤圖。100 mg/kg組的繼續治療表明消退不是持久的（圖3i），可能是由於p-ERK的不完全抑制（擴展數據圖2a）。因此，評估了200 mg/kg劑量的AMG 510，其幾乎完全抑制了p-ERK（擴展數據圖2a），並導致十個中有八個持久治癒（圖3j），AMG 510血漿水平剛好低於細胞IC90（擴展數據圖2h）。

【0084】 [圖44a]說明了針對NCI-H358腫瘤異種移植物的AMG 510與卡鉑組合。

【0085】 [圖44b]說明了使用Loewe加和性過量演算法計算AMG 510與靶向藥劑組合的協同作用得分，並表示為熱圖，更高得分（更深的紅色）表示更強的協同相互作用。

【0086】 [圖44c]說明了針對NCI-H358腫瘤異種移植物的AMG 510與MEK抑制劑（PD-0325901）組合。

【0087】 在圖44a和c中，數據代表平均腫瘤體積±SEM（n = 10/組）。a***P < 0.001，用於藉由鄧尼特法比較組合治療與每種單一藥劑，#P < 0.001，藉由配對t檢驗進行回歸。c****P < 0.001藉由鄧尼特法比較組合治療與每種單一藥劑，#P < 0.001藉由配對t檢驗進行回歸。與媒劑相比，來自所有治療組的結果均是顯著的（****P < 0.0001，藉由鄧尼特法）。

【0088】 [圖45a]顯示了用媒劑、AMG 510、抗PD-1或AMG 510與抗PD-1組合治療的單個小鼠中CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的生長（n = 10/組）。帶圓圈的線指示無腫瘤的小鼠。

【0089】 [圖45b]顯示了替代存活終點（腫瘤大小 > 800 mm3）的Kaplan Meier分析。與媒劑對照相比，Mantel-Cox****P < 0.001；組合與單獨的AMG 510或抗PD-1相比，#P < 0.005。

【0090】 [圖45c]顯示了來自用媒劑、AMG 510、抗PD-1、AMG 510與抗PD-1組合或MEKi治療四天的小鼠的CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤，並藉由流式細胞術進行了免疫分型（*n* = 8/組）。與媒劑對照相比，藉由圖凱法（Tukey's），****P < 0.0001，***P < 0.001，**P < 0.01，**P* < 0.05；NS = 不顯著。

【0091】 [圖45d]顯示了在治療兩天后從CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤中分離RNA（*n* = 5/組）。基因表現和得分藉由NanoString技術計算（參見方法）。藉由圖凱法，****P < 0.0001，***P < 0.001。

【0092】 [圖45e]顯示了如藉由流式細胞術測量的在存在或不存在干擾素γ（「IFNγ」）的情況下，在用AMG 510處理24小時後CT-26 *KRAS p.G12C*細胞上MHC I類抗原H-2K^{d}的細胞表面表現。藉由ELISpot測定法測量分泌的IFN-γ水平（n = 4-5/組）。

【0093】 [圖45f]顯示了用AMG 510加上抗PD-1治療治癒並用CT-26 *KRAS p.G12C*、CT-26或4T1細胞再次激發的小鼠的單個腫瘤生長。

【0094】 [圖45g]顯示收穫脾細胞並用所示細胞CT-26、CT-26 *KRAS p.G12C*或4T1細胞激發。藉由對照相對於組合的非配對t檢驗比較，*P = 0.0269。

【0095】 [圖45h] AMG 510治療誘導了促炎性腫瘤微環境。藉由免疫組織化學（對CD3/Ki67的免疫組織化學染色）對來自用媒劑、AMG 510、抗PD-1、AMG 510與抗PD-1組合或MEKi治療四天的小鼠的CT-26 KRAS p.G12C腫瘤進行免疫分型（n = 5/組）。Ki67免疫陽性染色為藍色和細胞核，而CD3和CD8免疫陽性染色為棕色和細胞質。h中的箭頭指向對CD3和Ki67具有雙重免疫陽性的細胞的實例。

【0096】 [圖45i] AMG 510治療誘導了促炎性腫瘤微環境，藉由免疫組織化學（對CD8的免疫組織化學染色）對來自用媒劑、AMG 510、抗PD-1、AMG 510與抗PD-1組合或MEKi治療四天的小鼠的CT-26 KRAS p.G12C腫瘤進行免疫分型（n = 5/組）。Ki67免疫陽性染色為藍色和細胞核，而CD3和CD8免疫陽性染色為棕色和細胞質。

【0097】 [圖46a]顯示了如在用純化的KRAS$^{G12C/C118A}$或KRAS^{C118A}蛋白進行的SOS1催化的核苷酸交換測定中測量的AMG 510及其非反應性丙醯胺類似物

的生化活性（$n \geq 2$）。對於所有圖46a-e，數據表示對於所示獨立重複數的平均值±SD。

【0098】 [圖46b]顯示了計算的最大反應速率和達到AMG 510和ARS-1620的最大速率一半的濃度。

【0099】 [圖46c]顯示了在NCI-H358細胞中用RMC-4550抑制ERK磷酸化，$t_{1/2}$ = 12.2 min（n = 2）。

【0100】 [圖46d]顯示了在MIA PaCa-2和NCI-H1373中，在黏附的單層或球狀體培養條件下，用AMG 510處理72小時對細胞活力的影響（n = 2）。

【0101】 [圖46e]顯示了藉由在細胞培養中，用/以胺基酸進行穩定的同位素標記（SILAC）在MIA PaCa-2和NCI-H358細胞中，KRAS的半衰期確定。

【0102】 [圖47a-c]顯示了用單劑口服媒劑或指定劑量的口服AMG 510治療攜帶CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠，並在2小時後收穫。藉由MSD免疫測定法測量p-ERK的水平。收集血漿和腫瘤樣本，並分析AMG 510濃度（分別為紅色三角形，黑色空心圓圈）。將數據表示為相對於媒劑的對照百分比（POC）。****P < 0.0001，*P < 0.05，與媒劑相比，藉由鄧尼特法。

【0103】 [圖47d]顯示了與p-ERK抑制成反比的KRASG12C共價修飾中的AMG 510治療結果。

【0104】 [圖47e]顯示了在SW480-1AC異種移植模型中AMG 510對腫瘤生長的影響。

【0105】 [圖47f]顯示了在$KRAS^{G12C}$ SCLC PDX模型中，AMG 510治療對腫瘤生長的影響。在圖47e和f中，當腫瘤達到約200 mm^3時開始治療。****P < 0.0001，藉由RM雙向ANOVA。

【0106】 [圖47g]顯示了來自MIA PaCa-2 T2，NCI-H358異種移植物的AMG 510的血漿水平。

【0107】 [圖47h]顯示了來自CT-26 *KRAS p.G12C*異種移植物的AMG 510的血漿水平。

【0108】 [圖47i]顯示了從第14天到第32天，在BALB/c裸小鼠中AMG 510治療的小鼠（200 mg/kg）的單個CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤圖。

【0109】 [圖47j]顯示了用AMG 510治療的兩名*KRAS p.G12C*肺癌患者的CT掃描。來自先前在圖43d中描述的患者的其他代表性治療前（「基線」）和治療後（Rx）掃描（最左端從上至下）肺左上葉、肺左下葉、淋巴結、肺左上葉、肺左上葉。最右端從上至下，肺左下葉、肺左下葉、胸膜和腎上腺。

【0110】 [圖47k]說明了針對NCI-H358腫瘤異種移植物的作為單一藥劑或與卡鉑組合的AMG 510。****P < 0.0001，與媒劑對照相比，藉由鄧尼特法，#P < 0.001，藉由配對t檢驗進行回歸。

【0111】 [圖48]顯示了在指定的細胞系中與靶向藥劑組合給藥的AMG 510的生長抑制矩陣和Loewe加和性過量，更深的顏色表示更大的細胞殺傷（生長抑制）和更強的協同相同作用（Loewe過量）。列出了每種組合中測試的抑制劑的最大濃度和矩陣覆蓋的劑量範圍。藉由將其各自的協同作用得分與其組分自交（A x A或B x B）的協同作用得分進行比較來評估單個異源組合（A x B）。僅當異源組合的協同作用得分超過任一組分自交的協同作用得分的三倍時，才認為它們具有協同作用。

【0112】 [圖49a]顯示了如藉由在2小時處理後對ERK1/2磷酸化的抑制測量的AMG 510和MEK抑制劑曲美替尼在CT-26 *KRAS p.G12C*和親代CT-26細胞系中的細胞活性（$n \geq 2$）。

【0113】 [圖49b]顯示了在球狀體培養中如藉由在72小時處理後對細胞活力的影響所測量的AMG 510和MEK抑制劑曲美替尼在CT-26 *KRAS p.G12C*和親代CT-26細胞系中的細胞活性（$n = 2$）。

【0114】 [圖50a]顯示了來自用媒劑、AMG 510、抗PD-1、AMG 510加抗PD-1、或MEKi治療四天的小鼠的CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤，並藉由流式細胞術進行了免疫分型（n = 8/組）。

【0115】 [圖50b]顯示了用單劑口服媒劑（黑條）或指示劑量的口服MEKi（藍條）治療攜帶CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠，並在2小時後收穫。藉由MSD免疫測定法測量p-ERK的水平。收集血漿和腫瘤樣本並分析MEKi濃度（分別為紅色三角形，黑色空心圓圈）。將數據表示為相對於媒劑的對照百分比（POC）。

【0116】 [圖50c]顯示了在攜帶CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠中測量了MEKi治療對腫瘤生長隨時間的影響。數據代表平均腫瘤體積±SEM（*n* = 10/組）。

【0117】 [圖50d]顯示了用媒劑、AMG 510、抗PD-1、AMG 510加抗PD-1、或MEKi治療四天的攜帶CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠中的腫瘤體積。數據代表平均腫瘤體積±SEM（*n* = 8/組）。

【0118】 [圖50e]顯示了治療兩天后從CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤分離RNA。基因表現和得分藉由NanoString技術計算（*n* = 5/組）。

【0119】 [圖50f]顯示了如藉由流式細胞術測量的在存在或不存在IFNγ的情況下，在用AMG 510處理24小時後，CT-26 *KRAS p.G12C*細胞上MHC I類抗原（H-2D^{d}和H-2L^{d}）的細胞表面表現。

【0120】 [圖50g]顯示了攜帶CT-26或CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的Balb/c小鼠的生長曲線。

【0121】 [圖50h]顯示了用AMG 510或MEKi對親代CT-26或CT-26 KRAS p.G12C細胞處理24小時後，對CXCL10或CXCL11轉錄本以及分泌的IP-10蛋白的定量。

【0122】 [圖50i]顯示了如藉由流式細胞術測量的在存在或不存在IFNγ的情況下，在用SW-1573處理24小時後，在處理48小時後，CT-26 KRAS p.G12C細

胞上，以及在用AMG 510處理48小時後，MIA PaCA-2上MHC I類抗原（HLA、H-2D^{d}和H-2K^{d}）的細胞表面表現。

【0123】 在圖50a、b、c和e中，*P < 0.05，相對於媒劑對照，藉由圖凱法；NS係不顯著的；***P < 0.001，與媒劑相比，藉由鄧尼特法；和****P < 0.0001，與媒劑對照相比，藉由鄧尼特法。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0124】 本申請要求2019年6月24日提交的美國臨時申請62/865,819、2019年3月20日提交的美國臨時申請62/821,376和2018年11月19日提交的美國臨時申請62/769,355的優先權和權益，所有申請均出於所有目的以引用方式全文併入本文。

序列表

【0125】 本申請與電子格式的序列表一起提交。序列表以標題為A-2326-US-NP_SeqList_102919_ST25.txt的文檔提供，該文檔創建於2019年10月29日，大小為15.4 kb。將電子格式的序列表的資訊藉由引用以其全文併入本文。

【0126】 本發明提供了包含KRAS^{G12C}抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑的組合療法，其特別用於治療癌症。本發明還關於用於治療癌症的含有KRAS^{G12C}抑制劑和一種或多種其他藥學活性藥劑的藥物組成物。本文所揭露的化合物包括所有藥學上可接受的同位素標記的化合物，其中本文所揭露的化合物的一個或多個原子由具有相同原子序數、但原子質量或質量數與通常在自然界中發現的原子質量或質量數不同的原子替代。可摻入所揭露化合物的同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素，例如分別為2H、3H、

11C、13C、14C、13N、15N、15O、17O、18O、31P、32P、35S、18F、36Cl、123I和125I。該等放射性標記的化合物可用於說明藉由表徵例如作用位點或方式，或與藥理學上重要的作用位點的結合親和性，來確定或測量化合物的有效性。本揭露的某些同位素標記的化合物（例如，那些摻入放射性同位素的化合物）可用於藥物和/或底物組織分佈研究中。鑒於易於摻入以及即用的檢測方式，放射性同位素氚（即3H）和碳-14（即14C）尤其可用於這個目的。

【0127】 用較重同位素（例如氘，即2H）取代可以提供源自較高代謝穩定性的某些治療優勢（例如，延長的體內半衰期或降低的劑量要求），並且因此在一些情況下是較佳的。

【0128】 用正電子發射同位素（例如11C、18F、15O和13N）取代可用於正電子發射斷層掃描（PET）研究，以檢查底物受體佔有率。結構 (I) 的同位素標記的化合物通常可以藉由熟悉該項技術者已知的常規技術，或者藉由與如下文所述的製備和實例（Preparations and Examples）中所述的那些類似之方法，使用適當的同位素標記的試劑代替先前採用的未經標記的試劑來製備。

【0129】 如本文所揭露的同位素標記的化合物通常可以藉由熟悉該項技術者已知的常規技術，或者藉由與所附實例和方案中所述的那些類似之方法，使用適當的同位素標記的試劑代替先前採用的未經標記的試劑來製備。

【0130】 如本文所揭露的某些化合物可以作為立體異構物（即，只有原子的空間排布不同的異構物）存在，包括光學異構物和構象異構物（或構象體）。本文所揭露的化合物包括作為純的個別立體異構物製劑和每一種的富集製劑的所有立體異構物、以及此類立體異構物的外消旋混合物以及可以根據熟悉該項技術者已知之方法分離的個別非鏡像異構物和鏡像異構物。另外，本文所揭露的化合物包括該等化合物的所有互變異構物形式。

【0131】 某些本文所揭露的化合物可以作為阻轉異構物存在，其為在由於與分子其他部分的空間相互作用，圍繞分子中單鍵的旋轉被阻止或大大減慢時出現的構象立體異構物。本文所揭露的化合物包括作為純的個別阻轉異構物製劑、每一種的富集製劑或者每一種的非特定混合物的所有阻轉異構物。如果圍繞單鍵的旋轉勢壘足夠高，並且構象之間的互變足夠緩慢，那麼可以容許異構物種類的分離和分開。異構物種類的分離和分開藉由熟知並且廣為接受的符號「M」或「P」適當表示。

【0132】 在另一實施方式中，該等化合物可以在製備本申請的化合物之方法中用作中間體。

【0133】 在另一實施方式中，該等化合物可以呈藥學上可接受的鹽的形式並且在與藥學上可接受的賦形劑的藥物配製物中。

【0134】 本文還提供了藥物組成物，該等藥物組成物包含如本文所揭露的化合物以及藥學上可接受的賦形劑，例如稀釋劑或載體。適合用於本發明的化合物和藥物組成物包括能以有效量投與化合物以實現其既定目的的那些。化合物的投與更詳細地描述於下文中。

【0135】 在另一實施方式中，該等化合物可以在製備本申請的化合物之方法中用作中間體。

【0136】 在另一實施方式中，該等化合物可以呈藥學上可接受的鹽的形式並且在與藥學上可接受的賦形劑的藥物配製物中。

【0137】 本文還提供了藥物組成物，該等藥物組成物包含如本文所揭露的化合物以及藥學上可接受的賦形劑，例如稀釋劑或載體。適合用於本發明的化合物和藥物組成物包括能以有效量投與化合物以實現其既定目的的那些。化合物的投與更詳細地描述於下文中。

【0138】 適合的藥物配製物可以由技術人員根據投與途徑和所需劑量來決定。參見例如，Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明頓藥物科學], 1435-712（第18版，賓夕法尼亞州伊斯頓市馬克出版公司（Mack Publishing Co, Easton, Pennsylvania），1990）。配製物可以影響所投與藥劑的物理狀態、穩定性、體內釋放速率和體內清除速率。取決於投與途徑，可以根據體重、體表面積或器官尺寸來計算適合的劑量。熟悉該項技術者在不進行過度實驗的情況下，尤其根據本文所揭露的劑量資訊和測定以及可藉由動物或人類臨床試驗獲得的藥物代謝動力學數據，以常規方式進行決定適當治療劑量所需計算的進一步細化。

【0139】 短語「藥學上可接受的」或「藥理學上可接受的」係指在投與於動物或人類時不產生不良反應、過敏反應或其他不利反應的分子實體和組成物。如本文所用，「藥學上可接受的」包括任何和所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑和抗真菌劑、等滲劑和吸收延遲劑等。此類賦形劑用於藥學活性物質的使用係本領域所熟知的。除非任何常規介質或藥劑與治療組成物不相容，否則考慮將其用於治療組成物中。還可以將補充性活性成分摻入組成物中。在示例性實施方式中，配製物可以包含玉米糖漿固體、高油酸紅花油、椰子油、大豆油、L-白胺酸、磷酸三鈣、L-酪胺酸、L-脯胺酸、乙酸L-離胺酸、DATEM（乳化劑）、L-麩醯胺酸、L-纈胺酸、磷酸氫二鉀、L-異白胺酸、L-精胺酸、L-丙胺酸、甘胺酸、L-天冬醯胺一水合物、L-絲胺酸、檸檬酸鉀、L-蘇胺酸、檸檬酸鈉、氯化鎂、L-組胺酸、L-甲硫胺酸、抗壞血酸、碳酸鈣、L-麩胺酸、L-胱胺酸二鹽酸鹽、L-色胺酸、L-天冬胺酸、氯化膽鹼、牛磺酸、m-肌醇、硫酸亞鐵、抗壞血酸棕櫚酸酯、硫酸鋅、L-肉鹼、α-生育酚乙酸酯、氯化鈉、煙醯胺、混合生育酚、泛酸鈣、硫酸酮、氯化硫胺素鹽酸鹽、維生素A棕櫚酸酯、硫酸錳、核黃素、鹽酸吡哆辛、葉酸、β-胡蘿蔔素、碘化鉀、葉綠醌、生物素、硒酸鈉、氯化鉻、鉬酸鈉、維生素D3和氰鈷胺。

【0140】 化合物可以作為藥學上可接受的鹽存在於藥物組成物中。如本文所用，「藥學上可接受的鹽」包括例如鹼加成鹽和酸加成鹽。

【0141】 藥學上可接受的鹼加成鹽可以用金屬或胺（例如鹼金屬和鹼土金屬或有機胺）來形成。化合物的藥學上可接受的鹽也可以用藥學上可接受的陽離子來製備。適合的藥學上可接受的陽離子係熟悉該項技術者所熟知的並且包括鹼金屬陽離子、鹼土金屬陽離子、銨陽離子和季銨陽離子。碳酸鹽或碳酸氫鹽也是可能的。用作陽離子的金屬的實例係鈉、鉀、鎂、銨、鈣或三價鐵等。適合的胺的實例包括異丙胺、三甲胺、組胺酸、N,N'-二苄基乙二胺、氯普魯卡因、膽鹼、二乙醇胺、二環己胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺和普魯卡因。

【0142】 藥學上可接受的酸加成鹽包括無機酸鹽或有機酸鹽。適合的酸鹽的實例包括鹽酸鹽、甲酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、水楊酸鹽、硝酸鹽、磷酸鹽。其他適合的藥學上可接受的鹽係熟悉該項技術者所熟知的並且包括例如甲酸、乙酸、檸檬酸、草酸、酒石酸或扁桃酸、鹽酸、氫溴酸、硫酸或磷酸；與有機羧酸、磺酸、磺酸基酸或磷酸基酸或N-取代的胺基磺酸，例如乙酸、三氟乙酸（TFA）、丙酸、乙醇酸、琥珀酸、馬來酸、羥基馬來酸、甲基馬來酸、富馬酸、蘋果酸、酒石酸、乳酸、草酸、葡糖酸、葡糖二酸、葡糖醛酸、檸檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、水楊酸、4-胺基水楊酸、2-苯氧基苯甲酸、2-乙醯氧基苯甲酸、撲酸、菸酸或異菸酸的鹽；以及與胺基酸，例如在自然界中參與蛋白質合成的20種α胺基酸，例如麩胺酸或天冬胺酸，以及與苯乙酸、甲磺酸、乙磺酸、2-羥基乙磺酸、乙烷1,2-二磺酸、苯磺酸、4-甲基苯磺酸、萘2-磺酸、萘1,5-二磺酸、2-磷酸甘油酸或3-磷酸甘油酸、葡萄糖6-磷酸、N-環己基胺基磺酸（用於環己胺磺酸鹽的形成），或與其他酸性有機化合物，例如抗壞血酸的鹽。

【0143】 含有本文所揭露的化合物的藥物組成物能以常規方式來製造，例如藉由常規混合、溶解、造粒、糖衣丸製備、磨細、乳化、囊封、捕集或凍乾方法。適當的配製物取決於所選的投與途徑。

【0144】 對於口服投與，可以藉由將本文所揭露的化合物與本領域熟知的藥學上可接受的賦形劑（例如載體）組合來容易地配製適合的組成物。此類賦形劑和載體使得能將本發明化合物配製為片劑、丸劑、糖衣丸、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液、懸浮液等，以供要治療的患者口服攝食。用於口服使用的藥物製劑可以藉由以下方式來獲得：向如本文所揭露的化合物添加固體賦形劑，視需要研磨所得混合物，並且在添加適合的輔助劑後（如果需要）加工顆粒混合物，獲得片劑或糖衣丸核心。適合的賦形劑包括例如填充劑和纖維素製劑。如果需要，可以添加崩解劑。用於各種類型的配製物的藥學上可接受的成分係熟知的，並且可以是例如用於各種配製物類型的黏合劑（例如，天然或合成聚合物）、潤滑劑、表面活性劑、甜味和矯味劑、包衣材料、防腐劑、染料、增稠劑、佐劑、抗微生物劑、抗氧化劑和載體。

【0145】 在口服投與治療有效量的本文所揭露的化合物時，組成物通常呈固體（例如，片劑、膠囊、丸劑、粉末或糖錠）或液體配製物（例如，水性懸浮液、溶液、酏劑或糖漿）的形式。

【0146】 在以片劑形式投與時，組成物可以另外含有功能性固體和/或固體載體，例如明膠或佐劑。片劑、膠囊和粉末可以含有約1%至約95%化合物，並且較佳的是約15%至約90%化合物。

【0147】 在以液體或懸浮液形式投與時，可以添加功能性液體和/或液體載體，例如水、石油或動物或植物來源的油。組成物的液體形式可以進一步含有生理鹽水溶液、糖醇溶液、右旋糖或其他糖溶液或二醇。在以液體或懸浮液形式投與時，組成物可以含有以重量計約0.5%至約90%的本文所揭露的化合物，

並且較佳的是約1%至約50%的本文所揭露的化合物。在考慮到的一個實施方式中，液體載體係非水性的或基本上非水性的。對於以液體形式投與，組成物可以作為快速溶解的固體配製物來供應，用於在即將投與前溶解或懸浮。

【0148】 在藉由靜脈內、經皮膚或皮下注射投與治療有效量的本文所揭露的化合物時，組成物呈無熱原、腸胃外可接受的水溶液的形式。此類腸胃外可接受的溶液的製備應充分考慮pH、等滲性、穩定性等，係在本領域技術範圍的。除了本文所揭露的化合物以外，用於靜脈內、經皮膚或皮下注射的較佳的組成物通常含有等滲媒劑。此類組成物可以經製備用於作為與表面活性劑（例如羥丙基纖維素）適當混合的游離鹼或藥理學上可接受的鹽於水中的溶液來投與。還可以在甘油、液體聚乙二醇及其混合物中以及在油中製備分散液。在普通的儲存和使用條件下，該等製劑可以視需要含有防腐劑以防止微生物生長。

【0149】 可注射組成物可以包括無菌水性溶液、懸浮液或分散液，以及用於臨時製備無菌可注射溶液、懸浮液或分散液的無菌粉末。在所有實施方式中，該形式必須是無菌的，並且流動性必須達到存在易可注射性的程度。其必須在製造和儲存條件下穩定，並且必須藉由視需要包括防腐劑來抵抗微生物（例如細菌和真菌）的污染作用。載體可以是溶劑或分散介質，其含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液體聚乙二醇等）、其適合的混合物以及植物油。在考慮到的一個實施方式中，載體係非水性的或基本上非水性的。適當流動性可以例如藉由以下方式來保持：藉由使用包衣，例如卵磷脂；在分散液的實施方式中藉由保持化合物的所需粒徑；以及藉由使用表面活性劑。對微生物作用的防止可以藉由各種抗細菌劑和抗真菌劑來實現，例如對羥苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等。在許多實施方式中，包括等滲劑（例如，糖或氯化鈉）將是較佳的。可注射組成物的延長吸收可以藉由在組成物中使用吸收延遲劑（例如，單硬脂酸鋁和明膠）來實現。

【0150】 無菌可注射溶液藉由以下方式來製備：將活性化合物以所需量摻入視需要含有上文所列舉的各種其他成分的適當溶劑中，隨後過濾滅菌。通常，分散液藉由以下方式來製備：將各種經滅菌活性成分摻入無菌媒劑中，該媒劑含有基礎分散介質和來自上文所列舉的那些的其他所需成分。在用於製備無菌可注射溶液的無菌粉末的實施方式中，較佳的製備方法係真空乾燥和冷凍乾燥技術，其產生活性成分加來自其預先經無菌過濾的溶液的任何所需的其他成分的粉末。

【0151】 還可以製備緩慢釋放或持續釋放配製物，以實現在胃腸道中與體液接觸的活性化合物的受控釋放，並且在血漿中提供基本上恒定且有效的活性化合物水平。例如，可以藉由溶解、擴散和離子交換中的一種或多種來控制釋放。另外，緩慢釋放方法可以藉由胃腸道內的可飽和或限制通路促進吸收。例如，出於這個目的，可以將化合物包埋於生物可降解聚合物、水溶性聚合物或二者的混合物以及視需要適合的表面活性劑的聚合物基質中。在這種情況下，包埋可以意指在聚合物基質中摻入微粒。還藉由經由已知的分散液或乳液包衣技術囊封經分散的微粒或經乳化的微滴來獲得受控釋放配製物。

【0152】 對於藉由吸入投與，本發明的化合物便捷地以氣溶膠噴霧劑呈遞的形式從加壓包裝或霧化器使用適合的推進劑來遞送。在加壓氣溶膠的實施方式中，可以藉由提供閥來確定劑量單位，以遞送經計量的量。用於吸入器或吹入器的例如明膠的膠囊和藥筒可以經配製含有化合物與適合的粉末基質（例如乳糖或澱粉）的粉末混合物。

【0153】 本文所揭露的化合物可以經配製用於藉由注射（例如，藉由推注或連續輸注）腸胃外投與。注射用配製物能以單位劑型（例如，於安瓿中或於多劑量容器中）呈現，並添加有防腐劑。組成物可以採取例如以下等形式：於

油性或水性媒劑中的懸浮液、溶液或乳液，並且可以含有配製劑，例如懸浮劑、穩定劑和/或分散劑。

【0154】 用於腸胃外投與的藥物配製物包括呈水溶性形式的化合物的水溶液。另外，可以將化合物的懸浮液製備為適當的油性注射懸浮液。適合的親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油或合成脂肪酸酯。水性注射懸浮液可以含有提高懸浮液黏度的物質。視需要，懸浮液還可以含有適合的穩定劑或提高化合物的溶解度並允許製備高度濃縮的溶液的試劑。可替代地，本發明組成物可以呈粉末形式以供在使用前用適合的媒劑（例如，無菌無熱原水）構造。

【0155】 本文所揭露的化合物還可以配製於直腸組成物中，例如栓劑或滯留型灌腸劑（例如，含有常規栓劑基質）。除了先前所述的配製物以外，還可以將化合物配製為長效製劑。此類長效配製物可以藉由植入（例如，皮下或肌內）或藉由肌內注射來投與。因此，例如，化合物可以用適合的聚合或疏水材料（例如，作為可接受的油中的乳液）或離子交換樹脂，或作為微溶衍生物（例如，作為微溶鹽）來配製。

【0156】 特別地，本文所揭露的化合物能以含有賦形劑（例如澱粉或乳糖）的片劑的形式，或以單獨的或與賦形劑混合的膠囊或珠囊（ovule），或以含有矯味劑或著色劑的酏劑或懸浮液的形式，口服、經頰或舌下投與。此類液體製劑可以用藥學上可接受的添加劑（例如懸浮劑）來製備。還可以腸胃外注射化合物，例如靜脈內、肌內、皮下或冠狀動脈內。對於腸胃外投與，化合物最佳地以無菌水溶液的形式來使用，其可以含有其他物質，例如鹽或糖醇（例如甘露醇）或葡萄糖，以使溶液與血液等滲。

【0157】 對於獸用，本文所揭露的化合物根據正規獸醫實踐作為適合地可接受的配製物來投與。獸醫可以容易地確定對於特定動物最適合的給藥方案和投與途徑。

【0158】 在一些實施方式中，可以將用於使用如本文所揭露的化合物（單獨的或與傳統地用於治療這種疾病的另一種藥劑或干預組合的）治療KRAS相關障礙的所有所需組分包裝至套組中。具體地，本發明提供了用於疾病的治療干預的套組，該套組包含經包裝的成套藥物，包括本文所揭露的化合物以及用於製備所述藥物的可遞送形式的緩衝劑和其他組分；和/或用於遞送此類藥物的裝置；和/或用於與本文所揭露的化合物的組合療法的任何藥劑；和/或與藥物一起包裝的疾病治療說明書。說明書可以固定於任何可觸摸介質中，例如印刷紙張、或電腦可讀取的磁性或光學介質、或參考遠端電腦數據來源的說明，例如可藉由互聯網訪問的萬維網網頁。

【0159】 「治療有效量」意指有效治療或預防所治療受試者的已有症狀的發展或減輕已有症狀的量。尤其根據本文所提供的詳細揭露，有效量的確定完全在熟悉該項技術者的能力範圍內。通常，「治療有效劑量」係指導致實現所需效果的化合物的量。例如，在一個較佳的實施方式中，與對照相比，治療有效量的本文所揭露的化合物將KRAS活性降低至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%。

【0160】 所投與的化合物的量可以取決於所治療的受試者、受試者的年齡、健康狀況、性別和體重、並行治療（如果有）的種類、病情的嚴重程度、所需效果的性質、治療的方式和頻率以及開處方醫師的判斷。給藥頻率還可以取決於對動脈氧分壓的藥效學作用。然而，可以根據個別受試者調整最較佳的劑量，如熟悉該項技術者所理解並且不經過度實驗即可確定的。這通常包括調整標準劑量（例如，如果患者體重低，那麼減小劑量）。

【0161】 雖然個體需求不同，但化合物的有效量的最佳範圍的確定係在本領域技術範圍的。對於在本文所鑒別的病症和障礙的治癒性或預防性治療中投

與人類，例如，本發明的化合物的典型劑量可以是約0.05 mg/kg/天至約50 mg/kg/天，例如至少0.05 mg/kg、至少0.08 mg/kg、至少0.1 mg/kg、至少0.2 mg/kg、至少0.3 mg/kg、至少0.4 mg/kg或至少0.5 mg/kg，並且較佳的是50 mg/kg或更少、40 mg/kg或更少、30 mg/kg或更少、20 mg/kg或更少或10 mg/kg或更少，例如，其可以是約2.5 mg/天（0.5 mg/kg x 5 kg）至約5000 mg/天（50 mg/kg x 100 kg）。例如，化合物的劑量可以是約0.1 mg/kg/天至約50 mg/kg/天、約0.05 mg/kg/天至約10 mg/kg/天、約0.05 mg/kg/天至約5 mg/kg/天、約0.05 mg/kg/天至約3 mg/kg/天、約0.07 mg/kg/天至約3 mg/kg/天、約0.09 mg/kg/天至約3 mg/kg/天、約0.05 mg/kg/天至約0.1 mg/kg/天、約0.1 mg/kg/天至約1 mg/kg/天、約1 mg/kg/天至約10 mg/kg/天、約1 mg/kg/天至約5 mg/kg/天、約1 mg/kg/天至約3 mg/kg/天、約1 mg/天至約1000 mg/天、約20 mg/天至約750 mg/天、約3 mg/天至約500 mg/天、約5 mg/天至約250 mg/天、約10 mg/天至約100 mg/天、約3 mg/天至約10 mg/天或約100 mg/天至約250 mg/天。此類劑量能以單一劑量來投與，或者可以將其分為多個劑量。

使用KRAS^{G12C}抑制劑之方法

【0162】 本揭露提供了抑制RAS介導的細胞傳訊之方法，該方法包括使細胞與有效量的一種或多種本文所揭露的化合物接觸。對RAS介導的訊息傳導的抑制可以藉由本領域已知的眾多種方式來評估和證實。非限制性實例包括顯示以下項：(a) RAS的GTP酶活性的降低；(b) GTP結合親和性的降低或GDP結合親和性的增加；(c) GTP的K解離的增加或GDP的K解離的減小；(d) RAS途徑中下游的傳訊轉導分子水平的降低，例如pMEK、pERK或pAKT水平的降低；和/或 (e) RAS複合物與下游傳訊分子（包括但不限於Raf)的結合的降低。可以利用套組和市售測定來確定上述項中的一種或多種。

【0163】 本揭露還提供了使用本揭露的化合物或藥物組成物治療疾病病症之方法，該等疾病病症包括但不限於受累於G12C KRAS、HRAS或NRAS突變的病症（例如，癌症）。

【0164】 在一些實施方式中，提供了治療癌症之方法，該方法包括向有需要的受試者投與有效量的任一種包含如本文所揭露的化合物的前述藥物組成物。在一些實施方式中，癌症係由KRAS、HRAS或NRAS G12C突變介導的。在各個實施方式中，癌症係胰臟癌、結直腸癌或肺癌。在一些實施方式中，癌症係膽囊癌、甲狀腺癌和膽管癌。

【0165】 在一些實施方式中，本揭露提供了治療有需要的受試者的障礙之方法，其中所述方法包括確定受試者是否具有KRAS、HRAS或NRAS G12C突變，以及如果確定受試者具有KRAS、HRAS或NRAS G12C突變，那麼向受試者投與治療有效劑量的至少一種如本文所揭露的化合物或其藥學上可接受的鹽。

【0166】 所揭露化合物抑制非錨定依賴性細胞生長，並且因此具有抑制腫瘤轉移的潛力。因此，本揭露的另一個實施方式提供了抑制腫瘤轉移之方法，該方法包括投與有效量的本文所揭露的化合物。

【0167】 還已經在血液惡性腫瘤（例如，影響血液、骨髓和/或淋巴結的癌症）中鑒別出KRAS、HRAS或NRAS G12C突變。因此，某些實施方式關於將所揭露化合物（例如，呈藥物組成物形式）投與需要治療血液惡性腫瘤的患者。此類惡性腫瘤包括但不限於白血病和淋巴瘤。例如，當前所揭露的化合物可以用於治療諸如以下等疾病：急性淋巴細胞性白血病（ALL）、急性髓性白血病（AML）、慢性淋巴球性白血病（CLL）、小淋巴細胞淋巴瘤（SLL）、慢性髓性白血病（CML）、急性單核細胞白血病（AMoL）和/或其他白血病。在其他實施方式中，該等化合物可用於治療淋巴瘤，例如所有亞型的何杰金氏淋巴瘤

或非何杰金氏淋巴瘤。在各個實施方式中，該等化合物可用於治療漿細胞惡性腫瘤，例如多發性骨髓瘤、外膜細胞淋巴瘤和華氏巨球蛋白血症。

【0168】 確定腫瘤或癌症是否包含G12C KRAS、HRAS或NRAS突變可以藉由評估編碼KRAS、HRAS或NRAS蛋白的核苷酸序列，藉由評估KRAS、HRAS或NRAS蛋白的胺基酸序列，或藉由評估推定的KRAS、HRAS或NRAS突變體蛋白的特徵來進行。野生型人類KRAS、HRAS或NRAS的序列係本領域已知的（例如，登錄號NP203524）。

【0169】 檢測KRAS、HRAS或NRAS核苷酸序列中的突變之方法係熟悉該項技術者已知的。該等方法包括但不限於聚合酶鏈式反應-限制性片段長度多態性（PCR-RFLP）測定、聚合酶鏈式反應-單鏈構象多態性（PCR-SSCP）測定、即時PCR測定、PCR定序、突變體等位基因特異性PCR擴增（MASA）測定、直接定序、引物延伸反應、電泳、寡核苷酸連接測定、雜交測定、TaqMan測定、SNP基因分型測定、高解析度熔解測定和微陣列分析。在一些實施方式中，藉由即時PCR針對G12C KRAS、HRAS或NRAS突變評估樣本。在即時PCR中，使用對KRAS、HRAS或NRAS G12C突變具特異性的螢光探針。在突變存在時，探針結合並檢測到螢光。在一些實施方式中，使用KRAS、HRAS或NRAS基因中的特定區域（例如，外顯子2和/或外顯子3）的直接定序方法來鑒別KRAS、HRAS或NRAS G12C突變。這種技術將鑒別所定序區域中所有可能的突變。

【0170】 檢測KRAS、HRAS或NRAS蛋白中的突變之方法係熟悉該項技術者已知的。該等方法包括但不限於使用對突變體蛋白具特異性的結合劑（例如，抗體）檢測KRAS、HRAS或NRAS突變體、蛋白質電泳和蛋白質印跡法、以及直接肽定序。

【0171】 確定腫瘤或癌症是否包含G12C KRAS、HRAS或NRAS突變之方法可以使用多種樣本。在一些實施方式中，樣本取自患有腫瘤或癌症的受試者。

在一些實施方式中，樣本係新鮮腫瘤/癌症樣本。在一些實施方式中，樣本係冷凍腫瘤/癌症樣本。在一些實施方式中，樣本係福馬林固定的石蠟包埋的樣本。在一些實施方式中，樣本係循環腫瘤細胞（CTC）樣本。在一些實施方式中，將樣本加工為細胞裂解物。在一些實施方式中，將樣本加工為DNA或RNA。

【0172】 本揭露還關於治療哺乳動物的過度增生障礙之方法，該方法包括向所述哺乳動物投與治療有效量的如本文所揭露的化合物或其藥學上可接受的鹽。在一些實施方式中，所述方法涉及治療患有癌症的受試者，該癌症係例如急性髓樣白血病、青少年癌症、兒童腎上腺皮質癌、AIDS相關癌症（例如，淋巴瘤和卡波西肉瘤）、肛門癌、闌尾癌、星形細胞瘤、非典型畸胎樣瘤、基底細胞癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、腦幹細胞神經膠質瘤、腦瘤、乳腺癌、支氣管腫瘤、柏基特淋巴瘤、類癌瘤、非典型畸胎樣瘤、胚胎瘤、胚細胞瘤、原發性淋巴瘤、子宮頸癌、兒童癌症、脊索瘤、心臟腫瘤、慢性淋巴球性白血病（CLL）、慢性髓性白血病（CML）、慢性骨髓增生性障礙、結腸癌、結直腸癌、顱咽管瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、肝外導管原位癌（DCIS）、胚胎瘤、CNS癌症、子宮內膜癌、室管膜瘤、食管癌、鼻腔神經膠質瘤、尤文肉瘤、顱外胚細胞瘤、性腺外胚細胞瘤、眼癌、骨纖維組織細胞瘤、膽囊癌、胃癌、胃腸類癌瘤、胃腸道間質瘤（GIST）、胚細胞瘤、妊娠滋養細胞瘤、毛細胞白血病、頭頸癌、心臟癌症、肝癌、何杰金氏淋巴瘤、下嘸癌、眼內黑色素瘤、胰島細胞瘤、胰腺神經內分泌腫瘤、腎癌、喉癌、嘴唇和口腔癌、肝癌、小葉原位癌（LCIS）、肺癌、淋巴瘤、轉移性伴隱匿性原發性鱗狀頸癌、中線癌、口腔癌、多發性內分泌瘤綜合症、多發性骨髓瘤/漿細胞腫瘤、蕈樣真菌病、骨髓增生異常綜合症、骨髓化生不良/骨髓增生腫瘤、多發性骨髓瘤、梅克爾細胞癌、惡性間皮瘤、骨惡性纖維組織細胞瘤和骨肉瘤、鼻腔和副鼻竇癌、鼻咽癌、神經母細胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤、非小細胞肺癌（NSCLC）、口癌、嘴唇和口腔癌、口咽癌、

卵巢癌、胰臟癌、乳頭瘤病、副神經節瘤、副鼻竇和鼻腔癌、副甲狀腺癌、陰莖癌、咽癌、胸膜肺母細胞瘤、原發性中樞神經系統（CNS）淋巴瘤、前列腺癌、直腸癌、移行細胞癌、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、涎腺癌、皮膚癌、胃（stomach/gastric）癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟組織肉瘤、T細胞淋巴瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲狀腺癌、腎盂和輸尿管移行細胞癌、滋養細胞瘤、兒童罕見癌症、尿道癌、子宮肉瘤、陰道癌、外陰癌或病毒誘發的癌症。在一些實施方式中，所述方法涉及治療非癌性過度增生障礙，例如皮膚的良性增生（例如，銀屑病）、再狹窄或前列腺（例如，良性前列腺肥大（BPH））。

【0173】 在一些實施方式中，治療方法涉及治療肺癌，該等方法包括向有此需要的受試者投與有效量的任一種上述化合物（或包含該化合物的藥物組成物）。在某些實施方式中，肺癌係非小細胞肺癌（NSCLC），例如腺癌、鱗狀細胞肺癌或大細胞肺癌。在一些實施方式中，肺癌係小細胞肺癌。可用所揭露化合物治療的其他肺癌包括但不限於腺瘤、類癌瘤和未分化癌。

【0174】 本揭露進一步提供了調節G12C突變體KRAS、HRAS或NRAS蛋白活性之方法，其藉由使該蛋白質與有效量的本揭露的化合物接觸來進行。調節可以是抑制或激活蛋白質活性。在一些實施方式中，本揭露提供了抑制蛋白質活性之方法，其藉由使G12C突變體KRAS、HRAS或NRAS蛋白與有效量的本揭露的化合物在溶液中接觸來進行。在一些實施方式中，本揭露提供了抑制G12C突變體KRAS、HRAS或NRAS蛋白活性之方法，其藉由接觸表現感興趣的蛋白質的細胞、組織或器官來進行。在一些實施方式中，本揭露提供了在包括但不限於齧齒動物和哺乳動物（例如，人類）的受試者中抑制蛋白質活性之方法，其藉由向該受試者投與有效量的本揭露的化合物來進行。在一些實施方式中，調節百分比超過25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些實施方式中，抑制百分比超過25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

【0175】 在一些實施方式中，本揭露提供了抑制細胞中的KRAS、HRAS或NRAS G12C活性之方法，其藉由使所述細胞與一定量的本揭露的化合物接觸來進行，該量足以抑制所述細胞中KRAS、HRAS或NRAS G12C的活性。在一些實施方式中，本揭露提供了抑制組織中的KRAS、HRAS或NRAS G12C活性之方法，其藉由使所述組織與一定量的本揭露的化合物接觸來進行，該量足以抑制所述組織中KRAS、HRAS或NRAS G12C的活性。在一些實施方式中，本揭露提供了抑制生物體中的KRAS、HRAS或NRAS G12C活性之方法，其藉由使所述生物體與一定量的本揭露的化合物接觸來進行，該量足以抑制所述生物體中KRAS、HRAS或NRAS G12C的活性。在一些實施方式中，本揭露提供了抑制動物中的KRAS、HRAS或NRAS G12C活性之方法，其藉由使所述動物與一定量的本揭露的化合物接觸來進行，該量足以抑制所述動物中KRAS、HRAS或NRAS G12C的活性。在一些實施方式中，本揭露提供了抑制哺乳動物中的KRAS、HRAS或NRAS G12C活性之方法，其藉由使所述哺乳動物與一定量的本揭露的化合物接觸來進行，該量足以抑制所述哺乳動物中KRAS、HRAS或NRAS G12C的活性。在一些實施方式中，本揭露提供了抑制人類中的KRAS、HRAS或NRAS G12C活性之方法，其藉由使所述人類與一定量的本揭露的化合物接觸來進行，該量足以抑制所述人類中KRAS、HRAS或NRAS G12C的活性。本揭露提供了治療需要這種治療的受試者的由KRAS、HRAS或NRAS G12C活性介導的疾病之方法。

組合療法

【0176】 本揭露還提供了用於組合療法之方法，其中將已知可調節其他途徑或相同途徑的其他組分的藥劑，或甚至靶標酶的重疊組與本揭露的化合物或其藥學上可接受的鹽組合使用。在一方面，這種療法包括但不限於本揭露的一種或多種化合物與化學治療劑、治療性抗體和輻射治療的組合，以提供協同或累加的治療效果。

【0177】 許多化學治療劑目前係本領域已知的，並且可以與本揭露的化合物組合使用。本揭露的化合物或藥物組成物可以與至少一種或多種化學治療劑組合使用。在一些實施方式中，化學治療劑選自由以下組成的組：有絲分裂抑制劑、烷基化劑、抗代謝藥、嵌入抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酶、拓撲異構酶抑制劑、生物反應修飾劑、抗激素藥、血管發生抑制劑和抗雄激素。非限制性實例係化學治療劑、細胞毒性劑和非肽小分子，例如Gleevec®（甲磺酸伊馬替尼）、Kyprolis®（卡非佐米（carfilzomib））、Velcade®（硼替佐米）、Casodex（比卡魯胺）、Iressa®（吉非替尼）、Venclexta™（維納妥拉）和Adriamycin™（多柔比星）以及多種化學治療劑。化學治療劑的非限制性實例包括烷基化劑，例如噻替派和環磷醯胺（Cytoxan™）；烷基磺酸酯，例如白消安、英丙舒凡（improsulfan）和哌泊舒凡（piposulfan）；氮丙啶，例如苯佐替哌（benzodopa）、卡波醌、美妥替哌（meturedopa）和烏瑞替哌（uredopa）；乙烯亞胺和甲基蜜胺（methylamelamine），包括六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺（triethylenethiophosphaoramide）和三羥甲基蜜胺（trimethylolomelamine）；氮芥，例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯環磷醯胺、雌氮芥、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、鹽酸甲氧氮芥（mechlorethamine oxide hydrochloride）、美法侖、新恩比興（novembichin）、苯芥膽甾醇（phenesterine）、潑尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥；亞硝基脲，例如卡莫司汀、氯脲黴素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；抗生素，例如阿克拉黴素（aclacinomysin）、放線菌素（actinomycin）、安麴黴素（authramycin）、重氮絲胺酸、博來黴素、放線菌素（cactinomycin）、卡奇黴素（calicheamicin）、卡柔比星(carabicin）、洋紅黴素、嗜癌菌素（carzinophilin）、Casodex™、色黴素、更生黴素、道諾黴素、地托比星、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊達比星、麻西羅黴素（marcellomycin）、絲裂黴

素、黴酚酸、諾加黴素、橄欖黴素、培洛黴素、泊非黴素（potfiromycin）、嘌呤黴素、三鐵阿黴素（quelamycin）、羅多比星、鏈黑菌素、鏈脲黴素、殺結核菌素、烏苯美司、淨司他丁、佐柔比星；抗代謝藥，例如胺甲喋呤和5-氟尿嘧啶（5-FU）；葉酸類似物，例如二甲葉酸（denopterin）、胺甲喋呤、蝶羅呤、三甲曲沙；嘌呤類似物，例如氟達拉濱、6-巰嘌呤、硫咪嘌呤、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，例如安西他濱（azacitidine）、阿紮胞苷、6-氮雜尿苷、卡莫氟（carmofur）、阿糖胞苷、二去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱、氟尿苷，雄激素例如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯（dromostanolone propionate）、環硫雄醇、美雄烷、睾內酯；抗腎上腺藥，例如胺魯米特、米托坦、曲洛司坦；葉酸補充劑，例如亞葉酸（frolinic acid）；醋葡醛內酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；安吖啶；倍曲布西（bestrabucil）；比生群；依達曲沙（edatraxate）；地磷醯胺（defofamine）；秋水仙胺；地吖醌（diaziquone）；依氟鳥胺酸（elfomithine）；依利醋銨；依託格魯；硝酸鎵；羥基脲；香菇多糖；氯尼達明；米托胍腙（mitoguazone）；米托蒽醌；莫哌達醇；硝胺丙吖啶（nitracrine）；噴司他丁；蛋胺氮芥（phenamet）；吡柔比星；鬼臼酸（podophyllinic acid）；2-乙基醯肼；丙卡巴肼；PSK；丙亞胺；西佐喃；鍺螺胺；細交鏈孢菌酮酸；三亞胺醌；2,2',2"-三氯三乙胺；烏拉坦（urethan）；長春地辛；達卡巴啉；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；哌泊溴烷；加賽特辛（gacytosine）；阿拉伯糖苷（「Ara-C」）；環磷醯胺；噻替派；紫杉烷，例如紫杉酚和多西他賽；視黃酸；埃斯波黴素（esperamicin）；卡培他濱；以及上述任何一種的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。

【0178】 作為適合的化學治療性細胞調理劑還包括用於調節或抑制激素對腫瘤的作用的抗激素劑，例如抗雌激素藥，包括例如他莫昔芬（Nolvadex™）、雷洛昔芬、芳香酶抑制性4(5)-咪唑、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬、可莫昔芬（keoxifene）、LY 117018、奧那司酮和托瑞米芬（法樂通）；和抗雄激素藥，

例如氟他胺、尼魯米特、比卡魯胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；苯丁酸氮芥；吉西他濱；6-硫鳥嘌呤；巯嘌呤；胺甲喋呤；鉑類似物，例如順鉑和卡鉑；長春鹼；鉑；依託泊苷（VP-16）；異環磷醯胺；絲裂黴素C；米托蒽醌；長春新鹼；長春瑞濱；諾維本；諾安托（novantrone）；替尼泊苷；道諾黴素；胺基蝶呤；希羅達（xeloda）；伊班膦酸鹽；喜樹鹼-11（CPT-11）；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸（DMFO）。

【0179】 如果需要，本揭露的化合物或藥物組成物可以與通常開具的抗癌藥物組合使用，例如Herceptin®、Avastin®、Erbitux®、Rituxan®、Taxol®、Arimidex®、Taxotere®、ABVD、阿維金（AVICINE）、阿巴伏單抗（Abagovomab）、吖啶羧醯胺（Acridine carboxamide）、阿德木單抗（Adecatumumab）、17-N-烯丙基胺基-17-去甲氧基格爾德黴素、阿法雷丁（Alpharadin）、阿瓦昔地（Alvocidib）、3-胺基吡啶-2-甲醛胺基硫脲、胺萘非特（Amonafide）、蒽二酮（Anthracenedione）、抗CD22免疫毒素、抗腫瘤藥、抗腫瘤發生草藥（Antitumorigenic herbs）、阿帕茲醌（Apaziquone）、阿替莫德（Atiprimod）、硫唑嘌呤（Azathioprine）、貝洛替康（Belotecan）、苯達莫司汀（Bendamustine）、BIBW 2992、比立考達（Biricodar）、伯斯塔利辛（Brostallicin）、苔蘚抑素（Bryostatin）、丁硫胺酸亞碸胺（Buthionine sulfoximine）、CBV（化學療法）、花萼海綿誘癌素（Calyculin）、細胞週期非特異性抗腫瘤劑、二氯乙酸、圓皮海綿內酯（Discodermolide）、依沙蘆星（Elsamitrucin）、依諾他濱（Enocitabine）、埃博黴素（Epothilone）、艾日布林（Eribulin）、依維莫司（Everolimus）、依沙替康（Exatecan）、依昔舒林（Exisulind）、鐵銹醇（Ferruginol）、氟羅德辛（Forodesine）、磷雌酚（Fosfestrol）、ICE化學治療方案、IT-101、伊美克（Imexon）、咪喹莫特（Imiquimod）、吲哚并咔唑（Indolocarbazole）、伊羅夫文（Irofulven）、拉尼喹達（Laniquidar）、拉洛他賽（Larotaxel）、來那度胺（Lenalidomide）、

硫蒽酮（Lucanthone）、勒托替康（Lurtotecan）、馬磷醯胺（Mafosfamide）、米托唑胺（Mitozolomide）、萘福昔定（Nafoxidine）、奈達鉑（Nedaplatin）、奧拉帕尼（Olaparib）、沃塔紫杉醇（Ortataxel）、PAC-1、木瓜（Pawpaw）、匹杉瓊（Pixantrone）、蛋白酶體抑制劑、蝴蝶黴素（Rebeccamycin）、瑞喹莫德（Resiquimod）、魯比特康（Rubitecan）、SN-38、鹽孢菌醯胺A（Salinosporamide A）、沙帕他濱（Sapacitabine）、斯坦福V（Stanford V）、苦馬豆素（Swainsonine）、他拉泊芬（Talaporfin）、塔利喹達（Tariquidar）、優福定（Tegafur-uracil）、特莫多（Temodar）、替司他賽（Tesetaxel）、四硝酸三鉑（Triplatin tetranitrate）、三(2-氯乙基)胺、曲沙他濱（Troxacitabine）、烏拉莫司汀（Uramustine）、瓦帝莫澤（Vadimezan）、長春氟寧（Vinflunine）、ZD6126或唑喹達（Zosuquidar）。

【0180】 本揭露進一步關於使用本文所提供的化合物或藥物組成物與放射療法的組合在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療過度增生障礙之方法。投與放射療法的技術係本領域已知的，並且該等技術可以用於本文所述的組合療法中。這種組合療法中本揭露的化合物的投與可以如本文所述來確定。

【0181】 放射療法可以藉由若干種方法之一或方法的組合來投與，包括但不限於外射束療法、內放射療法、植入物放射、立體定位性放射外科手術、全身放射療法、放射療法和永久性或臨時性間質近距離放射療法。如本文所用，術語「近距離放射療法」係指藉由空間受限的放射性材料遞送的放射療法，該放射性材料係在腫瘤或其他增生性組織患病位點處或附近插入體內的。該術語意圖不受限制地包括暴露於放射性同位素（例如，At-211、I-131、I-125、Y-90、Re-186、Re-188、Sm-153、Bi-212、P-32和Lu的放射性同位素）。用作本揭露的細胞調理劑的適合的放射源包括固體和液體。藉由非限制性實例，放射源可以是放射性核素，例如作為固體來源的I-125、I-131、Yb-169、Ir-192，作為固體來源的I-125，或發射光子、β粒子、γ輻射或其他治療性射線的其他放射性核素。

放射性材料還可以是從一種或多種放射性核素的任何溶液（例如，I-125或I-131的溶液）製備的流體，或者放射性流體可以使用含有固體放射性核素（例如Au-198、Y-90）的小顆粒的適合的流體的漿液產生。此外，可以將一種或多種放射性核素包埋於凝膠或放射性微球中。

【0182】 本揭露的化合物或藥物組成物可以與一定量的一種或多種選自以下的物質組合使用：化學治療劑、抗血管發生劑、訊息傳導抑制劑、抗增殖劑、糖酵解抑制劑或自體吞噬抑制劑。

【0183】 抗血管發生劑可以結合本揭露的化合物和本文所述的藥物組成物使用，該等抗血管發生劑係例如MMP-2（基質金屬蛋白酶2）抑制劑、MMP-9（基質金屬蛋白酶9）抑制劑和COX-11（環氧酶11）抑制劑。抗血管發生劑包括例如雷帕黴素、替西羅莫司（temsirolimus，CCI-779）、依維莫司（RAD001）、索拉非尼、舒尼替尼和貝伐單抗。有用COX-II抑制劑的實例包括阿來昔布（alecoxib）、伐地昔布和羅非昔布。有用基質金屬蛋白酶抑制劑的實例描述於以下專利中：WO 96/33172、WO 96/27583、歐洲專利公開案EP0818442、歐洲專利公開案EP1004578、WO 98/07697、WO 98/03516、WO 98/34918、WO 98/34915、WO 98/33768、WO 98/30566、歐洲專利公開案606046、歐洲專利公開案931 788、WO 90/05719、WO 99/52910、WO 99/52889、WO 99/29667、WO 1999007675、歐洲專利公開案EP1786785、歐洲專利公開案號EP 1181017、美國公開案US 20090012085、美國公開案US 5863 949、美國公開案US 5861 510和歐洲專利公開案EP 0780386，將所有該等專利藉由引用以其整體併入本文。較佳的MMP-2和MMP-9抑制劑係具有極小或無抑制MMP-1的活性的那些。更較佳的是相對於其他基質金屬蛋白酶（即，MAP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12和MMP-13）選擇性抑制MMP-2

和/或AMP-9的那些。可用於本揭露中的MMP抑制劑的一些具體實例係AG-3340、RO 32-3555和RS 13-0830。

【0184】 本發明化合物還可以用於與其他抗瘤劑的共同療法中，該等其他抗瘤劑係例如醋孟南（acemannan）、阿柔比星、阿地介白素、阿侖單抗（alemtuzumab）、阿利維A酸（alitretinoin）、六甲蜜胺、胺磷汀、胺基乙醯丙酸、胺柔比星、安吖啶、阿那格雷、阿那曲唑、ANCER、安西司亭（ancestim）、阿加來必（ARGLABIN）、三氧化二砷、BAM 002（諾夫洛斯公司（Novelos））、貝沙羅汀（bexarotene）、比卡魯胺、溴尿苷、卡培他濱、西莫介白素、西曲瑞克、克拉屈濱、克黴唑、阿糖胞苷十八烷基磷酸鹽（cytarabine ocfosfate）、DA 3030（Dong-A）、達克珠單抗（daclizumab）、地尼介白素（denileukin diftitox）、地洛瑞林（deslorelin）、右雷佐生、地拉卓（dilazep）、多西他賽、二十二醇、度骨化醇（doxercalciferol）、去氧氟尿苷、多柔比星、溴隱亭、卡莫司汀、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、HIT雙氯酚酸、干擾素-α、道諾黴素、多柔比星、維甲酸、依地福新、依決洛單抗、依氟鳥胺酸（eflornithine）、乙嘧替氟、表柔比星、紅血球生成素β、磷酸依託泊苷、依西美坦、依昔舒林（exisulind）、法倔唑、非格司亭（filgrastim）、非那雄胺、磷酸氟達拉濱、福美司坦（formestane）、福莫司汀、硝酸鎵、吉西他濱、吉妥珠單抗奧唑米星（gemtuzumab zogamicin）、吉美拉西（gimeracil）/奧替拉西（oteracil）/替加氟組合、格萊克濱（glycopine）、戈舍瑞林、庚鉑（heptaplatin）、人絨毛膜促性腺素、人類胎兒甲胎蛋白、伊班膦酸、伊達比星、咪喹莫特、干擾素-α、干擾素-α、天然干擾素-α-2、干擾素-α-2a、干擾素-α-2b、干擾素-α-N1、干擾素-α-n3、干擾素alfacon-1、干擾素α、天然干擾素β、干擾素β-1a、干擾素β-1b、干擾素γ、天然干擾素γ-1a、干擾素γ-1b、介白素-1β、碘苄胍、伊立替康、伊索拉定（irsogladine）、蘭瑞肽（lanreotide）、LC 9018（養樂多集團（Yakult））、來氟米特、來格司亭（lenograstim）、硫

酸香菇多糖、來曲唑、白血球α干擾素、亮丙瑞林、左旋咪唑+氟尿嘧啶、利阿唑（liarozole）、洛鉑、氯尼達明、洛伐他汀、馬索羅酚、美拉胂醇、甲氧氯普胺、米非司酮、米替福新、米立司亭、錯配雙鏈RNA、米托胍腙、二溴衛矛醇、米托蒽醌、莫拉司亭（molgramostim）、那法瑞林、納洛酮+噴他佐辛、那托司亭（nartograstim）、奈達鉑、尼魯米特（nilutamide）、那可丁、新穎紅血球生成刺激蛋白、NSC 631570奧曲肽、奧普瑞介白素（oprelvekin）、奧沙特隆、奧沙利鉑（oxaliplatin）、紫杉酚、帕米膦酸（pamidronic acid）、培門冬酶、聚乙二醇干擾素-α-2b、木聚硫鈉（pentosan polysulfate sodium）、噴司他丁、畢西巴尼（picibanil）、吡柔比星、兔抗胸腺細胞多株抗體、聚乙二醇干擾素-α-2a、卟吩姆鈉、雷洛昔芬、雷替曲塞、拉斯伯門特（rasburiembodiment）、羥乙膦酸銖（Re 186）、RII維甲醯酚胺（RII retinamide）、利妥昔單抗、羅莫肽、來昔決南釤（153 Sm）（samarium (153 Sm) lexidronam）、沙格司亭（sargramostim）、西佐喃、索布佐生、索納明（sonermin）、氯化鍶-89、蘇拉明、他索那明（tasonermin）、他紮羅汀、替加氟、替莫泊芬（temoporfin）、替莫唑胺、替尼泊苷、四氯十氧化物、沙利度胺、胸腺法新、促甲狀腺素α、托泊替康（topotecan）、托瑞米芬、托西莫單抗（tositumomab）-碘131、曲妥珠單抗、曲奧舒凡、維甲酸、曲洛司坦、三甲曲沙、曲普瑞林、腫瘤壞死因子α、天然烏苯美司、膀胱癌疫苗、丸山（Maruyama）疫苗、黑色素瘤裂解物疫苗、戊柔比星（valrubicin）、維替泊芬、長春瑞濱、維魯利秦（VIRULIZIN）、淨司他丁斯酯（zinostatin stimalamer）或唑來膦酸；阿巴瑞克（abarelix）；AE 941（依特納公司（Aeterna））、胺莫司汀（ambamustine）、反義寡核苷酸、bcl-2（珍塔公司（Genta））、APC 8015（丹德里昂公司（Dendreon））、西妥昔單抗、地西他濱（decitabine）、德胺魯米特（dexaminoglutethimide）、地吖醌、EL 532（義隆公司（Elan））、EM 800（英杜裡奇公司（Endorecherche））、恩尿嘧啶、依他硝唑、芬維A銨

（fenretinide）、非格司亭SD01（安進公司（Amgen））、氟維司群、加洛他濱、胃泌素17免疫原、HLA-B7基因療法（偉科公司（Vical））、粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子、組胺二鹽酸鹽、替伊莫單抗、伊洛馬司他、IM 862（興創公司（Cytran））、介白素-2、艾潑昔芬（iproxifene）、LDI 200（米克豪公司（Milkhaus））、來立司亭（leridistim）、林妥珠單抗（lintuzumab）、CA 125 MAb（巴米拉公司（Biomira））、癌症MAb（日本製藥發展公司（Japan Pharmaceutical Development））、HER-2和Fc MAb（梅達拉公司（Medarex））、獨特型105AD7 MAb（CRC技術公司（CRC Technology））、獨特型CEA MAb（特裡萊公司（Trilex））、LYM-1-碘131 MAb（特尼殖株公司（Techniclone））、多態性上皮黏液素-釔90 MAb（安特索瑪公司（Antisoma））、馬立馬司他（marimastat）、美諾立爾、米妥莫單抗（mitumomab）、莫特沙芬釓（motexafin gadolinium）、MX 6（高德美公司（Galderma））、奈拉濱（nelarabine）、諾拉曲塞（nolatrexed）、P 30蛋白、培維索孟（pegvisomant）、培美曲塞、泊非黴素（porfiromycin）、普馬司他（prinomastat）、RL 0903（夏爾公司（Shire））、魯吡替康、沙鉑（satraplatin）、苯乙酸鈉、斯帕磷酸（sparfosic acid）、SRL 172（SR製藥公司（SR Pharma））、SU 5416（蘇根公司（SUGEN））、TA 077（田邊公司（Tanabe））、四硫鉬酸鹽、厚果糖松草鹼（thaliblastine）、血小板生成素、本紫紅素乙酯錫（tin ethyl etiopurpurin）、替拉紮明、癌症疫苗（巴米拉公司）、黑色素瘤疫苗（紐約大學（New York University））、黑色素瘤疫苗（斯隆-凱特琳研究所（Sloan Kettering Institute））、黑色素瘤腫瘤裂解物疫苗（紐約醫學院（New York Medical College））、病毒黑色素瘤細胞裂解物疫苗（皇家紐卡斯爾醫院（Royal Newcastle Hospital））或伐司朴達（valspodar）。

【0185】 本發明的化合物可以進一步與VEGFR抑制劑一起使用。以下專利和專利申請案中所述的其他化合物可以用於組合療法中：US 6,258,812、US

2003/0105091、WO 01/37820、US 6,235,764、WO 01/32651、US 6,630,500、US 6,515,004、US 6,713,485、US 5,521,184、US 5,770,599、US 5,747,498、WO 02/68406、WO 02/66470、WO 02/55501、WO 04/05279、WO 04/07481、WO 04/07458、WO 04/09784、WO 02/59110、WO 99/45009、WO 00/59509、WO 99/61422、US 5,990,141、WO 00/12089和WO 00/02871。

【0186】 在一些實施方式中，該組合包含本發明的組成物與至少一種抗血管發生劑的組合。藥劑包括但不限於在體外以合成方式製備的化學組成物、抗體、抗原結合區、放射性核素及其組合和綴合物。藥劑可以是激動劑、拮抗劑、變構調節劑、毒素，或者更通常地，可以用於抑制或刺激其靶標（例如，受體或酶激活或抑制），並且由此促進細胞死亡或阻止細胞生長。

