



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110433165 A

(43)申请公布日 2019.11.12

(21)申请号 201910098566.5

A61K 31/166(2006.01)

(22)申请日 2012.03.30

A61P 35/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/471,038 2011.04.01 US

(62)分案原申请数据

201280027030.0 2012.03.30

(71)申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 B.李 K.林 M.南尼尼 E.彭努斯

D.桑帕思

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 陈桉

(51)Int.Cl.

A61K 31/517(2006.01)

A61K 31/4523(2006.01)

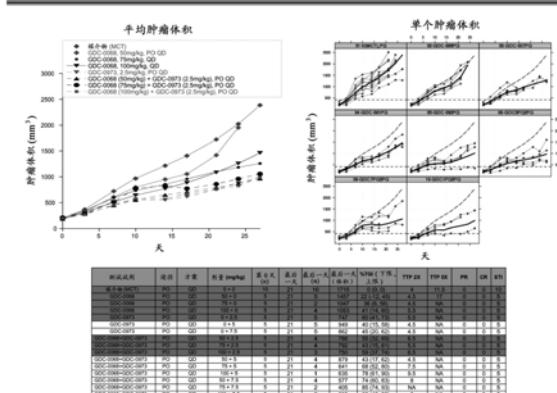
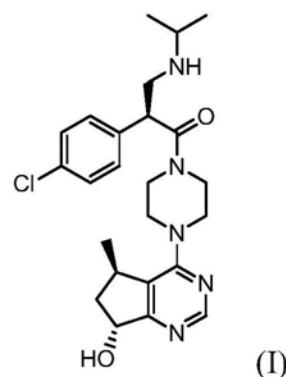
权利要求书2页 说明书29页 附图32页

(54)发明名称

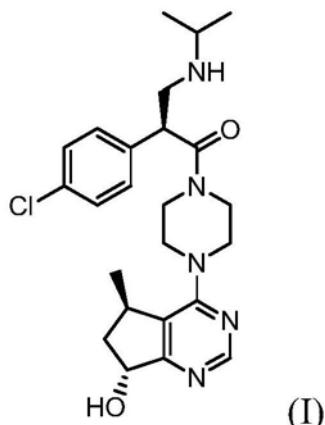
AKT和MEK抑制剂化合物的组合及其使用方法

(57)摘要

本发明提供了组合，其包含a)式I的化合物或者其药用盐；以及选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的另外的药物。所述组合具体用于治疗过度增殖性疾病诸如癌症。



1. 组合, 所述组合为式I的化合物或者其药用盐以及选自GDC-0973、PD-0325901或者它们的药用盐的药物的组合, 所述式I的化合物为:



所述组合用于预防性或者治疗性处置过度增殖性疾病。

2. 权利要求1的组合, 其中所述过度增殖性疾病为癌症。
3. 权利要求2的组合, 其中所述癌症与PTEN突变相关。
4. 权利要求2的组合, 其中所述癌症与AKT突变、过表达或者扩增相关。
5. 权利要求2的组合, 其中所述癌症与PI3K突变相关。
6. 权利要求2的组合, 其中所述癌症与Her2/ErbB2扩增相关。
7. 权利要求2-6中任一项的组合, 其中癌症选自间皮瘤、子宫内膜癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、黑色素瘤、胃癌、结肠癌、肾癌、头颈癌和胶质瘤。
8. 权利要求1-7中任一项的组合, 其中给予式I的化合物或者其药用盐与GDC-0973的组合。
9. 权利要求1-7中任一项的组合, 其中给予式I的化合物或者其药用盐与PD-0325901的组合。
10. 权利要求1-9中任一项的组合, 其中同时给予式I的化合物或者其盐与所述一种或者多种药物。
11. 权利要求1-9中任一项的组合, 其中先后给予式I的化合物或者其盐以及所述一种或者多种药物。
12. 权利要求1-9中任一项的组合, 其中在给予所述组合之前约1至约10天开始给予所述一种或者多种药物。
13. 权利要求1-9中任一项的组合, 其中在给予所述组合之前约1至约10天开始给予式I的化合物或者其盐。
14. 权利要求1-9中任一项的组合, 其中在同一天开始给予式I的化合物或者其盐且给予所述一种或者多种药物。
15. 权利要求1-7中任一项的组合, 其中给予式I的化合物或者其药用盐与GDC-0973的组合, 且所述癌症为胰腺癌。
16. 权利要求1-7中任一项的组合, 其中给予式I的化合物或者其药用盐与GDC-0973的组合, 且所述癌症为非小细胞肺癌。
17. 权利要求1-7中任一项的组合, 其中给予式I的化合物或者其药用盐与GDC-0973的

组合,且所述癌症为乳腺癌。

18. 权利要求1-7中任一项的组合,其中给予式I的化合物或者其药用盐与GDC-0973的组合,且所述癌症为结肠癌。

19. 权利要求1-7中任一项的组合,其中给予式I的化合物或者其药用盐与GDC-0973的组合,且所述癌症为黑色素瘤。

20. 式I的化合物或者其药用盐,用于与选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的药物一起改善针对过度增殖性疾病治疗的患者的生活质量的治疗用途。

21. 组合,其为a) 式I的化合物或者其药用盐;以及b) 选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的一种或者多种药物的组合,所述组合用于治疗过度增殖性疾病。

22. 组合,其为a) 式I的化合物或者其药用盐;以及b) 选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的一种或者多种药物的组合,所述组合用于治疗由AKT激酶调节的疾病或者病症。

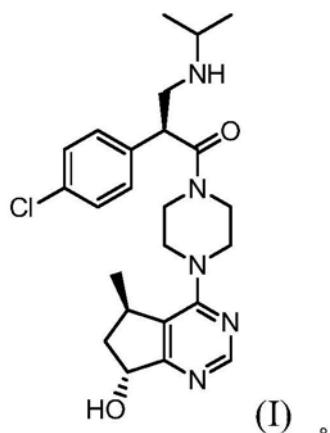
23. 式I的化合物或者其药用盐以及GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的组合在制备用于治疗哺乳动物中过度增殖性疾病的药物中的用途。

24. 式I的化合物或者其药用盐以及GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的组合在制备用于治疗哺乳动物中由AKT激酶调节的疾病或者病症的药物中的用途。

25. 试剂盒,包括式I的化合物或者其药用盐、容器以及包装说明书或者标签,所述包装说明书或者标签指明给予用于治疗过度增殖性疾病的式I的化合物与选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的一种或者多种药物。

26. 产品,包含具有式I的化合物或者其药用盐以及选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的一种或者多种药物;所述产品作为用于在治疗过度增殖性疾病中分开、同时或者先后使用的组合制品。

27. 用于治疗哺乳动物中过度增殖性疾病的方法,包括向所述哺乳动物给予组合,所述组合为式I的化合物或者其药用盐与选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的另外的药物的组合,所述式I的化合物为:



28. 用于治疗哺乳动物中由AKT激酶调节的疾病或者病症的方法,包括向所述哺乳动物给予a) 式I的化合物或者其药用盐;以及b) 选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的一种或者多种药物。

AKT和MEK抑制剂化合物的组合及其使用方法

[0001] 本申请是中国申请号为201280027030.0、发明名称为“AKT和MEK抑制剂化合物的组合及其使用方法”且申请日为2012年3月30日的专利申请（PCT申请号为PCT/US2012/031716）的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年4月1日提交的美国临时申请61/471,038的优先权。将该临时申请的全部内容通过引用的方式并入本申请。

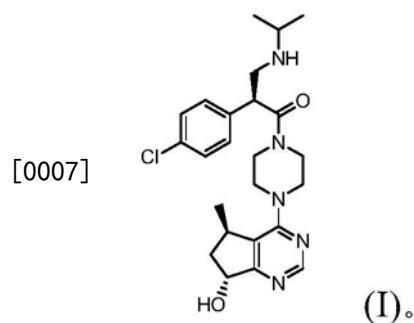
技术领域

[0004] 本发明大体上涉及具有抗过度增殖性疾病诸如癌症的活性的化合物的药物组合且其包括抑制AKT激酶活性的化合物。本发明还涉及使用所述组合用于体外、原位和体内诊断或者治疗哺乳动物细胞或者相关病理学病症的方法。

背景技术

[0005] 蛋白激酶（PK）是通过转移ATP上的末端（ γ ）磷酸酯，催化蛋白的酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基上羟基的磷酸化的酶。通过信号转导途径，这些酶调节细胞生长、分化和增殖，即细胞周期的几乎所有方面均取决于PK活性（Hardie, G. 和 Hanks, S. (1995) *The Protein Kinase Facts Book. I and II*, Academic Press, San Diego, CA）。此外，异常PK活性已经涉及许多病症，范围从相对无生命危险的疾病例如牛皮癣至极其致命的疾病例如恶性胶质瘤（脑癌）。蛋白激酶是治疗调节的重要靶向类别（Cohen, P. (2002) *Nature Rev. Drug Discovery* 1:309）。

[0006] 国际专利申请公开WO 2008/006040讨论了众多AKT抑制剂，包括化合物(S)-2-(4-氯苯基)-1-(4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-(异丙基氨基)丙-1-酮（式I）：



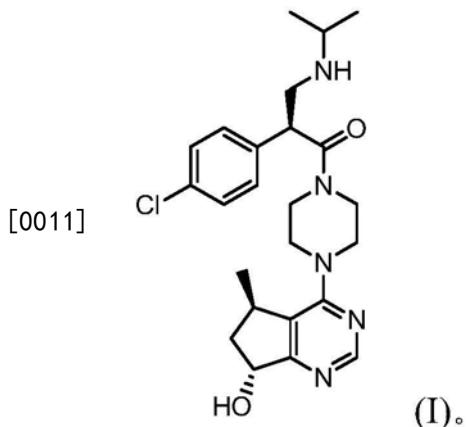
[0008] 目前，仍然存在对于可用于治疗过度增殖性疾病诸如癌症的改善的方法和组合物的需求。

发明内容

[0009] 已经确定体外和体内抑制癌细胞生长的累加效应或者协同效应可通过给予式I的化合物或者其药用盐与某些其它特定药物的组合来实现。所述组合和方法可用于治疗过度

增殖性疾病诸如癌症。

[0010] 因此,本发明的某些实施方案提供了用于治疗哺乳动物中过度增殖性疾病的方法,包括向所述哺乳动物给予组合,所述组合为式I的化合物或者其药用盐以及选自GDC-0973、PD-0325901或者其药用盐的另外的药物的组合,所述式I的化合物为:



[0012] 在某些实施方案中,所述过度增殖性疾病为癌症。

[0013] 在某些实施方案中,所述癌症与PTEN突变相关。

[0014] 在某些实施方案中,所述癌症与AKT突变、过表达或者扩增相关。

[0015] 在某些实施方案中,所述癌症与PI3K突变相关。

[0016] 在某些实施方案中,所述癌症与Her2/ErbB2扩增相关。

[0017] 在某些实施方案中,所述癌症选自间皮瘤、子宫内膜癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、黑色素瘤、胃癌、结肠癌、肾癌、头颈癌和胶质瘤。

[0018] 在某些实施方案中,给予式I的化合物或者其药用盐与GDC-0973或者其药用盐的组合。

[0019] 在某些实施方案中,给予式I的化合物或者其药用盐与PD-0325901或者其药用盐的组合。

[0020] 在某些实施方案中,同时给予式I的化合物或者其盐与所述一种或者多种药物的组合。

[0021] 在某些实施方案中,先后给予式I的化合物或者其盐以及所述一种或者多种药物。

[0022] 在某些实施方案中,在给予所述组合之前约1至约10天开始给予所述一种或者多种药物。

[0023] 在某些实施方案中,在给予所述组合之前约1至约10天开始给予式I 的化合物或者其盐。

[0024] 在某些实施方案中,在同一天开始给予式I的化合物或者其盐且给予所述一种或者多种药物。

[0025] 本发明的某些实施方案提供了式I的化合物或者其药用盐,其用于与选自GDC-0973和PD-0325901的药物一起改善针对过度增殖性疾病治疗的患者的生活质量的治疗用途。

[0026] 本发明的某些实施方案提供了用于治疗哺乳动物中由AKT激酶调节的疾病或者病症的方法,包括向所述哺乳动物给予a) 式I的化合物或者其药用盐;以及b) 选自GDC-0973和PD-0325901的一种或者多种药物。

[0027] 本发明的某些实施方案提供了a) 式I的化合物或者其药用盐;以及b) 选自GDC-0973和PD-0325901的一种或者多种药物的组合,其用于治疗过度增殖性疾病。

[0028] 本发明的某些实施方案提供了a) 式I的化合物或者其药用盐;以及b) 选自GDC-0973和PD-0325901的一种或者多种药物的组合,其用于治疗由 AKT激酶调节的疾病或者病症。

[0029] 本发明的某些实施方案提供了式I的化合物或者其药用盐以及 GDC-0973和PD-0325901的组合在制备用于治疗哺乳动物中过度增殖性疾病的药物中的用途。

[0030] 本发明的某些实施方案提供了式I的化合物或者其药用盐以及 GDC-0973和PD-0325901的组合在制备用于治疗哺乳动物中由AKT激酶调节的疾病或者病症的药物中的用途。

[0031] 本发明的某些实施方案提供了用于治疗过度增殖性疾病的试剂盒,其包括式I的化合物或者其药用盐、容器以及指明给予式I的化合物与选自 GDC-0973和PD-0325901的一种或者多种药物的包装说明书或者标签。

[0032] 本发明的某些实施方案提供了产品,包含具有式I的化合物或者其药用盐以及选自GDC-0973和PD-0325901的一种或者多种药物;所述产品作为用于在治疗过度增殖性疾病中分开、同时或者先后使用的组合制品。

[0033] 当体外在许多细胞类型包括黑色素瘤、肺癌、结肠癌、卵巢癌、肾癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌细胞系中给予GDC-0068和GDC-0973的组合时观察到协同/累加效应,且这些发现已经在体内黑色素瘤、结肠癌和肺癌异种移植物模型中得到证实。在由Ras/Raf或者两种途径活化所驱动的肿瘤类型中观察到协同效应。当在多种细胞中给予GDC-0068和GDC-0973的组合时,在黑色素瘤、肺癌(例如NSCLC) 和结肠癌细胞系中显示协同效应。当给予GDC-0068和GDC-0973的组合时,乳腺癌细胞(包括细胞腔(ER+)、Her2+ 和基底三倍体阴性乳腺癌(basal triple negative breast cancers))也可显示协同效应。当给予GDC-0068和GDC-0973的组合时,即使在对单独的Mek1敏感的细胞中也观察到协同效应。

[0034] 已经发现癌细胞的突变状态为所述癌细胞如何对不同的治疗方案响应的生物标记。例如,具有PI3K途径(例如PI3K或者AKT) 突变与Kras和/或者Braf突变的组合的癌细胞可显示对本申请所述的组合治疗的阳性(例如协同效应) 响应。此外,癌细胞的PTEN状态也是生物标记。因此,本发明的某些实施方案包括使用这些组合疗法来治疗具有这些生物标记的组合的癌细胞(体外或者体内) 的方法。本发明的某些实施方案包括选择具有这些生物标记的组合的用于组合治疗的患者。

[0035] 在A2058 (PTEN无/Braf突变体) 黑色素瘤模型中观察到GDC-0068和 GDC-0973组合的强的协同效应。在GDC-0973的所有剂量以及GDC-0068 的较高剂量(75和100mg/kg) 观察到相当的单一药物肿瘤生长抑制(TGI)。在 50mg/kg的GDC-0068未观察到TGI。两种药物的组合在该模型中良好耐受,其中最大重量损失为~13%。

[0036] 除了针对给定的过度增殖性疾病提供改善的治疗之外,本发明的某些组合的给予可改善患者的生活质量(相比于接受不同治疗的相同患者所经历的生活质量)。例如,向患者给予式I的化合物或者其药用盐以及本申请所述的药物的组合可提供改善的生活质量(相比于相同患者将经历的生活质量,条件是所述患者仅接受作为治疗的化学治疗剂)。例如,使用本申请所述的组合的组合疗法可降低所需的治疗剂的剂量,由此减弱与高剂量化

学治疗剂相关的副作用(例如恶心、呕吐、毛发脱落、皮疹、食欲下降、体重减轻等)。所述组合也可引起降低的肿瘤负担以及相关的不良事件,诸如疼痛、器官功能障碍、体重减轻等。因此,本发明的一个方面提供了式I的化合物或者其药用盐,其用于与本申请所述的药物一起改善针对过度增殖性疾病治疗的患者的生活质量的治疗用途。

附图说明

- [0037] 图1示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合(2.5mg/kg)对肿瘤体积的结果。
- [0038] 图2示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合(5.0mg/kg)对肿瘤体积的结果。
- [0039] 图3示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合(7.5mg/kg)对肿瘤体积的结果。
- [0040] 图4示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对体外结肠直肠癌细胞系的结果。
- [0041] 图5示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对HCT-116(结肠癌-PI3K和Kras突变体)的结果,即HCT-116(结肠-PI3K和Kras突变)的Mek和Akt体外组合的结果。显示了二维(2D)热图(heatmap),其显示了对HCT-116细胞的细胞存活的组合效应。在x轴显示了增加浓度的GDC-0068且在y-轴显示了增加浓度的GDC-0973。在右侧显示了抑制百分数(%抑制)热图,其指明在组合中或者作为单一药物的每个浓度的GDC-0068和GDC-0973的抑制百分数;暴露于媒介物(DMSO)的对照设置为0。针对在左侧显示的每个剂量对和热图来计算BLISS评分。
- [0042] 图6示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对体外NSCLC细胞系的结果。
- [0043] 图7示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对H2122(NSCLC-Kras突变体)的结果,即。二维(2D)热图显示出对NCI-H2122细胞的细胞存活的组合效应,即H2111(NSCLC-Kras突变)的Mek和Akt体外组合的结果。在x-轴显示了增加浓度的GDC-0068且在y-轴显示了增加浓度的GDC-0973。在右侧显示了抑制百分数(%抑制)热图,其指明在组合中或者作为单一药物的每个浓度的GDC-0068和GDC-0973的抑制百分数;暴露于媒介物(DMSO)的对照设置为0。针对在左侧显示的每个剂量对和热图来计算BLISS评分。
- [0044] 图8示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对体外黑色素瘤细胞系的结果。
- [0045] 图9示例说明了单一药物以及GDC-0068和GDC-0973的组合对A2058(黑色素瘤-PTEN-/-和Braf突变体)的结果,即A2058(黑色素瘤-PTEN-/-和Braf突变)的Mek和Akt的体外组合最小体外单一药物活性的结果。显示了二维(2D)热图,其显示出对A2058细胞的细胞存活的组合效应。针对在左侧显示的每个剂量对和热图来计算BLISS评分。在x-轴显示了增加浓度的GDC-0068且在y-轴显示了增加浓度的GDC-0973。在右侧显示了抑制百分数(%抑制)热图,其指明在组合中或者作为单一药物的每个浓度的GDC-0068和GDC-0973的抑制百分数;暴露于媒介物(DMSO)的对照设置为0。
- [0046] 图10示例说明了相比于单一药物而言的AKT和MEK途径活性的增强的击倒效应(knockdown)。
- [0047] 图11示例说明了GDC-0973和GDC-0068的组合对MDA-MB-468乳腺癌细胞系的结果。
- [0048] 图12示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对体外乳腺癌细胞系的结果。
- [0049] 图13示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对卵巢癌的结果。
- [0050] 图14示例说明了GDC-0068和GDC-0973的组合对体外前列腺癌细胞系的结果。
- [0051] 图15示例说明了口服给药的GDC-0068+GDC-0973(MEK抑制剂)的组合在MX-1乳腺

肿瘤中的结果。

[0052] 图16示例说明了口服给药的GDC-0068+GDC-0973 (MEK抑制剂) 的组合在H2122 NSCLC肿瘤中的结果。

[0053] 图17示例说明了口服给药的GDC-0068+GDC-0973 (MEK抑制剂) 的组合在SW1990胰腺肿瘤中的结果。

[0054] 图18示例说明了口服给药的GDC-0068+GDC-0973 (MEK抑制剂) 的组合在Pa_Tu-8902胰腺肿瘤中的结果。

[0055] 图19示例说明了口服给药的GDC-0068+GDC-0973 (MEK抑制剂) 的组合在537Me1黑色素瘤中的结果。

[0056] 图20示例说明了口服给药的GDC-0068+GDC-0973 (MEK抑制剂) 的组合在A2058黑色素瘤中的结果。

[0057] 图21示例说明了口服给药的GDC-0068+GDC-0973 (MEK抑制剂) 的组合在HCT-116结肠直肠肿瘤中的结果。

[0058] 图22a-22b显示了比较单一药物和组合疗法对各种细胞系的细胞存活的抑制的结果。GDC-0068细胞效能与由PI3K/PTEN/HER2的变更导致的 Akt活化相关联,而GDC-0973细胞效能与由RAS或者B-RAF突变导致的 MEK活化相关联。GDC-0068-和GDC-0973-敏感性细胞系通常是互相排斥的。约三分之一的测试的细胞系显示出对两种药物的抗性(参见图22a-22b)。在大多数测试的细胞系中,相比于单独使用的单一药物,GDC-0068和 GDC-0973的组合导致对细胞存活的增强的抑制。使用BLISS非依赖性模型评价组合效应(Lehár et al. 2007)。

[0059] 图22a上图示例说明了在多重癌细胞系中对于GDC-0068和GDC-0973 的单一药物 IC50。将细胞用增加浓度的GDC-0068或者GDC-0973或者与 RPMI+10%FBS的组合处理并在4天后针对存活率使用CellTiter-Glo进行测定。相应的下图示例说明了针对若干特异性基因型的GDC-0068和 GDC-0973组合的协同效应。着色的模块表示突变、缺失或者活化。B-RAF、RAS、HER2、PI3K或者PTEN的突变/变更在每种细胞系下由着色方块表示(B-RAF, 棕色; RAS, 红色; HER2, 蓝色; PTEN, 深绿色; 对于PI3K, 浅绿色表示PIK3CA的激酶域突变, 浅蓝色表示非激酶域的突变或者扩增)。PTEN变更表示对于该蛋白由蛋白质斑迹法所不能检测到的信号或者基因突变。对于每种细胞系的组织来源也用不同的颜色和字母来表示,即乳腺癌(Br)、结肠癌(Co)、非小细胞肺癌(Lu)、黑色素瘤(Me)、卵巢癌(Ov)、前列腺癌(Pr) 和肾癌(Re)。

[0060] 图22b示例说明了对于GDC-0068和GDC-0973在多重细胞系中的总体阳性组合 Bliss评分。在多重细胞系中观察到协同效应,其由总体阳性BLISS 评分表示,特别是在具有RAS/RAF途径活化的细胞系或者在具有PI3K/Akt 和RAS/RAF途径活化的细胞系中。

[0061] 总体阳性BLISS评分由在每种细胞系中的GDC-0068和GDC-0973的组合计算。

[0062] 图23示例说明了对于GDC-0068和GDC-0973在537MEL黑色素瘤 (PTEN无、Braf amp/del) 中的Bliss热图和%抑制;GDC-0068和GDC-0973 的组合抑制两种途径且增加细胞死亡。

[0063] 图24示例说明了对于用GDC-0068和GDC-0973细胞系处理24小时的人HTC116结肠癌细胞系的蛋白质斑迹分析。将HCT-116细胞与特定浓度的GDC-0068和GDC-0973培养约3小时。Akt、MEK以及它们的下游标记的磷酸化由蛋白质斑迹法进行分析。

[0064] 图25示例说明了GDC-0068和GDC-0973组合增加了在537MEL黑色素瘤(PTEN无、Braf amp/del)中的效应。

[0065] 图26示例说明了相对于媒介物对照而言,对于GDC-0068和GDC-0973 组合的磷蛋白表达水平的显著变化。在对小鼠给予单一剂量的GDC-0068 (100mg/kg) 或者GDC-0973 (7.5mg/kg) 或者组合后3小时收集A2058x1肿瘤。使用反相蛋白阵列(RPPA) 分析肿瘤。

[0066] 图27示例说明了在A2058异种移植植物肿瘤中在给药后,相对于单一药物而言,对于GDC-0068和GDC-0973组合的磷蛋白表达水平的显著变化。

[0067] 图28示例说明了二维(2D)热图,其显示出对MALME3M细胞的细胞存活的组合效应。在x-轴显示了增加浓度的GDC-0068且在y-轴显示了增加浓度的GDC-0973。抑制百分数(%抑制)热图显示出在组合中或者作为单一药物的每个浓度的GDC-0068和GDC-0973的抑制百分数;暴露于媒介物(DMSO)的对照设置为0。

[0068] 图29示例说明了二维(2D)热图,其显示出对MALME3细胞的细胞存活的组合效应。在x-轴显示了增加浓度的GDC-0068且在y-轴显示了增加浓度的GDC-0973。抑制百分数(%抑制)热图显示出在组合中或者作为单一药物的每个浓度的GDC-0068和GDC-0973的抑制百分数;暴露于媒介物(DMSO)的对照设置为0。针对在右侧显示的每个剂量对和热图来计算BLISS评分。

[0069] 图30示例说明了二维(2D)热图,其显示出对NCI-BL2122细胞的细胞存活的组合效应。在x-轴显示了增加浓度的GDC-0068且在y-轴显示了增加浓度的GDC-0973。抑制百分数(%抑制)热图显示出在组合中或者作为单一药物的每个浓度的GDC-0068和GDC-0973的抑制百分数;暴露于媒介物(DMSO)的对照设置为0。针对在右侧显示的每个剂量对和热图来计算 BLISS评分。

[0070] 图31显示了磷蛋白表达水平的变化(24小时)以及使用GDC-0068和 GDC-0973的组合调节AKT和MEK途径。在对小鼠给予单一剂量的 GDC-0068 (100mg/kg) 或者GDC-0973 (7.5mg/kg) 或者组合后24小时收集 A2058x1肿瘤。使用反相蛋白阵列(RPPA) 分析肿瘤。

具体实施方式

[0071] 在本说明书和权利要求中使用的词语“包含/包括(comprise、comprising、include、including和includes)”意在具体说明所述特征、整体、组分或者步骤的存在,但它们不排除存在或者添加一种或者多种其它特征、整体、组分、步骤或者它们的组合。

[0072] 术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”是指治疗性处置和预防性措施,其中目的是预防或减缓(减轻)不期望的生理学变化或障碍如癌的生长、发展或扩散。出于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于缓解症状、减小病变程度、稳定(即不是恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态以及好转(部分好转或完全好转),无论这些结果是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可表示与未接受治疗的预期存活相比延长的存活。需要治疗的对象包括已经患有病症或障碍的对象以及易患所述病症或障碍的对象或所述病症或障碍应该被预防的对象。

[0073] 短语“治疗有效量”表示(i)治疗或预防本申请描述的具体疾病、病症或障碍的本发明化合物的量,(ii)削弱、改善或消除本申请描述的具体疾病、病症或障碍的一种或多种症状的本发明化合物的量,或(iii)预防或延迟本申请描述的具体疾病、病症或障碍的一种

或多种症状的发作的本发明化合物的量。在癌症的情况下，治疗有效量的药物可降低癌细胞的数量；减小肿瘤尺寸；抑制(即在一定程度上减慢以及优选停止)癌细胞渗入周围器官中；在一定程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。如果药物可预防癌细胞的生长和/或杀死现存的癌细胞，其可能是细胞生长抑制性的(cytostatic)和/或细胞毒性的。对于癌症治疗而言，可例如通过评价疾病进展时间(TTP)和/或确定应答率(RR)来测量功效。

