



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101939006 B

(45) 授权公告日 2015.09.16

(21) 申请号 200880116412.4

代理人 张萍 李连涛

(22) 申请日 2008.09.10

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 31/505(2006.01)

60/971773 2007.09.12 US

A61P 35/00(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/50(2006.01)

2010.05.12

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2008/075883 2008.09.10

CN 1761671 A, 2006.04.19,

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/036082 EN 2009.03.19

HONG ZHOU ET AL..EFFECTS OF THE EGFR/HER2 KINASE INHIBITOR GW572016 ON EGFR-AND HER2-OVEREXPRESSING BREAST CANCER CELL LINE PROLIFERATION, RADIOSENSITIZATION, AND RESISTANCE. 《INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS》. 2003, 第58卷(第2期),

(73) 专利权人 吉宁特有限公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

Masahiko Hayakawa et al..

(72) 发明人 马西娅·贝尔文 洛里·弗里德曼 克劳斯·霍弗里茨 迪帕克·桑帕思 乌尔卡·维嘉普卡尔 杰弗里·沃林 利萨·约翰逊 马利卡·辛格 索纳尔·帕特尔

Synthesis and biological evaluation of pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidine derivatives as novel PI3 kinase p110α inhibitors. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》. 2007, 第17卷(第9期),

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

审查员 张丽芳

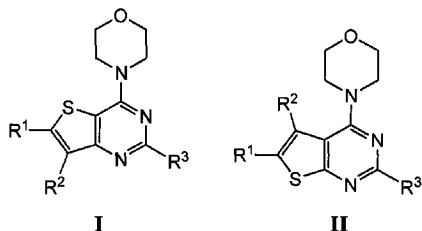
权利要求书6页 说明书84页 附图56页

(54) 发明名称

磷酸肌醇3-激酶抑制剂化合物与化疗剂的联合以及使用方法

(57) 摘要

具有式 I 和 II 的 PI3K 抑制剂化合物和化疗剂的联合,包括它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体、代谢物和药学上可接受的盐,用于治疗高增殖性病症,如癌症。公开了这些联合用于体外、原位和体内诊断、预防或治疗哺乳动物细胞中的这些病症,或与病理条件相关的病症的方法。



式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定;

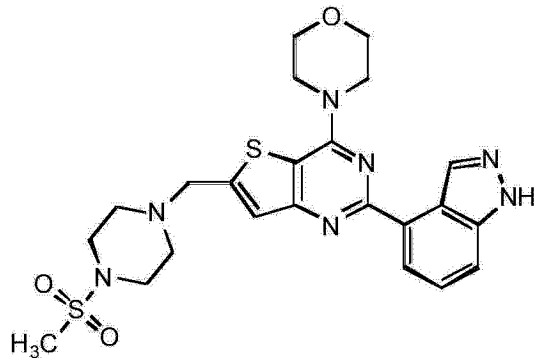
Table with 8 columns: 实验, 细胞系, 肿瘤类型, 基因突变, 化疗剂, 化合物 Ia, 联合指数 (CI), 协同作用. It lists various cell lines and treatments with their corresponding CI values.

CN 101939006 B

1. 治疗剂联合在制备用于治疗高增殖性病症的药物中的用途,其中所述治疗剂联合以联合制剂给予或交替给予哺乳动物,其中所述治疗剂联合导致协同作用,并且所述治疗剂联合具有在肿瘤类型细胞系中小于 0.8 的 CI(联合指数)值,所述 CI 值通过 Chou 和 Talalay 方法从获自体外细胞增殖测定的 EC₅₀ 值计算,其中所述治疗剂联合包含治疗有效量的具有式 Ia 或 Ib 的化合物和治疗有效量的选自下列的化疗剂:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素和拉帕替尼,

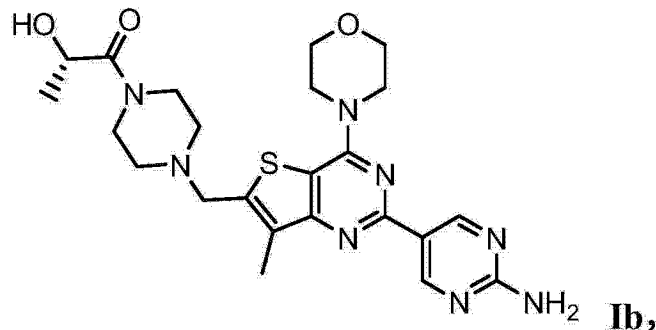
其中,具有式 Ia 或 Ib 的化合物是:

具有下式 Ia 的 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉:



Ia 或

具有下式 Ib 的 (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮:



Ib,

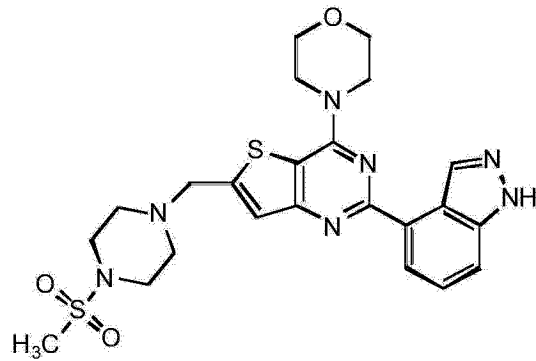
或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体或药物上可接受的盐;

以及其中所述高增殖性病症为选自下列的癌症:乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、胶质瘤、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌和前列腺癌。

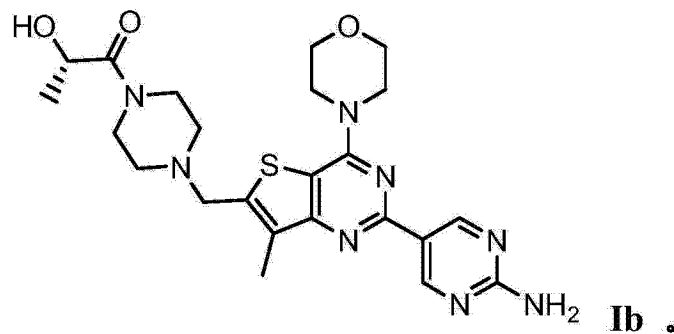
2. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为厄洛替尼。
3. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为多西他赛。
4. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为 5-FU。
5. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为吉西他滨。
6. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为 PD-0325901。
7. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为顺铂。
8. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为卡铂。
9. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为紫杉醇。

10. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为贝伐单抗。
11. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为曲妥珠单抗。
12. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为培妥珠单抗。
13. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为替莫唑胺。
14. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为他莫昔芬。
15. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为多柔比星。
16. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为 Akti-1/2。
17. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为 HPPD。
18. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为雷帕霉素。
19. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化疗剂为拉帕替尼。

20. 如权利要求 1 至 19 中任一项所述的用途,其中所述式 Ia 或 Ib 化合物为具有下式 Ia 的 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉:



21. 如权利要求 1-19 中任一项所述的用途,其中所述式 Ia 或 Ib 化合物为具有下式 Ib 的 (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮:



22. 如权利要求 1-19 中任一项所述的用途,其中所述式 Ia 或 Ib 化合物的药学上可接受的盐选自与下列酸形成的盐:氢氯酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、苯磺酸、甲酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乙磺酸、天冬氨酸和谷氨酸。

23. 如权利要求 1-19 中任一项所述的用途,其中所述治疗有效量的具有式 Ia 或 Ib 的化合物和所述治疗有效量的化疗剂以联合制剂给予。

24. 如权利要求 1-19 中任一项所述的用途,其中所述治疗有效量的具有式 Ia 或 Ib 的

化合物和所述治疗有效量的化疗剂交替给予哺乳动物。

25. 如权利要求 24 所述的用途,其中用所述化疗剂给予所述哺乳动物,随后给予所述式 Ia 或 Ib 化合物。

26. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述治疗剂联合通过如下的给药方案给予,其中以每天两次至每三周一次的范围给予具有式 Ia 或 Ib 的治疗有效量的化合物,并且以每天两次至每三周一次的范围给予治疗有效量的化疗剂。

27. 如权利要求 26 所述的用途,其中所述给药方案重复一次或多次。

28. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述高增殖性病症为乳腺癌或肺癌。

29. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述癌症表达 K-ras 突变体。

30. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述哺乳动物为乳腺癌患者,其中所述患者为 HER2 阴性、ER(雌激素受体)阴性和 PR(孕酮受体)阴性。

31. 如权利要求 30 所述的用途,其中给予所述患者所述式 Ia 化合物和多西他赛。

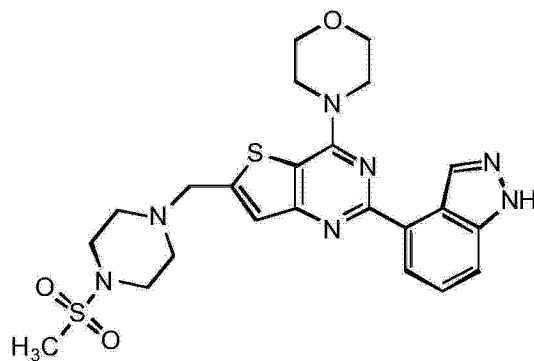
32. 如权利要求 1-19 中任一项所述的用途,其中所述式 Ia 或 Ib 化合物和所述化疗剂各自以每单位剂型 1mg-1000mg 的量给予。

33. 如权利要求 1-19 中任一项所述的用途,其中所述式 Ia 或 Ib 化合物和所述化疗剂以按重量计 1:50-50:1 的比例给予。

34. 一种药物制剂,其包含具有式 Ia 或 Ib 的化合物;选自下列的化疗剂:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素和拉帕替尼;以及一种或多种药学上可接受的载体、助流剂、稀释剂或赋形剂;

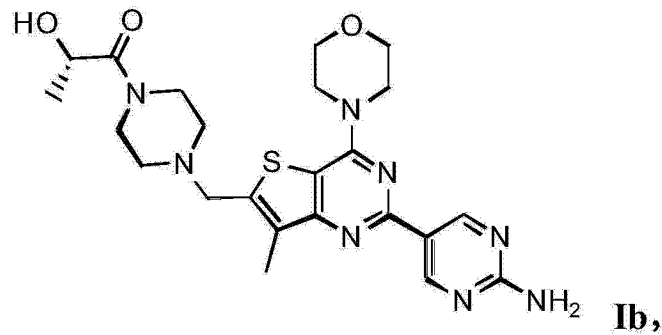
其中,具有式 Ia 或 Ib 的化合物是:

具有下式 Ia 的 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉:



Ia 或

具有下式 Ib 的 (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮:

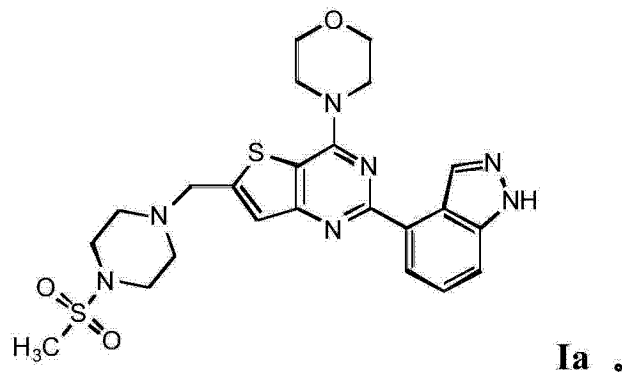


或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体或药学上可接受的盐；

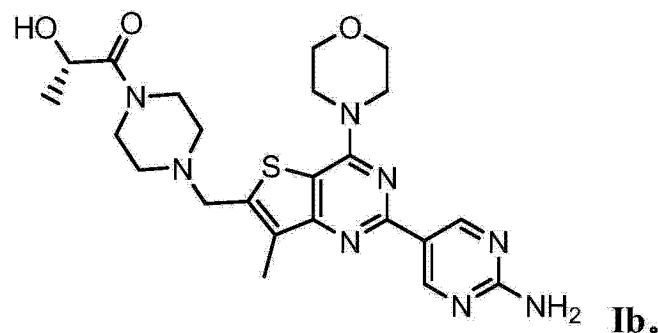
其中所述具有式 Ia 或 Ib 的化合物和化疗剂导致协同作用，具有在肿瘤类型细胞系中小于 0.8 的 CI (联合指数) 值，所述 CI 值通过 Chou 和 Talalay 方法从获自体外细胞增殖测定的 EC50 值计算。

35. 如权利要求 34 的药物制剂，其中所述式 Ia 或 Ib 化合物的药学上可接受的盐选自与下列酸形成的盐：氢氯酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、苯磺酸、甲酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乙磺酸、天冬氨酸和谷氨酸。

36. 如权利要求 34 所述的药物制剂，其中所述式 Ia 或 Ib 化合物为具有下式 Ia 的 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉：



37. 如权利要求 34 所述的药物制剂，其中所述式 Ia 或 Ib 化合物为具有下式 Ib 的 (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮：



38. 如权利要求 34-37 中任一项所述的药物制剂，其包含选自下列的药学上可接受的助流剂：二氧化硅、粉末纤维素、微晶纤维素、金属硬脂酸盐、铝硅酸钠、苯甲酸钠、碳酸钙、

硅酸钙、碳酸镁、不含石棉的滑石粉、stearowet C、淀粉、淀粉 1500、十二烷基硫酸镁、氧化镁,以及它们的组合。

39. 如权利要求 34-37 中任一项所述的药物制剂,其中所述式 Ia 或 Ib 化合物和所述化疗剂各自包含每单位剂型 1mg-1000mg 的量。

40. 如权利要求 34-39 中任一项所述的药物制剂在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

41. 一种用于治疗高增殖性病症的加工制品,其包含:

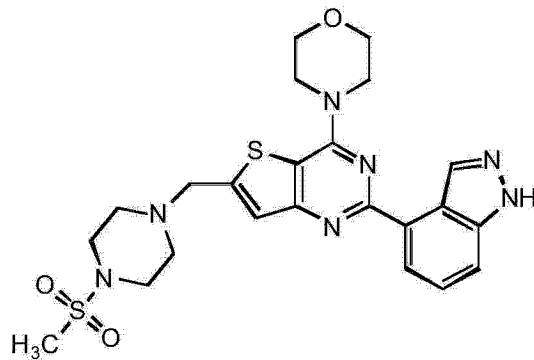
- a) 如权利要求 1-19 中任一项所述的治疗剂联合;和
- b) 使用说明书。

42. 如权利要求 41 所述的制品,其中所述高增殖性病症为乳腺癌或肺癌。

43. 一种产品,其包含作为联合制剂的具有式 Ia 或 Ib 的化合物和选自下列的化疗剂:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素和拉帕替尼,它们单独、同时或相继使用以治疗高增殖性病症;

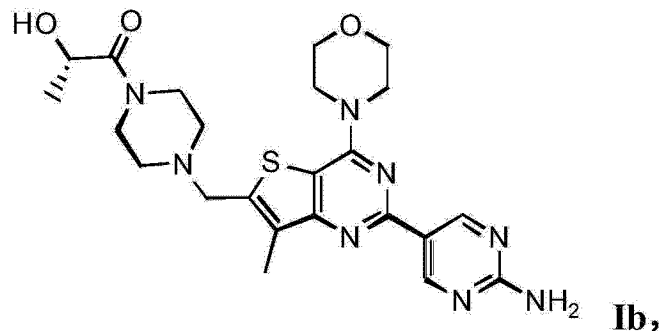
其中,具有式 Ia 或 Ib 的化合物是:

具有下式 Ia 的 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉:



Ia 或

具有下式 Ib 的 (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮:



Ib,

或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体或药学上可接受的盐;

其中所述治疗联合制剂导致协同作用,并且所述治疗联合制剂具有在肿瘤类型细胞系中小于 0.8 的 CI(联合指数)值,所述 CI 值通过 Chou 和 Talalay 方法从获自体外细胞增殖测定的 EC50 值计算,以及其中所述高增殖性病症为选自下列的癌症:乳腺癌、子宫颈癌、

结肠癌、子宫内膜癌、胶质瘤、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌和前列腺癌。

44. 如权利要求 43 所述的产品,其中所述高增殖性病症为乳腺癌或肺癌。

磷酸肌醇 3- 激酶抑制剂化合物与化疗剂的联合以及使用 方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据 37CFR § 1.53(b) 提交的此非临时申请根据 35 USC § 119(e) 要求 2007 年 9 月 12 日提交的美国临时申请系列 No. 60/971,773 的权益,该专利全文以引用方式并入。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及具有抗高增殖性病症如癌症的活性的化合物的药物联合,所述药物联合包含抑制 PI3 激酶活性的化合物。本发明还涉及所述化合物用于体外、原位和体内诊断或治疗哺乳动物细胞或相关病理病况的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 磷脂酰肌醇是在细胞膜中发现的大量磷脂之一,并且它参与了胞内信号转导。经由 3'-磷酸化的磷酸肌醇的细胞信号传导参与了大量细胞过程,例如恶性转化、生长因子信号传导、炎症和免疫 (Rameh 等人 (1999) *J. Biol. Chem.* 274 :8347-8350)。负责产生这些磷酸化信号传导产物的酶是磷脂酰肌醇 3- 激酶 (也称为 PI 3- 激酶或 PI3K),它最初被鉴定为具有与病毒癌蛋白和生长因子受体酪氨酸激酶相关的活性,生长因子酪氨酸激酶在肌醇环的 3'-羟基处磷酸化磷脂酰肌醇 (PI) 及其磷酸化衍生物 (Panayotou 等人 (1992) *Trends Cell Biol* 2 :358-60)。磷酸肌醇 3- 激酶 (PI3K) 是在肌醇环的 3- 羟基残基处将脂质磷酸化的脂激酶 (Whitman 等人 (1988) *Nature*, 332 :664)。PI3- 激酶产生的 3- 磷酸磷脂 (PIP3) 作为第二信使募集具有脂结合结构域 (包括 plekstrin 同源 (PH) 区) 的激酶,例如 Akt 和 PDK1、磷酸肌醇依赖性激酶 -1 (Vivanco 等人 (2002) *Nature Rev. Cancer* 2 :489 ;Phillips 等人 (1998) *Cancer* 83 :41)。

[0006] PI3 激酶家族包含至少 15 种通过结构同源性再分类的不同酶,并且它们根据序列同源性和酶分析所形成的产物被分为 3 类。I 类 PI3 激酶由 2 个亚基组成 :110kd 催化亚基和 85kd 调节亚基。所述调节亚基含有 SH2 结构域并且与被具有酪氨酸激酶活性的生长因子受体磷酸化的酪氨酸残基或癌基因产物结合,从而诱导 p110 的催化亚基的 PI3K 活性,使其脂底物磷酸化。I 类 PI3 激酶参与了细胞因子、整联蛋白、生长因子和免疫受体下游的重要信号转导事件,这表明这个通路的控制可能产生重要的治疗效果,如调控细胞增殖和致癌作用。I 类 PI3K 可以使磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰肌醇 -4- 磷酸、和磷脂酰肌醇 -4,5- 二磷酸 (PIP2) 磷酸化,从而分别产生磷脂酰肌醇 -3- 磷酸 (PIP)、磷脂酰肌醇 -3,4- 二磷酸、和磷脂酰肌醇 -3,4,5- 三磷酸。II 类 PI3K 使 PI 和磷脂酰肌醇 -4- 磷酸磷酸化。III 类 PI3K 仅可以使 PI 磷酸化。癌症中的主要 PI3- 激酶同种型是 I 类 PI3- 激酶 p110 α 。(US 5824492 ;US 5846824 ;US 6274327)。其他同种型参与了心血管和免疫炎性疾病 (Workman P (2004) *Biochem Soc Trans* 32 :393-396 ;Patel 等人 (2004) *Proc. Am. Assoc. of Cancer Res.* (摘要 LB-247) 第 95 届,3 月 27-31, Orlando, Florida, USA ;Ahmadi K 和 Waterfield MD (2004) "Phosphoinositide 3-Kinase :Function and Mechanisms" *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz W J, Lane M D 编辑) Elsevier/Academic Press) ;以

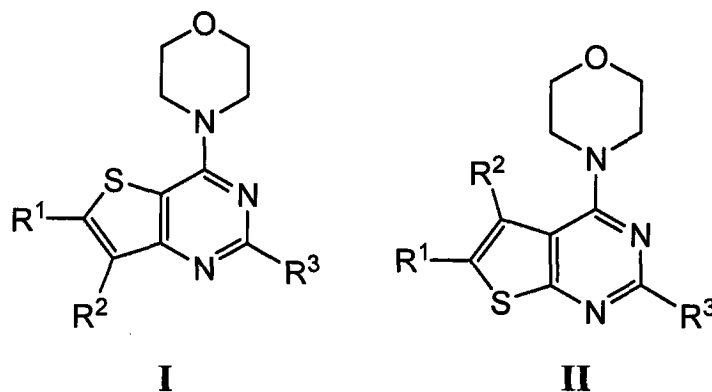
及 PI3 激酶中的癌基因突变 (Samuels 等人 (2004) Science 304 :554)。业已发现在结肠、乳腺、脑、肝、卵巢、胃、肺、和头颈实体瘤中极常发现 p110 α 的癌基因突变。在恶性胶质瘤、黑素瘤、前列腺、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌、头颈癌、肝细胞癌、和甲状腺癌中发现有 PTEN 异常。

[0007] PI3 激酶的最初纯化和分子克隆表明它是由 p85 和 p110 亚基构成的异源二聚体 (Otsu 等人 (1991) Cell 65 :91-104 ;Hiles 等人 (1992) Cell 70 :419-29)。此后, 鉴定了四种不同的 I 类 PI3K, 称为 PI3K α 、 β 、 δ 和 γ , 它们各自由独特的 110kDa 催化亚基和调节亚基组成。更具体地, 三种催化亚基, 即 p110 α 、p110 β 、和 p110 δ 各自与相同的调节亚基 p85 相互作用; 而 p110 γ 则与不同的调节亚基 p101 相互作用。这些 PI3K 在人细胞和组织中的表述模式也各自不同。在 PI3K α 、 β 、和 δ 亚型的每一种中, p85 亚基通过其 SH2 结构域与靶蛋白中磷酸化酪氨酸残基 (在适当的序列背景中存在) 的相互作用将 PI3 激酶定位在质膜上 (Rameh 等人 (1995) Cell, 83 :821-30 ;Volinia 等人 (1992) Oncogene, 7 :789-93)。

[0008] PI3 激酶 /Akt/PTEN 通路是具有吸引力的癌症药物开发靶标, 这是因为将预计这类药剂能够在癌细胞中抑制增殖、逆转凋亡抑制并且克服对细胞毒性剂的抗性。已经报道了 PI3 激酶抑制剂 (Yaguchi 等人 (2006) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 98(8) : 545-556 ;US 7173029 ;US 7037915 ;US 6608056 ;US 6608053 ;US 6838457 ;US 6770641 ;US 6653320 ;US 6403588 ;WO 2006/046031 ;WO2006/046035 ;WO 2006/046040 ;WO 2007/042806 ;WO 2007/042810 ;WO2004/017950 ;US 2004/092561 ;WO 2004/007491 ;WO 2004/006916 ;WO2003/037886 ;US 2003/149074 ;WO 2003/035618 ;WO 2003/034997 ;US2003/158212 ;EP 1417976 ;US 2004/053946 ;JP 2001247477 ;JP 08175990 ;JP 08176070)。渥曼青霉素类似物在哺乳动物中具有 P13 激酶活性 (US6703414 ;WO 97/15658)。

[0009] 式 I 和 II 的噻吩并嘧啶化合物具有 p110 α 结合活性、PI3 激酶抑制活性并且抑制癌细胞的生长 (WO 2006/046031 ;US 2008/0039459 ;US 2008/0076768 ;US 2008/0076758 ;WO 2008/070740 ;WO 2008/073785)。

[0010]



[0011] 式 I 化合物 GDC-0941 (Genentech Inc.) 为选择性、经过口服而生物获得的 PI3K 抑制剂, 它具有期望的药代动力学和药理学性质 (Belvin 等人, American Association for Cancer Research Annual Meeting (美国癌症研究学会年会) 2008, 第 99 界 :4 月 15 日, 摘要 4004 ;Folkes 等人, American Association for Cancer Research Annual Meeting (美国癌症研究学会年会) 2008, 第 99 界 :4 月 14 日, 摘要 LB-146 ;Friedman 等人, American

Association for Cancer Research Annual Meeting (美国癌症研究学会年会) 2008, 第 99 界: 4 月 14 日, 摘要 LB-110)。

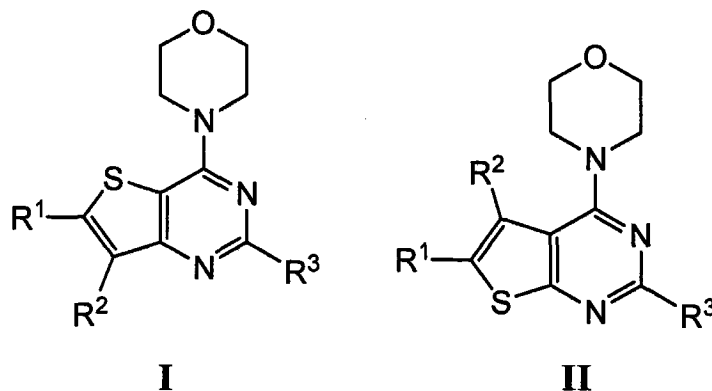
[0012] 目前在癌症治疗中在给药方案中同时或按顺序给予抗癌药物治疗剂的联合是常见的。成功的联合治疗与单项治疗 (即限制于一种药物的药物治疗) 相比提供改善的并且甚至是协同的效应。已经研究了用于治疗高增殖性病症如癌症的联合治疗, 其包括: 在人肿瘤异种移植模型中厄洛替尼 (erlotinib) 与卡培他滨的联合的抗肿瘤活性 (Ouchi 等人 (2006) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57:693-702); 和非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤异种移植模型中厄洛替尼与吉西他滨 (gemcitabine) 和顺铂的联合的抗肿瘤活性 (Higgins 等人 (2004) *Anti-Cancer Drugs* 15:503-512)。临床前研究已经为预测包括卡培他滨 (capecitabine) 和紫杉烷类的抗癌药物治疗剂联合用于治疗乳腺癌的临床期协同作用奠定了基础 (Sawada 等人 (1998) *Clin. Cancer Res.* 4:1013-1019)。卡培他滨和紫杉烷的联合治疗的某些剂量和方案可以改善安全性而不降低效力 (O' Shaughnessy 等人 (2006) *Clin. Breast Cancer* Apr 7(1):42-50)。已经发现体外抗真菌联合的协同效应与临床期的协同作用相关 (Steinbach 等人 (2003) *Clin. Inf. Dis.* Oct 1;37Suppl 3:S188-224)。

发明内容

[0013] 本发明一般涉及式 I 和 II 的噻吩并嘧啶化合物, 所述化合物具有抗癌活性, 更具体而言, 具有 PI3 激酶抑制活性, 它与化疗剂联合给予以抑制癌细胞的生长。式 I 和 II 化合物与化疗剂的某些联合显示出在体外和体内抑制癌细胞生长的协同作用。本发明的联合和方法可用于治疗高增殖性病症, 如癌症。该组合物可以抑制哺乳动物中的肿瘤生长, 并且可用于治疗人类癌症患者。

[0014] 在一个方面, 本发明包括用于治疗高增殖性病症的方法, 所述方法包括将治疗剂联合以联合制剂或变化形式给予哺乳动物, 其中所述治疗剂联合包含治疗有效量的具有式 I 或 II 的化合物; 和治疗有效量的选自下列的化疗剂: 厄洛替尼、多西他赛 (Docetaxel)、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂 (carboplatin)、紫杉醇、贝伐单抗 (bevacizumab)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、培妥珠单抗、替莫唑胺 (temozolomide)、他莫昔芬 (tamoxifen)、多柔比星 (doxorubicin)、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素 (rapamycin)、和拉帕替尼 (lapatinib)。

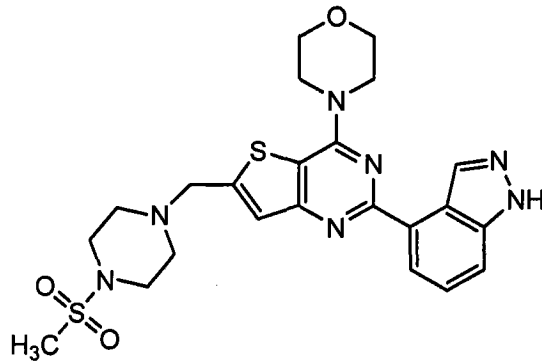
[0015]



[0016] 本发明还涉及所述组合物用于体外、原位、和体内诊断或治疗哺乳动物细胞、有机体或相关病理病况的方法。

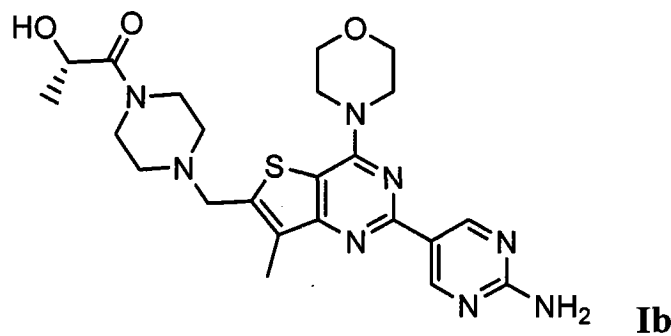
[0017] 本发明的一个方面提供治疗剂联合,所述治疗剂联合包含:具有式 Ia 的 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉 (US 2008/0076768 ;WO 2006/046031),也称为 GDC-0941 (Genentech, Inc.);和治疗有效量的选自下列的化疗剂:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素、和拉帕替尼。

[0018]



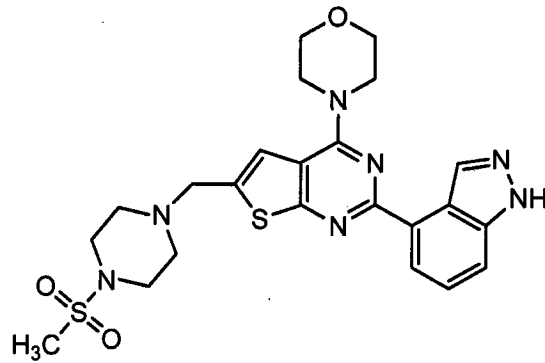
[0019] 本发明的一个方面提供治疗剂联合,所述治疗剂联合包含:具有式 Ib 的 (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮 (WO 2008/070740);和治疗有效量的选自下列的化疗剂:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素、和拉帕替尼。

[0020]



[0021] 本发明的一个方面提供治疗剂联合,所述治疗剂联合包含:具有式 IIa 的 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)吗啉 (US 2008/0076758 ;WO 2006/046031);和治疗有效量的选自下列的化疗剂:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素、和拉帕替尼。

[0022]



[0023] 式 Ia、Ib 和 IIa 化合物是可通过口服生物利用的并且在多个人类癌症模型中具有单药剂抗肿瘤活性。

[0024] 式 I 和 II 化合物包括所有立体异构体、几何异构体、互变异构体、代谢物和它们的药学上可接受的盐。某些式 I 和 II 化合物是具有类药物的物理化学和药代动力学特性的有效的 PI3K 抑制剂。某些式 I 和 II 化合物表现出对 Ia 类 PI3K 更甚于对 Ib 类的选择性，尤其是对于 P110 α 亚型。

[0025] 本发明的药物组合物和治疗剂联合包含选自下列的化疗剂：厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素、和拉帕替尼。

[0026] 本发明的药物组合物还可以含有药学上可接受的载体。

[0027] 本发明的另一方面提供治疗由 PI3 激酶调控的高增殖性疾病或病症的方法，其包括给予需要该治疗的哺乳动物有效量的式 I 或 II 化合物和化疗剂。可以共同配制式 I 或 II 化合物和化疗剂以作为药物组合物联合给药，或者它们可以作为治疗剂联合的交替（序贯）单独给药。

[0028] 本发明的另一方面提供治疗高增殖性病症的方法，其包括给予需要该治疗的哺乳动物有效量的式 I 或 II 化合物和化疗剂。

[0029] 在本发明的又一方面，提供使用本发明的药物组合物治疗哺乳动物中 PI3 激酶所调控的疾病或病症的方法。

[0030] 本发明的另一方面是本发明的药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中 PI3 激酶所调控的疾病或病症的药物中的用途。

[0031] 本发明的另一方面包括包含下列物质的制品或试剂盒：式 I 或 II 化合物、化疗剂、容器和可任选地指示治疗的包装说明书或标注。

[0032] 本发明的另一方面是包含具有式 I 或 II 的化合物和选自下列的化疗剂的产品：厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素、和拉帕替尼；它们作为联合制剂单独、同时或顺序用于治疗高增殖性病症。

[0033] 本发明的另一方面包括用于测定联合使用以治疗癌症的化合物的方法，该方法包括：a) 给予具有式 I 或 II 的化合物和化疗剂的治疗剂联合至 HER2- 扩增了的乳腺癌细胞中，该细胞处于富含层粘连蛋白的重组基膜培养基中，其中所述化疗剂靶向、结合至、或调节 HER2 受体；和 b) 测量细胞增殖的抑制，其中非恶性和恶性哺乳动物细胞通过选自细胞存活率和腺泡形态的一个或多个表型的不同来区分。

[0034] 本发明的另一方面包括用于测定联合使用以治疗癌症的化合物的方法,该方法包括:a)给予权利要求1所述的治疗剂联合至K-ras突变的体外肿瘤细胞系;和b)测量协同或非协同效应。

[0035] 附图简述

[0036] 图1-A显示式Ia化合物和各种化疗剂的联合同时给药时的体外细胞增殖测定概要。细胞系由肿瘤类型和已知突变的存在表征。将单独测量的化疗剂和式Ia化合物(GDC-0941)的EC₅₀值与联合的EC₅₀值比较,联合指数评分通过Chou和Talalay方法计算(Chou, T. 和 Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22 :27-55)。协同强度使用评级系统评分,并列在最后一栏中。

[0037] 图1-B显示式IIa化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定概要。细胞系由肿瘤类型和Ras突变的存在表征。将单独测量的化疗剂和式IIa化合物的EC₅₀值与联合的EC₅₀值比较,联合指数评分通过Chou和Talalay方法计算(Chou, T. 和 Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22 :27-55)。协同强度使用Chou和Talalay的评级系统评分。

[0038] 图1-C显示式Ib化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定概要。细胞系由肿瘤类型和Ras突变的存在表征。将单独测量的化疗剂和式Ib化合物的EC₅₀值与联合的EC₅₀值比较,联合指数评分通过Chou和Talalay方法计算(Chou, T. 和 Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22 :27-55)。协同强度使用Chou和Talalay的评级系统评分。

[0039] 图2显示测量不同浓度(以4×EC₅₀开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为5-FU、式Ia化合物(GDC-0941)、和5-FU与式Ia的联合。通过同时给药5-FU和式Ia(上)、用式Ia预给药4小时然后给药5-FU(中)、和给药5-FU之后4小时用式Ia后给药(下)处理MDA-MB-361(乳腺癌类型)细胞。

[0040] 图3显示测量不同浓度(以4×EC₅₀开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为吉西他滨、式Ia化合物(GDC-0941)、和吉西他滨和式Ia的联合。通过同时给药(上)、和给药吉西他滨之后4小时用式Ia后给药(下)处理Cal-51(乳腺癌类型)细胞。

[0041] 图4显示测量不同浓度(以4×EC₅₀开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为吉西他滨、式Ia化合物(GDC-0941)、和吉西他滨和式Ia的联合。通过同时给药吉西他滨和式Ia(上)、用式Ia预给药4小时然后给药吉西他滨(中)、和给药吉西他滨之后4小时用式Ia后给药(下)处理MDA-MB-361(乳腺癌类型)细胞。

[0042] 图5显示测量不同浓度(以4×EC₅₀开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为厄洛替尼、式Ia化合物(GDC-0941)、和厄洛替尼和式Ia的联合。通过同时给药(上)、用式Ia预给药4小时然后给药厄洛替尼(中)、和给药厄洛替尼之后4小时用式Ia后给药(下)处理A549(具有K-ras G12C的肺肿瘤类型)细胞。

[0043] 图6显示测量不同浓度(以4×EC₅₀开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为厄洛替尼、式Ia化合物(GDC-0941)、和厄洛替尼和式Ia的联合。通过同时给药(上)、用式Ia预给药4小时然后给药厄洛替尼(中)、和给药厄洛替尼之后4小时用式Ia后给药(下)处理H23(具有K-ras G12C突变

的肺肿瘤类型) 细胞。

[0044] 图 7 显示测量不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活细胞的体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 从右至左为替莫唑胺、式 Ia 化合物 (GDC-0941)、和替莫唑胺和式 Ia 的联合。通过同时给药 (上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药替莫唑胺 (中)、和给药替莫唑胺之后 4 小时用式 Ia 后给药 (下) 处理 U87 (胶质瘤类型) 细胞。

[0045] 图 8 显示测量不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活细胞的体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 从右至左为替莫唑胺、式 Ia 化合物 (GDC-0941)、和替莫唑胺和式 Ia 的联合。通过同时给药 (上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药替莫唑胺 (中)、和给药替莫唑胺之后 4 小时用式 Ia 后给药 (下) 处理 A375 (黑素瘤类型) 细胞。

[0046] 图 9 显示测量不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活细胞的体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 从右至左为替莫唑胺、式 Ia 化合物 (GDC-0941)、和替莫唑胺和式 Ia 的联合。通过同时给药 (上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药替莫唑胺 (中)、和给药替莫唑胺之后 4 小时用式 Ia 后给药 (下) 处理 MALME-3M (黑素瘤类型) 细胞。

[0047] 图 10 显示测量不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活细胞的体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 从右至左为多柔比星、式 Ia 化合物 (GDC-0941)、和多柔比星和式 Ia 的联合。通过同时给药 (上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药多柔比星 (中)、和给药多柔比星之后 4 小时用式 Ia 后给药 (下) 处理 SKOV3 (卵巢瘤类型) 细胞。

[0048] 图 11 显示测量不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活细胞的体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 从右至左为多西他赛、式 Ia 化合物 (GDC-0941)、和多西他赛和式 Ia 的联合。通过同时给药 (上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药多西他赛 (中)、和给药多西他赛之后 4 小时用式 Ia 后给药 (下) 处理 PC3 (前列腺肿瘤类型) 细胞。

[0049] 图 12 显示测量不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活 MDA-MB 361 (乳腺癌类型) 细胞的体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 从右至左为: (上) 5-FU、式 IIa 化合物、和 5-FU 和式 IIa 的同时的联合; (中) 多西他赛、式 IIa 化合物、和多西他赛和式 IIa 的同时的联合; 和 (下) 吉西他滨、式 IIa 化合物、和吉西他滨和式 IIa 的同时的联合。

[0050] 图 13 显示体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 该测定测量: (上) 不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的存活的 MT3 (乳腺癌类型) 细胞, 从右至左为: 多西他赛、式 IIa 化合物、和多西他赛和式 IIa 的同时的联合; (下) 不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活 U87 (胶质瘤类型) 细胞, 从右至左为: 替莫唑胺、式 IIa 化合物、和替莫唑胺和式 IIa 的同时的联合。

[0051] 图 14 显示测量不同浓度 (以 $4 \times EC_{50}$ 开始) 的活 ZR75-1 (乳腺癌类型) 细胞的体外细胞增殖测定 (Cell-Titer Glo, Promega) 的结果, 从右至左为: (上) 5-FU、式 IIa 化合物、和 5-FU 和式 IIa 的同时的联合; (下) 多西他赛、式 IIa 化合物、和多西他赛和式 IIa 的同时的联合。

[0052] 图 15 显示来自式 I-A 实验的厄洛替尼和式 Ia 化合物 (GDC-0941) 的抗肿瘤细胞系的协同作用 (联合指数) 的散点图, 其中所述肿瘤细胞系没有 Ras 突变 (Ras WT, 实验 41、42、73-75、77、79-81、83、84、86) 和具有 Ras 突变 (Ras Mut, 实验 40、69-72、76、78、82、144、145)。

[0053] 图 16 显示来自图 1-A 实验的 PD-0325901 和式 Ia 化合物 (GDC-0941) 抗肿瘤细胞系的协同作用 (联合指数) 的散点图, 其中所述肿瘤细胞系没有 Ras 突变 (Ras WT, 实验 22-24、26-28、31-33、36-38、55、59、61、63-66、85、89-98、149、161、162) 和具有 Ras 突变 (Ras Mut, 实验 25、30、34、35、39、56-58、60、62、67、68、146-148、150)。

[0054] 图 17 显示在 EC80 的给药水平用吉西他滨处理协同的肿瘤细胞系 MDA-MB-361 和非协同的肿瘤细胞系 MT-3 的时程结果。pAKT 水平在 T = 0 (未处理, UT)、1 小时、4 小时、6 小时和 24 小时时测量。

[0055] 图 18 显示来自图 1A 实验的多西他赛、5-FU 或吉西他滨和式 Ia 化合物 (GDC-0941) 抗肿瘤细胞系的协同作用 (联合指数) 的散点图, 所述肿瘤细胞系显示出 pAkt 增加, 或不显示 pAkt 增加。

[0056] 图 19 显示流式细胞术 FACS (荧光激活的细胞分选) 的结果: (上) MB361 细胞为 (由左至右): 未处理的、用式 Ia 处理的、用 5FU 处理的、先用 5FU 然后用式 Ia 化合物 (GDC-0941) 处理的; (中) PC3 细胞为 (由左至右): 未处理的、用式 Ia 处理的、用多西他赛处理的、同时用式 Ia 化合物和多西他赛处理的、先用式 Ia 然后用多西他赛处理的、以及先用多西他赛然后用式 Ia 处理的; 和 (下) MB361 细胞为 (由左至右): 未处理的、用式 Ia 处理的、用吉西他滨处理的、先用吉西他滨然后用式 Ia 处理的。

[0057] 图 20 显示在三维 (3D) 培养物中 BT474M1 细胞的处理。在具有和不具有 1nM 调蛋白 1 的 10% FBS 培养基中如下处理 (左至右) 后腺泡生长和形态发生与以相对光单位 (RLU) 表示的细胞 ATP 产生是相关的: 培养基、DMSO; 20 μ g/ml 曲妥珠单抗和 25 μ g/ml 培妥珠单抗的联合; 250nM 式 Ia 化合物 (GDC-0941); 和 20 μ g/ml 曲妥珠单抗、25 μ g/ml 培妥珠单抗和 250nM 式 Ia 化合物的联合。

[0058] 图 21 显示在三维 (3D) 培养物中 BT474M1 细胞的处理。在具有和不具有 1nM 调蛋白 1 的 10% FBS 培养基中如下处理 (左至右) 后腺泡生长和形态发生与以相对光单位 (RLU) 表示的细胞 ATP 产生是相关的: 培养基、DMSO; 20 μ g/ml 曲妥珠单抗和 25 μ g/ml 培妥珠单抗的联合; 250nM 式 IIa 化合物; 和 20 μ g/ml 曲妥珠单抗、25 μ g/ml 培妥珠单抗和 250nM 式 IIa 化合物的联合。

[0059] 图 21-A 显示在三维 (3D) 培养物中 BT474M1 细胞的处理。在具有和不具有 1nM 调蛋白 1 的 10% FBS 培养基中如下处理 (左至右) 后腺泡生长和形态发生与以相对光单位 (RLU) 表示的细胞 ATP 产生是相关的: DMSO; 20 μ g/ml 曲妥珠单抗和 25 μ g/ml 培妥珠单抗的联合; 20nM 式 Ib 化合物; 和 20 μ g/ml 曲妥珠单抗、25 μ g/ml 培妥珠单抗和 20nM 式 Ib 化合物的联合。

[0060] 图 22 显示在具有 MDA-MB-361.1 乳腺癌细胞异种移植物的 CD-1 裸小鼠 (Charles River 实验室) 中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: MCT 溶媒 (0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80)、150mg/kg 式 Ia (GDC-0941)、5mg/kg 多西他赛, 以及式 Ia 150mg/kg 和多西他赛 5mg/kg 的联合。在第 1、5 和 9 天 (q4d \times 3) 对小鼠进行多西他赛静脉内给药, 而式 Ia 则通过口服强饲法每日一次, 给药 21 天。

[0061] 图 23 显示在具有 MDA-MB-361.1 乳腺癌细胞异种移植物的 CD-1 裸小鼠 (Charles River 实验室) 中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 1 天如下给药: MCT 溶媒 (0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80)、37.5mg/kg 式 IIa、5mg/kg 多西他赛以及 37.5mg/kg 式 IIa 和

5mg/kg 多西他赛的联合。在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 对小鼠进行多西他赛静脉内给药,而式 IIa 则通过口服强饲法每日一次,给药 21 天。

[0062] 图 24 显示在具有 MAXF 401 原发性乳腺癌外植体异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu(裸)小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5%甲基纤维素/0.2%吐温 80)、100mg/kg 式 Ia(GDC-0941)、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 Ia 和 15mg/kg 多西他赛的联合。在第 0 天和第 11 天用多西他赛对小鼠进行静脉内给药,而式 Ia 则通过口服强饲法在第 0-4、11-17 和 21-28 天给药。

[0063] 图 25 显示在具有 MAXF 401 原发性乳腺癌细胞外植体异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5%甲基纤维素/0.2%吐温 80)、100mg/kg 式 IIa、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 IIa 和 15mg/kg 多西他赛的联合。在第 0 天和第 11 天用多西他赛对小鼠进行静脉内给药,而式 IIa 则通过口服强饲法在第 0-3、11-17 和 21-28 天给药。

[0064] 图 26 显示在具有 MAXF 1162 原发性乳腺癌细胞外植体异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5%甲基纤维素/0.2%吐温 80)、100mg/kg 式 Ia(GDC-0941)、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 Ia 和 15mg/kg 多西他赛的联合。在第 0、11、22 和 44 天对小鼠进行多西他赛静脉内给药,并且通过口服强饲法在第 0-5、11-16、22-27、30-32、42 和 44 天给药式 Ia 化合物。

[0065] 图 27 显示在具有 MAXF 1162 原发性乳腺癌细胞异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5%甲基纤维素/0.2%吐温 80)、100mg/kg 式 IIa、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 IIa 和 15mg/kg 多西他赛的联合。在第 0、11、22 和 44 天对小鼠进行多西他赛静脉内给药,并且通过口服强饲法在第 0-5、11-16、22-23、29-31、和 35-38 天给药式 IIa 化合物。

[0066] 图 28 显示在具有 NCI-H2122 非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu(裸)小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5%甲基纤维素/0.2%吐温 80)、50mg/kg 式 Ia(GDC-0941)、75mg/kg 厄洛替尼以及 50mg/kg 式 Ia 和 75mg/kg 厄洛替尼的联合。通过口服强饲法对小鼠进行每日一次的厄洛替尼和式 Ia 给药,给药 16 天。

[0067] 图 29 显示在具有 NCI-H2122 非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu(裸)小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5%甲基纤维素/0.2%吐温 80)、50mg/kg 式 IIa、75mg/kg 厄洛替尼以及 50mg/kg 式 IIa 和 75mg/kg 厄洛替尼的联合。通过口服强饲法对小鼠进行每日一次的厄洛替尼和式 IIa 给药,给药 14 天(研究结束)。

[0068] 图 30 显示在具有 MCF-7(PI3K 突变体)乳腺癌细胞异种移植物的 HRLN 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 和 PBS 溶媒(MCT;0.5%甲基纤维素/0.2%吐温 80 和 PBS;磷酸盐缓冲液)、对照 IgG 5mg/kg、mB20-4.1 鼠抗 VEGF 5mg/kg、式 Ia(GDC-0941) 150mg/kg、以及式 Ia 150mg/kg 和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 5mg/kg 的联合。用对照 IgG 和 mB20-4.1 对动物进行腹膜内给药 3 周,每周两次,并且通过口服强饲法每日一次给药式 Ia,给药 21 天,对肿瘤生长再监测 41 天(研究总天数为 62 天)。同时共同给药式 Ia 和 mB20-4.1。

[0069] 图 31 显示在具有 MCF-7 (PI3K 突变体) 乳腺癌细胞异种移植物的 HRLN 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: MCT 和 PBS 溶媒 (MCT; 0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80 和 PBS; 磷酸盐缓冲液)、对照 IgG 5mg/kg、mB20-4.1 鼠抗 VEGF (抗血管发生) 5mg/kg、式 IIa 100mg/kg、以及式 IIa 100mg/kg 和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 5mg/kg 的联合。用对照 IgG 和 mB20-4.1 对动物进行腹膜内给药 3 周, 每周两次, 并且每日一次口服给药式 IIa 达 21 天, 对肿瘤生长再监测 41 天 (研究总天数为 62 天)。同时共同给药式 IIa 和 mB20-4.1。

[0070] 图 32 显示在具有 U87MG 胶质瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 式 Ia (GDC-0941) 109mg/kg、替莫唑胺 100mg/kg、和式 Ia 109mg/kg 和替莫唑胺 100mg/kg 的联合、以及不接受药物的小鼠 (未处理组)。每天一次对动物进行式 Ia 口服给药达 21 天, 以及替莫唑胺口服给药 5 天。

[0071] 图 33 显示在具有 MDA-MB-361.1 乳腺癌细胞异种移植物的 CD-1 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 式 Ia (GDC-0941) 150mg/kg、吉西他滨 100mg/kg、和式 Ia 150mg/kg 和吉西他滨 100mg/kg 的联合、以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。每天一次对动物进行式 Ia 口服给药达 21 天, 并且在第 1、4、7 和 10 天 (q3d×4) 进行腹膜内吉西他滨给药。

[0072] 图 34 显示在具有 BT474 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 式 Ia (GDC-0941) 18、36 和 73mg/kg; 曲妥珠单抗 20mg/kg; 以及式 Ia 18、36 和 73mg/kg 与曲妥珠单抗 20mg/kg 的联合; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。每天一次对动物进行式 Ia 口服给药达 21 天, 并且每周两次静脉内给药曲妥珠单抗, 给药 3 周。

[0073] 图 35 显示在具有 BT474 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周; 每周 2 次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周; 每天一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周; 每周一次静脉内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周; 以及下列的联合: 每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周、每周 2 次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周、每天一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0074] 图 36 显示在具有 MCF-7 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg 鼠抗 VEGF 抗体 B20-4.13 周; 每天 1 次口服式 Ib 10mg/kg 4 天; 每天一次口服式 Ib 5mg/kg 0-3 天、10-26 天, 每天一次口服式 Ib 2mg/kg 0-4 天、10-25 天; 以及: 每天 1 次口服式 Ib 10mg/kg 4 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周的联合; 每天一次口服式 Ib 5mg/kg 0-3 天、10-26 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周的联合; 以及每天一次口服式 Ib 2mg/kg 0-4 天、10-25 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周的联合, 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0075] 图 37 显示在具有 Fo5 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg 鼠抗 VEGF 抗体 B20-4.13 周; 每天 1 次口服式 Ia (GDC-0941) 36 和 73mg/kg 达 21 天; 每天一次口服式

Ib 2.5 和 5mg/kg 达 21 天 ;以及每天一次口服式 Ia 36mg/kg 达 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周的联合 ;每天 1 次口服式 Ia 73mg/kg 达 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周的联合 ;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 达 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周的联合 ;以及每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 达 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周的联合以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0076] 图 38 显示在具有 MDA-MB-231 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg 鼠抗 VEGF 抗体 B20-4.13 周 ;每天 1 次口服式 Ia(GDC-0941)36 和 73mg/kg 21 天 ;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 21 天和每天一次口服 Ib 7.5mg/kg 8 天, 以及下列的联合 :每天一次口服式 Ia 36mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周 ;每天 1 次口服式 Ia 73mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周 ;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.13 周 ;以及每天一次口服式 Ib 7.5mg/kg 8 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.11.5 周以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0077] 图 39 显示在具有 H1299 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天 ;每天一次口服式 Ia(GDC-0941)100mg/kg 6 天 ;每天一次口服式 Ia 50mg/kg 21 天、每天一次口服式 Ia 25mg/kg 21 天 ;以及每天一次口服式 Ia 100mg/kg 6 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 6 天的联合 ;每天一次口服式 Ia 50mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合 ;和每天一次口服式 Ia 25mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0078] 图 40 显示在具有 H520 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天 ;每天一次口服式 Ia(GDC-0941)73mg/kg 4 天 ;每天一次口服式 Ia 36mg/kg 21 天、每天一次口服式 Ia 18mg/kg 21 天 ;以及每天一次口服式 Ia 73mg/kg 4 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 4 天的联合 ;每天一次口服式 Ia 36mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合 ;和每天一次口服式 Ia 18mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0079] 图 41 显示在具有 H1299 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 3 周 ;每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 21 天 ;每周 2 次口服式 Ib 5mg/kg 3 周 ;每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周 ;以及每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 3 周的联合 ;每周 2 次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 3 周的联合 ;以及每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 3 周的联合 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0080] 图 42 显示在具有 NCI-H2122 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Taconic NCR 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服厄洛替尼 75mg/kg 16 天 ;每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 16 天 ;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 16 天 ;每天一次口服式 Ib 7.5mg/kg 16 周 ;以及每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 16 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 3 周 ;每周 2 次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每天

一次口服厄洛替尼 50mg/kg 16 天 ;以及每天一次口服式 Ib 5mg/kg 16 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 16 天 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0081] 图 43 显示在具有 A375 人黑素瘤肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服 3mg/kg PD-03259013 周 ;每天一次口服式 Ia(GDC-0941)73mg/kg 3 周 ;以及每天一次口服 3mg/kg PD-03259013 周和每天一次口服式 Ia 73mg/kg 3 周的联合 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒对照)。

[0082] 图 44 显示在具有 A375 人黑素瘤肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服替莫唑胺 100mg/kg 5 天 ;每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周 ;每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周 ;以及每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周和每天一次口服替莫唑胺 100mg/kg 5 天的联合 ;和每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每天一次口服替莫唑胺 100mg/kg 5 天的联合 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒对照)。

[0083] 图 45 显示在具有 SKOV3 人卵巢癌肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服式 Ia(GDC-0941)73mg/kg 3 周 ;每天一次口服式 Ia 36mg/kg 3 周 ;每周一次腹膜内给药多西他赛 10mg/kg 3 周 ;以及每天一次口服式 Ia 73mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合 ;每天一次口服式 Ia36mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合 ;以及每周一次口服式 Ia 73mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周 ;以及不接受药物的小组 (溶媒组)。

[0084] 图 46 显示在具有 SKOV3 人卵巢癌肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每天一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周 ;每天一次口服式 Ib 1mg/kg 3 周 ;每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周 ;以及每日一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合 ;以及每日一次口服式 Ib 1mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0085] 图 47 显示在具有 SKOV3 人卵巢癌肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周 ;每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周 ;每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周 ;以及每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合 ;以及每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合 ;以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。

[0086] 图 48 显示在具有 LuCap 35V 人原发性前列腺癌肿瘤细胞异种移植物的雌性 SCID Beige 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药 :在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg ;每天一次口服式 Ia(GDC-0941)50mg/kg 18 天 ;每天一次口服式 Ia 100mg/kg 18 天 ;以及在第 1、5 和 9 天静脉内给药多西他赛 5mg/kg(q4d×3) 和每天一次口服式 Ia 50mg/kg 18 天的联合 ;以及在第 1、5 和 9 天静脉内给药多西他赛 5mg/kg(q4d×3) 和每天一次口服式 Ia 100mg/kg 18 天的联合, 以及不接受药物的小组 (溶媒组)。

[0087] 图 49 显示在具有 LuCap 35V 人原发性前列腺癌肿瘤细胞异种移植物的雌性 SCID Beige 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg;每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 15 天;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 15 天;以及在第 1、5 和 9 天静脉内给药多西他赛 5mg/kg(q4d x 3) 和每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 15 天的联合;以及在第 1、5 和 9 天静脉内给药多西他赛 5mg/kg(q4d x 3) 和每天一次口服式 Ib 5mg/kg15 天的联合,以及不接受药物的小组(溶媒组)。

[0088] 图 50 显示在具有 PC3-NCI 人原发性前列腺癌肿瘤细胞异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠如下给药:在第 1、5、9 和 13 天 (q4d×4) 静脉内给药多西他赛 2.5mg/kg,在第 1、5、9 和 13 天 (q4d×4) 口服给药式 Ib 10mg/kg 以及在第 1、5、9 和 13 天 (q4d×4) 静脉内给药多西他赛 2.5mg/kg 和口服给药式 Ib 10mg/kg 的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。

[0089] 图 51 显示在具有 PC3-NCI 人原发性前列腺癌肿瘤细胞异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每 3 天一次 (q3d) 腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg4 次;每 3 天一次 (q3d) 口服式 Ia(GDC-0941)150mg/kg 4 次;每 3 天一次 (q3d) 口服式 Ib 2.5mg/kg 4 次;每 3 天一次 (q3d) 口服式 Ib 5mg/kg 4 次;以及每 3 天一次腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次和每 3 天一次口服式 Ia 150mg/kg 4 次的联合;每 3 天一次腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次和每 3 天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 4 次的联合;每 3 天一次腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次和每 3 天一次口服式 Ib 5mg/kg 4 次的联合和每 3 天一次口服式 Ib 10mg/kg4 次的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。

[0090] 图 52 显示在具有 NCI-H2122(K-ras)NSCLC 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每天一次口服给药 6.3mg/kg PD-0325901 21 天;每天一次口服式 Ia(GDC-0941)100mg/kg 21 天;以及每天一次口服给药 6.3mg/kg PD-032590121 天和每天一次口服式 Ia 100mg/kg 21 天的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒对照)。

具体实施方式

[0091] 现在详细参考本发明的某些实施方式,它们的实例在所附的结构和式中例示。尽管将结合列举的实施方式描述本发明,但应了解它们并不旨在将本发明限制在那些实施方式中。相反,本发明旨在涵盖权利要求书所定义的本发明的范围内的所有替代形式、修改和等同形式。本领域的技术人员应认识到与本文所述的方法和材料类似或等同的那些方法和材料可以用于实施本发明。本发明绝非限制在所描述的方法和材料内。在一个或多个所并入的文献、专利和类似材料与本申请不同或冲突时,包括但不限于定义的术语、术语使用、所描述的技术等,以本申请为准。

[0092] 定义

[0093] 词语“包含”、“包括”,“含有”在用于本说明书和权利要求书时意欲说明所述特征、整数、组分或步骤的存在,而不排除存在或添加一个或多个其他特征、整数、组分、步骤或它们的组。

[0094] 如本文所用的术语“烷基”是指 1 至 12 个碳原子的饱和的直链或支链单价烃基,其中所述烷基可以任选地被一个或多个下面所述的取代基独立地取代。烷基的实例包括

但不限于：甲基 (Me、 $-\text{CH}_3$)、乙基 (Et、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$)、1-丙基 (n-Pr、正丙基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-丙基 (i-Pr、异丙基、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、1-丁基 (n-Bu、正丁基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-甲基-1-丙基 (i-Bu、异丁基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-丁基 (s-Bu、仲丁基、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-甲基-2-丙基 (t-Bu、叔丁基、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、1-戊基 (正戊基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-2-丁基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-甲基-2-丁基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3-甲基-1-丁基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-1-丁基 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、1-己基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-己基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-己基 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$)、2-甲基-2-戊基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-甲基-2-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、4-甲基-2-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3-甲基-3-戊基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-3-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2,3-二甲基-2-丁基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3,3-二甲基-2-丁基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、1-庚基、1-辛基等。

[0095] 术语“烯基”是指具有至少一个不饱和位点 (即,碳-碳, sp^2 双键) 的 2 至 12 个碳原子的直链和支链单价烃基,其中所述烯基可以任选地被一个或多个本文所述的取代基独立地取代,并且包括具有“顺”和“反”取向,或者“E”和“Z”取向的基团。实例包括但不限于:亚乙基或乙烯基 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基 ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) 等。

[0096] 术语“炔基”是指具有至少一个不饱和位点 (即,碳-碳, sp 三键) 的 2 至 12 个碳原子的直链和支链单价烃基,其中所述炔基可以任选地被一个或多个本文所述的取代基独立地取代。实例包括但不限于乙炔基 ($-\text{C}\equiv\text{CH}$)、丙炔基 (炔丙基, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) 等。

[0097] 术语“碳环”、“碳环基”、“碳环的环”和“环烷基”是指作为单环具有 3 至 12 个碳原子或作为双环具有 7 至 12 个碳原子的单价非芳族饱和或部分不饱和的环。具有 7 至 12 个原子的双环碳环可以排列为例如二环 [4,5]、[5,5]、[5,6] 或 [6,6] 系统,具有 9 或 10 个环原子的双环碳环可以排列成二环 [5,6] 或 [6,6],或排列成桥接系统,如二环 [2.2.1] 庚烷、二环 [2.2.2] 辛烷和二环 [3.2.1] 壬烷。单环碳环的实例包括但不限于:环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环己二烯基、环庚基、环辛基、环壬基、环癸基、环十一烷基、环十二烷基等。