【0187】 總而言之，抗體形成稱為免疫球蛋白的血漿蛋白的家族，並且由免疫球蛋白結構域組成。（Janeway等人, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease [免疫生物學：健康與疾病的免疫系統], 第4版，愛思唯爾科學有限公司（Elsevier Science Ltd.）/加蘭出版社（Garland Publishing）, 1999。如本文所用，術語「抗體」係指具有常規免疫球蛋白形式、包含重鏈及輕鏈且包含可變區及恒定區的蛋白質。例如，抗體可以是IgG，其係兩對相同多肽鏈的「Y形」結構，每對具有一條「輕」鏈（典型地具有約25 kDa的分子量）和一條「重」鏈（通常具有約50-70 kDa的分子量）。抗體具有可變區和恒定區。在IgG形式中，可變區通常為約100-110或更多個胺基酸，包含三個互補決定區（CDR），主要負責抗原識別，並且與結合不同抗原的其他抗體差異很大。恒定區允許抗體募集免疫系統的細胞和分子。可變區由每條輕鏈和重鏈的N末端區域構成，而恒定區由每條重鏈和輕鏈的C末端部分構成。（Janeway等人,「Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes」[抗體分子和免疫球蛋白基因的結構], Immunobiology: The Immune System in Health and Disease [免疫生物學：健康與

疾病的免疫系統], 第4版. 愛思唯爾科學有限公司（Elsevier Science Ltd.）/加蘭出版社（Garland Publishing）,（1999））。

【0188】 本領域已經描述了抗體CDR的一般結構和特性。簡而言之，在抗體支架中，CDR嵌埋於重鏈及輕鏈可變區中的框架內，其中，其構成主要負責抗原結合及識別的區域。可變區通常包含至少三個重鏈CDR或三個輕鏈CDR（Kabat等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫相關蛋白質序列], Public Health Service [公共衛生署] N.I.H., 貝塞斯達, 馬里蘭州；還參見Chothia和Lesk, 1987, J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 196:901-917；Chothia等人, 1989, Nature [自然] 342: 877-883），位於框架區內（由Kabat等人, 1991指定框架區1-4、FR1、FR2、FR3、和FR4；還參見Chothia和Lesk, 1987, 同上）。

【0189】 抗體可以包含本領域已知的任何恒定區。人類輕鏈分類為κ輕鏈及λ輕鏈。重鏈分類為μ、δ、γ、α或ε，並且將抗體的同種型分別定義為IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有若干個亞類，包括但不限於IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有亞類，包括但不限於IgM1和IgM2。本揭露的實施方式包括所有這種抗體類別或同種型。輕鏈恒定區可為例如κ型或λ型輕鏈恒定區，例如人類κ型或λ型輕鏈恒定區。重鏈恒定區可為例如α型、δ型、ε型、γ型或μ型重鏈恒定區，例如人類α型、δ型、ε型、γ型或μ型重鏈恒定區。因此，在示例性實施方式中，該抗體為同種型IgA、IgD、IgE、IgG或IgM的抗體，包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的任一種。

【0190】 抗體可以是單株抗體或多株抗體。在一些實施方式中，抗體包含與由哺乳動物（例如，小鼠、兔、山羊、馬、雞、倉鼠、人等）產生的天然存在的抗體基本上相似的序列。在這方面，抗體可以被認為係哺乳動物抗體，例如小鼠抗體、兔抗體、山羊抗體、馬抗體、雞抗體、倉鼠抗體、人抗體等。在某些方面，抗體係人抗體。在某些方面，抗體係嵌合抗體或人源化抗體。術語

「嵌合抗體」係指含有來自兩種或更多種不同抗體的結構域的抗體。嵌合抗體可以例如含有來自一個物種的恒定結構域，和來自第二物種的可變結構域，或更一般地，可以含有來自至少兩個物種的胺基酸序列的區段。嵌合抗體還可以含有同一物種內的兩種或更多種不同抗體的結構域。術語「人源化」在關於抗體使用時係指至少具有來自經工程改造以具有比原始來源抗體更類似於真人類抗體的結構和免疫學功能的非人類來源CDR區的抗體。例如，人源化可涉及將來自非人類抗體（例如小鼠抗體）的CDR接枝到人類抗體中。人源化還可以涉及所選擇的胺基酸取代以使非人序列更類似於人序列。

【0191】 抗體可以藉由酶（例如像木瓜蛋白酶和胃蛋白酶）切割成片段。木瓜蛋白酶切割抗體以產生兩個Fab片段和單個Fc片段。胃蛋白酶裂解抗體從而產生F(ab')2片段和pFc'片段。如本文所用，術語「抗原結合抗體片段」係指能夠結合抗體的抗原，並且也被稱為「抗原結合片段」或「抗原結合部分」的抗體分子的一部分。在示例性實例中，抗原結合抗體片段係Fab片段或F(ab')2片段。

【0192】 抗體架構已經被用於產生越來越多的替代形式，其跨越至少約12–150 kDa的分子量範圍和具有從單體（n = 1）、二聚體（n = 2）和三聚體（n = 3）到四聚體（n = 4）並且可能更高的化合價（n）範圍；此類替代形式在本文中稱為「抗體蛋白質產物」。抗體蛋白產物包括基於完整抗體結構的那些和模擬保留完整抗原結合能力的抗體片段的那些，例如scFv、Fab和VHH/VH（以下討論的）。保留其完整抗原結合位點的最小抗原結合抗體片段為Fv片段，其完全由可變（V）區組成。使用可溶性柔性胺基酸肽連接子（linker）將V區連接至scFv片段（可變單鏈片段）以使該分子穩定，或將恒定（C）結構域添加至V區以產生Fab片段[抗原結合片段]。scFv和Fab片段可以容易地在宿主細胞中產生，例如原核宿主細胞。其他抗體蛋白產物包括經二硫鍵穩定的scFv（ds-scFv）、單鏈Fab（scFab）以及二聚及多聚抗體形式，如雙功能抗體、三功能抗體和四功

能抗體，或包含由與寡聚結構域連接的scFv組成的不同形式的迷你抗體（miniAb）。最小的片段係駱駝科重鏈Ab的VHH/VH以及單結構域Ab（sdAb）。最常用於建造新穎抗體形式的構件為單鏈可變(V)結構域抗體片段（scFv），其包含由具有約15個胺基酸殘基的肽連接子連接的來自重鏈和輕鏈的V結構域（VH結構域和VL結構域）。肽體（peptibody）或肽-Fc融合體係另一種抗體蛋白產物。肽體的結構由接枝到Fc結構域上的生物活性肽組成。此項技術中已充分描述了肽抗體。參見，例如，Shimamoto等人., mAbs 4(5): 586-591 (2012)。

【0193】 其他抗體蛋白產物包括單鏈抗體（SCA）、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、雙特異性或三特異性抗體等。雙特異性抗體可分成五個主要類別：BsIgG、附加IgG、BsAb片段、雙特異性融合蛋白以及BsAb綴合物。參見，例如，Spiess等人, Molecular Immunology[分子免疫學] 67(2)部分A: 97/-106（2015）。

【0194】 示例性抗血管發生劑包括ERBITUX™（IMC-C225）、KDR（激酶結構域受體）抑制劑（例如，特異性結合至激酶結構域受體的抗體和抗原結合區）、抗VEGF劑（例如，特異性結合VEGF的抗體或抗原結合區、或可溶VEGF受體或其配位基結合區）（例如AVASTIN™或VEGF-TRAP™）和抗VEGF受體劑（例如，與其特異性結合的抗體或抗原結合區）、EGFR抑制劑（例如，與其特異性結合的抗體或抗原結合區）（例如維克替比（Vectibix））帕尼單抗）、IRESSA™（吉非替尼）、TARCEVA™（厄洛替尼）、抗Ang1劑和抗Ang2劑（例如，與其或與其受體（例如Tie2/Tek）特異性結合的抗體或抗原結合區）以及抗Tie2激酶抑制劑（例如，與其特異性結合的抗體或抗原結合區）。本發明的藥物組成物還可以包含一種或多種特異性結合生長因子並抑制生長因子的活性的藥劑（例如，抗體、抗原結合區或可溶受體），例如肝細胞生長因子（HGF，還

稱為散射因子）的拮抗劑、以及特異性結合其受體「c-met」的抗體或抗原結合區。

【0195】 其他抗血管發生劑包括坎帕斯（Campath）、IL-8、B-FGF、Tek拮抗劑（Ceretti等人, 美國公開案號2003/0162712；美國專利案號6,413,932）、抗TWEAK劑（例如，特異性結合抗體或抗原結合區，或可溶TWEAK受體拮抗劑；參見Wiley，美國專利案號6,727,225）、用於拮抗整聯蛋白與其配位基的結合的ADAM去整合素結構域（Fanslow等人, 美國公開案號2002/0042368）、特異性結合抗eph受體和/或抗蝶素（ephrin）抗體或抗原結合區（美國專利案號5,981,245；5,728,813；5,969,110；6,596,852；6,232,447；6,057,124和其專利族成員）和抗PDGF-BB拮抗劑（例如，特異性結合抗體或抗原結合區）以及特異性結合PDGF-BB配位基的抗體或抗原結合區和PDGFR激酶抑制劑（例如，與其特異性結合的抗體或抗原結合區）。

【0196】 其他抗血管發生/抗腫瘤劑包括：SD-7784（美國輝瑞公司（Pfizer））；西侖吉肽（cilengitide）（德國默克集團（Merck KGaA），EPO 770622）；哌加他尼八鈉（pegaptanib octasodium）（美國吉利德科學公司（Gilead Sciences））；阿耳法他汀（Alphastatin）（英國百克塔公司（BioActa））；M-PGA（美國賽爾基因公司（Celgene），US 5712291）；伊洛馬司他（美國愛瑞發公司（Arriva），US 5892112）；艾瑪夏尼（emaxanib）（美國輝瑞公司，US 5792783）；瓦他拉尼（vatalanib）（瑞士諾華製藥公司（Novartis））；2-甲氧基雌二醇（美國安翠梅德公司（EntreMed））；TLC ELL-12（愛爾蘭義隆公司）；乙酸阿奈可他（anecortave acetate）（美國愛爾康公司（Alcon））；α-D148 Mab（美商安進公司）；CEP-7055（美國瑟法隆公司（Cephalon））；抗Vn Mab（荷蘭克魯賽爾公司（Crucell））；DAC:抗血管發生劑（加拿大康久化學公司（ConjuChem））；安吉西丁（Angiocidin）（美國英可因製藥公司（InKine

Pharmaceutical））；KM-2550（日本協和發酵工業株式會社（Kyowa Hakko））；SU-0879（美國輝瑞公司）；CGP-79787（瑞士諾華製藥公司，EP 970070）；ARGENT技術（美國阿瑞雅德公司（Ariad））；YIGSR-Stealth（美國強生公司（Johnson & Johnson））；纖維蛋白原-E片段（英國百克塔公司）；血管發生抑制劑（英國三傑公司（Trigen））；TBC-1635（美國恩賽斯夫製藥公司（Encysive Pharmaceuticals））；SC-236（美國輝瑞公司）；ABT-567（美國雅培公司（Abbott））；轉移抑制素（Metastatin）（美國安翠梅德公司）；血管發生抑制劑（瑞典瑞派公司（Tripep））；乳腺絲抑蛋白（maspin）（日本創成公司（Sosei））；2-甲氧基雌二醇（美國腫瘤學公司（Oncology Sciences Corporation））；ER-68203-00（美國愛華克斯公司（IVAX））；氟草胺（美國萊恩實驗室公司（Lane Labs））；Tz-93（日本津村株式會社（Tsumura））；TAN-1120（日本武田株式會社（Takeda））；FR-111142（日本藤澤株式會社（Fujisawa），JP 02233610）；血小板因子4（美國瑞普利金公司（RepliGen），EP 407122）；血管內皮生長因子拮抗劑（丹麥波倫公司（Borean））；貝伐單抗（pINN）（美國基因泰克公司（Genentech））；血管發生抑制劑（美國蘇根公司）；XL 784（美國伊克塞利克斯公司（Exelixis））；XL 647（美國伊克塞利克斯公司）；第二代MAb α5β3整聯蛋白（美國應用分子進化基金會（Applied Molecular Evolution）和美國英商梅迪繆思有限公司（MedImmune））；視網膜病變的基因療法（英國牛津生物醫藥公司（Oxford BioMedica））；鹽酸恩紮妥林（enzastaurin hydrochloride）（USAN）（美國禮來公司（Lilly））；CEP 7055（美國瑟法隆公司和法國賽諾菲聖德拉堡集團（Sanofi-Synthelabo））；BC 1（義大利熱那亞癌症研究所（Genoa Institute of Cancer Research））；血管發生抑制劑（澳大利亞沃奇米亞公司（Alchemia））；VEGF拮抗劑（美國再生元公司（Regeneron））；rBPI 21和BPI衍生的抗血管發生劑（美國逍馬公司（XOMA））；PI 88（澳大利亞普健公

司（Progen））；西侖吉肽（pINN）（德國默克集團；德國慕尼克技術大學（Munich Technical University），美國斯克裡普斯診所和研究基金會（Scripps Clinic and Research Foundation））；西妥昔單抗（INN）（法國安萬特公司（Aventis））；AVE 8062（日本味之素公司（Ajinomoto））；AS 1404（紐西蘭癌症研究實驗室（Cancer Research Laboratory））；SG 292（美國泰利奧斯公司（Telios））；內皮抑素（美國波士頓兒童醫院（Boston Childrens Hospital））；ATN 161（美國阿特紐公司（Attenuon））；血管抑素（美國波士頓兒童醫院）；2-甲氧基雌二醇（美國波士頓兒童醫院）；ZD 6474（英國阿斯利康公司（AstraZeneca））；ZD 6126（英國安吉奧金尼製藥公司（Angiogene Pharmaceuticals））；PPI 2458（美國普雷西斯公司（Praecis））；AZD 9935（英國阿斯利康公司）；AZD 2171（英國阿斯利康公司）；瓦他拉尼（pINN）（瑞士諾華製藥公司和德國先靈公司（Schering AG））；組織因子途徑抑制劑（美國安翠梅德公司）；哌加他尼（Pinn）（美國吉利德科學公司）；束骨薑黃醇（xanthorrhizol）（韓國延世大學（Yonsei University））；基於基因的VEGF-2疫苗（美國斯克裡普斯診所和研究基金會）；SPV5.2（加拿大薩普泰克公司（Supratek））；SDX 103（美國聖地牙哥的加利福尼亞大學（University of California））；PX 478（美國派克斯公司（ProlX））；轉移抑制素（美國安翠梅德公司）；肌鈣蛋白I（美國哈佛大學（Harvard University））；SU 6668（美國蘇根公司）；OXI 4503（美國奧克斯吉尼公司（OXiGENE））；鄰胍（美國維度製藥公司（Dimensional Pharmaceuticals））；莫托普胺C（motuporamine C）（加拿大不列顛哥倫比亞大學（British Columbia University））；CDP 791（英國細胞科技集團（Celltech Group））；阿替莫德（pINN）（英國葛蘭素史克公司（GlaxoSmithKline））；E 7820（日本衛材株式會社（Eisai））；CYC 381（美國哈佛大學）；AE 941（加拿大依特納公司）；血管發生疫苗（美國安翠梅德公司）；尿激酶纖溶酶

原激活劑抑制劑（美國丹德里昂公司）；奧穀法奈（oglufanide）（pINN）（美國麥爾墨特公司（Melmotte））；HIF-1α抑制劑（英國新諾瓦公司（Xenova））；CEP 5214（美國瑟法隆公司）；BAY RES 2622（德國拜耳公司（Bayer））；安吉西丁（美國英可因公司）；A6（美國奧創公司（Angstrom））；KR 31372（韓國的韓國化學技術研究所（Korea Research Institute of Chemical Technology））；GW 2286（英國葛蘭素史克公司）；EHT 0101（法國埃克森海特公司（ExonHit））；CP 868596（美國輝瑞公司）；CP 564959（美國OSI公司）；CP 547632（美國輝瑞公司）；786034（英國葛蘭素史克公司）；KRN 633（日本麒麟啤酒株式會社（Kirin Brewery））；眼內2-甲氧基雌二醇藥物遞送系統（美國安翠梅德公司）；安吉尼克（anginex）（荷蘭馬斯特里赫特大學（Maastricht University）和美國明尼蘇達大學（Minnesota University））；ABT 510（美國雅培公司）；AAL 993（瑞士諾華製藥公司）；VEGI（美國普若技術公司（ProteomTech））；腫瘤壞死因子-α抑制劑（美國國立衰老研究所（National Institute on Aging））；SU 11248（美國輝瑞公司和美國蘇根公司）；ABT 518（美國雅培公司）；YH16（中國煙台榮昌公司（Yantai Rongchang））；S-3APG（美國波士頓兒童醫院和美國安翠梅德公司）；MAb, KDR（美國英殖株系統公司（ImClone Systems））；MAb α5β1（美國蛋白質設計公司（Protein Design））；KDR激酶抑制劑（英國細胞科技集團和美國強生公司）；GFB 116（美國南佛羅里達大學（South Florida University）和美國耶魯大學（Yale University））；CS 706（日本三協株式會社（Sankyo））；康普瑞汀（combretastatin）A4前驅藥（美國亞利桑那州立大學（Arizona State University））；軟骨素酶AC（chondroitinase AC）（加拿大阿卑斯公司（IBEX））；BAY RES 2690（德國拜耳公司）；AGM 1470（美國哈佛大學、日本武田株式會社和美國TAP公司）；AG 13925（美國阿古倫公司（Agouron））；四硫鉬酸鹽（美國密西根大學（University of Michigan））；

GCS 100（美國韋恩州立大學（Wayne State University））；CV 247（英國常春藤醫療公司（Ivy Medical））；CKD 732（韓國鐘根堂公司（Chong Kun Dang））；血管內皮生長因子MAb（英國新諾瓦公司）；伊索拉定（irsogladine）（INN）（日本新藥株式會社（Nippon Shinyaku））；RG 13577（法國安萬特公司）；WX 360（德國威萊克斯公司（Wilex））；角鯊胺（pINN）（美國吉納諾公司（Genaera））；RPI 4610（美國瑟納公司（Sirna））；癌症療法（澳大利亞馬力諾瓦公司（Marinova））；類肝素酶抑制劑（以色列洞見公司（InSight））；KL 3106（韓國科隆公司（Kolon））；和厚樸酚（美國埃默里大學（Emory University））；ZK CDK（德國先靈公司）；ZK Angio（德國先靈公司）；ZK 229561（瑞士諾華製藥公司和德國先靈公司）；XMP 300（美國逍馬公司）；VGA 1102（日本大正株式會社（Taisho））；VEGF受體調節劑（美國藥典公司（Pharmacopeia））；VE-鈣黏蛋白-2拮抗劑（美國英殖株系統公司）；伐索他汀（Vasostatin）（美國國立衛生研究院（National Institutes of Health））；Flk-1疫苗（美國英殖株系統公司）；TZ 93（日本津村株式會社）；腫瘤抑素（美國貝斯以色列醫院（Beth Israel Hospital））；截短型可溶FLT 1（血管內皮生長因子受體1）（美國默克公司（Merck & Co））；Tie-2配位基（美國再生元公司）；和血小板反應蛋白1抑制劑（美國阿列格尼健康、教育和研究基金會（Allegheny Health, Education and Research Foundation））。

【0197】 自體吞噬抑制劑包括但不限於氯喹、3-甲基腺嘌呤、羥氯喹（Plaquenil™）、巴弗洛黴素A1（bafilomycin A1）、5-胺基-4-咪唑甲醯胺核糖核苷（AICAR）、岡田酸、抑制2A型或1型蛋白磷酸酶的自體吞噬抑制性海藻毒素、cAMP類似物以及升高cAMP水平的藥物例如腺苷、LY204002、N6-巰嘌呤核糖核苷和長春鹼。另外，還可以使用抑制蛋白質表現的反義或siRNA，該等蛋白質包括但不限於ATG5（其參與自體吞噬）。

【0198】 可以用於治療癌症並且可以與本發明的一種或多種化合物組合使用的其他藥學活性化合物/藥劑包括：紅血球生成素α；阿法達貝泊汀（darbepoetin alfa）；帕尼單抗；培非格司亭（pegfilgrastim）；帕利夫明（palifermin）；非格司亭；地諾單抗（denosumab）；安西司亭；AMG 102；AMG 176；AMG 386；AMG 479；AMG 655；AMG 745；AMG 951；和AMG 706，或其藥學上可接受的鹽。

【0199】 在某些實施方式中，將本文所提供的組成物與化學治療劑聯合投與。適合的化學治療劑可以包括天然產物，例如長春花生物鹼（例如，長春鹼、長春新鹼和長春瑞濱）、紫杉酚、表鬼臼毒素（Epidipodophyllotoxin）（例如，依託泊苷和替尼泊苷）、抗生素（例如，更生黴素（放線菌素D）、道諾黴素、多柔比星和伊達比星）、蒽環類抗生素、米托蒽醌、博來黴素、普卡黴素（光輝黴素）、絲裂黴素、酶（例如，L-天冬醯胺酶，其系統性地代謝L-天冬醯胺並剝奪不具有合成自身天冬醯胺的能力的細胞）、抗血小板劑、抗增殖/抗有絲分裂烷基化劑（例如氮芥，例如，二氯甲基二乙胺、環磷醯胺和類似物、美法侖和苯丁酸氮芥）、乙烯亞胺和甲基蜜胺（例如，六甲基蜜胺（hexaamethylmelaamine）和噻替派）、CDK抑制劑（例如，塞利西利（seliciclib）、UCN-01、P1446A-05、PD-0332991、迪那西利（dinaciclib）、P27-00、AT-7519、RGB286638和SCH727965）、烷基磺酸酯（例如，白消安）、亞硝基脲（例如，卡莫司汀（BCNU）和類似物和鏈脲黴素）、三氮烯-達卡巴啡（Trazenes-dacarbazinine）（DTIC）、抗增殖/抗有絲分裂抗代謝藥例如葉酸類似物（例如，胺甲喋呤）、嘧啶類似物（例如，氟尿嘧啶、氟尿苷和阿糖胞苷）、嘌呤類似物和相關抑制劑（例如，巯嘌呤、硫鳥嘌呤、噴司他丁和2-氯去氧腺苷）、芳香酶抑制劑（例如，阿那曲唑、依西美坦和來曲唑）和鉑配位錯合物（例如，順鉑和卡鉑）、丙卡巴肼、羥基脲、米托坦、胺魯米特、組蛋白脫乙醯酶（HDAC）

抑制劑（例如，曲古抑菌素、丁酸鈉、阿匹西坦（apicidan）、辛二醯苯胺異羥肟酸（hydroamic acid）、伏立諾他（vorinostat）、LBH 589、羅米地辛（romidepsin）、ACY-1215和帕比司他（panobinostat））、mTor抑制劑（例如，替西羅莫司、依維莫司、地磷莫司（ridaforolimus）和西羅莫司）、KSP（Eg5）抑制劑（例如，Array 520）、DNA結合劑（例如，紮利普斯（Zalypsis））、PI3Kδ抑制劑（例如，GS-1101和TGR-1202）、PI3Kδ和γ抑制劑（例如，CAL-130）、多激酶抑制劑（例如，TG02和索拉非尼）、激素（例如，雌激素）和激素激動劑例如黃體化激素釋放激素（LHRH）激動劑（例如，戈舍瑞林、亮丙瑞林和曲普瑞林）、BAFF中和性抗體（例如，LY2127399）、IKK抑制劑、p38MAPK抑制劑、抗IL-6（例如，CNTO328）、端粒酶抑制劑（例如，GRN 163L）、極光激酶抑制劑（例如，MLN8237）、細胞表面單株抗體（例如，抗CD38（HUMAX-CD38）、抗CS1（例如，埃羅妥珠單抗（elotuzumab））、HSP90抑制劑（例如，17 AAG和KOS 953）、P13K/Akt抑制劑（例如，哌立福辛（perifosine））、Akt抑制劑（例如，GSK-2141795）、PKC抑制劑（例如，恩紮妥林）、FTI（例如，Zarnestra™）、抗CD138（例如，BT062）、Torc1/2特異性激酶抑制劑（例如，INK128）、激酶抑制劑（例如，GS-1101）、ER/UPR靶向劑（例如，MKC-3946）、cFMS抑制劑（例如，ARRY-382）、JAK1/2抑制劑（例如，CYT387）、PARP抑制劑（例如，奧拉帕尼和維利帕尼（veliparib）（ABT-888））、BCL-2拮抗劑。其他化學治療劑可以包括二氯甲基二乙胺、喜樹鹼、異環磷醯胺、他莫昔芬、雷洛昔芬、吉西他濱、諾維本、索拉非尼或前述項的任何類似物或衍生物變體。

【0200】 本發明的化合物還可以與放射療法、激素療法、手術和免疫療法組合使用，該等療法係熟悉該項技術者所熟知的。

【0201】 在某些實施方式中，將本文所提供的藥物組成物與類固醇聯合投與。適合的類固醇可以包括但不限於21-乙醯氧基孕烯醇酮、阿氯米松、阿爾孕

酮、安西奈德、倍氯米松（beclomethasone）、倍他米松、布地奈德、氯潑尼松（chloroprednisone）、氯倍他索（clobetasoL）、氯可托龍、氯潑尼醇、皮質酮、可體松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羥米松、地塞米松、二氟拉松（diflorasone）、二氟可龍（diflucortolone）、二氟孕甾丁酯（difuprednate）、甘草次酸、氟紮可特、氟氯奈德（flucloronide）、氟米松（flumethasone）、氟尼縮松、氟輕鬆（fluocinolone acetonide）、醋酸氟輕鬆、氟考丁酯（fluocortin butyL）、氟可龍、氟米龍（fluorometholone）、醋酸甲氟龍（fluperolone acetate）、醋酸氟潑尼定（fluprednidene acetate）、氟普賴蘇穠（fluprednisolone）、氟氫縮松（flurandrenolide）、丙酸氟替卡松、福莫可他（formocortaL）、氯氟舒松（halcinonide）、丙酸鹵倍他索（halobetasol propionate）、鹵米松（halometasone）、氫化可體松（hydrocortisone）、依碳酸氯替潑諾（loteprednol etabonate）、馬潑尼酮、甲羥松、甲潑尼松、甲普賴蘇穠（methylprednisolone）、糠酸莫米松（mometasone furoate）、帕拉米松、潑尼卡酯、潑尼松龍（prednisolone）、潑尼松龍25-二乙胺基乙酸酯、潑尼松龍磷酸鈉、潑尼松（prednisone）、潑尼松龍戊酸酯（prednivaL）、潑尼立定（prednylidene）、利美索龍、替可體松（tixocortoL）、曲安西龍（triamcinolone）、曲安奈德（triamcinolone acetonide）、苯曲安奈德（triamcinolone benetonide）、己曲安奈德（triamcinolone hexacetonide）及其鹽和/或衍生物。在一個特定實施方式中，本發明的化合物還可以與治療噁心的其他藥學活性藥劑組合使用。可以用於治療噁心的藥劑的實例包括：屈大麻酚；格拉司瓊；甲氧氯普胺；昂丹司瓊；和丙氯拉咁；或其藥學上可接受的鹽。

【0202】 本發明的$KRAS^{G12C}$抑制劑可以與Aurora激酶抑制劑組合使用，例如在公開的PCT申請WO2011/031842中發現的那些。具體的化合物係AMG 900（WO2011/031842的實例1，出於所有目的藉由引用併入本文）。

【0203】 本發明的$KRAS^{G12C}$抑制劑可以與MAP激酶途徑抑制劑組合使用。可以受到抑制的MAP激酶途徑中的蛋白質以及與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的此類蛋白質的抑制劑的實例係BRAF抑制劑、Pan-RAF抑制劑和MEK抑制劑。有三種主要的RAF同種型：ARAF、BRAF和CRAF。pan-RAF抑制劑顯示出對一種以上的RAF同種型具有抑制活性。相反，BRAF抑制劑表現出對BRAF的抑制劑活性（或選擇性）比其他RAF蛋白更高。

【0204】 本發明的化合物還可以與破壞或抑制RAS-RAF-ERK或PI3K-AKT-TOR傳訊途徑的其他藥學活性化合物組合使用。在其他此類組合中，其他藥學活性化合物係PD-1和PD-L1拮抗劑。本揭露的化合物或藥物組成物還可以與一定量的一種或多種選自以下的物質組合使用：EGFR抑制劑、MEK抑制劑、PI3K抑制劑、AKT抑制劑、TOR抑制劑、Mcl-1抑制劑、BCL-2抑制劑、SHP2抑制劑、蛋白酶體抑制劑和免疫療法，包括單株抗體、免疫調節性醯亞胺（IMiD）、抗PD-1（或可替代地PD-1抑制劑）、抗PDL-1、抗CTLA4、抗LAG1和抗OX40劑、GITR激動劑、CAR-T細胞和BiTE。

【0205】 EGFR抑制劑包括但不限於小分子拮抗劑、抗體抑制劑或特定反義核苷酸或siRNA。可以在本發明組合中使用的EGFR抑制劑包括但不限於阿法替尼（商品名：Gilotrif®，可購自勃林格殷格翰公司（Boehringer Ingelheim））、厄洛替尼（商品名：Tarceva®，可購自基因泰克/安斯泰來公司（Genetech/Astellas））、和拉帕替尼（商品名：Tykerb®，可購自諾華製藥公司（Novartis））。在本發明中，$KRAS^{G12C}$抑制劑也可以與EGFR抗體組合使用。可以在本發明組合中使用的EGFR抗體包括但不限於西妥昔單抗（商品名：Erbitux®，來自美國禮來公司（Lilly））。有用的EGFR抗體抑制劑包括帕尼單抗（維克替比）、紮魯木單抗（zalutumumab）、尼妥珠單抗（nimotuzumab）和馬妥珠單抗（matuzumab）。

【0206】 小分子EGFR抑制劑的非限制性實例包括以下專利公開案中描述的任何EGFR抑制劑、以及所述EGFR抑制劑的所有藥學上可接受的鹽和溶劑化物：歐洲專利申請案EP 520722，1992年12月30日公開；歐洲專利申請案EP 566226，1993年10月20日公開；PCT國際公開案WO 96/33980，1996年10月31日公開；美國專利案號5,747,498，1998年5月5日授權；PCT國際公開案WO 96/30347，1996年10月3日公開；歐洲專利申請案EP 787772，1997年8月6日公開；PCT國際公開案WO 97/30034，1997年8月21日公開；PCT國際公開案WO 97/30044，1997年8月21日公開；PCT國際公開案WO 97/38994，1997年10月23日公開；PCT國際公開案WO 97/49688，1997年12月31日公開；歐洲專利申請案EP 837063，1998年4月22日公開；PCT國際公開案WO 98/02434，1998年1月22日公開；PCT國際公開案WO 97/38983，1997年10月23日公開；PCT國際公開案WO 95/19774，1995年7月27日公開；PCT國際公開案WO 95/19970，1995年7月27日公開；PCT國際公開案WO 97/13771，1997年4月17日公開；PCT國際公開案WO 98/02437，1998年1月22日公開；PCT國際公開案WO 98/02438，1998年1月22日公開；PCT國際公開案WO 97/32881，1997年9月12日公開；德國申請案DE 19629652，1998年1月29日公開；PCT國際公開案WO 98/33798，1998年8月6日公開；PCT國際公開案WO 97/32880，1997年9月12日公開；PCT國際公開案WO 97/32880，1997年9月12日公開；歐洲專利申請案EP 682027，1995年11月15日公開；PCT國際公開案WO 97/02266，197年1月23日公開；PCT國際公開案WO 97/27199，1997年7月31日公開；PCT國際公開案WO 98/07726，1998年2月26日公開；PCT國際公開案WO 97/34895，1997年9月25日公開；PCT國際公開案WO 96/31510'，1996年10月10日公開；PCT國際公開案WO 98/14449，1998年4月9日公開；PCT國際公開案WO 98/14450，1998年4月9日公開；PCT國際公開案WO 98/14451，1998年4月9日公開；PCT國際公開案WO 95/09847，1995年4月13日公

開；PCT國際公開案WO 97/19065，1997年5月29日公開；PCT國際公開案WO 98/17662，1998年4月30日公開；美國專利案號5,789,427，1998年8月4日授權；美國專利案號5,650,415，1997年7月22日授權；美國專利案號5,656,643，1997年8月12日授權；PCT國際公開案WO 99/35146，1999年7月15日公開；PCT國際公開案WO 99/35132，1999年7月15日公開；PCT國際公開案WO 99/07701，1999年2月18日公開；和PCT國際公開案WO 92/20642，1992年11月26日公開。小分子EGFR抑制劑的其他非限制性實例包括描述於Traxler, P., 1998, Exp. Opin. Ther. Patents [治療術專利專家評述] 8(12):1599-1625中的任何EGFR抑制劑。

【0207】 基於抗體的EGFR抑制劑包括可以部分或完全阻斷EGFR被其天然配位基激活的任何抗EGFR抗體或抗體片段。基於抗體的EGFR抑制劑的非限制性實例包括以下文獻中描述的那些：Modjtahedi, H.等人, 1993, Br. J. Cancer [英國癌症雜誌] 67:247-253；Teramoto, T.等人, 1996, Cancer [癌症] 77:639-645；Goldstein等人, 1995, Clin. Cancer Res. [臨床癌症研究] 1:1311-1318；Huang, S. M. 等人, 1999, Cancer Res. [癌症研究] 15:59(8):1935-40；和Yang, X.等人, 1999, Cancer Res. [癌症研究] 59:1236-1243。因此，EGFR抑制劑可以是單株抗體Mab E7.6.3（Yang, 1999，同上）、或Mab C225（ATCC登錄號HB-8508）、或具有其結合特異性的抗體或抗體片段。

【0208】 本發明的$KRAS^{G12C}$抑制劑可以與MEK抑制劑組合使用，例如在公開的PCT申請WO2002/006213中發現的那些。一種特定化合物係N-(((2R)-2,3-二羥丙基)氧基)-3,4-二氟-2-((2-氟-4-碘苯基)胺基)苯甲醯胺，也稱為AMG 1009089或1009089（實例39）。

【0209】 本發明的$KRAS^{G12C}$抑制劑可以與BRAF抑制劑組合使用，例如在公開的PCT申請WO2008/153,947中發現的那些。一種特定化合物係AMG 2112819（也稱為2112819）（實例56）。可以在本發明的組合中使用的另一種

特定的BRAF抑制劑係達拉非尼。可以在本發明的組合中使用的另一種BRAF抑制劑係維羅非尼。

【0210】 在本發明的組合中，Pan-RAF抑制劑也可以與$KRAS^{G12C}$抑制劑一起使用。特定的Pan-Raf抑制劑包括RAF265和MLN-2480。

【0211】 本發明的$KRAS^{G12C}$抑制劑可以與MEK抑制劑組合使用。可以在本發明的組合中使用的特定的MEK抑制劑包括PD-325901、曲美替尼、匹馬塞替尼、MEK162[也稱為比尼替尼]、TAK-733、GDC-0973和AZD8330。可以在本發明的組合中與$KRAS^{G12C}$抑制劑一起使用的特定MEK抑制劑係曲美替尼（商品名：Mekinist®，可購自諾華製藥公司（Novartis Pharmaceuticals Corp.））。另一種特定的MEK抑制劑係N-(((2R)-2,3-二羥丙基)氧基)-3,4-二氟-2-((2-氟-4-碘苯基)胺基)苯甲醯胺，也稱為AMG 1009089、1009089或PD-325901。可用於本發明組合的另一種特定的MEK抑制劑包括考比替尼（cobimetinib）。

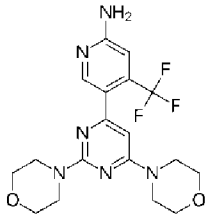
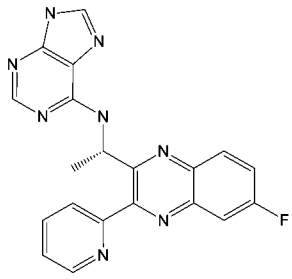
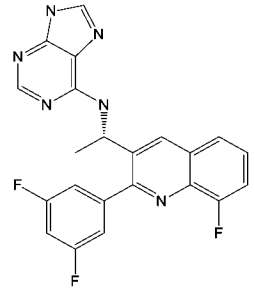
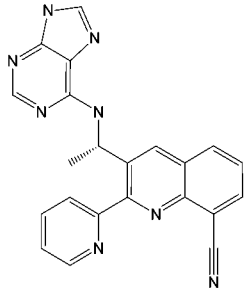
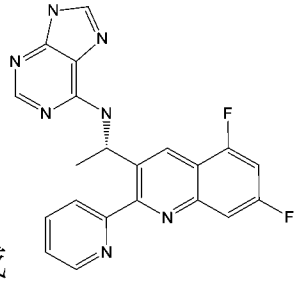
【0212】 MEK抑制劑包括但不限於CI-1040、AZD6244、PD318088、PD98059、PD334581、RDEA119、ARRY-142886和ARRY-438162。

【0213】 在另一方面，本發明關於本發明的化合物與一種或多種藥劑的組合之用途，該藥劑在磷脂醯肌醇3-激酶（PI3K）途徑中作為蛋白質的抑制劑。PI3K途徑中的蛋白質實例包括PI3K、mTOR和PKB（也稱為Akt或AKT）。PI3K蛋白以若干種同種型存在，包括α、β、δ或γ。預期可以在本發明中使用的PI3K抑制劑可以對一種或多種同種型具有選擇性。選擇性係指該化合物與其他同種型相比，更多地抑制一種或多種同種型。選擇性係熟悉該項技術者熟知的概念，並且可以用熟知的體外或基於細胞的活性測定法進行測量。較佳的選擇性包括對一種或多種同種型的選擇性，與其他同種型相比，大於2倍，較佳的是大於10倍，或更較佳的是100倍更大。在一方面，可與本發明的化合物組合使用的PI3K

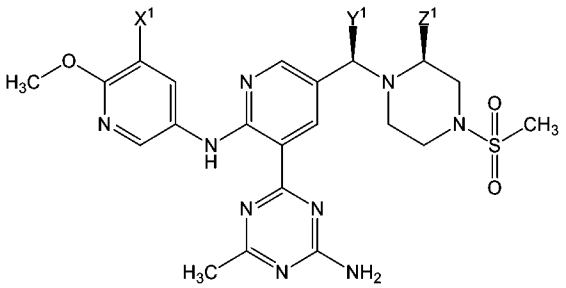
抑制劑係PI3Kα選擇性抑制劑。在另一方面，該化合物係PI3Kδ選擇性抑制劑。在又另一方面，該化合物係PI3Kβ選擇性抑制劑。

【0214】 可與一種或多種本發明的化合物組合使用的PI3K抑制劑的實例包括以下揭露的那些：PCT公開申請號WO2010/151791；PCT公開申請號WO2010/151737；PCT公開申請號WO2010/151735；PCT公開申請號WO 2010151740；PCT公開申請號WO2008/118455；PCT公開申請號WO2008/118454；PCT公開申請號WO2008/118468；美國公開申請號US20100331293；美國公開申請號US20100331306；美國公開申請號US20090023761；美國公開申請號US20090030002；美國公開申請號US20090137581；美國公開申請號US2009/0054405；美國公開申請號U.S. 2009/0163489；美國公開申請號US 2010/0273764；美國公開申請號U.S. 2011/0092504；或PCT公開申請號WO2010/108074。PI3K抑制劑包括但不限於渥曼青黴素、WO 06/044453中描述的17-羥基渥曼青黴素類似物、4-[2-(1H-吲唑-4-基)-6-[[4-(甲磺醯基)哌啡-1-基]甲基]噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]味啉（還稱為GDC 0941，並且描述於PCT公開案號WO 09/036,082和WO 09/055,730中）、2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-側氧基-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氫咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈（還稱為BEZ 235或NVP-BEZ 235，並且描述於PCT公開案號WO 06/122806中）、(S)-1-(4-((2-(2-胺基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-味啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌啡-1-基)-2-羥基丙-1-酮（描述於PCT公開案號WO 2008/070740中）、LY294002（2-(4-味啉基)-8-苯基-4H-1-苯并哌喃-4-酮，可從艾克松醫學化學公司（Axon Medchem)獲得）、PI 103鹽酸鹽（3-[4-(4-味啉基吡啶并-[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基]苯酚鹽酸鹽，可從艾克松醫學化學公司獲得）、PIK 75（N'-[(1E)-(6-溴代咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)亞甲基]-N,2-二甲基-5-硝基苯磺醯基-醯肼鹽酸鹽，可從艾克松醫學化學公司獲得）、PIK 90（N-(7,8-二甲氧基-2,3-

二氫-咪唑并[1,2-c]喹唑啉-5-基)-煙醯胺，可從艾克松醫學化學公司獲得）、GDC-0941二甲磺酸鹽（2-(1H-吲唑-4-基)-6-(4-甲烷磺醯基-哌啡-1-基甲基)-4-味啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶二甲磺酸鹽，可從艾克松醫學化學公司獲得）、AS-252424（5-[1-[5-(4-氟-2-羥基-苯基)-呋喃-2-基]-甲-(Z)-亞基]-四氫噻唑-2,4-二酮，可從艾克松醫學化學公司獲得）以及TGX-221（7-甲基-2-(4-味啉基)-9-[1-(苯基胺基)乙基]-4H-吡啶并-[1,2-a]嘧啶-4-酮，可從艾克松醫學化學公司獲得）、XL-765和XL-147。其他PI3K抑制劑包括去甲氧基綠膠黴素（demethoxyviridin）、哌立福辛、CAL101、PX-866、BEZ235、SF1126、INK1117、IPI-145、BKM120、XL147、XL765、帕羅米德529（Palomid 529）、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、PI-103、GNE-477、CUDC-907和AEZS-136。

與本發明的化合物組合使用的較佳的PI3K抑制劑包括：  ，也稱為布帕尼西，一種來自諾華製藥公司（Novartis Pharmaceuticals）的研究小分子，  ；  ；  ；或  ；或其藥學上可接受的鹽。

還較佳的是下面的式IIa化合物或其藥學上可接受的鹽，



IIa

其中X^1係氟或氫；Y^1係氫或甲基；以及Z^1係氫或甲基。可用於本發明的組合的特定PI3K抑制劑係AMG 511（也稱為AMG 2539965或2539965），其係公開的PCT申請WO2010/126895的實例148。

【0215】 可在本發明的組合中與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的其他PI3K抑制劑包括Pan-PI3K抑制劑，例如BKM120和GDC-0941；PI3Kα選擇性抑制劑，例如BYL719；和PI3Kβ選擇性抑制劑，例如GSK-2636771。

【0216】 抑制PI3K和mTOR兩者的化合物（雙重抑制劑）係已知的。在又另一方面，本發明提供了PI3K和mTOR雙重抑制劑與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用之用途。特定的雙重抑制劑的實例係GDC-0980。

【0217】 在本發明中，$KRAS^{G12C}$抑制劑也可以與SHP2抑制劑組合使用。可以在本發明組合中使用的SHP2抑制劑包括但不限於SHP099，以及RMC-4550或RMC-4630（來自加利福尼亞州紅木市（Redwood City, CA）的Revolutions Medicines）。

【0218】 mTOR係PI3K途徑中的蛋白質。本發明的另一方面係將mTOR抑制劑與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用。可與本發明的化合物組合使用的mTOR抑制劑包括以下文件中揭露的那些：PCT公開申請WO2010/132598和PCT公開申請WO2010/096314。在本發明的組合中可以與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的mTOR抑制劑包括AZD2014和MLN0128。

【0219】 TOR抑制劑包括但不限於，AP-23573、CCI-779、依維莫司、RAD-001、雷帕黴素、替西羅莫司、ATP競爭性TORC1/TORC2抑制劑，包括PI-103、PP242、PP30和托林1（Torin 1）。其他TOR抑制劑包括FKBP12增強劑；雷帕黴素及其衍生物，包括：CCI-779（替西羅莫司）、RAD001（依維莫司；WO 9409010）和AP23573；雷帕黴素類似物（rapalog），例如如WO 98/02441和WO 01/14387中所揭露，例如AP23573、AP23464或AP23841；40-(2-羥乙基)雷帕黴素、40-[3-羥基(羥甲基)甲基丙酸酯]-雷帕黴素（還稱為CC1779）、40-表-(四唑基)-雷帕黴素（還稱為ABT578）、32-去氧雷帕黴素、16-戊炔氧基-32(S)-二氫雷帕黴素和WO 05005434中揭露的其他衍生物；以下專利中揭露的衍生物：美國專利案號5,258,389、WO 94/090101、WO 92/05179、美國專利案號5,118,677、美國專利案號5,118,678、美國專利案號5,100,883、美國專利案號5,151,413、美國專利案號5,120,842、WO 93/111130、WO 94/02136、WO 94/02485、WO 95/14023、WO 94/02136、WO 95/16691、WO 96/41807、WO 96/41807和美國專利案號5,256,790；含磷雷帕黴素衍生物（例如，WO 05016252）；4H-1-苯并哌喃-4-酮衍生物（例如，美國臨時申請案號60/528,340）。

【0220】 PKB（AKT）也是PI3K途徑中的蛋白質。本發明的另一方面係將AKT抑制劑與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用。可與本發明的化合物組合使用的AKT抑制劑包括以下文件中揭露的那些：美國專利案號7,354,944；美國專利案號7,700,636；美國專利案號7,919,514；美國專利案號7,514,566；美國專利申請公開號US 2009/0270445 A1；美國專利案號7,919,504；美國專利案號7,897,619；或PCT公開申請號WO 2010/083246 A1。可在本發明的組合中與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的特定AKT抑制劑包括MK-2206、GDC-0068和AZD5363。

【0221】 AKT抑制劑包括但不限於Akt-1-1（抑制Akt1）（Barnett等人（2005）*Biochem. J.* [生物化學雜誌], 385（Pt. 2）, 399-408）；Akt-1-1,2（抑制

Ak1和2）（Barnett等人（2005）*Biochem. J.* [生物化學雜誌] 385 (Pt. 2), 399-408）；API-59CJ-Ome（例如，Jin等人（2004）*Br. J. Cancer* [英國癌症雜誌] 91, 1808-12）；1-H-咪唑并[4,5-c]吡啶基化合物（例如，WO 05011700）；吲哚-3-甲醇（carbinol）及其衍生物（例如，美國專利案號6,656,963；Sarkar和Li (2004) *J Nutr.* [營養學雜誌] 134(12增刊), 3493S-3498S）；哌立福辛（例如，干擾Akt膜定位；Dasmahapatra等人 (2004) *Clin. Cancer Res.* [臨床癌症研究] 10(15), 5242-52, 2004）；磷脂醯肌醇醚脂質類似物（例如，Gills和Dennis（2004）*Expert. Opin. Investig. Drugs* [研究藥物專家評論] 13, 787-97）；和曲西立濱（TCN或API-2或NCI識別符：NSC 154020；Yang等人 (2004) *Cancer Res.* [癌症研究] 64, 4394-9）。

【0222】 MCl-1抑制劑包括但不限於AMG-176、MIK665和S63845。髓樣細胞白血病-1（MCL-1）蛋白係B細胞淋巴瘤2（BCL-2）蛋白家族的關鍵抗凋亡成員之一。MCL-1的過表現與腫瘤進展以及不僅針對傳統化學療法還針對包括BCL-2抑制劑（例如ABT-263）的靶向療法的抗性密切相關。

【0223】 蛋白酶體抑制劑包括但不限於Kyprolis®（卡非佐米）、Velcade®（硼替佐米）和奧普佐米（oprozomib）。

【0224】 免疫療法包括但不限於抗PD-1劑、抗PDL-1劑、抗CTLA-4劑、抗LAG1劑和抗OX40劑。

【0225】 單株抗體包括但不限於Darzalex®（達雷木單抗（daratumumab））、Herceptin®（曲妥珠單抗（trastuzumab））、Avastin®（貝伐珠單抗（bevacizumab））、Rituxan®（利妥昔（rituximab））、Lucentis®（雷珠單抗（ranibizumab））、和Eylea®（阿柏西普（aflibercept））。

【0226】 免疫調節劑（IMiD）係一類含有醯亞胺基團的免疫調節藥物（調節免疫反應的藥物）。IMiD類包括沙利度胺及其類似物（來那度胺、泊馬利度胺和阿米司特）。

【0227】 包括但不限於抗體的抗PD-1抑制劑包括但不限於派姆單抗（Keytruda®）和納武單抗（Opdivo®）。示例性抗PD-1抗體及其使用方法描述於以下文獻中：Goldberg等人, Blood [血液] 110(1):186-192（2007）；Thompson等人, *Clin. Cancer Res.* [臨床癌症研究] 13(6):1757-1761（2007）；和Korman等人, 國際申請案號PCT/JP2006/309606（公開案號WO 2006/121168 A1），將其各自藉由引用明確併入本文。包括：Yervoy™（伊匹單抗（ipilimumab））或曲美目單抗（Tremelimumab）（針對CTLA-4）、加利昔單抗（galiximab）（針對B7.1）、BMS-936558（針對PD-1）、MK-3475（針對PD-1）、AMP224（針對B7DC）、BMS-936559（針對B7-H1）、MPDL3280A（針對B7-H1）、MEDI-570（針對ICOS）、AMG557（針對B7H2）、MGA271（針對B7H3）、IMP321（針對LAG-3）、BMS-663513（針對CD137）、PF-05082566（針對CD137）、CDX-1127（針對CD27）、抗OX40（普羅維登斯衛生服務（Providence Health Services））、huMAbOX40L（針對OX40L）、阿塞西普（Atacicept）（針對TACI）、CP-870893（針對CD40）、魯卡木單抗（Lucatumumab）（針對CD40）、達西珠單抗（Dacetuzumab）（針對CD40）、莫羅單抗-CD3（Muromonab-CD3）（針對CD3）、伊匹單抗（針對CTLA-4）。免疫療法還包括遺傳工程化的T細胞（例如，CAR-T細胞）和雙特異性抗體（例如，BiTE）。

【0228】 在特定的實施方式中，本發明的化合物與抗PD-1抗體例如AMG 404組合使用。在特定的實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合抗體片段）包括SEQ ID NO: 1-6的1、2、3、4、5或所有6個CDR胺基酸序列（依次表示HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3）。在特定實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合抗體片段）包含SEQ ID NO: 1-6的所有6個CDR胺基酸序列。在其他實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合抗體片段）包含 (a) SEQ ID NO: 7中的重鏈可變區胺基酸序列或僅相差一個或兩個胺基酸或具有至少或

約70%序列同一性的其變體序列，或 (b) SEQ ID NO: 8中的輕鏈可變區胺基酸序列或僅相差一個或兩個胺基酸或具有至少或約70%序列同一性的其變體序列。在一個示例性實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合抗體片段）包含SEQ ID NO: 7中的重鏈可變區胺基酸序列和SEQ ID NO: 8中的輕鏈可變區胺基酸序列。在其他實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合抗體片段）包含 (a) SEQ ID NO: 9的重鏈胺基酸序列或僅相差一個或兩個胺基酸或具有至少或約70%序列同一性的其變體序列，或 (b) SEQ ID NO: 10的輕鏈胺基酸序列或僅相差一個或兩個胺基酸或具有至少或約70%序列同一性的其變體序列。在一個示例性實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合抗體片段）包含SEQ ID NO: 9的重鏈胺基酸序列和SEQ ID NO: 10的輕鏈胺基酸序列。

【0229】 本揭露進一步提供了編碼抗PD-1抗體（或其抗原結合部分）的核酸序列。在示例性方面，抗體包含由SEQ ID NO: 11-16的核酸編碼的1、2、3、4、5或所有6個CDR（依次表示HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3）。在另一個示例性方面，該抗體包含由SEQ ID NO: 11-16的核酸編碼的所有6個CDR。在一些實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合部分）包含 (a) 由SEQ ID NO: 17編碼的重鏈可變區或僅相差1、2、3、4、5或6個核酸或具有至少或約70%、85%、90%或95%序列同一性的其變體序列，或 (b) 由SEQ ID NO: 18編碼的輕鏈可變區或僅相差1、2、3、4、5或6個核酸或具有至少或約70%、85%、90%或95%序列同一性的其變體序列。在一個示例性的實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合部分）包含由SEQ ID NO: 17編碼的重鏈可變區和由SEQ ID NO: 18編碼的輕鏈可變區。在其他實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合部分）包含 (a) SEQ ID NO: 19編碼的重鏈或僅相差1、2、3、4、5或6個核酸或具有至少或約70%、85%、90%或95%序列同一性的其變異序列，或 (b) SEQ ID NO: 20編碼的輕鏈或僅相差1、2、3、4、5或6個核酸或具有至少或約70%、

85%、90%或95%序列同一性的其變異序列。在一個示例性的實施方式中，抗PD-1抗體（或其抗原結合部分）包含SEQ ID NO: 19編碼的重鏈和SEQ ID NO: 20編碼的輕鏈。使用CRISPR技術由鼠T-26結腸直腸細胞系（ATCC）產生CT-26 KRAS p.G12C細胞，以用如SEQ ID NO: 21編碼的p.G12C（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））替代兩個KRAS p.G12D等位基因。

SEQ ID NO.	序列類型	序列
1	PRT	Ser Tyr Asp Met Ser
2	PRT	Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys
3	PRT	Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val
4	PRT	Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
5	PRT	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
6	PRT	Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr
7	PRT	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
8	PRT	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
9	PRT	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

		Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
10	PRT	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
11	DNA	agctatgaca tgagc
12	DNA	cttattagtg gtggtggtag tcaaacatac tacgcagaat ccgtgaaggg c
13	DNA	cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtc
14	DNA	cgggcgagtc agggtattag caactggtta gcc
15	DNA	gctgcatcca gtttgcaaag t
16	DNA	caacaggctg aaagtttccc tcacact
17	DNA	gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgaca tgagctgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggaatg ggtctcactt attagtggtg gtggtagtca aacatactac gcagaatccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gtcccccagt ggccactact tctacgctat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca
18	DNA	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc aactggttag cctggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctgaaagtt tccctcacac tttcggcgga gggaccaagg tggagatcaa a
19	DNA	atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg cgctgtgagg tgcagctgtt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgacatgag ctgggtccgc caggctccag ggaaggggct ggaatgggtc tcacttatta gtggtggtgg

		tagtcaaaca tactacgcag aatccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatattt ctgtgcgtcc cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccccа aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgtg cgaggagcag tacggcagca cgtaccgttg cgtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
20	DNA	atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg cgctgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcttccgtgt ctgcatctgt tggagacaga gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcaact ggttagcctg gtatcagcag aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tttgctgcat ccagtttgca aagtggggtc ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ccctcaccat cagcagcctg cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggctg aaagtttccc tcacactttc ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacga acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt
21	PRT	Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala

【0230】 GITR激動劑包括但不限於GITR融合蛋白和抗GITR抗體(例如二價抗GITR抗體),例如美國專利案號6,111,090box.c、歐洲專利案號:090505B1、美國專利案號8,586,023、PCT公開號:WO 2010/003118和2011/090754中所述的GITR融合蛋白,或例如在以下中描述的抗GITR抗體:美國專利案號7,025,962、歐洲專利案號:1947183B1、美國專利案號7,812,135、美國專利案號8,388,967、美國專利案號8,591,886、歐洲專利案號:EP 1866339、PCT公開號:WO 2011/028683、PCT公開號:WO 2013/039954、PCT公開號:WO2005/007190、

PCT公開號：WO 2007/133822、PCT公開號：WO2005/055808、PCT公開號：WO 99/40196、PCT公開號：WO 2001/03720、PCT公開號：WO99/20758、PCT公開號：WO2006/083289、PCT公開號：WO 2005/115451、美國專利案號7,618,632和PCT公開號：WO 2011/051726。

【0231】 在本發明中，$KRAS^{G12C}$抑制劑也可以與CDK4和/或6抑制劑組合使用。可以用於本發明組合的CDK4和/或6抑制劑包括但不限於以下文件中揭露的那些：PCT公開申請號WO 2009/085185或美國專利申請公開號US2011/0097305。

【0232】 可在本發明的組合中與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的其他化合物包括抑制作為內在凋亡途徑一部分的蛋白質的化合物。此類化合物的實例包括但不限於Bcl2/BclxL抑制劑（例如納威托克斯（navitoclax））和Bcl2抑制劑（例如ABT-199）。

【0233】 可在本發明的組合中與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的其他化合物包括BCR-ABL抑制劑，例如但不限於達沙替尼和HDAC抑制劑，例如帕比司他。

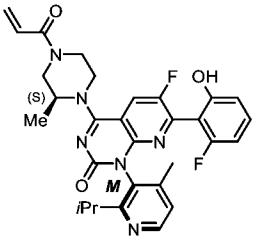
【0234】 在本發明的組合中可以與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的其他化合物包括鉑，例如順鉑、卡鉑和奧沙利鉑；拓撲異構酶II抑制劑，通常為蒽環類藥物，例如多柔比星、道諾黴素、伊達比星、表柔比星、聚乙二醇化脂質體多柔比星鹽酸鹽、myocet和依託泊苷；拓撲異構酶I抑制劑，例如伊立替康（CPT-11）；DNA烷基化劑，例如替莫唑胺；核苷類似物，例如阿糖胞苷和地西他濱。

【0235】 可在本發明的組合中與$KRAS^{G12C}$抑制劑組合使用的其他化合物包括受體和非受體激酶抑制劑，包括酪胺酸激酶抑制劑。此類化合物的實例包括伊馬替尼、達沙替尼、帕納替尼、博舒替尼、尼洛替尼、奎紮替尼、米司他林、厄洛替尼和拉帕替尼。

【0236】 本文所述之化合物可以與本文所揭露的藥劑或其他適合的藥劑組合使用，這取決於所治療的病症。因此，在一些實施方式中，本揭露的一種或多種化合物將與如上所述的其他藥劑共投與。在用於組合療法中時，本文所述之化合物與第二藥劑同時或分開投與。這種組合投與可以包括以相同劑型同時投與兩種藥劑、以單獨劑型同時投與和分開投與。也就是說，本文所述之化合物和上述任何藥劑可以一起配製於相同劑型中並同時投與。可替代地，本揭露的化合物和上述任何藥劑可以同時投與，其中兩種藥劑存在於單獨配製物中。在另一個替代方案中，可以在投與本揭露的化合物後立即投與上述任何藥劑，或反之亦然。在單獨投與方案的一些實施方式中，本揭露的化合物和上述任何藥劑的投與相隔幾分鐘，或相隔幾小時，或相隔幾天。

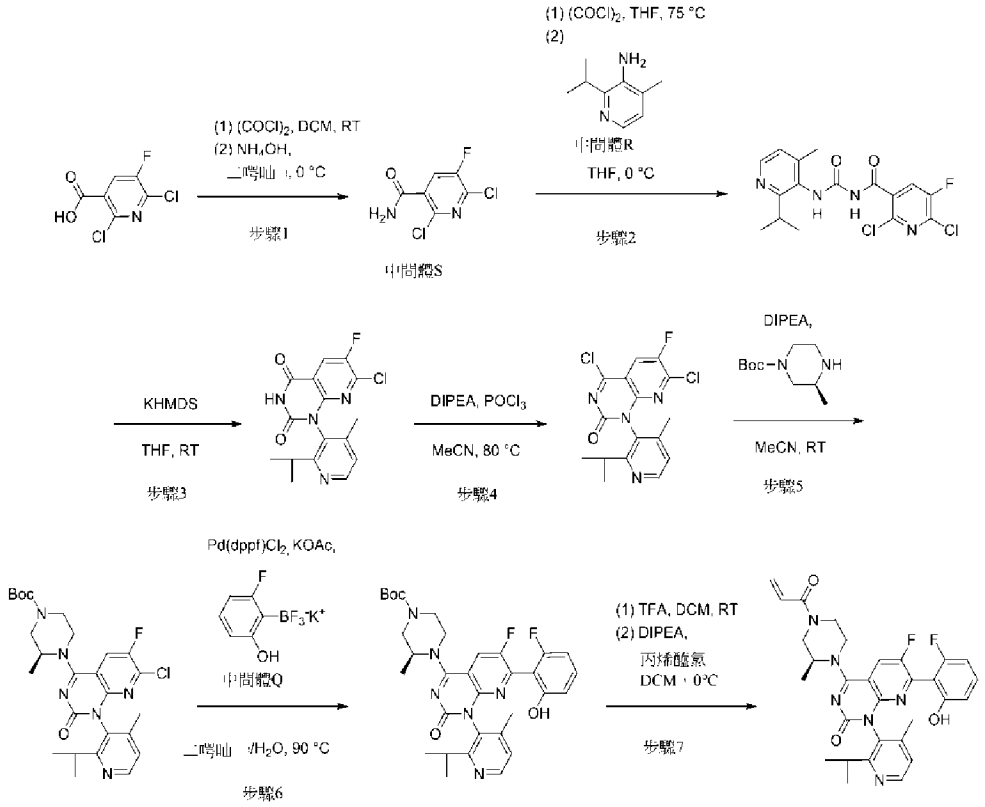
【0237】 由於本發明的一個方面考慮了用可以分開投與的藥學活性化合物的組合治療疾病/病症，本發明進一步關於以套組形式組合單獨的藥物組成物。該套組包含兩種單獨的藥物組成物：本發明的化合物和第二藥物化合物。該套組包含用於容納單獨組成物的容器，例如分開的瓶子或分開的箔袋。容器的其他實例包括注射器、盒和袋。在一些實施方式中，該套組包含單獨組分的使用說明。在較佳的是以不同劑型（例如，口服和腸胃外）投與單獨組分時，以不同劑量間隔投與時，或在開方的醫護專業人員需要組合中個別組分的滴定時，套組形式係特別有利的。

AMG 510的合成

【0238】 本發明的$KRAS^{G12C}$抑制劑包括公開的PCT申請WO 2018/119183中揭露的那些。如下所述，具有結構  的AMG 510的合成在2018

年5月21日提交的U.S.S.N. 15/984,855中陳述，其要求2017年5月22日提交的臨時申請號62/509,629的優先權和權益。

【0239】 使用以下方法製備6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(4-甲基-2-(2-丙烷基)-3-吡啶基)-4-((2S)-2-甲基-4-(2-丙烯醯基)-1-哌啉基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮，其中將最終產物拆分以分離M-阻轉異構物。



【0240】 **步驟1：2,6-二氯-5-氟煙醯胺（中間體S）**。向2,6-二氯-5-氟-菸酸（4.0 g，19.1 mmol，愛斯特科技有限公司（AstaTech Inc.）,布里斯托爾, 賓夕法尼亞州））在二氯甲烷（48 mL）中的混合物中添加草醯氯（2M DCM溶液，11.9 mL，23.8 mmoL），隨後添加催化量的DMF（0.05 mL）。將反應在室溫下攪拌過夜，然後濃縮。將殘餘物溶於1,4-二噁烷（48 mL）中，並冷卻至0°C。藉由注射器緩慢添加氫氧化銨溶液（基於NH3 28.0%-30%，3.6 mL，28.6 mmoL）。將所得混合物在0°C下攪拌30 min，然後濃縮。用EtOAc/庚烷的1：1混合物稀釋殘餘物，並攪拌5 min，然後過濾。丟棄過濾的固體，並將剩餘的母液部分濃縮至

一半體積並過濾。將過濾的固體用庚烷洗滌，並在減壓烘箱（45°C）中乾燥過夜，提供2,6-二氯-5-氟煙醯胺。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 8.23 (d, J = 7.9 Hz, 1 H) 8.09 (br s, 1 H) 7.93 (br s, 1 H)。*m/z* (ESI, +ve 離子）: 210.9 $(M+H)^+$。

【0241】 **步驟2：2,6-二氯-5-氟-N-((2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)胺基甲醯基)煙醯胺。**藉由注射器向冰冷卻的2,6-二氯-5-氟煙醯胺（**中間體S**，5.0 g，23.9 mmoL）在THF（20 mL）中的漿液中緩慢添加草醯氯（2M DCM溶液，14.4 mL，28.8 mmoL）。將所得混合物在75°C下加熱1h，然後停止加熱，並將反應濃縮至一半體積。冷卻至0°C後，藉由套管逐滴添加THF（20mL），隨後添加2-異丙基-4-甲基吡啶-3-胺（**中間體R**，3.59 g，23.92 mmoL）的THF（10 mL）溶液。將所得混合物在0°C下攪拌1 h，然後用鹽水和飽和氯化銨水溶液的1：1混合物淬滅。將混合物用EtOAc萃取（3x），將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥並濃縮，提供2,6-二氯-5-氟-*N*-((2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)胺基甲醯基)煙醯胺。該材料無需進一步純化即可用於以下步驟。*m/z* (ESI, +ve 離子）: 385.1$(M+H)^+$。

【0242】 **步驟3：7-氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮。**藉由注射器向冰冷卻的2,6-二氯-5-氟-*N*-((2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)胺基甲醯基)煙醯胺（9.2 g，24.0 mmoL）的THF（40 mL）溶液中緩慢添加KHMDS（1M THF溶液，50.2 mL，50.2 mmoL）。除去冰浴，並將所得混合物在室溫下攪拌40 min。用飽和氯化銨水溶液淬滅反應，並用EtOAc萃取（3x）。將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥並濃縮。將殘餘物藉由矽膠層析法純化（洗脫液：0-50% 3：1 EtOAc-EtOH/庚烷），提供7-氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶基[2,3-*d*]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.27 (br s, 1H), 8.48-8.55 (m, 2 H), 7.29 (d, J = 4.8 Hz, 1 H), 2.87 (quin, J = 6.6 Hz, 1 H), 1.99-2.06 (m, 3 H), 1.09 (d, J = 6.6 Hz, 3 H), 1.01 (d, J = 6.6

Hz, 3 H)。^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ: -126.90 (s, 1 F)。*m/z* (ESI, +ve 離子）: 349.1 $(M+H)^+$。

