



- (21) 申請案號：103102536 (22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 23 日
- (51) Int. Cl. : C07D413/14 (2006.01) A61K31/497 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)
- (30) 優先權：2013/01/23 歐洲專利局 13305078.1
- (71) 申請人：阿斯特捷利康公司 (瑞典) ASTRAZENECA AB (SE)
瑞典
- (72) 發明人：巴蘭 伯納德 克里斯多夫 BARLAAM, BERNARD CHRISTOPHE (FR)；德路雷
班德特 DELOUVRIE, BENEDICTE (FR)；奧瑞 吉爾斯 OUVRY, GILLES
(FR)；藍伯特 凡 德 柏普特 克里斯丁 馬利 保羅 LAMBERT-VAN DER
BREMPT, CHRISTINE MARIE PAUL (BE)；哈瑞斯 貴格 史蒂芬 HARRIS,
CRAIG STEVEN (GB)；貝瑞 大衛 BERRY, DAVID (GB)；湯金森 蓋瑞 彼
得 TOMKINSON, GARY PETER (GB)；瑞德 蓋瑞 派崔克 REID, GARY
PATRICK (GB)
- (74) 代理人：陳長文
- 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：13 共 147 頁

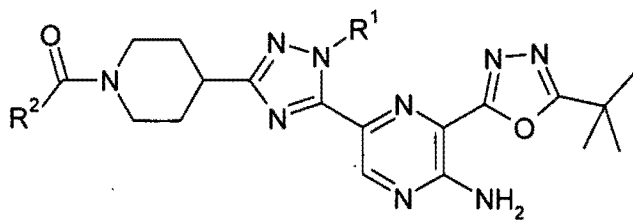
(54) 名稱

化合物

CHEMICAL COMPOUNDS

(57) 摘要

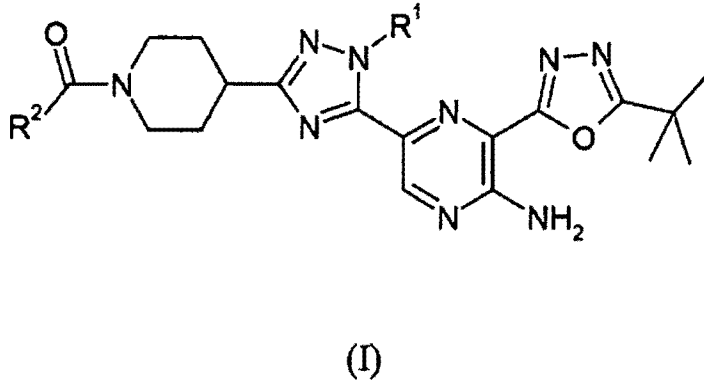
本發明係關於式(I)化合物



(I)

或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^1 及 R^2 具有在以下說明書中所定義之任一含義；其製備方法；含有其之醫藥組合物及其在治療細胞增殖性病中之用途。

The invention concerns compounds of Formula (I)



or pharmaceutically-acceptable salts thereof, wherein R¹ and R² have any of the meanings defined hereinbefore in the description; processes for their preparation, pharmaceutical compositions containing them and their use in the treatment of cell proliferative disorders.

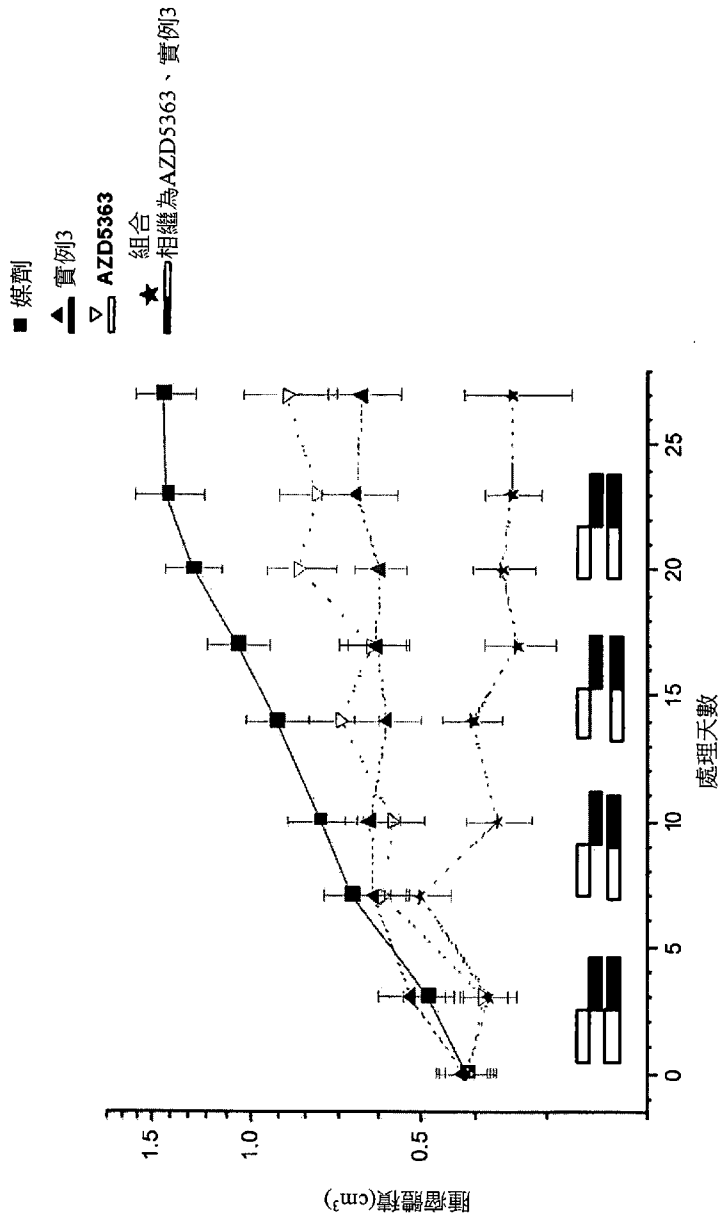
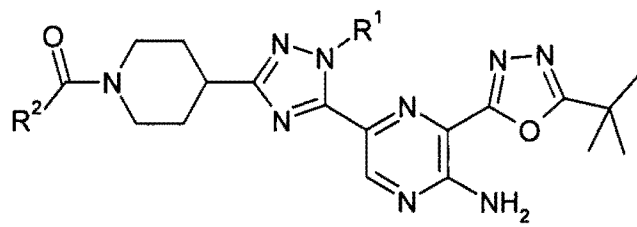


圖9：藉由依序投與實例3與AKT抑制劑(AZD5363)之組合來抑制腫瘤生長



(I)

發明摘要

※ 申請案號：103102536

※ 申請日：103.1.25

※IPC 分類：C07D 413/14 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

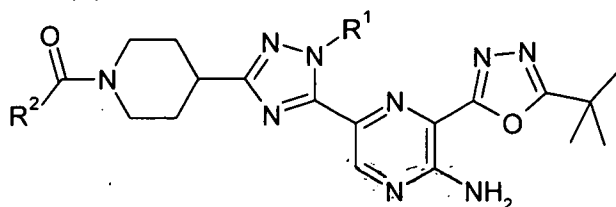
【發明名稱】

化合物

CHEMICAL COMPOUNDS

【中文】

本發明係關於式(I)化合物

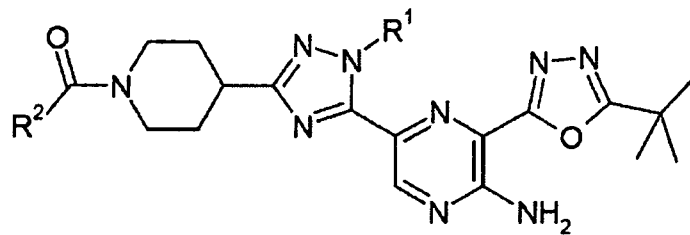


(I)

或其醫藥學上可接受之鹽，其中R¹及R²具有在以下說明書中所定義之任一含義；其製備方法；含有其之醫藥組合物及其在治療細胞增殖性病中之用途。

【英文】

The invention concerns compounds of Formula (I)



(I)

or pharmaceutically-acceptable salts thereof, wherein R¹ and R² have any of the meanings defined hereinbefore in the description; processes for their preparation, pharmaceutical compositions containing them and their use in the treatment of cell proliferative disorders.

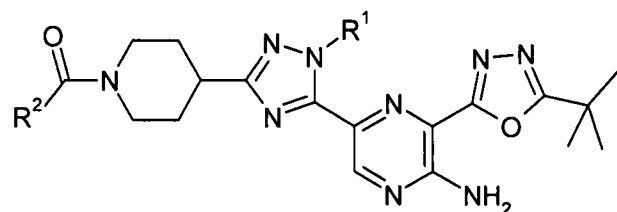
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(9)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



(I)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

化合物

CHEMICAL COMPOUNDS

本發明係關於某些新穎胺基吡嗪衍生物或其醫藥學上可接受之鹽，其具有抗癌活性且因此適用於治療人體或動物體之方法中。本發明亦關於製造該等胺基吡嗪衍生物之方法、含有其之醫藥組合物，及其在治療方法中之用途，例如用於製造用以預防或治療溫血動物(諸如人類)之癌症的藥物，包括用於預防或治療癌症。

本發明亦關於作為酶之PI3激酶家族(其或者稱為磷脂醯肌醇-3-激酶家族或PI3K家族)、尤其PI3K- α 及PI3K- δ 同功異型物之選擇性抑制劑，且例如適用於抗腫瘤療法的胺基吡嗪衍生物。

在癌症領域中，近年來已發現細胞可能由於其一部分DNA轉化成致癌基因而變成癌性，致癌基因為一種一旦活化即導致惡性腫瘤細胞形成之基因(Bradshaw, *Mutagenesis*, 1986, 1, 91)。若干此類致癌基因引起肽之產生，該等肽為激酶，一類能夠使其蛋白質或脂質受質磷酸化之酶。存在若干類激酶。

首先為酪胺酸激酶，其可為受體酪胺酸激酶或非受體酪胺酸激酶。基於可與不同受體酪胺酸激酶之細胞外表面結合之生長因子家族，各類受體酪胺酸激酶為已知的(Wilks, *Advances in Cancer Research*, 1993, 60, 43-73)；作為一實例，該分類包括I類受體酪胺酸激酶，其包含受體酪胺酸激酶之EGF家族。非受體酪胺酸激酶位於細胞內；已知各類非受體酪胺酸激酶，包括Src家族，諸如Src、Lyn、Fyn及Yes酪胺酸激酶。

其次，某些激酶屬於亦位於細胞內之絲胺酸/蘇胺酸激酶之類別。絲胺酸/蘇胺酸激酶信號傳導路徑包括Raf-MEK-ERK級聯及PI3激酶下游之彼等級聯，諸如PDK-1、AKT及mTOR (Blume-Jensen及Hunter, *Nature*, 2001, **411**, 355)。

亦已知某些其他激酶屬於脂質激酶之類別，其位於細胞內且與上述激酶一樣，涉及生物化學信號之傳輸，諸如影響腫瘤細胞生長及侵襲性之彼等生物化學信號。已知各類脂質激酶，其包括上述PI3激酶家族。

現已充分瞭解，致癌基因及腫瘤抑制基因之失調(deregulation)促成惡性腫瘤形成，例如經由增加細胞增殖或增加細胞存活。目前亦已知，由PI3激酶家族介導之信號傳導路徑在多個細胞過程(包括增殖及存活)中具有重要作用，且此等路徑之失調為廣譜人類癌症及其他疾病之病因因素(Katso等人, *Annual Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001, **17**: 615-617及Foster等人, *J. Cell Science*, 2003, **116**: 3037-3040)。

脂質激酶之PI3激酶家族為使磷脂醯肌醇(PI)之肌醇環之3-位磷酸化的一組酶。已知PI3激酶根據其生理受質特異性主要分成三組(Vanhaesebroeck等人, *Trends in Biol. Sci.*, 1997, **22**, 267; Engleman等人, *Nature Review Genetics*, 2006, **7**, 607)。III類PI3激酶僅使PI磷酸化。相比之下，II類PI3激酶使PI及PI4磷酸酯兩者磷酸化[在下文中簡稱為PI(4)P]。I類PI3激酶使PI、PI(4)P及PI4,5-雙磷酸酯磷酸化[在下文中簡稱為PI(4,5)P₂]，但咸信僅PI(4,5)P₂為生理細胞受質。PI(4,5)P₂之磷酸化產生脂質第二信使PI3,4,5-三磷酸酯[在下文中簡稱為PI(3,4,5)P₃]。與此超家族之關係較疏遠之成員為IV類激酶，諸如mTOR及DNA依賴性蛋白激酶，其使蛋白質受質內之絲胺酸/蘇胺酸殘基磷酸化。此等脂質激酶之大部分研究及瞭解為I類PI3激酶。

I類PI3激酶為由p110催化次單位及調控次單位組成之雜二聚體，

且基於調控搭配物及調控機制，該家族進一步分為Ia類及Ib類酶(Engleman等人, **Nature Review Genetics**, 2006, 7, 607)。Ia類酶由三個不同的催化次單位(p110 α 、p110 β 及p110 δ ，藉由命名法將PI3激酶同功異型物分別定義為 α 、 β 或 δ)組成，該等催化次單位與五個不同的調控次單位(p85 α 、p55 α 、p50 α 、p85 β 及p55 γ)二聚，其中所有催化次單位均能夠與所有調控次單位相互作用以形成各種雜二聚體。Ia類PI3激酶通常經由調控次單位SH2結構域與活化受體或接附蛋白之特異性磷酸化-酪胺酸殘基(諸如IRS-1)之相互作用，對受體酪胺酸激酶之生長因子刺激起反應得到活化。p110 α 及p110 β 均在所有細胞類型及組織中廣泛表現，而p110 δ 表現較受限於白血球群體及一些上皮細胞。相比之下，單一Ib類酶由與p101調控次單位相互作用之p110 γ 催化次單位組成。此外，Ib類酶對G蛋白偶聯受體(GPCR)系統起反應以及藉由上述機制活化。

目前存在大量證據表明，在多種人類癌症中，Ia類PI3激酶直接或間接地促成腫瘤形成(Vivanco及Sawyers, **Nature Reviews Cancer**, 2002, 2, 489-501)。特定言之，編碼PI3激酶之p110 α 催化次單位之PIK3CA基因廣泛地涉及腫瘤形成。活化點突變最常見於p110 α 之螺旋或催化結構域，提高全酶之PI3激酶活性且可轉化細胞。該等突變已以大量頻率尤其報導為多種腫瘤類型中之體細胞產生之突變(Samuels等人, **Science**, 2004, 304, 554；Samuels等人, **Cancer Cell**, 2005, 7, 561；Engleman等人, **Nature Review Genetics**, 2006, 7, 607；Zhao L及Vogt PK, **Oncogene** 2008, 27 5486)。亦已在諸如卵巢癌及結腸癌之癌症中鑑別出p85 α 中之腫瘤相關突變(Philp等人, **Cancer Research**, 2001, 61, 7426-7429)。此外，p110 α 次單位在諸如卵巢腫瘤(Shayesteh等人, **Nature Genetics**, 1999, 21, 99-102)及子宮頸腫瘤(Ma等人, **Oncogene**, 2000, 19, 2739-2744)之一些腫瘤中擴增。

除直接作用以外，據信Ia類PI-3-激酶之活化促成信號傳導路徑上游發生之腫瘤形成事件，例如經由受體酪胺酸激酶、GPCR系統或整合素之配位體依賴性或非配位體依賴性活化(Vara等人, **Cancer Treatment Reviews**, 2004, **30**, 193-204)。該等上游信號傳導路徑之實例包括在多種腫瘤中使得PI 3-激酶介導之路徑活化的受體酪胺酸激酶Erb2之過度表現(Harari等人, **Oncogene**, 2000, **19**, 6102-6114)，及致癌基因Ras之過度表現(Kauffmann-Zeh等人, **Nature**, 1997, **385**, 544-548)。另外，Ia類PI3激酶可促成由各種下游信號傳導事件造成之腫瘤形成。舉例而言，催化PI(3,4,5)P3轉化回PI(4,5)P2之PTEN腫瘤抑制因子磷酸酶之作用的缺失經由PI3激酶介導產生PI(3,4,5)P3之失調而與極寬範圍之腫瘤相關(Simpson及Parsons, **Exp. Cell Res.**, 2001, **264**, 29-41)。此外，加強其他PI3激酶介導之信號傳導事件的作用或促成各種癌症，例如藉由活化Akt (Nicholson及Anderson, **Cellular Signalling**, 2002, **14**, 381-395)。

因此，PI3激酶之常見失調連同上游及下游信號傳導路徑之彼等失調共同使PI3激酶之常見失調成爲人類癌症中最常見之失調路徑之一(Hennessey等人, **Nature Reviews Drug Discovery**, 2005, **4**, 988)。

除在腫瘤細胞中介導增殖及存活信號傳導方面之作用之外，亦存在充分證據表明Ia類PI3激酶亦將經由其在腫瘤相關之基質細胞中之功能促成腫瘤形成。舉例而言，PI3激酶信號傳導已知在內皮細胞中對諸如VEGF之促血管生成因子起反應來介導血管生成事件方面起重要作用(Abid等人, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 2004, **24**, 294-300)。因爲I類PI3激酶亦涉及活動及遷移(Sawyer, **Expert Opinion Investig. Drugs**, 2004, **13**, 1-19)，所以PI3激酶抑制劑應經由抑制腫瘤細胞侵襲及轉移提供治療效益。

另外，I類PI3激酶在調控具有PI3激酶活性之促成發炎細胞之促

腫瘤形成作用的免疫細胞方面起重要作用(Coussens及Werb, **Nature**, 2002, **420**, 860-867)。實際上，Ia類PI3激酶PI3激酶 δ 尤其涉及血液科惡性疾病中之腫瘤形成，諸如慢性淋巴細胞白血病(CLL)、急性淋巴母細胞白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤(MCL)。在多種惡性淋巴細胞中報導有PI3K (主要為p110 δ)之信號傳導提高(Herman等人, **Blood**, 2010, **116**, 2078；Ikeda等人, **Blood**, 2010, **116**, 1460；Uddin等人, **Blood**, 2006, **108**, 4178；Rudelius等人, **Blood** 2006, **108**, 1668；Garcia-Martinez., **Br J Cancer**, 2011, **104**, 1116；Renne等人, **Leukemia**, 2007, **2**,780)。此已促成靶向PI3激酶 δ 之藥劑的發展，其中血液科惡性疾病具有有前景的初始臨床結果。(Castillo等人, **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 2012, **21**, 15)。

此等發現表明，I類PI3激酶之藥理學抑制劑應具有用於治療各種形式癌症疾病之治療價值，該癌症疾病包含實體腫瘤(諸如癌瘤及肉瘤)及白血病及淋巴性惡性疾病。

早期研究(臨床前及臨床研究)探究PI3激酶之生理學及病理學作用，大量使用具有受限制之激酶抑制選擇性的藥劑，在較寬之激酶家族中，或在PI3激酶家族中，或在PI3激酶I類家族中擴展。因此，需要選擇性較高之藥物PI3激酶I類抑制劑以提供適用治療劑，其有可能改良進入臨床之初始藥劑所傳遞之治療範圍。

一般而言，本發明之化合物具有針對I類PI3激酶之子組，尤其針對Ia類PI3激酶 α 及 δ 同功異型物的強力抑制活性，其中Ia類PI3激酶 γ 及尤其 β 同功異型物相對保守。該等化合物亦選擇性針對較寬之PI3激酶家族及較寬之激酶組。該等化合物具有針對I類PI3激酶之足夠效力，其可以足以抑制I類PI3-激酶同功異型物之子組、尤其抑制Ia類PI3激酶 α 及 δ 之量使用，同時顯示出針對其他激酶之極小活性。

人類癌症及其他疾病中PI3激酶信號傳導之失調之理解經由稱為

個人化醫療(PHC)或個人化藥物之方法提供靶向最可能受益於此專利中所述之藥劑之治療的患者子組的前景。關於此等藥劑，疾病視PI3K- α 信號傳導及/或PI3K- δ 信號傳導之提高或者改變而定之患者可尤其受益於治療。在此項技術中熟知可使用診斷學來提供反應-預測生物標記讀出。該等診斷學可量測路徑失調之一或多個讀出，諸如(但不限於) PIK3CA、PTEN或p85 (PIK3R)基因之突變；PIK3CA基因擴增或其複本數目增加；PI3K- α 及/或 δ 同功異型物之過度表現或其活性提高；或在該路徑內使用磷酸化生物標記讀出，諸如磷酸化RTK或磷酸化AKT。另外，具有異常或失調PIK3CA或PI3K- α 之腫瘤中之其他基因(諸如Kras，一種潛在抗性標記)之突變狀態或活化狀態之量測(Engelman等人, **Nature Medicine**, 2008 **14**, 第1351-1355頁；Ihle等人, **Cancer Research**, 2009, **69**, 第143-160頁；Janku等人, **Molecular Cancer Therapeutics**, 2011, **10**, 第558-564頁)可有助於提高個人化藥物方法之預測。或者，在另一靶向性但特異性較差之方法中，治療可聚焦於相關PI3K同功異型物之失調已知最為普遍之疾病子集中。

所述化合物可用於單獨或與另外的醫藥劑組合靶向疾病。將PI3激酶抑制劑與其他療法組合可藉由克服先天性或對PI3激酶藥劑起反應誘導之抗性機制來改良功效。存在大量臨床前資料來支持此類方法(Courtney等人, **J Clin Oncol**, 2010, **28**, 1075；Engleman等人, **Nature Review Genetics**, 2006, **7**, 607)。一種方法為與調節PI3激酶信號傳導路徑中之其他軸之藥劑(例如mTOR、AKT、RTK、其他PI3激酶藥劑)的『路徑內(intra-pathway)』組合。第二方法為抑制一個以上信號傳導路徑之效益可優於抑制單一路徑的『路徑之間(inter-pathway)』組合(例如與MEK抑制劑、Raf抑制劑、Bcl家族調節劑、RTK抑制劑或DNA損傷信號傳導調節劑(諸如PARP抑制劑)組合)。其他方法包括PI3激酶抑制劑與已在臨床實踐中確定之藥劑或方案組合的方法，即所謂

的護理標準(SoC)方法，或與靶向非腫瘤細胞機制(諸如腫瘤基質細胞或經由免疫系統)之藥劑組合。

除腫瘤形成之外，有證據表明I類PI3激酶在其他疾病中起作用(Wymann等人, **Trends in Pharmacological Science**, 2003, **24**, 366-376)。Ia類PI3激酶(尤其PI3K- δ)與Ib類酶(PI3K- γ)兩者及單一的Ib類酶(PI3K- γ)在免疫系統之細胞中具有重要作用(Koyasu, **Nature Immunology**, 2003, **4**, 313-319)，且因此其為發炎及過敏性適應症之治療目標。PI3激酶之抑制亦如前所述適用於經由消炎作用或直接藉由影響心肌細胞來治療心血管疾病(Prasad等人, **Trends in Cardiovascular Medicine**, 2003, **13**, 206-212)。因此，I類PI3激酶之抑制劑可具有在預防及治療除癌症以外之多種疾病方面的價值。

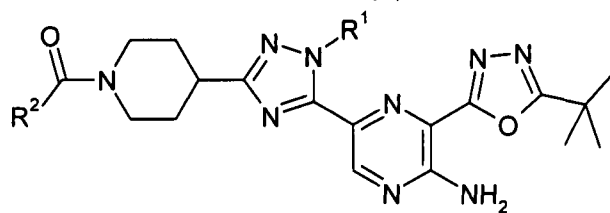
本發明之化合物(亦即胺基吡嗪衍生物)已發現具有強力抗腫瘤活性，適用於抑制由惡性疾病引起之不受控制的細胞增殖。不希望僅憑藉對單一生物過程之作用就暗示本發明中所揭示之化合物具有藥理學活性，咸信該等化合物藉助於抑制I類PI3激酶，尤其藉助於抑制Ia類PI3激酶之子組，更特定言之藉助於抑制PI3K- α 及 δ 同功異型物來提供抗腫瘤作用。

本發明化合物亦可適用於抑制由各種非惡性疾病引起的不受控制之細胞增殖，該等疾病為諸如發炎性疾病(例如類風濕性關節炎及發炎性腸病)、纖維化疾病(例如肝硬化及肺纖維化)、絲球體腎炎、多發性硬化症、牛皮癬、良性前列腺肥大(BPH)、皮膚過敏反應、血管疾病(例如動脈粥樣硬化及再狹窄)、過敏性哮喘、胰島素依賴性糖尿病、糖尿病性視網膜病變及糖尿病性腎病變。

脯胺酸醯胺已由Novartis在國際專利申請案WO2009/080705、WO2010/029082及WO2011/000905中揭示為選擇性PI3K- α 選擇性藥劑。含有ATR激酶抑制劑之胺基吡嗪已揭示於WO2011/143426及

WO2010/071837 (Vertex)中。

根據本發明之一個態樣，提供式(I)化合物



(I)

其中：

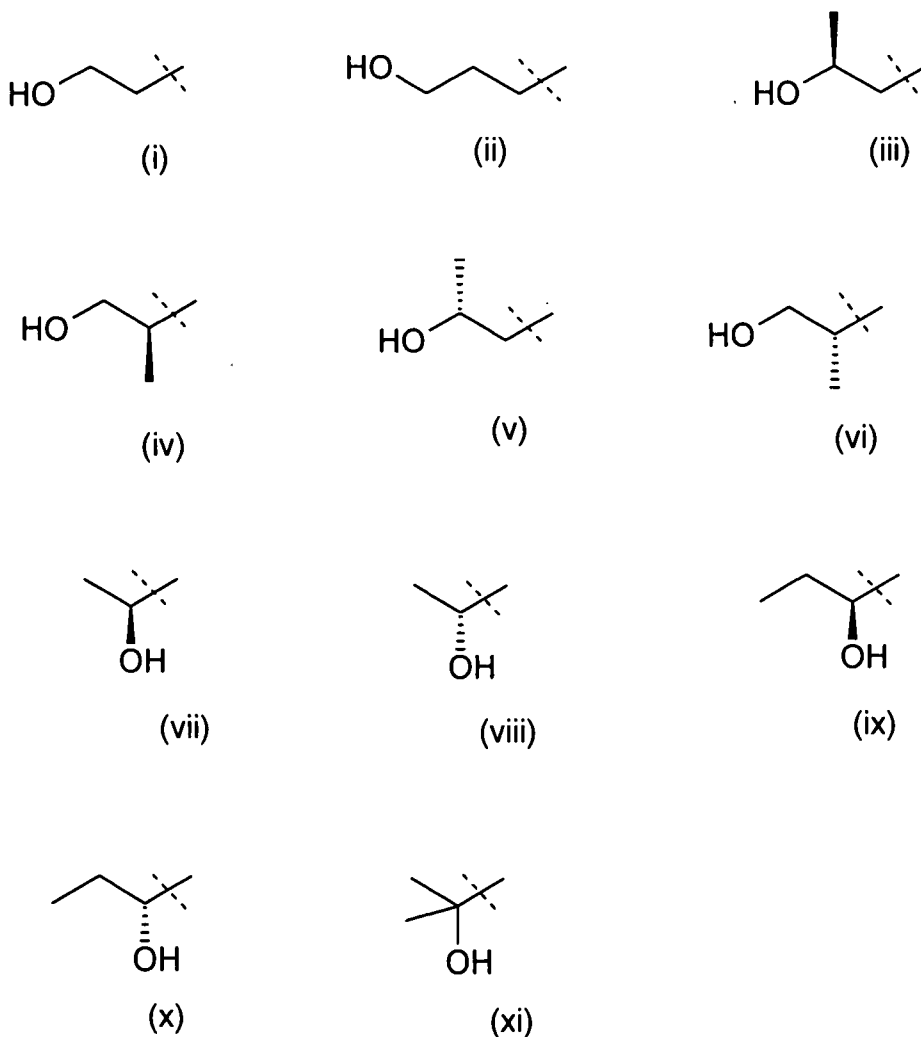
R^1 為甲基或乙基；且

R^2 為經羥基取代之(C2-3)烷基；

或其醫藥學上可接受之鹽。

在本發明之另一態樣中，提供如上文所定義之式(I)化合物。

應瞭解，術語「經羥基取代之(C2-3)烷基」包括直鏈及分支鏈烷基，例如顯示為以下基團(i)至(xi)之彼等基團：



應瞭解，就以上所定義之某些式(I)化合物可憑藉一或多個不對稱碳原子而以光學活性或外消旋形式存在而言，本發明在其定義中包括具有PI3K- α 及 δ 抑制活性之任何此類光學活性或外消旋形式。光學活性形式之合成可藉由此項技術中熟知之有機化學之標準技術，例如藉由自光學活性起始物質合成或藉由解析外消旋形式來進行。類似地，可使用標準實驗室技術評估上文所提及之活性。

本文所述之化合物之特定對映異構體之活性可高於同一化合物之其他對映異構體。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其為對映異構體過量(%ee) $\geq 95\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 之單一對映異構體。單一對映異構體之對映異構體過量(%ee)宜 $\geq 99\%$ 。

根據本發明之另一態樣，提供醫藥組合物，其包含式(I)化合物，其為對映異構體過量(%ee) $\geq 95\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 之單一對映異構體；或其醫藥學上可接受之鹽，以及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。單一對映異構體之對映異構體過量(%ee)宜 $\geq 99\%$ 。

一些式(I)化合物可為結晶且可具有一種以上晶形。應瞭解，本發明涵蓋任何晶形或非晶形或其混合物，該形式具有適用於抑制PI3K- α 及 δ 活性之性質，在此項技術中熟知如何藉由下文所述之標準測試測定晶形或非晶形對於抑制PI3K- α 及/或 δ 活性之功效。

通常已知可使用習知技術分析結晶物質，諸如X射線粉末繞射(下文稱為XRPD)分析、差示掃描熱量測定(下文稱為DSC)、熱解重量分析(下文稱為TGA)、漫反射紅外傅里葉變換(Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform, DRIFT)光譜分析、近紅外(NIR)光譜分析、溶液及/或固態核磁共振光譜分析。該等結晶物質之水含量可藉由卡爾費歇爾分析(Karl Fischer analysis)測定。

作為一實例，實例1之化合物展現出結晶性且已鑑別出一種晶

形。

因此，本發明之另一態樣為1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 5.1^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 18.0^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在約 $2-\theta = 5.1^\circ$ 及 18.0° 處之特定峰。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有在約 $2-\theta = 5.1^\circ$ 、 18.0° 、 10.2° 、 11.7° 、 19.4° 、 18.5° 、 14.8° 、 26.7° 、 26.6° 、 17.8° 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即X射線粉末繞射圖與圖1中所示之X射線粉末繞射圖實質上相同的形式A。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個

在約 $2-\theta = 5.1^\circ \pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 處之特定峰。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 18.0^\circ \pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 處之特定峰。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在約 $2-\theta = 5.1^\circ$ 及 $18.0^\circ \pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 處之特定峰。

根據本發明之另一態樣，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有在約 $2-\theta = 5.1^\circ$ 、 18.0° 、 10.2° 、 11.7° 、 19.4° 、 18.5° 、 14.8° 、 26.7° 、 26.6° 、 $17.8^\circ \pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 處之特定峰。

實例3亦為結晶且在本文中描述兩種形式(A及B)。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 4.8^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 10.0^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在約 $2-\theta =$

4.8°及10.0°處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有在約 $2-\theta = 4.8^\circ$ 、 10.0° 、 14.6° 、 5.2° 、 19.9° 、 10.4° 、 25.4° 、 23.6° 、 24.4° 、 16.2° 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖與圖3中所示之X射線粉末繞射圖實質上相同。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在 $2-\theta = 4.8^\circ \pm 0.2^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在 $2-\theta = 10.0^\circ \pm 0.2^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在 $2-\theta = 4.8^\circ$ 及 10.0° 處之特定峰，其中該等值可 $\pm 0.2^\circ$ 。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式A，其X射線粉末繞射圖具有在 $2-\theta = 4.8^\circ$ 、 10.0° 、 14.6° 、 5.2° 、 19.9° 、 10.4° 、 25.4° 、 23.6° 、 24.4° 、 16.2° 處之

特定峰，其中該等值可 $\pm 0.2^\circ 2-\theta$ 。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 5.8^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 10.9^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在約 $2-\theta = 5.8^\circ$ 及 10.9° 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有在約 $2-\theta = 5.8^\circ$ 、 10.9° 、 11.5° 、 25.9° 、 17.3° 、 24.0° 、 19.1° 、 12.9° 、 24.7° 、 27.2° 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖與圖5中之X射線粉末繞射圖實質上相同。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在 $2-\theta = 5.8^\circ \pm 0.2^\circ 2-\theta$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在 $2-\theta = 10.9^\circ \pm 0.2^\circ$ 2- θ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在 $2-\theta = 5.8^\circ$ 及 10.9° 處之特定峰，其中該等值可 $\pm 0.2^\circ$ 2- θ 。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式B，其X射線粉末繞射圖具有在 $2-\theta = 5.8^\circ$ 、 10.9° 、 11.5° 、 25.9° 、 17.3° 、 24.0° 、 19.1° 、 12.9° 、 24.7° 、 27.2° 處之特定峰，其中該等值可 $\pm 0.2^\circ$ 2- θ 。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 6.9^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在約 $2-\theta = 12.3^\circ$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在約 $2-\theta = 6.9^\circ$ 及 12.3° 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-

1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有在約 $2-\theta = 6.9^\circ$ 、 12.3° 、 10.5° 、 21.0° 、 24.6° 、 13.6° 、 16.4° 、 19.6° 、 20.2° 、 22.5° 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖與圖7中所示之X射線粉末繞射圖實質上相同。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在 $2-\theta = 6.9^\circ \pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有至少一個在 $2-\theta = 12.3^\circ \pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 處之特定峰。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有至少兩個在 $2-\theta = 6.9^\circ$ 及 12.3° 處之特定峰，其中該等值可 $\pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 。

根據本發明，提供一種晶形，即1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮之形式C，其X射線粉末繞射圖具有在 $2-\theta = 6.9^\circ$ 、 12.3° 、 10.5° 、 21.0° 、 24.6° 、 13.6° 、 16.4° 、 19.6° 、 20.2° 、 22.5° 處之特定峰，其中該等值可 $\pm 0.2^\circ$ $2-\theta$ 。

當據陳述本發明係關於本發明化合物之晶形時，諸如實例1或實

例3，結晶度宜大於約60%，更宜大於約80%，較佳大於約90%且更佳大於約95%。結晶度最佳為大於約98%。

當據陳述本發明係關於本發明化合物之晶形時，諸如實例1或實例3，該晶形較佳實質上不含同一化合物之其他晶形或非晶形。在此上下文中，「實質上不含」意謂宜大於約60%，更宜大於約80%，較佳大於約90%，更佳大於約95%，更佳大於約98%且甚至更佳大於約99%純單一晶形。舉例而言，實例3可呈形式A之形式且實質上不含形式B及C；或者，實例3可呈形式B之形式且實質上不含形式A及C；或者實例3可呈形式C之形式且實質上不含形式A及B。類似地，實例3可呈形式B之形式且實質上不含替代性晶形或非晶形。

應瞭解，X射線粉末繞射圖之2- θ 值可能因機器不同或因樣本不同而略有變化，且因此所引用之值不應理解為絕對的。

已知可獲得視量測條件(諸如，所用設備或機器)而定具有一或多個量測誤差之X射線粉末繞射圖。詳言之，一般已知X射線粉末繞射圖之強度可視量測條件而波動。因此應瞭解，除非另外規定，否則上述本發明之晶形不限於所提供之X射線粉末繞射圖與圖1、3、5中所示之X射線粉末繞射圖一致之晶體且所提供之X射線粉末繞射圖與此等圖中所示之彼等X射線粉末繞射圖實質上相同的任何晶體均落入本發明範疇內。熟習X射線粉末繞射技術者能夠判斷X射線粉末繞射圖之實質一致性。

熟習X射線粉末繞射技術者亦應認識到，相對峰強度可受例如尺寸大於30微米之晶粒及非單一縱橫比影響，該等因素可能影響樣本分析。熟習此項技術者亦將認識到反射位置可受樣本在繞射計中所處之確切高度及繞射計之零點校正影響。樣本之表面平坦度亦可具有細微影響。因此，所呈現之繞射圖資料不應視為絕對值(參見Jenkins, R及Snyder, R.L. 『Introduction to X-Ray Powder Diffractometry』, John

Wiley & Sons 1996 ; Bunn, C.W. (1948), Chemical Crystallography, Clarendon Press, London ; Klug, H. P.及Alexander, L. E. (1974), X-Ray Diffraction Procedures)。

一般而言，X射線粉末繞射圖中繞射角之量測誤差為約 $\pm 0.2^\circ$ 2θ ，且當考慮X射線粉末繞射資料時，應將該量測誤差度考慮在內。此外，應瞭解強度可視實驗條件及樣本製備(較佳取向)而波動。

特定本發明化合物為實例中之每一者，其各自提供本發明之另一獨立態樣。其他特定本發明化合物為該等實例中之每一者的醫藥學上可接受之鹽，其各自提供本發明之另一獨立態樣。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物，其可藉由遵循如本文所揭示之實例中之任一者獲得。

另一特徵為本文中所限定之範疇中之任一者，其限制條件為諸如實例1、3、4等之特定實例個別地宣佈棄權。

熟習此項技術者應瞭解，某些式(I)化合物含有經不對稱取代之碳原子，且因此可以光學活性及外消旋形式存在且分離。一些式(I)化合物可展現多晶型。應瞭解，本發明涵蓋任何外消旋、光學活性、多晶型或立體異構形式或其混合物，該形式具有適用於抑制PI3K- α 及 δ 活性之性質，在此項技術中熟知如何製備光學活性形式(例如藉由用再結晶技術解析外消旋形式、藉由自光學活性起始物質合成、藉由對掌性合成、藉由酶解析、藉由生物轉化或藉由使用對掌性固定相進行層析分離)及如何藉由下文所述之標準測試測定用於抑制PI3K- α 及 δ 活性之功效。

應瞭解，上文定義之某些式(I)化合物可展現互變異構現象。應瞭解，本發明在其定義中包括任何此類互變異構形式或其混合物，其具有PI3K抑制活性且不僅僅限於在結構式圖中所用或在實例中所命名之任何一種互變異構形式。一般而言，任何此類互變異構形式中僅一

者於下文之實例中命名或於下文之任何相關結構式圖中呈現。

本發明意欲包括存在於本發明化合物中之原子的所有同位素。同位素應理解為包括具有相同原子數但具有不同質量數之彼等原子。舉例而言，氫之同位素包括氕及氘。碳同位素包括 ^{13}C 及 ^{14}C 。

式(I)化合物之適合醫藥學上可接受之鹽為例如式(I)化合物之酸加成鹽，例如與強無機或有機酸(諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸或三氟乙酸)之酸加成鹽。式(I)化合物之另一適合醫藥學上可接受之鹽為例如在投與式(I)化合物之後人體或動物體內所形成之鹽。

應進一步瞭解，式(I)化合物之適合醫藥學上可接受之溶劑合物亦形成本發明之一態樣。適合醫藥學上可接受之溶劑合物為例如水合物，諸如半水合物、單水合物、二水合物或三水合物或其替代量。