[0098] “芳基”意指通过从母芳香环系统的单个碳原子上移除一个氢原子而衍生的 6-20 个碳原子的单价芳族烃基。在示例性结构中一些芳基表示为“Ar”。芳基包括包含与饱和的、部分不饱和的环或芳族碳环或杂环稠合的芳族环的二环基团。通常芳基包括但不限于衍生自下列的基团:苯 (苯基)、取代的苯、萘、蒽、联苯基、茛基、茛满基、1,2-二氢萘、1,2,3,4-四氢萘基等。芳基可任选地被一个或多个本文所述的取代基独立地取代。

[0099] 术语“杂环”、“杂环基”和“杂环的环”在本文可互换使用,是指 3 至 20 个环原子的饱和或部分不饱和 (即,在环中具有一个或多个双键和 / 或三键) 的碳环基团,其中至少一个还原原子为选自氮、氧和硫的杂原子,剩余的环原子为 C,其中一个或多个还原原子可任选地被一个或多个下文所述的取代基独立地取代。杂环可以是具有 3 至 7 个环成员 (2 至 6 个碳原子和 1 至 4 个选自 N、O、P 和 S 的杂原子) 的单环或具有 7 至 10 个环成员 (4 至 9 个碳原子和 1 至 6 个选自 N、O、P 和 S 的杂原子) 的双环,例如:二环 [4,5]、[5,5]、[5,6]、或 [6,6] 系统。杂环描述在 Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), 尤其是第 1、3、4、6、7、和 9

章；“The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), 尤其是第 13、14、16、19、和 28 卷；和 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82 :5566 中。术语“杂环”包括杂环烷氧基。“杂环基”还包括其中杂环基与饱和的、部分不饱和的环、或芳族碳环或杂环稠合的基团。杂环的实例包括但不限于：吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢硫代吡喃基、哌啶子基 (piperidino)、吗啉代、硫代吗啉代、噻噁烷基、哌嗪基、高哌嗪基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基 (thietanyl)、高哌啶基、氧杂环庚烷基 (oxepanyl)、硫杂环庚烷基 (thiepanyl)、氧杂吡啶基 (oxazepinyl)、二氮杂卓基 (diazepinyl)、硫氮杂卓基 (thiazepinyl)、2- 吡咯啉基、3- 吡咯啉基、二氢吡啶基、2H- 吡喃基、4H- 吡喃基、二噻烷基、1,3- 二氧戊环基 (1,3-dioxolanyl)、吡唑基、二噻烷基 (dithianyl)、二硫戊环基 (dithiolanyl)、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡啶基咪唑基、咪唑基、3- 氮杂二环 [3.1.0] 己烷基、3- 氮杂二环 [4.1.0] 庚烷基、氮杂二环 [2.2.2] 己烷基、3H- 吡啶基喹啉基和 N- 吡啶基脒。螺旋部分也包括在此定义的范围之内。其中两个环碳原子被氧 (=O) 部分取代的杂环基团的实例为嘧啶酮基和 1,1- 二氧化 - 硫代吗啉基。本文的杂环基团可任选地被一个或多个本文所述的取代基独立地取代。

[0100] 术语“杂芳基”是指含有独立地选自氮、氧、和硫的一个或多个杂原子的 5-、6-、或 7- 元环的单价芳族基团，并且包括 5-20 个原子的稠合环系统（其至少一个为芳族的）。杂芳基基团的实例包括吡啶基（包括，例如 2- 羟基吡啶基）、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基（包括，例如，4- 羟基嘧啶基）、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吡唑基、吡嗪基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吡啶基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、噻二唑基、呋喃基、苯并呋喃基、苯并苯硫基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹啉基、喹噁啉基、萘啶基、和呋喃吡啶基。杂芳基基团可任选地被一个或多个本文所述的取代基独立地取代。

[0101] 杂环或杂芳基在可能的情况下可以是碳（碳 - 连接的）、氮（氮 - 连接的）或氧（氧 - 连接的）连接的。例如但不限于：碳键结的杂环或杂芳基在下列位置处键合：吡啶的位置 2、3、4、5、或 6；哒嗪的位置 3、4、5、或 6；嘧啶的位置 2、4、5、或 6；吡嗪的位置 2、3、5、或 6；呋喃、四氢呋喃、硫茂 (thiofuran)、噻吩、吡咯或四氢吡咯的位置 2、3、4、或 5；噁唑、咪唑或噻唑的位置 2、4、或 5；异噻唑、吡唑、异噻唑的位置 3、4、或 5；氮丙啶的位置 2 或 3；氮杂环丁烷的位置 2、3、或 4；喹啉的位置 2、3、4、5、6、7、或 8 或异喹啉的位置 1、3、4、5、6、7、或 8。

[0102] 例如但不限于：氮键结的杂环或杂芳基在下列位置键合：氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2- 吡咯啉、3- 吡咯啉、咪唑、咪唑啉、2- 咪唑啉、3- 咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2- 吡唑啉、3- 吡唑啉、哌啶、哌嗪、吡啶、二氢吡啶、1H- 吡啶的位置 1 处；异吡啶或异二氢吡啶的位置 2 处；吗啉的位置 4 处；吡唑或 β - 吡啶的位置 9 处。

[0103] “碳连接的单环杂芳基”是指含有 1、2、3 或 4 个独立地选自 N、O 和 S 的环杂原子的 5 元或 6 元不饱和或饱和单环杂芳基。碳连接的单环杂芳基在单环杂芳基 R³ 基团的任何碳原子上在根据式 I 和 II 的嘧啶环的 C-2 位置连接。碳连接的单环杂芳基基团包括但不限于：2- 吡啶基、3- 吡啶基、4- 吡啶基、3- 异噻唑基、4- 异噻唑基、5- 异噻唑基、2- 咪唑基、4- 咪唑基、3- 吡唑基、4- 吡唑基、2- 吡咯基、3- 吡咯基、2- 噻唑基、4- 噻唑基、5- 噻唑基、

3- 哒嗪基、4- 哒嗪基、5- 哒嗪基、2- 嘧啶基、5- 嘧啶基、6- 嘧啶基、2- 吡嗪基、2- 噁唑基、4- 噁唑基、5- 噁唑基、2- 咪唑基、3- 咪唑基、2- 噻吩基、3- 噻吩基、3- 三唑基、1- 三唑基、5- 四唑基、1- 四唑基、和 2- 四唑基。碳连接的单环杂芳基可任选地被一个或多个本文所述的取代基独立地取代。

[0104] 含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的“碳连接的稠合二环 C_3 - C_{20} 杂环基”和“碳连接的稠合二环 C_1 - C_{20} 杂芳基”仅在他们的芳族特征上不同，并且具有两个稠合在一起的环，即，具有共同的键。碳连接的稠合的二环杂环基和杂芳基基团在稠合的二环 C_3 - C_{20} 杂环基或稠合的二环 C_1 - C_{20} 杂芳基 R^3 基团的任何碳原子处在根据式 I 和 II 的嘧啶环的 C-2 位置连接。碳连接的稠合的二环杂环基和杂芳基基团包括但不限于：1H- 吡啶、1H- 吡啶、二氢吡啶 -2- 酮、1-(二氢吡啶 -1- 基) 乙酮、1H- 苯并 [d] [1,2,3] 三唑、1H- 吡唑并 [3,4-b] 吡啶、1H- 吡唑并 [3,4-d] 嘧啶、1H- 苯并 [d] 咪唑、1H- 苯并 [d] 咪唑 -2(3H)- 酮、1H- 吡唑并 [3,4-c] 吡啶、1H- 吡咯并 [2,3-c] 吡啶、3H- 咪唑并 [4,5-c] 吡啶、7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶、7H- 嘌呤、1H- 吡唑并 [4,3-d] 嘧啶、5H- 吡咯并 [3,2-d] 嘧啶、2- 氨基 -1H- 嘌呤 -6(9H)- 酮、喹啉、喹唑啉、喹噁啉、异喹啉、异喹啉 -1(2H)- 酮、3,4- 二氢异喹啉 -1(2H)- 酮、3,4- 二氢喹啉 -2(1H)- 酮、喹唑啉 -2(1H)- 酮、喹噁啉 -2(1H)- 酮、1,8- 萘啶、吡啶并 [3,4-d] 嘧啶、和吡啶并 [3,2-b] 吡嗪。稠合的二环杂环和稠合的二环杂芳基可任选地被本文所述的一个或多个取代基独立地取代。

[0105] 烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、杂芳基、稠合二环 C_4 - C_{20} 杂环基、和稠合二环 C_1 - C_{20} 杂芳基可任选地被取代的取代基团包括下列的基团：F、Cl、Br、I、CN、CF₃、-NO₂、氧代、R¹⁰、-C(=Y)R¹⁰、-C(=Y)OR¹⁰、-C(=Y)NR¹⁰R¹¹、-(CR¹⁴R¹⁵)_nNR¹⁰R¹¹、-(CR¹⁴R¹⁵)_nOR¹⁰、-NR¹⁰R¹¹、-NR¹²C(=Y)R¹⁰、-NR¹²C(=Y)OR¹¹、-NR¹²C(=Y)NR¹⁰R¹¹、-NR¹²SO₂R¹⁰、=NR¹²、OR¹⁰、-OC(=Y)R¹⁰、-OC(=Y)OR¹⁰、-OC(=Y)NR¹⁰R¹¹、-OS(O)₂(OR¹⁰)、-OP(=Y)(OR¹⁰)(OR¹¹)、-OP(OR¹⁰)(OR¹¹)、SR¹⁰、-S(O)R¹⁰、-S(O)₂R¹⁰、-S(O)₂NR¹⁰R¹¹、-S(O)(OR¹⁰)、-S(O)₂(OR¹⁰)、-SC(=Y)R¹⁰、-SC(=Y)OR¹⁰、-SC(=Y)NR¹⁰R¹¹、可任选被取代的 C₁-C₁₂ 烷基、可任选被取代的 C₂-C₈ 烯基、可任选被取代的 C₂-C₈ 炔基、可任选被取代的 C₃-C₁₂ 碳环基、可任选被取代的 C₂-C₂₀ 杂环基、可任选被取代的 C₆-C₂₀ 芳基、可任选被取代的 C₁-C₂₀ 杂芳基、-(CR¹⁴R¹⁵)_t-NR¹²C(=O)(CR¹⁴R¹⁵)NR¹⁰R¹¹、和 (CR⁴R⁵)_t-NR¹⁰R¹¹。

[0106] 术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性或防止性措施，其中受试者的不期望的生理变化或病症得到预防或减缓（减轻），例如癌症的生长、发展或扩散。为了本发明的目的，有益的或期望的临床结果包括但不限于：可检测的或不可检测的症状的减轻、疾病程度的降低、疾病状态的稳定（即，不恶化）、疾病进展的延缓或推迟、疾病状态的改善或缓和、以及缓解（部分或全部）。“治疗”还可以指与不接受治疗时的预期寿命相比延长了寿命。需要治疗的那些包括已经具有病症或疾病的那些以及倾向于具有病况或病症的那些或其中要预防病况或病症的那些。

[0107] 短语“治疗有效量”意指本发明化合物达到下列作用的量：(i) 治疗特定疾病、病况或病症；(ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或病症的一个或多个症状；或 (iii) 预防或延缓本文所述的疾病、病况或病症的一个或多个症状的发作。在癌症的情况下，治疗有效量的药物可以降低癌细胞的数目；减小肿瘤大小；抑制（即，减缓至某种程度并且优选停止）癌细胞渗入周围器官；抑制（即，减缓至某种程度并且优选停止）肿瘤转移；抑制（至

某种程度) 肿瘤生长;和 / 或缓解一个或多个与癌症相关的症状至某种程度。在药物可能阻止生长和 / 或杀死现有癌细胞的程度上, 药物可能是细胞生长抑制性的和 / 或细胞毒性的。对于癌症治疗, 效力可以通过例如估计疾病进展的时间 (TTP) 和 / 或测定响应率 (RR) 来测量。

[0108] 术语“癌”和“癌的”是指或描述通常由不受调节的细胞生长所表征的哺乳动物中的生理状况。“肿瘤”包含一个或多个癌细胞。癌症的实例包括但不限于: 癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病或恶性淋巴瘤。这类癌症的更具体地实例包括: 鳞状细胞癌(例如, 鳞状上皮细胞癌)、肺癌, 包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、肺腺癌和肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃(gastric 或 stomach) 癌, 包括胃肠癌、胰腺癌、恶性胶质瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝癌(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌瘤、肛管癌、阴茎癌、以及头颈癌。

[0109] “化疗剂”是可用于治疗癌症的生物(大分子)或化学(小分子)化合物, 与作用机制无关。化疗剂的种类包括但不限于: 烷化剂、抗代谢剂、纺锤体毒性植物碱、细胞毒性 / 抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、蛋白、抗体、光敏剂和激酶抑制剂。化疗剂包括用于“靶向治疗”和非靶向常规化疗的化合物。

[0110] 化疗剂的实例包括: 厄洛替尼(TARCEVA[®], Genentech/OSI Pharm.)、多西他赛(TAXOTERE[®], Sanofi-Aventis)、5-FU(氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶, CAS No. 51-21-8)、吉西他滨(GEMZAR[®], Lilly)、PD-0325901(CAS No. 391210-10-9, Pfizer)、顺铂(顺-二胺, 二氯铂(II), CAS No. 15663-27-1)、卡铂(CAS No. 41575-94-4)、紫杉醇(TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、贝伐单抗(AVASTIN[®], Genentech)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN[®], Genentech)、培妥珠单抗(OMNITARG[®], rhuMab 2C4, Genentech)、替莫唑胺(4-甲基-5-氧代-2,3,4,6,8-五氮杂二环[4.3.0]壬-2,7,9-三烯-9-羧酰胺, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR[®], TEMODAL[®], ScheringPlough)、他莫昔芬((Z)-2-[4-(1,2-二苯基丁-1-烯基)苯氧基]-N,N-二甲基-乙烷胺, NOLVADEX[®], ISTUBAL[®], VALODEX[®])、多柔比星(ADRIAMYCIN[®])、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素、和拉帕替尼(TYKERB[®], Glaxo SmithKline)。

[0111] 化疗剂的更多实例包括: 奥沙利铂(oxaliplatin)(ELOXATIN[®], Sanofi)、硼替佐米(bortezomib)(VELCADE[®], Millennium Pharm.)、舒尼替尼(sutent)(SUNITINIB[®], SU11248, Pfizer)、来曲唑(letrozole)(FEMARA[®], Novartis)、甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)(GLEEVEC[®], Novartis)、XL-518(MEK 抑制剂, Exelixis, WO 2007/044515)、ARRY-886(MEK 抑制剂, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca)、SF-1126(PI3K 抑制剂, SemaphorePharmaceuticals)、BEZ-235(PI3K 抑制剂, Novartis)、XL-147(PI3K 抑制剂, Exelixis)、ABT-869(VEGF 和 PDGF 家族受体酪氨酸激酶的多靶点抑制剂, Abbott Laboratories and Genentech)、ABT-263(Bcl-2/Bcl-xL 抑制剂, Abbott Laboratories and Genentech)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、氟维司群(fulvestrant)(FASLODEX[®], AstraZeneca)、亚叶酸(甲酰四氢叶酸)、洛那法尼(lonafarnib)(SARASAR[™], SCH 66336, Schering Plough)、索拉非尼(sorafenib)(NEXAVAR[®], BAY43-9006, Bayer Labs)、吉非替尼(gefitinib)(IRESSA[®], AstraZeneca)、依立替康(irinotecan)(CAMPTOSAR[®]

, CPT-11, Pfizer)、替比伐尼 (tipifarnib) (ZARNESTRA™, Johnson&Johnson)、卡培他滨 (capecitabine) (XELODA® , Roche)、ABRAXANE™ (不含克列莫佛 (Cremophor)、紫杉醇的白蛋白工程化纳米粒子制剂 (AmericanPharmaceutical Partners, Schaumberg, IL)、凡德他尼 (vandetanib) (rINN, ZD6474, ZACTIMA® , AstraZeneca)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、AG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen)、西罗莫司 (temsirolimus) (TORISEL® , Wyeth)、帕唑帕尼 (pazopanib) (GlaxoSmithKline)、坎磷酰胺 (canfosfamide) (TELCYTA® , Telik)、硫替派 (thiotepa) 和环磷酰胺 (CYTOXAN® , NEOSAR®) ; 磺酸烷基酯, 如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan) ; 氮丙啶, 如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedopa)、和乌瑞替派 (uredopa) ; 乙烯亚胺和甲基三聚氰胺 (methylmelamine), 包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三甲基三聚氰胺; 多聚乙酰 (尤其是布拉它辛 (bullatacin) 和不拉它辛酮 (bullatacinone) ; 喜树碱 (包括合成类似物托泊替康 (topotecan)) ; 苔藓抑素; 海绵多烯酮类化合物 (callystatin) ; CC-1065 (包括它的阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物) ; 自念珠藻环肽 (cryptophycin) (尤其是自念珠藻环肽 1 和自念珠藻环肽 8) ; 多拉司他汀 (dolastatin) ; 倍癌霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1) ; 艾榴素; 水鬼蕉碱 (pancratistatin) ; 匍枝珊瑚醇 (sarcodictyin) ; 海绵抑制素 (spongistatin) ; 氮芥, 如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、环磷酰胺、雌氮芥 (estramustine)、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、氧化双氯乙基甲胺盐酸盐、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲, 如亚硝基脲氮芥 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine)、和雷莫司汀 (ranimustine) ; 抗生素, 如烯二炔抗生素 (例如, 刺孢霉素 (calicheamicin)、刺孢霉素 γ II、刺孢霉素 ω II、达内霉素 (dynemicin)、达内霉素 A; 二磷酸盐, 如氯膦酸盐 (clodronate) ; 埃斯培拉霉素 (esperamicin) 以及新制癌菌素 (neocarzinostatin) 生色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素、安曲霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C、卡拉比星 (carabycin)、卡美诺霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycinis)、放线菌素 D、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二偶氮-5-氧代-L-正亮氨酸、吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (mitomycin) (如丝裂霉素 C)、麦考酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (porfiromycin)、嘌罗霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑霉素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin) ; 抗代谢剂, 如氨甲喋呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU) ; 叶酸类似物, 如二甲叶酸、氨甲喋呤、蝶罗呤、三甲曲沙 (trimetrexate) ; 嘌呤类似物, 如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯嘌呤、

硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6- 氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine);雄性激素,卡普睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone);抗肾上腺素,如氨基米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane);叶酸补充剂,如亚叶酸;醋葡萄糖内酯 (aceglatone);醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶 (eniluracil);安吡啶 (amsacrine);贝司塔布斯 (bestrabucil);比生群 (bisantrene);依达曲沙 (edatraxate);地磷酰胺 (defofamine);秋水仙胺 (demecolcine);地吡醌 (diaziquone);依氟鸟氨酸 (elfornithine);依利醋铵 (elliptinium acetate);埃博霉素 (epothilone);依托格鲁 (etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖 (lentinan);氯尼达明 (lonidainine);美登醇 (maytansinoid),如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin);米托胍脲 (mitoguazone);米托蒽醌 (mitoxantrone);莫哌达醇 (mopidamol);尼曲吡啶 (nitraerine);喷司他丁 (pentostatin);蛋氨酸芥 (phenamet);吡柔比星 (pirarubicin);洛索蒽醌 (losoxantrone);鬼臼酸 (podophyllinic acid);2- 乙基胍;丙卡巴胍 (procarbazine);PSK[®] 多糖复合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR);雷佐生 (razoxane);根霉素 (rhizoxin);西佐喃 (sizofiran);锗螺胺 (spirogermanium);细格孢氮杂酸 (tenuazonic acid);三亚胺醌 (triaziquone);2,2', 2'' -三氯三乙胺;单端孢霉烯 (trichothecene) (尤其是T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素 (roridin)A 和蛇形菌素 (anguidine));乌拉坦 (urethane);长春地辛 (vindesine);达卡巴嗪 (dacarbazine);甘露莫司汀 (mannomustine);二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷 (pipobroman);加西托辛 (gacytosine);阿糖胞苷 (arabinoside) (" Ara-C");环磷酰胺;塞替派 (thiotepa);6- 硫鸟嘌呤;硫嘌呤;氨基嘌呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;依托泊苷 (etoposide) (VP-16);异环磷酰胺 (ifosfamide);米托蒽醌 (mitoxantrone);长春新碱 (vincristine);长春瑞滨 (vinorelbine) (NAVELBINE[®]);诺安托 (novantrone);替尼泊苷 (teniposide);依达曲沙 (edatrexate);道诺霉素 (daunomycin);氨基蝶呤;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);类视黄醇 (retinoid),如视黄酸;以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0112] 还包括在“化疗剂”的定义内的是:(i) 作用为调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,如抗雌激素和选择性的雌激素受体调控剂 (SERM),包括:例如他莫昔芬 (包括 NOLVADEX[®];柠檬酸他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 FARESTON[®] (柠檬酸托瑞米芬 (toremifine citrate));(ii) 抑制调节肾上腺中雌激素产生的酶芳香酶的芳香酶抑制剂,例如 4(5)-咪唑、氨基米特 (aminoglutethimide)、MEGASE[®] (醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate))、AROMASIN[®] (依西美坦 (exemestane);Pfizer)、甲酚苯丙胺 (formestane)、法倔唑 (fadrozole)、RIVISOR[®] (伏氯唑 (vorozole))、FEMARA[®] (letrozole(letrozole);Novartis)、和 ARIMIDEX[®] (阿那曲唑 (anastrozole);AstraZeneca);(iii) 抗雄性激素,如氟他胺

(flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、亮丙立德 leuprolide)、和戈舍瑞林 (goserelin) ;以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物) ;(iv) 蛋白激酶抑制剂,如 MEK 抑制剂 (WO 2007/044515) ;(v) 脂激酶抑制剂 ;(vi) 反义寡核苷酸,尤其是显示抑制参与异常细胞增殖的信号通路中的基因表达的那些,例如 PKC- α 、Raf 和 H-Ras,如奥利默森 (oblimersen) (GENASENSE[®], GentaInc.) ;(vii) 核酶,如 VEGF 表达抑制剂 (例如, ANGIOZYME[®]) 和 HER2 表达抑制剂 ;(viii) 疫苗,如基因治疗疫苗例如, ALLOVECTIN[®]、LLEUVECTIN[®]、和 VAXID[®] ;PROLEUKIN[®] rIL-2 ;拓扑异构酶 1 抑制剂,如 LURTOTECAN[®] ;ABARELIX[®] rmRH ;(ix) 抗血管发生剂,如贝伐单抗 (AVASTIN[®], Genentech) ;以及上述任一种的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0113] 还包括在“化疗剂”的定义内的是治疗抗体,如阿仑单抗 (alemtuzumab) (Campath), 贝伐单抗 (AVASTIN[®], Genentech) ;西妥昔单抗 (cetuximab) (ERBITUX[®], Imclone) ;帕尼单抗 (panitumumab) (VECTIBIX[®], Amgen) ;利妥昔单抗 (rituximab) (RITUXAN[®], Genentech/Biogen Idec) ;培妥珠单抗 (OMNITARG[™], 2C4, Genentech) ;曲妥珠单抗 (HERCEPTIN[®], Genentech) ;托西莫单抗 (tositumomab) (Bexxar, Corixia) ;以及抗体药剂结合物,吉姆单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin) (MYLOTARG[®], Wyeth)。

[0114] 作为化疗剂与本发明的 PI3K 抑制剂联合的具有治疗潜力的人源化单克隆抗体包括:阿仑单抗 (alemtuzumab)、阿泊珠单抗 (apolizumab)、阿塞珠 (aselizumab)、阿利珠单抗 (atlizumab)、巴品珠单抗 (bapineuzumab)、贝伐单抗、比伐单抗 DM1 细胞毒 (bivatuzumab mertansine)、美坎珠单抗 (cantuzumab mertansine)、西利珠单抗 (cedelizumab)、聚乙二醇化的赛妥珠单抗 (certolizumab pegol)、西弗斯妥珠单抗 (cidfusituzumab)、西妥珠单抗 (cidtuzumab)、达克珠单抗 (daclizumab)、依醋利珠单抗 (eculizumab)、依法珠单抗 (efalizumab)、依帕珠单抗 (epratuzumab)、厄利珠单抗 (erlizumab)、非维珠单抗 (felvizumab)、芳妥珠单抗 (fontolizumab)、吉姆单抗奥佐米星、伊诺妥珠单抗 (inotuzumab) 奥佐米星、伊皮利姆单抗 (ipilimumab)、拉贝珠单抗 (labetuzumab)、林妥珠单抗 (lintuzumab)、马妥珠单抗 (matuzumab)、美泊利单抗 (mepolizumab)、莫维珠单抗 (motavizumab)、莫妥维珠单抗 (motovizumab)、那他珠单抗 (natalizumab)、尼妥珠单抗 (nimotuzumab)、诺洛维珠单抗 (nolovizumab)、努马维珠单抗 (numavizumab)、厄克利珠单抗 (ocrelizumab)、奥马珠单抗 (omalizumab)、帕利珠单抗 (palivizumab)、帕考珠单抗 (pascolizumab)、帕氟珠单抗 (pecfusituzumab)、帕妥珠单抗 (pectuzumab)、培妥珠单抗 (pertuzumab)、培克珠单抗 (pexelizumab)、(ralivizumab)、来尼珠单抗 (ranibizumab)、热利维珠单抗 (reslivizumab)、瑞利珠单抗 (reslizumab)、热西维珠单抗 (resyvizumab)、罗维珠单抗 (rovelizumab)、鲁利单抗 (ruplizumab)、西罗珠单抗 (sibrotuzumab)、希普利珠单抗 (siplizumab)、索土珠单抗 (sontuzumab)、他珠单抗四氢西洋 (tacatuzumab tetraxetan)、(tadocizumab)、他利珠单抗 (talizumab)、特非巴珠单抗 (tefibazumab)、托珠单抗 (tocilizumab)、托利珠单抗 (toralizumab)、曲妥珠单抗、图口妥珠单抗 (tucotuzumab) 西莫白介素 (celmoleukin)、图库斯珠单抗 (tucusituzumab)、乌吗维珠单抗 (umavizumab)、乌珠单抗 (urtoxazumab)、和维西珠单抗 (visilizumab)。

[0115] 术语“哺乳动物”包括但不限于:人、小鼠、大鼠、豚鼠、猴、狗、猫、马、母牛、猪和绵羊和家禽。

[0116] “代谢物”是通过特定化合物或其盐的体内代谢所产生的产物。化合物的代谢物可以使用本领域已知的常规技术鉴定,并且它们的活性使用如本文所述的那些测试测定。这些产物可以从例如所给予的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、脱酯化、酶裂解等得到。因此,本发明包括本发明的化合物的代谢物,包括通过包括下列步骤的方法所产生的化合物:使本发明的化合物与哺乳动物接触一段足以产生其代谢产物的时间。

[0117] 术语“包装说明书”用于指通常在治疗产品的商业包装中通常所包括的说明书,它含有关于此治疗产品的适应症、用途、剂量、给药、禁忌症和 / 或警告的信息。

[0118] 如本文所用的术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的有机或无机盐。示例性的盐包括但不限于: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、酸式硫酸盐、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、单宁酸盐、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 (gentisinate)、延胡索酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、蔗糖盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐“敏使朗 (mesylate)”、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、和巴莫酸盐 (即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。药学上可接受的盐可以包括加入另一分子,如柠檬酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以为稳定母体化合物上电荷的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐可以在其结构内具有多于1个的带电荷原子。在多个带电荷的原子是药学上可接受的盐的一部分的情况下,可以具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可以具有一个或多个带电荷的原子和 / 或一个或多个抗衡离子。

[0119] 如果本发明的化合物是碱,则所需的药学上可接受的盐可以通过本领域内可用的任何适宜方法制备,例如,用下列物质处理游离碱:无机酸,例如氢氯酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等;或有机酸,例如乙酸、马来酸、琥珀酸、苦杏仁酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、羟乙酸、水杨酸、吡喃糖苷酸 (如葡糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α 羟基酸 (如柠檬酸或酒石酸)、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。通常认为适于从碱性药物化合物形成药学上可用的或可接受的盐的酸在下列文献中有所讨论:例如, P. Stahl 等人, Camille G. (编辑) Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge 等人, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66(1) 119; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201-217; Anderson 等人, The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, New York; Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, (1995) Mack Publishing Co., Easton PA; 以及 The Orange Book (美国食品药品监督管理局, 在他们的网站上)。这些公开文件以引用方式并入本文。

[0120] 如果本发明的化合物是酸,则所需的药学上可接受的盐可以通过任何适宜的方法制备,例如,用无机或有机碱处理游离酸,无机和有机碱如胺 (伯、仲或叔)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等。合适的盐的示例性实例包括但不限于:衍生自下列的有机盐:氨基酸,例如甘氨酸和精氨酸;氨、伯、仲、和叔胺;和环胺,如哌啶、吗啉和哌嗪;和衍生自下列的无机盐:钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂。

[0121] 短语“药学上可接受的”意指物质或组分必须与构成制剂的其他成分和 / 或用其处理的哺乳动物在化学上和 / 或毒理学上相容。

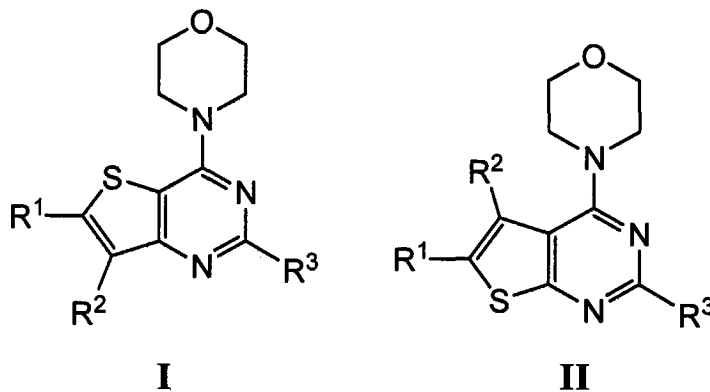
[0122] “溶剂合物”是指一个或多个溶剂分子与本发明化合物的物理缔合或复合体。本发明的化合物可以非溶剂合物和溶剂合物形式存在。形成溶剂合物的溶剂的实例包括但不限于：水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。术语“水合物”是指其中溶剂分子是水的复合体。这种物理缔合包括不同程度的离子和共价键合，包括氢键键合。在某些情况下，溶剂合物能够分离，例如在一个或多个溶剂分子整合到晶状固体的晶格中时。溶剂合物的制备是大致上已知的，例如 M. Cairra 等人，*J. Pharmaceutical Sci.*, 93(3), 601-611 (2004)。溶剂合物、半溶剂合物、水合物等的类似制备描述于 E. C. van Tonder 等人，*AAPS PharmSciTech.*, 5(1), article 12 (2004)；和 A. L. Bingham 等人，*Chem. Commun.*, 603-604 (2001) 中。典型的非限制性方法包括：在高于环境温度的条件下将本发明化合物溶解在所需量的所需溶剂（有机的或水或它们的混合物）中，以足以形成结晶的速率冷却溶液，然后通过标准方法分离结晶。分析技术（例如红外光谱）显示结晶中的溶剂（或水）以溶剂合物（或水合物）存在。

[0123] 如本文所用的术语“协同的”是指治疗剂联合比两种或更多种单独药剂的加成作用更加有效。式 I 或 II 化合物与一种或多种化疗剂之间的协同相互作用可以根据本文所述的测定所得的结果确定。这些测定的结果使用 Chou 和 Talalay 联合方法和用 CalcuSyn 软件进行的剂量-效应分析来分析以获得联合指数（Chou 和 Talalay, 1984, *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55）。本发明所提供的联合可以用几种测定系统来评定，使用定量抗癌剂之间的协同作用、加和作用 and 拮抗作用的标准程序分析数据。所用的程序优选是 Chou 和 Talalay 在“*New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy*,” Academic Press, 1987, 第 2 章中所描述的程序。联合指数值小于 0.8 表明是协同作用；值大于 1.2 表明拮抗作用；值在 0.8 至 1.2 之间表明是加性作用。联合治疗可以提供“协同作用”并且证实是“协同的”，即，当活性成分一起使用时取得的效果大于由单独的化合物所得的效果的和。协同效应可以在活性成分为下列情况时获得：(1) 以联合的单位计量制剂共同配制和并同时给予或递送；(2) 作为单独制剂交替递送或平行递送；或 (3) 通过一些其他的方案递送。当以交替治疗递送时，协同作用可能在化合物按顺序给予或递送时获得，例如通过以单独的注射器进行不同的注射时。一般地，在交替治疗期间，序贯（即，连续）给予有效剂量的各活性成分，而在联合治疗中，一起给予有效剂量的两种或更多种成分。

[0124] 式 I 和 II 化合物

[0125] 本发明包括包含下列物质的治疗剂联合：具有以下结构的式 I 和 II 化合物

[0126]



[0127] 或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体或药学上可接受的盐，其中：

[0128] R^1 选自: H、F、Cl、Br、I、CN、 $-(CR^{14}R^{15})_mNR^{10}R^{11}$ 、 $-C(R^{14}R^{15})_nNR^{12}C(=Y)R^{10}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_nNR^{12}S(O)_2R^{10}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_mOR^{10}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_nS(O)_2R^{10}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_nS(O)_2NR^{10}R^{11}$ 、 $-C(OR^{10})R^{11}R^{14}$ 、 $-C(=Y)R^{10}$ 、 $-C(=Y)OR^{10}$ 、 $-C(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-C(=Y)NR^{12}OR^{10}$ 、 $-C(=O)NR^{12}S(O)_2R^{10}$ 、 $-C(=O)NR^{12}(CR^{14}R^{15})_mNR^{10}R^{11}$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^{12}C(=Y)R^{11}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)OR^{11}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-NR^{12}S(O)_2R^{10}$ 、 $-NR^{12}SO_2NR^{10}R^{11}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-S(O)_2R^{10}$ 、 $-S(O)_2NR^{10}R^{11}$ 、 $-SC(=Y)R^{10}$ 、 $-SC(=Y)OR^{10}$ 、 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基、 C_3-C_{12} 碳环基、 C_2-C_{20} 杂环基、 C_6-C_{20} 芳基和 C_1-C_{20} 杂芳基；

[0129] R^2 选自 H、F、Cl、Br、I、CN、 CF_3 、 $-NO_2$ 、 $-C(=Y)R^{10}$ 、 $-C(=Y)OR^{10}$ 、 $-C(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_mNR^{10}R^{11}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_nOR^{10}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_t-NR^{12}C(=O)(CR^{14}R^{15})NR^{10}R^{11}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)R^{10}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)OR^{10}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-NR^{12}SO_2R^{10}$ 、 OR^{10} 、 $-OC(=Y)R^{10}$ 、 $-OC(=Y)OR^{10}$ 、 $-OC(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-OS(O)_2(OR^{10})$ 、 $-OP(=Y)(OR^{10})(OR^{11})$ 、 $-OP(OR^{10})(OR^{11})$ 、 SR^{10} 、 $-S(O)R^{10}$ 、 $-S(O)_2R^{10}$ 、 $-S(O)_2NR^{10}R^{11}$ 、 $-S(O)(OR^{10})$ 、 $-S(O)_2(OR^{10})$ 、 $-SC(=Y)R^{10}$ 、 $-SC(=Y)OR^{10}$ 、 $-SC(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基、 C_3-C_{12} 碳环基、 C_2-C_{20} 杂环基、 C_6-C_{20} 芳基和 C_1-C_{20} 杂芳基；

[0130] R^3 为碳连接的单环杂芳基、碳连接的稠合二环 C_3-C_{20} 杂环基、或碳连接的稠合二环 C_1-C_{20} 杂芳基，其中所述单环杂芳基、稠合二环 C_3-C_{20} 杂环基、和稠合二环 C_1-C_{20} 杂芳基可任选地被选自下列的一个或多个基团取代: F、Cl、Br、I、 $-CN$ 、 $-NR^{10}R^{11}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-C(O)R^{10}$ 、 $-NR^{10}C(O)R^{11}$ 、 $-N(C(O)R^{11})_2$ 、 $-NR^{10}C(O)NR^{10}R^{11}$ 、 $-NR^{12}S(O)_2R^{10}$ 、 $-C(=O)OR^{10}$ 、 $-C(=O)NR^{10}R^{11}$ 、 C_1-C_{12} 烷基和 $(C_1-C_{12}烷基)-OR^{10}$ ；

[0131] R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 独立地为 H、 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基、 C_3-C_{12} 碳环基、 C_2-C_{20} 杂环基、 C_6-C_{20} 芳基或 C_1-C_{20} 杂芳基，

[0132] 或 R^{10} 和 R^{11} 与它们所连接的氮一起形成可任选地被独立地选自下列的一个或多个基团取代的 C_2-C_{20} 杂环: 氧代、 $(CH_2)_mOR^{12}$ 、 $NR^{12}R^{12}$ 、 CF_3 、F、Cl、Br、I、 SO_2R^{12} 、 $C(=O)R^{12}$ 、 $NR^{12}C(=Y)R^{12}$ 、 $NR^{12}S(O)_2R^{12}$ 、 $C(=Y)NR^{12}R^{12}$ 、 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基、 C_3-C_{12} 碳环基、 C_2-C_{20} 杂环基、 C_6-C_{20} 芳基和 C_1-C_{20} 杂芳基；

[0133] R^{14} 和 R^{15} 独立地选自 H、 C_1-C_{12} 烷基或 $-(CH_2)_n-$ 芳基，

[0134] 或 R^{14} 和 R^{15} 与它们所连接的原子一起形成饱和或部分不饱和的 C_3-C_{12} 碳环；

[0135] 其中所述烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、和杂芳基可任选地被独立地选自下列的一个或多个基团取代: F、Cl、Br、I、CN、 CF_3 、 $-NO_2$ 、氧代、 R^{10} 、 $-C(=Y)R^{10}$ 、 $-C(=Y)OR^{10}$ 、 $-C(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_nNR^{10}R^{11}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_nOR^{10}$ 、 $-NR^{10}R^{11}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)R^{10}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)OR^{11}$ 、 $-NR^{12}C(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-(CR^{14}R^{15})_mNR^{12}SO_2R^{10}$ 、 $=NR^{12}$ 、 OR^{10} 、 $-OC(=Y)R^{10}$ 、 $-OC(=Y)OR^{10}$ 、 $-OC(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 $-OS(O)_2(OR^{10})$ 、 $-OP(=Y)(OR^{10})(OR^{11})$ 、 $-OP(OR^{10})(OR^{11})$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-S(O)R^{10}$ 、 $-S(O)_2R^{10}$ 、 $-S(O)_2NR^{10}R^{11}$ 、 $-S(O)(OR^{10})$ 、 $-S(O)_2(OR^{10})$ 、 $-SC(=Y)R^{10}$ 、 $-SC(=Y)OR^{10}$ 、 $-SC(=Y)NR^{10}R^{11}$ 、 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基、 C_3-C_{12} 碳环基、 C_2-C_{20} 杂环基、 C_6-C_{20} 芳基和 C_1-C_{20} 杂芳基；

[0136] Y 为 O、S 或 NR^{12} ；

[0137] m 为 0、1、2、3、4、5 或 6；并且

[0138] n 为 1、2、3、4、5 或 6。

[0139] 式 I 和 II 化合物的示例性实施方式包括，其中 R^1 为 $-(CR^{14}R^{15})_mNR^{10}R^{11}$ ，其中 m 为 1，并且 R^{10} 和 R^{11} 与它们所连接的氮一起形成可任选被取代的 C_3-C_{20} 杂环。所述 C_3-C_{20} 杂环可

以为可任选地被选自下列的一个或多个基团取代的哌嗪基： $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ 、 CF_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 SO_2R^{10} 、 $\text{C}(=\text{O})\text{R}^{10}$ 、 $\text{NR}^{12}\text{C}(=\text{Y})\text{R}^{11}$ 、 $\text{NR}^{12}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{11}$ 、 $\text{C}(=\text{Y})\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ 和 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基。

[0140] 式 I 和 II 化合物的示例性实施方式包括：其中 R^1 不为 H。

[0141] 式 I 和 II 化合物的示例性实施方式包括，其中 R^2 为 H、 CH_3 、 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ 碳环基、 $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ 杂环基、 $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ 芳基或 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 杂芳基。所述 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 杂芳基可以为选自下列的单环杂芳基：2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、3-吡唑基、4-吡唑基、2-吡咯基、3-吡咯基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、3-哒嗪基、4-哒嗪基、5-哒嗪基、2-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、3-三唑基、1-三唑基、5-四唑基、1-四唑基和 2-四唑基。

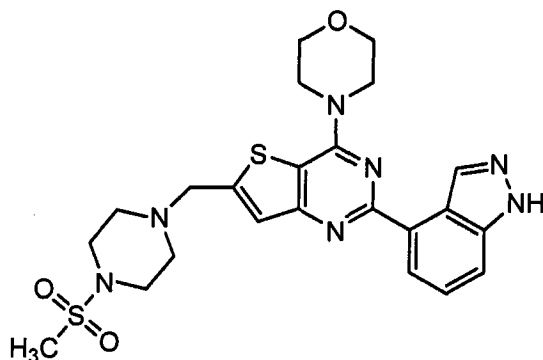
[0142] 式 I 和 II 化合物的示例性实施方式包括：其中 R^3 为 2-氨基嘧啶-5-基。

[0143] 式 I 和 II 化合物的示例性实施方式包括：其中 R^3 为选自下列的二环杂芳基：1H-吡啶、1H-吡啶、二氢吡啶-2-酮、1-(二氢吡啶-1-基)乙酮、1H-苯并[d][1,2,3]三唑、1H-吡啶并[3,4-b]吡啶、1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶、1H-苯并[d]咪唑、1H-苯并[d]咪唑-2(3H)-酮、1H-吡啶并[3,4-c]吡啶、1H-吡咯并[2,3-c]吡啶、3H-咪唑并[4,5-c]吡啶、7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶、7H-嘌呤、1H-吡啶并[4,3-d]嘧啶、5H-吡咯并[3,2-d]嘧啶、2-氨基-1H-嘌呤-6(9H)-酮、喹啉、喹啉、喹噁啉、异喹啉、异喹啉-1(2H)-酮、3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮、3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮、喹啉-2(1H)-酮、喹噁啉-2(1H)-酮、1,8-萘啶、吡啶并[3,4-d]嘧啶、和吡啶并[3,2-b]吡嗪。

[0144] 式 I 和 II 化合物的示例性实施方式包括：其中 R^3 为 1H-吡啶-4-基。

[0145] 示例性式 I 化合物为具有下式 Ia 的 4-(2-(1H-吡啶-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉：

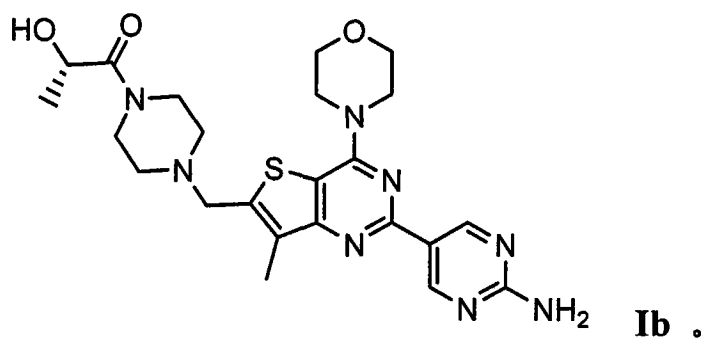
[0146]



Ia .

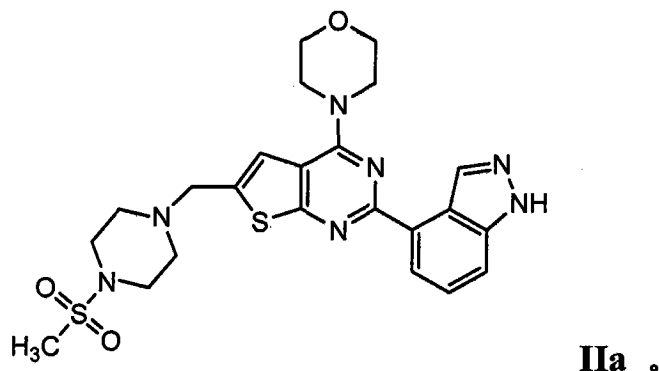
[0147] 另一示例性式 I 化合物为具有下式 Ib 的 (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮：

[0148]



[0149] 示例性式 II 化合物为具有下式 IIa 的 4-(2-(1H- 吡唑 -4- 基)-6-((4-(甲基磺酰基) 哌嗪 -1- 基) 甲基) 噻吩并 [2,3-d] 嘧啶 -4- 基) 吗啉 :

[0150]



[0151] 式 I 和 II 化合物的制备

[0152] 式 I 和 II 化合物可以通过合成途径来合成,该合成途径包括与化学领域内所熟知的方法类似的方法,还包括 WO 2006/046031 的方法。起始材料一般可得自商业来源,如 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI); 或者可以使用本领域的那些技术人员所熟知的方法 (例如通过 Louis F. Fieser 和 Mary Fieser, Reagents for Organic Synthesis, 第 1-19 卷, Wiley, N. Y. (1967-1999 编辑中所一般描述的方法制备)) 或 Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin, 包括补充材料 (也可以通过 Beilstein 在线数据库获得) 容易地制备。

[0153] 式 I 和 II 化合物可以使用制备其他噻吩和嘧啶 (US 6608053 ;US 6492383 ; US 6232320 ;US 6187777 ;US 3763156 ;US 3661908 ;US 3475429 ;US 5075305 ;US 2003/220365 ;GB 1393161 ;WO 93/13664) ; 以及其他杂环 (描述于 :Comprehensive Heterocyclic Chemistry, Editors Katritzky and Rees, Pergamon Press, 1984) 的方法制备。

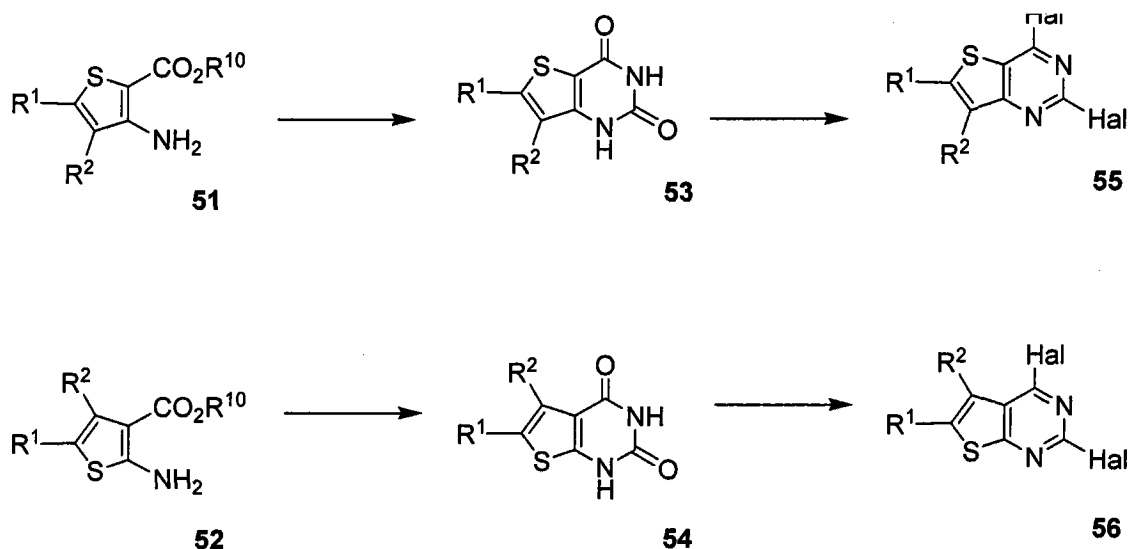
[0154] 可以通过常规方法将式 I 和 II 化合物转化为药学上可接受的盐,并且可以将盐转化为游离碱化合物。式 I 和 II 化合物可以游离碱或药学上可接受的盐的形式为治疗有效的,这取决于所需的性质,如溶解性、溶散度、吸湿性以及药代动力学性质。药学上可接受的盐的实例包括与如下的无机酸的盐:例如氢氯酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸和磷酸;和与如下的有机酸的盐,例如甲磺酸、苯磺酸、甲酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乙磺酸、天冬氨酸和谷氨酸。所述盐可以是:甲磺酸盐、盐酸盐、磷酸盐、苯磺酸盐或硫酸盐。盐可以为单盐或双盐。例如,甲磺酸盐可以为单甲磺酸盐或双甲磺酸盐。

[0155] 式 I 和 II 化合物和盐还可以作为水合物或溶剂合物存在。

[0156] 在制备式 I 和 II 化合物中可能需要保护中间体的官能团（例如，伯胺或仲胺）。这种保护的需要根据远程官能度和制备方法的条件而有所不同。合适的氨基保护基团包括：乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧基羰基 (BOC)、苯甲氧基羰基 (CBz) 和 9- 氟芴基亚甲氧基羰基 (Fmoc)。本领域的技术人员可以容易地确定对于此类保护的需要。对于保护基团和它们的用途的一般描述参见 T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley&Sons, New York, 1991。

[0157] 为了示例性目的，方案 1-7 显示了制备本发明的化合物以及重要的中间体的一般方法。对于单个反应步骤的更详细描述，参见下面的实施例部分。本领域的那些技术人员应了解可以使用其他合成途径来合成本发明化合物。尽管在方案中描述并且在下文中讨论了具体的起始材料和试剂，但是可以容易地替代成其他起始材料和试剂以提供多种衍生物和 / 或反应条件。此外，下文所述的方法所制备的很多化合物可以使用本领域的那些技术人员所熟知的常规化学法根据本公开内容进一步修改。

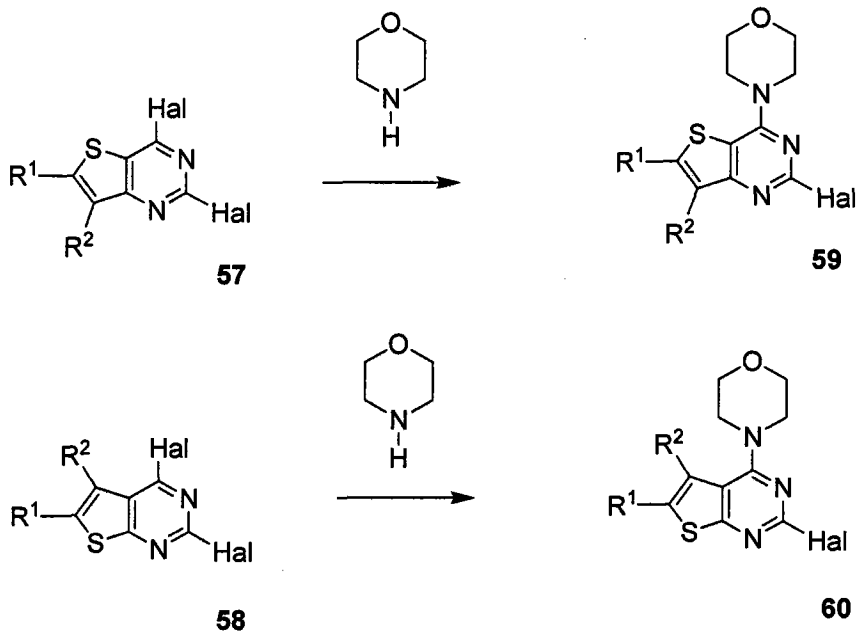
[0158]



[0159] 方案 1

[0160] 方案 1 显示由 2- 羧基酯, 3- 氨基噻吩和 2- 氨基, 3- 羧基酯噻吩试剂（分别为 51 和 52）制备噻吩并嘧啶中间体 55 和 56 的一般方法。其中 Hal 为 Cl、Br、或 I；并且 R¹、R²、和 R¹⁰如对式 I 和 II 化合物或它们的前体或药物前体所定义。

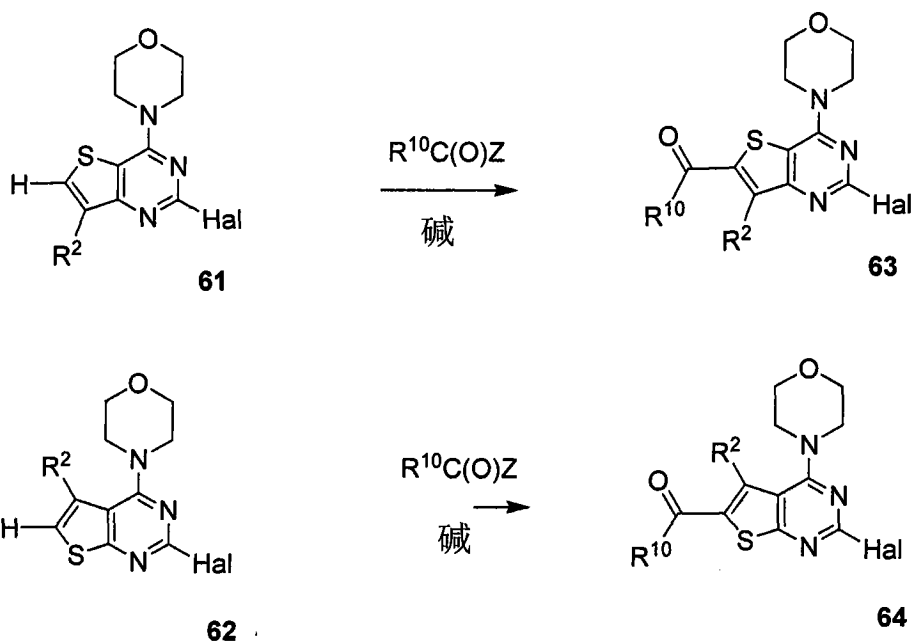
[0161]



[0162] 方案 2

[0163] 方案 2 显示在碱性条件下在有机溶剂中用吗啉选择性取代二卤代噻吩并嘧啶中间体 57 和 58 的 4- 卤离子以分别制备 2- 卤代, 4- 吗啉代噻吩并嘧啶化合物 59 和 60 的一般方法, 其中 Hal 为 Cl、Br、或 I ; 并且 R¹ 和 R² 如对式 I 和 II 化合物或它们的前体或药物前体所定义。

[0164]

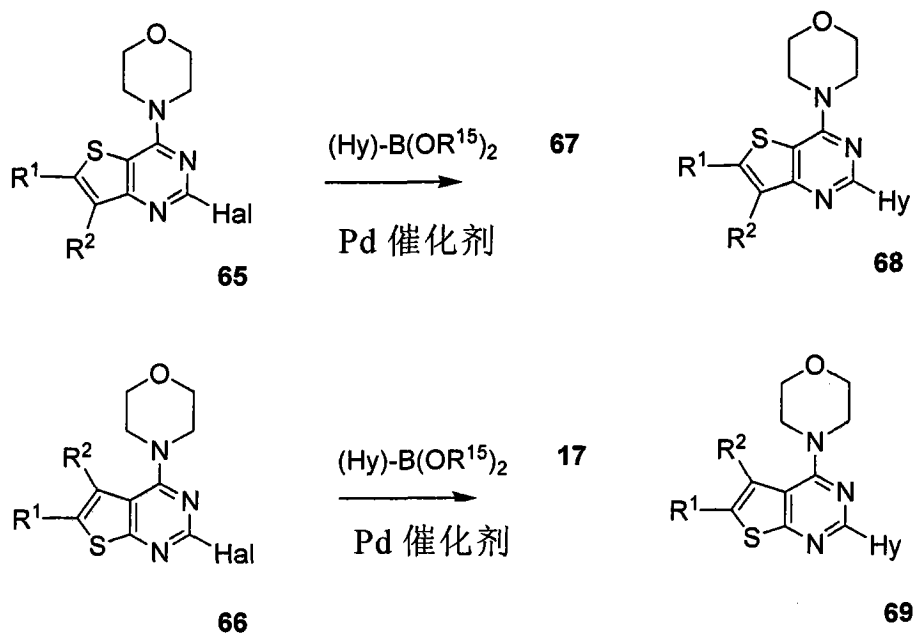


[0165] 方案 3

[0166] 方案 3 显示衍生 2- 卤代, 4- 吗啉代, 6- 氢噻吩并嘧啶化合物 61 和 62 的 6- 位的一般方法, 其中 R¹ 为 H。用锂化剂处理 61 或 62 以移除 6 位的质子, 然后添加酰化剂 R¹⁰C(O)Z, 其中 Z 为离去基团, 如卤离子、NHS 酯、羧酸根或二烷基氨基, 得到 2- 卤代, 4- 吗啉代, 6- 酰基噻吩并嘧啶化合物 63 和 64, 其中 Hal 为 Cl、Br、或 I ; 并且 R² 和 R¹⁰ 如对式 I 和 II 化合物或它们的前体或药物前体所定义。R¹⁰C(O)Z 制备 6- 甲酸基化合物 (R¹⁰ = H) 的实例为 N,

N'-二甲基甲酰胺 (DMF)。

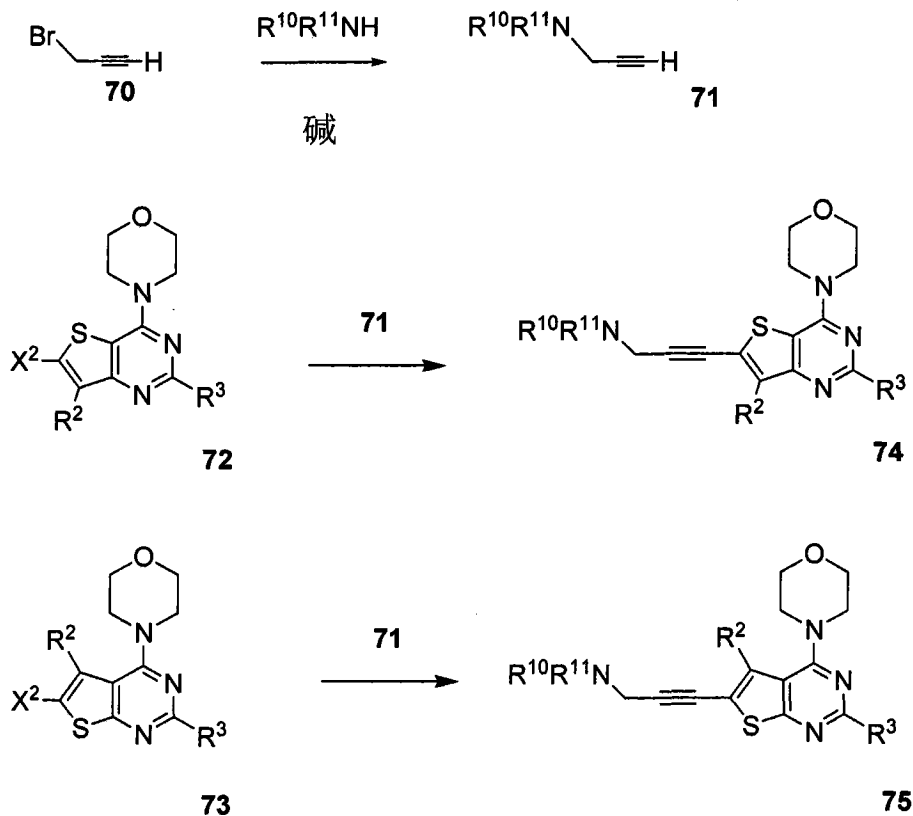
[0167]



[0168] 方案 4

[0169] 方案 4 显示用单环杂芳基、稠合二环杂环基或稠合二环杂芳基硼酸 ($R^{15} = H$) 或酯 ($R^{15} = \text{烷基}$) 试剂 67 对 2- 卤代嘧啶中间体 (65 和 66) 进行 Suzuki 型偶联以制备式 I 和 II 的 2- 取代的 (Hy), 4- 吗啉代噻吩并嘧啶化合物 (68 和 69) 的一般方法, 其中 Hal 为 Cl、Br、或 I; 并且 R^1 和 R^2 如对式 I 和 II 化合物或它们的前体或药物前体所定义。对于 Suzuki 反应的综述, 参见: Miyaura 等人 (1995) Chem. Rev. 95 :2457-2483; Suzuki, A. (1999) J. Organomet. Chem. 576 :147-168; Suzuki, A. in Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions, Diederich, F., Stang, P. J., 编辑, VCH, Weinheim, DE (1998), 第 49-97 页。钯催化剂可以是通常用于 Suzuki 型交联反应的任何钯催化剂, 如 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ 、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ 、 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{-DCM}$ 、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{Pt-Bu}_3$ (Owens 等人 (2003) Bioorganic & Med. Chem. Letters 13 :4143-4145; Molander 等人 (2002) Organic Letters 4(11) :1867-1870; US 6448433)。