[0074] 术语“癌症(cancer)”和“癌的(cancerous)”是指或描述哺乳动物中特征典型为未调节的细胞生长的生理学情况。“肿瘤”包含一种或多种癌细胞。癌症的实例包括但不限于癌瘤(carcinoma)、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤以及白血病或淋巴样恶性肿瘤。所述癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、肺腺癌(adenocarcinoma of the lung)和肺鳞状细胞癌(squamous carcinoma of the lung)，腹膜癌，肝细胞癌，胃癌(gastric or stomach cancer)包括胃肠癌，胰腺癌，成胶质细胞瘤，子宫颈癌，卵巢癌，肝癌(liver cancer)，膀胱癌，肝细胞瘤(hematoma)，乳腺癌(breast cancer)，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾癌或肾脏癌，前列腺癌，外阴癌(vulval cancer)，甲状腺癌，肝脏癌(hepatic carcinoma)，肛门癌，阴茎癌，以及头颈癌。本申请使用的胃癌包括胃癌(stomach cancer)，其可在胃的任何部分发展且可扩散遍布胃部各处且扩散至其它器官；特别是食管、肺、淋巴结和肝。

[0075] “化学治疗剂”是用于治疗癌症(与作用机制无关)的生物学(大分子)或者化学(小分子)化合物。

[0076] “铂剂”为包括铂的化学治疗剂，例如卡铂、顺铂和奥沙利铂。

[0077] 术语“哺乳动物”包括但不限于人、小鼠、大鼠、豚鼠、猴、狗、猫、马、牛、猪、羊和家畜。术语患者是指哺乳动物，且在一个实施方案中，所述患者为人。

[0078] 使用的术语“包装说明书(package insert)”是指通常包括在治疗产品的市售包装中的说明书，其含有关于适应症、用法、剂量、给药、禁忌症和/或告诫事项的信息，这些信息涉及上述治疗产品的使用。

[0079] 本申请使用的短语“药用盐”是指本发明化合物的药用有机或者无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、糖二酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐(methanesulfonate)“甲磺酸盐(mesylate)”、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即，1,1'-亚甲基-2-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。药用盐可涉及到包含另一个分子，诸如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它抗衡离子。抗衡离子可为稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分(moiety)。而且，药用盐可在它的结构中具有超过一个带电原子。多个带电原子的情况是药用盐的部分可具有多个抗衡离子。因此，药用盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0080] 预期的药用盐可通过本领域可用的任何适当方法来制备。例如，将游离碱用无机酸或者有机酸处理，所述无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等，所述有机酸诸如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、羟乙酸、水杨酸、吡喃糖

基酸(pyranosidyl acid)如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸、 α -羟基酸如枸橼酸或酒石酸、氨基酸如天冬氨酸或谷氨酸、芳族酸如苯甲酸或肉桂酸、磺酸如对甲苯磺酸或乙磺酸等。通常认为适于由碱性药学化合物形成药用或者可接受的盐的酸讨论于例如P. Stahl et al, Camille G. (eds.) *Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use.* (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge et al, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1977) 66 (1) 1-19; P. Gould, *International J. of Pharmaceutics* (1986) 33: 201-217; Anderson et al, *The Practice of Medicinal Chemistry* (1996), Academic Press, New York; Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton PA; 和The Orange Book (Food&Drug Administration, Washington, D.C. on their website)。将这些公开通过引用的方式并入本申请。

[0081] 短语“药用”表示所述物质或者组合物必须在化学上和/或者毒理学上与其它成分包括制剂和/或者待治疗的哺乳动物相适应。

[0082] 本申请使用的“协同效应”是指相比于两个或者更多个单一药物的累加效应而言更有效的治疗组合。式I的化合物或者其药用盐以及GDC-0973和 PD-0325901中的一种之间的协同性相互作用可根据由本申请所述的测定所获得的结果来确定。这些测定的结果可使用Chou和Talalay组合方法以及使用CalcuSyn软件的剂量-效应分析来分析,以获得组合指数(Chou and Talalay, 1984, *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55)。已经在若干测定系统中评价了本申请提供的组合,且所述数据可采用用于定量抗癌剂之间的协同效应、累加效应以及拮抗作用的标准程序来分析。示例性实例描述于Chou and Talalay, in "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy," Academic Press, 1987, Chapter 2。组合指数小于0.8表示协同效应,所述值大于1.2表示拮抗作用且所述值位于0.8至1.2之间表示累加效应。所述组合疗法可提供“协同性”且证实了“协同效应”,即所述活性成分一起使用时所实现的效应大于由分开使用所述化合物所获得的效应的总和。协同效应可在如下条件下获得:(1) 当将所述活性成分在组合的单位剂量制剂中共同配制且同时给予或者递送时;(2) 当将所述活性成分作为分开的制剂交替递送或者平行递送时;或者(3) 当通过某种其它方案时。当以交替疗法递送时,协同效应可在例如通过分开的注射器进行不同的注射来先后给予或者递送所述化合物时获得。一般而言,在交替疗法过程中,先后即连续给予有效剂量的每种活性成分,而在组合疗法中,一起给予有效剂量的两种或者更多种活性成分。使用BLISS非依赖性模型以及最高单一药物(HSA)模型来评价组合效应(Lehár et al. 2007, *Molecular Systems Biology* 3:80)。BLISS评分对单一药物的增效程度进行定量且阳性BLISS评分(大于0)表明大于简单的累加。累积的阳性BLISS评分大于250被认为是在所测试的浓度范围内所观察到的强的协同效应。HAS 评分(大于0)表明组合效应大于在相应浓度的最大单一药物应答。

[0083] 一个方面包括在患有包括PI3K、AKT或者PTEN突变的癌症的患者中进行肿瘤生长抑制(TGI)的方法,且所述癌症在一个实例中进一步包括 RAS/RAF突变,所述方法包括向所述患者给予GDC-0068以及GDC-0973 和PD-0325901中的一个或者其药用盐。在某些实施方案中,所述组合为协同性的。在某些实施方案中,所述组合的TGI大于GDC-0068或者GDC-0973 和PD-0325901中的一个的单独的TGI。在某些实施方案中,所述组合的TGI 大于GDC-0068或者GDC-0973和PD-0325901中的一个的单独的TGI的约 10、15、20、25、30、35、40、45、

50、55、60、65、70或者75%。

[0084] 测量TGI的方法是本领域已知的。在一个示例性方法中,确定了平均肿瘤体积且在治疗前和治疗后的患者之间进行比较。肿瘤体积可以二维(长度和宽度)进行测量,其使用本领域的任何方法例如UltraCal IV测径器(Fred V.Fowler Company)或者经PET(正电子发射断层扫描术)或者某些其它方法。可使用公式:肿瘤体积(mm^3) = (长度 \times 宽度 2) \times 0.5。历时多个时间段测量肿瘤体积可使用混合建模的线性混合效应(LME)方法(Pinheiro et al. 2009)来完成。该方法可解决重复测量(以及多个患者)。三次回归样条可用于将非线性分布拟合为在每个剂量水平的肿瘤体积的时程。然后可将这些非线性分布与混合模型内的剂量相关联。作为媒介物百分数的肿瘤生长抑制可作为如下来计算:与媒介物相关的每天的拟合曲线下面积(AUC)百分数,其使用以下公式:

$$[0085] \% \text{ TGI} = 100 \left[1 - \left(\frac{\text{AUC}_{\text{治疗}} / \text{天}}{\text{AUC}_{\text{媒介物}} / \text{天}} \right) \right]$$

[0086] 使用该公式,100%的TGI值表示肿瘤停滞,大于约1%但小于约100%的TGI值表示肿瘤生长抑制,且大于约100%的TGI值表示肿瘤退行。

[0087] 式I的化合物的制备

[0088] 式I的化合物及其盐可如在国际专利申请公开WO 2008/006040中所述或者如在如下实施例1中所述来制备。在制备式I的化合物中,可能需要对中间体的远端官能团(例如伯胺或者仲胺等)进行保护。对于所述保护的需求将取决于所述远端官能团的性质以及制备方法的条件而变化。适当的氨基-保护基(NH-Pg)包括乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、苄基氧基羰基(CBz)和9-芴基亚甲基氧基羰基(Fmoc)。对于所述保护的需求可由本领域技术人员容易地确定。对于保护基团以及它们的用途的一般性描述,参见T.W.Greene,Protective Groups in Organic Synthesis,John Wiley&Sons,New York,1991。

[0089] 分离方法

[0090] 在制备式I化合物的任何合成方法中,将反应产物互相分离和/或从起始原料中分离是有利的。利用本领域普通技术,将各个步骤或系列步骤的所需产物分离和/或纯化至目标均匀度。典型地,这种分离包括多相萃取、从溶剂或溶剂混合物中结晶、蒸馏、升华或色谱。色谱可以包括许多方法,包括例如:反相和正相色谱;体积排除色谱;离子交换色谱;高、中和低压液相色谱法和装置;小型分析;模拟移动床(SMB)和制备薄层色谱法或厚层色谱法,以及小规模薄层和快速色谱技术。

[0091] 另一种分离方法包括:用选择的试剂处理反应混合物,以与目标产物、未反应的起始原料、反应副产物等结合或使其分离。这种试剂包括吸附剂或吸收剂例如活性碳、分子筛、离子交换介质等。可选择地,试剂可以是酸(在碱性材料的情况下)、碱(在酸性物质的情况下)、结合试剂例如抗体、结合蛋白、选择性的螯合剂例如冠醚、液体/液体离子萃取试剂(LIX)等。

[0092] 根据所涉及物质的性质选择合适的分离方法。例如,在蒸馏和升华中的沸点和分子量,在色谱中的存在或不存在极性官能团,在多相萃取中的酸性和碱性介质中的物质稳定性等。本领域技术人员会应用最合适的技术,以实现所需的分离。

[0093] 基于物理化学差异,利用本领域技术人员熟知的方法,例如色谱和/或分级结晶,可以将非对映异构体混合物分离为其单一非对映异构体。对映异构体可以如下分离:通过与合适的旋光性化合物(例如手性助剂,例如手性醇或Mosher's酰氯)反应,将对映异构体混合物转化为非对映异构体混合物,分离非对映异构体,并将单一非对映异构体转化(例如水解)为相应的纯对映异构体。同样,本发明的一些化合物可能是阻转异构体(例如取代的联芳基),并且认为其是本发明的一部分。还可以使用手性HPLC柱分离对映异构体。

[0094] 单一的立体异构体,例如对映异构体(基本上不含其立体异构体)可以使用例如使用光学活性拆分试剂形成非对映异构体的方法,通过拆分消旋混合物而获得。(Eliel, E. and Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley&Sons, Inc., New York, 1994; Lochmuller, C.H., J. Chromatogr., (1975) 113 (3): 283-302)。本发明手性化合物的消旋混合物通过任一合适的方法分开和分离,其包括:(1)与手性化合物形成离子、非对映异构体盐,并通过分级结晶或其它方法进行分离,(2)与手性衍生化试剂形成非对映异构体化合物,分离非对映异构体,并转化为纯的立体异构体,和(3)在手性条件下,直接分离基本上纯的或富集的立体异构体。参见:"Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology," Irving W. Wainer, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1993)。在方法(1)中,非对映异构体盐可以由对映异构体纯的手性碱例如番木鳖碱、奎宁、麻黄碱、马钱子碱、 α -甲基- β -苯乙胺(苯丙胺)等与携带酸性官能团例如羧酸和磺酸的不对称化合物的反应形成。通过分级结晶或离子色谱,可以诱导分离非对映异构体盐。对于氨基化合物的旋光异构体的分离,加入手性羧酸或磺酸,例如樟脑磺酸、酒石酸、扁桃酸或乳酸,可以致使非对映异构体盐的形成。

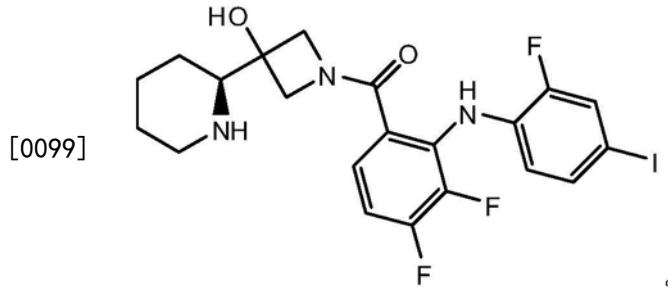
[0095] 可选择地,通过方法(2),使所要拆分的底物与手性化合物的一个对映异构体反应,形成非对映异构体对(E. and Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley&Sons, Inc., 1994, p. 322)。非对映异构体化合物可以由不对称化合物与对映异构体纯的手性衍生化试剂例如薄荷基衍生物的反应而形成,然后分离非对映异构体,并水解,以产生纯的或富集的对映异构体。测定光学纯度的方法包括:在碱的存在下制备消旋混合物的手性酯,例如薄荷基酯,例如(-)氯甲酸薄荷基酯,或Mosher酯(乙酸 α -甲氧基- α -(三氟甲基)苯基酯(Jacob III. J. Org. Chem., (1982) 47:4165),并分析 ^1H NMR光谱,确定两种阻转异构体对映异构体或非对映异构体的存在。按照分离阻转异构体萘基-异喹啉(WO 96/15111)的方法,通过正和反相色谱法,可以分开和分离阻转异构体化合物的稳定非对映异构体。通过方法(3),可以通过使用手性固定相的色谱来分离两个对映异构体的消旋混合物("Chiral Liquid Chromatography" (1989) W.J. Lough, Ed., Chapman and Hall, New York; Okamoto, J. of Chromatogr., (1990) 513:375-378)。通过辨别其它手性分子(带有不对称碳原子)所使用的方法(例如旋光和圆二色性),可以区别富集的或纯对映异构体。

[0096] 化学治疗剂

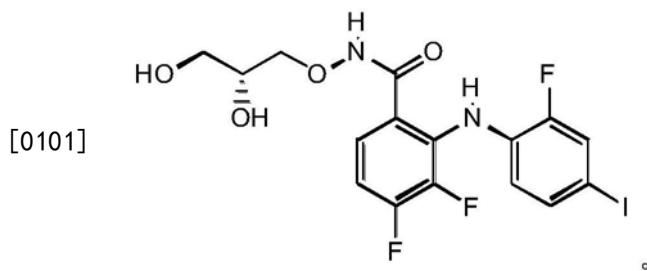
[0097] 某些化学治疗剂具有与式I的化合物或者其药用盐组合来抑制体外和体内细胞增殖的已被证实的令人惊讶的且不预期的性质。所述化学治疗剂包括GDC-0973和PD-0325901。

[0098] GDC-0973,也称为XL-518,是MEK的选择性抑制剂,其也称为细胞分裂素活化蛋白激酶(MAPKK),其为在人类肿瘤中频繁活化的 RAS/RAF/MEK/ERK途径的关键组分。MEK/ERK

途径的不适当活化促进了在不存在外源性生长因子的情况下细胞生长。正在进行针对实体瘤来评价 GDC-0973的I期临床试验。GDC-0973可如在国际专利申请公开 WO2007044515 (A1) 中所述来制备。GDC-0973具有以下命名: (S)- (3,4-二氟 -2- (2-氟-4-碘苯基氨基) 苯基) (3-羟基-3-(哌啶-2-基) 氮杂环丁烷-1-基) 甲酮,且具有以下结构:



[0100] PD-0325901 (CAS注册号391210-10-9,Pfizer) 为第二代非-ATP竞争性变构MEK抑制剂,其用于癌症的潜在口服片剂治疗(US 6960614;US 6972298; US 2004/147478;US 2005/085550)。已经针对乳腺癌肿瘤、结肠癌肿瘤和黑色素瘤的潜在治疗进行了II期临床试验。PD-0325901命名为(R)-N- (2,3-二羟基丙氧基)-3,4-二氟-2- (2-氟-4-碘苯基氨基) 苯甲酰胺,且具有以下结构:



[0102] 药物组合物

[0103] 本发明的药物组合物或者制剂包括式I的化合物或者其药用盐、化学治疗剂以及一种或者多种药用载体、助流剂、稀释剂或者赋形剂的组合。

[0104] 一个实例包括用于口服递送GDC-0068或者其盐以及一种或者多种药用载体、助流剂、稀释剂或者赋形剂的第一制剂,以及用于口服递送 GDC-0973和PD-0325901中的一种或者其盐以及一种或者多种药用载体、助流剂、稀释剂或者赋形剂的第二制剂。在一个实例中,所述第二制剂包含 GDC-0973或者其盐。

[0105] 式I的化合物或者其药用盐以及化学治疗剂可以非溶剂化形式或者具有药用溶剂诸如水、乙醇等的溶剂化形式存在,且本发明意在同时涵盖溶剂化以及非溶剂化形式。

[0106] 式I的化合物或者其药用盐以及化学治疗剂还可以存在不同的互变异构形式,所有的这些形式包括在本发明范围内。术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指可通过低能垒互相转换的具有不同能量的结构异构体。例如,质子互变异构体(亦称质子迁移互变异构体 (prototropic tautomer))包括通过质子的迁移而进行的相互转化,例如酮-烯醇和亚胺-烯胺互变异构化。价键互变异构体包括通过一些成键电子的重构而进行的相互转化。

[0107] 药物组合物涵盖散装(bulk)组合物和单一剂量单位,其包含多于一种(例如两种)药用活性剂,包括式I的化合物或者其药用盐和本申请所述的化学治疗剂以及任何药用非活性赋形剂、稀释剂、载体或者助流剂。所述散装组合物以及每个单一剂量单位可含有固定量的先前所述的药用活性剂。所述散装组合物为尚未形成为单一剂量单位的物质。示例性

剂量单位为口服剂量单位诸如片剂、丸剂、胶囊剂等。类似地,本申请所述的通过给予本发明的药物组合物来治疗患者的方法也意在涵盖给予散装组合物和单一剂量单位。

[0108] 药物组合物还涵盖同位素标记的化合物,其与本申请所列举的相同,不同的是,一个或多个原子被具有不同于通常在自然界中发现的原子质量或质量数的原子质量或质量数的原子替代。所列举的任何具体原子或元素的所有同位素均包括在本发明化合物和其用途范围内。可以结合进本发明化合物的示例性的同位素包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、氯和碘的同位素,例如²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O、³²P、³³P、³⁵S、¹⁸F、³⁶Cl、¹²³I和¹²⁵I。某些同位素标记的本发明化合物(例如用³H和¹⁴C标记的)可用于化合物和/或底物组织分布测试中。由于其易于制备和检测,氚代(即³H)和碳-14(即¹⁴C)同位素是有用的。此外,用较重同位素例如氘(即²H)的取代可以提供某些治疗优势,这是因为其产生更大的代谢稳定性(例如,体内半衰期增加或剂量要求减低),由此在一些情况下是优选的。正电子发射同位素例如¹⁵O、¹³N、¹¹C和¹⁸F可有效用于正电子发射成像术(PET)研究,以检测底物受体占有率。

[0109] 式I的化合物或者其药用盐和化学治疗剂根据用于治疗性治疗(包括预防性治疗)哺乳动物包括人类中的过度增殖性疾病的治疗组合的标准药学实践来配制。本发明提供了药物组合物,其包含式I的化合物或者其药用盐和一种或者多种本申请所述的化学治疗剂以及一种或者多种药用载体、助流剂、稀释剂或者赋形剂的组合。

[0110] 适当的载体、稀释剂和赋形剂为本领域技术人员所熟知的且包括以下物质诸如碳水化合物、蜡、水溶性和/或者可溶胀聚合物、亲水性或者疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。所使用的具体载体、稀释剂或赋形剂取决于本发明化合物的应用方法和目的。溶剂的选择一般基于本领域技术人员认为可安全(GRAS)给药至哺乳动物的溶剂。通常,安全溶剂是无毒的含水溶剂,例如水,以及其它可在水中溶解或互溶的无毒溶剂。合适的含水溶剂包括水、乙醇、丙二醇、聚乙二醇(例如PEG 400, PEG 300)等,和其混合物。制剂还可以包含一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、湿润剂、润滑剂、乳剂、助悬剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、助流剂、加工助剂、色素、甜味剂、香料、调味剂及其它已知的添加剂,以提供具有精美外观的药物(即本发明的化合物或其药物组合物)或帮助制备药学产品(即药物)。

[0111] 可以使用常规溶解和混合方法来制备制剂。例如,在一种或多种如上所述的赋形剂的存在下,将散装药物物质(即本发明的化合物或化合物的稳定化形式(例如,与环糊精衍生物或其它已知的络合试剂的复合物))溶于合适溶剂中。将本发明化合物通常配制为药物剂型以提供容易控制的剂量的药物且使得患者能够顺应开具的给药方案。

[0112] 本申请的药物组合物(或制剂)可以以各种方式包装,这取决于给药药物所使用的方法。例如,用于分配的物品可以包括容器,在其中,药物制剂以合适的形式放置。合适的容器对于本领域技术人员是熟知的,并且包括材料例如瓶(塑料和玻璃)、小袋、安瓿、塑料袋、金属筒等。容器还可以包括防干扰体系,以防止不慎重使用包装的内含物。此外,容器具有设置在其上的标签,标签描述容器的内含物。标签还可以包括合适的警告。

[0113] 化合物的药物制剂可针对各种给药途径和类型来制备。例如,具有预期纯度的式I的化合物或者其药用盐可任选地与药用稀释剂、载体、赋形剂或者稳定剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences (1995) 18th edition, Mack Publ. Co., Easton, PA),其形式为冻干制剂、研磨的粉末或者水溶液。制剂可通过在环境温度在适当的pH且以预期的纯度与生理学可接受的载体即在所采用的剂量和浓度时对接受者无毒性的载体混合来进行。制剂

的pH主要取决于具体用途和化合物的浓度,但其范围为约3至约8。

[0114] 药物制剂任选为无菌的。特别地,用于体内给药的制剂必须是无菌的。所述灭菌可通过经无菌滤膜滤过而容易地完成。

[0115] 药物制剂通常可作为固体组合物、冻干制剂或者水溶液来储存。

[0116] 药物制剂以一定方式进行剂量化和给药,即数量、浓度、进度、历程、载体和给药途径均符合良好的医疗实践。在本申请中考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床病症、病症的病因、药剂的递送位点、给药方法、给药的日程表,和医学专业人员已知的其它因素。所给药的化合物的“治疗有效量”取决于这种考虑,并且是预防、改善或治疗凝血因子介导的病症需要的最低量。所述量优选低于对宿主产生毒性或者使得宿主明显更易于出血的量。

[0117] 可接受的稀释剂、载体、赋形剂和稳定剂在使用剂量和浓度下对于受试者是无毒性的,并且包括缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚,丁基或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲基酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于大约10个残基)多肽;蛋白,例如血清清蛋白,凝胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰氨酸,组氨酸,精氨酸,或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖,或糊精;螯合剂例如EDTA;糖例如蔗糖,甘露糖醇,海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反离子,例如钠;金属配合物(例如,Zn-蛋白配合物);和/或非离子型表面活性剂例如TWEENTM,PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。活性药学组分还可以收集在微胶囊中,微胶囊是例如利用凝聚技术或利用界面聚合来制备的,例如羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲基酯)微胶囊,分别在胶体的给药体系(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳状液、纳米颗粒和毫微囊剂)或在粗乳状液中。这种技术是公开在Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, (1995) Mack Publ. Co., Easton, PA中。

[0118] 可以制备式I的化合物或者其药用盐的缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有式I化合物或者其药用盐的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,该基质是成形物品形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙烯酸2-羟基乙基酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 3,773,919)、L-谷氨酸和γ-乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物例如LUPRON DEPOTTM((由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮丙瑞林乙酸盐组成的可注射的微球体)和聚D-(–)-3-羟丁酸)。

[0119] 药物制剂包括适于本申请详述的给药途径的制剂。制剂可适宜地以单位剂型存在且可通过药学领域所熟知的任何方法来制备。技术和制剂通常可在 Remington's Pharmaceutical Sciences 18th Ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA中找到。所述方法包括使得活性成分与构成一种或者多种助剂的载体缔合的步骤。一般而言,制剂通过以下方法制备:使得活性成分与液体载体或者精细分开的固体载体或者两种载体均匀地且紧密地缔合且如果需要使得产物成型。

[0120] 适于口服给药的式I的化合物或者其药用盐和/或者化学治疗剂的制剂可制备为分散的单位诸如丸剂、硬或者软胶囊(例如明胶胶囊)、扁囊剂、糖锭、锭剂、水性或者油性混悬剂、可分散粉末或者颗粒、乳剂、糖浆剂或者醑剂,其各自含有预先确定量的式I的化合物

或者其药用盐和/或者化学治疗剂。作为组合制剂，式I的化合物或者其药用盐的量以及化学治疗剂的量可配制为丸剂、胶囊剂、溶液剂或者混悬剂。可选择地，式I的化合物或者其药用盐和化学治疗剂可分开配制为用于交替给药的丸剂、胶囊剂、溶液剂或者混悬剂。

[0121] 制剂可根据用于制备药物组合物的本领域已知的任何方法来制备且所述组合物可含有一种或者多种试剂包括甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂，以提供适口的制剂。压制片剂可通过在适当机器中将活性成分压制为自由流动的形式诸如粉末或者颗粒(其任选与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或者分散剂混合)来制备。模制片剂可通过在适当机器中将用惰性液体稀释剂湿润的粉末化的活性成分的混合物模制来制备。

[0122] 片剂可任选被包衣或者刻痕且任选配制由此提供活性成分从其中缓慢或者控制释放。药物制剂的片剂赋形剂可包括：填充剂(或者稀释剂)，其增加构成片剂的粉末化药物的总体积；崩解剂，其在摄入时促进片剂崩解为小碎片，理想地为单一药物颗粒，且促进药物的快速溶解和吸收；粘合剂，其保证颗粒和片剂可在压制后形成具有所需的机械强度且保持片剂在一起，这防止其在包装、装运以及常规操作过程中分裂为其组分粉末；助流剂，其改善构成片剂的粉末在生产过程中的流动性；润滑剂，其保证压片粉末在制造过程中不粘附于用于压制片剂的仪器上，其改善了粉末混合物经过压机的流动且在完成的片剂由仪器喷出时使得摩擦和破裂最小化；抗粘附剂，其具有类似于助流剂的功能，其降低在制造过程中构成片剂的粉末与用于压制片剂的机器之间的粘附；矫味剂，其掺入片剂中以提供适宜的味道或者掩蔽不适宜的味道；以及着色剂，其有助于辨别和患者顺应性。

[0123] 含有活性成分与适于制造片剂的无毒药用赋形剂的混合物的片剂是可接受的。这些赋形剂可为例如惰性稀释剂，诸如碳酸钙或者碳酸钠、乳糖、磷酸钙或碳酸钠；造粒剂和崩解剂诸如玉米淀粉或海藻酸；粘合剂诸如淀粉、明胶或阿拉伯胶；以及润滑剂诸如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂制剂可以是无包衣的或者通过已知的技术包括微囊化包衣的，以延缓在胃肠道中崩解和吸收且由此提供历时较长时期的持续作用。例如，可采用时间延缓材料诸如单独的单硬脂酸甘油酯或者二硬脂酸甘油酯或者其与蜡的组合。

[0124] 针对治疗眼部或者其它外部组织例如口和皮肤，制剂优选作为局部软膏剂或者乳膏剂来施用，其含有例如0.075-20% w/w的量的活性成分。当配制为软膏剂时，活性成分可与石蜡或者水可混溶的软膏基质一起采用。可选择地，活性成分可配制为具有水包油乳剂基质的乳膏剂。

