

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6698712号  
(P6698712)

(45) 発行日 令和2年5月27日(2020.5.27)

(24) 登録日 令和2年5月1日(2020.5.1)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
A 6 1 K 31/553 (2006.01)	A 6 1 K 31/553
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
請求項の数 10 (全 64 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-568028 (P2017-568028)	(73) 特許権者	306021192 エフ・ホフマンーラ・ロシュ・アクチュエン ゲゼルシャフト スイス、ツェハーー 4070バーゼル、グ レンツァッハーシュトラーセ 124番
(86) (22) 出願日	平成28年6月28日 (2016.6.28)	(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(65) 公表番号	特表2018-523119 (P2018-523119A)	(72) 発明者	エドガー, カイル アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
(43) 公表日	平成30年8月16日 (2018.8.16)	(72) 発明者	フリードマン, ロリ アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1 最終頁に続く
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/064920		
(87) 国際公開番号	W02017/001362		
(87) 国際公開日	平成29年1月5日 (2017.1.5)		
審査請求日	平成30年3月8日 (2018.3.8)		
(31) 優先権主張番号	62/186, 236		
(32) 優先日	平成27年6月29日 (2015.6.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 TASELISIBを用いた治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

t a s e l i s i b による治療のための患者を選択する方法であって：

- ( a ) 患者から得られた生物学的試料を t a s e l i s i b により処理すること；及び
- ( b ) p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇を検出すること；

を含み、

生物学的試料における p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇が、 t a s e l i s i b による治療に応答するであろう患者を同定し、

p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇が、抗 p 1 1 0 アルファ抗体への結合により又は質量分析により測定され、

生物学的試料は、腫瘍生検試料又は循環性腫瘍細胞である、方法。

【請求項 2】

p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇が、患者による t a s e l i s i b への治療的応答性を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇が、抗 p 1 1 0 アルファ抗体への結合により測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

試料中の p 1 1 0 アルファタンパク質に対する抗 p 1 1 0 アルファ抗体の結合が、ウェスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着法 ( E L I S A )、ラジオイムノアッセイ ( R I

A)、免疫組織化学(IHC)、蛍光活性化セルソーティング(FACS)、又は逆相タンパク質アレイにより決定される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

p110アルファタンパク質の枯渇が質量分析法により検出される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

乳がんを有すると診断された患者のための治療レジメンを選択することを補助するための方法であって、患者のがん細胞を有効量のtaselisibと接触させること、及びtaselisibに反応したp110アルファタンパク質のレベルを検出することを含み、p110アルファタンパク質の枯渇の検出は、がんがtaselisibによる治療に感受性であることを示し、治療レジメンは、がんがtaselisibによる治療に感受性であると決定された場合に患者にtaselisibを投与することを含む、方法であって、

10

p110アルファタンパク質の枯渇が、抗p110アルファ抗体への結合により又は質量分析により測定され、

生物学的試料は、腫瘍生検試料又は循環性腫瘍細胞である、方法。

【請求項7】

がん細胞がPIK3CA突然変異がん細胞である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

taselisib及び抗p110アルファ抗体を含む、がんを有すると診断された患者のための治療レジメンを選択するためのキットであって、

20

p110アルファタンパク質の枯渇の検出は、がんがtaselisibによる治療に感受性であることを示し、

がんがtaselisibによる治療に感受性であると決定された場合に、治療レジメンは患者にtaselisibを投与することを含み、

p110アルファタンパク質の枯渇が、抗p110アルファ抗体への結合により又は質量分析により測定され、

生物学的試料は、腫瘍生検試料又は循環性腫瘍細胞である、キット。

【請求項9】

がん細胞がPIK3CA突然変異がん細胞である、請求項8に記載のキット。

30

【請求項10】

taselisib及び抗p110アルファ抗体を含む、taselisibによる治療のための患者を選択するためのキットであって、

生物学的試料におけるp110アルファタンパク質の枯渇が、taselisibによる治療に反応するであろう患者を同定し、

p110アルファタンパク質の枯渇が、抗p110アルファ抗体への結合により又は質量分析により測定され、

生物学的試料は、腫瘍生検試料又は循環性腫瘍細胞である、キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

37 CFR 1.53(b)の下に出願された本非仮特許出願は、2015年6月29日出願の米国仮特許出願第62/186236号の米国特許法119(e)に基づく利益を主張し、この仮出願の全体は引用により本明細書に包含される。

【0002】

発明の分野

本発明は、概してPI3K阻害化合物であるtaselisib(GDC-0032)

50

によるがんの治療に関する。本発明はまた、*in vitro*、*in situ*、及び *in vivo*での哺乳動物細胞又は関連する病的状態の診断又は治療のための *t a s e l i s i b*の使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