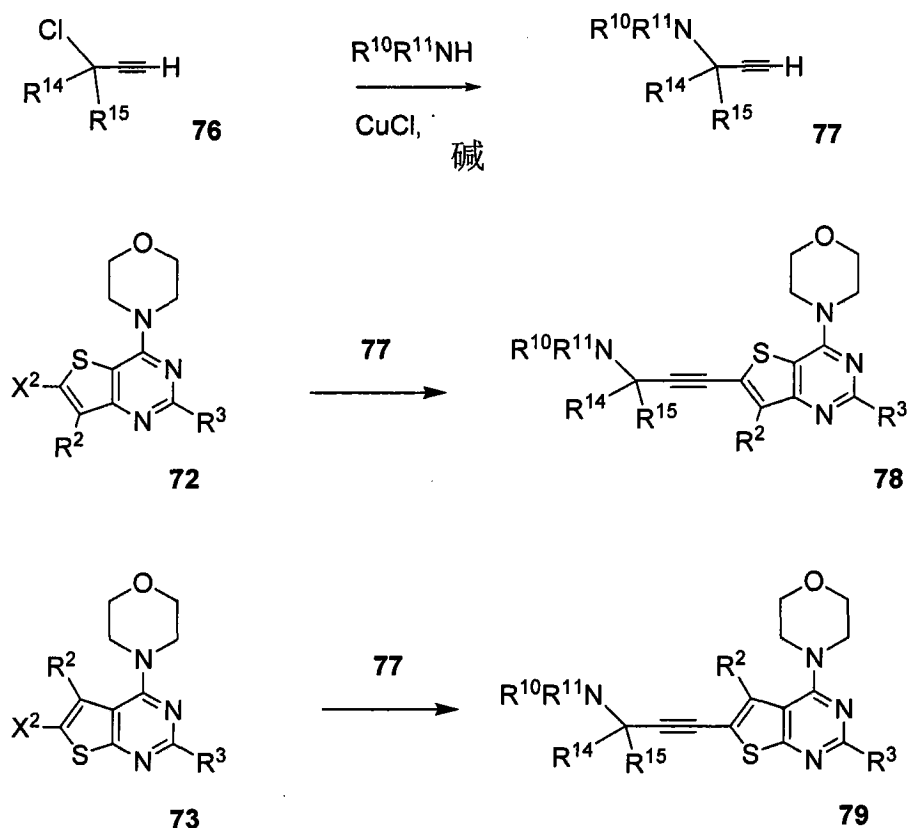
[0170]



[0171] 方案 5

[0172] 方案 5 显示合成炔 71 的一般方法, 炔 71 可以用于制备化合物 72 和 73 的炔化衍生物。炔丙基胺 71 可以通过炔丙基溴 70 与式 $\text{R}^{10}\text{R}^{11}\text{NH}$ (其中 R^{10} 和 R^{11} 独立地选自 :H、烷基、芳基和杂芳基, 或者 R^{10} 和 R^{11} 与它们所连接的氮一起形成杂环) 的胺在合适的碱 (Cs_2CO_3 等) 的存在下反应来制备。对于炔基胺和相关的合成的综述参见 Booker-Milburn, K. I., *Comprehensive Organic Functional Group Transformations* (1995), 2:1039-1074; 和 Viehe, H. G., (1967) *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, 6(9):767-778。炔 71 随后可以与中间体 72 ($\text{X}^2 = \text{溴或碘}$) 或 73 (经由 Sonogashira 偶联) 反应以分别提供化合物 74 和 75, 其中 R^2 和 R^3 如对式 I 和 II 化合物或它们的前体或药物前体所定义。

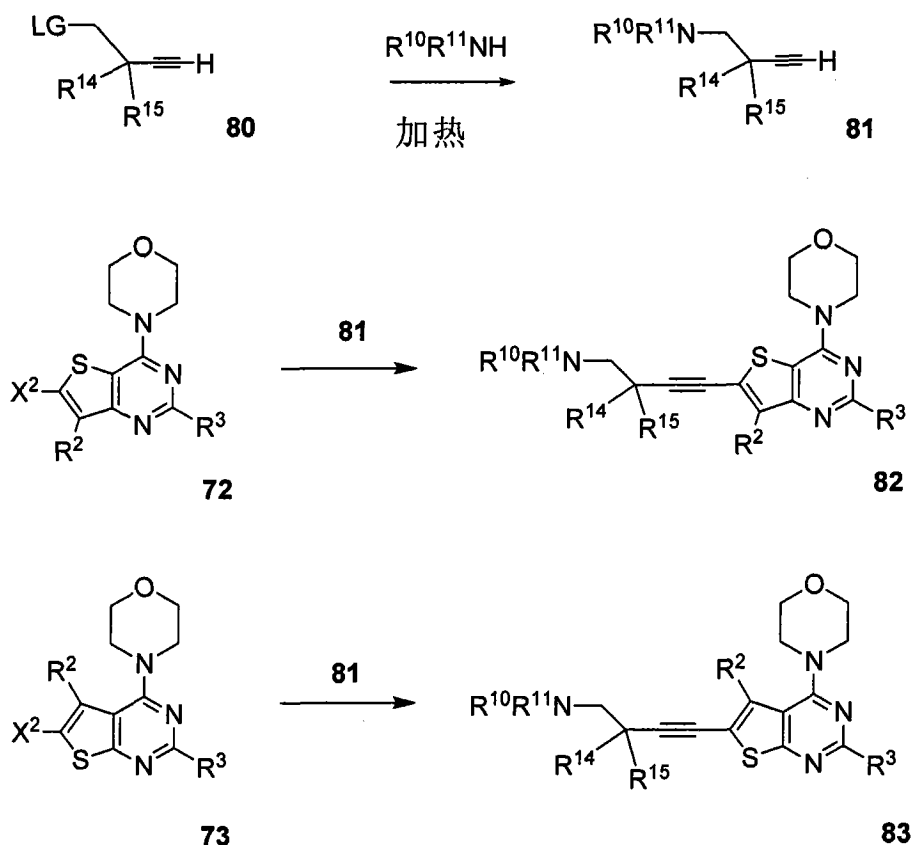
[0173]



[0174] 方案 6

[0175] 方案 6 显示合成炔 77 的一般方法, 炔 77 可用于制备化合物 72 和 73 的炔化衍生物。偕-二烷基炔丙基胺 77 可以使用 Zaragoza 等人 (2004) J. Med. Chem., 47:2833 所述的方法制备。根据方案 6, 偕-二烷基氯 76 (R^{14} 和 R^{15} 独立地为甲基、乙基或其他烷基) 可以在 CuCl 和合适的碱 (例如, TEA 等) 的存在下与式 $\text{R}^{10}\text{R}^{11}\text{NH}$ (其中 R^{10} 和 R^{11} 独立地选自 H、烷基、芳基和杂芳基, 或 R^{10} 和 R^{11} 与它们所连接的氮一起形成杂环) 的胺反应以提供炔 77。炔 77 可以与中间体 72 或 73 反应 (经由 Sonogashira 偶联) 以分别提供化合物 78 和 79, 其中 R^2 和 R^3 如对式 I 和 II 化合物或它们的前体或药物前体所定义。

[0176]



[0177] 方案 7

[0178] 方案 7 显示合成炔 **81** 的一般方案, 炔 **81** 可以用于制备化合物 **72** 和 **73** 的炔化衍生物。丁-3-炔-1-胺 **81** (其中 R^{14} 和 R^{15} 独立地为 H、烷基、芳基、杂芳基, 或 R^{14} 和 R^{15} 与它们所连接的碳原子一起形成碳环或杂环) 可以使用 Olomucki M 等人 (1960) Ann. Chim. 5 :845 所述的步骤由炔 **80** (LG = 甲苯磺酸盐或其他离去基团) 与式 $\text{R}^{10}\text{R}^{11}\text{NH}$ (其中 R^{10} 和 R^{11} 独立地选自 H、烷基、芳基和杂芳基, 或 R^{10} 和 R^{11} 与它们所连接的氮一起形成杂环) 的胺反应来制备。炔 **81** 随后可以根据方案 5 和 6 所提供的说明与中间体 **72** 或 **73** 反应 (通过 Sonogashira 偶联) 以分别提供化合物 **82** 和 **83**, 其中 R^2 和 R^3 如对式 I 和 II 化合物或它们的前体或药物前体所定义。

[0179] 式 I 或 II 的噻吩并嘧啶化合物的药学上可接受的盐可以使用常规技术来制备。通常, 所述方法包括在合适的溶剂中用合适的酸处理如上所定义的式 I 的噻吩并嘧啶。

[0180] 在如上所定义的本发明方法中, 氨基化步骤和 Pd 介导的交联步骤都在常规条件下进行。钯催化剂可以是通常用于 Suzuki 型交联的任何钯催化剂, 如 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ 。还原剂通常为硼氢化物, 如 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ 、 NaBH_4 或 NaCNBH_4 。

[0181] 分离方法

[0182] 在制备本发明的化合物的方法中, 有利的是将反应产物彼此和 / 或与起始材料分离。每步或一系列步骤的期望产物通过本领域内的常用技术分离和 / 或纯化 (在下文中称为分离) 以达到所需的均匀程度。通常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。色谱可以包括任何数目的方法, 包括, 例如: 反相和正相; 尺寸排阻; 离子交换; 高、中和低压液相色谱方法和设备; 小规模分析; 模拟移动床 (SMB) 和制备薄层或厚层色谱, 以及小规模薄层和快速色谱技术。

[0183] 另一类分离方法包括用经选择结合期望产物、未反应的起始材料、反应副产物等或使得它们可分离的试剂处理混合物。此类试剂包括吸附剂或吸收剂,如活性炭、分子筛、离子交换介质等。可选择地,所述试剂可以是酸(在碱性材料的情况下);碱(在酸性材料的情况下);结合试剂,如抗体;结合蛋白;选择性螯合剂,如冠醚、液/液离子萃取试剂(LIX)等。

[0184] 适当的分离方法的选择取决于所涉及的材料性质。例如,蒸馏和升华中的沸点和分子量、色谱中是否存在极性官能团、在多相萃取中在酸性和碱性介质中材料的稳定性等。本领域的技术人员将能应用最能达成所需分离的技术。

[0185] 非对映混合物可以通过本领域的技术人员所熟知的方法如色谱和/或分步结晶,根据它们的物理化学不同而分离为它们的单独非对映体。对映体可以如下分离:通过与适当的光学活性化合物(例如,手性助剂,如手性醇或 Mosher 酰基氯)反应将对映体混合物转化为非对映混合物,分离非对映体并将单独的非对映体转化(例如,水解)为相应的纯对映体。而且,一些本发明的化合物可以为阻转异构体(例如取代的联芳基)并且认为它们是本发明的一部分。对映体还可以通过使用手性 HPLC 柱子来分离。

[0186] 基本上不含其立体异构体的单个异构体如对映体可以通过使用如下的方法溶解外消旋混合物来获得:例如使用光学活性拆分剂形成非对映体(ElieI, E. 和 Wilen, S. " Stereochemistry of Organic Compounds, " John Wiley&Sons, Inc., New York, 1994; Lochmuller, C. H., (1975) J. Chromatogr., 113(3):283-302)。本发明的手性化合物的外消旋混合物可以通过任何适宜的方法来分离和分隔,包括:(1) 用手性化合物形成离子性非对映体的盐,并通过分步结晶或其他方法分离;(2) 用手性衍生剂形成非对映体化合物,分离非对映体,并转化为纯的立体异构体;以及(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)。

[0187] 根据方法(1),可以通过如下的对映体纯的手性碱与携带有诸如羧酸和磺酸等酸官能团的不对称化合物反应来形成非对映体盐:马钱子碱、奎宁、麻黄素、番木鳖碱、 α -甲基- β -苯乙胺(安非他明)等。可以通过分步结晶或离子色谱来诱导非对映体分离。对于氨基化合物的光学异构体分离,添加诸如樟脑磺酸、酒石酸、扁桃酸或乳酸的手性羧酸或磺酸可以引起非对映体盐形成。

[0188] 可选择地,对于方法(2),使要溶解的基质与手性化合物的一种对映体反应以形成非对映体对(E. 和 Wilen, S. " Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., 1994, 第 322 页)。可以通过不对称化合物与如薄荷基(menthyl)衍生物的对映体纯的手性衍生剂反应来形成非对映化合物,然后分离非对映体并水解以产生纯的或富集的对映体。测定手性纯度的方法包括:制备外消旋混合物的手性酯,如薄荷基酯,例如在存在碱的条件下的(-)氯甲酸薄荷酯;或 Mosher 酯, α -甲氧基- α -(三氟甲基)苯基乙酸酯(Jacob III. J. Org. Chem., (1982) 47:4165),并分析存在的两个阻转异构体或非对映体的¹H NMR 谱。阻转异构体化合物的稳定非对映体可以根据分离阻转异构体萘基-异喹啉的方法(WO 96/15111)通过正相和反相色谱来分离和分隔。对于方法(3),可以通过色谱使用手性固相来分离两种对映体的外消旋混合物(" Chiral Liquid Chromatography" (1989) W. J. Lough, 编辑, Chapman 和 Hall, New York; Okamoto, J. Chromatogr., (1990) 513:

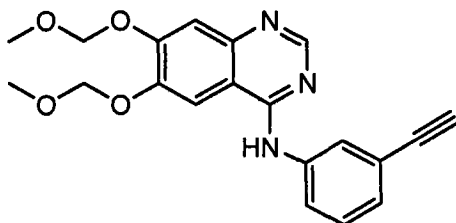
375-378)。可以通过用于区分其他手性分子与不对称碳原子的方法如旋光度和圆二色性来区分富集的对映体。

[0189] 化疗剂

[0190] 业已证明,某些化合物与式 I 或 II 化合物联合时在抑制体外和体内细胞增殖方面展现了惊人的和出乎意料特性。这些化疗剂包括:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD 和雷帕霉素。

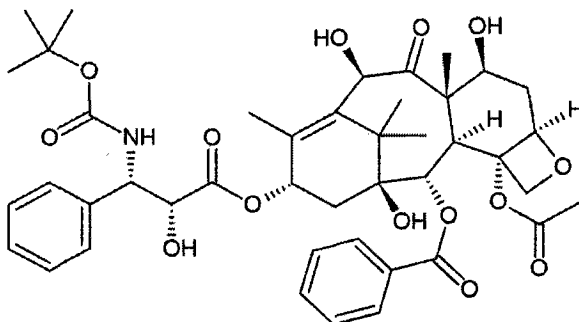
[0191] 厄洛替尼 (TARCEVA[®], OSI-774, Genentech) 通过特异性靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶而用于治疗非小细胞肺癌 (NSCLC)、肺癌、胰腺癌和一些其他类型的癌症 (US 5747498 ;US 6900221 ;Moyer 等人 (1997) Cancer Res. 57 :4838 ;Pollack 等人 (1999) J. Pharmacol. Exp. Ther. 291 :739 ;Perez-Soler 等人 (2004) J. Clin. Oncol. 22 :3238 ;Kim 等人 (2002) Curr. Opin. Invest. Drugs 3 :1385-1395 ;Blackhall 等人 (2005) Expert Opin. Pharmacother. 6 :995-1002)。厄洛替尼的名称为 N-(3-乙炔基苯基)-6,7-双(甲氧基甲氧基)喹唑啉-4-胺 (CAS 注册号 183321-74-6) 并且具有结构:

[0192]



[0193] 多西他赛 (TAXOTERE[®], Sanofi-Aventis) 用于治疗乳腺癌、卵巢癌和 NSCLC 癌症 (US 4814470 ;US 5438072 ;US 5698582 ;US 5714512 ;US5750561 ;Mangatal 等人 (1989) Tetrahedron 45 :4177 ;Ringel 等人 (1991) J. Natl. Cancer Inst. 83 :288 ;Bissery 等人 (1991) Cancer Res. 51 :4845 ;Herbst 等人 (2003) Cancer Treat. Rev. 29 :407-415 ;Davies 等人 (2003) Expert. Opin. Pharmacother. 4 :553-565)。多西他赛的名称为 (2R,3S)-N-叔丁氧基甲酰基-3-苯基异丝氨酸,4-乙酰氧基,2-苯甲酰氧基-5,20-环氧基-1,7,10,13-四羟基紫杉-11-烯-9-酮-13-酯,三水合物 (US 4814470 ;EP 253738 ;CAS 注册号 114977-28-5) 并且具有结构:

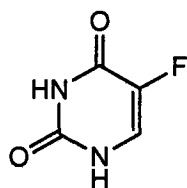
[0194]



[0195] 5-FU (氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶, CAS 注册号 51-21-8) 是胸苷酸合成酶抑制剂并且已经用于治疗癌症包括结肠直肠癌和胰腺癌达数十年 (US 2802005 ;US2885396 ;Duschinsky 等人 (1957) J. Am. chem. Soc. 79 :4559 ;Hansen, R. M. (1991) Cancer Invest. 9 :637-642)。

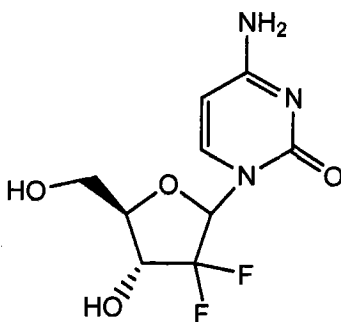
5-FU 名称为 5-氟-1H-嘧啶-2,4-二酮,并且具有结构:

[0196]



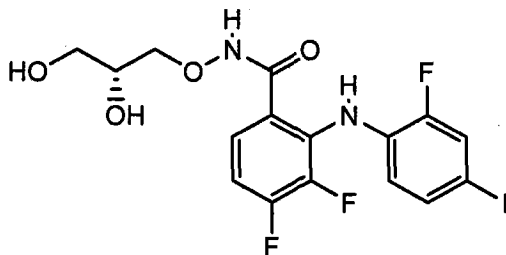
[0197] 吉西他滨 (GEMZAR[®], Lilly, CAS 注册号 95058-81-4) 是阻断 DNA 复制的核苷类似物,它用于治疗各种肿瘤,包括胰腺癌、乳腺癌、NSCLC 和淋巴瘤 (US 4808614 ;US 5464826 ; Hertel 等人 (1988) J. Org. Chem. 53 :2406 ;Hertel 等人 (1990) Cancer Res. 50 :4417 ;Lund 等人 (1993) Cancer Treat. Rev. 19 :45-55)。吉西他滨名称为 4-氨基-1-[3,3-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)四氢呋喃-2-基]-1H-嘧啶-2-酮并且具有结构:

[0198]



[0199] PD-0325901 (CAS RN 391210-10-9, Pfizer) 是用于可能的癌症口服片剂治疗的二代非 ATP 竞争性变构 MEK 抑制剂 (US 6960614 ;US 6972298 ;US2004/147478 ;US 2005/085550)。已经进行了用于乳腺癌、结肠瘤和黑素瘤潜在治疗的 II 期临床试验。PD-0325901 名称为 (R)-N-(2,3-二羟基丙氧基)-3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基) 苯甲酰胺并且具有结构:

[0200]

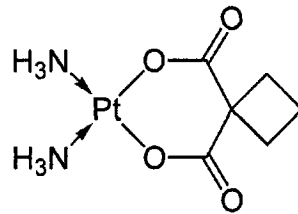


[0201] 顺铂 (顺-二胺,二氯铂 (II), CAS 注册号 15663-27-1) 是用于治疗包括肉瘤、一些肿瘤 (例如,小细胞肺癌和卵巢癌)、淋巴瘤和生殖细胞瘤的各种类型癌症的铂基化疗药物 (Ochs 等人 (1978) Cancer Treat. Rep. 62 :239 ;Pinedo 等人 (1978) Eur. J. Cancer 14 : 1149 ; " Cisplatin, Current Status and New Developments" , A. W. Prestayko 等人,编辑, Academic Press, New York, 1980)。顺铂 (CDDP) 是其类别中的第一个成员,该类别现在还包括卡铂和奥沙利铂。

[0202] 卡铂 (CAS 注册号 41575-94-4) 是用于抗卵巢肿瘤、肺癌、头颈癌的化疗药物 (US 4140707 ;Calvert 等人 (1982) Cancer Chemother. Pharmacol. 9 :140 ;Harland 等人 (1984) Cancer Res. 44 :1693)。卡铂名称为硫唑嘌呤 (azanide) ;环丁烷-1,1-二羧酸 ;铂并且具

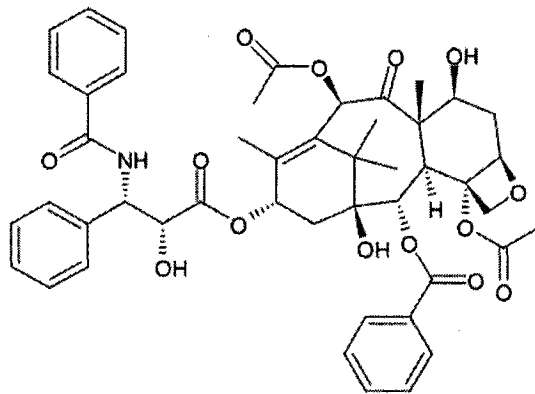
有结构：

[0203]



[0204] 紫杉醇 (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton NJ, CAS 注册号 33069-62-4) 是从太平洋紫杉树 *Taxus brevifolia* 的树皮中分离的化合物, 并且用于治疗肺癌、卵巢癌、乳腺癌、卡波济 (Kaposi) 肉瘤的末期形式 (Wani 等人 (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93 :2325 ;Mekhail 等人 (2002) *Expert. Opin. Pharmacother.* 3 :755-766)。紫杉醇名称为 β -(苯甲酰氨基)- α -羟基-, 6, 12b-双(乙酰氧基)-12-(苯甲酰氧基)-2a, 3, 4, 4a, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b-十二氢-4, 11-二羟基-4a, 8, 13, 13-四甲基-5-氧代-7, 11-亚甲基-1H-环十(3, 4)苯(1, 2-b)乙氧-9-基酯, (2aR-(2a- α , 4- β , 4a- β , 6- β , 9- α (α -R*, β -S*), 11- α , 12- α , 12a- α , 2b- α))-苯丙酸并且具有结构：

[0205]



[0206] 贝伐单抗 (AVASTIN[®], Genentech) 是抗 VEGF 血管内皮生长因子的重组人源化单克隆抗体 (US 6054297 ;Presta 等人 (1997) *Cancer Res.* 57 :4593-4599)。它用于治疗癌症, 其中它通过阻断新血管形状来抑制肿瘤生长。贝伐单抗是美国首个临床应用的血管发生抑制剂, 它在 2004 年被 FDA 批准与标准化疗剂联合用于治疗转移性结肠癌以及大多数形式的转移性非小细胞肺癌。正在进行若干晚期临床研究来测定它对于下列患者的安全性和效力: 辅剂 / 非转移性结肠癌、转移性乳腺癌、转移性肾细胞肿瘤、转移性多形性成胶质细胞瘤、转移性卵巢癌、转移性激素抵抗性前列腺癌和转移性或不能切除的局部晚期胰腺癌 (Ferrara 等人 (2004) *Nat. Rev. Drug Disc.* 3 :391-400)。

[0207] 贝伐单抗包含突变的人 IgG1 框架区和来自鼠抗 hVEGF 单克隆抗体 A. 4. 6. 1 的抗原结合互补决定区, 它阻断人 VEGF 与其受体的结合。贝伐单抗的分子量为约 149, 000 道尔顿并且被糖基化。贝伐单抗和其他人源化抗 VEGF 抗体还在 US 6884879 中描述。另外的抗 VEGF 抗体包括 G6 或 B20 系列抗体, 如 G6-31、B20-4. 1、(WO 2005/012359 ; WO 2005/044853 ;US 7060269 ;US6582959 ;US 6703020 ;US 6054297 ;WO 98/45332 ; WO 96/30046 ;WO 94/10202 ;EP 0666868B1 ;US 2006/009360 ;US 2005/0186208 ;US 2003/0206899 ;US2003/0190317 ;US 2003/0203409 ;20050112126 ;Popkov 等人 (2004)

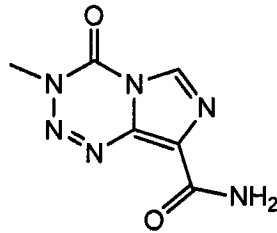
Journal of Immunological Methods 288:149-164)。“B20 系列抗体”是源自根据 WO2005/012359 的图 27-29 中任一个的 B20 抗体序列或 B-20 来源的抗体的抗 VEGF 抗体，WO 2005/012359 的整个公开内容通过引用清楚地并入本文。在一个实施方式中，B20 系列抗体结合人 VEGF 上的功能表位，该功能表位包括残基 F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103 和 C104。其他抗 VEGF 抗体包括结合人 VEGF 上的包括下列的功能表位的那些抗体：残基 F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103 和 C104 或者可选择地，所述功能表位包括残基 F17、Y21、Q22、Y25、D63、I83 和 Q89。

[0208] 曲妥珠单抗 (HERCEPTIN[®], huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) 是重组 DNA 来源的人源化 IgG1 κ 单克隆抗体形式的鼠 HER2 抗体，它在细胞基测定中以高亲和力 (Kd = 5nM) 选择性地结合人表皮生长因子受体 2 蛋白 HER2 (ErbB2) 的胞外结构域 (US 5821337; US 6054297; US 6407213; US6639055; Coussens L 等人 (1985) Science 230:1132-9; Slamon DJ 等人 (1989) Science 244:707-12)。曲妥珠单抗含有人框架区和与 HER2 结合的鼠抗体 (4D5) 的互补决定区。曲妥珠单抗与 HER2 抗原结合并因此抑制癌细胞生长。已经在体外测定和动物中显示曲妥珠单抗能抑制过量表达 HER2 的人肿瘤细胞的增殖 (Hudziak RM 等人 (1989) Mol Cell Biol 9:1165-72; Lewis GD 等人 (1993) Cancer Immunol Immunother ;37:255-63; Baselga J 等人 (1998) Cancer Res. 58:2825-2831)。曲妥珠单抗是抗体依赖性细胞毒作用 ADCC 的介导因子 (Hotelling TE 等人 (1996) [摘要]. Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res ;37:471; Pegram MD 等人 (1997) [摘要]. Proc Am Assoc Cancer Res ;38:602; Sliwkowski 等人 (1999) Seminars in Oncology 26(4), Suppl 12:60-70; Yarden Y. 和 Sliwkowski, M. (2001) Nature Reviews :Molecular Cell Biology, MacmillanMagazines, Ltd., 卷 2:127-137)。HERCEPTIN[®] 在 1998 年被批准用于治疗 ErbB2 过量表达的转移性乳腺癌患者 (Baselga 等人, (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744)。FDA 在 2006 年批准 HERCEPTIN[®] 作为含有多柔比星、环磷酰胺和紫杉醇的治疗方案的一部分来辅助治疗 HER2 阳性、瘤 (node) 阳性的乳腺癌患者。临床上明显需要进一步开发针对 HER2 的癌症治疗以用于具有 HER2 过量表达肿瘤或与 HER2 表达相关的其他疾病而对 HERCEPTIN[®] 治疗无反应、或反应较弱的那些患者。

[0209] 培妥珠单抗 (OMNITARG[™], rhuMAb 2C4, Genentech) 是临床期的人源化抗体，并且是被称为 HER 二聚化抑制剂 (HDI) 的新种类药剂的第一种药物，该新种类药剂阻断 HER2 受体与其他 HER 受体家族成员 (即 HER1/EGFR、HER3 和 HER4) 合作的能力 (US 6949245; Agus 等人 (2002) Cancer Cell 2:127-37; Jackson 等人 (2004) Cancer Res 64:2601-9; Takai 等人 (2005) Cancer 104:2701-8)。在癌细胞中，干扰 HER2 与其他 HER 家族受体合作的能力阻断细胞信号传导并可能最终导致癌细胞生长抑制和癌细胞死亡。由于 HDI 的独特作用模式，它可能在多种肿瘤中起作用，包括不过量表达 HER2 的那些肿瘤 (Mullen 等人 (2007) Molecular Cancer Therapeutics 6:93-100)。

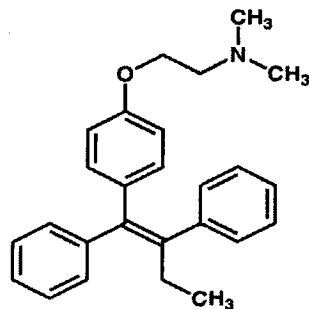
[0210] 替莫唑胺 (CAS 注册号 85622-93-1, TEMODAR[®], TEMODAL[®], Schering Plough) 是被 FDA 认证用于治疗间变性星形细胞瘤 (anaplastic astrocytoma) 的口服化疗药物，并且已经被研究用于其他脑肿瘤类型，如多形性成胶质细胞瘤 (US 5260291; Stevens 等人 (1984) J. Med. Chem. 27:196; Newlands 等人 (1997) Cancer Treat. Rev. 23:35-61; Danson 等人 (2001) Expert Rev. Anticancer Ther. 1:13-19)。替莫唑胺名称为 (4-甲基-5-氧

代-2,3,4,6,8-五氮二环[4.3.0]壬-2,7,9-三烯-9-羧酰胺或3,4-二氢-3-甲基-4-氧基咪唑并[5,1-d]-as-四嗪-8-羧酰胺(US 5260291,CAS No. 85622-93-1)并且具有结构:
[0211]



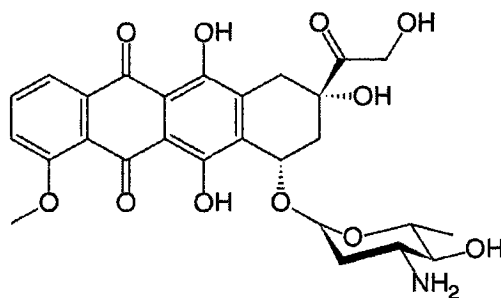
[0212] 他莫昔芬(NOLVADEX[®], ISTUBAL[®], VALODEX[®])是口服活性的选择性雌激素受体调节剂(SERM),它用于治疗乳腺癌并且目前是世界上销售量最大的药物。他莫昔芬(Nolvadex[®])1977年首次被FDA(ICIPharmaceuticals,现在的AstraZeneca)批准用于转移性乳腺癌(Jordan VC(2006)Br J Pharmacol 147(Suppl 1):S269-76)。他莫昔芬目前用于在绝经前和绝经后的妇女中治疗早期和晚期的雌激素受体(ER)阳性乳腺癌(Jordan VC(1993)Br J Pharmacol 110(2):507-17)。它还被FDA批准用于在具有发展为乳腺癌的高风险的妇女中预防该疾病并且用于降低对侧(另一侧乳房)乳腺癌。他莫昔芬名称为(Z)-2-[4-(1,2-二苯基丁-1-烯)苯氧基]-N,N-二甲基-乙烷胺,(CAS注册号10540-29-1)并且具有结构:

[0213]



[0214] 多柔比星(ADRIAMYCIN[®],羟基柔红霉素)是自20世纪60年代以来广泛用于化疗的与DNA相互作用的药物。它是蒽环类抗生素并且在结构上与道诺霉素相关,道诺霉素也嵌入DNA中。多柔比星常用于治疗大范围的癌症。多柔比星的名称为(8S,10S)-10-(4-氨基-5-羟基-6-甲基-四氢-2H-吡喃-2-基氧基)-6,8,11-三羟基-8-(2-羟基乙酰基)-1-甲氧基-7,8,9,10-四氢并四苯-5,12-二酮,(CAS目录号23214-92-8)并且具有结构:

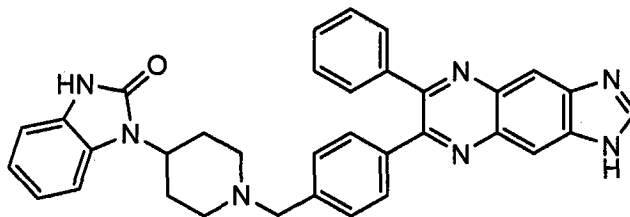
[0215]



[0216] Akti-1/2为有效地并且选择性地抑制Akt1/Akt2活性的细胞透性的喹噁啉

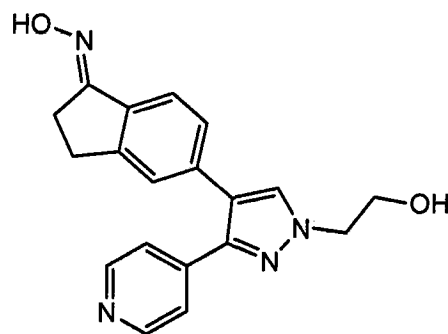
化合物：在体外激酶测定中对于 Akt1、Akt2 和 Akt3 的 IC_{50} 分别等于 58nM、210nM 和 2.12 μ M (Barnett 等人 (2005) *Biochem. J.* 385, :399 ; DeFeo-Jones, 等人 (2005) *Mol. Cancer Ther.* 4 :271 ; Zhao 等人 (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 :905 ; Lindsley 等人 (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 :761 ; US2006/142178 ; US 2005/159422 ; US 2004/102360)。该抑制似乎是普列克底物蛋白同源 (PH) 结构域依赖性的。它不显示对缺乏 PH 结构域的 Akt 或其他密切相关的 AGC 家族激酶 PKA、PKC 和 SGK 的任何抑制作用, 甚至在高达 50 μ M 时也如此。Akti-1/2 克服了在肿瘤细胞中 Akt1/Akt2 介导的对化疗剂的抗性, 并且显示它能在体外培养的细胞中和小鼠体内阻断基本的和激活的 Akt1/Akt2 磷酸化 / 活化。Akti-1/2 (EMD Biosciences 产品号 124018) 名称为 1,3-二氢-1-(1-((4-(6-苯基-1H-咪唑并[4,5-g]噻啉-7-基)苯基)甲基)-4-哌啶基)-2H-苯并咪唑-1-酮并且具有结构：

[0217]



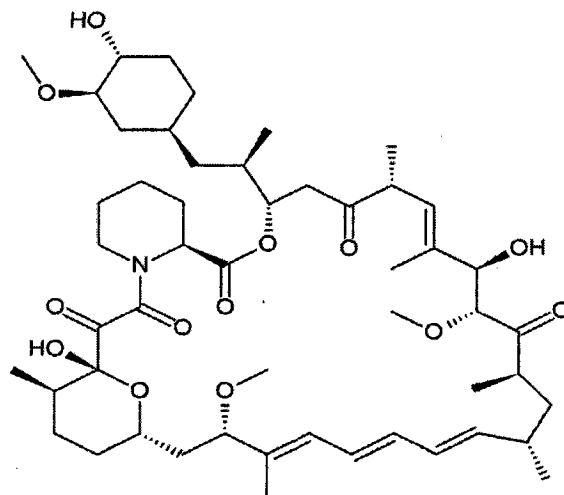
[0218] HPPD 是处于临床前研究阶段的选择性的 B-Raf 抑制剂 (B-Raf $IC_{50} < 2$ nM, pERK IC_{50} 87nM) (US 2006/0189627)。HPPD 的名称为 5-(1-(2-羟基乙基)-3-(嘧啶-4-基)-1H-吡唑-4-基)-2,3-二氢-1H-茚-1-酮并且具有结构：

[0219]



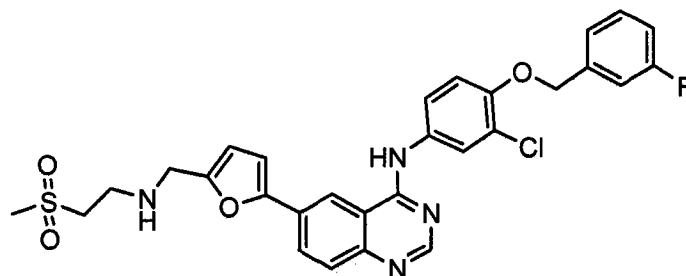
[0220] 雷帕霉素 (西罗莫司, RAPAMUNE[®]) 是用于防止器官移植中的排斥的免疫抑制药物, 并且尤其可用于肾脏移植。雷帕霉素最初是作为从称为 Rapa Nui (更广泛地称为复活岛) 土壤样品中的细菌吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的产物被发现的一种大环内酯类抗生素 (“-霉素 (-mycin)”) (Pritchard DI (2005). *Drug Discovery Today* 10 (10) :688-691)。雷帕霉素抑制对白细胞介素-2 (IL-2) 的反应并且从而阻断 T 细胞和 B 细胞的活化。雷帕霉素的作用模式是与细胞溶质蛋白 FK-结合蛋白 12 (FKBP12) 结合。雷帕霉素-FKBP12 复合体通过直接结合 mTOR 复合体 1 (mTORC1) 而抑制帕霉素的哺乳动物雷帕霉素靶 (mTOR) 通路。mTOR 还称为 FRAP (FKBP-雷帕霉素相关蛋白) 或 RAFT (雷帕霉素和 FKBP 靶)。雷帕霉素名称为 (3S, 6R, 7E, 9R, 10R, 12R, 14S, 15E, 17E, 19E, 21S, 23S, 26R, 27R, 34aS)-9, 10, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 32, 33, 34, 34a-十六氢-9, 27-二羟基-3-[(1R)-2-[(1S, 3R, 4R)-4-羟基-3-甲氧基环己基]-1-甲基乙基]-10, 21-二甲氧基-6, 8, 12, 14, 20, 26-六甲基-23, 27-环氧基-3H-吡啶并[2,1-c][1,4]-氧杂氮杂环

三十一烷-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-戊酮(CAS注册号53123-88-9)并且具有结构:
[0221]



[0222] 拉帕替尼 (TYKERB[®], GW572016, Glaxo SmithKline) 已经被批准与卡培他滨 (XELODA[®], Roche) 联合用于治疗具有晚期和转移性乳腺癌的患者, 该患者的肿瘤过量表达 HER2 (ErbB2) 并且之前接受过治疗, 包括蒽环类抗生素、紫杉烷和曲妥珠单抗治疗。拉帕替尼是 ATP 竞争性表皮生长因子 (EGFR) 和 HER2/neu (ErbB-2) 双酪氨酸激酶抑制剂 (US 6727256 ;US 6713485 ;US7109333 ;US 6933299 ;US 7084147 ;US 7157466 ;US 7141576), 它通过与 EGFR/HER2 蛋白激酶结构域的 ATP 结合区域结合来抑制受体自磷酸化和活化。拉帕替尼名称为 N-(3-氯-4-(3-氟苄氧基)苯基)-6-(5-((2-(甲基磺酰基)乙基氨基)甲基)呋喃-2-基)喹唑啉-4-胺并且具有结构:

[0223]



[0224] 生物学评定

[0225] 某些式 I 和 II 化合物与 PI3 激酶同种型特异性结合并抑制肿瘤细胞增殖 (WO 2006/046031 ;US 2008/0039459 ;US 2008/0076768 ;US 2008/0076758 ;WO 2008/070740 ;WO 2008/073785)。

[0226] 某些式 Ia 和 IIa 化合物以小于 1 微摩尔的 IC₅₀ 与 p110 α 同种型结合, 并且在小鼠异种移植模型中显示单药剂的体内肿瘤生长抑制。因此, 式 I 和 II 化合物作为单个治疗剂或与一种或多种化疗剂联合可用于治疗由异常细胞生长、功能或行为引起的疾病或病症。

[0227] 制备、鉴定了本文所述的某些示例性式 I 和 II 化合物, 并且测定了它们的 PI3K 结合活性 (实施例 13) 和体外抗肿瘤细胞活性 (实施例 14)。PI3K 结合活性 (IC₅₀) 的范围为小于 1nM (1 纳摩尔) 至约 10 μ M (10 微摩尔)。某些示例性式 I 和 II 化合物具有 IC₅₀ 值小于 10mM 的 PI3K 结合活性。某些式 I 和 II 化合物具有 EC₅₀ 值小于 100nM 的肿瘤细胞基

活性。

[0228] 式 I 和 II 示例性化合物的细胞毒性或细胞抑制活性可以通过下列步骤测量：在细胞培养基中建立增殖哺乳动物肿瘤细胞系，添加式 I 或 II 化合物，培养细胞约 6 小时至约 5 天的一段时间；并测量细胞存活率（实施例 14）。使用基于细胞的体外测定来测量存活率，即增殖（ IC_{50} ）、细胞毒性（ EC_{50} ）、和诱导凋亡（胱天蛋白酶激活）。通过包括下列的测定测量了某些示例性化合物的吸收、分布、代谢和排泄（ADME）的药效学和药代动力学特性：Caco-2 通透性、肝细胞清除率、细胞色素 P450 抑制、细胞色素 P450 诱导、血浆蛋白结合和 hERG 通道阻断。

[0229] 体外细胞增殖测定

[0230] 式 I 或 II 化合物与化疗剂联合的体外效力通过实施例 14；CellTiter-Glo® 发光细胞存活率测定（Luminescent Cell Viability Assay，从 Promega Corp.，Madison, WI 商购获得）的细胞增殖测定来测量。这种均匀的测定方法基于鞘翅目（Coleoptera）荧光素酶的重组表达（US 5583024；US 5674713；US 5700670）并基于所存在的 ATP 定量来测定培养中的活细胞数目，所存在的 ATP 是代谢活性细胞的指示物（Crouch 等人（1993）*J. Immunol. Meth.* 160：81-88；US6602677）。CellTiter-Glo® 测定以 96 或 384 孔形式进行，使得它适于自动的高通量筛选（HTS）（Cree 等人（1995）*AntiCancer Drugs* 6：398-404）。该均匀的测定方法涉及：将单个试剂（CellTiter-Glo® 试剂）直接添加到在补充有血清的培养基中培养的细胞中。不需要洗涤细胞、清除培养基和多次吸打步骤。在添加试剂并混合后，该系统能在 10 分钟内检测 384 孔形式中少至 15 个细胞 / 孔。

[0231] 均匀的“添加 - 混合 - 测量”形式导致细胞裂解并产生与所存在的 ATP 量成比例的发光信号。ATP 的量与培养物中所存在的细胞数目直接成比例。CellTiter-Glo® 测定产生“辉光（glow）类型”的发光信号，该信号由荧光素酶反应产生，依据所用的细胞类型和培养基，其一般具有大于 5 小时的半衰期。活细胞以相对发光单位（RLU）来表示。底物甲虫荧光素（Beetle Luciferin）被重组的萤火虫荧光素酶氧化脱羧，同时伴随着 ATP 向 AMP 的转化和质子的产生。延长的半衰期消除了使用试剂注射器的需要并为连续模式或分批模式的多板处理提供了灵活性。这种细胞增殖测定可以使用多种多孔形式，例如 96 或 384 孔形式。可以通过光度计或 CCD 照相成像设备记录数据。发光输出表示为随时间而测量的相对光单位（RLU）。

[0232] 在图 1-A、1-B 和 1-C 中，通过抗肿瘤细胞系的 CellTiter-Glo® 测定（实施例 14）测量了式 I 和 II 示例性化合物和与化疗剂联合的抗增殖作用。确定了测试化合物和联合的 EC_{50} 值。体外细胞效价活性范围为约 100nM 至约 10 μ M。

[0233] 图 1-A 显示了式 Ia 化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定概要。图 1-B 显示式 IIa 化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定概要。图 1-C 显示式 Ib 化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定概要。癌细胞系由肿瘤类型和基因突变的存在来表征。

[0234] 将单独测量的式 Ia、Ib 和 IIa 化合物和化疗剂针对具体细胞的 EC_{50} 值与联合的 EC_{50} 值进行比较。联合指数（CI）评分通过 Chou 和 Talalay 方法计算（Chou, T. 和 Talalay, P. (1984) *Adv. Enzyme Regul.* 22：27-55）。CI 小于 0.8 表明协同作用。CI 在 0.8 和 1.2 之间表明加成作用。CI 大于 1.2 表明拮抗作用。图 1-A、1-B 和 1-C 中的 CI 值是从 EC_{50} 浓度

(右起第三个点)得到的。协同作用强度根据 Chou 和 Talalay 评估并列在表的最后一列中。图 1-A、1-B 和 1-C 中的某些联合在使用包括乳腺、子宫颈、结肠、子宫内膜、胶质瘤、肺、黑素瘤、卵巢、胰腺、和前列腺的肿瘤细胞类型的体外细胞增殖测定中具有惊人的和意料不到的协同作用特性。图 1-A、1-B 和 1-C 中的其他联合不显示协同作用,仅显示加成作用或拮抗作用。某些联合对于一种或多种肿瘤类型是协同的,但其他的则不是。体外细胞增殖测定中所显示的协同作用为预计治疗人患者中包括但不限于下列的癌症中的相应协同作用提供了基础:乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、胶质瘤、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、和前列腺。

[0235] 图 2 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为 5-FU、式 Ia 化合物、以及 5-FU 和式 Ia 的联合。通过同时给药 5-FU 和式 Ia(上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药 5-FU(中)、和给药 5-FU 之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 MDA-MB-361(乳腺癌类型)细胞。在同时给药(CI = 0.11)和用式 Ia 后给药(CI = 0.10)的情况下观察到了强的协同作用。观察到了强的给药顺序(次序)作用。用式 Ia 预给药显示出较低的协同作用(CI = 0.67)。

[0236] 图 3 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为吉西他滨、式 Ia 化合物、以及吉西他滨和式 Ia 的联合。通过同时给药吉西他滨和式 Ia(上)、和给药吉西他滨之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 Cal-51(乳腺癌类型)细胞。在同时给药(CI = 0.59)观察到协同作用,用式 Ia 后给药(CI = 0.17)的情况下观察到强的协同作用。

[0237] 图 4 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为吉西他滨、式 Ia 化合物、以及吉西他滨和式 Ia 的联合。通过同时给药吉西他滨和式 Ia(上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药吉西他滨(中)、和给药吉西他滨之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 MDA-MB-361(乳腺癌类型)细胞。在同时给药(CI = 0.27)、用式 Ia 预给药(CI = 0.46)和用式 Ia 后给药(CI = 0.28)的情况下观察到了协同作用。

[0238] 图 5 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为厄洛替尼、式 Ia 化合物、以及厄洛替尼和式 Ia 的联合。通过同时给药厄洛替尼和式 Ia(上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药厄洛替尼(中)、和给药厄洛替尼之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 A549(具有 K-ras G12C 的肺肿瘤类型)细胞。在同时给药(CI = 0.17)和、用式 Ia 预给药(CI = 0.31)和用式 Ia 后给药(CI = 0.33)的情况下观察到了协同作用。

[0239] 图 6 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为厄洛替尼、式 Ia 化合物、以及厄洛替尼和式 Ia 的联合。通过同时给药厄洛替尼和式 Ia(上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药厄洛替尼(中)、和给药厄洛替尼之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 H23(具有 K-ras G12C 突变的肺肿瘤类型)细胞。在同时给药(CI = 0.28)、用式 Ia 预给药(CI = 0.39)和用式 Ia 后给药(CI = 0.37)的情况下观察到了协同作用。

[0240] 图 7 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为替莫唑胺、式 Ia 化合物、以及替莫唑胺和

式 Ia 的联合。通过同时给药替莫唑胺和式 Ia(上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药替莫唑胺(中)、和给药替莫唑胺之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 U87(胶质瘤类型)细胞。在同时给药(CI = 0.004)的情况下观察到了协同作用,但是用式 Ia 预给药(CI = 1.13)和用式 Ia 后给药(CI = 1.41)的情况下则没有。

[0241] 图 8 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为替莫唑胺、式 Ia 化合物、以及替莫唑胺和式 Ia 的联合。通过同时给药替莫唑胺和式 Ia(上)、用式 Ia 予给药 4 小时然后给药替莫唑胺(中)、和给药替莫唑胺之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 A375(黑素瘤类型)细胞。在同时给药(CI = 0.007)的情况下观察到了协同作用,但是用式 Ia 预给药(CI = 0.99)和用式 Ia 后给药(CI = 1.02)的情况下则没有。

[0242] 图 9 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为替莫唑胺、式 Ia 化合物、以及替莫唑胺和式 Ia 的联合。通过同时给药替莫唑胺和式 Ia(上)、用式 Ia 予给药 4 小时然后给药替莫唑胺(中)、和给药替莫唑胺之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 MALME-3M(黑素瘤类型)细胞。在同时给药(CI = 0.18)的情况下观察到了协同作用,但是用式 Ia 预给药(CI = 1.46)和用式 Ia 后给药(CI = 1.22)的情况下则没有。

[0243] 图 10 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为多柔比星、式 Ia 化合物、以及多柔比星和式 Ia 的联合。通过同时给药多柔比星和式 Ia(上)、用式 Ia 予给药 4 小时然后给药多柔比星(中)、和给药多柔比星之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 SKOV3(卵巢瘤类型)细胞。在同时给药(CI = 0.39)和用式 Ia 后给药(CI = 1.18)的情况下观察到了协同作用,但是用式 Ia 预给药(CI = 1.44)的情况下则没有。

[0244] 图 11 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为多西他赛、式 Ia 化合物、以及多西他赛和式 Ia 的联合。通过同时给药多西他赛和式 Ia(上)、用式 Ia 预给药 4 小时然后给药多西他赛(中)、和给药多西他赛之后 4 小时用式 Ia 后给药(下)处理 PC3(前列腺肿瘤类型)细胞。在同时给药(CI = 0.43)和用式 Ia 后给药(CI = 1.30)的情况下观察到了协同作用,但是用式 Ia 预给药(CI = 1.23)的情况下则没有。

[0245] 图 12 显示测量不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活 MDA-MD 361(乳腺癌类型)细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为:(上)5-FU、式 IIa 化合物、以及 5-FU 和式 IIa 的同时的联合;(中)多西他赛、式 IIa 化合物、以及多西他赛和式 IIa 的同时的联合;和(下)吉西他滨、式 IIa 化合物、以及吉西他滨和式 IIa 的同时的联合。在同时给药 5-FU 和式 IIa(CI = 0.34)、多西他赛和式 IIa(CI = 0.09)、以及吉西他滨和式 IIa(CI = 0.50)的情况下观察到了协同作用。

[0246] 图 13 显示体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,该测定测量:(上)不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活 MT3(乳腺癌类型)细胞,从右至左为:多西他赛、式 IIa 化合物、以及多西他赛和式 IIa 的同时的联合;(下)不同浓度(以 $4 \times EC_{50}$ 开始)的活 U87(PTEN neg 突变的胶质瘤类型)细胞,从右至左为:替莫唑胺、式 IIa 化合物、以及替莫唑胺和式 IIa 的同时的联合;在 MT3 细胞中同时给药多西他赛和式 IIa(CI = 0.69);

和在 U87 细胞中同时给药替莫唑胺和式 IIa(CI = 0.67) 观察到了协同作用。

[0247] 图 14 显示测量不同浓度(以 450 开始)的活 ZR75-1(乳腺癌类型)细胞的体外细胞增殖测定(Cell-Titer Glo, Promega)的结果,从右至左为:(上)5-FU、式 IIa 化合物、以及 5-FU 和式 IIa 的同时的联合;(下)多西他赛、式 IIa 化合物、以及多西他赛和式 IIa 的同时的联合。在 ZR75-1 细胞中同时给药 5-FU 和式 IIa(CI = 0.47);和在 ZR75-1 细胞中同时给药多西他赛和式 IIa(CI = 0.46) 观察到了协同作用。

[0248] Ras 突变与图 1A 中(实验 1-248)所列的式 Ia 化合物和化疗剂的联合所引起的体外协同作用的相关性可以通过散点图来显示。图 15 和 16 中的各个点位来自图 1A 的实验。实验分组为 Ras 野生型(Ras WT)或 Ras 突变型(Ras Mut),具体地突变在图 1A 中列出,相对于协同作用(联合指数, CI)作图,其中协同作用随着根据 Chou 和 Talalay 方法(Chou, T. 和 Talalay, P. (1984) Adv. 22 :27-55)所测量的 CI 的降低而增加。

[0249] 图 15 显示来自图 1A 的厄洛替尼和式 Ia 化合物抗肿瘤细胞系实验的协同作用(联合指数)的散点图,其中所述肿瘤细胞系具有和不具有 Ras 突变(实验 71-73、140-168、230-231)。Ras 突变体细胞系显示比 ras 野生型细胞系强的厄洛替尼和式 Ia 化合物的协同作用。

[0250] 图 16 显示来自图 1A 的 PD-0325901 和式 Ia 化合物抗肿瘤细胞系实验的协同作用(联合指数)的散点图,其中所述肿瘤细胞系具有和不具有 Ras 突变(实验 29-35, 74-83, 124-139, 175-184, 224-226, 232-236, 247, 248)。Ras 突变体细胞系显示比 ras 野生型细胞系强的 PD-0325901 和式 Ia 化合物的协同作用。

[0251] 图 17 显示在 EC80 的给药水平用吉西他滨处理协同的肿瘤细胞系 MDA-MB-361 和非协同的肿瘤细胞系 MT-3 的时程结果。pAkt 水平在 T = 0(未处理, UT)、1 小时、4 小时、6 小时和 24 小时时测量。已知组成型和诱导型 Akt 活性在乳腺癌细胞中能促进对化疗剂曲妥珠单抗或他莫昔芬的抗性(Clark 等人(2002) Mol Cancer Ther. 1(9) :707-17)。磷酸化 Akt (pAkt) 水平可以通过实施例 18 中所述的方法测量。低的 CI 与化疗剂诱导 pAkt 增加的作用相关。pAkt (Ser473) 水平使用来自 Biosource (Carlsbad, CA) 的磁珠试剂盒和 Luminex Bio-Plex 系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 测定。吉西他滨处理引起协同的细胞系 (MDA-MB-361) 中 pAkt 水平增加,但是在非协同的细胞系 (MT-3) 中不增加,这表明 pAkt 水平响应于化疗的增加与式 I 或 II 化合物和化疗剂在癌症治疗中的协同作用相关并且是协同作用的指示。

[0252] 图 18 显示来自图 1A 的多西他赛、5-FU、或吉西他滨和式 Ia 化合物实验抗肿瘤细胞系的协同作用(联合指数)的散点图,所述肿瘤细胞系显示显示出 pAkt 增加,并且响应于单独的化疗剂时则不显示 pAkt 增加。在用多西他赛、5-FU、或吉西他滨处理后显示出 pAkt 增加的细胞系与无 pAkt 反应的细胞系相比显示与式 Ia 化合物的协同作用较强。

[0253] 本发明包括用于测定联合使用以治疗癌症的化合物的方法,该方法包括:a) 将具有式 I 或 II 的化合物与选自下列的化疗剂的治疗剂联合给予具有 K-ras 突变的体外肿瘤细胞系:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素和拉帕替尼;和 b) 测量协同或非协同作用。

[0254] 尽管其他作用机制可能在图 1A、1B、1C 和图 2-14 中所示例的联合中是有效地,但

是结果与下列作用一致:PI3K 抑制剂对肿瘤细胞增殖抑制施加 G1 期特异性作用;5FU 施加 DNA 合成的 S 期特异性破坏;吉西他滨施加 DNA 合成的 S 期特异性破坏;以及多西他赛施加 M 期特异性的微管去极化。

[0255] 流式细胞术 FACS

[0256] 用流式细胞术来测量式 Ia 化合物与几种化疗剂对 MB3 乳腺癌和 PC3 前列腺肿瘤细胞的联合治疗效果。膜联蛋白 V/PI 测定检测早期和晚期凋亡事件(实施例 15)。膜联蛋白 V 阳性的细胞为处于凋亡早期,膜联蛋白 V 和 PI 双阳性的那些细胞在图 19 的柱形图中记录为“死亡”。剩余的细胞组成了“活”群体。

[0257] 图 19 显示流式细胞术 FACS(荧光激活的细胞分选)的结果:(上)MB361 细胞为(由左至右):未处理的、用式 Ia 处理的、用 5FU 处理的、先用 5FU 然后用式 Ia 化合物处理的;(中)PC3 细胞为(由左至右):未处理的、用式 Ia 处理的、用多西他赛处理的、同时用式 Ia 和多西他赛处理的、先用式 Ia 然后用多西他赛处理的、以及先用多西他赛然后用式 Ia 化合物处理的;和(下)MB361 细胞为(由左至右):未处理的、用式 Ia 处理的、用吉西他滨处理的、先用吉西他滨然后用式 Ia 化合物处理的。

[0258] 以 EC80 的剂量给药式 Ia 化合物和遗传毒性的化疗剂 24、48、72 小时。FACS(固定的用于细胞周期(PI),活细胞用于膜联蛋白 V 和 PI)同时、或者相隔 4 小时用式 Ia 化合物预给药和后给药来添加化合物(实施例 19)。在 1 小时后获得最大协同作用时,注意到了淘汰作用。在给药后 1 小时,与两种淘汰的药物的联合保持协同。当式 Ia 与化疗药物联合时,在所有三个联合中都有早期和晚期凋亡的增加(图 19)。低的 Chou 和 Talalay CI 值表明当这些药物在体内联合时很可能有显著地肿瘤抑制有益效果。

[0259] 三维联合测定

[0260] 在诸如乳腺的腺体组织中,表皮与特化形式的胞外基质相互作用,这种特化形式的胞外基质称为基膜。胞外基质条调节正常的乳腺生物学和发病机理。将重组的富含层粘连蛋白的基膜(1rBM)添加到标准细胞培养物中可以再现乳腺的基本腺泡结构,并且被认为是改良的模拟肿瘤动态微环境的体外模型(Debnath J, Brugge JS. (2005) Nat Rev Cancer. 5:675-88)。使用广谱特异性抑制剂发现 PI3K 信号传导参与了在 1rBM 中生长的 HMT-3522T4-2 人乳腺癌细胞的腺泡发育,因而 PI3K 抑制足以恢复顶-基底极性并诱导生长停滞(Liu H, Radisky DC, Wang F, Bissell MJ. (2004) J Cell Biol. ;164:603-12)。考虑到所提出的 PI3K 对乳腺癌的开始和发育起作用,3D 培养系统提供了评估小分子 PI3K 抑制剂如式 Ia 化合物的效力的新的和全面的方法。

[0261] 受体酪氨酸激酶 HER2 (Neu/ErbB2) 在人乳腺癌中扩增和过量表达了大约 20%,并且在乳腺癌发生中起因果作用(Yarden Y, Sliwkowski MX. (2001) Nat Rev Mol Cell Biol. 2:127-37)。这种 HER2 过量表达在人乳腺癌中所起的作用通过抗 HER2 单克隆抗体曲妥珠单抗(HERCEPTIN[®], Genentech)的治疗效力得到了证明。除了同源二聚体化之外,HER2 还可以作为其他 HER 家族成员的共同受体起作用。单克隆抗体培妥珠单抗靶向 HER2 二聚体化臂(胞外亚结构域 II)并且破坏 HER2 向 HER 受体-配体复合体中募集(Franklin 等人 (2004) Cancer Cell. 5:317-28。使用式 Ia 和 IIa 化合物与用治疗剂抗体曲妥珠单抗和培妥珠单抗进行 HER 家族信号传导的抑制的联合来测定 PI3K 抑制的效力。

[0262] 本发明包括用于测定联合使用以治疗癌症的化合物的方法,该方法包括:a) 将权

利要求 1 的治疗剂联合给予 HER2- 扩增的乳腺癌细胞中,该细胞处于富含层粘连蛋白的重组基膜培养基中,其中所述化疗剂靶向、结合至、或调节 HER2 受体 ;b) 测量细胞增殖的抑制,其中非恶性和恶性哺乳动物细胞通过选自细胞存活率和腺泡形态的一个或多个表型的不同来区分。

[0263] 式 I 和 II 化合物与治疗剂抗体的联合在 HER2 扩增的 BT474M1 细胞中评定(实施例 16)。在 3 维 (3D) 的富含层粘连蛋白的重组基膜中培养细胞以解释胞外基质分子在癌基因信号传导和生物学中的作用。3D 培养重现癌基因微环境的能力意味着更可靠地预测体内效率(与在塑料上的二维 (2D) 细胞培养相比)并且可用于鉴定抑制剂和靶基因。使用 3D 培养来评估 HER 家族信号传导并测量抑制剂的协同效力。使用细胞存活率和腺泡表型(形态发生)作为药物效力的标记物(实施例 16)。

[0264] 使用 HER2 扩增的 BT474M1 细胞和用新的 3D 细胞培养物表型检测 HER 家族信号传导,并根据腺泡形态发生测量协同效力(实施例 16)。富含层粘连蛋白的重组基膜培养基的一个实施方式是 Engelbreth-Holm-Swarm 胞外基质提取物,以 BD Matrigel™(BD Biosciences) 商购获得。用于 3D 培养的胞外基质 (ECM) 的另一示例性实施方式 (ECM) 是马-达二氏犬 (Madin-Darby canine) 肾表皮细胞。示例性的表型不同为侵袭性(恶性)和非侵袭性(非恶性)细胞的腺泡结构。

[0265] 作为药物效力的另一测定可以对腺泡形态发生进行评分。滴加各种抑制剂以检测通路的药效 (PD) 标记物、细胞存活率和腺泡表型。确定有效抑制靶标的最低抑制剂药物浓度。用于 3D 培养测定的合适的式 I 和 II 化合物浓度通过在给予增加的剂量时考虑整体细胞存活率、响应下游通路标记物(如磷酸化的 AKT1) 的药效和腺泡表型的改变来确定。选择有效抑制靶标的最低药物浓度进行测定。选择 250nM 的式 Ia 和 IIa 化合物浓度作为用于 3D 培养测定的最终工作浓度。