[0125] 如果需要，乳膏基质的水相可包括多元醇，即具有两个或者更多个羟基的醇诸如丙二醇、丁-1,3-二醇、甘露醇、山梨醇、甘油和聚乙二醇(包括PEG 400)以及它们的混合物。局部制剂可预期地包括增强活性成分经皮肤或者其它相关区域吸收或者渗透的化合物。所述经皮渗透增强剂的实例包括二甲基亚砜和相关类似物。

[0126] 本发明乳剂的油相可由已知成分以已知的方式构成，包括至少一种乳化剂与脂肪或者油的混合物，或者至少一种乳化剂与脂肪和油的混合物。优选地，亲水性乳化剂与作为稳定剂的亲脂性乳化剂一起包括在内。乳化剂与/不与稳定剂一起构成乳化蜡，且所述蜡与油和脂肪一起构成乳化软膏基质，其形成乳膏制剂的油分散相。适用于所述制剂的乳化剂和乳剂稳定剂包括 Tween® 60、Span® 80、十八醇十六醇混合物、苯甲醇、肉豆蔻醇、单硬脂酸甘油酯和月桂硫酸钠。

[0127] 药物制剂的水性混悬剂含有活性物质与适于制造水性混悬剂的赋形剂的混合物。

所述赋形剂包括助悬剂,诸如羧甲基纤维素钠、交联羧甲纤维素、聚维酮、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯-吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或湿润剂,诸如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、氧化烯烃与脂肪酸的缩合产物(例如聚硬脂酸氧乙烯酯)、氧化乙烯与长链脂族醇的缩合产物(例如十七烷环氧乙烷鲸蜡醇)、氧化乙烯与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇一油酸酯)。水性混悬剂还可以含有一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸乙基酯或对羟基苯甲酸丙酯)、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂、和一种或多种甜味剂(例如蔗糖或糖精)。

[0128] 药物组合物可以是无菌注射制剂形式,例如无菌可注射的含水或含油悬浮液。可以按照本领域已知的方法配制这种悬浮液,使用上述那些合适的分散或湿润剂和悬浮剂。无菌注射制剂还可以是在无毒胃肠外可接受稀释剂或溶剂中的溶液或悬浮液,例如在1,3-丁二醇中的溶液,或制备成冷冻干燥粉末形式。在可接受的载体和溶剂之中,可以使用的是水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。此外,可以传统地使用无菌的不挥发油作为溶剂或悬浮介质。对于这种目的,可以使用任何柔和的不挥发油,包括合成的单或二甘油脂。此外,也可以在注射制剂中使用脂肪酸例如油酸。

[0129] 可与载体物质混合以产生单一剂型的活性成分的量将取决于受治疗的宿主和具体给药方式而变化。例如,意在口服给药于人类的时间-释放制剂可含有约1-1000mg的活性物质,其与适当的且便利的量的载体物质复合,所述量可在约5至约95%的总体组合物(重量:重量)之间变化。可制备药物组合物以提供易于测量的给药的量。例如,意在静脉内输注的水溶液可含有每毫升溶液约3-500 μ g的活性成分以使得可产生以约30mL/hr的速率的适当体积的输注。

[0130] 适于肠胃外给药的制剂包括含水和无水无菌注射液,其可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使制剂与预定受试者的血液等渗的溶质;和含水和非水无菌的悬浮液,其可以包含悬浮剂和增稠剂。

[0131] 适于向眼部局部给药的制剂也包括滴眼剂,其中将活性成分溶于或者混悬于适当载体,特别是用于活性成分的含水溶剂。所述活性成分优选以约0.5-20%w/w例如约0.5-10%w/w、约1.5%w/w的浓度存在于所述制剂中。

[0132] 适于在口中局部给药的制剂包括锭剂,其包含在矫味基质中的活性成分,所述基质通常为蔗糖和阿拉伯胶或者西黄蓍胶;软锭剂,其包含在惰性基质中的活性成分,所述基质诸如明胶和甘油,或者蔗糖和阿拉伯胶;以及漱口剂,其包含在适当液体载体中的活性成分。

[0133] 用于直肠给药的制剂可作为具有适当基质的栓剂存在,所述基质包含例如可可豆脂或者水杨酸盐。

[0134] 适于肺内或经鼻给药的制剂具有例如0.1至500微米范围内的粒度(包括介于0.1和500微米范围中间的粒度,增量微米为例如0.5、1、30微米、35微米等),通过使其快速吸入鼻腔来给药,或通过吸入口腔来给药,以便达到肺泡囊中。合适的制剂包括活性组分的水性或油性溶液。适于气雾剂或干粉给药的制剂可以按照常规方法制备,并且可以与其它治疗剂例如迄今用于治疗或预防如下所述病症的化合物一起递送。

[0135] 适于阴道给药的制剂可以以阴道栓、塞、乳膏、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷剂的形式提供,除了含有活性组分之外,还含有本领域已知的合适载体。

[0136] 制剂还可以包装在单剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可以保存在冷冻干燥(冻干)条件下,只需要在即将使用之前加入注射用的无菌的液体载体,例如水。临时的注射液和悬浮液是用先前描述的种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备的。优选的单位剂量制剂是含有本文上面列举的活性组分的日剂量或单位日亚剂量,或其合适部分的那些制剂。

[0137] 本发明还提供了兽用组合物,其包含式I的化合物或者其药用盐和至少一种如上所定义的化学治疗剂以及兽用载体。兽用载体是可用于给药组合物目的的材料,并且可以是固体、液体或气态物质,其是惰性的或在兽医领域是可接受的,并且与活性组分相容。这些兽用组合物可以胃肠外、口服给药,或通过任何其它所需途径给药。

[0138] 组合治疗

[0139] 式I的化合物或者其药用盐可与用于治疗过度增殖性疾病或者病症包括肿瘤、癌症和瘤形成组织以及恶化前和非新生物或者非恶性过度增殖性疾病的其它化学治疗剂组合使用。在某些实施方案中,在作为组合治疗的给药方案中,使得式I的化合物或者其药用盐与具有抗-过度增殖性质或者用于治疗过度增殖性疾病的第二化合物组合。给药方案的第二化合物优选具有与式 I 的化合物或者其药用盐互补的活性,且使得它们不会彼此不利地影响。所述化合物可以对于预期目的有效的量来给予。在一个实施方案中,通过给药方案给予治疗组合,在所述给药方案中,治疗有效量的式I的化合物或者其药用盐在每日两次至每三周一次(q3wk)的范围内给予,且治疗有效量的化学治疗剂在每日两次至每三周一次的范围内给予。

[0140] 组合治疗可作为同时或者先后给药方案来给予。当先后给予时,所述组合可以两次或者多次给药来给予。组合给药包括使用分开制剂的共同给药,以及以任何次序的连续给药,其中优选存在两种(或者所有)活性成分同时显示它们的生物活性的一段时间。

[0141] 在本发明的一个具体方面,式I的化合物或者其药用盐可在开始给予一种或者多种药物之后给药约1至约10天的时间段。在本发明的另一个具体方面,式I的化合物或者其药用盐可在开始给予所述组合之前给药约1至约 10天的时间段。在本发明的另一个具体方面,式I的化合物或者其药用盐的给药和化学治疗剂的给药在同一天开始。

[0142] 用于任何上面共同给予的药物的适当剂量为目前使用的那些且可降低,这是因为新鉴别的药物与其它化学治疗剂或者治疗的组合作用(协同作用),诸如增加治疗指数或者减轻毒性或者其它副作用或者后果。

[0143] 在抗癌治疗的具体实施方案中,式I的化合物或者其药用盐可与化学治疗剂组合,以及与外科治疗和放射疗法组合。将选择式I的化合物或者其药用盐和其它药用活性化学治疗剂的量以及给药的相关时限以实现预期的组合治疗效果。

[0144] 药物组合物的给药

[0145] 化合物可以通过任何适合于所治疗病症的途径给药。合适的途径包括口服、肠胃外(包括皮下、肌注、静脉内、动脉注射、吸入、真皮内、鞘内、硬膜外和输注技术)、透皮、直肠、经鼻、局部(包括面颊和舌下)、阴道、腹腔内、肺内和鼻内给药。局部给药也可涉及透皮给药诸如透皮贴剂或者离子电渗疗法装置的使用。

[0146] 药物制剂在Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA 中讨论。药物制剂的其它实例可在Liberman, H.A. and

Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol 3, 2nd Ed., New York, NY中找到。对于局部免疫抑制治疗,化合物可通过病灶内给药,包括灌注或者以其它方式在移植前使得移植物与抑制剂接触。应该认识到优选的途径可随着例如接受者的状况而变化。当将化合物口服给药时,其可与药用载体、助流剂或者赋形剂一起配制为丸剂、胶囊剂、片剂等。当将化合物肠胃外给药时,其可与药用肠胃外媒介物或者稀释剂配制,且其为如下详述的单位剂量可注射形式。

[0147] 治疗人类患者的剂量范围可为每日约20mg至约1600mg的式I的化合物或者其药用盐。典型的剂量可为约50mg至约800mg的化合物。剂量可每日给予一次(QD)、每日两次给予(BID)或者更频繁地给予,这取决于具体化合物的药代动力学(PK)和药效学(PD)性质,包括吸收、分布、代谢和排泄。此外,毒性因素可影响剂量和给药方案。当口服给药时,丸剂、胶囊剂或者片剂可每日两次摄入、每日一次摄入或者更不频繁地摄入诸如每周一次或者每两周一次或者每三周一次摄入达指定的时间段。可针对治疗的众多周期重复所述给药方案。

[0148] 治疗方法

[0149] (1) 式I的化合物或者其药用盐和(2) 化学治疗剂的治疗组合用于治疗疾病、病症和/或者障碍,包括但不限于哺乳动物中的由AKT激酶调节的那些。可根据本发明方法治疗的癌症包括但不限于间皮瘤、子宫内膜癌、胶质瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、黑色素瘤、胃癌、结肠癌、头颈癌。

[0150] 已经确定了本发明的某些组合提供了针对某些癌症表型的改善的效果。例如,本发明的某些组合提供了针对与PTEN突变(或者低或者无的状态)、AKT突变(或者高pAKT表达或者扩增水平)、PI3K突变、Her2/ErbB2扩增、RAS突变、RAF突变或者上述组合相关的癌症的改善的效果。

[0151] 因此,本申请所述的某些组合针对这些类型的癌症可为特别有效的。

[0152] 例如,在结肠直肠癌中,预计PI3k/AKT突变(例如PI3K H1047R、E545K、D549N、P421L、L568F、L569F、P449T或者它们的组合)与RAS/RAF突变(KRAS G13D、G12D、G12V或者它们的组合)的组合对本申请组合强应答且针对GDC-0068与GDC-0973的组合观察到强的协同作用。

[0153] 同样,在非小细胞肺癌中,针对GDC-0068与GDC-0973的组合可观察到强的协同作用,其中:(i) 存在PI3k/AKT突变(PI3k E545K、L997P、M772X、N996H或者它们的组合)与RAS/RAF突变(Q61H、G12C、Q61K、N85K、G12S、BRAF V600E或者它们的组合)的组合,且(ii) 存在不具有PI3k突变的 RAS/RAF的组合。

[0154] 同样,在黑色素瘤中,针对GDC-0068与GDC-0973的组合可观察到强的协同作用,其中:(i) 存在BRAF V600E突变,且(ii) 存在具有PTEN突变(无或者低的状态)或者具有高pAKT表达或者活性水平的BRAF V600E突变或者缺失或者扩增。

[0155] 用于测试患者是否具有BRAF V600E突变的试剂盒为可商购得到的。一个实例为COBAS® 4800 BRAF V600突变测试(Roche Molecular Systems Inc.),其在甲醛固定的石蜡包埋的(FFPET) 人类黑色素瘤组织中检测BRAF V600E突变。其在美国已经批准作为对于用维罗非尼(vemurafenib)或者其药用盐治疗的结合诊断(companion diagnostic),其设计为治疗其中黑色素瘤隐藏BRAF基因的突变形式的患者。在临床前和临床研究中,cobas® BRAF 突变测试在检测BRAF V600E(1799T>A)突变中具有97.3%的阳性一致性,这

表示>~85%的所有BRAF突变报道于COSMIC数据库中。

[0156] 在甲醛固定的石蜡包埋的组织(FFPET)中,cobas® BRAF突变测试可检测>5%突变水平的V600E突变。该测试也可检测其它V600突变诸如V600D 和V600K。cobas® BRAF突变测试可在从接收样本(诸如由患者获得的组织样品或者肿瘤细胞)<8小时内进行。cobas® 4800 BRAF V600突变测试为在 cobas® 4800系统,v2.0上的实时PCR测试,且其意在用于辅助选择其中肿瘤带有BRAF V600E突变的黑色素瘤患者。

[0157] PTEN无(或者低)状态可通过本领域已知的任何适当方法来测量。在一个实例中,使用IHC。可选择地,可使用蛋白质斑迹法分析。对PTEN的抗体为可商购得到的(Cell Signaling Technology,Beverly,MA,Cascade Biosciences,Winchester,MA)。针对PTEN状态的IHC和蛋白质斑迹法分析的示例性操作描述于Neshat,M.S. et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR, Proc.Natl Acad.Sci.USA 98,10314-10319 (2001) 和Perren,A., et.al. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast, American Journal of Pathology, Vol.155, No.4, October 1999中。此外,与AKT突变、PI3K突变和Her2/ErbB2扩增相关的癌症可使用本领域已知的技术来鉴别。

[0158] 在给定样品中AKT的活化或者磷酸化(“pAKT”)的水平相比于非活化或者非磷酸化的AKT水平可通过本领域已知的方法来测量。pAKT状态可按照比例(例如肿瘤细胞中的pAKT的量除以相同类型的非肿瘤细胞中的 pAKT的量)或者减法(例如肿瘤细胞中的pAKT的量减去相同类型的非肿瘤细胞中的pAKT的量)来表示。pAKT分布也可以如下方式来表示:通过测量 AKT的磷酸化下游靶标(例如pGSK或者PRAS40)的量获得的活化途径的水平。高pAKT分布是指全部AKT在样品中的活化或者磷酸化水平高于基线值。在一个实例中,所述基线值为针对给定细胞类型的基本水平。在其它实例中,所述基线值为在给定样品细胞群体例如非癌性细胞中的 pAKT的平均值或者平均水平。在其它实例中,高pAKT是指当相比于来自相同哺乳动物或者患者群体的相同类型的正常的、健康的(例如非肿瘤)细胞的平均值而言,在细胞中过表达或者扩增磷酸化或者活化的AKT的肿瘤细胞。所述pAKT分布也可用于与其它标记(例如FOXO3a定位分布)结合以预测某些PI3k/AKT激酶途径抑制剂的效能,或者例如与BRAF V600E突变状态结合以预测式I化合物与维罗非尼的某些组合的效能,特别是在具有维罗非尼抵抗的癌症诸如转移性或者不能切除的黑色素瘤的患者中。用于测量组织样品中pAKT的试剂盒为可商购得到的(例如磷-Akt (Thr308) STAR ELISA 试剂盒,EMD Millipore)。

[0159] 用于测试PI3k、KRAS和AKT突变存在的试剂盒为可商购得到的 (Qiagen)。

[0160] 在一个具体方面,本发明提供了用于治疗具有与PTEN突变或者表达损失、AKT突变或者扩增、PI3K突变或者扩增、Her2/ErbB2突变或者扩增、KRAS突变或者扩增、BRAF突变或者扩增或者它们的组合相关的癌症的患者的方法,包括向所述患者给予组合。在另一个方面,本发明提供了用于鉴别患者具有可用本发明的组合治疗的癌症的方法,包括确定所述患者的癌症是否与PTEN突变或者表达损失、AKT突变或者扩增、PI3K突变或者扩增或者Her2/ErbB2扩增、KRAS突变或者扩增、BRAF突变或者扩增或者它们的组合相关,其中所述患者的癌症与PTEN突变或者表达损失、AKT突变或者扩增、PI3K突变或者扩增或者Her2/ErbB2

扩增、KRAS突变或者扩增、BRAF突变或者扩增或者它们的组合的相关性可预测所述癌症可用本发明的组合治疗。在另一个方面，本发明提供了方法，其进一步包括用本发明组合治疗如此鉴别的患者。在一个实施方案中，所述癌症为卵巢癌、乳腺癌、黑色素瘤、结肠癌或者非小细胞肺癌。

[0161] 制品

[0162] 在本发明的另外的实施方案中，提供了含有用于治疗如上所述的疾病和病症的式I的化合物或者其药用盐的制品或者“试剂盒”。在一个实施方案中，所述试剂盒包括容器和式I的化合物或者其药用盐。

[0163] 试剂盒可以在容器上或与容器相关地进一步包括标签或包装说明书。术语“包装说明书”指的是通常包括在治疗产品的商业包装中的说明，其包括这种治疗产品的有关指标、用途、剂量、给药、禁忌症和/或涉及使用的警告的介绍。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡罩包装等。容器可以由各种材料例如玻璃或塑料形成。容器可以容纳有效治疗病症的量的式I的化合物或者其药用盐或其制剂，并且可以具有无菌的入口（例如，容器可以是可以用皮下注射针刺穿的静脉内溶液袋或具有塞子的小瓶）。组合物中的至少一种活性剂为式I的化合物或者其药用盐。标签或者包装说明书指明所述组合物用于治疗所选病症诸如癌症。在一个实施方案中，标签或者包装说明书指明包含式I的化合物或者其药用盐的组合物可用于治疗由异常细胞生长导致的病症。标签或者包装说明书也可指明所述组合物可用于治疗其它病症。可选择地或者额外地，制品可以进一步包含第二容器，其包含药用缓冲液例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸缓冲盐水、林格溶液和右旋糖溶液。其可以进一步包含其它合乎需要的材料（从商品和使用者观点来说），包含其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0164] 试剂盒可以进一步包含给药式I的化合物或者其药用盐和第二药物制剂（如果存在的话）的指示。例如，如果试剂盒包含第一组合物（包含式I的化合物或者其药用盐和第二药物制剂），试剂盒可以进一步包含同时、先后或分开放药需要的患者第一和第二药物组合物的指示。

[0165] 在另外的实施方案中，试剂盒适合于递送固体口服形式的式I的化合物或者其药用盐，例如片剂或胶囊。优选，这种试剂盒包含许多单位剂量。这种试剂盒可以包含卡片，其具有以它们的预期使用次序取向的剂量。这种试剂盒的实例是“泡罩包装”。泡罩包装在包装工业中为大家所熟知，并且广泛地用于包装药物单位剂型。如果需要的话，可以提供记忆辅助工具，例如，以数目、字母或其它标志形式，或用日程表，在可以给药剂量的治疗日程中标明天数。

[0166] 按照一个实施方案，试剂盒可以包括(a)第一容器，具有含有在其中的式I的化合物或者其药用盐；和任选(b)第二容器，具有含有在其中的第二药物制剂，其中第二种药物制剂包括具有抗过度增殖活性的第二化合物。替换地或者另外地，试剂盒可以进一步包含第三容器，其包含药用缓冲液例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸缓冲盐水、林格溶液和右旋糖溶液。其可以进一步包含其它合乎需要的材料（从商品和使用者观点来说），包含其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0167] 当试剂盒包含式I的化合物或者其药用盐和第二治疗剂即化学治疗剂的组合物时，试剂盒可以包含容器，其用于容纳单独的组合物，例如分开的瓶或分开的薄箔包装，然

而,单独的组合物还可以包含在单个未分开的容器之内。通常,试剂盒包含给药单独组分的用法说明书。当优选以不同剂型(例如口服和肠胃外)给药的分开的组分时,是以不同的剂量间隔给药的,或当处方医师想要确定联用药的单一组分的剂量时,试剂盒形式是特别有利的。

[0168] 本发明的具体方面

[0169] 在本发明的一个具体方面,过度增殖性疾病为癌症。

[0170] 在本发明的一个具体方面,癌症与PTEN突变相关。

[0171] 在本发明的一个具体方面,癌症与AKT突变、过表达或者扩增相关。

[0172] 在本发明的一个具体方面,癌症与PI3K突变相关。

[0173] 在本发明的一个具体方面,癌症与KRAS突变相关。

[0174] 在本发明的一个具体方面,癌症与BRAF突变相关。

[0175] 在本发明的一个具体方面,癌症与(1) PTEN、AKT或者PI3K突变和(2) KRAS或者BRAF突变的组合相关。在一个实例中,癌症为卵巢癌、乳腺癌、黑色素瘤、结肠癌或者非小细胞肺癌。

[0176] 在本发明的一个具体方面,癌症对GDC-0068和GDC-0973单一药物治疗中的一种或者两种抵抗,但是对GDC-0068和GDC-0973的组合治疗应答。在一个实例中,癌症为卵巢癌、乳腺癌、黑色素瘤、结肠癌或者非小细胞肺癌。

[0177] 在本发明的一个具体方面,癌症选自间皮瘤、子宫内膜癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌(例如阉割抵抗的前列腺癌)、黑色素瘤、胃癌、结肠癌、肾癌、头颈癌和胶质瘤。

[0178] 在本发明的一个具体方面,口服给予式I的化合物或者其药用盐。

[0179] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者PD-0325901或者其药用盐的组合。

[0180] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者PD-0325901或者其药用盐的组合且癌症为胰腺癌。

[0181] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者其药用盐的组合且癌症为胰腺癌。

[0182] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者PD-0325901或者其药用盐的组合且癌症为结肠癌。

[0183] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者PD-0325901或者其药用盐的组合且癌症为乳腺癌。

[0184] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者PD-0325901或者其药用盐的组合且癌症为卵巢癌。

[0185] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者PD-0325901或者其药用盐的组合且癌症为肺癌。

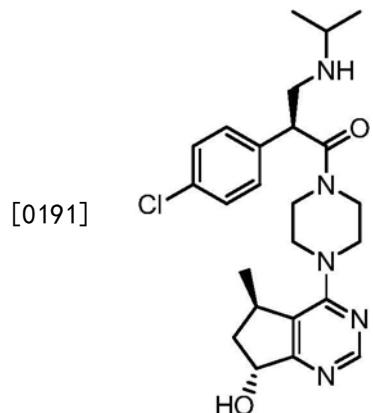
[0186] 在本发明的一个具体方面,给予式I的化合物或者其药用盐与 GDC-0973或者PD-0325901或者其药用盐的组合且癌症为黑色素瘤。

[0187] 在本发明的一个具体方面,将式I的化合物或者其药用盐配制为片剂。

[0188] 实施例

[0189] 为了示例说明本发明，本发明包括下述实施例。然而，应该理解的是这些实施例不限制本发明且仅意在提出实践本发明的方法。

[0190] 实施例1



[0192] (S)-2-(4-氯苯基)-1-(4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-(异丙基氨基)丙-1-酮

[0193] 步骤1：使用干冰-异丙醇浴将普累根酸乙酯 (ethyl pulegenate) (130g, 662 mmol) 在EtOAc (900mL) 中的溶液冷却至-78°C。使得该混合物进行臭氧分解直到反应混合物变为紫色。此时，臭氧发生停止，且将反应混合物由干冰浴移去。使得氧气鼓泡经过反应混合物直到其变为黄色。将反应混合物真空浓缩，并将所得的残留物溶于冰醋酸 (400mL) 中。将溶液冷却至0°C，并历时 30分钟分批加入锌粉 (65g, 993mmol)。然后将反应混合物搅拌2小时，此时将反应混合物滤过硅藻土填料除去锌粉。将乙酸用含水NaOH和NaHCO₃中和为pH 7并用乙醚 (3X 800mL) 萃取。将合并的有机物用盐水、MgSO₄干燥并浓缩得到 (2R)-2-甲基-5-氧代环戊烷-羧酸乙酯，其为棕色液体 (107g, 95%)。

[0194] 步骤2：将乙酸铵 (240.03g, 3113.9mmol) 加入至 (R)-2-甲基-5-氧代环戊烷羧酸乙酯 (106.0g, 622.78mmol) 在MeOH (1.2L) 中的溶液中。将反应混合物在室温在氮气下搅拌20小时，之后经TLC和HPLC判断其完成。将反应混合物浓缩，除去MeOH。将所得的残留物溶于DCM中，用H₂O洗涤两次，用盐水洗涤一次，干燥 (Na₂SO₄)，滤过，并浓缩得到 (R)-2-氨基-5-甲基环戊-1-烯羧酸乙酯 (102g, 97%的收率)，其为橙色油状物。LC/MS (APCI+) m/z 170 [M+H]⁺。

[0195] 步骤3：将含有 (R)-2-氨基-5-甲基环戊-1-烯羧酸乙酯 (161.61g, 955.024 mmol) 和甲酸铵 (90.3298g, 1432.54mmol) 在甲酰胺 (303.456ml, 7640.19 mmol) 中的溶液加热至150°C的内部温度并搅拌17小时。将反应混合物冷却，并转移至2L单颈烧瓶中。然后经高真空蒸馏除去过量的甲脒。一旦甲脒停止产生，将在蒸馏锅中的剩余油状物溶于DCM中并用盐水洗涤 (3X 200 mL)。将合并的含水洗涤液用DCM萃取。将合并的有机萃取物干燥 (Na₂SO₄)，滤过并浓缩。将所得的棕色油状物溶于最少的DCM中，并使用分液漏斗将该溶液加入至乙醚的搅拌的溶液 (约5vol的乙醚/DCM溶液) 中，这引起形成一些棕色沉淀物。将该棕色沉淀物经中等玻璃料漏斗滤过除去，将其用乙醚淋洗并处理。将滤液浓缩，由乙醚研磨重复两次以上，然后在高真空线上干燥得到 (R)-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-醇 (93.225g, 65.00%的收率)，其为棕黄色糊状固体。LC/MS (APCI-) m/z 149.2.

[0196] 步骤4：将纯的POCl₃ (463.9ml, 5067mmol) 通过滴加漏斗缓慢加入至 (R)-5-甲基-

6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-醇(152.2g,1013mmol)在DCE (1.2L)中的0℃溶液。加入完成后,将反应混合物温热至室温,然后加热回流且搅拌70分钟。经HPLC确定反应完成。将反应混合物冷却至室温,并将过量的POCl₃以4份如下淬灭:将反应混合物转移至分液漏斗中并滴至在冰浴中冷却的含有冰和饱和NaHCO₃溶液的烧杯中。一旦各部分的反应混合物加入完成,将淬灭的混合物搅拌30分钟,保证在转移至分液漏斗之前 POCl₃的完全破坏。将混合物转移至分液漏斗中并用DCM萃取两次。将合并的萃取物干燥(Na₂SO₄),滤过并浓缩。将粗物质在硅胶上如下纯化:将硅胶(1kg)在3L玻璃料漏斗中在9:1的己烷:乙酸乙酯中制成淤浆,将硅胶真空静置,用沙封顶。将粗物质用DCM/己烷混合物载入,并使用1L支管烧瓶在真空下将化合物洗脱。高Rf副产物首先洗脱出,然后洗脱出(R)-4-氯-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶(104.4g,61.09%的收率),其为棕色油状物。将三乙胺(93.0ml,534mmol)和哌嗪-1-羧酸叔丁酯(34.8g,187mmol)加入至(R)-4-氯-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶(30.0g,178mmol)在n-BuOH(250mL)中的溶液中。将反应混合物在氮气下加热回流并搅拌过夜(17小时),之后将其在Rotavap上浓缩。将所得的油状物溶于DCM中,用H₂O洗涤,干燥(Na₂SO₄),滤过并浓缩。将所得的棕色油状物在硅胶上纯化(首先用2:1的己烷:乙酸乙酯洗脱直到产物干净地洗脱出,然后用梯度1:1-1:5的DCM:乙酸乙酯洗脱)得到(R)-4-(5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(42.0g,74.1%的收率),其为米色粉末。LC/MS (APCI+) m/z 319.1 [M+H]⁺.