ホスホイノシチド3-キナーゼ(P I 3 K) / A k tシグナル伝達経路の上方制御は、多くのがんに通じた特徴である(Yuan and Cantley (2008) Oncogene 27:5497-510)。経路内の遺伝的偏差は、多くのヒトがんを検出されており(Osaka et al (2004) Apoptosis 9:667-76)、主に細胞の増殖、移動及び生存を刺激するように作用する。点突然変異の活性化又はp 1 1 0 a P I 3 KアイソフォームをコードするP I K 3 C A遺伝子の増幅に続いて経路の活性化が起こる(Samuels et al (2004) Science 304:554; Hennessy et al (2005) Nat. Rev. Drug Discov. 4 (988-1004)。腫瘍抑制因子P T E N ( P I 3 Kとは反対の機能を有するホスファターゼ)内の遺伝子欠失又は機能欠損の突然変異も、P I 3 K経路のシグナル伝達を増加させる(Zhang and Yu (2010) Clin. Cancer Res. 16 (4325-30)。

10

【0004】

これら異常は、A k t及びm T O Rといったキナーゼによる下流でのシグナル伝達の増加を招き、P I 3 K経路の活性亢進は、がん治療に対する耐性の特徴として提言されている(Opel et al (2007) Cancer Res. 67:735-45; Razis et al (2011) Breast Cancer Res. Treat. 128:447-56)。

20

【0005】

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(P I 3 K)シグナル伝達経路は、ホルモン受容体(H R)陽性転移性乳がん(m B C)において最も調整不全の経路の一つである(Bachman KE, et al. Cancer Biol Ther. 2004; 3:772-775; Stemke-Hale K, et al. Cancer Res. 2008; 68:6084-6091; Koboldt DC, et al. Nature 2012; 490:61-70)。ホスファチジルイノシトール-4, 5-ビスホスフェート3-キナーゼ、触媒サブユニットアルファ(P I K 3 C A)は、P I 3 K触媒サブユニットのP I 3 K アイソフォーム(p 1 1 0)をコードし(Samuels Y, et al. Science 2004; 304:554)、H R陽性B Cの~40%にこの遺伝子内に突然変異が検出されている(Arthur LM, et al. Breast Cancer Res Treat. 2014; 147:211)。

30

【0006】

ホスファチジルイノシチド3-キナーゼ(P I 3 K)は、リンパ腫の重要な生存及び増殖シグナルのための主要なシグナル伝達リンパ節であり、ホスファターゼP T E Nの活性に対抗する。P I 3 K経路は、侵襲型のリンパ腫において調整不全である(Abubaker (2007) Leukemia 21:2368-2370)。D L B C L(びまん性大B細胞型リンパ腫)がんの八パーセントがP I 3 K C A(ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ触媒サブユニットアルファ)ミスセンス突然変異を有し、免疫組織化学試験では37%がP T E N陰性である。

【0007】

ホスファチジルイノシトールは、細胞膜に見られる複数のリン脂質の一つであり、細胞内シグナル伝達に参与する。3'-リン酸化ホスホイノシチドを介した細胞シグナル伝達は、様々な細胞プロセス、例えば、悪性形質転換、増殖因子シグナル伝達、炎症、及び免疫に参与していた(Rameh et al (1999) J. Biol Chem. 274:8347-8350)。これらリン酸化シグナル伝達産物を生成する酵素であるホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(P I 3-キナーゼ又はP I 3 Kとも呼ばれる)は、最初にウイルス性腫瘍性タンパク質及びホスファチジルイノシトール(P I)及びそのリン酸化誘導体をイノシトール環の3'-ヒドロキシルにおいてリン酸化する成長因子受容体チロシンキナーゼとして同定された(Panayotou et al (1992) Trends Cell Biol 2:358-60)。ホスホイノシチド3-キナーゼ(P I 3 K)は、イノシトール環の3-ヒドロキシル残基において脂質をリン酸化する脂質キナーゼである(Whitman et al (1988) Nature, 332:664)。P I 3-キナー

40

50

ゼによって生成される 3 - リン酸化リン脂質 ( P I P 3 ) は、 A k t 及び P D K 1 ( ホスホイノシチド依存性キナーゼ - 1 ) といった、脂質結合ドメイン ( プレクストリン相同 ( P H ) ドメインを含む ) を有するキナーゼを補充するセカンドメッセンジャーとして機能する ( Vivanco et al ( 2002 ) Nature Rev. Cancer 2:489; Phillips et al ( 1998 ) Cancer 83:41 ) 。