應進一步瞭解，式(I)化合物之適合醫藥學上可接受之前藥亦形成本發明之一態樣。因此，本發明化合物可以前藥形式投與，該前藥為在人體或動物體內分解以釋放本發明化合物之化合物。前藥可用於改變本發明化合物之物理性質及/或藥物動力學性質。當本發明化合物含有可連接改性基團之適合基團或取代基時，可形成前藥。前藥之實例包括活體內可裂解之酯衍生物，其可形成於式(I)化合物之羥基處；及活體內可裂解之醯胺衍生物，其可形成於式(I)化合物之胺基處。

因此，本發明包括當可藉由有機合成得到時及當可經由前藥之裂解而在人體或動物體內得到時，如上文所定義之彼等式(I)化合物。因此，本發明包括彼等由有機合成方法產生之式(I)化合物且亦包括在人體或動物體內經由前驅體化合物代謝而產生之該等化合物，即式(I)化合物可為合成產生之化合物或代謝產生之化合物。

式(I)化合物之適合醫藥學上可接受之前藥為基於合理醫學判斷，適合投與人體或動物體而無不合需要之藥理學活性且無不當毒性

者。

例如在以下文獻中已描述各種形式之前藥：

- a) **Methods in Enzymology**, 第 42 卷, 第 309-396 頁, 由 K. Widder 等人編 (Academic Press, 1985) ;
- b) **Design of Pro-drugs**, 由 H. Bundgaard 編, (Elsevier, 1985) ;
- c) **A Textbook of Drug Design and Development**, 由 Krogsgaard-Larsen 及 H. Bundgaard 編, 第 5 章 「Design and Application of Pro-drugs」, H. Bundgaard 第 113-191 頁 (1991) ;
- d) H. Bundgaard, **Advanced Drug Delivery Reviews**, **8**, 1-38 (1992) ;
- e) H. Bundgaard, 等人, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **77**, 285 (1988) ;
- f) N. Kakeya 等人, **Chem. Pharm. Bull.**, **32**, 692 (1984) ;
- g) T. Higuchi 及 V. Stella, 「Pro-Drugs as Novel Delivery Systems」, A.C.S. Symposium Series, 第 14 卷 ; 及
- h) E. Roche (編者), 「Bioreversible Carriers in Drug Design」, Pergamon Press, 1987。

具有羥基之式(I)化合物的適合之醫藥學上可接受之前藥為例如其活體內可裂解的酯或醚。含有羥基之式(I)化合物的活體內可裂解之酯或醚為例如在人體或動物體內裂解以產生母體羥基化合物的醫藥學上可接受之酯或醚。對於羥基之適合之醫藥學上可接受的酯形成基團包括無機酯，諸如磷酸酯(包括磷醯胺環酯)。對於羥基之其他適合之醫藥學上可接受之酯形成基團包括(1-10C)烷醯基，諸如乙醯基、苯甲醯基、苯乙醯基及經取代之苯甲醯基及苯乙醯基；(1-10C)烷氧羰基，諸如乙氧羰基、*N,N*-[二(1-4C)烷基]胺甲醯基、2-二烷基胺基乙醯基及2-羧基乙醯基。苯乙醯基及苯甲醯基上之環取代基之實例包括

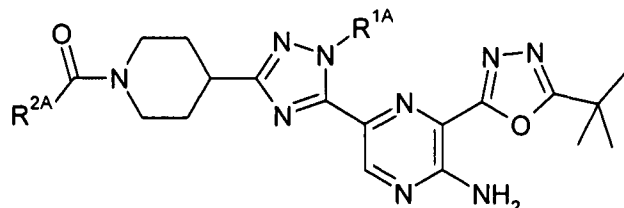
胺甲基、*N*-烷基胺甲基、*N,N*-二烷基胺甲基、*N*-嗎啉基甲基、哌嗪-1-基甲基及4-(1-4C)烷基哌嗪-1-基甲基。對於羥基之適合之醫藥學上可接受之醚形成基團包括 α -醯氧基烷基，諸如乙醯氧基甲基及特戊醯氧基甲基。

具有胺基之式(I)化合物的適合之醫藥學上可接受之前藥為例如其活體內可裂解的醯胺衍生物。自胺基形成之適合的醫藥學上可接受之醯胺包括例如與(1-10C)烷醯基形成的醯胺，該等(1-10C)烷醯基諸如乙醯基、苯甲醯基、苯乙醯基及經取代之苯甲醯基及苯乙醯基。苯乙醯基及苯甲醯基上之環取代基之實例包括胺甲基、*N*-烷基胺甲基、*N,N*-二烷基胺甲基、*N*-嗎啉基甲基、哌嗪-1-基甲基及4-(1-4C)烷基哌嗪-1-基甲基。

式(I)化合物之活體內作用可部分地由在投與式(I)化合物之後在人體或動物體內形成之一或多種代謝物來發揮。如上所述，式(I)化合物之活體內作用亦可經由前驅體化合物(前藥)代謝來發揮。

式(I)化合物含有經-C(O)R²取代之哌啶子單元，其中R²為經羥基取代之(C2-3)烷基。此等化合物之一種可能的代謝途徑為藉由氧化此基團上之羥基取代基。此等經氧化之化合物通常保留一些PI3K- α 及 δ 抑制活性。

因此，根據本發明之另一態樣，提供式(A)化合物：



(A)

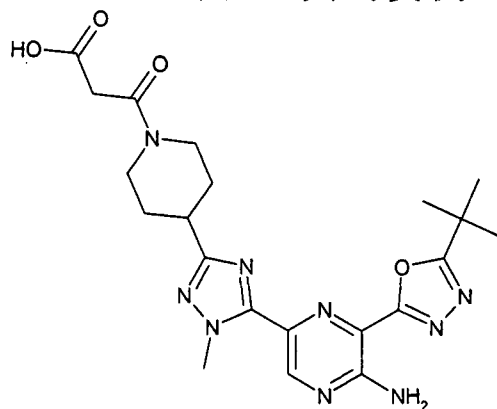
其中：

R^{1A}為甲基或乙基；且

R^{2A}為經羧基取代之(C1-2)烷基；

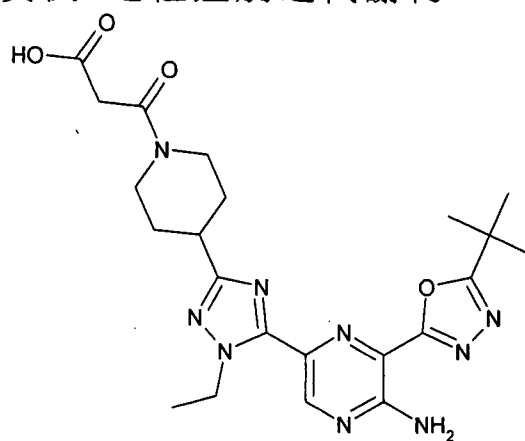
或其醫藥學上可接受之鹽。

式(A)化合物之實例包括實例8，其為實例1之經鑑別之代謝物；



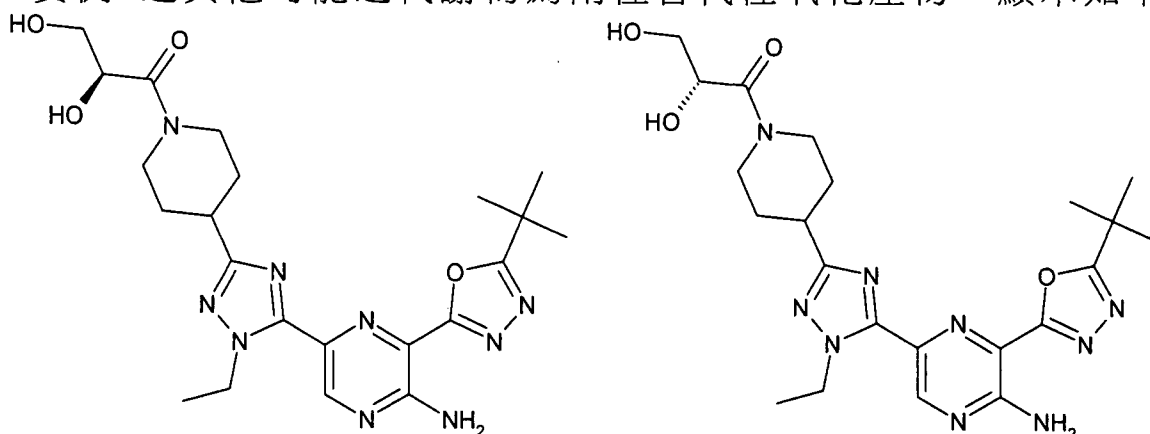
實例8

及實例9，其為實例3之經鑑別之代謝物：



實例9

實例3之其他可能之代謝物為兩種替代性氧化產物，顯示如下：



式(A)化合物之適合的醫藥學上可接受之鹽包括例如鹼金屬鹽或鹼土金屬鹽，諸如鈣鹽或鎂鹽；或銨鹽；或與諸如甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、嗎啉或參(2-羥乙基)胺之有機鹼形成之鹽。

為避免疑義，應瞭解，若在本說明書中某一基團經『上文所定義(hereinbefore defined/defined hereinbefore)』限定，則該基團涵蓋首次出現且最廣泛之定義以及對彼基團之每一及所有特定定義。

本發明之特定新穎化合物包括例如式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中除非另外規定，否則 R^1 及 R^2 各自具有上文或以下陳述中所定義之含義中之任一者：

R^1 為甲基。

R^1 為乙基。

R^2 為如上文所定義之基團(i)至(xi)中之任一者。

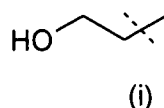
R^2 為如上文所定義之基團(i)至(vi)。

R^2 為基團(i)。

一組特定之本發明化合物為以上式(I)化合物，其中：

R^1 為甲基或乙基，

R^2 為基團(i)：



或其醫藥學上可接受之鹽。

特定之本發明化合物為例如在下文中所陳述之實例中所揭示之式(I)化合物。

舉例而言，特定之本發明化合物為選自以下任一者的式(I)化合物：

1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丙-1-酮(實例1及2)；

1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-乙基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丙-1-酮(實例3)；

(3R)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-

基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丁-1-酮(實例4)；

(3S)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丁-1-酮(實例5)；

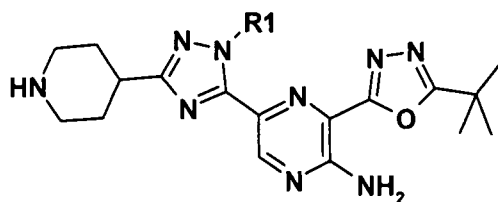
(2R)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-2-甲基-丙-1-酮(實例6)；

1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-2-羥基-2-甲基-丙-1-酮(實例7)。

本發明之另一態樣提供一種製備式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的方法。適合方法藉由以下代表性方法變化形式來說明，其中除非另外陳述，否則 R^1 、 R^2 具有上文所定義之含義中之任一者。藉由有機化學之標準程序可獲得必要之起始物質。該等起始物質之製備結合以下代表性方法變化形式並在隨附實例中描述。或者，可藉由於有機化學家之普通技能中說明之彼等程序的類似程序獲得必要之起始物質。

適合之方法變化形式包括例如以下：

(a) 式II化合物與羧酸 R^2 -COOH宜在適合之活化試劑存在下進行的反應



II

其中 R^1 具有上文所定義之含義中之任一者，除了必要時在適合鹼基存在下對任何官能基進行保護，隨後移除所存在之任何保護基。

用於此反應之適合的偶合劑包括例如在2-羥基-吡啶N-氧化物存在下之六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲錄、TBTU

(四氟硼酸2-(1H-苯并[d][1,2,3]三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基異錄)或1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽。

該反應宜在適合鹼存在下進行。適合鹼為例如有機胺鹼，諸如吡啶、2,6-二甲基吡啶、三甲基吡啶、4-二甲胺基吡啶、三乙胺、*N*-甲基嗎啉、二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯、二異丙基乙基胺；或例如鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽或氫氧化物，例如碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鈣、氫氧化鈉或氫氧化鉀；較佳為*N*-乙基-*N,N*-二異丙胺。

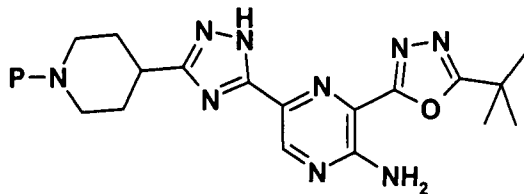
該反應宜在適合之惰性溶劑存在下且在例如-50°C至100°C範圍內，較佳0°C至30°C範圍內之溫度下進行，該惰性溶劑諸如乙腈、*N,N*-二甲基甲醯胺、*N*-甲基吡咯啉酮、四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯、二甲苯、甲醇、乙醇、鹵化溶劑(諸如二氯甲烷、氯仿或四氯化碳)。

或者，羧酸R²-COOH可轉化成活性物質，該活性物質可隨後與式II化合物在此項技術中熟知之條件下反應。

羥基之適合保護基為四氫呋喃保護基，如實例2及3中所述。

移除此基團之適合條件包括弱酸性條件，在作為溶劑之醇(諸如甲醇或乙醇)存在下，在20°C至70°C之間之溫度下。所用之典型弱酸為對甲苯磺酸吡啶。

式II化合物可自式III化合物：



III

其中P為保護基，諸如第三丁氧羰基，

與式R¹-L化合物(其中L為適合之離去基，諸如鹵基，諸如溴、碘基(宜為碘))在適合鹼存在下進行反應，隨後移除所存在之任何保護基

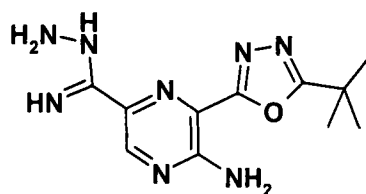
而獲得。

適合鹼爲例如有機胺鹼，諸如1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。

該反應宜在適合惰性溶劑存在下且在例如-50°C至60°C範圍內，較佳在-10°C至0°C範圍內之溫度下進行，該惰性溶劑諸如2-甲基四氫呋喃、四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯、二甲苯。

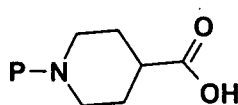
脫除第三丁氧羰基之保護基之適合條件包括酸性條件，諸如三氟乙酸於諸如二氯甲烷之惰性溶劑中，在接近室溫(20°C-25°C)下。

化合物III可自式IV化合物



IV

與式V化合物



V

在適合之活化試劑存在下，較佳在適合鹼存在下進行偶合反應，隨後在弱酸存在下進行環化反應而獲得。

偶合反應可在適合偶合劑存在下進行，該偶合劑諸如六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲錄或TBTU (四氟硼酸2-(1H-苯并[d][1,2,3]三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基異錄)。

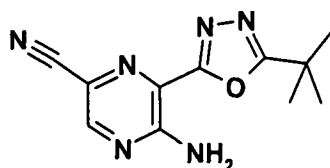
該偶合反應宜在適合鹼存在下進行。適合鹼爲例如有機胺鹼，諸如吡啶、2,6-二甲基吡啶、三甲基吡啶、4-二甲胺基吡啶、三乙胺、N-甲基嗎啉、二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯、二異丙基乙基胺；或例如鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽或氫氧化物，例如碳酸鈉、碳酸鉀、碳

酸鈣、氫氧化鈉或氫氧化鉀；較佳為N-乙基-N,N-二異丙胺。

該偶合反應宜在適合之惰性溶劑存在下且在例如-50°C至100°C範圍內，較佳0°C至30°C範圍內之溫度下進行，該惰性溶劑諸如N,N-二甲基乙醯胺、N,N-二甲基甲醯胺、N-甲基吡咯啉酮、四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯、二甲苯、甲醇、乙醇、鹵化溶劑(諸如二氯甲烷、氯仿或四氯化碳)。

環化條件係在弱酸(典型地為乙酸)存在下進行。該反應宜在適合之惰性溶劑存在下且在例如50°C至150°C範圍內，較佳80°C至100°C範圍內之溫度下進行，該惰性溶劑諸如N,N-二甲基乙醯胺、N,N-二甲基甲醯胺、N-甲基吡咯啉酮、四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯、二甲苯。

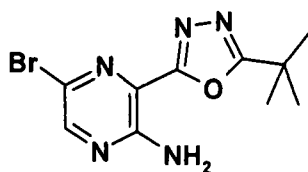
化合物IV可自式VI化合物與肼之反應獲得。



VI

此反應宜在適合惰性溶劑存在下，在例如20°C至70°C範圍內之溫度，較佳約50°C下進行，該惰性溶劑諸如四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯、二甲苯或醇(諸如乙醇或異丙醇)。

化合物VI可自式VII化合物與氰化物源(諸如二氰化鋅(II))之金屬催化反應獲得。



VII

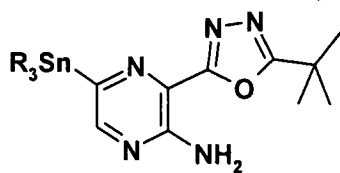
該反應之適合催化劑包括例如金屬催化劑，諸如鈹(0)，例如肆(三苯基膦)鈹(0)；或自鈹(II)鹽原位形成之催化劑，例如乙酸鈹(II)、

氯化鈀(II)、溴化鈀(II)、氯化雙(三苯基膦)鈀(II)、[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯化鈀(II)或參(二苯亞甲基丙酮)二鈀及膦配位體，例如二環己基(2',4',6'-三異丙基聯苯-2-基)膦。該反應宜在適合溶劑中，且在例如20°C至150°C範圍內，較佳在60°C至120°C範圍內之溫度下進行，該溶劑諸如*N,N*-二甲基乙醯胺、*N,N*-二甲基甲醯胺、四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯或二甲苯。該反應亦宜在諸如鋅之其他金屬存在下進行。

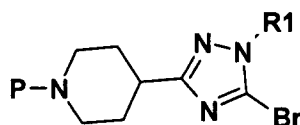
適合之此類型反應描述於『Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions』，第二版，由Armin Meijere, François Diederich編，Wiley-VCH, 2004)中。

化合物VII之合成已描述於實例1及2中。

或者，式II化合物可藉由化合物VIII (其中R為低碳烷基)與化合物IX (其中P為保護基，諸如第三丁氧羰基)之金屬催化反應獲得。



VIII



IX

該反應之適合催化劑包括例如金屬催化劑，諸如鈀(0)，例如肆(三苯基膦)鈀(0)；或自鈀(II)鹽原位形成之催化劑，例如乙酸鈀(II)、氯化鈀(II)、溴化鈀(II)、氯化雙(三苯基膦)鈀(II)、[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯化鈀(II)或參(二苯亞甲基丙酮)二鈀及膦配位體，例如二環己基(2',4',6'-三異丙基聯苯-2-基)膦。

該反應宜在適合溶劑中，在例如在50°C至180°C範圍內，較佳在

120°C至150°C範圍內之溫度下進行，該溶劑諸如*N,N*-二甲基乙醯胺、*N,N*-二甲基甲醯胺、四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯或二甲苯或醇(諸如4-甲基-2-戊醇)。

該反應亦宜在諸如氯化鋰之其他鹽存在下進行。

適合之此類型反應描述於『Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions』，第二版，由Armin Meijere, François Diederich編，Wiley-VCH, 2004)中。

式VIII化合物可自化合物VII與適合之六烷基二錫烷之金屬催化反應獲得。該反應之適合催化劑包括例如金屬催化劑，諸如鈀(0)，例如肆(三苯基膦)鈀(0)；或自鈀(II)鹽原位形成之催化劑，例如乙酸鈀(II)、氯化鈀(II)、溴化鈀(II)、氯化雙(三苯基膦)鈀(II)、[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯化鈀(II)或參(二苯亞甲基丙酮)二鈀及膦配位體，例如二環己基(2',4',6'-三異丙基聯苯-2-基)膦。該反應宜在適合溶劑中，在例如在50°C至100°C範圍內，較佳在70°C至80°C範圍內之溫度下進行，該溶劑諸如*N,N*-二甲基乙醯胺、*N,N*-二甲基甲醯胺、四氫呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、苯、甲苯、二甲苯或醇(諸如4-甲基-2-戊醇)。

式IX化合物可自可商購之物質以若干步驟獲得，如實例1所示(其中R¹=Me且P=第三丁氧羰基)。

應瞭解，上述方法變化形式中之方法步驟之其他排列亦有可能。

應瞭解，藉由上文所述方法中之任一者獲得之任何式(I)化合物必要時均可轉化成另一式(I)化合物。

當需要式(I)化合物之醫藥學上可接受之鹽，例如酸加成鹽時，其可藉由例如該化合物與適合酸之反應獲得。

當需要式(I)化合物之醫藥學上可接受之前藥時，其可使用習知

程序獲得。舉例而言，式(I)化合物之活體內可裂解之酯可藉由例如含有羥基之式(I)化合物與醫藥學上可接受之羧酸之反應獲得。關於前藥之其他資訊已在上文中提供。

亦應瞭解，在上文提及之一些反應中，可能必需或需要保護化合物中之任何敏感性基團。必需或需要保護之情況及適用於保護之方法為熟習此項技術者所知。習知保護基可根據標準規範來使用(關於說明，參見T.W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 1991)。因此，若反應物包括諸如胺基、羧基或羥基之基團，則在本文提及之一些反應中可能需要保護該基團。

適合之胺基或烷基胺基保護基為例如醯基，例如烷醯基，諸如乙醯基；烷氧羰基，例如甲氧羰基、乙氧羰基或第三丁氧羰基；芳基甲氧羰基，例如苯甲氧羰基；或芳醯基，例如苯甲醯基。關於以上保護基之脫除保護基條件必然隨保護基之選擇而變化。因此，舉例而言，諸如烷醯基或烷氧羰基或芳醯基之醯基可例如藉由用諸如鹼金屬氫氧化物(例如，氫氧化鋰或氫氧化鈉)之適合鹼進行水解來移除。或者，諸如第三丁氧羰基之醯基可例如藉由用如鹽酸、硫酸或磷酸或三氟乙酸之適合酸處理來移除，且諸如苯甲氧羰基之芳基甲氧羰基可例如藉由經諸如鈀/碳之催化劑氫化或藉由用路易斯酸(Lewis acid)(例如參(三氟乙酸)硼)處理來移除。用於一級胺基之適合之替代保護基為例如酞醯基，其可藉由用例如二甲胺基丙胺之烷基胺或用胍處理來移除。

適合之羥基保護基為例如醯基(例如烷醯基，諸如乙醯基)、芳醯基(例如苯甲醯基)或芳甲基(例如苯甲基)。關於以上保護基之脫除保護基條件將必然隨保護基之選擇而變化。因而，舉例而言，諸如烷醯基或芳醯基之醯基可例如藉由用諸如鹼金屬氫氧化物(例如，氫氧化鋰或氫氧化鈉)之適合鹼進行水解來移除。或者，諸如苯甲基之芳基

甲基可例如藉由經諸如鈀/碳之催化劑氫化來移除。

適合之羧基保護基爲例如酯化基團，例如甲基或乙基，其可例如藉由用諸如氫氧化鈉之鹼進行水解來移除；或例如第三丁基，其可例如藉由用酸(例如有機酸，諸如三氟乙酸)進行處理來移除；或例如苯甲基，其可例如藉由經諸如鈀/碳之催化劑進行氫化來移除。

可使用於化學技術中熟知之習知技術於合成之任何便利階段移除該等保護基。

本文中所定義之某些中間體(例如式II、III、IV、VI、VII、VIII之化合物)爲新穎的且提供此等中間體作爲本發明之另一特徵。

生物分析

使用以下分析來量測本發明化合物作爲以下之作用：a)生物化學分析中PI3激酶之抑制劑；b)生物化學分析中其他激酶之抑制劑；c) BT474細胞中磷酸化AKT (Thr308)之活體外抑制劑；d) MDA-MB-468細胞中磷酸化AKT (Ser473)之活體外抑制劑；e) JEKO細胞中磷酸化AKT (Ser473)之活體外抑制劑；f) HT29細胞中磷酸化Chk1 (Ser345)之活體外抑制劑；g)腫瘤細胞株池中細胞增殖之抑制劑；h及i)分別作爲用人類乳腺癌細胞株MCF7移植之SCID小鼠中磷酸化AKT (Ser473)之活體內抑制劑或腫瘤生長之活體內抑制劑。

分析方案中所用之縮寫：

PIP2： PI(4,5)P2，磷脂醯肌醇4,5-雙磷酸酯

s.c.： 皮下

ATP： 三磷酸腺苷

DMSO： 二甲亞砜

TRIS： 參(羥甲基)胺基甲烷

CHAPS： 3-[(3-膽醯胺基丙基)二甲基銨基]-1-丙烷磺酸鹽

DTT： 二硫蘇糖醇

FBS :	胎牛血清
DMEM :	達爾伯克氏改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)
EDTA :	乙二胺四乙酸
EGTA :	乙二醇四乙酸
BSA :	牛血清白蛋白
PBS :	磷酸鹽緩衝生理食鹽水
HRP :	辣根過氧化酶
RPMI :	羅斯維公園紀念研究所(Roswell Park Memorial Institute) 1640培養基
4NQO :	4-硝基喹啉N-氧化物
EMEM :	伊格爾氏最低必需培養基(Eagle's Minimal Essential medium)
CO ₂ :	二氧化碳
PBST :	磷酸鹽緩衝生理食鹽水/Tween
Ab :	抗體
MTS試劑 :	[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺酸基苯基)-2H-四唑鎓，內鹽；MTS]及電子偶合試劑(甲基硫酸吩嗪) PMS。

(a) 活體外酶抑制分析

使用人類重組酶，在基於激酶Glo之酶活性分析中評估PI3K- β 、PI3K- α 、PI3K- γ 及PI3K- δ 之抑制作用。該分析平台間接量測在用酶、PIP2受質、ATP及化合物培育之後ATP之耗盡。

在酶反應完成之後，剩餘ATP用於第二酶促反應，其中螢光素酶在光之發射下將甲蟲螢光素轉化成氧化螢光素。所量測之發光與已完成之激酶反應中所剩餘ATP之間存在直接關係。因此，發光與激酶活

性呈逆相關。典型地，測試十二種不同的化合物濃度且繪製PI3K- β 、PI3K- α 、PI3K- γ 或PI3K- δ 之抑制作用的原始資料對比抑制劑濃度之曲線。

方法細節：

藉由聲學分配(acoustic dispensing)將含化合物之100% DMSO添加至分析板中。在Tris緩衝液(50 mM Tris pH 7.4, 0.05% CHAPS, 2.1 mM DTT及10 mM氯化鎂)中添加PI3K酶且使其與化合物預培育20分鐘，隨後添加含有PIP2及ATP之受質溶液。80分鐘後藉由添加含有螢光素及螢光素酶(得自Kinase Glo(R) Plus Luminescent Kinase Assay套組(Promega #V3772))之Kinase Glo偵測溶液來停止酶反應。使板在室溫下靜置30分鐘，隨後在具有標準發光過濾塊之Pherastar儀器上讀取。在該分析中DMSO、ATP及PIP2之最終濃度分別為1%、8 μ M及80 μ M。

資料分析

使用擬合為非線性回歸擬合之對數曲線來計算IC₅₀值。IC₅₀值為抑制50%酶活性之測試化合物之濃度。

(b) 除PI3激酶I類酶以外之激酶選擇性評估

由一系列商業供應商(諸如Millipore、Invitrogen及ProQinase)提供龐大激酶分析池。該等池允許評估既定化合物之整體激酶選擇性。確切方法/技術將視供應商而變化。

使用在英國鄧迪之MRC蛋白質磷酸化單位的MRC-信號轉導療法部門(DSTT)(MRC-Division of Signal Transduction Therapy (DSTT), MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK)所進行之酶分析來產生一些本文中所述化合物之選擇性資料。使用放射化學形式進行蛋白激酶分析。在多點(multidrop) 384孔板中在室溫下以25.5 μ l之總分析體積進行分析。在酶及肽/蛋白質受質存在下使化合物預培育5分鐘，

隨後藉由添加10 μl ATP起始反應(針對各激酶所選擇之最終濃度為5 μM 、20 μM 或50 μM)。在室溫下進行分析，隨後藉由添加5 μl 正磷酸終止。隨後藉由Packard Harvester (洗滌緩衝液為50 mM正磷酸)將分析板內容物收集至Whatman-P81-Unifilter板上且在空氣中乾燥。隨後添加MicroScint O來密封乾Unifilter板且在Packard Topcount NXT閃爍計數器中計數。此方案擷取適用於池中大部分激酶之通用形式，但如熟習此項技術者應熟悉，對於少數激酶需要對該等方案進行修改。

針對約18種脂質激酶之脂質激酶分析亦在DSTT進行。在384孔板中在室溫下以40 μl 之總分析體積進行所有脂質激酶分析。根據由ADP-GLO分析(Promega, #V9101)提供之方案進行該分析。此方案擷取適用於池中大部分激酶之通用形式，但如熟習此項技術者應熟悉，對於少數激酶需要對該等方案進行修改。

亦使用經由DiscoverX可獲得之KINOMEscan™篩選平台評估激酶選擇性。此篩選平台採用活性位點定位之競爭結合分析來定量地量測在測試化合物及超過450種人類激酶與疾病相關突變體變異體之間的相互作用。KINOMEscan™分析不需要ATP且因此報導真實的熱力學相互相用親和力，與IC₅₀值形成對照，IC₅₀值可視ATP濃度而定。該方法係基於以下化合物：其結合激酶活性位點且直接(空間)或間接(異位)防止激酶結合至固定配位體，由此減少固體載體上所捕獲之激酶的量。反之，不結合激酶之測試分子對固體載體上所捕獲之激酶的量無影響。藉由使用偵測相關之DNA標記之定量qPCR方法量測在測試樣本對比對照樣本中所捕獲之激酶的量來鑑別篩選「命中」。以類似方式，藉由量測隨測試化合物濃度而變之固體載體上所捕獲之激酶的量來計算測試化合物-激酶相互作用之解離常數(K_d)。

(c) 量測BT474細胞中磷酸化AKT (Tyr308)之分析方案

此分析用於量測細胞中之PI3K- α 抑制。將BT474細胞(人類乳腺

管癌，ATCC HTB-20)以每孔5600個細胞之密度接種於黑色384孔板(Costar，#3712)中含有10% FBS及1%麩醯胺酸之DMEM中且使其黏附隔夜。

次日早晨藉由聲學分配將含化合物之100% DMSO添加至分析板中。在37°C及5% CO₂下培育2小時之後，抽吸培養基且用含有25 mM Tris、3 mM EDTA、3 mM EGTA、50 mM氟化鈉、2 mM原鈳酸鈉、0.27 M蔗糖、10 mM β-甘油磷酸鹽、5 mM焦磷酸鈉、0.5% Triton X-100及康普利特(complete)蛋白酶抑制劑混合錠劑(Roche #04 693 116 001，每50 ml溶解緩衝液使用1錠)之緩衝液溶解該等細胞。

20分鐘後，將細胞溶菌液轉移至已預塗佈含抗所有AKT抗體之PBS緩衝液的ELISA板(Greiner #781077)中，且用含1% BSA之含有0.05% Tween 20之PBS阻斷非特異性結合。在4°C下將板培育隔夜。次日用含有0.05% Tween 20之PBS緩衝液洗滌該等板且再與小鼠單株抗磷酸化AKT T308一起培育2小時。再次如上洗滌板，隨後添加馬抗小鼠HRP結合之二級抗體。在室溫下培育2小時後，洗滌板且向各孔中添加QuantaBlu受質工作溶液(Thermo Scientific #15169，根據提供者指令製備)。60分鐘後藉由向孔中添加停止溶液使已發展之螢光產物停止。使用Tecan Safire讀板儀分別使用325 nm激勵波長及420 nm發射波長讀取板。除非有所指定，否則在此ELISA分析中使用來自Cell Signalling (#7144)之Path Scan磷酸化AKT (Thr308)夾心ELISA套組中所含之試劑。

(d) 用於偵測MDA-MB-468細胞中之磷酸化AKT(Ser473)作為PI3激酶-β抑制之量度的方案

此分析用於量測細胞中之PI3K-β抑制且與以上分析(c)聯合用於測定細胞中之α對比β選擇性。將MDA-MB-468細胞(人類乳腺癌#ATCC HTB 132)以每孔1500個細胞接種於Greiner 384孔黑色平底板

中之含有10% FBS及1%麩醯胺酸的40 μ l DMEM中。在37°C培育箱中將細胞板培育18小時，隨後使用聲學分配給予含化合物之100% DMSO。

在12點濃度範圍中將化合物給予至隨機板圖中。藉由給予100% DMSO(最大信號)或添加完全消除pAKT信號之參考化合物(PI3K- β 抑制劑)(最小對照)產生對照孔。在37°C下將板培育2小時，隨後藉由添加10 μ l 3.7%甲醛溶液固定細胞。30分鐘後，使用Tecan PW384洗板機用PBS洗滌板。阻斷各孔且藉由添加40 μ l含有0.5% Tween20及1% Marvel™(經乾燥之奶粉)的PBS滲透細胞且使細胞在室溫下培育60分鐘。用含有0.5% (v/v) Tween20之PBS洗滌板且添加含20 μ l兔抗磷酸化AKT Ser473 (Cell Signalling Technologies, #3787)之相同PBS-Tween + 1% Marvel™並在4°C下培育隔夜。

使用Tecan PW384，用PBS + 0.05% Tween 20將板洗滌3次。向各孔中添加於PBS + 0.05%含有1% Marvel™之Tween20中稀釋之20 μ l二級抗體Alexa Fluor 488抗兔(Molecular Probes, #A11008)且在室溫下培育1小時。如之前般將板洗滌三次，隨後向各孔中添加20 μ l PBS且用黑色板密封物對板進行密封。

在用488 nm雷射激勵之後，儘可能快地在Acumen讀板儀上讀取該等板，量測綠色螢光。使用此系統產生IC₅₀值且藉由對照孔測定板之品質。每次均操作參考化合物以監測分析效能。

(e) 偵測Jeko細胞中之磷酸化AKT(ser473)之方案

此分析用於量測細胞中之PI3K- δ 抑制。將化合物以 $\times 10$ 最終濃度添加至Greiner V形底96孔板(Sigma #M9686)之孔中之10 μ l 1% (v/v) DMSO中。以1 μ M或10 μ M最高劑量之10點濃度範圍給予化合物，在一個板上給予8種化合物。每一給予有抗IgM (AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人類IgM (Strattech, # 109-006-129)及媒劑之板存在8個最大信

號對照孔，且給予有抗IgM及參考PI3K- δ 抑制劑之對照孔存在8個最小信號。最終媒劑濃度為0.1% DMSO。各操作中均包括PI3K- δ 選擇性化合物之完整劑量反應曲線。將Jeko B細胞(人類套細胞淋巴瘤，ATCC #CRL-3006)接種於含有化合物之Greiner V形底96孔板中。以每孔100,000個細胞將細胞接種於含有1%麩醯胺酸之70 μ l RPMI中。

使細胞板與化合物一起在37°C培育箱中培育1小時。在此化合物預培育時間之後，以20 μ l分析緩衝液(含有1%麩醯胺酸之RPMI)中之 $\times 5$ 最終濃度將上述抗IgM添加至該等板。最終抗IgM濃度為0.06 μ g/ml或等效之EC90劑量。在37°C下將板培育10分鐘，隨後立即將板置放於冰上且在12000 rpm下離心4分鐘。在冰上，用手動移液管小心地移除上清液且添加40 μ l溶解緩衝液。將板在冰上培育5分鐘且儲存在-80°C下直至根據製造商之說明書(Mesoscale Diagnostics, #K11100D-3)在磷光體(Ser473)/總Akt全細胞溶菌液套組中分析。

(f) 用於偵測HT29細胞中之磷酸化Chk1 (Ser 345)之方案

ATR(共濟失調毛細管擴張+Rad3相關激酶)為對DNA損傷或複製阻斷起反應而使絲胺酸或蘇胺酸殘基上之多個受質磷酸化之PI3激酶相關的激酶。Chk1 (ATR之下游蛋白激酶)在DNA損傷檢查點控制中起重要作用。Chk1之活化涉及Ser317及Ser345之磷酸化(後者視為藉由ATR磷酸化/活化之優先目標)。

此為基於細胞之分析，用於藉由在用化合物及UV模擬劑4NQO (Sigma #N8141)處理之後量測HT29細胞中Chk1 (Ser 345)之磷酸化減少，來量測ATR激酶之抑制。將HT29細胞(ECACC #85061109)以每孔6000個細胞之密度接種於384孔分析板(Costar #3712)中含有1% L-麩醯胺酸及10% FBS之40 μ l EMEM培養基中且使其黏附隔夜。次日早晨藉由聲學分配將含化合物之100% DMSO添加至分析板中。在37°C及5% CO₂下培育1小時之後，藉由聲學分配向所有孔中添加40 nl含3

mM 4NQO之100% DMSO，除了未用4NQO處理以產生空反應對照之最小對照孔。將板返回至培育箱，再持續1小時。隨後藉由添加20 μ l 含3.7%甲醛之PBS溶液且在室溫下培育20分鐘來固定細胞。隨後添加20 μ l 含0.1% Triton X100之PBS且在室溫下培育10分鐘以滲透細胞。隨後使用Biotek EL405洗板機，每孔用50 μ l PBS洗滌該等板一次。

在含有0.05%聚山梨醇酯/Tween之PBS中將磷酸化Chk1 Ser 345抗體(Cell Signalling Technology #2348)稀釋150倍且向各孔中添加15 μ l 並在室溫下培育隔夜。次日早晨使用Biotek EL405洗板機，每孔用50 μ l PBS洗滌板三次，且隨後添加20 μ l 二級抗體溶液，即含有500倍稀釋之Alexa Fluor 488山羊抗兔IgG (Molecular Probes #A-11008)及0.002 mg/ml Hoeschst染料(Molecular Probes #H-3570)之PBST。在室溫下培育2小時後，使用Biotek EL405洗板機，每孔用50 μ l PBS洗滌板三次，且隨後用黑色板密封物對板進行密封直至讀取。使用ArrayScan VTI儀器，使用具有10X物鏡之XF53濾光器來讀取板。使用雙雷射設置來分析細胞核之Hoeschst (405 nM)染色及二級抗體之pChk1 (488 nM)染色。

(g) 腫瘤細胞株中之細胞增殖分析(用於證實個人化藥物假設)

在標準增殖分析中測定人類癌細胞株池對化合物作用之靈敏度。經由AstraZeneca細胞庫獲得細胞株。大部分細胞株亦可經由熟習此項技術者已知的細胞庫Repositories獲得，例如ATCC、ECACC、DMSZ、RIKEN、KCLB、JCRB(HSRRB)、LBNL、CLS及ICLC。

將細胞以每孔1000-6000個細胞之密度塗在96孔板中含有10% FBS之RPMI培養基中。在37°C下培育16小時之後，向分析板添加各種濃度之化合物。在再培育72小時之後，藉由向各孔中添加MTS試劑(Promega #3582)並持續2小時來測定活細胞。MTS為四唑鎘鹽，其在電子偶合試劑存在下藉由代謝活性細胞生物還原成甲臞。隨後藉由

490 nm下之吸光度對甲臆產物進行定量，作為活細胞之相對數目的指標。為測定GI50(細胞生長受到50%抑制時所處之濃度)，藉由與添加藥物前之MTS讀數進行比較來測定藥物添加時所存在之細胞的相對數目，且自未經處理之細胞之72小時值扣除此值作為分析期間細胞生長之量度。