【0243】 **步驟4：4,7-二氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮。**藉由注射器向7-氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮（4.7 g，13.5 mmoL）和DIPEA（3.5 mL，20.2 mmoL）在乙腈（20 mL）中的溶液中逐滴添加三氯氧化磷（1.63 mL，17.5 mmoL）。將所得混合物在80°C下加熱1h，然後冷卻至室溫並濃縮，提供4,7-二氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮。該材料無需進一步純化即可用於以下步驟。*m/z* (ESI, +ve 離子）: 367.1 $(M+H)^+$。

【0244】 **步驟5：4-(7-氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-3-甲基哌啉-1-甲酸 (S)-三級丁基酯。**向冰冷卻的4,7-二氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮（13.5 mmoL）在乙腈（20 mL）中的溶液中添加DIPEA（7.1 mL，40.3 mmoL），隨後添加(S)-4-N-Boc-2-甲基哌啉（3.23 g，16.1 mmol，Combi-Blocks有限公司（Combi-Blocks, Inc.）, 聖地牙哥市, 加利福尼亞州, 美國）。將所得混合物溫熱至室溫並攪拌1 h，然後用冷的飽和碳酸氫鈉水溶液（200 mL）和EtOAc（300 mL）稀釋。將混合物再攪拌5 min，分離各層，並將水層用更多的EtOAc萃取（1x）。將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥並濃縮。將殘餘物藉由矽膠層析法純化（洗脫液：0-50% EtOAc/庚烷），提供4-(7-氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-3-甲基哌啉-1-甲酸 (S)-三級丁基酯。*m/z* (ESI, +ve 離子): 531.2 $(M+H)^+$。

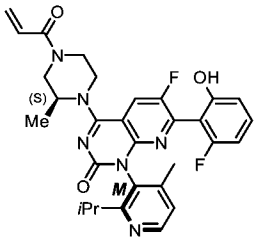
【0245】 **步驟6：4-(6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-3-甲基哌啉-1-甲酸 (3S)-三級丁基酯。**將4-(7-氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-

基)-3-甲基哌啉-1-甲酸 (S)-三級丁基酯（4.3 g，8.1 mmoL），三氟(2-氟-6-羥基苯基)硼酸鉀（**中間體Q**，2.9 g，10.5 mmoL），乙酸鉀（3.2 g，32.4 mmoL）和與二氯甲烷複合的[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯鈀(II)（661 mg，0.81 mmoL）在1,4-二噁烷（80 mL）中的混合物用氮氣脫氣1 min。添加去氧水（14 mL），並將所得混合物在90°C加熱1 h。使反應冷卻至室溫，用半飽和碳酸氫鈉水溶液淬滅，並用EtOAc（2x）和DCM（1x）萃取。將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥並濃縮。將殘餘物藉由矽膠層析法純化（洗脫液：0-60% 3：1 EtOAc-EtOH/庚烷），提供4-(6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-3-甲基哌啉-1-甲酸 (3*S*)-三級丁基酯。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 10.19 (br s, 1 H), 8.38 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H), 8.26 (dd, *J* = 12.5, 9.2 Hz, 1 H), 7.23-7.28 (m, 1 H), 7.18 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H), 6.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.68 (t, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 4.77-4.98 (m, 1 H), 4.24 (br t, *J* = 14.2 Hz, 1 H), 3.93-4.08 (m, 1 H), 3.84 (br d, *J*=12.9 Hz, 1 H), 3.52-3.75 (m, 1 H), 3.07-3.28 (m, 1 H), 2.62-2.74 (m, 1 H), 1.86-1.93 (m, 3 H), 1.43-1.48 (m, 9 H), 1.35 (dd, *J* = 10.8, 6.8 Hz, 3 H), 1.26-1.32 (m, 1 H), 1.07 (dd, *J* = 6.6, 1.7 Hz, 3 H), 0.93 (dd, *J* = 6.6, 2.1 Hz, 3 H)。^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ: -115.65 (s, 1 F), -128.62 (s, 1 F)。*m/z* (ESI, +ve 離子）：607.3 $(M+H)^+$。

【0246】 **步驟7：6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(4-甲基-2-(2-丙烷基)-3-吡啶基)-4-((2S)-2-甲基-4-(2-丙烯醯基)-1-哌啉基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮。**將三氟乙酸（25 mL，324 mmoL）添加4-(6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-3-甲基哌啉-1-甲酸 (3*S*)-三級丁基酯（6.3 g，10.4 mmoL）在DCM（30 mL）中的溶液中。將所得混合物在室溫下攪拌1 h，然後濃縮。將殘餘物溶於DCM（30 mL）中，冷卻至0°C，並依次用DIPEA（7.3 mL，41.7 mmoL）和丙烯醯氯（0.849 mL，10.4 mmoL）的DCM（3

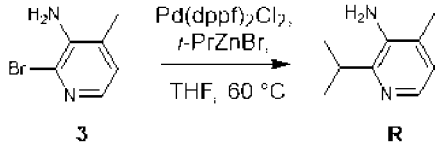
mL；藉由注射器逐滴添加）溶液處理。將反應在0°C下攪拌10 min，然後用半飽和碳酸氫鈉水溶液淬滅，並用DCM萃取（2x）。將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥並濃縮。層析法純化殘留物（矽膠；洗脫液：0–100% EtOAc-EtOH（3：1）/庚烷），隨後使用超臨界流體層析（Chiralpak IC，30 x 250 mm，5 μm，55% MeOH/CO_2，120 mL/min，102巴；收集第一個洗脫峰）進行手性拆分，提供AMG 510（2.25 g，43%產率）。6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(4-甲基-2-(2-丙烷基)-3-吡啶基)-4-((2*S*)-2-甲基-4-(2-丙烯醯基)-1-哌啡基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 10.20 (s, 1 H), 8.39 (d, *J* = 4.8 Hz, 1 H), 8.24-8.34 (m, 1 H), 7.23-7.32 (m, 1 H), 7.19 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H), 6.87 (td, *J* = 16.3, 11.0 Hz, 1 H), 6.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 6.69 (t, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 6.21 (br d, *J* = 16.2 Hz, 1 H), 5.74-5.80 (m, 1 H), 4.91 (br s, 1 H), 4.23-4.45 (m, 2 H), 3.97-4.21 (m, 1 H), 3.44-3.79 (m, 2 H), 3.11-3.31 (m, 1 H), 2.67-2.77 (m, 1 H), 1.91 (s, 3 H), 1.35 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 0.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H)。^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ ppm -115.64 (s, 1 F), -128.63 (s, 1 F). *m/z* (ESI, +ve 離子）：561.2 $(M+H)^+$。

【0247】 如本文所指，AMG 510係6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(4-甲基-2-(2-丙烷基)-3-吡啶基)-4-((2*S*)-2-甲基-4-(2-丙烯醯基)-1-哌啡基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮的M阻轉異構物，其具有下式：



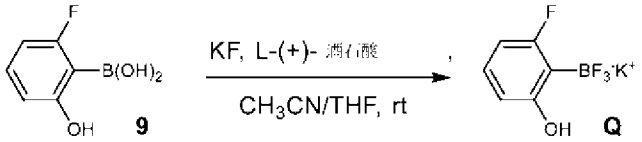
或其藥學上可接受的鹽。

中間體的合成



3 R

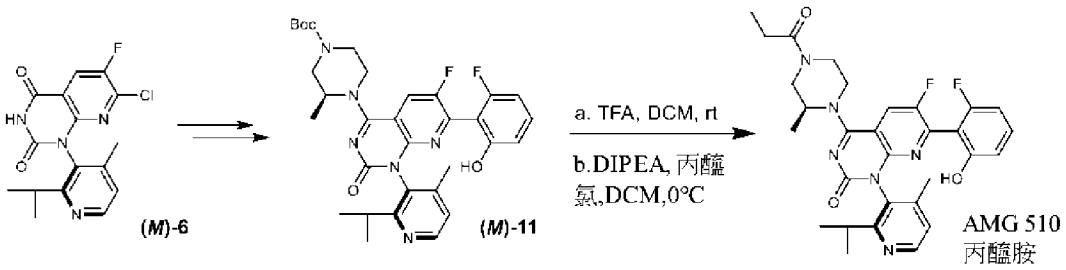
【0248】 **2-異丙基-4-甲基吡啶-3-胺（R）：**將與二氯甲烷複合的**[1,1'**-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯鈀(II)（79 mg，0.10 mmoL）添加到3-胺基-2-溴-4-甲基吡啶（**3**；360 mg，1.9 mmol，Combi-Blocks有限公司（Combi-Blocks），聖地牙哥市, 加利福尼亞州）在THF（4 mL）中的漿液中，將所得混合物用氬氣鼓泡2 min。添加2-丙基溴化鋅（0.5 M THF溶液，5.40 mL，2.7 mmoL），並將所得溶液在60°C下加熱17 h，然後冷卻至室溫。添加水（10 mL）和1N NaOH水溶液（20 mL），並將所得混合物用EtOAc（2x）萃取。將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥並真空濃縮。層析法純化殘留物（矽膠，洗脫液：0-15% MeOH/DCM），供給**R**（284 mg，98%產率）。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.66 p.p.m.(d, J = 4.6 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.72 (br s, 2H), 3.14–3.25 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 6H); *m/z* (ESI, +ve 離子）：151.1 $(M+H)^+$。



【0249】 **(2-氟-6-羥基苯基)三氟硼酸鉀（Q）：**將氟化鉀（44.7 g，770 mmoL）在水（75 mL）中的溶液添加(2-氟-6-羥基苯基)硼酸（**9**；30 g，192 mmol，Combi-Blocks有限公司（Combi-Blocks）, 聖地牙哥市, 加利福尼亞州）在乙腈（750 mL）中的懸浮液中。攪拌2 min後，經10 min添加L-(+)-酒石酸（72.2 g，481 mmoL）的THF（375 mL）溶液。將所得混合物機械攪拌1 h。藉由過濾除去懸浮的固體，並用少量THF洗滌。然後將合併的濾液在真空中部分濃縮，直到固體開始沈澱。將濾液冷卻至-20°C，攪拌16 h，然後緩慢溫熱至環境溫度。添加2-丙醇（20mL），並藉由過濾收集沈澱的固體，並用2-丙醇洗滌，提供27.5g固體。將濾液再次部分濃縮（直到觀察到沈澱），冷卻至-20°C，並攪拌20 min。添加另外的2-丙醇，並藉由過濾收集沈澱的固體，並用2-丙醇洗滌。將兩批固體合併，提供**Q**（34.6g，

82%產率）。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.07 p.p.m.(q, J = 14.7 Hz, 1H), 6.93 (q, J = 7.5 Hz, 1H), 6.30–6.38 (m, 2H)。

AMG 510丙醯胺的合成

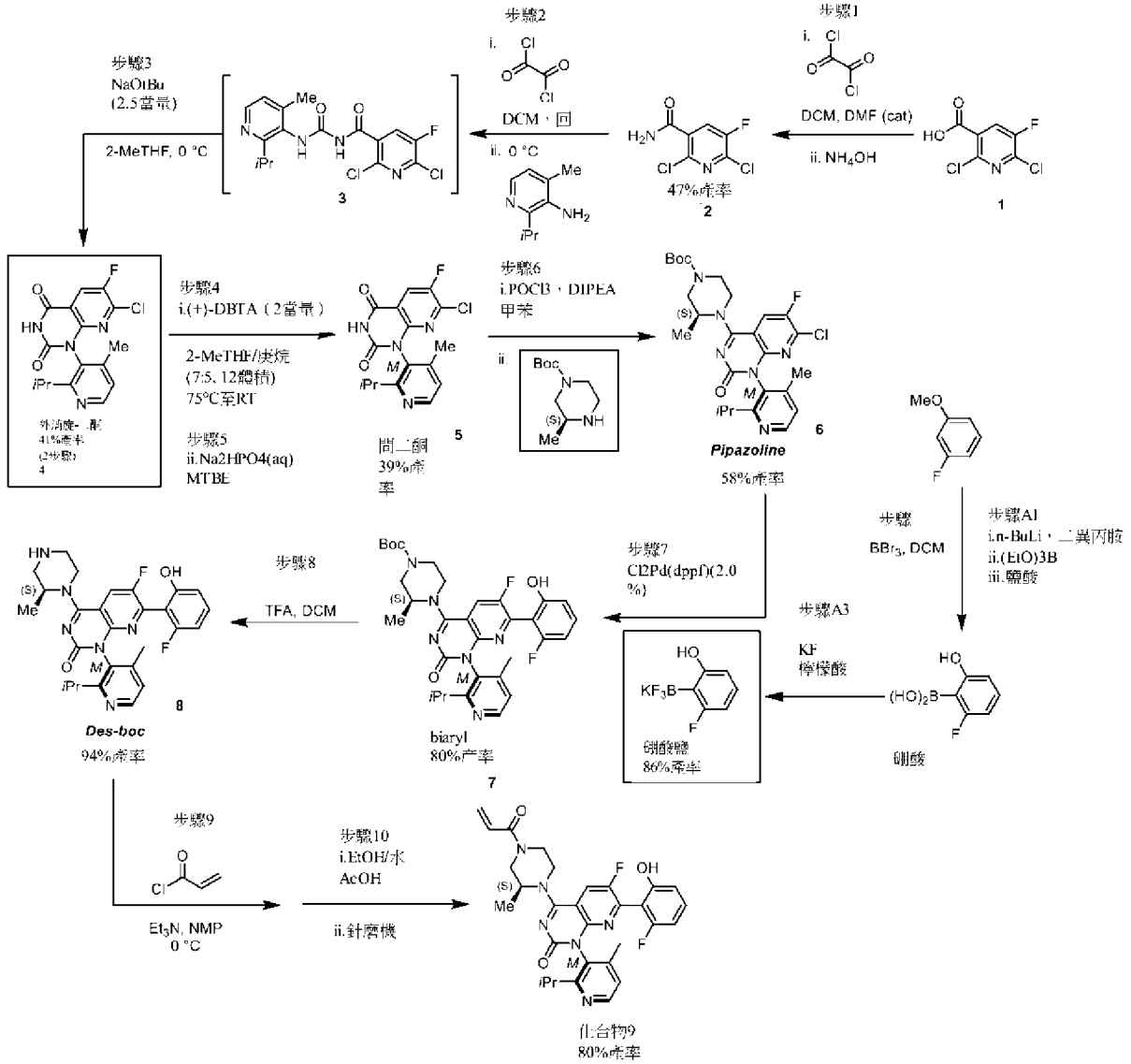


【0250】 **(*M*)-6**和**(*M*)-11：**藉由超臨界流體層析法（Chiralpak AD，21 × 250 mm，5 μm，40% MeOH/CO_2，80 mL/min，110巴；收集到第二個洗脫峰）拆分消旋體**6**，提供 **(*M*)-6**，使用針對外消旋底物報導的程序將其轉化為 **(*M*)-11**。

【0251】 **(*M*)-6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(4-甲基-2-(2-丙烷基)-3-吡啶基)-4-((2*S*)-2-甲基-4-丙醯基-1-哌啡基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮（AMG 510丙醯胺）：**將三氟乙酸（4.0 ml，51.9 mmoL）添加到**(*M*)-11**（0.196 g，0.323 mmoL）在DCM（5 mL）中的溶液中，並將所得混合物在室溫下攪拌20 min。然後將混合物真空濃縮，並將殘餘物吸收於DCM（10 mL）中，冷卻至0°C，並依次用DIPEA（0.169 mL，0.969 mmoL）和丙醯氯（0.016 mL，0.194 mmoL）處理。將所得混合物在0°C下攪拌10 min，然後用飽和碳酸氫鈉水溶液稀釋並用DCM（2x）萃取。將合併的萃取物經無水硫酸鈉乾燥並真空濃縮。層析法純化殘留物（矽膠；洗脫液：0-70% EtOAc-EtOH（3 : 1）/庚烷），提供AMG 510丙醯胺（0.180 g，99%產率）。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 10.20 p.p.m (s, 1H), 8.40 (d, J=5.0 Hz, 1H), 8.27 (br dd, J=15.1, 9.3 Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.21 (br d, J=4.8 Hz, 1H), 6.73 (d, J=8.3 Hz, 1H), 6.69 (t, J=8.9 Hz, 1H), 4.87 (br s, 1H), 4.31 (m, 1.5H), 4.21 (br d, J=13.5 Hz, 0.5H), 3.94 (br d, J=12.2 Hz, 0.5H), 3.82 (br d, J=13.3 Hz, 0.5H), 3.62–3.76 (m, 1H), 3.52–3.62 (m, 0.5H), 3.43–3.51 (m, 0.5H), 3.18 (br dd, J=13.3, 3.3 Hz, 0.5H),

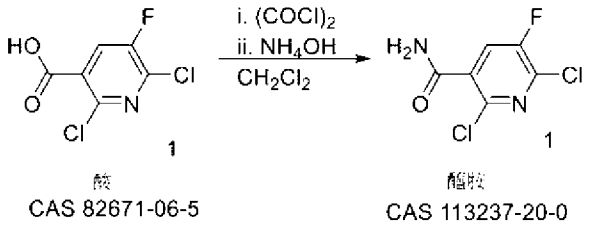
3.06 (br t, J=10.7 Hz, 0.5H), 2.73 (br dd, J=10.5, 6.1 Hz, 1H), 2.33–2.48 (m, 2H), 1.91 (s, 3H), 1.29–1.42 (m, 3H), 0.98–1.12 (m, 6H), 0.94 (d, J=6.6 Hz, 3H); *m/z* (ESI, +ve 離子）: 563.2 $(M+H)^+$。

在替代方法中，合成了AMG 510，並且相關中間體在2018年11月16日提交的美國臨時專利申請號62/768,802中進行了描述。替代方法包括以下步驟，其中在步驟4和5中拆分外消旋-二酮促進阻轉異構物的成功分離：



方法描述

步驟1



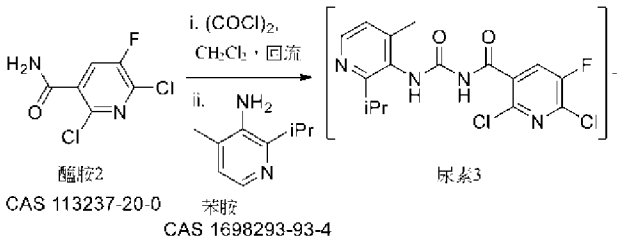
酸
CAS 82671-06-5

醯胺
CAS 113237-20-0

材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	莫耳	理論
2,6-二氯-5-氟-3-吡啶甲酸	82671-06-5	209.99	1.0當量	119.1	25 kg
DCM	74-09-2	84.93	16.51當量	2354.9	200 kg
DMF	68-12-2	73.09	0.068當量	8.1	592 g（627 mL）
草醯氯	79-37-8	126.93	1.25當量	148.9	18.9 kg
氫氧化銨	1336-21-6	35.05	5當量	595.5	40.2 L
水	7732-18-5	18.02	N/A	N/A	261 L

【0252】 向2,6-二氯-5-氟-3-吡啶甲酸（化合物1）（25 kg；119.1 moL）在二氯甲烷（167 kg）和DMF（592 g）中的溶液中添加草醯氯（18.9 kg；148.9 moL），同時保持內部溫度在15°C-20°C之間。添加另外的二氯甲烷（33 kg）作為沖洗液，並將反應混合物攪拌2 h。冷卻反應混合物，然後用氫氧化銨（40.2 L；595.5 moL）淬滅，同時保持內部溫度為0 ± 10°C。將所得漿液攪拌90 min，然後藉由過濾收集產物。將過濾的固體用去離子水（3 x 87 L）洗滌，乾燥，以提供2,6-二氯-5-氟煙醯胺（化合物2）。

步驟2



醯胺2
CAS 113237-20-0

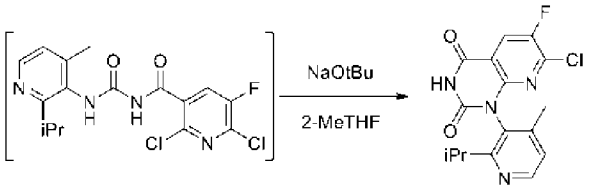
苯胺
CAS 1698293-93-4

尿素3

材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	莫耳	理論
醯胺（2,6-二氯-5-氟煙醯胺）	113237-20-0	209.99	1.0當量	77.8	16.27 kg
草醯氯	79-37-8	126.93	1.2當量	93.8	11.9 kg（7.9 L）
二氯甲烷	75-09-2	84.93	N/A	N/A	730.7 kg（551.5 L）
苯胺DCM溶液 2-異丙基-4-甲基吡啶-3-胺	1698293-93-4	150.22	1.1當量	85.9	12.9 kg（含有苯胺的重量）

【0253】 在反應器A中，向2,6-二氯-5-氟煙醯胺（化合物2）（16.27 kg；77.8 moL）的二氯甲烷（359.5 kg）溶液添加草醯氯（11.9 kg；93.8 moL），同時將溫度保持≤25°C長達75 min。然後將所得溶液加熱至40°C ± 3°C並老化3 h。使用真空，蒸餾溶液以除去二氯甲烷，直到溶液在攪拌器以下。然後添加二氯甲烷（300 kg），並將混合物冷卻至0 ± 5°C。向乾淨的乾燥反應器（反應器B）中，添加2-異丙基-4-甲基吡啶-3-胺（苯胺）（12.9 kg；85.9 moL），隨後添加二氯甲烷（102.6kg）。將苯胺溶液藉由真空蒸餾進行共沸乾燥，同時保持內部溫度在20°C-25°C之間，用另外的二氯甲烷替代，直至藉由KF分析將該溶液乾燥（極限值≤0.05%）。用二氯甲烷將溶液體積調節至約23 L體積。然後將乾燥的苯胺溶液添加到反應器A中，同時在整個添加過程中保持內部溫度為0 ± 5°C。然後將混合物加熱至23°C並老化1 h。將該溶液精細過濾至乾淨的反應器中，得到2,6-二氯-5-氟-N-((2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)胺基甲醯基)煙醯胺（化合物3）的DCM溶液並直接用於下一步。

步驟3



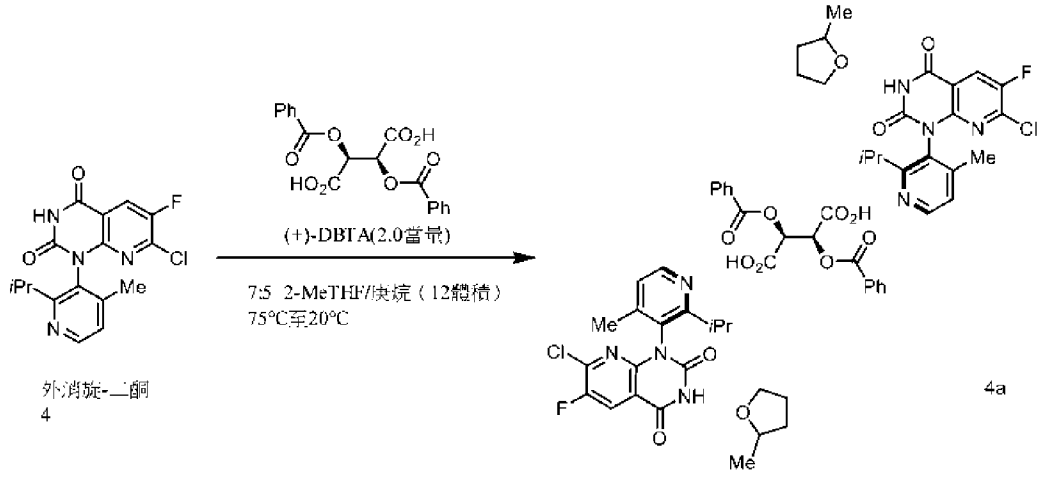
尿素3　　外消旋-二酮4

材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	莫耳	理論
尿素，DCM溶液 2,6-二氯-5-氟-*N*-{[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]胺基甲醯基}吡啶-3-甲醯胺	N/A	385.22	1.0當量	38.9	208.3 kg（含15 kg重量）
2-甲基四氫呋喃	96-47-9	86.13	N/A	N/A	308 kg（358 L）
三級丁醇鈉	865-48-5	96.11	2.0當量	97.8	9.4 kg
氯化銨	12125-02-9	53.49	N/A	430	23.0 kg
鹽酸	7467-01-0	36.46	N/A	41	1.6 kg
硫酸鎂	7487-88-9	120.37	N/A	195	23.5 kg
氯化鈉	7647-14-5	58.44	N/A	282	16.5 kg
庚烷	142-82-5	100.21	N/A	N/A	94 L
10%檸檬酸					75 kg

【0254】 使用真空蒸餾將2,6-二氯-5-氟-*N*-{[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]胺基甲醯基}吡啶-3-甲醯胺（UREA（化合物3））（含有15kg；38.9moL）的二氯甲烷溶液溶劑更換成2-MeTHF，同時保持內部溫度為20°C-25°C。將反應器體積調節至40 L，然後充入另外的2-MeTHF（105.4 kg）。添加三級丁醇鈉（9.4 kg；97.8 mol），同時保持5°C-10°C。將內容物溫熱至23°C並攪拌3 h。然後將內容物冷卻至0-5°C，並添加氯化銨（23.0 kg；430 moL）在60 L去離子水中的溶液。將混合物溫熱至20°C，並添加去離子水（15 L），並進一步老化30 min。停止攪拌並分離各層。除去水層，並向有機層中添加去離子水（81.7 L）。製備濃HCl（1.5 kg）和水（9L）的混合物，然後將其緩慢添加至反應器中，直到所測pH值在4-5之間為止。分離各層，並用2-MeTHF（42.2 kg）反萃取水層。合併兩個有機層，並用10%檸檬酸溶液（75 kg）洗滌，隨後用水（81.7 L）和飽和NaCl（19.8 kg）的混合物洗滌。然後將有機層用飽和碳酸氫鈉（75 kg）洗滌，如果

必要的話，重複進行以達到水溶液目標pH ≥ 7.0。再次用鹽水（54.7 kg）洗滌有機層，然後用硫酸鎂（5 kg）乾燥。過濾混合物以除去硫酸鎂，用2-MeTHF（49.2 kg）沖洗濾床。將合併的濾液和洗滌液在真空下蒸餾至40 L體積。將濃縮的溶液加熱至55°C，並緩慢添加庚烷（10-12 kg）直至達到濁點。經2h將溶液冷卻至23°C，然後經2 h添加庚烷（27.3 kg）。將產物漿液在20°C-25°C下老化3 h，然後過濾並用2-MeTHF（2.8 kg）和庚烷（9 kg）的混合物洗滌。使用氮氣和真空乾燥產物，得到固體7-氯-6-氟-1-(2-異丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮（外消旋-二酮（化合物4））。

步驟4

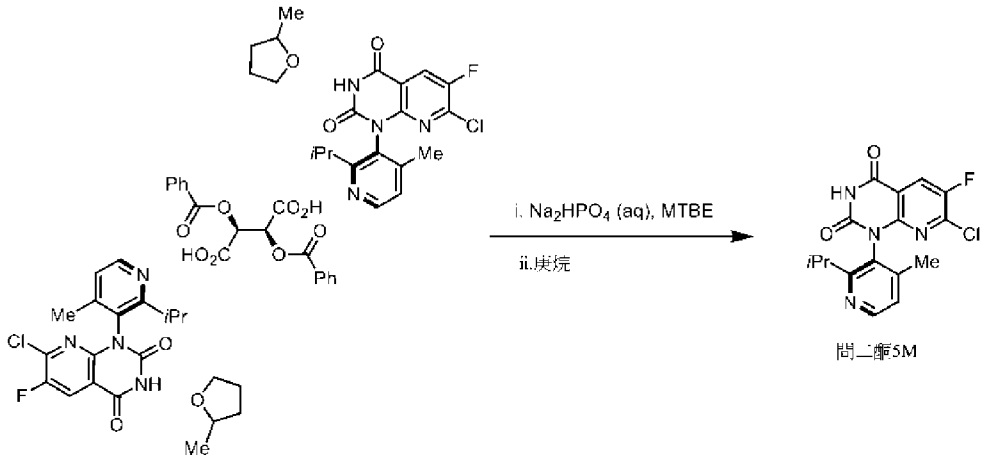


材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	莫耳	理論
外消旋-二酮	N/A	348.76	1.0	-	-
(+)-2,3-二苯甲醯基-D-酒石酸	17026-42-5	358.30	2.0	-	-
2-甲基四氫呋喃	96-47-9	86.13	7.0	-	-
庚烷	142-82-5	100.21	2.0	-	-
庚烷	142-82-5	100.21	3.0	-	-
2-甲基四氫呋喃	96-47-9	86.13	4.0	-	-
庚烷	142-82-5	100.21	2.0	-	-

【0255】 在氮氣氣氛下，向容器中，向化合物4（1.0當量）在2-甲基四氫呋喃（7.0 L/kg）中的攪拌懸浮液添加(+)-2,3-二苯甲醯基-D-酒石酸（2.0當量）。

2-MeTHF係手性的，但用作外消旋混合物。將2-MeTHF的不同鏡像異構物隨機摻入共晶體中。將所得懸浮液溫熱至75°C並在75°C下老化直至觀察到完全溶解（≤30 min）。將所得溶液在75°C下精細過濾至第二容器中。以保持內部溫度高於65°C的速率，向精細過濾的溶液中充入正庚烷（2.0 L/kg）。然後將溶液冷卻至60°C，用晶體（0.01 kg/kg）接種，並老化30分鐘。經4小時將所得懸浮液冷卻至20°C，然後取樣以藉由HPLC進行手性純度分析。向該懸浮液中充入正庚烷（3.0 L/kg），然後在氮氣氣氛下在20°C下老化4小時。將懸浮液過濾，並將分離的固體用（2 : 1）正庚烷 : 2-甲基四氫呋喃（3.0 L/kg）洗滌兩次。將該材料用氮氣和真空乾燥，得到間二酮：DBTA：Me-THF複合物（化合物4a）。

步驟5



間二酮/DBTA/2-MeTHF 共晶4a

間二酮5M

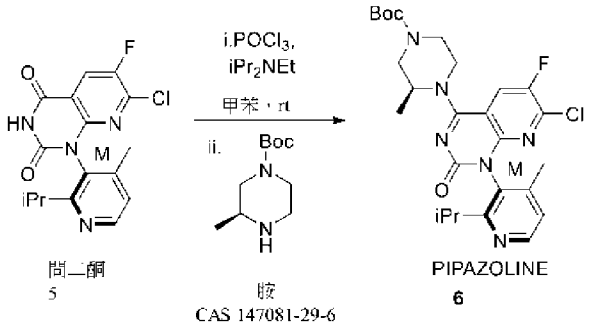
材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	莫耳	理論
間二酮/DBTA/Me-THF共晶體	N/A	1228.08	1.0	74.2	46.9 kg（對於間二酮校正為25.9 kg）
甲基三級丁基醚	1634-04-4	88.15	45.0	17593	2100 L
磷酸氫二鈉	7558-79-4	141.96	2.0	148.4	21.1 kg
USP純淨水					根據需要
硫酸鎂	7487-88-9	120.37	N/A	N/A	25 kg
庚烷	142-82-5	100.20	60.0	19322	2835 L

【0256】 在容器A中，攪拌磷酸氫二鈉（21.1 kg，2.0當量）在去離子水（296.8 L，6.3 L/kg）中的懸浮液，直到觀察到溶解（≥30 min）。在容器B中，將間二酮 : DBTA : Me-THF複合物（組成物4a）[46.9 kg（對於間二酮校正為25.9 kg，1.0當量）]在甲基三級丁基醚（517.8 L，11.0 L/kg）中的懸浮液攪拌15至30分鐘。將來自容器A的所得溶液添加至容器B，然後將混合物攪拌超過3小時。停止攪拌，並將雙相混合物分離超過30分鐘。除去下面的水相，然後用甲基三級丁基醚（77.7 L，1.7 L/kg）反萃取。將有機相在容器B中合併，並用硫酸鎂（24.8 kg，0.529 kg/kg）乾燥。將來自容器B的所得懸浮液攪拌超過三小時，並且然後過濾至容器C中。向容器B中充入甲基三級丁基醚（46.9 L，1.0 L/kg）沖洗液，並且然後過濾至容器C中。將容器C的內容物冷卻至10°C，然後在真空下蒸餾，同時緩慢溫熱至35°C。繼續蒸餾直到收集到320-350 kg（6.8-7.5 kg/kg）甲基三級丁基醚。將容器C的內容物冷卻至20°C後，經1小時充入正庚烷（278.7 L，5.9 L/kg），然後在真空下蒸餾，同時緩慢溫熱至35°C。繼續蒸餾直到收集到190-200 kg（4.1-4.3 kg/kg）的甲基三級丁基醚和正庚烷的混合物。將容器C中的內容物冷卻至20°C後，經1小時第二次充入正庚烷（278.7 L，5.9 L/kg），然後在真空下蒸餾，同時緩慢溫熱至35°C。繼續蒸餾直到收集到190-200 kg（4.1-4.3 kg/kg）的甲基三級丁基醚和正庚烷的混合物。將容器C的內容物冷卻至20°C後，經1小時第三次充入正庚烷（195.9 L，4.2 L/kg），然後採樣以藉由GC分析溶劑組成。繼續攪拌容器C的懸浮液超過一小時。過濾該懸浮液，然後用正庚烷（68.6 L，1.5 L/kg）沖洗液從容器C中洗滌。將分離的固體在50°C下乾燥，並提交樣本便於儲備。得到7-氯-6-氟-(1M)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2,4(1*H*,3*H*)-二酮（間二酮）化合物5M。

【0257】 以上突出顯示的第一代方法已成功按比例放大至200+ kg外消旋-二酮起始材料（化合物5）。在此方法中，用熱力學穩定的外消旋-二酮晶體形

式（表現出低溶解度）接種會導致批次失敗。基於我們的後續研究，我們發現藉由調節庚烷進料時間表來提高DBTA當量並降低種子溫度，提高了方法的穩健性。改善之方法可抵抗熱力學穩定的外消旋-二酮晶體形式的存在，並促進阻轉異構物的成功分離。隨後的批次將合併改善之方法進行大規模製造。

步驟6

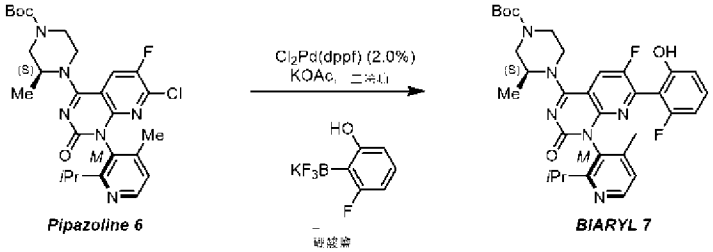


材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	莫耳	理論
間二酮	N/A	348.76	1當量	9.8	3.7 kg
甲苯	108-88-3	92.14	N/A	375	34.6 kg（40 L）
磷醯氯	10025-87-3	153.33	1.2當量	11.7	1.8 kg（1.1 L）
N,N-二異丙基乙胺	7087-68-5	129.24	3.0 equiv.	29.4	3.8 kg（5.1 L）
(s)-1-Boc-3-甲基哌啡	147081-29-6	200.28	1.1當量	10.8	2.214 kg
碳酸氫鈉	144-55-8	84.01	N/A	N/A	973 g
二氯甲烷	75-09-2	84.93	N/A	871	74 kg（55.6 L）
氯化鈉	7647-14-5	58.44	N/A	103	6.0 kg
乙酸乙酯	141-78-6	88.11	N/A	288	25.4 kg（28.2 L）

【0258】 將7-氯-6-氟-(1*M*)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮（間二酮）（3.7 kg；9.8 moL）與10.5 kg甲苯在反應器（A）中合併，蒸餾到只剩油以除去水，同時保持設定點為45°C。將甲苯（21 kg）添加到殘餘物中，並將混合物在40°C-45°C下攪拌30 min。將內容物冷卻至22°C，然後添加磷醯氯（1.8 kg；11.7 moL）。將混合物冷卻至0-5°C，然後添加N,N-二異丙基乙胺（2.5 kg；19.34 moL），同時保持溫度< 5°C。將該溶液在22°C下老化3 h。在單獨的反應器（B）中，將(s)-1-boc-3-甲基哌啡（2.21 kg；10.8 moL）

和N,N-二異丙基乙胺（1.26kg；9.75moL）合併在甲苯（6 kg）中，然後充入反應器（A）中，同時保持< 25°C。將反應混合物在22°C下老化15 min，然後用碳酸氫鈉（973g）的水（12.9 L）溶液淬滅，同時保持溫度 < 25°C。將混合物攪拌30 min，然後添加DCM（36.8 kg），同時繼續攪拌1 h。使各層分離，並將下部有機層排至反應器（C）。用DCM（18.4 kg）反萃取反應器（A）中的水層，將合併的有機層用鹽水溶液（6.0 kg NaCl；16.5 kg去離子水）洗滌。將有機層在大氣壓下蒸餾，保持內部溫度在45°C-55°C之間。在蒸餾過程中將DCM替代以共沸乾燥溶液。蒸餾後，使用DCM將溶液體積調節至19 L。將該溶液冷卻至30°C，並精細過濾。將濾液與乙酸乙酯（8.5 kg）合併，然後在大氣壓下蒸餾直到在接收器中收集到11-13 kg。將溶液用30g真品接種，然後在25°C-30°C下老化1 h，然後在45-55°C內部溫度下於大氣壓下進一步蒸餾，直到收集到8.2 kg餾出液為止。將漿液冷卻至22°C並老化過夜，然後進一步冷卻至0-5°C。藉由過濾收集產物，並用乙酸乙酯洗滌兩次（每次4.2 kg）。將濾餅用氮氣和真空乾燥，得到(3*S*)-4-{7-氯-6-氟-(1*M*)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基}-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯（化合物6，PIPAZOLINE）。

步驟 7



Pipazoline 6　　*BIARYL 7*

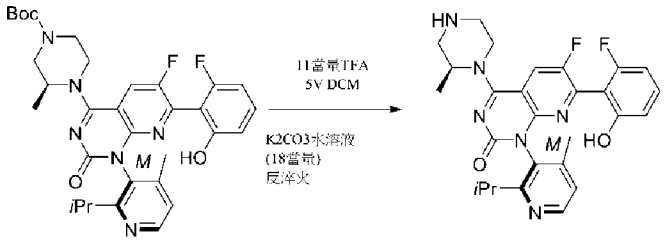
材料	CAS #	MW (g/mol)	當量/體積	莫耳	理論
[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯化鈀(II)	72287-26-4	731.714	0.020	1.01	0.74 kg
二氯甲烷	75-09-2	84.93	-	N/A	400 kg

1,4-二噁𠯿	123-91-1	88.1052	5.0	N/A	168 kg
乙二胺四乙酸二鈉二水合物	6381-92-6	336.207	1.0	45.2	15.2 kg
庚烷	142-82-5	100.21	-	-	200 kg
氮氣	-	-	-	-	根據需要
Pipazoline	N/A	531.0	1.0	45.2	24.0 kg
乙酸鉀	127-08-2	98.1417	5.0	225.99	22.2 kg
三氟(2-氟-6-羥基苯基)硼酸鉀	N/A	233.03	1.20	54.24	12.6 kg
2-丙醇	67-63-0	66.10	-	N/A	850 kg
矽硫醇	N/A	N/A	-	N/A	13.2 kg
氫氧化鈉	1310-73-2	40.00	-	-	6.5 kg
USP純淨水	-	-	-	-	根據需要

【0259】 向反應器中添加脫氣的二噁𠯿（74.2 kg）、(3S)-4-{7-氯-6-氟-(1M)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基}-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯（化合物6，Pipazoline）（24.0 kg，45.2 moL）、乙酸鉀（22.2 kg，45.2 moL）和(dppf)$PdCl_2$（0.74 kg，1.01 moL）。將反應器用氮氣惰性化。向溶液中鼓泡入氮氣直至氧氣含量 < 500 mg/L。將反應加熱至87.5°C。將三氟(2-氟-6-羥基苯基)硼酸鉀（12.6 kg，54.3 moL）在脫氣的二噁𠯿（49.4 kg）和脫氣的水（14.4 kg）中的含氧量 < 500 mg/L的溶液轉移到反應中，保持內部溫度為82.5°C ± 7.5°C。將反應調節至87.5°C ± 1.5°C，並攪拌75 min ± 15 min。向反應器中充入1.0 M EDTA溶液（47.3 kg），隨後充入水（40.1 kg），同時保持內部溫度為85°C ± 5°C。經 > 2 h將反應混合物冷卻至20°C ± 3°C，然後攪拌 > 16 h。將反應過濾，並將粗固體用水（3 × 120 kg）沖洗。將固體用庚烷（28.8 kg）和2-丙醇（33.1 kg）的混合物沖洗，然後在 < 50°C下乾燥 > 10 h。在乾淨的反應器中裝入粗固體和二氯甲烷（240 kg）。將內容物在20°C ± 5°C下攪拌 > 30 min。向反應器中添加矽硫醇（144 kg）和二氯甲烷（14.9 kg）。將反應在20°C ± 5°C下攪拌18 h。將反應過濾並用二氯甲烷（84 kg）沖洗。蒸餾溶液，並將溶劑交換為2-丙醇。將反應加熱至60°C ± 3°C，充入庚烷（108 kg），同時保持反應溫度為60°C ± 3°C。將反應攪拌45 min，然後冷卻並在20°C ± 5°C下攪拌2.5 h。

將反應過濾並用50體積%庚烷/2-丙醇（61.9 kg）沖洗。將分離出的固體在 < 50°C 下乾燥 > 12 h，得到(3S)-4-{6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-(1M)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基}-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯（化合物7，BIARYL）。

步驟8



BIARYL 7 *Des-BOC 8*

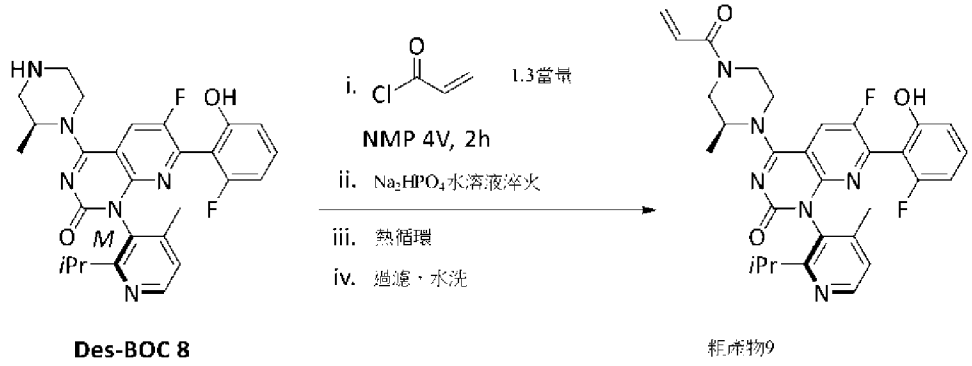
一般注釋：所有當量和體積均參考BIARYL 7報告

材料	**CAS #**	**MW（g/mol）**	**當量/體積**	**莫耳**	**理論**
BIARYL 7	NA	606.67	1.0當量	5.27	2.75 kg
TFA	76-05-1	114.02	11當量	49.7	5.67 kg
DCM	74-09-2	84.93	5體積	NA	13.71 L
甲醇	67-56-1	32.04	5體積	NA	13.71 L
水	7732-18-5	18.02	20體積	NA	54.8 L
碳酸鉀	584-08-7	138.20	18當量	94.91	11.24 kg
DCM	74-09-2	84.93	1體積	NA	2.75 L
水	7732-18-5	18.02	10體積	NA	27.5 L
水	7732-18-5	18.02	10體積	NA	27.5 L

【0260】 向反應器中添加(3S)-4-{6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-(1*M*)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]-2-氧-1,2-二氫吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-4-基}-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯（化合物 7，BIARYL）（2.75 kg，5.27 moL）、DCM（13.7 L）和 TFA（5.67 kg，49.7 moL）。將反應在 20°C ± 5°C 下攪拌 8-16 h。向第二反應器中添加碳酸鉀（11.24 kg）、水（54.8 L）和甲醇（13.7 L）以形成均勻溶液。經 2 h 將反應混合物添加碳酸鉀溶液中。將混合物在 20°C ± 5°C 下再攪拌 12 h。過濾所得漿液，並用水（2 × 27.5 L）沖洗。將濕濾餅乾燥 24 h，得到 6-氟-7-(2-

氟-6-羥基苯基)-4-[(2S)-2-甲基哌啡-1-基]-(1M)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮（化合物 8，DESBOC）。

步驟9



一般注釋：所有當量和體積均參考Des-BOC報告

材料	**CAS #**	**MW（g/mol）**	**當量/體積**	**mmol**	**質量**	**體積**
Des-BOS	NA	506.56	1.0當量	308.4	156.25 g	-
丙烯醯氯[1]	814-68-6	90.51	1.3當量	401.0	36.29 g	-
						-
NMP N-甲基吡咯啶酮[2]	872-50-4	99.13	4體積	NA	-	625 mL
水	7732-18-5	18.02	20體積	NA	3125 g	3125 mL
Na_2HPO4 [3]	7558-79-4	141.96	4當量	1233.6	175.12 g	-
水	7732-18-5	18.02	20體積	NA	3125 g	3,125 mL

【0261】 將 6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-4-[(2*S*)-2-甲基哌啡-1-基]-(1M)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮（化合物 8，DESBOC）（156.25 g）與 N-甲基吡咯啶酮（625 mL）合併並在環境溫度下攪拌。向所得溶液中添加丙烯醯氯（36.29 g；401.0 mmoL），同時保持 < 30°C 內部溫度。在 25°C 下將內容物攪拌 2 h。在單獨的反應器中，製備磷酸二鈉（175.1 g；1234 mmoL）在去離子水（3.1 L）中的溶液。然後在 25°C 下經 > 2 h 將粗產物溶液轉

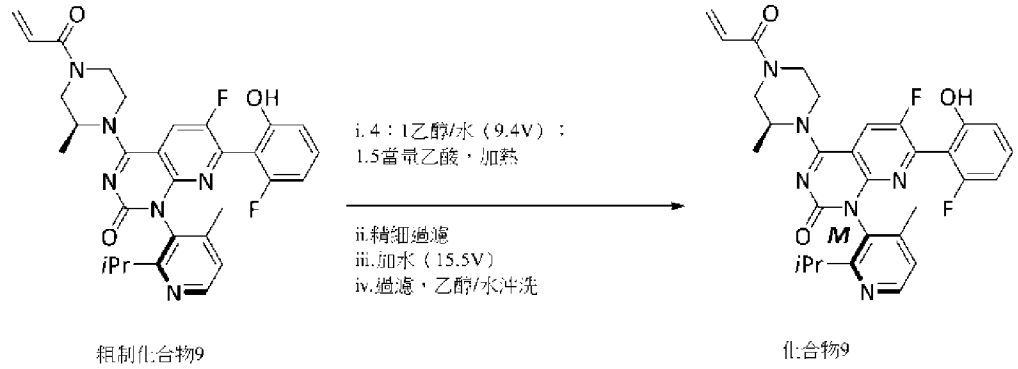
[1] 在此規模上，經 7 min 添加丙烯醯氯。避免過度冷卻反應。當起始材料與產物發生反應時，更冷的反應溫度會導致更慢的反應時間，從而導致更高水平的 m/z 1066 雜質。理想溫度範圍是 22°C-25°C

[2] 幹濾餅的 NMP 含量通常為 1 wt%-2 wt%。

[3] 表中的磷酸二鈉以無水物計。可以使用水合物，相應地調節質量以獲得所需的 mmol。

移到含有磷酸二鈉溶液的反應器中。在添加到一半時中將漿液加熱至 45°C，並且在完全添加之後，在相同溫度下老化 2 h。將混合物冷卻至 25°C 並老化 4 h，然後藉由真空過濾收集固體。用水洗滌固體兩次（每次 1.5 L），將產物在氮氣和真空下乾燥，得到產物 6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-(1M)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]-4-[(2S)-2-甲基-4-(丙-2-烯醯基)哌啉-1-基]吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮（粗製化合物 9）。[4]

步驟10



粗制化合物9　　化合物9

一般注釋：所有當量和體積均參考粗藥物物質報告

材料	**CAS #**	**MW（g/mol）**	**當量/體積**	**mmol**	**質量**	**體積**
粗製化合物9	NA	560.60	1.0當量	253.9	142.33 g	-
乙醇（200 proof）	64-17-5	-	7.5 V	-	-	1067 mL
USP水	-	18.02	1.9V	-	-	270 mL
乙酸	64-19-7	60.05	1.5當量	380.8	22.87 g	21.82 mL
WFI水	-	18.02	15.5體積	-	-	2200 mL
乙醇（用於洗滌）	64-17-5	-	2.5 V	-	-	356 mL
WFI水（用於洗滌）	-	-	5.0 V	-	-	712 mL
化合物9種子[5]	-	560.60	0	-	0.3-0.7 g	-

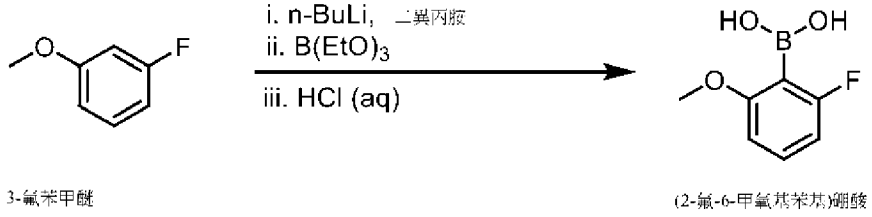
【0262】 將 6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-(1*M*)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]-4-[(2*S*)-2-甲基-4-(丙-2-烯醯基)哌啉-1-基]吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮（粗

[4] 此前導批次的結果：154.06 g 分離質量，93% wt，82.9%校正後的產率，18,000 ppm NMP

[5] 藉由研磨工具研磨或如果沒有研磨工具（研缽/研杵），則藉由其他類型的機械碾磨來減小細微性時，種子表現最佳。實際利用的種子將基於種子的可用性。種子目標量是 0.25%-0.5%。

化合物 9）（142.33 g；253.9 mmoL）與乙醇（996 mL）和水（270 mL）合併。添加乙酸（21.8 ml；380.8 mmoL），並將混合物加熱至 75°C 以形成溶液，將其精細過濾至乾淨的反應器中。將該溶液冷卻至 45°C，然後添加水（1067 mL），同時保持內部溫度 > 40°C。將該溶液用真品化合物 9 接種，將所得混合物老化 30 min。然後經 2 h 添加水（1138 mL）。將混合物冷卻至 25°C 並老化 8 h，然後藉由真空過濾收集固體，並使用乙醇（355.8 mL）和水（711.6 mL）的混合物洗滌。使用真空和氮氣乾燥固體，以獲得 6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-(1*M*)-1-[4-甲基-2-(丙烷-2-基)吡啶-3-基]-4-[(2*S*)-2-甲基-4-(丙-2-烯醯基)哌啉-1-基]吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮（化合物 9）。

步驟A1反應方案和進料表



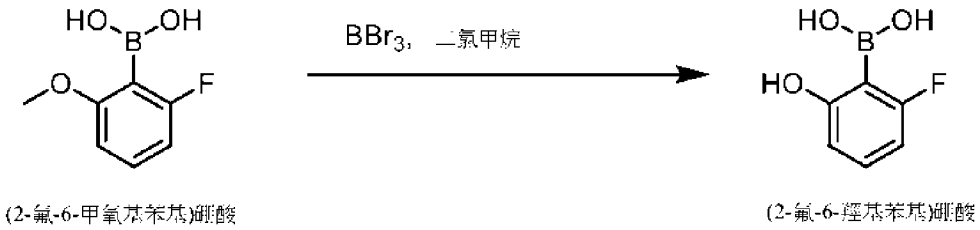
3-氟苯甲醚　　(2-氟-6-甲氧基苯基)硼酸

材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	mol	質量（g）	體積（L）
3-氟苯甲醚	456-49-5	126.13	1.0	1.19	150	0.136
正丁基鋰（2.5 M 己烷）	109-72-8	64.06	1.5	1.78	N/A	0.712
二異丙胺	108-18-9	101.19	1.4	1.66	168	0.233
硼酸三乙酯	150-46-9	145.99	2.0	2.38	347.5	0.405
四氫呋喃	109-99-9	72.11	12體積	N/A	N/A	1.8
鹽酸（2N）	7647-01-0	36.46	10體積	N/A	N/A	1.5
甲基三級丁基醚	1634-04-4	88.15	12體積	N/A	N/A	1.8
庚烷	142-82-5	100.20	10.5體積	N/A	N/A	1.575

【0263】 向反應器A中充入THF（6體積）和二異丙胺（1.4當量）。將所得溶液冷卻至-70°C，並緩慢添加n-BuLi（2.5 M己烷，1.5當量）。加完後，緩慢添加3-氟苯甲醚（1.0當量）在THF（6體積）中的溶液，並在-70°C下保持5 min。緩慢添加$B(EtO)_3$（2.0當量），並在-70°C下保持10 min。將反應混合物用2N HCl

淬滅。用MTBE（3 x 4體積）萃取淬滅的反應混合物。將合併的有機相濃縮至1.5～3總體積。逐滴添加庚烷（7-9體積），並將混合物冷卻至0-10°C，攪拌3 h。將混合物過濾並用庚烷（1.5體積）沖洗。將固體在 < 30°C下在氮氣下乾燥，得到(2-氟-6-甲氧基苯基)硼酸。

步驟A2反應方案和進料表



(2-氟-6-甲氧基苯基)硼酸　　(2-氟-6-羥基苯基)硼酸

材料	CAS #	MW（g/mol）	當量/體積	mol	質量（g）	體積（L）
(2-氟-6-甲氧基苯基)硼酸。	78495-63-3	169.95	1.0	0.118	20	N/A
三溴化硼	10294-33-4	250.52	1.5	0.177	44.2	0.017
二氯甲烷	75-09-2	84.93	4體積	N/A	N/A	0.080
水	7732-18-5	18.02	13體積	N/A	N/A	0.26
甲基三級丁基醚	1634-04-4	88.15	13體積	N/A	N/A	0.26
庚烷	142-82-5	100.20	10體積	N/A	N/A	0.20

【0264】 向反應器A中充入二氯甲烷（4體積）和2-氟-6-甲氧基-4-甲基苯基硼酸（1當量）。將反應混合物冷卻至-30°C，並逐滴添加1.5 BBr_3（1.5當量）。加完後，將混合物溫熱至25°C，並攪拌2 h。將反應混合物在冰冷的（0-5°C）水（10體積）中淬滅。添加MTBE（10體積），將混合物溫熱至25°C，並攪拌1-2 h或直至所有固體溶解。分離水相，並用MTBE（3體積）萃取。用水（3體積）洗滌合併的有機萃取物，然後濃縮至1總體積。將庚烷（10體積）添加到混合物中並攪拌2 h。藉由過濾分離所得產物，並在 < 30°C下乾燥，得到(2-氟-6-羥基苯基)硼酸。

步驟A3反應方案和進料表



硼酸　　硼酸鹽

材料	CAS #	MW (g/mol)	當量/體積	mol	質量 (kg)	體積 (L)
(2-氟-6-羥基苯基)硼酸	1256345-60-4	155.92	1.0	89.79	14.00	N/A
檸檬酸一水合物	5949-29-1	210.14	1.64	147.26	30.94	N/A
乙腈	75-05-8	41.05	21體積	N/A	220.1	294
氟化鉀	7789-23-3	58.10	4.00	359.16	20.87	N/A
USP水	7732-18-5	18.02	2.0體積	N/A	28.00	28.00
矽藻土	N/A	N/A	N/A	N/A	7.00	N/A
2-丙醇	67-63-0	60.10	25體積	N/A	275	350

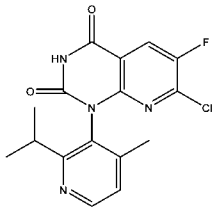
步驟A3

【0265】 在反應器（反應器A）中將氟化鉀（21.0 kg；20.87 moL）與水（28 L）合併，並將內容物攪拌30 min。在單獨的反應器（反應器B）中，在25°C下充入(2-氟-6-羥基苯基)硼酸（14.00 kg，89.79 moL），隨後充入乙腈（206.1 kg）和檸檬酸（30.94 kg；147.26 moL）。在25°C下將反應器A的內容物添加反應器B中，並在該溫度下攪拌10 h。通過矽藻土床（7.0 kg）過濾反應混合物，並用乙腈（42 kg）沖洗。將濾液與異丙醇（56 kg）合併，然後在真空下在＜35°C的溫度下蒸餾，用異丙醇替代反應器的蒸餾體積，並根據需要重複進行以完成從乙腈到異丙醇的溶劑交換。將漿液冷卻至15°C並老化1 h，然後過濾並用28kg異丙醇洗滌。使用真空和氮氣乾燥濾餅並包裝,得到化合物A3。

間二酮化合物5的拆分

間二酮中間體的層析拆分

【0266】 使用了許多手性層析技術和方法以從化合物4中分離間二酮。該技術和固定相在本領域中係熟知的，並列於表1中。



化合物4

[表1]

技術	固定相	流動相	產率^
SFC	Chiralpak® AD	40%甲醇/60% CO2*	約95%
HPLC	Chiralpak® AD	90/10/0.1 乙醇/甲醇/三乙胺	約94%
HPLC	Chiralpak® IG	60/40/0.1 乙醇/甲醇/三乙胺	約92%
模擬移動床（SMB）	Chiralpak® IC	乙腈	約96%

【0267】 ^產率定義為以 > 98%ee的所需純度回收的可用間二酮的%。

*該分離進行了多次。對於每批材料，可能已對流動相進行了稍微修改，以適應批次中的變化。用於純化的其他流動相包括：

1) 25/75甲醇/CO_2，

2) 30/70甲醇/CO_2，以及

3) 50/50甲醇/CO_2。

【0268】 SFC、HPLC和SMB技術係本領域熟知的，並且Chiralpak®固定相可購自商業來源，例如飛世爾科技公司（Fisher Scientific）和大賽璐公司（Daicel Corporation）。

【0269】 然而，期望開發出更有效之方法來分離間二酮（化合物5）。

經典拆分

【0270】 本發明關於用於間/對-二酮外消旋體（化合物4）的可行的經典拆分方法的開發。

【0271】 總共進行了100次共晶篩選實驗，並鑒定出三種潛在的二酮的共晶。基於殘留固體中，間/對-二酮的最高面積比和上清液中的最低面積比，選擇(+)-2,3-二苯甲醯基-D-酒石酸（DBTA）作為手性試劑進行拆分。

【0272】 根據100次共晶篩選實驗和20次更多的溶劑篩選的結果，發現2-MeTHF/正庚烷比其他溶劑系統提供更好的拆分結果。基於間-二酮共晶和對-二酮共晶在不同比例的2-MeTHF和正庚烷下的溶解度結果，選擇2-MeTHF/正庚烷（1.4 : 1，v/v）作為最佳溶劑組成物進行拆分。

【0273】 為了找出手性拆分結晶過程中轉化為二酮外消旋體或間/對-二酮的任何可能形式，確定間-二酮共晶、對-二酮共晶、間+對-二酮共晶混合物（1 : 1，w/w）、二酮外消旋體和DBTA在不同溫度下在2-MeTHF/正庚烷（1.4 : 1，v/v）中的溶解度。在不同溫度下持續7天未觀察到間-二酮共晶和對-二酮共晶的形式變化。但是，在不同溫度下將間+對-二酮共晶混合物（1 : 1，w/w）的混合物攪拌7天后，獲得C型二酮外消旋體。在相應溫度下攪拌二酮外消旋體7天后，觀察到D型二酮外消旋體（20°C和30°C）或C型二酮外消旋體（40°C、50°C、60°C和65°C）。在所有溫度下，DBTA的溶解度均為約100 mg/mL。

【0274】 為了進一步優化拆分過程，基於平衡溶解度結果繪製了間/對-二酮共晶的三元相圖，並且未獲得共晶點，這可能是因為當存在間-二酮共晶和對-二酮時，C型外消旋體會結晶出來。基於平衡溶解度結果繪製了間/對-二酮的另一個三元相圖，並且未獲得共晶點，這可能是因為當存在間-二酮共晶和對-二酮時，C型或D型二酮外消旋體會結晶出來。

【0275】 總之，已鑒定出用於拆分二酮外消旋體的手性試劑（DBTA）和溶劑系統（（2-MeTHF/正庚烷（1.4 : 1，v/v））。使用該拆分試劑和溶劑系統進行小規模結晶過程，對間-二酮的產率可達39%，ee純度可達99%。另外，在篩選實驗中觀察和研究了二酮外消旋體的多態性。

【0276】 本發明的化合物還可以與治療噁心的藥學活性藥劑組合使用。可以用於治療噁心的藥劑的實例包括：屈大麻酚；格拉司瓊；甲氧氯普胺；昂丹司瓊；和丙氯拉咁；或其藥學上可接受的鹽。

【0277】 本發明的化合物還可以與放射療法、激素療法、手術和免疫療法組合使用，該等療法係熟悉該項技術者所熟知的。

【0278】 由於本發明的一個方面考慮了用可以分開投與的藥學活性化合物的組合治療疾病/病症，因此本發明進一步關於以套組形式組合單獨的藥物組成物。該套組包含兩種單獨的藥物組成物：本發明的化合物和第二藥物化合物。該套組包含用於容納單獨組成物的容器，例如分開的瓶子或分開的箔袋。容器的其他實例包括注射器、盒和袋。通常，該套組包含單獨組分的使用說明。在較佳的是以不同劑型（例如，口服和腸胃外）投與單獨組分時，以不同劑量間隔投與時，或在處方醫師或獸醫需要組合中個別組分的滴定時，套組形式係特別有利的。

【0279】 這種套組的實例係所謂的泡罩包裝。泡罩包裝在包裝工業中係熟知的，並且被廣泛用於藥物單位劑型（片劑、膠囊等）的包裝。泡罩包裝通常由相對堅硬的材料的片組成，該材料的片覆蓋有較佳的是透明塑膠材料的箔。在包裝過程中，在塑膠箔中形成了凹槽。凹槽具有待包裝的片劑或膠囊的大小和形狀。然後，將片劑或膠囊放入凹槽中，將相對堅硬的材料的片在箔的與凹槽形成方向相反的面上密封在塑膠箔上。結果，片劑或膠囊被密封在塑膠箔和片之間的凹槽中。較佳的是，片的強度使得可以藉由在凹槽上手動施加壓力而在片中的凹槽處形成開口，從而可從泡罩包裝中取出片劑或膠囊。然後可以藉由所述開口取出片劑或膠囊。

【0280】 可能需要在套組上提供記憶輔助，例如以片劑或膠囊旁邊的數字的形式，其中數字對應於應攝入如此指定的片劑或膠囊的方案的天數。這種記憶輔助的另一個實例係印在卡上的日曆，例如，如下所示：「第一周，星期一，星期二...等...第二周，星期一，星期二，...」等。記憶輔助的其他變化將是易於瞭解的。「日劑量」可以是在給定的一天服用的單個片劑或膠囊或若干個丸劑

或膠囊。而且，本發明的化合物的日劑量可以由一個片劑或膠囊組成，而第二種化合物的日劑量可以由若干個片劑或膠囊組成，且反之亦然。記憶輔助應反映這一點，並有助於正確地投與活性劑。

【0281】 在本發明的另一特定實施方式中，提供了一種分配器，該分配器被設計成按其預期用途的順序一次分配一次日劑量。較佳的是，分配器配備有記憶輔助，以便進一步促進對方案的依從性。這種記憶輔助的一個實例係機械計數器，該機械計數器指示已分配的日劑量數。這種記憶輔助的另一個實例係電池供電的微晶片記憶體，該微晶片記憶體與液晶讀數或聽覺提醒訊號相偶聯，例如，該讀數或訊號讀出上一次服用日劑量的日期和/或提醒下一次服藥的日期。

【0282】 如果需要，可以將本發明的化合物和其他藥物活性化合物口服、直腸、腸胃外（例如靜脈內、肌肉內或皮下）腦池內、陰道內、腹膜內、膀胱內、局部（例如粉末、軟膏劑或滴劑）、或以經頰或鼻腔噴霧劑投與給患者。考慮了熟悉該項技術者用來投與藥學活性藥劑的所有方法。

【0283】 適用於腸胃外注射的組成物可包含生理學上可接受的無菌水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液、以及用於重構成無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。適合的水性和非水性載體、稀釋劑、溶劑或媒劑的實例包括水、乙醇、多元醇（丙二醇、聚乙二醇、甘油等）、其適合的混合物、植物油（例如橄欖油）和可注射的有機酯（例如油酸乙酯）。可以例如藉由使用例如卵磷脂的包衣，在分散液的情況下，藉由保持所需的粒徑以及藉由使用表面活性劑，來保持適當的流動性。

【0284】 該等組成物還可含有佐劑，例如防腐劑、濕潤劑、乳化劑和分散劑。藉由添加各種抗細菌劑和抗真菌劑（例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等）可以防止微生物污染。還可能希望包括等滲劑，例如糖、氯化鈉等。

可藉由使用延遲吸收的藥劑（例如單硬脂酸鋁和明膠）來實現可注射藥物組成物的延長吸收。

【0285】 用於口服投與的固體劑型包括膠囊、片劑、粉末和顆粒。在這樣的固體劑型中，將活性化合物與以下混合：至少一種惰性慣用賦形劑（或載體）（例如檸檬酸鈉或磷酸二鈣）或 (a) 填充劑或增量劑，例如澱粉、乳糖、蔗糖、甘露醇和矽酸；(b) 黏合劑，例如羧甲基纖維素、藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖和阿拉伯膠；(c) 保濕劑，例如甘油；(d) 崩解劑，例如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些複合的矽酸鹽和碳酸鈉；(a) 溶液緩凝劑，例如石蠟；(f) 吸收促進劑，例如季銨化合物；(g）潤濕劑，例如鯨蠟醇和單硬脂酸甘油酯；(h) 吸附劑，例如高嶺土和膨潤土；以及 (i) 潤滑劑，例如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉或其混合物。在膠囊和片劑的情況下，劑型還可包含緩衝劑。