[0266] 已显示直接的 HER2 抑制剂如曲妥珠单抗和培妥珠单抗能干扰若干关键效应子通路的下游激活,包括 PI3K-AKT 轴线。在 HER2 扩增的乳腺癌细胞中的 PI3K 和 HER 家族信号传导的联合抑制可以导致有效的肿瘤细胞抑制。

[0267] 通过磷酸化的 AKT1 (pAkt) 的免疫印迹检测,确定 250nM 式 Ia 化合物有效地抑制 PI3K 下游的信号传导(实施例 16)。对于培妥珠单抗和曲妥珠单抗,所用的治疗剂抗体的饱和浓度分别为 20 μ g/ml 和 25 μ g/ml。式 Ia 和曲妥珠单抗的联合引起在缺乏 HRG 配体的基质胶 (Matrigel) 中培养的 BT474M1 腺泡 3D 生长的加成抑制。为了检测配体依赖性的 HER2-HER3 异源二聚体信号传导,如在多种细胞系中转化所建议的,在这些测定中添加 1nM HRG。式 Ia 和曲妥珠单抗对于 HRG 诱导的增殖没有作用。通过比较,用式 Ia 和培妥珠单抗的共同处理导致了 HRG 诱导的腺泡生长和形态发生的加成减小。这个作用显示,对于多次重复在统计学上显著。在不存在配体的情况下,用式 Ia 和曲妥珠单抗处理后与式 Ia 和培妥珠单抗相比 3D 腺泡生长的减小较大。曲妥珠单抗和式 Ia 化合物的联合抑制了细胞增殖并减弱了调蛋白诱导的形态发生。曲妥珠单抗和式 Ia 化合物对于正常血清中的 3D 生长具有有效和加成的作用,但是在调蛋白处理的培养基中的腺泡生长或形态发生则没有观察到该联合的加成作用。培妥珠单抗和式 Ia 化合物的联合有效地但是加成地抑制 BT474M1 腺泡生长和形态发生。曲妥珠单抗、培妥珠单抗和式 Ia 化合物的三联合在补充了 HRG 的培养基和标准培养基中都协同抑制 BT474M1 腺泡芽生长和形态发生(图 20)。

[0268] 滴加各种抑制剂以检测相关通路的药效 (PD) 标记物、细胞存活率和腺泡表型。确定有效抑制靶标的最低抑制剂药物浓度并且将其用于所有的 3D 测定中。

[0269] 图 20 显示在三维 (3D) 培养中 BT474 生长的定量。细胞存活率通过测量细胞 ATP 水平来测定。在 10% 血清或 10% 血清与 1nM 调蛋白中培养 BT474M1 细胞并使其接触如下所指示的抑制剂联合 (由左至右): 培养基、DMSO ; 20 μ g/ml 曲妥珠单抗和 25 μ g/ml 培妥珠单抗的联合 ; 250nM 式 Ia 化合物 ; 以及 20 μ g/ml 曲妥珠单抗、25 μ g/ml 培妥珠单抗和 250nM 式 Ia 化合物的联合。在具有和不具有 1nM 调蛋白的 10% FBS 培养基中腺泡生长和形态发生与以相对光单位 (RLU) 表示的细胞 ATP 产生相关。

[0270] 在标准培养基 (无调蛋白), 在单独存在曲妥珠单抗、培妥珠单抗或式 Ia 化合物的情况下细胞存活率相对较低, 但是在用 HRG 处理的培养基中则不同。曲妥珠单抗和式 Ia 化合物的联合在正常血清中抑制细胞增殖并减弱调蛋白诱导的形态发生, 但是在调蛋白处理的培养基中没有观察到对腺泡生长或形态发生的加成作用。在标准培养基和补充有调蛋白的培养基中培妥珠单抗和式 Ia 化合物的联合都有效地并且加成地抑制 BT474M1 腺泡生长和形态发生。曲妥珠单抗、培妥珠单抗和式 Ia 化合物的三联合在标准培养基和补充了 HRG 的培养基中都协同抑制 BT474M1 细胞增殖和调蛋白诱导的形态发生 (图 20)。所有三种药剂的联合都协同降低标准培养基和补充有 HRG 的培养基二者中的细胞存活率。如通过显微镜观察所测定的, 调蛋白诱导的 BT474M1 细胞的形态发生也被该三联合消除。这些数据表明式 Ia、曲妥珠单抗和培妥珠单抗三联合可以提供在人患者中治疗 HER2 扩增的乳腺癌的改进的效力。

[0271] 曲妥珠单抗或式 Ia 在正常培养基中显著减小腺泡大小, 但是对于 HRG 诱导的形态发生的作用有限。作为联合治疗, 曲妥珠单抗和式 Ia 可以最小化腺泡大小和形态发生。通过细胞存活率的 Cell Titer-Glo 分析, 曲妥珠单抗和式 Ia 的加成作用导致在正常培养基中细胞生长减少, 但是没有观察到与添加了 HRG 的情况的不同。

[0272] 培妥珠单抗完全抑制 HRG 诱导的形态发生, 而式 Ia 则仅部分减少表型。培妥珠单抗和式 Ia 一起则在正常和补充有 HRG 的培养基中都能减少细胞生长和形态发生。通过如 Cell Titer-Glo 测量的细胞存活率评定, 在正常培养基中培妥珠单抗和式 Ia 化合物作为单独的药剂存在或联合治疗的情况下观察到细胞活性降低。HRG 处理的腺泡也显示出类似的倾向, 但是程度较轻。通过 CellTiter-Glo 重复 ($n = 8$) 的 Dunnett T 检验比较, 培妥珠单抗和式 Ia 的联合显著抑制细胞活性 ($p = 0.0054$)。

[0273] 图 21 显示将式 IIa 添加到曲妥珠单抗和培妥珠单抗双治疗中的类似作用。图 21 显示用所指示的 20 μ g/ml 曲妥珠单抗、25 μ g/ml 培妥珠单抗或 250nM 式 IIa 化合物治疗后 3D 细胞培养中的 BT474 生长。式 IIa 在正常培养基中显著减小腺泡大小, 但是作为单独的药剂则对 HRG 诱导的形态发生作用有限。如使用 Cell Titer Glo 的细胞存活率测量所测定的, 作为联合治疗, 式 IIa、曲妥珠单抗和培妥珠单抗显著减小腺泡大小和减少形态发生。与式 Ia 化合物相比, 式 IIa 化合物在 250nM 时作为单独的药剂 ($p = 0.0001$, Dunnett T- 检验) 和与曲妥珠单抗和培妥珠单抗的联合 ($p < 0.0001$, Dunnett T 检验) 的效力都略低

[0274] 图 21-A 显示将式 Ib 添加到曲妥珠单抗和培妥珠单抗双治疗中的类似作用。测量用所指示的 20 μ g/ml 曲妥珠单抗、25 μ g/ml 培妥珠单抗或 20nM 式 Ib 化合物处理后 3D 细胞培养中的 BT474 生长。式 Ib 的单治疗在正常培养基和补充有 HRG 的培养基中减小腺泡

大小。如使用 Cell Titer Glo 的细胞存活率测量所测得的,腺泡大小和形态发生的最显著减小是由式 Ib、曲妥珠单抗和培妥珠单抗的联合治疗所得到的。

[0275] 体内肿瘤异种移植物的效力

[0276] 本发明联合的效力可以在体内测量,这通过将癌细胞的同种移植物或异种移植物移植到啮齿动物中并用联合治疗携带有肿瘤的动物来进行。依据细胞系、肿瘤细胞中某些突变的存在与否、式 I 或 II 化合物和化疗剂的给药顺序、给药方案和其他因素来预计变量结果。用药物或对照(溶媒)处理受试小鼠并监控数周或更长时间以测量肿瘤倍增、对数细胞死亡和肿瘤抑制的时间(实施例 17)。

[0277] 图 22 显示在具有 MDA-MB-361.1 乳腺癌细胞异种移植物的 CD-1 裸小鼠(Charles River 实验室)中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5% 甲基纤维素/0.2%吐温 80)、150mg/kg 式 Ia、5mg/kg 多西他赛以及式 Ia 150mg/kg 和多西他赛 5mg/kg 的联合。在第 1、5 和 9 天(q4d×3)对小鼠进行多西他赛静脉内给药,而式 Ia 则通过口服强饲法每日一次给药达 21 天。在同一天给药时,式 Ia 在多西他赛后 1 小时给药。150mg/kg 式 Ia 与 5mg/kg 多西他赛的联合与各单独药剂相比,在体内协同抑制 MDA-MB-361.1 乳腺癌生长更明显。

[0278] 用 150mg/kg 式 Ia 给药的 11 只动物组在 21 天后显示 75%的抑制率,并且在 41 天后显示 3 个局部消退和 66%的抑制率。用 5mg/kg 多西他赛给药的 10 只动物组在 21 天后显示 78%的抑制率,并且在 41 天后显示 2 个局部消退和 26%的抑制率。用 150mg/kg 式 Ia 和多西他赛 5mg/kg 的联合给药的 9 只动物组在 21 天后显示 90%的抑制率,并且在 41 天后显示 7 个局部消退和 83%的抑制率。当与各单独药物相比时,联合显示出较好的肿瘤抑制效力,并且在统计学上显著(与多西他赛相比, $p = .0001$;与式 Ia 相比 $p = .02$)。

[0279] 图 23 显示在具有 MDA-MB-361.1 乳腺癌细胞异种移植物的 CD-1 裸小鼠(Charles River 实验室)中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 1 天如下给药:MCT 溶媒(0.5% 甲基纤维素/0.2%吐温 80)、37.5mg/kg 式 IIa、5mg/kg 多西他赛,以及 37.5mg/kg 式 IIa 和 5mg/kg 多西他赛的联合。在第 1、5 和 9 天(q4d×3)对小鼠进行多西他赛静脉内给药,而式 IIa 则通过口服强饲法每日一次给药达 21 天。在同一天给药时,式 IIa 在多西他赛后 1 小时给药。用 37.5mg/kg 式 IIa 给药的 10 只动物组在 21 天后显示出 30%的抑制率和 2 个局部消退。用 5mg/kg 多西他赛给药的 10 只动物组在 21 天后显示出 35%的抑制率和 3 个局部消退。用式 IIa 37.5mg/kg 和多西他赛 5mg/kg 的联合给药的 10 只动物组显示出 63%的抑制率。当与各单独药物相比时,联合显示出较好的肿瘤抑制效力,并且在统计学上显著(与多西他赛相比, $p = 0.0454$;与式 IIa 相比 $p = .0174$)。

[0280] 图 24 显示在具有 MAXF 401(三阴性)原发性乳腺癌细胞外植体异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu(裸)小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:MCT 溶媒(0.5% 甲基纤维素/0.2%吐温 80)、100mg/kg 式 Ia、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 Ia 和 15mg/kg 多西他赛的联合。MAXF401 是直接对多西他赛反应的患者中活组织检查获得的原发性乳腺癌,并且将其皮下移植到小鼠中。乳腺癌群体是 HER2 阴性、ER(雌激素受体)阴性和 PR(孕酮受体)阴性的“三阴性”患者亚群。在离体的小鼠中保持着对多西他赛的敏感性。在第 0 天和第 11 天用多西他赛对小鼠进行静脉内给药,而式 Ia 则通过口服强饲法在第 0-4、11-17 和 21-28 天给药。在式 Ia 的最后一次给药后对动物的肿瘤生

长再监测 22 天（动物研究总天数为 50 天）。在同一天给药时，式 Ia 在多西他赛后 1 小时给药。用 100mg/kg 式 Ia 给药的 10 只动物组在第 28 天显示出 49% 的抑制率。用 15mg/kg 多西他赛给药的 10 只动物组在第 28 天显示出 95% 的抑制率。用式 Ia 150mg/kg 和多西他赛 15mg/kg 的联合给药的 10 只动物组在 28 天后显示出大于 90% 的抑制率。在研究结束时（第 50 天），用多西他赛和式 Ia 单独给药的动物的肿瘤再次生长起来并且肿瘤抑制分别由 95% 降至 68% 和 49% 降至 10%。然而，在研究结束时（第 50 天），多西他赛和式 Ia 的联合则引起所有 10 只动物具有 MAXF 401 原发性乳腺癌的持续肿瘤消退（大于 90% 的抑制率）并且与各单独药物相比时在统计学上显著（与多西他赛相比， $p = .05$ ；与式 Ia 相比， $p < .001$ ）。考虑到 MAXF 401 乳腺癌源自对紫杉烷治疗反应的患者，离体条件下所观察到的改良效力表明式 Ia 的联合可能在与多西他赛联合时对乳腺癌具有临床有益效果。

[0281] 图 25 显示在具有 MAXF 401 原发性乳腺癌细胞外植体异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变，该小鼠在第 0 天如下给药：MCT 溶媒（0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80）、100mg/kg 式 IIa、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 IIa 和 15mg/kg 多西他赛的联合。MAXF 401 是直接对多西他赛反应的患者中活组织检查获得的原发性乳腺癌，并且将其皮下移植到小鼠中。在离体的小鼠中保持着对多西他赛的敏感性。在第 0 天和第 11 天用多西他赛对小鼠进行静脉内给药，而式 IIa 则通过口服强饲法在第 0-3、11-17 和 21-28 天给药。在式 IIa 的最后一次给药后对动物的肿瘤生长再监测 22 天（动物研究总天数为 50 天）。在同一天给药时，式 IIa 在多西他赛后 1 小时给药。用 100mg/kg 式 IIa 给药的 10 只动物组在第 28 天显示出 82% 的抑制率。用 15mg/kg 多西他赛给药的 10 只动物组在第 28 天显示出 95% 的抑制率。用式 IIa 150mg/kg 和多西他赛 15mg/kg 的联合给药的 10 只动物组在第 28 天显示出 99% 的抑制率。在研究结束时（第 50 天），用多西他赛和式 IIa 单独给药的动物的肿瘤则再次生长起来并且肿瘤抑制分别降至 68% 和 51%。然而，在研究结束时（第 50 天），100mg/kg 式 IIa 和 15mg/kg 多西他赛的联合则引起 MAXF 401 原发性乳腺癌的持续肿瘤消退（99% 的抑制率）并且与各单独药物相比在统计学上显著（与多西他赛相比， $p = 0.0118$ ；与式 IIa 相比， $p = 0.005$ ）。考虑到 MAXF 401 乳腺癌源自对紫杉烷治疗反应的患者，离体条件下所观察到的改良效力表明式 IIa 的联合可能在与多西他赛联合时对乳腺癌具有临床有益效果。

[0282] 图 26 显示在具有 MAXF 1162 原发性乳腺癌细胞外植体异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变，该小鼠在第 0 天如下给药：MCT 溶媒（0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80）、100mg/kg 式 Ia、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 Ia 和 15mg/kg 多西他赛的联合。MAXF 1162 是直接对多西他赛治疗失败的患者中活组织检查获得的原发性乳腺癌，并且将其皮下移植到小鼠中。在这些小鼠中离体时保持着对多西他赛的抗性。在第 0、11、22 和 44 天对小鼠进行多西他赛静脉内给药，并且通过口服强饲法在第 0-5、11-16、22-27、30-32、42 和 44 天给药式 Ia。在式 Ia 的最后一次给药后对动物的肿瘤生长再监测 6 天（动物研究总天数为 50 天）。在同一天给药时，式 Ia 在多西他赛后 1 小时给药。用 100mg/kg 式 Ia 给药的 10 只动物组在 49 天后显示出 54% 的抑制率。用 15mg/kg 多西他赛给药的 10 只动物组在 49 天后显示出 36% 的抑制率。用式 Ia 100mg/kg 和多西他赛 15mg/kg 的联合给药的 10 只动物组在 49 天后显示出 87% 的抑制率。在研究结束时（第 50 天），联合引起了持续的肿瘤消退（大于 87% 的抑制率）并且与各单独药物相比时在统计

学上显著（与多西他赛相比， $p = .0005$ ；与式 Ia 相比， $p = .0007$ ）。考虑到 MAXF1162 乳腺癌源自对紫杉烷治疗失败的患者，离体条件下所观察到的改良效力表明式 Ia 与多西他赛的联合可能在人类中对紫杉烷抗性的乳腺癌具有临床有益效果。

[0283] 图 27 显示在具有 MAXF 1162 原发性乳腺癌细胞异种移植物的 NMRI 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变，该小鼠在第 0 天如下给药：MCT 溶媒（0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80）、100mg/kg 式 IIa、15mg/kg 多西他赛以及 100mg/kg 式 IIa 和 15mg/kg 多西他赛的联合。MAXF 1162 是直接来自多西他赛治疗失败的患者中活组织检查获得的原发性乳腺癌，并且将其皮下移植到小鼠中。在这些小鼠中离体时保持着对多西他赛的抗性。在第 0、11、22 和 44 天对小鼠进行多西他赛静脉内给药，并且通过口服强饲法在第 0-5、11-16、22-23、29-31、和 35-38 天给药式 IIa。在式 IIa 的最后一次给药后对动物的肿瘤生长再监测 12 天（动物研究总天数为 50 天）。在同一天给药时，式 IIa 在多西他赛后 1 小时给药。用 100mg/kg 式 IIa 给药的 10 只动物组在 49 天后显示出 32% 的抑制率。用 15mg/kg 多西他赛给药的 10 只动物组在 49 天后显示出 36% 的抑制率。用式 IIa 100mg/kg 和多西他赛 15mg/kg 的联合给药的 10 只动物组在 49 天后显示出 80% 的抑制率。在研究结束时（第 50 天），联合引起了 MAXF 1162 原发性乳腺癌肿瘤的持续肿瘤消退（大于 80% 的抑制率）并且与各单独药物相比时在统计学上显著（与多西他赛相比， $p < 0.0001$ ；与式 IIa 相比， $p = 0.0166$ ）。考虑到 MAXF 1162 乳腺癌源自对紫杉烷治疗失败的患者，离体条件下所观察到的改良效力表明式 II 与多西他赛的联合可能在紫杉烷抗性的人乳腺癌具有临床有益效果。

[0284] 图 28 显示在具有 NCI-H2122 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu (裸) 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变，该小鼠在第 0 天如下给药：MCT 溶媒（0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80）、50mg/kg 式 Ia、75mg/kg 厄洛替尼以及 50mg/kg 式 Ia 和 75mg/kg 厄洛替尼的联合。通过口服强饲法对小鼠进行每日一次的厄洛替尼和式 Ia 达 16 天。对动物的肿瘤生长再监测 5 天（研究结束位第 21 天）。同时给予厄洛替尼和式 Ia 两者。用 50mg/kg 式 Ia 给药的 8 只动物组在 20 天后显示出 17% 的肿瘤抑制率。用 75mg/kg 厄洛替尼给药的 8 只动物组在 20 天后显示出 21% 的抑制率。用式 Ia 50mg/kg 和厄洛替尼 75mg/kg 的联合给药的 8 只动物组在 20 天后显示出 55% 的抑制率。在研究结束时（第 21 天），50mg/kg 式 Ia 和厄洛替尼的联合是加成的并且与各单独药物相比导致 NCI-H2122 NSCLC 肿瘤异种移植物的显著肿瘤生长延迟（与厄洛替尼相比， $p = .032$ ；与式 Ia 相比， $p = .019$ ）。

[0285] 图 29 显示在具有 NCI-H2122 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu (裸) 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变，该小鼠在第 0 天如下给药：MCT 溶媒（0.5% 甲基纤维素 / 0.2% 吐温 80）、50mg/kg 式 IIa、75mg/kg 厄洛替尼以及 50mg/kg 式 IIa 和 75mg/kg 厄洛替尼的联合。通过口服强饲法对小鼠进行每日一次的厄洛替尼和式 IIa 给药达 14 天（研究结束）。同时给予厄洛替尼和式 IIa 两者。用 50mg/kg 式 IIa 给药的 9 只动物组在研究结束时显示出 27% 的肿瘤抑制率。用 75mg/kg 厄洛替尼给药的 10 只动物组在研究结束时显示出 34% 的肿瘤抑制率。用式 IIa 50mg/kg 和厄洛替尼 75mg/kg 的联合给药的 9 只动物组在研究结束时显示出的 63% 肿瘤抑制率。在研究结束时（第 21 天），50mg/kg 式 IIa 和 75mg/kg 厄洛替尼的联合是加成的并且与各单独药物相比导致 NSCLC 肿瘤异种移植物的显著肿瘤生长延迟（与厄洛替尼相比， $p = .032$ ；与式 IIa 相比， $p = .029$ ）。

[0286] 图 30 显示在具有 MCF-7 (PI3K 突变体) 乳腺癌细胞外植体异种移植物的 HRLN 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 1 天如下给药: MCT 和 PBS 溶媒 (MCT ;0.5% 甲基纤维素 /0.2% 吐温 80 和 PBS ;磷酸盐缓冲液)、对照 IgG 5mg/kg、mB20-4.1 鼠抗 VEGF (抗血管发生) 5mg/kg、式 Ia 150mg/kg、以及式 Ia 150mg/kg 和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 5mg/kg 的联合。用对照 IgG 和 mB20-4.1 对动物进行腹膜内给药 3 周, 每周两次, 并且通过口服强饲法每日一次给药式 Ia 达 21 天, 对肿瘤生长再监测 41 天 (研究总天数为 62 天)。同时共给予式 Ia 和 mB20-4.1。用对照 IgG 给药并研究的 15 只动物中的 13 只小组在 21 天后显示出 19% 的抑制率和 0 个局部消退。用 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 给药并研究的 15 只动物中的 10 只小组在 21 天后显示出 49% 的抑制率和 0 个局部消退。用 150mg/kg 式 Ia 化合物给药并研究的 13 只动物小组在 21 天后显示出 36% 的抑制率和 0 个局部消退。用式 Ia 化合物和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 的联合给药并研究的 10 只动物小组在 21 天后显示出 66% 的抑制率和 4 个完全消退。用式 Ia 化合物和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 的联合给药的动物在给药终止后 41 天 (研究结束时) 与各单独药物相比显示出显著的抑制和持续的肿瘤生长消退 (与式 Ia 相比, $p < .006$; 与 mB20-4.1 相比 $< .01$)。

[0287] 图 31 显示在具有 MCF-7 (PI3K 突变体) 乳腺癌细胞外植体异种移植物的 HRLN 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 1 天如下给药: MCT 和 PBS 溶媒 (MCT ;0.5% 甲基纤维素 /0.2% 吐温 80 和 PBS ;磷酸盐缓冲液)、对照 IgG 5mg/kg、mB20-4.1 鼠抗 VEGF (抗血管发生) 5mg/kg、式 IIa 100mg/kg、以及式 IIa 100mg/kg 和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 5mg/kg 的联合。用对照 IgG 和 mB20-4.1 对动物进行腹膜内给药 3 周, 每周两次, 并且每日一次口服给药式 IIa 达 21 天, 对肿瘤生长再监测 41 天 (研究总天数为 62 天)。同时共给予式 IIa 和 mB20-4.1。用溶媒给药并研究的 15 只动物中的 12 只小组在 21 天后显示出 10% 的抑制率和 0 个局部消退。用 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 给药并研究的 15 只动物中的 10 只小组在 21 天后显示出 49% 的抑制率和 0 个局部消退。用 100mg/kg 式 IIa 化合物给药并研究的 13 只动物小组在 21 天后显示出 5% 的抑制率和 0 个局部消退。用式 IIa 化合物和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 的联合给药并研究的 15 只动物中的 10 只小组在 21 天后显示出 61% 的抑制率和 1 个完全消退。用式 Ia 化合物和 mB20-4.1 鼠抗 VEGF 的联合给药的动物在给药终止后 41 天与各单独药物相比显示出显著的抑制和肿瘤生长延迟 (与式 IIa 相比, $p < .001$; 并与 mB20-4.1 相比 $< .01$)。

[0288] 图 32 显示在具有 U87MG 胶质瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 如下给药: 式 Ia (GDC-0941) 109mg/kg、替莫唑胺 100mg/kg、以及式 Ia 109mg/kg 和替莫唑胺 100mg/kg 的联合、以及不接受药物的小鼠 (未处理组)。每天一次对动物进行式 Ia 口服给药达 21 天, 以及替莫唑胺口服给药 5 天。109mg/kg 式 Ia 与 100mg/kg 替莫唑胺的联合与单独的式 Ia 或替莫唑胺相比在体内协同抑制 U87MG 肿瘤生长更明显并且引起了肿瘤消退, 随后肿瘤生长被延缓。

[0289] 图 33 显示在具有 MDA-MB-361.1 乳腺癌细胞异种移植物的 CD-1CR/Hollister 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 式 Ia (GDC-0941) 150mg/kg、吉西他滨 100mg/kg、以及式 Ia 150mg/kg 和吉西他滨 100mg/kg 的联合、以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。每天一次对动物进行式 Ia 口服给药达 21 天, 并且在第 1、4、7 和 10 天 (q3d×4) 进行腹膜内吉西他滨给药。150mg/kg 式 Ia 与 100mg/kg 吉西他滨的联合与单独

的式 Ia 或吉西他滨相比在体内协同抑制 MDA-MB-361.1 乳腺癌生长更明显并且引起了肿瘤消退,随后肿瘤生长被延缓。

[0290] 图 34 显示在具有 BT474 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 如下给药:式 Ia (GDC-0941) 18、36 和 73mg/kg;曲妥珠单抗 20mg/kg;以及式 Ia 18、36 和 73mg/kg 与曲妥珠单抗 20mg/kg 的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。每天一次对动物进行式 Ia 口服给药达 21 天,并且每周两次腹膜内给药曲妥珠单抗达 3 周。73mg/kg 式 Ia 与 20mg/kg 曲妥珠单抗的联合与单独的式 Ia 或曲妥珠单抗相比在体内协同抑制 BT474 乳腺癌生长更明显并且引起了肿瘤消退,随后肿瘤生长被延缓。

[0291] 用曲妥珠单抗处理 BT474-M1(体内传代的 BT474 亚克隆)细胞引起 pAKT 降低,该降低等于用式 Ia 化合物(GDC-0941)所达到的降低。将曲妥珠单抗添加至 50nM 式 Ia 中导致剂量依赖性的增强的 pAKT 降低。在最大的曲妥珠单抗剂量下,额外的降低为 GDC-0941 单独处理的 29-38%。对 pAKT 抑制的增强的联合作用不是瞬时的,而是在处理后 48 小时仍能检测到。在 pAKT 中所看到的联合作用还反映在下游 AKT 信号传导组分中。在存在或不存在曲妥珠单抗的条件下用式 Ia 处理 BT474-M1 细胞 4 小时。添加曲妥珠单抗进一步降低了直接的 AKT 底物 PRAS40(Thr246)和远端底物磷酸-S6 核糖体蛋白(Ser235/236)的磷酸化,这表明曲妥珠单抗和式 Ia 对下游 AKT 信号传导具有增强的联合作用。当处理 BT474-M1 细胞 6 天并且测量细胞存活率时证明增强的 PI3K/AKT 通路抑制导致了细胞增殖/存活率的降低。单独的曲妥珠单抗将增殖/存活率降低了 40%。在不存在曲妥珠单抗的条件下,式 Ia 的 IC₅₀ 值为 296nM。曲妥珠单抗的添加引起了剂量依赖性的增强的增殖/存活率降低。10ug/ml 的最大曲妥珠单抗剂量引起式 Ia 达到其 106nM 的 IC₅₀ 所需的浓度降低了 64%,这表明在降低细胞增殖/存活率中也具有增强的联合作用。当处理 SKBR-3 细胞时也观察到了 pAKT 和增殖抑制的类似联合作用,但是处理曲妥珠单抗不反应性的 KPL-4 细胞时则没有。如 CalcuSyn 软件所测定曲妥珠单抗和式 Ia 的联合在 BT474 和 SKBR-3 细胞中的协同抑制增殖作用高于大多数有效药物范围,这表明该联合增强了对 AKT 和其下游靶标的抑制作用,从而导致了曲妥珠单抗敏感的乳腺癌细胞增殖的协同作用。

[0292] 曲妥珠单抗和式 Ia 的联合加成地诱导已处理 48 小时的 BT474-M1 细胞乳腺癌细胞的凋亡。曲妥珠单抗和式 Ia 的联合增加了裂解的胱天蛋白酶-3 片段的积累,这表示着这种关键的效应子胱天蛋白酶的激活。曲妥珠单抗和式 Ia 的联合还导致了裂解的 PARP 89kDa 片段增加,该片段已知对胱天蛋白酶-3 激活反应。当将曲妥珠单抗添加到式 Ia 处理中时,也增加了胱天蛋白酶 3 和 7 的活性。曲妥珠单抗与 250nM 式 Ia 的联合将胱天蛋白酶 3 和 7 的活性增加到与用 4 倍高的剂量(1000nM)的单独的式 Ia 所检测到的活性类似的水平。重要的是,这种胱天蛋白酶活性的增加反应在这些细胞的凋亡指数上。曲妥珠单抗的添加显著降低诱导凋亡所需的式 Ia 的浓度。当用 100nM 式 Ia 和曲妥珠单抗处理细胞时和用 1000nM 单独的式 Ia 处理时检测到了接近相等的凋亡水平。如所预期的,凋亡的增加反应在 48h 后细胞存活率的降低上。当用抑制剂联合处理 SKBR-3 细胞时观察到胱天蛋白酶活性和凋亡的类似增加。式 Ia 与曲妥珠单抗的联合在曲妥珠单抗敏感性乳腺癌细胞中显著降低了达到胱天蛋白酶激活阈值和凋亡所需的式 Ia 浓度。因此,曲妥珠单抗处理可以用于敏化 HER2 扩增细胞以抑制 PI3K 并且因此提供增加水平的 PI3K 抑制剂式 Ia 的肿瘤特异

性。

[0293] 图 35 显示在具有 BT474 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周;每周 2 次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周;每周一次腹膜内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周;以及每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周和每周一次腹膜内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周的联合;每周 2 次口服式 Ib 2.5mg/kg 3 周和每周一次腹膜内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周的联合;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每周一次腹膜内给药曲妥珠单抗 15mg/kg 3 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。每天一次给药的 2.5mg/kg 式 Ia 与每周一次给药的 15mg/kg 曲妥珠单抗的联合与单独的式 Ia 或曲妥珠单抗相比在体内协同抑制 BT474 乳腺癌生长更明显并且引起了肿瘤生长延缓。

[0294] 图 36 显示在具有 MCF-7 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg 鼠抗 VEGF 抗体 B20-4.1 3 周;或式 Ib 5mg/kg 以及每天 1 次口服式 Ib 5mg/kg 0-3 天、10-26 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 3 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。5.0mg/kg 式 Ib 与 5mg/kg B20-4.1 的联合与单独的式 Ib 或 B20-4.1 相比协同抑制体内 MCF-7 乳腺癌生长更明显并且导致了肿瘤消退。

[0295] 图 37 显示在具有 Fo5 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg 鼠抗 VEGF 抗体 B20-4.1 3 周;每天 1 次口服式 Ia (GDC-0941) 36 和 73mg/kg 21 天;每天一次口服式 Ib 2.5 和 5mg/kg 21 天,以及每天一次口服式 Ia 36mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 3 周的联合;每天 1 次口服式 Ia 73mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 3 周的联合;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 3 周的联合;以及每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 B20-4.1 5mg/kg 3 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。36mg/kg 式 Ia 与 5mg/kg B20-4.1 的联合与单独的式 Ia 或 B20-4.1 相比协同抑制体内 Fo5 乳腺癌生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。73mg/kg 式 Ia 与 5mg/kg B20-4.1 的联合与单独的式 Ia 或 B20-4.1 相比协同抑制体内 Fo5 乳腺癌生长也更明显并且导致了肿瘤生长延缓。2.5mg/kg 式 Ib 与 5mg/kg B20-4.1 的联合与单独的式 Ib 或 B20-4.1 相比协同抑制体内 Fo5 乳腺癌生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。5.0mg/kg 式 Ib 与 5.0mg/kg B20-4.1 的联合与单独的式 Ib 或 B20-4.1 相比协同抑制体内 Fo5 乳腺癌生长更明显并且导致了肿瘤生长消退。

[0296] 图 38 显示在具有 MDA-MB-231 乳腺癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg 鼠抗 VEGF 抗体 B20-4.1 3 周;每天 1 次口服式 Ia (GDC-0941) 36 和 73mg/kg 21 天;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 21 天和每天一次口服 Ib 7.5mg/kg 8 天,以及每天一次口服式 Ia 36mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 3 周的联合;每天 1 次口服式 Ia 73mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 3 周的联合;每天一次口服式 Ib 5mg/kg 21 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 3 周的联合;以及每天一次口服式 Ib 7.5mg/kg 8 天和每周 2 次腹膜内给药 5mg/kg B20-4.1 11.5 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。5.0mg/kg 式 Ib 与 5.0mg/kg B20-4.1 的联合与单独的式 Ib 或 B20-4.1 相比协同抑制体内

MDA-MB-231 乳腺癌生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。

[0297] 图 39 显示在具有 H1299 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 3 周; 每天一次口服式 Ia (GDC-0941) 100mg/kg 6 天; 每天一次口服式 Ia 50mg/kg 21 天、每天一次口服式 Ia 25mg/kg 21 天; 以及每天一次口服式 Ia 100mg/kg 6 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 6 天的联合; 每天一次口服式 Ia 50mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合; 和每天一次口服式 Ia 25mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。25mg/kg 式 Ia 与 50mg/kg 厄洛替尼的联合与单独的式 Ia 或厄洛替尼相比协同抑制体内 H1299 非小细胞肺癌肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。50mg/kg 式 Ia 与 50mg/kg 厄洛替尼的联合与单独的式 Ia 或厄洛替尼相比也更明显地协同抑制体内 NCI-H1299 非小细胞肺癌肿瘤生长并且导致了肿瘤生长延缓。

[0298] 图 40 显示在具有 H520 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 3 周; 每天一次口服式 Ia (GDC-0941) 73mg/kg 4 天; 每天一次口服式 Ia 36mg/kg 21 天、每天一次口服式 Ia 18mg/kg 21 天; 以及每天一次口服式 Ia 73mg/kg 4 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 4 天的联合; 每天一次口服式 Ia 36mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合; 和每天一次口服式 Ia 18mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天的联合; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。18mg/kg 式 Ia 与 50mg/kg 厄洛替尼的联合与单独的式 Ia 或厄洛替尼相比协同抑制体内 H520 非小细胞肺癌肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。36mg/kg 式 Ia 与 50mg/kg 厄洛替尼的联合与单独的式 Ia 或厄洛替尼相比也更明显地协同抑制体内 H520 非小细胞肺癌肿瘤生长并且导致了肿瘤生长延缓。

[0299] 图 41 显示在具有 H1299 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天; 每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 21 天; 每周 2 次口服式 Ib 5mg/kg 21 天; 每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周; 以及下列的联合: 每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 21 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天; 每周 2 次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天; 以及每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 21 天; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。每天一次口服给药 2.5mg/kg 式 Ib 与每天一次口服给药 50mg/kg 厄洛替尼的联合与单独的式 Ib 或厄洛替尼相比协同抑制体内 H520 非小细胞肺癌肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。

[0300] 图 42 显示在具有 NCI-H2122 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Taconic NCR 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每天一次口服厄洛替尼 75mg/kg 16 天; 每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 16 天; 每天一次口服式 Ib 5mg/kg 16 天; 每天一次口服式 Ib 7.5mg/kg 16 天; 以及每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 16 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 16 天的联合; 每天一次口服式 Ib 5mg/kg 16 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 16 天的联合; 以及每天一次口服式 Ib 7.5mg/kg 16 天和每天一次口服厄洛替尼 50mg/kg 16 天的联合; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒

组)。2.5mg/kg 式 Ib 与 75mg/kg 厄洛替尼的联合与单独的式 Ib 或厄洛替尼相比协同抑制体内 NCI-H2122 非小细胞肺癌肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤停滞。

[0301] 图 43 显示在具有 A375 人黑素瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每天一次口服给药 3mg/kg PD-03259013 周;每天一次口服式 Ia(GDC-0941)73mg/kg 3 周;以及每天一次口服给药 3mg/kg PD-0325901 3 周和每天一次口服式 Ia 73mg/kg 3 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒对照)。73mg/kg 式 Ia 与 3mg/kg PD-0325901 的联合与单独的式 Ia 或 PD-0325901 相比在体内协同作用抑制 BT474 乳腺癌生长更明显并且引起了肿瘤消退和肿瘤生长延缓。

[0302] 图 44 显示在具有 A375 人黑素瘤肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每天一次口服替莫唑胺 100mg/kg 5 天;每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周;每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周;以及每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周和每天一次口服替莫唑胺 100mg/kg 5 天的联合;和每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每天一次口服替莫唑胺 100mg/kg 5 天的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒对照)。5mg/kg 式 Ib 与 100mg/kg 替莫唑胺的联合与单独的式 Ib 或替莫唑胺相比协同抑制体内 A375 人黑素瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。

[0303] 图 45 显示在具有 SKOV3 人卵巢癌细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每天一次口服式 Ia(GDC-0941)73mg/kg 3 周;每天一次口服式 Ia 36mg/kg 3 周;每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周;以及每天一次口服式 Ia 73mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合;每天一次口服式 Ia 36mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合;以及每周一次口服式 Ia 73mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。每天一次给药 36mg/kg 式 Ia 与 10mg/kg 多西他赛的联合与单独的式 Ib 或替莫唑胺相比协同抑制体内 SKOV3 人卵巢瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。每天一次给药 73mg/kg 式 Ia 与 10mg/kg 多西他赛的联合与单独的式 Ib 或多西他赛相比也更明显地协同抑制体内 SKOV3 人卵巢瘤生长并且导致了肿瘤生长延缓。

[0304] 图 46 显示在具有 SKOV3 人卵巢癌肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每天一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周;每天一次口服式 Ib 1mg/kg 3 周;每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周;以及每天一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合;以及每天一次口服式 Ib 1mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。5mg/kg 式 Ib 与 10mg/kg 多西他赛的联合与单独的式 Ib 或多西他赛相比协同抑制体内 SKOV3 人卵巢瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长停滞。

[0305] 图 47 显示在具有 SKOV3 人卵巢癌肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变,该小鼠在第 0 天如下给药:每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周;每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周;每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周;以及每周一次口服式 Ib 5mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合;以及每周一次口服式 Ib 10mg/kg 3 周和每周一次静脉内给药多西他赛 10mg/kg 3 周的联合;以及不接受药物的小鼠(溶媒组)。每周一次给药 10mg/kg 式 Ib 与 10mg/kg 多西他赛的联

合与单独的式 Ib 或多西他赛相比协同抑制体内 SKOV3 人卵巢瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长延缓。

[0306] 图 48 显示在具有 LuCap 35V 人原发性前列腺癌肿瘤细胞异种移植物的雌性 SCID Beige 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg; 每天一次口服式 Ia (GDC-0941) 50mg/kg 18 天; 每天一次口服式 Ia 100mg/kg 18 天; 以及 在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg 和每天一次口服式 Ia 50mg/kg 18 天的联合; 以及 在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg 和每天一次口服式 Ia 100mg/kg 18 天的联合, 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。100mg/kg 式 Ia 与 5mg/kg 多西他赛的联合与单独的式 Ia 或多西他赛相比协同抑制体内 LuCap 35V 人原发性前列腺肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤生长消退。

[0307] 图 49 显示在具有 LuCap 35V 人原发性前列腺癌肿瘤细胞异种移植物的雌性 SCID Beige 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg; 每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 15 天; 每天一次口服式 Ib 5mg/kg 15 天; 以及 在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg 和每天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 15 天的联合; 以及 在第 1、5 和 9 天 (q4d×3) 静脉内给药多西他赛 5mg/kg 和每天一次口服式 Ib 5mg/kg 15 天的联合, 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。2.5mg/kg 式 Ib 与 5mg/kg 多西他赛的联合与单独的式 Ib 或多西他赛相比协同抑制体内 LuCap 35V 人原发性前列腺肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤消退。5.0mg/kg 式 Ib 与 5mg/kg 多西他赛的联合与单独的式 Ib 或多西他赛相比也更明显地协同抑制体内 LuCap 35V 人原发性前列腺肿瘤生长并且导致了肿瘤消退。

[0308] 图 50 显示在具有 PC3-NCI 人原发性前列腺癌肿瘤细胞异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠如下给药: 在第 1、5、9 和 13 天 (q4d×4) 静脉内给药 2.5mg/kg 多西他赛; 在第 1、5、9 和 13 天 (q4d×4) 给药式 Ib 2.5mg/kg; 在第 1、5、9 和 13 天 (q4d×4) 口服给药式 Ib 10mg/kg; 以及 静脉内给药多西他赛 2.5mg/kg 和口服式 Ib 10mg/kg 的联合; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。在第 1、5、9 和 13 天给药 10mg/kg 式 Ib 与 5mg/kg 多西他赛的联合与单独的式 Ib 或多西他赛相比协同抑制体内 PC3-NCI 人原发性前列腺肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤消退。

[0309] 图 51 显示在具有 PC3-NCI 人原发性前列腺癌细胞异种移植物的 CRL 雌性 nu/nu 小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每 3 天一次 (q3d) 腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次; 每 3 天一次 (q3d) 口服式 Ia (GDC-0941) 150mg/kg 4 次; 每 3 天一次 (q3d) 口服式 Ib 2.5mg/kg 4 次; 每 3 天一次 (q3d) 口服式 Ib 5mg/kg 4 次; 以及 每 3 天一次腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次和每 3 天一次口服式 Ia 150mg/kg 4 次的联合; 每 3 天一次腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次和每 3 天一次口服式 Ib 2.5mg/kg 4 次的联合; 每 3 天一次腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次和每 3 天一次口服式 Ib 5mg/kg 4 次的联合; 每 3 天一次腹膜内给药吉西他滨 100mg/kg 4 次和每 3 天一次口服式 Ib 10mg/kg 4 次的联合; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒组)。每 3 天一次口服给药 150mg/kg 式 Ia 4 次与 100mg/kg 吉西他滨的联合与单独的式 Ia 或吉西他滨相比协同抑制体内 PC3-NCI 人原发性前列腺肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤消退和肿瘤生长延缓。每 3 天一次 (q3d) 口服给药 2.5mg/kg 式 Ib 4 次与 100mg/kg 吉西他滨的联合与单独的式 Ia 或吉西他滨相比协同

抑制体内 PC3-NCI 人原发性前列腺肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤消退和肿瘤生长延缓。每 3 天一次 (q3d) 口服给药 5.0mg/kg 式 Ib 4 次与 100mg/kg 吉西他滨的联合与单独的式 Ia 或吉西他滨相比协同抑制体内 PC3-NCI 人原发性前列腺肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤消退和肿瘤生长延缓。每 3 天一次 (q3d) 口服给药 10mg/kg 式 Ib 4 次与 100mg/kg 吉西他滨的联合与单独的式 Ia 或吉西他滨相比协同抑制体内 PC3-NCI 人原发性前列腺肿瘤生长更明显并且导致了肿瘤消退和肿瘤生长延缓。

[0310] 图 52 显示在具有 NCI-H2122 (K-ras) 非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞异种移植物的 Harlan 雌性 nu/nu 裸小鼠中平均肿瘤体积随时间的改变, 该小鼠在第 0 天如下给药: 每天一次口服给药 6.3mg/kg PD-0325901 21 天; 每天一次口服式 Ia (GDC-0941) 100mg/kg 21 天; 以及每天一次口服给药 6.3mg/kg PD-0325901 21 天和每天一次口服式 Ia 100mg/kg 21 天的联合; 以及不接受药物的小鼠 (溶媒对照)。100mg/kg 式 Ia 与 6.3mg/kg PD-0325901 的联合与单独的式 Ia 或 PD-0325901 相比在体内协同抑制 NCI-H2122 (K-ras) NSCLC 肿瘤生长更明显并且引起了肿瘤消退。

[0311] 遗传工程化的小鼠模型肿瘤效力

[0312] 式 I 化合物与化疗剂的联合治疗在内源组织微环境中概括了人肿瘤进展的遗传工程化小鼠模型 (GEMM) 中在治疗小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、和胰腺癌 (PDAC) 是有效的 (Singh, M. 和 Johnson, L. (2006) Clin. Cancer Res. 12(18):5312-5328; US 2007/0292948, 它们都通过整体引用并入)。来自这些实验的令人惊奇地和出乎意料的结果可以预测具有选择肿瘤类型和突变的某些患者群对式 I 和 II 化合物与化疗剂的这些联合治疗的临床反应。

[0313] 在具有患者群中常见的突变的 SCLC 模型 (Meuwissen 等人 (2003) Cancer Cell 4(3):181-189) 中, 如微 CT 成像所评估的, 单独的式 Ia 化合物不显示对肿瘤生长的作用但是与对照相比它确实对存活有影响 (显著的危害比)。通过微 CT 成像, 用式 Ia 化合物和 mB20-4.1.1 鼠抗 VEGF-A 的联合给药的动物显示出与对照和各单独药物相比明显的肿瘤生长抑制和消退。式 Ia 化合物和 mB20-4.1.1 鼠抗 VEGF-A 的联合与对照相比还对整体的存活具有统计学上显著的影响。用式 Ia 化合物、卡铂、和 mB20-4.1.1 鼠抗 VEGF-A 的三联合给药的动物还显示出与单药剂相比可测量的和耐久的抗肿瘤反应。该三联合与单独药剂相比显著增加了存活, 并且此三联合方案中的式 Ia 化合物与卡铂和 mB20-4.1.1 鼠抗 VEGF-A 双联合相比增强了存活优势。此外, 这些联合方案与对照和各单独药物相比显著降低了向局部淋巴结和肝转移的发生率。

[0314] 胰腺癌的 GEMM (Aguirre 等人 (2003) Genes & Development 17:3112-3126) 涵盖了具有这种疾病的大多数患者中所发现的突变。当用式 Ia 化合物处理时, 经由超声发现这些小鼠与对照处理的小鼠相比显示出肿瘤生长的初始降低。然而, 这种反应是不持久的并且该单药剂处理在这些小鼠中对存活具有轻度 (非统计学上显著的) 的影响。相比之下, 经由超声发现, 式 Ia 与 mB20-4.1.1 鼠抗 VEGF-A 的联合在肿瘤生长方面显示出显著的降低 (与未处理的小鼠和单药剂相比) 以及对存活的显著影响。用吉西他滨与 mB20-4.1.1 鼠抗 VEGF-A 的联合治疗或不与 mB20-4.1.1 鼠抗 VEGF-A 联合的治疗与单独的吉西他滨相比不显示肿瘤生长抑制 (经由超声) 或存活的显著改善。

[0315] 在 K-ras 驱动的 NSCLC GEMM (Johnson 等人 (2001) Nature 410:1111-1116;

Jackson 等人 (2001) *Genes & Development* 15 :3243-3248) 中, 如微 CT 成像所测量的, 单独的式 Ia 化合物处理最小地影响肿瘤生长, 并且与对照相比对存活没有影响。式 Ia 化合物与厄洛替尼的联合处理与单药剂处理相比显示出轻度肿瘤生长抑制和存活优势。式 Ia 化合物与 mB20-4. 1. 1 鼠抗 VEGF-A 的联合与对照相比导致了显著的肿瘤生长降低和存活增加, 虽然与 mB20-4. 1. 1 鼠抗 VEGF-A 作为单药剂所观察到的作用相比并不显著更高。用式 Ia 化合物、卡铂、和 mB20-4. 1. 1 鼠抗 VEGF-A 的三联合给药的动物与对照相比还显示出可测量的和耐久的抗肿瘤反应并且还显著地影响该模型的存活。

[0316] 药物组合物

[0317] 本发明的药物组合物或制剂包括式 I 或 II 化合物、化疗剂、以及一种或多种药学上可接受的载体、助流剂、稀释剂或赋形剂的组合。

[0318] 本发明的式 I 或 II 化合物、化疗剂可以非溶剂化和用药学上可接受的溶剂如水、乙醇等溶剂化的形式存在, 并且本发明意欲涵盖溶剂化和非溶剂化的形式。

[0319] 本发明的式 I 或 II 化合物和化疗剂还可以不同的互变异构形式存在, 并且所有这些形式都涵盖在本发明的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指可以经由低能垒相互转化的不同能量的结构异构体。例如, 质子互变异构体 (还称为质子移变互变异构体) 包括经由质子迁移的互相转化, 如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。效价互变异构体包括通过一些键合电子的再组织的互相转化。

[0320] 药物组合物涵盖总体组合物和由多于一个 (例如 2 个) 的药物活性剂组成的单个剂量单元, 所述药物活性剂包括式 I 或 II 化合物和选自本文所述的额外药剂的列表的化疗剂, 以及任何药物上无活性的赋形剂、稀释剂、载体或助流剂。总体组合物和各单个剂量单元可以含有固定量的上述药物活性剂。总体组合物是还未形成单个剂量单元的材料。一种示例性的剂量单元为口服剂量单元, 如片剂、丸剂、胶囊等。类似地, 通过给予本发明的药物组合物治疗患者的本文所述的方法还意欲涵盖给予总体组合物和单个剂量单元。

[0321] 药物组合物还涵盖与本文所列的那些相同的同位素标记的本发明的化合物, 但是事实是一个或多个原子被原子质量或质量数与自然界中常见的原子质量或质量数不同的原子取代。如所说明的任何具体原子或元素的所有同位素都包括在本发明的化合物和它们的用途范围内。可以被掺入本发明的化合物中的示例性同位素包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、氯和碘的同位素, 如 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 、 ^{123}I 和 ^{125}I 。本发明的某些同位素标记的化合物 (例如, 用 ^3H 和 ^{14}C 标记的那些) 可用于化合物和 / 或基底组织分布测定中。氚化的 (^3H) 和碳 14 (^{14}C) 同位素由于其容易制备和检测而可以使用。此外, 用较重的同位素如氘 (^2H) 取代可以提供某些治疗优势, 这些优势是由于较高的代谢稳定性 (例如, 增加的体内半衰期或降低的剂量需要) 引起的, 因此在某些情况下是优选的。正电子同位素如 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{11}C 和 ^{18}F 可用于正电子成像术 (PET) 研究以检测基底受体的占有。本发明的同位素标记的化合物一般可以通过类似于 Schemes 中所公开的那些和 / 或在本文下面的实施例中所示的下列方法通过用同位素标记的试剂取代未用同位素标记的试剂来制备。

[0322] 根据在哺乳动物包括人中用于治疗性治疗 (包括预防性治疗) 高增殖性病症的治疗剂联合的标准药物实践来配制式 I 或 II 化合物和化疗剂。本发明提供包括式 I 或 II 化合物与一种或多种药学上可接受的载体、助流剂、稀释剂或赋形剂结合的药物组合物。

[0323] 合适的载体、稀释剂和赋形剂是本领域的技术人员所熟知的,并且包括如下的材料:例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或可膨胀性聚合物、亲水或疏水材料、明胶、油、溶剂、水等。所用的具体载体、稀释剂或赋形剂取决于本发明的化合物所应用的方法和目的。一般根据本领域的技术人员认为是安全的溶剂(GRAS)来选择给予哺乳动物的溶剂。一般来说,安全的溶剂为无毒的水性溶剂。如水和可溶于水或与水混溶的其他无毒的溶剂。合适的水性溶剂包括水、乙醇、丙二醇、聚乙二醇(例如,PEG 400、PEG 300)等以及它们的混合物。制剂还可以包括一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面赋形剂、湿润剂、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、抗氧化剂、乳浊剂、助流剂、加工助剂、着色剂、增甜剂、芳香剂、调味剂和为药物(即,本发明的化合物或其药物组合物)提供较佳表现或有助于制备药物制品(即,药品)的其他已知的添加剂。

[0324] 制剂可以使用常规的溶解和混合步骤制备。例如,在存在一种或多种上述赋形剂的条件下将总体药物物质(即,本发明的化合物或该化合物的稳定形式(例如与环糊精衍生物或其他已知的络合剂的络合物))溶解在合适的溶剂中。本发明的化合物通常配制成药物剂型以提供容易控制的药物剂量并且能够使患者依从所制定的方案。

[0325] 可以依据用于给予药物的方法而以多种方式包装用于应用的药物组合物(或制剂)。一般来说,用于销售的制品包括其中以合适的形式存放药物制剂的容器。合适的容器是本领域的那些技术人员所熟知的并且包括如下材料:例如瓶子(塑料的和玻璃的)、小袋、安瓿、塑料袋、金属筒等。容器还可以包括防干扰装配物以防止不慎接触包装的内容物。此外,容器具有放置在其上的描述容器内容物的标签。所述标签还可以包括合适的警告。

[0326] 本发明的化合物的药物制剂可以被制备用于多种给药途径和类型。例如,可以冻干制剂、研磨的粉末或水溶液的形式将具有所需纯度的式 I 或 II 化合物任选地与药学上可接受的稀释剂、载体、赋形剂或稳定剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences(1995)第 18 版, Mack Publ. Co., Easton, PA)。可以在环境温度下,在合适的 pH 下,以所需的纯度将制剂与生理上可接受的载体(即在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的)混合。制剂的 pH 主要取决于化合物的具体用途和浓度,但可以在约 3 至约 8 的范围内。

[0327] 药物制剂优选为无菌的。具体地,用于体内给药的制剂必须是无菌的。这种灭菌可以通过无菌滤膜过滤容易地达成。

[0328] 药物制剂通常可以固体组合物、冻干制剂或水溶液储存。

[0329] 本发明的药物制剂将以与良好医疗实践一致的形式,即量、浓度、方案、进程、溶媒和给药途径给药和给予。本文中所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、个体患者的临床病况、病症的起因、药剂的递送部位、给药方法、给药方案和医学从业者们所已知的其他因素。要给予的化合物的“治疗有效量”将通过这些考虑因素来控制,它是防止、改善或治疗介导病症的凝结因子所需的最小量。这个量优选低于对宿主有毒的量或低于使宿主显著更易出血的量。

[0330] 作为一般的建议,口服或肠胃外给药的每剂量的式 I 或 II 化合物的初始药物有效量在约 0.01-1000mg/kg 的范围内,即,每天约 0.1 至 20mg/kg 患者体重,化合物的通常初始范围为 0.3 至 15mg/kg/天。待给予的式 I 或 II 化合物的剂量和化疗剂的剂量可以各自在每单位剂型约 1mg 至约 1000mg、或每单位剂型约 10mg 至约 100mg 的范围内。式 I 或 II 化

合物和化疗剂的剂量可以按重量计约 1 : 50 至约 50 : 1 的比率或按重量计约 1 : 10 至约 10 : 1 的比率给予。

[0331] 可接受的稀释剂、载体、赋形剂和稳定剂是在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,包括:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;氯化苄烷铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如 EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属复合体(例如, Zn-蛋白复合体);和/或非离子表面活性剂,如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。活性药物成分还可以包括在通过例如凝聚技术或通过界面聚合法制备的微囊中,例如,分别为在胶质药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米粒子和纳米胶囊)或粗乳状液中的羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊。这类技术在 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版,(1995)Mack Publ.Co., Easton, PA 中公开。

[0332] 可以制备式 I 和 II 化合物的缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有式 I 化合物的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质为成形的制品形式,例如膜、或微囊。缓释基质的实例包括:聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸 2-羟基乙酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯 US 3773919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRONDEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林所组成的注射用微球)和聚-D(-)3-羟基丁酸。

[0333] 药物制剂包括适于本文所详述的给药途径的那些。制剂可以方便地以单位剂型存在,并且可以通过药学领域内所熟知的任何方法来制备。技术和制剂一般参见 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版(1995)Mack PublishingCo., Easton, PA。这些方法包括将活性成分与组成一种或多种附加成分的载体结合的步骤。一般地,制剂如下制备:将活性成分与液体载体或微细的固体载体或二者均匀并且紧密的结合,然后,如果需要的话,使制品成型。

[0334] 适于口服给药的式 I 或 II 化合物和/或化疗剂的制剂可以制备为离散单元,如丸剂、硬或软的例如明胶胶囊、扁囊剂、片剂、糖锭、水性或油性悬浮液、可分散粉末或粒剂、乳液、糖浆或酞剂,它们每种都含有预定量的式 I 或 II 化合物和/或化疗剂。式 I 或 II 化合物的量和化疗剂的量可以作为联合制剂配制在丸剂、胶囊、溶液或悬浮液中。可替代地,可以将式 I 或 II 化合物和化疗剂单独配制在丸剂、胶囊、溶液或悬浮液中以供给药。

[0335] 可以根据本领域中用于制备药物组合物的任何已知方法来制备制剂,并且这些组合物可以含有包括下列的一种或多种药剂以提供适口的制剂:增甜剂、调味剂、着色剂和防腐剂。压缩的片剂可以通过在合适的机器中将活性成分以自由流动形式如粉末或颗粒压缩,任选地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂混合来制备。模制的片剂可以通过在合适的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。片剂可任选地被涂覆或刻痕并且可任选地被配制以使活性成分从其中缓慢或

受控地释放。

[0336] 本发明的药物制剂的片剂赋形剂可以包括：填充剂（或稀释剂），以增加组成片剂的粉末药物的总体体积；崩解剂，以在被消化时促使片剂降解为小部分，理想地为单独的药物粒子并且促进药物快速解离和吸收；粘合剂，以确保颗粒和片剂可以所需的机械强度下形成并且在压缩后将片剂聚在一起，防止其在包装、运输和常规操作中降解为其组分粉末；助流剂，以在生产期间改善组成片剂的粉末的流动性；润滑剂，以在生产期间确保片剂粉末不粘附在用于压缩片剂的仪器上。它们在成品片剂从仪器中喷出时通过压力和最小化摩擦和断裂来改善粉末混合物的流动；与助流剂的功能类似，抗粘附剂在制备期间降低组成片剂的粉末和用于弹出片剂形状机器之间的粘附力；掺杂在片剂中的香料给予它们更加舒适的口味或遮蔽不舒适的口味；以及有助于鉴别和患者依从性的着色剂。

[0337] 含有活性成分与适于制备片剂的无毒的药学上可接受的赋形剂混合的片剂是可以接受的。这些赋形剂可以是例如，惰性稀释剂，如碳酸钙或碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；粒化剂和崩解剂，如玉米淀粉或褐藻酸；结合剂，如淀粉、明胶或阿拉伯胶；以及润滑剂，如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可以是未涂覆的或者通过包括微囊化的已知技术涂覆以延缓在胃肠道中的崩解和吸收，从而在较长时期内提供持续作用。例如，可以采用延时材料，如单独的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯或与蜡一起采用。

[0338] 对于眼睛或其他外部组织例如嘴和皮肤的治疗，所述制剂优选以含有活性成分的外敷软膏或乳霜施用，所述活性成分的量例如 0.075 到 20% w/w。当以软膏配制时，活性成分可以与石蜡或水可混溶的软膏基底一起施用。可替代地，活性成分可以与水包油乳霜基底一起配制为乳霜。

[0339] 如果需要，乳霜基底的水相可以包括多元醇，即，具有两个或更多个羟基的醇，如丙二醇、1,3-丁二醇、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。外敷制剂可以期望地包含增强活性成分穿过皮肤或其他受影响区域吸收或渗透的化合物。这种皮肤透性增强剂的实例包括二甲基亚砜和相关的类似物。

[0340] 本发明的乳液的油相由已知的成分以已知的方法构成，包括至少一种乳化剂与脂肪或油或脂肪和油二者的混合物。优选地，包含亲水乳化剂和作为稳定剂的亲脂乳化剂。总之，具有或不具有稳定剂的乳化剂构成乳化蜡，并且该蜡与油和脂肪一起构成了乳化软膏基底，该乳化软膏基底形成乳霜制剂的油性分散相。用于本发明的制剂的乳化剂和乳液稳定剂包括 Tween® 60、Span® 80、鲸蜡硬脂醇、苯醇、肉豆蔻醇、单硬脂酸甘油酯和十二烷基硫酸钠。

[0341] 本发明的药物制剂的水性悬浮液含有与适于制备水性悬浮液的赋形剂混合的化学材料。这类赋形剂包括悬浮剂，如羧甲基纤维素钠、交联甲羧纤维素、聚维酮、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯酮、西黄蓍胶和阿拉伯胶；和分散剂或湿润剂，如天然存在的磷脂（如卵磷脂）、烯炔氧化物与脂肪酸的缩合产物（如聚氧乙烯硬脂酸酯）、环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物（如十七乙烯氧基十六醇）、环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇苷的部分酯的缩合产物（例如聚氧乙烯山梨醇单硬脂酸酯）。水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂，如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯；一种或多种着色剂；一种或多种调味剂和一种或多种增甜剂，如蔗糖或糖精。

[0342] 药物组合物可以为无菌注射制剂，如无菌注射水性或油性悬浮液。这种悬浮液

可以根据已知的技术使用上文所提到的那些合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制。无菌注射制剂可以为无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的溶液或悬浮液,如在 1,3-丁二醇中的溶液;或从冻干粉末制备。在可接受的溶媒和溶剂中可以采用的是水、林格氏(Ringer's)溶液和等渗的氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油通常可以作为溶剂或悬浮介质使用。对于此目的,可以采用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,如油酸的脂肪酸可以同样用于注射制剂的制备。