[0197] 步骤5:将固体77%max.MCPBA(23.9g,107mmol)分批加入至(R)-4-(5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(20.0 g,62.8mmol)在CHCl₃(310mL)中的0℃溶液中。将反应混合物搅拌5分钟,然后温热至室温并搅拌90分钟。在7.5小时后观察到相似的HPLC。将反应混合物冷却至0℃,然后加入NaHCO₃(13.2g,157mmol)和另外的0.5当量的m-CPBA。将反应混合物搅拌过夜(14小时)。将反应混合物冷却至0℃,并经滴加漏斗逐滴加入Na₂S₂O₃(29.8g,188mmol)在H₂O(50mL)中的溶液。之后经滴加漏斗加入Na₂CO₃(24.6g,232mmol)在H₂O(70mL)中的溶液(混合物变为均匀的)。将反应混合物搅拌30分钟,然后将混合物用CHCl₃(3X 150mL)萃取。将合并的萃取物干燥(Na₂SO₄),滤过,并浓缩得到N-氧化物。LC/MS (APCI+) m/z 335.1 [M+H]⁺.

[0198] 步骤6:将Ac₂O(77.0ml,816mmol)加入至步骤5的N-氧化物(21.0g, 62.8mmol)中。将反应混合物在氮气下在90℃沙浴中加热且搅拌100分钟。将反应混合物冷却至室温,并经旋转蒸发除去过量的乙酸酐。将所得的油状物溶于DCM中,然后将其小心地倒入冰饱和的Na₂CO₃中。将混合物用DCM 萃取,并将合并的萃取物干燥(Na₂SO₄),滤过,并浓缩得到(5R)-4-(7-乙酰氧基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(23.6g, 100%),其为棕色泡沫状物。LC/MS (APCI+) m/z 377.1 [M+H]⁺.

[0199] 步骤7:将LiOH-H₂O(6.577g,156.7mmol)加入至(5R)-4-(7-乙酰氧基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(23.6g,62.69 mmol)在2:1的THF:H₂O(320mL)中的0℃溶液中。将反应混合物搅拌10 分钟,然后温热至室温。在3小时和4.5小时观察到相同的LC/MS。将反应混合物冷却至0℃,然后将饱和NH₄Cl加入至混合物中。将混合物搅拌5分钟,将其大部分THF经旋转蒸发除去。将混合物用EtOAc(3X 250mL)萃取,并将合并的萃取物干燥(Na₂SO₄),滤过,并浓缩。将粗物质在Biotage 65M 上进行快速色谱法纯化(4:1的DCM:乙酸乙酯,然后梯度为1:1-1:4的DCM: 乙酸乙酯)。一旦产物洗脱,则将

乙酸乙酯冲洗过柱。然后用30:1的 DCM:MeOH洗脱剩余的产物(8.83g)。将混合物的馏分用Biotage 40M使用相同条件重新进行快速色谱法纯化得到另外2.99g,这得到组合收率的(5R)-4-(7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(11.82g,56.38%的收率),其为棕色泡沫状物。LC/MS(APCI+)m/z 335.1 [M+H]+.

[0200] 步骤8:将DMSO(5.45ml,76.8mmol)在DCM(50mL)中的溶液经滴加漏斗逐滴加入至草酰氯(3.35ml,38.4mmol)在DCM(150mL)中的-78℃溶液中。将反应混合物搅拌35分钟,然后经滴加漏斗缓慢加入(5R)-4-(7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(9.17g,27.4 mmol)在DCM(80mL)中的溶液。将反应混合物在-78℃搅拌另外1小时,之后将纯的三乙胺(18.0ml,129mmol)加入至混合物中。然后将反应混合物温热至室温,然后将其搅拌30分钟。加入H₂O。将混合物用DCM(3X 200 mL)萃取,并将合并的萃取物干燥(Na₂SO₄),滤过,并真空浓缩。将粗物质在硅胶(Biotage 65M)上纯化(将柱用约800mL 4:1的DCM:EtOAc冲洗,然后梯度为1:1的DCM:乙酸乙酯洗脱直到产物洗脱出,然后用1:4的DCM:EtOAc 洗脱产物)得到(R)-4-(5-甲基-7-氧代-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(7.5g,82.3%的收率),其为棕色泡沫状物。将泡沫状物由DCM/己烷浓缩(3X),得到极浅的棕色泡沫状物。HPLC>95%面积。LC/MS (APCI+) m/z 333 [M+H]+.

[0201] 步骤9:将三乙胺(4.33ml,31.1mmol;在使用前用氮气脱气30分钟)和甲酸(1.36ml,36.1mmol;在使用前用氮气脱气30分钟)加入至(R)-4-(5-甲基 -7-氧代-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(9.75g, 29.3mmol)在DCM(210mL;在使用前用氮气脱气30分钟)中的溶液中。将混合物搅拌5分钟,然后加入Ru催化剂(0.0933g, 0.147mmol)。将反应混合物在氮气正压力下搅拌过夜(18小时)。将反应混合物浓缩干燥并在高真空干燥。将不纯的物质在Biotage 65M上进行快速色谱法纯化(用1:1的DCM:乙酸乙酯500mL载入,冲洗,然后1:4的DCM:乙酸乙酯直到洗脱出产物(第二斑点),然后梯度为纯的乙酸乙酯,然后用25:1的DCM:MeOH洗脱剩余产物)。合并馏分并在旋转蒸发器上浓缩。将残留物再次由DCM/己烷浓缩得到4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(主要)和4-((5R,7S)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶 -4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(次要)的混合物(9.35g,95.3%的收率),其为米色泡沫状物。LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]+。通过积分原醇甲川,1H NMR (CDCl₃) 显示88%de。

[0202] 步骤10:将4-硝基苯甲酰氯(4.27g,23.0mmol)加入至4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(7.0g,20.9 mmol)和三乙胺(4.38ml,31.4mmol)在DCM(110mL)中的0℃溶液中。将反应混合物在室温搅拌过夜,之后加入饱和NaHCO₃。将混合物搅拌10分钟,然后用DCM萃取。将合并的萃取物干燥(Na₂SO₄),滤过,并浓缩。将粗物质在Biotage 65M上进行快速色谱法纯化(用3:1的己烷:乙酸乙酯载入产物,然后用2:1的己烷:乙酸乙酯洗脱出4-((5R,7R)-5-甲基-7-(4-硝基苯甲酰基氧基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯和少量混合馏分)。然后使用1:2的己烷:乙酸乙酯洗脱4-((5R,7S)-5-甲基-7-(4-硝基苯甲酰基氧基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯。将含有产物的馏分经旋转蒸发浓缩得到4-((5R,7R)-5-甲基-7-(4-硝基苯甲酰基氧基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌

嗪-1-羧酸叔丁酯(8.55g, 84.5%的收率), 其为黄色泡沫状物。LC/MS (APCI+) m/z 484 [M+H]⁺。¹H NMR (CDCl₃) 显示单一非对映异构体)。将含有其它非对映异构体的馏分经旋转蒸发浓缩得到4-((5R,7S)-5-甲基-7-(4-硝基苯甲酰基氧基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基) 味嗪-1-羧酸叔丁酯(0.356g, 3.52%的收率), 其为棕色泡沫状物。LC/MS (APCI+) m/z 484 [M+H]⁺。

[0203] 步骤11: 将LiOH-H₂O (0.499g, 11.9mmol) 加入至4-((5R,7R)-5-甲基-7-(4-硝基苯甲酰基氧基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基) 味嗪-1-羧酸叔丁酯(2.30g, 4.76mmol) 在2:1的THF:H₂O (40mL) 中的0℃溶液中。将反应混合物温热至室温并搅拌1小时。将THF经旋转蒸发除去, 加入饱和NaHCO₃, 并将混合物用乙酸乙酯萃取。将合并的萃取物用饱和NaHCO₃洗涤(1X), 干燥(Na₂SO₄), 滤过, 并浓缩得到4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基) 味嗪-1-羧酸叔丁酯(1.59g, 100.0%的收率), 其为黄色泡沫状物。后处理后的HPLC产生>98面积%的纯度。LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]⁺。使用类似方法制备4-((5R,7S)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基) 味嗪-1-羧酸叔丁酯。

[0204] 步骤12: 将4M HCl/二噁烷(11.2ml, 44.9mmol) 加入至4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基) 味嗪-1-羧酸叔丁酯(0.600g, 1.79mmol) 在二噁烷(15mL) 中的溶液中。将反应混合物在室温在氮气下搅拌过夜(20小时)。将混合物浓缩干燥并在高真空线上干燥。将粗物质混悬于乙醚中, 超声, 并搅拌5分钟。将固体在氮气压力下经中等玻璃料漏斗滤过分离, 用乙醚淋洗, 在氮气压力下干燥, 并在高真空线上进一步干燥得到(5R,7R)-5-甲基-4-(味嗪-1-基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-7-醇二盐酸盐(0.440g, 79.8%的收率), 其为黄色粉末。LC/MS (APCI+) m/z 235。使用类似方法制备(5R,7S)-5-甲基-4-(味嗪-1-基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-7-醇二盐酸盐。

[0205] 步骤13: 将2-(4-氯苯基)乙酸甲酯(36.7g, 199mmol) 和多聚甲醛(6.27g, 209mmol) 溶于/混悬于DMSO(400mL) 中并用NaOMe(537mg, 9.94mmol) 处理。将混合物在室温搅拌2小时, 经粗物质的TLC分析显示完成。将反应混合物倒入冰冷的水(700mL; 白色乳状物) 中并通过加入1M HCl溶液中和。将水层用乙酸乙酯萃取(3X), 并合并有机层。将有机层用水洗涤(2X), 用盐水洗涤(1X), 分离, 经MgSO₄干燥, 滤过, 并真空浓缩得到粗产物, 其为黄色油状物。将残留物载入至含有硅胶的大玻璃料滤器上并用9:1的己烷:乙酸乙酯洗脱直到开始收集起始物质/烯烃。然后将填料用1:1的己烷:乙酸乙酯洗脱直到完全洗脱出纯的预期产物。浓缩的纯馏分得到2-(4-氯苯基)-3-羟基丙酸甲酯, 其为无色油状物(39.4g, 92%)。

[0206] 步骤14: 将2-(4-氯苯基)-3-羟基丙酸甲酯(39.4g, 184mmol) 溶于DCM(500mL) 中并用TEA(64.0mL, 459mmol) 处理。将溶液冷却至0℃并用MsCl(15.6mL, 202mmol) 缓慢处理, 然后搅拌30分钟, 经TLC分析显示完成。将溶液用1N HCl溶液分配, 并将水层用DCM萃取一次。将合并的有机层用1N HCl溶液洗涤一次以上, 分离, 用稀NaHCO₃溶液洗涤, 并分离。将有机层经MgSO₄干燥, 滤过, 并真空浓缩得到橙色油状物。将残留物载入至具有硅胶填料的大玻璃料滤器上并用9:1的己烷:乙酸乙酯洗脱, 经TLC分析显示, 得到纯的预期产物。浓缩的纯馏分得到2-(4-氯苯基)丙烯酸甲酯, 其为无色油状物(30.8g, 85%)。在0℃将该2-(4-氯苯基)丙烯酸甲酯(500mg, 2.54mmol) 在THF(1.35mL) 中的溶液加入至i-PrNH₂(217uL,

2.54mmol) 在 THF (5.0mL) 中的搅拌的溶液中。将反应混合物在室温搅拌过夜, 经LCMS 分析显示完成。将Boc20 (584uL, 2.54mmol) 加入至经移液管搅拌的胺中。将反应混合物搅拌过夜, 经混合物的LCMS和TLC分析显示完成。将溶液真空浓缩得到3- (叔丁氧基羰基(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸甲酯, 其为无色油状物 (854mg, 94%)。LC/MS (APCI+) m/z 256.1 [M-Boc]⁺.

[0207] 步骤15: 将3- (叔丁氧基羰基(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸甲酯 (133g, 374mmol) 溶于THF (1.0L) 中并用KOTMS (56.0g, 392mmol) 在室温处理。将混合物搅拌过夜, 经粗物质的LCMS分析显示完成。将混合物真空浓缩得到湿的泡沫状物, 将其在真空下干燥过夜得到3- (叔丁氧基羰基(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸钾, 其为白色固体 (148.7g, 105%)。LC/MS (APCI+) m/z 242.1 [M-Boc-K]⁺.

[0208] 步骤16: 将3- (叔丁氧基羰基(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸钾 (77.2g, 203mmol) 溶于THF (515mL) 中并用特戊酰氯 (26.3mL, 213mmol) 在室温处理。将混合物搅拌3小时, 形成混合酸酐。将(S)-4-苄基噁唑烷-2-酮 (46.1g, 260 mmol) 溶于THF (600mL) 中并在分离烧瓶中冷却至-78°C。将溶液用n-BuLi (102mL 2.50M己烷溶液, 254mmol) 处理并搅拌一小时。将制备的酸酐溶液经插管加入至搅拌的Li-噁唑烷酮中, 并将混合物温热至室温过夜。将混合物通过加入饱和氯化铵溶液进行淬灭, 然后在更多的水和乙酸乙酯之间分配。将水层萃取若干次, 并合并有机层。将有机层用水洗涤, 然后用盐水洗涤, 分离, 经MgSO₄干燥, 滤过, 并真空浓缩。将残留物经色谱法(硅胶, 用4:1的己烷:乙酸乙酯洗脱)纯化/分离(非对映异构体)得到完全分离的非对映异构体, 其为粘稠的油状物: (R)-3- ((S)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-(4- 氯苯基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯 (12.16g, 24% 基于1/2的酸外消旋化合物) 和 (S)-3- ((S)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-(4-氯苯基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯 (39.14g, 77% 基于1/2的酸外消旋化合物)。LC/MS (APCI+) m/z 401.2 [M-Boc]⁺.

[0209] 步骤17: 在室温将LiOH-H₂O (168mg, 4.00mmol) 加入至THF (30mL) 和水 (15mL) 的搅拌溶液中直到其溶解。将混合物用过氧化氢 (658uL的35% wt. 水溶液, 8.00mmol) 处理并在室温搅拌10分钟。将反应混合物用冰浴冷却至0°C并历时10分钟经滴加漏斗逐滴加入 (S)-3- ((S)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3- 基)-2-(4-氯苯基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯 (1.00g, 2.00mmol) 在 THF (15mL) 中的溶液。将混合物在室温搅拌过夜, 经粗物质的LCMS分析显示完成。将反应混合物冷却至0°C, 然后历时10分钟经滴加漏斗用1M Na₂SO₃ (9.00mL) 溶液处理。加入完成后, 将混合物温热至室温达10分钟。将混合物浓缩, 除去THF, 然后用水稀释。将水层用乙酸乙酯洗涤两次(弃去)。将水层用乙酸乙酯分配, 然后在搅拌下用1M HCl逐滴处理, 直到达到 pH 2-3。将水层用乙酸乙酯萃取两次, 并合并有机层。将有机层用盐水洗涤, 分离, 经MgSO₄干燥, 滤过, 并真空浓缩。将无色油状产物在高真空干燥1 小时, 得到 (S)-3- (叔丁氧基羰基(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸, 其为粘稠的油状物/泡沫状物 (685mg, 100%)。LC/MS (APCI+) m/z 242.1 [M-Boc]⁺.

[0210] 步骤18: 将 (5R,7R)-5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-7-醇二盐酸盐 (2.92g, 9.51mmol) 和 (S)-3- (叔丁氧基羰基(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸 (3.25g, 9.51mmol) 在DCM (40mL) 和DIEA (5.0mL, 28.7mmol) 中的溶液在室温搅拌10分钟。将HBTU (3.61g, 9.51mmol) 加入至混合物中。将混合物在室温搅拌1小时。除去溶剂, 并将残

留物溶于乙酸乙酯(500mL)中并用水洗涤(6X 100mL)。将有机相干燥并浓缩。使得残留物进行柱色谱法纯化(经EtOAc-DCM/MeOH(20:1)洗脱)得到(S)-2-(4-氯苯基)-3-(4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(3.68g,69%)。LC/MS(APCI+) m/z 558.2 [M+H]⁺。

[0211] 步骤19: 将(S)-2-(4-氯苯基)-3-(4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(2.50g, 4.48mmol)溶于二噁烷(22.4mL)中并用4M HCl在二噁烷中的溶液(22.4mL, 89.6mmol)在室温处理。将所得的溶液搅拌过夜, 经粗物质的LCMS 分析显示完成。将溶液真空浓缩, 得到胶状物, 将其溶于最少量的甲醇(10mL) 中。将溶液经移液管转移至搅拌的乙醚(300mL)中, 得到白色的预期产物沉淀物。当添加进行至约一半时, 白色沉淀物熔化为黄色胶状物。将物质真空浓缩得到黄色胶状物, 将其减压静置过夜得到(S)-2-(4-氯苯基)-1-(4-((5R,7R)-7-羟基-5-甲基-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-(异丙基氨基)丙-1-酮二盐酸盐, 其为浅黄色粉末(2.14g, 90%)。¹H NMR(D₂O, 400MHz) 8.39(s, 1H), 7.37-7.35(d, J=8.4Hz, 2H), 7.23-7.20(d, J=8.4Hz, 2H), 5.29-5.25(m, 1H), 4.33-4.29(m, 1H), 4.14-4.10(m, 1H), 3.89-3.19(m, 11H), 2.23-2.17(m, 1H), 2.08-1.99(m, 1H), 1.20-1.18(m, 6H), 0.98-0.96(d, J=6.8Hz, 3H). MS(APCI+) [M+H]⁺ 458。

[0212] 实施例2体外细胞增殖测定

[0213] 式I的化合物与某些特定化学治疗剂的组合的体外效能可使用CellTiter-Glo[®] 荧光细胞存活测定(可由Promega Corp., Madison, WI商购得到) 进行测量。该均质测定(homogeneous assay)方法基于同翅目萤光素酶的重组表达(US 5583024; US 5674713; US 5700670) 并基于存在的ATP(代谢活性细胞的指示物)的定量确定培养物中活细胞的数目(Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; US 6602677)。所述CellTiter-Glo[®] 测定以96或384 孔模式进行, 使其可进行自动高通量筛选(HTS) (Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404)。所述均质测定操作包括将单一试剂(CellTiter-Glo[®] Reagent) 直接加到在血清补充的培养基中孵育的细胞中。不需要洗涤细胞、除去培养基和多次移液步骤。在加入试剂并混合后的10分钟内, 在384-孔模式中系统检出低至15个细胞/孔。

[0214] 所述均质“加入-混合-测量(add-mix-measure)”模式导致细胞溶解并产生与存在的ATP的量成比例的荧光信号。ATP的量与在培养物中存在的细胞数目成正比。所述CellTiter-Glo[®] 测定产生“辉光型”荧光信号(由萤光素酶反应产生), 其具有通常大于五小时的半衰期, 依赖于细胞类型和所使用的培养基。以相对发光单位(RLU)反映活细胞。通过重组萤火虫萤光素酶使底物(甲虫萤光素(Beetle Luciferin))氧化性脱羧, 伴随着将ATP转化成AMP并产生光子。延长的半衰期使之不再需要使用试剂注射器并且使多板连续或多板分批模式加工具有灵活性。该细胞增殖测定可用于各种多孔模式, 例如96 或384孔模式。可通过光度计或CCD相机成像装置记录数据。呈现发光输出, 其为随时间测量的相对光单位(RLU)。

[0215] 实施例3体内肿瘤异种移植物效能

[0216] 本发明的代表性组合的效能通过将癌细胞的同种异体移植物或者异种移植物植

入啮齿动物中并将荷瘤动物用所述组合处理来进行体内测量。可变结果可取决于细胞系、在肿瘤细胞中存在或者不存在某些突变、给予化合物的顺序、给药方案以及其它因素而为预期的。将受试小鼠用药物或者对照(媒介物)处理并历时若干周或者更长时间监测以测量肿瘤体积倍增的时间、细胞死亡对数值和肿瘤抑制。针对在该模型中测试的本发明代表性组合的结果显示于附图中。附图中的数据表明代表性组合相比于单独给予各个药物而言提供了改善的结果。

[0217] 实施例4测量PTEN状态

[0218] PTEN状态可通过本领域已知的任何适当方法来测量。在一个实例中,使用IHC。可选择地,可使用蛋白质斑迹法分析。对PTEN的抗体可商购得到(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Cascade Biosciences, Winchester, MA)。针对PTEN状态的IHC和蛋白质斑迹法分析的示例性操作描述于 Neshat, M.S. et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR, Proc. Natl Acad. Sci. USA 98, 10314-10319 (2001) 和 Perren, A., et al. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast, American Journal of Pathology, Vol. 155, No. 4, October 1999。此外,与AKT突变、PI3K突变和Her2/ErbB2扩增相关的癌症可使用本领域已知的技术来鉴别。

[0219] 实施例5细胞存活测定

[0220] 将细胞以1500个细胞/孔的密度接种于黑色、透明底部的384-孔板(Catalog 353962; Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ)中并在37°C、5% CO₂孵育过夜至1.5天。然后将GDC-0068、GDC-0973或者其组合的连续稀释液加入至细胞中并孵育另外的96小时。按照制造商的操作说明所述通过测量细胞内三磷酸腺苷(ATP)水平来确定细胞存活率(CellTiter-Glo荧光细胞存活测定试剂盒; Catalog G7573; Promega, Madison, WI)。荧光信号记录于EnVision 2101多标签读取器(PerkinElmer; Waltham, MA)上。

[0221] 抑制百分数通过如下计算:用1减去暴露于GDC-0068和GDC-0973组合的细胞的相对光单位(RLU)除以暴露于DMSO的细胞的RLU的商值,如下所示:

$$\text{[0222]} \quad \% \text{ 抑制} = 1 - (\text{RLU}_{\text{组合}} / \text{RLU}_{\text{DMSO}})$$

[0223] BLISS分析对预期的%抑制($E = E_{\text{GDC-0068}} + E_{\text{GDC-0973}} - E_{\text{GDC-0068}} \times E_{\text{GDC-0973}}$)与实验观察的%抑制E_{OBS}进行比较.BLISS评分为预期的%抑制E与实验观察的%抑制E_{OBS}的差值($\Delta E = E_{\text{OBS}} - E$)。

[0224] BLISS评分定量了来自单一药物的增效程度且正性BLISS评分表明大于简单的相加作用。认为大于250的总体BLISS评分是在测试浓度范围内所观察到的强的协同作用。

[0225] 组合效能的实例显示为以下三种癌细胞系的热图:A2058,具有PTEN缺陷和B-RAF^{V600E}突变的黑色素瘤细胞系(参见图9);HCT-116,具有 PIK3CA^{H1047R}和KRAS^{G13D}突变的结肠直肠癌(CRC)细胞系(参见图5);和 NCI-H2122,具有KRAS^{G12C}突变的非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系(参见图7)。在所有三种细胞系中在0.37和10μM之间的GDC-0068浓度和在0.062和0.56μM之间的GDC-0973浓度观察到对于单独剂量对具有≥15的BLISS评分的强协同作用。

[0226] 为了进一步研究GDC-0068和GDC-0973之间的协同作用是否取决于 RAS/RAF和/或者PI3K/Akt途径的活化,在一系列衍生自黑色素瘤患者的细胞系中比较了组合效应:

MALME3M B-RAF^{V600E}转移性黑色素瘤细胞系和患者匹配的MALME3正常皮肤成纤维细胞。MALME3M细胞显示了对低浓度GDC-0973的敏感性,且也在低浓度的GDC-0973和宽浓度范围的 GDC-0068观察到强的协同作用,尽管缺乏GDC-0068的单一药物活性(参见图28)。相反,MALME3细胞对GDC-0973抵抗且在与GDC-0068的组合中未观察到协同作用(参见图29)。类似地,NCI-BL2122,其为来源于与NSCLC 细胞系NCI-H2122相同的患者的正常B淋巴母细胞,其也未显示出对 GDC-0973和GDC-0068组合的协同应答(参见图30),这与在NCI-H2122细胞中所观察的强的协同作用相反(参见图7)。这些结果表明MEK和Akt抑制剂组合的治疗益处可选择性地在其中RAS/RAF途径或者PI3K/Akt和 RAS/RAF两种途径均为活化的癌细胞中观察到。

[0227] 实施例6蛋白质斑迹法分析

[0228] 在培养皿(10cm²)中接种10mL体积的两百万个细胞,然后在37°C在 5%CO₂孵育过夜(约16小时)。将细胞暴露于1和3μM GDC-0068、0.25和 0.75μM GDC-0973或者1μM GDC-0068+0.25μM GDC-0973达3小时。暴露后,将细胞用冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤并在补充有蛋白酶抑制剂 (Roche,Germany)、1mM苯基甲磺酰氟 (PMSF) 和来自Sigma (St.Louis, MO) 的磷酸酶抑制剂混合物1和2的来自Biosource (Carlsbad, CA) 的1×细胞提取缓冲液中裂解。使用Bradford方法(Bio-Rad蛋白测定 (Bio-Rad; Hercules, CA) 确定蛋白浓度。对于免疫印迹,相同蛋白量通过电泳经三-甘氨酸4-20%梯度凝胶 (Invitrogen; Carlsbad, CA) 分开;使用来自Bio-Rad的Criterion系统和操作方案将蛋白转移至硝基纤维素膜上。

[0229] 除非另作说明,使用下述抗体,其均来自Cell Signaling Technologies (Beverly, MA) :

[0230] 抗-pAkt (S473)

[0231] 抗-pAkt (T308)

[0232] 抗-pMEK1/2 (S217/221)

[0233] 抗-pFox01 (T24) /Fox03a (T32)

[0234] 抗-pPRAS40 (T246)

[0235] 抗-p4EBP1 (T37/46)

[0236] 抗-pERK1/2 (T202/Y204)

[0237] 抗-pTSC2 (T1462)

[0238] 抗-pS6 (S235/236)

[0239] 抗-pS6 (S240/244)

[0240] 聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 和裂解的PARP

[0241] GAPDH (来自Advanced ImmunoChemical; Long Beach, CA)

[0242] 为了研究所述组合对Akt和MEK信号传导的作用,在暴露于1和3μM GDC-0068、0.25和0.75μM GDC-0973或者1μM GDC-0068与0.25μM GDC-0973组合的HCT-116CRC细胞中,通过蛋白质斑迹法评价Akt和MEK 的下游靶标,其中观察到协同作用。如在图24中显示,在所述组合观察到 Akt和MEK的下游靶标的组合的击倒效应,以及若干靶标诸如pTSC2、pS6 (s235/236和S240/244) 、PARP和裂解的PARP的增强的击倒效应,这显示出相比于甚至在更高剂量的单独使用的单一药物而言更好的击倒效应。