【0286】 相似類型的固體組成物也可以在使用例如乳糖（lactose或milk sugar）以及高分子量聚乙二醇等賦形劑的軟和硬填充明膠膠囊中用作填充劑。

【0287】 固體劑型例如片劑、糖衣丸、膠囊、丸劑和顆粒可以用包衣和外殼，例如腸溶包衣和本領域熟知的其他形式製備。它們還可以含有遮光劑，並且也可以具有這樣的組成物，使得它們以延遲的方式在腸道的某些部分中釋放一種或多種活性化合物。可以使用的包埋組成物的實例係聚合物質和蠟。若適當，活性化合物還可呈具有一種或多種上述賦形劑的微囊封形式。

【0288】 用於口服投與的液體劑型包括藥學上可接受的乳液、溶液、懸浮液、糖漿和酏劑。除活性化合物外，液體劑型還可含有本領域中常用的惰性稀釋劑，例如水或其他溶劑、增溶劑和乳化劑，例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄基醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油，尤

其是棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄欖油、蓖麻油和芝麻籽油、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇和脫水山梨糖醇的脂肪酸酯、或該等物質的混合物等。

【0289】 除了這種惰性稀釋劑之外，組成物還可以包含佐劑，例如濕潤劑、乳化劑和懸浮劑、甜味劑、調味劑和加香劑。除活性化合物外，懸浮液還可以含有懸浮劑，例如乙氧基化的異硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脫水山梨醇酯、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂和黃蓍膠、或該等物質的混合物等。

【0290】 用於直腸投與的組成物係較佳的栓劑，其可以藉由將本發明的化合物與適合的無刺激性的賦形劑或載體如可可脂、聚乙二醇或栓劑蠟混合而製備，它們在普通室溫下為固體，但是在體溫下為液體，並且因此會在直腸或陰道腔中融化並釋放出活性組分。

【0291】 用於本發明的化合物的局部投與的劑型包括軟膏劑、粉末、噴霧劑和吸入劑。將一種或多種活性化合物在無菌條件下與生理上可接受的載體以及可能需要的任何防腐劑、緩衝劑或推進劑混合。眼科配製物、眼膏、粉末和溶液也被認為在本發明的範圍內。

【0292】 本發明的化合物可以以每天約0.1至約3,000 mg範圍內的劑量水平投與給患者。對於體重約70 kg的正常成年人，在每千克體重約0.01至約100 mg範圍內的劑量通常就足夠了。可以使用的具體劑量和劑量範圍取決於許多因素，包括患者的需求，所治療的病症或疾病的嚴重性以及所投與化合物的藥理活性。如果該化合物已經被批准，則本發明的化合物的特定劑量係FDA批准的劑量。

【0293】 本發明的化合物可作為藥學上可接受的鹽、酯、醯胺或前驅藥投與。術語「鹽」係指本發明的化合物的無機和有機鹽。該等鹽可在化合物的最終分離及純化期間原位製備，或藉由使經純化的化合物以其游離鹼或酸形式與適合有機或無機鹼或酸單獨反應且分離由此形成的鹽來製備。代表性的鹽包括

氫溴酸鹽、鹽酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、硝酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、硬脂酸鹽、月桂酸鹽、硼酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、甲苯磺酸鹽、檸檬酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、萘酸鹽、甲磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖酸鹽和月桂基磺酸鹽等。鹽可以包括基於鹼金屬和鹼土金屬的陽離子，例如鈉、鋰、鉀、鈣、鎂等，以及無毒銨、季銨和胺陽離子，包括但不限於銨、四甲基銨、四乙基銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。參見，例如，S. M. Berge,等人, "Pharmaceutical Salts [藥用鹽]," J Pharm Sci [藥物科學雜誌], 66: 1-19 (1977)。

【0294】 本發明的化合物的藥學上可接受的酯的實例包括C_1-C_8烷基酯。可接受的酯還包括C_5-C_7環烷基酯，以及芳烷基酯，例如苄基酯。通常使用C_1-C_4烷基酯。本發明的化合物的酯可以根據本領域熟知之方法製備。

【0295】 本發明的化合物的藥學上可接受的醯胺的實例包括衍生自氨、C_1-C_8烷基一級胺和C_1-C_8二烷基二級胺的醯胺。在二級胺的情況下，胺也可以是含有至少一個氮原子的5或6元雜環烷基的形式。通常使用衍生自氨、C_1-C_3烷基一級胺和C_1-C_2二烷基二級胺的醯胺。本發明的化合物的醯胺可以根據熟悉該項技術者熟知之方法製備。

【0296】 術語「前驅藥」係指在體內轉化以產生本發明的化合物的化合物。轉化可以藉由多種機制發生，例如藉由在血液中水解。前驅藥的使用的論述提供於T. Higuchi及W. Stella，「Prodrugs as Novel Delivery Systems[作為新穎給藥系統的前驅藥]」, A.C.S. Symposium Series[A.C.S.研討會文集]的第14卷及Bioreversible Carriers in Drug Design[藥物設計中的生物可逆載體], Edward B. Roche編輯, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press[美國製藥協會和佩加蒙出版社], 1987中。

【0297】 為了說明，因為本發明的化合物含有羧酸官能基，所以前驅藥可包含藉由用例如以下的基團替代酸基的氫原子所形成的酯：(C_1-C_8)烷基、(C_2-$C1_2$)烷醯基氧基甲基、具有4至9個碳原子的1-(烷醯基氧基)乙基、具有5至10個碳原子的1-甲基-1-(烷醯基氧基)乙基、具有3至6個碳原子的烷氧基羰基氧基甲基、具有4至7個碳原子的1-(烷氧基羰基氧基)乙基、具有5至8個碳原子的1-甲基-1-(烷氧基羰基氧基)乙基、具有3至9個碳原子的N-(烷氧基羰基)胺基甲基、具有4至10個碳原子的1-(N-(烷氧基羰基)胺基甲基、3-酞基、4-巴豆酸內酯基（4-crotonolactonyL）、γ-丁內酯-4-基、二-N,N-(C_1-C_2)烷基胺基(C_2-C_3)烷基（例如β-二甲基胺基乙基）、胺甲醯基-(C_1-C_2)烷基、N,N-二(C_1-C_2)烷基胺甲醯基-(C_1-C_2)烷基及哌啶並(C_2-$_3$)烷基、吡咯啶並(C_2-$_3$)烷基或味啉基(C_2-$_3$)烷基。

【0298】 本發明的化合物可以含有不對稱或手性中心，並且因此以不同的立體異構形式存在。預期化合物的所有立體異構形式及其混合物（包括外消旋混合物）構成本發明的一部分。另外，本發明涵蓋所有幾何和位置異構物。例如，如果化合物含有雙鍵，則考慮順式和反式形式（分別稱為Z和E）以及混合物。

【0299】 可以基於物理化學差異藉由已知方法（例如層析法和/或分段結晶）將立體異構物的混合物（例如非鏡像異構物混合物）分離為其個別立體化學組分。鏡像異構物還可藉由以下來分離：藉由與適當光學活性化合物（例如醇）反應將鏡像異構物混合物轉化為非鏡像異構物混合物，分離非鏡像異構物且將個別非鏡像異構物轉化（例如水解）成相應純鏡像異構物。而且，一些化合物可以是阻轉異構物（例如，取代的聯芳基）。

【0300】 本發明的化合物可以非溶劑化形式以及與藥學上可接受的溶劑（例如水（水合物）、乙醇等）的溶劑化形式存在。本發明考慮並涵蓋溶劑化和非溶劑化形式。

【0301】 本發明的化合物也可能以不同的互變異構形式存在。考慮了本發明的化合物的所有互變異構物。例如，四唑部分的所有互變異構形式都包括在本發明中。而且，例如，化合物的所有酮-烯醇或亞胺-烯胺形式都包括在本發明中。

【0302】 熟悉該項技術者應認識到，本文所含有的化合物名稱及結構可基於化合物的具體互變異構物。儘管可使用僅用於具體互變異構物的名稱或結構，但除非另有說明，否則本發明意欲涵蓋所有互變異構物。

【0303】 本發明還意欲涵蓋使用實驗室技術（例如合成化學師所熟知的那些技術）在活體外合成的化合物；或使用體內技術（例如藉由代謝、發酵、消化等）合成的化合物。還預期本發明的化合物可使用體外和體內技術的組合來合成。

【0304】 本發明還包括同位素標記的化合物，其與本文所述的那些相同，但是由於以下事實：一個或多個原子被具有與通常在自然界中發現的原子質量或質量數不同的原子質量或質量數的原子替代。可以摻入本發明的化合物中的同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素，例如^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{16}O、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F和^{36}Cl。在一方面，本發明關於其中一個或多個氫原子被氘（^{2}H）原子替代的化合物。

【0305】 含有前述同位素和/或其他原子的其他同位素的本發明的化合物在本發明的範圍內。本發明的某些同位素標記的化合物（例如其中摻入有放射性同位素如^{3}H和^{14}C的那些）可用於藥物和/或底物組織分佈測定。由於易於製備和檢測，因此氚化即^{3}H和碳-14即^{14}C同位素係特別較佳的。進一步地，用更重同位素（例如氘，即^{2}H）取代可以提供源自較高代謝穩定性的某些治療優勢（例如，延長的體內半衰期或降低的劑量要求），並且因此在一些情況下是較佳的。

通常可以藉由用容易獲得的同位素標記的試劑取代非同位素標記的試劑來製備本發明的同位素標記的化合物。

【0306】 本發明的化合物可以多種固體狀態（包括結晶狀態）及作為非晶形狀態存在。預期本發明化合物的不同結晶狀態（還稱為多晶型）及非晶形狀態為本發明的一部分。

【0307】 在合成本發明的化合物時，可能希望使用某些脫離基。術語「脫離基」（「LG」）通常是指可被親核試劑置換的基團。這樣的脫離基係本領域已知的。脫離基的實例包括但不限於鹵化物（例如I、Br、F、CL）、磺酸鹽（例如甲磺酸鹽、甲苯磺酸鹽）、硫化物（例如SCH_3）、N-羥基琥珀醯亞胺、N-羥基苯并三唑等。親核試劑的實例包括但不限於胺、硫醇、醇、格氏試劑、陰離子物質（例如醇鹽、醯胺、碳負離子）等。

【0308】 本文引用的所有專利、專利申請和其他文件均藉由引用全文併入本文。

【0309】 下文所呈現的實例說明本發明的具體實施方式。該等實例係代表性的，無意以任何方式限制申請專利範圍的範圍。

實例

【0310】 已開發出AMG 510作為$KRAS^{G12C}$的口服生物利用型共價抑制劑，其具有強大的生化和細胞活性，並且具有強大的體內功效。用AMG 510處理的NCI-H358細胞的半胱胺酸蛋白質組分析顯示，只有KRAS的含G12C肽被共價修飾。AMG 510抑制重組突變體$KRAS^{G12C/C118A}$的SOS催化的核苷酸交換，但對$KRAS^{C118A}$（在位置12處為野生型）的影響很小。在細胞測定中，AMG 510共價修飾$KRAS^{G12C}$，並抑制$KRAS^{G12C}$傳訊，如藉由ERK1/2在測試的所有*KRAS p.G12C*突變細胞系中的磷酸化所測量，但沒有抑制ERK1/2在具有其他各種*KRAS*

突變的細胞系中的磷酸化。AMG 510還選擇性損害*KRASp.G12C*突變細胞系的活力，但不影響具有其他*KRAS*突變的細胞系。體內藥效學測定展示$KRAS^{G12C}$傳訊受到劑量和時間依賴性抑制，如藉由在人胰腺（MIA PaCa-2 T2）和NSCLC（NCI-H358）腫瘤異種移植物中ERK1/2（p-ERK）的磷酸化所測量。藉由質譜法測量了AMG 510對$KRAS^{G12C}$的共價修飾，並與腫瘤中p-ERK的抑制相關。在荷瘤小鼠中進行的時程研究展示，AMG 510的血漿暴露在給藥後0.5小時達到峰值，緊接著腫瘤中p-ERK受到抑制。AMG 510在更高劑量下顯著抑制MIA PaCa-2 T2和NCI-H358異種移植物的生長，並導致腫瘤消退。用共價$KRAS^{G12C}$抑制劑處理KRAS p.G12C細胞系增加HLA的表現。AMG 510與其他細胞傳訊通路抑制劑的組合處理表現出對細胞活力的協同作用的證據。與任一種單一藥劑相比，AMG 510與護理標準卡鉑的組合治療展示出增強的NCI-H358腫瘤生長抑制作用。類似地，與任一種單一藥劑相比，AMG 510與MEK抑制劑的組合導致增強的抗腫瘤功效。

【0311】 為了測試$KRAS^{G12C}$抑制對體內免疫監視的影響，產生了一種新穎同系腫瘤細胞系，其適用於結合檢查點抑制劑療法測試AMG 510，並且因此體外表徵。在新開發的KRAS-G12C突變癌症模型中，AMG 510治療顯著抑制腫瘤生長並引起消退。意外的是，AMG 510與免疫檢查點抑制劑的組合導致顯著提高了總存活率，並導致了持久治癒。鼠*KRAS p.G12C*腫瘤的免疫分型顯示治療後T細胞浸潤顯著增加，這表明AMG 510可能誘導對免疫檢查點抑制更敏感的腫瘤微環境。

新穎同系CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤模型

【0312】 鼠CT26（結腸癌＃26）細胞係1975年藉由將BALB/c小鼠暴露於N-亞硝基-N-甲基聚胺酯（NMU）而開發的，導致易於植入並且易於轉移的快速生長的IV級癌。在500多個已發表的研究中使用的CT26結腸癌係藥物開發中最常

用的細胞系之一。用該等細胞已經研究了許多細胞毒性劑以及靶向特定傳訊通路的治療劑。此外，由於BALB/c小鼠中的CT26模型提供了同系體內測試系統，因此它經常用於開發和測試免疫治療概念。*BMC Genomics.[BMC基因組學] 2014年3月13日;15:190. doi: 10.1186/1471-2164-15-190. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma[CT26結腸直腸癌的免疫，基因組和轉錄組學表徵]*。

【0313】 如表 A 和圖 3、4、5、6、18、24、31、34、38 和 39 所概述，開發了同系 CT-26 *KRAS p.G12C* 腫瘤模型以實現與細胞系和免疫療法的組合研究。基於其親本系中存在 KRAS-G12D 突變而選擇 CT-26 同系腫瘤細胞系。KRAS-G12D 突變的存在表明細胞系生長和存活可能受到組成型 KRAS 傳訊（G12D）驅動，並且潛在地對 KRAS 抑制敏感。CT-26 *KRAS p.G12C* 細胞係從 CT-26 鼠結腸直腸腫瘤細胞系產生的。如 Liang 等人（Journal of Biotechnology[生物技術雜誌] 241（2017）136-146）在先前技術中所述的 CRISPR 技術用於利用序列 CTTGTGATGGTTGGAGCTGA（SEQ ID NO: 21），將兩個 *KRAS p.G12D* 等位基因替代為 *KRAS p.G12C*。藉由下一代定序（NGS），殖株 10 被確定對於 *KRAS p.G12C* 等位基因係純合的，並被鑒定為 CT-26 *KRAS G12C-H10*。這種新型分離的同系腫瘤細胞系 CT-26 KRAS p.G12C 允許藉由 AMG 510 抑制 KRAS 傳訊，並用於所有 CT-26 G12C 體內研究（參見圖 3、4、5 和 6）和體外研究（參見圖 18、24、31、34、38 和 39）。

【0314】 本發明涵蓋包含兩個 $KRAS^{G12C}$ 等位基因的新穎分離的細胞系和產生包含兩個 $KRAS^{G12C}$ 等位基因的細胞系之方法，該方法包括：

a) 將包含兩個$KRAS^{G12D}$等位基因的細胞系與CRISPR構建體一起孵育，該CRISPR構建體誘導兩個KRAS等位基因上的核苷酸替代，從而形成兩個$KRAS^{G12C}$等位基因；以及

b) 分離包含兩個$KRAS^{G12C}$等位基因的細胞系。

下一代定序（NGS）（也稱為高通量定序）係一種通用術語，用於描述許多不同的現代定序技術，其包括：

- Illumina(Solexa)定序
- 羅氏（Roche）454定序
- 離子激流（Ion torrent）：質子/PGM定序
- SOLiD™定序

【0315】 將可購自賽默飛世爾科技公司（Thermo-Fisher Scientific）的Ion Torrent™ Personal Genome Machine™平台用於本發明。該等最新技術使科學家能夠比以前使用的桑格（Sanger）定序更快並更便宜地對DNA和RNA進行定序。

體外基於細胞的組合研究

【0316】 細胞系購自美國典型培養物保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC），德國微生物和細胞培養物保藏中心（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures，DSMZ）和日本研究生物資源保藏中心（Japanese Collection of Research Bioresources，JCRB）。將每個細胞系在其推薦的生長培養基中培養。

【0317】 對於雙向化合物組合，將細胞以範圍從500至2500個細胞/孔的初始密度接種到96孔或384孔細胞培養板中。

【0318】 16至24小時後，將化合物以矩陣形式添加到培養板中，其中一種試劑沿x軸滴定，並且第二種試劑沿y軸滴定。

【0319】 對於在任何給定細胞系中測試的所有組合，選擇每種化合物的起始高濃度和稀釋因子以在針對組合篩選形式所選擇的劑量範圍內很好地定義曲線最大值，曲線最小值和斜率。使用CellTiter-Glo®發光細胞活力（普洛麥格公司（Promega））測定套組以確定活細胞的數量。

【0320】 在添加化合物之前在零時（V0）以及化合物處理72小時後，用EnVision®多標記讀取器（珀金埃爾默公司（Perkins Elmer））測量每個細胞系的發光。根據以下等式，以200點制計算生長抑制（GI），其中V72係72小時DMSO對照的發光，T72係化合物處理的樣本的發光：如果T72 > V0，則GI = 100 x (1 - ((T72-V0)/(V72 - V0)))；如果T72 < V0，則GI = 100 x (1 - ((T72 - V0)/V0))。GI值0、100和200分別代表不受抑制的細胞生長（即DMSO對照）、細胞停滯和完全細胞殺傷。使用4參數邏輯模型繪製S形劑量反應曲線。使用Chalice™分析軟體（Zalicus公司）分析數據以產生協同相互作用，該軟體基於Loewe加和性模型生成協同作用得分。

【0321】 如前所述計算矩陣每個孔的生長抑制，並使用Chalice™分析軟體（Zalicus公司; 劍橋, 麻塞諸塞州）分析數據以得出協同相互作用，該軟體基於Loewe加和性模型產生協同作用得分（Lehàr, J., 等人（2009）。"Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity.[協同藥物組合傾向改善治療相關的選擇性]" *Nat Biotech*[自然生物技術] **27(7)**: 659-666）和Rickles, 等人（2012）「Adenosine A2A and Beta-2 Adrenergic Receptor Agonists: Novel Selective and Synergistic Multiple Myeloma Targets Discovered through Systematic Combination Screening[腺苷A2A和β2腎上腺素能受體激動劑：藉由系統組合篩選發現新穎選擇性和協同多發性骨髓瘤靶標]」, Mol Cancer Therapeutics[分子癌症治療] 11 (7): 1432。

【0322】 Loewe ADD（加和性）模型（如圖7-37所示）量化了組合效果。組合最初按加和過量體積進行排序，其定義為ADD體積 = $\sum C_X,C_Y (I_{data} - I_{Loewe})$，其中$I_{Loewe}(C_X,C_Y)$係滿足$(C_X/EC_X) + (C_Y/EC_Y) = 1$的抑制作用，而$EC_{X,Y}$係單一藥劑曲線在$I_{Loewe}$下的有效濃度。還使用「協同得分」，其中協同得分$S = \log f_X \log f_Y \sum I_{data} (I_{data} - I_{Loewe})$，對所有非單一藥劑濃度對求和，其中$\log f_{X,Y}$係每個單一藥劑

所使用的稀釋因子的自然對數。這樣有效地計算出所測值和Loewe加和反應表面之間的體積，對高度抑制進行加權並針對不同的稀釋因子進行校正。基於I_{data}值的測量誤差和標準誤差傳播，對每個協同得分計算不確定性σ_S。

【0323】 在所示的實例中，生長抑制（%）矩陣含有使用上述公式由發光數據計算得出的共有生長抑制值；ADD模型生長抑制（%）矩陣含有基於Loewe加和性模型預測的生長抑制值，該模型衍生自建模的單一藥劑生長抑制曲線；而ADD過量生長抑制（%）矩陣含有超出加和性模型的生長抑制的值。加和性模型充當「零假設」，並且假定兩種藥劑之間沒有協同相互作用。從生長抑制劑量反應矩陣（= ADD過量生長抑制）減去ADD模型後觀察到的任何活性均表明協同作用。

【0324】 下表A說明了針對特定癌症類型的$KRAS^{G12C}$抑制劑與一種或多種其他藥學活性藥劑的具體體外組合。在圖7-39中獲得並總結的數據表明，與單獨使用組合療法的各個成員時所預期情況相比，表A中列出的組合顯示出增強的抗癌活性。應當注意，所看到的治療協同作用的幅度可以取決於所治療的癌症類型和所使用的藥劑而變化。

表A

	EGFRi			**SHP2i**	**MEKi**	**PI3Ki**		**AKTi**	**EGFR Ab**
	AMG 510 阿法替尼	**AMG 510 厄洛替尼**	**AMG 510 拉帕替尼**	**AMG 510 RMC-4550**	**AMG 510 曲美替尼**	**AMG 510 AMG 511**	**AMG 510 布帕尼西**	**AMG 510 AZD5363**	**AMG 510 西妥昔單抗**
NCI-H358（肺）	**22.3**	**12.4**	**19.7**	**25**	**17**	**10.5**	**13.5**	**4.53**	**--**
MIA PaCa-2（胰腺）	**4.7**	**2.07**	**--**	**6.36**	**3.06**	**5.53**	**--**	**2.67**	**--**
MIA PaCa-2 3D	**2.76**	**--**	**--**	**--**	**7.46**	**--**	**--**	**--**	**--**

NCI-H1373 3D（肺）	**8.7***	**--**	**--**	**--**	**11.8**	**--**	**--**	**--**	**--**
CT-26 KRAS p.G12C 3D（小鼠結腸）	**10.8***	**--**	**--**	**11.7***	**2.63**	**10.8**	**--**	**--**	**--**
SW837（結腸）	**--**	**--**	**--**	**--**	**--**	**--**	**--**	**--**	**2.96**

- 更高濃度下的脫靶效應可能有助於提高協同作用得分

體內腫瘤異種移植組合研究

【0325】 按照該等以下一般程序進行體內腫瘤異種移植研究：

【0326】 培養，收穫腫瘤細胞並將其皮下植入雌性無胸腺裸小鼠的右側腹肋部。當腫瘤達到約200mm^{3}時，將小鼠隨機分為治療組（n = 10/組）並開始治療（在圖上指示的天數）。每週測量2至3次腫瘤大小和體重。藉由數字卡尺測量腫瘤體積，以L × W × H計算並以mm^{3}表示。藉由對數轉換後的腫瘤體積數據的重複測量協方差分析（RMANOVA），並用鄧尼特調整後的多重比較，將對照組與治療組進行比較，從而評估生長曲線之間觀察到的差異的統計顯著性。對於組合研究，對組合組進行RMANOVA，與每個單一藥劑治療組進行一對一的比較。

【0327】 BD Matrigel™基底膜基質係從Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）小鼠肉瘤（加利福尼亞州聖約瑟BD生物科學公司（BD Biosciences, San Jose, CA））提取的增溶基底膜製劑。

【0328】 所有研究均以盲法進行。

【0329】 在圖3、4、5和6中，抗小鼠PD-1（殖株29F.1A12）抗體可購自新罕布什爾州西黎巴嫩Bio X Cell公司（Bio X Cell, West Lebanon, New Hampshire）。

【0330】 圖1、2、3、4、5和6說明了針對特定癌症類型的$KRAS^{G12C}$抑制劑與一種或多種其他藥學活性藥劑的具體體內組合。附圖中獲得和總結的數據表明，與單獨使用組合療法的各個成員時所預期情況相比，附圖中所示的組合顯示出增強的抗癌活性。應當注意，所看到的治療協同作用的幅度可以取決於所治療的癌症類型和所使用的藥劑而變化。

【0331】 在圖4中，與任一單一藥劑治療相比，AMG 510和抗PD1抗體（殖株29F.1A12）在CT26-KRASG12C同系腫瘤模型中的組合治療可顯著提高存活率並導致持久治癒。與對照組相比，AMG 510單一療法或抗PD1單一療法導致腫瘤生長延遲。每種單一療法治療均導致1/10的完全反應者。AMG 510+抗PD1的組合治療導致9/10的完全反應者。該等被認為係持久治癒，並且在停止治療後（第43天），直到研究終止的第57天，那9隻小鼠仍然沒有腫瘤。

增強AMG 510的結合和效力

【0332】 儘管ARS-1620驗證了直接抑制$KRAS^{G12C}$之方法，但已證明難以鑒定適合臨床測試的改善抑制劑。我們認為，一個重要的挑戰係由於ARS-1620佔用的變構口袋體積很小而導致效力欠佳，這為另外的蛋白質-配位基相互作用提供了有限的途徑。$KRAS^{G12C}$/ARS-1620共價複合物的X射線晶體結構（圖40a）說明了這一點，其中ARS-1620和組胺酸95（H95）之間的氫鍵突出表示（虛線）。我們的突破係發現由H95的替代性取向所產生的表面凹槽可能被取代的芳香環所佔據，從而增強了與$KRAS^{G12C}$的相互作用。AMG 510成為H95凹槽結合分子優化運動的最佳候選者，因為它代表了改善的效力和良好的開發特性的融合。共價AMG 510-$KRAS^{G12C}$複合物的X射線共晶結構（圖40b）突出顯示了AMG 510在KRAS的P2口袋中的結合。異丙基甲基吡啶取代基佔據Y96、H95和Q99之間的凹槽，並參與25個配位基-蛋白質范德華接觸的連續網路，該網路從螺旋2的骨架（H95，Y96）延伸到柔性開關II環的骨架（E62，E63）。

【0333】 為了評估增強的相互作用對AMG 510效力的影響，我們使用了兩種測定方法，其採用在殘基118處進行另外的半胱胺酸-丙胺酸取代的重組GDP結合的$KRAS^{C118A}$或$KRAS^{G12C/C118A}$，以避免與非C12半胱胺酸的反應性。酶促核苷酸交換測定法利用SOS1催化的GDP/GTP交換來促進c-RAF的RAS結合域（RBD）與兩種形式的KRAS結合。在40分鐘的反應中，AMG 510展示了比ARS-1620高出約10倍（平均IC_{50} = 0.09 μM）的效力（圖40c）。AMG 510沒有明顯抑制$KRAS^{C118A}$（圖40c），並且在該等測定中AMG 510的非反應性類似物具有最小的活性（圖46a）。藉由質譜法（MS）測量AMG 510與$GDP\text{-}KRAS^{G12C/C118A}$之間在擬一級反應條件下的反應動力學。濃度-速率數據的非線性擬合（圖40d）確立了最大反應速率k_{inact} = 0.85 ± 0.08 s^{-1}，而AMG 510在半最大速率下的濃度K_I = 8.6E-05 ± 1.4E-05 M，導致k_{inact}/K_I比為9.8E + 03 ± 1.8E + 03 $M^{-1}s^{-1}$。相對於ARS-1620，AMG 510和$KRAS^{G12C/C118A}$之間的反應動力學得到了顯著改善。相對於臨床中靶向半胱胺酸的激酶抑制劑，AMG 510的特徵在於顯著更大的k_{inact}，與先前針對ARS-1620描述的KRAS誘導的催化機制一致。AMG 510與5 mM麩胱甘肽 的非特異性反應性相對較慢（AMG 510 $t_{1/2}$ = 196 min），並且在臨床共價丙烯醯胺範圍內。

抑制腫瘤細胞傳訊和生長

【0334】 藉由測量ERK1/2的基礎磷酸化（p-ERK）並藉由MS檢測$KRAS^{G12C}$與AMG 510的共價綴合（即佔有）來評估AMG 510的細胞活性。在兩個*KRAS p.G12C*細胞系中，在2小時處理後，AMG 510有效抑制p-ERK（IC_{50}分別為約0.02和0.03 μM）至接近不可檢測的水平，且效力比ARS-1620高20倍（圖40e）。這種抑制作用密切跟蹤了AMG 510對$KRAS^{G12C}$的佔有，具有在兩種測定中在約0.2 μM下實現的近最大水平（圖40f）。AMG 510還有效損害了兩種細胞

系中的細胞活力（IC_{50}約0.006 μM和0.009 μM，效力比ARS-1620高約40倍）（圖40g）。

【0335】 使用p-ERK的時間和濃度依賴性抑制作用來確定AMG 510在兩種*KRAS p.G12C*細胞系中的細胞動力學，這反映了AMG 510對$KRAS^{G12C}$的佔有。p-ERK抑制速率隨AMG 510濃度增加，濃度高於3 μM時達到飽和。AMG 510和ARS-1620的濃度-速率曲線擬合（圖40h和圖46b）表明，AMG 510抑制$KRAS^{G12C}$的細胞動力學效率比ARS-1620高約23倍。AMG 510對ERK磷酸化的最大抑制速率（8.9E-04 s^{-1}）比最近動力學模型中提出的限速GTP-$KRAS^{G12C}$水解速率高約2倍（從EGFR抑制估計的速率 = 4.2E-04 s^{-1}；$t_{1/2}$ = 27.4 min）。為了提供$KRAS^{G12C}$對GTP水解速率的替代性估計，採用SHP2抑制劑消除了所有向KRAS的上游傳訊。該實驗產生的細胞GTP水解速率為9.4E-04 s^{-1}（$t_{1/2}$ = 12.2 min；圖46c），與對AMG 510觀察到的速率一致。

【0336】 為了更廣泛地評估$KRAS^{G12C}$抑制的傳訊影響，用多劑量的AMG 510處理了兩種細胞系4小時和24小時，並進行了蛋白質印跡以評估多個傳訊節點（圖41a）。AMG 510與$KRAS^{G12C}$的共價加合物形成藉由遷移更慢的KRAS譜帶的遷移率的變化來檢測（頂部箭頭）。這種改變的種類隨著時間和劑量的增加而積累，並且與兩種細胞系中MAPK途徑（即p-MEK1/2和p-ERK1/2）的下游抑制作用一致（圖41a，41b）。AMG 510對KRAS的抑制作用還導致了活性EGFR（p-EGFR Y1068）的積累。AKT磷酸化（p-AKT）的抑制作用在一種細胞系中很明顯，但是在兩種細胞系中24小時都觀察到了核糖體蛋白S6的磷酸化（p-S6）的降低。在24小時也觀察到caspase-3的切割，這表明誘導了細胞凋亡。在更廣泛的時程內，以0.1μM進行AMG 510處理（圖41b）對MAPK和EGFR產生快速（< 2 h）和持續（> 24 h）作用，而在兩種細胞系中處理後8-16小時出現p-S6和caspase切割。

【0337】 為了評估活性和選擇性，在具有雜合或純合*KRAS p.G12C*或*p.G12C*以外的*KRAS*突變的22種細胞系，以及野生型（WT）*KRAS*細胞系中分析AMG 510。在所有*KRAS p.G12C*細胞系中，用AMG 510處理兩小時均抑制了基礎p-ERK，IC_{50}值範圍為0.010 μM至0.123 μM（圖41c和補充表1）。AMG 510在任何非*KRAS p.G12C*細胞系中均不抑制p-ERK（IC_{50} > 10μM；圖41c和補充表1）。

【0338】 在細胞活力測定中，AMG 510損害了除SW1573外的所有純合和雜合*KRAS p.G12C*細胞系的生長，其中IC_{50}值範圍為0.004 μM至0.032 μM（圖41d和補充表1）。儘管所有*KRAS p.G12C*細胞系均顯示出對p-ERK的類似的最大抑制作用，但對細胞活力的最大影響卻有所不同。具有*p.G12C*以外的*KRAS*突變或具有KRAS以外的基因突變的細胞系對AMG 510不敏感（IC_{50} > 7.5μM；圖41d和補充表1）。選擇了*KRAS p.G12C*細胞系的一個子集，以評估在低黏附條件下誘導球狀體形成的活力。如對其他$KRAS^{G12C}$抑制劑所報導的那樣，該等條件增強了所有測試細胞系對AMG 510的敏感性，並且導致效力提高了20倍，並且最大抑制提高了2.5倍（圖41e，圖46d和補充表1）。SW1573保持最低敏感度，可能是由於同時發生的驅動突變*PIK3CA p.K111E*。

【0339】 為了進一步確定AMG 510與$KRAS^{G12C}$的共價相互作用的選擇性並鑒定細胞中其他潛在的「脫靶」的含半胱胺酸的蛋白質，按上述方法藉由MS進行了半胱胺酸蛋白質組分析。用DMSO或1 μM AMG 510（> 30倍p-ERK IC50）處理細胞4小時後，富集半胱胺酸蛋白質組，並鑒定了肽。在6451種獨特的含半胱胺酸的肽中，來自$KRAS^{G12C}$的Cys12肽係唯一鑒定出的滿足共價靶標接合標準的肽（圖41f）。

AMG 510在體內抑制KRAS傳訊

【0340】 AMG 510口服治療對$KRAS^{G12C}$傳訊的影響在測量p-ERK的藥效學（PD）測定中進行評估。在具有*KRAS p.G12C*的人類腫瘤中，AMG 510在治

療後2小時以劑量依賴性方式抑制p-ERK（圖42a，b）。與對照組相比，AMG 510治療（100 mg/kg）後對p-ERK的抑制作用降低69%（MIA PaCa-2 T2）至83%（NCI-H358）。使用同系CT-26 *KRAS p.G12C*細胞系（使用CRISPR技術產生），在小鼠腫瘤模型中觀察到了AMG 510對p-ERK水平的相似作用（圖47a）。時程PD測定展示，單次劑量（10 mg/kg）後0.5小時，AMG 510的血漿和腫瘤暴露達到峰值，導致在治療後2-4小時對p-ERK的抑制作用達到最大，並保持顯著抑制48小時（圖42c，42d）。這與$KRAS^{G12C}$蛋白相對較長的20至24小時半衰期一致（圖46e）。

【0341】 另外，在平行實驗中，藉由MS測量了AMG 510對$KRAS^{G12C}$的佔有率，並且在最高劑量（100 mg/kg）下接近100%，這與p-ERK的最大抑制作用有關（圖42e和42f）。時程研究表明，在0.5小時後可檢測到AMG 510的部分佔有，而在2小時後觀察到約100%佔有率（圖42g）。

體內突變選擇性腫瘤抑制

【0342】 評估了AMG 510在小鼠中抑制人*KRAS p.G12C*和*KRAS p.G12V*（SW480-1AC）腫瘤異種移植物生長的能力。AMG 510在所有劑量水平下均顯著抑制MIA PaCa-2 T2和NCI-H358腫瘤的生長，其中在更高劑量下觀察到腫瘤消退（圖43a，43b）。相反，AMG 510治療對*KRAS p.G12V*腫瘤生長沒有影響（圖47b）。在所有模型中，AMG 510的血漿水平均一致（數據未顯示）。在免疫活性小鼠中生長的鼠CT-26 KRAS p.G12C腫瘤模型中，AMG 510在最高劑量下導致腫瘤生長抑制和消退（圖43c）。當研究在第29天終止時，10隻小鼠中有兩隻（100 mg/kg組）沒有可檢測到的腫瘤。AMG510還顯著抑制了小鼠中人*KRAS p.G12C*突變患者源性異種移植物（PDX）的生長（圖43d和圖47c）。

臨床活性的證據

【0343】 AMG 510的增強的效力，強大的功效和良好的藥物特性促使其被選為第一個進入臨床試驗的$KRAS^{G12C}$抑制劑（臨床試驗數據庫NCT03600883（Clinical trials.gov NCT03600883））。值得注意的是，在前兩組患者中，AMG 510治療導致兩名*KRAS p.G12C NSCLC*患者發生客觀的部分反應（根據RECIST 1.1）（圖43e和圖47d）。兩名患者均已進行了多種先前的全身治療，包括卡鉑、培美曲塞和納武單抗，並記錄有疾病進展。第一名患者在AMG 510治療6周後顯示出34%腫瘤縮小。第二名反應者在AMG 510治療僅2周後顯示出腫瘤減少67%。該等患者分別在6個月和2個月後（當前的美國臨時專利申請日時）繼續接受AMG 510治療。沒有不良事件的報導。該等患者成為有史以來第一個對突變體特異性KRAS抑制劑產生反應的患者，代表患有*KRAS p.G12C*突變腫瘤的癌症患者的里程碑。

組合的增強功效

【0344】 鑒於*KRAS p.G12C*在肺腺癌中的高患病率，在NCI-H358模型中研究了AMG 510與卡鉑（肺癌化療藥物的標準治療）的組合治療。用任一種單一藥劑（AMG 510或卡鉑）進行治療均能導致顯著抑制腫瘤生長（圖44a）。但是，各種劑量下的組合治療導致顯著改善抗腫瘤功效（圖44a和圖47e）。據我們所知，這係將突變選擇性KRAS抑制劑與化學治療劑組合使用可增強功效的第一個證明，並為這種方法在臨床中提供了理論依據。

【0345】 經臨床驗證的將BRAF和MEK抑制劑組合的策略表明，在MAPK（和AKT）傳訊通路中AMG 510和其他抑制劑組合可增強腫瘤細胞殺傷並克服抗性[26]。因此，用AMG 510和HER激酶、EGFR、SHP2、PI3K、AKT和MEK抑制劑的矩陣在若干種*KRAS p.G12C*細胞系中進行了體外組合實驗（圖48）。如AMG 510誘導p-EGFR所表明的（圖41a），AMG 510與多種藥劑的組合導致在NCI-H358中協同殺死腫瘤細胞（圖44b和圖48）。協同作用在其他細胞系中更為

有限，但與MEKi組合在多種情況下具有協同作用，並在球狀體生長條件下得到增強（圖44b）。當與任一種單獨單一藥劑相比時，在最小有效劑量的AMG 510與MEKi組合下在體內也觀察到了顯著增強的抗腫瘤活性（圖44c）。該等數據共同表明了一種有趣的臨床方法，也就是將AMG 510與靶向MAPK途徑中其他節點的藥劑組合，以消除可能限制功效或誘導抗性的殘留或旁路傳訊。

促炎性腫瘤微環境

【0346】 免疫檢驗點計劃性細胞死亡1/計劃性死亡配位基1（PD-1/PD-L1）軸的阻斷經臨床驗證並批准用於某些癌症患者。在CT-26 *KRAS p.G12C*模型中在免疫活性環境下評估了AMG 510與抗PD-1療法組合的活性。此細胞系取決於*KRAS p.G12C*等位基因（圖49a，b），並且對AMG 510敏感（圖43c和圖47a）。如先前所示（圖43c），AMG 510作為單一藥劑導致腫瘤消退（圖45a）。然而，隨著時間的流逝，10個腫瘤中只有1個保持完全消退（圖45a）。抗PD-1單一療法導致腫瘤生長延遲，10個腫瘤中只有1個顯示出完全消退。意外的是，組合治療導致10名中有9名係完全反應者（圖45a）。在第43天后停止治療，並再繼續監測小鼠112天。組合治療的所有完全反應者持續不具有可檢測的腫瘤，這表明AMG 510與抗PD-1抗體的組合導致了持久治癒。使用替代存活終點（腫瘤體積 > 800 mm^3），與單一療法相比，組合治療導致了存活率的顯著增加（45b）。

【0347】 為了瞭解治療對腫瘤中免疫細胞組成的影響，在治療後對CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤進行了免疫分型。治療4天后，AMG 510導致T細胞浸潤明顯增加，主要是CD8+ T細胞（圖45c和圖50a）。在主要由AMG 510驅動的組合組中，也觀察到CD8+ T細胞浸潤增加，因為在抗PD-1單一療法後並未發生這種情況。作為另一個比較劑，MEK抑制劑（MEKi）阻斷RAS下游的MAPK傳訊（圖50b），並產生與AMG 510類似的CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤生長抑制作用（圖50c，50d），但不會影響浸潤CD8+ T細胞的數量（圖45c）。AMG 510治療還導致巨

噬細胞和樹突狀細胞的浸潤增加，而用MEKi則未觀察到該等（圖45c）。AMG 510和MEKi均適度增加了CD8+ T細胞上PD-1的表現（圖44a）。治療後純化全腫瘤RNA，並評估一組免疫基因的轉錄譜圖。僅2天的治療後，AMG 510對$KRAS^{G12C}$的抑制作用誘導了促炎性微環境，其特徵在於干擾素傳訊、抗原加工、細胞毒性和NK細胞活性增強，以及與MEK抑制誘導的效果相比顯著更高的先天性免疫刺激的標誌物（圖45d和圖44e）。AMG 510還誘導了MHC-I蛋白在CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤細胞上的表現（圖45e和圖50f）。該等數據表明，AMG 510對腫瘤細胞的治療作用可能導致T細胞引發和抗原識別增加。為了測試這一點，將來自組合治療的治癒小鼠（圖45a）用CT-26 *KRAS p.G12C*和親代CT-26（*KRAS p.G12D*）或CT-26 *KRAS p.G12C*的雙側腫瘤和無關的小鼠乳腺腫瘤模型4T1再次激發。所有4T1腫瘤（4/4）均生長，但沒有（0/8）CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤被確立（圖45f）。值得注意的是，所有接受CT-26親代腫瘤的小鼠在40天后均無腫瘤（圖45f）。在一個單獨的未免疫小鼠對照組中，15例（100%取用比率）親代CT-26和CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤中15例生長（圖50g）。用CT-26、CT-26 *KRAS p.G12C*或4T1腫瘤細胞刺激從治癒小鼠中收穫的脾細胞，並測量分泌的IFN-γ的水平作為腫瘤特異性T細胞引發和活性的標誌。CT-26 *KRAS p.G12C*細胞和親代CT-26細胞導致IFN-γ升高約3倍，而4T1細胞並未誘導此升高（圖45g）。

討論

【0348】 與$KRAS^{G12C}$的H95凹槽發生新穎相互作用的發現顯著提高了功效，並鑒定了AMG 510，其為一流的口服$KRAS^{G12C}$抑制劑並在患者中具有臨床活性的證據。AMG 510選擇性靶向*KRAS p.G12C*腫瘤，並與細胞毒性和靶向藥劑組合以協同殺傷腫瘤細胞。AMG 510誘導的腫瘤細胞死亡導致發炎的腫瘤微環境，其對免疫檢查點抑制反應非常好。抗PD-1和MEKi的組合治療在若干報導中顯示出令人信服的臨床前功效，這與T細胞浸潤增加有關。在本研究中，選擇性

$KRAS^{G12C}$抑制後的免疫細胞浸潤比MEKi誘導的浸潤顯著更強。與報導的阻斷T細胞擴增和引發的非腫瘤選擇性MEKi作用相反，AMG 510對$KRAS^{G12C}$的選擇性抑制導致T細胞引發增加。該等數據支持了增強的抗原識別和T細胞記憶的模型，由此AMG 510誘導的腫瘤細胞死亡與抗PD-1治療組合，可導致適應性免疫反應，從而識別並根除非*p.G12C*腫瘤。有充分的證據表明，在同一腫瘤內以及原發和轉移部位之間，腫瘤內*KRAS*突變狀態可能是異質的。綜上所述，我們的數據表明，即使在$KRAS^{G12C}$表現係異質的情況下，AMG 510仍可能是有效的抗腫瘤藥劑。

方法

重組蛋白

【0349】 在大腸桿菌中表現重組His標記的人$KRAS^{G12C/C118A}$（1-169），GST-人c-RAF（1-149）和His標記的人$KRAS^{C118A}$（1-169），並使用親和層析和尺寸排阻層析進行純化。在粉紋夜蛾（*Trichoplusia ni*）中表現重組His標記的人SOS1（564-1049，昆蟲密碼子優化），並用親和層析進行純化；除去His標籤後，藉由尺寸排阻層析進行進一步純化。基於Ostrem等人[15]的工作，將半胱胺酸光突變體構建體用於共結晶研究。在大腸桿菌中表現重組His標記的人$KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$（1-169），並使用親和層析，離子交換層析和尺寸排阻層析進行純化，除去His標籤以進行結晶。

化合物和抗體

【0350】 ARS-1620、PD-0325901、曲美替尼、阿法替尼、厄洛替尼、RMC-4550和AZD5363從商業來源獲得。AMG 511係內部合成的。本文描述了AMG 510及其非反應性丙醯胺的合成。將AMG 510和用於體外實驗的所有其他抑制劑的儲備液製成100%二甲基亞碸（DMSO）中的10 mM溶液。對於體內研究，將AMG 510和MEKi（PD-0325901）在2%HPMC，1% Tween 80中配製，並

每天以10 mL/kg藉由口管飼喂投與。將10 mg/mL的卡鉑儲備液在1% PBS中進一步稀釋至5 mg/mL或3 mg/mL，並每週一次藉由腹膜內注射（IP）進行投與。大鼠抗小鼠PD1殖株29F.1A12被嵌合以含有小鼠IgG1骨架。另外，將Fc受體沈默突變N297G引入IgG重鏈區域以降低效應子功能。將抗PD-1抗體29F.1A12在1X PBS中稀釋至500 μg/mL的濃度，每3天投與一次，共藉由I.P.注射3次。除了抗RAS（艾博抗公司（Abcam））、抗磷酸ERK1/2（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））和抗β-肌動蛋白-HRP（希格瑪公司（Sigma））以外，用於蛋白質印跡的所有抗體均購自細胞傳訊公司（Cell Signaling）。

細胞系

【0351】 除從美國國家癌症研究所獲得的KM12和NCI-H3122外，所有細胞系均從美國典型培養物保藏中心（ATCC）購買。藉由短串聯重複序列（STR）譜圖鑒定細胞系。為了改善體內生長動力學，分別藉由在小鼠中傳代MIA PaCa-2和SW480細胞來產生MIA PaCa-2 T2和SW480-1AC細胞。使用CRISPR技術由鼠CT-26結腸直腸細胞系產生CT-26 *KRAS p.G12C*細胞，以用*p.G12C*（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））替代兩個*KRAS p.G12D*等位基因。殖株H10被確定對於*KRAS p.G12C*等位基因係純合的，被鑒定為CT-26 *KRAS p.G12C-H10*，並且被稱為CT-26 *KRAS p.G12C*。將所有細胞系在補充有10%胎牛血清和1x青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸的RPMI 1640培養基中，在37°C、5% CO_2下在潮濕培養箱中培養。

X射線晶體學

【0352】 將在20 mM HEPES pH 7.5，150 mM NaCl中的純化的未標記的$KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$（「KRAS」）濃縮至40 mg/mL，並添加到溶解於DMSO的兩倍莫耳過量的固體AMG 510化合物中。將蛋白質複合物樣本在室溫下置於定軌振盪器上16小時，並且然後進行旋轉過濾。使用坐滴蒸氣擴散法進行共結

晶。將「KRAS」-AMG 510蛋白複合物樣本和結晶緩衝劑（1 mM MgCl2、0.1 M MES pH 6.5、30% w/v聚乙二醇4000）混合。於20°C下在一天內出現扁平的棒狀晶體。

【0353】 在液氮中冷凍之前，將晶體在作為冷凍保護劑的結晶緩衝劑中平衡。在高級光源束線5.0.1下，在Pilatus 6M矽圖元檢測器上以波長0.97741 Å和溫度100K收集數據集。使用HKL2000對數據進行整合和縮放。該晶體屬於正交晶空間群P212121，其晶胞尺寸為a = 40.9 Å、b = 58.4 Å、c = 65.9 Å、α = 90°、β = 90°、γ = 90°（請參見補充表2）。將apo KRAS結構作為搜索模型，使用MolRep藉由分子替代來解析該結構。不對稱單元中只有一個蛋白質分子。使用Refmac5改善了結構，並使用圖形程式Coot進行了模型構建。使用PRODRG產生配位基。與GDP和AMG 510結合的$KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$的結構被細化到1.65 Å，其中R因子為18.1%，R_{free}為21.5%。Ramachandran統計數據獲得98.2%支持，1.8%允許，沒有異常值。胺基酸殘基105-107未在晶體結構中解析出。原子座標和結構因子將存放在蛋白質數據庫中（PDB ID代碼：尚未指定）。

偶合核苷酸交換測定

【0354】 使用Alpha（擴增發光鄰近均相測定）技術測量$KRAS^{G12C/C118A}$或$KRAS^{C118A}$對SOS1催化的核苷酸交換活性的抑制作用。將20 nM GDP結合的人$KRAS^{G12C/C118A}$或$KRAS^{C118A}$蛋白與兩倍連續稀釋的AMG 510或DMSO在室溫（RT）下於反應緩衝劑（25 mM HEPES，pH 7.4；10 mM $MgCl_2$；0.01% Triton X-100）中孵育5分鐘。對於所有後續步驟，將DTT以1 mM的最終濃度添加反應緩衝劑中。接下來，將GTP和SOS-1分別以1.25 mM或500 nM的最終濃度添加DTT反應緩衝劑中，並在室溫下孵育30分鐘。最後，添加均在DTT反應緩衝劑中稀釋的c-RAF RBD（最終濃度為50 nM），α麩胱甘肽 供體珠（珀金埃爾默公司（PerkinElmer）；最終濃度為20 μg/mL）和AlphaLISA®鎳螯合物受體珠（珀金

埃爾默公司（PerkinElmer）；最終濃度為20 μg/mL）。將反應混合物在室溫下孵育5 min，並且然後使用AlphaScreen方案在EnVision®多標記讀取器上讀取板。在680 nm處180 ms激發後，在570 nm處測量發光訊號。訊號強度對應於c-RAF RBD與GTP結合的$KRAS^{G12C/C118A}$或$KRAS^{C118A}$的締合，並歸一化為DMSO對照。

ERK1/2磷酸化測定

【0355】 為了進行細胞測定，將每孔2.5E+04個細胞接種在96孔板中，並在37°C、5% CO_2下孵育過夜。第二天，將三倍連續稀釋的化合物或DMSO添加細胞中，並將板在37°C、5% CO_2下孵育2小時。處理後，將細胞用冰冷的PBS洗滌，並在含有蛋白酶和磷酸酶抑制劑的RIPA裂解緩衝劑（50 mM Tris-HCl，pH 7.5；1% Igepal；0.5%去氧膽酸鈉；150 mM NaCl；0.1%十二烷基硫酸鈉）中裂解。根據製造商方案，使用磷酸ERK1/2全細胞裂解物套組（美莎帝公司（Meso Scale Discovery））測量了處理過的細胞裂解物的基礎ERK1/2磷酸化水平。訊號強度對應於磷酸-ERK1/2水平，並歸一化為DMSO對照。

【0356】 對於來自體內藥效學測定的腫瘤細胞裂解物，根據製造商方案，使用磷酸-ERK1/2和總ERK1/2全細胞裂解物套組（美莎帝公司（Meso Scale Discovery））分析了每個樣本中50 μg總蛋白。對於給定的樣本，將磷酸-ERK1/2訊號歸一化為總ERK1/2訊號，並相對於媒劑組計算ERK磷酸化的抑制%。

細胞活力測定

【0357】 對於黏附活力測定，將每孔0.5-1.0E+03個細胞接種在384孔板中（或將每孔2.5-4.0E+04個細胞接種在96孔板中）並在37°C、5% CO_2下孵育過夜。第二天，將連續稀釋的化合物或DMSO添加至細胞，並將板在37°C、5% CO_2下孵育72小時。根據製造商方案，使用CellTiter-Glo®發光細胞活力測定套組（普洛麥格公司（Promega））測量細胞活力。將處理過的樣本的發光訊號歸一化為DMSO對照。

【0358】 對於球狀體活力測定，將每孔2.5-4.0E+04個細胞接種在96孔球狀體微孔板（康寧公司（Corning））中，並在37°C、5% CO_2下孵育24小時。除了根據製造商方案使用CellTiter-Glo®3D細胞活力測定套組（普洛麥格公司（Promega））測量活力以外，如上所述進行相同程序。

協同組合研究

【0359】 如先前所述（Saiki, A. Y.等人 MDM2 antagonists synergize broadly and robustly with compounds targeting fundamental oncogenic signaling pathways[MDM2拮抗劑與靶向基本致癌傳訊通路的化合物廣泛而穩固地協同作用]. Oncotarget[癌症靶標] **5**, 2030-2043, doi:10.18632/oncotarget.1918（2014）），進行了組合實驗以評估AMG 510與其他抑制劑在體外的協同相互作用。

動力學分析

【0360】 如先前所述[44]，使用MS測量共價抑制劑-$KRAS^{G12C}$加合物的形成。使用Prism（GraphPad軟體），將在各種孵育時間下各種抑制劑濃度的相對%結合值擬合到指數方程，以產生測試的每種濃度的k_{obs}值。然後相對於抑制劑濃度重新繪製所得的k_{obs}值以產生k_{inact}和K_i值。

【0361】 為了確定細胞中共價抑制劑-$KRAS^{G12C}$加合物形成的動力學值，精確地如上所述，在各種孵育時間下，用各種抑制劑濃度處理後，測量了基礎ERK1/2磷酸化水平，並將%活性值用於動力學計算。

半胱胺酸蛋白質組學分析

【0362】 將人非小細胞肺癌NCI-H358細胞以2.0E+06個細胞/10 cm板接種，並在37°C、5% CO_2下孵育過夜。第二天，將細胞用1 μM AMG 510或DMSO（n = 5）處理，並在37°C、5% CO_2下孵育4小時。處理後，將細胞用含有蛋白酶抑制劑的冰冷的PBS洗滌，然後從板中移除。根據Patricelli等人的描述，按其方案使用質譜（MS）在IQ Proteomics，LLC上處理速凍細胞沈澱。簡而言之，

將細胞沈澱裂解並用100 μM脫硫生物素碘乙醯胺處理，以標記剩餘的未反應的溶劑暴露的半胱胺酸。胰蛋白酶消化後，將從每個樣本中產生的肽混合物用TMT-10 plex（串聯質譜標籤）等壓標記試劑（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））標記。標記後，將樣本混合，然後使用大容量鏈黴親和素瓊脂糖富集脫硫生物素化肽。在Orbitrap Lumos質譜儀（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））上，使用基於三小時梯度和同步先質選擇（SPS）的MS3方法，藉由奈米LC-MS分析富集的肽。脫硫生物素化肽的鑒定係經哈佛醫學院的Gygi實驗室利用SEQUEST開發的定制資訊學管道藉由數據庫搜索而獲得的。所有光譜均在Human Uniprot (2018)蛋白序列數據庫中搜索，該數據庫附有突變體$KRAS^{G12C}$蛋白序列和常見污染物。將肽和蛋白質過濾到1%假髮現率（FDR），並且只有滿足最小信噪比200和分離純度大於50%的標準的那些肽才能用於定量分析。使用含半胱胺酸的肽的歸一化峰豐度，在Microsoft Excel中執行用於統計分析的所有數據處理。計算DMSO對照和AMG 510處理的樣本組之間的Log_2倍數變化。假設相等方差，對每種肽進行兩尾t檢驗以評估處理組和DMSO對照樣本組之間差異的統計學顯著性。針對每個脫硫生物素化的含半胱胺酸肽，相對於log_2倍數變化繪製顯示負log_{10} p值的火山圖。將顯示出豐度的log_2倍數降低大於2且p值小於0.0001的肽指定為AMG 510的共價靶標（$n = 5$個生物學重複）。

動物研究

【0363】 所有動物實驗程序均根據美商安進公司（Amgen）動物護理和使用委員會指南以及實驗室動物護理評估和鑒定協會標準進行。所有研究均利用4至7周大的雌性無胸腺裸小鼠或雌性Balb/c小鼠（查理斯河實驗室（Charles River Laboratories））。將無胸腺裸小鼠在每個過濾器加蓋的籠子中放五隻並以無菌方式安置，並且將Balb/c小鼠在每個過濾器加蓋的籠子中放五隻並以非無菌方式

安置在環境控制的房間中（溫度23°C ± 2°C，相對濕度50% ± 20%），光照/黑暗週期為12小時。向小鼠餵食商業性齧齒動物食物。

基因表現分析

【0364】 藉由RNeasy迷你套組（凱傑公司（QIAGEN））從CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤中純化總RNA，該等腫瘤經口服媒劑，口服AMG 510（100 mg/kg QD）或口服MEKi（PD-0325901，10 mg/kg QD）治療兩天（n = 5/組）。藉由DropSense 96（珀金埃爾默公司（PerkinElmer Inc））定量RNA。利用含有750個靶基因，20個管家基因，8個內部陰性對照和6個內部陽性對照的小鼠泛癌免疫譜分析組，將300ng RNA在nCounter™（納斯瑞技術公司（NanoString Technologies））上運行。藉由nSolver軟體（納斯瑞技術公司（NanoString Technologies））對原始數據進行品質控制，歸一化和分析。將原始數據進行$\log_2$轉換，並進行統計分析。藉由nSolver高級分析（納斯瑞技術公司（NanoString Technologies））產生通路得分（干擾素得分、抗原加工得分、MHC得分、TLR得分和T細胞功能得分）和細胞譜分析得分（NK細胞得分、細胞毒性細胞得分和CD45得分）。

【0365】 參見補充表3A、表3B、表3C、表3D和表3E，以獲取每個得分中包含的基因的詳細列表，以及用於計算通路和細胞譜分析得分的p值。

腫瘤藥效學測定

【0366】 在攜帶MIA PaCa-2 T2、NCI-H358和CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤的小鼠中評估了AMG 510對ERK1/2磷酸化的影響。將MIA PaCa-2 T2或NCI-H358腫瘤細胞（5.0E+06個細胞）皮下注射到雌性無胸腺裸小鼠的腹肋部，其中細胞與基質膠（BD生物科學公司（BD Biosciences），聖約瑟，加利福尼亞州）的比率為2 : 1。當平均腫瘤大小達到約300-600 mm^3（n = 3/組），小鼠接受單次口服劑量的媒劑或AMG 510（0.3、1、3、10、30和100 mg/kg）並在2小時後收穫。將單次口服劑量的AMG 510（10 mg/kg）用於時程研究。向雌性Balb/c小鼠皮下

注射CT-26 *KRAS p.G12C*腫瘤細胞（3.0E+05個細胞）。當腫瘤平均體積為486 mm^3時，將小鼠隨機分組（*n* = 3/組），並接受單次口服劑量的媒劑或AMG 510（3、10、30或100 mg/kg）或MEKi（PD-0325901，10 mg/kg），並在2小時後收穫。對於所有研究，均分析血漿和腫瘤以確定測試物品的濃度。在指定的時間也收集腫瘤樣本，在液氮中速凍並加工進行生物分析或使用cryoPREP®乾式撞擊取樣器（Covaris公司）進行粉碎。將粉碎的樣本重懸在含有蛋白酶和磷酸酶抑制劑的RIPA裂解緩衝劑中並均質化。然後如上所述測定澄清裂解物的ERK1/2磷酸化水平並藉由MS測定$KRAS^{G12C}$的共價修飾。

異種移植物和同系研究

【0367】 將MIA PaCa-2 T2、NCI-H358或SW480-1AC細胞（5.0E+06個細胞與基質膠的比率為2 : 1）皮下注射到雌性無胸腺裸小鼠的腹肋部（*n* = 10/組）。當腫瘤確立，且對於MIA PaCa-2 T2和NCI-H358研究為約170 mm^3時，或對於SW480-1AC模型為約200 mm^3時，開始治療。在劑量反應研究中；小鼠接受口服媒劑（QD）或口服AMG 510（3、10、30和100 mg/kg QD）。在使用AMG 510和卡鉑進行的NCI-H358組合研究中，將小鼠隨機分為8組（*n* = 10/組），並接受口服媒劑（QD）+腹膜內PBS（1x/周）；口服AMG 510（10或30 mg/kg QD）+腹膜內PBS（1x/周）；口服媒劑（QD）+腹膜內卡鉑（50或100 mg/kg）（1x/周）；口服AMG 510（10或30 mg/kg QD）+腹膜內卡鉑（50或100 mg/kg）（1x/周）。對於使用AMG 510和MEKi的組合研究，將小鼠隨機分為4組，*n*=10/組，並接受口服媒劑（QD）；口服AMG 510（10 mg/kg QD）；口服MEKi（1 mg/kg QD）；口服AMG 510（10 mg/kg QD）+口服MEKi（1 mg/kg QD）。對於同系研究，將CT-26 *KRAS p.G12C*細胞（3.0E+05個細胞）皮下注射到雌性Balb/c小鼠的腹肋部。當腫瘤確立，且對於劑量反應研究為約170 mm^3時，並且對於組合研究為約130 mm^3時，開始治療，*n* = 10/組；除了MEKi劑量反應研究（其中*n* = 8/

組）。在劑量反應研究中，小鼠接受口服媒劑（QD），口服AMG 510（3、10、30和100 mg/kg QD）或口服MEKi（PD-0325901）（1、3或10 mg/kg QD）。在組合研究中，將小鼠隨機分為4組，n = 10/組，並從第15天到第43天接受口服媒劑（QD）+腹膜內PBS（Q3Dx3）；口服AMG 510（100 mg/kg QD）+腹膜內PBS（Q3Dx3）；口服媒劑（QD）+腹膜內抗PD-1抗體（29F.1A12；100 μg/劑量，Q3Dx3）；口服AMG 510（100 mg/kg QD）+腹膜內抗PD-1抗體（29F.1A12；100 μg/劑量，Q3Dx3）。組合治療研究以盲法進行。每週兩次用Pro-Max電子數位卡尺（日本千分尺製造有限公司（Japan Micrometer Mfg. Co. LTD））評估腫瘤尺寸，並使用以下公式計算腫瘤體積：長x寬x高，並表示為mm^3。在*KRAS p.G12C*肺PDX模型中，將小鼠皮下植入約70 mg大小的腫瘤塊。當腫瘤體積為約160-200mm^3時，將小鼠隨機分組，並在隨機分組後第二天接受口服媒劑（QD）或口服AMG 510（100mg/kg QD）。每週兩次使用以下公式收集腫瘤尺寸：寬度^2 x 長度 x 0.52，並表示為mm^3。將數據表示為平均值 ± SEM。

AMG 510-KRAS^{G12C}綴合物檢測

【0368】 抗人RAS（抗RAS）抗體購自艾博抗公司（Abcam），並使用供應商描述的方案用EZ-Link NHS-PEG4-生物素（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））進行生物素化。除去殘留的生物素，並將所得生物素-抗RAS以1：1的比率載入到Dynabeads® MyOne™鏈黴親和素C1珠（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））上，在室溫下持續1小時並伴有振盪。將來自先前描述的體外處理的細胞或體內處理的腫瘤細胞的裂解物與生物素化的抗RAS珠在室溫下孵育3小時並伴有振盪。使用磁鐵，將珠用PBST（3x），隨後是PBS（1x）和水（1x）洗滌。使用2%甲酸水溶液/10%乙腈水溶液從珠上洗脫樣本，隨後在室溫下孵育10分鐘並伴有振盪。將上清液轉移至96孔板並乾燥。將樣本重懸於變性緩衝劑（10 mM TCEP，8 M尿素）中，並在65°C下孵育15分

鐘並伴有振盪。添加碘乙醯胺（40 mM）並在37°C下孵育30分鐘，避光進行。添加50 mM NH_4HCO_3和胰蛋白酶（0.01 μg/μL），並將樣本在37°C消化過夜，持續約16-20小時，然後最後用甲酸淬滅，使其最終濃度為1%（v : v）。然後使用與Acquity UPLC（沃特斯公司（Waters））耦合的6500 QTRAP（AB SCIEX公司），藉由正離子電噴霧模式下的多反應監測（MRM），藉由液相層析-串聯質譜（LC-MS/MS）分析樣本。將樣本注射到Acquity UPLC BEH C8 1.7 μm, 2.1 x 100 mm柱（沃特斯公司（Waters））上。流動相由流動相A（水 + 0.1%甲酸）和流動相B（乙腈 + 0.1%甲酸）組成。LC梯度為：經5分鐘5%-50% B，經0.5分鐘 50%-95% B，以及經1分鐘 95% B。監測以下肽 $KRAS^{G12C}$ LVVVGAC(CAM)GVGK(529.8 → 846.3)和AMG 510修飾的$KRAS^{G12C}$ AMG 510-LVVVGAC(CAM)GVGK（521.4 → 675.2）。將佔有率計算為歸一化為未修飾和修飾的$KRAS^{G12C}$肽的總和的AMG 510修飾的$KRAS^{G12C}$肽的百分比。

流式細胞術

【0369】 為了體外分析AMG 510對MHC I類抗原表現的影響，將CT-26 *KRAS p.G12C*細胞（5.0E+04個細胞/孔）接種到96孔板中，並在不存在或存在IFNγ的情況下用三倍連續稀釋的AMG 510處理，最終濃度為25或250 pg/mL。將培養板在37°C、5% CO_2下孵育24小時。將細胞從孔中非酶法分離，用染色緩衝劑（PBS/0.5% BSA）洗滌，並且然後與PE綴合的H-2D^d、H-2K^{d}或H-2L^{d}抗體（BioLegend公司）在冰上孵育30分鐘。洗滌後，將細胞重懸於含有SYTOX藍色死細胞染色劑（生命技術公司（Life Technologies））的染色緩衝劑中，並且然後藉由流式細胞術進行分析。使用BD FACSDiva軟體在BD LSRFortessa流式細胞儀上進行採集和分析。