此資料之分析描述在下文『個人化醫療/個人化藥物實例』下，說明可如何分析此資料以揭露PI3K α 抑制劑展示出具有PIK3CA基因突變之細胞株的選擇性生長抑制。此說明個人化醫療(PHC)或個人化藥物機會，其中反應預測生物標記讀數可用於鑑別患有含有PIK3CA基因突變之腫瘤的患者及較可能對本文中所述之化合物起反應的患者。

對本文中所述之化合物起反應的其他可能標記包括(但不限於)增加之複本數目、PIK3CA基因之擴增或易位及提供PI3激酶路徑活化或依賴性之量度的其他遺傳、基因組或蛋白質組變化；例如(但不限於)一或多種受體酪胺酸激酶之活化或編碼PI3激酶之調控次單位(p85)的PIK3R基因中之突變或易位，或諸如pAKT、pS6或FOXO狀態之下游信號傳導標記之磷酸化。另外，其他基因及/或其蛋白質產物(例如Kras)之信號傳導的分析可幫助改良個人化藥物方法之預測。

(h) 用於偵測生長於雄性SCID小鼠中之MCF-7腫瘤的磷酸化AKT(ser473)的方案

此為在動物模型中提供PI3K- α 抑制之量度的藥效學分析。使雄性SCID小鼠(AZ UK，亦可購自Charles River, UK)皮下(s.c.)移植人類乳腺癌細胞株MCF7(ICRF London，亦可購自ATCC # HTB-22)，來測定PI3激酶抑制劑對AKT之磷酸化的抑制。在細胞植入前24小時，使小鼠植入0.5 mg 21天雌激素集結粒(Innovative Research of America, #E121)。將50%基質膠(BD Bioscience)中之 5×10^6 個細胞皮下注射在該等動物之左側腰窩上。當腫瘤達到400 mm³體積時將動物隨機分成8隻

對照動物之組及4隻處理動物之組且在次日開始給藥。在所選擇之時間點獲取腫瘤，此時亦獲取血液樣本進行PK量測。

將自小鼠切除之腫瘤置放於Fast Prep管(2 ml含有溶解基質A之脊形管，MP Biomedicals #6910-500)中且立即急凍。向各管中添加1 ml溶解緩衝液(25 mM Tris、3 mM EDTA、3 mM EGTA、50 mM氯化鈉、2 mM原鈳酸鹽、0.27 M蔗糖、10 mM β -甘油磷酸鹽、5 mM焦磷酸鹽、0.5% Triton x-100)加磷酸酶抑制劑(Sigma #P2850及Sigma #P5726，1:100稀釋)及蛋白酶抑制劑(Sigma #P8340，1:200稀釋)。使腫瘤在FastPrep-TM機(MP Biomedicals #116004500)上均質化1分鐘，且隨後在冰上靜置5分鐘，再繼之以兩個均質化步驟，各均質化步驟後在冰上培育5分鐘。使樣本在13,000 rpm下在冷凍離心機中離心10分鐘。隨後將澄清溶菌液放入新鮮管中且使用10 μ l進行蛋白質測定分析。

使用MSD多點分析套組(Meso Scale Discovery # K1510OD-3)進行總AKT及磷酸化AKT (ser473)之偵測。板之各孔含有4個點；其中兩個點用由該套組提供之小鼠單株抗體塗佈；一個用針對總AKT之捕捉抗體塗佈且一個用針對磷酸化AKT (ser473)之抗體塗佈。在冷室中在震盪器上每孔用150 μ l阻斷溶液來阻斷該等板隔夜，該阻斷溶液係使用20 ml具有洗滌溶液加600 mg由該套組供應之Blocker A之1 \times 溶液製造。每孔用0.3 ml洗滌溶液洗滌板三次。自各腫瘤獲取溶菌液之等分試樣且用溶解緩衝液將其稀釋至2 mg/ml之濃度，隨後向各孔中添加25 μ l經稀釋之溶菌液，得到每孔50 μ g之總量。將該等板在室溫下置放於震盪器中，持續一小時，隨後洗滌板三次。使用阻斷溶液及洗滌溶液加1:50稀釋之50 \times SULFO-TAG-TM抗總AKT抗體之混合物製備偵測抗體溶液。將該等板在室溫下置放於震盪器中，持續一小時，隨後洗滌板三次。用去離子水1:4稀釋150 μ l由該套組供應之讀取緩衝液且

將其添加至各孔，且隨後在MSD板分析儀上讀取該等板。讀取緩衝液提供電化學發光之正確化學環境，因此當讀板儀向板施加電壓時，板基底上之電極使得標記與偵測抗體結合而發射光。所發射之光的強度為所存在之AKT (總AKT或磷酸化AKT)之定量量度。為計算磷酸化AKT與總AKT之比率，應用如由Meso Scale所推薦之計算法：兩倍磷酸化信號除以總信號加磷酸化信號，隨後乘以100，得到磷蛋白%。將該等值轉化成Log 10，且隨後使用此等值來計算各組之幾何平均值加標準誤差。隨後使用雙尾公式及不等變異數來應用史都登T測試以檢查顯著性。研究顯示，對照組8隻動物及每個治療組4隻動物足以支持該研究。

(i) 用於偵測移植至SCID小鼠中之人類乳腺癌細胞株MCF7中之腫瘤生長抑制的方案。

此方法提供在PI3K- α 依賴性模型中活體內PI3激酶抑制劑之抗腫瘤功效的評估。關於上文所指出之PD研究，使雄性SCID小鼠皮下移植人類乳腺癌細胞株MCF7。在細胞植入之前24小時，使小鼠植入0.5 mg 21天雌激素集結粒。將50%基質膠中之 5×10^6 個細胞皮下注射在該等動物之左側腰窩上。當腫瘤達到約200-300 mm³體積時將動物隨機分成10-15隻動物之組且開始治療。藉由經口、靜脈內或腹膜內途徑向動物給予適於經由所需途徑給予且符合福利要求之含化合物之媒劑(用於經口給藥之懸浮液，pH範圍為4-7；用於ip/iv給藥之溶液，pH範圍5.5-7.0)且以限定劑量給藥2-4週。通常藉由測徑規來量測腫瘤，每週兩次，且使用橢圓公式($\pi/6 \times$ 寬度 \times 寬度 \times 長度)計算腫瘤體積。

雖然式(I)化合物之藥理學性質正如所預期的隨結構變化而變化，但一般而言，式(I)化合物所具有之活性可在以下濃度或劑量下在以上測試(a)及(c)中之一或多者中得到證明：

測試(a)：在例如1 nM-100 nM範圍內，IC₅₀對比PI3K- α ；

測試(c)：在例如10 nM-1 μ M範圍內，BT474細胞中之IC₅₀對比細胞磷酸化AKT (Tyr308)；

特定本發明化合物宜在以下濃度或劑量下在以上測試(a)及(c)中之一或多者中具有活性：

測試(a)：在例如1 nM-100 nM範圍內，IC₅₀對比PI3K- α ；

測試(c)：在例如10 nM-1 μ M範圍內，BT474細胞中之IC₅₀對比細胞磷酸化AKT (Tyr308)；

特定本發明化合物宜在以下濃度或劑量下在以上測試(a)、(c)、(h)及(i)中之一或多者中具有活性：

測試(a)：在例如1 nM-100 nM範圍內，IC₅₀對比PI3K- α ；

測試(c)：在例如10 nM -1 μ M範圍內，BT474細胞中之IC₅₀對比細胞磷酸化AKT (Tyr308)；

測試(h)：在例如1-200毫克/公斤/天範圍內，活體內磷酸化AKT (ser473)抑制>50%；

測試(i)：在例如1-200毫克/公斤/天範圍內，異種移植活性。

產生實例之以下資料：

表A

實例編號	PI3K- α 抑制 IC ₅₀ (μ M)*	PI3K- δ 抑制 IC ₅₀ (μ M)*	PI3K- β 抑制 IC ₅₀ (μ M)*	PI3K- α 細胞 IC ₅₀ (μ M)**	ATR細胞 IC ₅₀ (μ M)#
1	0.023	<0.014	2.24	0.36	>30
3	0.007	<0.010	0.57	0.09	>30
4	0.025	<0.012	2.91	0.31	>30
5	0.030	0.012	3.31	0.27	>30
6	0.032	<0.012	3.42	0.53	>30
7	0.037	0.014	6.26	0.42	>30
8	0.024	0.012	1.52	0.59	>30
9	<0.010	<0.010	0.640	0.33	-

* 測試方案a：此等值為自多於用於計算針對既定實例化合物所引述之第一值所用之複製次數計算之平均值。

** 測試方案c：此等值為自多於用於計算針對既定實例化合物

所引述之第一值所用之複製次數計算之平均值。

測試方案f：僅進行一次測試複製。

組合研究

物質及方法

MCF7為攜帶PIKC3CA基因突變(E545K)之雌激素受體陽性乳房腫瘤細胞株。使雄性SCID小鼠(AZ UK)皮下(s.c.)移植人類乳腺癌細胞株MCF7 (ICRF London)以測定PI3激酶抑制劑之抗腫瘤活性。在細胞植入之前24小時，使小鼠植入0.5 mg 21天雌激素集結粒(Innovative Research of America)。將50%基質膠(BD Bioscience)中之 5×10^6 個細胞皮下注射在該等動物之左側腰窩上。

BT474為Her2表現提高之雌激素受體陽性乳房腫瘤細胞株且攜帶PIK3CA基因突變(K111N)。使雌性瑞士無胸腺裸小鼠(swiss nu/nu - AZUK)皮下移植在小鼠中繼代之人類上皮細胞乳腺管癌細胞株BT474c (以AZ形式源自BT474 - ATCC HTB-20)腫瘤。在細胞植入之前24小時，使小鼠植入0.36 mg 60天雌激素集結粒(Innovative Research of America)。將50%基質膠(BD Bioscience)中之 5×10^6 個細胞皮下注射在該等動物之左側腰窩上。

HCC70為缺乏PTEN基因表現之乳房腫瘤細胞株。使雌性瑞士無胸腺裸小鼠(swiss nu/nu - AZUK)皮下移植乳腺管上皮細胞腫瘤細胞株HCC70 (ATCC - CRL2315)細胞。將50%基質膠(BD Bioscience)中之 1×10^6 個細胞皮下注射在該等動物之左側腰窩上。

當腫瘤達到約200-300 mm³體積時將動物隨機分成10-15隻動物之組且開始治療。藉由經口途徑，以限定劑量及時程向動物給予含化合物之適合媒劑，持續3-4週。藉由測徑規來量測腫瘤，每週兩至三次，且使用橢圓公式($\pi/6 \times$ 寬度 \times 寬度 \times 長度)計算腫瘤體積。

當單獨給藥時，AZD5363係在10% DMSO、25% Kleptose溶液中

調配。(Kleptose係源自Roquette-Pharma (商標) 羥丙基 β -環糊精，適於活體內使用及調配)。

當與實例3共同給藥時，AZD5363係在HPMC/Tween (0.5% Methocel(羥丙基甲基纖維素)/0.1%聚山梨醇酯80)中調配。使懸浮液球磨隔夜。

實例3係在HPMC/Tween (0.5% Methocel(羥丙基甲基纖維素)/0.1%聚山梨醇酯80)中調配。

AZD8186係在HPMC/Tween (0.5% Methocel(羥丙基甲基纖維素)/0.1%聚山梨醇酯80)中調配。

當與實例3共同給藥時，AZD8186係在HPMC/Tween (0.5% Methocel(羥丙基甲基纖維素)/0.1%聚山梨醇酯80)中調配。使懸浮液球磨隔夜。

奧拉帕尼(Olaparib)係在10% DMSO/30% Kleptose溶液中調配。

藉由實例3與AKT抑制劑(AZD5363)之組合依序投藥抑制腫瘤生長

在BT474異種移植模型中進行研究。實例3及AZD5363依序以每週2天給藥/5天停藥之週期，每天給予兩次(BID)，相隔6-8小時，以使得AZD5363在每週週期之第1天及第2天給予且實例3在每週週期之第3天及第4天給予。實例3係以50毫克/公斤BID給予且AZD5363係以170毫克/公斤BID給予，分別在HPMC/Tween及DMSO/Kleptose中。

腫瘤生長曲線(圖9中所示)指示，間歇地給予實例3或AZD5363相對於僅含媒劑之對照(HPMC/Tween)部分地抑制腫瘤生長。實例3加AZD5363之組合誘導腫瘤消退。

藉由實例3與AKT抑制劑(AZD5363)之組合共同投藥抑制腫瘤生長

在BT474異種移植模型中進行研究。實例3及AZD5363每天給予兩次(BID)，相隔6-8小時且以每週2天給藥/5天停藥之週期伴隨給藥。實例3係以25毫克/公斤BID給予且AZD5363係以100毫克/公斤BID給

予，均在HPMC/Tween中。

腫瘤生長曲線(圖10中所示)指示，間歇地給予實例3或AZD5363相對於僅含媒劑之對照(HPMC/Tween)部分地抑制腫瘤生長。實例3加AZD5363之組合在給藥期間誘導腫瘤消退，但在不給藥期間繼之以腫瘤再生長。

藉由實例3與PARP抑制劑(奧拉帕尼)之組合抑制腫瘤生長

在BT474異種移植模型中進行研究。實例3及奧拉帕尼在整個研究中每天給予，實例3以25毫克/公斤各劑量每天給予兩次(BID)，相隔6-8小時；且奧拉帕尼在實例3之第一個日劑量之後1小時以100毫克/公斤每天給予一次(QD)。兩種藥劑均在HPMC/Tween中給予。

腫瘤生長曲線(圖11)指示，奧拉帕尼單獨對腫瘤生長無重要作用，實例3單獨部分地抑制生長，但實例3加奧拉帕尼之組合誘導腫瘤消退。

藉由實例3與PARP抑制劑(奧拉帕尼)之組合抑制腫瘤生長

在MCF7異種移植模型中進行研究。實例3及奧拉帕尼在整個研究中每天給予，實例3以25毫克/公斤各劑量每天給予兩次，相隔6-8小時；且奧拉帕尼在實例3之第一個日劑量之後1小時以100毫克/公斤每天給予一次(QD)。兩種藥劑均在HPMC/Tween中給予。

腫瘤生長曲線(圖12)指示，奧拉帕尼單獨對腫瘤生長具有極少作用，實例3單獨引起一些腫瘤消退但實例3加奧拉帕尼之組合誘導較強腫瘤消退。

藉由實例3與PI3K- β/δ 抑制劑(AZD8186)之組合抑制腫瘤生長

在HCC異種移植模型中進行研究。實例3及AZD8186在整個研究中每天給予，每天兩次(BID)，實例3以25毫克/公斤各劑量給予且AZD8186以50毫克/公斤各劑量給予。兩種藥劑均在HPMC/Tween中給予。

腫瘤生長曲線(圖13)指示，AZD8186部分地抑制腫瘤生長，實例3單獨較強烈地抑制生長，但實例3加AZD8186之組合誘導腫瘤消退。

根據本發明之又一態樣，提供一種醫藥組合物，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑組合。

用於錠劑調配物之適合之醫藥學上可接受的賦形劑包括例如惰性稀釋劑、成粒劑及崩解劑、黏合劑、潤滑劑、防腐劑及抗氧化劑。錠劑調配物可未包覆包衣或包覆包衣，以改變其崩解性及隨後活性成分在胃腸道內之吸收，或改良其穩定性及/或外觀，在任一情況下，均使用在此項技術中熟知之習知包衣劑及程序。

經口使用之組合物可呈硬明膠膠囊形式，其中活性成分與惰性固體稀釋劑混合；或呈軟明膠膠囊形式，其中活性成分與水或油混合。

水性懸浮液通常含有呈細粉形式之活性成分以及一或多種懸浮劑、分散劑或潤濕劑。水性懸浮液亦可含有一或多種防腐劑、抗氧化劑、著色劑、調味劑及/或甜味劑。

油性懸浮液可藉由將活性成分懸浮於植物油中或礦物油中來調配。油性懸浮液亦可含有增稠劑。可添加甜味劑(諸如上文所列之甜味劑)及調味劑，以提供可口之口服製劑。此等組合物可藉由添加抗氧化劑來保存。

適於藉由添加水來製備水性懸浮液之可分散性散劑及顆粒劑一般含有活性成分以及分散劑或潤濕劑、懸浮劑及一或多種防腐劑。亦可存在諸如甜味劑、調味劑及著色劑之額外賦形劑。

本發明醫藥組合物亦可呈水包油乳液形式。油相可為植物油或礦物油或任何此等油之混合物。乳液亦可含有甜味劑、調味劑及防腐劑。

糖漿及醃劑可使用甜味劑調配，且亦可含有緩和劑、防腐劑、調味劑及/或著色劑。

醫藥組合物亦可呈無菌可注射水性或油性懸浮液之形式，其可根據已知程序，使用上述適當分散劑或潤濕劑及懸浮劑中之一或多者來調配。無菌可注射製劑亦可為含於無毒非經腸可接受之稀釋劑或溶劑中之無菌可注射溶液或懸浮液。

用於經吸入投藥之組合物可呈習知加壓氣霧劑之形式，該加壓氣霧劑經配置以分配呈含有細粉狀固體之氣霧劑形式或液滴形式之活性成分。可使用諸如揮發性氟化烴或烴之習知氣霧劑推進劑，且便利地配置氣霧劑裝置以分配定量之活性成分。

有關調配物之其他資訊，請讀者參考 *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Corwin Hansch；編輯委員會主席)，Pergamon Press 1990 之第5卷，第25.2章。

與一或多種賦形劑組合以產生單一劑型之活性成分的量將必需視所治療主體及特定投藥途徑而變化。舉例而言，向人類經口投藥將通常需要例如1 mg至2 g活性劑(更適當地100 mg至2 g，例如250 mg至1.8 g，諸如500 mg至1.8 g，尤其500 mg至1.5 g，宜為500 mg至1 g)與適當且適宜量之賦形劑混合投與，該等賦形劑可在總組合物之約3重量%至約98重量%內變化。應瞭解，若需要大劑量，則可需要多種劑型，例如兩種或兩種以上錠劑或膠囊，其中活性成分之劑量宜在其間劃分。適宜地，單一固體劑型可含有1 mg與300 mg之間之活性成分。

為達成治療或預防目的之式(I)化合物之劑量大小自然將根據疾病病況之性質及嚴重程度、動物或患者之年齡及性別及投藥途徑，根據熟知之醫學原則而變化。

在使用式(I)化合物以達成治療或預防目的時，一般將投與式(I)化合物以致接受例如每公斤體重1 mg至每公斤體重100 mg之範圍內的

日劑量，若需要則分次給藥。一般而言，當採用非經腸途徑時，將投與較低劑量。因此，例如，對於靜脈內投與而言，通常將使用介於例如每公斤體重1 mg至每公斤體重25 mg範圍內之劑量。類似地，對於經吸入投與而言，將使用介於例如每公斤體重1 mg至每公斤體重25 mg範圍內之劑量。然而，經口投與(特定言之以錠劑形式)為較佳的。典型地，單位劑型將含有約10 mg至0.5 g之本發明化合物。

如上所述，已知PI3K- α 及 δ 酶藉由以下作用中之一或多者促成腫瘤形成：介導癌症及其他細胞之增殖、介導血管生成事件及介導癌細胞之活動、遷移性及侵襲性。已發現，本發明化合物具有強力抗腫瘤活性，該活性或信藉助於抑制涉及信號轉導步驟之PI3K- α 及 δ 酶而獲得，該等信號轉導步驟引起腫瘤細胞增殖及存活及使腫瘤細胞轉移之侵襲性及遷移能力。

因此，本發明化合物具有作為抗腫瘤劑之價值，詳言之，作為哺乳動物癌細胞增殖、存活、活動、播散及侵襲之選擇性抑制劑，從而抑制腫瘤生長及存活並抑制轉移性腫瘤生長。特定言之，本發明化合物具有在抑制及/或治療實體腫瘤疾病方面作為抗增殖性及抗侵襲性藥劑的價值。特定言之，本發明化合物預期適用於預防或治療對PI3K- α 及/或 δ 酶之抑制敏感且涉及信號轉導步驟之彼等腫瘤，該等信號轉導步驟引起腫瘤細胞增殖及存活及使腫瘤細胞轉移之遷移能力及侵襲性。另外，本發明化合物預期適用於預防或治療單獨或部分地藉由抑制PI3K- α 及/或 δ 酶來介導之彼等腫瘤，亦即該等化合物可用以在需要該治療之溫血動物中產生PI3K- α 及/或 δ 酶抑制作用。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義在諸如人類之溫血動物中用作藥物。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於在諸如人類之溫血動物中產生抗增殖性作

用。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於在諸如人類之溫血動物中作為抑制及/或治療實體腫瘤疾病之抗侵襲性藥劑。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義用於在諸如人類之溫血動物中產生抗增殖性作用。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於在諸如人類之溫血動物中產生抗增殖性作用。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於在諸如人類之溫血動物中作為抑制及/或治療實體腫瘤疾病之抗侵襲性藥劑。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種於需要治療之溫血動物(諸如人類)中產生抗增殖性作用之方法，其包含向該動物投與有效量之如上定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種藉由於需要治療之溫血動物(諸如人類)中抑制及/或治療實體腫瘤疾病來產生抗侵襲性作用之方法，其包含向該動物投與有效量之如上定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於在諸如人類之溫血動物中預防或治療癌症。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於在諸如人類之溫血動物中預防或治療癌症。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種於需要治療之溫血動物(諸如人類)中預防或治療癌症之方法，其包含向該動物投與有效量之如上定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於在諸如人類之溫血動物中預防或治療實體腫瘤疾病。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於在諸如人類之溫血動物中預防或治療實體腫瘤疾病。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種於需要治療之溫血動物(諸如人類)中預防或治療實體腫瘤疾病之方法，其包含向該動物投與有效量之如上定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於預防或治療對抑制PI3K- α 及/或 δ 酶敏感、涉及信號轉導步驟之彼等腫瘤，該等信號轉導步驟引起腫瘤細胞之增殖、存活、侵襲性及遷移性能力。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於預防或治療對抑制PI3K- α 及/或 δ 酶敏感、涉及信號轉導步驟之彼等腫瘤，該等信號轉導步驟引起腫瘤細胞之增殖、存活、侵襲性及遷移性能力。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種用於預防或治療對抑制PI3K- α 及/或 δ 酶敏感、涉及信號轉導步驟之彼等腫瘤的方法，該等信號轉導步驟引起腫瘤細胞之增殖、存活、侵襲性及遷移性能力，該方法包含向該動物投與有效量之如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受

之鹽，如上文所定義適用於提供PI3K- α 及 δ 酶抑制作用。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於提供PI3K- α 及 δ 酶抑制作用。

根據本發明之另一態樣，亦提供一種用於提供PI3K- α 及 δ 酶抑制作用的方法，其包含投與有效量之如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

如上文所述，某些本發明化合物針對PI3K- α 及 δ 酶之效力實質上優於針對其他PI3激酶或其他激酶之效力。該等化合物具有針對PI3K- α 及 δ 酶之足夠效力，其可以足以抑制PI3K- α 及 δ 酶同時針對PI3K- β 酶及針對大多數其他激酶顯示極少活性之量使用。該等化合物可能適用於選擇性抑制PI3K- α 及 δ 酶且可能適用於有效治療例如PI3K- α 及/或 δ 酶驅動之腫瘤。

根據本發明之此態樣，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於提供選擇性PI3K- α 及 δ 酶抑制作用。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於提供選擇性PI3K- α 及 δ 酶抑制作用。

根據本發明之另一態樣，亦提供一種用於提供選擇性PI3K- α 及 δ 酶抑制作用的方法，其包含投與有效量之如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

「選擇性PI3K- α 及 δ 酶抑制作用」意謂式(I)化合物針對PI3K- α 及 δ 酶之效力強於針對其他I類PI3激酶之效力，且通常展示出關於較寬PI3激酶家族之其他成員及在包含酪胺酸及ser/thr激酶之較寬激酶類別中的良好選擇性。

根據本發明之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受

之鹽，如上文所定義適用於治療乳癌；胃(Stomach/Gastric)癌及食管癌；非小細胞肺癌(NSCLC)，包括鱗狀細胞癌(SCC)及腺癌、頭頸部(H&N)之SCC；婦科癌症(包括子宮內膜癌、卵巢癌及子宮頸癌)及血液科癌症，諸如多發性骨髓瘤、淋巴瘤及白血病(包括慢性淋巴細胞白血病(CLL)、急性淋巴母細胞白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤(MCL)。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於治療膀胱癌、腦/CNS癌、結腸直腸癌、肺癌(所有其他形式)、膽囊癌及膽管癌以及皮膚癌。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽，如上文所定義適用於治療前列腺癌、骨癌、腎癌、肝癌、黑素瘤癌、胃腸組織癌、胰腺癌、睪丸癌、甲狀腺癌、陰莖癌、外陰癌及經由突變、擴增或其他畸變具有PI3激酶依賴性之其他腫瘤類型。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種用於治療需要治療之溫血動物(諸如人類)中之乳癌、胃癌及食管癌、NSCLC(包括SCC及腺癌、H&N之SCC)、婦科癌症(包括子宮內膜癌、卵巢癌及子宮頸癌)及血液科癌症(諸如多發性骨髓瘤、淋巴瘤及白血病(包括CLL、ALL及MCL))的方法，其包含投與有效量之如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種用於治療需要治療之溫血動物(諸如人類)中之膀胱癌、腦/CNS癌、結腸直腸癌、肺癌(所有其他形式)、膽囊癌及膽管癌以及皮膚癌的方法，其包含投與有效量之如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供一種用於治療需要治療之溫血動物(諸如人類)中之前列腺癌、骨癌、腎癌、肝癌、黑素瘤癌、胃腸組織癌、胰腺癌、睪丸癌、甲狀腺癌、陰莖癌、外陰癌及經

由突變、擴增或其他畸變具有PI3激酶依賴性之其他腫瘤類型的方法，其包含投與有效量之如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

根據本發明之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於治療乳癌、胃癌及食管癌、NSCLC(包括SCC及腺癌、H&N之SCC)、婦科癌症(包括子宮內膜癌、卵巢癌及子宮頸癌)及血液科癌症(諸如多發性骨髓瘤、淋巴瘤及白血病(包括CLL、ALL及MCL))。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於治療膀胱癌、腦/CNS癌、結腸直腸癌、肺癌(所有其他形式)、膽囊癌及膽管癌以及皮膚癌。

根據本發明之此態樣之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，如上文所定義在藥物製造中適用於治療前列腺癌、骨癌、腎癌、肝癌、黑素瘤癌、胃腸組織癌、胰腺癌、睪丸癌、甲狀腺癌、陰莖癌、外陰癌及經由突變、擴增或其他畸變具有PI3激酶依賴性之其他腫瘤類型。

在本發明之一個特徵中，待治療之癌症為乳癌。在此特徵之另一態樣中，該乳癌為雌激素受體陽性。在此態樣之一個實施例中，式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與如本文所定義之抗激素劑組合給予。在此態樣之另一實施例中，實例3與如本文所定義之抗激素劑組合給予。在此態樣之又一實施例中，實例3與奧拉帕尼或其醫藥學上可接受之鹽組合，且視情況進一步與如本文所定義之抗激素劑組合給予。在此態樣之又一實施例中，實例3與AZD5363或其醫藥學上可接受之鹽組合，且視情況進一步與如本文所定義之抗激素劑組合給予。

在表明癌症治療之一個態樣中，應瞭解，此治療可指預防轉移

及治療轉移(亦即癌症擴散)。因此，本發明化合物可用於治療不具有轉移之患者而終止轉移發生，或延長轉移發生前之時間段，及針對已具有轉移之患者來治療轉移本身。此外，癌症治療可指治療確定之原發性腫瘤及發展中之原發性腫瘤。因此，在一個態樣中，癌症治療係關於預防轉移。在本發明之另一態樣中，癌症治療係關於治療轉移。在本發明之另一態樣中，癌症治療係關於治療確定之原發性腫瘤或發展中之原發性腫瘤。

如上文所述，式(I)化合物之活體內作用可部分藉由在投與式(I)化合物之後在人體或動物體內形成之一或多種代謝物(諸如如上文所定義之式A化合物)來發揮。

特定本發明化合物針對PI3激酶 α 及 δ 之效力優於針對其他I類PI3激酶同功異型物(諸如 β 及 γ)之效力。在一個態樣中，本發明化合物具有相比於PI3K- β 或 γ 針對PI3K- α 及 δ 之選擇性。

因此，本發明亦涵蓋一種用於抑制患者中之PI3激酶 α 之方法，其包含向患者投與有效抑制該患者中之磷酸肌醇3-激酶- α 之量的式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

因此，本發明亦涵蓋一種用於抑制患者中之PI3激酶- α 及 δ 之方法，其包含向患者投與有效抑制該患者中之PI3激酶- α 及 δ 之量的式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽為PI3激酶之抑制劑，在各種其他疾病病況中亦具有潛在治療用途。舉例而言，PI3激酶在促進血管樹(亦即血管平滑肌細胞)中(Thyberg, **European Journal of Cell Biology**, 1998, **76(1)**, 33-42)，及肺(氣管平滑肌細胞)中(Krymskaya, V.P., **BioDrugs**, 2007, **21(2)**, 85-95)之平滑肌增殖方面起重要作用。血管平滑肌細胞之過度增殖在侵襲性血管程序之後在形成動脈粥樣硬化斑中及在發展新生內膜增生中起重要作用(Scwartz等人, **Progress in**

Cardiovascular Disease, 1984, **26**, 355-372 ; Clowes等人, **Laboratory Investigations**, 1978, **39**, 141-150)。此外，氣管平滑肌細胞之過度增殖在哮喘及慢性支氣管炎背景下引起COPD之發展。因此，可使用PI3激酶活性之抑制劑來預防血管再狹窄、動脈粥樣硬化及COPD。

PI3激酶在白血球功能(Fuller等人, **The Journal of Immunology**, 1999, **162**(11), 6337-6340 ; Eder等人, **The Journal of Biological Chemistry**, 1998, **273**(43), 28025-31)及淋巴細胞功能(Vicente-Manzanares等人, **The Journal of Immunology**, 1999, **163**(7), 4001-4012)中亦起重要作用。舉例而言，白血球與發炎內皮之黏附涉及藉由PI3激酶依賴性信號傳導過程活化內源性白血球整合素。此外，嗜中性白血球中之氧化爆發(Nishioka等人, **FEBS Letters**, 1998, **441**(1), 63-66及Condliffe, A.M.等人, **Blood**, 2005, **106**(4), 1432-40)及細胞骨架重組(Kirsch等人, **Proceedings National Academy of Sciences USA**, 1999, **96**(11), 6211-6216)似乎涉及PI3激酶信號傳導。嗜中性白血球遷移及定向移動亦視PI3激酶活性而定(Camps, M.等人, **Nat Med**, 2005, **11**(9), 936-43及Sadhu, C.等人, **J Immunol**, 2003, **170**(5), 2647-54)。因此，PI3激酶之抑制劑可適用於減少在發炎位點處之白血球黏附及活化且因此可用以治療急性及/或慢性發炎病症。PI3激酶在淋巴細胞增殖及活化中亦起重要作用(Fruman等人, **Science**, 1999, **283** (5400), 393-397)。特定言之，PI3K- δ 對B細胞發育及功能為至關重要的，包括IgM特異性抗體誘導之B細胞增殖(Okkenhaug K等人, **Science**, 2002, **297**(5583), 1031-1034)、B細胞受體誘導之DNA合成與增殖及IL-4-誘導之存活(Bilancio A等人, **Blood**, 2006, **107**, 642-650)。此等觀察結果表明，PI3K- δ 在不能藉由其他I類PI3K補償之B細胞功能中具有至關重要且非冗餘之作用。考慮到淋巴細胞在自體免疫疾病中之重要作用，可使用PI3激酶活性之抑制劑來治療該等病症(Rommel C, Camps M及

Ji H, *Nat Rev Immunol*, 2007, **1038**, 191-201)。

上文所定義之抗癌治療可以單獨療法形式施用，或除本發明之化合物外，亦可涉及習知外科手術或放射線療法或化學療法。該化學療法可包括以下抗腫瘤劑類別中之一或多者：

(i) 如腫瘤醫學中所用之抗增生性藥物/抗贅生性藥物及其組合，諸如烷基化劑(例如順鉑、奧賽力鉑(oxaliplatin)、卡鉑、環磷醯胺、氮芥子氣、美法侖(melphalan)、苯丁酸氮芥、白消安、替莫唑胺(temozolamide)及亞硝基脲)；抗代謝物(例如吉西他濱(gemcitabine)及抗葉酸製劑，諸如氟嘧啶，如5-氟尿嘧啶及喃氟啶(tegafur)、拉替曲澤(raltitrexed)、甲胺喋呤、胞嘧啶阿拉伯糖苷及羥基脲)；抗腫瘤抗生素(例如蒽環黴素(anthracycline)，如艾黴素(adriamycin)、博萊黴素(bleomycin)、小紅莓(doxorubicin)、道諾黴素(daunomycin)、表柔比星(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)、絲裂黴素C (mitomycin-C)、更生黴素(dactinomycin)及米拉黴素(mithramycin))；抗有絲分裂劑(例如長春花生物鹼，如長春新鹼、長春鹼、長春地辛(vindesine)及長春瑞濱(vinorelbine)，及紫杉類(taxoid)，如紫杉醇(taxol)及多烯紫杉醇(taxotere)，及 polo 激酶抑制劑)；及拓撲異構酶抑制劑(例如表鬼臼毒素，如依託泊苷(etoposide)及替尼泊甙(teniposide)，安吡啶(amsacrine)、拓朴替康(topotecan)及喜樹鹼)；

(ii) 抗激素劑，諸如抗雌激素(例如它莫西芬(tamoxifen)、氟維司群(fulvestrant)、托瑞米芬(toremifene)、雷諾昔酚(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)及艾多昔芬(iodoxyfene))、抗雄激素(例如比卡魯胺(bicalutamide)、氟他胺、尼魯米特(nilutamide)及乙酸環丙孕酮(cyproterone acetate))、LHRH拮抗劑或LHRH促效劑(例如戈舍瑞林(goserelin)、亮丙瑞林及布舍瑞林(buserelin))、孕激素(例如乙酸甲地孕酮)、芳香酶抑制劑(例如阿那曲唑(anastrozole)、來曲唑

(letrozole)、維拉唑(vorazole)及依西美坦(exemestane))及5 α 還原酶抑制劑(諸如非那雄安(finasteride))；

(iii) 生長因子功能及其下游信號傳導路徑之抑制劑：包括任何生長因子或生長因子受體目標之Ab調節劑，由Stern等人 **Critical Reviews in Oncology/Haematology**, 2005, **54**, 第11-29頁)綜述；亦包括該等目標之小分子抑制劑，例如激酶抑制劑，實例包括抗erbB2抗體曲妥珠單抗(trastuzumab)[Herceptin™]、抗EGFR抗體帕尼單抗(panitumumab)、抗EGFR抗體西妥昔單抗(cetuximab)[Erbitux, C225]及酪胺酸激酶抑制劑，包括erbB受體家族之抑制劑，諸如表皮生長因子家族受體(EGFR/erbB1)酪胺酸激酶抑制劑，諸如吉非替尼(gefitinib)或埃羅替尼(erlotinib)，erbB2酪胺酸激酶抑制劑，諸如拉帕替尼(lapatinib)，及混合erb1/2抑制劑，諸如阿法替尼(afatinib)；類似策略可用於生長因子及其受體之其他類別，例如肝細胞生長因子家族或其受體(包括c-met及ron)之抑制劑；胰島素及胰島素生長因子家族或其受體(IGFR、IR)之抑制劑、血小板衍生之生長因子家族或其受體(PDGFR)之抑制劑及藉由其他受體酪胺酸激酶(諸如c-kit、AnLK及CSF-1R)介導之信號傳導之抑制劑；

亦包括在較寬PI3激酶信號傳導路徑中靶向信號傳導蛋白質之調節劑，例如其他PI3激酶同功異型物(諸如PI3K- β)及ser/thr激酶(諸如AKT、mTOR、PDK、SGK、PI4K或PIP5K)之抑制劑；

亦包括以上未列出之絲胺酸/蘇胺酸激酶之抑制劑，舉例而言，諸如維羅非尼(vemurafenib)之raf抑制劑，諸如司美替尼(selumetinib)(AZD6244)之MEK抑制劑，諸如伊馬替尼(imatinib)或尼羅替尼(nilotinib)之Abl抑制劑，諸如依魯替尼(ibrutinib)之Btk抑制劑，諸如福他替尼(fostamatinib)之Syk抑制劑，極光激酶抑制劑(例如AZD1152)，諸如JAK、STAT及IRAK4之其他ser/thr激酶抑制劑，及週

期素依賴性激酶抑制劑；

iv) DNA損傷信號傳導路徑之調節劑，例如PARP抑制劑(例如奧拉帕尼)、ATR抑制劑或ATM抑制劑；

v) 細胞凋亡及細胞死亡路徑之調節劑，諸如Bcl家族調節劑(例如ABT-263/Navitoclax、ABT-199)；

(vi) 抗血管生成劑，諸如抑制血管內皮生長因子之作用的彼等藥劑，[例如抗血管內皮細胞生長因子抗體貝伐單抗(bevacizumab)(Avastin™)及例如VEGF受體酪胺酸激酶抑制劑，諸如索拉非尼(sorafenib)、阿西替尼(axitinib)、帕佐泮尼(pazopanib)、舒尼替尼(sunitinib)及凡德他尼(vandetanib)(及藉由其他機制起作用之化合物(例如利諾胺(linomide)、整合素 $\alpha v \beta 3$ 功能之抑制劑及血管生長抑素)]；

(vii) 血管破壞劑，諸如康柏斯達汀A4(Combretastatin A4)；

(viii) 抗侵襲劑，例如c-Src激酶家族抑制劑，如(達沙替尼(dasatinib), *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 6658-6661)及伯舒替尼(bosutinib)(SKI-606)，及金屬蛋白酶抑制劑，如馬立馬司他(marimastat)、尿激酶纖維蛋白溶酶原活化劑受體功能之抑制劑或針對肝素酶之抗體]；

(ix) 免疫療法方法，包括例如增加患者腫瘤細胞之免疫原性之離體及活體內方法，諸如以諸如介白素2、介白素4或顆粒球巨噬細胞群落刺激因子之細胞激素轉染，減少T細胞無因變性之方法，使用諸如細胞激素轉染之樹突狀細胞之經轉染免疫細胞之方法，使用細胞激素轉染之腫瘤細胞株之方法，及使用抗個體基因型抗體之方法。特定實例包括靶向PD-1之單株抗體(例如BMS-936558)或靶向CTLA4之單株單抗(例如伊匹單抗(ipilimumab)及曲美單抗(tremelimumab))；

(x) 反義或基於RNAi之療法，例如有關所列目標之彼等療法。

(xi) 基因療法方法，包括例如置換異常基因(諸如異常p53或異常BRCA1或BRCA2)的方法；GDEPT(基因定向酶前藥療法)方法，諸如使用胞嘧啶脫胺酶、胸苷激酶或細菌性硝基還原酶的彼等方法；以及增強患者對化學療法或放射線療法之耐受性的方法(諸如多重藥物抗性基因療法)。