[0343] 可以与载体材料组合以制备单个剂型的活性成分的量可以依据所治疗的宿主和具体地给药模式变化。例如用于人类口服给药的缓释制剂可以含有与合适和方便量的载体材料混合的约 1 至 1000mg 活性材料,所述载体材料的量可在总组合物的约 5 至约 95% 之间变化(重量:重量)。可以配制药组合物以提供容易测量的给药量。例如,用于静脉内输注的水溶液可以含有每毫升溶液约 3 至 500 μg 的活性成分以便可以约 30mL/hr 的速率进行合适量的输注。

[0344] 适于肠胃外给药的制剂包括水性和非水性无菌注射溶液,它可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,它可以包括悬浮剂和增稠剂。

[0345] 适于外敷给予到眼睛的制剂还包括滴眼液,其中活性成分溶解或悬浮在合适的载体中,尤其是活性成分的水性溶剂。活性成分优选以约 0.5 至 20% w/w,例如约 0.5 至 10% w/w,例如约 1.5% w/w 的浓度存在于这类制剂中。

[0346] 适于在口中外敷施用的制剂包括:糖锭,其包含在通常为蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶的调味基质中的活性成分;含剂,其包含在如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶的惰性基质中的活性成分;和漱口剂,其包含在合适的液体载体中的活性成分。

[0347] 用于直肠给药的制剂可以具有合适的基质的栓剂存在,所述合适的基质包括:例如可可脂或水杨酸酯。

[0348] 适于肺内或经鼻给药的制剂具有例如 0.1 至 500 微米的范围内的粒径(包括在 0.1 至 500 微米范围内以如下微米数增加的粒径,如 0.5、1、30 微米、35 微米等),这种制剂通过鼻道快速吸入或通过口吸入给药以到达肺囊泡。合适的制剂包括活性成分的水性或油性溶液。适于气雾剂或干粉给药的制剂可以根据常规方法制备,并且可以与其他治疗剂如以前用于治疗或预防下文所述的病症的化合物一起递送。

[0349] 适于阴道给药的制剂可以作为阴道栓剂、塞剂、乳霜、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾剂形式存在,其除了活性成分之外,还含有如本领域所已知的适当的载体。

[0350] 制剂可以包装在单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可以储存在冷冻干燥(冻干)的条件下,仅需要添加无菌液体载体,例如水以便在即将使用之前注射。临时的注射溶液和悬浮液由上文所述的种类的无菌粉末、颗粒或片剂制备。优选的单位剂型制剂为含有如上文所述的日剂量或单位亚日剂量或它们的合适部分的活性成分的那些。

[0351] 本发明还提供包含至少一种上面所定义的活性成分与兽医载体的兽医组合物。兽医载体为可用于给予组合物目的的材料,并且可以为固体、液体或气体材料,它们或者可以是兽医领域内惰性的和可接受的,并与所述活性成分相容。这些兽医组合物可以肠胃外、口服或通过任何其他所需途径给药。

[0352] 联合治疗

[0353] 式 I 和 II 化合物可以与其他化疗剂联合使用以治疗高增殖性疾病或病症,包括肿瘤、癌症、新生瘤组织以及恶化前和非瘤或非恶性高增殖性病症。在某些实施方式中,式 I 或 II 化合物在药物联合制剂、或在作为联合治疗的给药方案中与具有抗高增殖性特性或用于治疗高增殖性病症的第二化合物联合。药物联合制剂或给药方案的第二化合物优选具有式 I 或 II 化合物的补充活性从而使得它们不会互相不利地影响。这些化合物可以对预期目的有效的量给予。在一个实施方式中,本发明的药物制剂包含式 I 或 II 化合物,或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂合物、代谢物或药学上可接受的盐与如本文所述的化疗剂的联合。在另一个实施方式中,治疗剂联合通过如下的给药方案给予,其中以每天两次至每三周一次 (q3wk) 的范围给予具有式 I 或 II 的治疗有效量的化合物,并且以每天 2 次至每 3 周一次的范围给予治疗有效量的化疗剂。

[0354] 本发明的治疗剂联合包括包含作为联合制剂的具有式 I 或 II 的化合物和选自下列的化疗剂的产品:厄洛替尼、多西他赛、5-FU、吉西他滨、PD-0325901、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、Akti-1/2、HPPD、雷帕霉素和拉帕替尼,它们单独、同时或相继使用以治疗高增殖性病症。

[0355] 联合治疗可以作为同时或连续方案给予。当连续给予时,所述联合可以两次或更多次给药来给予。联合给药包括使用单独的制剂或单个药物制剂共同给药;和任一顺序的连续给药,其中优选具有时间间隔使得两种(或所有)活性剂同时发挥它们的生物活性。

[0356] 任何上述共同给药的药剂的合适剂量为目前所用的剂量或由于新鉴定的药剂与其他化疗剂或治疗例如增加治疗指数或减轻毒性或其他副作用或后果的联合作用(协同作用)而为更低的剂量。

[0357] 在抗癌治疗的具体实施方式中,式 I 或 II 化合物或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂合物、代谢何物或药学上可接受的盐可以与化疗剂联合,所述化疗剂包括激素或抗体剂,如本文所述的那些,以及与手术治疗和放疗联合。因此,根据本发明的联合治疗包括给予至少一种式 I 或 II 化合物或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂合物、代谢物或药学上可接受的盐以及至少一种其他癌症治疗方法的使用。式 I 或 II 化合物和其他药物活性化疗剂的量以及相对的给药时间将为了达到所需的联合治疗效果而选择。

[0358] 药物组合物的给药

[0359] 本发明的化合物可以通过适于待治疗的病况的任何途径给药。合适的途径包括口服、肠胃外(包括皮下、肌内、静脉内、动脉内、吸入、皮内、鞘内、硬膜外和输注技术)、经皮、经直肠、经鼻、局部(包括含服和舌下)、阴道、腹膜内、肺内和鼻内。局部给药还可以包括经皮给药的使用如透皮贴剂或离子透入技术。药物制剂在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA 中讨论。药物制剂的其他实例可参见 Liberman, H. A. 和 Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, MarcelDecker, 第 3 卷, 第 2 版, New York, NY。对于局部的免疫抑制治疗,可以通过病灶部位内给药来给予所述化合物,包括灌注或以其他方式在移植前接触具有抑制剂的植入物。应了解优选的途径可以随例如接受者的病况而变化。当口服给予化合物时,它可以与药学上可接受的载体、助流剂或赋形剂一起配制为丸剂、胶囊、片剂等。当肠胃外给予化合物时,它

可以与药学上可接受的肠胃外溶媒或稀释剂以单位剂量注射形式配制,如下文详细说明。

[0360] 治疗人患者的剂量可以在约 10mg 至约 1000mg 式 I 或 II 化合物的范围内。通常的剂量为约 100mg 至约 300mg 的化合物。剂量可以一天一次 (QD)、每天两次 (BID) 或更频繁地给予,这取决于具体化合物的药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 特性,包括稀释、分散、代谢和排泄。此外,毒性因素可能影响剂量和给药剂量方案。当口服给予时,丸剂、胶囊或片剂可以每天两次、每天一次或更低频率如一段指定的时间内每周一次或每两周或三周一次。该方案可以重复以进行多次治疗循环。

[0361] 治疗方法

[0362] (1) 式 I 或 II 化合物与 (2) 化疗剂的治疗剂联合用于治疗包括但不限于特征为 PI3 激酶通路激活的那些疾病、病况和 / 或病症。因此,本发明的另一方面包括治疗可以通过抑制包括 PI3 的脂激酶治疗的疾病或病况的方法。在一个实施方式中,所述方法包括给予需要其的哺乳动物治疗有效量的式 I 或 II 化合物或它们的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂合物、代谢物或药学上可接受的盐。(1) 式 I 或 II 化合物与 (2) 化疗剂的治疗剂联合可用于治疗包括下列的高增殖性疾病或病症:肿瘤、癌症、瘤组织;以及恶化前和非瘤或非恶性高增殖性病况。在一个实施方式中,用治疗剂联合和药学上可接受的载体、辅料或溶媒治疗人患者,其中所述治疗剂联合中式 I 或 II 化合物或其代谢物以可检测地抑制 PI3 激酶活性的量存在。

[0363] 可以根据本发明的方法治疗的癌症包括但不限于:乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、生殖泌尿道癌症、食管癌、喉癌、胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、胃癌、皮肤癌、角化棘皮瘤、肺癌、表皮样癌、大细胞癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、小细胞癌、肺腺癌、骨癌、结肠癌、腺瘤、胰腺癌、腺癌、甲状腺癌、滤泡性癌、未分化的癌、乳头状癌、精原细胞瘤、黑素瘤、肉瘤、膀胱癌、肝癌和胆道癌、肾癌、骨髓病症、淋巴病症、毛细胞癌、口腔和咽 (口) 癌、唇部癌症、舌部癌症、口部癌症、咽癌、小肠癌、结肠 - 直肠癌、大肠癌、直肠癌、脑和中枢神经系统癌、霍奇金斯 (Hodgkin) 病和白血病。

[0364] 本发明的另一方面提供用于在哺乳动物如人中治疗本文所述的疾病或病况的药物组合物或治疗剂联合,所述人类患有此类疾病或病况。还提供了药物组合物在制备用于在患本文所述的病症的温血动物,如诸如人的哺乳动物中治疗此类疾病和病况中的药物的用途。

[0365] 式 I 和 II 化合物的代谢物

[0366] 还在本发明范围内的是本文所述的式 I 和 II 的体内代谢产物。这些产物可以从例如所给予的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、脱酯化、酶裂解等得到。因此,本发明包括式 I 和 II 化合物的代谢物,其包括通过包括下列步骤的方法所产生的化合物:使本发明的化合物与哺乳动物接触一段足以产生其代谢产物的时间。

[0367] 通常通过下列步骤来鉴定代谢产物:制备本发明化合物放射性标记 (例如,¹⁴C 或 ³H) 同位素;将其以可检测的剂量 (例如大于约 0.5mg/kg) 肠胃外给予动物,如大鼠、小鼠、豚鼠、猴或人,容许有足够的时间以发生代谢 (通常约 30 秒至 30 小时);从尿、血液或其他生物样品中分离其转化产物。这些产物因其被标记而容易分离 (其它的是通过使用能够结合在代谢物中保留的表位的抗体分离)。以常规方式,例如通过 MS、LC/MS 或 NMR 分析测定代谢物的结构。一般来说,代谢物的分析以与本领域的那些技术人员所熟知的常规药物代

谢研究相同的方法进行。代谢产物,只要它们不是在体内另外发现的便可用于本发明化合物治疗剂给药的诊断测定。

[0368] 加工制品

[0369] 在本发明的另一实施方式中,提供可用于治疗上文所述的疾病和病症的含有式 I 和 II 化合物的加工制品或“试剂盒”。在一个实施方式中,试剂盒包含含有式 I 化合物、或其立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂合物、代谢物或药学上可接受的盐的容器。试剂盒还可以包括在容器上或与容器结合的标签或包装说明书。术语“包装说明书”用于指通常在治疗产品的商业包装中所包括的说明书,它含有关于此治疗产品的适应症、用途、剂量、给药、禁忌症和 / 或警告的信息。合适的容器包括:例如,瓶子、小瓶、注射器、泡罩包装等。该容器可以由如玻璃或塑料的多种材料形成。容器可以容纳式 I 或 II 化合物或其有效用于治疗病况的制剂,并且可以具有无菌接触口(例如,容器可以为静脉内溶液袋或具有皮下注射针头穿透的塞子的小瓶)。组合物中至少一种活性剂为式 I 或 II 的化合物。标签或包装说明书指示组合物用于治疗选择的疾病,如癌症。在一个实施方式中,所述标签或包装说明书指示包含式 I 或 II 的化合物可用于治疗由异常细胞生长引起的病症。所述标签或包装说明书还可以指示组合物可用于治疗其他病症。可选择地或另外的,加工制品还可以包含第二容器,该第二容器包含药学上可接受的缓冲液,如用于注射的抑菌水 (BWFI)、磷酸盐缓冲液、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它还可以包括商业和用户的立场上所希望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0370] 试剂盒还可以包含式 I 或 II 的化合物和如果存在的话的第二药物制剂的给药说明。例如,如果该试剂盒包含含有式 I 或 II 化合物的第一组合物和第二药物制剂,则试剂盒还可以包含将第一和第二药物组合物同时、相继或单独给予需要其的患者的说明。

[0371] 在另一实施方式中,所述试剂盒适于化合物 I 或 II 的固体口服形式递送,如片剂或胶囊。这种试剂盒优选包括大量单位剂型。这种试剂盒可以包括卡片,该卡片具有以预期用途的顺序定位的剂量。这类试剂盒的一个实例是“泡罩包装”。泡罩包装是包装业内所熟知的并且广泛用于包装药物的单位剂型。如果需要,可以提供记忆帮助,例如,以数字、字母或其他标志的形式或用日历说明书指明治疗方案中可以给予剂量的日期。

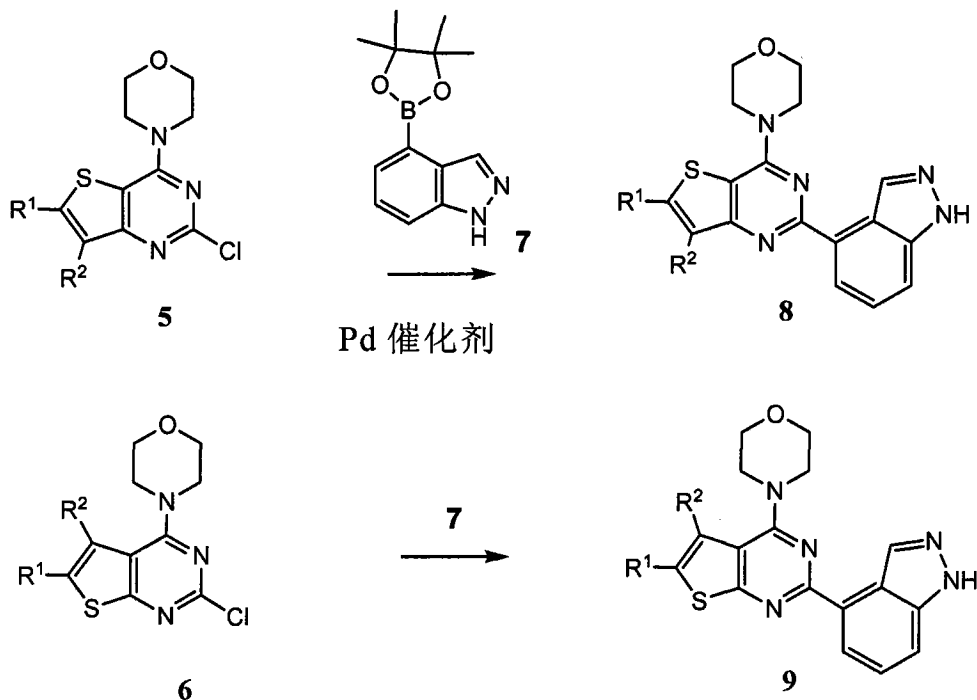
[0372] 根据一个实施方式,试剂盒可以包含 (a) 具有包含在其中的式 I 或 II 化合物的第一容器;以及任选的 (b) 具有包含在其中的第二药物制剂的第二容器,其中所述第二药物制剂包含具有抗高增殖活性的第二化合物。可选择地或另外的,该试剂盒还可以包含第三容器,该第三容器包含药学上可接受的缓冲液,如用于注射的抑菌水 (BWFI)、磷酸盐缓冲液、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它还可以包括商业和用户的立场上所希望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0373] 当所述试剂盒包含式 I 或 II 的组合物和第二治疗剂即化疗剂时,该试剂盒可以包含用于容纳单独的组分的容器,例如分开的瓶子或分开的箔盒,然而单独的组合物还可以包含在单个未分开的容器中。通常,所述试剂盒包含单独组分给药的说明。当单独的组分优选以不同的剂型(例如,口服和肠胃外)给予、以不同的剂量间隔给予、或在治疗医师希望滴定联合的单个组分时,该试剂盒形式是尤为有利的。

[0374] 一般制备程序

[0375] 一般程序 A-1 Suzuki 偶联:

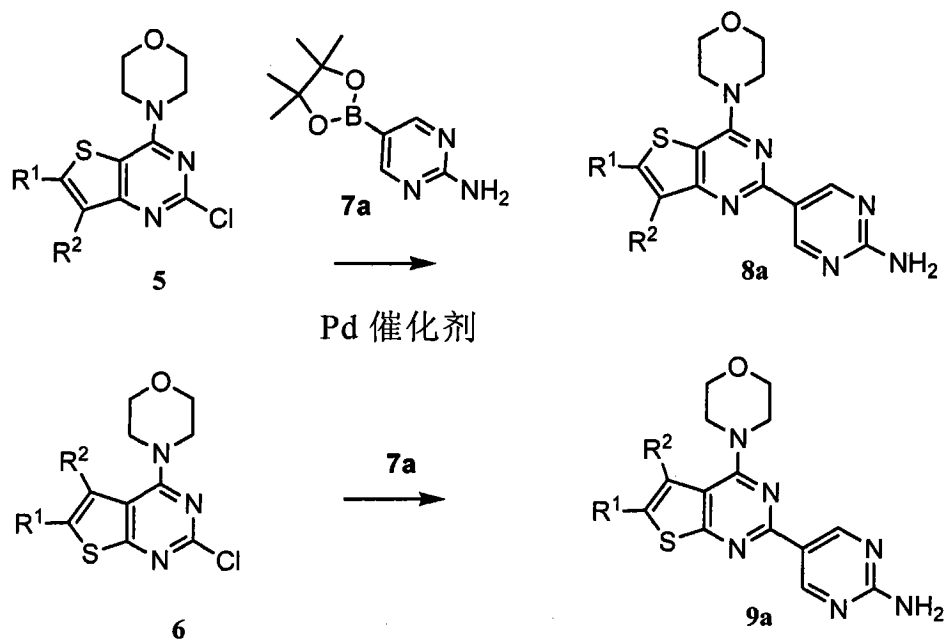
[0376]



[0377] Suzuki 型偶联反应用于在嘧啶环的 2- 位连接耦合的二环杂环或杂芳基 (参见方案 4)。一般来说,可以将取代的 2-氯-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶 5 或取代的 2-氯-4-吗啉代噻吩并 [2,3-d] 嘧啶 6 与 1.5 当量的 4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)1H-吡唑 7 混合,并溶解在与乙腈等体积的 3 当量的碳酸钠的 1 摩尔水溶液中。添加催化量的或更多的低价钯试剂,如双(三苯基膦)二氯化钯 (II)。可以使用多种硼酸或硼酯代替所指出的吡唑硼酯。还可选择地,可以保护吡唑的氮,例如用四氢吡喃基基团。参见化合物 40。在一些情况下,使用醋酸钾代替碳酸钠来调节水层的 pH。然后在 Biotage Optimizer 微波反应器 (Biotage, Inc.) 中将反应在压力下加热至约 140-150°C 达 10 至 30 分钟。用乙酸乙酯或另一有机溶剂萃取内容物。蒸发有机层,然后可以在二氧化硅上或通过反相 HPLC 纯化产物 8 或 9。

[0378] 一般程序 A-2 Suzuki 偶联:

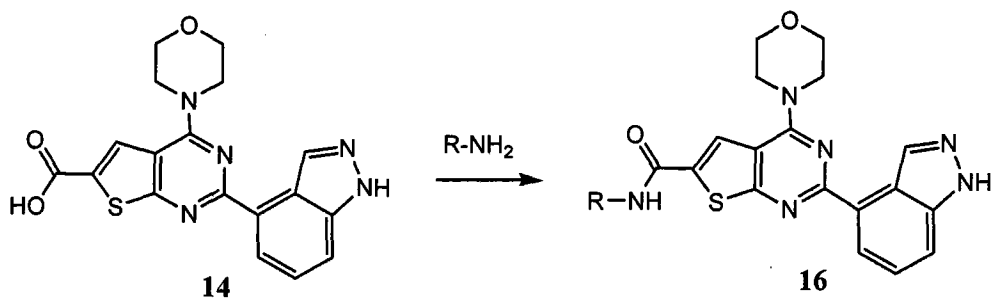
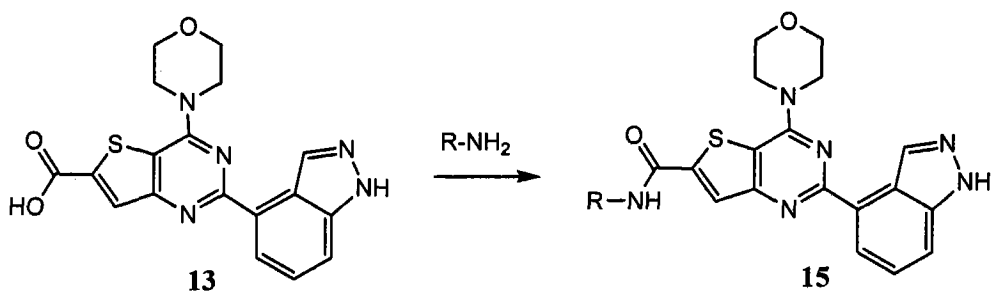
[0379]



[0380] Suzuki 型偶联反应可用于在嘧啶环的 2- 位连接单环杂芳基 (参见方案 4)。一般来说, 可以将取代的 2- 氯 -4- 吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶 5 或取代的 2- 氯 -4- 吗啉代噻吩并 [2,3-d] 嘧啶 6 与 1.5 当量的 5-(4,4,5,5- 四甲基 -1,3,2- 二氧杂环戊硼烷 -2- 基) 嘧啶 -2- 胺 7a 混合, 并溶解在与乙腈等体积的 3 当量的碳酸钠或碳酸钾的 1 摩尔水溶液中。添加催化量的或更多的低价钯试剂, 如双 (三苯基膦) 二氯化钯 (II)。可以使用多种硼酸或硼酯代替所指出的吡啶硼酯。还可选择地, 可以保护嘧啶 -2- 胺的氮, 例如用四氢吡喃基团。在一些情况下, 使用醋酸钾代替碳酸钠来调节水层的 pH。然后在 Biotage Optimizer 微波反应器 (Biotage, Inc.) 中将反应在压力下加热例如至约 100-150°C 达 10 至 30 分钟。用乙酸乙酯或另一有机溶剂萃取内容物。蒸发有机层, 然后可以在二氧化硅上或通过反相 HPLC 纯化产物 8a 或 9a。

[0381] 一般程序 B 酰胺偶联:

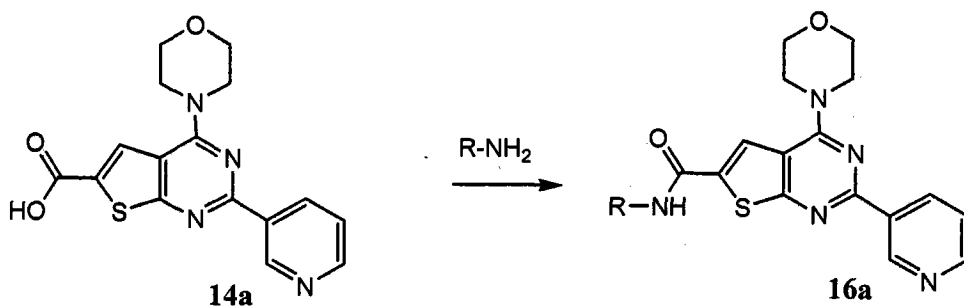
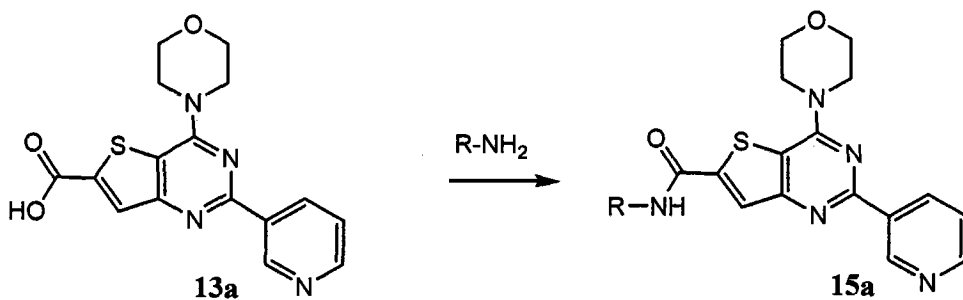
[0382]



[0383] 用在 DMF 中的 1.5eq HATU、3eq 烷基胺和 3eq DIPEA 处理 2-(1H-吡唑-4-基)-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-羧酸 13 或 2-(1H-吡唑-4-基)-4-吗啉代噻吩并 [2,3-d] 嘧啶-6-羧酸 14 至约 0.1M 的浓度。搅拌反应直到反应完全,在具有饱和的碳酸氢盐溶液的乙酸乙酯中萃取一次。干燥有机层,过滤并将其浓缩以产生粗中间体。经由反相 HPLC 纯化该中间体以产生产物 15 或 16。

[0384] 一般方案 B-1 酰胺偶联:

[0385]

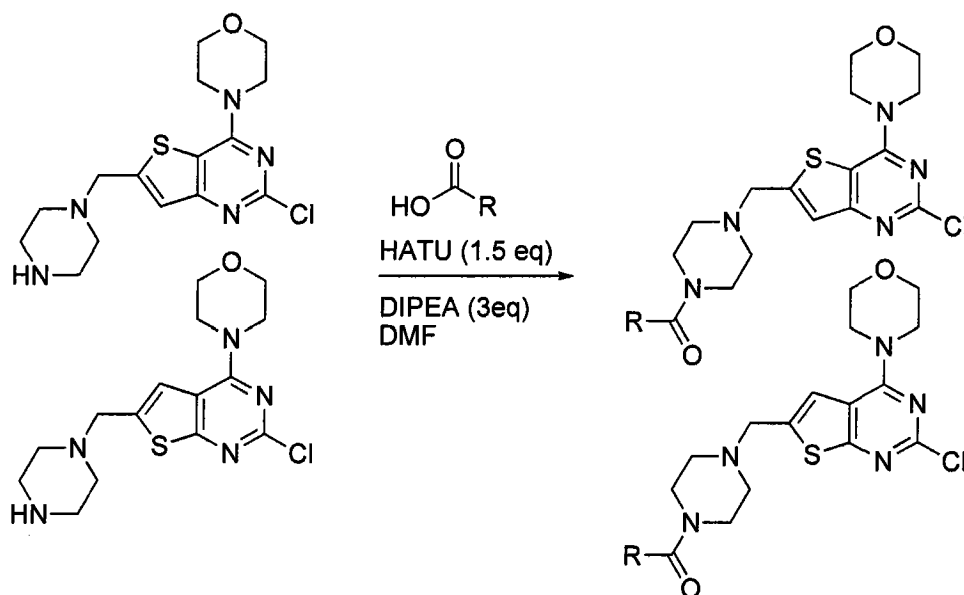


[0386] 用在 DMF 中的 1.5eq HATU、3eq 烷基胺 ($R-NH_2$) 和 3eq DIPEA 处理 4-吗啉代-2-(嘧啶-3-基)噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-羧酸 13a 或 4-吗啉代-2-(嘧啶-3-基)噻吩并 [2,3-d] 嘧啶-6-羧酸 14a 至约 0.1M 的浓度。搅拌反应直到反应完全,在具有饱和的碳酸氢

盐溶液的乙酸乙酯中萃取一次。干燥有机层,过滤并将其浓缩以产生粗中间体。经由反相 HPLC 纯化该中间体以产生产物 15a 或 16a。

[0387] 一般方案 B-2 酰胺偶联:

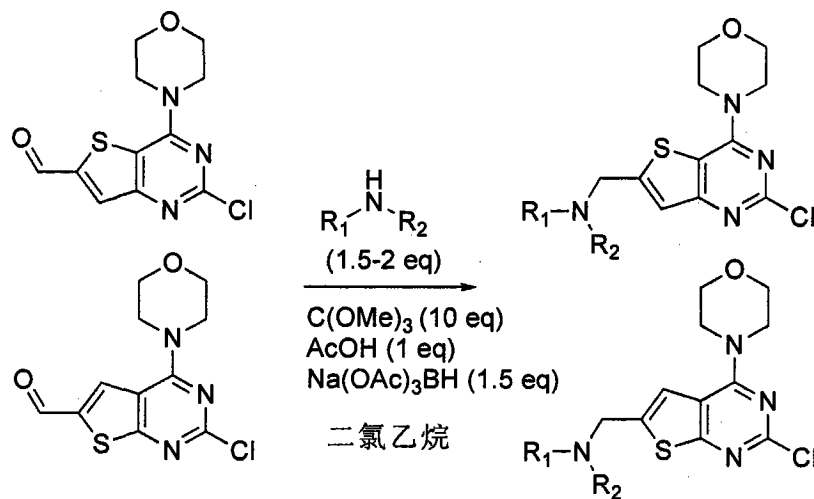
[0388]



[0389] 用在 DMF 中的 1.5eq HATU、3eq 羧酸 (RCO₂H) 和 3eq DIPEA 处理 2-氯-4-吗啉代-6-((哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶或 2-氯-4-吗啉代-6-((哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[2,3-d]嘧啶至约 0.1M 的浓度。搅拌反应直到反应完全,在具有饱和的碳酸氢盐的乙酸乙酯中萃取一次。干燥有机层,过滤并将其浓缩以产生粗中间体。

[0390] 一般方案 B-3 还原氨基化:

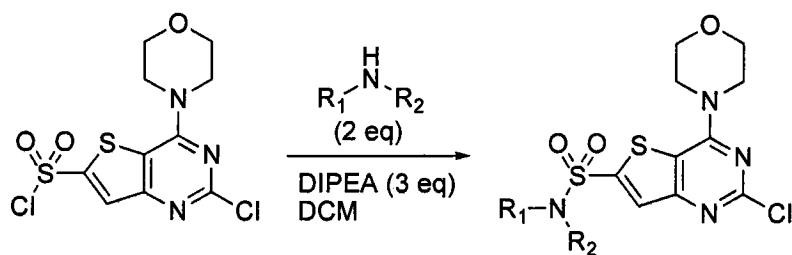
[0391]



[0392] 将 2-氯-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 10 或 2-氯-4-吗啉代噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-甲醛 33 以 0.2M 的浓度溶解在二氯乙烷中。添加 1.5 至 2.0 当量的胺 (R¹R²NH)、10 当量的原甲酸三甲酯和 1 当量的乙酸添加至该溶液中。容许混合物搅拌 2-6 小时,然后添加 1.5 当量的三乙酰氧基硼氢化钠。12 至 16 小时的搅拌后,将反应物倾倒至饱和的碳酸氢钠中并用乙酸乙酯萃取几次以得到还原氨化中间体,将该中间体在二氧化硅胶上纯化或者以粗制物用于下一反应。

[0393] 一般程序 C 磺酰胺形成：

[0394]



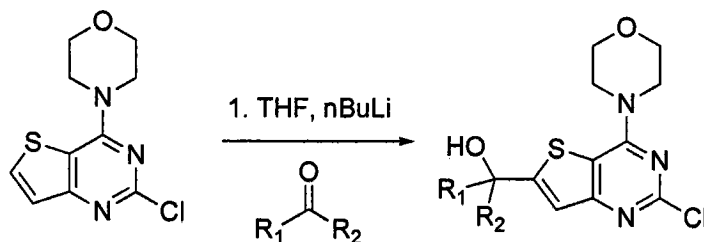
17

18

[0395] 将 2-氯-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-磺酰基氯化物 17 悬浮在 1mL 的 DCM 中,然后添加 2eq 的胺和 3eq 的 DIPEA。通过 LCMS 监测反应直到反应完全。用乙酸乙酯稀释粗反应混合物,用饱和氯化铵萃取并用乙酸乙酯反萃取一次。合并有机层并浓缩至干燥。将粗磺酰胺中间体 18 直接用于随后的 Suzuki 偶联中。

[0396] 一般程序 D醇合成

[0397]



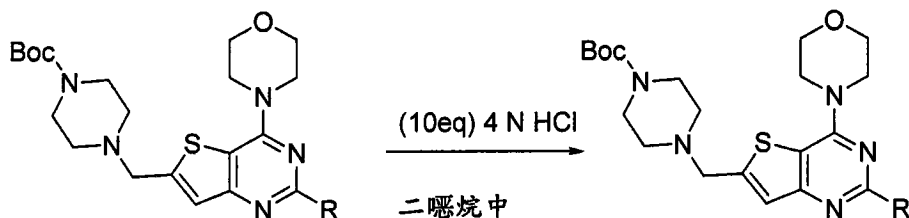
4

12

[0398] 将 2-氯-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶 4 在 THF 中悬浮至浓度为 0.2 摩尔并在干冰/乙腈浴中冷却至 -50°C ,然后添加 2 当量在己烷中的 2.5M nBuLi。15 分钟后,将 3.0 摩尔当量的环酮或非环酮添加到该溶液中。在 -50°C 下继续搅拌反应 1h,然后在多数情况下使其回复至 0°C 。当通过 TLC 或质谱完成该反应后,将其在饱和的氯化铵溶液中淬灭并用 EtOAc 萃取两次。浓缩有机层,将其作为粗混合物使用,或在二氧化硅上纯化,可以将产物 12 溶解在最少量的乙腈中并且过滤以去除剩余的起始材料 4。

[0399] 一般程序 E 叔丁氧基羰基 (Boc) 基团的移除

[0400]

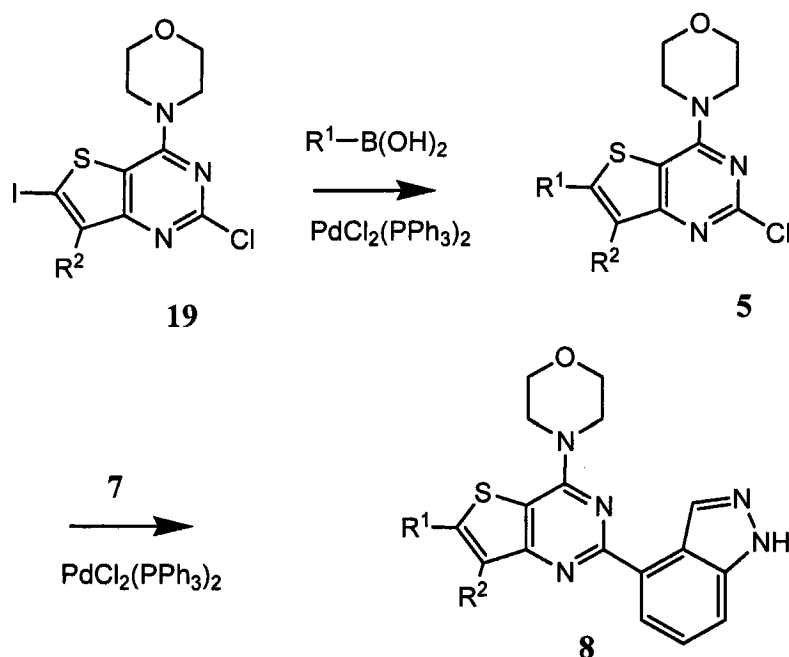


Δ

[0401] 将在二噁烷中具有或不具有二氯甲烷作为助溶剂的 10 或更多当量的 4NHCl 添加至起始材料中(一般程序在上文显示,但是也使用类似的框架)。有时需要加热至 40°C 几小时以移除 Boc 基团。浓缩反应物至干燥,可以将其以粗制物用于随后的反应中。

[0402] 一般程序 F 在一个坩埚中的 Suzuki 偶联反应

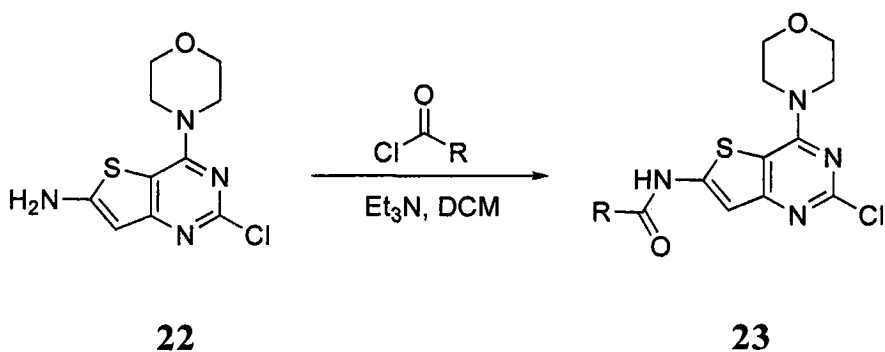
[0403]



[0404] 将在 1M Na_2CO_3 水溶液 (3eq) 和乙腈 (3eq) 中的 2-氯-6-碘-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶 19 (1eq)、苯基硼酸或杂环硼酸 ($\text{R}^1\text{-B(OH)}_2$, 1.1eq) 和双(三苯基膦)二氯化钯 (II) (0.1eq) 在密封的微波反应器中加热至 100°C 达 10 至 40 分钟以得到 5。完成后,将 4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-咪唑 7 (1.3eq) 和双(三苯基膦)二氯化钯 (II) (0.1eq) 添加到同一坩埚中。将反应混合物在密封的微波反应器中加热至 150°C 达 10 至 15 分钟。用乙酸乙酯萃取混合物 ($3 \times 5\text{mL}$)。浓缩合并的有机层以产生粗制物 8。

[0405] 一般程序 G 酰胺偶联反应

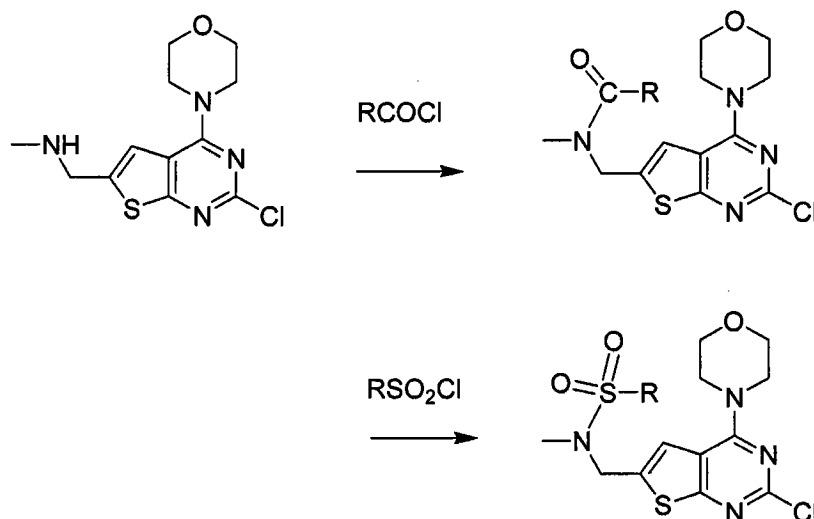
[0406]



[0407] 搅拌在二氯甲烷中的 2-氯-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-胺 22 (1eq)、酰基氯 ($1.5 \sim 2\text{eq}$) 和三乙胺 (2eq)。通过 LC/MS 监测反应直到反应完全。蒸发该混合物以得到粗酰胺 23, 其不经纯化而直接用于下一步反应。

[0408] 一般程序 H 乙酰胺、苯甲脒和磺酰胺的制备

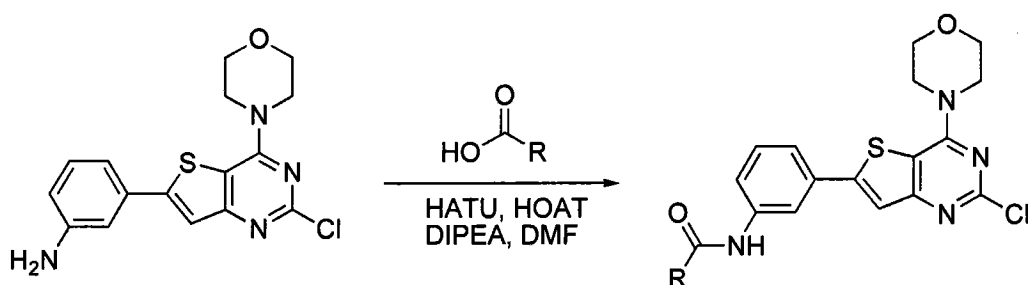
[0409]



[0410] 将 1.5eq. TEA 添加至冷却至 0°C 的在 DCM 中的 0.25 至 0.40M 1-(2-氯-4-吗啉代噻吩并 [2,3-d] 嘧啶-6-基)-N-甲基甲烷胺溶液中, 然后逐滴添加在 DCM 中稀释的 1.0 至 1.5eq 的烷基或芳基-酰基氯或磺酰氯。在环境温度下搅拌反应并通过 LCMS 监测其完成。完成后, 用 DCM 增加反应体积, 并将稀水性碳酸氢钠添加到该溶液中。分离有机层和水层。最后, 用盐水洗涤有机层并干燥 (MgSO₄)。在真空中浓缩干燥的有机溶液并且需要时通过二氧化硅色谱纯化产物。

[0411] 一般程序 I 苯胺的酰胺偶联反应

[0412]



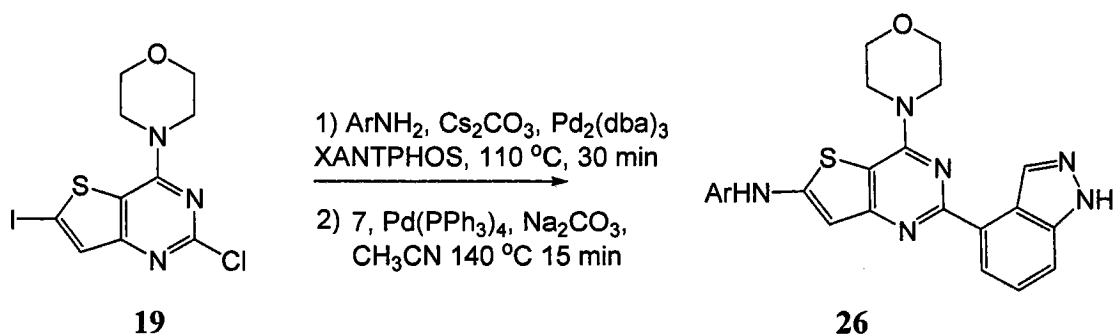
24

25

[0413] 在室温下搅拌在 DMF 中的 3-(2-氯-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-基) 苯胺 24(1eq)、羧酸 (1.5eq)、1-羟基-7-氮杂苯并三唑 (0.2eq)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-(N, N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (HATU, 1.5eq)、和 N, N-二异丙基乙胺 (2.5eq)。通过 LC/MS 监测反应直到反应完全。用乙酸乙酯稀释反应混合物, 用饱和碳酸氢钠和盐水洗涤。在 MgSO₄ 上干燥有机层, 过滤并蒸发以产生酰胺产物 25。

[0414] 一般程序 J 6-碘取代和 2-Suzuki 偶联

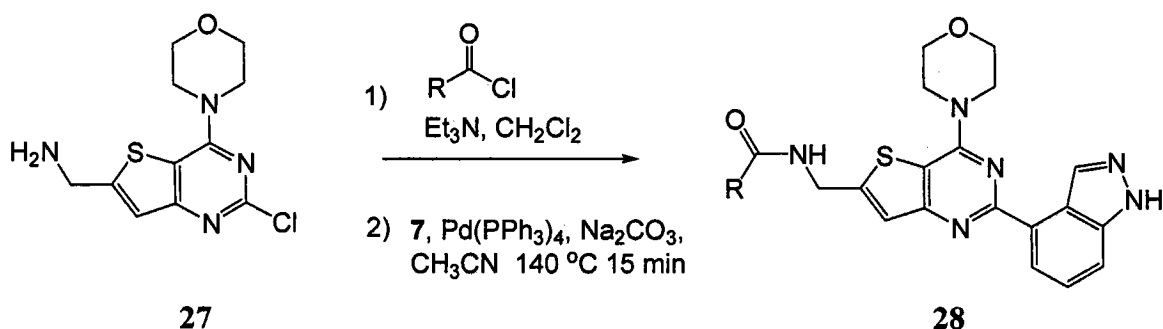
[0415]



[0416] 添加合适的苯胺 (200mol %)、Cs₂CO₃ (50mol %)、Pd₂(dba)₃ (5mol %) 和 XANTPHOS (10mol %) 至在 DMF (1.00mL) 中的 2-氯-6-碘-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶 19 (0.05g, 0.13mmol) 溶液中。将反应物在 Biotage optimizer 微波反应器中在压力下加热至 110°C 达 30 分钟。在真空中浓缩所得溶液以得到 26, 然后进行一般程序 A。

[0417] 一般程序 K 6-氨基烷基酰化和 2-Suzuki 偶联

[0418]

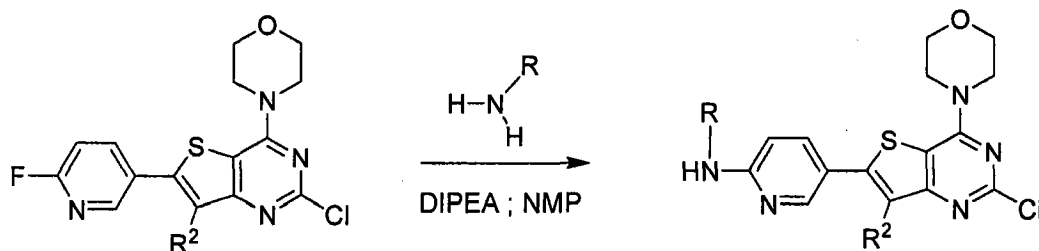


[0419] 添加 Et₃N (84 μL, 0.6mmol) 和合适的酰基氯或其盐酸盐 (0.3mmol) 至在 CH₂Cl₂ (4mL) 中的 (2-氯-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-基) 甲烷胺 27 (50mg, 0.2mmol) 溶液中。在室温下搅拌反应物 18-48hr, 然后用水淬灭。用 EtOAc 萃取水层。在 Na₂SO₄ 上干燥合并的有机相并在真空中浓缩。根据一般程序 A 将 2-氯代粗产物与硼酸盐试剂 7 和钯催化剂偶联以得到 28, 其通过反相 HPLC 纯化来纯化。

[0420] 可选择地, 添加 2,6-二甲基吡啶 (48.2 μL, 0.41mmol) 和合适的酰基氯或其盐酸盐 (0.39mmol) 至在 DMF (5mL) 中的 (2-氯-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-基) 甲烷胺 27 (111mg, 0.39mmol) 溶液中。在室温下搅拌反应物 18-72 小时, 然后用水淬灭。用 EtOAc 萃取水层。在 MgSO₄ 上干燥合并的有机相并在真空中浓缩。根据一般程序 A 将 2-氯代粗产物与硼酸盐试剂 7 和钯催化剂偶联以得到 20mg 的 28, 其通过反相 HPLC 纯化来纯化。

[0421] 一般程序 L 氟吡啶上的酰胺取代

[0422]



[0423] 将 2-氯-6-(6-氟吡啶-3-基)-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶或 2-氯-6-(6-氟

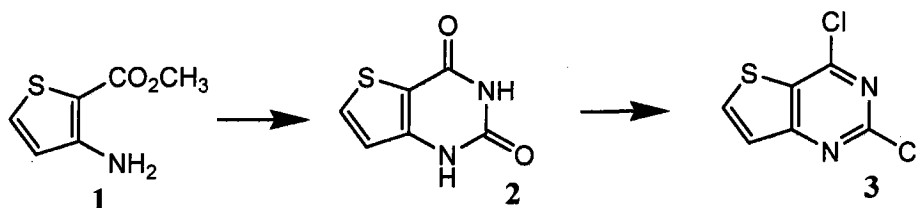
吡啶-3-基)-4-吗啉代噻吩并[2,3-d]嘧啶化合物、约4当量的伯胺或仲胺(R = H、C₁-C₁₂烷基、C₂-C₈烯基、C₂-C₈炔基、C₃-C₁₂碳环基、C₂-C₂₀杂环基、C₆-C₂₀芳基或C₁-C₂₀杂芳基)以及约2eq.的二异丙基乙胺在N-甲基吡咯烷(约0.1M)中的混合物在密封的微波反应器中加热至约130-140°C达10~40分钟,然后在高真空下移除挥发物。通过快速色谱法纯化粗混合物以得到中间体2-氯-6-(6-氨基吡啶-3-基)-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶或2-氯-6-(6-氨基吡啶-3-基)-4-吗啉代噻吩并[2,3-d]嘧啶化合物,可以根据一般程序A将该化合物与单环杂芳基、稠合的二环杂环或杂芳基硼酸酯化合物偶联。

[0424] 实施例

[0425] 为了示例本发明,包括了下列实施例。然而,应了解这些实施例不限制本发明,其仅意味着建议了实施本发明的一种方法。本领域的技术人员应认识到可以容易地修改所描述的化学反应以制备大量本发明的其他PI3K抑制剂,制备本发明化合物的替代性方法也认为是在本发明的范围内。例如,可以通过对本领域的技术人员来说明显的修改来成功地进行根据本发明的非示例性化合物的合成,例如通过合适的保护干扰基团、通过利用所述那些试剂之外的本领域内已知的其他合适的试剂、和/或进行反应条件的常规改变。可选择地,本文所公开的其他反应或本领域已知的反应应认为是适用于制备本发明的其他化合物。

[0426] 实施例1:2,4-二氯-噻吩并[3,2-d]嘧啶3

[0427]

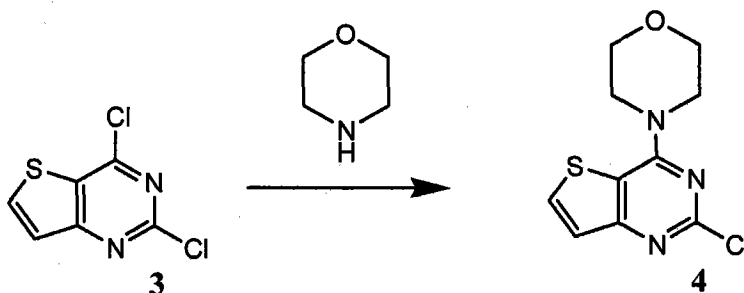


[0428] 将3-氨基-2-噻吩羧酸甲酯1(13.48g,85.85mmol)和脲(29.75g,5eq.)的混合物在190°C下加热2小时。将热反应混合物倒在氢氧化钠溶液上并且通过过滤移除任何不可溶的物质。然后将混合物酸化(HCl,2N)以产生白色沉淀1H-噻吩并[3,2-d]嘧啶-2,4-二酮2,该白色沉淀通过过滤收集并进行空气干燥(9.49g,66%)。¹H NMR(400MHz, d₆-DMSO)6.90(1H, d, J = 5.2Hz),8.10(1H, d, J = 5.2Hz),11.60-11.10(2H, br s)。

[0429] 将1H-噻吩并[3,2-d]嘧啶-2,4-二酮2(9.49g,56.49mmol)和磷酰氯(phosphorous oxychloride)(150mL)的混合物回流加热6h。然后冷却反应混合物并且边剧烈搅拌边倒在冰/水上,产生沉淀。然后过滤混合物以产生白色固体2,4-二氯-噻吩并[3,2-d]嘧啶3(8.68g,75%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃)7.56(1H, d, J = 5.5Hz),8.13(1H, d, J = 5.5Hz)。

[0430] 实施例2:2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶4

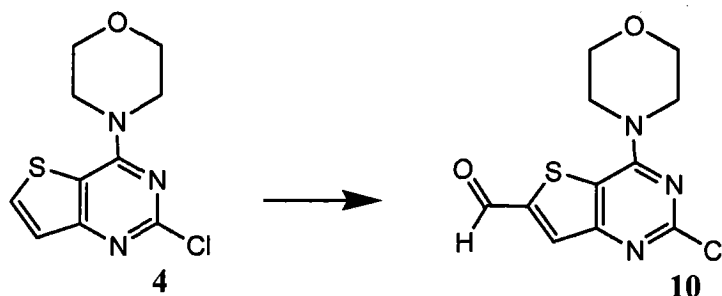
[0431]



[0432] 将2,4-二氯-噻吩并[3,2-d]嘧啶3 (8.68g, 42.34mmol)、吗啉 (8.11mL, 2.2eq.) 和 MeOH(150mL) 的混合物在室温下搅拌 1h。过滤反应混合物,用水和 MeOH 洗涤以产生白色固体 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶4(11.04g, 100%)。¹H NMR 400MHz, d₆-DMSO) 3.74(4H, t, J = 4.9Hz), 3.90(4H, t, J = 4.9Hz), 7.40(1H, d, J = 5.6Hz), 8.30(1H, d, J = 5.6Hz)。

[0433] 实施例 3: 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 10

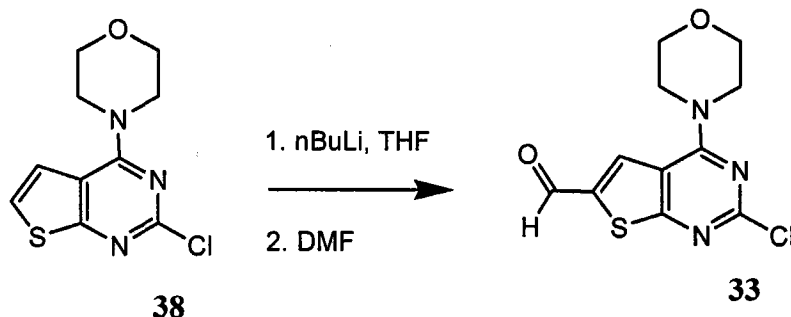
[0434]



[0435] 添加在己烷 (3.3mL, 1.2eq.) 中的 2.5M 正丁基锂 (nBuLi) 溶液至 -78 °C 的 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶4(1.75g, 6.85mmol) 在干 THF(40mL) 中的悬浮液中。搅拌 1h, 然后添加干 DMF (796 μL, 1.5eq.)。在 -78 °C 下搅拌反应混合物 1h, 然后缓慢升温至室温。在室温下 2h 后, 将反应混合物倒在冰 / 水上, 产生黄色沉淀。通过过滤收集该黄色沉淀并进行空气干燥以产生 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 10(1.50g, 77%)。¹H NMR-400MHz, d₆-DMSO) 3.76(4H, t, J = 4.9), 3.95(4H, t, J = 4.9), 8.28(1H, s), 10.20(1H, s)。

[0436] 实施例 3a 2-氯-4-吗啉代噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-甲醛 33

[0437]

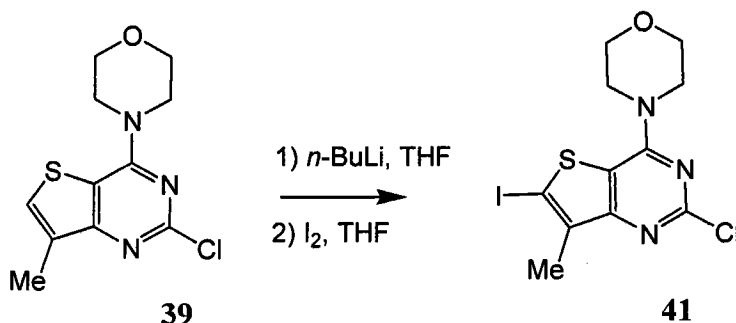


[0438] 添加在己烷 (3.3mL, 1.2eq.) 中的 2.5M 正丁基锂 (nBuLi) 溶液至 -78 °C 的 2-氯-4-吗啉代噻吩并[2,3-d]嘧啶 38(1.75g, 6.85mmol) 在干 THF(40mL) 中的悬浮液中。搅拌 1h, 然后添加干 DMF (796 μL, 1.5eq.)。在 -78 °C 下搅拌反应混合物 1h, 然后缓慢升温至室温。在室温下 2h 后, 将反应混合物倒在冰 / 水上, 产生黄色沉淀。通过过滤收集该黄

色沉淀并进行空气干燥以产生 2-氯-4-吗啉代噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-甲醛 33(1.50g) MS(Q1) 284(M⁺)。

[0439] 实施例 3b 2-氯-6-碘-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶 41

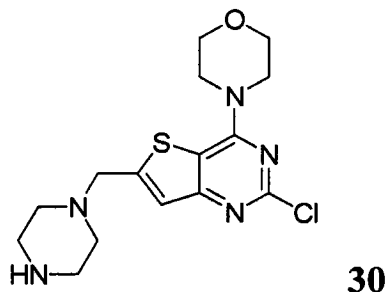
[0440]



[0441] 添加正 BuLi (8.9mL, 2.5M in Et₂O) 至 -78°C 的在 THF (60mL) 中的 2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶 39 (3.0g, 11.1mmol; 根据 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶的合成程序制备, 但是以 3-氨基-4-甲基-噻吩-2-羧酸乙酯开始) 溶液中。将所得的浆液升温至 -40°C 并搅拌 50 分钟, 然后将反应混合物冷却至 -78°C, 并添加在 THF (30mL) 中的 I₂ (5.6g, 22.2mmol) 溶液。将溶液升温至室温并搅拌 5h。通过添加水淬灭反应。分离有机层并用 CH₂Cl₂ 萃取水层。用饱和的水性 Na₂S₂O₃ 洗涤合并的有机层, 在 Na₂SO₄ 上干燥、过滤并在真空中浓缩以得到 2-氯-6-碘-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶 41 (3.8g, 84% 产率)。

[0442] 实施例 3c 4-(2-氯-6-(哌嗪-1-基甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉 30

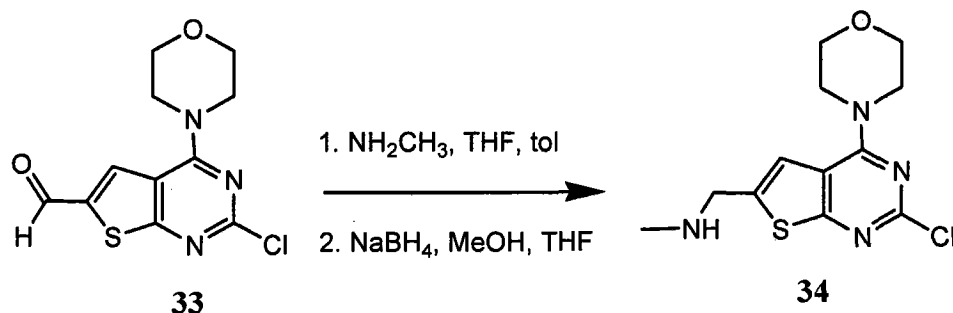
[0443]



[0444] 在室温下将 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 10 (3.5g)、1-BOC-哌嗪 (2.76g) 和原甲酸三甲酯 (4.05mL) 的混合物在 1,2-二氯乙烷 (300mL) 中搅拌 1hr。在其中添加三乙酰氧基硼氢化钠 (3.92g), 并在室温下搅拌反应混合物 24 小时。然后用盐水淬灭混合物, 用二氯甲烷萃取, 干燥 (MgSO₄) 并在真空中移除溶剂。使用快速色谱法纯化残留物以产生 4-(2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基甲基)-哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (3.4g)。在二氯甲烷/甲醇中用 HCl 处理产生 4-(2-氯-6-(哌嗪-1-基甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉 30。

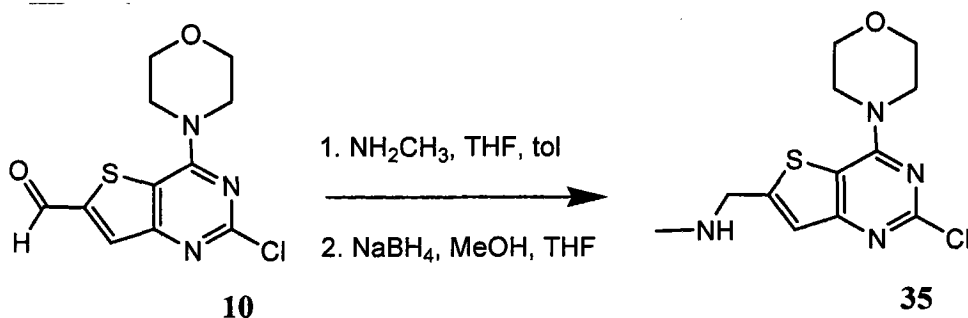
[0445] 实施例 3d (2-氯-4-吗啉代噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-基)-N-甲基甲烷胺 34

[0446]