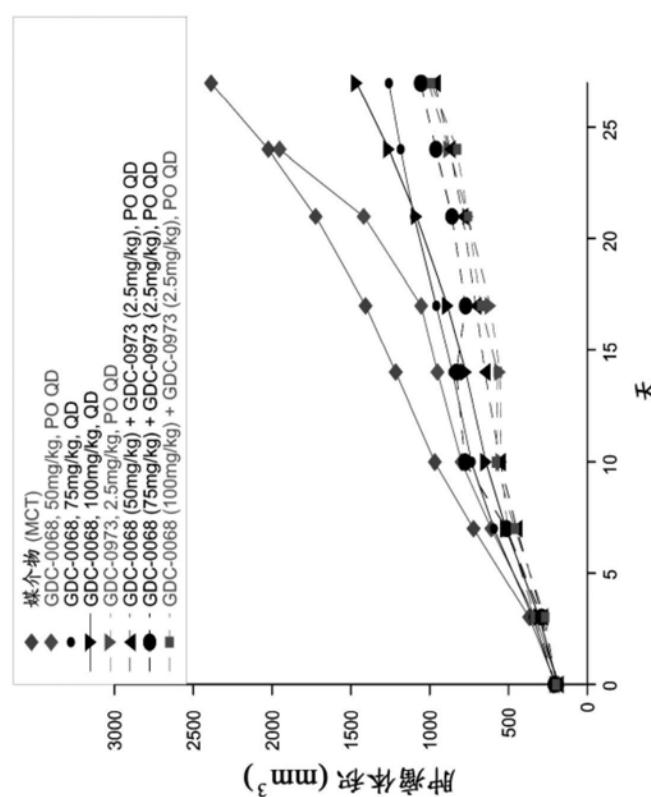
[0243] 实施例7流式细胞术测定

[0244] 将HCT-116细胞接种于96-孔组织培养板中。在37°C、5%CO₂过夜孵育后，将细胞暴露于增加浓度的GDC-0068或者GDC-0973或者组合中达4天。为了检测细胞凋亡，将100μL细胞混悬液加入至含有4mM CaCl₂、5μL 锚定蛋白V-异硫氰酸荧光素(FITC) (BD Pharmingen; Franklin Lakes, NJ) 和 5μg/mL碘化丙啶(PI) 的100μL PBS中。将混合物在冰上孵育30分钟并将细胞用流式细胞器(BD Biosciences; San Jose, CA) 进行分析。

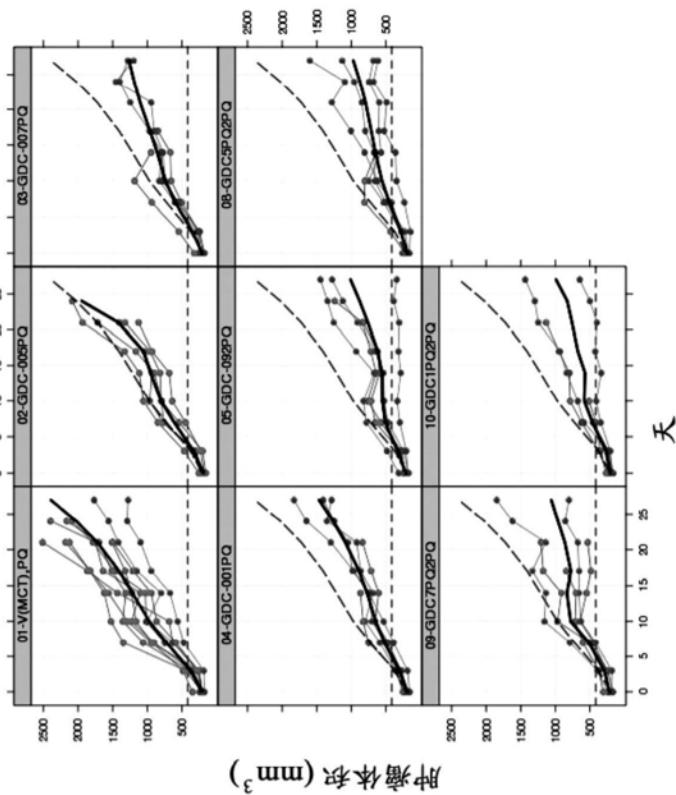
[0245] 碘化丙啶-(PI) 或者锚定蛋白V-(AV) 阳性细胞的百分数在每个单一药物或者GDC-0068和GDC-0973的组合对中测量，且细胞死亡诱导的协同作用经BLISS分析进行分析。相比于每个单独使用的单一药物，所述组合导致 PI⁺/AV⁺细胞的百分数增加，以及在0.37–10μM GDC-0068和0.185–0.556μM GDC-0973观察到强的协同作用(BLISS评分≥15)。因此，GDC-0068和 GDC-0973的组合也导致对在HCT-116细胞中的细胞死亡诱导的协同作用。

[0246] 此外，由于众多修改和变化将对于本领域技术人员而言是显而易见的，因此不期望将本发明限制为如上所述显示的精确构成和方法。相应地，可以认为，所有合适的修改和等效内容在下述权利要求书所定义的本发明范围之内。

平均肿瘤体积



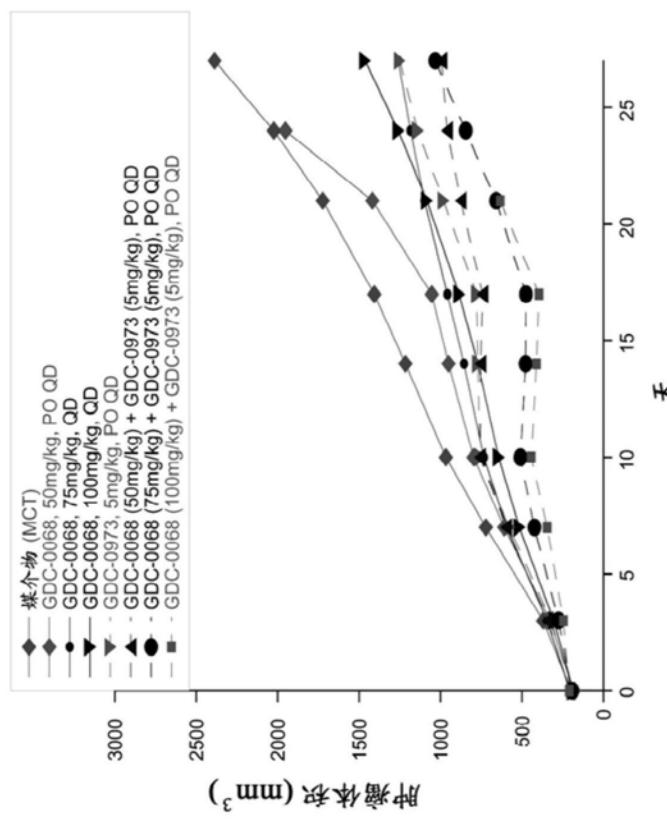
单个肿瘤体积



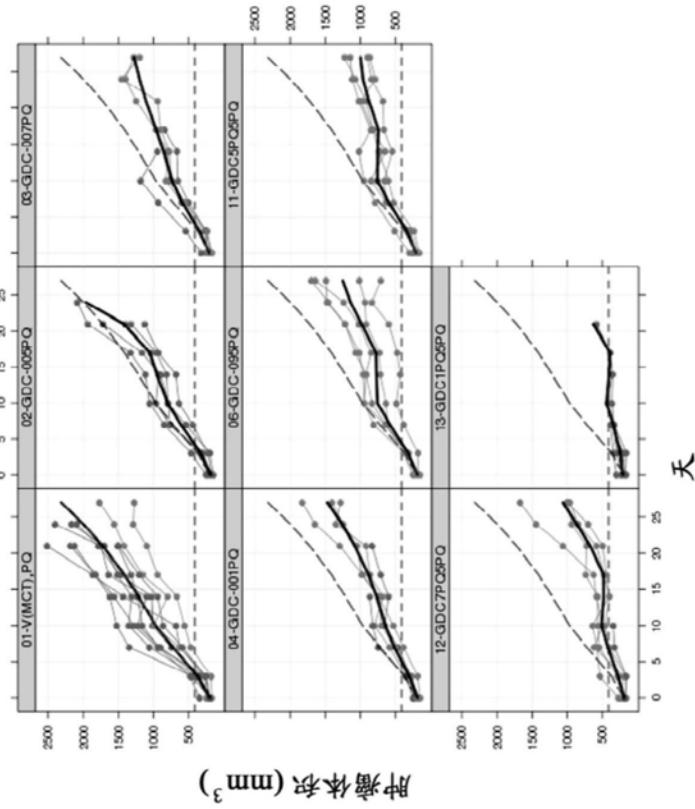
测试试剂	途径	方案	剂量 (mg/kg)	第 0 天 (n)	最后一天 (n)	最后一天 (体积) (下限 上限)	%TGI (下限 上限)	TTP 2X	TTP 5X	PR	CR	STI
媒介物 (MCT)	PO	QD	0 + 0	10	21	1715 0 (0, 0)	4	11.5	0	0	10	
GDC-0068	PO	QD	50 + 0	5	21	1457 -12, 45	4.5	17	0	0	5	
GDC-0068	PO	QD	75 + 0	5	21	1047 36 (6, 56)	4.5	NA	0	0	5	
GDC-0068	PO	QD	100 + 0	5	21	41053 41 (14, 60)	5.5	NA	0	0	5	
GDC-0973	PO	QD	0 + 2.5	5	21	747 60 (41, 73)	5.5	NA	0	0	5	
GDC-0973	PO	QD	0 + 5	5	21	949 40 (15, 58)	4.5	NA	0	0	5	
GDC-0973	PO	QD	0 + 7.5	5	21	862 45 (20, 62)	4.5	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	50 + 2.5	5	21	4786 55 (32, 69)	6.5	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	75 + 2.5	5	21	4792 43 (15, 61)	5.5	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	100 + 2.5	5	21	3750 59 (37, 74)	6.5	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	50 + 5	5	21	4879 43 (17, 62)	4.5	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	75 + 5	5	21	4641 68 (52, 80)	7.5	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	100 + 5	5	21	1635 78 (61, 90)	9.5	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	50 + 7.5	5	21	4577 74 (60, 83)	8	NA	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	75 + 7.5	5	21	2405 85 (74, 93)	NA	0	0	0	5	
GDC-0968+GDC-0973	PO	QD	100 + 7.5	5	21	2635 68 (46, 82)	8	NA	0	0	5	

图 1

平均肿瘤体积



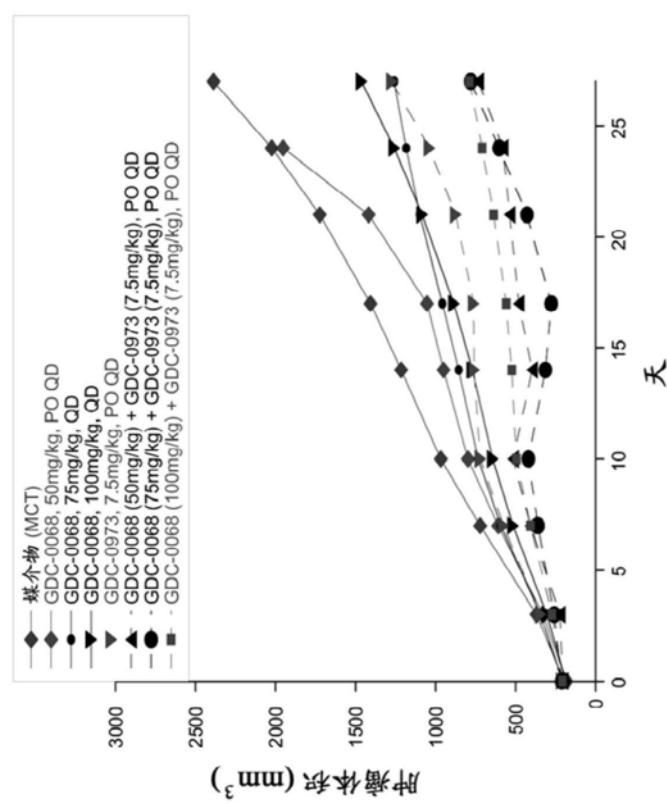
单个肿瘤体积



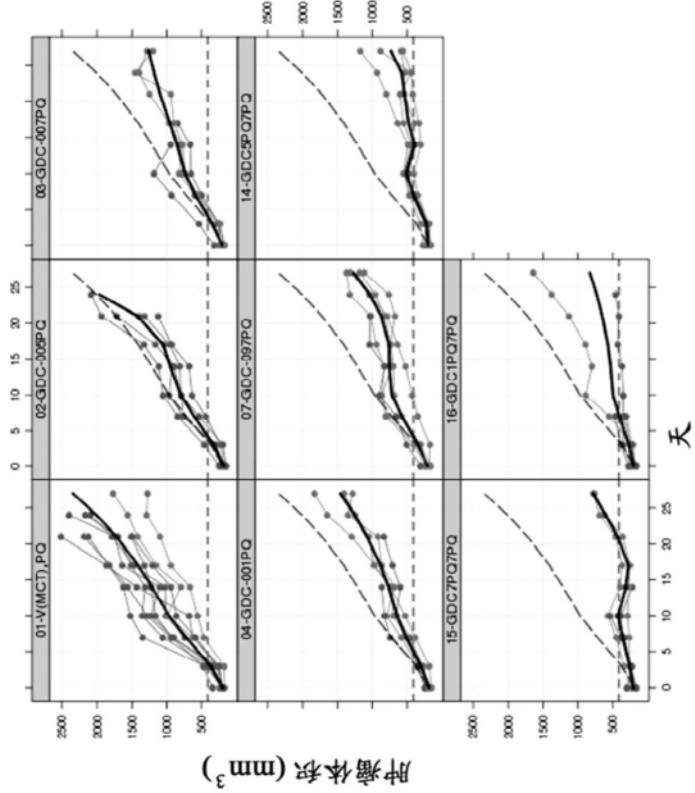
测试试剂	途径	方案	剂量 (mg/kg)	第 0 天 (n)	最后一天 (n)	最后一天 体积 (mm ³)	%TGI (下限, 上限)	TTP 2X	TTP 3X	PR	CR	STI
煤介物 (MCT)	PO	QD	0 + 0	10	21	1715	0 (0, 0)	4	11.5	0	0	10
GDC-0068	PO	QD	50 + 0	5	21	1457	22 (-12, 45)	4.5	17	0	0	5
GDC-0068	PO	QD	75 + 0	5	21	1047	36 (6, 56)	4.5	NA	0	0	5
GDC-0068	PO	QD	100 + 0	5	21	4	1053	41 (14, 60)	5.5	NA	0	0
GDC-0973	PO	QD	0 + 2.5	5	21	5	747	60 (41, 73)	5.5	NA	0	0
GDC-0973	PO	QD	0 + 5	5	21	5	949	40 (15, 58)	4.5	NA	0	0
GDC-0973	PO	QD	0 + 7.5	5	21	5	862	45 (20, 62)	4.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50 + 2.5	5	21	4	786	55 (32, 69)	6.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75 + 2.5	5	21	4	792	43 (15, 61)	5.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100 + 2.5	5	21	3	750	59 (37, 74)	6.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50 + 5	5	21	4	879	43 (17, 62)	4.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75 + 5	5	21	4	641	68 (52, 80)	7.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100 + 5	5	21	1	635	78 (61, 90)	9.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50 + 7.5	5	21	4	577	74 (60, 83)	8	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75 + 7.5	5	21	2	405	85 (74, 93)	NA	0	0	5
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100 + 7.5	5	21	2	635	68 (46, 82)	8	NA	0	0

图2

单个肿瘤体积



平均肿瘤体积



测试试剂	途径	方案	剂量 (mg/kg)	% 0 天 (n)	最后一天 (n)	最后一天 (体积)	%TGI (下限， 上限)	TTP 2X	TTP 5X	PR	CR	STI
媒介物(MCT)	PO	QD	0+0	10	21	1715	0(0.0)	4	11.5	0	0	10
GDC-0068	PO	QD	50+0	5	21	1457	22(12.45)	4.5	17	0	0	5
GDC-0068	PO	QD	75+0	5	21	1047	36(6.56)	4.5	NA	0	0	5
GDC-0068	PO	QD	100+0	5	21	4(14.60)	41	5.5	NA	0	0	5
GDC-0973	PO	QD	0+2.5	5	21	747	60(41.73)	5.5	NA	0	0	5
GDC-0973	PO	QD	0+5	5	21	949	40(15.58)	4.5	NA	0	0	5
GDC-0973	PO	QD	0+7.5	5	21	862	45(20.62)	4.5	NA	0	0	5
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50+2.5	5	21	4	786	55(32.69)	6.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75+2.5	5	21	4	792	43(15.61)	5.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100+2.5	5	21	3	750	59(37.74)	6.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50+5	5	21	4	879	43(17.62)	4.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75+5	5	21	4	641	68(52.80)	7.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100+5	5	21	1	635	78(61.90)	9.5	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	50+7.5	5	21	4	577	74(50.83)	8	NA	0	0
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	75+7.5	5	21	2	405	85(74.93)	NA	0	0	5
GDC-0068+GDC-0973	PO	QD	100+7.5	5	21	2	635	68(46.82)	8	NA	0	0

图3

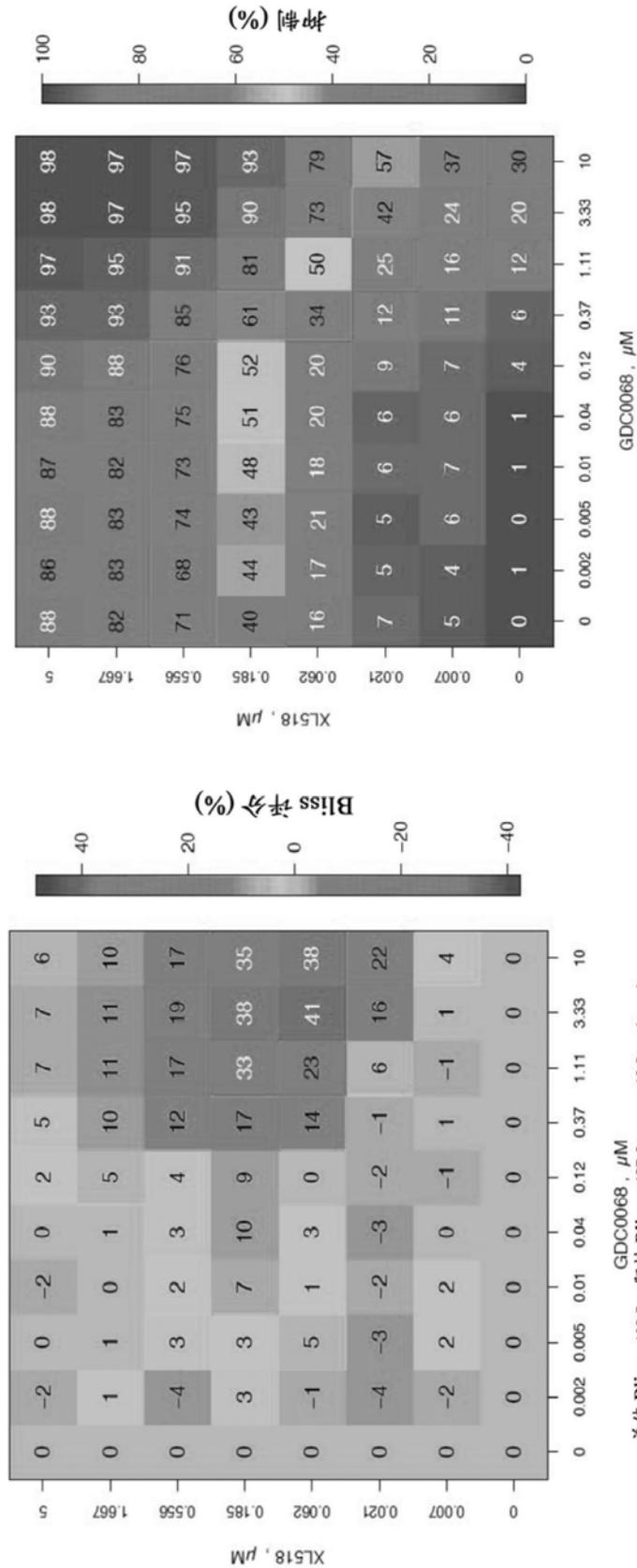
组织	细胞系	Akt 途径活化	Ras/Raf 活化	RTK	其它	IC50s		Bliss 评分
						GDC-0068	XL-518	
结肠	HCT-116 (PRC)*	PI3K H1047R	Kras G13D	E-Cad, RER+	>10	0.25	488	460
结肠	DLD-1 (PRC)*	PI3K E545K,D549N	Kras G13D	p53, RER+	>10	3.15	367	339
结肠	LS174T (PRC)*	PI3K H1047	Kras G12D	E-Cad, RER+	9.13	0.25	269	242
结肠	HM-7	PI3K H1047	Kras G12D		7.09	0.57	228	140
结肠	LS180	PI3K H1047R, P421L	Kras G12D	RER+	>10	0.08	226	173
结肠	HT-29 (PRC)*	PI3K L566F, L569F,P449T	Braf V600E	p53	>10	0.01	204	201
结肠	SW620 (PRC)*		Kras G12V	RER+	>10	0.11	199	156

XL518								
	细胞系	分子亚型	PI3K 活化	MAPK 活化	GDC-0068 IC50 (uM)	Run1	Run2	Run3
CRC	KM12		PTEN- AKT2 mut	KRAS	2.3	6/29/2009	7/10/2009	8/17/2009
CRC	Lovo		PI3K Mut	KRAS	2.25			
CRC	LS180		PTEN- PI3K Mut	BRAF	max	S		
CRC	MDST8		PTEN- PI3K Mut	BRAF	max	S		
CRC	HT-29			BRAF	max			

- 高频率的 PI3K 和 Ras 途径突变共存
- 在具有两种途径突变的细胞中观察到强的增效作用

图 4

HCT-116 (PRC) run 2



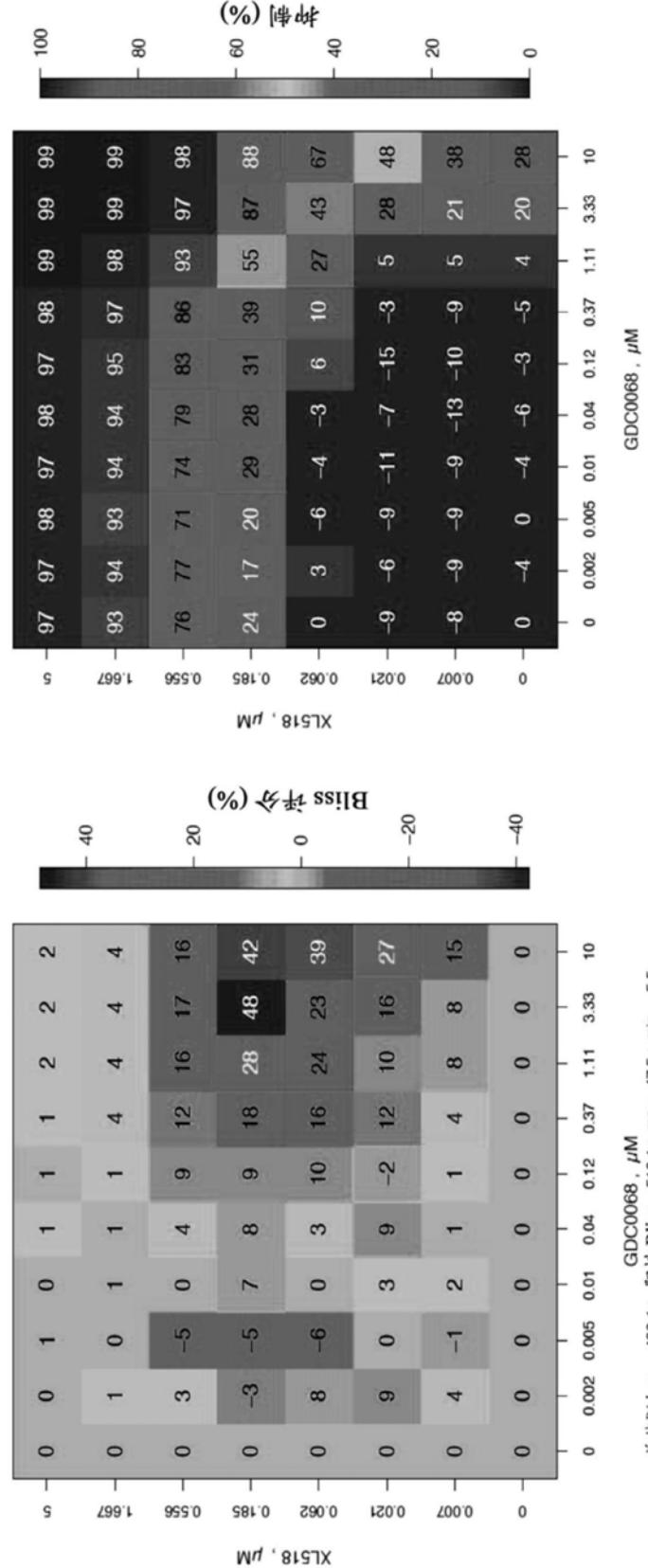
Bliss 评分范围 : GDC-0973 0.021-0.185 μM , GDC-0068 0.37-10 μM

组织	细胞系	Akt 途径活化	Ras/Raf 活化	RTK	其它	IC50s		Bliss 评分
						GDC-0068	XL-518	
肺 -NSCLC	H460 (PRC)*	P13K E545K	Kras Q61H	EGFR L933P	LKB1	>10	>5	545
肺-NSCLC	NCI-H2122		Kras G12C		p53, LKB1	>10	0.3	518
肺-NSCLC	H1299 (PRC)*		Nras Q61K		p53	>10	3.01	429
肺-NSCLC	SK-MES-1 (PRC)*	P13K L997P	Kras N85K		p53	>10	0.50	426
肺-NSCLC	MV522 (PRC)*		Braf V600E			>10	0.04	304
肺-NSCLC	A549 (PRC)*	P13K M772X, N996H	Kras G12S		p53, LKB1	>10	0.34	252
B 淋巴母细胞	NCI-BL2122					4.54	>5	12
								-549

XL518								
细胞系	分子亚型	PI3K 活化	MAPK 活化	GDC-0068 IC50 (μM)	Run1	Run2	Run3	
					6/29/2009	7/10/2009	8/17/2009	
NSCLC	NCI-H2122	WT	KRAS	max		S		
NSCLC	NCI-H460	PI3K mut	KRAS	max	S	S	S	

- 高频率的 PI3K 和 Ras 途径突变共存
- 在所有测试细胞（包括只具有 Ras/Raf 突变而不具有已知的 PI3K 途径突变的细胞）中观察到强的增效作用