根據本發明之此態樣，提供適用於治療癌症之組合，包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及另一抗腫瘤劑，尤其是在上文之(i)-(xi)下所列之抗腫瘤劑中之任一者。特定言之，以上在(i)-(xi)下所列之抗腫瘤劑為待治療之特定癌症之護理標準；熟習此項技術者應瞭解「護理標準」之含義。

因此，在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與另一抗腫瘤劑之組合，尤其是選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑。

在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與另一抗腫瘤劑之組合，尤其是選自在上文之(i)下所列之一者的抗腫瘤劑。

在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及在上文之(i)下所列之任一抗腫瘤劑。

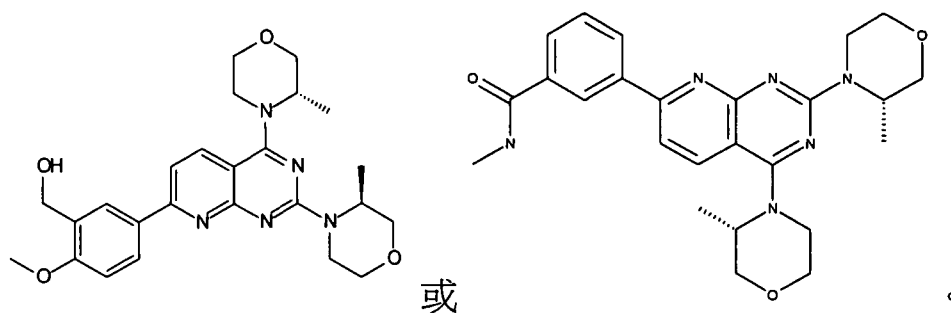
在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及紫杉類，諸如紫杉醇或紫杉德，以紫杉德為宜。

在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與另一抗腫瘤劑之組合，尤其是選自在上文之(ii)下所列之一者的抗腫瘤劑。

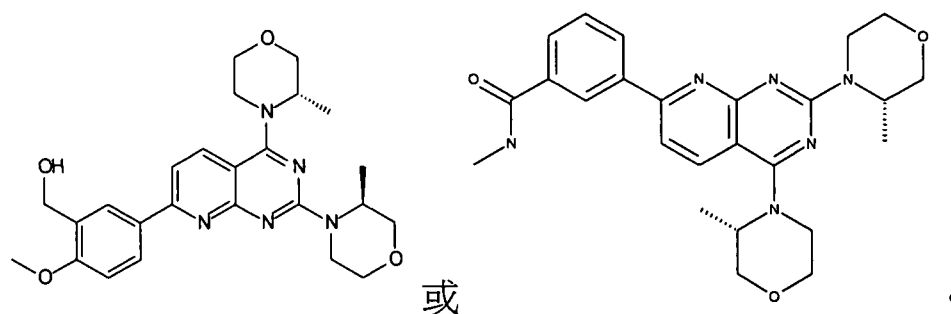
在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其

包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及在上文之(ii)下所列之抗激素劑中之任一者，例如在上文之(ii)中所列之抗雌激素中之任一者。

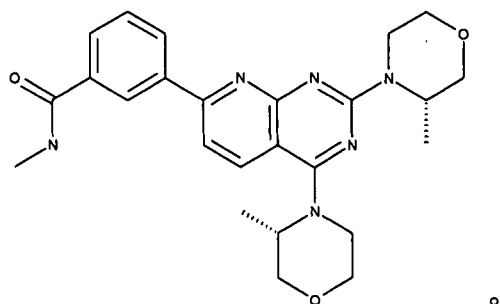
在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與mTOR抑制劑之組合，諸如WO2008/023161中所揭示之彼等mTOR抑制劑，例如



在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及mTOR抑制劑，諸如WO2008/023161中所揭示之彼等mTOR抑制劑，例如



特定言之，mTOR抑制劑為AZD2014，其具有以下結構：



在一個態樣中，式(I)化合物與AZD2014之以上組合適用於治療ER陽性乳癌，視情況與護理性激素療法標準組合。

在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受

之鹽與PI3K- β 之抑制劑之組合。

式(I)化合物與PI3K- β 之抑制劑的組合可尤其適用於治療腫瘤，例如前列腺腫瘤、乳房腫瘤(例如三陰性乳房腫瘤)、鱗狀細胞NSCLC及腎癌，其中PTEN背景缺失。

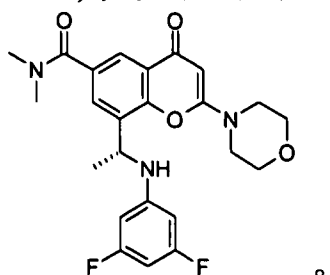
在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及PI3K- β 之抑制劑。

在一個態樣中，本文中所述之PI3K- β 之抑制劑亦具有一些PI3K- δ 抑制活性。

在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與PI3K- β 之抑制劑之組合，諸如國際專利申請案WO2011/051704中之實例中之任一者。

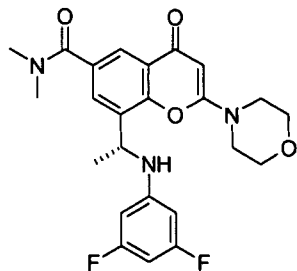
在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及PI3K- β 之抑制劑，諸如國際專利申請案WO2011/051704中之實例中之任一者。

在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與PI3K- β 及PI3K- δ 之抑制劑之組合，該抑制劑諸如8-((1R)-1-(3,5-二氟苯胺基)乙基)-N,N-二甲基-2-N-嗎啉基-4-側氧基-4H-吡啶-6-甲醯胺(國際專利申請案WO2011/051704中之實例3.06b，亦稱為AZD8186)或其醫藥學上可接受之鹽：



在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及PI3K- β 與

PI3K- δ 之抑制劑，諸如8-((1R)-1-(3,5-二氟苯胺基)乙基)-N,N-二甲基-2-N-嗎啉基-4-側氧基-4H-吡啶-6-甲醯胺(國際專利申請案WO2011/051704中之實例3.06b，亦稱為AZD8186)或其醫藥學上可接受之鹽：



在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與AKT激酶之抑制劑之組合，該抑制劑諸如(S)-4-胺基-N-(1-(4-氯苯基)-3-羥丙基)-1-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲醯胺(AZD5363)或其醫藥學上可接受之鹽(參見例如WO2009/047563)。

式(I)化合物與AKT抑制劑之組合可尤其適用於治療PIK3CA基因中突變流行率較高之腫瘤，諸如ER陽性乳癌、子宮內膜癌、卵巢癌、鱗狀細胞NSCLC、胃癌、膀胱癌及膽道癌。

在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及AKT激酶之抑制劑，該抑制劑諸如(S)-4-胺基-N-(1-(4-氯苯基)-3-羥丙基)-1-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲醯胺(AZD5363)或其醫藥學上可接受之鹽(參見例如WO2009/047563)。

在本發明之另一態樣中，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與奧拉帕尼(4-[3-(4-環丙烷羰基-哌嗪-1-羰基)-4-氟-苯甲基]-2H-酞嗪-1-酮)或其醫藥學上可接受之鹽之組合。

式(I)化合物與奧拉帕尼之組合可尤其適用於BRCA野生型或缺失型三陰性乳癌中及雌激素受體陽性(ER陽性)乳癌中，尤其是具有PIK3CA基因突變之彼等癌症。

在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之組合，其包含如上文所定義之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及奧拉帕尼(4-[3-(4-環丙烷羰基-哌嗪-1-羰基)-4-氟-苯甲基]-2H-酞嗪-1-酮)或其醫藥學上可接受之鹽。

本發明之特定組合包含本文中之實例化合物(或其醫藥學上可接受之鹽)及如上文所述之mTOR抑制劑、PI3K β 抑制劑、AKT激酶之抑制劑或奧拉帕尼中之任一者。本發明之其他特定組合包含實例3(或其醫藥學上可接受之鹽)及如上文所述之mTOR抑制劑、PI3K β 抑制劑、AKT激酶之抑制劑或奧拉帕尼。本發明之其他特定組合包含實例3(或其醫藥學上可接受之鹽)及如上文所述之PI3K β 抑制劑、AKT激酶之抑制劑或奧拉帕尼(或此三者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽)。本發明組合之又一特定實例包含實例3(或其醫藥學上可接受之鹽)；及AZD8186、AZD5363及奧拉帕尼(或此三者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽)中之任一者。本發明組合之另一實例包含實例3及AZD2014。

在所有以上組合中，應瞭解，該組合亦可在如熟習此項技術者所瞭解之護理治療標準下給予，諸如上文(i)至(xi)之其他治療。舉例而言，當預期使用以上組合中之任一者來治療ER陽性乳癌時，可使用護理性激素療法標準(諸如在上文之(ii)下所列之彼等藥劑)以及本發明之組合。在其他態樣中，護理標準可適當地選自以上(i)。

因此，在本發明之另一態樣中，提供一種適用於治療癌症之三重組合

- a) 式(I)化合物(諸如實例3)或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) mTOR抑制劑、PI3K β 抑制劑、AKT激酶之抑制劑或奧拉帕尼或其醫藥學上可接受之鹽；及
- c) 用於待治療之癌症的護理療法標準。

如熟習此項技術者所瞭解，護理療法標準適當地可根據其常見給藥方案給予。

根據本發明之另一態樣，提供一種醫藥組合物，其包含式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合，以及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

根據本發明之另一態樣，提供一種醫藥組合物，其包含實例3或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合，以及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

根據本發明之另一態樣，提供一種醫藥組合物，其包含實例3或其醫藥學上可接受之鹽與AZD5363、AZD8186或奧拉帕尼(或此三者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽)之組合以及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

根據本發明之另一態樣，提供一種用於治療癌症之醫藥組合物，其包含式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(ix)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合，以及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

根據本發明之另一態樣，提供一種用於治療癌症之醫藥組合物，其包含實例3或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合，以及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

根據本發明之另一態樣，提供一種用於治療癌症之醫藥組合物，其包含實例3或其醫藥學上可接受之鹽與AZD5363、AZD8186或奧拉帕尼(或此三者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽)之組合以及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

根據本發明之另一特徵，提供式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合的用途，

其係用於製造用於溫血動物(諸如人類)之癌症的藥物。

根據本發明之另一特徵，提供實例3或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合的用途，其係用於製造用於溫血動物(諸如人類)之癌症的藥物。

根據本發明之另一特徵，提供實例3或其醫藥學上可接受之鹽與AZD5363、AZD8186或奧拉帕尼(或此三者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽)之組合的用途，其係用於製造用於溫血動物(諸如人類)之癌症的藥物。

因此，在本發明之另一特徵中，提供一種治療需要治療之溫血動物(諸如人類)之癌症的方法，其包含向該動物投與有效量之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合。

因此，在本發明之另一特徵中，提供一種治療需要治療之溫血動物(諸如人類)之癌症的方法，其包含向該動物投與有效量之實例3或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合。

因此，在本發明之另一特徵中，提供一種治療需要治療之溫血動物(諸如人類)之癌症的方法，其包含向該動物投與有效量之實例3或其醫藥學上可接受之鹽與AZD5363、AZD8186或奧拉帕尼(或此三者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽)之組合。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽與選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫瘤劑之組合。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫

瘤劑；及

c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；

b) 呈第二單位劑型之選自在上文之(i)-(xi)下所列之一者的抗腫

瘤劑；

c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件；及視情況存在之

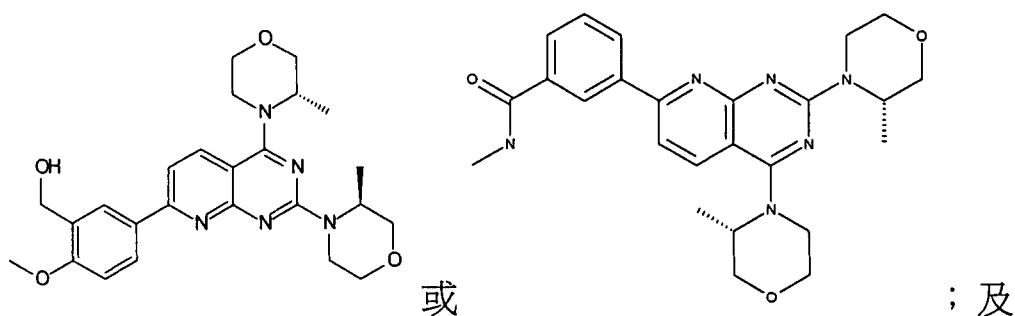
d) 使用說明書。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；

b) 呈第二單位劑型之mTOR抑制劑，諸如WO2008/023161中所

揭示之彼等mTOR抑制劑，例如



c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；

b) 呈第二單位劑型之PI3K- β 之抑制劑，諸如國際專利申請案WO2011/051704中之實例中之任一者或其醫藥學上可接受之鹽；及

c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；

b) 呈第二單位劑型之PI3K- β 之抑制劑，諸如國際專利申請案

WO2011/051704中之實例中之任一者或其醫藥學上可接受之鹽；

- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件；及視情況存在之
- d) 使用說明書。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之PI3K- β 及PI3K- δ 之抑制劑，其為8-((1R)-1-(3,5-二氟苯胺基)乙基)-N,N-二甲基-2-N-嗎啉基-4-側氧基-4H-吡啶-6-甲醯胺(國際專利申請案WO2011/051704中之實例3.06b，亦稱為AZD8186)或其醫藥學上可接受之鹽；及

- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之PI3K- β 及PI3K- δ 之抑制劑，其為8-((1R)-1-(3,5-二氟苯胺基)乙基)-N,N-二甲基-2-N-嗎啉基-4-側氧基-4H-吡啶-6-甲醯胺(國際專利申請案WO2011/051704中之實例3.06b，亦稱為AZD8186)或其醫藥學上可接受之鹽；

- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件；及視情況存在之
- d) 使用說明書。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之AKT激酶之抑制劑，諸如(S)-4-胺基-N-(1-(4-氨基)-3-羥丙基)-1-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽(AZD5363，參見例如WO2009/047563)；

- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件；及視情況存在之
- d) 使用說明書。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之AKT激酶之抑制劑，諸如(S)-4-胺基-N-(1-(4-氯苯基)-3-羥丙基)-1-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽(AZD5363，參見例如WO2009/047563)；及
- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之AKT激酶之抑制劑，諸如(S)-4-胺基-N-(1-(4-氯苯基)-3-羥丙基)-1-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲醯胺或其醫藥學上可接受之鹽(AZD5363，參見例如WO2009/047563)；
- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件；及視情況存在之
- d) 使用說明書。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之奧拉帕尼(4-[3-(4-環丙烷羰基-哌嗪-1-羰基)-4-氟-苯甲基]-2H-酞嗪-1-酮)或其醫藥學上可接受之鹽；及
- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件。

根據本發明之另一態樣，提供一種套組，其包含：

- a) 呈第一單位劑型之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- b) 呈第二單位劑型之奧拉帕尼(4-[3-(4-環丙烷羰基-哌嗪-1-羰基)-4-氟-苯甲基]-2H-酞嗪-1-酮)或其醫藥學上可接受之鹽；
- c) 用於容納該第一及該第二劑型之容器構件；及視情況存在之
- d) 使用說明書。

在所有以上組合、用途、治療方法及套組中，AZD5363、AZD8186及奧拉帕尼可呈游離鹼形式或呈醫藥學上可接受之鹽形式。因此，在一個實施例中，AZD5363呈游離鹼形式；在又一實施例中，

AZD5363呈醫藥學上可接受之鹽形式。在另一實施例中，AZD8186呈游離鹼形式；在又一實施例中，AZD8186呈醫藥學上可接受之鹽形式。在另一實施例中，奧拉帕尼呈游離鹼形式；在又一實施例中，奧拉帕尼呈醫藥學上可接受之鹽形式。

雖然式(I)化合物主要具有作為用於溫血動物(包括人類)之治療劑的價值，但其亦適用於需要抑制PI3激酶 α 及 δ 之作用的任何時候。因此，其適用作用於發展新生物測試及搜尋新藥理學藥劑中之藥理學標準。

本文中若使用術語「組合」，則應瞭解，此術語係指同時、各別或依序投藥。在本發明之一個態樣中，「組合」係指同時投藥。在本發明之另一態樣中，「組合」係指各別投藥。在本發明之另一態樣中，「組合」係指依序投藥。若投藥係依序或各別進行，則投與第二組分不應延遲以致失去有利的作用。

在一個實施例中，依序治療涉及在11天之時間段內投與該組合之各組分。在另一實施例中，此時間段為10天。在另一實施例中，此時間段為9天。在另一實施例中，此時間段為8天。在另一實施例中，此時間段為7天。在另一實施例中，此時間段為6天以內。在另一實施例中，此時間段為5天以內。在另一實施例中，此時間段為4天以內。在另一實施例中，此時間段為3天以內。在另一實施例中，此時間段為2天以內。在另一實施例中，此時間段為24小時以內。在另一實施例中，此時間段為12小時以內。

依序及共同投藥均在本文中於BT474模型中使用實例3及AZD5363之組合實驗中例示。在此實例中，依序投藥藉由給予AZD5363持續2天，繼之以實例3持續2天，隨後為3天不給予任一藥劑，接著重複該模式(「劑量週期」)來說明。共同投藥藉由以下給藥方案來說明，其中AZD5363及實例3均給予2天，繼之以5天不給予任

一藥劑。在這兩個實例中，依序投藥似乎在引起腫瘤消退方面較有效，展示出使方案達到最佳之潛在重要性。其他可能的共同給藥方案包括：

1) AZD5363及實例3均給予2天，繼之以3天不給予任一藥劑之給藥週期；

2) AZD5363及實例3均給予3天，繼之以4天不給予任一藥劑之給藥週期；

3) AZD5363及實例3均給予4天，繼之以3天不給予任一藥劑之給藥週期；

4) AZD5363及實例3均給予5天，繼之以2天不給予任一藥劑之給藥週期；

5) AZD5363及實例3每隔一天給予之給藥週期；

6) AZD5363及實例3每三天給予之給藥週期；

7) AZD5363及實例3以每週時程給予，給藥之間間隔3及4天(例如星期一/星期四)之給藥週期；

8) AZD5363及實例3以每週時程給予，給藥之間間隔2及3天(例如星期一/星期三/星期五)之給藥週期。

式(I)化合物、尤其實例3與mTOR抑制劑(諸如AZD2014或PI3K- β 抑制劑(諸如 β/δ 抑制劑AZD8186))之組合可適當地以與上文關於實例3及AZD5363之組合所述的彼等方案類似的方案給予。

式(I)化合物及奧拉帕尼之組合可根據以下方案給予，其中奧拉帕尼每天給予且式(I)化合物根據間歇性給藥時程給予(諸如2天給藥，繼之以3至5天不給藥)。

此等說明性給藥方案各自包含本發明之另一態樣。

在既定給藥週期內，投與該組合之一種特定組分，隨後為另一組分(亦即依序給藥)可為有利的。

因此，在一個實施例中，依序投藥包含在給藥週期內依序投與式(I)化合物(尤其實例3)，隨後投與在以上(i)至(xi)中所列之另一抗腫瘤劑，尤其是選自AZD5363、AZD8186及奧拉帕尼之抗腫瘤劑。

在另一實施例中，依序投藥包含在給藥週期內依序投與在以上(i)至(xi)中所列之抗腫瘤劑，尤其是選自AZD5363、AZD8186及奧拉帕尼之抗腫瘤劑，隨後投與式(I)化合物(尤其實例3)。

在一個實施例中，在以上(i)至(xi)中所列之抗腫瘤劑及式(I)化合物相隔至多2天給予。在另一實施例中，在以上(i)至(xi)中所列之抗腫瘤劑及式(I)化合物相隔至多1天給予。在另一實施例中，在以上(i)至(xi)中所列之抗腫瘤劑及式(I)化合物相隔至多18小時給予。在另一實施例中，在以上(i)至(xi)中所列之抗腫瘤劑及式(I)化合物相隔至多12小時給予。在另一實施例中，在以上(i)至(xi)中所列之抗腫瘤劑及式(I)化合物相隔至多6小時給予。在另一實施例中，在以上(i)至(xi)中所列之抗腫瘤劑及式(I)化合物相隔至多3小時給予。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為5至10天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為6至10天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為7至9天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為6至8天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為10天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為9天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為8天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為7天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為6天。

在另一實施例中，給藥週期之長度可為5天。

在其他實施例中，給藥週期可涉及在6至9天給藥週期長度內，式(I)化合物(尤其實例3)給予2-4個連續日且其他幾天不給予。

在其他實施例中，給藥週期可涉及在6至9天給藥週期長度(例如長度為7天)內，式(I)化合物(尤其實例3)給予3-4個連續日且其他幾天不給予。

在其他實施例中，給藥週期可涉及在7至10天給藥週期長度內，式(I)化合物(尤其實例3)給予3-5個連續日且其他幾天不給予。

在其他實施例中，給藥週期可涉及在6至9天給藥週期長度內，式(I)化合物(尤其實例3)給予5個連續日且其他幾天不給予。

在其他實施例中，給藥週期可涉及在6至9天給藥週期長度(例如長度為7天)內，式(I)化合物(尤其實例3)給予4個連續日且其他幾天不給予。

在其他實施例中，給藥週期可涉及在6至9天給藥週期長度內，式(I)化合物(尤其實例3)給予3個連續日且其他幾天不給予。

給藥週期可相隔數天，在此期間不投與活性組合組分。

可在典型地根據常見處方給藥時程進行之護理療法標準之上添加如上所述之組合療法。

個人化醫療

本發明之另一態樣係基於鑑別編碼磷酸肌醇-3-激酶之基因的狀態、催化性 α 多肽(PIK3CA)及用式(I)化合物治療之易感性之間的聯繫。因此，此態樣提供用於選擇用式(I)化合物治療之患者，尤其是癌症患者及/或避免較不可能與該治療發生治療性反應的患者治療而由此避免不必要之治療及可能與該無效治療有關之任何副作用的機會、方法及工具。

本發明係關於患者選擇工具及方法(包括個人化藥物)。該選擇係基於待治療之腫瘤細胞是具有野生型抑或突變型PIK3CA基因。PIK3CA基因狀態可因此用作PI3K- α 及 δ 抑制劑之治療易感性的生物標記。

明確需要將針對以下患者增濃或用於選擇該等患者之生物標記：該等患者之腫瘤將對PI3K- α 及 δ 抑制劑(諸如式(I)化合物)治療起反應。鑑別最可能對藥劑起反應之患者的患者選擇生物標記在癌症治療中為理想的，因為其減少具有非反應性腫瘤之患者之不必要治療，由此減少該等藥劑之潛在副作用。

生物標記可描述為「作為正常生物過程、致病過程或對治療性干預之藥理學反應之指示劑客觀地經量測且評估的特性」。生物標記為與特定病狀或疾病有關的任何可鑑別且可量測之指示劑，其中在生物標記之存在或含量與該病狀或疾病之一些態樣(包括該病狀或疾病之存在、其含量或其變化含量、其類型、其階段、其易感性或對用於治療該病狀或疾病之藥物的反應)之間存在相關性。相關性可為定性的、定量的或定性且定量。生物標記典型地為化合物、化合物片段或化合物組。該等化合物可為在生物體中發現或藉由生物體產生之任何化合物，包括蛋白質(及肽)、核酸及其他化合物。

生物標記可具有預測能力，且因此可用以預測或偵測特定病狀或疾病之存在、含量、類型或階段(包括特定微生物或毒素之存在或含量)、對特定病狀或疾病之易感性(包括遺傳易感性)或對特定治療(包括藥物治療)之反應。據認為在藥物發現及發展之未來，生物標記將藉由改良研究與發展程序之效率而發揮日益重要之作用。生物標記可用作診斷劑、疾病進程監測劑、治療監測劑及臨床結果預測劑。舉例而言，各種生物標記研究凸顯出用於鑑別特定癌症及特定心血管疾病及免疫疾病之標記的嘗試。咸信新的經驗證之生物標記之發展將使醫療及藥物發展成本顯著降低，且使多種疾病及病狀之治療顯著改善。

為最佳地設計臨床試驗且為自此等試驗獲得最多資訊，生物標記可為需要的。該標記在替代物及腫瘤組織中可為可量測的。此等標

記理想地亦將與功效相關且由此可最終用於患者選擇。

因此，本發明之此態樣之根本技術問題為鑑別對用式(I)化合物治療之患者分類的方法。該技術問題藉由提供在本文中之申請專利範圍及/或說明書中所表徵之實施例來解決。

如本文中之實例中所詳述，發現具有PIK3CA突變之細胞的生長通常較易受式(I)化合物抑制。

本發明提供一種測定細胞對式(I)化合物之敏感性的方法。該方法包含測定該等細胞中之PIK3CA基因狀態。若該等細胞具有突變之PIK3CA基因，則該等細胞經鑑別為可能對式I化合物敏感。因此預測具有突變之PIK3CA基因之彼等患者尤其易受式(I)化合物治療影響。若一細胞在細胞生長分析中抑制細胞數目增加(經由抑制細胞增殖及/或經由增加細胞死亡)，則將其定義為對式(I)化合物敏感。本發明方法適用於預測較可能藉由生長抑制對式(I)化合物起反應的細胞。

本發明進一步部分地基於可用於測定患者對式(I)化合物之反應的方法，包括確定是否投與式(I)化合物。特定言之，本發明方法包括測定PIK3CA之基因狀態。突變之PIK3CA基因之存在指示腫瘤細胞當與式(I)化合物接觸時較可能藉由生長抑制起反應。PIK3CA基因狀態可因此用於選擇用式(I)化合物治療之患者。

此外，揭示一種用於鑑別可能對式(I)化合物敏感之患者的活體外方法。亦揭示能夠偵測PIK3CA基因之突變狀態的寡核苷酸或聚核苷酸引子或探針之用途。亦揭示用於偵測PIK3CA突變之'套組'的用途，包括(但不限於)由診斷公司出售之PIK3CA突變偵測套組，包括Qiagen及Roche Molecular Systems。在另一實施例中，本發明係關於一種用於確定罹患癌症之患者是否可能為使用式(I)化合物之藥物治療之反應者的活體外方法，該方法包含以下步驟：(i)獲得代表先前自該患者收集之腫瘤之樣本；及(ii)確定該樣本中之PIK3CA基因是否含有

突變。PIK3CA基因突變指示對式(I)化合物治療之反應可能性增加。作為單一基因生物標記測試，含有PIK3CA突變之腫瘤的鑑別將使對式(I)化合物之反應增加。含有PIK3CA突變之個別腫瘤具有對式(I)化合物起反應之最大可能性。

「代表腫瘤」之樣本可為經分離之實際腫瘤樣本或可為已進一步加工之樣本，例如自腫瘤樣本進行PCR擴增之核酸樣本。

定義：

在此個人化醫療部分中：

「對偶基因」係指遺傳基因座之特定形式，藉由其特定核苷酸或胺基酸序列與其他形式相區分。

「擴增反應」為導致目標核酸優於非目標核酸進行特異性擴增的核酸反應。聚合酶鏈反應(PCR)為熟知擴增反應。

「癌症」在本文中用於指由於細胞轉化成贅生性表型所出現之贅生性生長。該細胞轉化通常涉及遺傳突變。

「基因」為含有關於RNA產物之經調節生物合成之所有資訊的DNA區段，包括啓動子、外顯子、內含子及可位於控制表現之5'或3'側接區域內(不在該基因之轉錄部分內)之其他序列要素。

「基因狀態」係指該基因為野生型或者不是(亦即突變型)。

「標記」係指能夠產生指示在分析樣本中存在目標聚核苷酸之可偵測信號的組合物。適合標記包括放射性同位素、核苷酸發色團、酶、受質、螢光分子、化學發光部分、磁性粒子、生物發光部分及其類似標記。因此，標記為可藉由光譜、光化學、生物化學、免疫化學、電學、光學或化學手段偵測之任何組合物。

「非同義變異」係指基因編碼序列中或與基因編碼序列重疊之變異(變化)，導致產生不同(經改變之)多肽序列。此等變異可影響或可不影響蛋白質功能且包括誤義變異體(導致一個胺基酸取代另一

個)、無意義變異體(由於產生過早終止密碼子而產生截短多肽)及插入/缺失變異體。

「同義變異」係指不影響所編碼多肽之序列的基因編碼序列中之變異(變化)。此等變異可間接地(例如藉由改變基因表現)影響蛋白質功能，但在不存在相反證據之情況下，通常假定為無害的。

「核酸」係指單股或雙股DNA及RNA分子，包括自然界中所發現之天然核酸及/或經修飾之具有經修飾之主鏈或鹼基的人工核酸，如此項技術中已知。

「引子」係指能夠充當用於合成與待複製之核酸股互補之引子延長產物之起始點的單股DNA寡核苷酸序列。引物之長度及序列必須使其能夠引發延長產物之合成。典型引子在與目標序列實質上互補之序列長度中含有至少約7個核苷酸，但略微較長之引子為較佳的。引子通常含有約15-26個核苷酸，但亦可採用較長或較短引子。

「多形位點」為基因座內導致在一群體中發現至少兩種替代性序列之位置。

「多形現象」係指在個體中在多形位點處所觀察到之序列變異。多形現象包括核苷酸取代、插入、缺失及小型隨體，且可以(但無需)引起基因表現或蛋白質功能方面可偵測之差異。在不存在對表現或蛋白質功能之影響證據的情況下，包括非同義變異體之常見多形現象通常視為包括在野生型基因序列之定義中。人類多形現象及相關註釋之目錄包括驗證、觀察頻率及疾病關聯，由NCBI (dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)維護。請注意，術語「多形現象(polymorphism)」當用於基因序列之情形中時不應與術語「多晶型現象(polymorphism)」當用於化合物之固態形式(亦即化合物之結晶或非晶性質)之情形中時混淆。熟習此項技術者將藉由其背景瞭解所需之含義。

「探針」係指具有與待偵測之對偶基因之目標序列完全互補的序列的單股序列特異性寡核苷酸。

「反應」係根據實體腫瘤反應評估準則(Response Evaluation Criteria in Solid Tumours; RECIST)考慮藉由量測來定義，涉及將患者主要分成兩個組：顯示部分反應或穩定疾病之組及顯示進行性疾病之跡象之組。

「嚴格的雜交條件」係指在42°C下在包含50%甲醯胺、5× SSC (750 mM NaCl、75 mM檸檬酸三鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5×鄧哈特溶液(Denhardt's solution)、10%硫酸葡聚糖及20 pg/ml變性剪切的鮭魚精子DNA之溶液中培育隔夜，繼之以在0.1 × SSC中在約65°C下洗滌過濾物。

「存活」涵蓋患者之整體存活及無進展存活。

「整體存活(OS)」定義為自起始投藥至由於任何原因死亡之時間。「無進展存活(PFS)」定義為自起始投藥至第一次出現進行性疾病或由於任何原因死亡之時間。

根據本發明之一個態樣，提供一種用於選擇用式(I)化合物治療之患者的方法，該方法包含自患者提供含有腫瘤細胞之樣本；確定含有患者之腫瘤細胞之樣本中的PIK3CA基因為野生型抑或突變型；及基於以上來選擇用式(I)化合物治療之患者。

該方法可包括或不包括實際患者樣本分離步驟。因此，根據本發明之一個態樣，提供一種用於選擇用式(I)化合物治療之患者的方法，該方法包含確定先前自患者分離之含有腫瘤細胞之樣本中的PIK3CA基因為野生型抑或突變型；及基於以上來選擇用式(I)化合物治療之患者。

在一個實施例中，若腫瘤細胞DNA具有突變型PIK3CA基因，則選擇該患者用式(I)化合物治療。在其他實施例中，腫瘤細胞DNA具

有野生型PIK3CA基因之患者不選擇用式(I)化合物治療。

根據本發明之另一態樣，提供一種用於預測患者對式(I)化合物之反應的方法，該方法包含確定患者之腫瘤細胞中之PIK3CA基因為野生型抑或突變型及基於以上，預測患者對用式(I)化合物治療之反應。

根據本發明之另一態樣，提供一種用於測定在罹患癌症之人類患者中用式I化合物治療之有效性之可能性的方法，該方法包含：測定患者之腫瘤細胞中之PIK3CA基因為野生型抑或突變型及基於以上，預測患者對用式(I)化合物治療之反應。

出於本發明之目的，野生型之基因狀態意欲表明基因之正常或恰當表現及所編碼蛋白質之正常功能。相比之下，突變型狀態意欲表明異常或不當基因表現，或蛋白質功能改變之表現，與癌症中突變型PIK3CA之已知作用(如本文中所述)一致。任何數目之遺傳或後生變化(包括(但不限於)突變、擴增、缺失、基因組重排或甲基化特徵變化)可導致突變型狀態。然而，若該等變化仍然促成正常蛋白質或功能上等變異體之恰當表現，則該基因狀態視為野生型。典型地將不產生功能突變型基因狀態之變異體實例包括同義編碼變異體及常見多形現象(同義或非同義)。如下文所討論，基因狀態可藉由功能分析來評估，或其可自與參考序列之偵測偏差之性質推斷。

在某些實施例中，PIK3CA基因之野生型或突變型狀態藉由該等基因中非同義核酸變異之存在或缺乏來確定。所觀察之非同義變異對應於未標註功能作用之已知常見多形現象，不促成突變型基因狀態。

PIK3CA基因中意味著突變型狀態之其他變異包括剪接位點變異，其在前體mRNA加工成mRNA期間降低內含子/外顯子接合點之識別。此可導致外顯子跳躍或在剪接mRNA中包含通常內含之序列(內含子滯留或採用隱含的剪接接合點)。此可轉而藉由插入及/或缺失促

使產生相對於正常蛋白質之異常蛋白質。因此，在其他實施例中，若在內含子/外顯子接合點處存在改變剪接位點識別序列之變異體，則該基因具有突變型狀態。

另外，具有異常或失調PIK3CA或PI3K- α 之腫瘤中之其他基因(諸如Kras，一種潛在抗性標記)之突變狀態或活化狀態之量測可有助於提高個人化藥物方法之預測。

在AstraZeneca進行之關於乳癌(基於COSMIC資料庫(Welcome Trust Sanger Institute, 2011年9月))的調查中，自覆蓋>5千種人類腫瘤之整個資料集鑑別出PIK3CA基因中>55種不同突變。大部分突變以<1%頻率發生，3種以1%-3%頻率發生，但4種突變佔總PIK3CA突變之約88%。此等突變為C端激酶結構域中之激酶結構域誤義突變H1047R(55%)及H1047L(5%)，及螺旋結構域殘基E545K(18%)及E542K(11%)。雖然並不意欲為窮盡性的，但其他普遍之乳癌突變之較長清單涵蓋R38H、R38C、R88Q、N345K、C420R、E453Q、P539R、E542K、E545K、E545A、Q546K、Q546P、M1043I、M1043V、H1047R、H1047L、H1047Y。因此，診斷分析可聚焦於偵測最常見突變，由此允許鑑別大部分PIK3CA突變。舉例而言，來自Roche Molecular Systems之Cobas (TM) PIK3CA突變測試經設計以偵測自福馬林固定之石蠟嵌埋之腫瘤樣本分離之DNA中PIK3CA基因之外顯子1、4、7、9及20中之17種突變(E542K、E545A、E545G、E545K、E545D、Q546K、Q546R、Q546E、Q546L、N345K、C420R、R88Q、H1047L、H1047R、H1047Y、G1049R及M1043I)。此套組能夠拾取ER陽性乳癌中之約95%突變。突變分佈在其他腫瘤類型中不同且診斷策略可相應地調適。舉例而言，在子宮內膜癌中，相比於乳癌，擴散在整個PIK3CA基因編碼序列中之突變分佈更均勻且蛋白質N端區域中之突變數目更多(由Douglas A. Levine, M.D傳達，

TCGA第2次年會, 2012年11月28日)。

關於PIK3CA, 參考序列可用於基因(基因庫寄存編號: NG_012113)、mRNA(基因庫寄存編號: NM_006218)及蛋白質(基因庫寄存編號: NP_006209或Swiss-Prot寄存號: P42336)。參考基因(基因組區域)序列包括上游序列之5000個鹼基及下游序列之2000個鹼基。PIK3CA內之突變眾所周知(COSMIC資料庫- Welcome Trust Sanger Institute), 且熟習此項技術者將能夠基於與野生型比較DNA或蛋白質序列來確定PIK3CA基因狀態, 亦即特定PIK3CA基因為野生型抑或突變型。

關於PI3激酶 α 蛋白質序列之PIK3CA及p110 α 催化次單位所揭示之基因及mRNA序列顯然各自為代表性序列。在正常個體中, 每種基因存在兩個複本(母本及父本複本), 其將可能具有一些序列差異, 此外在一群體內將存在基因序列之許多對偶基因變異體。視為野生型之其他序列包括具有以下之序列: 核酸序列之一或多種同義變化(該等變化不改變所編碼之蛋白質序列)、改變蛋白質序列但不影響蛋白質功能之非同義常見多形現象(例如生殖系多形現象)及內含子非剪接位點序列變化。

根據本發明之另一態樣, 提供一種用於測定在罹患癌症之人類患者中用式(I)化合物治療之有效性之可能性的方法, 該方法包含: 偵測該患者之PIK3CA基因中相對於野生型基因之至少一種非同義核酸變化的存在或缺乏, 其中在PIK3CA基因中存在至少一種體細胞非同義核酸變化指示用式(I)化合物治療可能為有效的。

根據本發明之另一態樣, 提供一種用於評估個體對用式(I)化合物治療之易感性的方法, 該方法包含:

(i) 確定個體之腫瘤細胞DNA中PIK3CA基因之非同義突變狀態; 及

(ii) 藉由參考腫瘤細胞中PIK3CA基因之非同義突變狀態來測定個體對用式(I)化合物治療之可能易感性。

熟習此項技術者可用許多技術來確定PIK3CA之基因狀態。基因狀態可藉由測定核酸序列來確定。此可經由對全長基因進行直接定序或分析該基因內之特異性位點，例如一般突變位點。

用於確定PIK3CA基因為野生型抑或突變型之替代性手段為分析轉錄基因之功能。此PIK3CA基因之功能突變產生脂質激酶活性增加之蛋白質，引起細胞中該路徑之下游信號傳導增加，包括(但不限於)Akt及S6激酶之活化。當PIK3CA變異體在細胞中表現時，用於分析其功能狀態之分析包括(但不限於)：

(i) 增加具有PIK3CA基因三磷酸磷脂醯肌醇(PI(3,4,5)P3)之激酶活性之產物的產生；

(ii) 增加磷酸化Akt或S6激酶之含量；

(iii) 增加用PIK3CA變異體轉染之NIH-3T3細胞的聚集及群落形成；(Ikenoue T等人, *Cancer Res.*, 2005 **65**, 4562-4567)。

樣本

待測試基因狀態之患者樣本可為自個體獲得或可自個體獲得之任何含有腫瘤組織或腫瘤細胞的樣本。測試樣本宜為自個體獲得之血液樣本、口腔抹片(mouth swab)、活檢體或其他體液或組織。特定實例包括：循環腫瘤細胞、血漿或血清中之循環DNA、自卵巢癌患者之腹水液分離之細胞、具有腫瘤之患者肺內的肺痰、來自乳癌患者之細針抽出物、尿液、周邊血液、細胞刮片、毛囊、皮膚鑽孔或面頰樣本。

應瞭解，測試樣本同樣可為對應於測試樣本中之序列的核酸序列，換言之，樣本核酸中之所有或一部分區域可在分析之前先使用任何便利技術(例如聚合酶鏈反應；PCR)擴增。核酸可為基因組DNA或

部分分離之RNA或全細胞RNA。在特定實施例中，RNA為全細胞RNA且直接用作使用隨機引子或poly A引子來標記第一股cDNA之模板。可根據標準方法自測試樣本萃取該樣本中之核酸或蛋白質(參見Green及Sambrook編, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 第4版, 第1-3卷, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。

本發明之診斷方法可使用先前自個體或患者獲取之樣本進行。該等樣本可藉由冷凍或固定及嵌埋於福馬林-石蠟或其他介質中來保存。或者，可獲得且使用含有新鮮腫瘤細胞之樣本。

本發明方法可使用來自任何腫瘤之細胞進行。用式(I)化合物治療之適合腫瘤已在上文中描述。

在臨床腫瘤中廣泛發現PIK3CA突變，但各基因突變之流行率隨腫瘤組織類型顯著不同。舉例而言，PIK3CA突變在乳癌中相對常見，但在腎臟腫瘤中相對罕見。

表1.