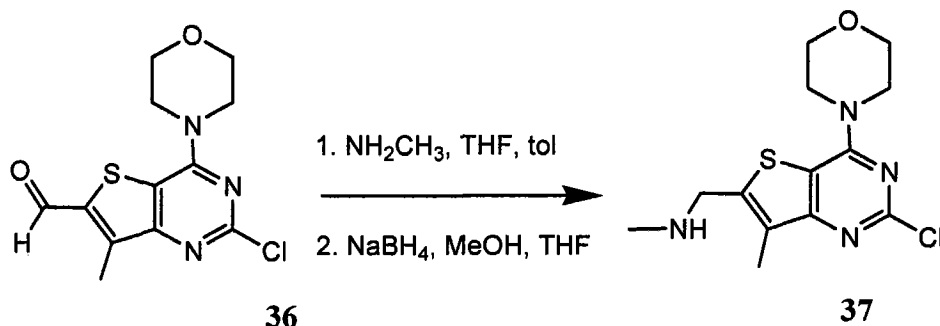
[0447] 将 20mL 在 H_2O 中的 40% 甲胺添加到在 50mL 甲苯和 50mL THF 中的 2-氯-4-吗啉代噻吩并 [2,3-d] 嘧啶-6-甲醛 33 (2.0g) 中。在室温下在 N_2 下搅拌反应混合物 24 小时。在真空下移除溶剂并且将残留物溶解在 50mL MeOH 和 50mL THF 中, 并逐份添加 NaBH_4 。在室温下在 N_2 下搅拌该反应混合物 24 小时, 通过 LCMS 确定完成反应。在真空中移除溶剂并通过快速色谱 (EtOAc/EtOH) 纯化粗产物以得到 1.12g 34 (53% 产率)。MS (Q1) 300 (M+)

[0448] 实施例 3e (2-氯-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-基)-N-甲基甲烷胺 35
 [0449]



[0450] 将 2-氯-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-甲醛 10 (2.0g) 溶于 50mL 甲苯和 50mL THF 中, 然后添加 20mL 在 H_2O 中的 40% 甲胺。在室温下在 N_2 搅拌反应混合物 24 小时。在真空下移除溶剂并且将残留物溶解在 50mL 甲醇和 50mL THF 中, 并逐份添加 NaBH_4 。在室温下在 N_2 下搅拌该反应混合物 24 小时, 通过 LCMS 确定完成反应。在真空中移除溶剂并通过快速色谱 (EtOAc/EtOH) 纯化粗产物以得到 1.12g 35 (53% 产率)。MS (Q1) 300 (M+)

[0451] 实施例 3f (2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-基)-N-甲基甲烷胺 37
 [0452]

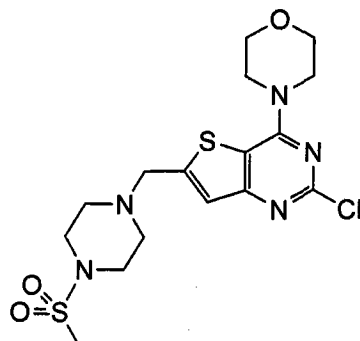


[0453] 将 2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并 [3,2-d] 嘧啶-6-甲醛 36 溶解在 20mL 甲醇和 20mL THF 中, 然后添加 15mL 在 H_2O 的 40% 甲胺, 并且搅拌反应物 24 小时。在真空中浓缩反应混合物并将残留物溶解在 30mL 甲醇和 30mL THF 中, 随后添加 NaBH_4 。在室温下搅拌该反应物至少 24 小时, 通过 LCMS 确定产物形成。在真空中移除溶剂并通过快速色谱纯化

粗产物,得到 2.53g(2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)-N-甲基甲烷胺 37(70%产率)MS(Q1)314(M)+

[0454] 实施例 4:4-(2-氯-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉 31

[0455]



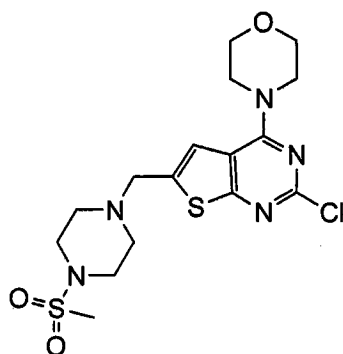
31

[0456] 在二氯甲烷和三乙胺中的 N-BOC-哌嗪和甲烷磺酰氯之间的反应产生 4-甲烷磺酰基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯。使用在二氯甲烷中的 HCl(2M) 裂解 BOC 保护基团产生 1-甲烷磺酰基-哌嗪盐酸盐。

[0457] 在室温下将 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 10(1.00g)、1-甲烷磺酰基-哌嗪(750mg) 和原甲酸三甲酯(3.80mL) 的混合物在 1,2-二氯乙烷(30mL) 中搅拌 6 小时。在其中添加三乙酰氧基硼氢化钠(900mg),并在室温下搅拌反应混合物 24 小时。然后用盐水淬灭该混合物,用二氯甲烷萃取,干燥(MgSO₄) 并在真空中移除溶剂。将残留物与乙酸乙酯研磨,产生白色固体 4-(2-氯-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉 31(1.01g)。

[0458] 实施例 5:2-氯-6-(4-甲烷磺酰基-哌嗪-1-基甲基)-4-吗啉-4-基-噻吩并[2,3-d]嘧啶 32

[0459]

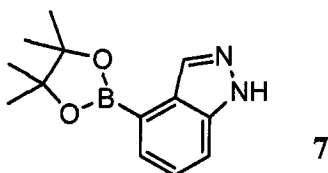


32

[0460] 使用一般程序 C,1-甲烷磺酰基-哌嗪盐酸盐和 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-甲醛 33 之间的反应产生 2-氯-6-(4-甲烷磺酰基-哌嗪-1-基甲基)-4-吗啉-4-基-噻吩并[2,3-d]嘧啶。

[0461] 实施例 6 4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷(2-基)-1H-吡唑-7-基)-N-甲基甲烷胺 38 途径 1

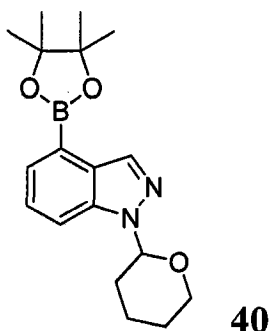
[0462]



[0463] 中间体 7 根据 US 2008/0076768 ;US 2008/0076758 ;WO 2006/046031 的方法制备,这些专利以引用方式并入。

[0464] 实施例 8 1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑 40

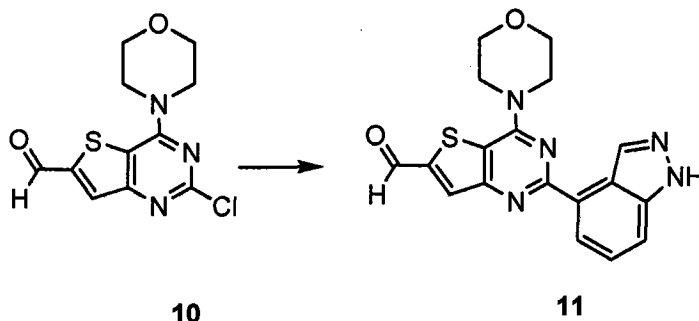
[0465]



[0466] 中间体 40 根据 US 2008/0039459 ;US 2008/0076768 ;US 2008/0076758 ;WO 2006/046031 的方法制备,这些专利以引用方式并入。

[0467] 实施例 10 2-(1H-吡唑-4-基)-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 11

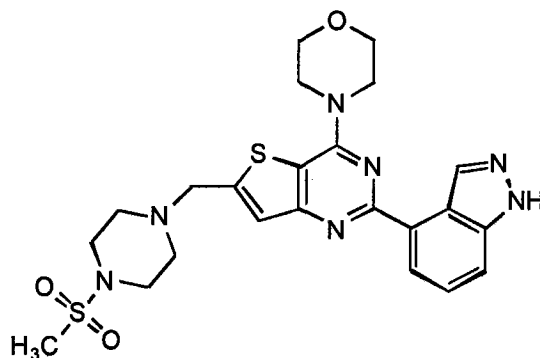
[0468]



[0469] 将 2-氯-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 10(100mg, 0.35mmol)、4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑 (70) (95mg, 0.39mmol) 和碳酸钠 (112mg) 悬浮在甲苯 (2.5mL)、乙醇 (1.5mL) 和水 (0.7mL) 中。向其中加入双(三苯基膦)氯化钯(II) (13.5mg) 用氩气吹扫反应容器。将反应混合物在 120℃微波 1h, 然后在 DCM 和水之间分层, 用盐水洗涤有机层, 在硫酸镁上干燥, 过滤并在真空中蒸发。使用快速层析纯化所得残留物以产生 2-(1H-吡唑-4-基)-4-吗啉-4-基-噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 11(97mg)。

[0470] 实施例 11 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉 (式 Ia, GDC-0941) :

[0471]

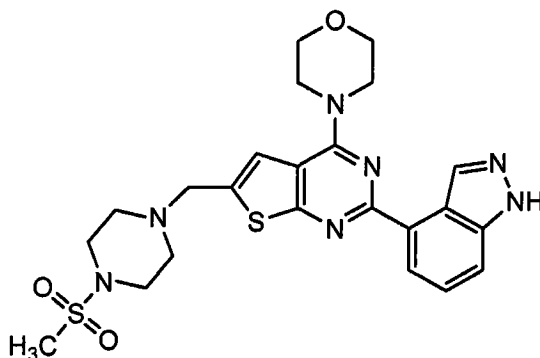
**Ia**

[0472] 将来自实施例 4 的 4-(2-氯-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基)吗啉 31 (2.00g)、4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑 7 (2.26g)、甲苯 (24mL)、乙醇 (12mL)、水 (6mL)、碳酸钠 (1.72g) 和 PdCl₂(PPh₃)₂ (325mg) 的混合物在微波中加入至 130 °C 达 90 分钟 (US2008/0076768 ;WO 2006/046031, 以引用方式并入)。

[0473] 冷却反应混合物,用氯仿稀释,用盐水洗涤,干燥 (MgSO₄) 并在真空中移除溶剂。使用快速色谱法 (乙酸乙酯,然后 5% 乙酸乙酯 / 甲醇) 纯化残留物,然后用醚研磨式 Ia 化合物、GDC-0941 (1.4g)。MS 数据:(ESI+):MH+514。NMR 数据:(CDC13):2.67-2.71(4H, m), 2.81(3H, s), 3.29-3.33(4H, m), 3.89(2H, s), 3.89-3.93(4H, m), 4.08-4.12(4H, m), 7.41(1H, s), 7.51(1H, t, J = 7.2), 7.60(1H, d, J = 8.3), 8.28(1H, d, J = 7.5), 9.02(1H, s), 10.10(1H, br)。

[0474] 实施例 12 4-(2-(1H-吡唑-4-基)-6-((4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)吗啉 (式 IIa) :

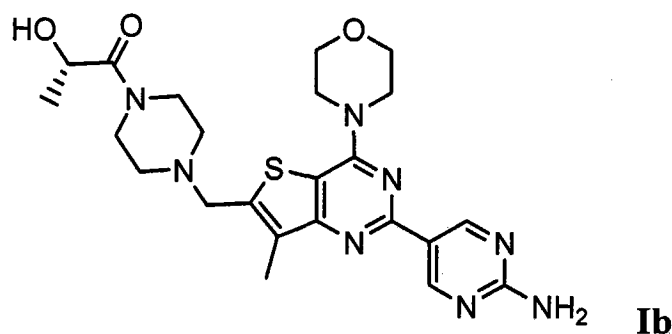
[0475]

**IIa**

[0476] 使来自实施例 5 的 2-氯-6-(4-甲烷磺酰基-哌嗪-1-基甲基)-4-吗啉-4-基-噻吩并[2,3-d]嘧啶 32 与 4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑 7 反应并且根据一般程序 A 以得到 IIa 化合物,该化合物使用快速色谱法纯化 (US 2008/0076758 ;WO 2006/046031, 以引用方式并入)。400MHz 1H NMR CDC13 :2.67(m, 4H, 2x CH₂), 2.81(s, 3H, CH₃), 3.30(m, 4H, 2x CH₂), 3.83(s, 2H, CH₂), 3.92-3.94(m, 4H, 2x CH₂), 3.98-4.00(m, 4H, 2x CH₂), 7.17(s, H, ArH), 7.50(t, H, ArH, J = 7.81Hz), 7.59(d, H, ArH, J = 8.31Hz), 8.31(d, H, ArH, J = 6.98Hz), 10.12(sbr, H, NH). MH+ = 514.10

[0477] 实施例 12a (S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮 (式 Ib) :

[0478]



[0479] 式 2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-甲醛 36(495mg) 与 Boc-哌嗪经由一般程序 B-3 反应以得到 4-((2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯。

[0480] 使 4-((2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(777mg) 进行一般程序 E 以得到 2-氯-7-甲基-4-吗啉代-6-((哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶的盐酸盐。使 2-氯-7-甲基-4-吗啉代-6-((哌嗪-1-基)甲基)噻吩并[3,2-d]嘧啶的盐酸盐(590mg) 与乳酸经由一般程序 B-2 反应以得到 (S)-1-(4-((2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮。

[0481] 使 (S)-1-(4-((2-氯-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6-基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙-1-酮(60mg) 与 50mg 5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)嘧啶-2-胺经由一般程序 A-2 反应以得到 10mg 式 Ib(WO 2008/070740, 以引用方式并入)。MS(Q1)499.3(M)+。

[0482] 实施例 13 p110 α (阿尔法)PI3K 结合测定

[0483] 结合测定:在分析仪 HT 96-384(Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA.) 上进行最初的偏振实验。荧光偏振亲和力测量的样品如下制备:添加 1 : 3 系列稀释的 p110 α PI3K(Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, VA), 以在偏振缓冲液(10mM Tris pH 7.5, 50mM NaCl, 4mM MgCl₂, 0.05% Chaps, and 1mM DTT) 中的终浓度 20ug/mL 开始至 10mM PIP₂(Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) 终浓度。在室温下孵育 30 分钟, 然后通过添加终浓度分别为 100nM 和 5nM GRP- 的 GRP-1 和 PIP3-TAMRA 探针(Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) 终止反应。用罗丹明荧光团($\lambda_{ex} = 530\text{nm}$; $\lambda_{em} = 590\text{nm}$) 的标准截止滤光片在 384 孔低体积黑 Proxi 板(PerkinElmer, Wellesley, MA.) 中读数。荧光偏振值作为蛋白浓度的函数作图, 通过将数据与使用 KaleidaGraph 软件(Synergy software, Reading, PA) 的 4 参数方程拟合获得 EC₅₀ 值。这个实验还建立在随后的与抑制剂的竞争性实验中所用的合适的蛋白浓度。

[0484] 通过添加与 PIP₂(10mM 终浓度) 混合的 0.04mg/mL p110 α PI3K(终浓度) 至含有在偏振缓冲液中终浓度为 25mM ATP 的 1 : 3 系列稀释的拮抗剂(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) 的孔中来测定抑制剂的 IC₅₀ 值。在室温下孵育 30 分钟, 然后通过添加终浓度分别为 100nM 和 5nM 的 GRP-1 和 PIP3-TAMRA 探针(Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) 终止反应。用罗丹明荧光团($\lambda_{ex} = 530\text{nm}$; $\lambda_{em} = 590\text{nm}$) 的标准截止滤光片在 384 孔低体积黑 Proxi 板(PerkinElmer, Wellesley, MA.) 中读数。荧光偏振值作为拮抗剂浓度的函数作图, 通过将数据与使用 Assay Explorer 软件(MDL, San Ramon,

CA.) 中的 4 参数方程拟合获得 IC_{50} 值。

[0485] 可选择地,使用纯化的重组酶和浓度为 1 μ M 的 ATP 在放射测定中测定 PI3K 的抑制。将化合物在 100% DMSO 中系列稀释。在室温下孵育激酶反应 1h,并且通过添加 PBS 终止反应。随后,通过使用 S 形 (sigmoidal) 剂量 - 反应曲线拟合 (可变的斜率) 测定 IC_{50} 值。

[0486] **实施例 14** 体外细胞增殖测定

[0487] 式 I 或 II 化合物通过采用下列步骤的细胞增殖测定来测量 (PromegaCorp. Technical Bulletin TB288 ;Mendoza 等人 (2002) Cancer Res. 62 :5485-5488)。Cell-Titer Glo 测定试剂和方案商购获得 (Promega)。该测定评估化合物进入细胞并抑制细胞增殖的能力。该测定原理是通过定量所存在的 ATP 来测定所存在的活细胞数目。Cell-Titer Glo 是用于这种定量的试剂。它是均质的测定,其中 Cell-Titer Glo 的添加导致细胞裂解并通过荧光素酶反应产生发光信号。发光信号与所存在的 ATP 的量成比例。

[0488] 细胞 :对于细胞系和肿瘤类型参见图 1A-C

[0489] DMSO 和培养基板 :得自 Nunc (目录号 249946) 的 96 孔锥底聚丙烯板。

[0490] 细胞板 :得自 Falcon (353962) 的带盖的 384 孔黑色、透明底 (微清) TC 板。

[0491] 细胞培养基 :RPMI 或 DMEM 高葡萄糖、10% 胎牛血清、2mM L- 谷氨酰胺, P/S

[0492] Cell Titer-Glo :Promega (目录号 G7572)

[0493] 步骤 :

[0494] 第 1 天 - 接种细胞板,收获细胞,将 PC3 以 1000 个细胞 /54 μ l/ 孔接种到 384 孔细胞板中用于 3 天测定。在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 中孵育 0/N。

[0495] 第 2 天 - 添加药物至细胞,化合物稀释, DMSO 板 (1 : 2 系列稀释, 9 个点), 将 10mM 的 20 μ l 化合物添加在 96 孔板的第 2 列。使用 Precision 跨板进行 1 : 2 系列稀释 (10 μ l+10 μ l 100% DMSO), 共 9 个点。培养基板 (1 : 50 稀释) 添加 147 μ l 培养基到所有的孔中。将 3 μ l DMSO+ 化合物从 DMSO 板的各孔中使用 Rapid 板转移到培养基板上的各对应孔中。对于 2 种药物联合研究将一种药物 1.5 μ l DMSO+ 化合物从 DMSO 板的各孔中使用 Rapid 板转移到培养基板上的各对应孔中。然后,将另一药物 1.5 μ l 转移到培养基板中。

[0496] 药物添加至细胞、细胞板 (1 : 10 稀释), 将 6 μ l 培养基 + 化合物直接添加到细胞中 (细胞已有 54 μ l 培养基)。在不会经常被打开的培养箱中在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 3 天。

[0497] 第 5 天 - 板显影,在室温下解冻 Cell Titer Glo 缓冲液。将细胞板从 37 $^{\circ}$ C 移出,并平衡至室温达约 30 分钟。将 Cell Titer Glo 缓冲液添加至 Cell Titer Glo 底物 (瓶至瓶) 中。添加 30 μ l Cell Titer Glo 试剂至各细胞孔中。置于平板振荡器上约 30 分钟。在 Analyst HT 平板读数仪上读取发光 (每孔半秒钟)。

[0498] 细胞存活率测定和联合测定 :将细胞以 1000-2000 个细胞 / 孔接种在 384 孔板中 16h。第二天,在 96 孔板中用 DMSO 进行 9 次 1 : 2 的化合物系列稀释。然后使用 Rapidplate 自动设备 (Zymark Corp., Hopkinton, MA) 将化合物进一步在生长培养基中稀释。然后将稀释的化合物以 4 个重复副本添加到 384 孔细胞板中,在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下孵育。4 天后,使用 Cell-Titer Glo (Promega) 根据厂商的说明检测发光并在 Wallac Multilabel 读数仪 (PerkinElmer, FosterCity) 上读数来测量活细胞的相对数目。使用 Prism 4.0 软件 (GraphPad, SanDiego) 计算 EC50 值。在联合测定中药物以 4 \times EC50 浓度开始给药。如果是

在药物的 EC₅₀ 大于 2.5 μM 的情况下,则所用的最高浓度为 10 μM。在所有的测定中 PI3K 抑制剂和化疗剂同时或相隔 4 小时(一种在另一种之前)添加。

[0499] 体外细胞增殖测定的额外示例包括下列步骤:

[0500] 1. 将在培养基中含有约 10⁴细胞的 100 μl 细胞培养物的等分溶液(参见图 1A-C 的细胞系和肿瘤类型)放入 384 孔不透明壁板的各孔中。

[0501] 2. 制备含有培养基不含细胞的对照孔。

[0502] 3. 将化合物添加到实验孔中,并孵育 3-5 天。

[0503] 4. 将板平衡至室温约 30 分钟。

[0504] 5. 添加与各孔中所存在的细胞培养基体积相同体积的 CellTiter-Glo 试剂。

[0505] 6. 在定轨振荡器上混合内容物 2 分钟以诱导细胞裂解。

[0506] 7. 将板在室温下孵育 10 分钟以稳定发光信号。

[0507] 8. 记录发光,并在图中报道为 RLU = 相对发光单位。

[0508] 可选择地,将细胞在 96 孔板中以最佳密度接种并在存在测试化合物的条件下孵育 4 天。随后将 Alamar Blue™ 添加至测定培养基中,孵育细胞 6h,然后在 544nm 激发光,590nm 发射光处读数。使用 S 型剂量反应曲线拟合计算 EC₅₀ 值。

[0509] 实施例 15 FACS 膜联蛋白 V/PI 测定

[0510] 将细胞 (2×10⁶) 置于 10cm 组织培养板中。16 小时后,将细胞暴露于 0.1% DMSO(对照)或式 Ia(含有 0.1% DMSO)48 小时。然后使用胰蛋白酶将细胞从板中移出,并用 PBS 洗涤一次。为了检测凋亡,将细胞 (MB361, PC3) 以 1×10⁶细胞/毫升重悬在结合缓冲液 (10mM HEPES/NaOH [pH 7.4]、140mM NaCl 和 2.5mM CaCl₂) 中并立即用 5 μL 膜联蛋白 V-FITC (BD Pharmingen; Franklin Lakes, NJ) 和含有 50 μg/mL 碘化丙啶 (PI) (Sigma) 的 500 μL PI 溶液、0.2mg/mL RNA 酶溶液 (Sigma)、和在 PBS 中的 0.1% Triton-X (Sigma) 染色。将混合物在室温下孵育 30 分钟,用流式细胞仪 (BD Biosciences; San Jose, CA) 分析细胞。

[0511] 实施例 16 在 HER2+BT474M1 细胞的 3D 培养中的腺泡形态发生

[0512] 使用覆盖方法在 3D 细胞培养中测定了 PI3K 抑制剂和 PI3K 抑制剂与 HER 家族抑制剂的最有效治疗剂联合在 HER2- 扩增的乳腺癌细胞中的生物学活性。式 Ia 化合物以在二甲基亚砜中的 50mM 浓度的悬浮液使用。调蛋白 β-1₁₇₇₋₂₄₄ (后面称为 HRG) 以 225.8 μM 的储存浓度提供。在 3D 培养中用 20 μg/ml 曲妥珠单抗、25 μg/ml 培妥珠单抗、250nM 式 Ia 化合物或 250nM 式 IIa 化合物处理 BT474M1 细胞。通过使用 Cell Titer-Glo 发光细胞存活率测定 (Promega) 测量细胞 ATP 水平来测定细胞存活率。根据每个测定条件下 3 个重复的平均值读数。通过从相差照片计算芽形成程度来定量形态发生。通常在 9 天的持续时间内,对每个测定条件下的 100 个腺泡进行腺泡表面上所形成的芽数目评分。每 3 天更新培养基。

[0513] 在滴定曲线中,用增加剂量的式 Ia 处理 BT474M1 细胞以测定有效抑制 PI3K (AKT) 下游标志物并导致细胞存活率 (Cell Titer-Glo) 整体降低的最佳浓度。BT474M1 细胞是从购自美国标准培养物收集所 (American Type Culture Collection) 的 BT474 亲本细胞系衍生而来。将细胞通过小鼠传代以获得适于体外和体内研究的活的雌激素依赖性细胞系。

[0514] 所有的 3D 测定都使用所述的 (Lee 等人 (2007) Nat Methods. 4:359-65) “覆盖法”进行。在冰上用 100ul 生长因子诱导的基质胶 (BD Biosciences) 均匀涂覆 48 孔皿。随后

将板转移到 37°C 的培养箱中 20 分钟以容许基质聚合。收获 BT474M1 细胞,并以 10,000 个细胞 / 孔接种到涂覆基质胶的皿上。将细胞在补充有 5% 基质胶和相应的药物或配体的生长培养基中培养。测定通常持续 9-10 天,每 3 天更换生长培养基。使用适于莱卡 (Leica) DMIL 显微镜的索尼数码相机 (DXC-S500) 记录相差照片。通过使用 Cell Titer-Glo 发光细胞存活率测定 (Promega) 测量细胞 ATP 水平来测定细胞存活率。根据每个测定条件下 3 个重复的平均值通过光度计估计读数。通过从相差照片计算芽形成程度来定量形态发生。对每个测定条件下的 100 个腺泡进行腺泡表面上所形成的芽数目评分。合计评分并将其按下列种类分组:每个腺泡 0-1、2-3 或 ≥ 4 个芽。

[0515] 表 1 在 3D 细胞培养中评定的 PI3K 抑制剂联合

[0516]

	联合	靶
1	20 μ g/ml 曲妥珠单抗 250nM 式 Ia	Her2(胞外亚结构域 IV) PI3K
2	25 μ g/ml 培妥珠单抗 250nM 式 Ia	Her2(胞外亚结构域 II) PI3K
3	20 μ g/ml 曲妥珠单抗 25 μ g/ml 培妥珠单抗 250nM 式 Ia	Her2(胞外亚结构域 II) Her2(胞外亚结构域 IV) PI3K

[0517] 实施例 17 体内肿瘤异种移植

[0518] 适于转基因实验的动物可以从标准的商业来源获得。将具有基质胶和 0.36mg 雌激素的 2000 万 MDA-MB-361.1 (PI3K 突变体) 乳腺癌细胞移植到在后侧腹皮下植入雌性 CD-1 裸小鼠 (Charles River 实验室) 的小组中的每只小鼠。将具有基质胶和 0.36mg 雌激素小球的 150mm³ MAXF 401 (Her2+/ER+/PR+) 或 MAXF 1162 (Her2+/ER+/PR+) 原发性乳腺癌 (从两个单独的乳腺癌患者直接活组织切片) 片段植入雌性 NMRI nu/nu 小鼠 (Janvier) 的小组中每只小鼠。将具有基质胶和 0.36mg 雌激素小球的 1000 万 MCF-7 (PI3K 突变体) 乳腺癌细胞植入雌性 HRLN nu/nu (Harlan 实验室) 的小组中每只小鼠。将每只小鼠 1500 万 NCI-H2122 (K-Ras 突变体) 非小细胞肺癌细胞和基质胶植入雌性无胸腺的 nu/nu 小鼠 (Charles River 实验室) 的小组中。在第 1 天根据指定方案用药物、药物联合或溶媒对每个肿瘤模型的小鼠异种移植给药。静脉内给予多西他赛,腹膜内给予 B20-1.4,通过口服强饲经口递送式 I 和 IIa。在研究过程中每周记录两次肿瘤大小。小鼠体重也每

周记录两次,并且定期观察小鼠。使用 Ultra Cal-IV 测径器 (Model 54-10-111 型;Fred V.Fowler Co., Inc.;Newton, MA) 在两个维度上(长和宽)测量肿瘤体积并使用 Excel v.11.2(Microsoft Corporation;Redmond, WA) 分析。使用 KaleidaGraph 3.6 板 (Synergy Software;Reading,PA) 绘制肿瘤抑制图。使用下式计算肿瘤体积:肿瘤大小 (mm^3) = (较长测量值 \times 较短测量值²) \times 0.5

[0519] 使用 Adventurera Pro AV812 天平 (Ohaus Corporation;Pine Brook,NJ) 测量动物体重。使用 KaleidaGraph 3.6 版生成图。使用下式计算百分比的体重改变: %组体重改变 = $(1 - (\text{初始体重} / \text{新体重})) \times 100$ 。

[0520] 根据法规性指南对肿瘤体积超过 2000mm^3 或体重损伤大于其初始体重的 20% 的小鼠迅速实施无痛致死。

[0521] 使用下式计算研究结束时 (EOS) 的百分比肿瘤生长抑制率 (% INH): % INH = $100 \times (\text{给予溶媒的动物中的 EOS 肿瘤平均体积} - \text{给予药物的动物中的 EOS 肿瘤平均体积}) / \text{给予溶媒的动物中的 EOS 肿瘤平均体积}$ 。

[0522] 根据在研究结束时每组中剩余的可测量肿瘤数测定肿瘤发病率 (TI)。部分反应 (PR) 定义为在研究的任一天观察的肿瘤体积与开始的肿瘤体积相比降低大于 50% 但小于 100%。完全反应 (CR) 定义为在研究的任一天观察的肿瘤体积与开始的肿瘤体积相比降低了 100%。用 JMP 统计软件 5.1.2 版 (SAS Institute;Cary,NC) 使用 Dunnett 检验分析数据并测定 p 值。用 JMP 统计软件 5.1.2 版计算研究结束时的个体肿瘤体积和平均肿瘤体积 \pm SEM 值。根据与初始体重相比的平均百分比改变 \pm SEM 将体重数据作图。

[0523] 实施例 18 磷酸 AKT 诱导测定

[0524] 将细胞以 5×10^5 个细胞接种在 6 孔组织培养板中过夜。用 EC_{80} 的化疗剂处理细胞。处理后,用冷 PBS 处理细胞一次并在得自 Biosource (Carlsbad, CA) 的 $1 \times$ 细胞提取缓冲液中裂解,所述细胞提取缓冲液中补充有蛋白酶抑制剂 (Roche, Mannheim, Germany)、1mM PMSF 和得自 Sigma (St.Louis, MO) 的磷酸酶抑制剂混合物 1 和 2。使用 Pierce BCA 蛋白测定试剂盒 (Rockford, IL) 进行蛋白浓度测定。pAkt (Ser⁴⁷³) 和总 Akt 水平使用来自 Biosource (Carlsbad, CA) 的磁珠试剂盒和 Luminex Bio-Plex 系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 评估。

[0525] 应认为上述说明仅是本发明的原理的示例。另外,由于数字修改和改变对于本领域的技术人员来说是显而易见的,所以不应将本发明限制在上文所述的具体构建和方法。因此,可以认为所有合适的修改和等同物都在下列权利要求所限定的本发明的范围内。

式Ia化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定;

实验	细胞系	肿瘤类型	基因突变	化疗剂	化疗剂 EC50	化合物 Ia EC50	联合指数 (CI)	协同作用
1	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	5-FU	>40	0.48	0.048	++++
2	MT3	乳腺癌	K-ras G12D PI3K H1047R	5-FU	>40	0.58	0.954	+/-
3	MDA-MB-436	乳腺癌	PTEN neg	5-FU	>40	0.82	0.757	++
4	MDA-MB-468	乳腺癌	PTEN neg	5-FU	20	0.87	0.674	+++
5	ZR75-1	乳腺癌	PTEN neg	5-FU	20	0.3	0.682	+++
6	Cal-120	乳腺癌		5-FU	1.33	1.38	1.33	-
7	HCC-1569	乳腺癌	PTEN neg	卡铂	>40	0.322	1.1	-
8	HCC-1569	乳腺癌	PTEN neg	多西他赛	0.0004	0.322	0.737	++
9	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	多西他赛	0.0016	0.48	0.11	++++
10	MDA-MB-468	乳腺癌	PTEN neg	多西他赛	0.005	0.87	0.136	++++
11	ZR75-1	乳腺癌	PTEN neg	多西他赛	0.0025	0.3	0.901	+/-
12	MT3	乳腺癌	K-ras G12D PI3K H1047R	多西他赛	0.001	0.58	0.278	++++
13	MCF7	乳腺癌	PI3K E545K	多西他赛	0.005	0.17	0.866	+
14	MDA-MB-436	乳腺癌	PTEN neg	多西他赛	0.005	0.82	0.346	+++
15	Cal-120	乳腺癌		多西他赛	0.85	1.38	0.85	+
16	MDA-MB-231	乳腺癌	K-ras G13G	多西他赛	0.0001	6.5	0.96	-
17	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	多柔比星	0.148	0.48	0.137	++++
18	Cal-51	乳腺癌	PI3K E542K, PTEN neg	吉西他滨	0.002	0.76	0.189	++++
19	Cal-120	乳腺癌		吉西他滨	0.4	1.38	0.4	+++
20	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	吉西他滨	0.006	0.48	0.421	+++

式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

21	MT3	乳腺	K-ras G12D PI3K H1047R	吉西他滨	0.002	0.58	0.863	+
22	MCF7	乳腺	PI3K E545K	吉西他滨	0.005	0.17	0.651	+++
23	MDA-MB-436	乳腺	PTEN neg	吉西他滨	0.001	0.82	0.959	+/-
24	MDA-MB-468	乳腺	PTEN neg	吉西他滨	0.0025	0.87	0.722	++
25	ZR75-1	乳腺	PTEN neg	吉西他滨	0.01	0.3	0.655	+++
26	BT474	乳腺	PI3K K111N	拉帕替尼	0.1	0.52	0.22	++++
27	EFM192A	乳腺	PI3K C420R	拉帕替尼	0.31	0.41	0.24	++++
28	MDA-MB-231	乳腺	K-ras G13G PI3K E542K, PTEN neg	紫杉醇	0.0017	6.5	1.1	-
29	Cal-51	乳腺	PI3K E545K	PD-0325901	0.37	0.76	0.109	+++
30	MDA-MB-361	乳腺	PI3K E545K	PD-0325901	>2	0.48	0.275	++++
31	MCF7	乳腺	PI3K E545K	PD-0325901	>20	0.17	0.95	+/-
32	MT3	乳腺	K-ras G12D PI3K H1047R	PD-0325901	0.023	0.58	0.01	+++++
33	MDA-MB-436	乳腺	PTEN neg	PD-0325901	2	0.82	0.092	+++++
34	ZR75-1	乳腺	PTEN neg	PD-0325901	0.36	0.3	0.779	++
35	MDA-MB-468	乳腺	PTEN neg	PD-0325901	0.27	0.87	0.114	++++
36	MCF7	乳腺	PI3K E545K	他莫昔芬	>10	0.17	0.353	+++
37	MDA-MB-361	乳腺	PI3K E545K	雷帕霉素	0.01	0.55	0.29	++++
38	MDA-MB-361	乳腺	PI3K E545K	Akt1-1/2	3.73	0.55	0.57	+++
39	MDA-MB-453	乳腺	PI3K H1047R	雷帕霉素	0.01	0.40	0.37	+++
40	MDA-MB-453	乳腺	PI3K H1047R	Akt1-1/2	1.90	0.40	0.42	+++
41	T47D	乳腺	PI3K H1047R	雷帕霉素	0.01	0.17	0.39	+++
42	T47D	乳腺	PI3K H1047R	Akt1-1/2	0.28	0.17	0.97	+/-
43	ZR75-1	乳腺	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	0.33	0.47	+++

式Ia化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

44	ZR75-1	乳腺	PTEN neg	Akti-1/2	6.05	0.33	0.67	++
45	MDA-MB-468	乳腺	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	1.73	0.24	+++
46	MDA-MB-468	乳腺	PTEN neg	Akti-1/2	17.62	1.73	0.60	+++
47	BT549	乳腺	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	0.28	0.23	+++
48	BT549	乳腺	PTEN neg	Akti-1/2	16.81	0.28	0.58	+++
49	MDA-MB-436	乳腺	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	0.82	0.37	+++
50	MDA-MB-436	乳腺	PTEN neg	Akti-1/2	17.38	0.82	0.90	+
51	HCC1937	乳腺	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	0.70	0.35	+++
52	HCC1937	乳腺	PTEN neg	Akti-1/2	10.19	0.70	0.69	++
53	SKBR3	乳腺	p53 mut	雷帕霉素	0.01	0.26	0.30	++++
54	SKBR3	乳腺	p53 mut	Akti-1/2	2.21	0.26	0.71	++
55	SKBR3	乳腺	p53 mut	拉帕替尼	0.07	0.33	0.66	++
56	MDA-MB-175	乳腺	p53 mut	雷帕霉素	0.01	0.42	0.32	+++
57	MDA-MB-175	乳腺	p53 mut	Akti-1/2	1.43	0.42	0.67	++
58	Hs587T	乳腺	p53 mut	雷帕霉素	0.01	0.68	0.37	+++
59	Hs587T	乳腺	p53 mut	Akti-1/2	20	0.86	0.82	++
60	HDQ-P1	乳腺		雷帕霉素	0.01	0.49	0.52	+++
61	HDQ-P1	乳腺		Akti-1/2	4.69	0.49	0.98	+/-
62	C-33A	子宫颈	PTEN neg	5-FU	3.84	1.2	0.77	++
63	ME-180	子宫颈	P13K E545K	5-FU	4	0.32	0.88	+
64	SIHa	子宫颈		5-FU	47	2.5	1.23	-
65	C-33A	子宫颈	PTEN neg	多西他赛	0.001	1.2	0.53	++
66	ME-180	子宫颈	P13K E545K	多西他赛	0.0017	0.32	0.66	++
67	SIHa	子宫颈		多西他赛	0.0025	2.5	0.85	+

式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

68	C-33A	子宫颈	PTEN neg	吉西他滨	0.0025	1.2	0.72	++
69	ME-180	子宫颈	PI3K E545K	吉西他滨	0.035	0.32	0.55	+++
70	SiHa	子宫颈		吉西他滨	0.0025	2.5	0.6	++
71	SW620	结肠	K-ras G12V, p53 mut	厄洛替尼	>10	1.25	0.115	++++
72	KM12	结肠	PTEN neg	厄洛替尼	>10	3.46	1.094	+/-
73	WDR	结肠		厄洛替尼	>10	0.27	1.1	-
74	SW620	结肠	K-ras G12V, p53 mut	PD-0325901	0.01	1.25	0.37	+++
75	HT-55	结肠		PD-0325901	0.05	0.41	0.091	++++
76	KM12	结肠	PTEN neg	PD-0325901	>2	3.46	0.061	++++
77	WDR	结肠		PD-0325901	0.05	0.27	0.093	++++
78	HCT-116	结肠	K-ras G12V	PD-0325901	0.13	1.16	0.03	++++
79	DLD-1	结肠	K-ras G12V, PI3K E545K	PD-0325901	0.70	1.21	0.07	++++
80	RKO	结肠	B-raf V600E, PI3K H1047K	PD-0325901	0.07	1.66	0.08	++++
81	Colo205	结肠	B-raf V600E, PI3K H1047K	PD-0325901	0.006	2.14	0.10	++++
82	HT-29	结肠		PD-0325901	0.03	0.45	0.20	++++
83	LoVo	结肠	K-ras G13D	PD-0325901	0.009	0.45	0.20	++++
84	HCT116	结肠	PI3K H1047K, K-ras G13D	雷帕霉素	0.01	2.5	0.75	++
85	KM12	结肠	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	3.46	0.28	+++
86	LoVo	结肠	K-ras G13D	雷帕霉素	0.01	2.44	0.42	+++
87	MDST8	结肠	B-raf V600X	雷帕霉素	0.01	2.44	0.2	+++
88	WDR	结肠		雷帕霉素	0.01	0.27	0.2	+++

式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

89	ECC-1	子宫内膜	PTEN neg	5-FU	2	1.4	0.64	++
90	ECC-1	子宫内膜	PTEN neg	多西他赛	0.0009	1.4	0.64	++
91	ECC-1	子宫内膜	PTEN neg	: 吉西他滨	0.0113	1.4	0.83	+
92	HEC-1-A	子宫内膜		5-FU	2.5	0.9	0.8	+
93	HEC-1-A	子宫内膜		多西他赛	0.0012	0.9	0.56	+++
94	HEC-1-A	子宫内膜		: 吉西他滨	0.05	0.9	0.82	+
95	SK-JT-1B	子宫内膜	PTEN neg	5-FU	1.3	0.3	0.54	+++
96	SK-JT-1B	子宫内膜	PTEN neg	多西他赛	0.0005	0.3	0.52	+++
97	SK-JT-1B	子宫内膜	PTEN neg	吉西他滨	0.0019	0.3	0.79	+
98	U87	胶质瘤	PTEN neg	替莫唑胺	11.7	0.27	0.004	+++++
99	G111	胶质瘤		替莫唑胺	12	0.42	0.62	++
100	G402	胶质瘤		5-FU			0.8	
101	G402	胶质瘤		多西他赛			0.49	
102	G402	胶质瘤		吉西他滨			0.62	
103	G140	胶质瘤	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	0.41	0.22	++++
104	G140	胶质瘤	PTEN neg	替莫唑胺	>16.25	0.41	0.83	+
105	G59	胶质瘤	PTEN neg	替莫唑胺	>16.25	0.24	0.76	++
106	G61	胶质瘤		雷帕霉素	0.01	1.28	0.14	++++
107	G63	胶质瘤	PTEN neg	替莫唑胺	>16.25	0.31	1.65	-
108	LN229	胶质瘤	PI3K E545K	雷帕霉素	0.01	4.95	0.18	++++
109	LN229	胶质瘤	PI3K E545K	替莫唑胺	>16.25	2.5	1.1	-
110	U87	胶质瘤	PTEN neg	替莫唑胺	11.7	0.27	0.48	+++
111	U87	胶质瘤	PTEN neg	雷帕霉素	0.01	0.19	0.31	+++
112	H2122	肺	K-ras G12C, p53	卡铂	>10	1.1	0.53	+++

式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

113	LKR10 (小鼠)	肺	mut	顺铂	0.5	1.38	0.316	+++
114	LKR13 (小鼠)	肺	K-ras G12C	顺铂	1	0.815	0.403	+++
115	H2122	肺	K-ras G12C	顺铂	5	0.538	0.085	+++++
116	H1651	肺	K-ras G12C, p53 mut	顺铂	0.75	7.71	1.142	-
117	H2122	肺	K-ras G12C, p53 mut	多西他赛	0.0015	0.538	0.58	+++
118	LKR10 (小鼠)	肺	K-ras G12C	紫杉醇	0.0075	1.38	0.084	+++++
119	LKR13 (小鼠)	肺	K-ras G12C	紫杉醇	0.005	0.815	0.064	+++++
120	H2122	肺	K-ras G12C, p53 mut	紫杉醇	0.0015	1.1	0.77	++
121	H1651	肺	K-ras G12C, p53 mut	紫杉醇	0.0015	7.71	1.08	+/-
122	H2122	肺	K-ras G12C, p53 mut	吉西他滨	0.0036	1.1	0.87	+
123	A549	肺	K-ras G12S	吉西他滨	0.01	0.49	0.749	++
124	H1703	肺	p53 mut	PD-0325901	>2	0.675	0.501	+++
125	A549	肺	K-ras G12S	PD-0325901	0.06	0.485	0.076	+++++
126	LKR10 (小鼠)	肺	K-ras G12C	PD-0325901	0.03	1.38	0.124	++++
127	LKR13 (小鼠)	肺	K-ras G12C	PD-0325901	0.02	0.815	0.156	++++
128	H322T	肺	EGFR	PD-0325901	0.05	1.46	0.088	+++++
129	Calu-6	肺	K-ras Q61K	PD-0325901	0.053	3.64	0.061	+++++
130	H2126	肺	K-ras G12C, p53 mut	PD-0325901	1.5	0.467	1.07	+/-
131	H2122	肺	K-ras G12C, p53 mut	PD-0325901	0.002	0.538	0.036	+++++
132	H1781	肺	p53 mut	PD-0325901	>2	0.2	0.372	+++
133	H1435	肺	p53 mut	PD-0325901	>2	1.25	0.341	+++

式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

134	H661	肺		p53 mut	PD-0325901	>2	1.43	1.213	-
135	H1299	肺		p53 mut	PD-0325901	2.5	0.414	0.024	++++
136	A549	肺		K-ras G12S	PD-0325901	0.06	0.49	0.076	++++
137	H23	肺		K-ras G12C	PD-0325901	0.01	0.82	0.154	++++
138	H838	肺		EGFR	PD-0325901	>2	0.578	0.949	+/-
139	LKR13 (小鼠)	肺		K-ras, p53 mut	PD-0325901	>2	0.578	0.949	+/-
140	LKR10 (小鼠)	肺		K-ras, p53 mut	厄洛替尼	6	1.38	0.042	++++
141	LKR13 (小鼠)	肺		K-ras, p53 mut	厄洛替尼	>10	0.815	0.109	++++
142	Calu-6	肺		K-ras Q61K	厄洛替尼	7	3.64	0.056	++++
143	H1299	肺		N-ras Q61K	厄洛替尼	>10	0.414	0.058	++++
144	H2126	肺		p53 mut	厄洛替尼	9	0.467	0.293	++++
145	H661	肺		p53 mut	厄洛替尼	7	1.43	0.532	+++
146	H1435	肺		p53 mut	厄洛替尼	2.5	1.25	0.034	++++
147	H2122	肺		K-ras G12C, p53 mut	厄洛替尼	6	0.538	0.095	++++
148	H1781	肺		p53 mut	厄洛替尼	>10	0.2	0.383	++++
149	A549	肺		K-ras G12S	厄洛替尼	13.1	0.49	0.167	++++
150	H1703	肺		p53 mut	厄洛替尼	6	0.675	0.781	++
151	H1781	肺		p53 mut	厄洛替尼	>10	0.2	0.383	++++
152	H838	肺		EGFR	厄洛替尼	6	0.578	0.808	+
153	H23	肺		K-ras G12C	厄洛替尼	>20	0.82	0.282	++++
154	H322T	肺		EGFR	厄洛替尼	0.16	1.46	0.29	++++
155	H1651	肺			厄洛替尼	>10	7.71	0.739	++
156	H838	肺		EGFR	厄洛替尼	6	0.578	0.808	++
157	A427	肺		K-ras G12D	厄洛替尼	>10	0.458	0.038	++++

式Ia化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

158	H1155	肺	K-ras Q61H	厄洛替尼	8.62	1.456	0.415	+++
159	H1299	肺	p53 mut	厄洛替尼	>10	0.41	0.2	++++
160	H1975	肺		厄洛替尼	5.51	0.836	0.811	+
161	H2009	肺	K-ras Q61H	厄洛替尼	7.1	0.595	0.446	+++
162	H2030	肺	K-ras G12C	厄洛替尼	5.82	1.874	0.41	+++
163	H292	肺	K-ras N85K	厄洛替尼	2.1	0.391	0.446	+++
164	H358	肺	K-ras G12C	厄洛替尼	0.66	2.474	0.273	++++
165	H441	肺	K-ras G12V	厄洛替尼	4.89	4.195	0.27	++++
166	H460	肺	K-ras G61H	厄洛替尼	>10	0.24	0.314	+++
167	H647	肺	K-ras G13D	厄洛替尼	>2	1.43	1.213	-
168	H650	肺	K-ras Q61L	厄洛替尼	>10	14.34	0.245	++++
169	537MEL	黑色素瘤	PTEN neg	5-FU	>50	0.49	0.65	++
170	537MEL	黑色素瘤	PTEN neg	多西他赛	0.0125	0.49	0.29	++++
171	537MEL	黑色素瘤	PTEN neg	吉西他滨	0.0045	0.49	0.85	+
172	A375	黑色素瘤	B-raf V600E	替莫唑胺	>10	2.06	0.007	+++++
173	Malm-3M	黑色素瘤		替莫唑胺	>20	0.35	0.18	++++
174	537MEL	黑色素瘤	PTEN neg	替莫唑胺	>16.25	0.49	1.2	-
175	537 Mel	黑色素瘤	PTEN neg	PD-0325901	0.009	0.49	0.16	++++
176	A375	黑色素瘤	B-raf V600E	PD-0325901	0.004	2.06	0.19	++++
177	Hs294T	黑色素瘤		PD-0325901	0.022	0.50	0.2	++++
178	Malm-3M	黑色素瘤		PD-0325901	0.35	0.004	0.6	+++
179	MeWo	黑色素瘤		PD-0325901	0.14	0.67	0.06	+++++
180	A2058	黑色素瘤		PD-0325901	0.04	0.45	0.29	++++
181	C32	黑色素瘤		PD-0325901	0.02	0.51	0.66	+++

式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

205	EFO21	卵巢			5	0.77	0.967	+/-
206	SKOV3	卵巢		5-FU	>40	0.66	1.94	-
207	OVCAR3	卵巢		5-FU	5	0.34	0.915	+/-
208	TOV112D	卵巢		卡铂	30.7	1.53	1.06	+/-
209	TOV21G	卵巢	K-ras G13C	卡铂	11	1.03	0.487	+++
210	FU-OV1	卵巢		多柔比星	>0.02	0.146	0.733	++
211	TOV112D	卵巢		多柔比星	0.0002	1.53	0.969	+/-
212	TOV112D	卵巢		多柔比星	0.02	0.294	1.05	+/-
213	SKOV3	卵巢		多柔比星	0.01	0.66	0.177	++++
214	OVCAR3	卵巢		多柔比星	0.001	0.34	0.709	++
215	EFO21	卵巢		多柔比星	0.01	0.77	0.937	+/-
216	TOV21G	卵巢	K-ras G13C	多柔比星	0.005	0.48	0.962	+/-
217	EFO21	卵巢		多柔比星	0.02	0.77	0.921	+/-
218	SKOV3	卵巢		多柔比星	0.3	0.66	0.39	+++
219	FU-OV1	卵巢		吉西他滨	>0.02	0.146	0.686	+++
220	EFO21	卵巢		吉西他滨	0.01	0.77	0.579	+++
221	SKOV3	卵巢		吉西他滨	0.0018	0.66	1.177	-
222	OVCAR3	卵巢		吉西他滨	0.001	0.34	1.022	+/-
223	TOV21G	卵巢	K-ras G13C	吉西他滨	0.005	0.48	0.536	+++
224	EFO21	卵巢		PD-0325901	0.01	0.77	0.196	++++
225	OVCAR3	卵巢		PD-0325901	>2	0.34	0.912	+/-
226	SKOV3	卵巢		PD-0325901	>2	0.66	0.144	++++
227	OVCAR3	卵巢		他莫昔芬	>20	0.34	0.875	+
228	SKOV3	卵巢		他莫昔芬	>20	0.66	0.821	++

式 Ia 化合物 (GDC-0941) 和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

229	ASPC-1	胰腺	K-ras G12D	吉西他滨	0.021	3.36	0.236	+++
230	MiaCaPa1	胰腺	K-ras G12C	厄洛替尼	>10	0.78	1.13	-
231	ASPC-1	胰腺	K-ras G12D	厄洛替尼	4.28	3.36	0.794	++
232	HPAF-II	胰腺	K-ras G12D	PD-0325901	0.14	1.19	0.07	++++
233	AsPC-1	胰腺	K-ras G12D	PD-0325901	0.02	0.81	0.3	++++
234	SW1990	胰腺	K-ras G12D	PD-0325901	0.03	5.43	0.3	++++
235	BxPC3	胰腺		PD-0325901	0.05	0.55	0.4	+++
236	Panc 05.04	胰腺	K-ras G12D	PD-0325901	0.008	0.23	0.5	+++
237	KP4	胰腺	K-ras G12D	HPPD	20.0	1.73	0.86	+
238	PATU8988T	胰腺	K-ras G12V	HPPD	20.0	0.59	1.06	+/-
239	SU86.86	胰腺	K-ras G12D	HPPD	20.0	7.90	0.39	+++
240	PC-3	前列腺		5-FU	5	0.27	0.711	++
241	DU1145	前列腺		多西他赛	8.2	0.865	0.918	+/-
242	PC-3	前列腺		多西他赛	0.0025	0.27	0.364	+++
243	22rv1	前列腺		多西他赛	0.005	0.25	0.511	+++
244	PC-3	前列腺		多柔比星	0.002	0.27	1.248	-
245	PC-3	前列腺		吉西他滨	0.01	0.27	0.972	+/-
246	DU1145	前列腺		紫杉醇	0.032	0.865	0.79	++
247	22rv1	前列腺		PD-0325901	>10	0.25	0.308	+++
248	PC-3	前列腺		PD-0325901	0.013	0.27	1.07	+/-

图 1A

式IIa化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

实验	细胞系	肿瘤类型	Ras突变	化疗剂	化疗剂 EC50	化合物 IIa EC50	联合指数 (CI)	协同作用
1	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	5-FU	>40	0.61	0.336	+++
2	MDA-MB-468	乳腺癌	PI3K E545K	5-FU	20	7.14	1.24	-
3	MT3	乳腺癌	K-ras G12D	5-FU	>40	0.77	1.11	-
4	ZR75-1	乳腺癌	PTEN neg	5-FU	20	0.78	0.468	+++
5	Cal-120	乳腺癌		5-FU	1.33	2.26	1.13	-
6	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	多西他赛	0.0016	0.61	0.092	+++++
7	MDA-MB-468	乳腺癌	PTEN neg	多西他赛	0.005	7.14	0.872	+
8	MT3	乳腺癌	K-ras G12D	多西他赛	0.001	0.77	0.691	+++
9	Cal-120	乳腺癌		多西他赛	0.85	2.26	1.21	-
10	ZR75-1	乳腺癌	PTEN neg	多西他赛	0.0025	0.78	0.459	+++
11	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	吉西他滨	0.006	0.61	0.501	+++
12	MDA-MB-468	乳腺癌		吉西他滨	0.0025	7.14	1.26	-
13	MT3	乳腺癌	K-ras G12D	吉西他滨	0.002	0.77	0.99	-
14	Cal-120	乳腺癌		吉西他滨	0.4	2.26	0.47	+++
15	ZR75-1	乳腺癌	PTEN neg	吉西他滨	0.01	0.78	1.06	+/-
16	C-33A	子宫颈	PTEN neg	5-FU	3.84	2.5	1.27	-
17	ME-180	子宫颈	PI3K E545K	5-FU	4	0.6	0.87	+
18	SiHa	子宫颈		5-FU	47	2.5	1.25	-
19	C-33A	子宫颈	PTEN neg	多西他赛	0.001	2.5	0.84	+
20	ME-180	子宫颈	PI3K E545K	多西他赛	0.0017	0.6	0.67	++
21	SiHa	子宫颈		多西他赛	0.0025	2.5	0.98	-

式IIa化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

22	ME-180	子宫颈	PI3K E545K	吉西他滨	0.035	0.6	0.54	+++
23	C-33A	子宫颈	PTEN neg	吉西他滨	0.0025	2.5	1.09	-
24	SiHa	子宫颈		吉西他滨	0.0025	2.5	0.59	+++
25	ECC-1	子宫内腹	PTEN neg	5-FU	2	2.5	0.75	++
26	ECC-1	子宫内腹	PTEN neg	多西他赛	0.0009	2.5	0.66	++
27	ECC-1	子宫内腹	PTEN neg	吉西他滨	0.0113	2.5	1.17	-
28	HEC-1-A	子宫内腹		5-FU	2.5	1.25	0.8	+
29	HEC-1-A	子宫内腹		多西他赛	0.0012	1.25	0.66	++
30	HEC-1-A	子宫内腹		吉西他滨	0.05	1.25	0.81	+
31	SK-JT-1B	子宫内腹	PTEN neg	5-FU	1.3	0.48	0.54	+++
32	SK-JT-1B	子宫内腹	PTEN neg	多西他赛	0.0005	0.48	0.46	+++
33	SK-JT-1B	子宫内腹	PTEN neg	吉西他滨	0.0019	0.48	0.76	++
34	U87	胶质瘤	PTEN neg	替美唑胺	11.7	0.9	0.672	++
35	G402	胶质瘤		5-FU			0.74	++
36	G402	胶质瘤		多西他赛			0.47	+++
37	G402	胶质瘤		吉西他滨			0.54	+++
38	537MEL	黑色素瘤	PTEN neg	5-FU	>50	2.5	1.25	-
39	537MEL	黑色素瘤	PTEN neg	多西他赛	0.0125	2.5	0.51	+++
40	537MEL	黑色素瘤	PTEN neg	吉西他滨	0.0045	2.5	0.96	-
41	PC-3	前列腺		吉西他滨	0.01	1.53	0.703	++

图 1B

式Ib化合物和各种化疗剂的联合的体外细胞增殖测定

实验	细胞系	肿瘤类型	Ras突变	化疗剂	化疗剂 EC50	化合物 IIa EC50	联合指数 (CI)	协同作用
1	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	多西他赛	0.0016	0.232	0.32	+++
2	MDA-MB-361	乳腺癌	PI3K E545K	吉西他滨	0.148	0.232	0.54	++
3	C-33A	子宫颈	PTEN neg	5-FU	3.84	1.36	0.9	+
4	ME-180	子宫颈	PI3K E545K	5-FU	4	0.6	0.87	+
5	SiHa	子宫颈		5-FU	47	0.62	1.15	-
6	ME-180	子宫颈	PI3K E545K	多西他赛	0.0017	0.14	0.74	+
7	C-33A	子宫颈	PTEN neg	多西他赛	0.001	1.36	0.73	+
8	SiHa	子宫颈		多西他赛	0.0026	0.62	0.93	+
9	SiHa	子宫颈		吉西他滨	0.0025	0.62	0.47	++
10	ME-180	子宫颈	PI3K E545K	吉西他滨	0.035	0.6	0.54	++
11	C-33A	子宫颈	PTEN neg	吉西他滨	0.0025	1.36	0.65	++
12	ECC-1	子宫内膜	PTEN neg	5-FU	2	0.34	0.66	++
13	ECC-1	子宫内膜	PTEN neg	多西他赛	0.0009	0.34	0.8	+
14	ECC-1	子宫内膜	PTEN neg	吉西他滨	0.0113	0.34	0.83	+
15	HEC-1-A	子宫内膜		5-FU	2.5	0.3	0.94	+
16	HEC-1-A	子宫内膜		多西他赛	0.0012	0.3	0.77	+
17	HEC-1-A	子宫内膜		吉西他滨	0.05	0.3	0.7	+
18	SK-JT-1B	子宫内膜	PTEN neg	5-FU	1.3	0.11	0.87	+
19	SK-JT-1B	子宫内膜	PTEN neg	多西他赛	0.0005	0.11	0.59	++
20	SK-JT-1B	子宫内膜	PTEN neg	吉西他滨	0.0019	0.11	0.51	++
21	G402	胶质瘤		5-FU			1.05	-
22	G402	胶质瘤		多西他赛			0.67	++