【0370】 對於體內研究，將CT-26 *KRAS p.G12C*細胞植入約6周齡的Balb/c雌性小鼠體內。植入後第22天，將小鼠隨機分為4天給藥群組，該群組由5組組

成，*n*=8/組，接受口服媒劑（QD）+腹膜內PBS（Q3Dx2）；口服AMG 510（100 mg/kg QD）+腹膜內PBS（Q3Dx2）；口服媒劑（QD）+腹膜內抗PD-1抗體（29F.1A12；100 μg/劑量，Q3Dx2）；口服AMG 510（100 mg/kg QD）+腹膜內抗PD-1抗體（29F.1A12；100 μg/劑量，Q3Dx2）；或口服MEKi（10 mg/kg，QD）+腹膜內PBS（Q3Dx2），持續4天。給藥四天后，收穫腫瘤並從周圍筋膜切開，稱重，機械切碎，並放入Liberase TL（0.2 mg/ml，羅氏）和DNA酶（DNase）I（20 μg/ml，Ambion公司）中。然後使用輕柔的MACS離解器（美天旎生物技術有限公司（Miltenyi Biotech））將腫瘤溶液機械均質化，並在MACSmix管旋轉器（美天旎生物技術有限公司（Miltenyi Biotech））上在37°C下孵育15分鐘。然後將細胞用0.02%EDTA（西格瑪公司（Sigma））和熱滅活的FBS（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））處理，並通過70 μm過濾器以除去團塊。然後將細胞離心，棄去上清液，然後將細胞沈澱重懸於LIVE/DEAD可固定的藍色死細胞染色劑（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））中30分鐘。然後在將細胞固定和通透化（細胞內固定和通透緩衝劑套件，eBiosciences公司）進行細胞內染色之前，用指定的抗體（補充表4）進行細胞表面染色。在LSR II流式細胞儀（BD生物科學公司（BD Biosciences））上進行分析之前，將CountBright™絕對計數珠（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））添加到每個樣本孔中，以便進行細胞計數。所有分析均使用FlowJo軟體v10（FlowJo公司）進行。藉由將細胞數歸一化為記錄的珠，除以分析的腫瘤等分試樣的體積和腫瘤的質量來確定絕對細胞計數。

酶聯免疫斑點（ELISpot）測定

【0371】 使用IFN-γELISpot測定法（細胞技術有限公司（Cellular Technology Ltd.））評估抗原特異性T細胞應答。收穫脾細胞（*n* = 4-5/組），並用於全細胞ELISpot測定。簡而言之，將2.5E+05個脾細胞與2.5E+04 CT-26、CT-26

*KRAS p.G12C*或4T1腫瘤細胞混合，並在37°C下孵育20小時。使用CTLS6螢光斑點分析儀（細胞技術有限公司（Cellular Technology Ltd.））來計數斑點。

統計分析

【0372】 藉由單向ANOVA隨後是鄧尼特事後檢驗對藥效學實驗進行分析。對於功效研究，進行了重複測量方差分析（RMANOVA），隨後使用GraphPad Prism 7.04進行鄧尼特事後檢驗。藉由配對t檢驗進行回歸分析。藉由具有Mantel-Cox對數秩的卡普蘭一梅爾估計量（Kaplan-Meier estimator）確定存活率的統計分析，以使用GraphPad Prism 7.04來比較曲線。藉由雙向ANOVA多重比較隨後是圖凱事後檢驗分析流式細胞術數據。藉由單向ANOVA多重比較隨後是圖凱事後檢驗分析納斯瑞（NanoString）數據。藉由非配對t檢驗使用GraphPad Prism進行ELISpot數據比較。

用於AMG 510的LC-MS/MS生物分析方法

【0373】 藉由在TissueLyzer（凱傑公司（Qiagen））中使用碳化鎢珠，向組織中添加水（4：1 mL：g），來製備腫瘤組織勻漿。向20 μL樣本（血漿或腫瘤組織勻漿）中添加100 μL含IS（200 ng/mL甲苯磺丁脲）的乙腈，將樣本渦旋10 min，以3500 g離心10 min，並且收集90 μL上清液。向收集的上清液中添加100 μL水（含0.1%甲酸），並將5 μL所得溶液注射入LC-MS/MS系統。使用保持在50°C下的Phenomenex Kinetex C18 50 x 2.1 mm，2.7 μm，使用0.1%甲酸的H_2O溶液（流動相A）和0.1%甲酸的乙腈溶液（流動相B）實現層析分離。層析梯度如下運行：使用10%流動相B從0 min到0.1 min進行等度洗脫，從0.1到0.85 min線性增加到95%流動相B，使用95%流動相B從0.85到1.10 min保持等度洗脫，從1.10到1.11 min線性下降到10%流動相B，使用10%流動相B從1.11到1.40 min保持等度洗脫。API 4000質譜儀通常用於分析，並在561.179 > 134.100（AMG 510）和271.100 > 134.100（甲苯磺丁脲）的MS/MS過渡後以正離子模式ESI運行。使用Analyst®

（Sciex公司）對峰面積進行積分。進行峰面積積分後，將數據匯出到Watson LIMS™（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）），並藉由峰面積比（AMG 510的峰面積/IS的峰面積）相對於血漿校準標準品的標稱濃度的加權（$1/x^2$）線性回歸確定濃度。血漿中AMG 510的校準範圍為1.0到10,000 ng/mL（LLOQ 1.0 ng/mL）。腫瘤組織勻漿中AMG 510的校準範圍為5.0至50,000 ng/mL（LLOQ 5.0 ng/mL）。

在細胞培養中藉由胺基酸進行穩定的同位素標記（SILAC）

【0374】 藉由將以下組分添加到1 L的最終體積中來製備輕質培養基（LM）：100 mL透析FBS，10.4 g粉末狀RPMI-1640培養基，2 g碳酸氫鈉，200 mg L-精胺酸，48 mg L-離胺酸，100 mg L-白胺酸和1x Pen-Strep，用0.22 μm過濾系統進行過濾。用與LM相同之方法製備重質培養基（HM），但是用100 mg [$^{13}C_6$]-L-白胺酸（劍橋同位素實驗室（Cambridge Isotope Laboratories））取代非同位素富集的L-白胺酸。將MIA PaCa-2和NCI-H358細胞接種（3E+05個細胞）到具有LM的T75燒瓶中；每天更換LM。48小時後，將細胞用1x PBS洗滌，並將培養基切換為HM；每天更換HM，持續4天。在第6天，將細胞用1x PBS洗滌，並將培養基切換為LM；每天更換LM。從第6天開始，在0、1、3、6、9、12、15、18、21、24、30、36、48和72 h收集MIA PaCa-2樣本。從第6天開始，在0、3、6、9、12、24、36、48、72和96 h收集NCI-H358樣本。在每個時間點收集一式三份製備的分開的T75燒瓶，並處理為裂解物。

SILAC樣本收集和裂解蛋白的製備

【0375】 用1x PBS洗滌T75燒瓶，用胰蛋白酶處理並孵育2 min，隨後添加冰冷的含有10%透析FBS的PBS。充分混合細胞並收集，隨後使用Vi-CELL XR進行細胞計數。離心剩餘的細胞，並用冰冷的PBS（無Mg^{+2}，無Ca^{+2}）洗滌。再次離心細胞，除去PBS，將細胞溶解在少量冰冷的含有磷酸酶（PhosSTOP，羅

氏）和蛋白酶（不含EDTA的cOmplete，羅氏）抑制劑的RIPA中。將所得裂解物渦旋，置於冰上10分鐘，離心以除去不溶性碎片，然後在-80°C下儲存直至進一步處理。

SILAC KRAS^{G12C}靶標半衰期確定

【0376】 抗人RAS（抗RAS）抗體購自艾博抗公司（Abcam），並使用供應商描述的方案用EZ-Link NHS-PEG4-生物素（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））進行生物素化。除去殘留的生物素，並將所得生物素-抗RAS載入到Dynabeads® MyOne™ 鏈黴親和素C1珠（賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））上，在室溫下持續1.5 h並伴有振盪。將細胞裂解物（如上所述）與生物素化的抗RAS珠在室溫下孵育2小時並伴有振盪。使用磁鐵，將珠用PBST（3x），隨後是PBS（1x）洗滌。使用3%甲酸水溶液/30%乙腈水溶液從珠上洗脫樣本，隨後在室溫下孵育10 min並伴有振盪。將上清液轉移至96孔板並乾燥。將樣本重懸於變性緩衝劑（10 mM TCEP，8 M尿素）中，並使用水浴在37°C下孵育1 h。添加碘乙醯胺（40 mM）並在25°C下孵育1 h，避光進行。添加50 mM NH_4HCO_3和胰蛋白酶（0.1 μg/μL），並將樣本在37°C下消化24小時，然後用甲酸淬滅，使其最終濃度為1%（v：v）。在藉由質譜進行分析之前，將樣本濃縮至約80 μL。使用與Acquity UPLC（沃特斯公司（Waters））耦合的6500 QTRAP（AB SCIEX公司），藉由正離子電噴霧模式下的多反應監測（MRM），藉由液相層析-串聯質譜（LC-MS/MS）分析樣本。將樣本注射到Acquity UPLC BEH C8 1.7μm, 2.1 x 100mm柱（沃特斯公司（Waters））上。流動相由流動相A（水+0.1%甲酸）和流動相B（乙腈+0.1%甲酸）組成。LC梯度為：經5分鐘5-50%B，經0.5分鐘50-95%B，以及經1分鐘95%B。將用於KRAS^{G12C}（LVVVGAc(CAM)GVGK（529.8 → 846.3）& 13C-LVVVGAc(CAM)GVGK（532.8 → 846.3））和RAS WT（LVVVGAGGVGK（478.3 → 743.2）&

13C-LVVVGAGGVGK（481.3 → 743.2））的以下肽用於監測從重標籤到輕標籤的過渡。相對同位素豐度（RIA）使用以下公式確定：

$$\text{RIA} = \frac{\text{A重}}{\text{A輕} + \text{A重}}$$

SILAC確定KRAS^{G12C}半衰期

【0377】 為了說明細胞生長對確定蛋白質半衰期的影響，將與每個時間點相關的細胞數和RIA數據同時擬合到一系列等式，以確定KRAS^{G12C}在MIA PaCa-2和NCI-H358細胞中的半衰期。使用了以下等式：

重肽的一階等式：

$$\frac{d\,Hv}{dt} = -k_{dec}\,Hv$$

輕肽的一階等式：

$$\frac{d\,lt}{dt} = k_{dec}\,(Hv_0 + lt_0) - k_{dec}\,lt + \frac{\text{細胞}_{\text{新}}}{\text{細胞}_{(0)}}(Hv_0 + lt_0)\,k_{dec} - k_{dec}\,\frac{\text{細胞}_{\text{新}}}{\text{細胞}_{(0)}}\,lt$$

細胞生長的一階等式：

$$\frac{d\,\text{細胞}_{\text{新}}}{dt} = -k_{dil}\,(\text{細胞}_{(0)} + \text{細胞}_{\text{新}})$$

其他等式：

$$k_{syn} = k_{dec}(Hv_0 + lt_0)$$

$$\text{半衰期} = \frac{0.693}{k_{dec}}$$

【0378】 時間0定義為HM變為LM的時間，Hv係重肽的濃度，lt係輕肽的濃度，$cell_{new}$係新細胞的數量，k_{dec}係降解的一階速率常數，k_{syn}係合成的零階速率常數，k_{dil}係一階細胞生長常數，$cell_{(0)}$係時間0時的細胞數，$Hv_{(0)}$係時間0時的重肽濃度，$lt_{(0)}$係時間0時的輕肽濃度。使用逐步方法進行建模，其中在第一步中，由細胞數估計k_{dil}，並且在第二步中，使用上述等式估計k_{dec}。

【0379】 藉由在更換為LM後量化細胞數並應用以下等式來估計k_{dil}：$A = A_0 e^{-k_{dil} t}$，其中A和A_0分別代表時間t和0時的細胞數。

補充表1 細胞測定數據

突變	細胞系	組織來源	基礎p-ERK1/2 IC_{50}（μM）	細胞活力 IC_{50}（μM）	球狀體細胞活力 IC_{50}（μM）
KRAS p.G12C 純合	MIA PaCa-2	胰腺	0.036 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.001 ± 0.001
	NCI-H1373	肺	0.010 ± 0.0001	0.020 ± 0.006	0.005 ± 0.002
	NCI-H2030	肺	0.040 ± 0.020	0.006 ± 0.003	ND
	NCI-H2122	肺	0.123 ± 0.006	0.032 ± 0.005	0.009 ± 0.002
	SW1463	結腸	0.033 ± 0.004	0.015 ± 0.007	ND
	SW1573	肺	0.027 ± 0.001	> 7.5	> 10
	UM-UC-3	膀胱	0.029 ± 0.016	0.005 ± 0.001	ND
KRAS p.G12C 雜合	Calu-1	肺	0.013 ± 0.004	0.004 ± 0.001	ND
	NCI-H1792	肺	0.045 ± 0.023	0.011 ± 0.008	ND
	NCI-H23	肺	0.090 ± 0.017	0.006 ± 0.001	ND
	NCI-H358	肺	0.035 ± 0.003	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.002
	SW837	結腸	0.018 ± 0.002	0.009 ± 0.006	ND
KRAS p.G12D 純合	AsPC-1	胰腺	> 10	> 7.5	ND
KRAS p.G12D 雜合	A-427	肺	> 10	> 7.5	ND
	LS 174T	結腸	> 10	> 7.5	ND

突變	細胞系	組織來源	基礎p-ERK1/2 IC_{50}（μM）	細胞活力 IC_{50}（μM）	球狀體細胞活力 IC_{50}（μM）
KRAS p.G12V 純合	SW480	結腸	> 10	> 7.5	ND
KRAS p.G12S 純合	A549	肺	> 10	> 7.5	ND
KRAS p.G13C 雜合	NCI-H1355	肺	> 10	> 7.5	ND
KRAS WT *EGFR p.E746_A750 del*	HCC-827	肺	> 10	> 7.5	ND
KRAS WT *EML4-ALK* 融合	NCI-H1322	肺	> 10	> 7.5	ND
KRAS WT *TPM3-NTRK* 融合	KM12	結腸	> 10	> 7.5	ND
KRAS WT *BRAF p.V600E*	COLO-205	結腸	> 10	> 7.5	ND

【0380】 突變注釋係從Catalogue of Somatic Mutations in Cancer[癌症體細胞突變目錄](COSMIC)[1] 或Misale等人2019[2]獲得的。基礎ERK1/2磷酸化和細胞活力測定的平均IC_{50}值係從至少n = 2個實驗中獲得的。ND = 未確定

補充表2.數據收集和細化統計（分子替代）

	$KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$ AMG 510
數據收集	
空間群	P 21 21 21
晶胞尺寸	
a, *b*, *c*（Å）	40.87, 58.42, 65.89
α, β, γ（°）	90, 90, 90
解析度（Å）	30.0-1.65（1.71-1.65）
R_{sym}	0.162（0.521）
$I/\sigma I$	6.9（2.5）
完整性（%）	97.0（96.3）
冗餘	4.4（4.2）
細化	
解析度（Å）	30.00 - 1.65
反射數	18077

R_{work}/R_{free}	0.1809/0.2152
原子數	1613
蛋白質	1336
配位基/離子	70
水	207
*B*因子	24.8
蛋白質	24.3
配位基/離子	24.1
水	34.1
R.m.s.偏差	
鍵長（Å）	0.005
鍵角（°）	1.08

收集此結構的一個晶體數據集

*括弧中的值係針對最高解析度shell。

補充表3. 基因表現通路得分分析

補充表3A

T細胞功能通路得分計算中涉及的基因	P值	T細胞功能通路得分計算中涉及的基因	P值
STAT1	1.72E-09	LCP1	1.20E-04
H2-T23	2.70E-09	IKZF2	1.46E-04
ADA	5.22E-09	SOCS1	1.63E-04
EGR1	7.09E-09	TCF7	2.02E-04
TGFB3	1.22E-08	CEBPB	2.26E-04
TLR6	1.24E-08	IL1R1	5.42E-04
ITGA1	1.40E-08	JAK3	6.60E-04
THY1	1.65E-08	PVRL2	6.90E-04
NFATC2	2.31E-08	CD1D1	8.57E-04
H2-AB1	3.62E-08	CD274	8.63E-04
H2-AA	4.93E-08	ICOS	9.52E-04
CTSH	5.80E-08	TNFSF13B	9.63E-04
CD48	6.78E-08	IL4RA	1.02E-03
ITGAL	6.82E-08	STAT4	1.07E-03
CD74	7.35E-08	FAS	1.09E-03
ITGAM	8.78E-08	LGALS3	1.18E-03
IL2RG	8.97E-08	IL13RA1	1.28E-03
H2-DMA	1.33E-07	IFNG	1.29E-03
CD83	1.41E-07	FASL	1.39E-03
TNFRSF14	1.48E-07	IRF4	1.47E-03
MAF	1.60E-07	TRAF6	1.63E-03
CD247	1.66E-07	CD2	1.65E-03

T細胞功能通路得分計算中涉及的基因	P值	T細胞功能通路得分計算中涉及的基因	P值
PTPRC	1.70E-07	TIGIT	1.65E-03
TAP1	2.32E-07	TLR4	1.69E-03
CD3G	2.80E-07	CD47	2.26E-03
MILL2	3.39E-07	VEGFA	2.31E-03
CD27	3.64E-07	PDCD1LG2	2.47E-03
LCK	4.04E-07	BCL6	2.48E-03
CD3E	4.62E-07	IL12RB1	3.49E-03
SPP1	5.19E-07	RORA	3.60E-03
IKZF1	5.24E-07	NFKB1	3.96E-03
CCR2	7.34E-07	CXCL12	4.63E-03
ZAP70	7.73E-07	RIPK2	4.83E-03
NFATC1	8.07E-07	GFI1	4.88E-03
LAG3	8.54E-07	IL15	5.01E-03
IRF1	8.95E-07	IL12B	5.09E-03
SYK	9.31E-07	IL2RA	5.56E-03
IRF8	1.17E-06	CD276	6.24E-03
PSMB10	1.17E-06	BTLA	6.27E-03
XCL1	1.36E-06	FOXP3	6.70E-03
PVR	1.54E-06	ANXA1	7.25E-03
CXCR3	1.54E-06	SOCS3	7.29E-03
CD3D	1.56E-06	CD40	7.52E-03
IL18R1	1.93E-06	CD80	1.21E-02
EOMES	1.95E-06	MAPK1	1.22E-02
PSEN2	2.40E-06	MAP3K7	1.43E-02
CCL5	3.67E-06	TRP53	1.46E-02
IFNAR1	3.85E-06	TRAF2	1.59E-02
JAK1	4.90E-06	IL12RB2	1.78E-02
CXCR4	4.94E-06	NOS2	1.79E-02
CARD11	6.83E-06	TGFB1	2.02E-02
ICAM1	6.84E-06	JAK2	2.46E-02
FCGR4	6.94E-06	SPN	2.48E-02
IL1B	7.10E-06	YY1	2.53E-02
CCL2	7.33E-06	STAT6	2.90E-02
CMA1	7.69E-06	CCL3	2.97E-02
H2-K1	9.48E-06	MAPK8	3.73E-02
VCAM1	1.03E-05	IL7R	5.28E-02
IL6ST	1.16E-05	TNFSF11	5.45E-02
BCL2	1.21E-05	CCND3	6.50E-02
ICOSL	1.35E-05	TNF	1.23E-01
TYK2	1.57E-05	CSF2	1.54E-01
ITGB2	1.62E-05	RELB	1.55E-01
CD86	1.68E-05	CCL11	1.73E-01

T細胞功能通路得分計算中涉及的基因	P值	T細胞功能通路得分計算中涉及的基因	P值
IL18RAP	1.72E-05	SELL	1.91E-01
CCR5	1.74E-05	ITGAX	2.11E-01
ITK	1.84E-05	CCR7	2.17E-01
ITCH	1.94E-05	TNFRSF4	2.31E-01
IL18	2.01E-05	RPS6	2.43E-01
CD8A	2.41E-05	HAVCR2	3.03E-01
REL	2.69E-05	TNFSF18	3.43E-01
CD8B1	3.06E-05	FLT3	3.64E-01
CD5	3.39E-05	GZMB	3.89E-01
H2-D1	3.80E-05	FUT7	4.36E-01
STAT5B	3.93E-05	IDO1	4.69E-01
PDCD1	5.10E-05	CASP3	4.78E-01
CCL7	5.31E-05	CCR6	5.02E-01
CREBBP	5.39E-05	TMED1	5.07E-01
H2-M3	5.67E-05	BCL10	5.21E-01
CD4	5.83E-05	CXCL13	6.89E-01
TBX21	7.14E-05	CD28	7.48E-01
PSEN1	7.20E-05	TNFSF14	7.51E-01
GATA3	7.48E-05	CTLA4	7.97E-01
POU2F2	7.52E-05	CD40LG	8.17E-01
TXK	8.94E-05	IL7	8.86E-01
DPP4	9.70E-05	RORC	1.00E+00

補充表3B

干擾素通路得分計算中涉及的基因	P值	干擾素通路得分計算中涉及的基因	P值
GBP5	7.49E-09	DDX58	1.73E-05
IFIT3	2.66E-08	IFIT2	5.17E-05
H2-AB1	3.62E-08	TBK1	5.83E-05
H2-AA	4.93E-08	IFI35	7.52E-05
IFI44L	8.05E-08	SH2D1B1	4.08E-04
IFNAR2	1.13E-07	IFITM2	5.30E-04
IRGM2	1.18E-07	IFI27	6.90E-04
CIITA	1.68E-07	ULBP1	9.81E-04
CD3E	4.62E-07	TMEM173	1.10E-03
IFNGR1	5.77E-07	H60A	2.91E-03
IFIH1	7.59E-07	IFIT1	3.52E-03
IRF8	1.17E-06	IL12RB2	1.78E-02
IRF7	1.19E-06	NOS2	1.79E-02
NLRC5	1.46E-06	RUNX3	9.02E-02
EOMES	1.95E-06	CCR7	2.17E-01

IFNAR1	3.85E-06	FADD	2.37E-01
CXCL16	6.82E-06	IFITM1	6.10E-01
IFI44	8.06E-06	MAVS	8.59E-01

補充表3C

MHC通路得分計算中涉及的基因	P值
H2-T23	2.70E-09
KLRK1	3.47E-08
H2-AB1	3.62E-08
H2-EB1	4.45E-08
H2-AA	4.93E-08
CTSH	5.80E-08
CD74	7.35E-08
MR1	9.98E-08
H2-DMA	1.33E-07
CIITA	1.68E-07
TAP1	2.32E-07
FCER1G	2.41E-07
LAG3	8.54E-07
CD160	1.02E-06
FCGR3	1.13E-06
NLRC5	1.46E-06
FCGR1	1.50E-06
TAPBP	1.53E-06
H2-K1	9.48E-06
H2-D1	3.80E-05
TAP2	4.89E-05
PML	5.37E-05
H2-M3	5.67E-05
FCGR2B	6.05E-05
H2-DMB1	1.80E-04
CD1D1	8.57E-04
H2-DMB2	1.17E-02
H2-Q2	4.41E-02
H2-OB	1.92E-01
CD40LG	8.17E-01

補充表3D

抗原加工通路得分計算中涉及的基因	P值
H2-T23	2.70E-09
H2-AB1	3.62E-08
H2-EB1	4.45E-08

H2-AA	4.93E-08
H2-EA-P	4.94E-08
NOD1	4.97E-08
CD74	7.35E-08
MR1	9.98E-08
H2-DMA	1.33E-07
PSMB8	2.03E-07
TAP1	2.32E-07
FCER1G	2.41E-07
FCGR3	1.13E-06
FCGR1	1.50E-06
TAPBP	1.53E-06
PSMB9	2.02E-06
SLC11A1	2.53E-06
ICAM1	6.84E-06
H2-K1	9.48E-06
H2-D1	3.80E-05
TAP2	4.89E-05
H2-M3	5.67E-05
FCGR2B	6.05E-05
H2-DMB1	1.80E-04
CD1D1	8.57E-04
H2-DMB2	1.17E-02
H2-Q2	4.41E-02
RELB	1.55E-01
H2-OB	1.92E-01
CCR7	2.17E-01
NOD2	2.69E-01

補充表3E

TLR通路得分計算中涉及的基因	**P值**
TLR6	1.24E-08
TICAM2	1.88E-08
TLR7	4.46E-08
TLR8	9.04E-08
TLR9	1.23E-07
TLR1	2.11E-07
TLR2	3.63E-06
CD86	1.68E-05
TLR3	2.63E-05
TBK1	5.83E-05
IRAK2	1.44E-04
PRKCE	3.72E-04
TICAM1	8.09E-04

IRF4	1.47E-03
TRAF6	1.63E-03
TLR4	1.69E-03
TLR5	1.90E-03
MYD88	4.49E-03
GFI1	4.88E-03
MAP3K7	1.43E-02
IRF3	3.71E-02
MAPKAPK2	1.16E-01
IRAK1	1.39E-01
NFKBIA	1.62E-01
TRAF3	6.07E-01
TIRAP	9.18E-01

補充表4.流式細胞術抗體

抗體	殖株	目錄號	供應商
BUV737大鼠抗小鼠CD4	RM4-5	564933	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BV421大鼠抗小鼠CD8a	53-6.7	563898	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BV510大鼠抗CD11b	M1/70	562950	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BUV737大鼠抗CD11b	M1/70	564443	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BV421倉鼠抗小鼠CD11c	HL3	562782	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BB700大鼠抗小鼠CD19	1D3	566411	BD生物科學公司（BD Biosciences）
FITC大鼠抗小鼠CD24	M1/69	11-0242-81	賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）
BV650大鼠抗小鼠CD25	PC61	564021	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BV786小鼠抗小鼠CD45.2	104	563686	BD生物科學公司（BD Biosciences）
APC/Cy7大鼠抗小鼠CD90.2	30-H12	105328	BioLegend公司
APC倉鼠抗小鼠CD103	2E7	17-1031-80	賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）
PE大鼠抗小鼠CD274	MIH5	558091	BD生物科學公司（BD Biosciences）
PE倉鼠抗小鼠CD279（PD-1）	J43	12-9985-82	賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）

FITC大鼠抗小鼠CD335（NKp46）	29A1.4	560756	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BV650大鼠抗小鼠F4/80	BM8	123149	BioLegend公司
APC大鼠抗小鼠FOXP3	FJK-16s	17-5773	賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）
BV711大鼠抗小鼠Ly-6C	HK1.4	128037	BioLegend公司
APC-H7大鼠抗小鼠Ly-6G	1A8	565369	BD生物科學公司（BD Biosciences）
BV510大鼠抗小鼠I-A/I-E（MHCII）	M5/114.15.2	107635	BioLegend公司
BV711倉鼠抗小鼠TCR β鏈	H57-597	563135	BD生物科學公司（BD Biosciences）

【0381】 結合較佳的實施方式描述了本發明。然而，應瞭解，本發明並不限於所揭露的實施方式。應理解，鑒於本文中對本發明的實施方式的描述，熟悉該項技術者可以做出多種修改。此類修改涵蓋於下文的申請專利範圍中。

【符號說明】

【0382】 無

【生物材料寄存】

【0383】 無

【序列表】

<110> 美商安進公司(AMGEN INC.)

<120> 用於治療癌症的包括KRASG12C抑制劑和一種或多種其他藥物活性劑之組合療法

<150> 62/769,355
<151> 2018-11-19

<150> 62/821,376
<151> 2019-03-20

<150> 62/865,819
<151> 2019-06-24

<160> 21

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 1

Ser Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 2

Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 3

Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 6

Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr
1 5

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 472
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 9

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

```
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
                85                  90                  95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
            100                 105                 110

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala
        115                 120                 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
    130                 135                 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
                165                 170                 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
            180                 185                 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
        195                 200                 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
    210                 215                 220
```

```
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
225                 230                 235                 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
                245                 250                 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            260                 265                 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        275                 280                 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    290                 295                 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln
305                 310                 315                 320

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                325                 330                 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            340                 345                 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        355                 360                 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
    370                 375                 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385                 390                 395                 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                405                 410                 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            420                 425                 430
```

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 10
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 10

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 11
agctatgaca tgagc 15

<210> 12
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 12
cttattagtg gtggtggtag tcaaacatac tacgcagaat ccgtgaaggg c 51

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 13
cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtc 33

<210> 14
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 14
cgggcgagtc agggtattag caactggtta gcc 33

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 15
gctgcatcca gtttgcaaag t 21

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 16
caacaggctg aaagtttccc tcacact 27

<210> 17
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 17
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgaca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggaatg ggtctcactt attagtggtg gtggtagtca aacatactac 180

gcagaatccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gtcccccagt 300

ggccactact tctacgctat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 18
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 18
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc aactggttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctgaaagtt tccctcacac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 19
<211> 1416
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 19
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg 60

cgctgtgagg tgcagctgtt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg 120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgacatgag ctgggtccgc 180

caggctccag ggaaggggct ggaatgggtc tcacttatta gtggtggtgg tagtcaaaca 240

tactacgcag aatccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatattt ctgtgcgtcc 360

cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420

tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccccctgg caccctcctc caagagcacc 480

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 780

gggggaccgt cagtcttcct cttccccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 840

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgtg cgaggagcag 960

tacggcagca cgtaccgttg cgtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1080

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1320

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1416

<210> 20
<211> 708
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 20
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg 60

cgctgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcttccgtgt ctgcatctgt tggagacaga 120

gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcaact ggttagcctg gtatcagcag 180

aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tttgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 240

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ccctcaccat cagcagcctg 300

cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggctg aaagtttccc tcacactttc 360

ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacga acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 708

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRISPR分子

<400> 21

Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly
1 5 10 15

Cys Thr Gly Ala
20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種(1M)-6-氟-7-(2-氟-6-羥基苯基)-1-(4-甲基-2-(2-丙烷基)-3-吡啶基)-4-((2S)-2-甲基-4-(2-丙烯醯基)-1-哌啡基)吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2(1H)-酮或其藥學上可接受的鹽之用途，其係用於製備治療KRAS G12C突變介導之癌症的藥劑，其中該藥劑進一步包含至少一種其他藥學活性藥劑或與至少一種其他藥學活性藥劑組合投與，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係抗PD-1抗體、MEK抑制劑、SHP2抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。

【請求項2】

如請求項1之用途，其中該癌症係非小細胞肺癌、小腸癌、闌尾癌、結直腸癌、子宮內膜癌、胰臟癌、皮膚癌、胃癌、鼻腔癌、膽管癌或腦瘤。

【請求項3】

如請求項2之用途，其中該癌症係胰臟癌。

【請求項4】

如請求項2之用途，其中該癌症係結直腸癌。

【請求項5】

如請求項2之用途，其中該癌症係非小細胞肺癌。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係抗PD-1抗體。

【請求項7】

如請求項6之用途，其中該抗PD-1抗體係AMG 404、派姆單抗(pembrolizumab)或納武單抗(nivolumab)。

【請求項8】

如請求項6之用途，其中該係抗PD-1抗體係派姆單抗。

【請求項9】

如請求項6之用途，其中該係抗PD-1抗體係納武單抗。

【請求項10】

如請求項6之用途，其中該係抗PD-1抗體包含含有SEQ ID NO: 1之重鏈(HC)互補決定區(CDR)1胺基酸序列；含有SEQ ID NO: 2之HC CDR2胺基酸序列；含有SEQ ID NO: 3之HC CDR3胺基酸序列；含有SEQ ID NO: 4之輕鏈(LC) CDR1胺基酸序列；含有SEQ ID NO: 5之LC CDR2胺基酸序列；及含有SEQ ID NO: 6之LC CDR3胺基酸序列。

【請求項11】

如請求項6之用途，其中該係抗PD-1抗體包含SEQ ID NO: 7之重鏈可變區序列及SEQ ID NO: 8之輕鏈可變區序列。

【請求項12】

如請求項6之用途，其中該係抗PD-1抗體包含SEQ ID NO: 9之重鏈序列及SEQ ID NO: 10之輕鏈序列。

【請求項13】

如請求項6之用途，其中該係抗PD-1抗體係AMG 404。

【請求項14】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係MEK抑制劑。

【請求項15】

如請求項14之用途，其中該MEK抑制劑係係曲美替尼(trametinib)、匹馬塞替尼(pimasertib)、PD-325901、MEK162、TAK-733、GDC-0973或AZD8330。

【請求項16】

如請求項15之用途，其中該MEK抑制劑係係曲美替尼。

【請求項17】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係SHP2抑制劑。

【請求項18】

如請求項17之用途，其中該SHP2抑制劑係RMC 4550。

【請求項19】

如請求項17之用途，其中該SHP2抑制劑係RMC 4630。

【請求項20】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係PI3K抑制劑。

【請求項21】

如請求項20之用途，其中該PI3K抑制劑係AMG 511或布帕尼西(buparlisib)。

【請求項22】

如請求項20之用途，其中該PI3K抑制劑係AMG 511。

【請求項23】

如請求項20之用途，其中該PI3K抑制劑係布帕尼西。

【請求項24】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該至少一種其他藥學活性藥劑係AKT抑制劑。

【請求項25】

如請求項24之用途，其中該AKT抑制劑係AZD5363。

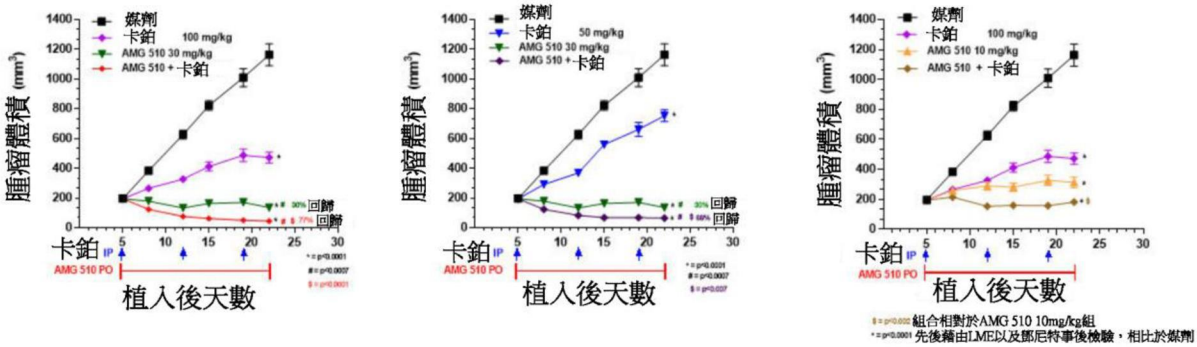
【請求項26】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該藥劑及至少一種其他藥學活性藥劑係同時或分開投與。

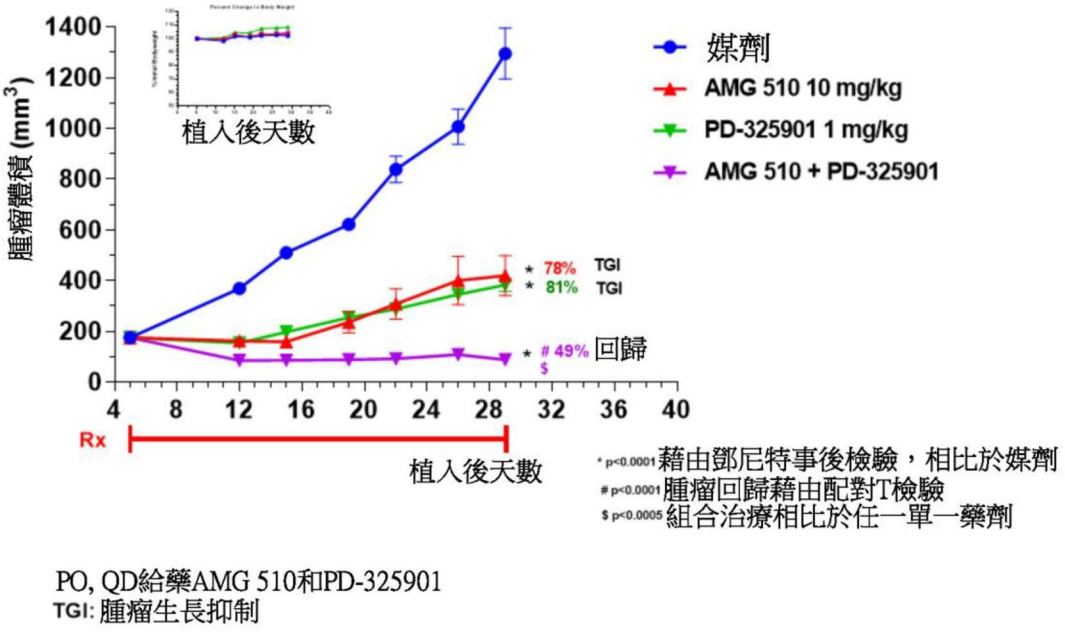
【請求項27】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該藥劑係用於投與成人。

【發明圖式】

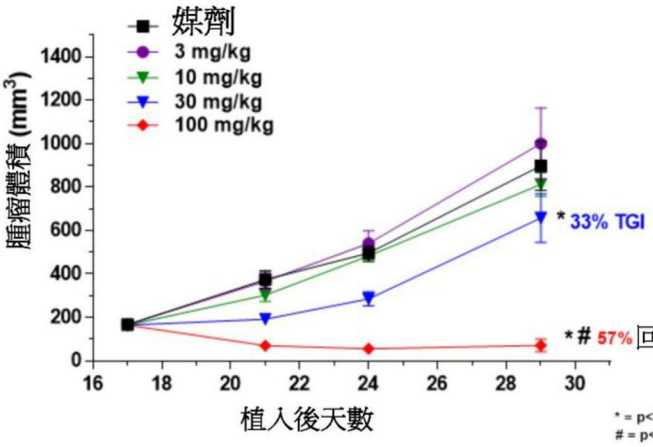


【圖 1】



PO, QD給藥AMG 510和PD-325901
TGI: 腫瘤生長抑制

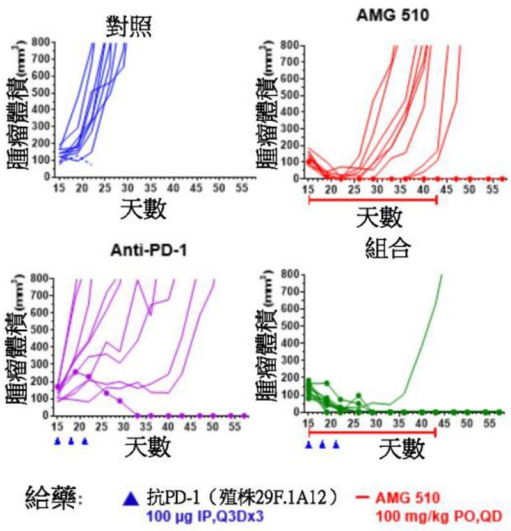
【圖 2】

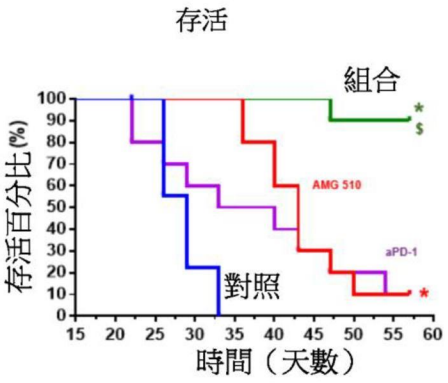


* = p<0.02 藉由鄧尼特事後檢驗，相比於媒劑
= p<0.03 腫瘤回歸藉由配對T檢驗

PO, QD給藥AMG 510
TGI: 腫瘤生長抑制

【圖 3】

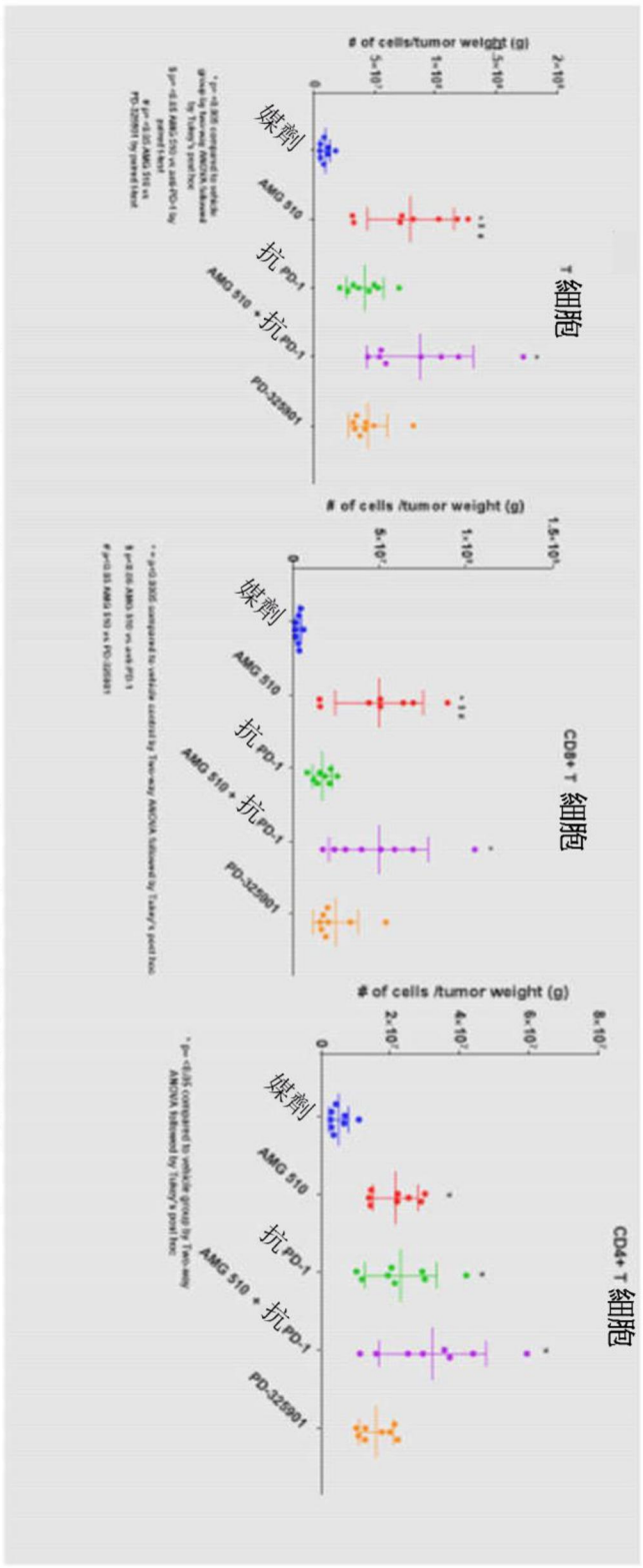




* p<0.001 相比於對照
$ p<0.005 組合相對於AMG 510或抗-PD-1

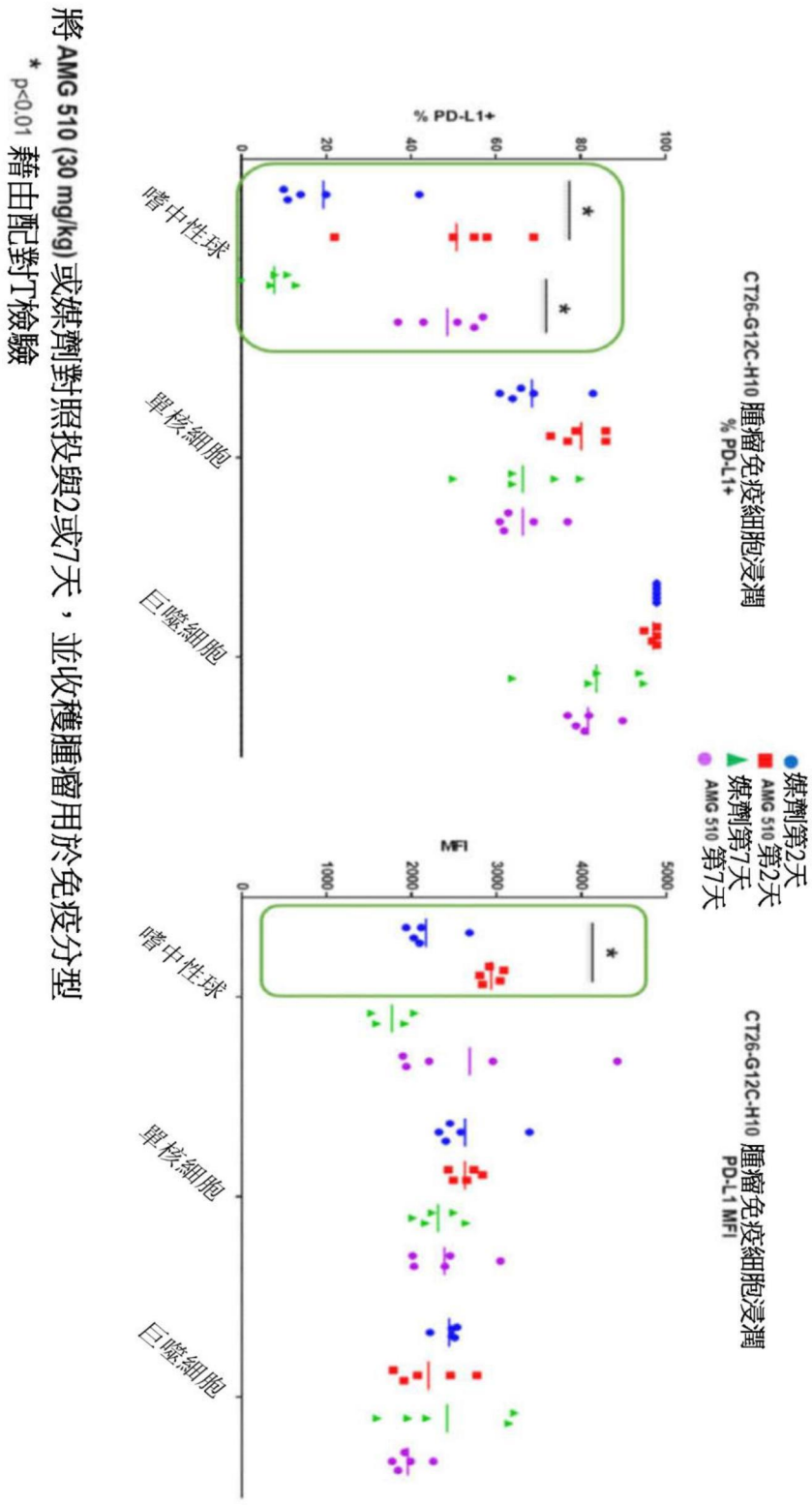
結腸直腸癌的CT-26 G12C模型
存活是替代終點，被定義為達到> 800mm³的腫瘤尺寸的時間

【圖 4】



將AMG 510（100 mg/kg），抗PD1抗體（100ug），510+抗PD1組合或媒劑對照投與4天，並收集腫瘤用於免疫分型。PD-325901是MEK抑制劑。

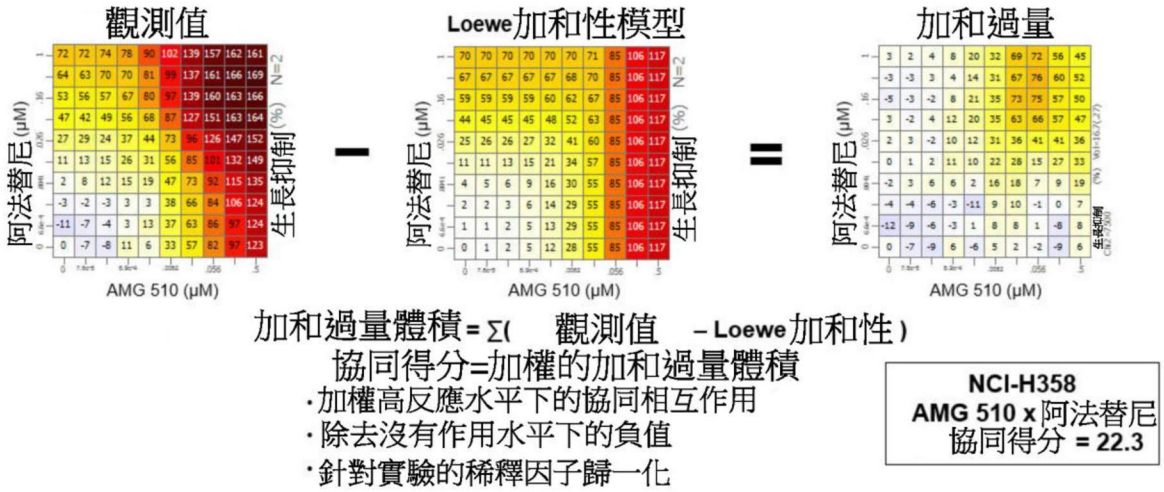
【圖 5】



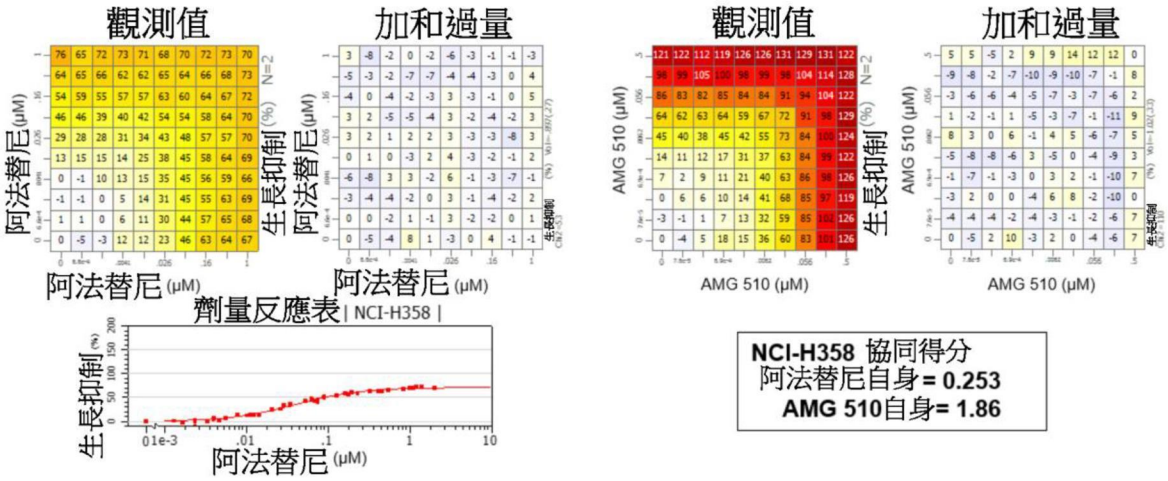
將 AMG 510 (30 mg/kg) 或媒劑對照投與2或7天，並收穫腫瘤用於免疫分型

* p<0.01 藉由配對T檢驗

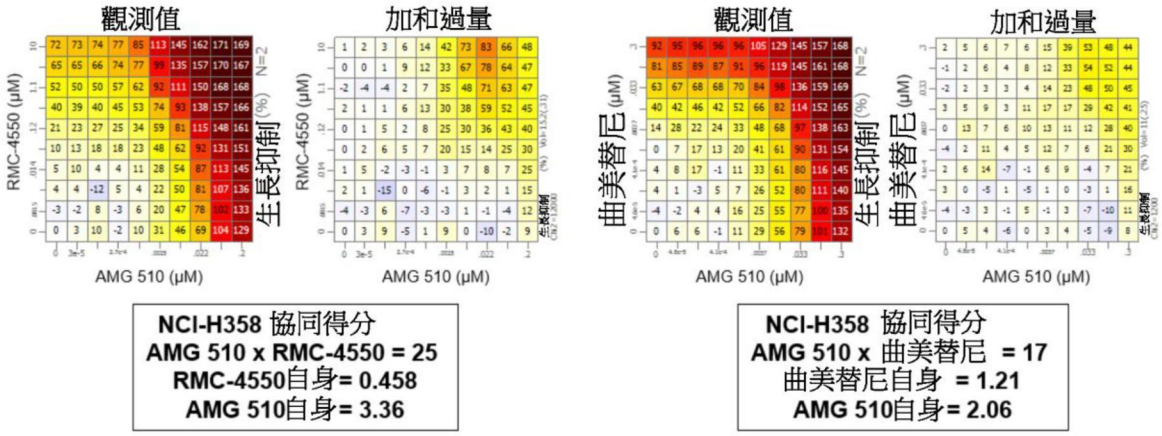
【圖 6】


觀測值
Loewe加和性模型
加和過量
阿法替尼 (μM)
生長抑制 (%)
AMG 510 (μM)
N=2
加和過量體積 = Σ(觀測值 – Loewe加和性)
協同得分=加權的加和過量體積
·加權高反應水平下的協同相互作用
·除去沒有作用水平下的負值
·針對實驗的稀釋因子歸一化
NCI-H358
AMG 510 x 阿法替尼
協同得分 = 22.3

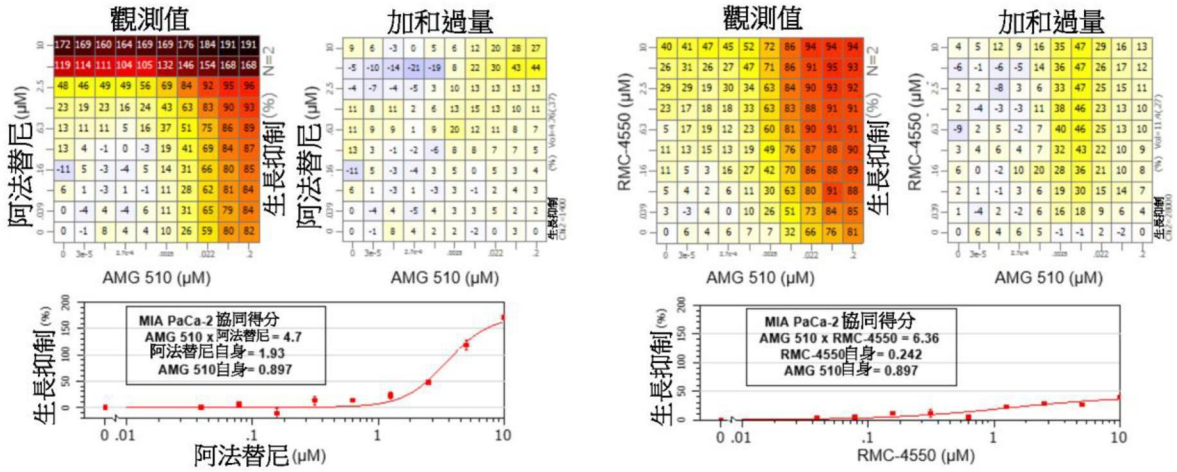
【圖 7】


觀測值
加和過量
觀測值
加和過量
阿法替尼 (μM)
生長抑制 (%)
AMG 510 (μM)
N=2
劑量反應表 | NCI-H358 |
生長抑制 (%)
阿法替尼 (μM)
NCI-H358 協同得分
阿法替尼自身 = 0.253
AMG 510自身 = 1.86

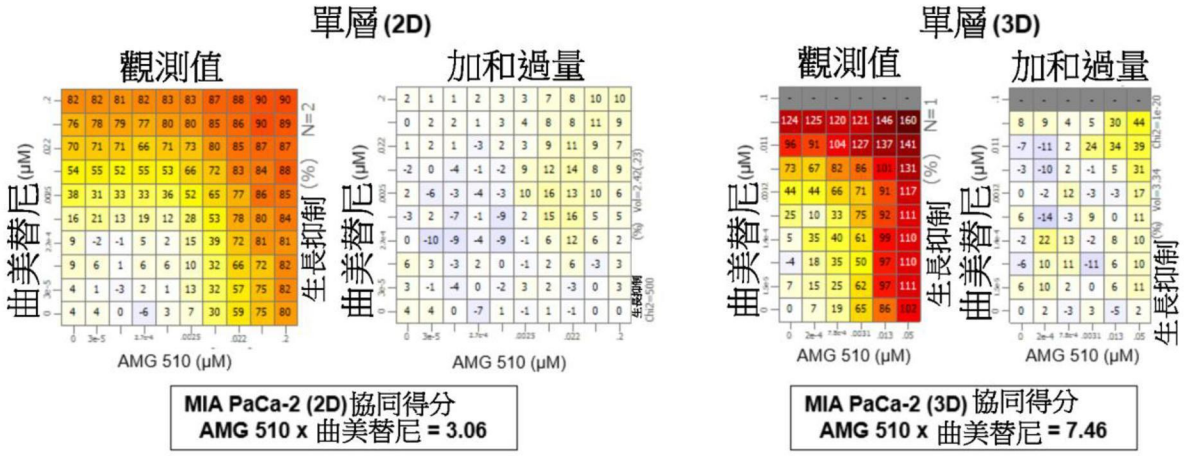
【圖 8】


觀測值
加和過量
RMC-4550 (μM)
AMG 510 (μM)
生長抑制(%)
N=2
NCI-H358 協同得分
AMG 510 x RMC-4550 = 25
RMC-4550自身= 0.458
AMG 510自身= 3.36
觀測值
加和過量
曲美替尼 (μM)
AMG 510 (μM)
生長抑制(%)
NCI-H358 協同得分
AMG 510 x 曲美替尼 = 17
曲美替尼自身 = 1.21
AMG 510自身= 2.06

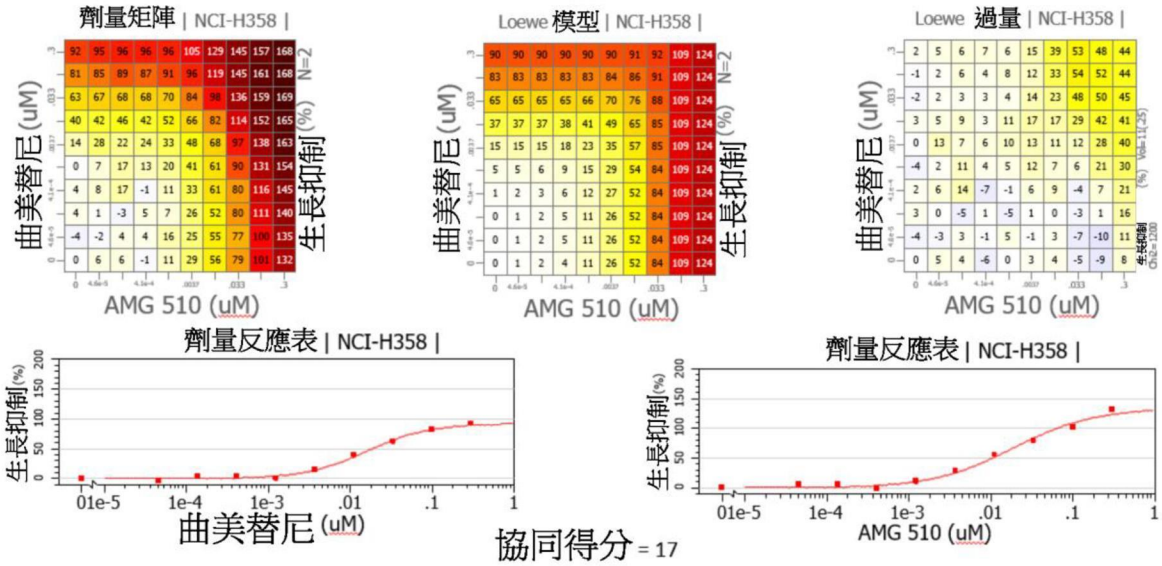
【圖 9】


觀測值
加和過量
阿法替尼 (μM)
AMG 510 (μM)
生長抑制(%)
N=2
MIA PaCa-2 協同得分
AMG 510 x 阿法替尼 = 4.7
阿法替尼自身= 1.93
AMG 510自身= 0.897
阿法替尼(μM)
觀測值
加和過量
RMC-4550 (μM)
AMG 510 (μM)
生長抑制(%)
MIA PaCa-2 協同得分
AMG 510 x RMC-4550 = 6.36
RMC-4550自身= 0.242
AMG 510自身= 0.897
RMC-4550 (μM)

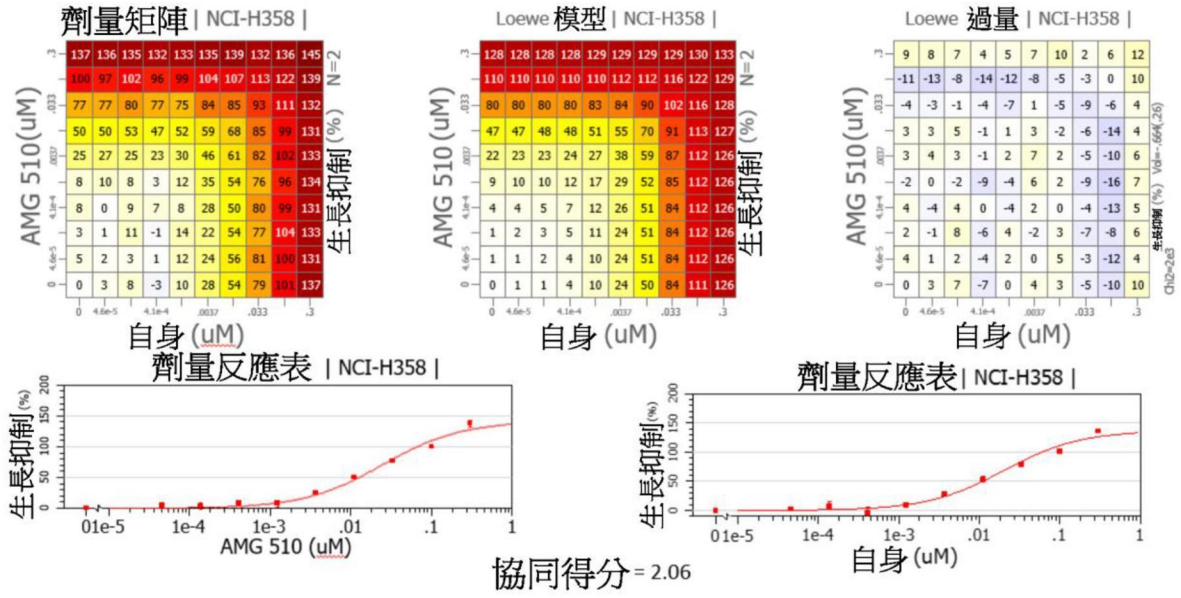
【圖 10】


單層 (2D)
觀測值
加和過量
曲美替尼 (μM)
生長抑制 (%)
AMG 510 (μM)
MIA PaCa-2 (2D)協同得分
AMG 510 x 曲美替尼 = 3.06
單層 (3D)
觀測值
加和過量
曲美替尼 (μM)
生長抑制 (%)
AMG 510 (μM)
MIA PaCa-2 (3D) 協同得分
AMG 510 x 曲美替尼 = 7.46

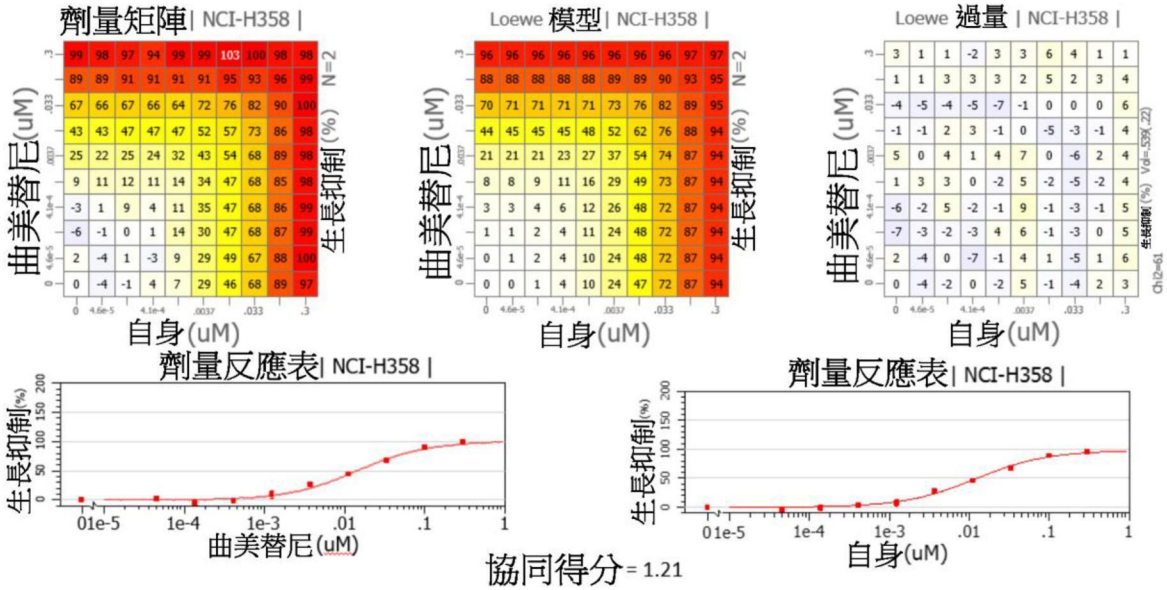
【圖 11】


劑量矩陣 | NCI-H358 |
Loewe 模型 | NCI-H358 |
Loewe 過量 | NCI-H358 |
曲美替尼 (uM)
生長抑制 (%)
AMG 510 (uM)
劑量反應表 | NCI-H358 |
生長抑制(%)
曲美替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 17