組織	PIK3CA突變流行率(%)
陰莖	29
子宮內膜	26
乳房	26
小腸	20
泌尿道	17
皮膚	13
大腸	12
胃	9
膽道	9
卵巢	9
子宮頸	8
食管	6
肝	6
上呼吸消化道	6
CNS	5
NS	5
肺	4
甲狀腺	4

垂體	3
軟組織	3
胰腺	3
腎	2
前列腺	2
腦膜	1
眼	1
自主神經節	1
造血性/淋巴性	1
腎上腺	0
骨	0
輸卵管	0
胃腸道(位點不確定)	0
腹膜	0
唾液腺	0
睪丸	0
胸腺	0
陰道	0

表 1：臨床樣本中PIK3CA突變之流行率。PIK3CA資訊來源為COSMIC資料庫(v62版)。本發明之患者選擇方法可尤其適用於存在PIK3CA突變之高發生率的疾病(組織)區段(例如乳房、泌尿道、子宮內膜、大腸、子宮頸等)。

如熟習此項技術者將顯而易知，隨著新的且較全面之資料自諸如TCGA (The Cancer Genome Atlas)及ICGC (International Cancer Genome Consortium)之人類癌症基因組分析協會(Human Cancer Genome profiling consortia)出現，此頻率資料持續地得到改進及更新。因此，可鑑別具有PIK3CA依賴性之其他腫瘤類型且其適用於用本文中所述之化合物治療。

偵測核酸之方法

在本發明之上下文中，可採用突變型PIK3CA核酸之偵測來預測對藥物治療之反應。因為此等基因中之突變發生在DNA層面，所以本發明方法可基於偵測基因組DNA之突變或變化，以及轉錄物及蛋白質本身。可需要藉由分析轉錄物及/或多肽來確認基因組DNA突變，以

便確保所偵測之突變實際上在該個體中表現。

熟習此項技術者將顯而易知，存在可用以偵測基因中一或多個位置處變異體核苷酸之存在或缺乏的大量分析程序。一般而言，對偶基因變異之偵測需要突變辨別技術、視情況選用之擴增反應(諸如基於聚合酶鏈反應之擴增反應)及視情況選用之信號產生系統。在此項技術中可獲得多種突變偵測技術且此等突變偵測技術可與信號產生系統組合使用，在此項技術中可獲得許多信號產生系統。偵測對偶基因變異之許多方法由Nollau等人, **Clin. Chem.**, 1997, **43**, 1114-1120；Anderson SM. **Expert Rev Mol Diagn.**, 2011, **11**, 635-642；Meyerson M.等人, **Nat Rev Genet.**, 2010, **11**, 685-696綜述；及綜述於標準教科書中，例如「**Laboratory Protocols for Mutation Detection**」，由U. Landegren編, Oxford University Press, 1996及「**PCR**」，第2版，由Newton及Graham編, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997。

如上所指出，測定具有癌症之患者中存在或缺乏PIK3CA基因之特定變化或複數種變化可以各種方式進行。該等測試一般使用自生物樣本收集之DNA或RNA進行，該等生物樣本例如組織活檢體、尿液、大便、痰、血液、細胞、組織刮片、乳房抽出物或其他細胞物質，且可藉由各種方法進行，該等方法包括(但不限於)PCR、與對偶基因特异性探針雜交、酶突變偵測、錯配之化學裂解、質譜或DNA定序，包括微定序。

適合之突變偵測技術包括擴增阻礙突變系統(ARMS™)、擴增阻礙突變系統線性延伸(ALEX™)、競爭性寡核苷酸引發系統(COPS)、塔克曼(Taqman)、分子信標(Molecular Beacons)、限制性片段長度多形現象(RFLP)及基於限制位點之PCR及螢光共振能量轉移(FRET)技術。

在特定實施例中，用於測定生物標記基因內之核苷酸所用之方

法係選自：對偶基因特異性擴增(對偶基因特異性PCR)(諸如擴增阻礙突變系統(ARMS))、定序、對偶基因辨別分析、雜交、限制性片段長度多形現象(RFLP)或寡核苷酸連接分析(OLA)。

在特定實施例中，與對偶基因特異性探針雜交可藉由以下來進行：(1)溶液中結合至具有經標記樣本之固相(例如玻璃、矽、耐綸膜)的對偶基因特異性寡核苷酸，例如如同在許多DNA晶片應用中；或(2)溶液中之經結合樣本(通常為經選殖DNA或PCR擴增之DNA)及經標記寡核苷酸(對偶基因特異性或較短以便允許藉由雜交來定序)。診斷測試可涉及一組變化，通常在固體載體上，其使得能夠同時測定一種以上變化。該等雜交探針在此項技術中為熟知的(參見例如Green及Sambrook編, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 第4版, 第1-3卷, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)且可跨越兩個或兩個以上變化位點。

因此，在一個實施例中，偵測至少一種突變之存在或缺乏使含有假定突變位點之PIK3CA核酸與至少一個核酸探針接觸。探針優先在選擇性雜交條件下與包括變化位點且在該變化位點處含有互補核苷酸鹼基之核酸序列雜交。雜交可使用熟習此項技術者已知之標記用可偵測標記來偵測。該等標記包括(但不限於)放射性、螢光、染料及酶標記。

在另一實施例中，偵測至少一種突變之存在或缺乏使含有假定突變位點之PIK3CA核酸與至少一個核酸引子接觸。引子較佳在選擇性雜交條件下與包括變化位點且在該變化位點處含有互補核苷酸鹼基之核酸序列雜交。

用作特異性擴增之引子的寡核苷酸可攜帶與分子中間(因此擴增視差異性雜交而定；參見例如Gibbs等人, 1989. *Nucl. Acids Res.*, 17, 2437-248)或在一個引子之3'遠端處之所關注之突變互補之核苷酸鹼

基，其中在恰當的條件下，可防止錯配或減少聚合酶延伸(參見例如 Prossner, 1993, **Tibtech**, 11 238)。

在另一實施例中，偵測至少一種突變之存在或缺乏包含對至少一種核酸序列進行定序且比較所獲得之序列與已知野生型核酸序列。

或者，至少一種突變之存在或缺乏包含質譜測定至少一種核酸序列。

在一個實施例中，偵測至少一種核酸變化之存在或缺乏包含進行聚合酶鏈反應(PCR)。使含有假設變化之目標核酸序列擴增且測定經擴增之核酸之核苷酸序列。測定經擴增之核酸的核苷酸序列包含對至少一個核酸片段進行定序。或者，擴增產物可使用能夠根據其大小分離擴增產物的任何方法來分析，包括自動化及手動凝膠電泳及其類似方法。

基因組核酸中之突變宜藉由基於擴增核酸片段中之活動位移(mobility shift)之技術來偵測。舉例而言，Chen等人，**Anal Biochem** 1996, 239, 61-9描述藉由競爭性活動位移分析來偵測單鹼基突變。此外，基於Marcelino等人，**BioTechniques** 1999, 26, 1134-1148之技術的分析可商購。

在特定實例中，可使用毛細管異雙螺旋分析以基於毛細管系統中雙螺旋核酸之活動位移來偵測突變之存在作為存在錯配之結果。

自樣本產生用於分析之核酸通常需要核酸擴增。許多擴增方法依賴於酶鏈反應(諸如聚合酶鏈反應、接合酶鏈反應或自持續序列複製)或來自己進行選殖之所有或一部分載體。根據本發明之擴增較佳為指數擴增，如藉由例如聚合酶鏈反應所展現。

許多目標及信號擴增方法已描述於文獻中，例如此等方法之一般性綜述描述於Landegren, U.等人，**Science**, 1988 242, 229-237及Lewis, R., **Genetic Engineering News** 1990, 10, 54-55中。此等擴增方

法可用於本發明方法中，且包括聚合酶鏈反應(PCR)、原位PCR、接合酶擴增反應(LAR)、接合酶雜交、Q β 噬菌體複製酶、基於轉錄之擴增系統(TAS)、基因組擴增與轉錄物定序(GAWTS)、基於核酸序列之擴增(NASBA)及原位雜交。適用於各種擴增技術之引子可根據此項技術中已知之方法製備。

聚合酶鏈反應(PCR) PCR為核酸擴增方法，尤其描述於美國專利第4,683,195號及第4,683,202號中。PCR由DNA聚合酶產生之引子延伸反應之重複週期組成。目標DNA為熱變性的且使兩個寡核苷酸雜交，這兩個寡核苷酸支撐待擴增之DNA相對股上之目標序列。此等寡核苷酸變成引子用於DNA聚合酶。藉由引子延伸複製DNA來製造兩個股之第二複本。藉由重複熱變性、引子雜交及延伸之週期，目標DNA可在約二至四小時內擴增一百萬倍或一百萬倍以上。PCR為分子生物學工具，其必須與偵測技術結合用於測定擴增結果。PCR之優點為其藉由將目標DNA之量在約4小時內擴增一百萬至十億倍來增加敏感性。PCR可用於在診斷背景中擴增任何已知核酸(Mok等人, **Gynaecologic Oncology**, 1994, **52**: 247-252)。

諸如擴增阻礙突變系統(ARMS™)之對偶基因特異性擴增技術(Newton等人, **Nucleic Acids Res.**, 1989, **17**, 2503-2516)亦可用於偵測單鹼基突變。在恰當的PCR擴增條件下，位於引子之3'末端之單鹼基錯配對完全匹配之對偶基因之優先擴增而言已足夠(Newton等人, 1989, 前述)，允許辨別密切相關之物質。使用上述引子之擴增系統之基礎為具有錯配3'-殘基之寡核苷酸在恰當的條件下將不充當PCR引子。此擴增系統允許在瓊脂糖凝膠電泳之後僅藉由檢查反應混合物來進行基因分型。

擴增產物之分析可使用能夠根據其大小分離擴增產物的任何方法來進行，包括自動化及手動凝膠電泳、質譜及其類似方法。

核酸分離、擴增及分析方法對熟習此項技術者而言為常規的且方案之實例可見於例如Green及Sambrook編, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 第4版, 第1-3卷, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。PCR擴增中所用方法之尤其適用之方案來源為**PCR (Basics: From Background to Bench)**, M. J. McPherson, S. G. Mailer, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag; 第1版 (2000年10月15日), ISBN: 0387916008。

本發明亦提供預測及診斷套組, 其包含用於擴增PIK3CA基因中之目標核酸之簡併引子; 及說明書, 其包含擴增方案及結果分析。該套組或者亦可包含用於進行擴增及擴增產物之分析的緩衝劑、酶及容器。該套組亦可為包含其他工具(諸如DNA微陣列或其他支撐物)之篩選或診斷套組之組件。該套組較佳亦提供一或多個對照模板, 諸如自正常組織樣本分離之核酸; 及/或一系列代表參考基因中之不同變化的樣本。

在一個實施例中, 該套組提供兩個或兩個以上引子對, 每一對均能夠擴增參考(PIK3CA)基因之不同區域(各區域具有可能變化位點), 由此提供用於分析生物樣本在一個反應或若干平行反應中之若干基因變化之表現的套組。

套組中之引子可經標記(例如螢光標記)以促進偵測擴增產物及隨後分析核酸變化。該套組亦可在一個分析中偵測一種以上變化。組合套組將因此包含能夠擴增參考基因之不同區段之引子。該等引子可例如使用不同的螢光標記進行差示性標記, 以便在該等變化之間進行區分。

亦揭示套組用於偵測PIK3CA突變之用途, 包括(但不限於)由診斷公司(包括Qiagen及Roche Molecular Systems)出售之PIK3CA突變偵

測套組。

在另一態樣中，本發明提供一種治療罹患癌症之患者的方法，其包括：確定患者之腫瘤細胞中之PIK3CA基因之突變型或野生型狀態，且若PIK3CA基因為突變型，則向該患者投與有效量之式(I)化合物。

如本文中所用，術語「有效」及「有效性」包括藥理學有效性及生理學安全性。藥理學有效性係指在患者中產生所需生物作用之治療能力。生理學安全性係指由所投與治療在細胞、器官及/或生物體層面上造成之毒性程度或其他不良生理學作用(通常稱為副作用)。「較不有效(Less effective)」意謂該治療產生治療學上顯著較低程度之藥理學有效性及/或治療學上較大程度之不良生理學作用。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物用於治療患有已經鑑別為具有突變型PIK3CA基因之腫瘤細胞之癌症患者的用途。

根據本發明之另一態樣，提供式(I)化合物，用於治療具有已經鑑別為攜帶突變型PIK3CA基因之腫瘤細胞之癌症。

在又一實施例中，本發明係關於包含式(I)化合物之醫藥組合物，其用於預防及治療具有已經鑑別為攜帶突變型PIK3CA基因之腫瘤細胞之癌症。

對於所有以上態樣，所測定/鑑別之PIK3CA之突變體形式處於基因中之所有位置處。

對於所有以上態樣，使用諸如乳癌之腫瘤作為實例，所測定/鑑別之PIK3CA之特定突變體形式為在R38、R88、N345、C420、E453、P539、E542K、E545K、Q546、M1043、M1043及H1047R位置處者。

對於所有以上態樣，使用諸如乳癌之腫瘤作為實例，所測定/鑑別之PIK3CA之特定突變體形式為在E542、E545及H1047位置處者。

個人化醫療/個人化藥物實例

腫瘤細胞株中之細胞增殖分析

在標準增殖分析中測定人類癌症細胞株池對化合物作用之靈敏度。分析方案細節根據以上生物分析(g)擷取。

突變相關性分析

方法

自各種組織及自多種來源收集209種癌症細胞株來獲得量測對用實例3治療起反應之細胞生長抑制的藥理學資料。將各細胞株分類為敏感性($GI_{50} \leq 1.0 \mu M$)或抗性($GI_{50} > 1.0 \mu M$)。

各細胞株中之基因突變狀態藉由整合來自內部(AstraZeneca)及公共來源之結果獲得。公共資料包括來自以下之所有細胞株資料：Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Project release 3 (Garnett MJ等人 *Nature*, 2012, Mar **483**, 570-5)、Cancer Cell Line Encyclopedia project (Barretina J等人, *Nature* 2012, **483**, 603-7)及 Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) 資料庫 (v61 版；<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>；Forbes SA 等人 *Nucleic Acids Res*, 2011, **39** (資料庫發行號)：D945-50；Forbes SA 等人, *Curr Protoc Hum Genet*. 2008；第10章：第10.11單元)及所選期刊文章。不包括沉默編碼區突變(同義變異體)及非同義多形現象，且出於此分析之目的，忽略突變之接合子型式。對於細胞株及基因之各組合，狀態概述為突變型(MUT)、野生型(WT)或不一致(INCON)。藉由衡量內部觀察結果及COSMIC之Cancer Cell Line Project (CCLP)子集之彼等觀察結果或藉由在手動回顧之後選擇狀態來解決一些最初不一致之情況(相同細胞株中相同基因之獨立WT及MUT觀察結果)。在不可解決不一致觀察結果之情況下，在分析期間保留INCON標記且基因狀態視為未知。

突變狀態與反應之間的聯繫藉由構築各基因之列聯表且測定相應優勢比(odd-ratio)及雙尾費雪準確測試(two-tailed Fisher's exact test) p值來鑑別。分類為反應邊緣之細胞株已自初始分析排除，從而鑑別候選生物標記。關於突變狀態，計數MUT或WT結果且亦排除少於4個WT或4個MUT細胞株之基因。

結果及討論

如方法中所述鑑別突變狀態與反應之間的聯繫。細胞株對實例3之反應及PIK3CA基因之相應遺傳狀態顯示於表3中。

表3.此研究中所用之細胞株的PIK3CA基因之藥理學資料、反應分類及突變狀態。

細胞株	分類	組織	GI50 μ M	PIK3CA
RS411	敏感性	血液/淋巴	9.03E-02	WT
T47D	敏感性	乳房	0.1982	MUT
H596	敏感性	肺	0.3018	MUT
MCF7	敏感性	乳房	0.3094	MUT
MV411	敏感性	血液/淋巴	0.3816	WT
HRA19	敏感性	直腸	0.3926	MUT
IM95M	敏感性	胃	0.4359	MUT
MDAMB453	敏感性	乳房	0.4564	MUT
JEKO1	敏感性	血液/淋巴	0.4994	WT
SNU601	敏感性	胃	0.5063	MUT
HCC1187	敏感性	乳房	0.5088	WT
SW48	敏感性	結腸	0.5131	MUT
H1703	敏感性	肺	0.5144	WT
THP1	敏感性	血液/淋巴	0.5281	WT
LK2	敏感性	肺	0.5884	WT
HUPT4	敏感性	胰腺	0.6408	WT
L363	敏感性	血液/淋巴	0.6812	MUT
TCCSUP	敏感性	膀胱	0.7237	MUT
VMCUB1	敏感性	膀胱	0.7319	MUT
RERFLCSQ1	敏感性	肺	0.7711	MUT
HCC1419	敏感性	乳房	0.7799	WT
LNCAPCASRES	敏感性	前列腺	0.7924	WT
CCK81	敏感性	結腸	0.8031	MUT
HCC1954	敏感性	乳房	0.8794	MUT
SW948	敏感性	結腸	0.9111	MUT
PANC0203	敏感性	胰腺	0.9628	WT

BFTC905	敏感性	膀胱	0.9662	WT
REH	抗性	血液/淋巴	1.047	WT
SNU216	抗性	胃	1.072	WT
SKCO1	抗性	結腸	1.128	WT
SUM52PE	抗性	乳房	1.145	WT
RT11284	抗性	膀胱	1.171	WT
OVCAR3	抗性	卵巢	1.179	WT
MOLM13	抗性	血液/淋巴	1.22	WT
C99	抗性	結腸	1.224	WT
CALU3	抗性	肺	1.296	WT
N87	抗性	胃	1.301	WT
2313287	抗性	胃	1.339	WT
PAMC82	抗性	胃	1.366	WT
HCC1569	抗性	乳房	1.369	WT
AGS	抗性	胃	1.414	MUT
JIMT1	抗性	乳房	1.46	MUT
HGC27	抗性	胃	1.501	MUT
MKN1	抗性	胃	1.579	MUT
SKBR3	抗性	乳房	1.588	WT
SNU368	抗性	肝臟	1.597	WT
PANC89	抗性	胰腺	1.618	WT
ASPC1	抗性	胰腺	1.74	WT
SNU484	抗性	胃	1.785	WT
H2085	抗性	肺	1.835	WT
HARA	抗性	肺	1.906	WT
AZ521	抗性	十二指腸	2.063	WT
HPAC	抗性	胰腺	2.162	WT
NOMO1	抗性	血液/淋巴	2.167	WT
PNT1A	抗性	前列腺	2.17	WT
H1975	抗性	肺	2.262	MUT
OCUM1	抗性	胃	2.332	WT
BT20	抗性	乳房	2.36	MUT
HCT8	抗性	結腸	2.51	MUT
COLO320DM	抗性	結腸	2.512	WT
PANC1005	抗性	胰腺	2.607	WT
SW403	抗性	結腸	2.61	MUT
MONOMAC6	抗性	血液/淋巴	2.622	WT
HPAFII	抗性	胰腺	2.63	WT
HT1197	抗性	膀胱	2.8	MUT
LNCAPCLONEFGC	抗性	前列腺	3.007	WT
HCC95	抗性	肺	3.107	WT
SNU620	抗性	胃	3.144	WT
MOLP8	抗性	血液/淋巴	3.289	WT
H2291	抗性	肺	3.291	WT
DMS114	抗性	肺	3.294	WT

MHCC97L	抗性	肝臟	3.353	WT
CFPAC1	抗性	胰腺	3.384	WT
HS766T	抗性	胰腺	3.467	WT
ZR751	抗性	乳房	3.558	WT
PC3	抗性	前列腺	3.833	WT
22RV1	抗性	前列腺	4.144	MUT
RKO	抗性	結腸	4.323	MUT
977	抗性	膀胱	4.42	WT
MOLM16	抗性	血液/淋巴	4.601	WT
H358	抗性	肺	4.642	WT
LUDLU1	抗性	肺	4.646	WT
QGP1	抗性	胰腺	4.865	WT
OE19	抗性	食道	5.129	WT
SW1710	抗性	膀胱	5.339	WT
PANC1	抗性	胰腺	5.344	WT
SNU449	抗性	肝臟	5.41	WT
647V	抗性	膀胱	5.464	WT
HT29	抗性	結腸	5.483	MUT
SNU354	抗性	肝臟	5.604	WT
HS746T	抗性	胃	5.978	WT
H1869	抗性	肺	6.044	WT
UMUC3	抗性	膀胱	6.217	WT
PANC0403	抗性	胰腺	6.468	WT
KG1	抗性	血液/淋巴	6.588	WT
H520	抗性	肺	6.619	WT
HEP3B	抗性	肝臟	6.687	WT
HCT15	抗性	結腸	7.268	MUT
H1793	抗性	肺	7.329	WT
U937	抗性	血液/淋巴	7.345	WT
H2170	抗性	肺	7.644	WT
PANC0327	抗性	胰腺	8.025	WT
BEL7405	抗性	肝臟	8.11	WT
HT1376	抗性	膀胱	8.199	WT
SNU638	抗性	胃	8.221	WT
H322	抗性	肺	8.227	WT
DU145	抗性	前列腺	8.239	WT
EBC1	抗性	肺	8.566	WT
JURKAT	抗性	血液/淋巴	8.691	WT
COLO205	抗性	結腸	8.934	WT
RT4	抗性	膀胱	8.936	WT
KATOIII	抗性	胃	9.155	WT
MDAMB468	抗性	乳房	9.325	WT
5637	抗性	膀胱	9.627	WT
OE33	抗性	食道	9.856	WT
LS180	抗性	結腸	9.942	MUT

HCCC9810	抗性	膽管	10.02	WT
H226	抗性	肺	10.1	WT
A549	抗性	肺	10.15	WT
QGY7703	抗性	肝臟	11.07	WT
H647	抗性	肺	11.34	WT
MGHU3	抗性	膀胱	11.5	WT
H23	抗性	肺	12.3	WT
SCABER	抗性	膀胱	12.4	WT
H2126	抗性	肺	12.91	WT
HUPT3	抗性	胰腺	13.39	WT
SW620	抗性	結腸	13.4	WT
CAPAN2	抗性	胰腺	13.42	WT
J82	抗性	膀胱	13.42	MUT
HLE	抗性	肝臟	13.47	WT
BXPC3	抗性	胰腺	14.08	WT
MCF7MDR+	抗性	乳房	14.45	WT
BEL7404	抗性	肝臟	14.9	WT
SNU1	抗性	胃	14.97	WT
KP4	抗性	胰腺	15.05	WT
CAMA1	抗性	乳房	15.47	WT
HCA7	抗性	結腸	15.49	WT
SNU668	抗性	胃	15.51	WT
H522	抗性	肺	15.55	WT
SNU886	抗性	肝臟	15.6	WT
SW480	抗性	結腸	15.9	WT
HUH7	抗性	肝臟	15.97	WT
CALU1	抗性	肺	16.03	WT
SNU878	抗性	肝臟	16.06	WT
HCC1806	抗性	乳房	16.71	WT
SNU16	抗性	胃	16.76	WT
GTL16	抗性	胃	17.38	WT
BT549	抗性	乳房	17.44	WT
NAMALWA	抗性	血液/淋巴	17.55	WT
WSUDLCL2	抗性	血液/淋巴	17.71	WT
SU8686	抗性	胰腺	17.97	WT
H460DNP53	抗性	肺	17.98	WT
SNU761	抗性	肝臟	18.49	WT
LOVO	抗性	結腸	18.64	WT
SW780	抗性	膀胱	19.23	WT
SKMES1	抗性	肺	19.54	WT
H2286	抗性	肺	20.03	WT
SNU5	抗性	胃	21.19	WT
HCC1395	抗性	乳房	21.81	WT
HUH1	抗性	肝臟	22.34	WT
MDAMB231	抗性	乳房	23.61	WT

NUGC3	抗性	胃	24.15	WT
MIAPACA2	抗性	胰腺	24.2	WT
SNU739	抗性	肝脏	25.91	WT
CALU6	抗性	肺	26.15	WT
AMO1	抗性	血液/淋巴	26.93	WT
SW1990	抗性	胰腺	28.28	WT
CMK	抗性	血液/淋巴	28.91	WT
1A6	抗性	膀胱	30	WT
A2058	抗性	皮肤	30	WT
ARH77	抗性	血液/淋巴	30	WT
CAPAN1	抗性	胰腺	30	WT
CC20	抗性	结肠	30	WT
H1299	抗性	肺	30	WT
H1437	抗性	肺	30	WT
H460	抗性	肺	30	MUT
H526	抗性	肺	30	WT
H838	抗性	肺	30	WT
HCC15	抗性	肺	30	WT
HCC1937	抗性	乳房	30	WT
HCT116	抗性	结肠	30	MUT
HEL9217	抗性	血液/淋巴	30	INCON
HEPG2	抗性	肝脏	30	WT
HLF	抗性	肝脏	30	WT
HX147	抗性	肺	30	WT
IM9	抗性	血液/淋巴	30	WT
JJN3	抗性	血液/淋巴	30	WT
JVM3	抗性	血液/淋巴	30	WT
K562	抗性	血液/淋巴	30	WT
KU1919	抗性	膀胱	30	WT
MDAMB157	抗性	乳房	30	WT
MDAMB436	抗性	乳房	30	WT
MEC1	抗性	血液/淋巴	30	WT
MKN74	抗性	胃	30	WT
NUGC4	抗性	胃	30	WT
OCIAML2	抗性	血液/淋巴	30	WT
OCILY19	抗性	血液/淋巴	30	WT
PC9	抗性	肺	30	WT
RAJI	抗性	血液/淋巴	30	WT
RAMOS	抗性	血液/淋巴	30	WT
RERFLCAI	抗性	肺	30	WT
RPMI8226	抗性	血液/淋巴	30	WT
SC1	抗性	血液/淋巴	30	WT
SKHEP1	抗性	肝脏	30	WT
SMMC7721	抗性	肝脏	30	WT
SNU398	抗性	肝脏	30	WT

SW900	抗性	肺	30	WT
T24	抗性	膀胱	30	WT
YAPC	抗性	胰腺	30	WT

突變與對實例3之敏感性最強烈相關之基因為PIK3CA。177個PIK3CA WT細胞株中僅12個(7.7%)對實例3敏感，而作為PIK3CA突變體之32個細胞株中之15個(46.9%)為敏感的，對應於12.1之優勢比及 1.2×10^{-7} 之p值(參見表4)。

突變狀態 (PIK3CA)	反應	
	敏感性	抗性
MUT	15	17
WT	12	165

優勢比： 12.1
p值： 1.2×10^{-7}

表4. PIK3CA突變狀態及對實例3之反應的列聯表。

如本文中所表明，已報導具有異常或失調PIK3CA或PI3K- α 之腫瘤中之其他基因(諸如KRAS，一種潛在抗性標記)之突變狀態或活化狀態之量測可有助於提高個人化藥物方法之預測。

關於以上資料集，藉由比較PIK3CA突變體細胞中之KRAS突變增濃與該細胞株對抑制之反應來對此進行舉例說明。分析限於含有兩種基因之『熱點』突變的細胞株(在PIK3CA之密碼子E542、E545及H1047處及在KRAS之密碼子K12、13及Q61處)。此證明在PIK3CA突變體細胞株中，KRAS突變賦予對實例3抑制之抗性。

- 二十八個細胞株含有PIK3CA中之活化突變。
- 含有活化PIK3CA突變及野生型KRAS基因之19個細胞株中之6個(31.6%)對實例3具有抗性。
- 9個PIK3CA突變體細胞株中之7個(77.8%)含有共存KRAS突變且對實例3具有抗性。

此轉化成7.5之優勢比及0.042之p值(參見表5)。

突變狀態	反應	
	敏感性	抗性
KRAS及PIK3CA MUT	2	7
PIK3CA MUT及KRAS WT	13	6

優勢比： 7.5
p值： 0.042

表5. PIK3CA及KRAS突變狀態及對實例3之反應的列聯表。

實例

現將於下列實例中說明本發明，在該等實例中，一般而言：

(i) 除非另外陳述，否則在環境溫度(亦即在17°C至25°C範圍內)下及在諸如氮氣之惰性氣體氛圍下進行操作；

(ii) 藉由旋轉蒸發或利用Genevac設備在真空中進行蒸發且在藉由過濾移除殘餘固體之後進行處理程序；

(iii) 使用自Merck, Darmstad, Germany獲得之預填充Merck正相Si60二氧化矽濾筒(粒度計：15-40或40-63 μm)在自動化Armen Glider Flash: Spot II Ultimate (Armen Instrument, Saint-Ave, France)上進行急驟層析純化；

(iv) 使用水(含有0.2%碳酸銨)與乙腈之極性遞減混合物作為溶離劑，在配備有ZMD或ZQ ESCi質譜儀及Waters X-Terra或Waters X-Bridge或Waters SunFire逆相管柱(C-18，5微米二氧化矽，19 mm直徑，100 mm長度，流速40毫升/分鐘)之Waters儀器(600/2700或2525)上進行製備層析法；

(v) 產率(當存在時)並不必需為可得到之最大值；

(vi) 一般而言，式I之最終產物之結構藉由核磁共振(NMR)光譜法確認；根據 δ 量表量測NMR化學位移值[使用Bruker Avance 500 (500 MHz)儀器測定質子磁共振光譜]；除非另外說明，否則在環境溫度下進行量測；已使用以下縮寫：s，單峰；d，雙重峰；t，三重峰；q，四重峰；m，多重峰；dd，雙重峰之雙重峰；ddd，雙重峰之雙重峰之雙重峰；dt，三重峰之雙重峰；bs，寬信號；

(vii) 一般而言，式I之最終產物亦藉由液相層析後之質譜(LCMS)表徵；LCMS係使用配備有Waters ZQ ESCi或ZMD ESCi質譜儀及X Bridge 5 μm C-18管柱(2.1 \times 50 mm)之Waters Alliance HT (2790

及2795)以2.4 mL/min之流速，使用95% A + 5% C至95% B + 5% C之溶劑系統進行4分鐘，其中A=水，B =甲醇，C=1:1甲醇:水(含有0.2%碳酸銨)；

(viii) 中間體通常未經完全表徵且純度藉由薄層層析、質譜、HPLC及/或NMR分析來評估；

(ix) 藉由將結晶物質樣本安裝在Bruker單矽晶體(SSC)晶圓黏片上且藉助於顯微鏡載片將樣本展佈成薄層來測定(使用Bruker D4分析儀器) X射線粉末繞射光譜。使樣本以每分鐘30轉離心(以改良計數統計)且用由在40 kV及40 mA下操作之銅製長細聚焦管產生之具有1.5418埃之波長的X射線來照射。使準直X射線源穿過設定在V20下之自動可變發散狹縫且引導反射之輻射穿過5.89 mm防散射狹縫及9.55 mm偵測器狹縫。在2°至40° 2- θ 範圍內以 θ - θ 模式每0.00570° 2- θ 增量使樣本曝露0.03秒(連續掃描模式)。運作時間為3分鐘36秒。該儀器裝備有位置敏感性偵測器(Lynxeye)。藉助於用Diffract+軟體操作之Dell Optiplex 686 NT 4.0工作站進行控制及資料擷取。熟習X射線粉末繞射技術者將認識到，峰之相對強度可受例如大小在30微米以上之晶粒及非單一縱橫比影響，其可影響樣本之分析。熟習此項技術者亦將認識到，反射位置可受樣本在繞射計中所處之確切高度及繞射計之零點校正影響。樣本之表面平坦度亦可具有細微影響。因此，所呈現之繞射圖資料不應視為絕對值；

(x) 使用TA Instruments Q1000 DSC儀器進行差示掃描熱量測定。在25°C至300°C之溫度範圍內以10°C/min之恆定加熱速率加熱含於配備有蓋之標準鋁盤中之典型地小於5 mg之物質。以50 mL/min之流速使用採用氦氣之淨化氣體；及

(xi) 已使用以下縮寫：

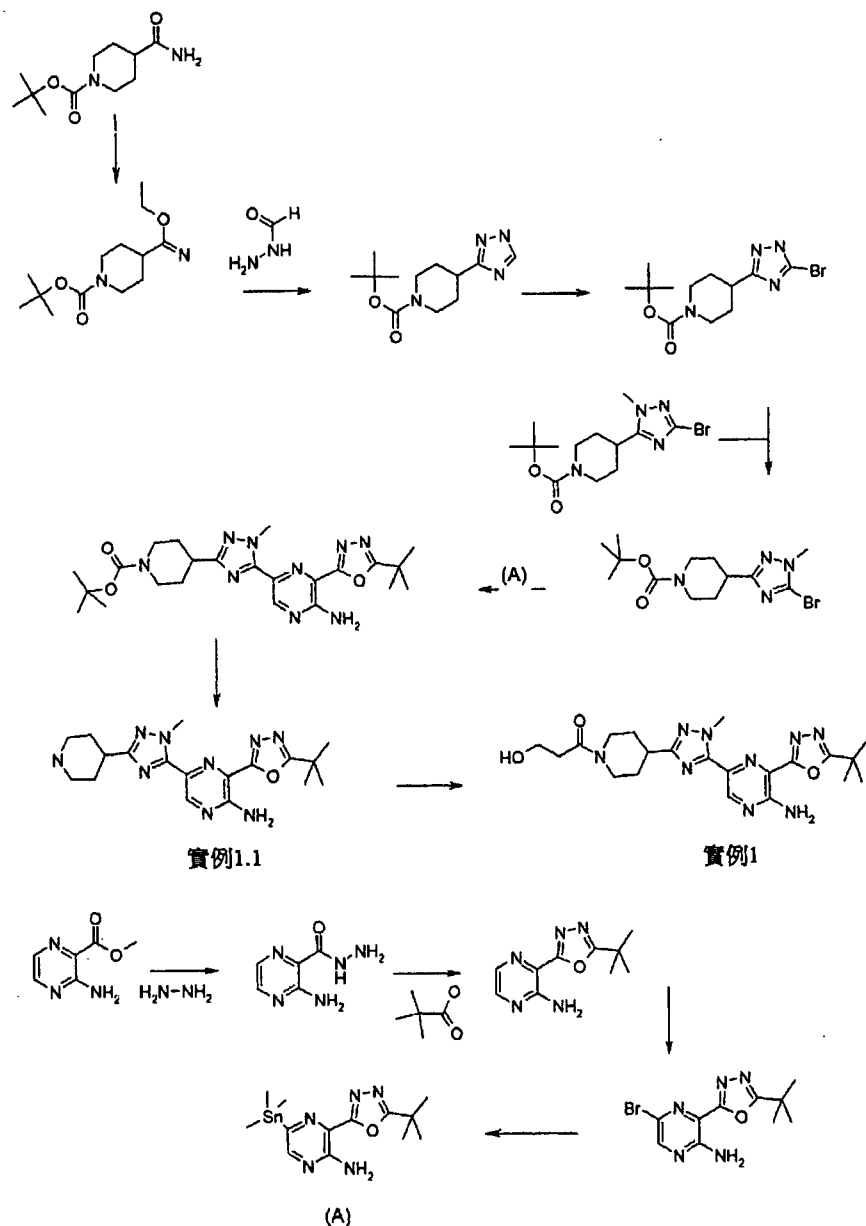
aq. 水性

CDCl ₃	氘化氯仿
CHCl ₃	氯仿
DBU	1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯
DCM	二氯甲烷
DEA	二乙胺
DIPEA	N-乙基-N-異丙基丙-2-胺
DMA	N,N-二甲基乙醯胺
DMF	N,N-二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞砜
DSC	示差掃描熱量測定
DTAD	(E)-二氮烯-1,2-二甲酸二第三丁酯
EDCI	1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽
Ether	乙醚
EtOH	乙醇
EtOAc	乙酸乙酯
%ee	%對映異構體過量
HOPO	2-羥基-吡啶N-氧化物
HPLC	高效液相層析
IPA	異丙醇
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
MTBE	甲基第三丁醚
NMP	1-甲基-2-吡咯啉酮
rt	室溫
sat.	飽和
sol.	溶液

THF	四氫呋喃
TEA	三乙胺
TBTU	四氟硼酸 2-(1H- 苯并 [d][1,2,3] 三唑 -1-基)-1,1,3,3-四 甲基異錄
v/v	體積/體積
TFA	三氟乙酸

實例1

1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮



將3-羥丙酸(30% v/v水溶液)(200 μ L, 47.0 mg, 0.52 mmol)蒸發至乾燥，隨後與甲苯共沸。將該酸溶解於NMP (1 mL)中且添加分子篩(100 mg, 0.26 mmol)、N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(0.136 mL, 0.78 mmol)，接著添加四氟硼酸2-(1H-苯并[d][1,2,3]-三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基異錄(209 mg, 0.65 mmol)。攪拌30分鐘後，添加3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(100 mg, 0.26 mmol)且攪拌混合物2小時。藉由製備型HPLC使用Waters X-Bridge逆相管柱(C-18, 5微米二氧化矽, 19 mm直徑, 100 mm長度, 流速40 ml/min)及水(含有0.2%碳酸銨)與乙腈之極性遞減混合物作為溶離劑來純化反應混合物。

將含有所需化合物之溶離份蒸發至乾燥，得到呈透明黃色固體狀之1-(4-(5-(5-氨基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(45.0 mg, 37.9%)：¹H NMR光譜(CDCl₃) 1.52 (9H, s), 1.79 - 1.94 (2H, m), 2.07 - 2.15 (2H, m), 2.58 (2H, t), 2.84 - 2.94 (1H, m), 3.00 - 3.10 (1H, m), 3.17 - 3.26 (1H, m), 3.53 (1H, t), 3.86 - 3.94 (3H, m), 4.30 (3H, s), 4.56 - 4.62 (1H, m), 9.02 (1H, s)；質譜 [M+H]⁺ = 456。