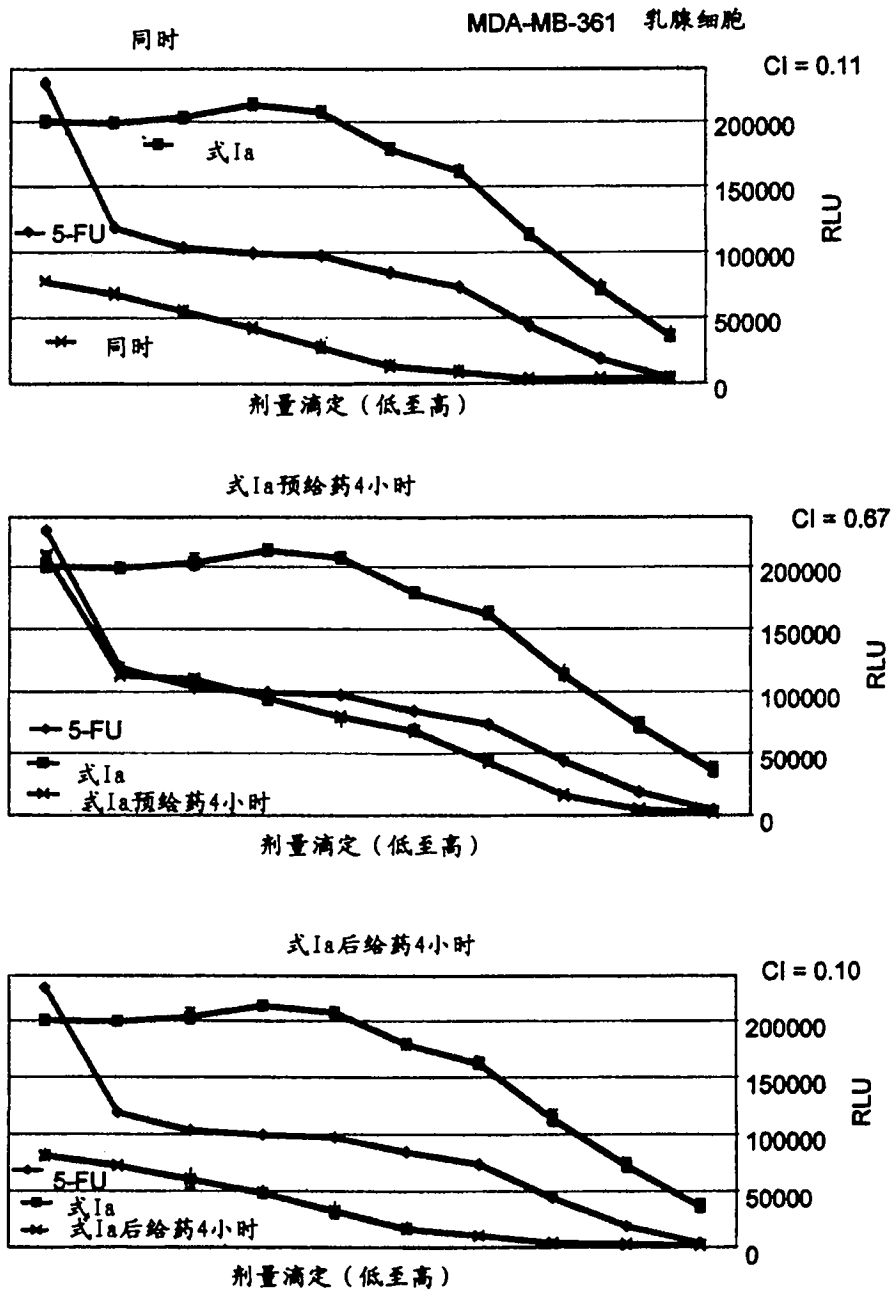


图 2

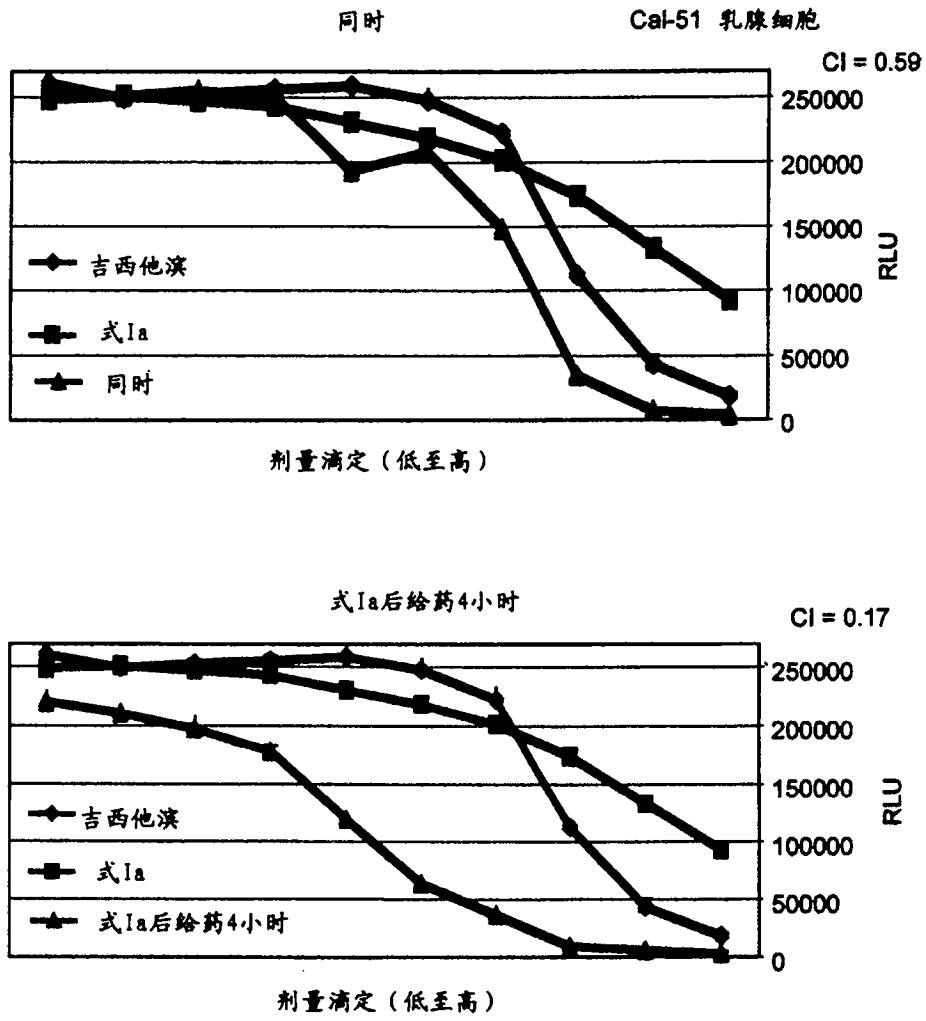


图 3

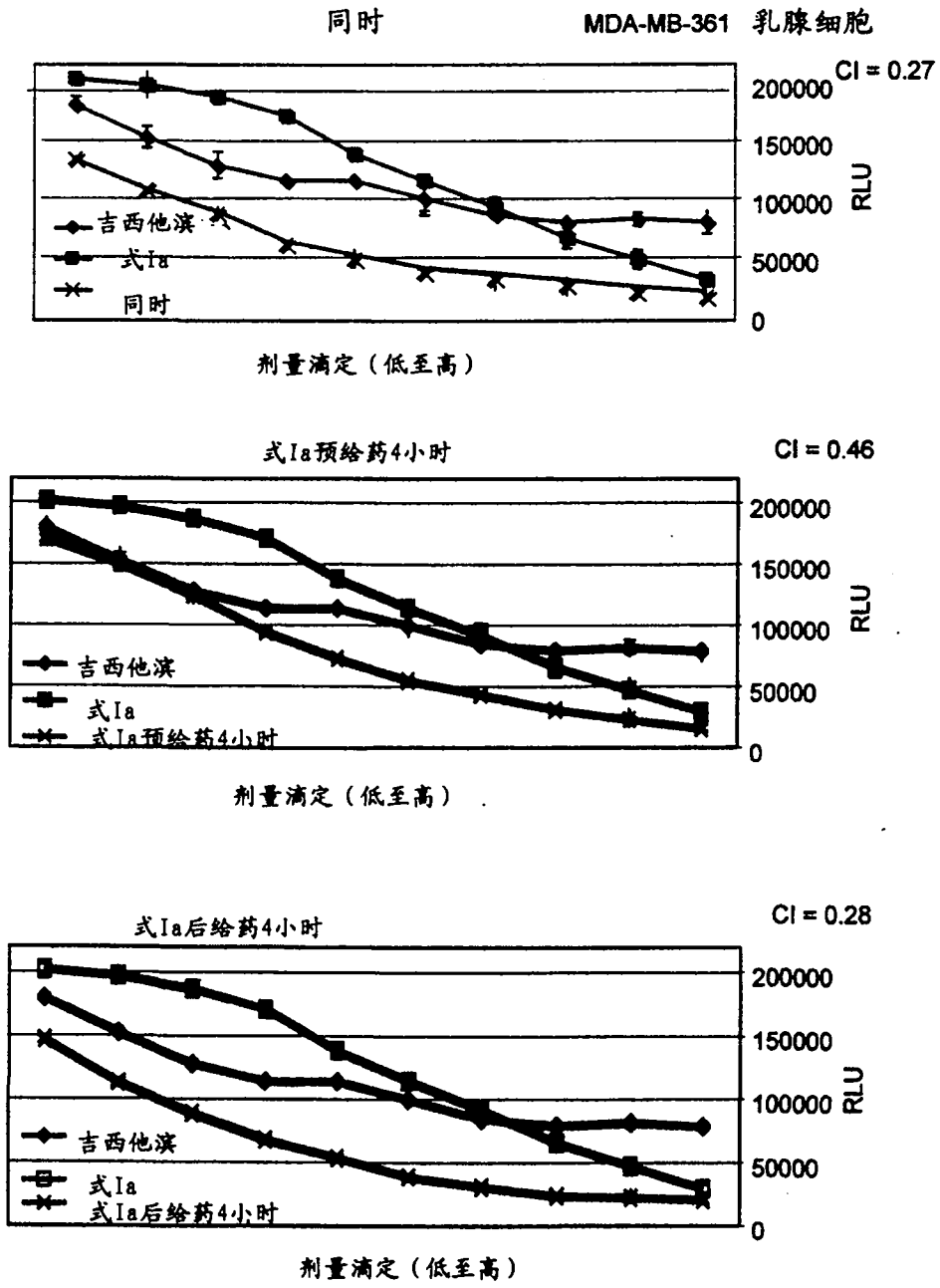


图 4

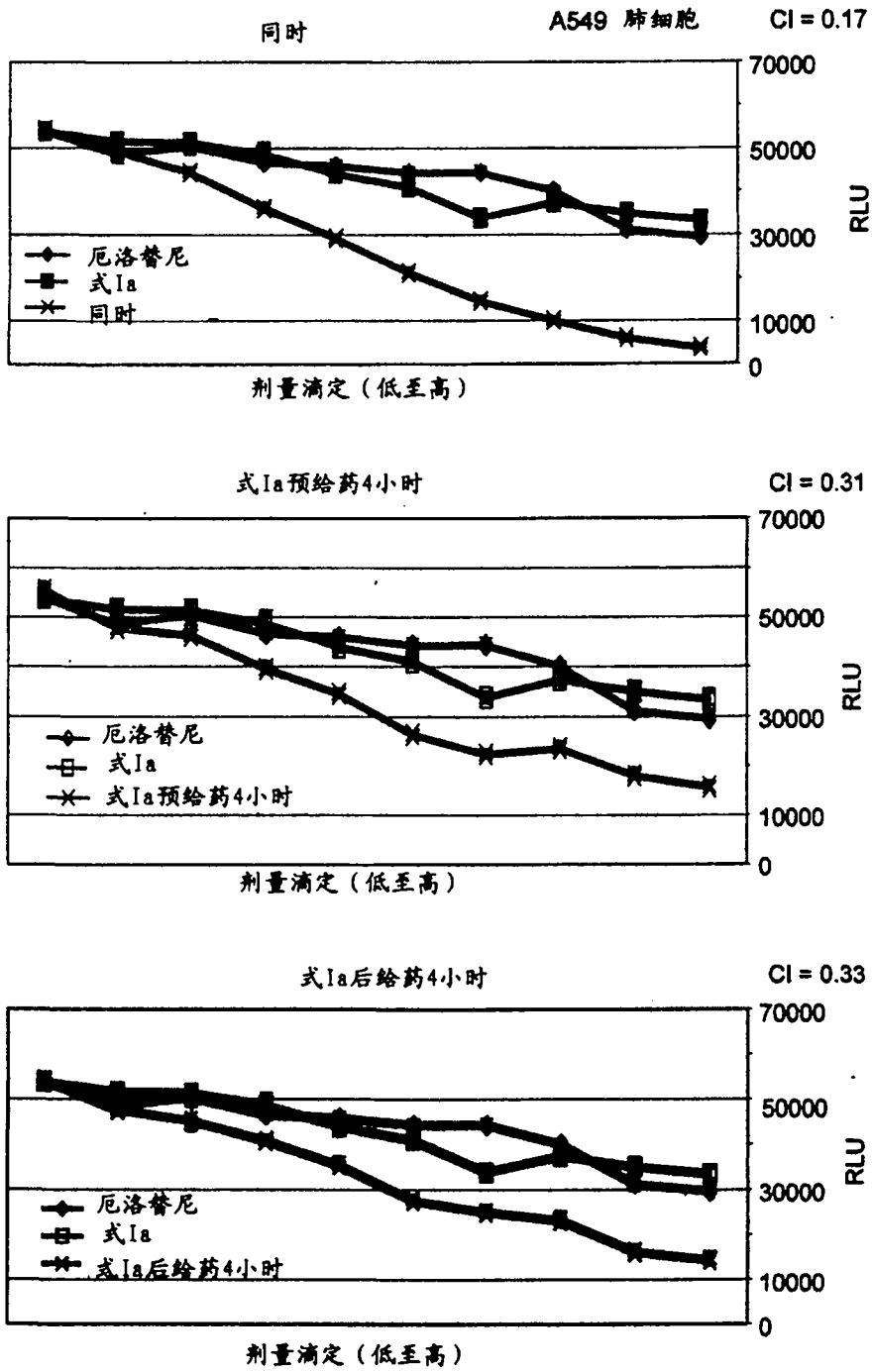


图 5

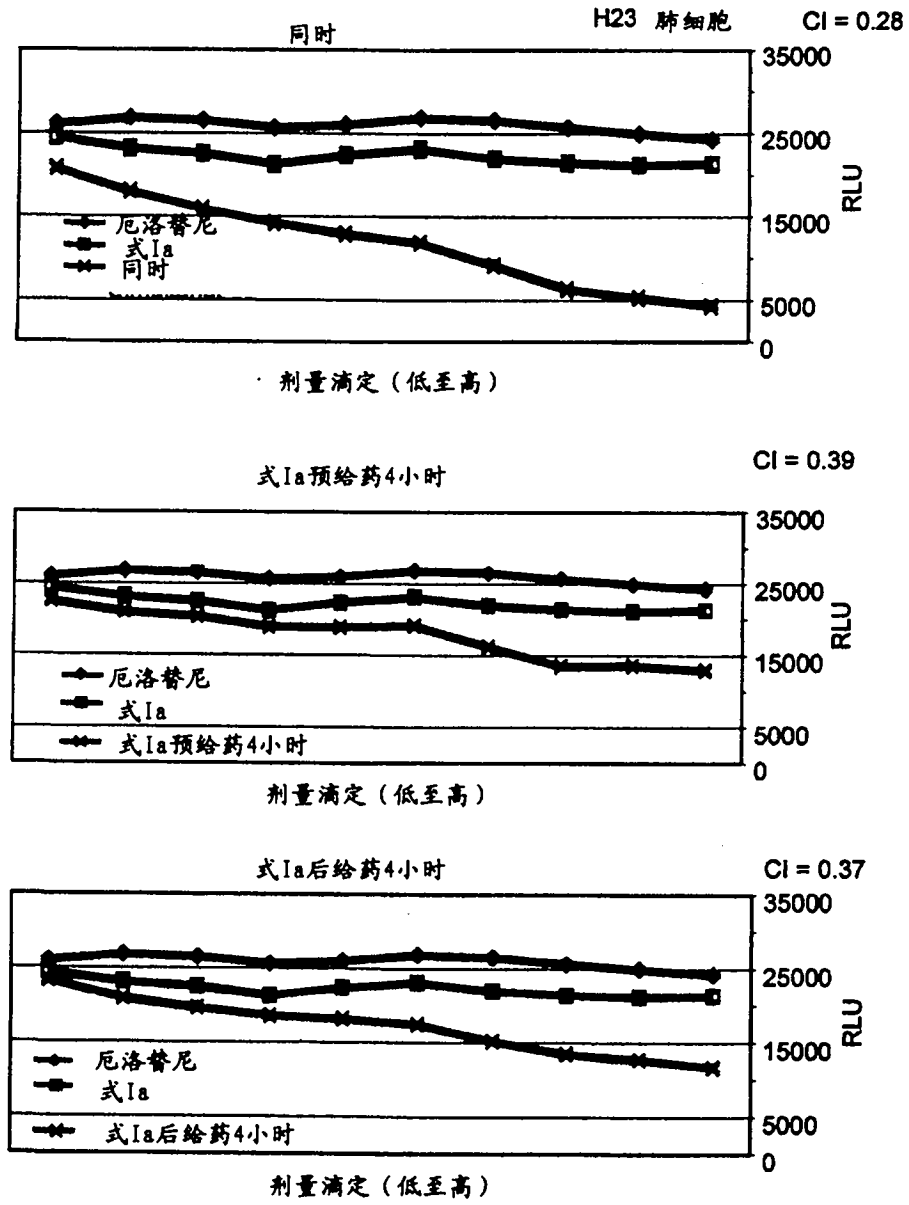


图 6

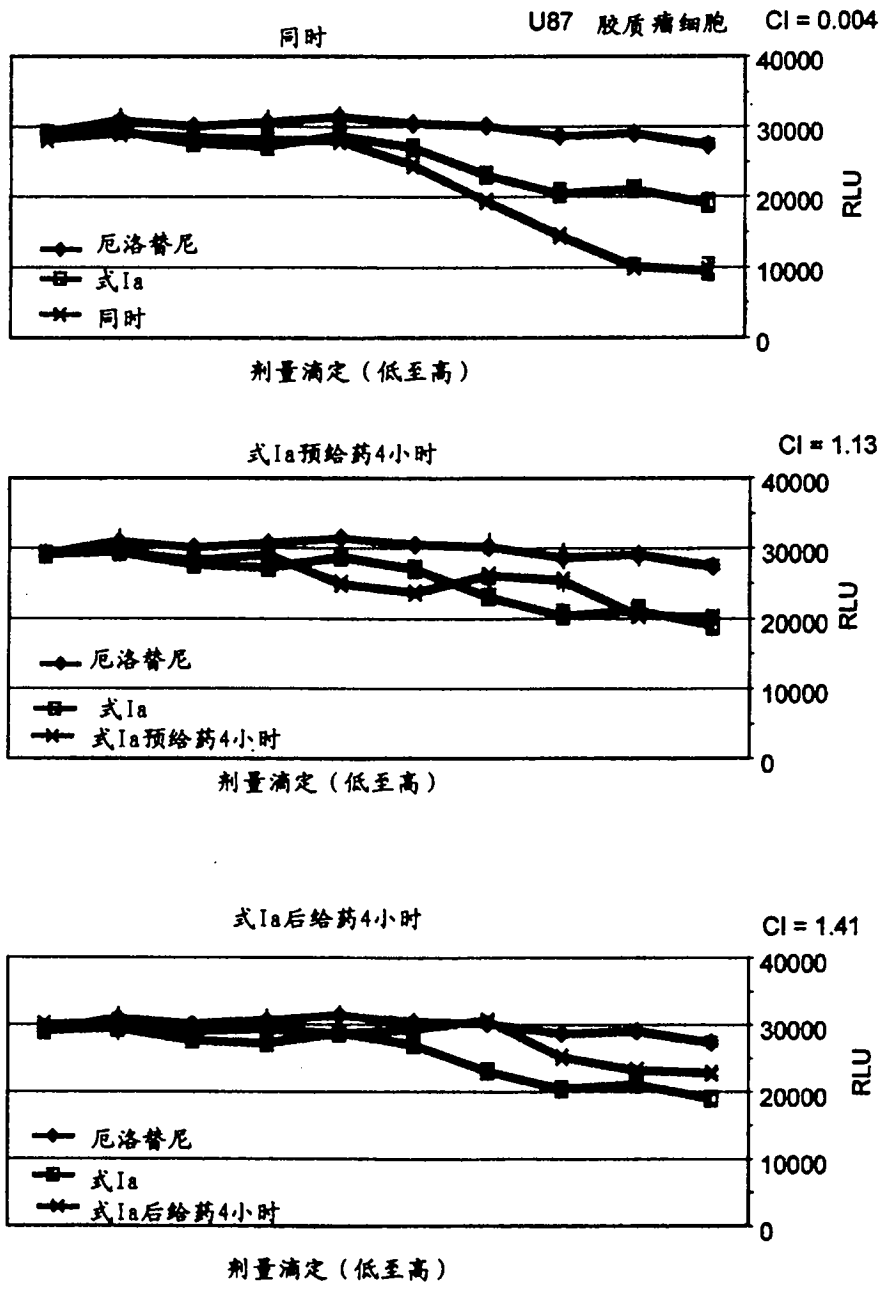


图 7

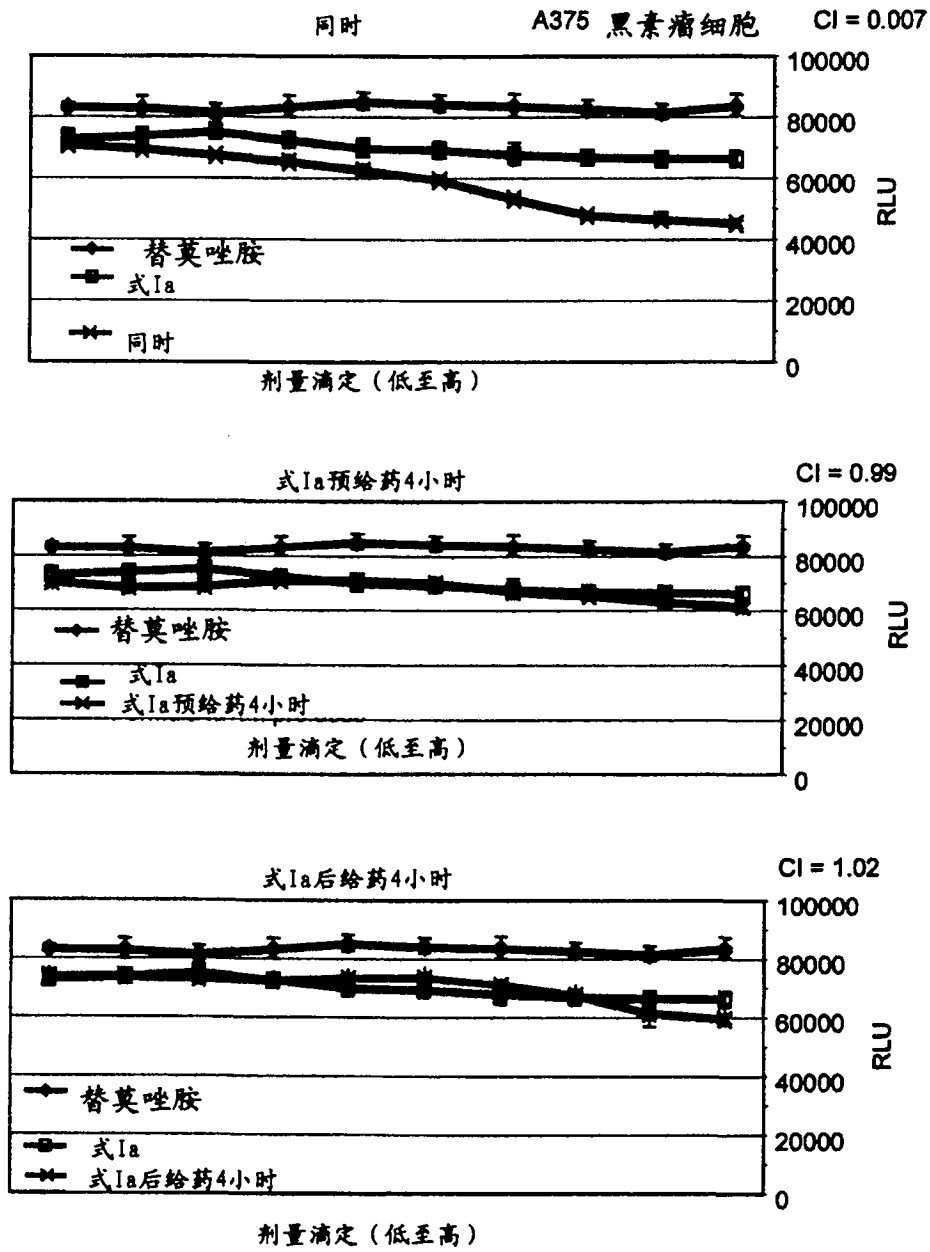


图 8

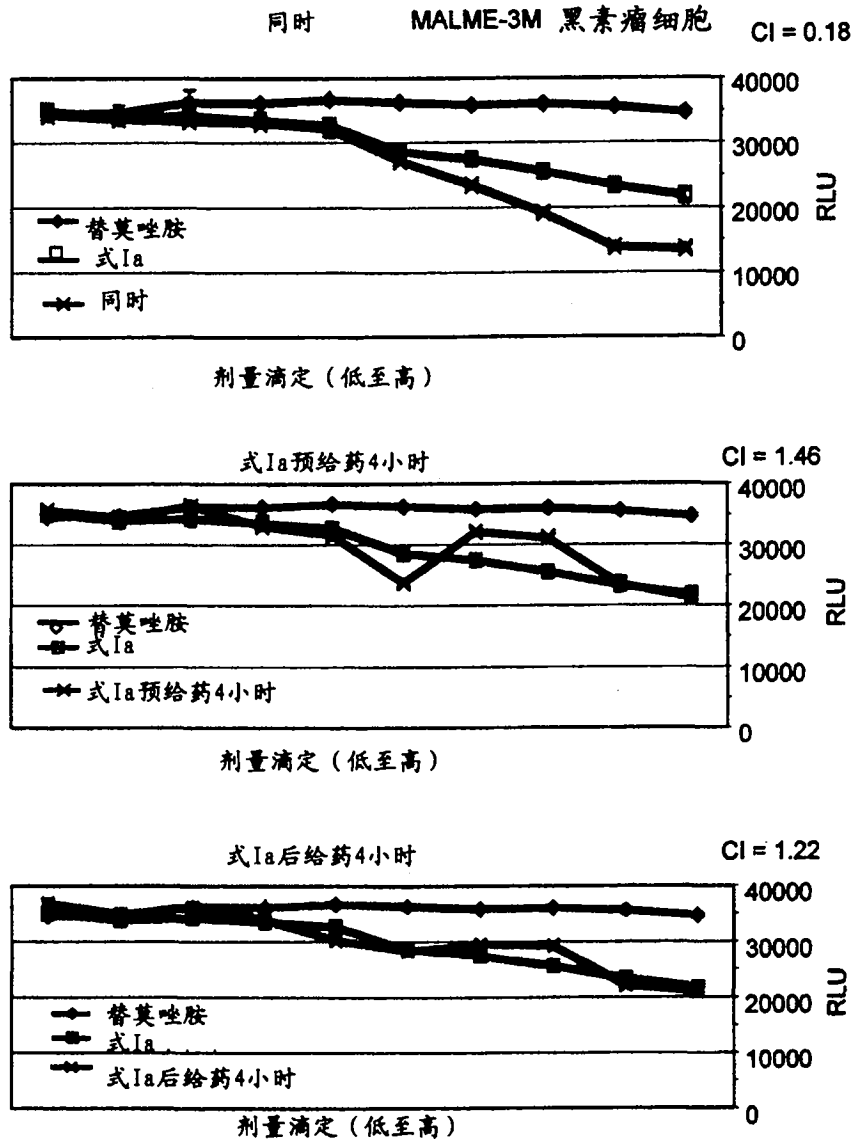


图 9

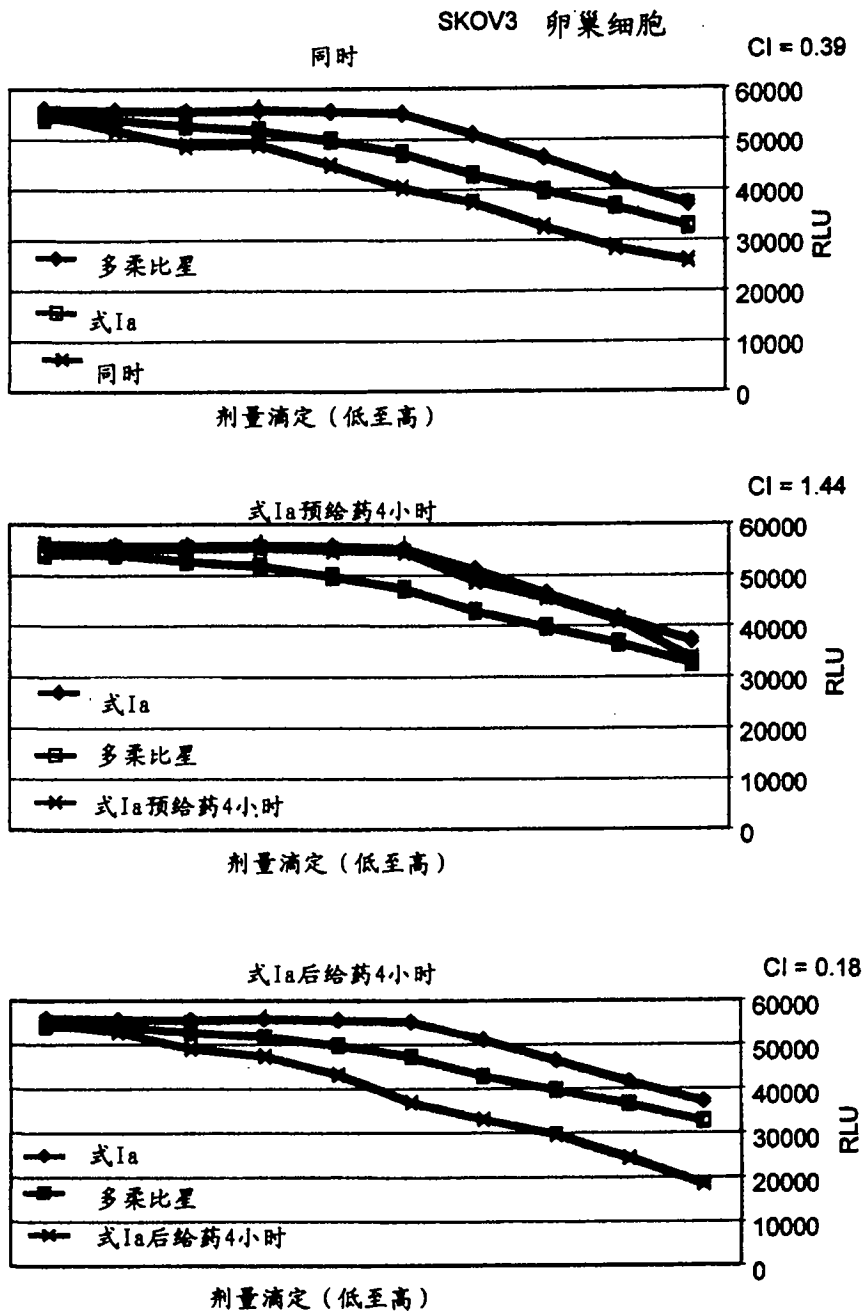


图 10

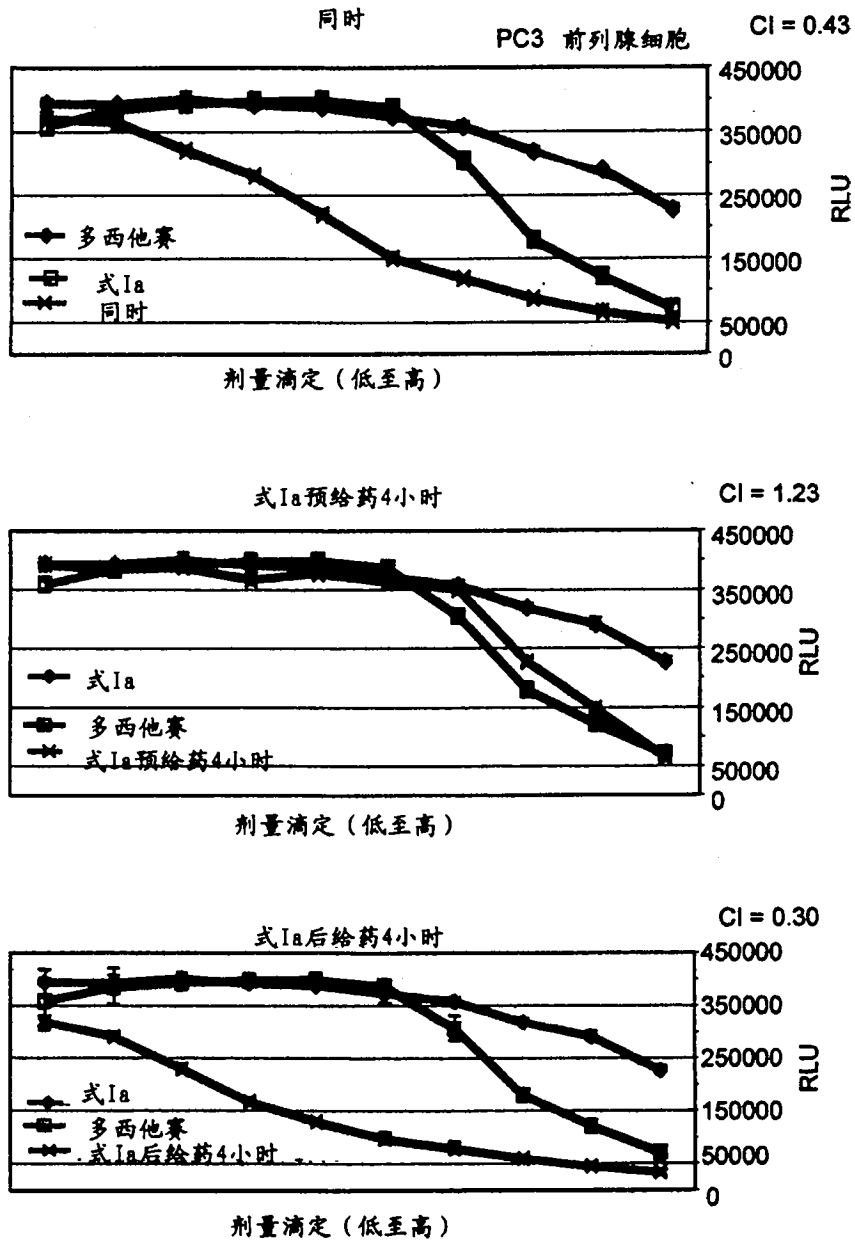


图 11

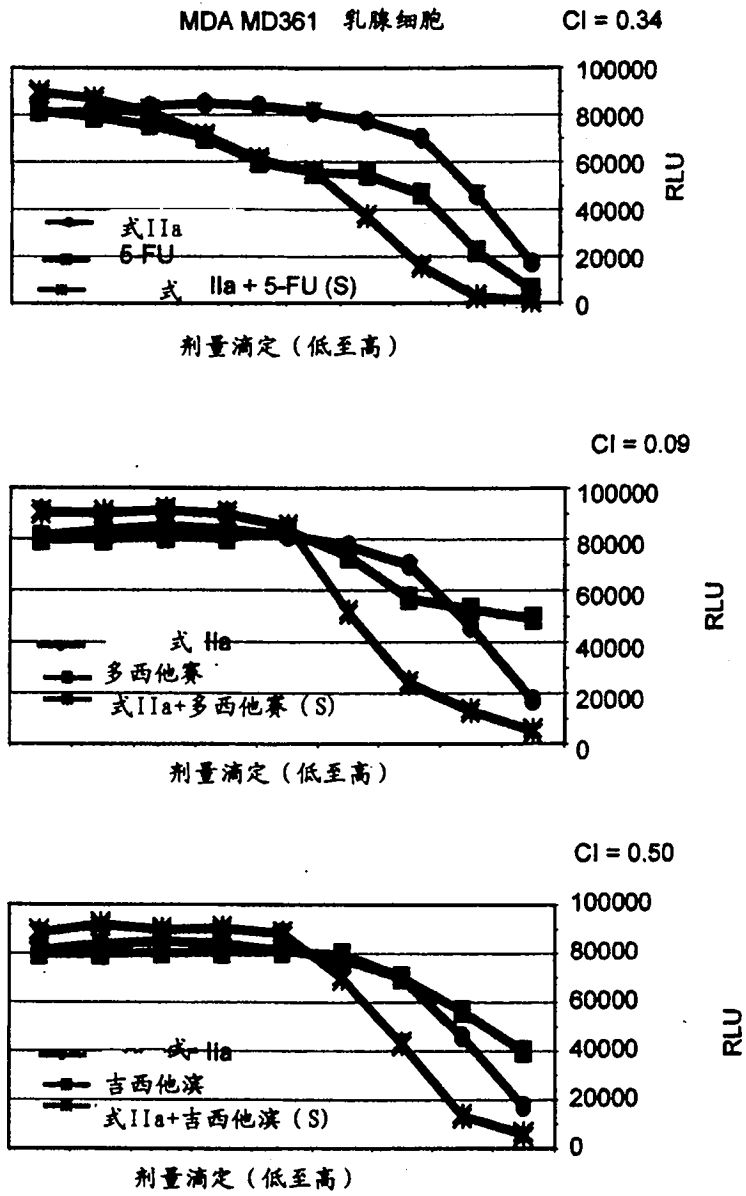


图 12

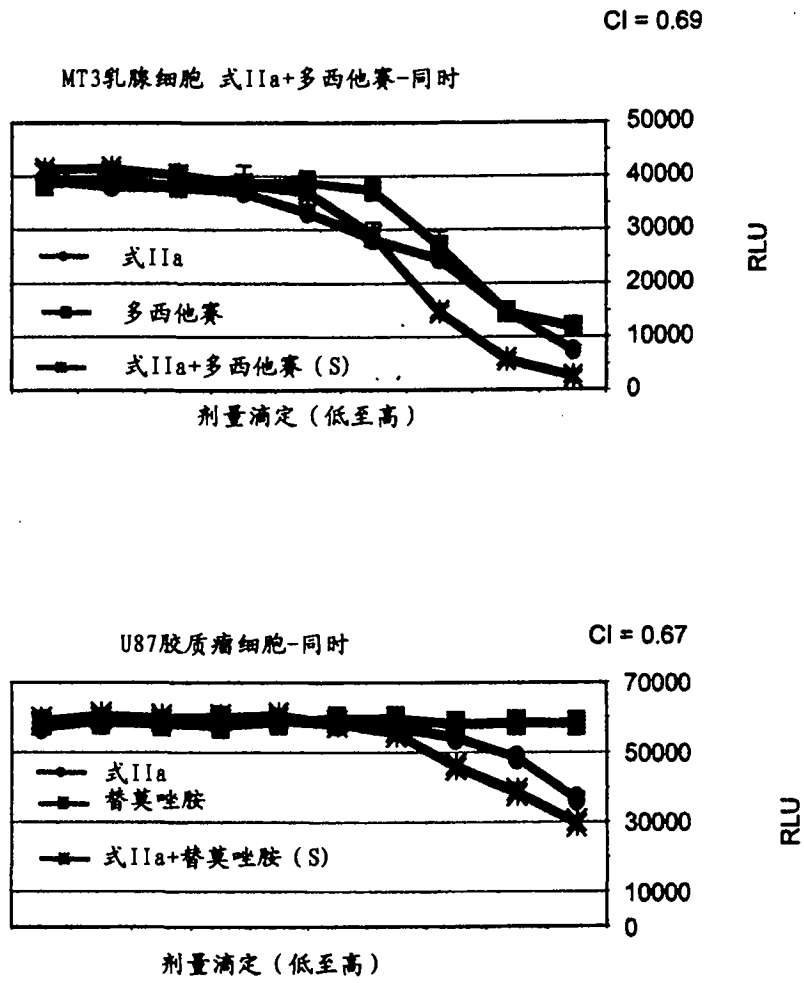


图 13

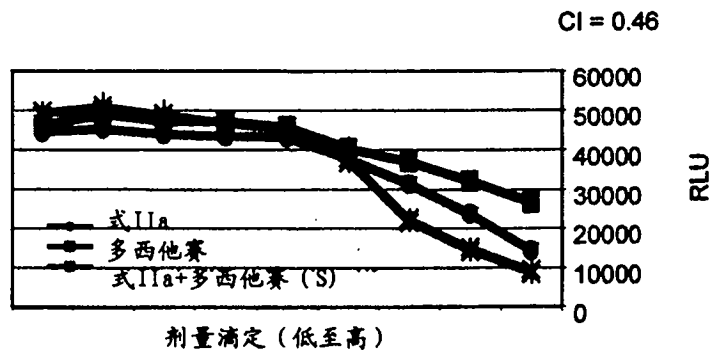
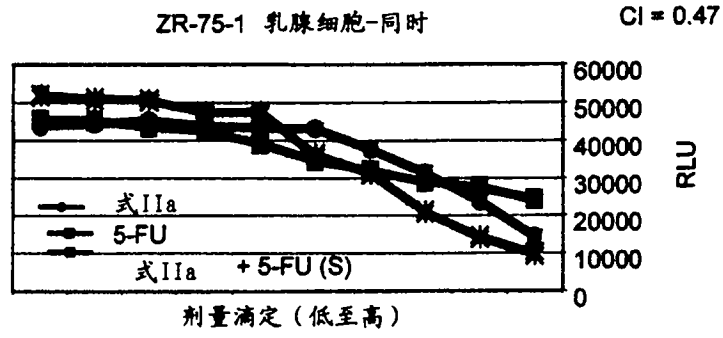