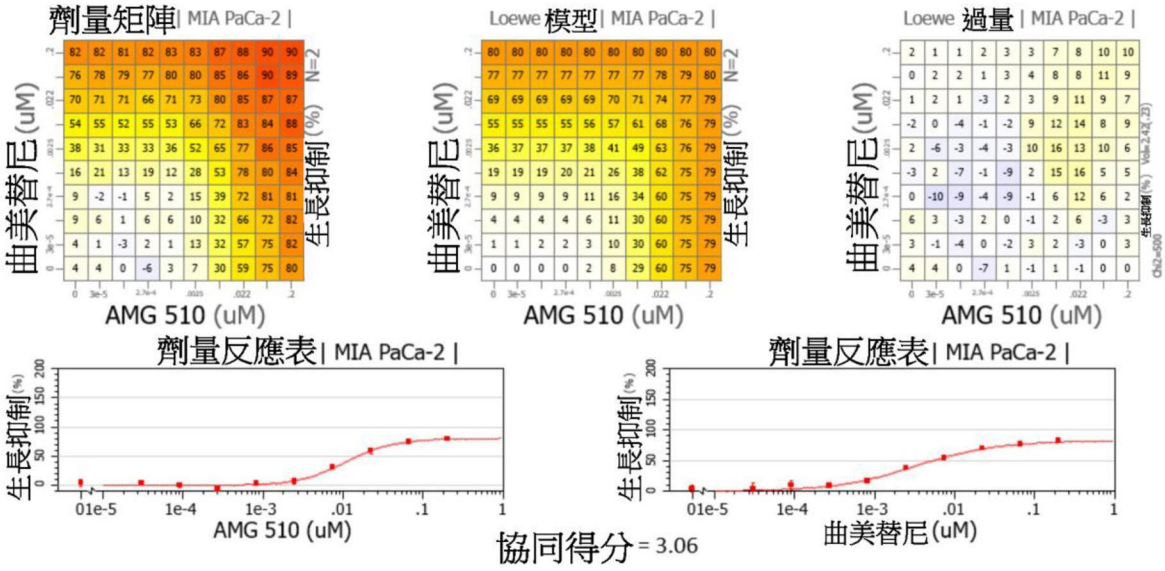
【圖 12】


劑量矩陣 | NCI-H358 |
Loewe 模型 | NCI-H358 |
Loewe 過量 | NCI-H358 |
AMG 510 (uM)
自身 (uM)
生長抑制 (%)
N=2
劑量反應表 | NCI-H358 |
生長抑制 (%)
AMG 510 (uM)
自身 (uM)
協同得分 = 2.06

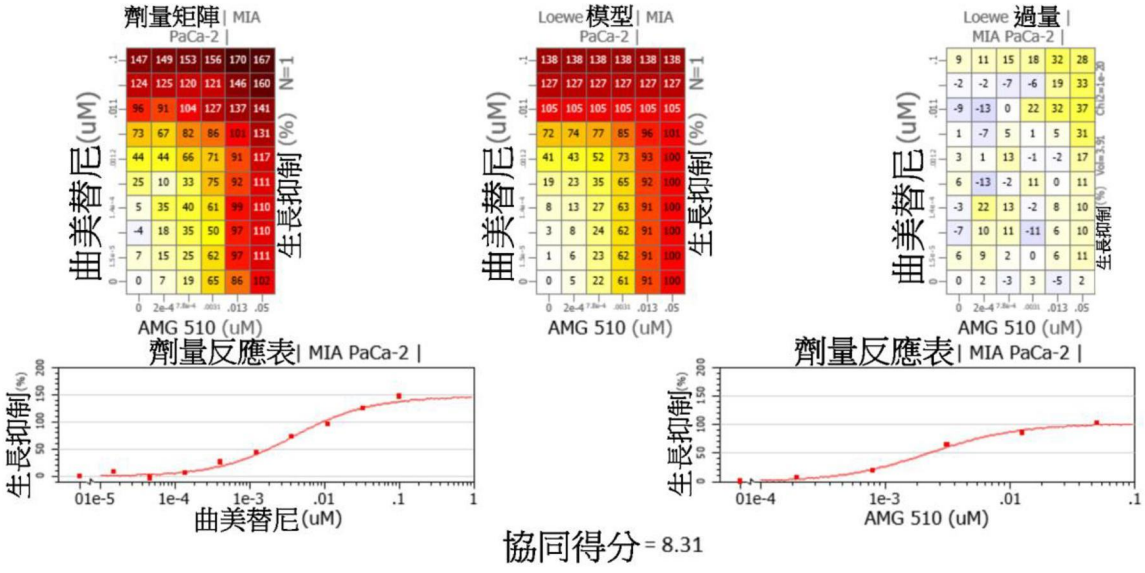
【圖 13】


劑量矩陣 | NCI-H358 |
Loewe 模型 | NCI-H358 |
Loewe 過量 | NCI-H358 |
曲美替尼 (uM)
自身 (uM)
生長抑制 (%)
N=2
劑量反應表 | NCI-H358 |
生長抑制 (%)
曲美替尼 (uM)
自身 (uM)
協同得分 = 1.21

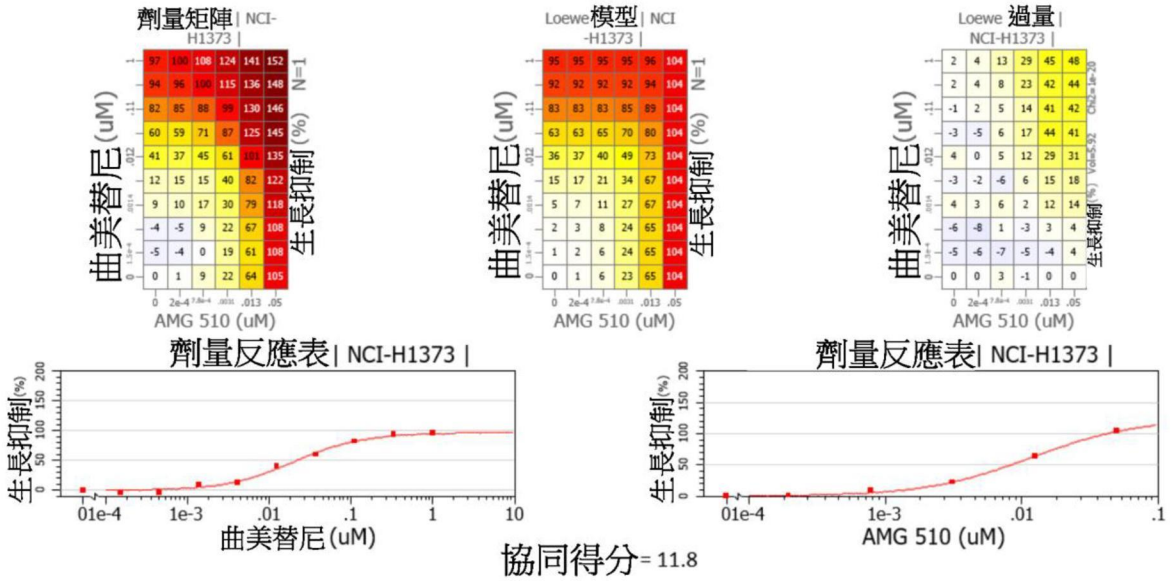
【圖 14】


劑量矩陣 | MIA PaCa-2 |
Loewe 模型 | MIA PaCa-2 |
Loewe 過量 | MIA PaCa-2 |
曲美替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
劑量反應表 | MIA PaCa-2 |
協同得分 = 3.06

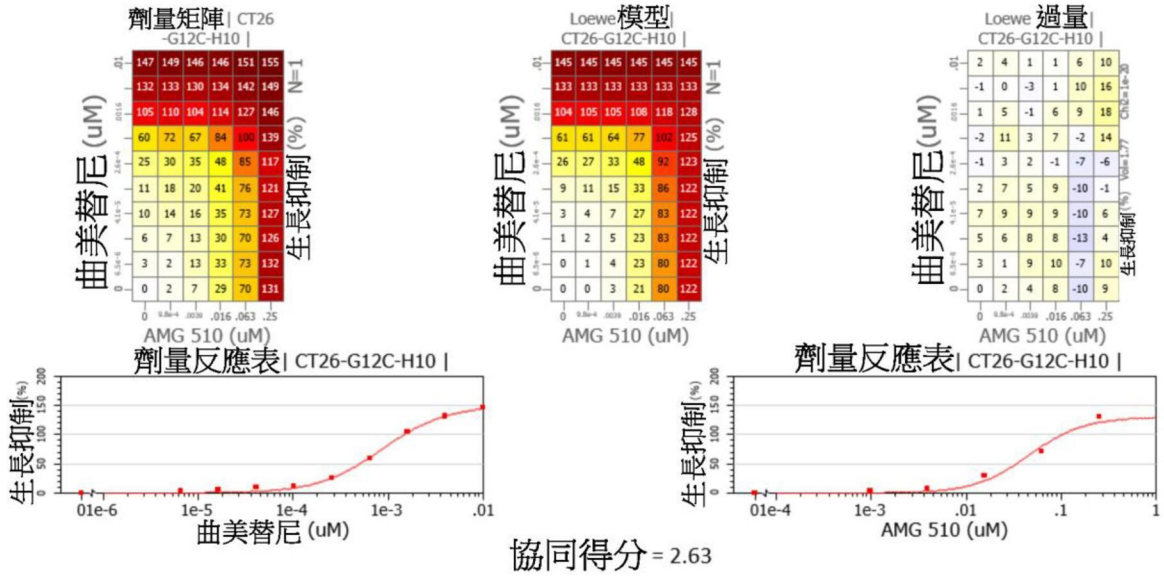
【圖 15】


劑量矩陣 | MIA PaCa-2 |
Loewe 模型 | MIA PaCa-2 |
Loewe 過量 | MIA PaCa-2 |
曲美替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
劑量反應表 | MIA PaCa-2 |
協同得分 = 8.31

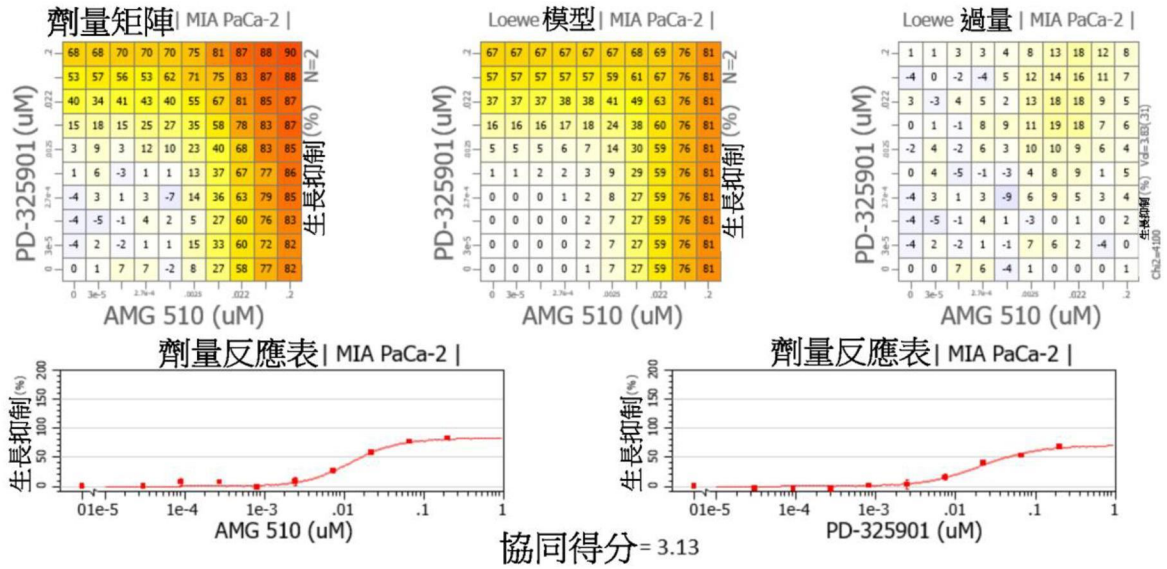
【圖 16】


劑量矩陣 | NCI-H1373 |
Loewe模型 | NCI-H1373 |
Loewe 過量 | NCI-H1373 |
曲美替尼 (uM)
生長抑制 (%)
AMG 510 (uM)
劑量反應表 | NCI-H1373 |
生長抑制(%)
曲美替尼(uM)
協同得分 = 11.8

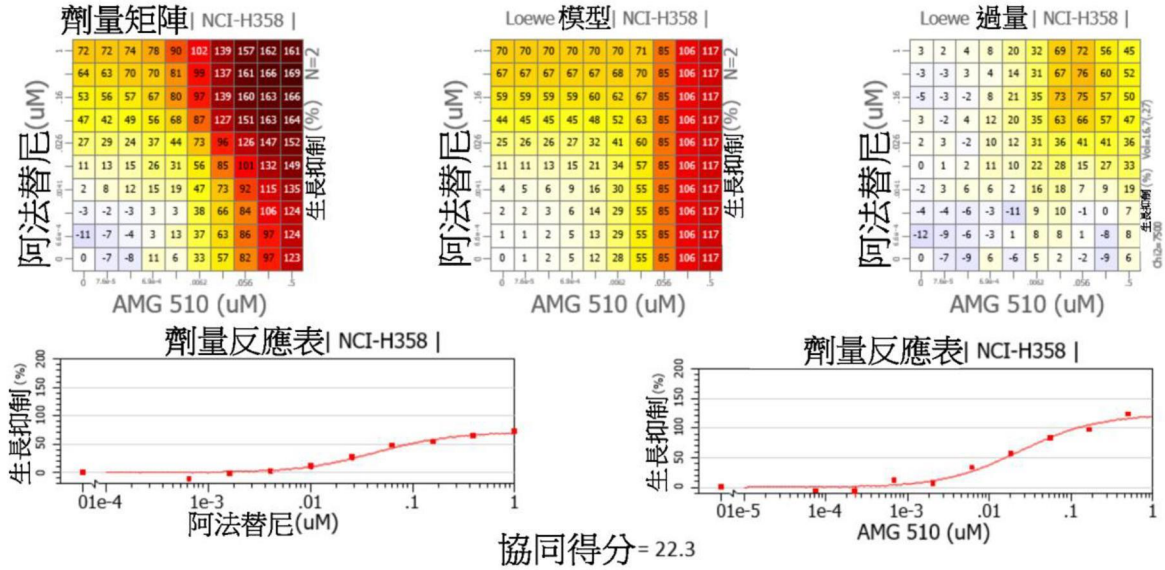
【圖 17】


劑量矩陣 | CT26-G12C-H10 |
Loewe模型 | CT26-G12C-H10 |
Loewe 過量 | CT26-G12C-H10 |
曲美替尼 (uM)
生長抑制 (%)
AMG 510 (uM)
劑量反應表 | CT26-G12C-H10 |
生長抑制(%)
曲美替尼 (uM)
協同得分 = 2.63

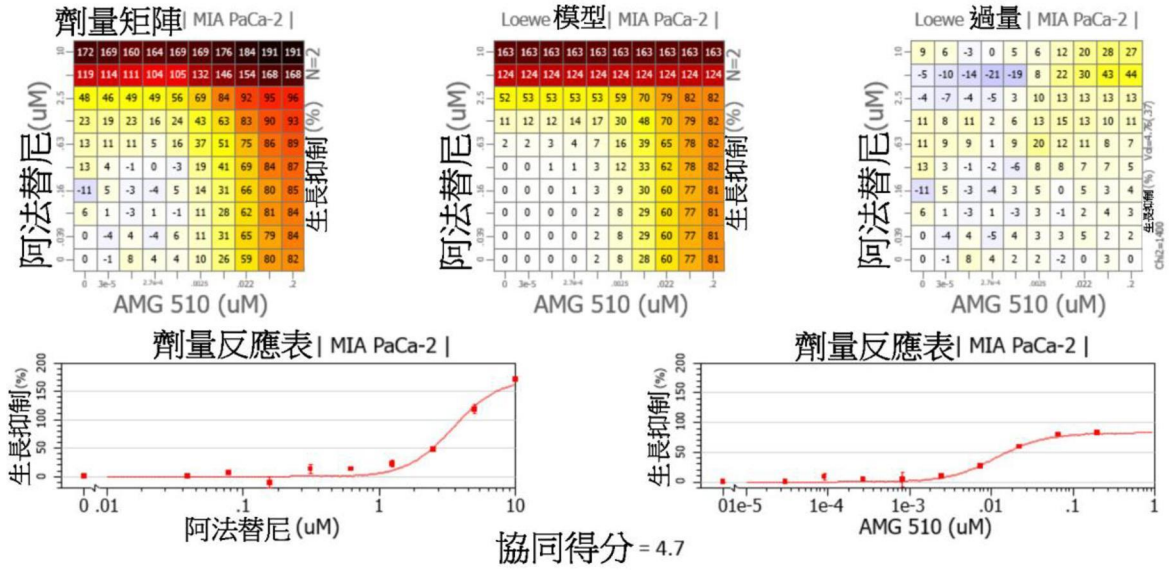
【圖 18】


劑量矩陣| MIA PaCa-2 |
Loewe 模型| MIA PaCa-2 |
Loewe 過量 | MIA PaCa-2 |
PD-325901 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| MIA PaCa-2 |
生長抑制(%)
AMG 510 (uM)
PD-325901 (uM)
協同得分= 3.13

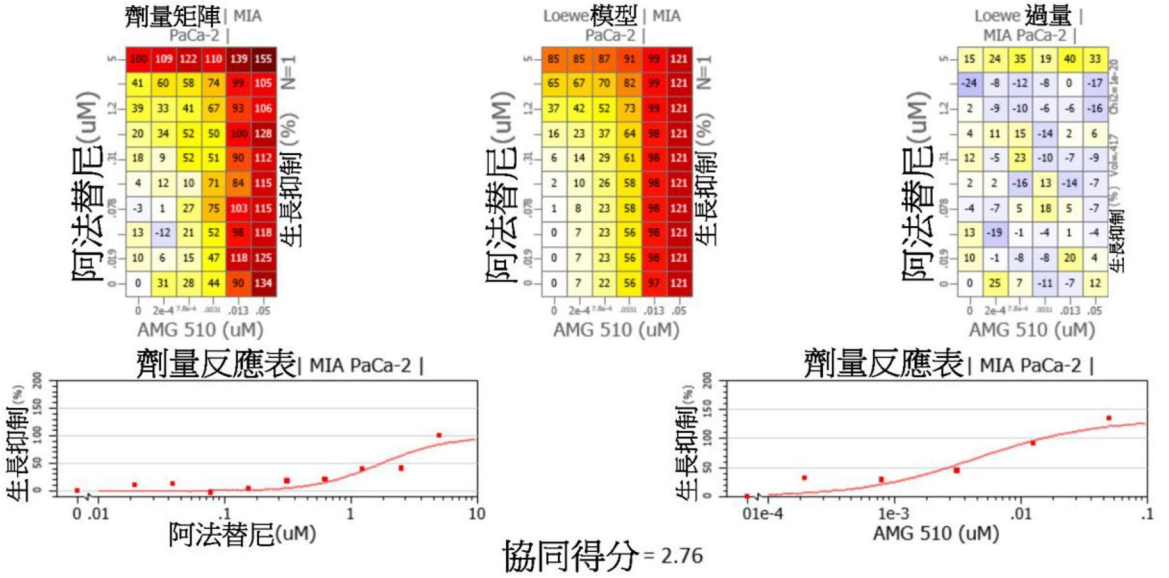
【圖 19】


劑量矩陣| NCI-H358 |
Loewe 模型| NCI-H358 |
Loewe 過量 | NCI-H358 |
阿法替尼(uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| NCI-H358 |
生長抑制(%)
阿法替尼(uM)
AMG 510 (uM)
協同得分= 22.3

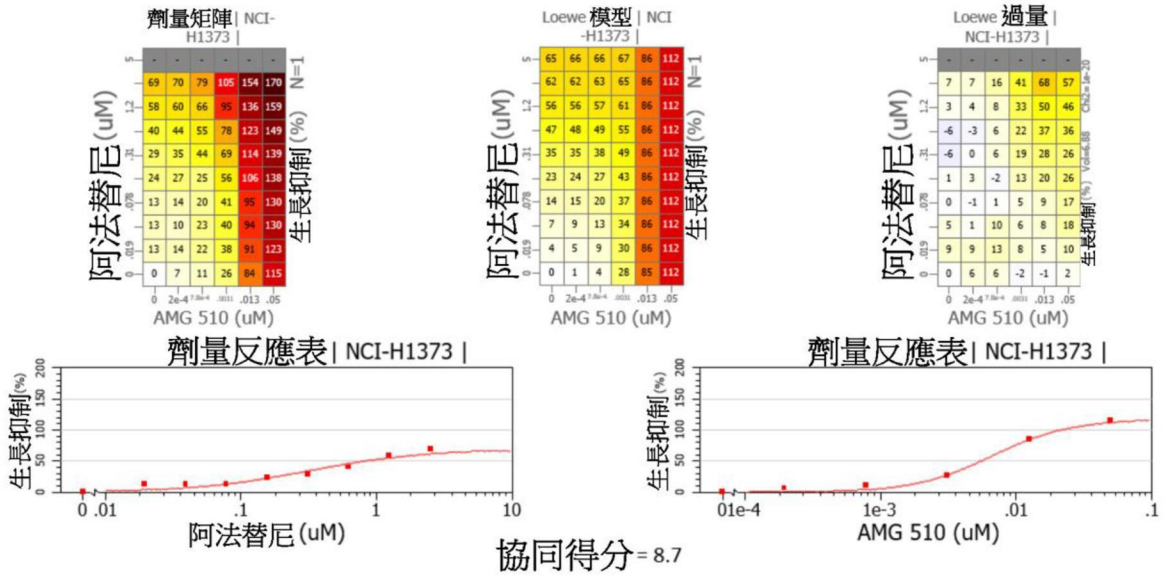
【圖 20】


劑量矩陣 | MIA PaCa-2 |
Loewe 模型 | MIA PaCa-2 |
Loewe 過量 | MIA PaCa-2 |
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
N=2
劑量反應表 | MIA PaCa-2 |
生長抑制 (%)
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 4.7

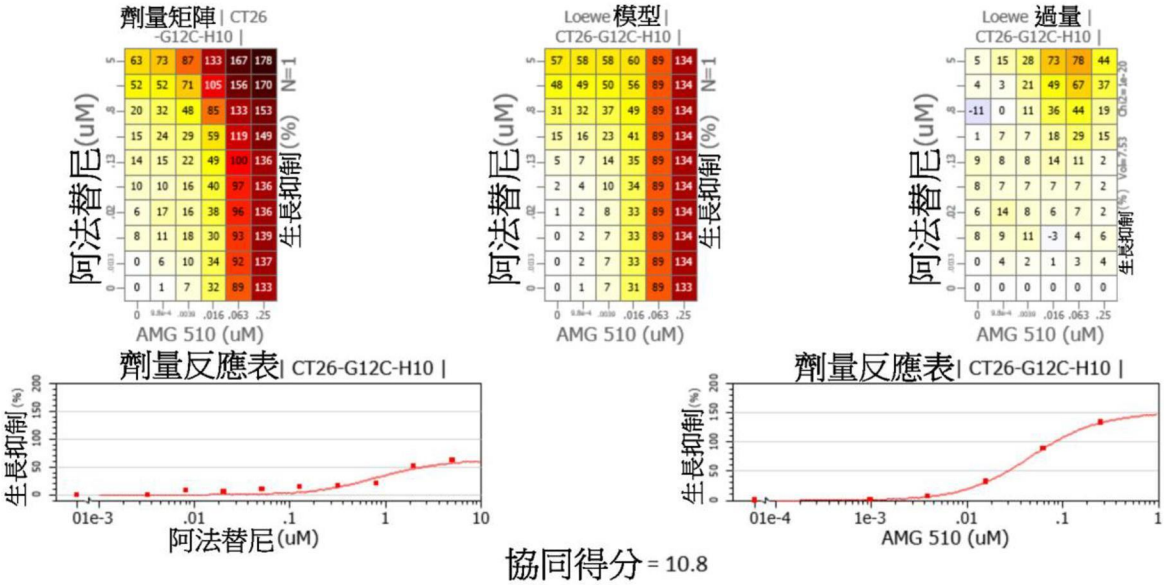
【圖 21】


劑量矩陣 | MIA PaCa-2 |
Loewe 模型 | MIA PaCa-2 |
Loewe 過量 | MIA PaCa-2 |
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
N=1
劑量反應表 | MIA PaCa-2 |
生長抑制 (%)
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 2.76

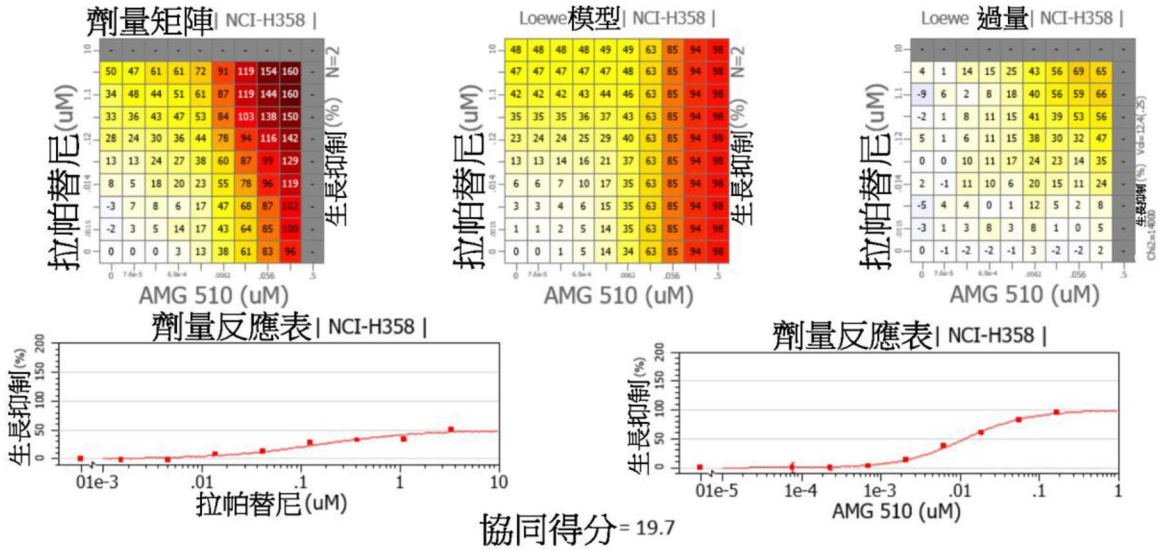
【圖 22】


劑量矩陣 | NCI-H1373 |
Loewe 模型 | NCI-H1373 |
Loewe 過量 | NCI-H1373 |
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
N=1
劑量反應表 | NCI-H1373 |
生長抑制(%)
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 8.7

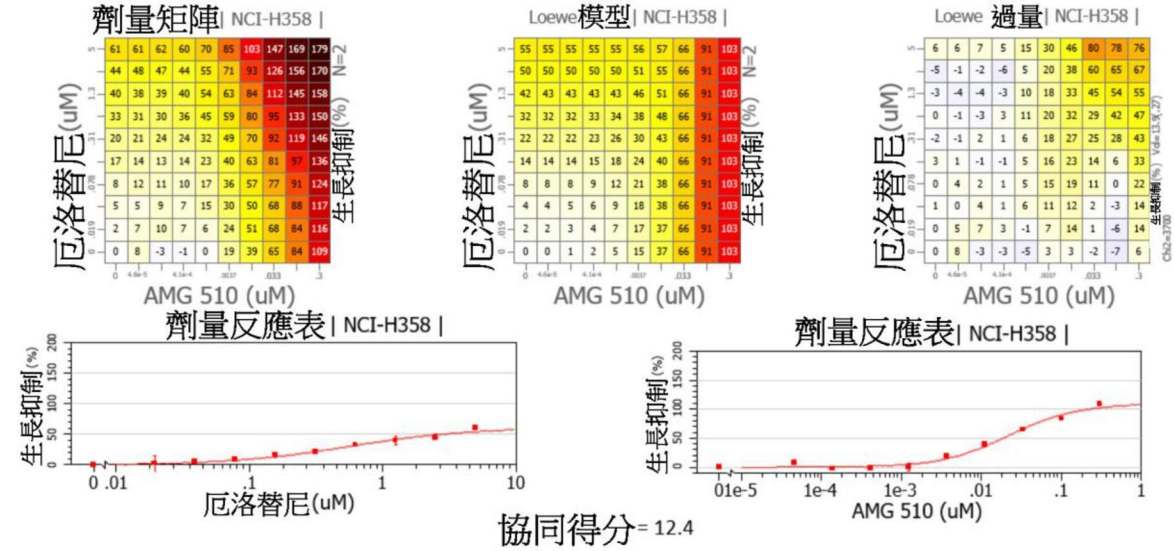
【圖 23】


劑量矩陣 | CT26-G12C-H10 |
Loewe 模型 | CT26-G12C-H10 |
Loewe 過量 | CT26-G12C-H10 |
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
N=1
劑量反應表 | CT26-G12C-H10 |
生長抑制(%)
阿法替尼 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 10.8

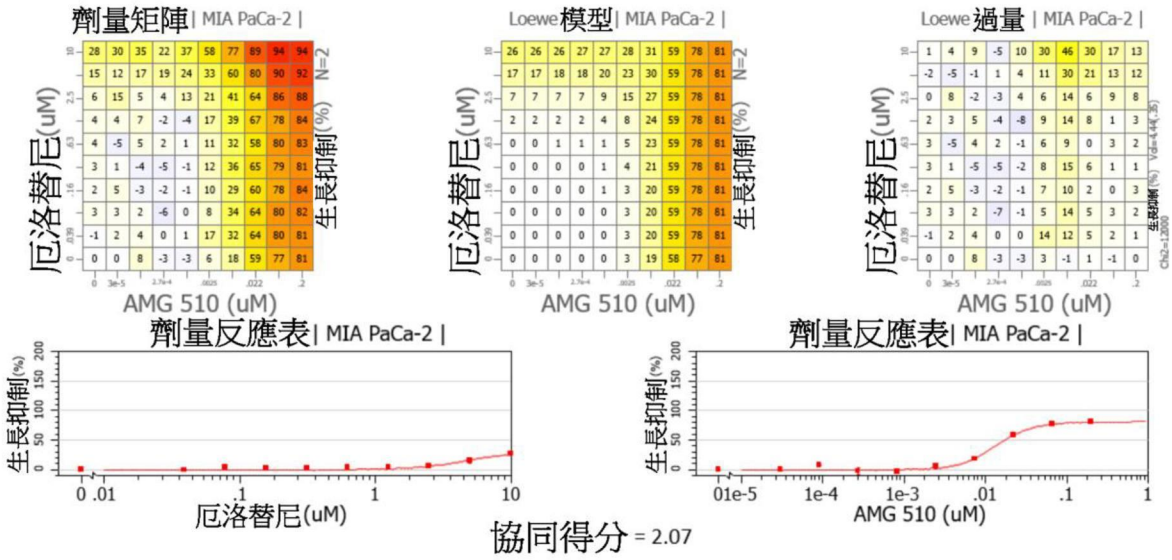
【圖 24】


劑量矩陣| NCI-H358 |
Loewe模型| NCI-H358 |
Loewe 過量| NCI-H358 |
拉帕替尼(uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| NCI-H358 |
拉帕替尼(uM)
AMG 510 (uM)
協同得分= 19.7

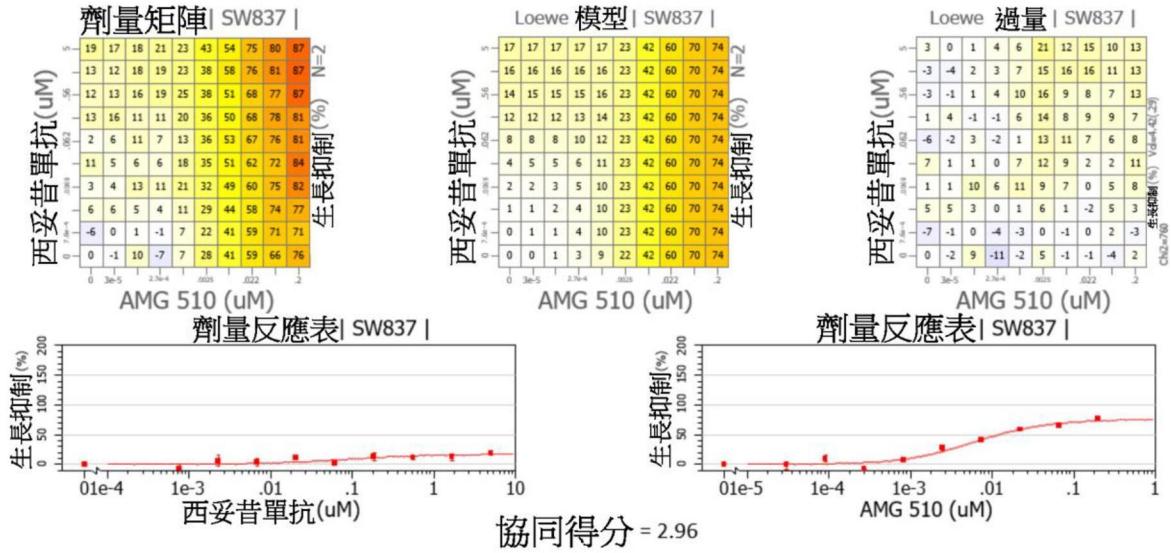
【圖 25】


劑量矩陣| NCI-H358 |
Loewe模型| NCI-H358 |
Loewe 過量| NCI-H358 |
厄洛替尼(uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| NCI-H358 |
厄洛替尼(uM)
AMG 510 (uM)
協同得分= 12.4

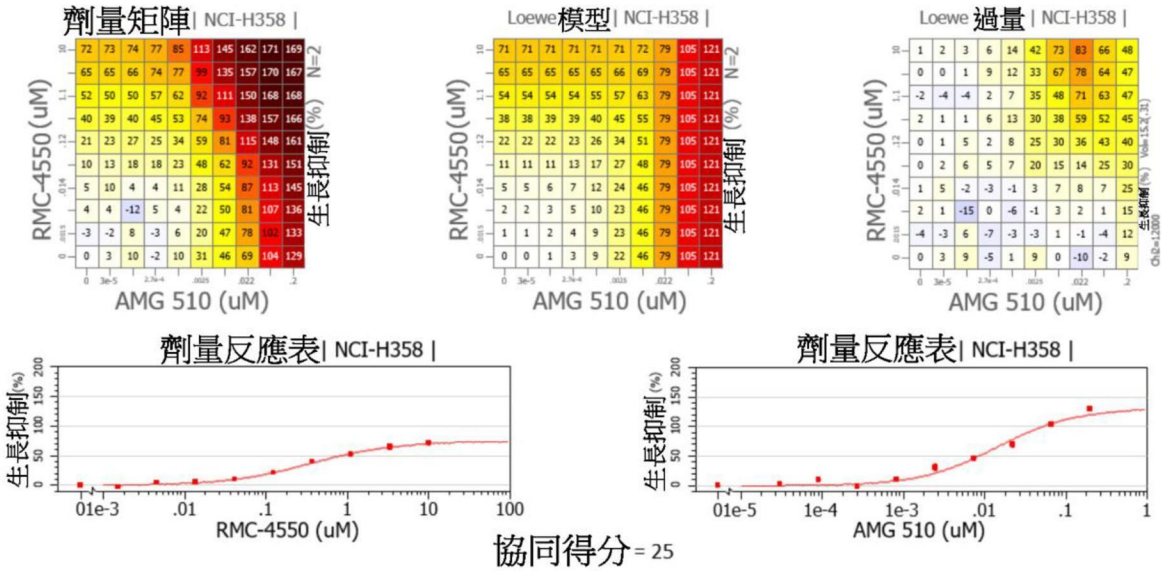
【圖 26】


劑量矩陣| MIA PaCa-2 |
Loewe模型| MIA PaCa-2 |
Loewe過量 | MIA PaCa-2 |
厄洛替尼(uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| MIA PaCa-2 |
生長抑制(%)
厄洛替尼(uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 2.07

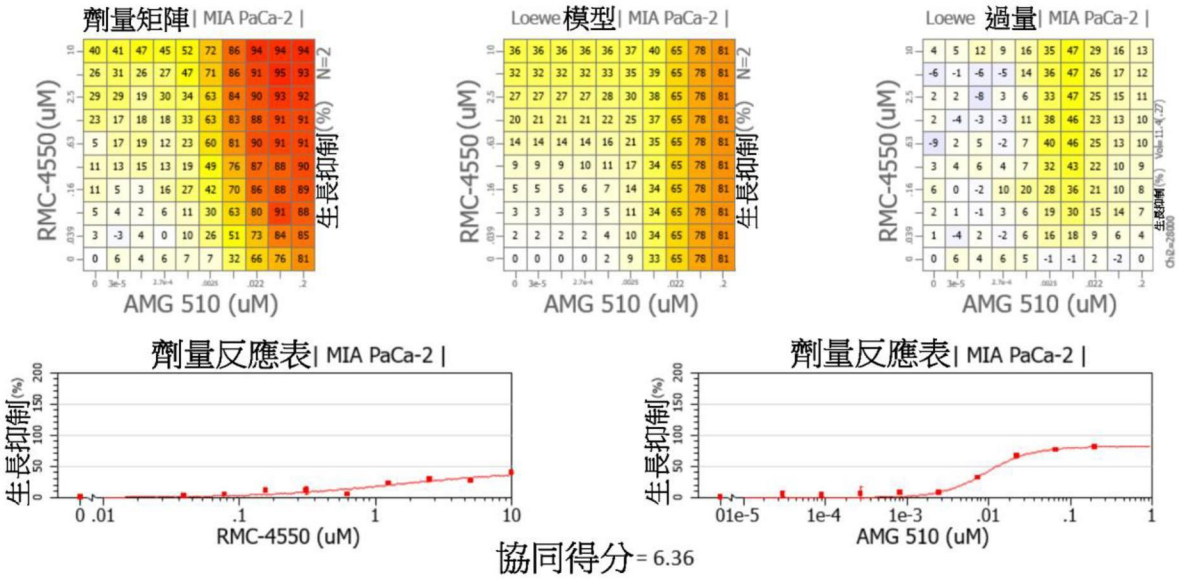
【圖 27】


劑量矩陣| SW837 |
Loewe 模型| SW837 |
Loewe 過量 | SW837 |
西妥昔單抗(uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| SW837 |
生長抑制(%)
西妥昔單抗(uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 2.96

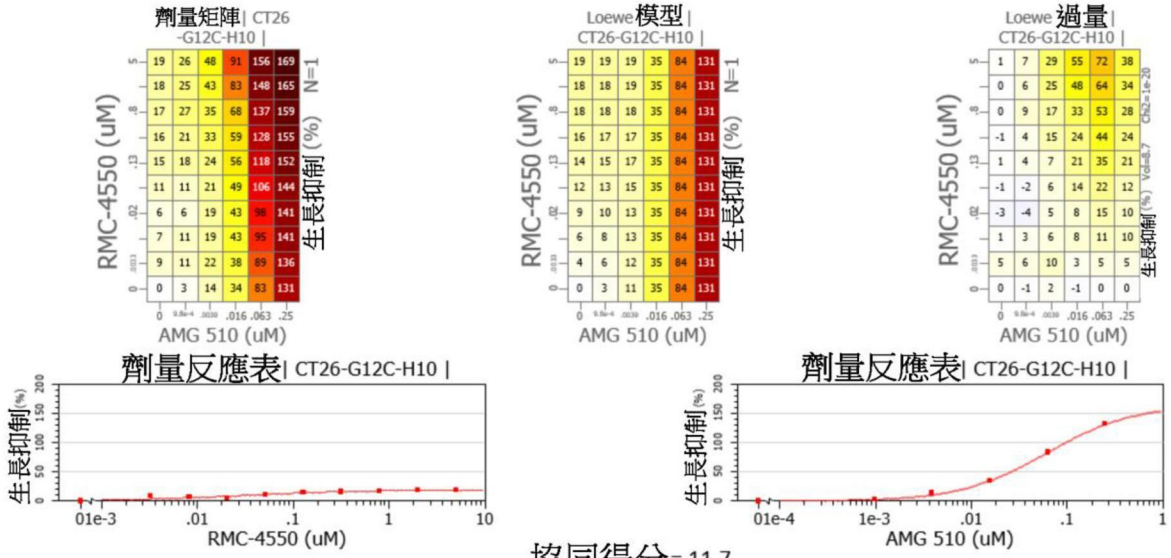
【圖 28】


劑量矩陣| NCI-H358 |
Loewe模型| NCI-H358 |
Loewe 過量 | NCI-H358 |
RMC-4550 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| NCI-H358 |
生長抑制(%)
RMC-4550 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分= 25

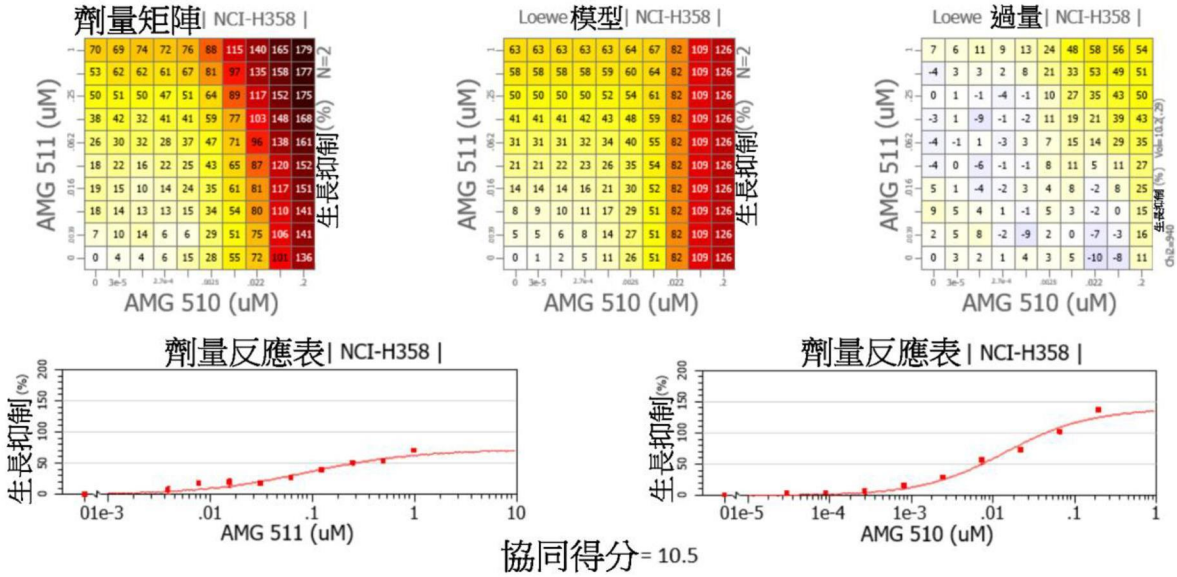
【圖 29】


劑量矩陣| MIA PaCa-2 |
Loewe模型| MIA PaCa-2 |
Loewe 過量| MIA PaCa-2 |
RMC-4550 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
N=2
劑量反應表| MIA PaCa-2 |
生長抑制(%)
RMC-4550 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分= 6.36

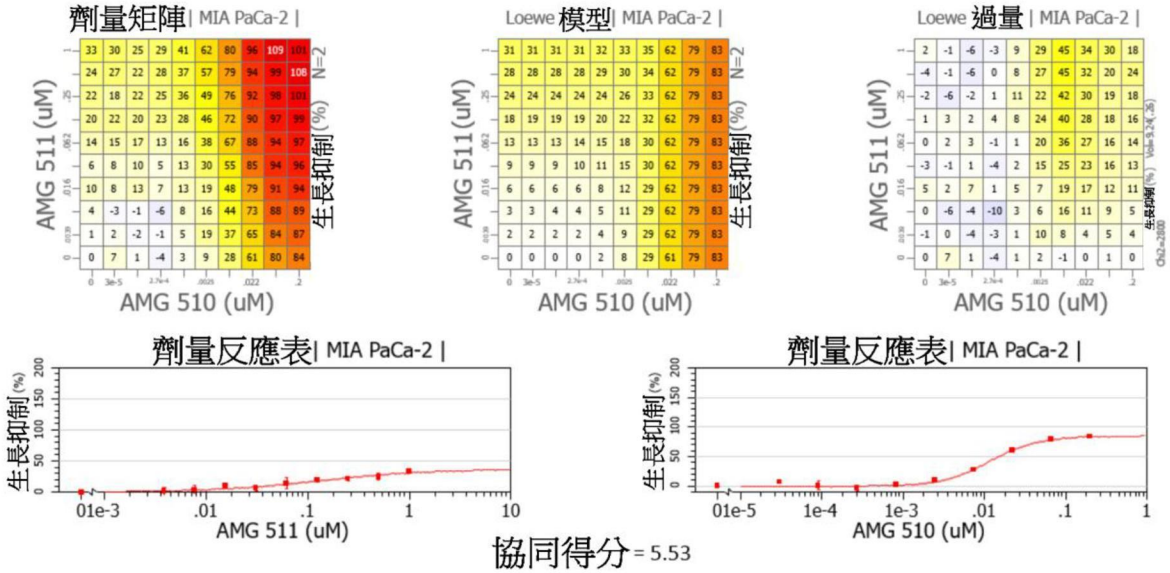
【圖 30】


劑量矩陣| CT26-G12C-H10 |
RMC-4550 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
N=1
Loewe模型| CT26-G12C-H10 |
Loewe 過量| CT26-G12C-H10 |
劑量反應表| CT26-G12C-H10 |
生長抑制(%)
RMC-4550 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分= 11.7

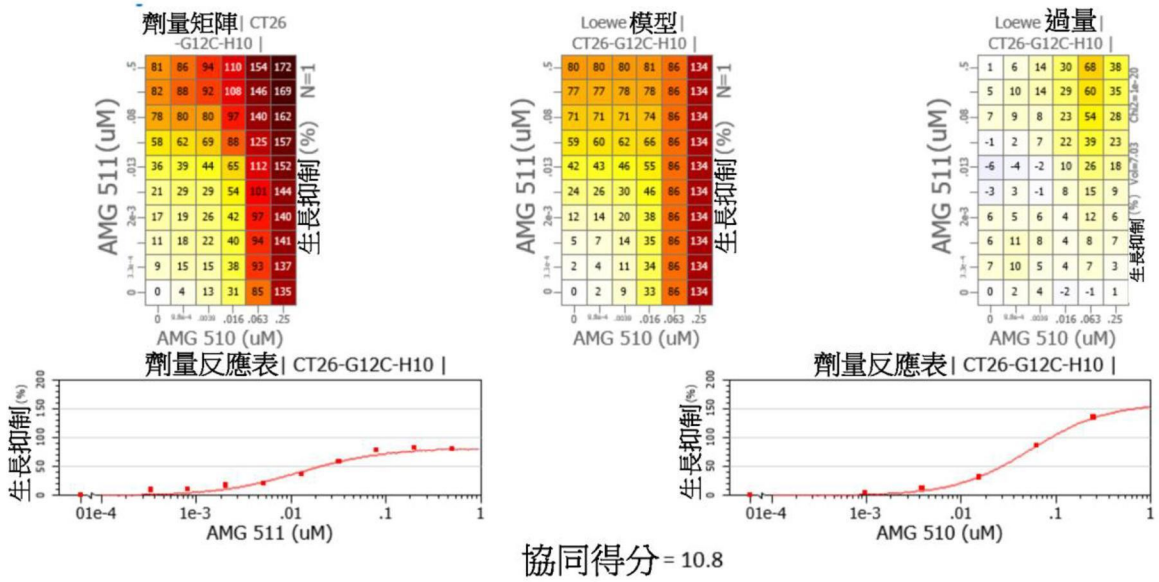
【圖 31】


劑量矩陣| NCI-H358 |
AMG 511 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
N=2
Loewe模型| NCI-H358 |
Loewe 過量| NCI-H358 |
劑量反應表| NCI-H358 |
生長抑制(%)
AMG 511 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分= 10.5

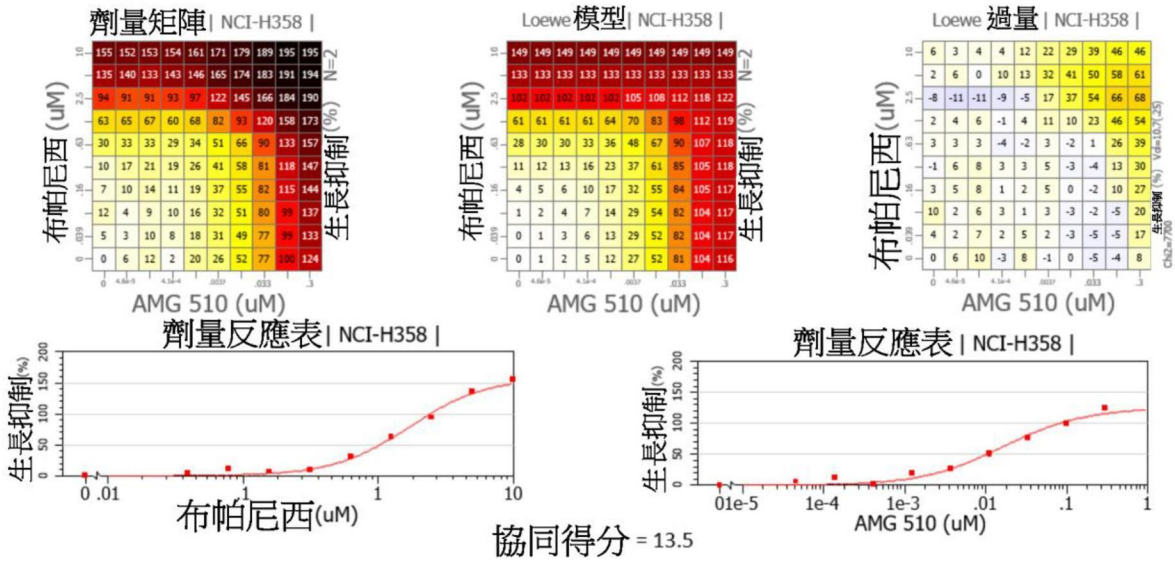
【圖 32】


劑量矩陣| MIA PaCa-2 |
Loewe 模型| MIA PaCa-2 |
Loewe 過量 | MIA PaCa-2 |
AMG 511 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
劑量反應表| MIA PaCa-2 |
AMG 511 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 5.53

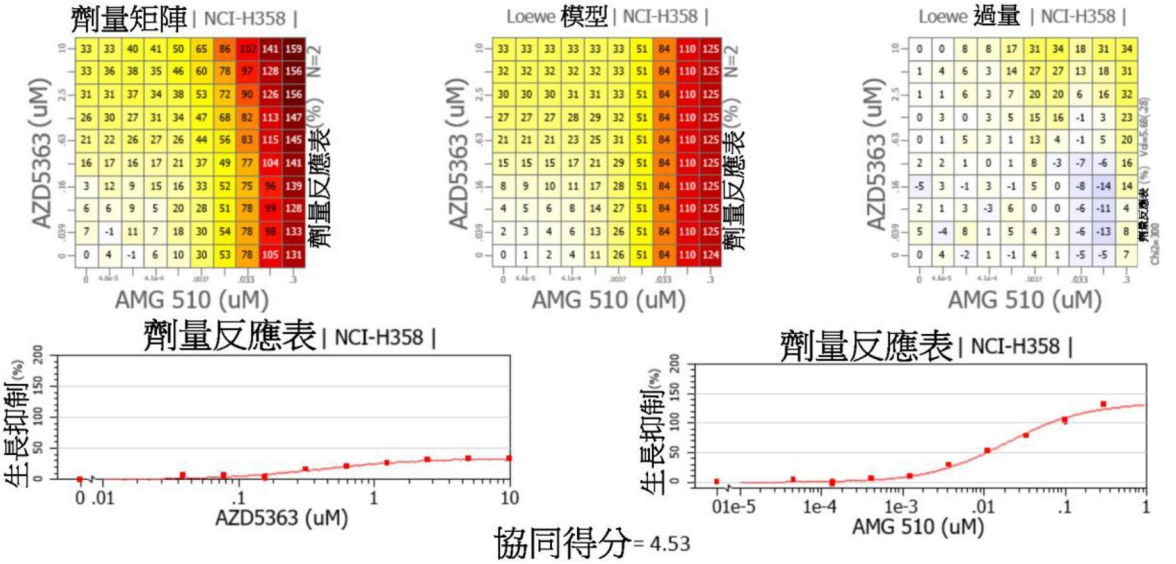
【圖 33】


劑量矩陣| CT26 -G12C-H10 |
Loewe 模型| CT26-G12C-H10 |
Loewe 過量| CT26-G12C-H10 |
AMG 511 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
劑量反應表| CT26-G12C-H10 |
AMG 511 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 10.8

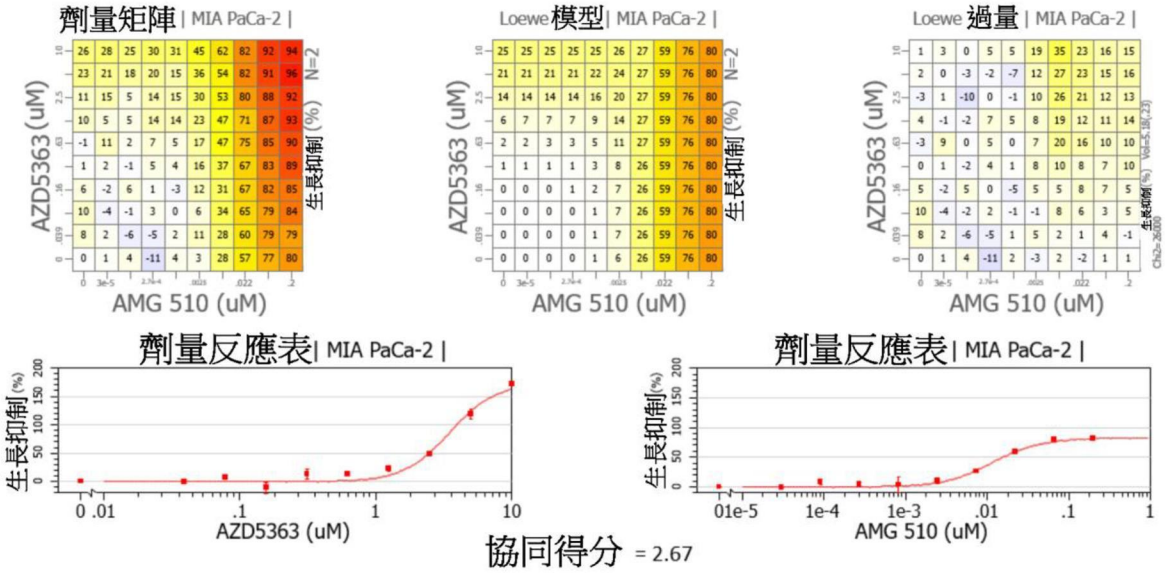
【圖 34】


劑量矩陣 | NCI-H358 |
Loewe 模型 | NCI-H358 |
Loewe 過量 | NCI-H358 |
布帕尼西 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制(%)
劑量反應表 | NCI-H358 |
布帕尼西(uM)
協同得分 = 13.5

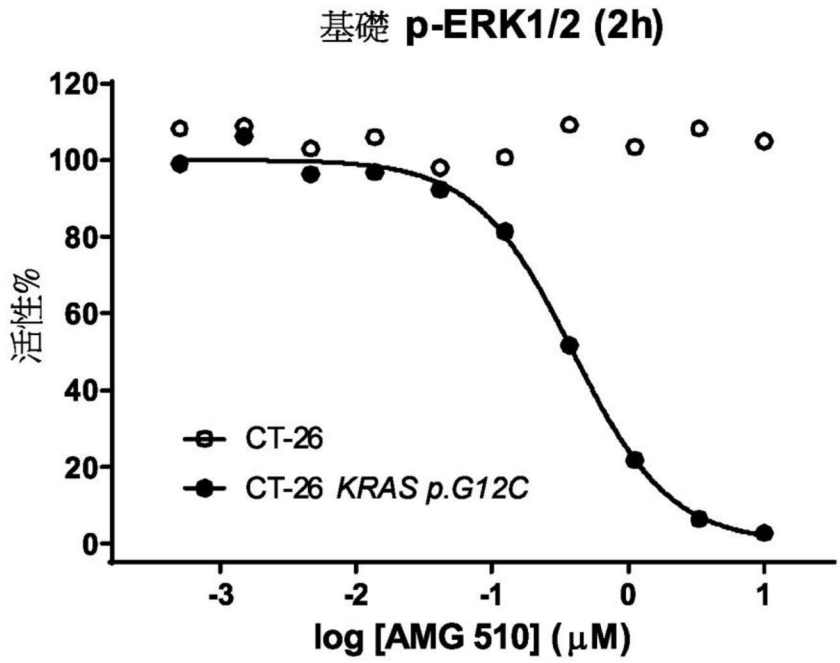
【圖 35】


劑量矩陣 | NCI-H358 |
Loewe 模型 | NCI-H358 |
Loewe 過量 | NCI-H358 |
AZD5363 (uM)
AMG 510 (uM)
劑量反應表 | NCI-H358 |
生長抑制(%)
協同得分= 4.53

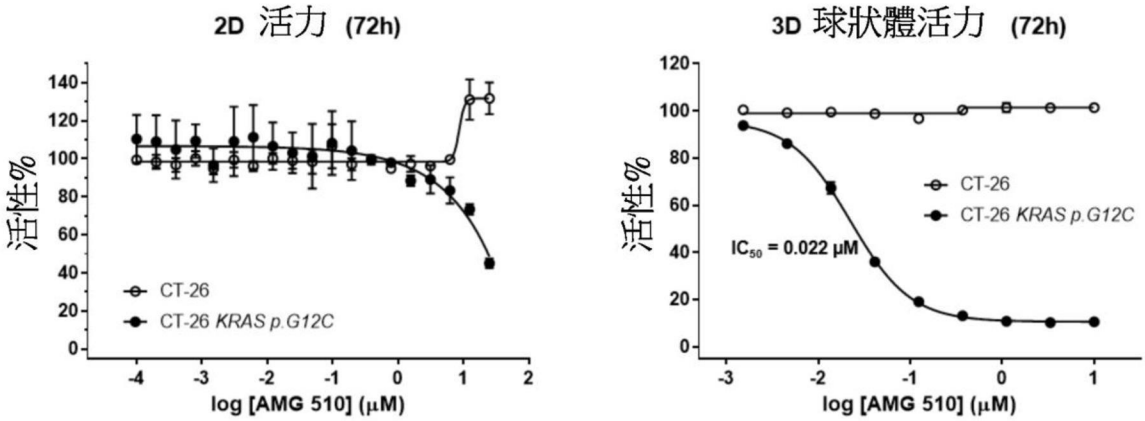
【圖 36】


劑量矩陣 | MIA PaCa-2 |
Loewe模型 | MIA PaCa-2 |
Loewe 過量 | MIA PaCa-2 |
AZD5363 (uM)
AMG 510 (uM)
生長抑制 (%)
N=2
劑量反應表 | MIA PaCa-2 |
劑量反應表 | MIA PaCa-2 |
生長抑制(%)
AZD5363 (uM)
AMG 510 (uM)
協同得分 = 2.67

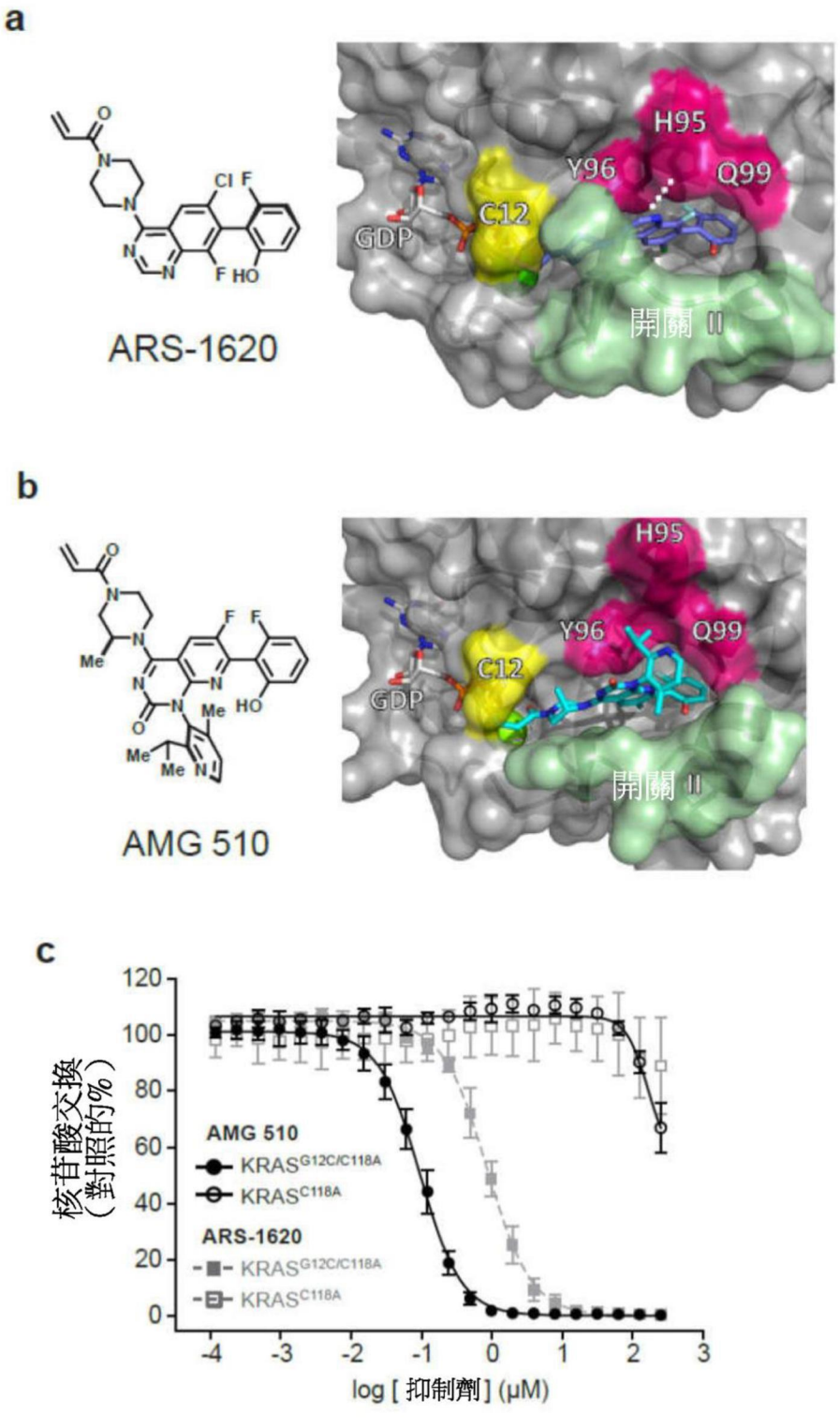
【圖 37】


基礎 p-ERK1/2 (2h)
活性%
CT-26
CT-26 KRAS p.G12C
log [AMG 510] (μM)

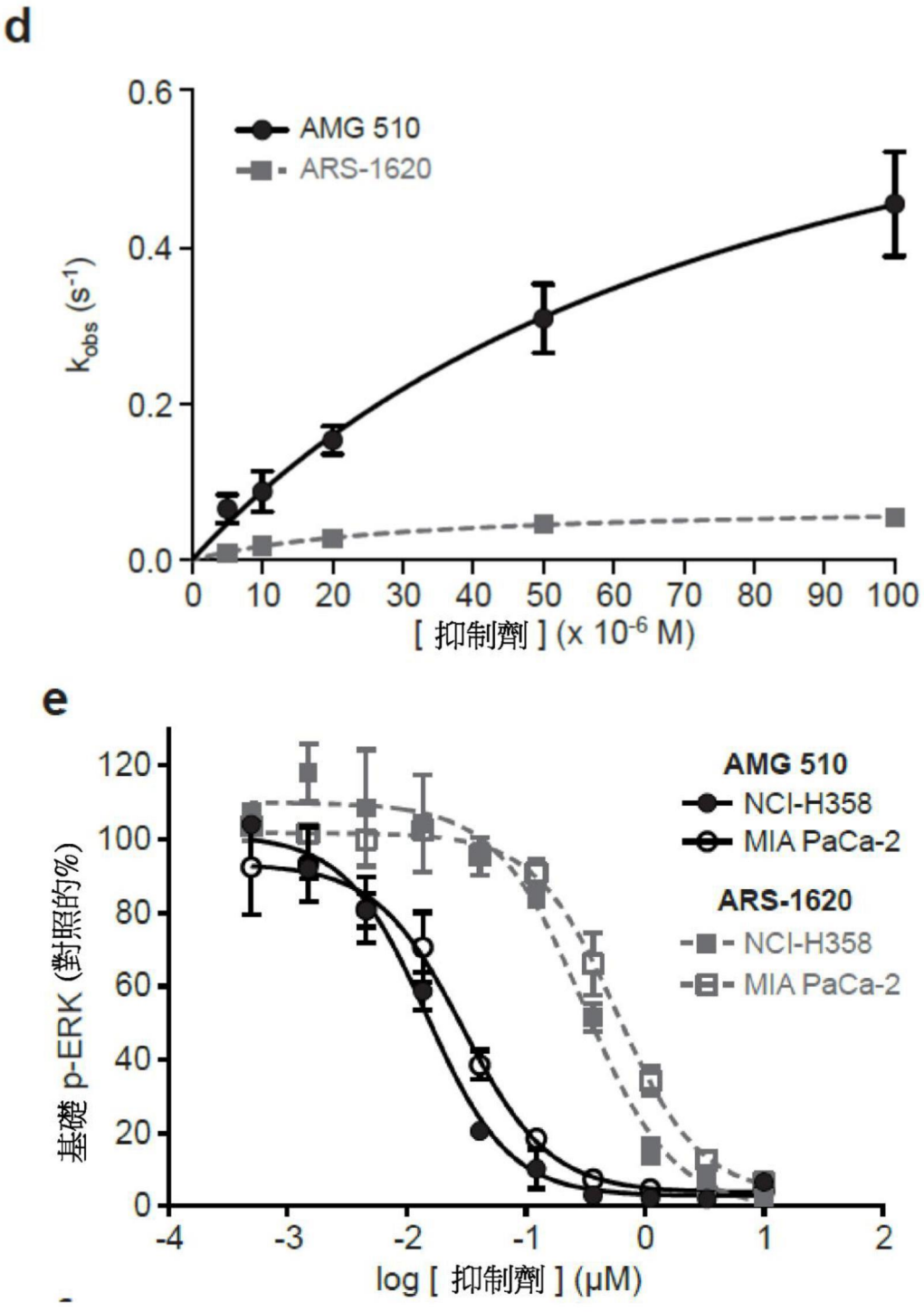
【圖 38】


2D 活力 (72h)
活性%
CT-26
CT-26 KRAS p.G12C
log [AMG 510] (μM)
3D 球狀體活力 (72h)
活性%
CT-26
CT-26 KRAS p.G12C
IC50 = 0.022 μM
log [AMG 510] (μM)