如下製備3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(實例1.1)：

在20°C下，在氮氣下經45分鐘之時間段，向三乙基氧鎘六氟磷酸鹽(V) (56.2 g, 226.47 mmol)於二氯甲烷(500 mL)中之攪拌溶液中逐滴添加含4-胺甲醯基哌啶-1-甲酸第三丁酯(47 g, 205.88 mmol)之二氯甲烷(500 mL)。在20°C下攪拌所得溶液隔夜。隨後添加Na₂CO₃飽和水溶液直至獲得pH 8。傾析各相且再用200 mL CH₂Cl₂萃取水相，隨後經MgSO₄乾燥有機相，過濾且濃縮，得到呈無色液體狀之4-(乙氧基(亞胺基)甲基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(51.0 g, 97%)：¹H NMR光譜：

(CDCl₃) 1.28 (3H, t), 1.46 (9H, s), 1.47 (2H, m), 1.79 - 1.93 (2H, m), 2.28 (1H, m), 2.73 (2H, m), 4.10 (2H, q), 4.13 - 4.18 (2H, m); 質譜: [M+H]⁺ = 無質量離子。

向4-(乙氧基(亞胺基)甲基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(51 g, 198.95 mmol)於二噁烷(500 mL)中之攪拌溶液中添加甲醯肼(17.92 g, 298.43 mmol)。使此溶液在40°C下在N₂下攪拌隔夜，產生白色固體沈澱(醯肼中間體)。隨後將反應混合物加熱至80°C，持續6小時，冷卻至室溫且濃縮。將殘餘物溶解於500 mL CH₂Cl₂中且添加300 mL水。傾析各相且用鹽水洗滌有機相，經MgSO₄乾燥，過濾且濃縮，得到呈白色固體狀之4-(1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(46.0 g, 92%): ¹H NMR光譜: (CDCl₃) 1.47 (9H, s), 1.76 (2H, m), 1.98 - 2.11 (2H, m), 2.91 (2H, s), 2.97 - 3.08 (m, 1H), 4.06 - 4.23 (2H, m), 8.05 (1H, s); 質譜[M+H]⁺ = 無質量離子。

向4-(1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(22 g, 87.19 mmol)於二氯甲烷(250 mL)中之攪拌溶液中添加氫氧化鈉2 N (131 mL, 261.58 mmol)。藉由機械攪拌劇烈攪拌反應混合物且隨後逐滴添加三溴化苯甲基三甲基銻(37.4 g, 95.91 mmol)於二氯甲烷(250 mL)中之溶液，保持溫度在約15°C。使反應混合物在室溫下攪拌1小時且添加2 N HCl，得到pH 5(保持溫度在約15°C)。傾析各相且用H₂O (2 × 1 L)洗滌有機相，經MgSO₄乾燥，過濾且濃縮，得到呈灰白色固體狀之4-(5-溴-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(25.00 g, 87%): ¹H NMR光譜: (CDCl₃) 1.46 (9H, s), 1.67 - 1.84 (2H, m), 1.90 - 2.13 (2H, m), 2.77 - 2.96 (2H, m), 2.98 - 3.10 (1H, m), 3.94 - 4.35 (2H, m); 質譜[M+H]⁺ = 無質量離子。

在N₂下，向4-(5-溴-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(26 g, 78.50 mmol)於甲苯(200 mL)及甲醇(50 mL)中之攪拌懸浮液中逐滴

添加(重氮甲基)三甲基矽烷2 M己烷溶液(43.2 mL, 86.35 mmol), 保持溫度在約20°C: 觀察到氣體逸出及少量放熱。在室溫下攪拌所獲得之黃色溶液1小時。蒸發溶劑且經二氧化矽純化所得油, 用含40% EtOAc之石油醚溶離, 得到呈油狀之4-(5-溴-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-1-甲酸第三丁酯(15.00 g, 55.3%): ¹H NMR光譜: (CDCl₃) 1.46 (9H, s), 1.65 - 1.78 (2H, m), 1.90 - 2.01 (2H, m), 2.68 - 3.02 (3H, m), 3.83 (3H, s), 3.94 - 4.31 (2H, m); 質譜[M+H]⁺ = 無質量離子。

在室溫下, 向3-胺基吡嗪-2-甲酸甲酯(21.3 g, 139.09 mmol)於乙醇(65 mL)中之攪拌懸浮液中逐份添加單水合肼(34 mL, 1094.95 mmol)。在60°C下攪拌所得漿料2小時, 冷卻至室溫且過濾。用冷乙醇(2×25 mL)洗滌固體且乾燥至恆重, 得到呈米色固體狀之3-胺基吡嗪-2-甲醯肼(20.75 g, 97%): ¹H NMR光譜: (DMSO-d₆) 4.49 (2H, d), 7.46 (2H, br s), 7.78 (1H, d), 8.17 (1H, d), 9.79 (1H, t); 質譜[M+H]⁺ = 154。

經15分鐘向N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(70.6 mL, 405.51 mmol)、特戊酸(17.08 mL, 148.69 mmol)及3-胺基吡嗪-2-甲醯肼(20.7 g, 135.17 mmol)於乙腈(350 mL)中之攪拌懸浮液中逐份添加四氟硼酸2-(1H-苯并[d][1,2,3]三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基異錄(47.7 g, 148.69 mmol), 且在80°C下攪拌反應混合物20分鐘(獲得溶液)。將反應混合物冷卻至0°C且經15分鐘之時間段相繼添加N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(70.6 mL, 405.51 mmol)、4-甲苯-1-磺醯氯(77 g, 405.51 mmol)。使反應混合物(黃色懸浮液)回流(溶解), 且隨後允許在室溫下攪拌14小時, 得到暗橙色溶液。濃縮該溶液。殘餘物用二氯甲烷稀釋, 用水、鹽水洗滌, 經硫酸鎂乾燥且濃縮。用0至40%乙酸乙酯之二氯甲烷溶液溶離, 藉由矽膠急驟層析純化粗產物。蒸發溶劑至乾燥。所得混合物用乙醚(100 mL)濕磨, 過濾, 用極少之乙醚洗滌且乾燥, 得到呈淺

黃色固體狀之3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-胺(20.8 g, 70.2%)：¹H NMR光譜：(CDCl₃) 1.53 (9H, s), 1.58 - 1.68 (2H, m), 6.67 (2H, s), 8.13 (2H, dt)；質譜[M+H]⁺ = 220。

向3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-胺(20.8 g, 94.87 mmol)於THF(320 mL)中之溶液中逐份添加1-溴吡咯啉-2,5-二酮(18.57 g, 104.36 mmol)且在室溫下攪拌該溶液16小時。濃縮反應混合物且將殘餘物溶解於二氯甲烷(300 mL)中，用水(2×150 mL)、鹽水洗滌，經硫酸鎂乾燥且濃縮。蒸發溶劑且用0至10%乙酸乙酯之二氯甲烷溶液溶離，藉由矽膠急驟層析純化粗產物。蒸發溶劑至乾燥，得到呈米色固體狀之5-溴-3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-胺(25.5 g, 90%)：¹H NMR光譜：(CDCl₃) 1.52 (9H, s), 8.23 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 300。

向5-溴-3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-胺(45 g, 150.94 mmol)於甲苯(450 mL)中之懸浮液中添加1,1,1,2,2,2-六甲基二錫烷(37.6 mL, 181.12 mmol)及氯化雙(三苯基膦)鈹(II)(5.30 g, 7.55 mmol)。用氫氣使反應混合物脫氣且在80°C下加熱2小時。(一旦加熱即溶解，橙色溶液隨後再沈澱且變為黑色，表明反應完全。)使反應混合物冷卻下來，濃縮且將殘餘物溶解於CH₂Cl₂中並經Decalite過濾以移除不溶性雜質。濃縮濾液且用0至10% EtOAc之CH₂Cl₂溶液溶離，經二氧化矽純化。濃縮溶劑，得到呈橙色固體狀之3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(三甲基錫烷基)吡嗪-2-胺(22.63 g, 39.2%)：¹H NMR光譜：(CDCl₃) 0.38 (9H, s), 1.53 (9H, s), 6.49 (2H, br s), 8.13 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 384。

向4-(5-溴-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-1-甲酸第三丁酯(2700 mg, 7.82 mmol)及3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(三甲基錫烷基)吡嗪-2-胺(2988 mg, 7.82 mmol)於4-甲基-2-戊醇(28 mL)中之攪拌

懸浮液中添加氯化鋰(995 mg, 23.46 mmol)及氯化雙(三苯基膦)鉀(II)(220 mg, 0.31 mmol)。用氫氣使混合物脫氣且在140°C下加熱2小時。使反應冷卻下來且藉由過濾收集所得沈澱，用異丙醇(25 mL)、水(25 mL)洗滌且在抽吸下乾燥。濃縮異丙醇有機溶離份且收集所形成之沈澱並與主要沈澱合併，得到4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(3.0 g, 79%)：¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.41 (9H, s), 1.45 (9H, s), 1.50 - 1.68 (2H, m), 1.95 (3H, dd), 2.78 - 3.05 (1H, m), 3.96 (3H, d), 4.21 (3H, s), 8.86 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 484。

在25°C下攪拌4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(3 g, 6.20 mmol)於TFA(15 mL)及CH₂Cl₂(15 mL)中之溶液1小時。使混合物與甲苯共沸，添加氨於甲醇及二氯甲烷中之7 N溶液且經矽膠吸附混合物。相繼用0至8%甲醇之二氯甲烷溶液、0至10%甲醇氨之二氯甲烷溶液溶離，藉由矽膠急驟層析純化粗產物。蒸發溶劑至乾燥，得到呈黃色結晶固體狀之3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(2.040 g, 86%)：¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.45 (9H, s), 1.55 - 1.66 (2H, m), 1.86 (2H, dd), 2.52 - 2.61 (2H, m), 2.69 - 2.78 (1H, m), 2.95 - 3.02 (2H, m), 4.20 (3H, s), 8.86 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 384。

分離實例1之單一晶形

經以上分離之物質的X射線粉末繞射譜顯示該物質為結晶但為多晶型形式之混合物。此物質具有226.4°C(開始)之熔點。

形式A物質藉由使初始物質在25°C下在乙腈中製成漿料而產生。將約20 mg初始物質置放於具有磁性攪拌棒之小瓶中，且添加約2 mL乙腈，隨後用帽蓋緊密地密封小瓶且使其在磁性攪拌板上攪拌。約5

天後，自該板移出樣本，脫去帽蓋且使漿料在環境條件下乾燥，隨後藉由XRPD及DSC對其進行分析。此形式(形式A)藉由XRPD測定為結晶。此物質具有227.2°C(開始)之熔點。

相同晶形可藉由在室溫下在乙腈中攪拌粗物質隔夜，隨後過濾所得固體，用冷乙腈洗滌且乾燥來製造。

在本發明之一個態樣中，提供一種藉由使化合物樣本在乙腈中製成漿料來形成實例1之晶形(形式A)的方法。十個X射線粉末繞射峰顯示於下表中：

實例1形式A之十個X射線粉末繞射峰

角度2- θ (2 θ)	強度%
5.1	100.0
18.0	22.5
10.2	22.0
11.7	17.8
19.4	14.5
18.5	14.2
14.8	12.6
26.7	11.0
26.6	10.6
17.8	9.9

實例1形式A之X射線粉末繞射譜顯示於圖1中。

實例1形式A之DSC分析顯示開始於227.2°C之熔融吸熱及在228.6°C處之峰(圖2)。

因此，DSC分析顯示實例1形式A為在約227.2°C開始熔融且具有在228.6°C處之峰的高熔點固體。

實例1形式A之DSC顯示於圖2中。

X射線粉末繞射

分析儀器：Bruker D4。

藉由將結晶物質樣本安裝在Bruker單矽晶體(SSC)晶圓黏片上且藉助於顯微鏡載片將樣本展佈成薄層來測定X射線粉末繞射圖。使樣本以每分鐘30轉離心(以改良計數統計)且用由在40 kV及40 mA下操作

之銅製長細聚焦管產生之具有1.5418埃之波長的X射線來照射。使準直X射線源穿過設定在V20下之自動可變發散狹縫且引導反射之輻射穿過5.89 mm防散射狹縫及9.55 mm偵測器狹縫。在2°至40° 2- θ 範圍內以 θ - θ 模式每0.00570° 2- θ 增量使樣本曝露0.03秒(連續掃描模式)。運作時間為3分鐘36秒。該儀器裝備有位置敏感性偵測器(Lynxeye)。藉助於用Diffract+軟體操作之Dell Optiplex 686 NT 4.0工作站進行控制及資料擷取。熟習X射線粉末繞射技術者將認識到，峰之相對強度可受例如大小在30微米以上之晶粒及非單一縱橫比影響，其可影響樣本之分析。熟習此項技術者亦將認識到，反射位置可受樣本在繞射計中所處之確切高度及繞射計之零點校正影響。樣本之表面平坦度亦可具有細微影響。因此，所呈現之繞射圖資料不應視為絕對值。

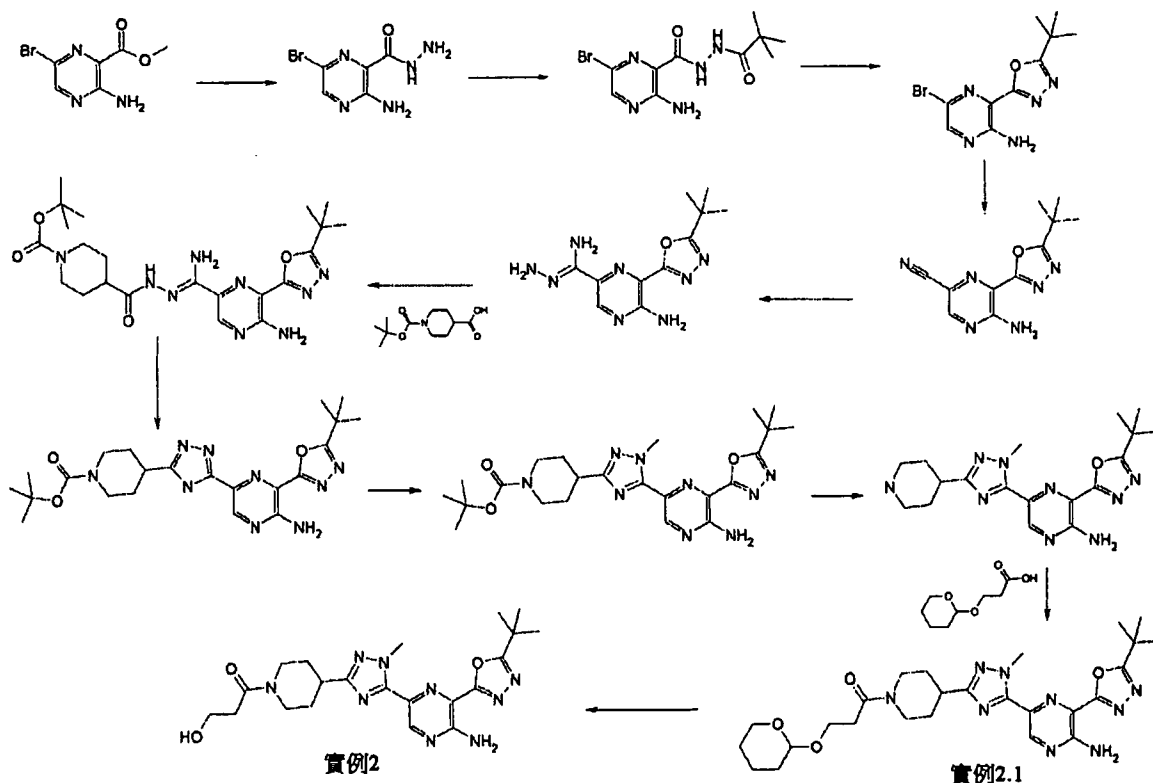
示差掃描熱量測定

分析儀器：TA Instruments Q1000 DSC。

在25°C至300°C之溫度範圍內以10°C/min之恆定加熱速率加熱含於配備有蓋之標準鋁盤中之典型地小於5 mg之物質。以50 ml/min之流速使用採用氮氣之淨化氣體。

實例1化合物之替代性合成在下文中提供為實例2。

實例2：1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮



在氮氣下，向1-(4-(5-(5-氨基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮(37 g, 68.57 mmol)於甲醇(275 mL)中之懸浮液中添加吡啶4-甲基苯磺酸鹽(3.58 g, 14.25 mmol)。於60°C下攪拌混合物1.5小時。5分鐘後混合物溶解。使混合物在50°C下靜置隔夜，在此期間形成沈澱。將反應混合物溶解於二氯甲烷(400 mL)中，用水(300 mL)及鹽水(100 mL)洗滌。水性萃取物用DCM(100 mL)回洗且經MgSO₄乾燥經合併之有機層且濃縮。用100%乙酸乙酯至10:50:40 甲醇/乙酸乙酯/DCM溶離，藉由矽膠急驟層析純化粗產物。將含有溶離份之產物蒸發至乾燥，得到米色固體(24.5 g)。使固體在乙腈(500 mL)中製成漿料隔夜，過濾且在高真空下乾燥，得到呈奶白色固體狀之1-(4-(5-(5-氨基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(實例2) (24g, 78%)：¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.51 (9H, s), 1.55 - 1.68 (1H, m), 1.68 - 1.84 (1H, m), 1.96 - 2.13 (2H, m), 2.78 - 2.93 (1H, m), 2.98 - 3.1 (1H, m), 3.19 - 3.3

(1H, m), 3.71 (2H, q), 3.93 - 4.04 (1H, m), 4.27 (3H, s), 4.35 - 4.48 (1H, m), 4.54 (1H, t), 7.96 (2H, s), 8.92 (1H, s); 質譜[M+H]⁺ = 456。

(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮 (實例2.1)製備如下：

向3-胺基-6-溴吡嗪-2-甲酸甲酯(100 g, 418.04 mmol)於EtOH (2 L)中之攪拌混合物中逐滴添加水合肼(23.59 mL, 480.75 mmol)。在50°C下在氮氣下加熱混合物。在50°C下攪拌所得稠懸浮液16小時。一次性添加另一份肼(2.5 mL)且將懸浮液在50°C下再攪拌24小時。向稠反應混合物中饋入乙醇(500 mL)且使混合物冷卻至室溫。過濾所得懸浮液且用乙醇(1 L)洗滌固體且在真空中乾燥，得到呈奶白色固體狀之3-胺基-6-溴吡嗪-2-甲醯肼(98 g, 定量)：¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 4.52 (2H, s), 7.59 (2H, s), 8.30 (1H, s), 9.74 (1H, s); 質譜[M+H]⁺ = 232。

向3-胺基-6-溴吡嗪-2-甲醯肼(172 g, 741.26 mmol)於乙腈(1.8 L)中之攪拌混合物中添加特戊酸酐(165 mL, 815.38 mmol)且在80°C下加熱混合物1小時。攪拌反應物16小時。藉由過濾分離所需黃色固體物質。將濾液分配於EtOAc(2 L)與水性碳酸氫鈉(2 L)之間。用飽和鹽水洗滌有機層並經MgSO₄乾燥。過濾且濃縮溶液，得到橙色黏性固體，用MTBE(250 mL)對其進行濕磨。藉由過濾分離不溶性黃色固體且此物質顯示與第一固體相同。在真空烘箱中在50°C下乾燥經合併之固體3天，得到呈黃色固體狀之3-胺基-6-溴-N'-特戊醯基吡嗪-2-甲醯肼(224 g, 96%)：¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.17 (9H, s), 7.62 (2H, s), 8.37 (1H, s), 9.42 - 9.56 (1H, m), 10.09 - 10.23 (1H, m); 質譜[M+H]⁺ = 318。

向3-胺基-6-溴-N'-特戊醯基吡嗪-2-甲醯肼(227 g, 718.00 mmol)

及N,N-二異丙基乙胺(297 mL, 1795.01 mmol)於乙腈(2200 mL)中之懸浮液中分批添加對甲苯磺醯氯(164 g, 861.60 mmol)。在70°C下攪拌混合物2小時。使反應物冷卻至室溫隔夜。將反應混合物分配於乙酸乙酯(2 L)與碳酸氫鈉溶液(2 L)之間。用飽和鹽水洗滌有機層，經硫酸鎂乾燥，過濾且在減壓下濃縮。所得棕色/米色固體用熱MTBE(1000 mL)濕磨且藉由過濾分離並乾燥，得到呈黃色固體狀之5-溴-3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-胺(187 g, 87%)。將母液蒸發至乾燥。用MTBE(500 mL)濕磨粗固體，過濾且用100 mL MTBE洗滌。風乾所得固體，得到第二批5-溴-3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-胺(36 g, 17%)：¹HNMR光譜：(DMSO-d₆) 1.43 (9H, s), 7.70 (2H, s), 8.39 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 298。

使氮氣流穿過5-溴-3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-胺(89.35 g, 239.75 mmol)於DMA(1.2 L)中之溶液，持續20分鐘。向攪拌混合物中依次添加二環己基(2',4',6'-三異丙基聯苯-2-基)膦(11.43 g, 23.98 mmol)、參(二苯亞甲基丙酮)二鈮(0) (5.49 g, 5.99 mmol)、鋅(1.568 g, 23.98 mmol)及二氰基鋅(16.89 g, 143.85 mmol)。將混合物加熱至100°C且攪拌1小時。將混合物冷卻且分配於DCM(3 L)與水(1 L)之間。經由矽藻土過濾黑色混合物且分離有機層。相繼用水、鹽水洗滌溶液。經硫酸鎂乾燥溶液且在減壓下濃縮。殘餘物用MTBE濕磨且藉由過濾分離，用MTBE洗滌。在真空中乾燥濾餅，得到呈淺橙色固體狀之5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-甲腈(55.7 g, 95 %)：¹HNMR光譜：(DMSO-d₆) 1.46 (9H, s), 6.02 (1H, s), 8.38 (2H, s)；質譜[M-H]⁻ = 242。

向5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-甲腈(55 g, 225.18 mmol)之IPA (200 mL)溶液中添加水合肼(82 mL, 1.69 mol)且在50°C下在氮氣下加熱混合物16小時。在冰浴中冷卻混合物。藉由過

濾來收集所得沈澱，用IPA及二乙醚洗滌且乾燥至恆重，得到呈黃色固體狀之(Z)-5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-甲脞醯胺(49.2 g, 79%)：¹HNMR光譜：(DMSO-d₆) 1.45 (9H, s), 5.26 (2H, s), 5.58 (2H, s), 7.56 (2H, s), 8.75 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 277。

向N-Boc-異哌啶甲酸(41.1 g, 179.15 mmol)及4-甲基嗎啉(35.9 mL, 325.74 mmol)於DMA(800 mL)中之溶液中添加六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲銻(74.3 g, 195.44 mmol)。攪拌混合物10分鐘，隨後向該溶液中一次性添加(Z)-5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-甲脞醯胺(45 g, 162.87 mmol)(自22°C至27°C觀察到放熱)。數分鐘後，自反應混合物結晶出產物。自容器中移出反應混合物且經由燒結物過濾。自容器側面向洗滌產物中再添加(DMA 150 mL)且將此傾至濾餅上。向容器中添加異丙醇(600 mL)且使用劇烈攪拌將容器中產物之剩餘部分懸浮於此溶劑中。在DMA已藉由抽吸移除之後，使用異丙醇懸浮液洗滌濾餅。吸乾濾餅，隨後用MTBE洗滌且再次吸乾。在真空中乾燥濾餅，得到呈黃色固體狀之(Z)-4-(2-(胺基(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)亞甲基)肼羰基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(76 g, 95%)：¹HNMR光譜：(DMSO-d₆) 1.40 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.63 - 1.9 (2H, m), 2.33 - 2.6 (2H, m, 因DMSO信號而模糊), 2.63 - 3.03 (2H, m), 3.18 - 3.48 (4H, m, 因水信號而模糊), 3.88 - 4.11 (2H, m), 6.43 (2H, s), 7.76 (2H, br), 8.84 (0.5H, s), 8.87 (0.5H, s), 9.85 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 488

向3 L固定雙夾套容器中之二噁烷(500 mL)中添加乙酸(200 mL)且將該溶液在氮氣下加熱至70°C。向溫熱之混合物中逐份添加(Z)-4-(2-(胺基(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)亞甲基)肼羰基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(74.5 g, 152.80 mmol)。10分鐘後，升溫至100°C(略微回流)。在100°C下攪拌反應混合物1.5小時(懸浮液)，

隨後在80°C下靜置隔夜(在靜置隔夜之後形成溶液)。在減壓下濃縮所得溶液，隨後用甲苯稀釋，蒸發至乾燥，用甲苯溶解且再次濃縮。剩餘油與一些乙酸乙酯混合且濃縮至乾燥。自溶液結晶之固體用MTBE(200 mL)濕磨且藉由過濾分離。用水及MTBE洗滌濾餅，得到呈灰色固體狀之4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(50 g, 70%)。在減壓下濃縮濾液，得到黃色固體。此物質用MTBE濕磨且過濾。相繼用乙酸乙酯、MTBE洗滌濾餅，得到呈淺黃色固體狀之第二批(4.93g, 7%)。此物質與第一批相同：¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.17 (9H, s), 1.22 (9H, s), 1.29 - 1.47 (2H, m), 1.67 - 1.78 (2H, m), 2.57 - 2.87 (3H, m), 3.57 - 3.92 (2H, m), 7.56 (2H, br), 8.56 (1H, s), 13.47 (2H, br s)；質譜[M+H]⁺ = 470。

向4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(48 g, 102.23 mmol)於2-甲基THF (300 mL)中之懸浮液中添加1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯(19.87 mL, 132.90 mmol)。5分鐘後獲得暗溶液，將其用木炭處理且經由矽藻土墊過濾，再用2-甲基THF (100 mL)洗滌木炭及木炭。在-5°C下在3 L夾套固定容器中在氮氣氛圍下用空氣攪拌器攪拌濾液。添加2-甲基THF(100 mL)來幫助攪拌黃色懸浮液。經15分鐘逐滴添加碘甲烷(7.96 mL, 127.78 mmol)。攪拌混合物2小時且將反應混合物溫至室溫。16小時後，再添加碘甲烷(6 mL)及DBU(20 mL)且繼續攪拌16小時。將混合物傾入水中且攪拌5分鐘。分離出呈米色固體狀之不溶性物質且在真空中乾燥，得到4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(24.77 g, 50.1%)。在減壓下濃縮母液且使用MTBE作為溶離劑，藉由二氧化矽急驟管柱層析純化殘餘物。由此獲得呈黃色固體狀之第二批

所需產物(13.04 g, 26%) : $^1\text{HNMR}$ 光譜 : (DMSO- d_6) 1.47 (9H, s), 1.51 (9H, s), 1.57 - 1.76 (2H, m), 1.94 - 2.1 (2H, m), 2.87 - 3.09 (3H, m), 3.9 - 4.08 (2H, m), 4.26 (3H, s), 7.97 (2H, br, s), 8.92 (1H, s) ; 質譜 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 484$

向2,2,2-三氟乙酸(100 mL, 1305.87 mmol)於DCM (100 mL)中之溶液中添加4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(36.81 g, 76.12 mmol)。在室溫下攪拌混合物3小時。在減壓下濃縮混合物。將殘餘物溶解於DCM(1.5 L)中且添加至劇烈攪拌濃縮之含氨(150 mL)之水(400 mL)溶液中。用DCM(400 mL)洗滌水溶液且經硫酸鎂乾燥經合併之有機物溶液，過濾且濃縮至乾燥，得到呈黃色固體狀之3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(30.0 g, 103 %) :

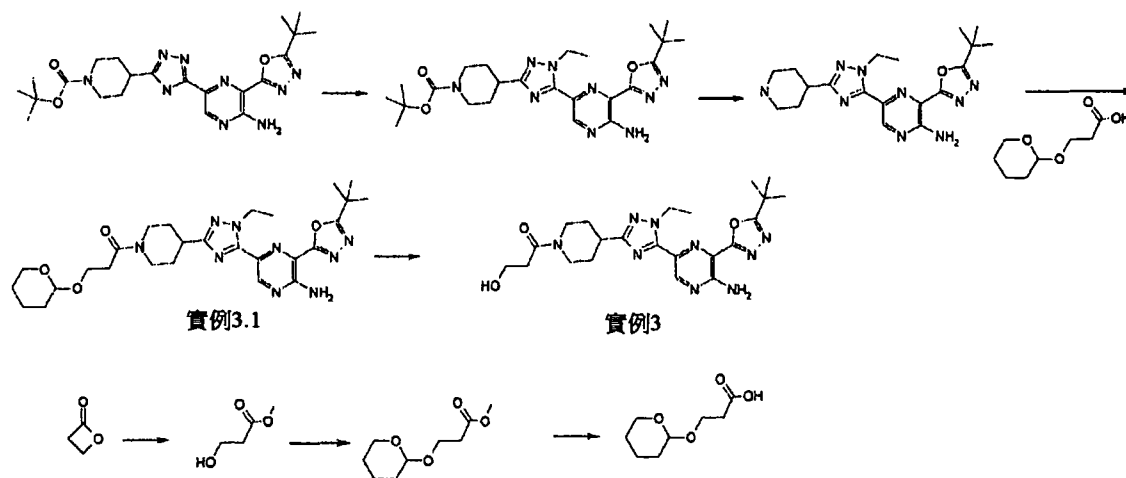
$^1\text{HNMR}$ 光譜 : (DMSO- d_6) 1.44 (9H, s), 1.54 - 1.69 (2H, m), 1.8 - 1.92 (2H, m), 2.53 - 2.63 (2H, m), 2.68 - 2.83 (1H, m), 2.93 - 3.05 (2H, m), 4.19 (3H, s), 7.89 (2H, br), 8.85 (1H, s) ; 質譜 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 384$ 。

在25°C下，向溶解於乙腈(200 mL)中之3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸(12.67 g, 72.76 mmol)及N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(25.3 mL, 145.52 mmol)之攪拌溶液中逐份添加六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲銲(30.4 g, 80.04 mmol)。在25°C下攪拌所得溶液20分鐘，隨後逐份添加3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(30 g, 72.76 mmol)，將最終部分在乙腈(100 mL)中洗滌成呈漿料狀之混合物。攪拌1小時後，藉由過濾來收集沈澱，用乙腈洗滌且在真空中乾燥，得到呈米色固體狀之1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮

(35.0 g, 89%)。濾液用DCM(600 mL)稀釋，用水洗滌，經硫酸鎂乾燥且濃縮。用含2至2.5% 7 N氨之甲醇與二氯甲烷溶液梯度溶離，藉由矽膠急驟層析純化殘餘物。亦獲得呈奶白色固體狀之第二批產物(3.31 g, 6.13 mmol, 8.43 %)。合併兩個樣本，得到米色固體：¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.44 (9H, s), 1.52 - 1.79 (4H, m), 1.88 - 2.04 (2H, m), 2.53 - 2.73 (2H, m), 2.73 - 2.87 (1H, m), 2.91 - 3.05 (1H, m), 3.13 - 3.24 (1H, m), 3.37 - 3.47 (1H, m), 3.53 - 3.65 (1H, m), 3.7 - 3.8 (1H, m), 3.81 - 3.89 (1H, m), 3.89 - 3.99 (1H, m), 4.20 (3H, s), 4.29 - 4.4 (1H, m), 4.54 - 4.61 (1H, m), 7.60 - 8.20 (2H, br), 8.85 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 540。

實例3

1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮



在氮氣下，向1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮(128 g, 231.19 mmol)於甲醇(1 L)中之懸浮液中添加吡啶4-甲基苯磺酸鹽(11.62 g, 46.24 mmol)。於60°C下攪拌混合物1.5小時。5分鐘之後混合物溶解。在50°C下使混合物靜置隔夜，在此期間形成沈澱。固體物質藉由過濾來分離且用水及乙腈洗滌。此物質仍包

含來自先前階段之少量雜質且需要進一步純化。將該物質溶解於二氯甲烷中且藉由矽膠急驟層析(0%甲醇/DCM至10%甲醇/DCM)來純化。由此分離出呈奶白色固體(形式A)狀之所需產物1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(實例3) (92 g, 85%) : $^1\text{HNMR}$ 光譜 : (DMSO- d_6) 1.4 - 1.51 (12H, m), 1.51 - 1.78 (2H, m), 1.89 - 2.05 (2H, m), 2.72 - 2.86 (1H, m), 2.91 - 3.05 (1H, m), 3.12 - 3.24 (1H, m), 3.64 (2H, q), 3.83 - 4.01 (1H, m), 4.29 - 4.41 (1H, m), 4.47 (1H, t), 4.58 (2H, q), 8.26 (2H, s), 8.85 (1H, s) ; 質譜[M+H] $^+$ = 470。

1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮(實例3.1)製備如下 :

向4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(150 g, 319.46 mmol)於2-甲基THF(1.2 L)中之懸浮液中添加1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯(76 mL, 511.14 mmol)。添加碘乙烷(46 mL, 575.03 mmol)且在35°C下攪拌混合物16小時。再添加碘乙烷(46 mL, 575.03 mmol)及1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯(76 mL, 511.14 mmol)且在35°C下繼續攪拌24小時。將混合物傾入水中且藉由過濾來分離不溶性物質, 用水及MTBE洗滌且在真空中乾燥, 得到呈黃色固體狀之4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(116 g, 73.0%)。用DCM萃取濾液且有機溶液經硫酸鎂乾燥, 過濾且在減壓下濃縮。使用梯度溶離(30% MTBE/庚烷至100% MTBE), 藉由二氧化矽急驟管柱層析純化殘餘物。由此分離出呈黃色固體狀之第二批所需產物(12 g, 24.12 mmol, 7.55%), 隨後將其與第一批合併 : $^1\text{HNMR}$ 光譜 : (DMSO- d_6) 1.41 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.48

(3H, t), 1.52 - 1.69 (2H, m), 1.87 - 2.04 (2H, m), 2.79 - 3.03 (3H, m), 3.86 - 4.03 (2H, m), 4.59 (2H, q), 7.89 (2H, s), 8.85 (1H, s); 質譜 $[M+H]^+ = 498$ 。

THF亦可為以上反應之適合溶劑。

向4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-甲酸第三丁酯(126 g, 253.22 mmol)於DCM(400 mL)中之溶液中逐份添加TFA(400 mL)。在室溫下攪拌混合物16小時。在減壓下濃縮混合物，將其溶解於DCM(1 L)中且在0°C下緩慢添加至濃氨水(500 mL)於水中之劇烈攪拌溶液中。自水溶液分離出有機溶液且在減壓下濃縮*，得到呈黃色固體狀之3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-乙基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(101 g, 100%): ¹H NMR光譜: (DMSO-d₆) 1.4 - 1.52 (12H, m), 1.57 - 1.73 (2H, m), 1.83 - 1.93 (2H, m), 2.57 - 2.7 (2H, m), 2.71 - 2.84 (1H, m), 2.96 - 3.09 (2H, m), 4.58 (2H, q), 8.06 (2H, s), 8.84 (1H, s); 質譜 $[M+H]^+ = 398$ 。

*在類似規模(約170 g起始物質)之另一實驗中，使用以下分離程序：分離各層且過濾頂層(含固體之乳液)。用DCM(0.5 L)洗滌固體且將濾液轉移至分液漏斗。分離各層且用DCM(0.5 L)萃取水層。有機層經MgSO₄乾燥，過濾並濃縮。在50°C下使產物乾燥隔夜(81.75 g)。使來自萃取之固體在水(200 mL)中在室溫下製成漿料，持續30分鐘且過濾。在50°C下在真空中乾燥產物(61.8 g)。

在25°C下，向溶解於乙腈(600 mL)中之3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸(44.3 g, 254.10 mmol)及*N*-乙基-*N*-異丙基丙-2-胺(89 mL, 508.21 mmol)之攪拌溶液中逐份添加六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲錄(106 g, 279.51 mmol)。在25°C下攪拌所得溶液20分鐘，隨後逐份添加3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-乙基-3-

(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(101 g, 254.10 mmol), 將最終部分在乙腈(300 mL)中洗滌成呈漿料狀之混合物。攪拌1小時後, 藉由過濾來收集沈澱, 用乙腈洗滌且在真空中乾燥, 得到呈米色固體狀之1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮(128 g, 91%)。濾液用DCM(600 ml)稀釋, 用水洗滌, 經硫酸鎂乾燥且濃縮。用含2至2.5% 7 N氨之甲醇與二氯甲烷溶液梯度分離, 藉由矽膠急驟層析純化殘餘物。獲得呈奶白色固體狀之第二批所需產物(40 g, 72.2 mmol, 28.4%), 將其與第一批合併: $^1\text{HNMR}$ 光譜: (DMSO- d_6) 1.29 - 1.48 (16H, m), 1.48 - 1.75 (4H, m), 1.83 - 1.99 (2H, m), 2.48 - 2.68 (2H, m), 2.68 - 2.79 (1H, m), 2.87 - 2.99 (1H, m), 3.07 - 3.19 (1H, m), 3.32 - 3.42 (1H, m), 3.47 - 3.6 (1H, m), 3.64 - 3.75 (1H, m), 3.75 - 3.84 (1H, m), 3.84 - 3.95 (1H, m), 4.24 - 4.39 (1H, m), 4.47 - 4.6 (3H, m), 7.84 (2H, s), 8.79 (1H, s); 質譜 $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 577$ 。

替代性製備:

在室溫下在氮氣下, 向3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸(48.80 g, 0.2774 mol)及*N*-乙基-*N*-異丙基丙-2-胺(86.96 mL, 0.4993 mol)於THF(552 mL)中之溶液中逐份添加六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲錄(115.73 g, 0.3051 mol)。攪拌所得混合物20分鐘, 隨後經1小時逐份添加3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-乙基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(122.5 g (110.25 g有效), 0.2774 mol)。3.5小時後, 濃縮混合物且使殘餘物在室溫下在MeCN(275 mL)中製成漿料, 持續15分鐘。過濾出產物, 用MeCN (3 × 110 mL)洗滌且在50°C下在真空中乾燥隔夜。由此得到1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮(131.9 g, 96%)。

96%)。

替代性製備實例3

在N₂下，向1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙-1-酮(131.9 g, 0.2382 mol)於甲醇(1045 mL)中之懸浮液中添加對甲苯磺酸吡錠(11.97 g, 47.7 mmol)。在60°C下攪拌反應混合物5.5小時，隨後在50°C下隔夜。將反應混合物冷卻至0°C且過濾出固體。使產物在水(250 mL)中在室溫下製成漿料，持續20分鐘，過濾，用水(3 × 40 mL)洗滌且在50°C下在真空中乾燥。由此得到呈形式A(參見以下)之1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(21.4 g, 97.8%)。

濃縮甲醇液體且使所得固體在水(0.6 L及0.5 L)中在室溫下製成漿料兩次，持續20分鐘。過濾出產物，用水(3×100 mL)洗滌且在50°C下在真空中乾燥。由此得到81.9 g呈形式A之1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(81.9 g, 97.1%)。

合併兩批(103.3 g)，用形式B(16.68 g)接種且在MeCN(826 mL)中在室溫下製成漿料隔夜。由此得到117.6 g呈淺黃色固體狀之1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(117.6 g, 97%)，即形式B(參見下文)。

形式B亦可藉由在不接種之情況下使形式A在MeCN中製成漿料來製造。

使1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(112.5 g)在庚烷

(7.5 vol)中製成漿料。在回流下加熱1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮於IPA (12 vol)中之懸浮液直至固體溶解。熱過濾該溶液，隨後冷卻至室溫。由此得到117.6 g呈淺黃色固體狀之1-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-羥基丙-1-酮(99.4 g, 98%)作為形式C。