#### 【 0 0 0 8 】

P I 3 キナーゼファミリーは、構造相同性によって小分類される少なくとも 1 5 の異なる酵素を含み、配列相同性及び酵素の触媒により形成される産物に基づいて 3 のクラスに分けられる。クラス I の P I 3 キナーゼは、 2 のサブユニット、即ち 1 1 0 k d の触媒サブユニットと 8 5 k d の調節サブユニットからなる。調節サブユニットは、 S H 2 ドメインを含み、チロシンキナーゼ活性を有する成長因子受容体又は癌遺伝子産物によってリン酸化されたチロシン残基に結合し、それによりその脂質基質をリン酸化する p 1 1 0 触媒サブユニットの P I 3 K 活性を誘導する。クラス I の P I 3 キナーゼは、サイトカイン、インテグリン、増殖因子及び免疫受容体といった重要なシグナル伝達イベントに関与し、このことは、この経路の制御が細胞増殖及び癌形成の調節といった重要な治療効果に繋がりうることを示唆する。クラス I P I 3 K は、ホスファチジルイノシトール ( P I ) 、ホスファチジルイノシトール - 4 - ホスフェート、及びホスファチジルイノシトール - 4 , 5 - ビホスフェート ( P I P 2 ) をリン酸化して、それぞれホスファチジルイノシトール - 3 - ホスフェート ( P I P ) 、ホスファチジルイノシトール - 3 , 4 - ビスホスホネート及びホスファチジルイノシトール - 3 , 4 , 5 - トリホスフェートを生成することができる。クラス I I の P I 3 K は、 P I 及びホスファチジルイノシトール - 4 - ホスフェートをリン酸化する。クラス I I I の P I 3 K は、 P I のみをリン酸化することができる。がんにおいて重要な P I 3 - キナーゼアイソフォームは、 p 1 1 0 における再発性がん遺伝子突然変によって示されるクラス I P I 3 - キナーゼ、 p 1 1 0 である ( Samuels et al ( 2004 ) Science 304:554 ; U S 5 8 2 4 4 9 2 ; 米国特許第 5 8 4 6 8 2 4 号 ; 米国特許第 6 2 7 4 3 2 7 号 ) 。他のアイソフォームが、がんにおいて重要である場合があり、心血管性及び免疫炎症性疾患にも関与している ( Workman P ( 2004 ) Biochem Soc Trans 32:393-396; Patel et al ( 2004 ) Proc. Am. Assoc. of Cancer Res. ( Abstract LB-247 ) 95th Annual Meeting, March 27-31, Orlando, Florida, USA; Ahmadi K and Waterfield MD ( 2004 ) “ Phosphoinositide 3-Kinase: Function and Mechanisms ” Encyclopedia of Biological Chemistry ( Lennarz W J, Lane M D eds ) Elsevier / Academic Press ) 。

#### 【 0 0 0 9 】

R a s の後、 P I 3 K が、がんにおいて変異の度合いが二番目に大きいがん遺伝子である。 p 1 1 0 アルファのがん遺伝子突然変異は、結腸、乳房、脳、肝臓、卵巣、胃、肺、及び頭頸部の固形腫瘍に高い頻度で観られた。約 3 5 ~ 4 0 % のホルモン受容体陽性 ( H R + ) 乳がん腫瘍が P I K 3 C A 突然変異を有している。 P T E N の異常は、膠芽細胞腫、メラノーマ、前立腺がん、子宮内膜がん、卵巣がん、乳がん、肺がん、頭頸部のがん、肝細胞がん、及び甲状腺がんにも見られた。ホスファターゼ・テンシンホモログ ( P T E N ) は、ヒトにおいて、 P T E N 遺伝子によってコードされるタンパク質である ( Steck PA, et al ( 1997 ) Nat. Genet. 15 ( 4 ) ( 356-62 ) ) 。この遺伝子の突然変異は、多くのがんの発生の一段階である。 P T E N は、そのホスファターゼタンパク質産物の作用により腫瘍抑制因子遺伝子として作用する。このホスファターゼは、細胞周期の制御に関与しており、細胞の増殖及び速すぎる分割を妨げる ( Chu EC, et al ( 2004 ) Med. Sci. Monit. 10 ( 10 ) RA235-41 ) 。

#### 【 0 0 1 0 】

P I 3 キナーゼは、 p 8 5 及び p 1 1 0 サブユニットからなるヘテロ二量体である ( Otsu et al ( 1991 ) Cell 65:91-104; Hiles et al ( 1992 ) Cell 70:419-29 ) 。各々が別個の 1 1 0 k D a の触媒サブユニット及び調節サブユニットからなる四つの異なるクラス I P I 3 K アイソフォームが同定され、 P I 3 K ( アルファ ) 、 ( ベータ ) 、 (