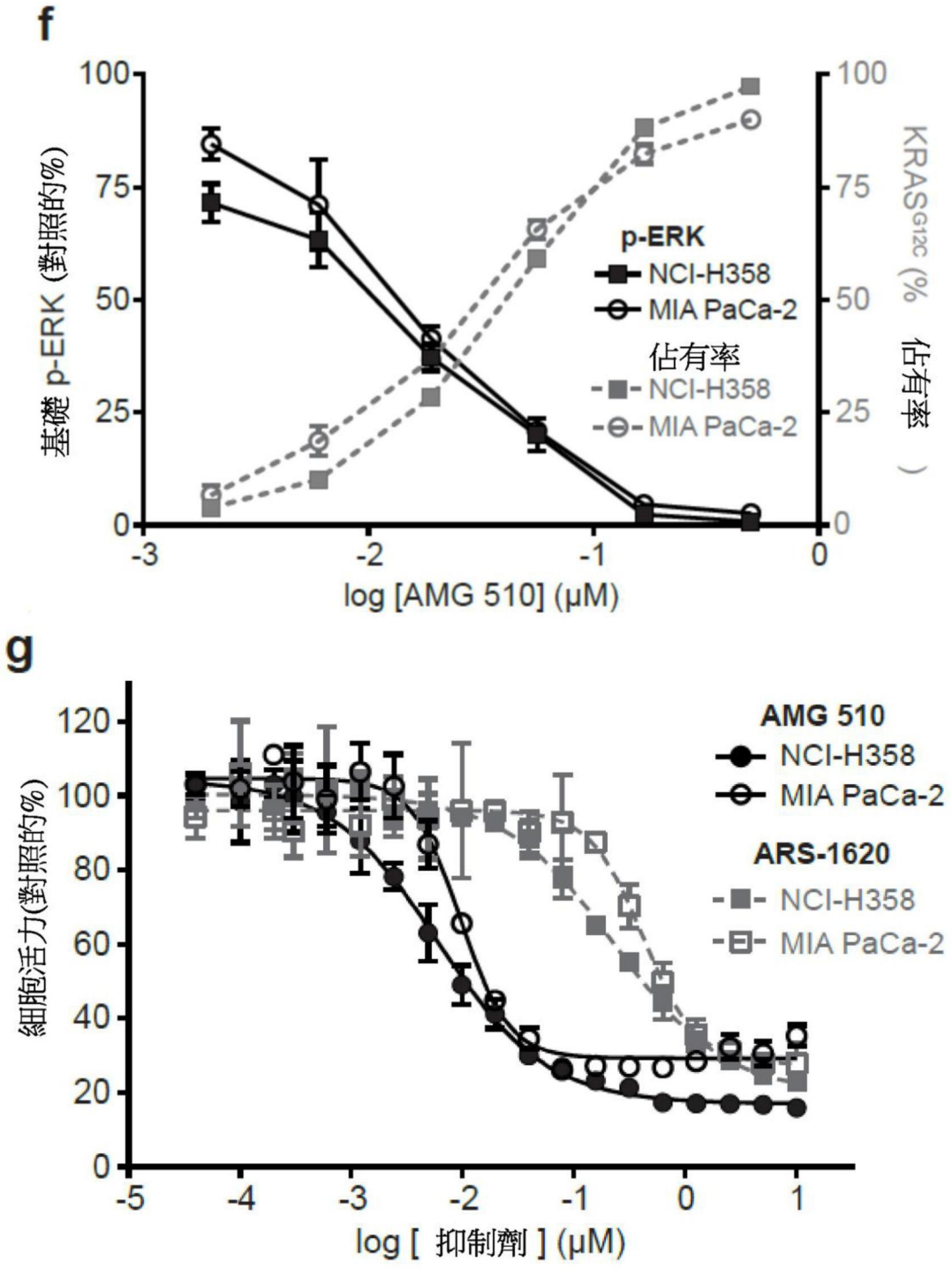
【圖 39】


a
ARS-1620
H95
Y96
Q99
C12
GDP
開關 II
b
AMG 510
H95
Y96
Q99
C12
GDP
開關 II
c
核苷酸交換（對照的%）
AMG 510
KRASG12C/C118A
KRASC118A
ARS-1620
KRASG12C/C118A
KRASC118A
log [抑制劑] (μM)

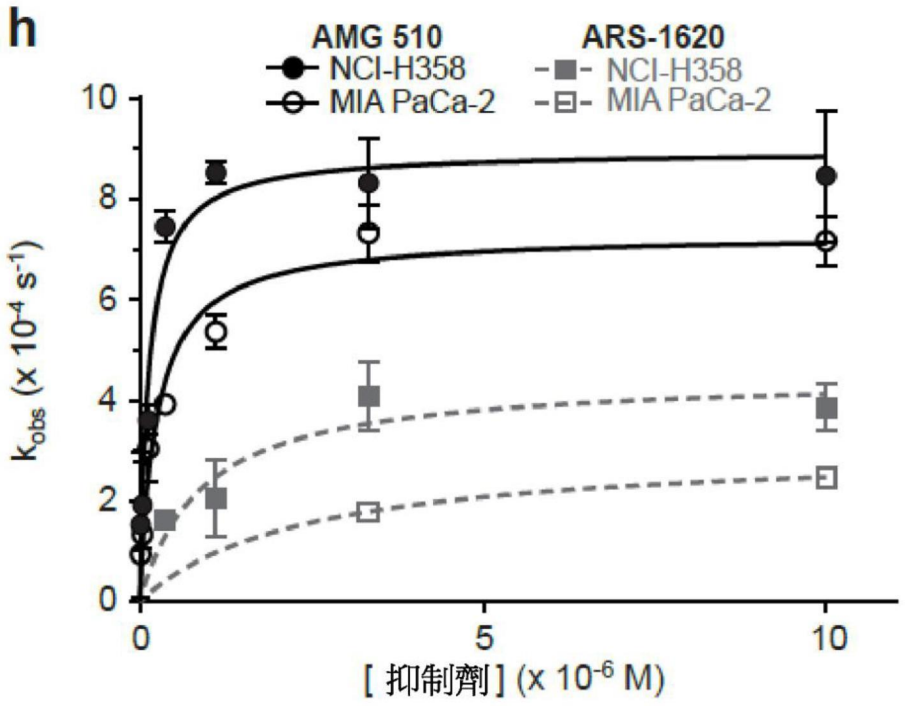
【圖 40】


d
AMG 510
ARS-1620
k_{obs} (s^{-1})
0.6
0.4
0.2
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
[抑制劑] (x 10^{-6} M)
e
基礎 p-ERK (對照的%)
120
100
80
60
40
20
0
-4 -3 -2 -1 0 1 2
log [抑制劑] (μM)
AMG 510
NCI-H358
MIA PaCa-2
ARS-1620
NCI-H358
MIA PaCa-2

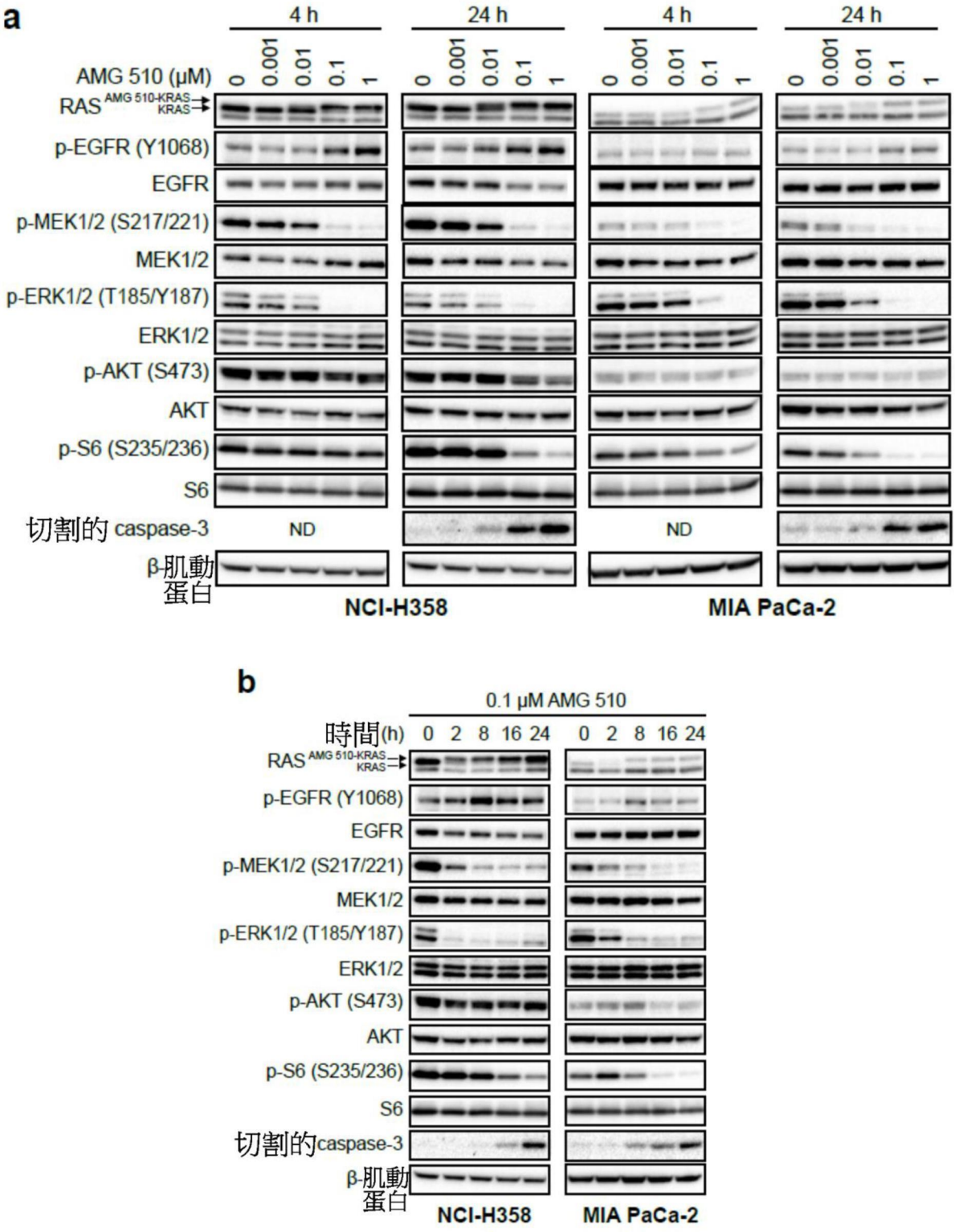
【圖 40】(續)


f
基礎 p-ERK (對照的%)
KRASG12C (% 佔有率)
log [AMG 510] (μM)
p-ERK
NCI-H358
MIA PaCa-2
佔有率
NCI-H358
MIA PaCa-2
g
細胞活力(對照的%)
log [抑制劑] (μM)
AMG 510
NCI-H358
MIA PaCa-2
ARS-1620
NCI-H358
MIA PaCa-2

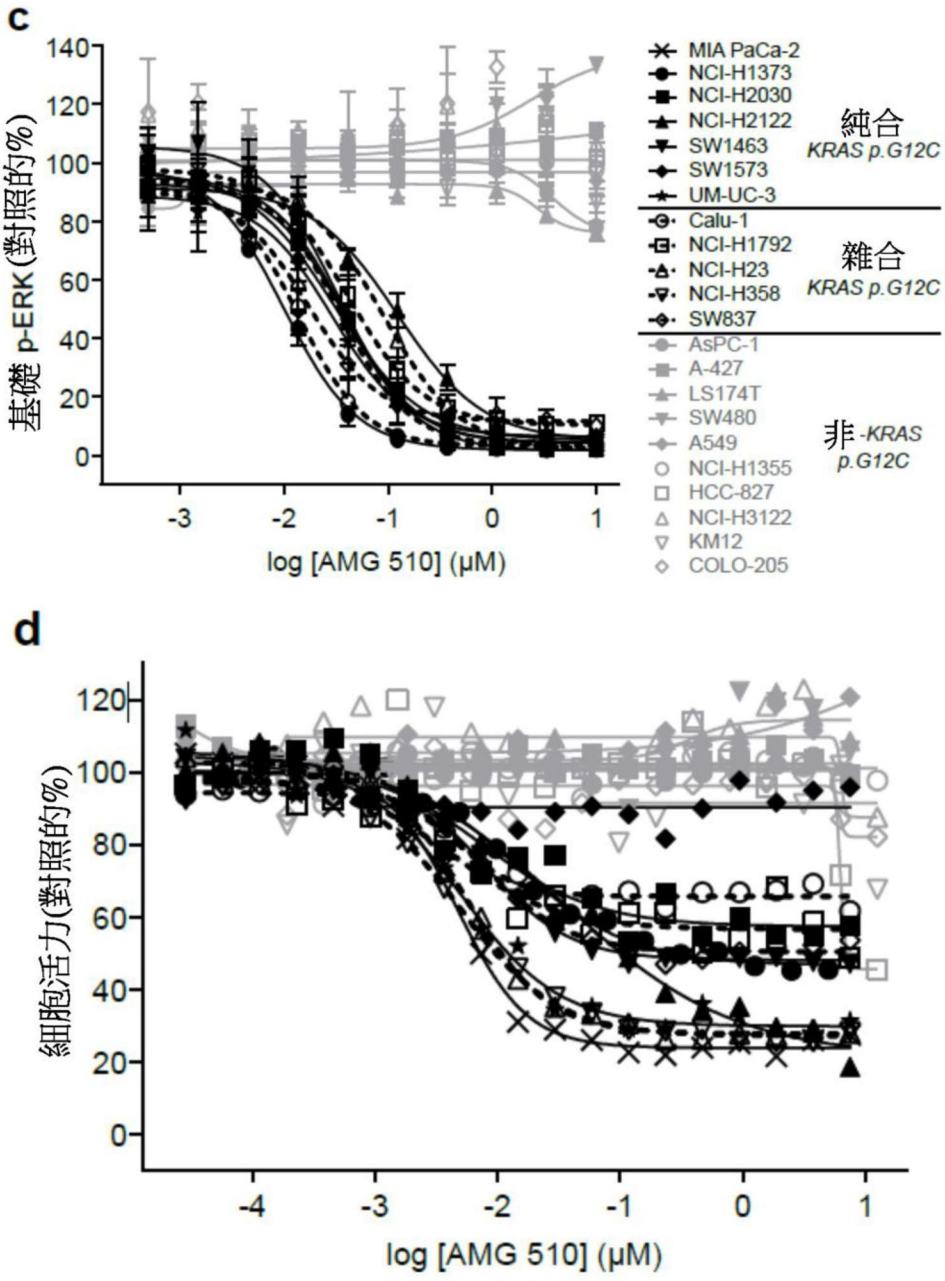
【圖 40續】


h
AMG 510
NCI-H358
MIA PaCa-2
ARS-1620
NCI-H358
MIA PaCa-2
10
8
6
4
2
0
k_{obs} (x 10^{-4} s^{-1})
0
5
10
[抑制劑] (x 10^{-6} M)

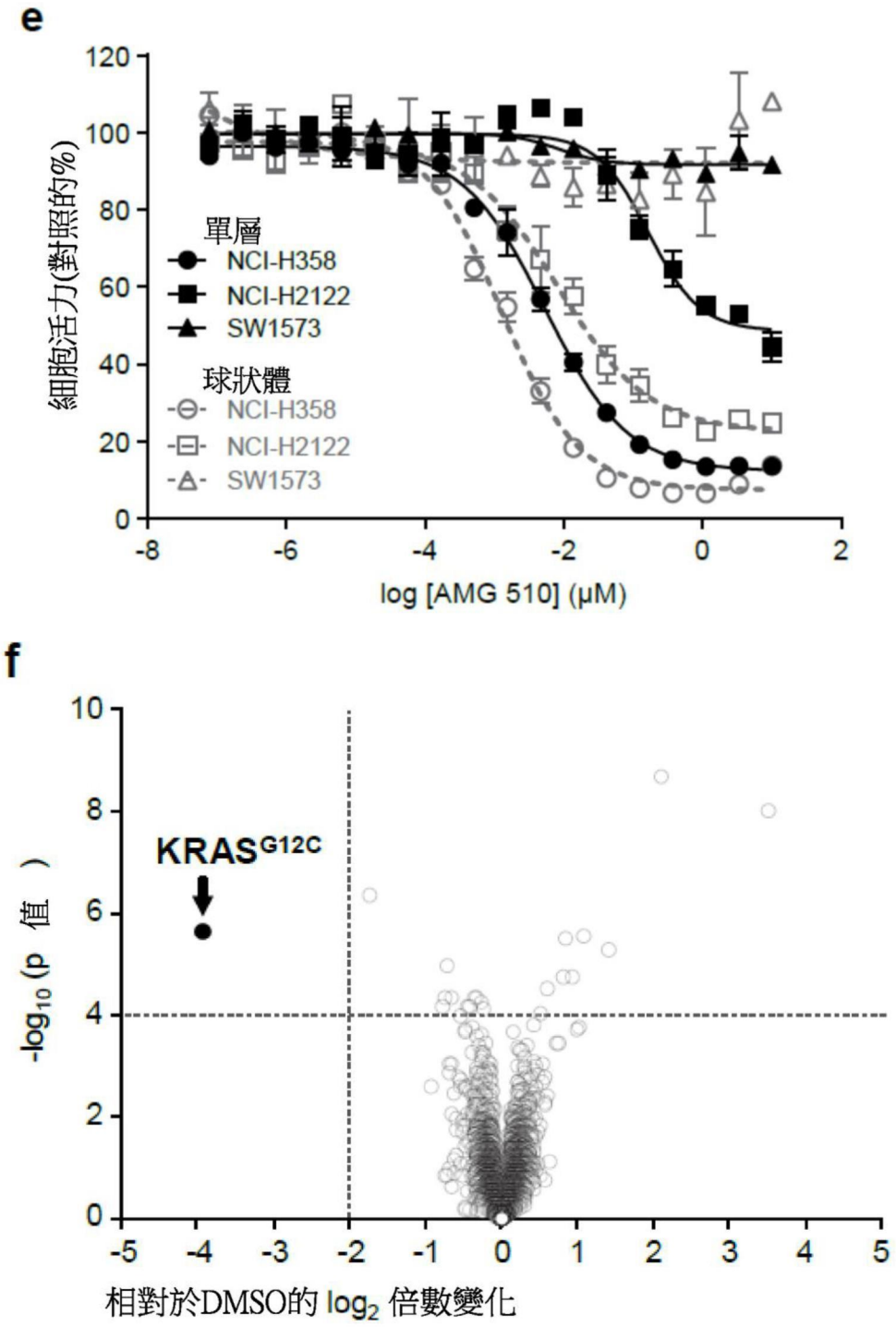
【圖 40續】


a
4 h
24 h
4 h
24 h
AMG 510 (μM)
0
0.001
0.01
0.1
1
RAS
AMG 510-KRAS
KRAS
p-EGFR (Y1068)
EGFR
p-MEK1/2 (S217/221)
MEK1/2
p-ERK1/2 (T185/Y187)
ERK1/2
p-AKT (S473)
AKT
p-S6 (S235/236)
S6
切割的 caspase-3
ND
ND
β-肌動蛋白
NCI-H358
MIA PaCa-2
b
0.1 μM AMG 510
時間(h)
0 2 8 16 24
0 2 8 16 24
RAS
AMG 510-KRAS
KRAS
p-EGFR (Y1068)
EGFR
p-MEK1/2 (S217/221)
MEK1/2
p-ERK1/2 (T185/Y187)
ERK1/2
p-AKT (S473)
AKT
p-S6 (S235/236)
S6
切割的caspase-3
β-肌動蛋白
NCI-H358
MIA PaCa-2

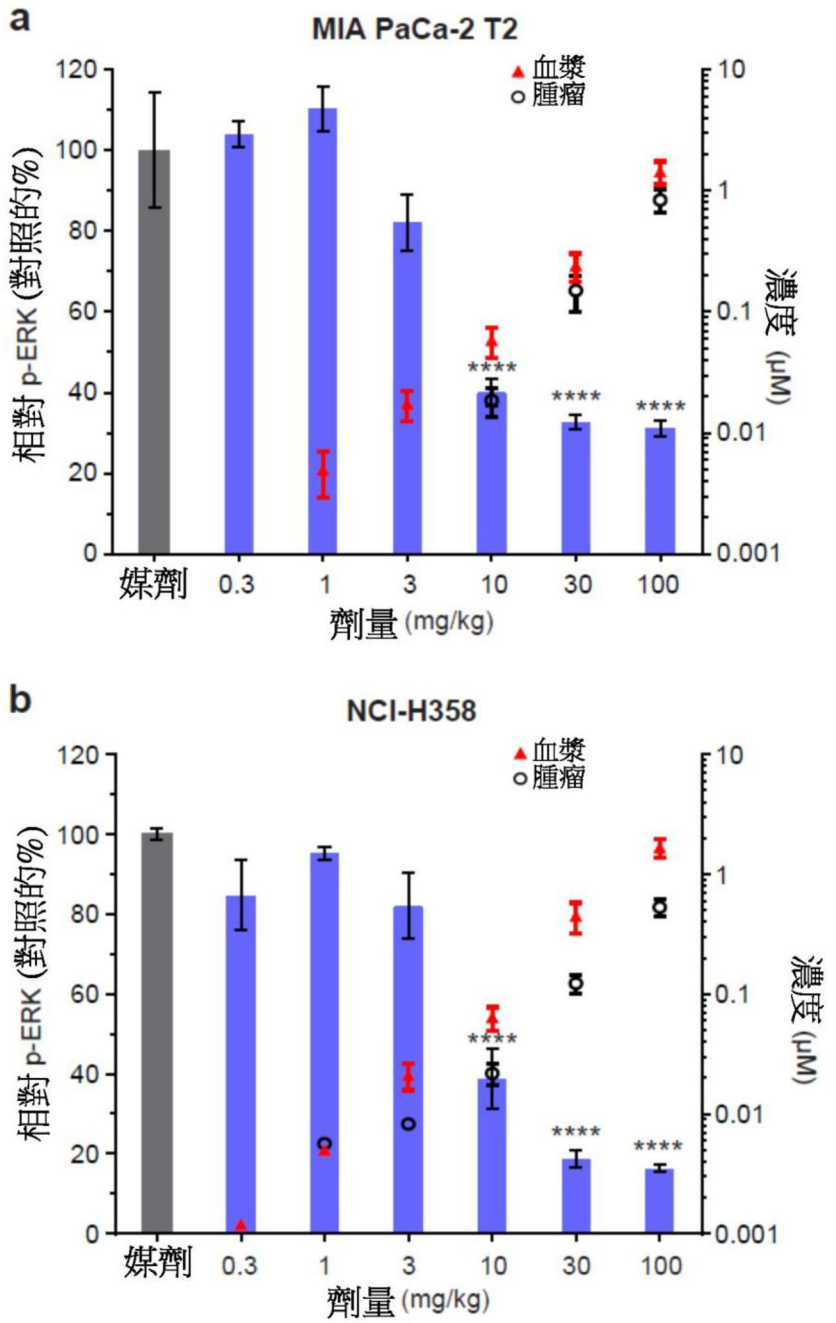
【圖 41】


c
基礎 p-ERK (對照的%)
log [AMG 510] (μM)
MIA PaCa-2
NCI-H1373
NCI-H2030
NCI-H2122
SW1463
SW1573
UM-UC-3
純合
KRAS p.G12C
Calu-1
NCI-H1792
NCI-H23
NCI-H358
SW837
雜合
KRAS p.G12C
AsPC-1
A-427
LS174T
SW480
A549
NCI-H1355
HCC-827
NCI-H3122
KM12
COLO-205
非-KRAS
p.G12C
d
細胞活力(對照的%)
log [AMG 510] (μM)

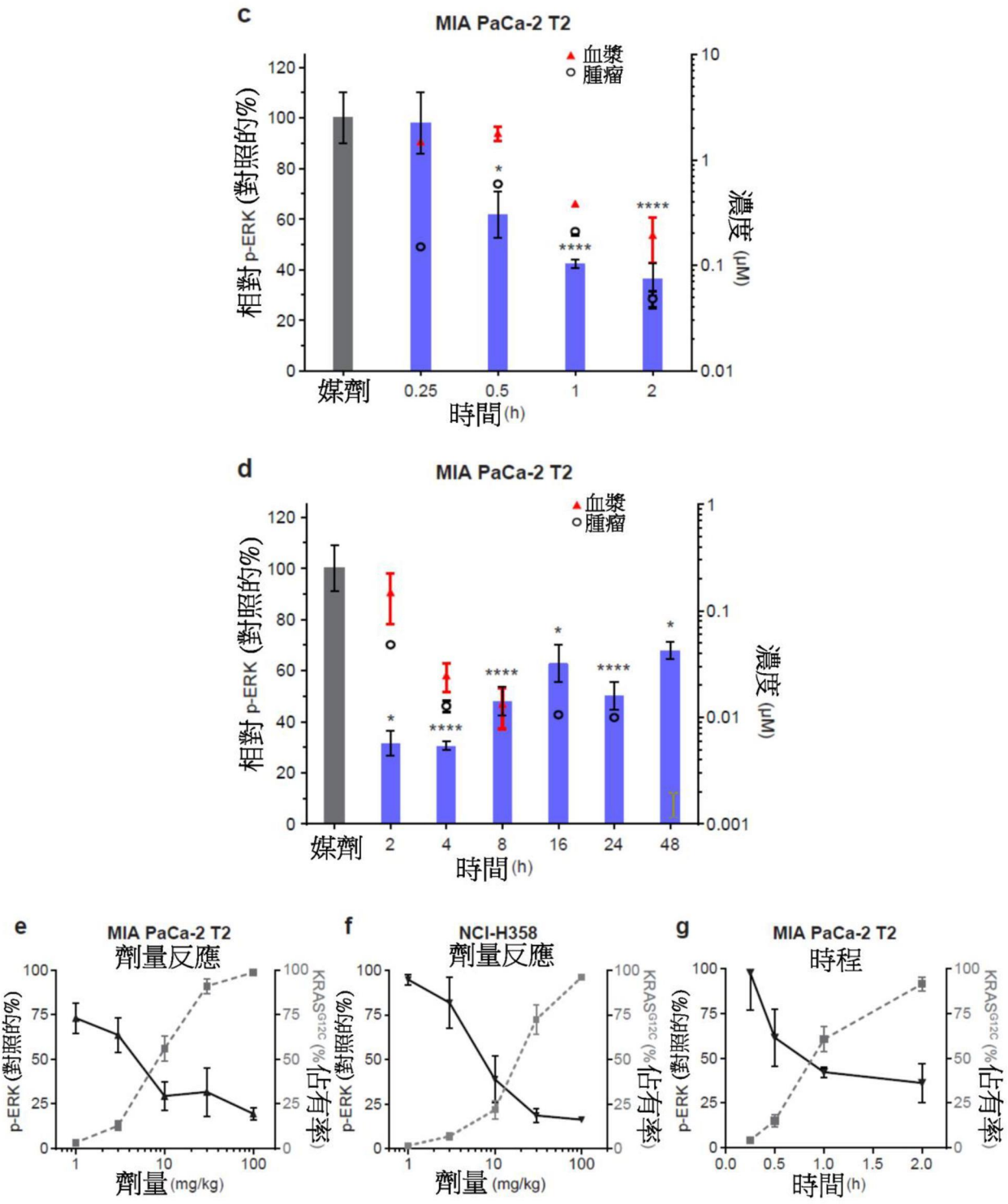
【圖 41續】


e
細胞活力(對照的%)
120
100
80
60
40
20
0
單層
NCI-H358
NCI-H2122
SW1573
球狀體
NCI-H358
NCI-H2122
SW1573
-8
-6
-4
-2
0
2
log [AMG 510] (μM)
f
-log10 (p 值)
10
8
6
4
2
0
KRASG12C
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
相對於DMSO的 log2 倍數變化

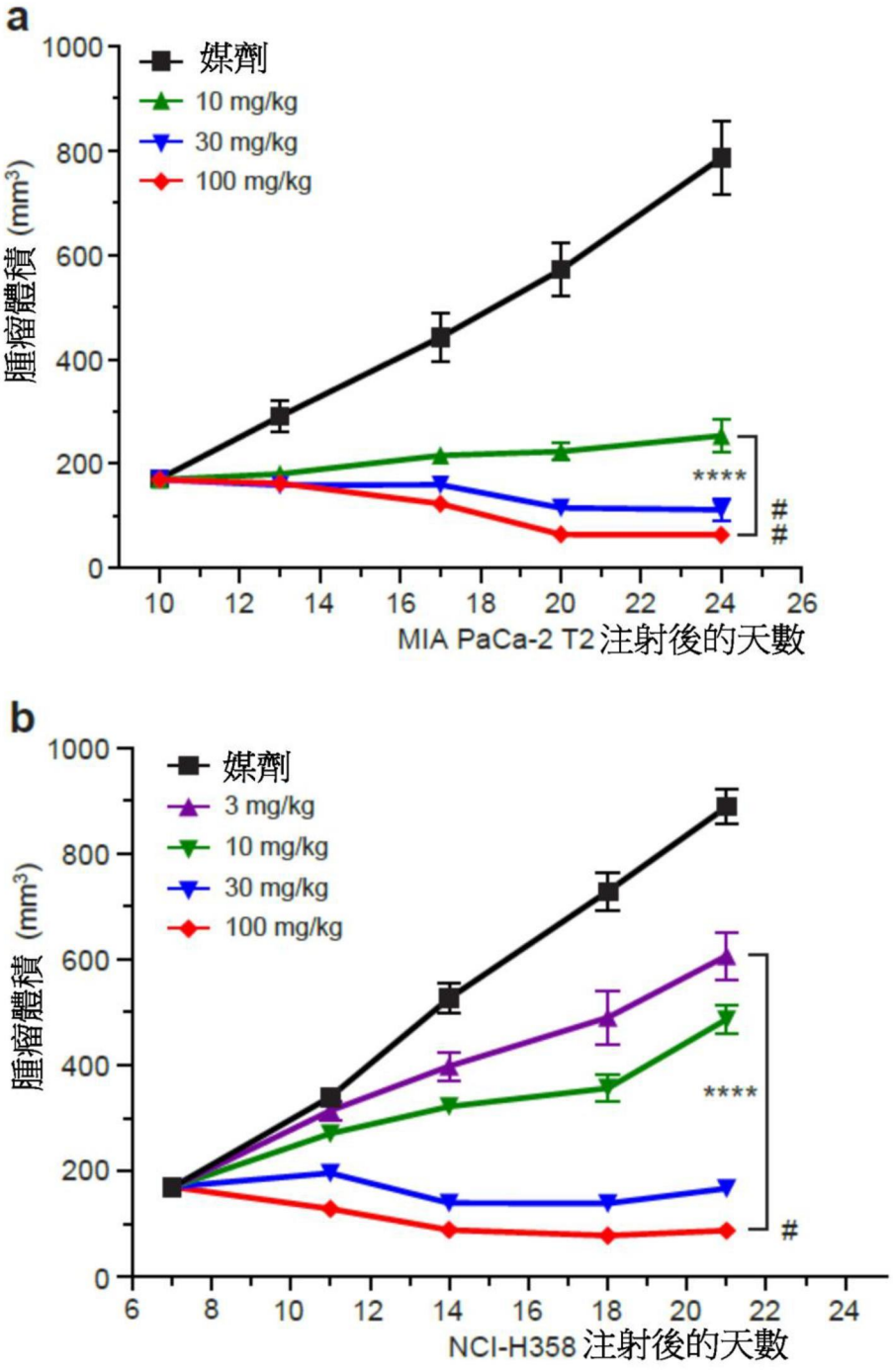
【圖 41續】


a
MIA PaCa-2 T2
血漿
腫瘤
相對 p-ERK (對照的%)
濃度 (μM)
媒劑
0.3
1
3
10
30
100
劑量 (mg/kg)
****
b
NCI-H358
血漿
腫瘤
相對 p-ERK (對照的%)
濃度 (μM)
媒劑
0.3
1
3
10
30
100
劑量 (mg/kg)
****

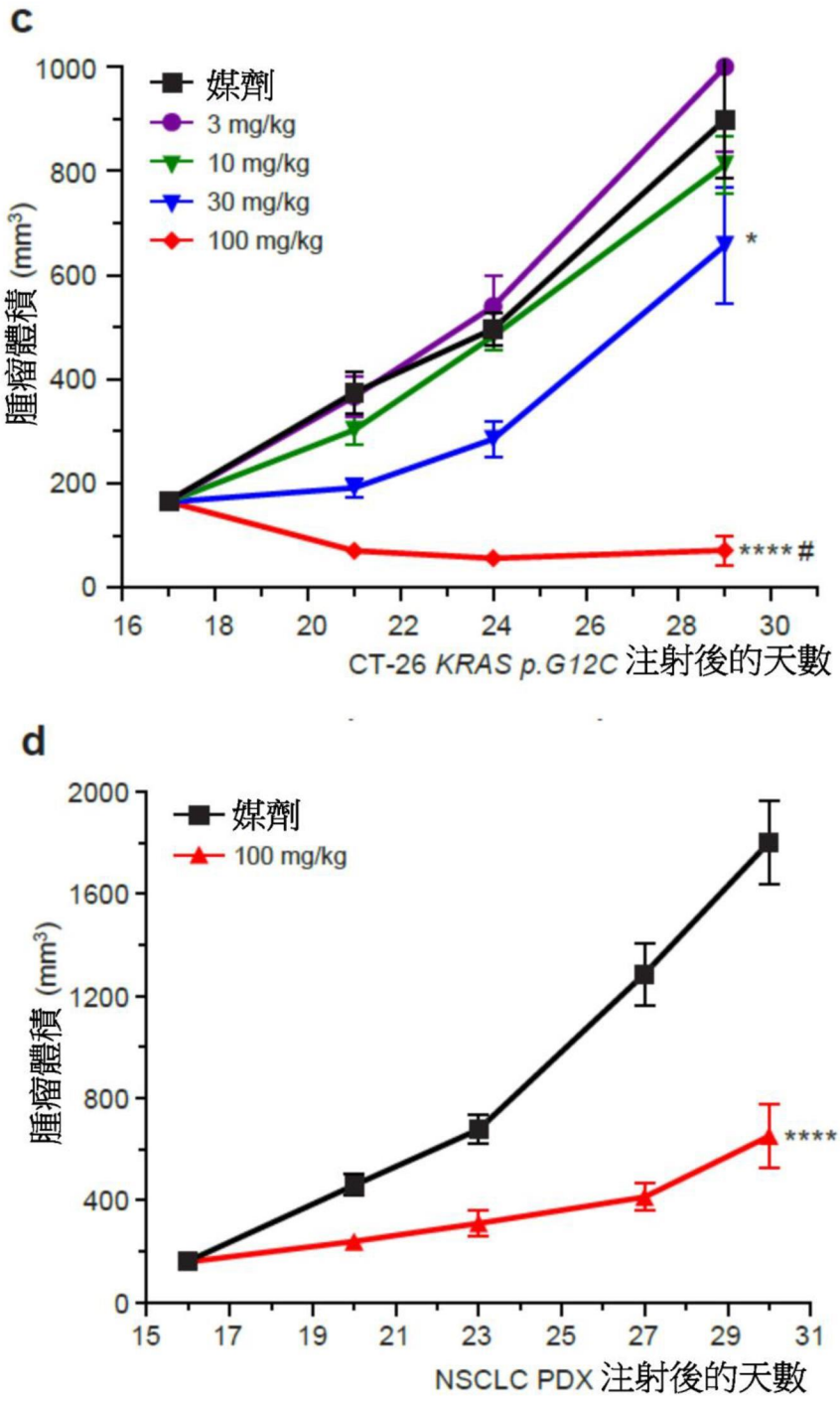
【圖 42】


c
MIA PaCa-2 T2
血漿
腫瘤
相對 p-ERK (對照的%)
濃度 (μM)
媒劑
0.25
0.5
1
2
時間 (h)
d
MIA PaCa-2 T2
血漿
腫瘤
相對 p-ERK (對照的%)
濃度 (μM)
媒劑
2
4
8
16
24
48
時間 (h)
e
MIA PaCa-2 T2
劑量反應
p-ERK (對照的%)
KRASG12C (%佔有率)
劑量 (mg/kg)
f
NCI-H358
劑量反應
p-ERK (對照的%)
KRASG12C (%佔有率)
劑量 (mg/kg)
g
MIA PaCa-2 T2
時程
p-ERK (對照的%)
KRASG12C (%佔有率)
時間 (h)

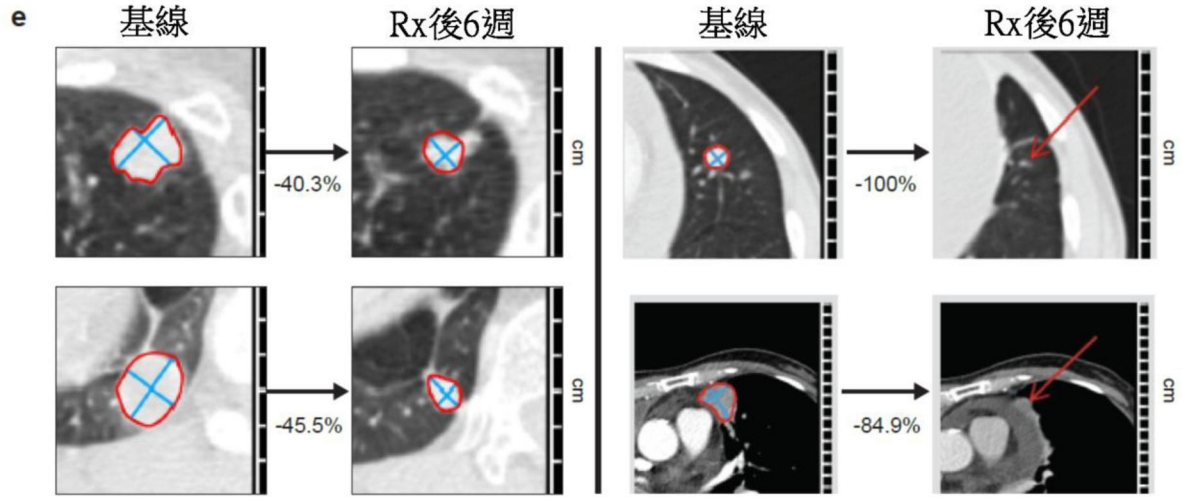
【圖 42續】

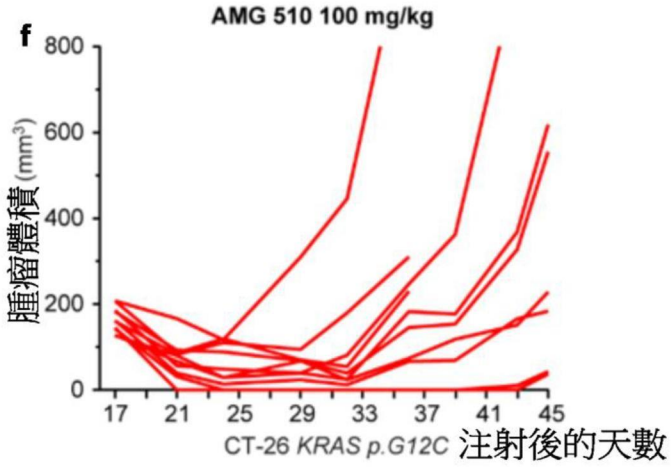

a
媒劑
10 mg/kg
30 mg/kg
100 mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
10
12
14
16
18
20
22
24
26
****
#
#
MIA PaCa-2 T2 注射後的天數
b
媒劑
3 mg/kg
10 mg/kg
30 mg/kg
100 mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
****
#
NCI-H358 注射後的天數

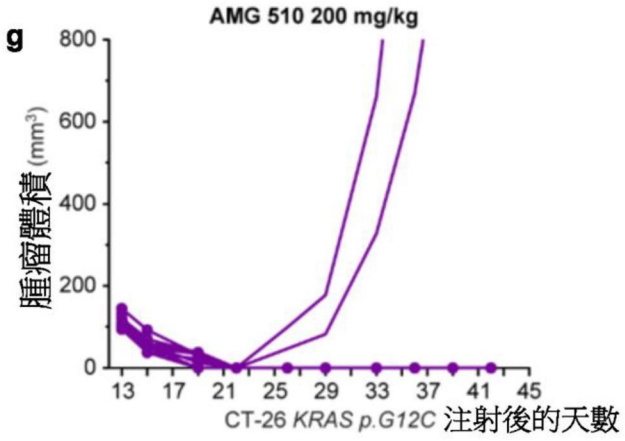
【圖 43】


c
媒劑
3 mg/kg
10 mg/kg
30 mg/kg
100 mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
*
**** #
16
18
20
22
24
26
28
30
CT-26 KRAS p.G12C 注射後的天數
d
媒劑
100 mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
2000
1600
1200
800
400
0
****
15
17
19
21
23
25
27
29
31
NSCLC PDX 注射後的天數

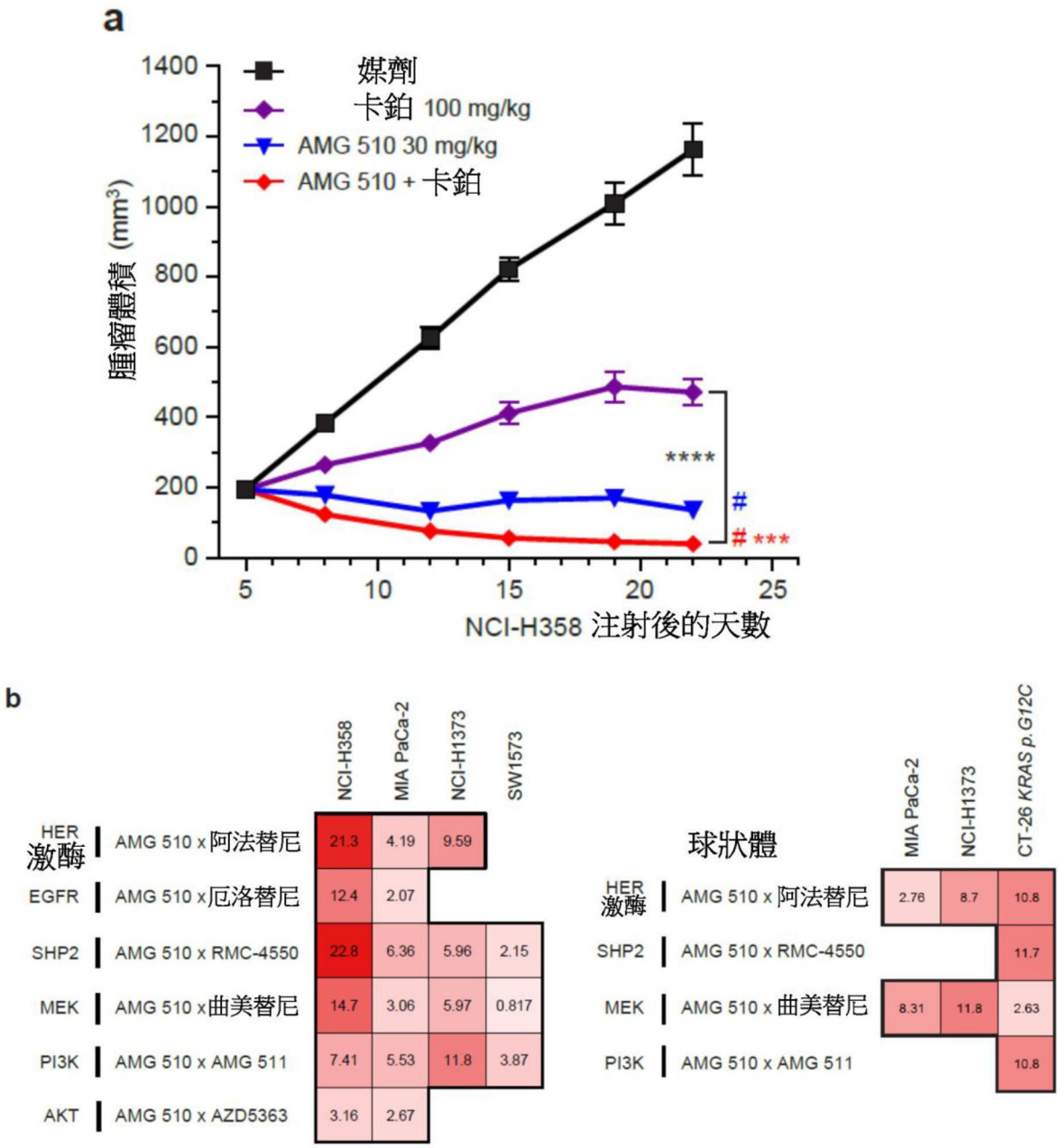
【圖 43續】


e
基線
Rx後6週
基線
Rx後6週
-40.3%
-100%
-45.5%
-84.9%
cm

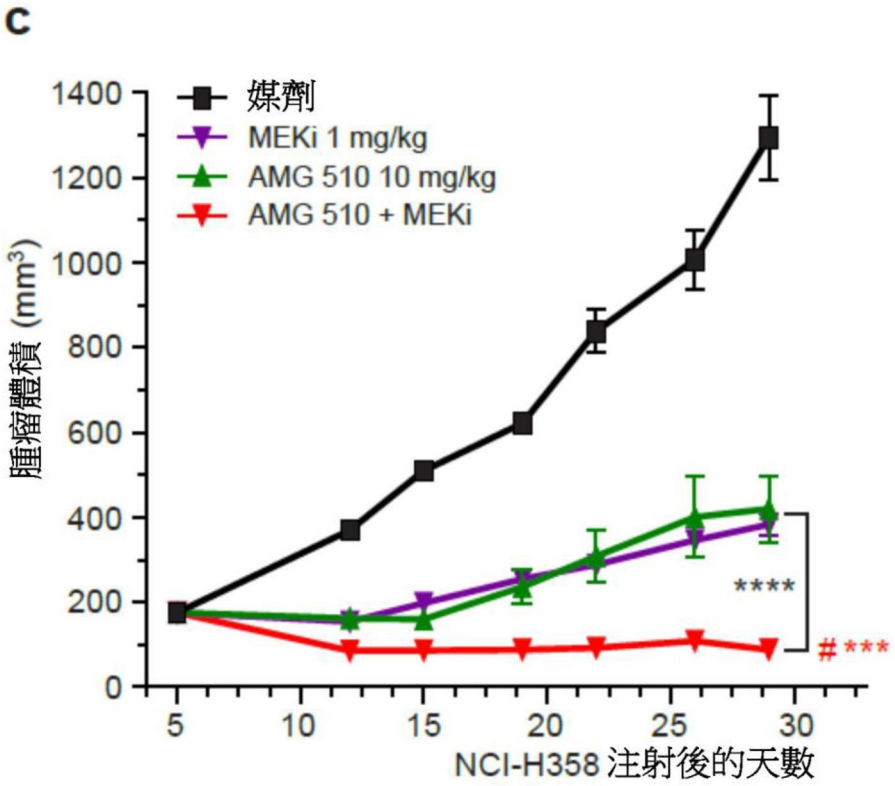

f
AMG 510 100 mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
800
600
400
200
0
17 21 25 29 33 37 41 45
CT-26 KRAS p.G12C 注射後的天數


g
AMG 510 200 mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
800
600
400
200
0
13 17 21 25 29 33 37 41 45
CT-26 KRAS p.G12C 注射後的天數

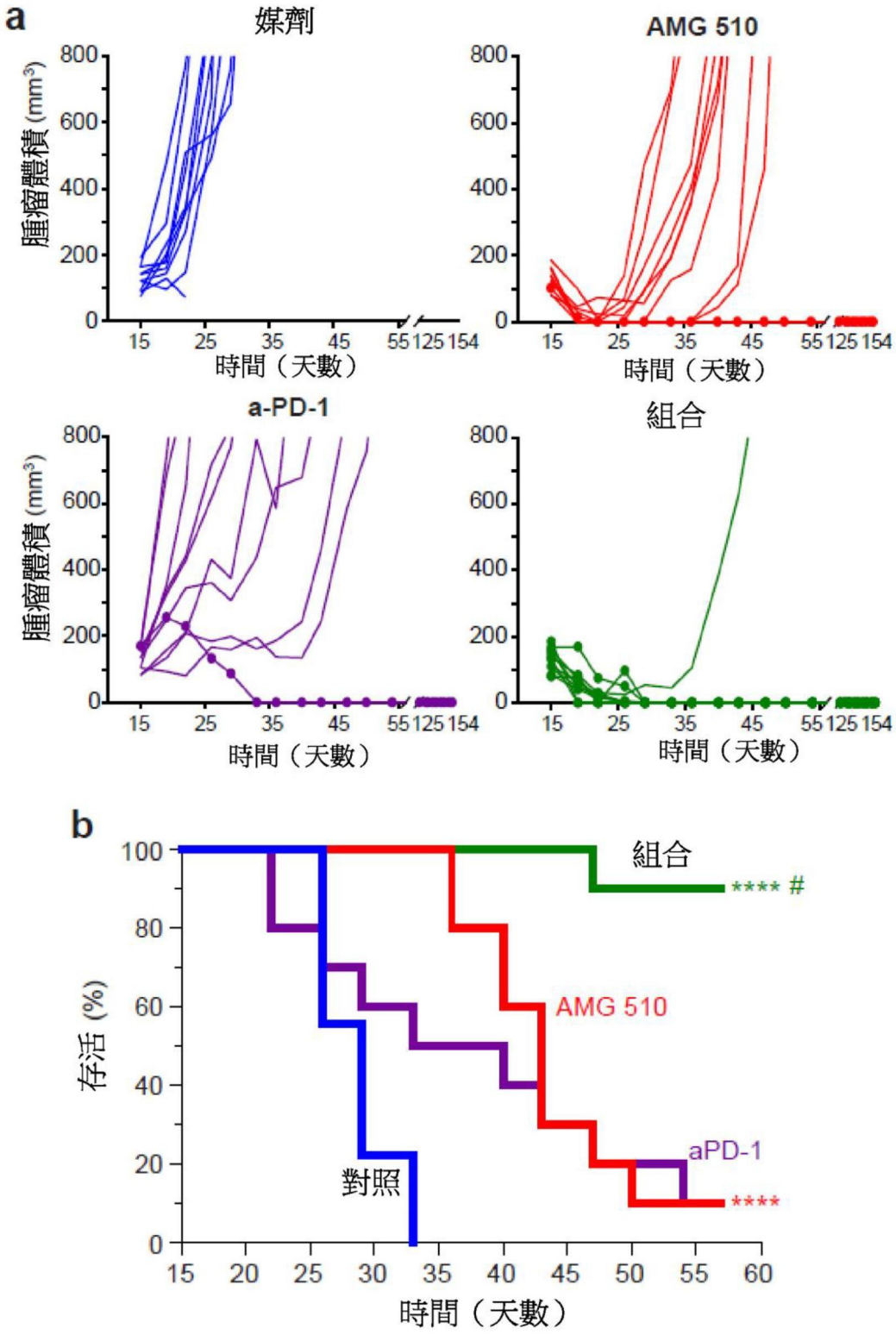
【圖 43續】


a
媒劑
卡鉑 100 mg/kg
AMG 510 30 mg/kg
AMG 510 + 卡鉑
腫瘤體積 (mm³)
NCI-H358 注射後的天數
****
#
***
b
NCI-H358
MIA PaCa-2
NCI-H1373
SW1573
HER 激酶
EGFR
SHP2
MEK
PI3K
AKT
AMG 510 x 阿法替尼
AMG 510 x 厄洛替尼
AMG 510 x RMC-4550
AMG 510 x 曲美替尼
AMG 510 x AMG 511
AMG 510 x AZD5363
21.3
4.19
9.59
12.4
2.07
22.8
6.36
5.96
2.15
14.7
3.06
5.97
0.817
7.41
5.53
11.8
3.87
3.16
2.67
球狀體
MIA PaCa-2
NCI-H1373
CT-26 KRAS p.G12C
2.76
8.7
10.8
11.7
8.31
11.8
2.63
10.8

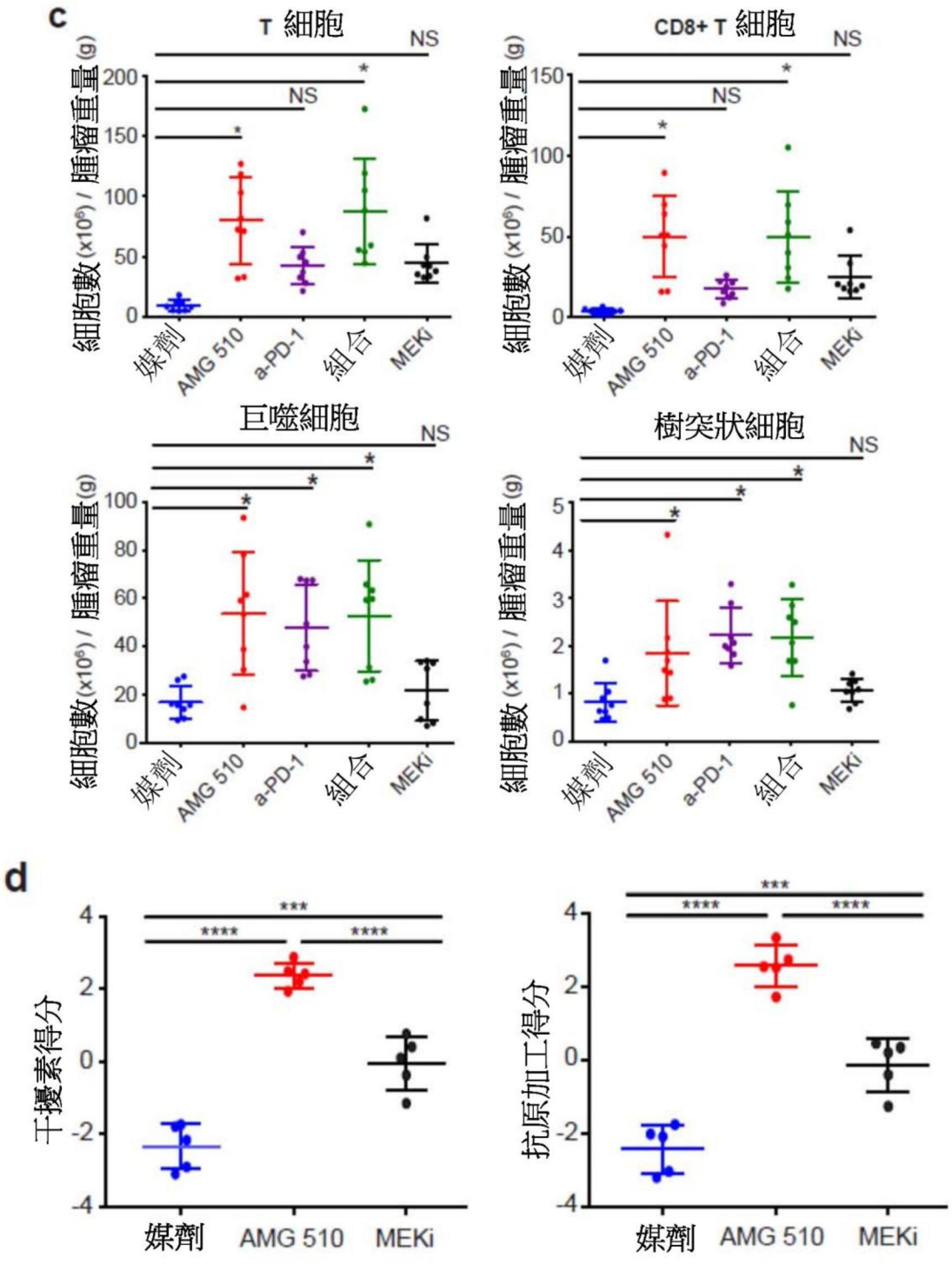
【圖 44】


c
媒劑
MEKi 1 mg/kg
AMG 510 10 mg/kg
AMG 510 + MEKi
腫瘤體積 (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
NCI-H358 注射後的天數
****
#***

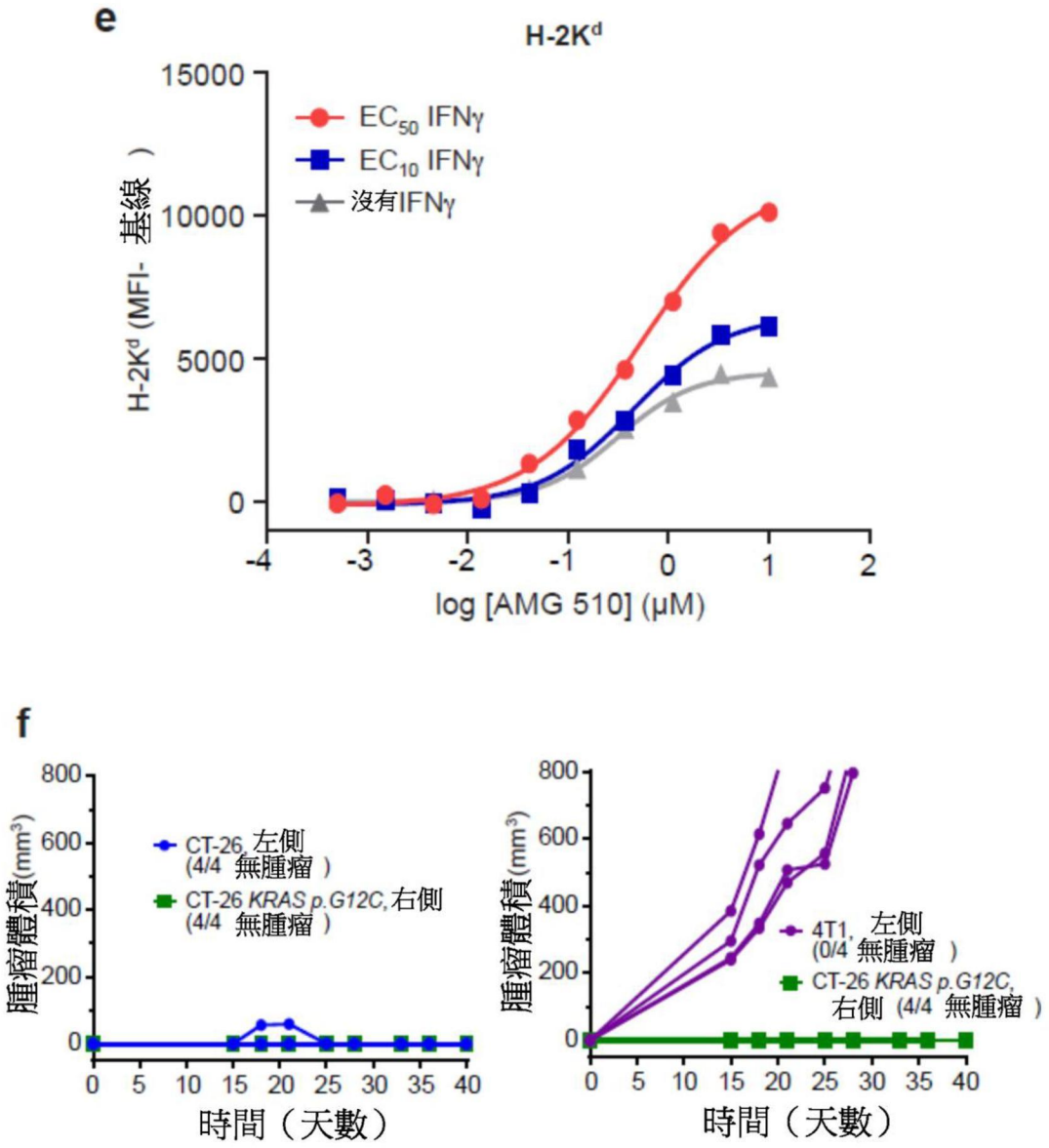
【圖 44續】



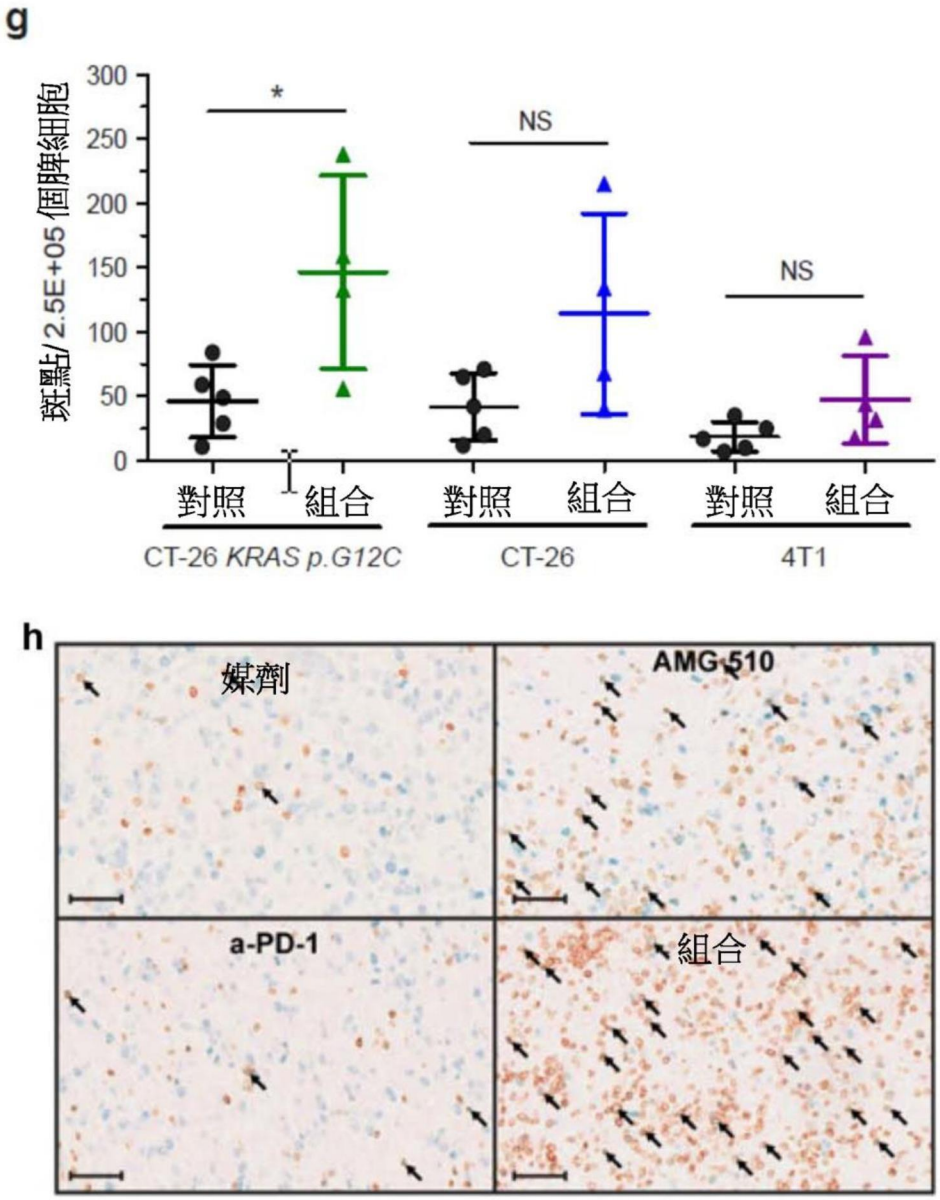
【圖 45】


c
T 細胞
CD8+ T 細胞
巨噬細胞
樹突狀細胞
細胞數 (x10⁶) / 腫瘤重量 (g)
NS
媒劑
AMG 510
a-PD-1
組合
MEKi
d
干擾素得分
抗原加工得分
媒劑
AMG 510
MEKi

【圖 45續】

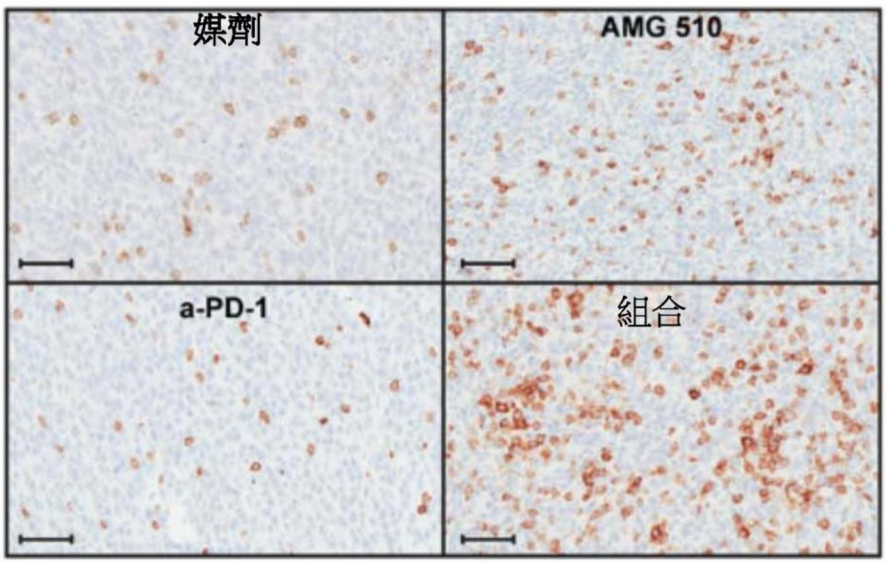

e
H-2K^d
15000
10000
5000
0
H-2K^d (MFI- 基線)
EC$_{50}$ IFNγ
EC$_{10}$ IFNγ
沒有IFNγ
-4
-3
-2
-1
0
1
2
log [AMG 510] (μM)
f
800
600
400
200
0
腫瘤體積(mm^3)
CT-26 左側
(4/4 無腫瘤)
CT-26 KRAS p.G12C, 右側
(4/4 無腫瘤)
0 5 10 15 20 25 30 35 40
時間（天數）
4T1, 左側
(0/4 無腫瘤)
CT-26 KRAS p.G12C,
右側 (4/4 無腫瘤)