3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸製備如下：

在0°C下在氮氣下，向甲醇(2.4 L)及濃硫酸(44.4 mL, 832.61 mmol)之攪拌溶液中逐滴添加β-丙內酯(175 mL, 2.78 mol)。在室溫下攪拌此溶液2天。將反應混合物冷卻至10°C，隨後逐份添加碳酸氫鈉(145 g, 1.72 mol)，在室溫下攪拌所得懸浮液75分鐘。過濾此溶液，用甲醇(800 mL)洗滌濾餅。將濾液蒸發為油，將其再溶解於二氯甲烷(1.2 L)中且攪拌60分鐘，隨後再過濾。過濾此溶液，隨後蒸發，得到呈油狀之3-羥基丙酸甲酯(219 g, 76%)。¹H NMR光譜：(CDCl₃) 2.50 (2H, t), 3.63 (3H, s), 3.78 (2H, t)。

在室溫下在氮氣下，向3-羥基丙酸甲酯(63.4 g, 609.00 mmol)及3,4-二氫-2H-哌喃(78 mL, 852.60 mmol)於二氯甲烷(650 mL)中之澄清溶液中添加對甲苯磺酸吡錠(7.65 g, 30.45 mmol)，得到混濁溶液。在室溫下攪拌此溶液隔夜。反應混合物用水(250 mL)及鹽水(250 mL)洗滌，隨後乾燥(MgSO₄)且蒸發成油。藉由急驟二氧化矽層析，15%至30% EtOAc之庚烷溶液之溶離梯度來純化此粗產物。蒸發純溶離份至乾燥，得到呈無色油狀之3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸甲酯(67.7 g, 59.0%)：¹H NMR光譜：(CDCl₃) 1.47 (4H, dddd), 1.55 - 1.84 (2H, m), 2.55 (2H, t), 3.33 - 3.53 (1H, m), 3.53 - 3.7 (4H, m), 3.78 (1H, ddd), 3.93 (1H, dt), 4.42 - 4.72 (1H, m)；質譜[MH]⁺ = 189。

在室溫下，向3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸甲酯(67.68 g，

359.58 mmol)於THF(680 mL)中之溶液中添加氫氧化鈉(2 M, 349 mL, 697.58 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物3小時。在真空中移除THF, 隨後用乙酸乙酯(260 mL)洗滌水層, 隨後冷卻至0°C且藉由添加鹽酸(2 M)小心酸化至pH 5。用乙酸乙酯(3×250 mL)萃取產物, 隨後乾燥(MgSO₄)且蒸發, 得到呈透明油狀之3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸(57.0 g, 91%)。將此物質溶解於乙酸乙酯(750 mL)中, 隨後用水(3×250 mL)及鹽水(250 mL)洗滌以移除剩餘乙酸。乾燥(MgSO₄)且蒸發有機溶液, 得到呈無色油狀之3-(四氫-2H-哌喃-2-基氧基)丙酸(45.67 g, 72.9%)：¹H NMR光譜：¹H NMR (CDCl₃) 1.43 - 1.67 (4H, m), 1.65 - 1.95 (2H, m), 2.68 (2H, t), 3.48 - 3.58 (1H, m), 3.73 (1H, dt), 3.88 (1H, ddd), 4.02 (1H, dt), 4.59 - 4.7 (1H, m)；質譜[M-H]⁻ = 173。

如以上所分離出之實例3為呈三種不同晶形之結晶固體, 本文中描述為形式A、B及C。

實例3之形式A之晶體結構可藉由XRPD及DSC表徵。進行此等技術之方法如關於實例1所述。

實例3形式A之十個X射線粉末繞射峰

角度2-θ (2θ)	強度%
4.8	100
10.0	89.2
14.6	81.9
5.2	59.4
19.9	53.6
10.4	49.3
25.4	48.7
23.6	48.6
24.4	43.9
16.2	36.3

實例3形式A之XRPD顯示於圖3中。

實例3形式A之DSC分析顯示開始於27.0°C之初始吸熱及在63.0°C處之峰, 其他吸熱位移可見在以下溫度處之開始及峰: 166.5°C及168.7°C、172.2°C及173.2°C以及在174.8°C處之最終熔融物及在175.7°C

處之峰(圖4)。

因此，DSC分析顯示實例3形式A為在約27.0°C下開始去溶劑化且具有在約63.0°C處之峰的溶劑化物質。

實例3(形式A)之X射線粉末繞射譜顯示該物質為結晶。此物質具有28.0°C(開始)之去溶劑化點。

實例3亦可以替代性多晶型形式存在，在本文中稱作形式B。形式B之製備描述於上文中。

此物質具有172.5°C(開始)之熔點。

在本發明之另一態樣中，提供一種藉由使實例3樣本在乙腈中製成漿料來製造實例3之形式B的方法。

實例3形式B之十個X射線粉末繞射峰

角度2- θ (2 θ)	強度%
5.8	100.0
10.9	59.8
11.5	33.8
25.9	18.2
17.3	15.8
24.0	14.1
19.1	13.4
12.9	11.7
24.7	11.1
27.2	9.7

實例3形式B之XRPD顯示於圖5中。

實例3形式B之DSC分析顯示開始於172.5°C之熔融吸熱及在174.2°C處之峰(圖6)。

因此，DSC分析顯示實例3 B為在約172.5°C下開始熔融且具有在約174.2°C處之峰的高熔點固體。

實例3亦可以第三晶形存在，在本文中稱作形式C。藉由自異丙醇(IPA)結晶，自形式B物質製造形式C物質之方法描述於上文中。

因此，在本發明之另一態樣中，提供一種藉由自IPA結晶出實例3來製造實例3之形式C的方法。

實例3形式C之特徵為提供以下使用CuK α 輻射所量測之2 θ 值中之至少一者：6.9及12.3。實例3形式C之特徵為提供實質上如圖A中所示之X射線粉末繞射圖。十個X射線粉末繞射峰顯示如下：

實例3形式C之十個X射線粉末繞射峰

角度2- θ (2 θ)	強度%
6.9	40.1
12.3	100.0
10.5	23.8
21.0	67.9
24.6	36.1
13.6	21.4
16.4	19.9
19.6	18.1
20.2	17.5
22.5	18.4

實例3形式C之DSC分析顯示開始於183.0°C之熔融吸熱及在185.6°C處之峰(圖B)。

因此，DSC分析顯示實例3形式C為在約183.0°C下開始熔融且具有在約185.6°C處之峰的高熔點固體。

用於形式C分析之技術細節

X射線粉末繞射

分析儀器：Panalytical Cubix。

藉由將結晶物質樣本安裝在Panalytical單矽晶體(SSC)晶圓黏片上且藉助於顯微鏡載片將樣本展佈成薄層來測定X射線粉末繞射圖。使樣本以每分鐘30轉離心(以改良計數統計)且用由在45 kV及40 mA下操作之銅製長細聚焦管產生之具有1.5418埃之波長的X射線來照射。使X射線光束穿過0.04拉德索勒(soller)狹縫，隨後穿過設定在20 mm下之自動可變發散狹縫及最後穿過20 mm光束遮罩。引導反射之輻射穿過20 mm防散射狹縫及0.04拉德索勒狹縫。在2°至40° 2- θ 範圍內以 θ - θ 模式每0.0025067° 2- θ 增量使樣本曝露1.905秒(連續掃描模式)。該儀器裝備有X-Celerator偵測器。藉助於用X'Pert Industry軟體操作之

Dell Pentium 4HT工作站進行控制及資料擷取。熟習X射線粉末繞射技術者將認識到，峰之相對強度可受例如大小在30微米以上之晶粒及非單一縱橫比影響，其可影響樣本之分析。熟習此項技術者亦將認識到，反射位置可受樣本在繞射計中所處之確切高度及繞射計之零點校正影響。樣本之表面平坦度亦可具有細微影響。因此，所呈現之繞射圖資料不應視為絕對值。

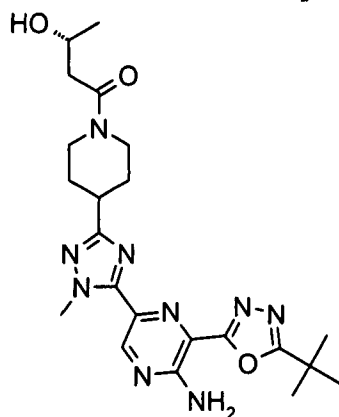
示差掃描熱量測定

分析儀器：TA Instruments Q1000 DSC。

在25°C至300°C之溫度範圍內以10°C/min之恆定加熱速率加熱含於配備有蓋之標準鋁盤中之典型地小於5 mg之物質。以50 ml/min之流速使用採用氮氣之淨化氣體。

實例4

(3R)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丁-1-酮



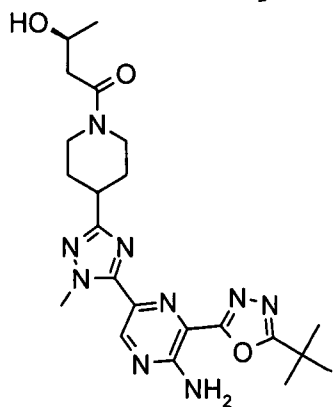
向3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(200 mg, 0.52 mmol, 描述於實例1中)、N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(0.273 mL, 1.56 mmol)及(R)-3-羥基丁(65.2 mg, 0.63 mmol)於N,N-二甲基甲醯胺(3 mL)中之攪拌懸浮液中添加四氟硼酸2-(1H-苯并[d][1,2,3]三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基異錄(201 mg, 0.63 mmol)。在室溫下攪拌所得懸浮液2小時。使用Waters X-Bridge逆

相管柱(C-18, 5微米二氧化矽, 30 mm直徑, 150 mm長度, 流速60 ml/min), 使用31%乙腈於水(含有碳酸銨(2 g/L))中之等位溶劑混合物, 藉由製備型HPLC來純化所得混合物。將含有所需化合物之溶離份蒸發至乾燥, 得到淺黃色固體。在乙腈(3 mL)中在室溫下攪拌此固體。過濾所得固體, 用冷乙腈洗滌且乾燥, 得到呈淺黃色固體狀之標題化合物(125 mg, 51.0%)。

$^1\text{H NMR}$ 光譜: (CDCl_3) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35 (1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H, m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 質譜 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ 。

實例5

(3S)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丁-1-酮

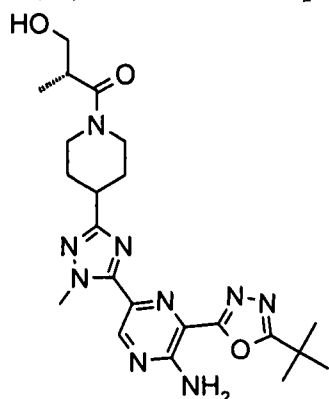


使用與實例4類似之程序, 使3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺與(S)-3-羥基丁酸反應, 得到呈淺黃色固體狀之標題化合物(167 mg, 68.2%)。

$^1\text{H NMR}$ 光譜: (CDCl_3) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35 (1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H, m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 質譜 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ 。

實例6

(2R)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-2-甲基-丙-1-酮

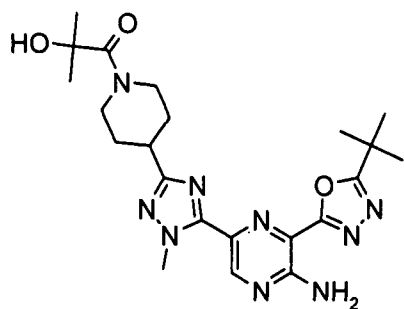


使用與實例4類似之程序，使3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺與(R)-3-羥基-2-甲基丙酸反應，得到呈淺黃色固體狀之標題化合物(87 mg, 47.4%)。

$^1\text{H NMR}$ 光譜：(CDCl_3) 1.55 (9H, s), 1.61 (3H, s br), 1.8-2.0 (2H, m), 2.10-2.25 (2H, m), 2.90 (2H, m), 3.10 (1H, m), 3.3 (2H, m), 3.77 (2H, m), 4.33 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.05 (1H, s)；質譜 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ 。

實例7

1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-2-羥基-2-甲基-丙-1-酮



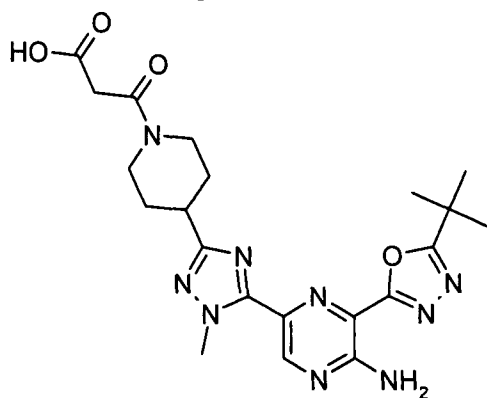
在氬氣下，向溶解於NMP(1.2 mL)中之2-羥基-2-甲基丙酸(38.0 mg, 0.37 mmol)、3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(100 mg, 0.26 mmol)及2-羥基-吡啶N-氧化物(57.9 mg, 0.52 mmol)中一次性添加1-(3-二甲胺基丙

基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(100 mg, 0.52 mmol)。在25°C下攪拌所得溶液3小時。添加吡啶(100 μ L, 1.24 mmol)且攪拌混合物18小時。再添加2-羥基吡啶1-氧化物(57.9 mg, 0.52 mmol)及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(100 mg, 0.52 mmol)。隨後加熱混合物至70°C, 持續48小時, 再添加2-羥基-2-甲基丙酸(15 mg, 0.14 mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(50.0 mg, 0.26 mmol)及2-羥基吡啶1-氧化物(25.0 mg, 0.23 mmol), 且隨後保持混合物在70°C, 持續8小時。使用Waters X-Bridge逆相管柱(C-18, 5微米二氧化矽, 19 mm直徑, 100 mm長度, 流速40 ml/min)及水(含有0.2%碳酸銨)與乙腈之極性遞減混合物作為溶離劑, 藉由製備型HPLC來純化溶液, 得到呈淺黃色固體狀之標題化合物(71 mg, 58%)。

$^1\text{H NMR}$ 光譜: (CDCl_3) 1.55 (15H, s br), 1.90 (2H, m), 2.15 (2H, m), 3.05-3.3 (4H, m), 4.32 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 質譜 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ 。

實例8

3-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-側氧基-丙酸



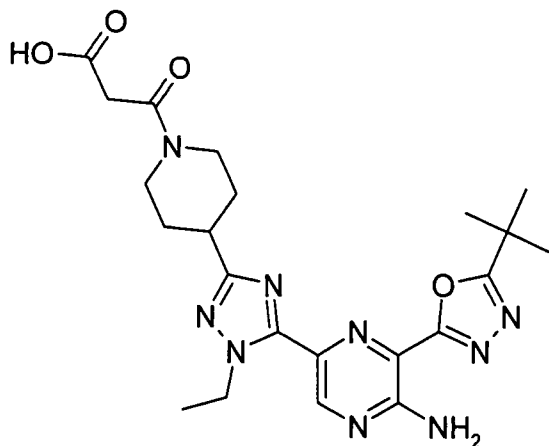
在0°C下在氮氣下, 經2分鐘之時間段, 向溶解於 CH_2Cl_2 (1.5 mL)中之3-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-甲基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺(100 mg, 0.26 mmol)及三乙胺(0.047 mL,

0.34 mmol)之攪拌溶液中逐滴添加3-氯-3-側氧基丙酸乙酯(0.037 mL, 0.29 mmol)。在0°C下攪拌混合物10分鐘，隨後使其溫至室溫且攪拌1小時。蒸發混合物，使其溶解於DMF中；過濾出白色固體且使用Waters X-Terra逆相管柱，用水(含有0.2%碳酸銨)與乙腈之混合物溶離，藉由製備型HPLC來純化濾液，得到呈黃色固體狀之3-(4-(5-(5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-側氧基丙酸乙酯(80 mg, 61.7%)。將此物質懸浮於THF(2 mL)中。添加2 N氫氧化鈉(0.235 mL, 0.47 mmol)及水(0.5 ml)。在室溫下攪拌混合物隔夜。向該混合物中添加2 N鹽酸(230 μ L)。蒸發溶劑。用CH₂Cl₂(30 mL)及水(5 mL)稀釋殘餘物。有機相用鹽水洗滌且經MgSO₄乾燥。蒸發溶劑。在乙醚中濕磨所得發泡體。過濾所得黃色固體，乾燥，在乙腈(3 mL)中濕磨。藉由過濾來收集黃色固體，在40°C下乾燥，得到呈黃色固體狀之標題化合物(50 mg, 68%)。

¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.46 (9H, s), 1.58 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.98 (2H, m), 2.84 (1H, m), 3.0 (1H, m), 3.21 (1H, m), 3.46 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.22 (3H, s), 4.34 (1H, m), 7.8-8.2 (1H, m), 8.87 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 470。

實例9

3-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-乙基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-側氧基-丙酸



在 50°C 下，向溶解於 DMF (20 mL) 中之 3-乙氧基-3-側氧基丙酸 (150 mg, 1.13 mmol)、N-乙基-N-異丙基丙-2-胺 (0.394 mL, 2.26 mmol) 及 3-(5-(第三丁基)-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-乙基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺 (450 mg, 1.13 mmol) 於中之攪拌溶液中經 30 秒逐份添加六氟磷酸 O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲銻 (474 mg, 1.25 mmol)。1 分鐘後 (完全反應) 對所得溶液進行取樣且使其即刻冷卻至環境溫度。濃縮反應混合物且用 EtOAc (100 mL) 稀釋，依次用水 (20 mL) 及飽和鹽水 (20 mL) 洗滌。經 MgSO₄ 乾燥有機層，過濾且蒸發，得到粗 3-(4-(5-(5-胺基-6-(5-(第三丁基)-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-側氧基丙酸乙酯 (850 mg)。

將彼物質中之一些 (780 mg) 溶解於 THF (20 ml) 中。向此溶液中添加 2 N 水性氫氧化鈉 (2.3 ml, 4.57 mmol) 及水 (5 ml)，隨後添加甲醇 (5 ml)，得到澄清溶液。於室溫下攪拌混合物 3 小時。蒸發 THF。用 2 N 水性鹽酸 (2.5 ml) 將水層酸化至 pH 3。添加二氯甲烷 (50 ml) 且萃取有機相。用鹽水 (10 ml) 洗滌有機相且經 MgSO₄ 乾燥。蒸發溶劑。使用水 (含有 1% 氨) 與乙腈之極性遞減混合物作為溶離劑，藉由製備型 HPLC (Waters X-Bridge Prep C18 OBD 管柱，5 μ 二氧化矽，50 mm 直徑，100 mm 長度) 來純化所得膠狀物。將含有所需化合物之溶離份蒸發至乾燥，得到純銨鹽。將此銨鹽溶解在水中且用 2 N 鹽酸 (約 0.3 ml) 酸化

至pH 3。添加二氯甲烷(50 ml)且分離出有機相，用鹽水(5 ml)洗滌且經MgSO₄乾燥。在過濾之後，將所得溶液蒸發至乾燥且用二乙醚(5 ml)濕磨殘餘物並過濾，得到呈奶白色固體狀之3-(4-(5-(5-胺基-6-(5-(第三丁基)-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)嘧啶-1-基)-3-側氧基丙酸(195 mg, 26.5%)。

¹H NMR光譜：(DMSO-d₆) 1.45 (9H, s), 1.48 (3H, m), 1.55 - 1.62 (1H, m), 1.70 - 1.80 (1H, m), 1.95 - 2.05 (2H, m), 2.80 - 2.90 (1H, m), 2.95 - 3.05 (1H, m), 3.15 - 3.25 (1H, m), 3.45 (2H, s), 3.78 - 3.85 (1H, m), 4.30 - 4.40 (1H, m), 4.55 - 4.65 (2H, m), 7.80 - 8.00 (2H, br s), 8.88 (1H, s), 12.60 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 484

【圖式簡單說明】

圖1顯示實例1形式A之X射線粉末繞射圖。

圖2顯示實例1形式A之DSC熱分析圖。

圖3顯示實例3形式A之X射線粉末繞射圖。

圖4顯示實例3形式A之DSC熱分析圖。

圖5顯示實例3形式B之X射線粉末繞射圖。

圖6顯示實例3形式B之DSC熱分析圖。

圖7顯示實例3形式C之X射線粉末繞射圖。

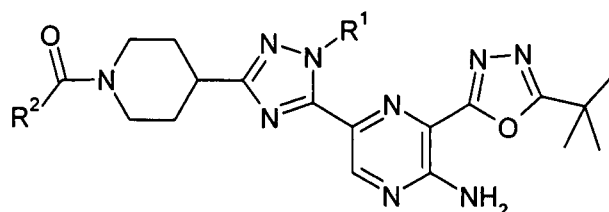
圖8顯示實例3形式C之DSC熱分析圖。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種式(I)化合物，



(I)

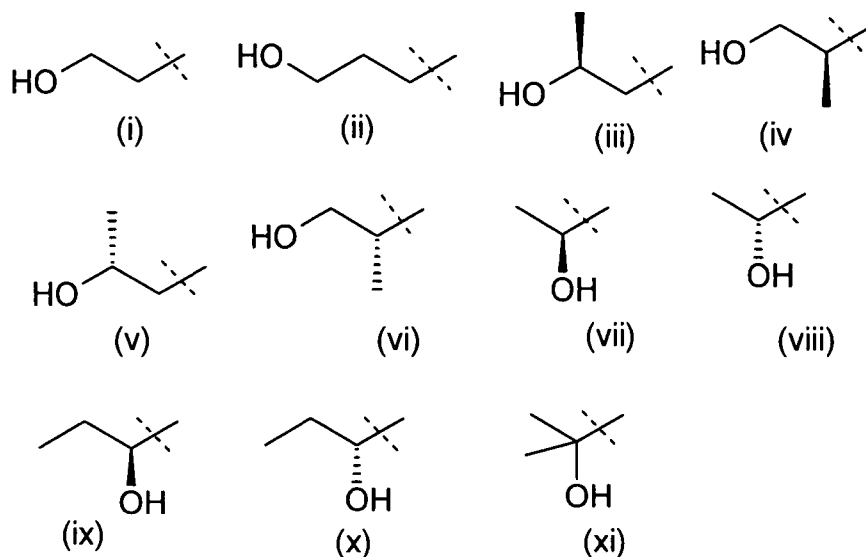
其中

R^1 為甲基或乙基；且

R^2 為經羥基取代之(C2-3)烷基；

或其醫藥學上可接受之鹽。

2. 如請求項1之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^2 係選自基團(i)至(xi)：



3. 如請求項1或2之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^2 係選自如請求項2中所定義之基團(i)至(vi)。
4. 如前述請求項中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^2 為如請求項2中所定義之基團(i)。
5. 如前述請求項中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其

中R¹為甲基。

6. 如請求項1至4中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中R¹為乙基。
7. 如請求項1之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，該化合物係選自：
 - 1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丙-1-酮；
 - 1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-乙基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丙-1-酮；
 - (3R)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丁-1-酮；
 - (3S)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-丁-1-酮；
 - (2R)-1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-3-羥基-2-甲基-丙-1-酮；
 - 1-[4-[5-[5-胺基-6-(5-第三丁基-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基]-1-甲基-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基]-2-羥基-2-甲基-丙-1-酮。
8. 如前述請求項中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其係呈晶形。
9. 如前述請求項中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其係用作藥物。
10. 如前述請求項中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其適用於預防或治療諸如人類之溫血動物中之癌症。
11. 一種適用於治療癌症之組合，其包含如請求項1之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽及另一抗腫瘤劑。
12. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1之式(I)化合物或其醫藥學上

可接受之鹽及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

13. 一種選出可使用式(I)化合物治療之患者的方法，該方法包括提供來自含有腫瘤源性DNA或腫瘤細胞之患者樣本；確定該患者之腫瘤細胞或腫瘤源性DNA中之PIK3CA基因為野生型抑或突變型；以及基於以上來選出可使用式(I)化合物治療之患者。
14. 一種治療罹患癌症之患者的方法，其包括：由患者提供含有腫瘤細胞之樣本；確定該患者之腫瘤細胞中之PIK3CA基因為野生型抑或突變型；若該等腫瘤細胞具有突變型PIK3CA基因，則向該患者投與有效量之如請求項1之式(I)化合物。
15. 如請求項1之式(I)化合物，其用於治療具有經鑑別為攜帶突變型PIK3CA基因之腫瘤細胞的癌症。