10

20

30

40

50

デルタ)、及び (ガンマ)と命名された。触媒サブユニットのうちの三つ、即ち、p 1 1 0 アルファ、p 1 1 0 ベータ及び p 1 1 0 デルタは、各々が同じ調節サブユニット、p 8 5 と相互作用し、p 1 1 0 ガンマは別個の調節サブユニット、p 1 0 1 と相互作用する。ヒト細胞及び組織におけるこれら P I 3 K の各々の発現パターンは異なる。P I 3 K アルファ、ベータ、及びデルタアイソフォームサブタイプの各々において、p 8 5 サブユニットは、標的タンパク質内において、その S H 2 ドメインとリン酸化チロシン残基(適切な配列関係内に存在する)との相互作用により P I 3 キナーゼを原形質膜に局在化させるように作用する(Rameh et al (1995) Cell, 83:821-30; Volinia et al (1992) Oncogene, 7:789-93)。

#### 【 0 0 1 1 】

バイオマーカーのレベル(例えば、血漿中分泌タンパク質の発現レベル又は機能タンパク質レベル)を測定することは、例えば、化学療法剤による治療を含む特定の療法に应答する患者及び患者集団を同定するための有効な手段である。がんのような過剰増殖性疾患を有するどのような患者が、化学療法剤によるどのような治療に应答すると思われるかを決定するため、及び化学療法剤が単剤として使用されるか又は他の薬剤と組み合わせて使用されるかに関係なく、そのような決定を患者のためのさらに有効な治療レジメンに組み込むための、さらに有効な手段に対する需要が存在する。

#### 【 0 0 1 2 】

細胞の生存、成長、及び代謝の重要なメディエーターであるホスホイノシチド 3 - キナーゼ(P I 3 K)シグナル伝達カスケードは、ヒトのがんにおいてしばしば変性する。P I 3 K の - 触媒サブユニットをコードする遺伝子である P I K 3 C A における突然変異の活性化は、乳がんの約 3 0 % に起こる。このような突然変異は、酵素の恒常的活性をもたらし、がん遺伝子である。管腔乳房内皮における突然変異 P I K 3 C A H 1 0 4 7 R の発現は、管腔及び基底マーカーを発現し、エストロゲン受容体について陽性である異種腫瘍を引き起こす。P I K 3 C A H 1 0 4 7 R がん遺伝子は、多分化能前駆細胞を標的とし、P I K 3 C A H 1 0 4 7 R によりヒト乳房腫瘍の特徴を再現する(Meyer et al (2011). Cancer es; 71 (13):4344-51)。P I 3 K の過剰活性化は、P I 3 K の p 1 1 0 サブユニットをコードする遺伝子である P I K 3 C A における体細胞突然変異の結果として起こる。H E R 2 がん遺伝子は、すべての乳がんの 2 5 % において増幅され、これら腫瘍の一部は P I K 3 C A 突然変異も有している。P I 3 K は、形質転換を亢進し、H E R 2 指向療法への耐性を付与しうる。さらに H E R 2 を過剰発現する M C F 1 0 A ヒト乳房上皮細胞に導入された P I 3 K 突然変異 E 5 4 5 K 及び H 1 0 4 7 R は、M C F 1 0 A / H E R 2 細胞に機能の獲得をもたらした。E 5 4 5 K P I 3 K を発現しない H 1 0 4 7 R P I 3 K の発現は、H E R 3 / H E R 4 リガンドヘレグリン(H R G)を著しく上方制御した(Chakrabarty et al (2010) Oncogene 29 (37):5193-5203)。

#### 【 0 0 1 3 】

P I 3 キナーゼ/A k t / P T E N 経路は、がんの薬の開発にとって、このような薬剤には細胞増殖を阻害し、がん細胞の生存及び化学的抵抗を提供する間質細胞由来のシグナルを抑え、アポトーシスの抑制を逆転させ、且つ細胞傷害性剤に対するがん細胞の固有耐性に打ち勝つことが期待されるため、魅力的な標的である。特定のチエノピリミジン化合物は、p 1 1 0 アルファ結合、P I 3 キナーゼ阻害活性を有し、がん細胞の増殖を阻害する(Wallin et al (2011) Mol. Can. Ther. 10 (12):2426-2436; Sutherlin et al (2011) Jour. Med. Chem. 54:7579-7587; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 0 7 6 1 1 号; 米国特許第 7 8 4 6 9 2 9 号; 米国特許第 7 7 8 1 4 3 3 号; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 7 6 7 5 8 号; 米国特許第 7 8 8 8 3 5 2 号; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 6 9 2 1 0 号)。G D C - 0 9 4 1 (ピクチリシブ、C A S R e g . N o . 9 5 7 0 5 4 3 0 7、G e n e t e c h I n c .) は、有望な薬物動態学的及び製薬的特性を有する P I 3 K の、選択的で、経口投与される生体利用可能な阻害剤であり(Folkes et al (2008) Jour. of Med. Chem. 51 (18):5522-5532; 米国特許第 7 7 8 1 4 3 3 号; 米国特許第 8 3 2 4 2 0 6 号; Belvin et al, American Association for Cance