NCI-H2122 run 7

Bliss 评分范围：GDC-0973 0.021-0.185 μM , GDC-0068 0.37-10 μM

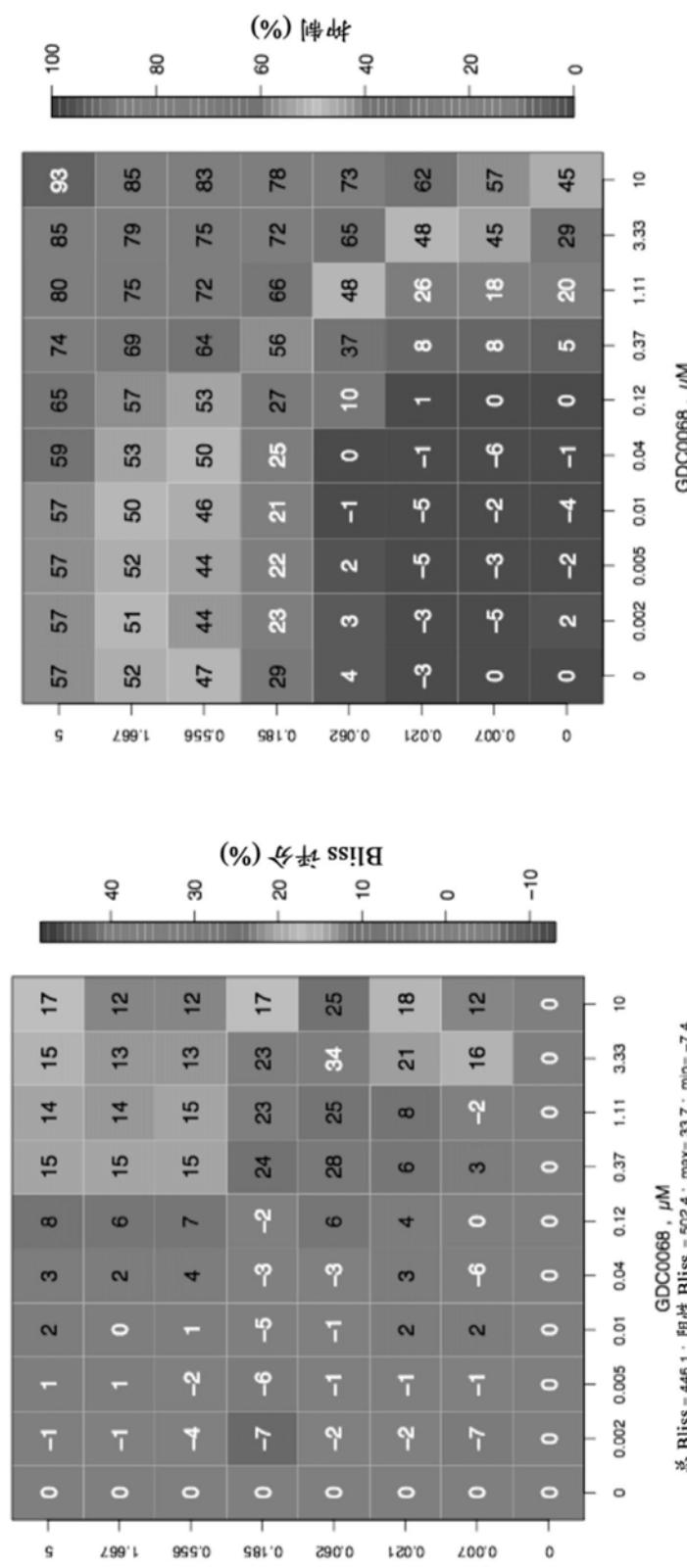
组织	细胞系	Akt 途径活化	Ras/Raf	RTK	其它	IC50s		Bliss 评分
			活化			GDC-0068	XL-518	
黑色素瘤	MALME3M		Braf V600E			>10	0.07	719
黑色素瘤	A375	Akt3 hi	Braf V600E			>10	0.01	553
黑色素瘤	A2058	PTEN-	Braf V600E	p53		>10	0.6	502
黑色素瘤	537MEL	PTEN-	Braf del,amp			2.33	0.02	434
正常成纤维细胞	MALME3					5.02>5		42
								-142

- 主要为 Braf 突变，通常与 PTEN-、有时与 PI3K 突变或 Akt3 过表达共存

- 在所有测试的黑色素瘤细胞（包括只具有 BRaf 突变而不具有已知的 PI3K 途径突变的细胞）中观察到强的增效作用

图8

BLISS A2058 run 1



细胞系	组织	Bliss 评分										Max % 抑制	
		PTEN	PI3K	Kras	Braf	其它	GDC-0068	GDC-0973	# Combo BS>15	总计	[GDC-0068] Max @ Max	[GDC-0973] Max @ Max	组合
A2058	黑色素瘤	N											

Bliss 评分范围: GDC-0973 0.21uM-0.185uM, GDC-0068 0.37-10uM
Brian B Lee, Kui Lin

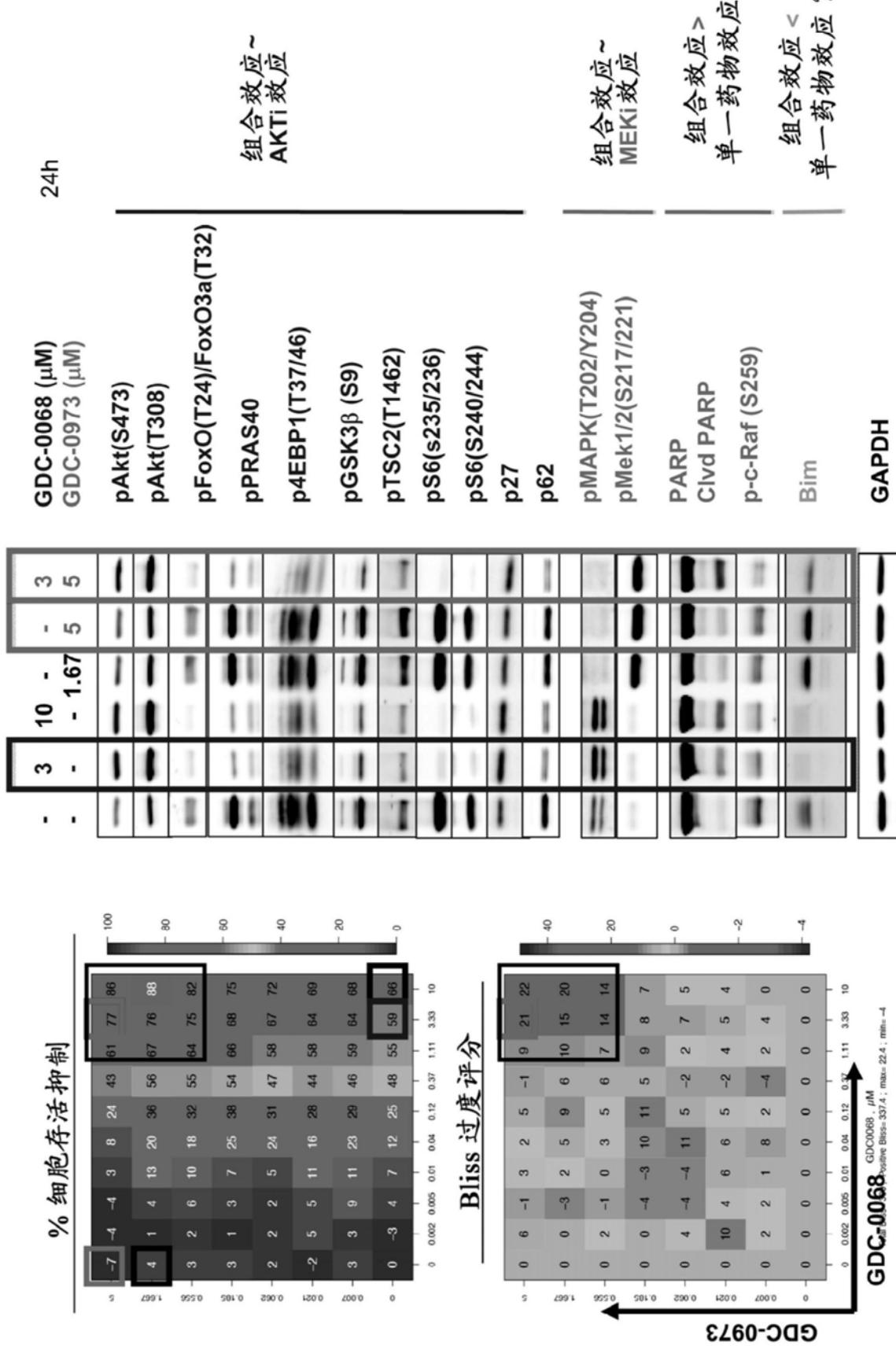


图10

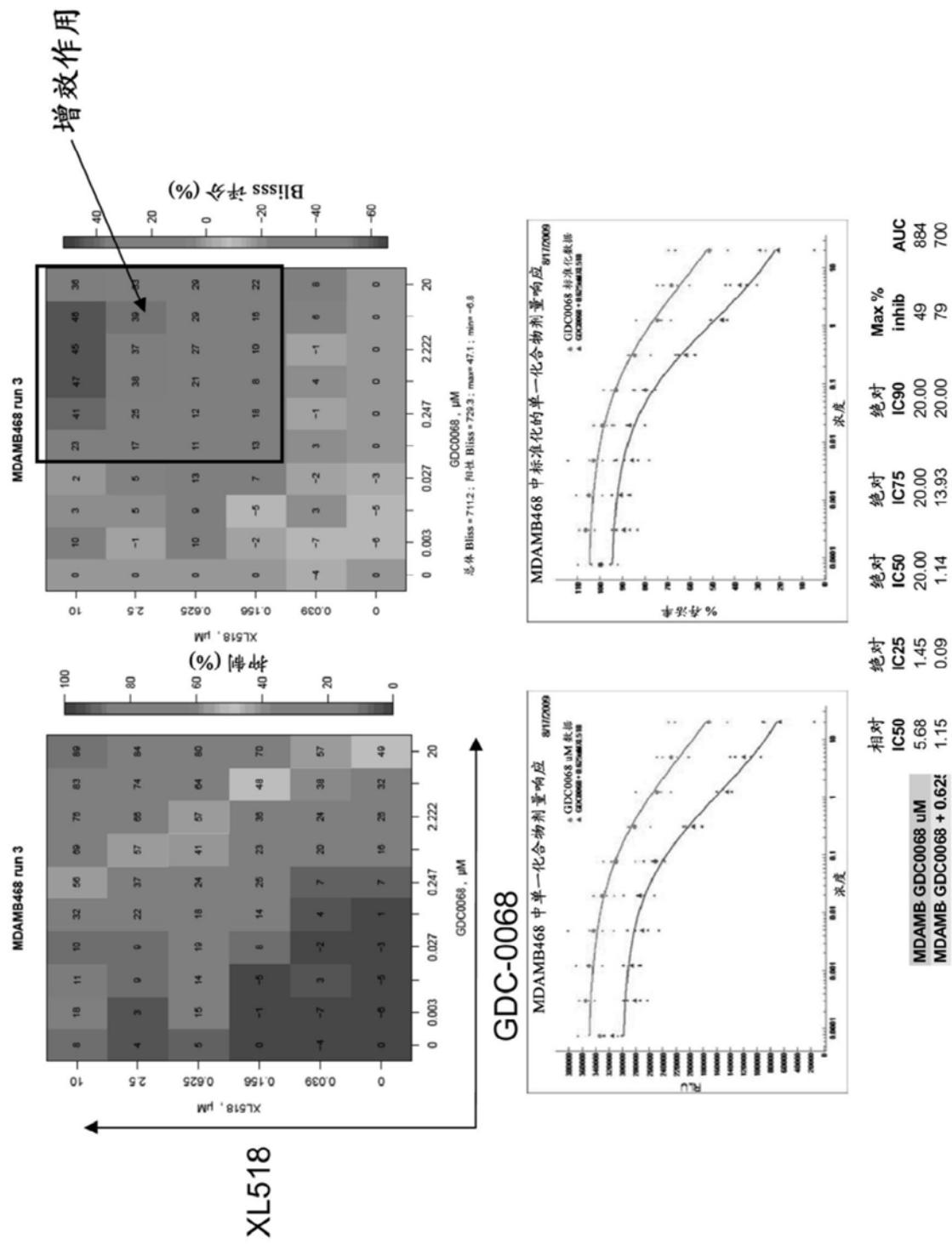


图 11

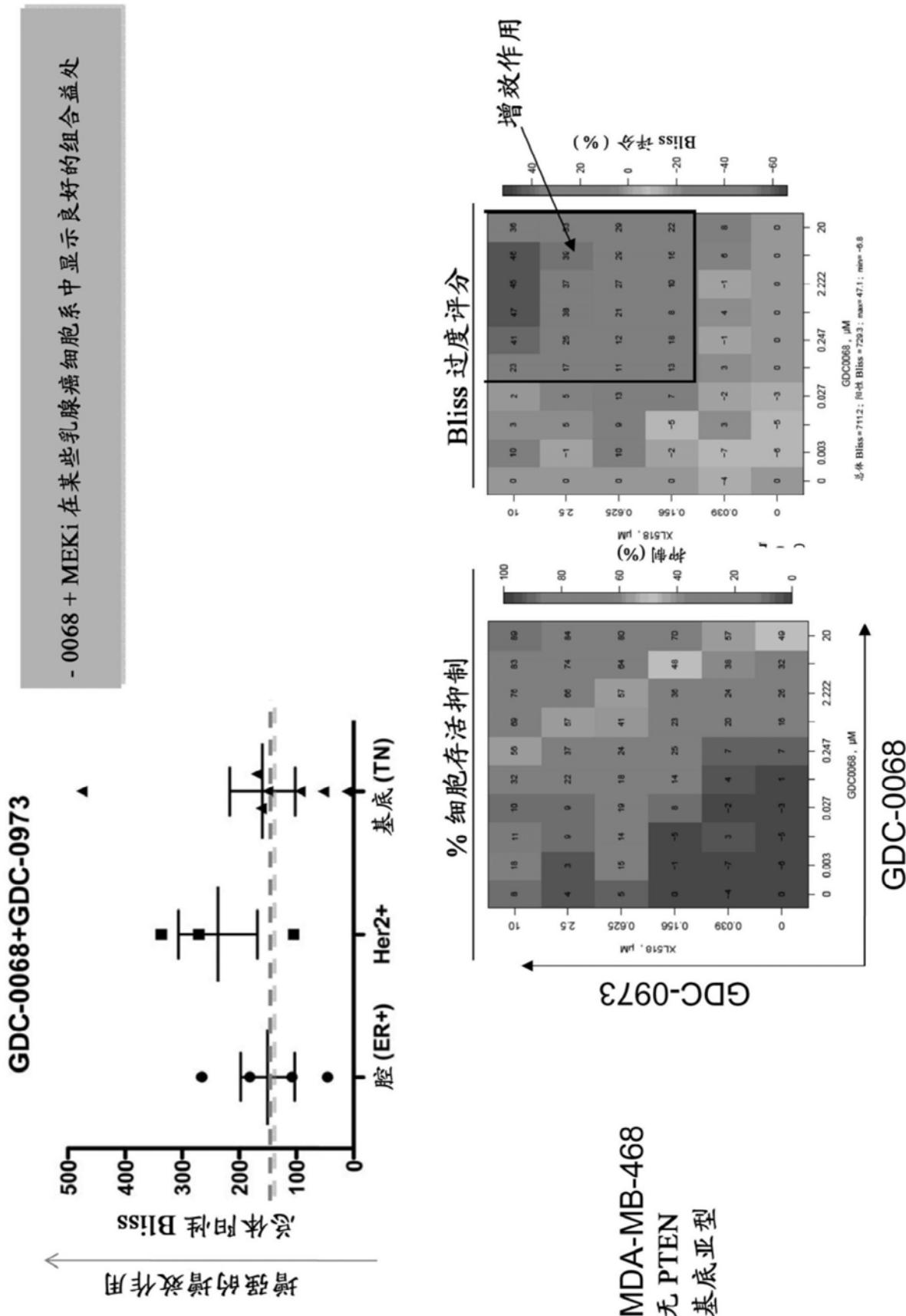


图12

组织	细胞系	Akt 途径活化	Ras/Raf 活化	RTK	其它	IC50s		Bliss 评分	
						GDC-0068	XL-518	总体阳性	总体
卵巢	OVCAR-3	PI3Kp110amp, p85mut, Akt2amp		p53	ND	9.04>5		575	573
	PEO1	ND	ND	ND	>10		1.81	344	334
卵巢	TOV-21G	PTEN-, PI3K H1047Y	Kras G13C			0.67	2.48	298	282
卵巢	SK-OV-3 (PRC)*	PI3K H1047R			>10	>5		291	239
卵巢	IGROV1	PI3K O1069W		p53		0.66	0.39	237	211
卵巢	A2780 (PRC)*	PTEN mut			>10		0.98	131	43
卵巢	OV-90	Braf del	p53,p16	9.19	0.39			107	47

	细胞系	分子亚型	PI3K 活化	MAPK 活化	XL518			
					GDC-0068 IC50 (μM)	Run1 6/29/2009	Run2 7/10/2009	Run3 8/17/2009
卵巢	TOV21G		PTEN/PI3K	KRAS	0.558	s		
卵巢	CAOV3		PIK3CA 4 拷贝		max			
卵巢	EFO27		PTEN		0.55			
卵巢	OVCAR3		AKT2 amp		1.44			
卵巢	SKOV3		PI3K		max			

- 低频率的 PI3K 和 Ras 途径突变共存
- 在卵巢癌中牵涉 Raf-1 和 A-Raf 活化而不是 Braf 活化
- 在不具有已知的 Ras/Raf 突变的细胞（包括对 GDC-0068 单独抵抗或对两种药物同时抵抗的细胞）中观察到增效作用

XL518						
	细胞系	分子亚型	PI3K 活化	MAPK 活化	GDC-0068 IC50 (μM)	Run1 6/29/2009
前列腺	22RV1	PI3K Mut	BRAF	9.09	Run2 7/10/2009	Run3 8/17/2009
前列腺	DU145	WT		max		
前列腺	PC3	PTEN-		2.26		
前列腺	PC3MLN4	PTEN-		11.03		
			IC50>5			