图 14

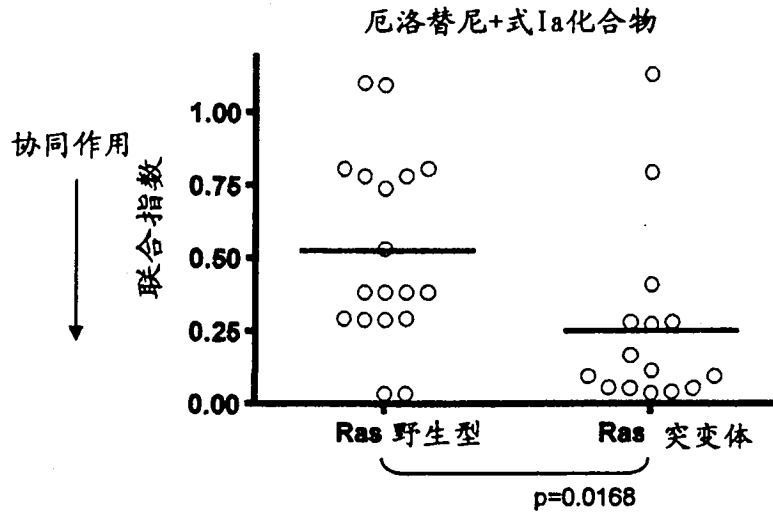


图 15

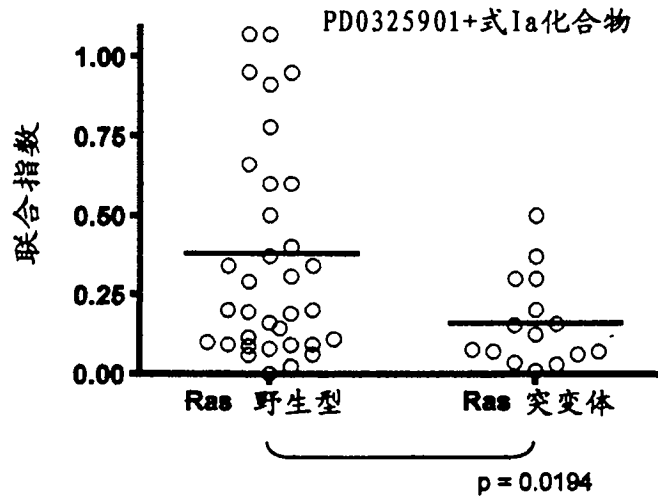


图 16

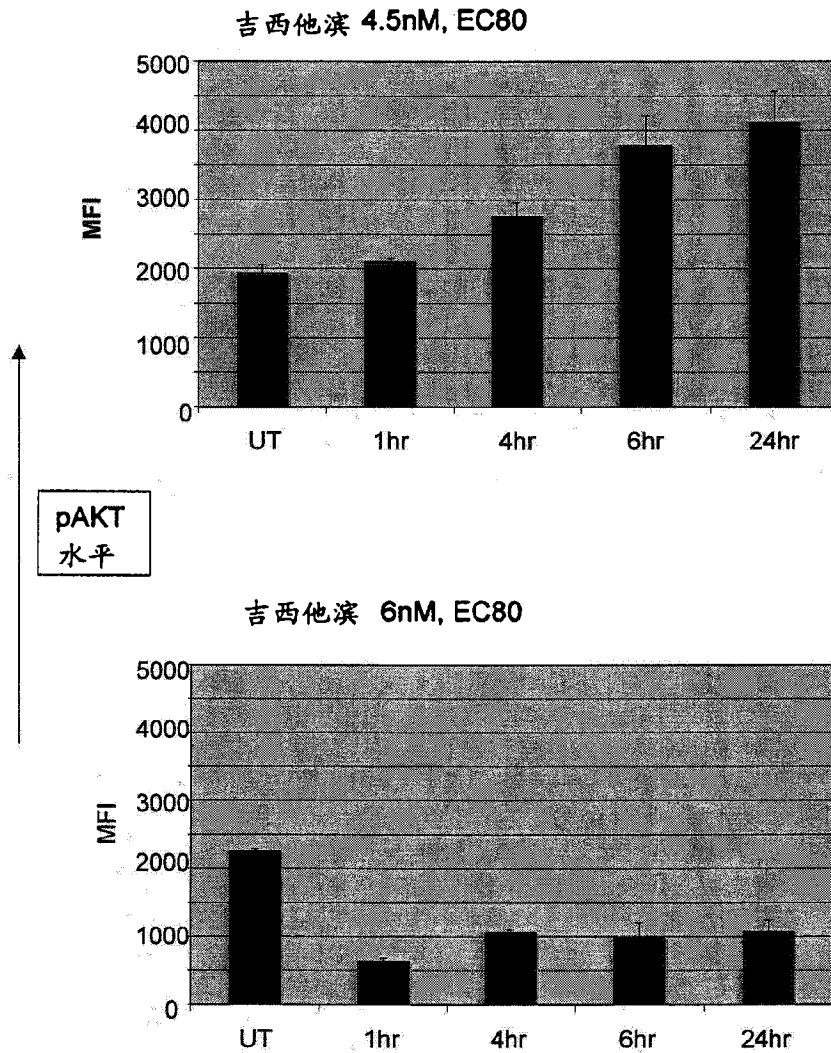


图 17

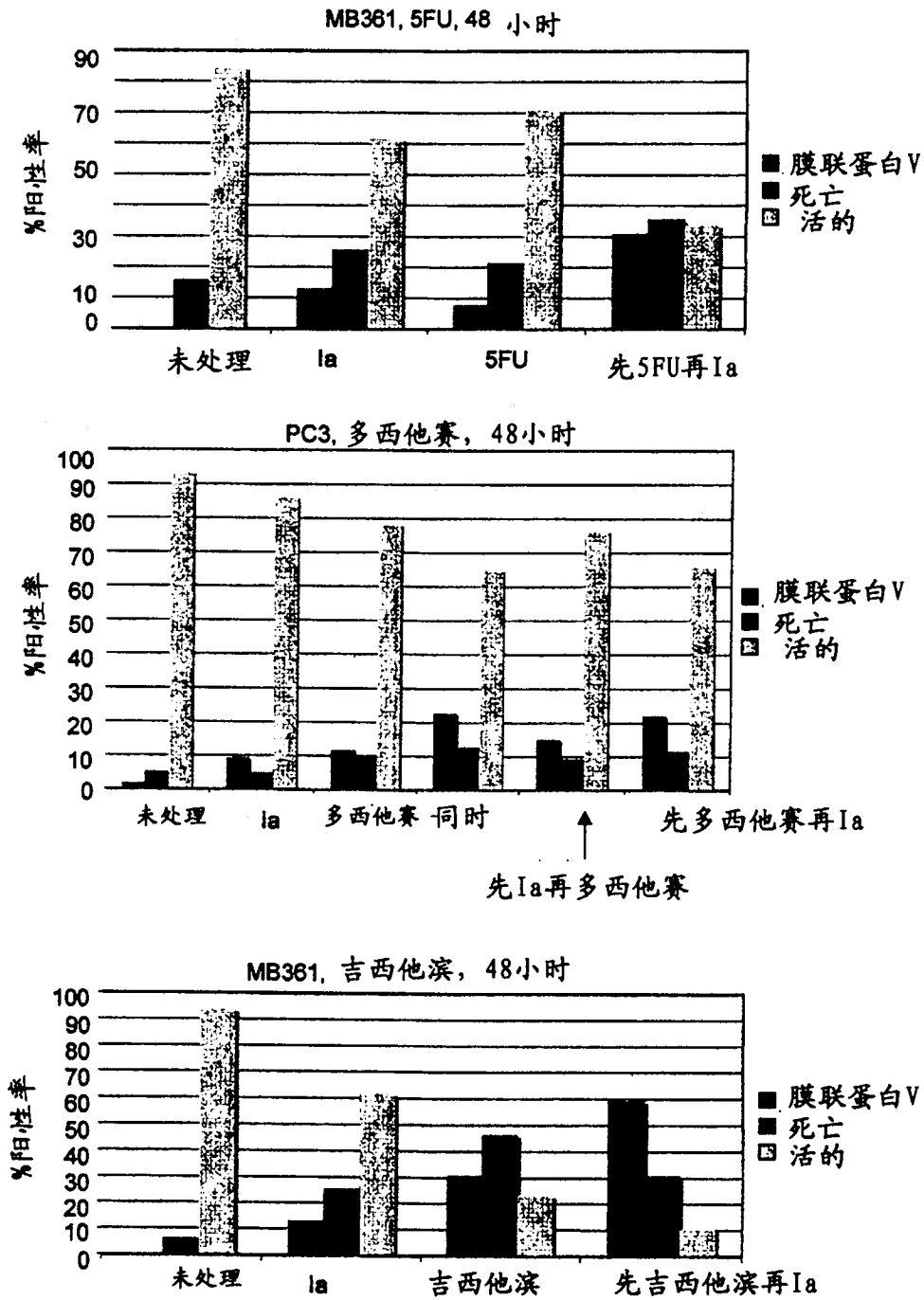


图 19

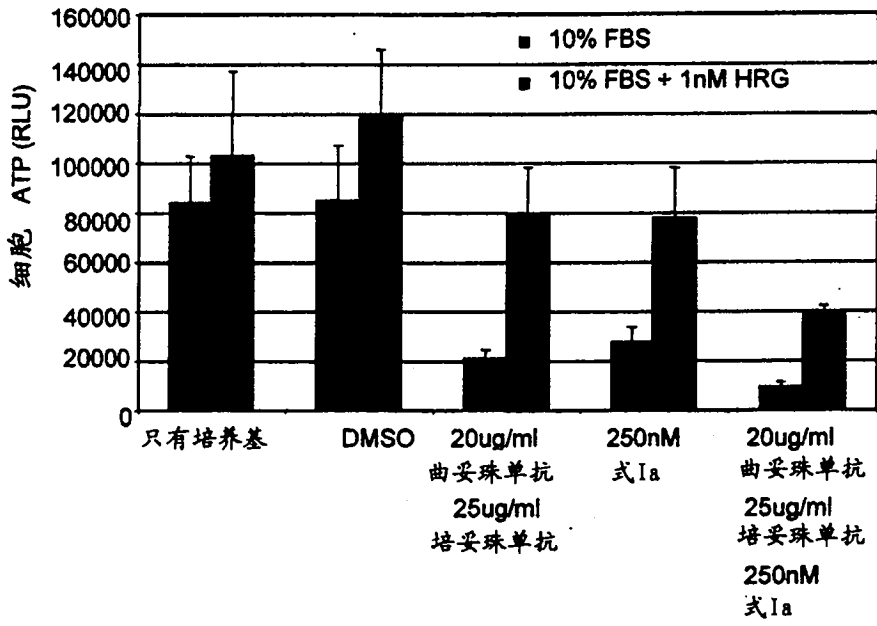


图 20

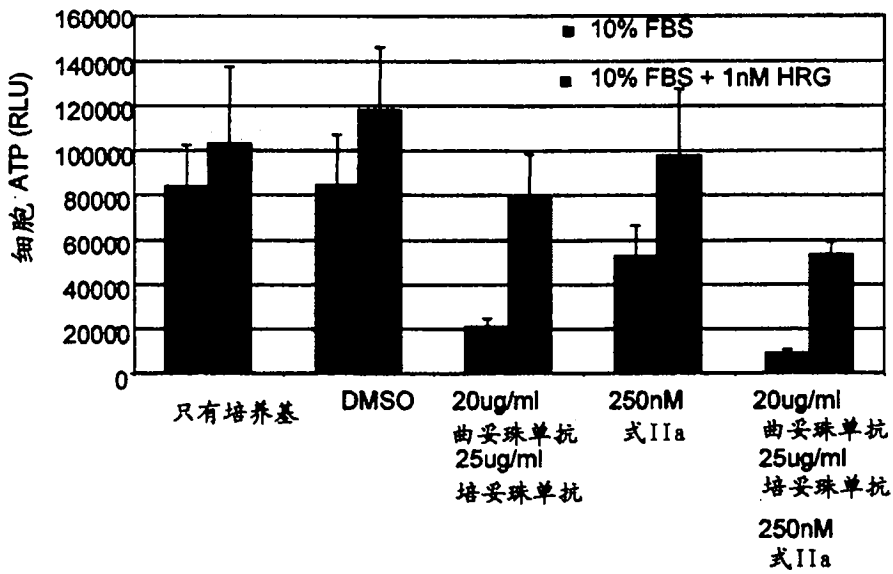


图 21

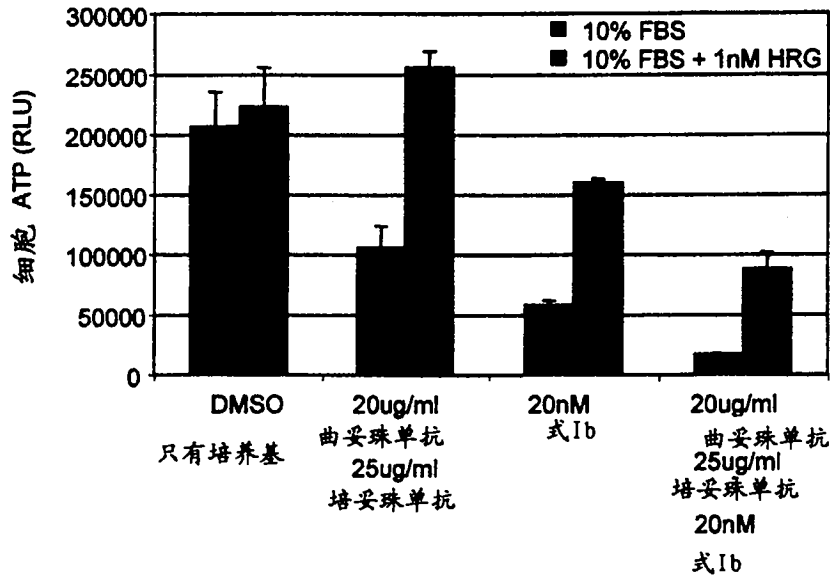


图 21A

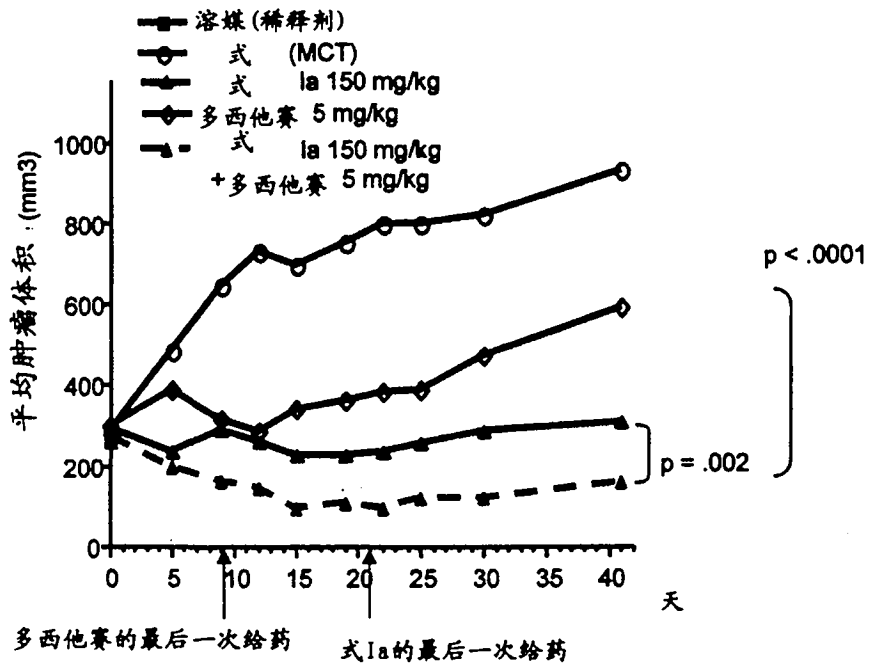


图 22

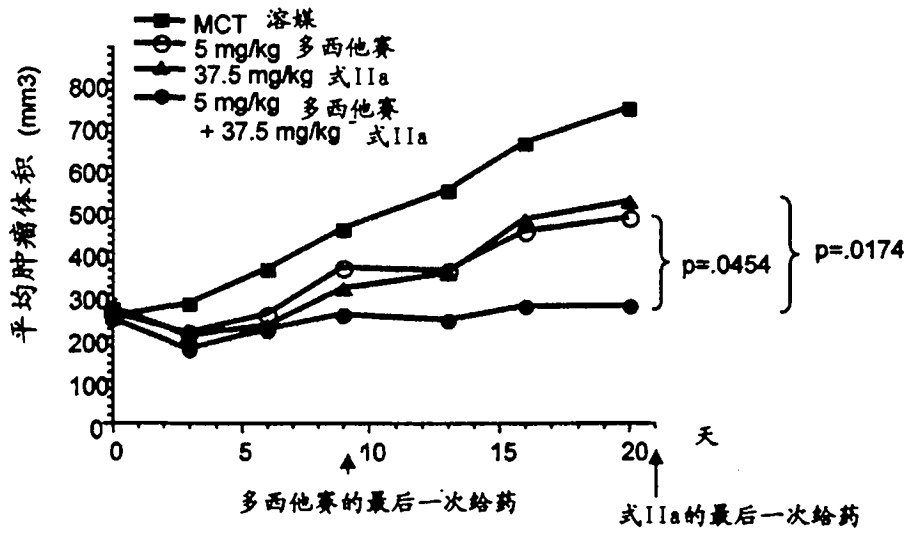


图 23

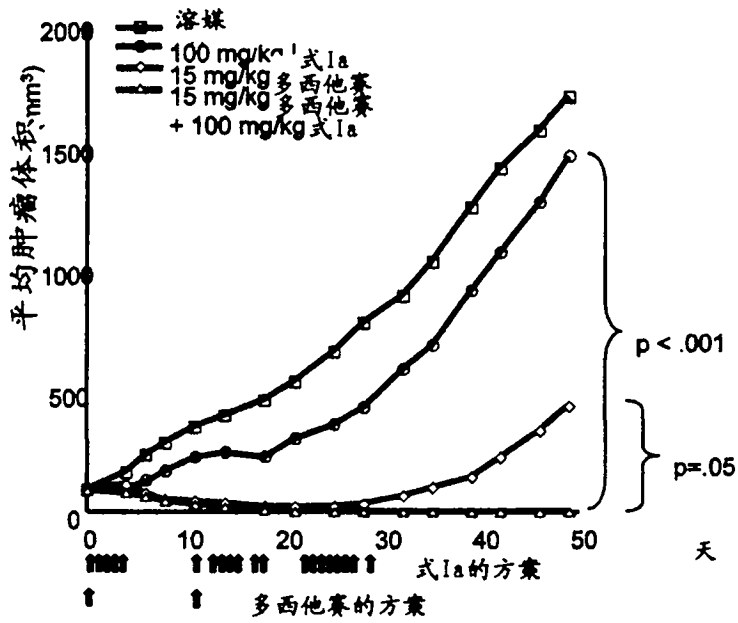


图 24

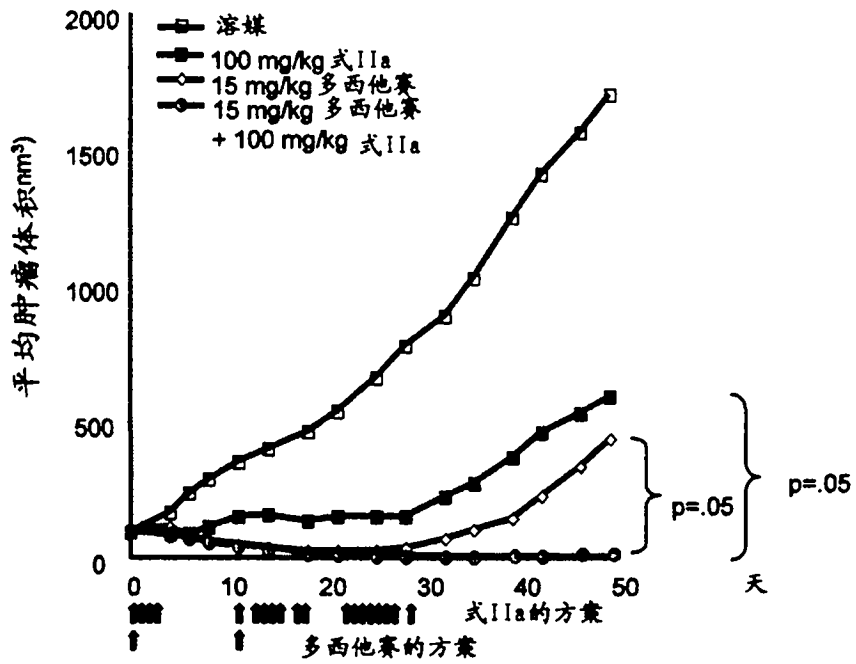


图 25

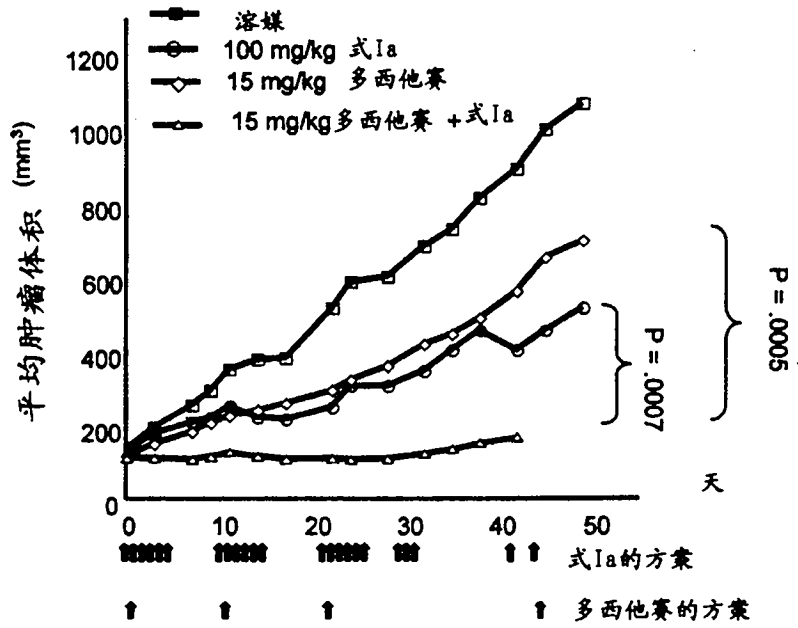


图 26

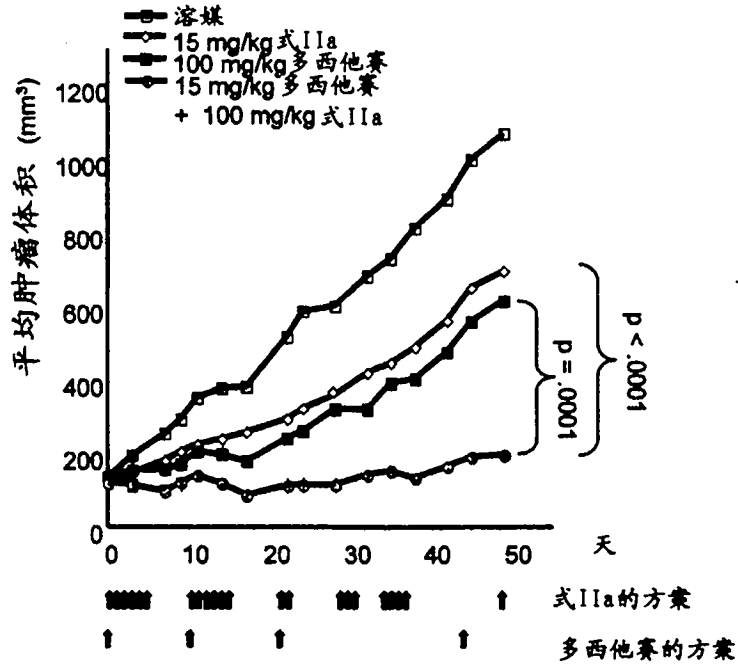


图 27

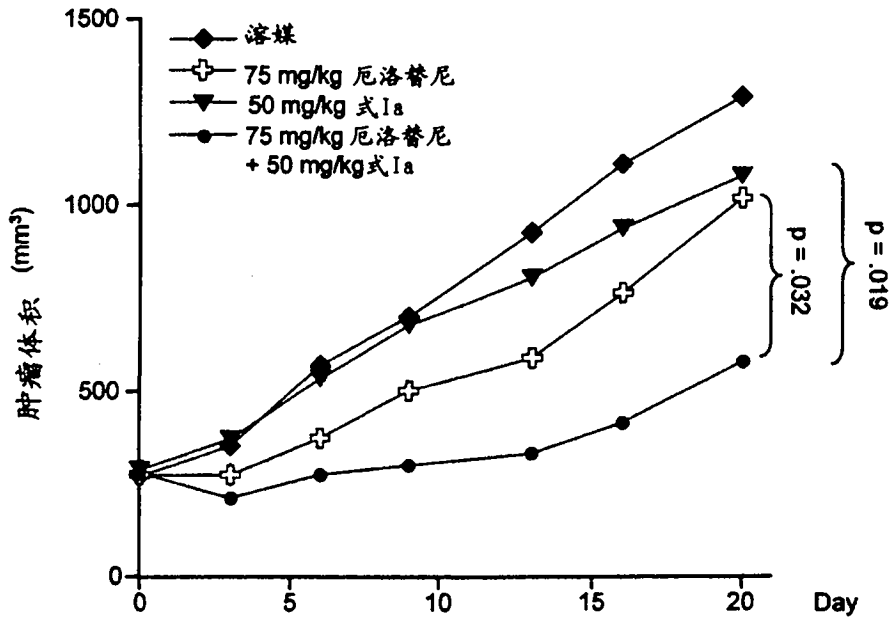


图 28

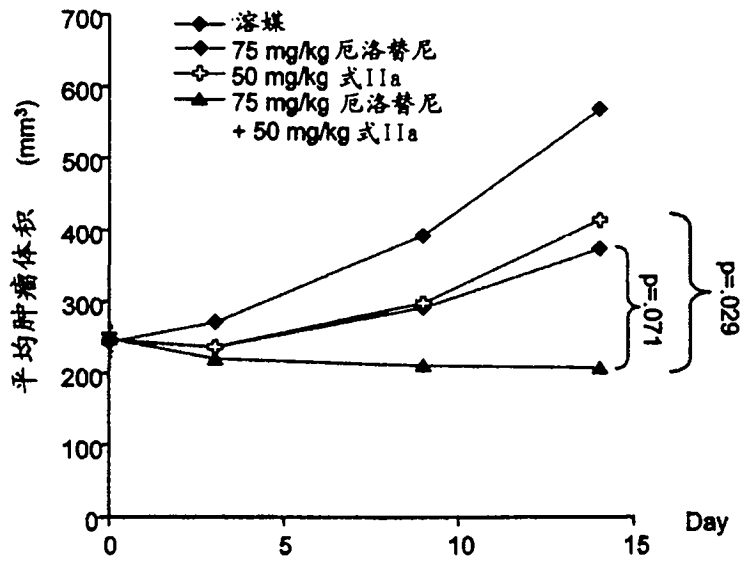


图 29

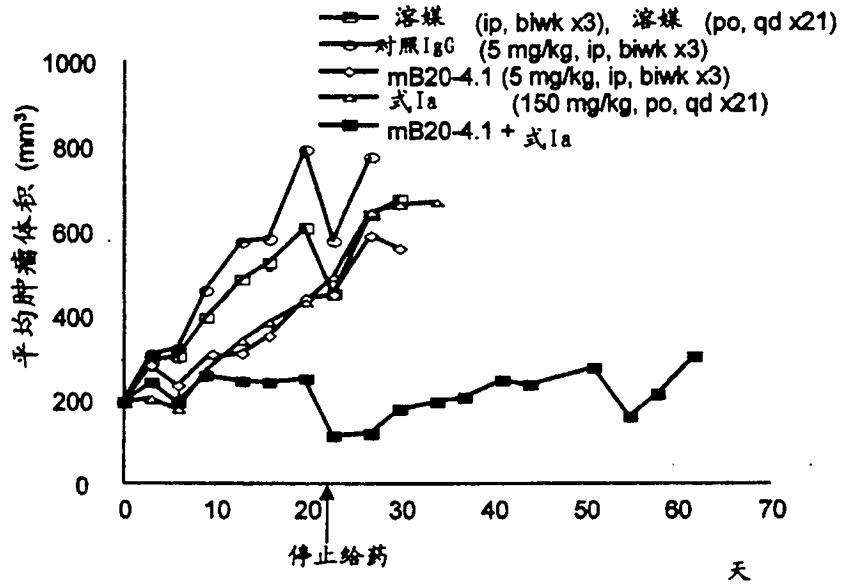


图 30

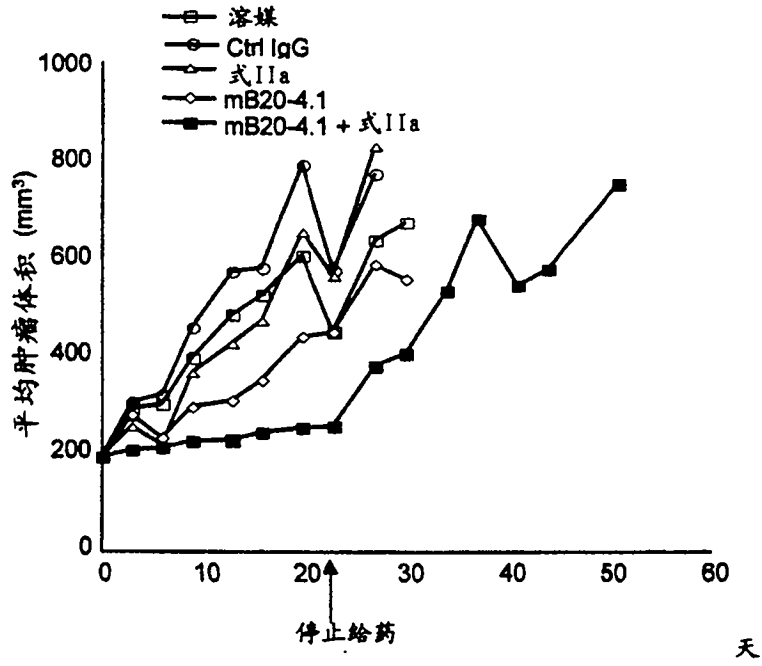


图 31

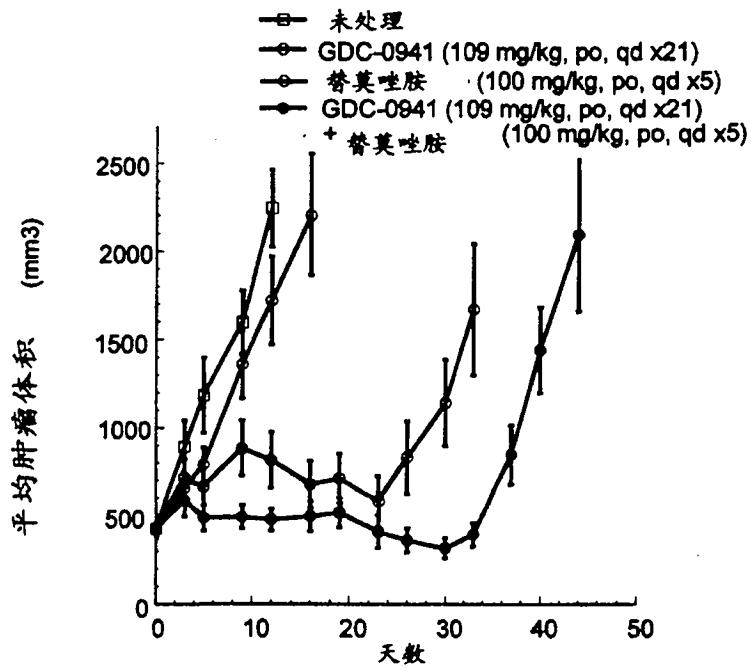


图 32

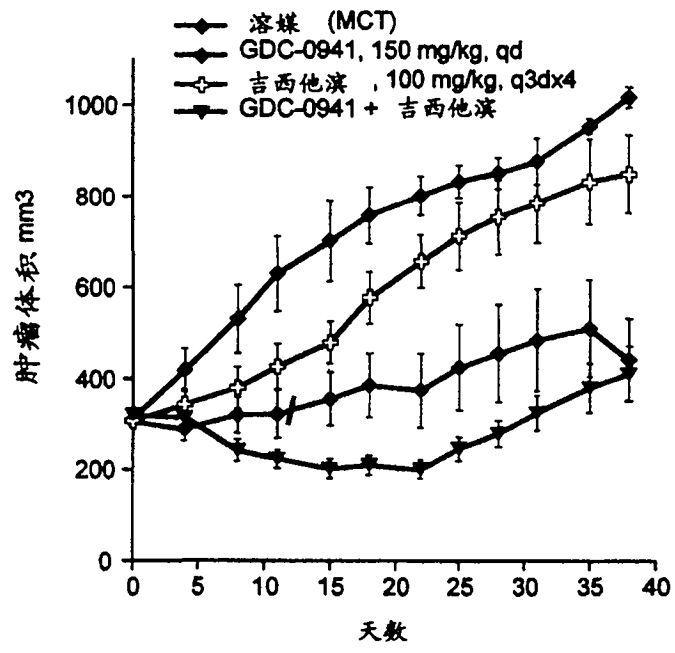


图 33

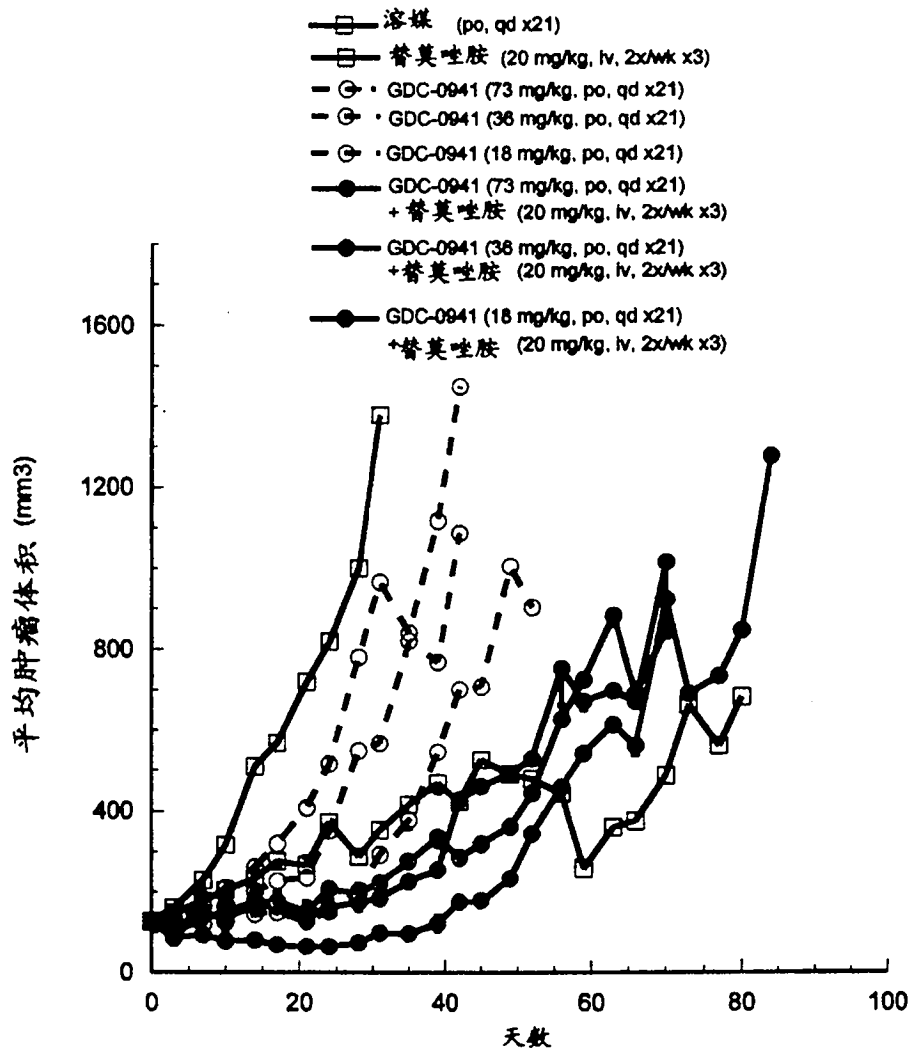


图 34

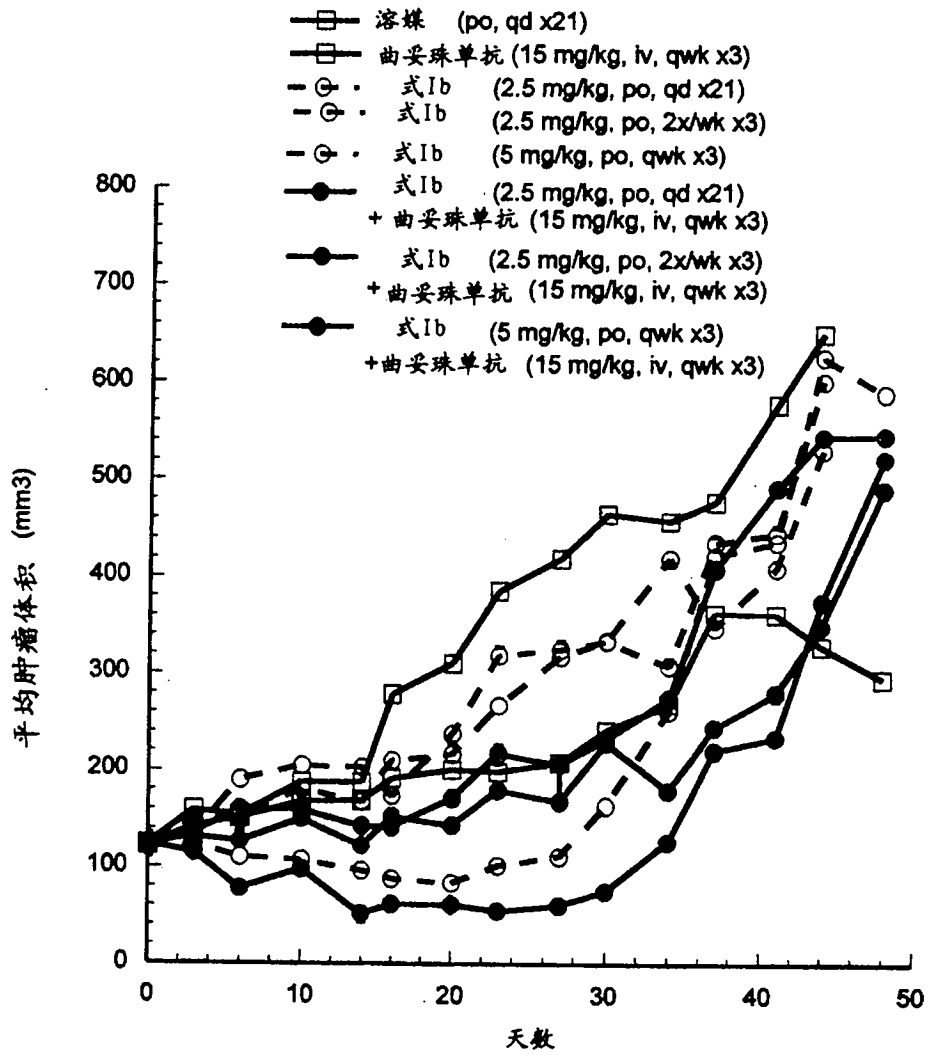


图 35

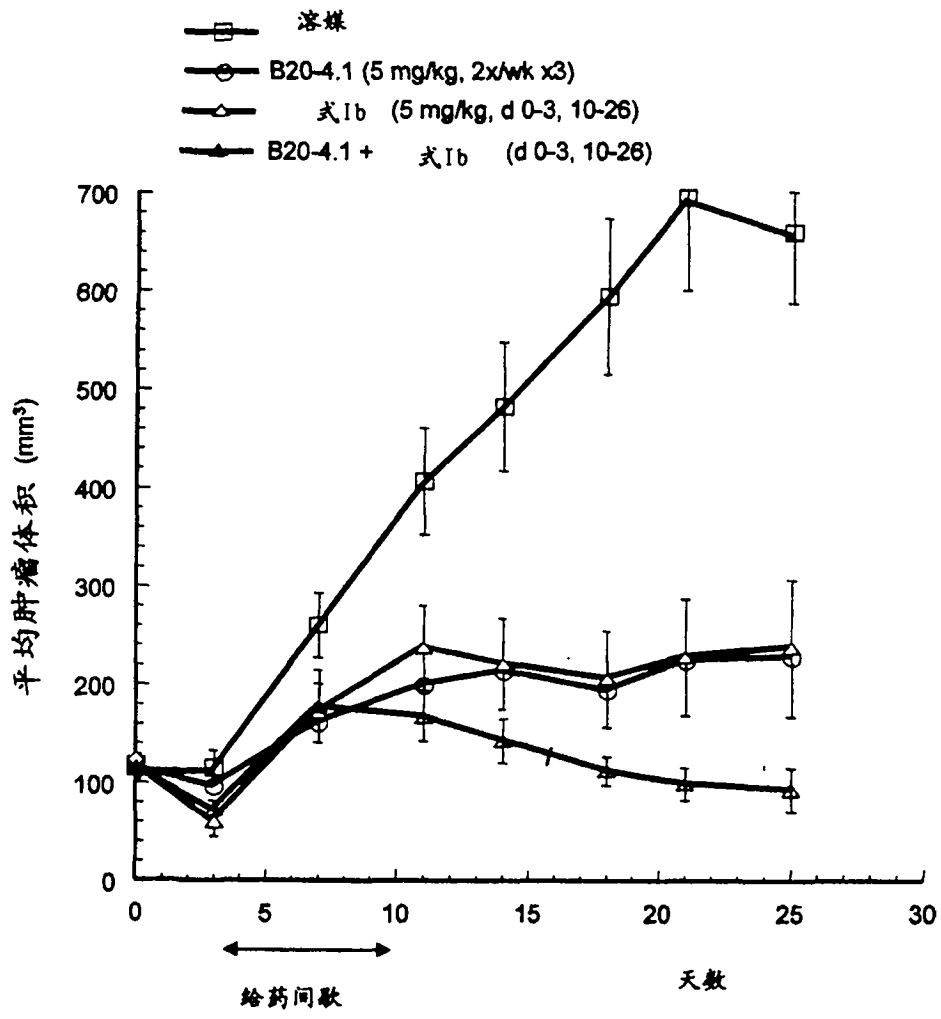


图 36

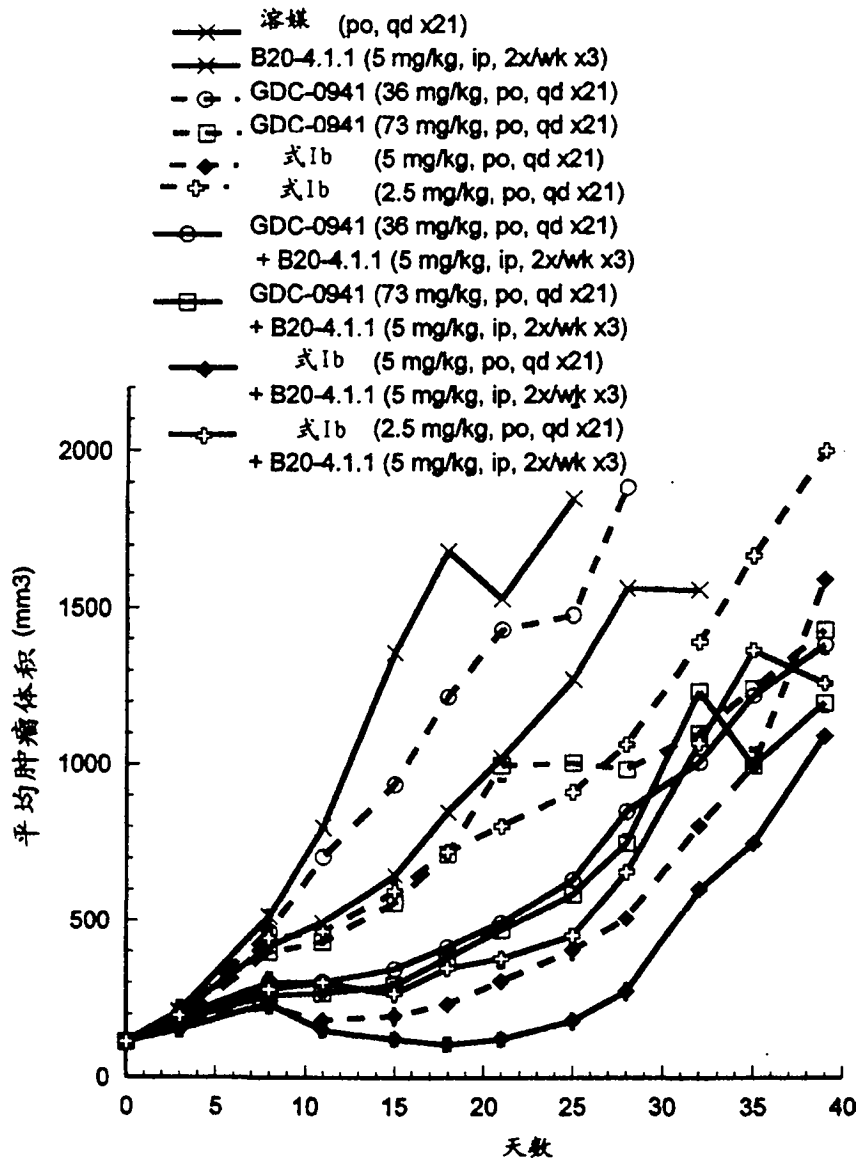


图 37

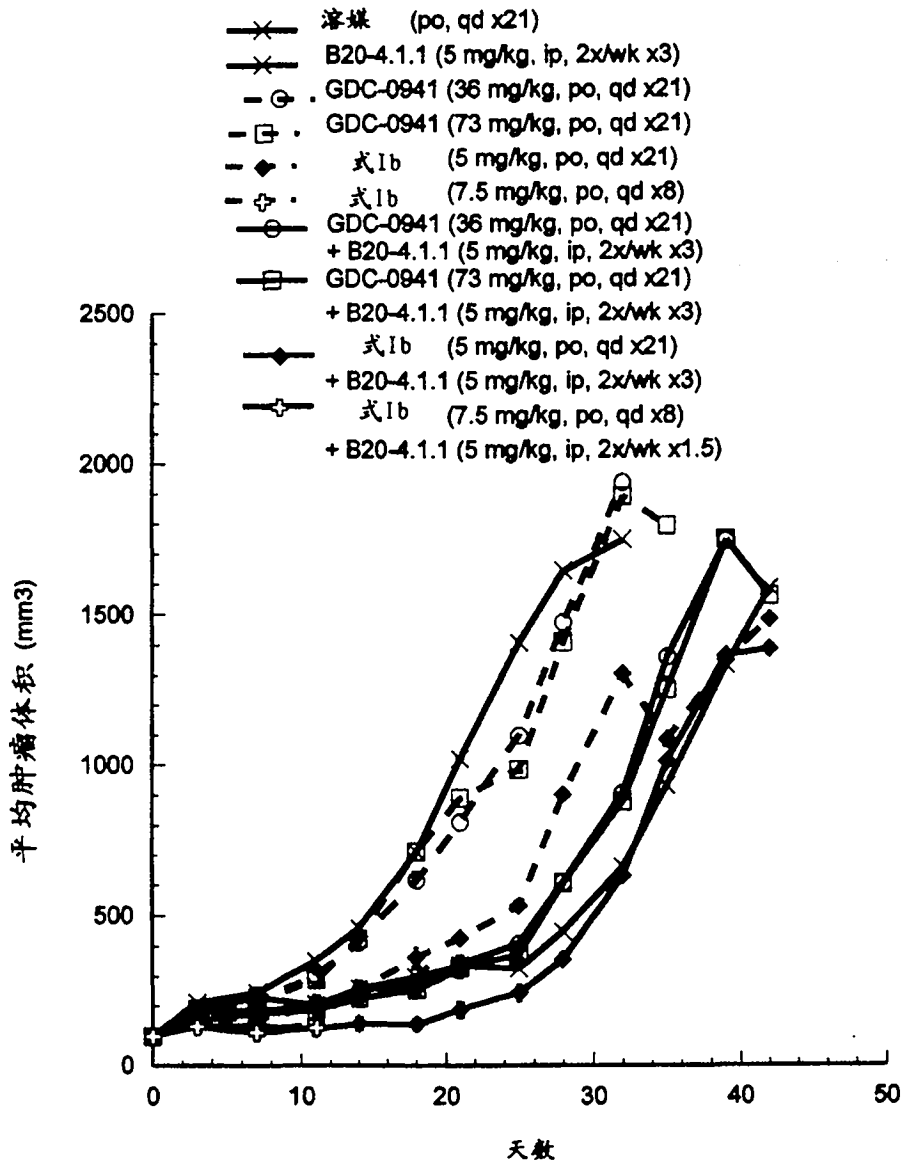


图 38

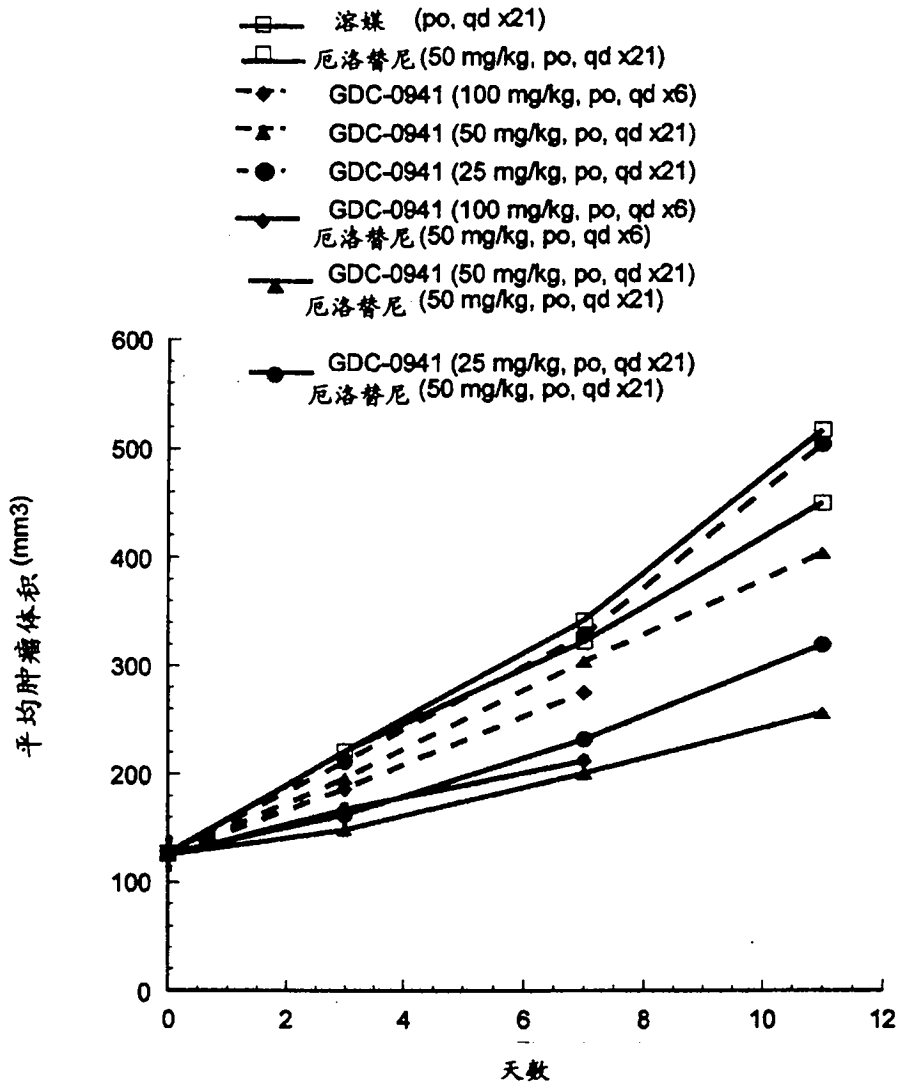


图 39

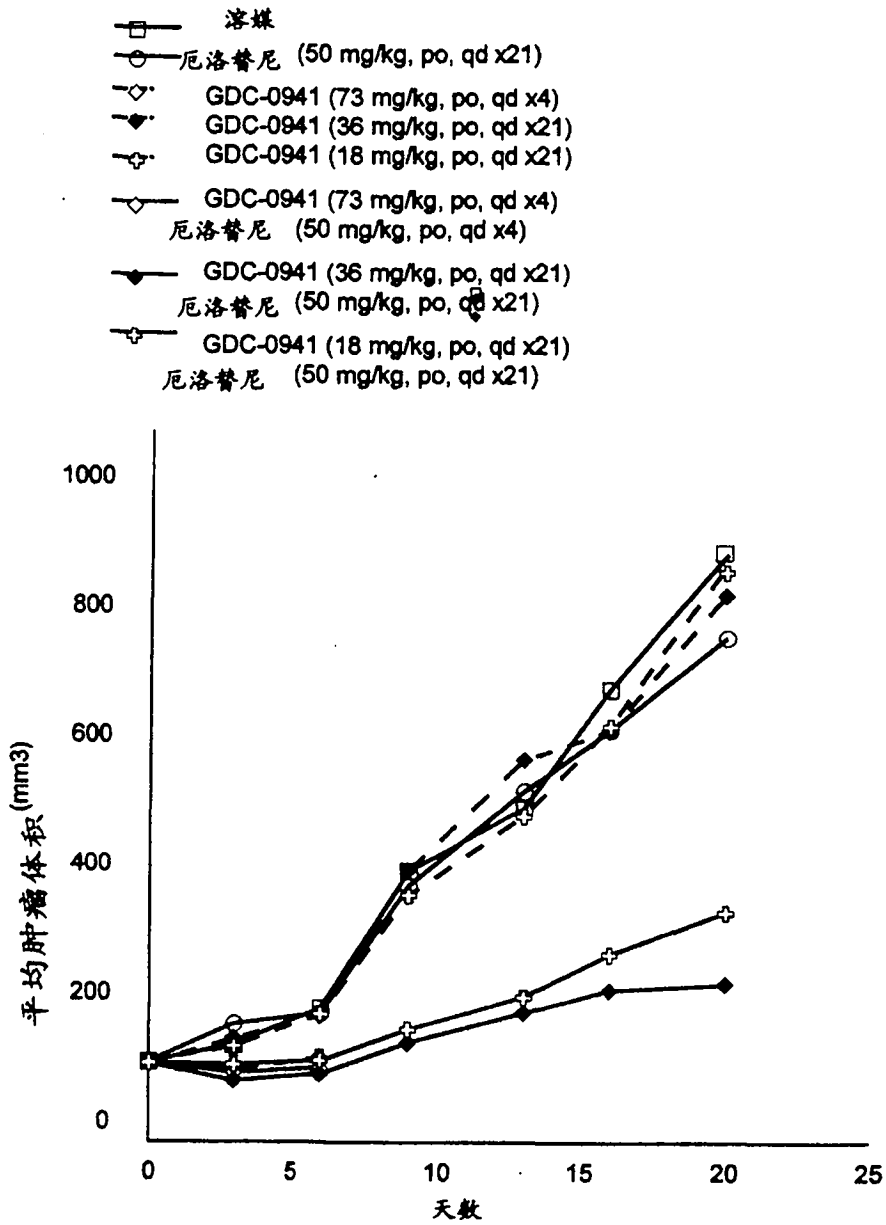


图 40

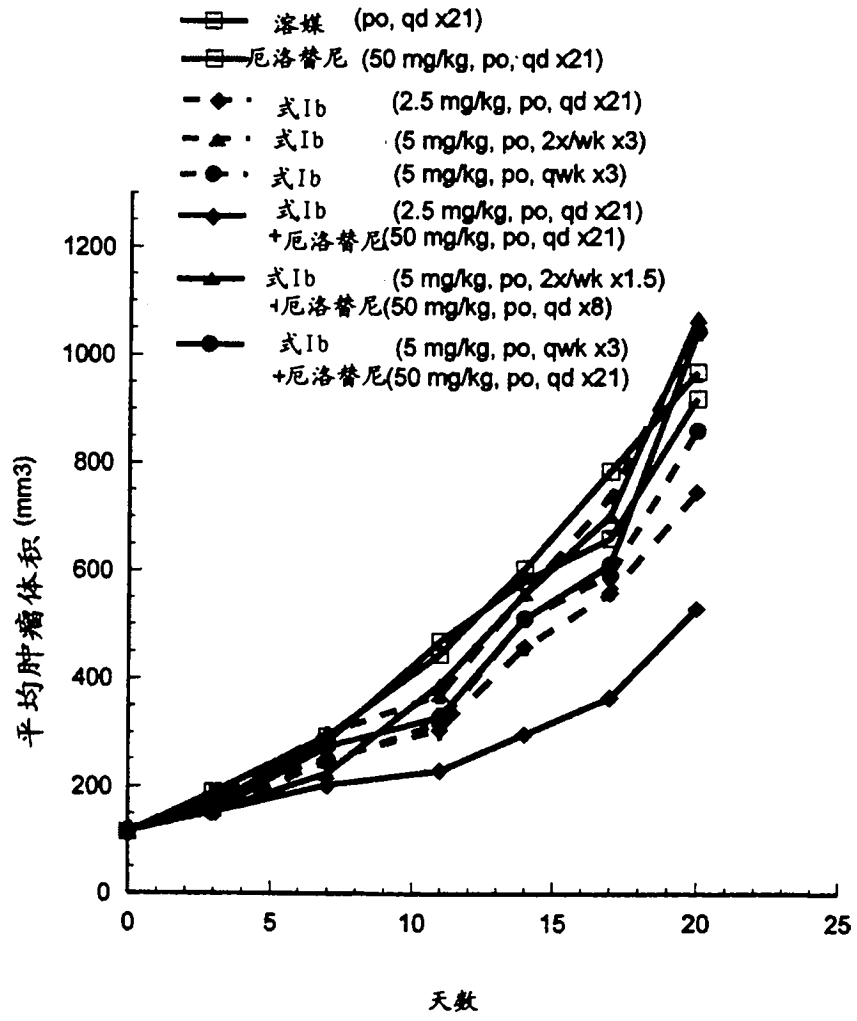


图 41

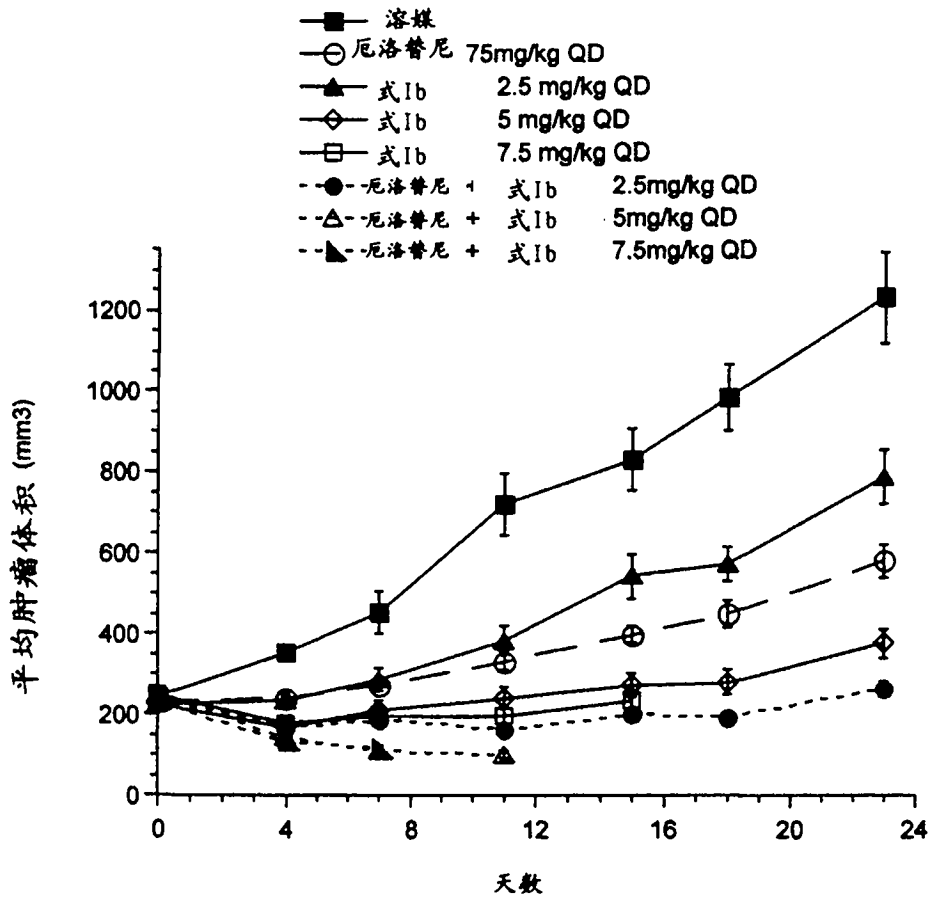


图 42

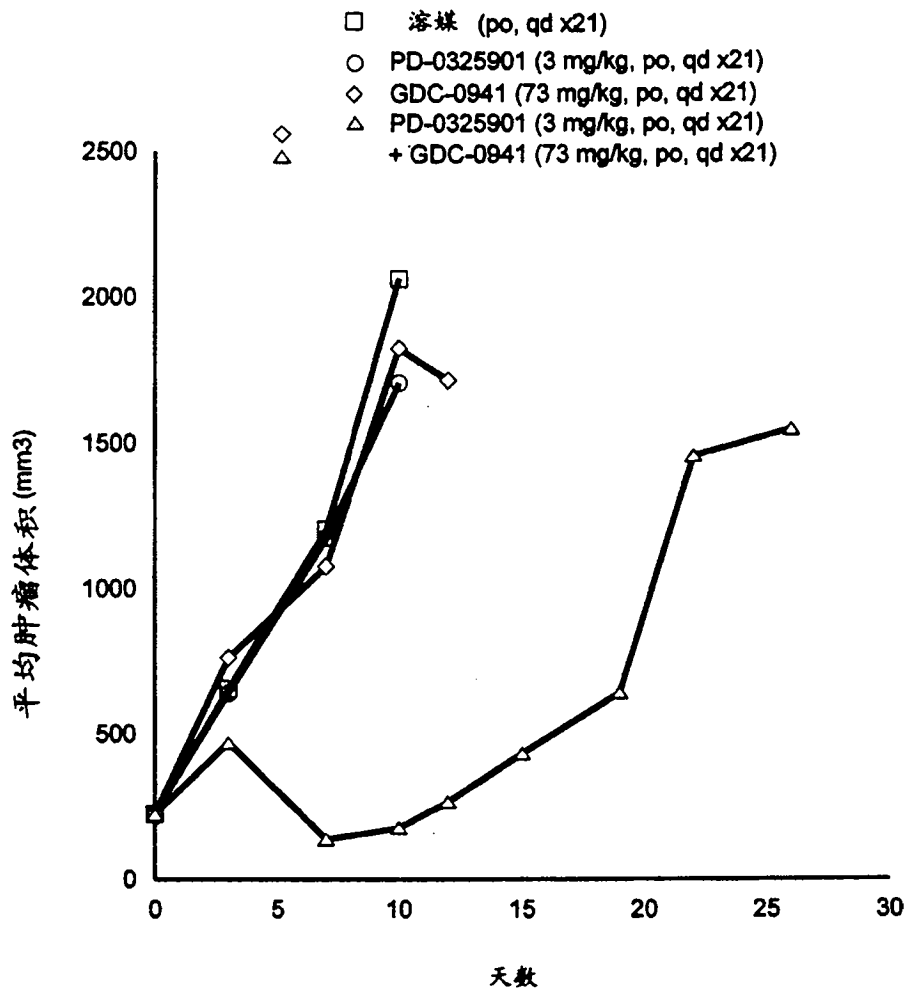


图 43

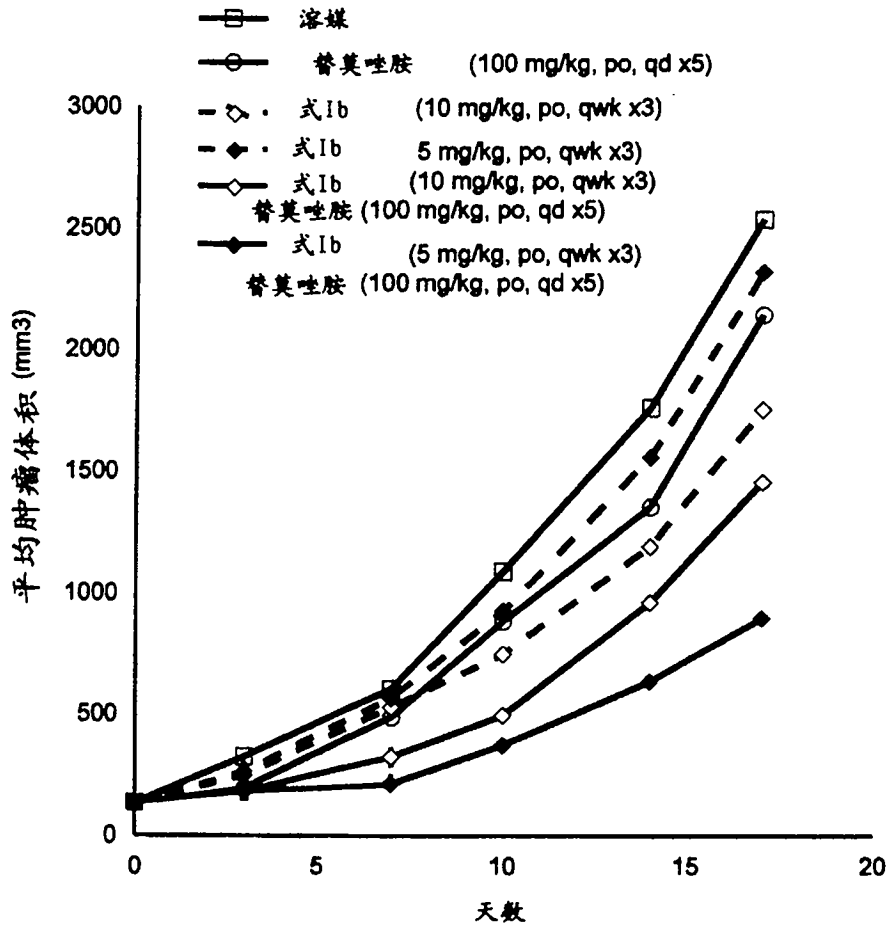


图 44

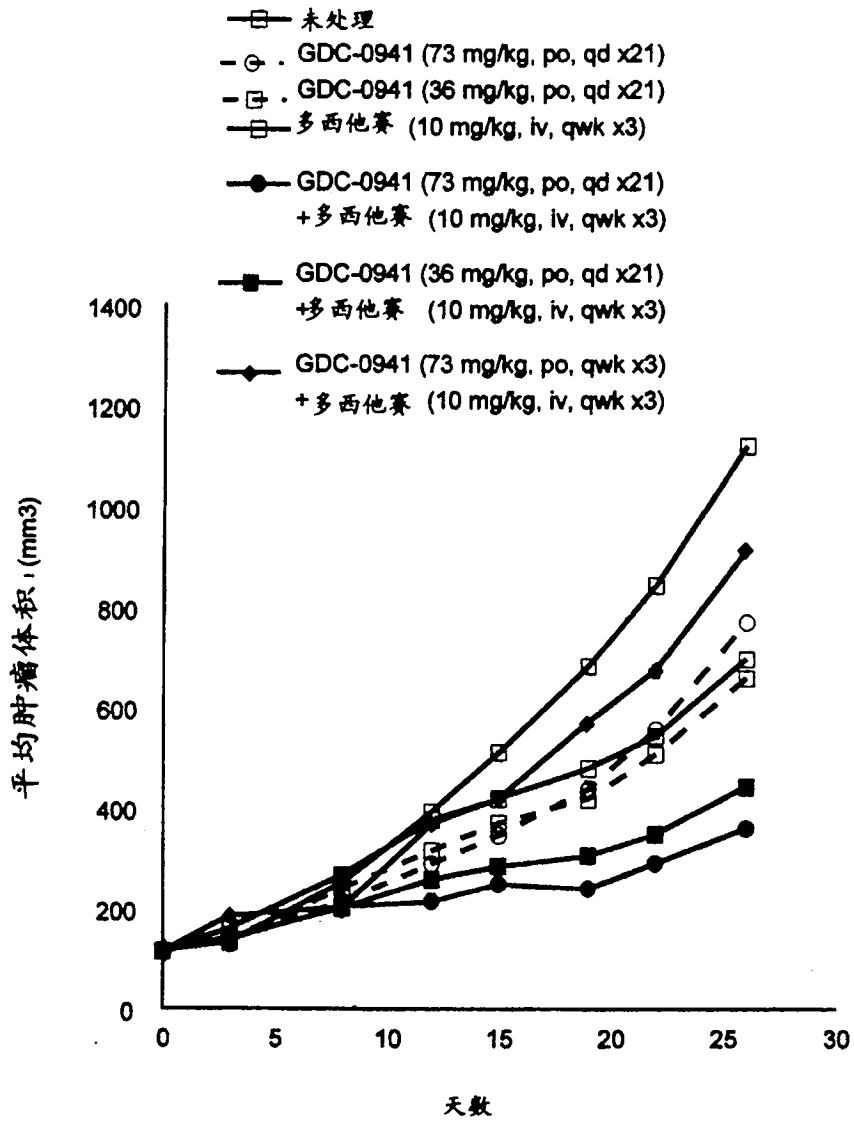


图 45

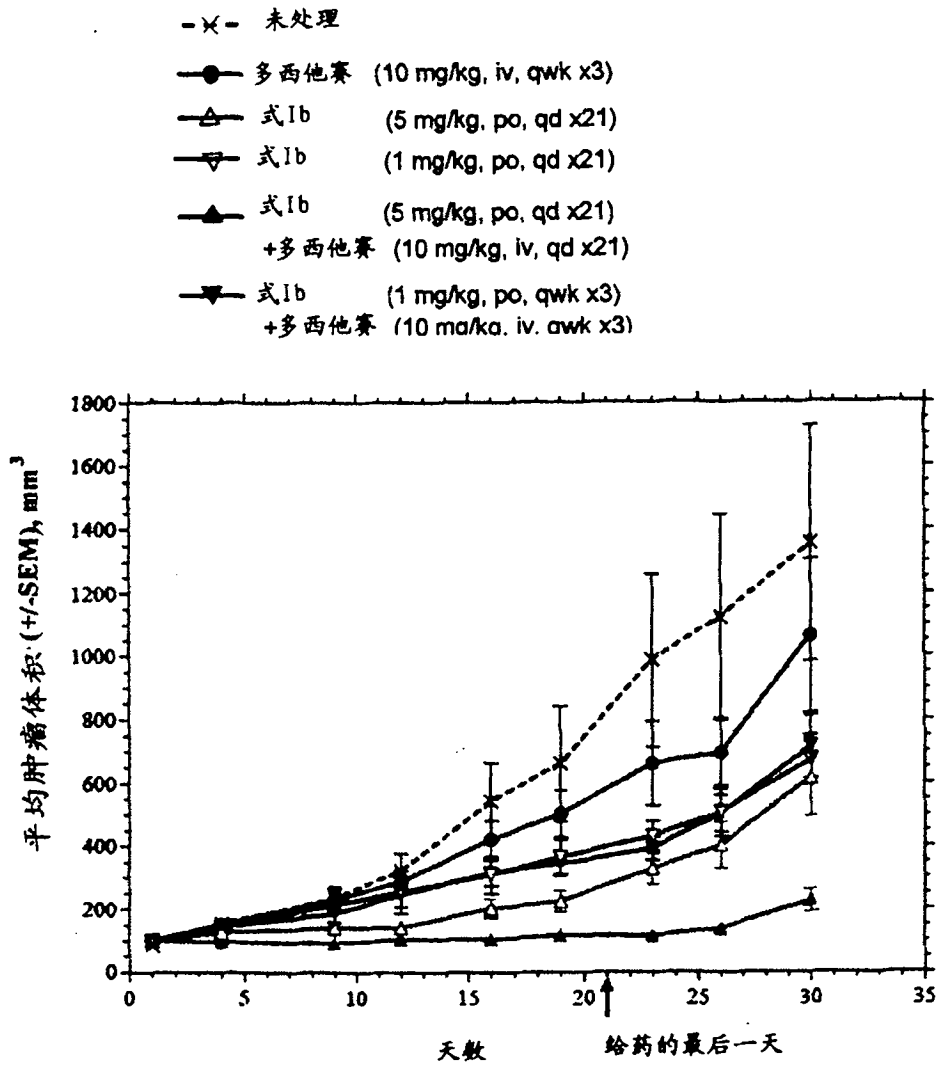


图 46

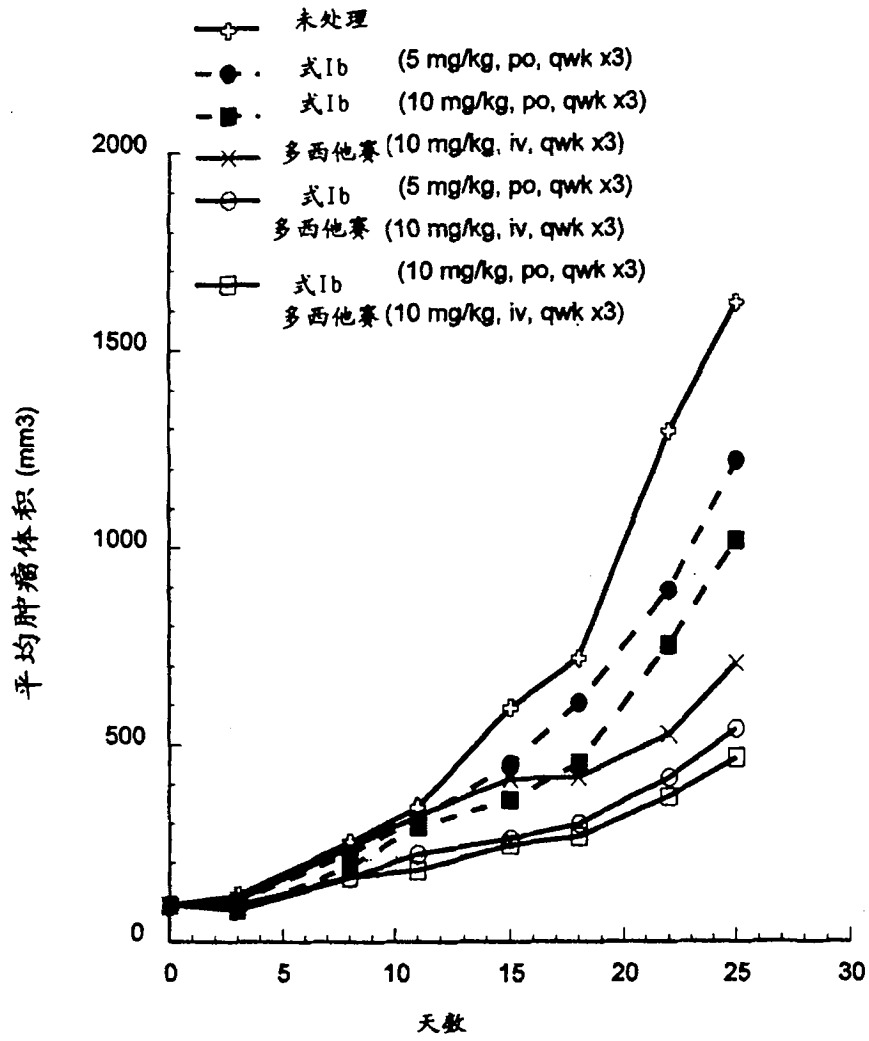


图 47

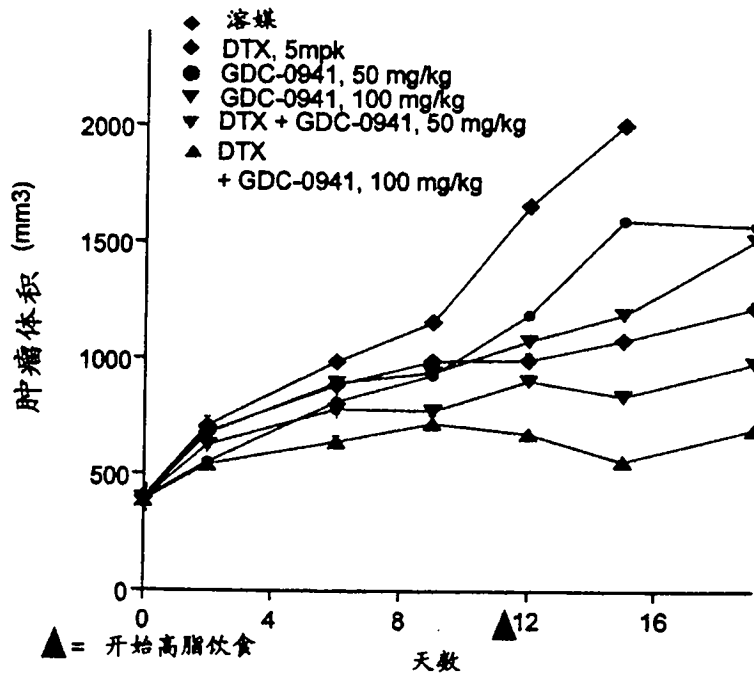


图 48

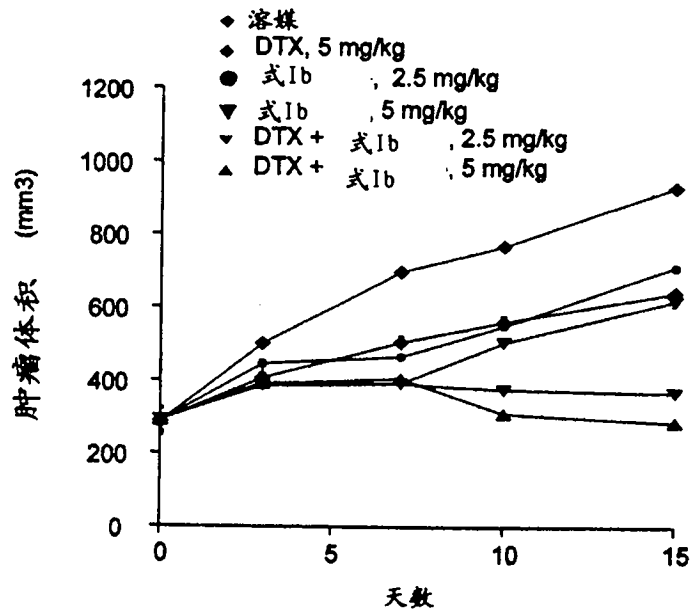


图 49

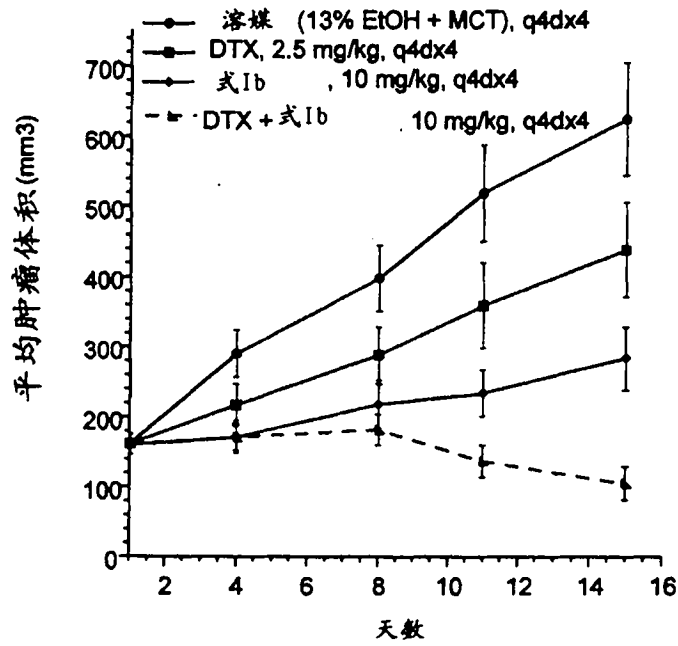


图 50

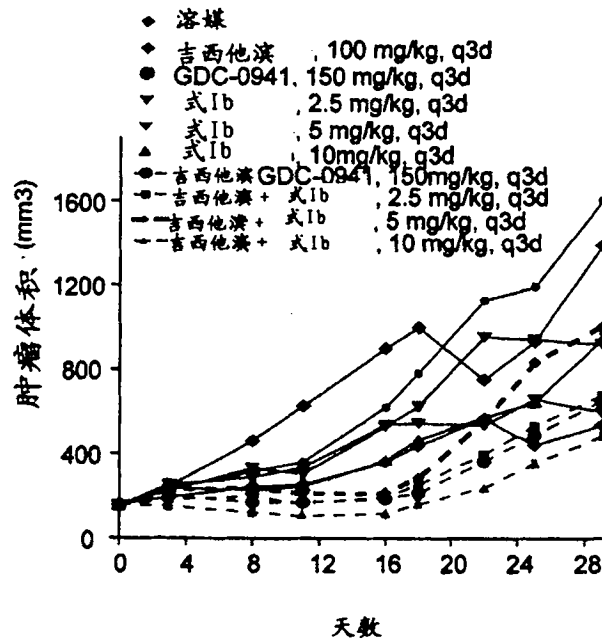


图 51

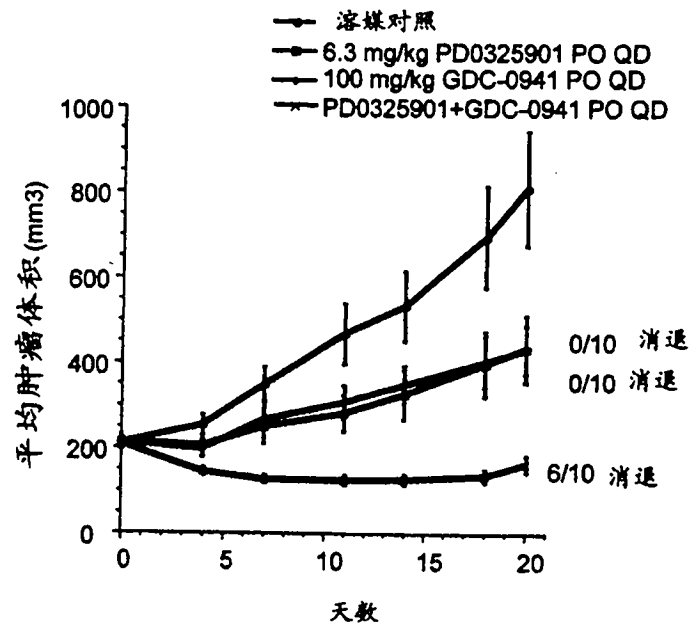


图 52