10

20

30

40

50

r Research Annual Meeting 2008, 99th:April 15, Abstract 4004; Folkes et al, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99th:April 14, Abstract LB-146; Friedman et al, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99th:April 14, Abstract LB-110; Wallin et al (2012) Clin. Cancer Res. 18:3901-3911; Yuan et al (2013) Oncogene 32:318-326; O'Brien et al (2010) Clin Cancer Res. 16:3670-3683; Salphati et al (2010) Drug Metab. and Disp. 38(9):1436-1442; Edgar et al (2010) Cancer Res. 70:1164-1172)、固体腫瘍細胞株に対して特定の化学療法剤との組み合わせにおいて *in vitro* 及び *in vivo* で相乗的活性を示す(米国特許第 8 2 4 7 3 9 7 号; 米国特許第 8 6 0 4 0 1 4 号; 米国特許第 8 5 3 6 1 6 1 号)。

10

## 【 0 0 1 4 】

T a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2、Genentech Inc., Roche RG 7 6 0 4、CAS Reg. No. 1 2 8 2 5 1 2 - 4 8 - 4 ) は、2 - ( 4 - ( 2 - ( 1 - イソプロピル - 3 - メチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) - 5 , 6 - ジヒドロベンゾ [ f ] イミダゾ [ 1 , 2 - d ] [ 1 , 4 ] オキサゼピン - 9 - イル ) - 1 H - ピラゾール - 1 - イル ) - 2 - メチルプロパンアミドと命名され、選択的且つ強力な、経口投与により生体利用可能な P I 3 K アルファ ( ) の阻害剤であり、K i = 0 . 2 n M であり、且つ P I 3 K ベータ ( ) に対するその阻害活性は低い (Ndubaku et al (2013) Jour. Med. Chem. 56 ( 11 ) :4597-4610; Staben et al (2013) Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 2606-2613; 国際公開第 2 0 1 1 / 0 3 6 2 8 0 号; 米国特許第 8 2 4 2 1 0 4 号; 米国特許第 8 3 4 3 9 5 5 号; 米国特許第 8 5 8 6 5 7 4 号; 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 0 6 号)。T a s e l i s i b は、局所的に進行した固形腫瘍又は転移性固形腫瘍を有する患者において研究されている。この選択的プロファイルと、優良な薬物動態学的及び製薬的特性は、P I K 3 C A 突然変異異種移植片において、p a n クラス I P I 3 K 阻害剤、G D C - 0 9 4 1 ( G e n e n t e c h I n c .、ピクチリシブ) と比較して、最大耐量で *in vivo* での有効性を高めることを可能にした。ホスホイノシチド - 3 キナーゼアルファアイソフォーム ( P I K 3 C A ) の突然変異は、乳がんによく、P I 3 K シグナル伝達経路を活性化した (Kang et al (2005) Cell Cycle 4 ( 4 ) :578-581)。突然変異は、p 8 5 サブユニットとの阻害性相互作用を弱めることによりヘリックス突然変異が活性化する脂質結合を増大させる (Zhao and Vogt (2008) Oncogene 27 ( 41 ) :5486-5496)。キナーゼドメイン突然変異は、タンパク質立体配座を変化させることにより活性化する (Burke et al (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. 109 ( 38 ) ,15259-15264)。明らかに、G D C - 0 0 3 2 は、野生型 P I 3 K を有する細胞と比較して、P I K 3 C A 突然変異細胞を優先的に阻害する。G D C - 0 0 3 2 は、P I 3 K の下流でシグナル伝達を強力に阻害し、乳がん細胞株及び P I K 3 C A 突然変異を有する異種移植モデルに低濃度でアポトーシスを誘導する。G D C - 0 0 3 2 の突然変異バイアスは、突然変異アイソフォームに対する細胞力価及び受容体チロシンキナーゼ ( R T K ) シグナル伝達の減少を含む G D C - 0 0 3 2 に固有の特性とリンクしている。

20

30

## 【 0 0 1 5 】

T a s e l i s i b は、クラス I の P I 3 K 、 - 、及び - アイソフォームの強力な選択的阻害剤であり、野生型 P I 3 K よりも突然変異 P I 3 K アイソフォームに対して高い選択性を呈する (Olivero A, et al. American Association for Cancer Research annual meeting, Washington, DC, USA, April 6-10, 2013; Wallin J, et al. 36th San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, TX, USA, December 10-14, 2013)。P I K 3 C A 突然変異乳がん ( B C ) モデルでは、t a s e l i s i b は、E R アンタゴニストフルベストラントを含む標準治療法の有効性を強化した (Sampath D, et al, 36th San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS), San Antonio, TX, USA, Dec. 10-14, 2013)。P I K 3 C A 突然変異は、乳がん ( B C ) に最も多いゲノム異常であり、エストロゲン受容体 ( E R ) 陽性、H E R 2 陰性乳房腫瘍の約 4 0 % に存在している。P I K 3 C A の突然変異は、腫瘍の成長及び増殖を促進し、B C の内分泌療法に対する