【圖 45續】


g
斑點/ 2.5E+05 個脾細胞
300
250
200
150
100
50
0
*
NS
NS
對照
組合
對照
組合
對照
組合
CT-26 KRAS p.G12C
CT-26
4T1
h
媒劑
AMG-510
a-PD-1
組合

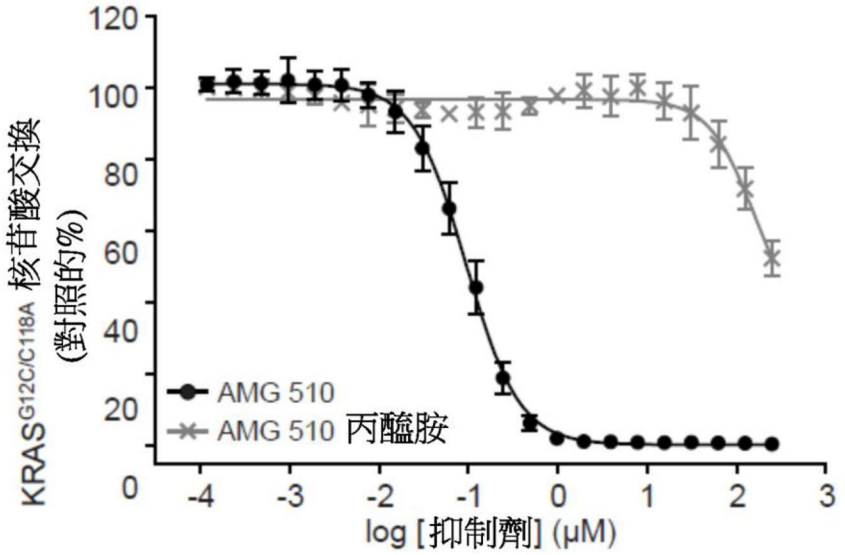
【圖 45】(續)

i



【圖 45續】

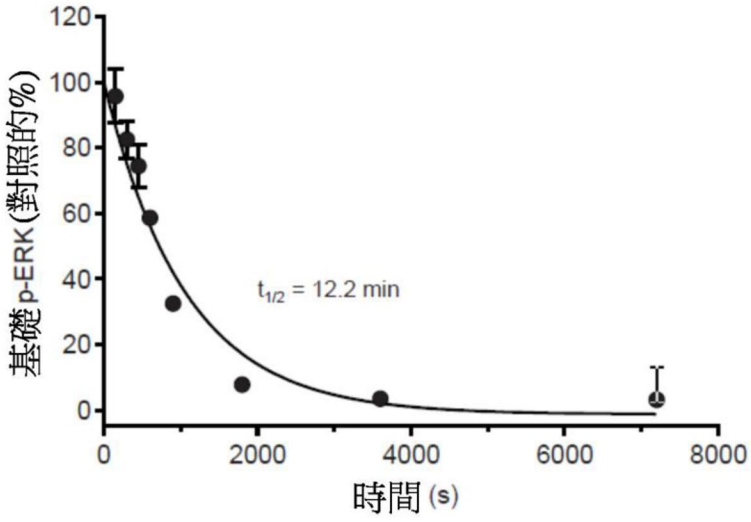
a



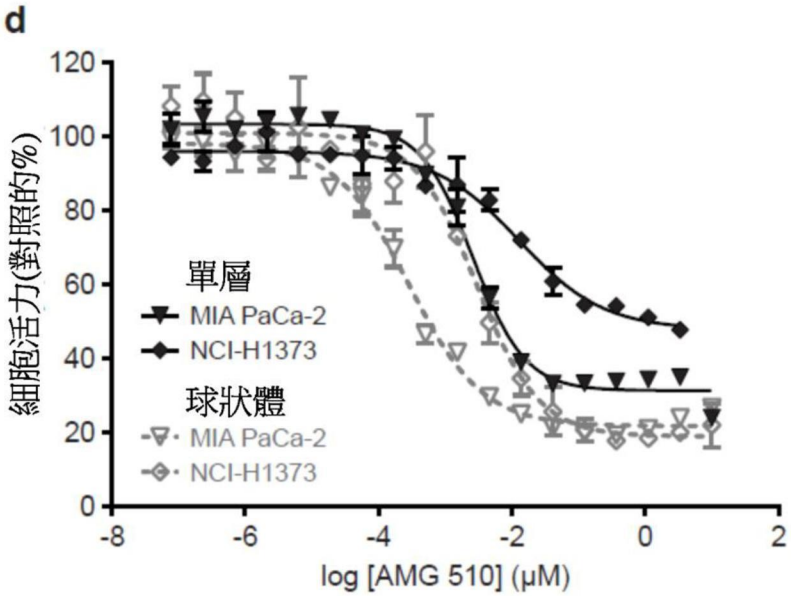
b

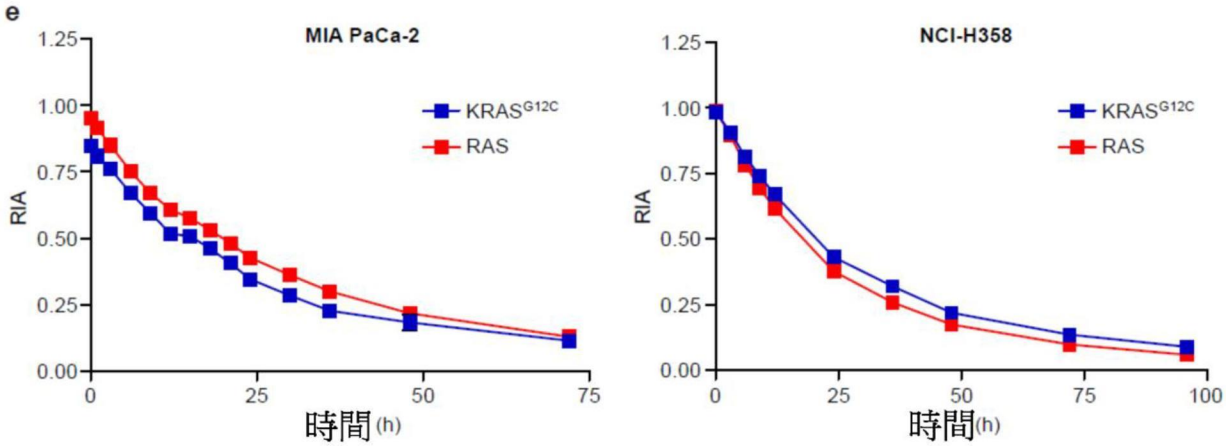
		Max k_{inact} 或 k_{obs} (s^{-1})	K_I 或 $[I]_{50}$ (M)	Max k_{inact}/K_I 或 Max k_{obs} / $[I]_{50}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
質譜	AMG 510	8.5E-01 ± 7.8E-02	8.6E-05 ± 1.4E-05	9.8E+03 ± 1.8E+03
	ARS-1620	7.3E-02 ± 3.0E-03	3.1E-05 ± 3.1E-06	2.4E+03
MIA PaCa-2	AMG 510	7.3E-04 ± 3.6E-05	2.5E-07 ± 6.2E-09	3.0E+03 ± 7.1E+01
	ARS-1620	3.1E-04 ± 2.2E-05	2.4E-06 ± 6.6E-07	1.3E+02 ± 2.7E+01
NCI-H358	AMG 510	8.9E-04 ± 7.4E-05	1.3E-07 ± 1.5E-08	7.1E+03 ± 1.4E+03
	ARS-1620	4.6E-04 ± 3.7E-05	1.1E-06 ± 4.9E-07	4.8E+02 ± 2.5E+02

c



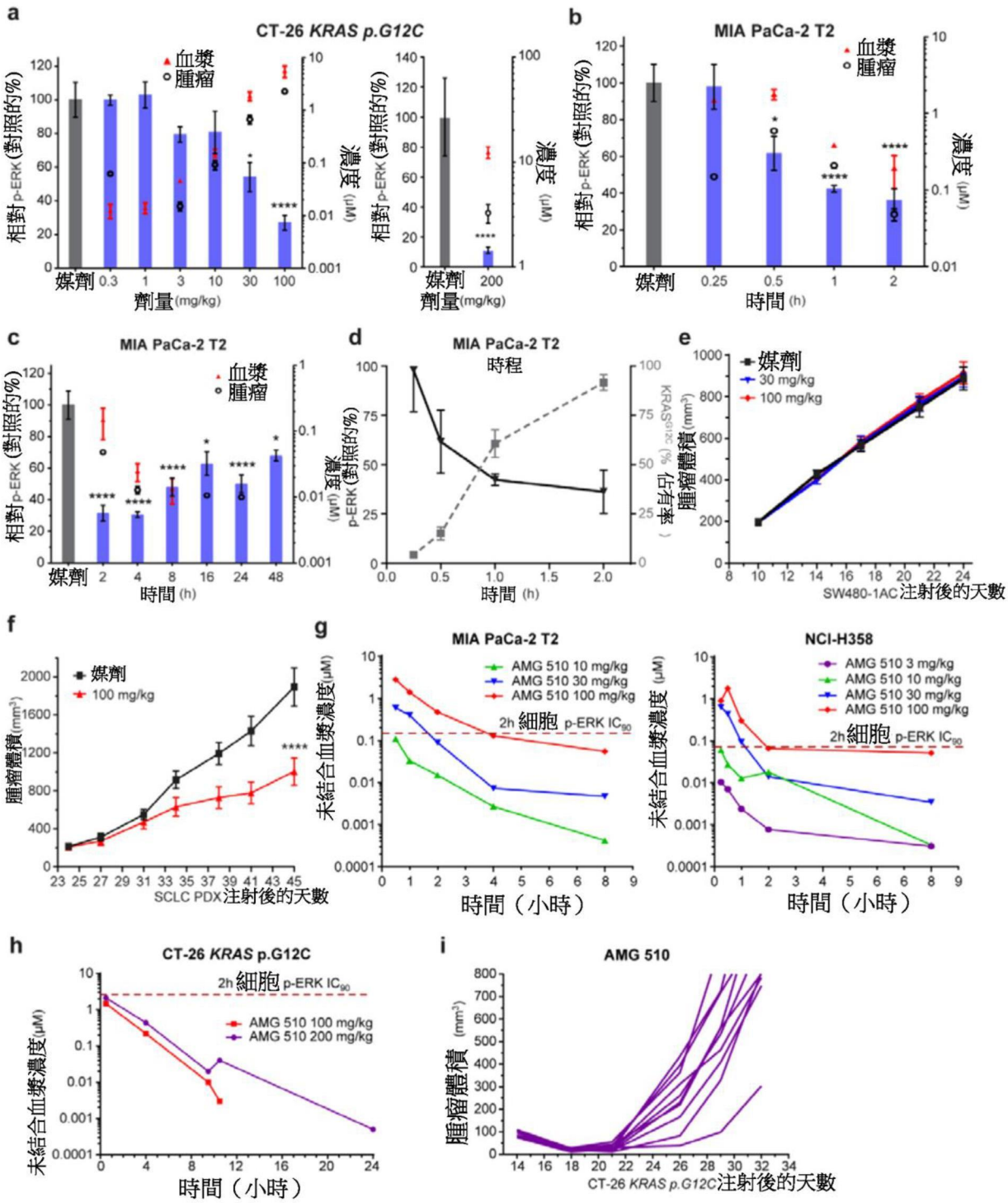
【圖 46】



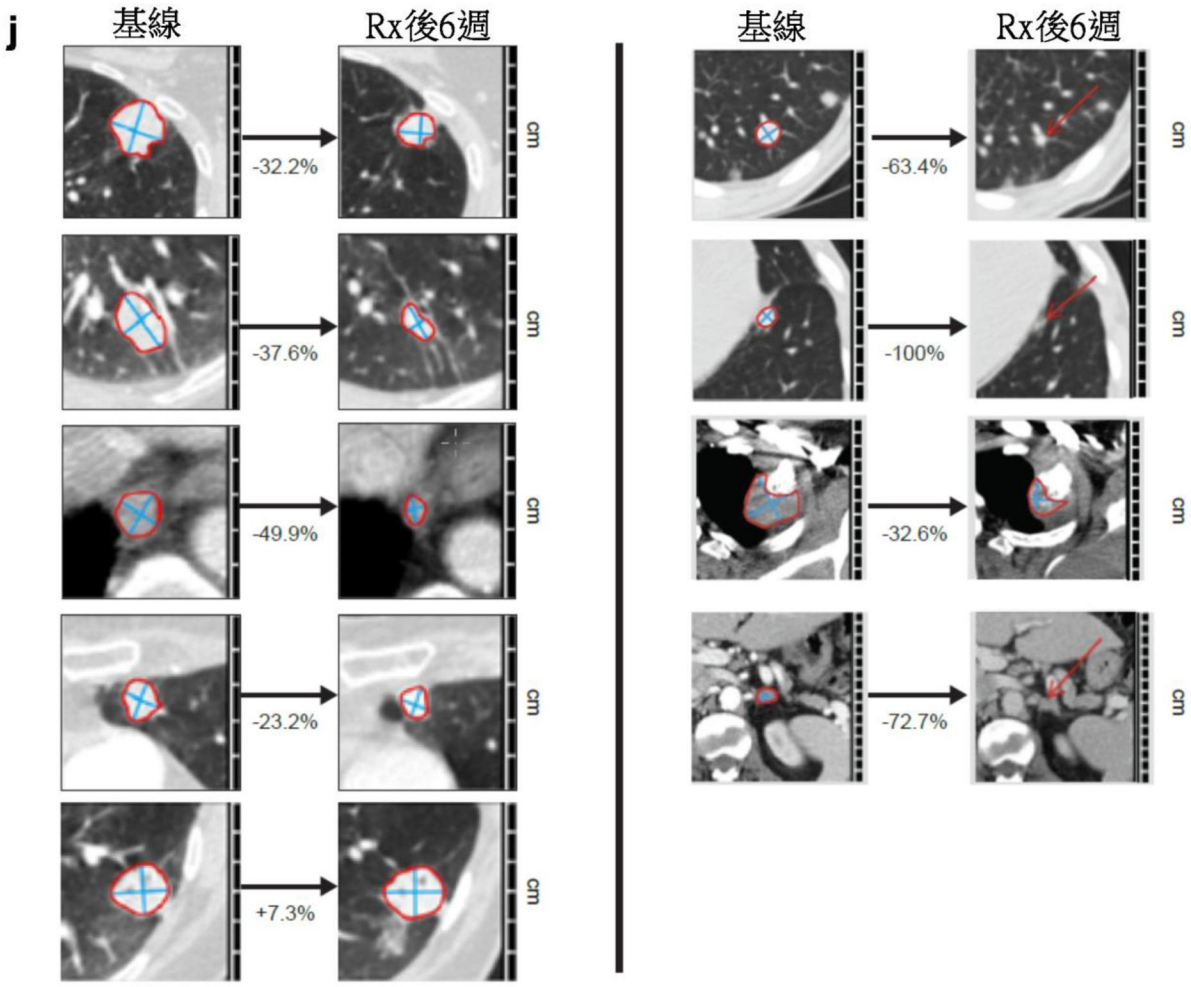


細胞	測定時長 (h)	細胞倍增時間 (h)	不進行k_{dil}校正		進行k_{dil}校正		
			k_{dec} (h^{-1})	$KRAS^{G12C}$半衰期 (h)	k_{dil} (h^{-1})	k_{dec} (h^{-1})	$KRAS^{G12C}$ 半衰期 (h)
MIA PaCa-2	72	24	0.042	17	0.006	0.035	20
NCI-H358	96	36	0.037	19	0.010	0.029	24

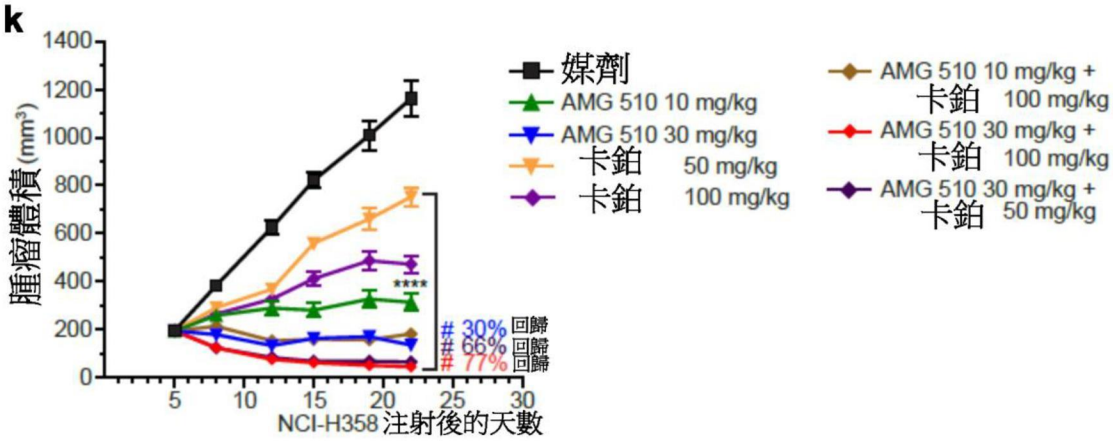
【圖 46續】


a
CT-26 KRAS p.G12C
血漿
腫瘤
相對p-ERK(對照的%)
血漿p-ERK(wrt)
媒劑
劑量(mg/kg)
b
MIA PaCa-2 T2
時間(h)
c
MIA PaCa-2 T2
d
MIA PaCa-2 T2
時程
KRASG12C(%)
e
媒劑
30 mg/kg
100 mg/kg
腫瘤體積(mm³)
SW480-1AC注射後的天數
f
SCLC PDX注射後的天數
g
MIA PaCa-2 T2
AMG 510 10 mg/kg
AMG 510 30 mg/kg
AMG 510 100 mg/kg
2h 細胞 p-ERK IC90
未結合血漿濃度(μM)
時間（小時）
NCI-H358
AMG 510 3 mg/kg
h
CT-26 KRAS p.G12C
AMG 510 200 mg/kg
i
AMG 510
CT-26 KRAS p.G12C注射後的天數

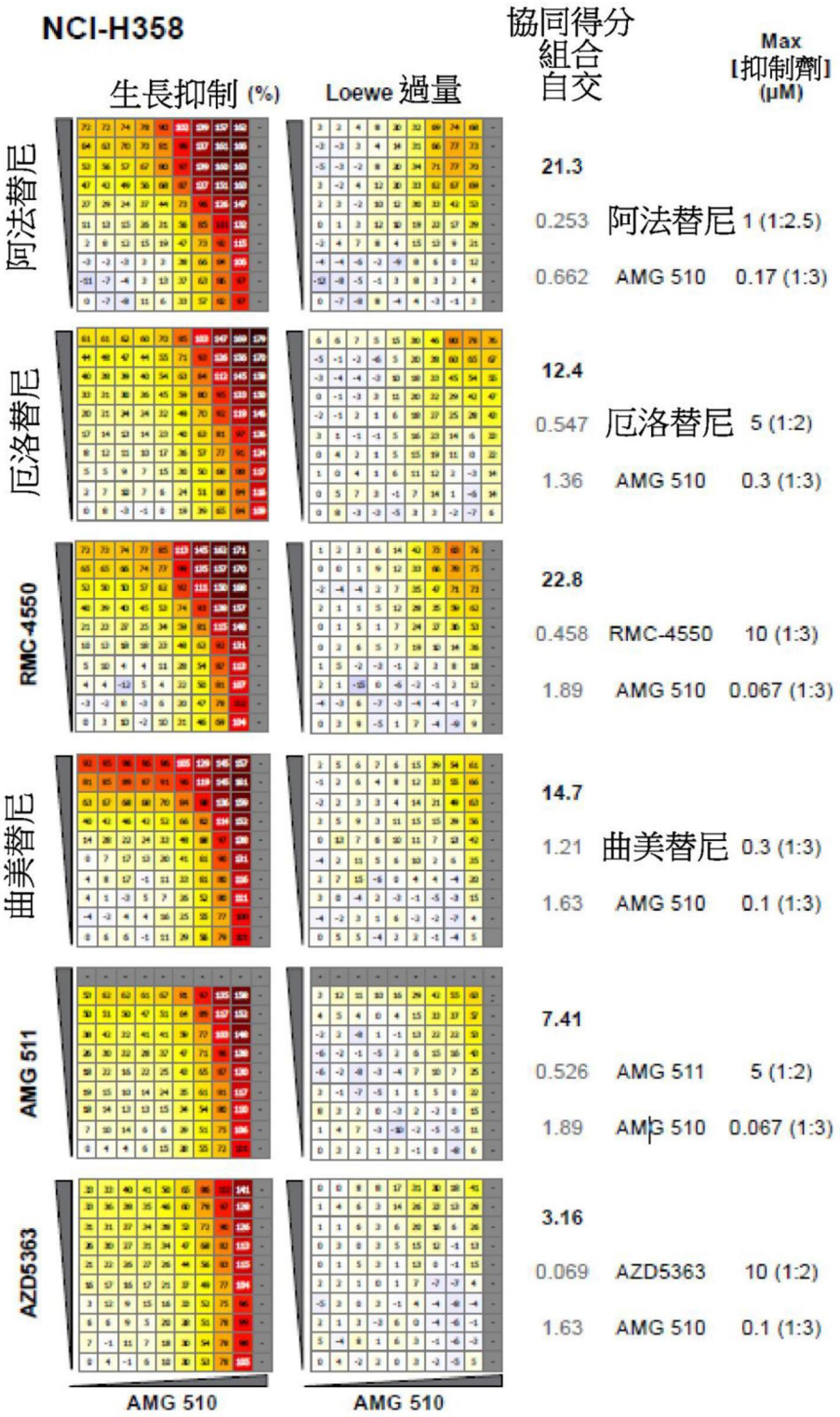
【圖 47】



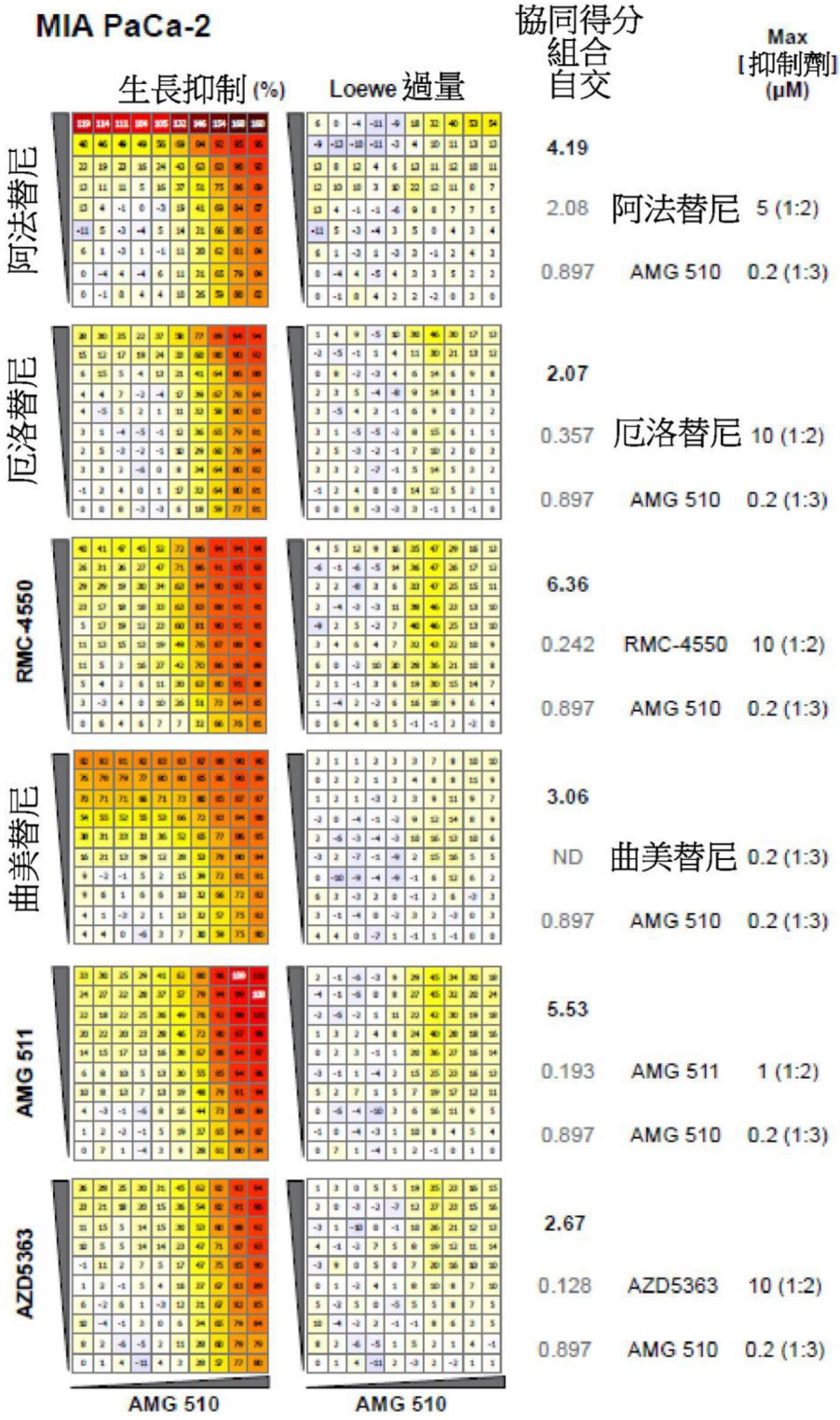
【圖 47】(續)


k
腫瘤體積 (mm³)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
NCI-H358 注射後的天數
媒劑
AMG 510 10 mg/kg
AMG 510 30 mg/kg
卡鉑 50 mg/kg
卡鉑 100 mg/kg
AMG 510 10 mg/kg + 卡鉑 100 mg/kg
AMG 510 30 mg/kg + 卡鉑 100 mg/kg
AMG 510 30 mg/kg + 卡鉑 50 mg/kg
****
30% 回歸
66% 回歸
77% 回歸

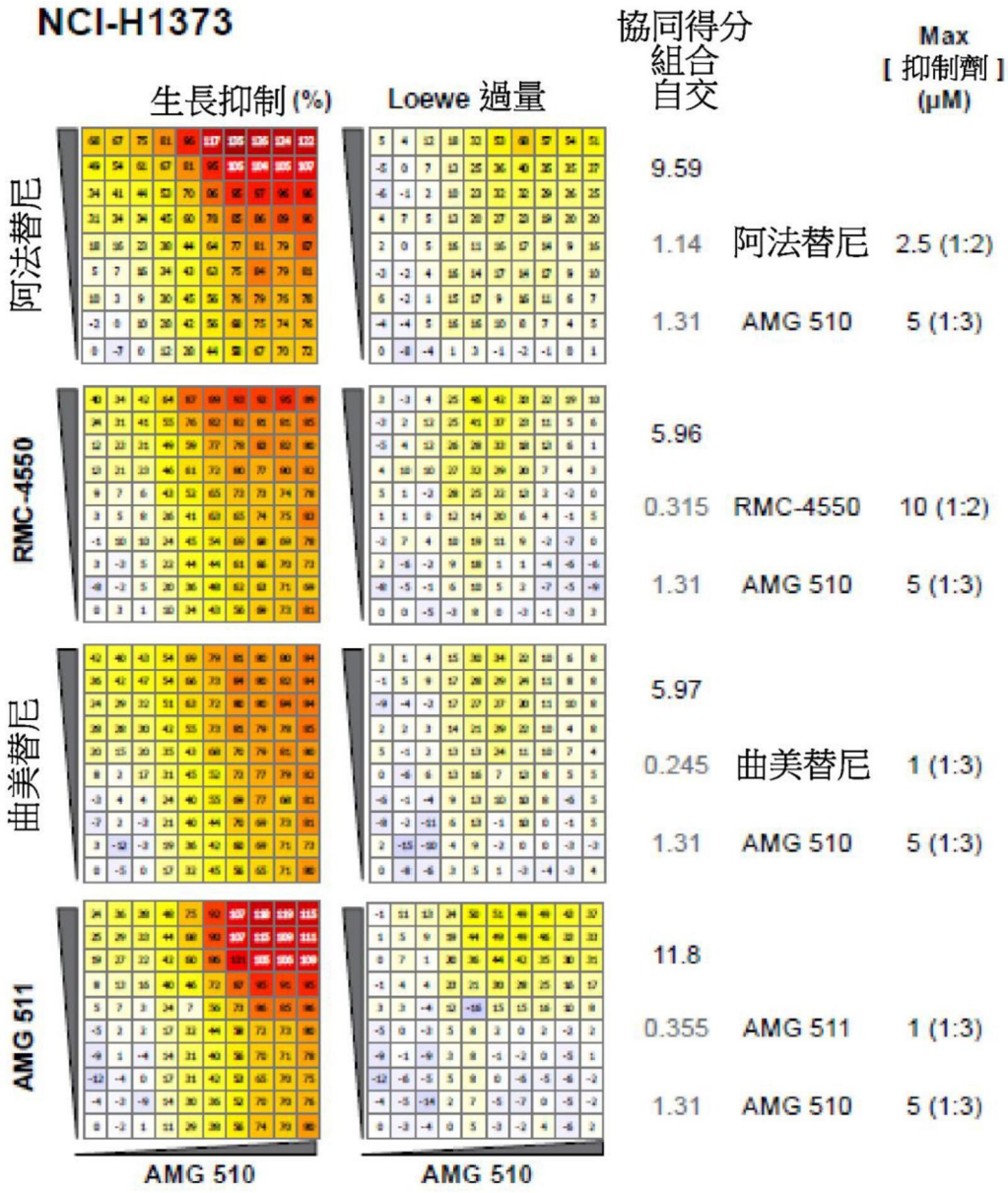
【圖 47續】


NCI-H358
生長抑制 (%)
Loewe 過量
協同得分
組合
自交
Max
[抑制劑]
(μM)
阿法替尼
厄洛替尼
RMC-4550
曲美替尼
AMG 511
AZD5363
AMG 510
AMG 510
21.3
0.253 阿法替尼 1 (1:2.5)
0.662 AMG 510 0.17 (1:3)
12.4
0.547 厄洛替尼 5 (1:2)
1.36 AMG 510 0.3 (1:3)
22.8
0.458 RMC-4550 10 (1:3)
1.89 AMG 510 0.067 (1:3)
14.7
1.21 曲美替尼 0.3 (1:3)
1.63 AMG 510 0.1 (1:3)
7.41
0.526 AMG 511 5 (1:2)
1.89 AMG 510 0.067 (1:3)
3.16
0.069 AZD5363 10 (1:2)
1.63 AMG 510 0.1 (1:3)

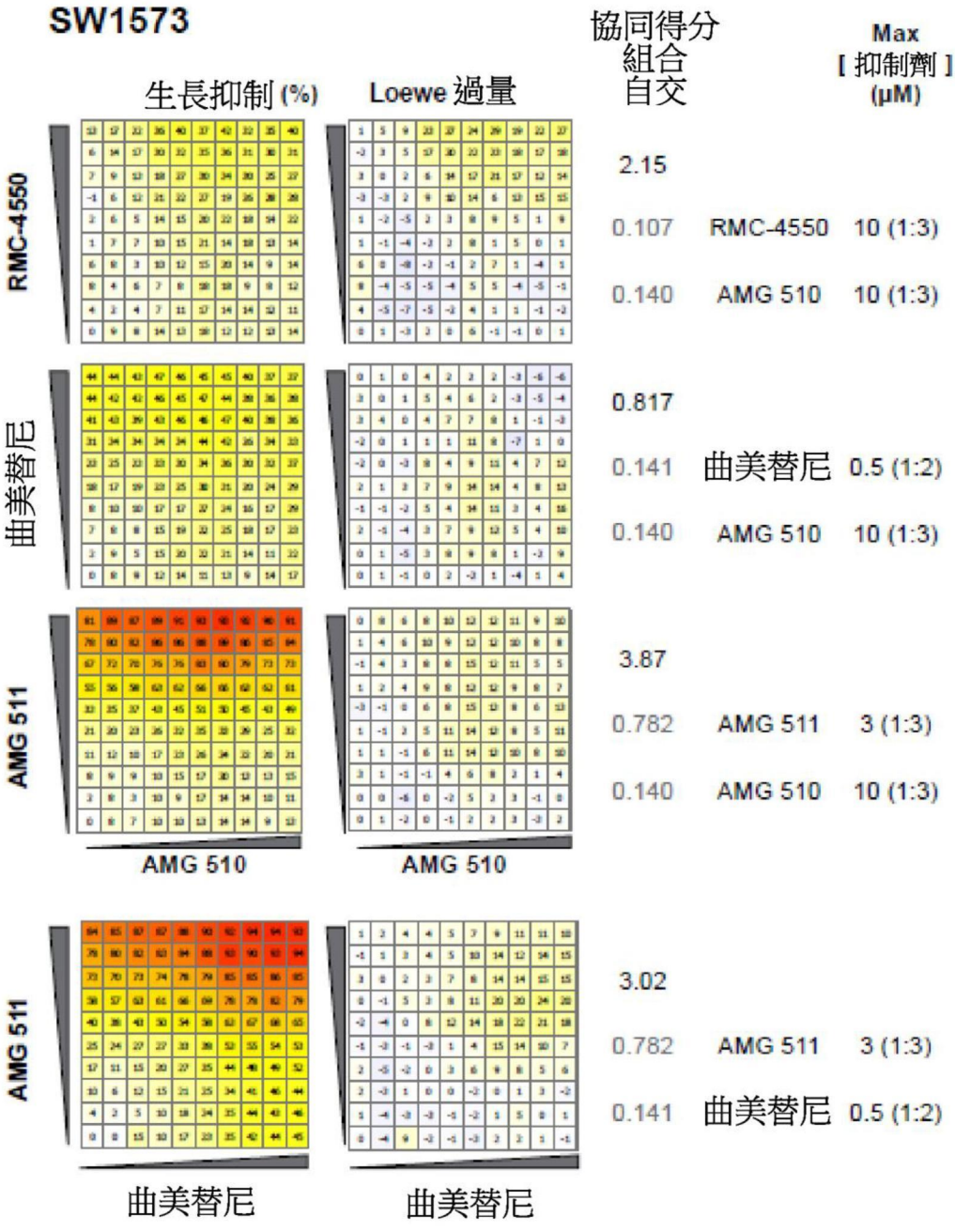
【圖 48】


MIA PaCa-2
生長抑制 (%)
Loewe 過量
協同得分
組合
自交
Max
[抑制劑]
(μM)
阿法替尼
厄洛替尼
RMC-4550
曲美替尼
AMG 511
AZD5363
4.19
2.08 阿法替尼 5 (1:2)
0.897 AMG 510 0.2 (1:3)
2.07
0.357 厄洛替尼 10 (1:2)
0.897 AMG 510 0.2 (1:3)
6.36
0.242 RMC-4550 10 (1:2)
0.897 AMG 510 0.2 (1:3)
3.06
ND 曲美替尼 0.2 (1:3)
0.897 AMG 510 0.2 (1:3)
5.53
0.193 AMG 511 1 (1:2)
0.897 AMG 510 0.2 (1:3)
2.67
0.128 AZD5363 10 (1:2)
0.897 AMG 510 0.2 (1:3)
AMG 510
AMG 510

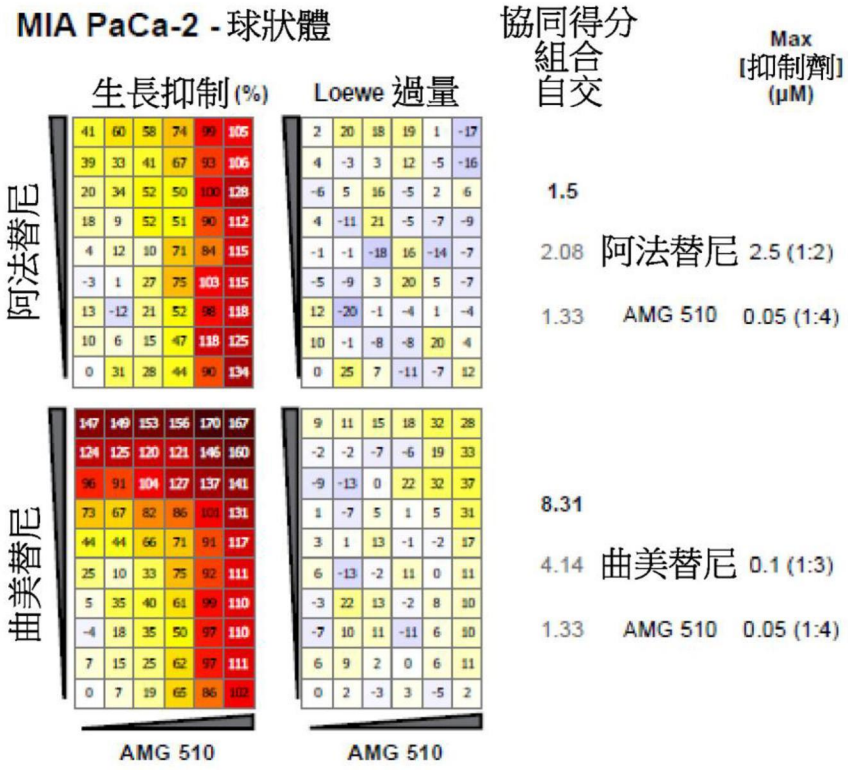
【圖 48續】

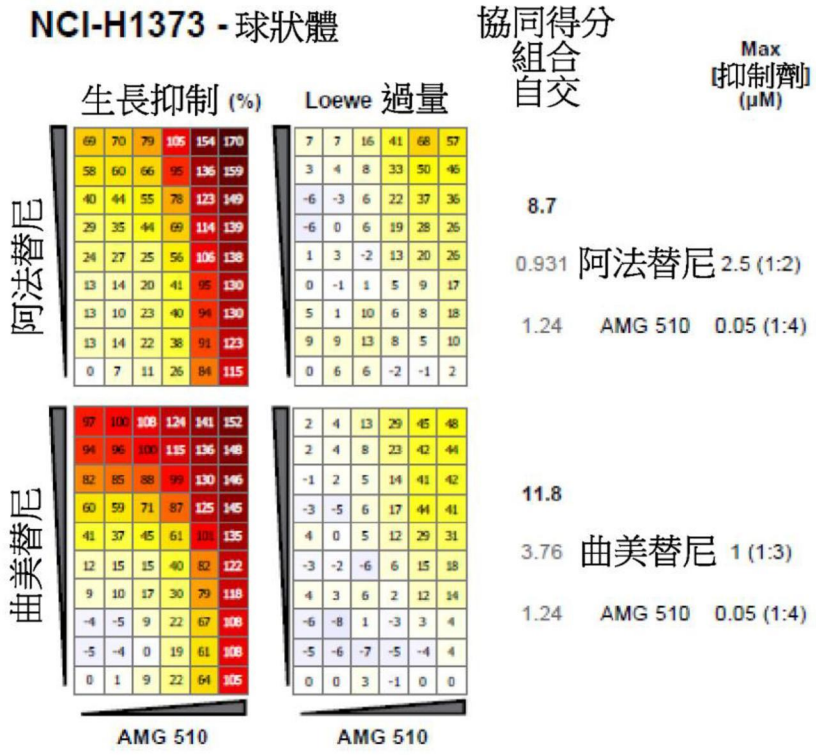

NCI-H1373
生長抑制 (%)
Loewe 過量
協同得分
組合
自交
Max
[抑制劑]
(μM)
阿法替尼
RMC-4550
曲美替尼
AMG 511
AMG 510
AMG 510
9.59
1.14 阿法替尼 2.5 (1:2)
1.31 AMG 510 5 (1:3)
5.96
0.315 RMC-4550 10 (1:2)
1.31 AMG 510 5 (1:3)
5.97
0.245 曲美替尼 1 (1:3)
1.31 AMG 510 5 (1:3)
11.8
0.355 AMG 511 1 (1:3)
1.31 AMG 510 5 (1:3)

【圖 48續】

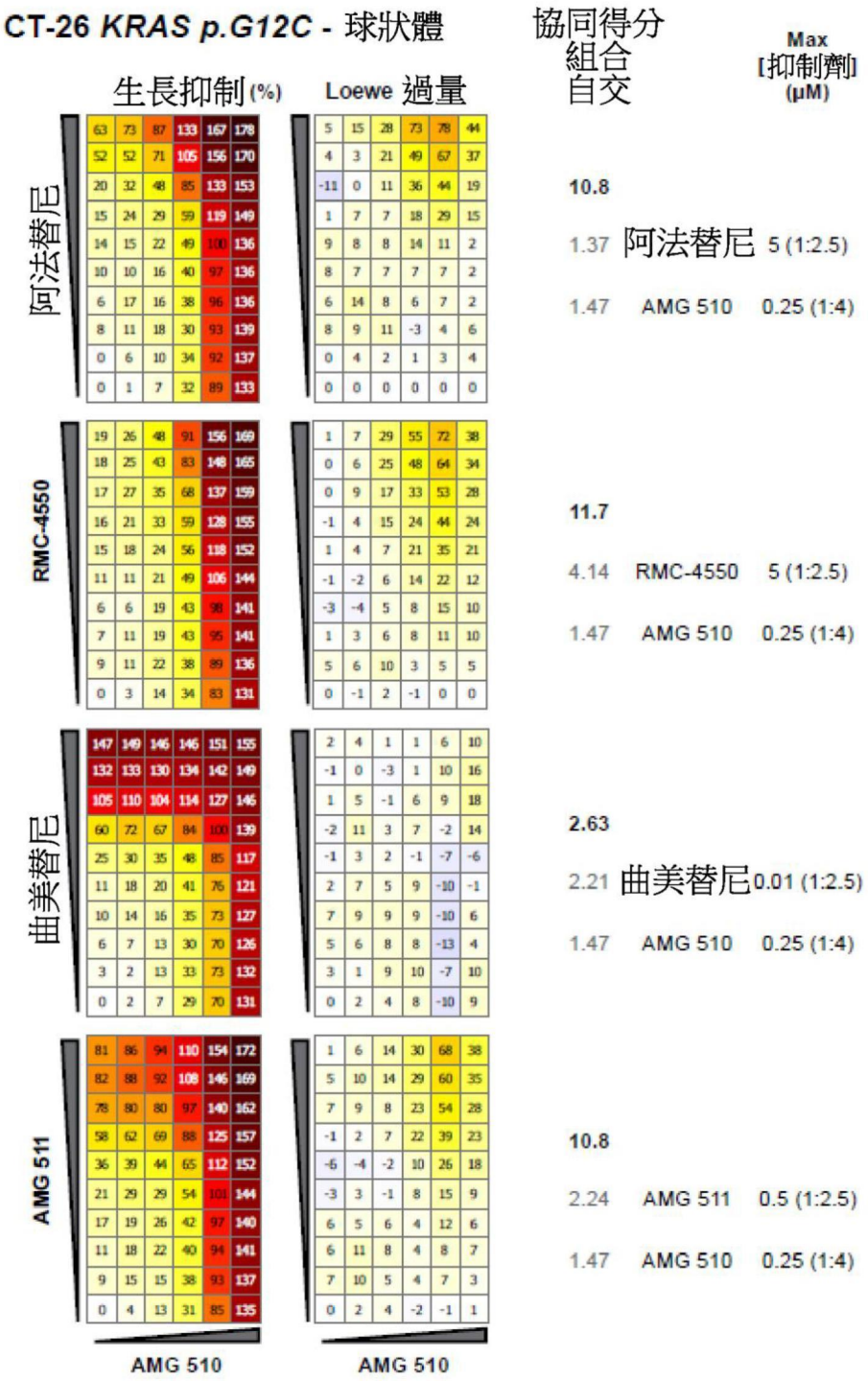

SW1573
生長抑制 (%)
Loewe 過量
協同得分
組合
自交
Max
[抑制劑]
(μM)
RMC-4550
2.15
0.107 RMC-4550 10 (1:3)
0.140 AMG 510 10 (1:3)
曲美替尼
0.817
0.141 曲美替尼 0.5 (1:2)
0.140 AMG 510 10 (1:3)
AMG 511
3.87
0.782 AMG 511 3 (1:3)
0.140 AMG 510 10 (1:3)
AMG 510
AMG 510
AMG 511
3.02
0.782 AMG 511 3 (1:3)
0.141 曲美替尼 0.5 (1:2)
曲美替尼
曲美替尼

【圖 48續】

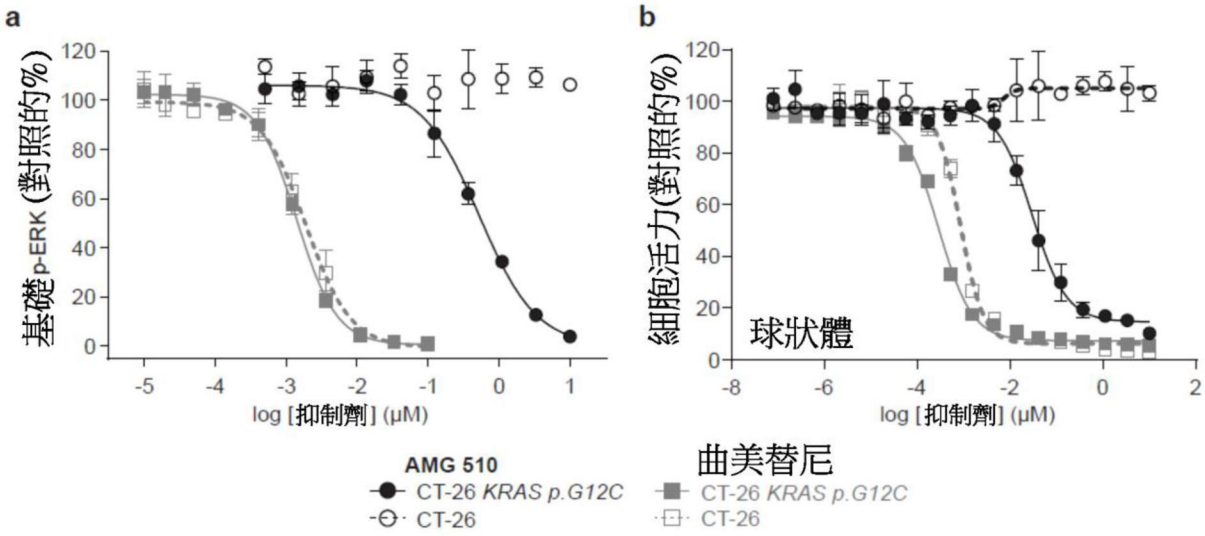

MIA PaCa-2 - 球狀體
協同得分
組合
自交
Max
[抑制劑]
(μM)
生長抑制 (%)
Loewe 過量
阿法替尼
曲美替尼
AMG 510
AMG 510
1.5
2.08 阿法替尼 2.5 (1:2)
1.33 AMG 510 0.05 (1:4)
8.31
4.14 曲美替尼 0.1 (1:3)
1.33 AMG 510 0.05 (1:4)


NCI-H1373 - 球狀體
協同得分
組合
自交
Max
[抑制劑]
(μM)
生長抑制 (%)
Loewe 過量
阿法替尼
曲美替尼
AMG 510
AMG 510
8.7
0.931 阿法替尼 2.5 (1:2)
1.24 AMG 510 0.05 (1:4)
11.8
3.76 曲美替尼 1 (1:3)
1.24 AMG 510 0.05 (1:4)

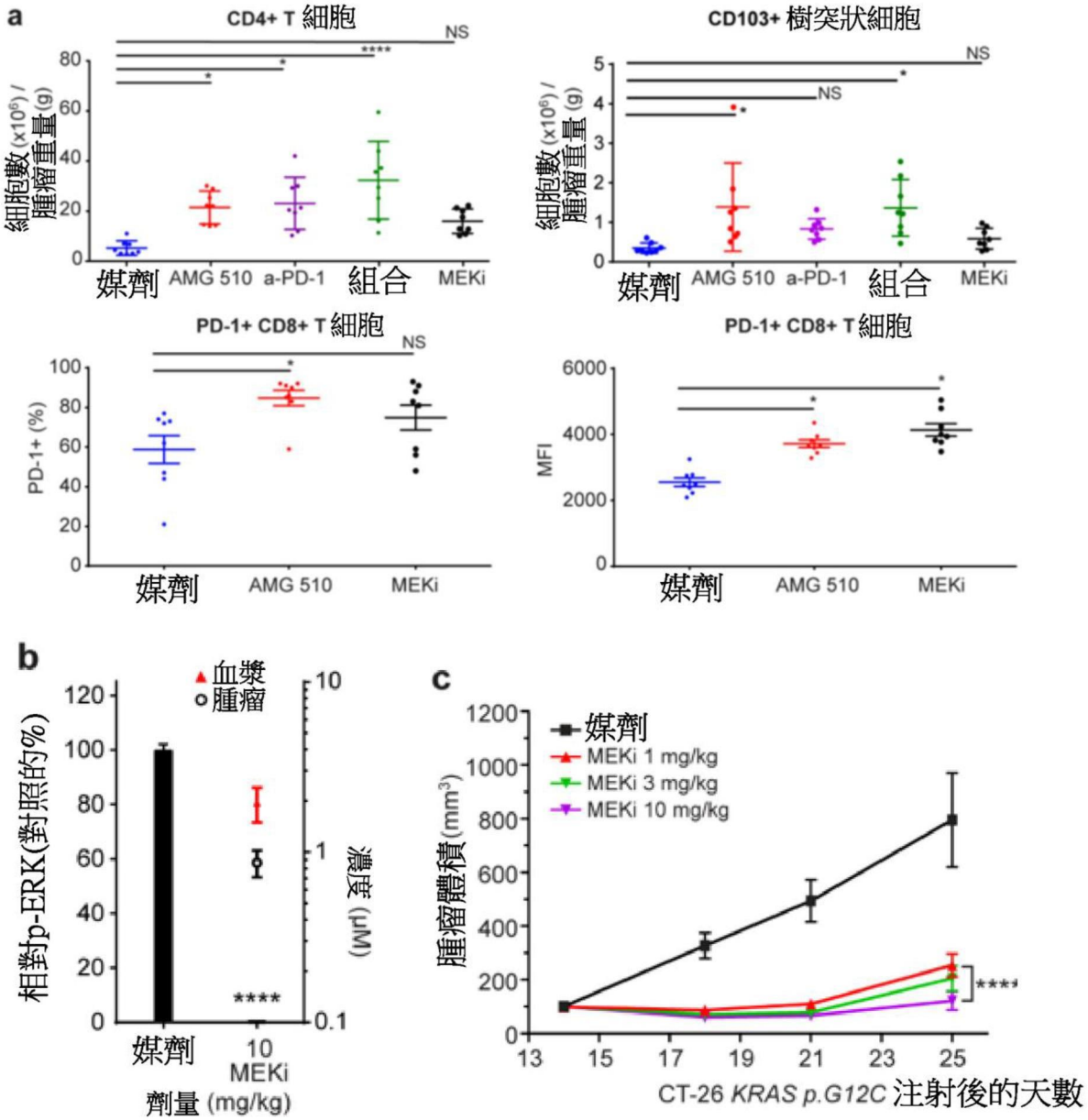
【圖 48續】


CT-26 KRAS p.G12C - 球狀體
生長抑制(%)
Loewe 過量
協同得分
組合
自交
Max
[抑制劑]
(μM)
阿法替尼
RMC-4550
曲美替尼
AMG 511
AMG 510
AMG 510
10.8
1.37 阿法替尼 5 (1:2.5)
1.47 AMG 510 0.25 (1:4)
11.7
4.14 RMC-4550 5 (1:2.5)
1.47 AMG 510 0.25 (1:4)
2.63
2.21 曲美替尼 0.01 (1:2.5)
1.47 AMG 510 0.25 (1:4)
10.8
2.24 AMG 511 0.5 (1:2.5)
1.47 AMG 510 0.25 (1:4)

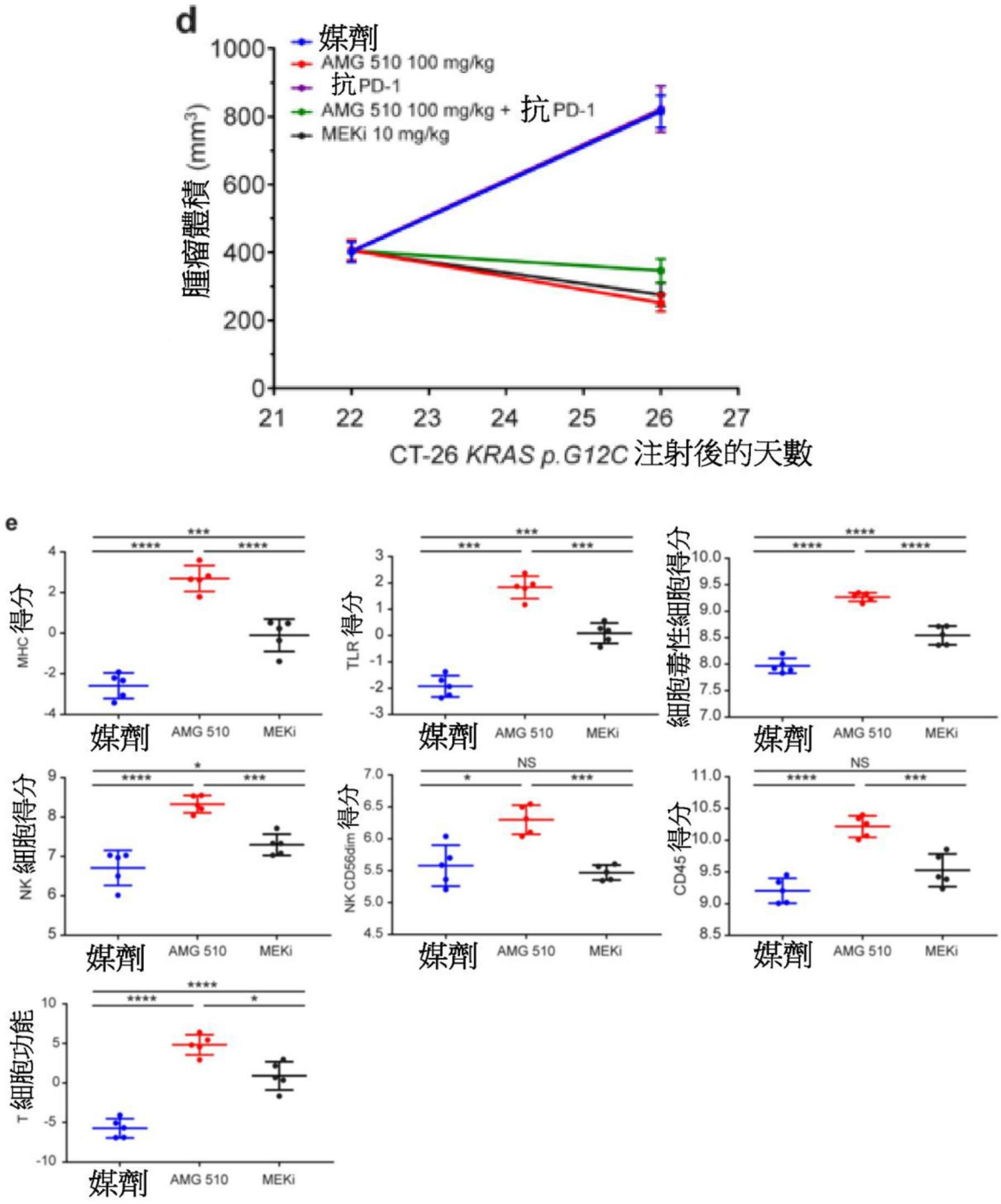
【圖 48續】


a
基礎p-ERK (對照的%)
120
100
80
60
40
20
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
log [抑制劑] (μM)
AMG 510
CT-26 KRAS p.G12C
CT-26
b
細胞活力(對照的%)
球狀體
-8
-6
-4
-2
0
2
log [抑制劑] (μM)
曲美替尼
CT-26 KRAS p.G12C
CT-26

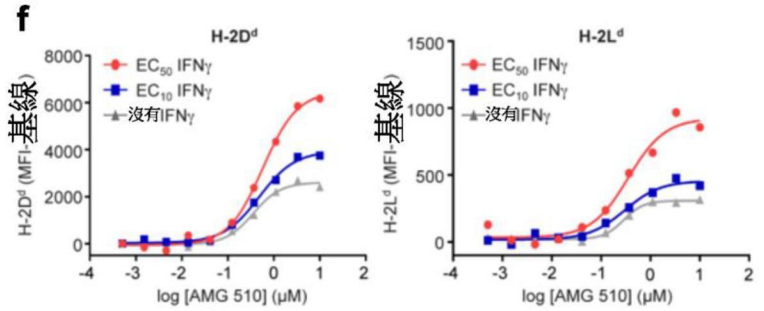
【圖 49】


a
CD4+ T 細胞
細胞數 (x10⁶) / 腫瘤重量 (g)
媒劑
AMG 510
a-PD-1
組合
MEKi
CD103+ 樹突狀細胞
PD-1+ CD8+ T 細胞
PD-1+ (%)
MFI
b
血漿
腫瘤
相對p-ERK(對照的%)
濃度 (μM)
劑量 (mg/kg)
c
媒劑
MEKi 1 mg/kg
MEKi 3 mg/kg
MEKi 10 mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
CT-26 KRAS p.G12C 注射後的天數

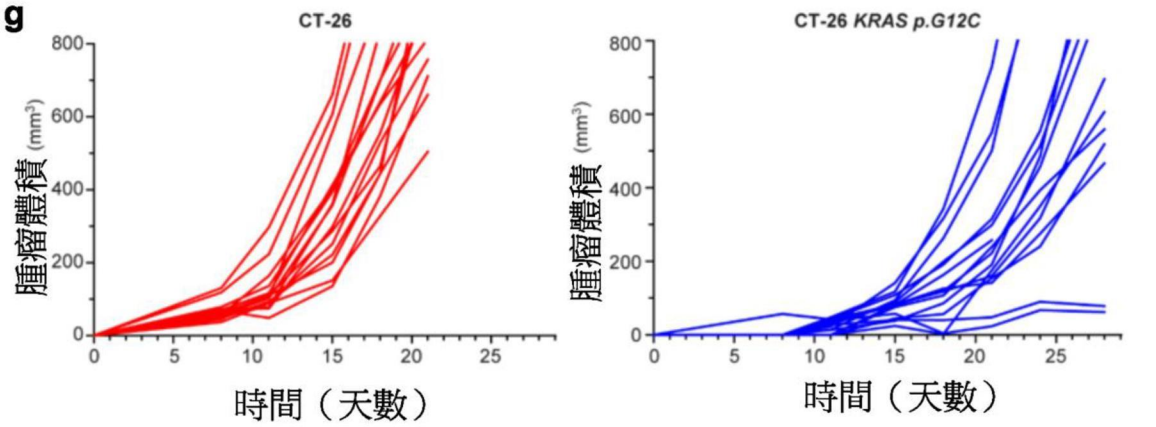
【圖 50】

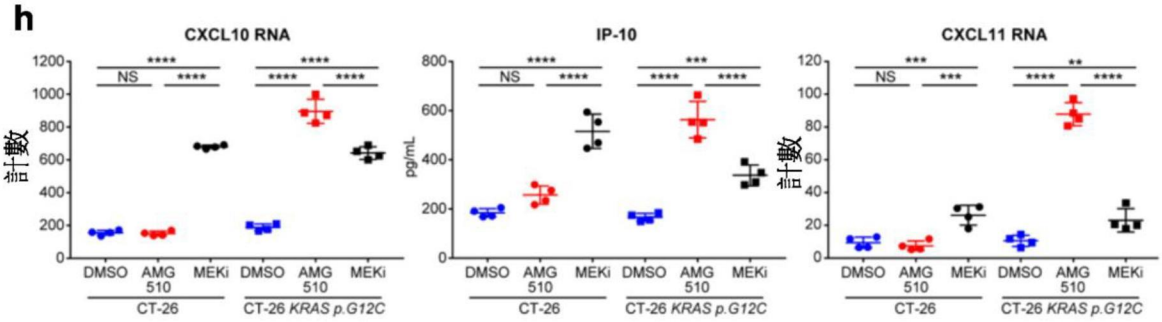

d
媒劑
AMG 510 100 mg/kg
抗PD-1
AMG 510 100 mg/kg + 抗PD-1
MEKi 10 mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
CT-26 KRAS p.G12C 注射後的天數
e
MHC 得分
TLR 得分
細胞毒性細胞得分
NK 細胞得分
NK CD56dim 得分
CD45 得分
T 細胞功能
媒劑
AMG 510
MEKi
NS

【圖 50】(續)

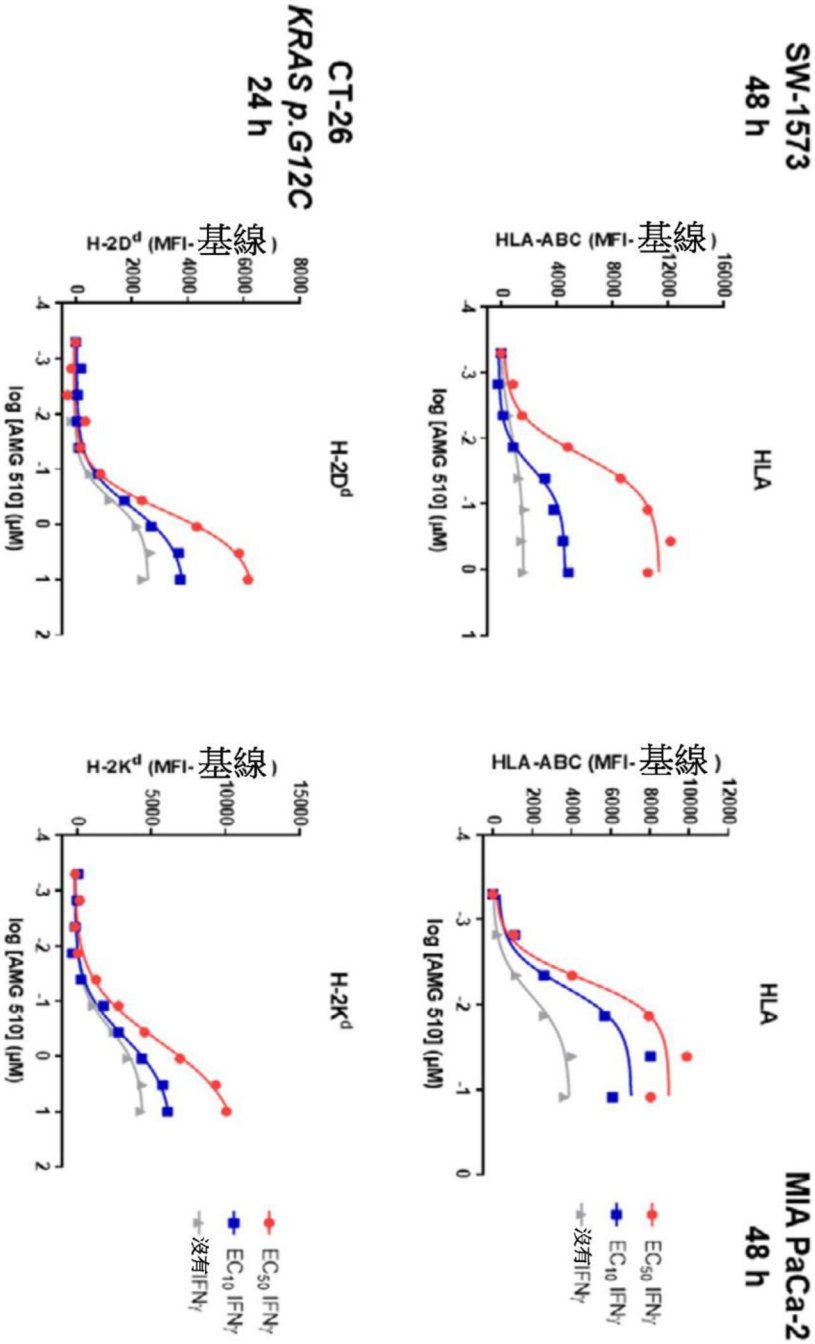


	AMG 510 EC$_{50}$ (μM)		
	沒有IFNγ	EC$_{10}$ IFNγ	EC$_{50}$ IFNγ
H-2D^d	0.356	0.484	0.577
H-2K^d	0.315	0.441	0.534
H-2L^d	0.288	0.301	0.356





【圖 50續】


i
SW-1573
48 h
HLA
HLA-ABC (MFI-基線)
log [AMG 510] (μM)
CT-26
KRAS p.G12C
24 h
H-2D^d
H-2D^d (MFI-基線)
log [AMG 510] (μM)
MIA PaCa-2
48 h
HLA
HLA-ABC (MFI-基線)
log [AMG 510] (μM)
H-2K^d
H-2K^d (MFI-基線)
log [AMG 510] (μM)
EC50 IFNγ
EC10 IFNγ
沒有IFNγ

【圖 50續】