- 低频率的 PI3K 和 Ras 途径突变共存
- 在同时具有 PI3K 和 Braf 突变的细胞系中观察到增效作用

图14

GDC-0973 5mg/kg QD

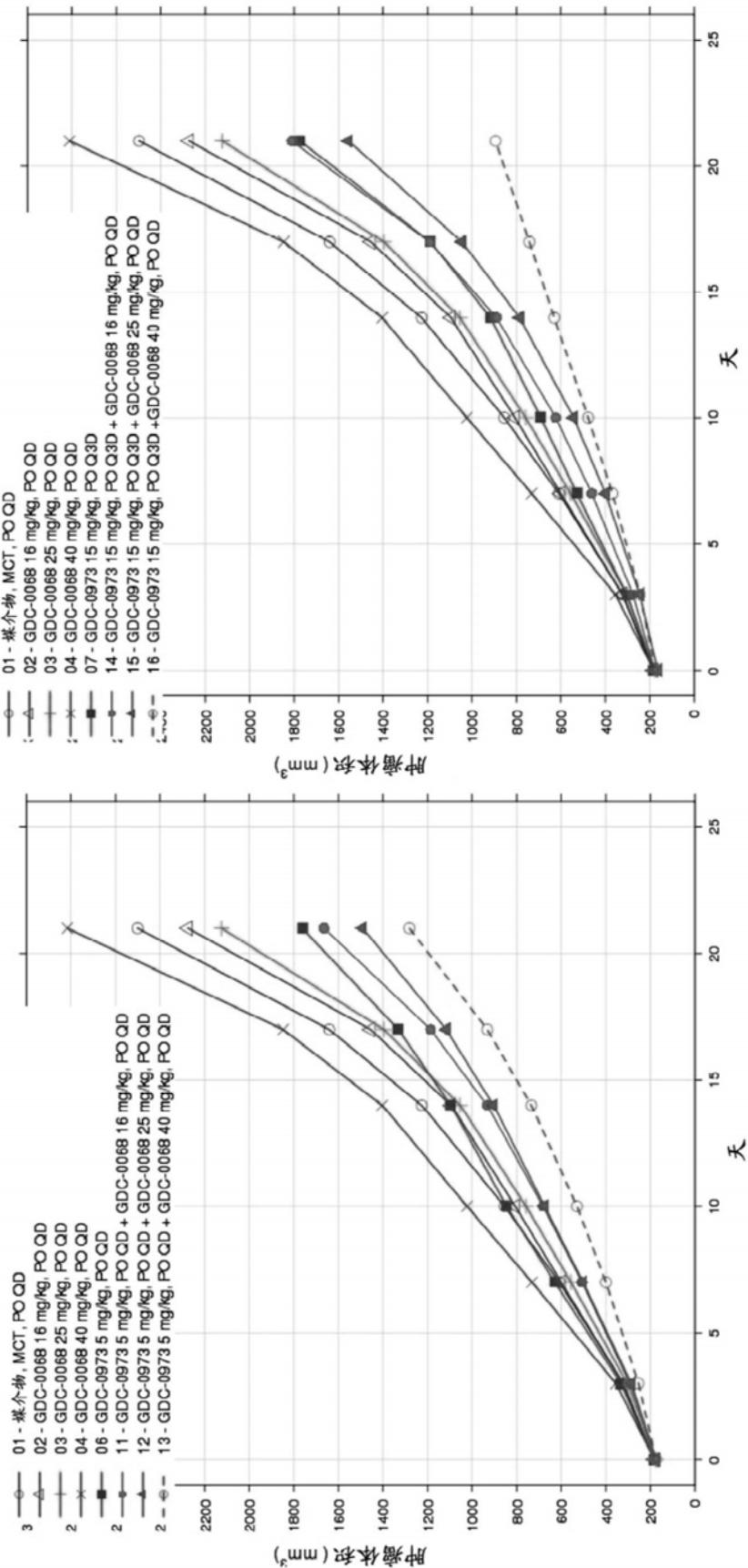


图15

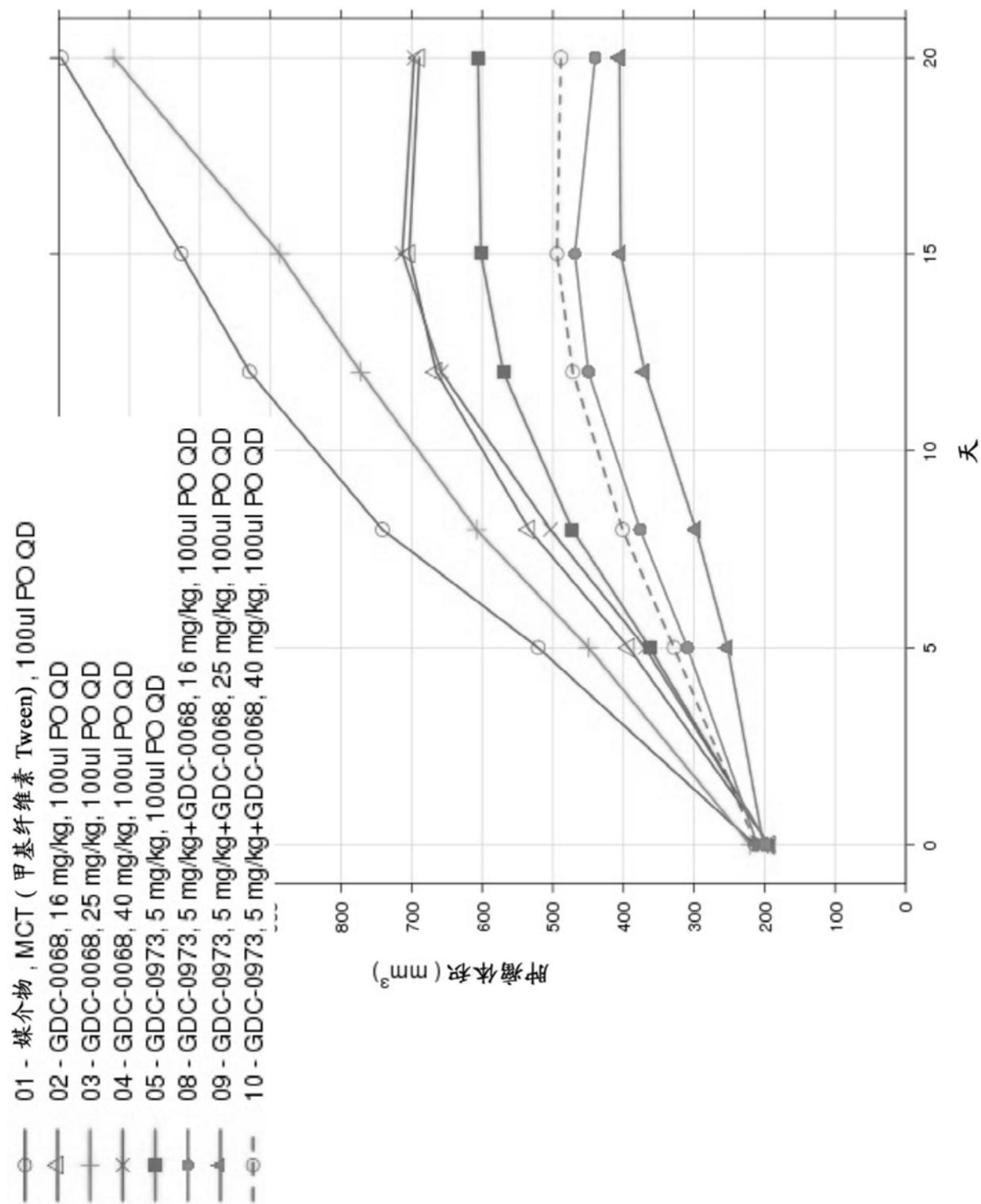


图16

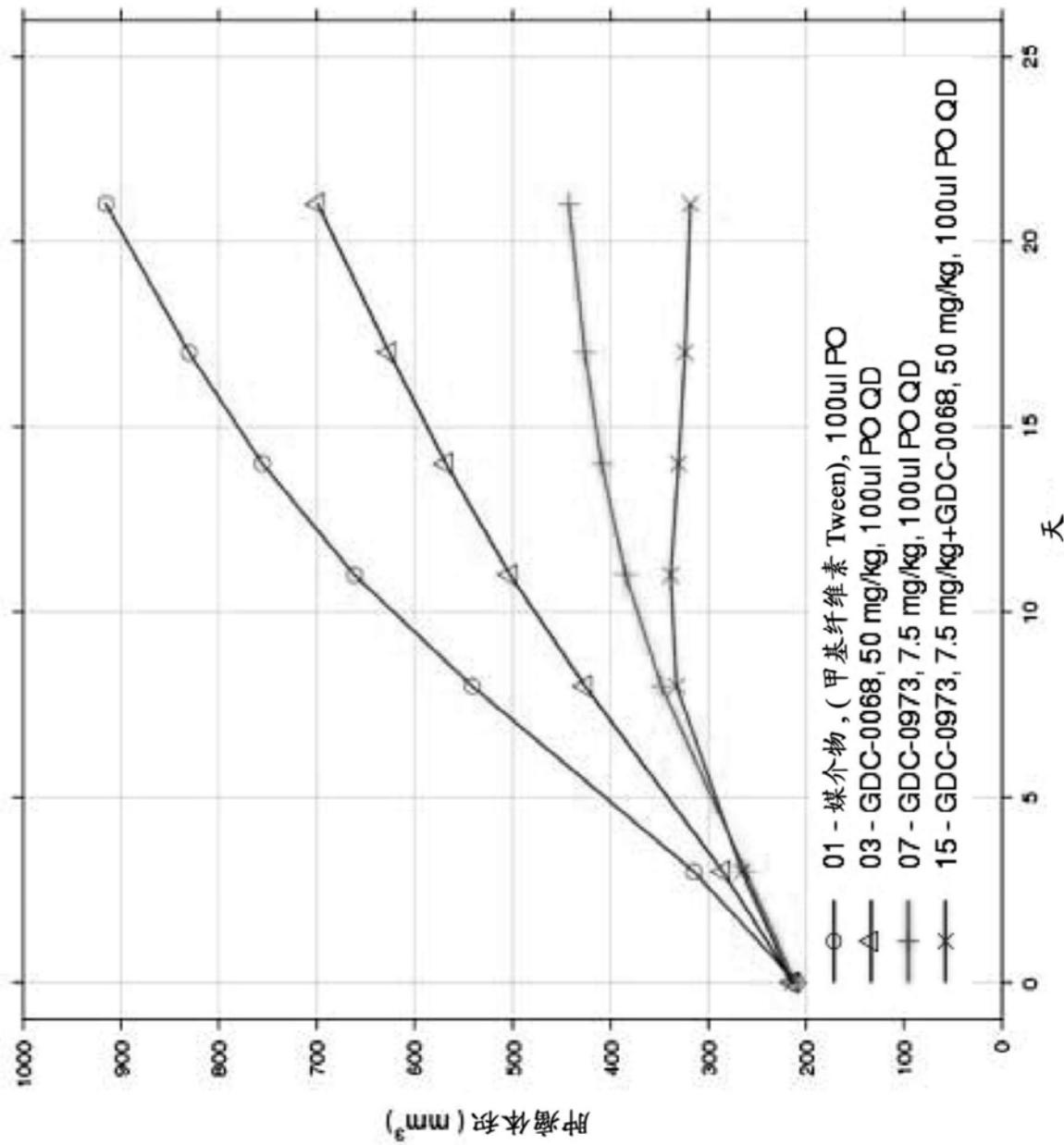


图17

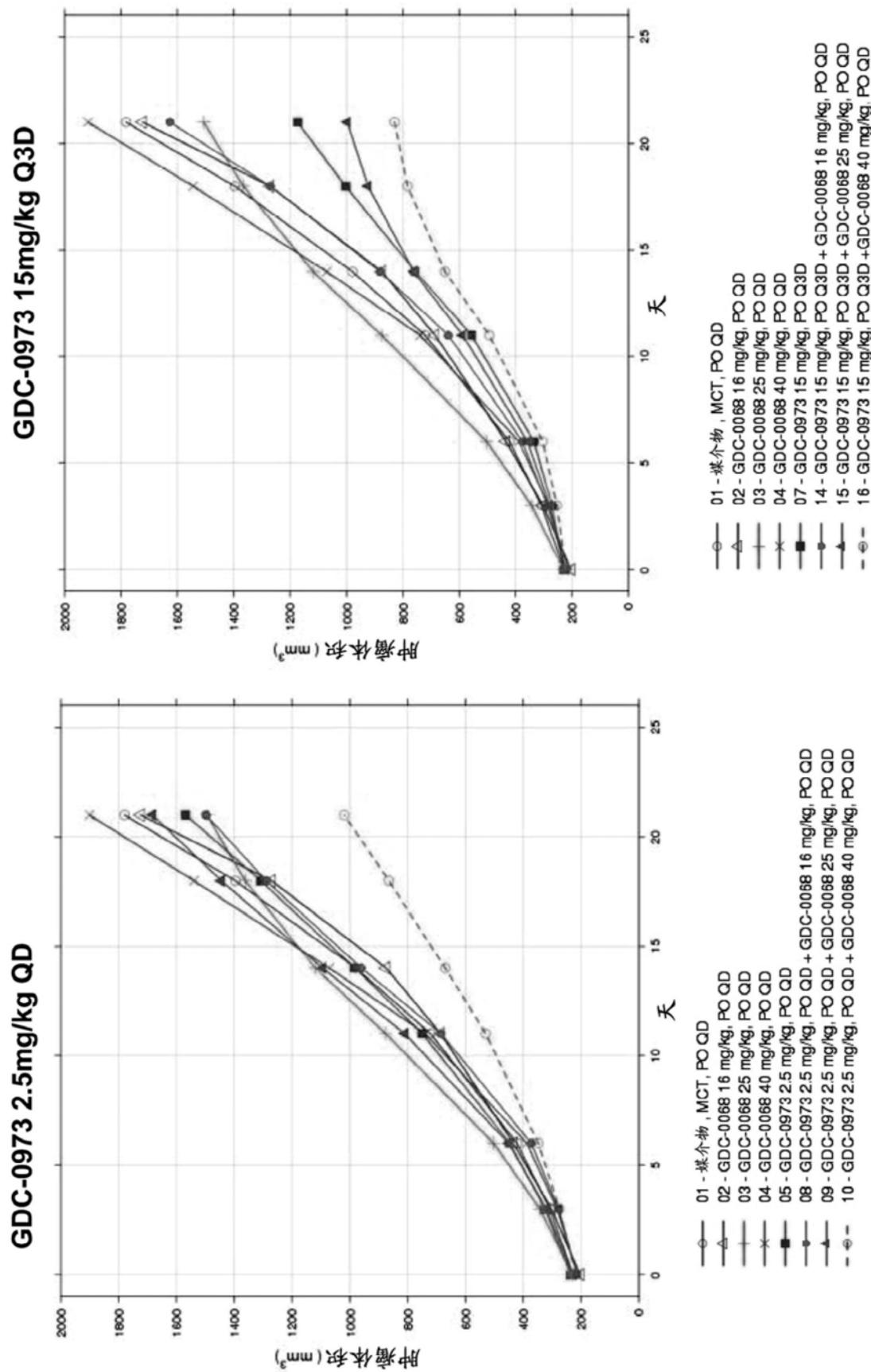


图18

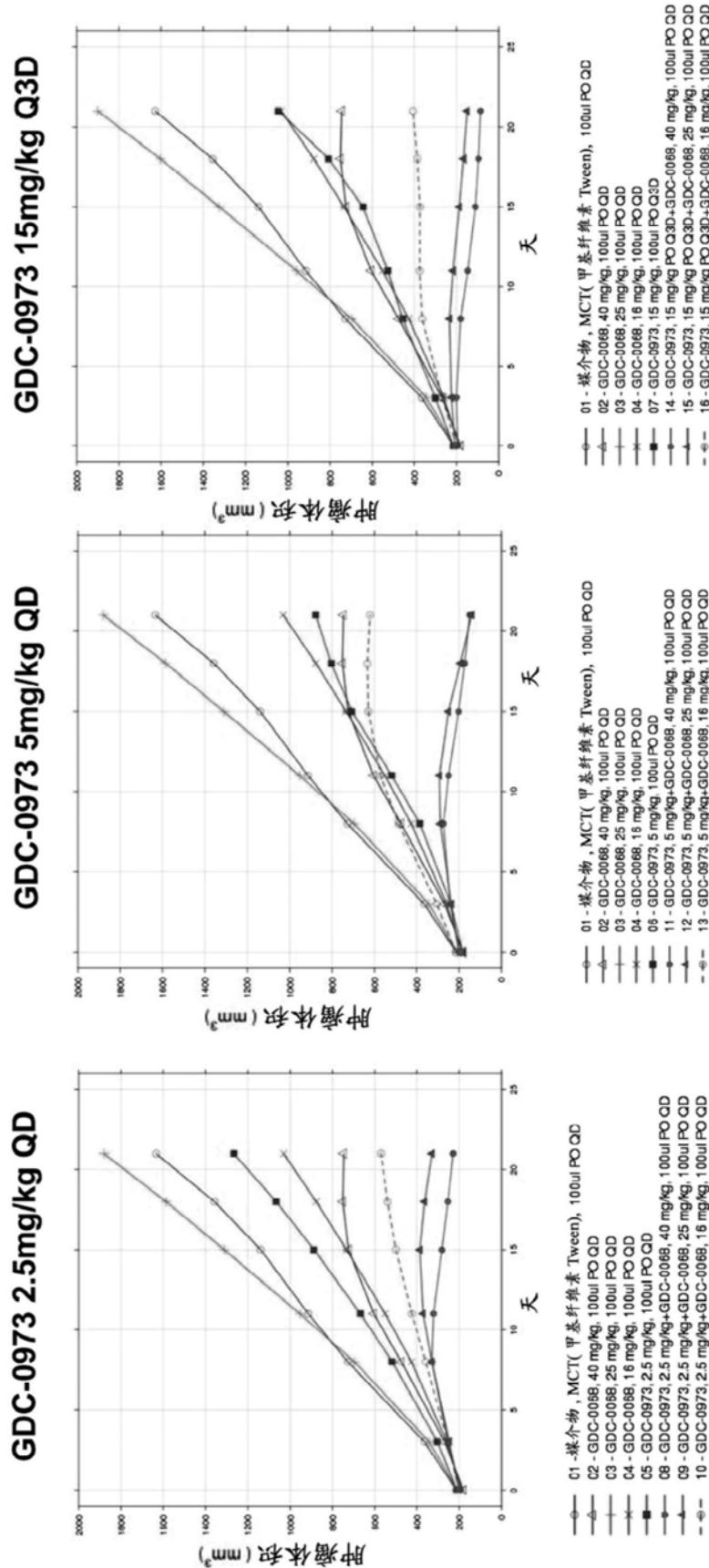


图19

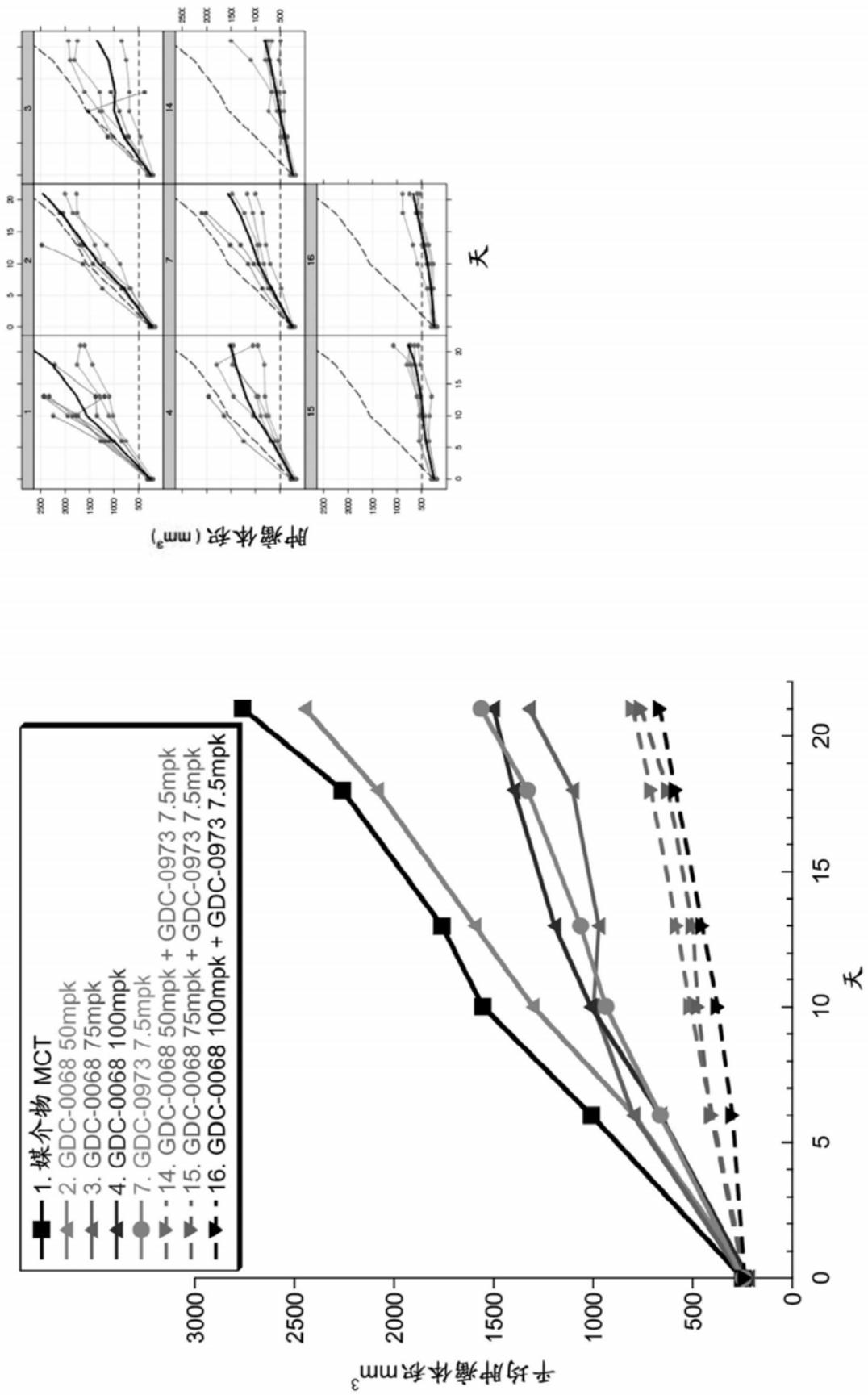


图20

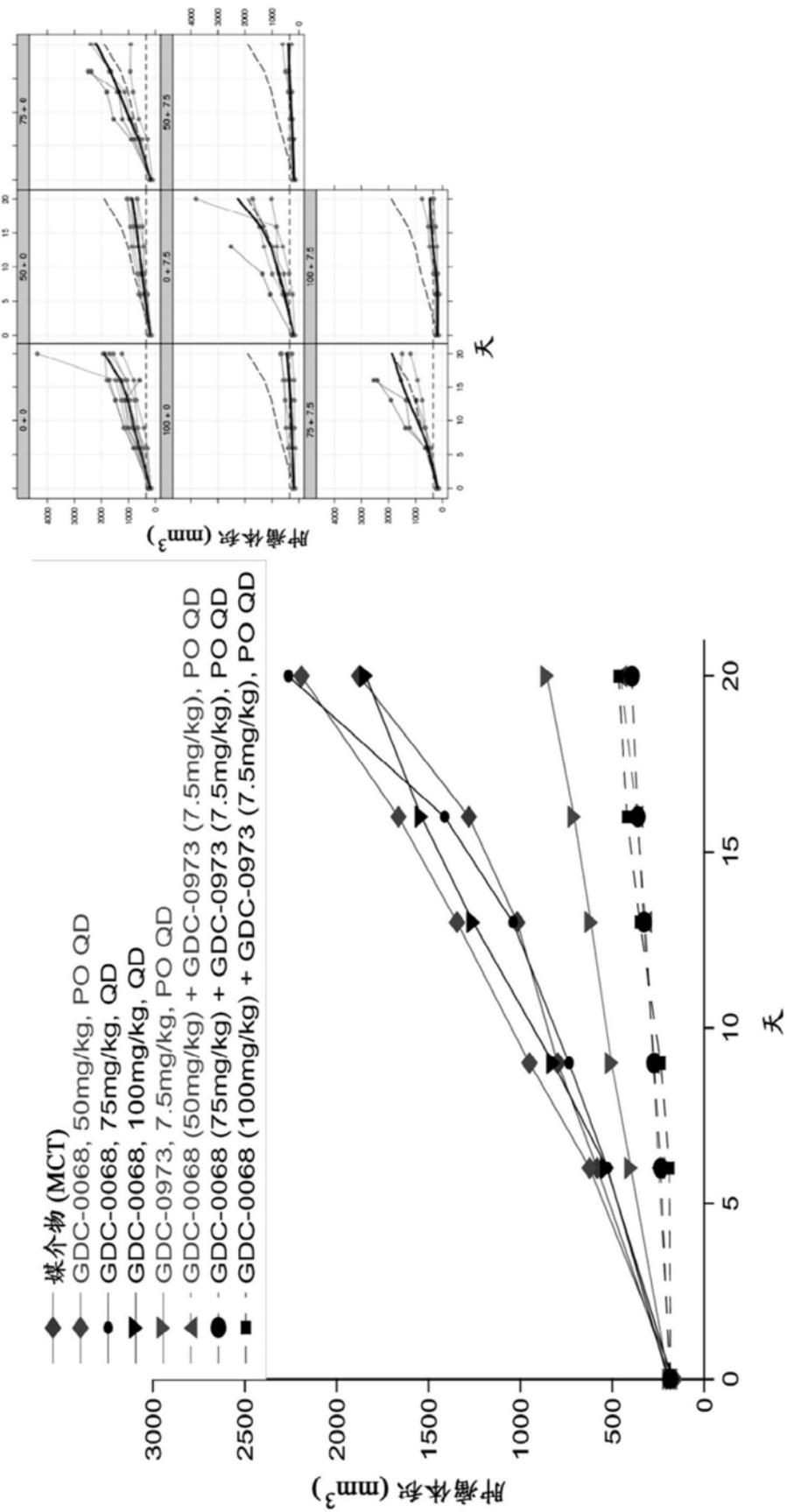


图21

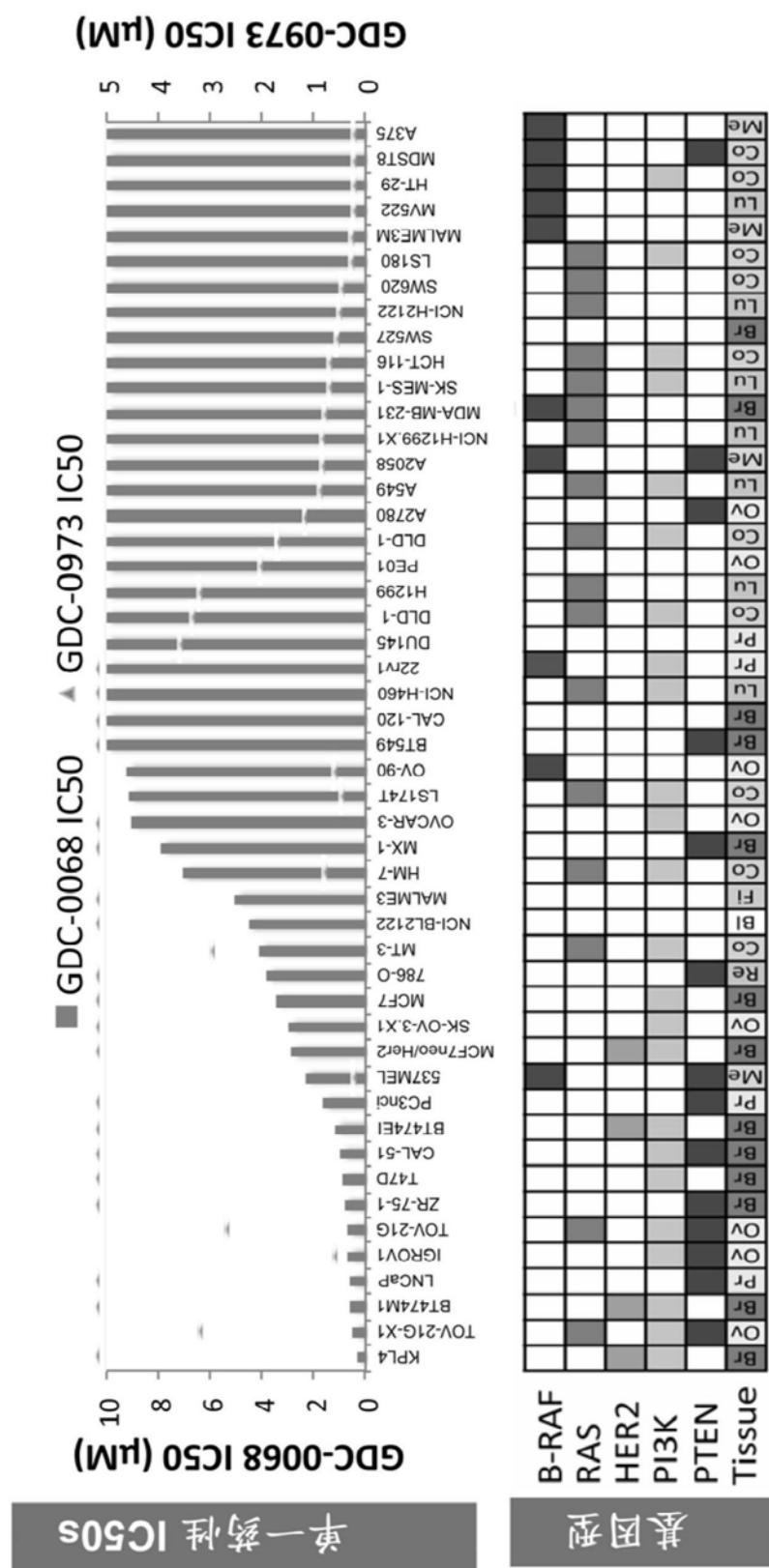


图22a

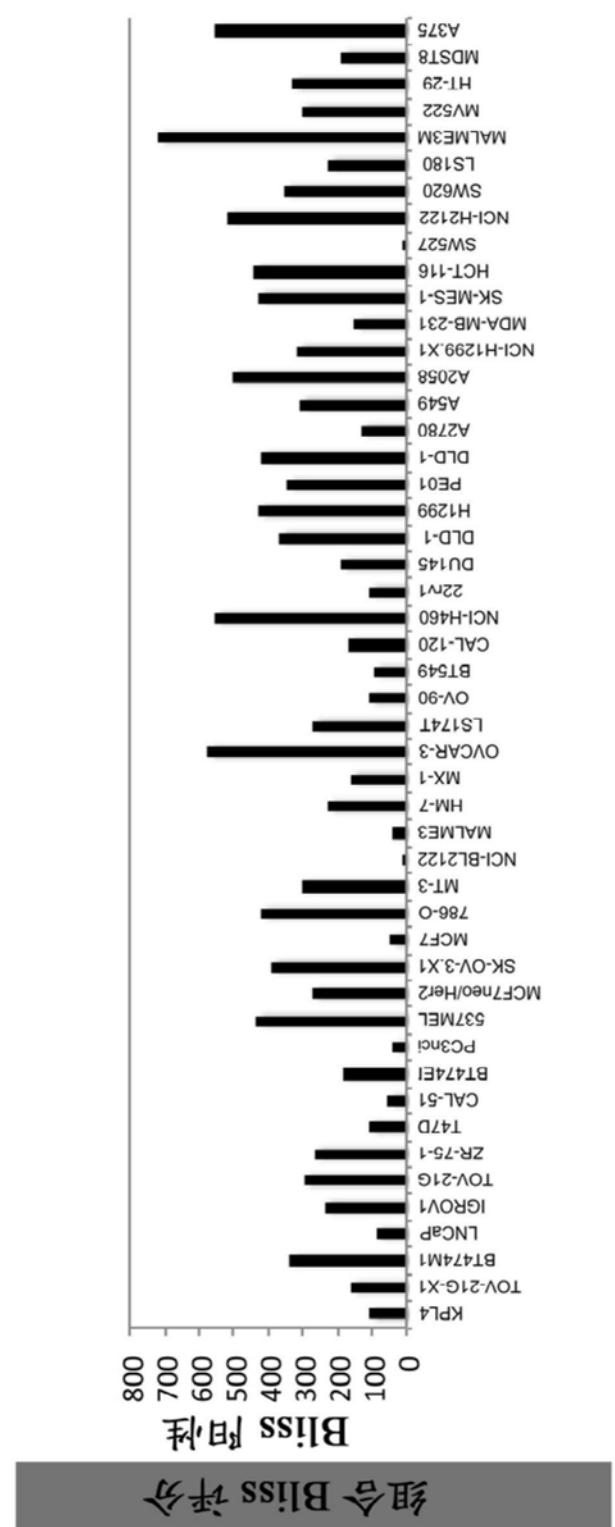