40

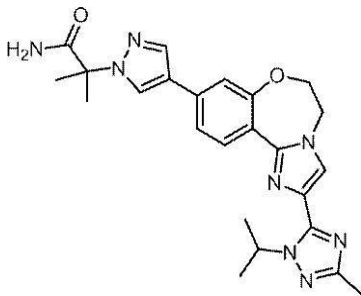
50

耐性を媒介する。T a s e l i s i b は、野生型 P I 3 K (アルファ)より突然変異 P I 3 K に対して大きな選択性を呈する。T a s e l i s i b は、P I K 3 C A 突然変異乳がん細胞株に対抗する活性を強化するもので、臨床データには、単剤としての又はフルベストラントとの組み合わせでの t a s e l i s i b で治療した P I K 3 C A 突然変異 B C 患者に部分寛解が確認されたことが含まれている。

【発明の概要】

【0016】

T a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2、G e n e n t e c h I n c . , R o c h e R G 7 6 0 4、C A S R e g . N o . 1 2 8 2 5 1 2 - 4 8 - 4 ) は、2 - ( 4 - ( 2 - ( 1 - イソプロピル - 3 - メチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) - 5 , 6 - ジヒドロベンゾ [ f ] イミダゾ [ 1 , 2 - d ] [ 1 , 4 ] オキサゼピン - 9 - イル ) - 1 H - ピラゾール - 1 - イル ) - 2 - メチルプロパンアミド)と命名されて、突然変異 p 1 1 0 アルファタンパク質の分解を誘導する。P I 3 K 阻害剤の p 1 1 0 分解能は、臨床応答と相関している。p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇は、t a s e l i s i b による治療に応答する患者を同定しうる。



G D C - 0 0 3 2 ( t a s e l i s i b )

【0017】

T a s e l i s i b は、用量、時間、ユビキチン及びプロテアソーム依存性に、突然変異 p 1 1 0 アルファサブユニットの分解を特異的に促進する。これまでに試験されたすべての p 1 1 0 突然変異について観察されたこのような効果は、p 1 1 0 - p 8 5 相互作用の不安定化により媒介されていると思われる。

【0018】

野生型 P I 3 K タンパク質には起こらない突然変異 P I 3 K タンパク質の分解は、R T K 駆動 P I 3 K 経路の再活性化を防げると思われ、P I 3 K 阻害剤の使用の治療濃度域を広げることができると考えられる。

【0019】

本発明の一態様は、t a s e l i s i b による治療のための患者を選択する方法であり、この方法は：

( a ) t a s e l i s i b を用いた患者から得られた生物学的試料を処理すること；及び

( b ) p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇を検出すること；  
を含み、生物学的試料における p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇が、t a s e l i s i b による治療に  
40 応答するであろう患者を同定する。p 1 1 0 アルファタンパク質の枯渇は、化合物に対する患者の  
治療的応答性を示し、抗 p 1 1 0 アルファ抗体への結合により測定されうる。試料中の p 1 1 0  
アルファタンパク質に対する抗 p 1 1 0 アルファ抗体の結合は、ウェスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着法 ( E L I S A )、ラジオイムノアッセイ ( R I A )、免疫組織化学 ( I H C )、蛍光活性化セルソーティング ( F A C S )、又は逆相タンパク質アレイにより決定される。

【0020】

本発明の一態様は：

( a ) 患者から得られた生物学的試料を、H 1 0 4 7 R、C 4 2 0 R、H 1 0 4 7 L、E 5 4 2 K、E 5 4 5 K 及び Q 5 4 6 R から選択される突然変異を含む P I K 3 C A 突然

10

20

30

40

50

変異状態について試験すること；

(b) P I K 3 C A 突然変異を有する患者由来の生物学的試料を t a s e l i s i b と接触させ、p 1 1 0 アルファアイソフォームの枯渇を検出すること；及び

(c) t a s e l i s i b を、P I K 3 C A 突然変異を有する患者に投与することを含む、患者の治療法である。生物学的試料は循環性腫瘍細胞でもよい。t a s e l i s i b と組み合わせて、患者には、5 - F U、ドセタキセル、エリブリン、ゲムシタピン、G D C - 0 9 7 3、G D C - 0 6 2 3、パクリタキセル、タモキシフェン、フルベストラント、デキサメタゾン、ペルツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、トラスツズマブ及びレトロゾールから選択される化学療法剤が投与されうる。患者は、H E R 2 発現乳がん又はエストロゲン受容体陽性 ( E R + ) 乳がん罹患している場合もある。がんは転移性でありうる。T a s e l i s i b は、アジュバント設定において患者に投与されてよい。