圖式

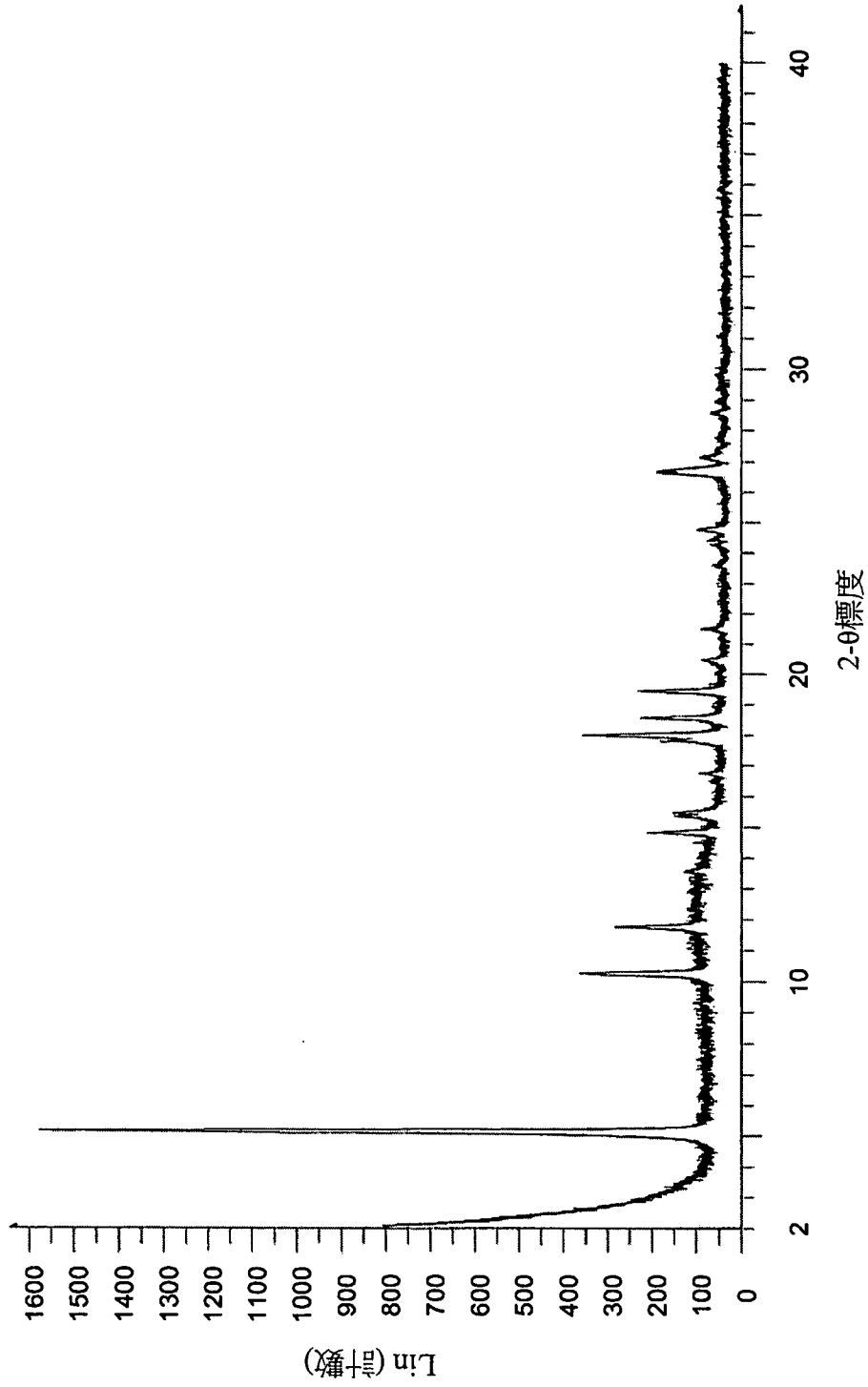


圖1：實例1形式A之X射線粉末繞射圖

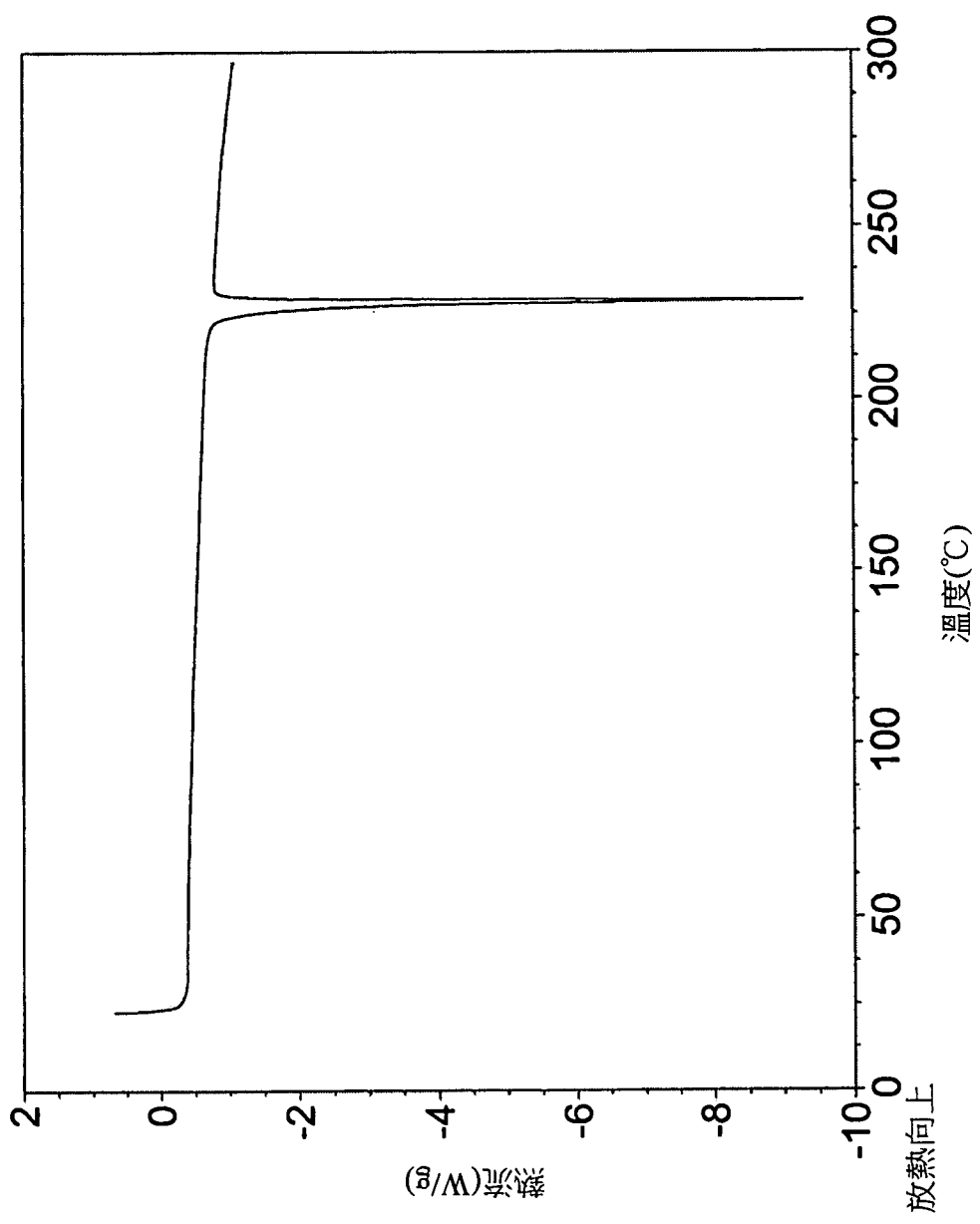


圖2：實例1形式A之DSC熱分析圖

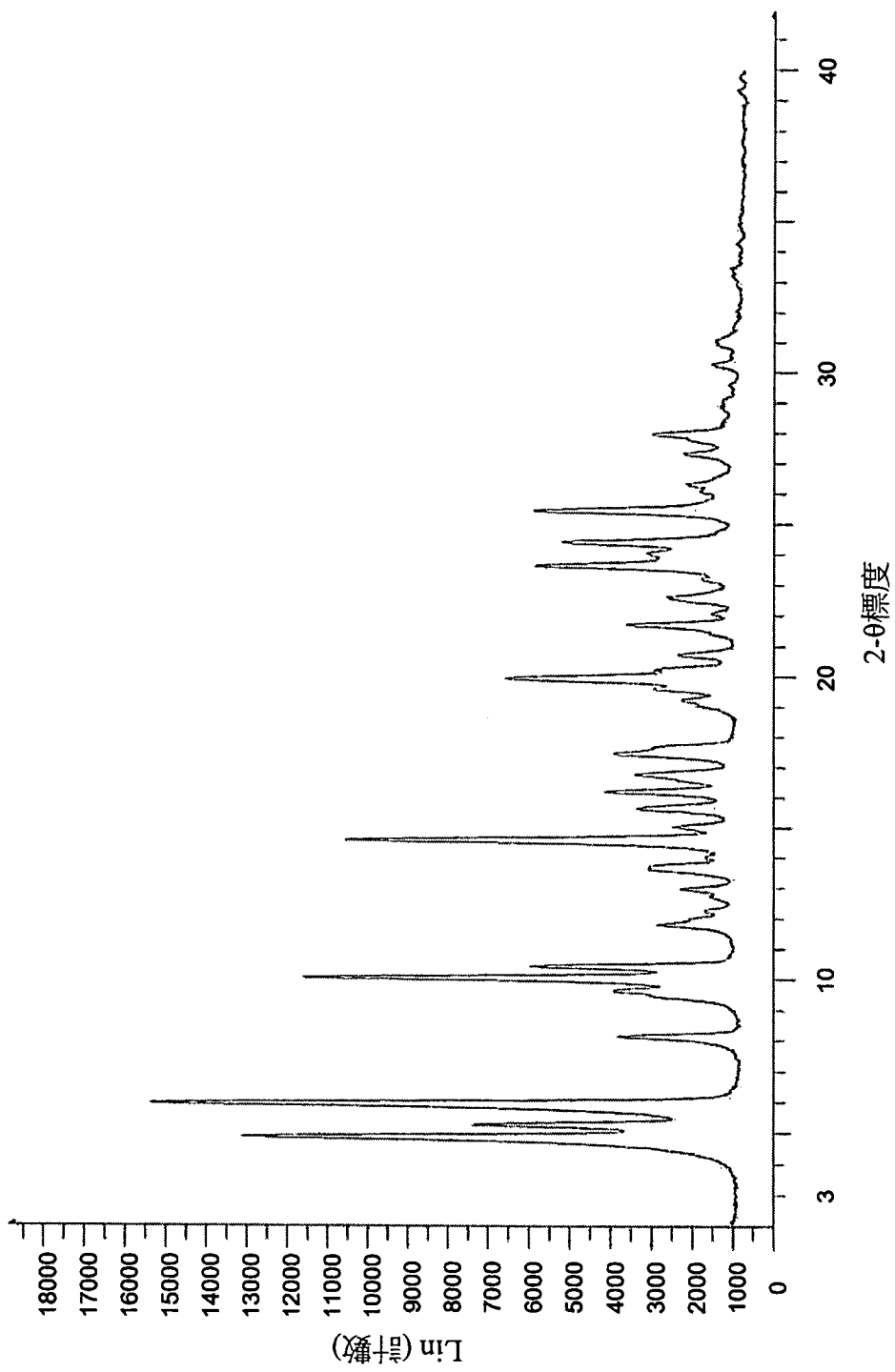


圖3：實例3形式A之X射線粉末繞射圖

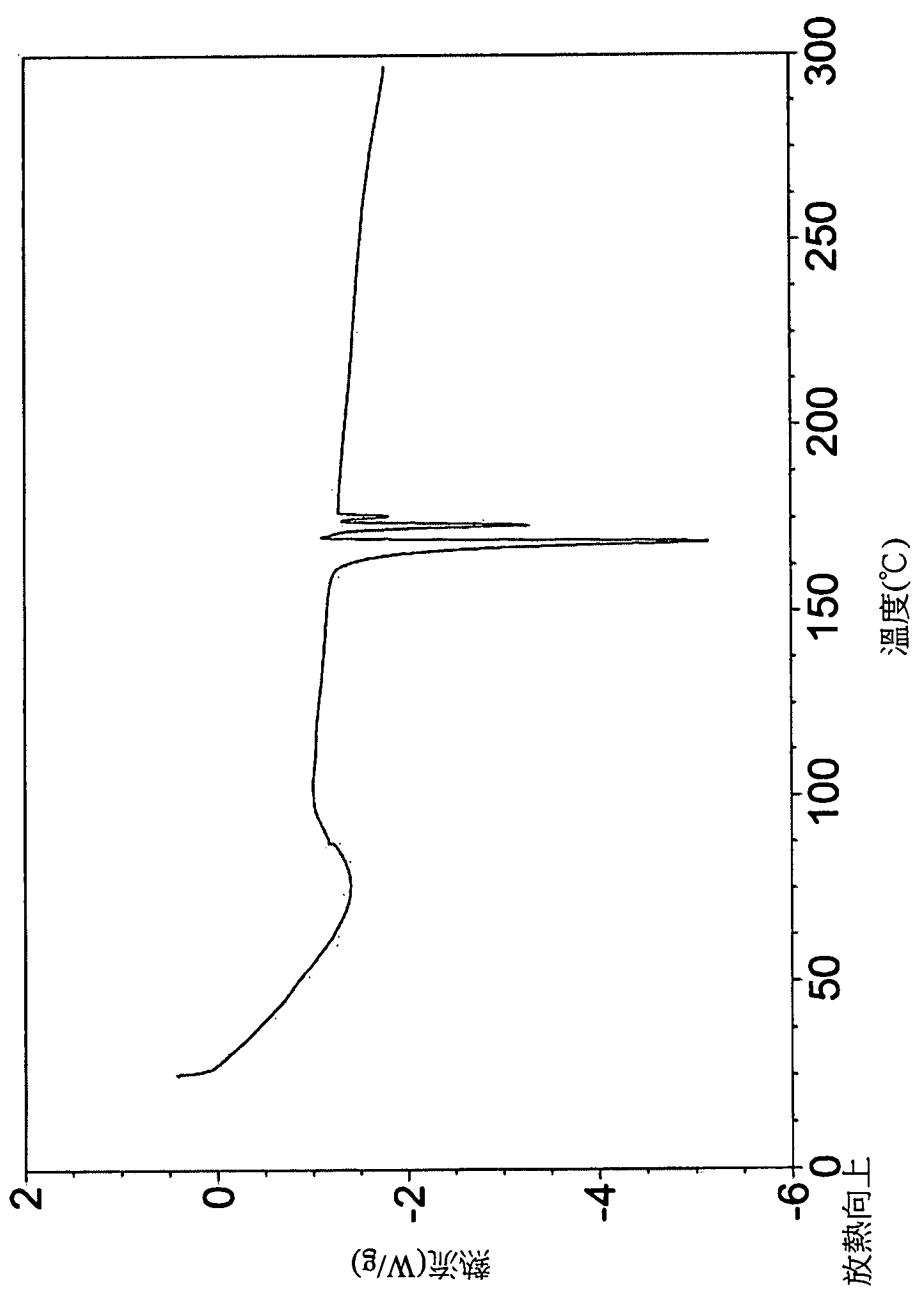


圖4：實例3形式A之DSC熱分析圖

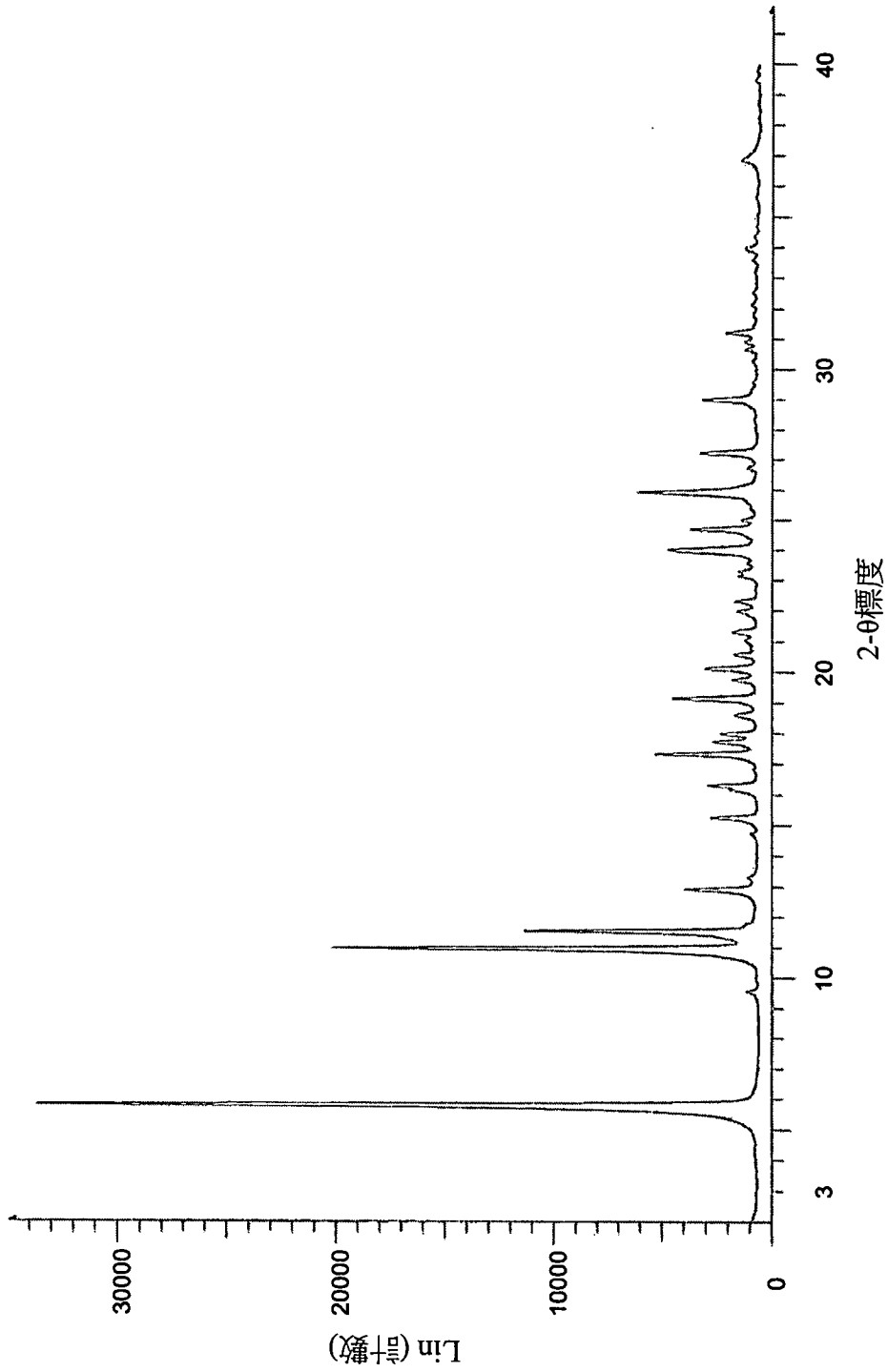


圖5：實例3形式B之X射線粉末繞射圖

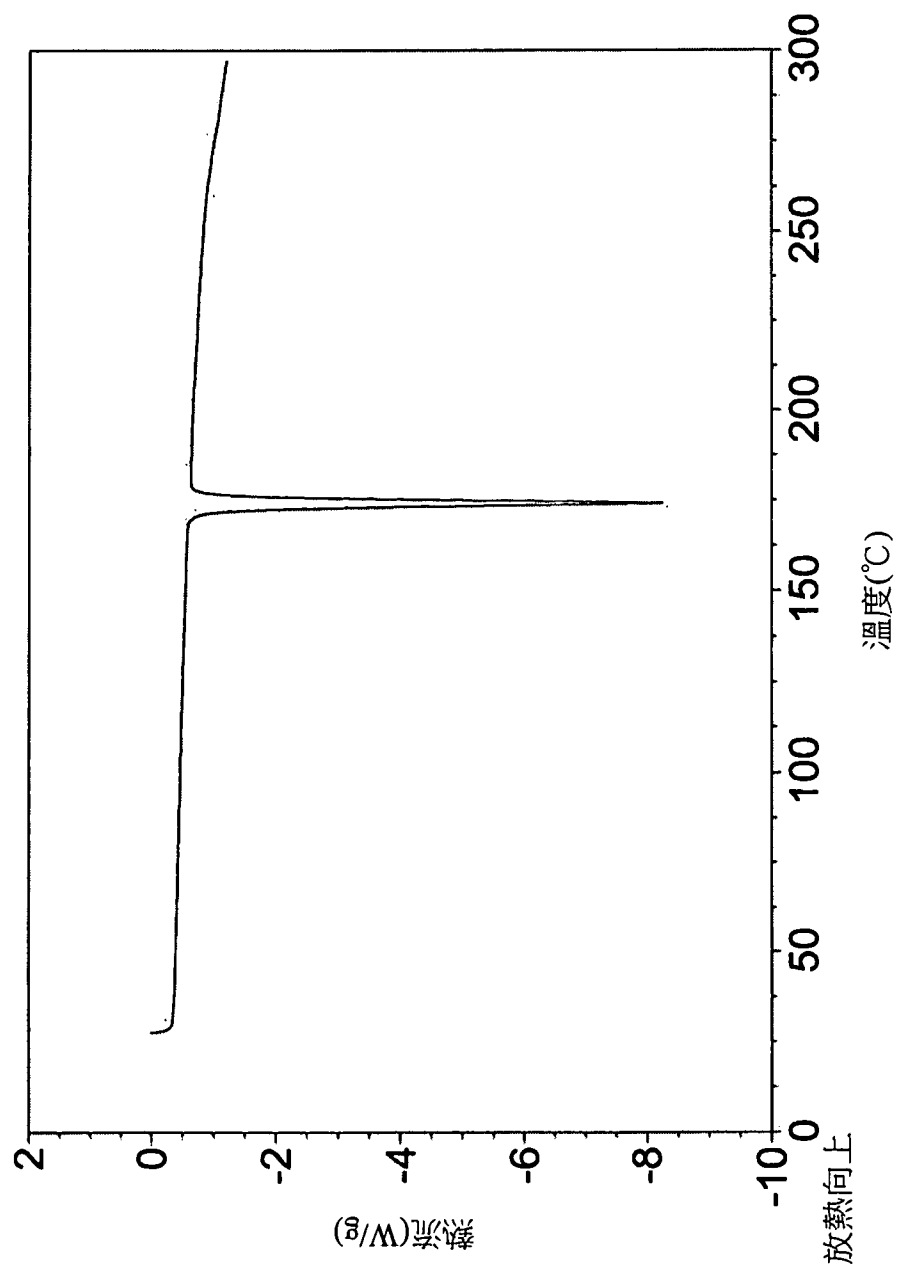


圖6：實例3形式B之DSC熱分析圖

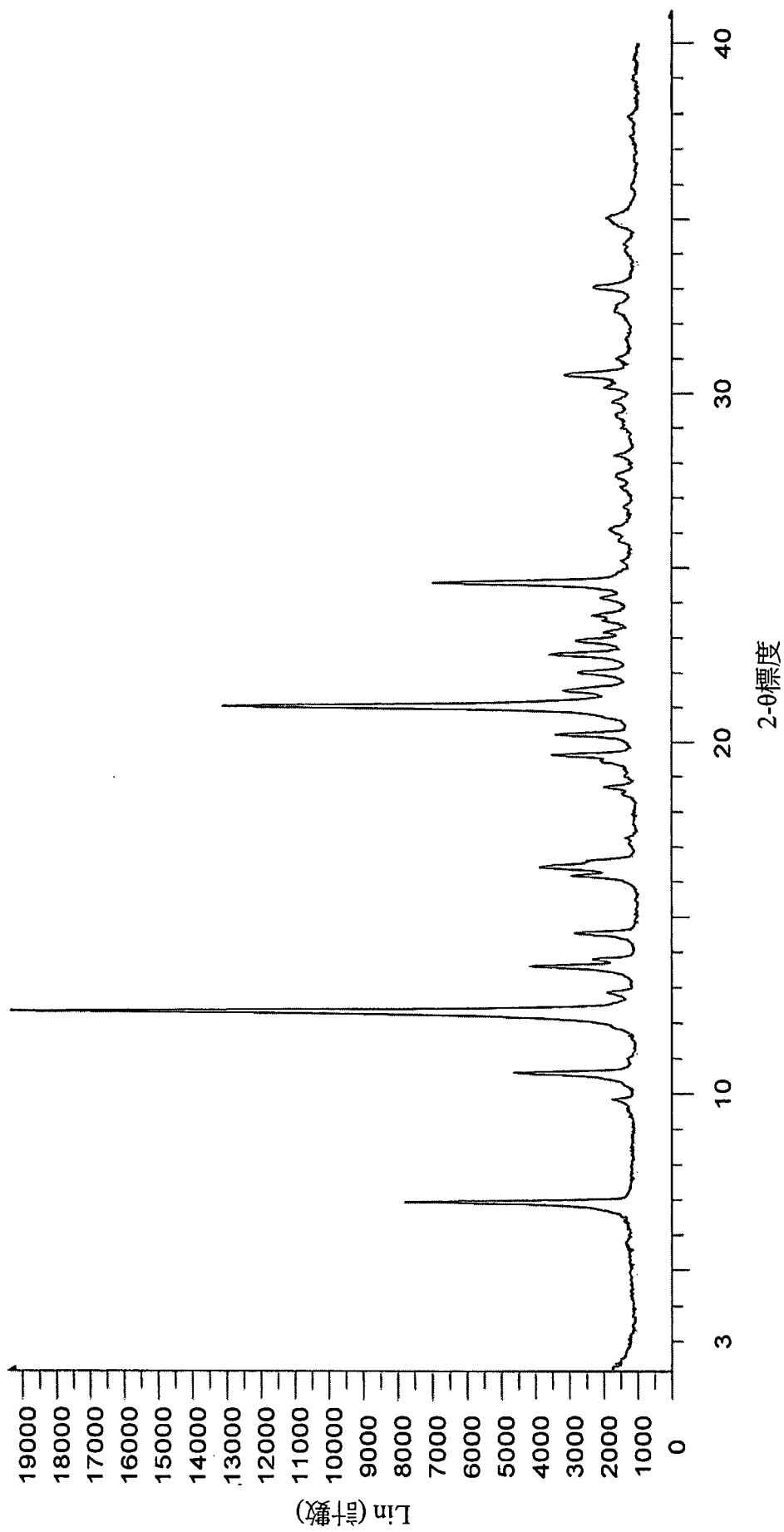


圖7：實例3形式C之X射線粉末繞射圖

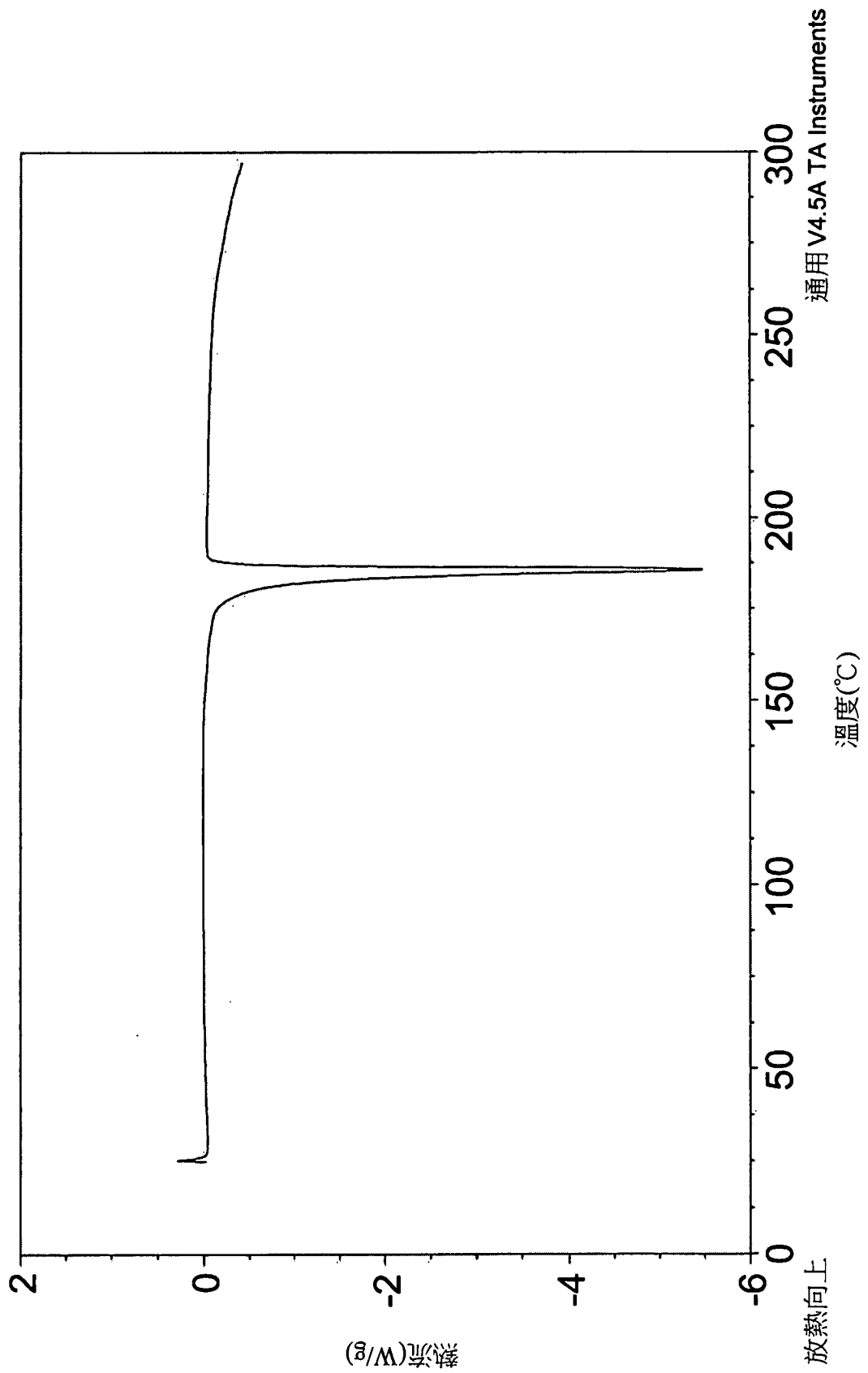


圖8：實例3形式C之DSC熱分析圖

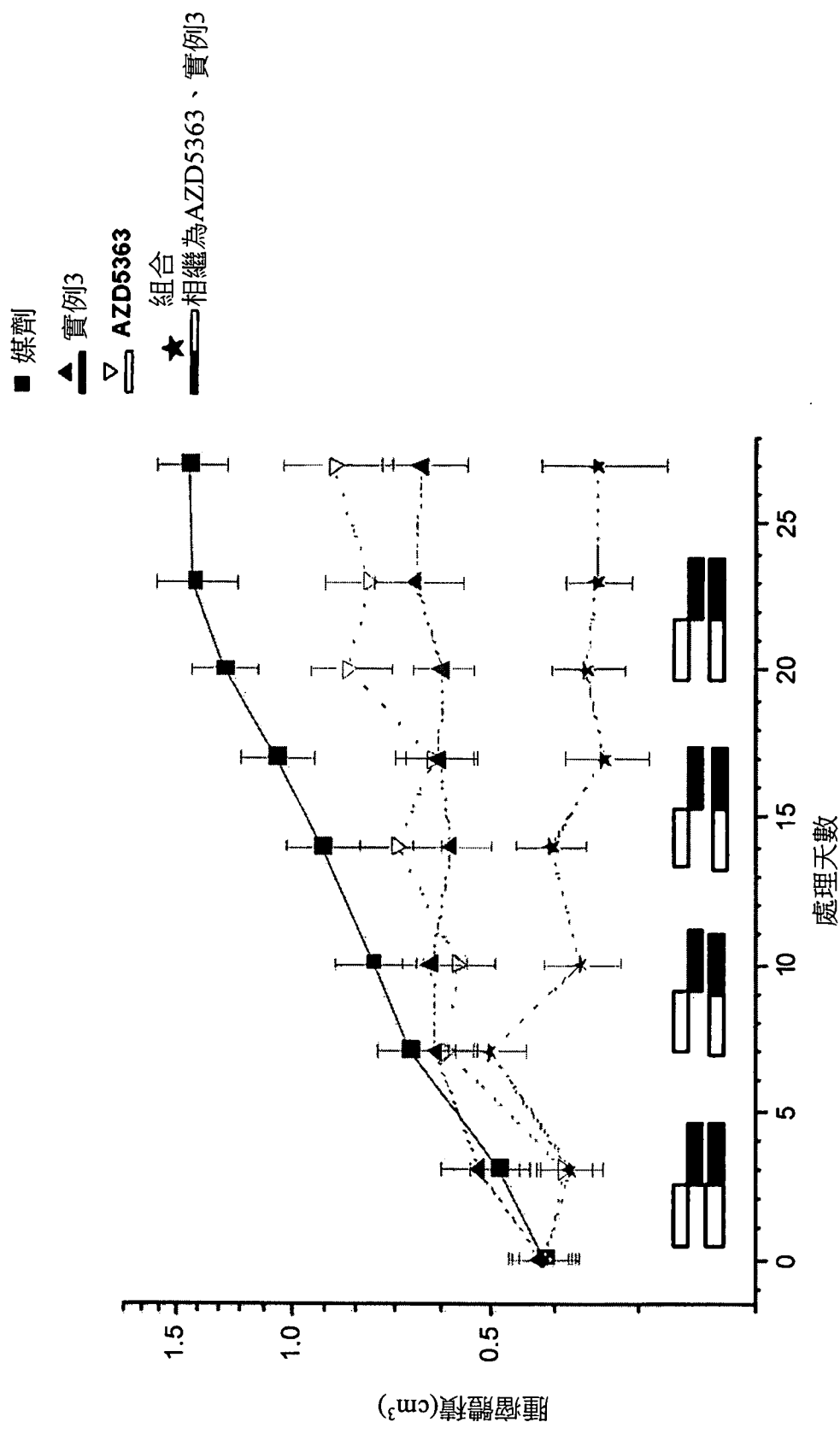


圖9：藉由依序投與實例3與AKT抑制劑(AZD5363)之組合來抑制腫瘤生長

- 媒劑
- ▲ 實例3
- ▽ AZD5363
- 共同給予AZD5363加實例3

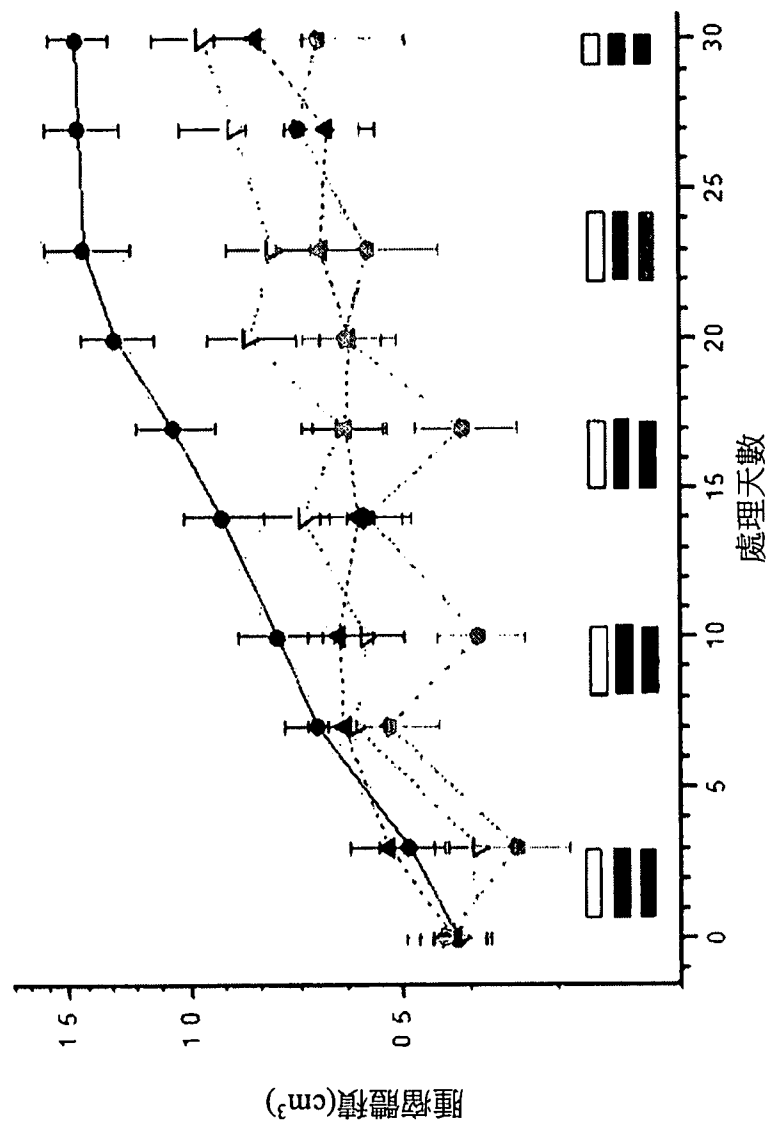


圖10：藉由共同投與實例3與AKT抑制劑(AZD5363)之組合來抑制腫瘤生長

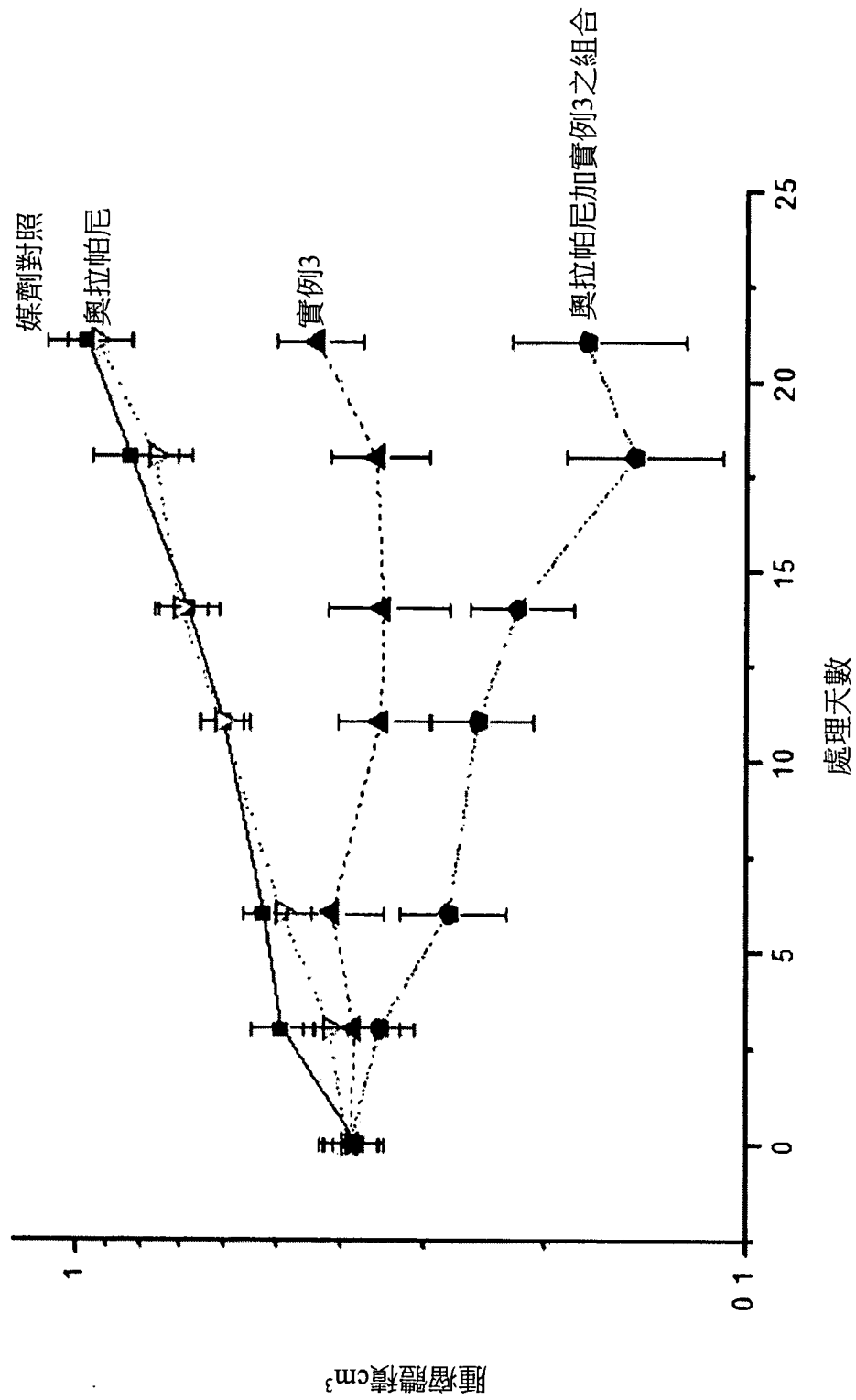


圖11：在BT474異種移植模型中，藉由實例3與PARP抑制劑(奧拉帕尼)之組合來抑制腫瘤生長

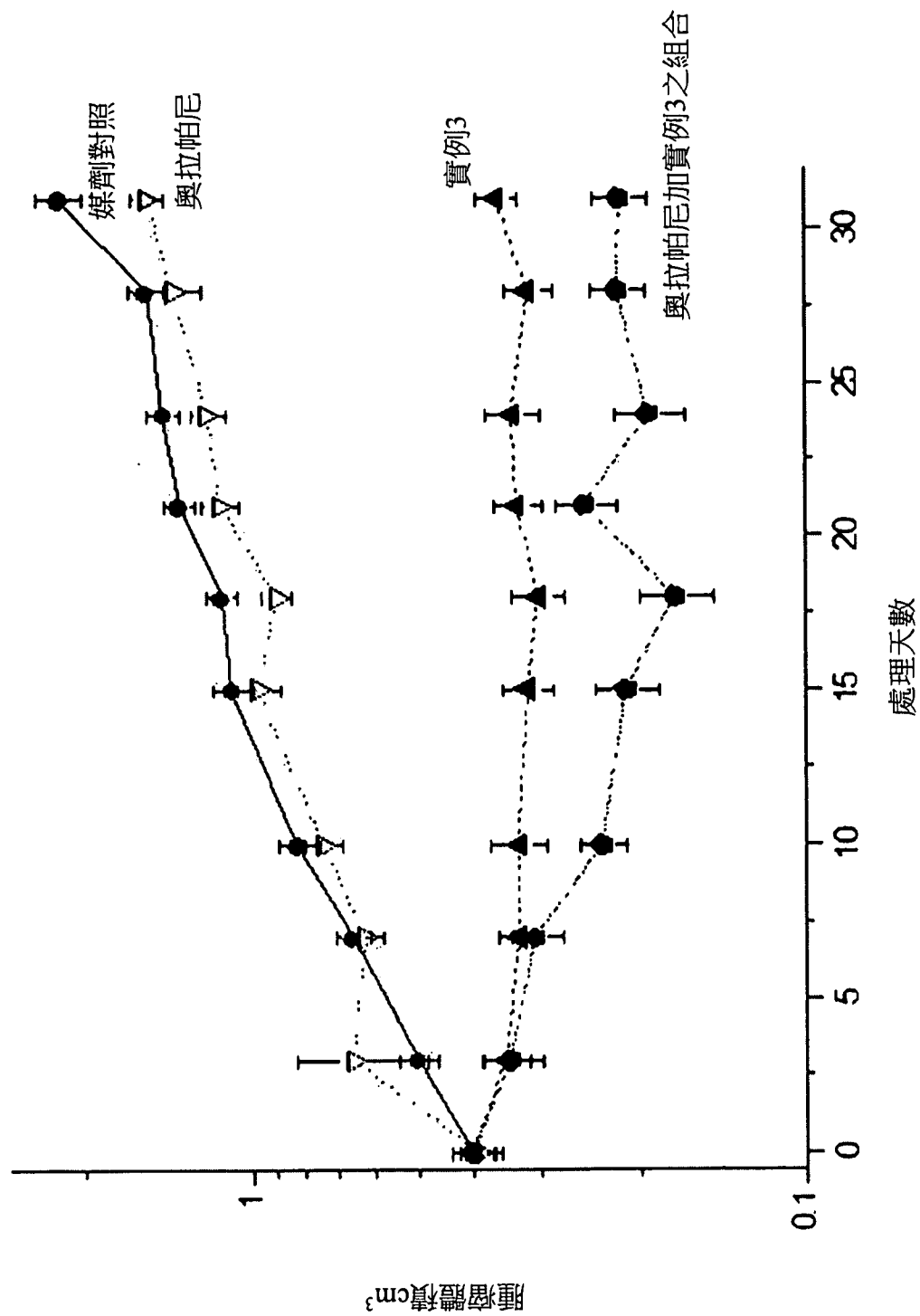


圖12：在MCF7異種移植模型中，藉由實例3與PARP抑制劑(奧拉帕尼)之組合來抑制腫瘤生長

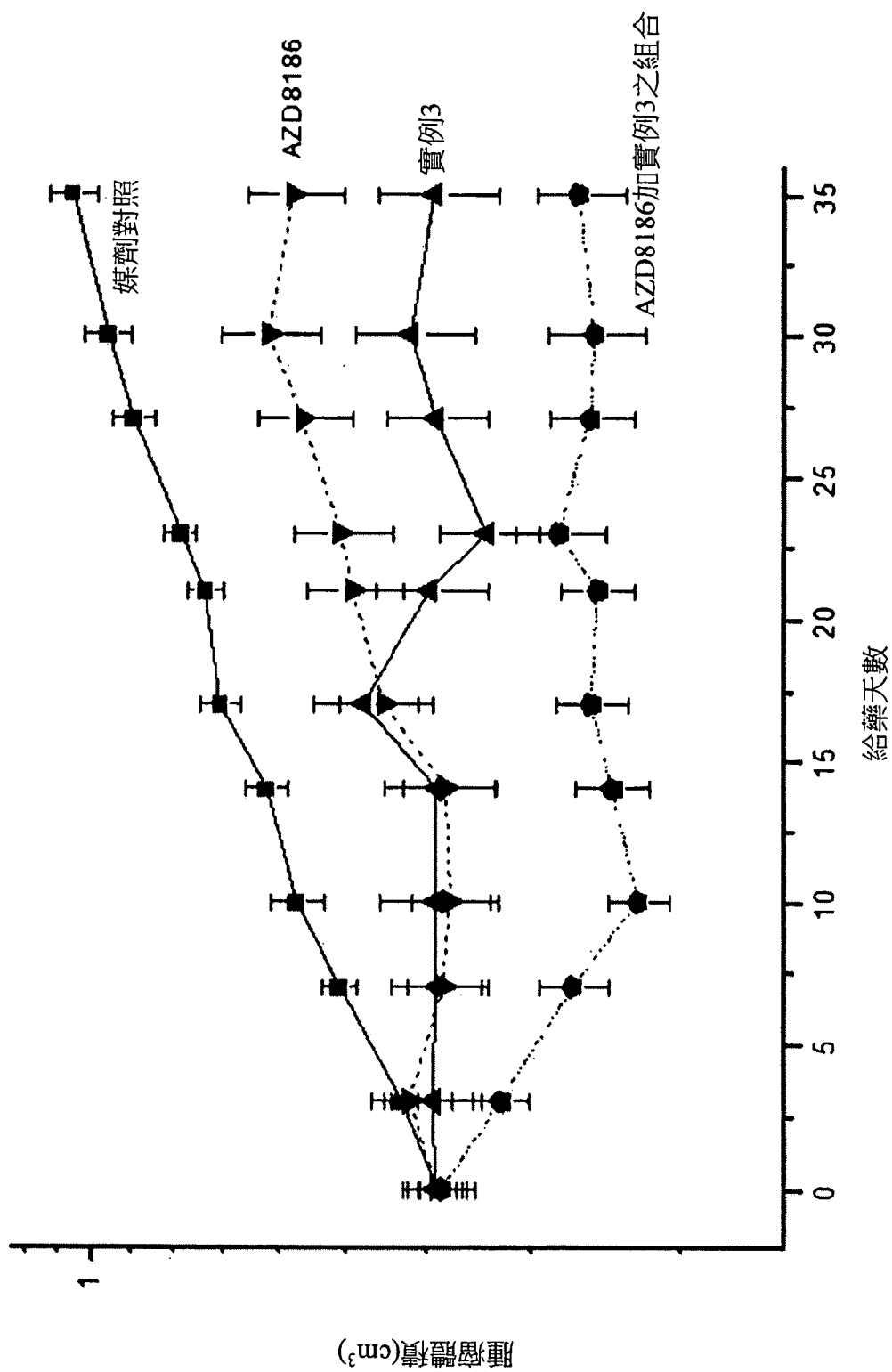
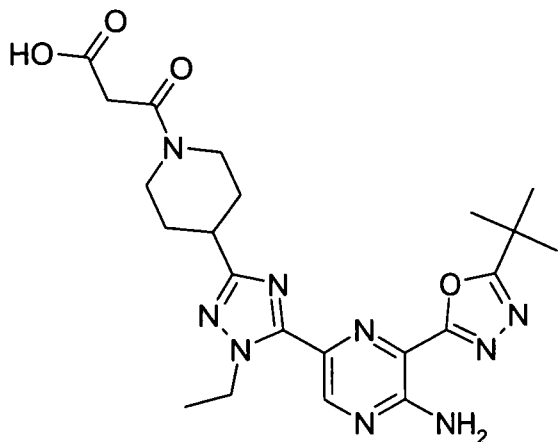


圖13：藉由實例3與(AZD8186)之組合來抑制腫瘤生長



在 50°C 下，向溶解於 DMF(20 mL) 中之 3-乙氧基-3-側氧基丙酸 (150 mg, 1.13 mmol)、N-乙基-N-異丙基丙-2-胺 (0.394 mL, 2.26 mmol) 及 3-(5-(第三丁基)-1,3,4-噁二唑-2-基)-5-(1-乙基-3-(哌啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-5-基)吡嗪-2-胺 (450 mg, 1.13 mmol) 於中之攪拌溶液中經 30 秒逐份添加六氟磷酸 O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲錄 (474 mg, 1.25 mmol)。1 分鐘後(完全反應)對所得溶液進行取樣且使其即刻冷卻至環境溫度。濃縮反應混合物且用 EtOAc(100 mL) 稀釋，依次用水(20 mL)及飽和鹽水(20 mL)洗滌。經 MgSO₄ 乾燥有機層，過濾且蒸發，得到粗 3-(4-(5-(5-胺基-6-(5-(第三丁基)-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-側氧基丙酸乙酯 (850 mg)。

將彼物質中之一些(780 mg)溶解於 THF(20 ml) 中。向此溶液中添加 2 N 水性氫氧化鈉(2.3 ml, 4.57 mmol) 及水(5 ml)，隨後添加甲醇(5 ml)，得到澄清溶液。於室溫下攪拌混合物 3 小時。蒸發 THF。用 2 N 水性鹽酸(2.5 ml) 將水層酸化至 pH 3。添加二氯甲烷(50 ml) 且萃取有機相。用鹽水(10 ml) 洗滌有機相且經 MgSO₄ 乾燥。蒸發溶劑。使用水(含有 1% 氨) 與乙腈之極性遞減混合物作為溶離劑，藉由製備型 HPLC (Waters X-Bridge Prep C18 OBD 管柱，5 μ 二氧化矽，50 mm 直徑，100 mm 長度) 來純化所得膠狀物。將含有所需化合物之溶離份蒸發至乾燥，得到純銨鹽。將此銨鹽溶解在水中且用 2 N 鹽酸(約 0.3 ml) 酸化

至 pH 3。添加二氯甲烷(50 ml)且分離出有機相，用鹽水(5 ml)洗滌且經 MgSO₄ 乾燥。在過濾之後，將所得溶液蒸發至乾燥且用二乙醚(5 ml)濕磨殘餘物並過濾，得到呈奶白色固體狀之 3-(4-(5-(5-胺基-6-(5-(第三丁基)-1,3,4-噁二唑-2-基)吡嗪-2-基)-1-乙基-1H-1,2,4-三唑-3-基)哌啶-1-基)-3-側氧基丙酸(195 mg, 26.5%)。

¹H NMR 光譜：(DMSO-d₆) 1.45 (9H, s), 1.48 (3H, m), 1.55 - 1.62 (1H, m), 1.70 - 1.80 (1H, m), 1.95 - 2.05 (2H, m), 2.80 - 2.90 (1H, m), 2.95 - 3.05 (1H, m), 3.15 - 3.25 (1H, m), 3.45 (2H, s), 3.78 - 3.85 (1H, m), 4.30 - 4.40 (1H, m), 4.55 - 4.65 (2H, m), 7.80 - 8.00 (2H, br s), 8.88 (1H, s), 12.60 (1H, s)；質譜[M+H]⁺ = 484

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示實例 1 形式 A 之 X 射線粉末繞射圖。

圖 2 顯示實例 1 形式 A 之 DSC 熱分析圖。

圖 3 顯示實例 3 形式 A 之 X 射線粉末繞射圖。

圖 4 顯示實例 3 形式 A 之 DSC 熱分析圖。

圖 5 顯示實例 3 形式 B 之 X 射線粉末繞射圖。

圖 6 顯示實例 3 形式 B 之 DSC 熱分析圖。

圖 7 顯示實例 3 形式 C 之 X 射線粉末繞射圖。

圖 8 顯示實例 3 形式 C 之 DSC 熱分析圖。

圖 9 顯示藉由依序投與實例 3 與 AKT 抑制劑(AZD5363)之組合來抑制腫瘤生長。

圖 10 顯示藉由共同投與實例 3 與 AKT 抑制劑(AZD5363)之組合來抑制腫瘤生長。

圖 11 顯示在 BT474 異種移植模型中，藉由實例 3 與 PARP 抑制劑(奧拉帕尼)之組合來抑制腫瘤生長。

圖 12 顯示在 MCF7 異種移植模型中，藉由實例 3 與 PARP 抑制劑(奧拉帕尼)之組合來抑制腫瘤生長。

圖 13 顯示藉由實例 3 與(AZD8186)之組合來抑制腫瘤生長。

【符號說明】

無