图22b

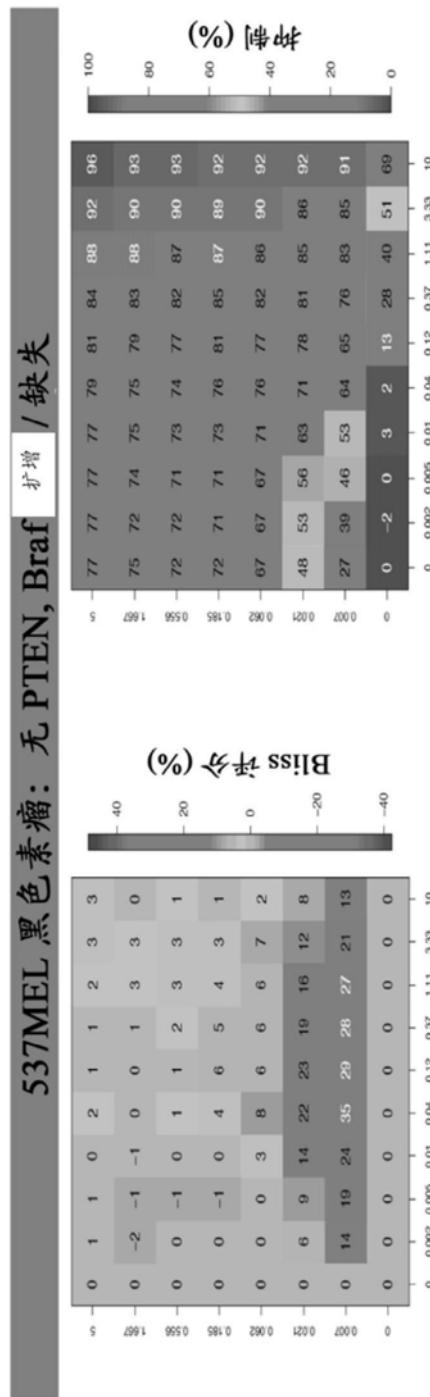


图23

HCT-116 结肠 : PI3K H1047R, Kras G13D, E-Cad

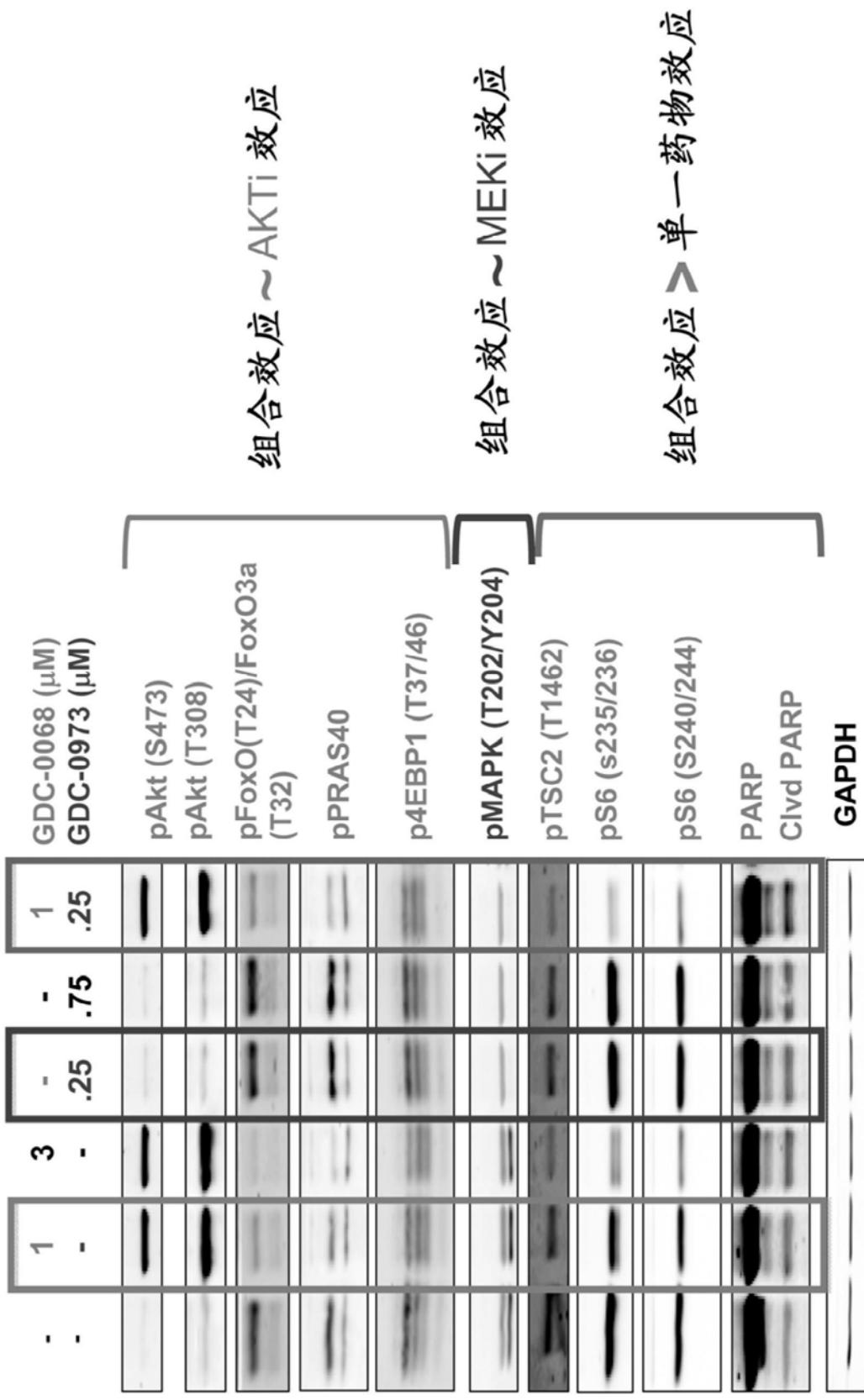


图24

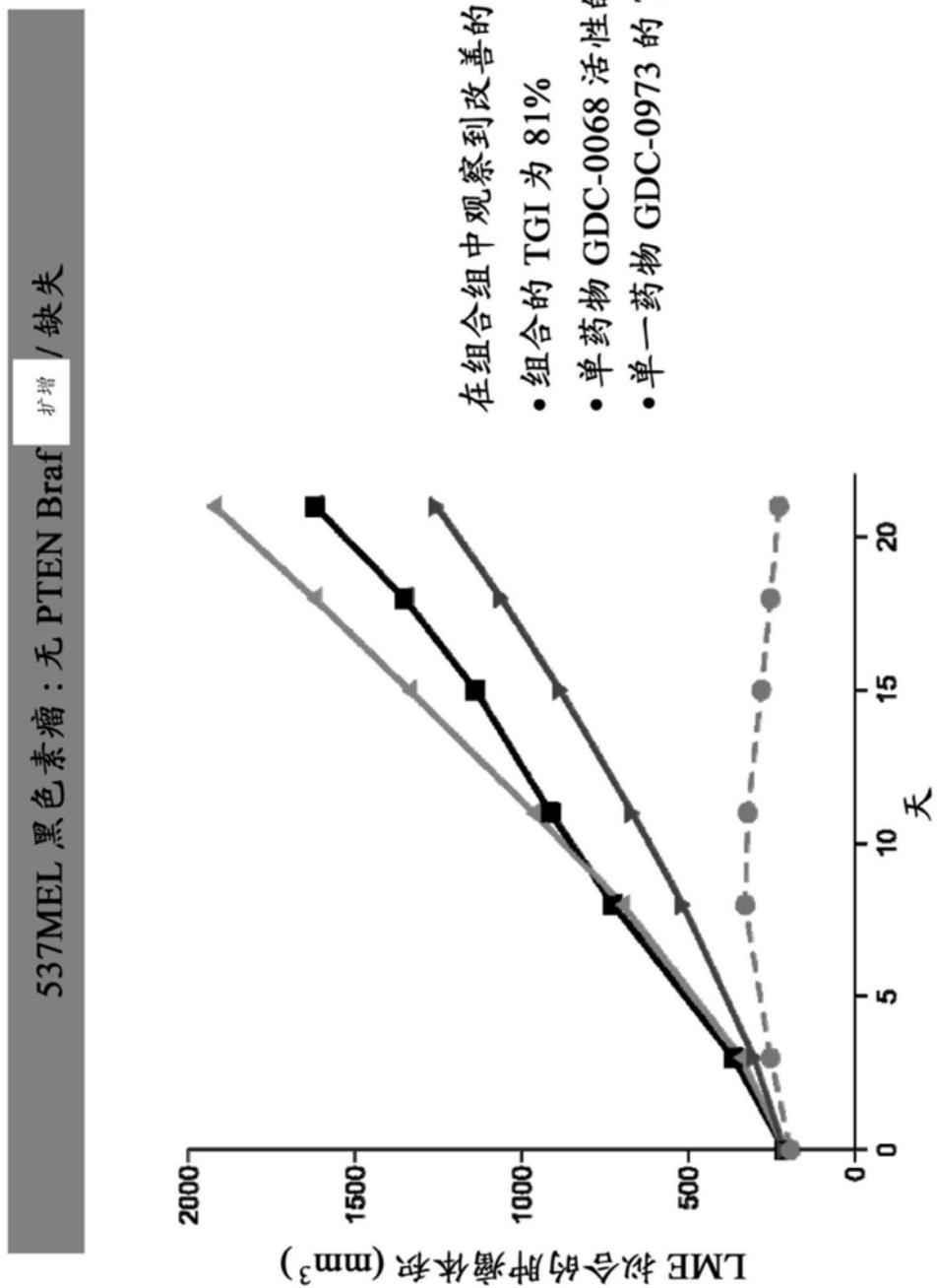


图25

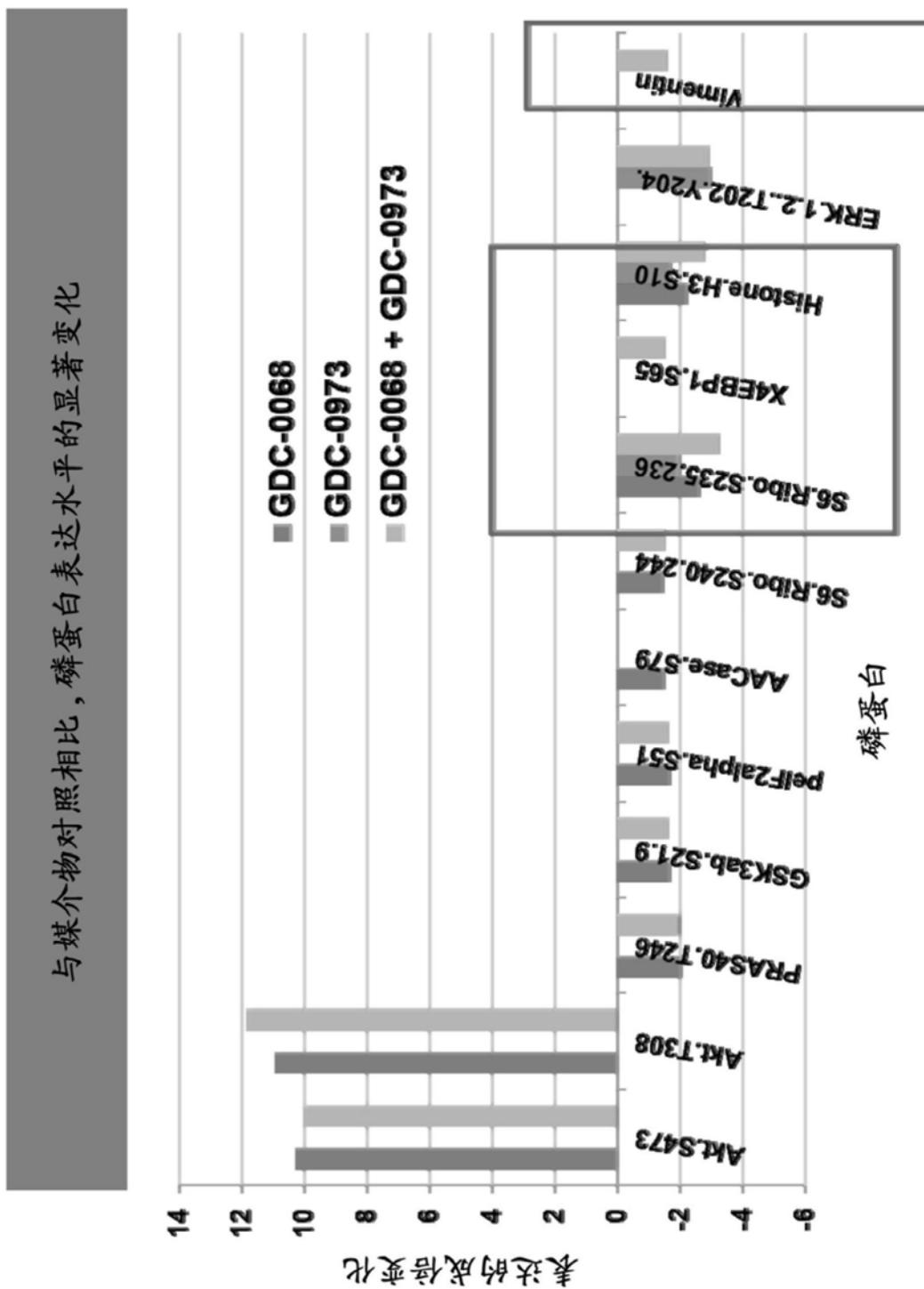


图26

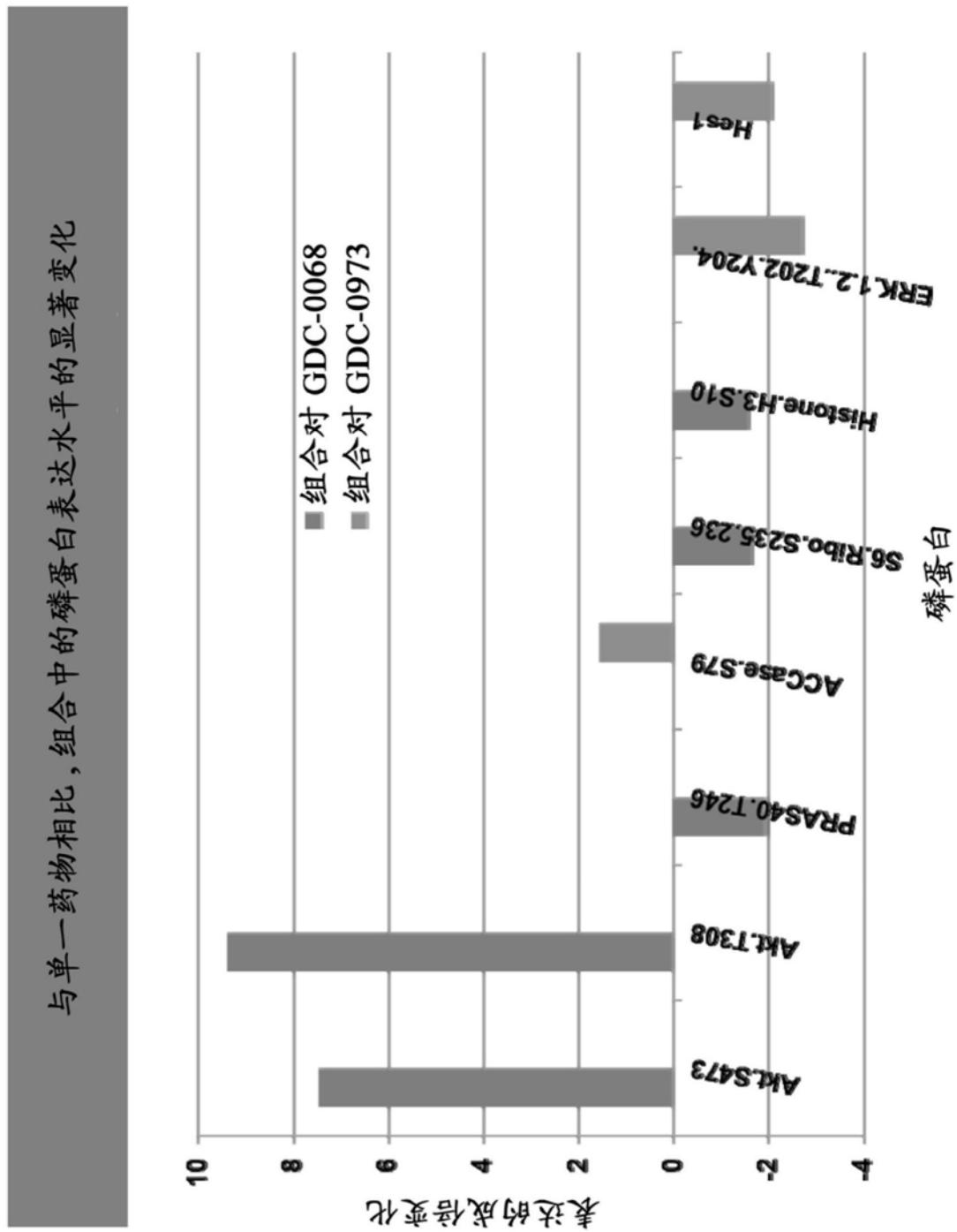


图27

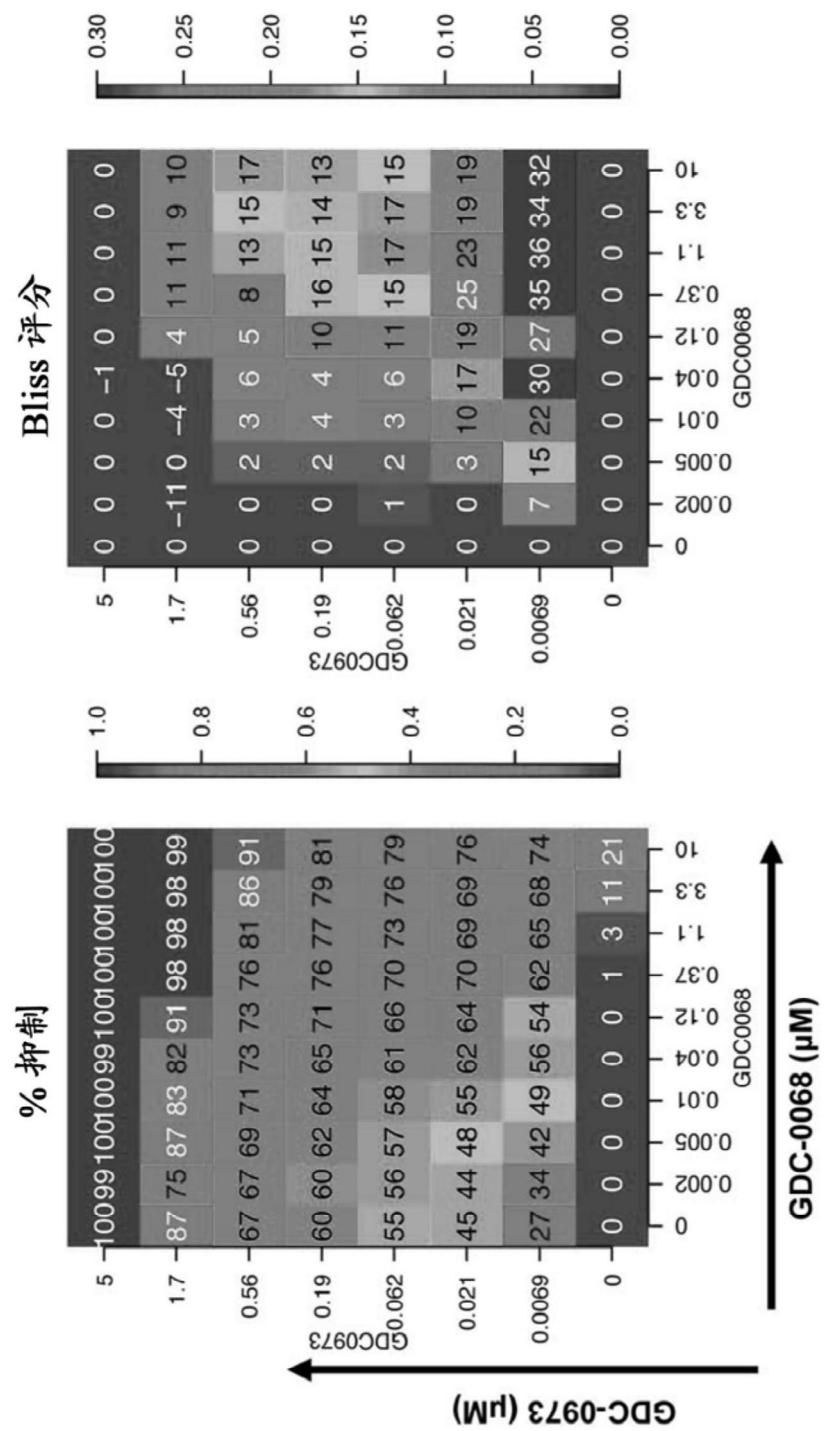


图28

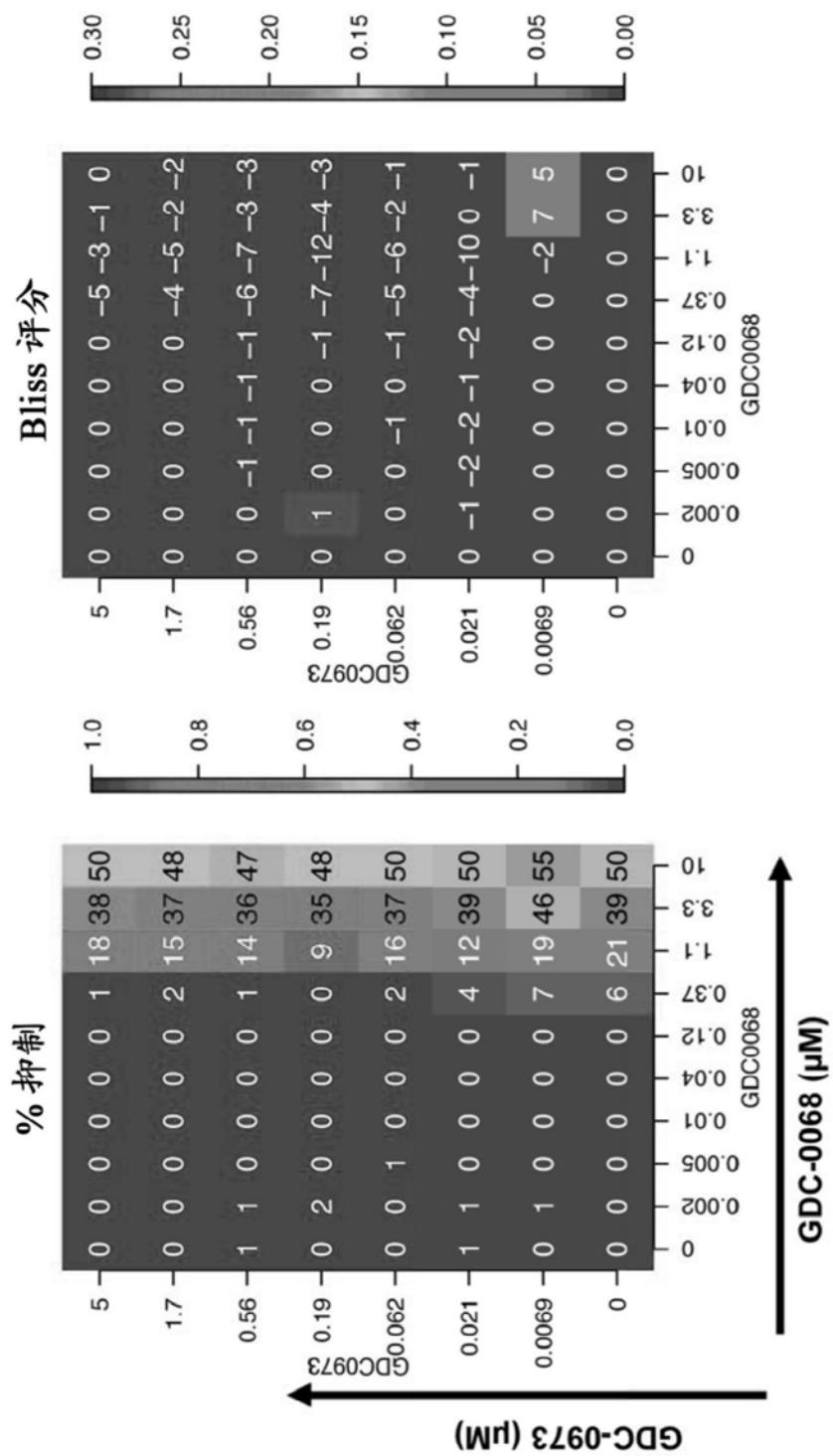


图29

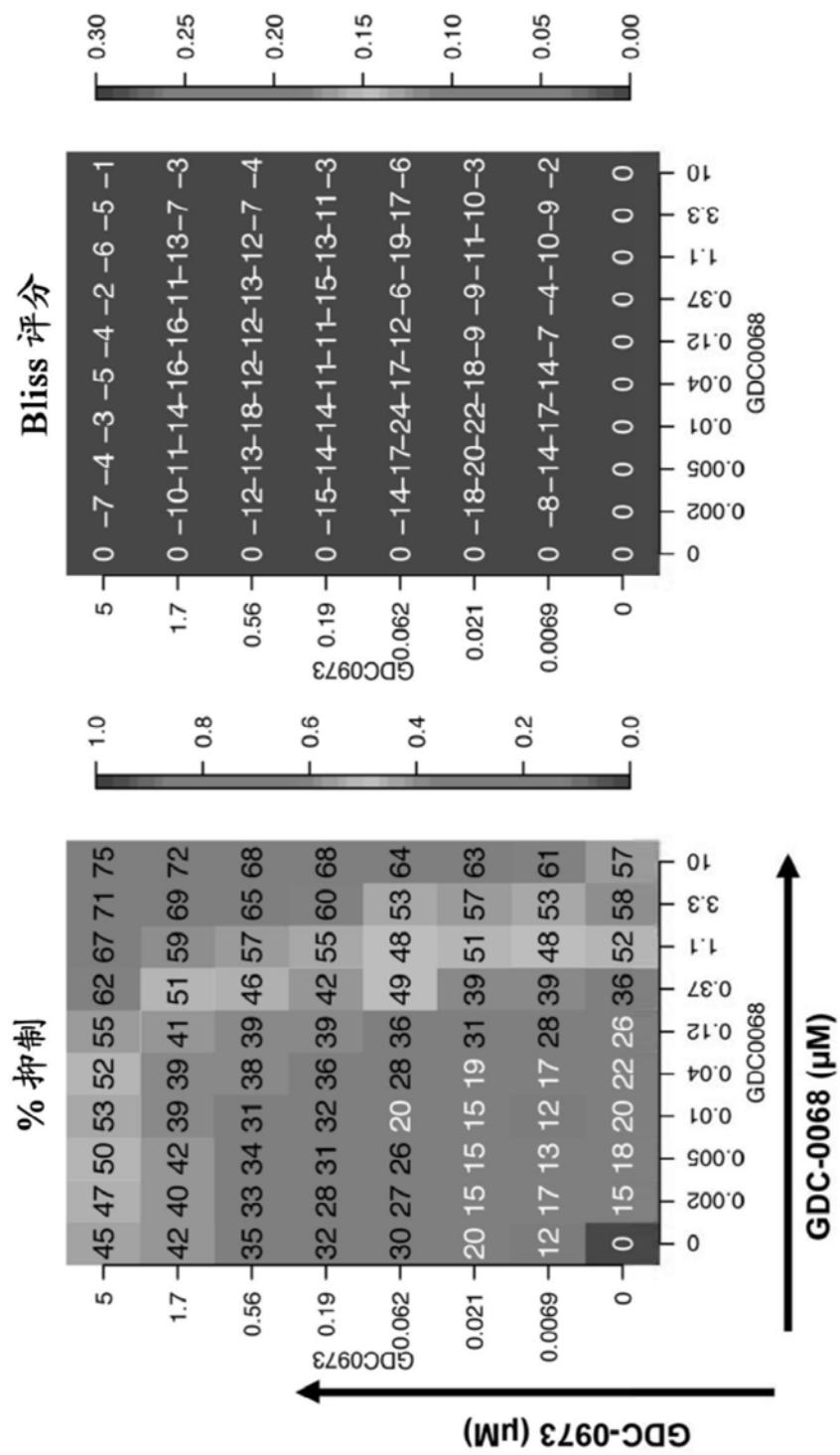


图30

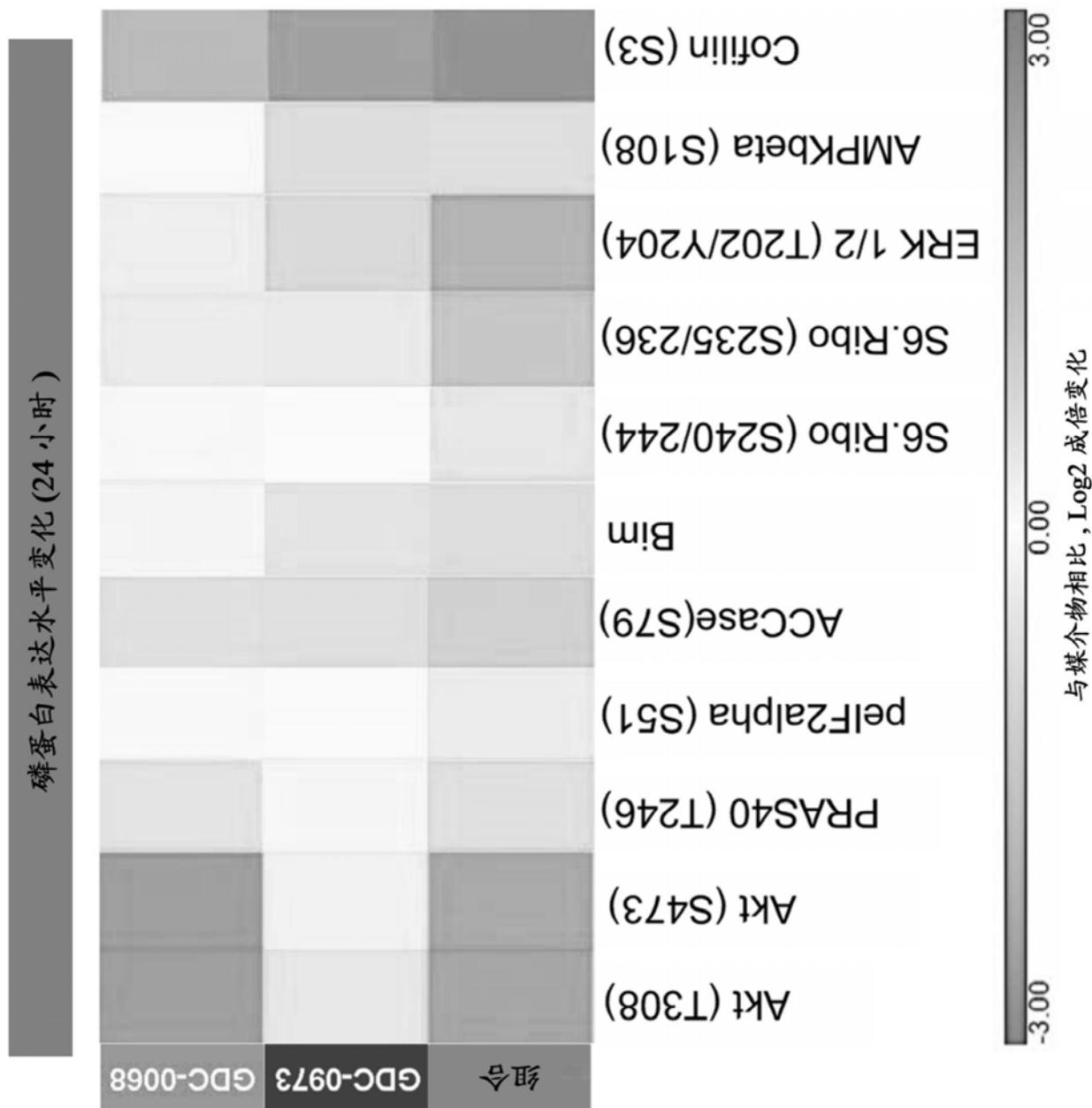


图31