10

【 0 0 2 1 】

本発明の一態様は、t a s e l i s i b による治療のための、P I K 3 C A 突然変異を有する患者を選択する方法であり、この方法は：

(a) 患者から得られた生物学的試料中の P I K 3 C A 突然変異を検出すること；

(b) t a s e l i s i b の投与に先立って患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと、t a s e l i s i b の投与後に患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルとを比較すること

を含み、t a s e l i s i b の投与後に患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルの枯渇が、t a s e l i s i b による治療に応答するであろう患者を同定する。

20

【 0 0 2 2 】

本発明の一態様は：

(a) t a s e l i s i b の投与に先立ってがん患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと、t a s e l i s i b の投与後に患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルとを比較すること、及び

(b) 患者に投与される t a s e l i s i b 療法の投薬量、投与頻度、又は過程を変更すること

を含む、がんの治療方法である。

【 0 0 2 3 】

本発明の一態様は、がん患者における治療有効性の監視方法であり、この方法は：

(a) 患者に t a s e l i s i b を投与すること；

(b) t a s e l i s i b の投与後に患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファを測定すること；及び

(c) 患者に投与される t a s e l i s i b 療法の投薬量、投与頻度、又は過程を変更すること

を含む。

【 0 0 2 4 】

本発明の一態様は、がんを有すると診断された患者のための治療レジメンを選択する方法であり、この方法は、患者のがん細胞を有効量の t a s e l i s i b と接触させること、及び t a s e l i s i b に応答した p 1 1 0 アルファのレベルを検出することを含み、p 1 1 0 アルファの枯渇の検出が、がんが t a s e l i s i b による治療に感受性であることを示し、治療レジメンは、がんが t a s e l i s i b による治療に感受性であると決定された場合に患者に t a s e l i s i b を投与することを含む。

40

【 0 0 2 5 】

がん細胞は、P I K 3 C A の突然変異がん細胞でありうる。

【 0 0 2 6 】

本発明の一態様は：

a) 患者に t a s e l i s i b を投与すること；

b) 患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベル又は p 1 1 0 アルフ

50



アのレベルと相関するバイオマーカーにおける変化を測定すること；及び

c) 患者から得られた生物学的試料中に p 1 1 0 アルファの枯渇を示す患者に投与される t a s e l i s i b 療法の治療量、投与頻度、又は過程を選択することを含む、がんの治療方法である。p 1 1 0 アルファのレベルの変化は p 1 1 0 アルファのレベルの枯渇とすることができる。

【 0 0 2 7 】

本発明の一態様は、がんの治療において t a s e l i s i b に対する応答性を監視するためのバイオマーカーを同定する方法であり、この方法は：

( a ) 少なくとも一用量の t a s e l i s i b を投与された患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと相関するバイオマーカーの発現、変調、又は活性を検出すること；及び

( b ) バイオマーカーの発現、変調、又は活性を、 t a s e l i s i b の投与に先立って患者から得られた生物学的試料である基準試料中のバイオマーカーの状態と比較すること；

を含み、基準試料と比較して、バイオマーカーの変化が少なくとも2分の1への低下又は少なくとも2倍への増加に相当する変調が、 t a s e l i s i b に対する応答性を監視するために有用なバイオマーカーとして同定される。がんは H E R 2 発現乳がんでありうる。

【 0 0 2 8 】

本発明の一態様は、患者に治療的有効量の t a s e l i s i b を投与することを含む、患者のがんの治療方法であり、治療は、患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと相関するバイオマーカーを検出することに基づいている。生物学的試料は、腫瘍生検試料又は循環性腫瘍細胞とすることができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 9 】

【 図 1 】 t a s e l i s i b による p 1 1 0 a タンパク質分解のウェスタンブロット分析が用量依存性であり、且つ P I 3 K a 突然変異細胞に特異的であることを示している。この作用機序により、 t a s e l i s i b は、そうでなければ抗腫瘍活性を弱めてしまう R T K によるフィードバックの影響を減少させることができる。

【 図 2 】 t a s e l i s i b 、 ピクチリシブ ( G D C - 0 9 4 1 、 G e n e n t e c h ) 、及びアルペリシブ ( B Y L 7 1 9 、 N o v a r t i s C A S # : 1 2 1 7 4 8 6 ( - 6 1 - 7 ) で 2 4 時間処理した H C C 1 9 5 4 細胞 ( P I K 3 C A H 1 0 4 7 R ) のウェスタンブロット分析を示している。臨床開発中の他の経口 P I 3 K 阻害剤であるピクチリシブ及びアルペリシブは、突然変異 p 1 1 0 a タンパク質を分解しない。

【 図 3 】 t a s e l i s i b で処理した P I K 3 C A 野生型 H D Q P 1 乳がん細胞及び突然変異 H C C 1 9 5 4 ( P I K 3 C A H 1 0 4 7 R ) 乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。 t a s e l i s i b は、 p 8 5 のレベルに影響を及ぼすことなく P I K 3 C A の突然変異細胞株中の p 1 1 0 a を枯渇させる。

【 図 4 】 様々な濃度、即ち 0 . 2 μ M 、 1 μ M 、 5 μ M の t a s e l i s i b とコントロール ( D M S O ピヒクル ) とを用いた、 S W 4 8 親 P I K 3 C A 野生型、突然変異同質遺伝子的 S W 4 8 E 5 4 5 K ヘテロ接合体 ( h e t ) 、及び P I K 3 C A の突然変異同質遺伝子的 S W 4 8 H 1 0 4 7 R ヘテロ接合体細胞を含む S W 4 8 同質遺伝子株のウェスタンブロット分析を示している。

【 図 5 A 】 1 8 S コントロールに対する相対的 p 1 1 0 アルファ m R N A 発現レベルにより測定した細胞内 p 1 1 0 アルファ m R N A 発現のグラフである。薬物は、 p 1 1 0 a の m R N A 発現を変化させない。

【 図 5 B 】 C R I S P R ( クラスター化された規則的に間隔を空けた短いパンドローム反復 ) 生成 S W 4 8 E 5 4 5 K ヘミ接合体 ( 重複する二つのクローン ) のウェスタンブロット分析を示している。このウェスタンブロットは、 S W 4 8 E 5 4 5 K ヘテロ接合体と比較して有意に低下した突然変異 p 1 1 0 a のレベルを示し、このことは、突然変異 p 1 1

10

20

30

40

50

0 aの安定性がWT p 1 1 0 aより低いことを示唆している。レーンは、左から右へ、SW 4 8 E 5 4 5 Kヘミ接合クローン1、SW 4 8 E 5 4 5 Kヘミ接合クローン2、SW 4 8 親、SW 4 8 E 5 4 5 Kヘテロ接合、SW 4 8 E 5 4 5 Kヘテロ接合である。

【図6】1  $\mu$ M及び5  $\mu$ Mのt a s e l i s i bとコントロール(DMSOビヒクル)で処理したPIK3CAの突然変異HCC 1 9 5 4 (PIK3CA H 1 0 4 7 R)乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。P 1 1 0アルファ(p 1 1 0 a)は、時間依存性に枯渇する。

【図7A】t a s e l i s i b (GDC 0 0 3 2)で処理したHCC 1 9 5 4野生型(左)及びH 1 0 4 7 R突然変異(右)の、1 8 Sコントロールに対するp 1 1 0アルファ細胞の相対的RNAレベルの測定におけるリアルタイムQPCRの結果を示している。

10

【図7B】t a s e l i s i b (GDC 0 0 3 2)で処理したHCC 1 9 5 4 p 1 1 0アルファ野生型(左)及びp 1 1 0アルファH 1 0 4 7 R突然変異(右)p 1 1 0アルファ細胞の、RPL 1 9コントロールに対するp 1 1 0 a mRNA発現の測定における、リアルタイムQPCRの結果を示す。

【図7C】アルペリシブ(BYL - 7 1 9)で処理したHCC 1 9 5 4 p 1 1 0アルファ野生型(左)及びp 1 1 0アルファH 1 0 4 7 R突然変異(右)p 1 1 0アルファ細胞のRPL 1 9コントロールに対するp 1 1 0 a mRNA発現の測定における、リアルタイムQPCRの結果を示している。

【図8A】図示の時間にわたって1.6  $\mu$ Mのt a s e l i s i bで処理した突然変異HCC 1 9 5 4 (PIK3CA H 1 0 4 7 R)乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10  $\mu$ MのMG 1 3 2を加えた(右レーン)。

20

【図8B】図示の時間にわたって1.6  $\mu$ Mのt a s e l i s i bで処理した突然変異HCC 1 9 5 4 (PIK3CA H 1 0 4 7 R)乳がん細胞の溶解物のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10  $\mu$ MのMG 1 3 2(中央レーン)及び10  $\mu$ MのUAE 1阻害剤を加えた。

【図8C】図示の時間にわたって1.6  $\mu$ Mのt a s e l i s i bで処理した突然変異HCC 1 9 5 4 (PIK3CA H 1 0 4 7 R)乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10  $\mu$ MのMG 1 3 2を加えた(右レーン)。

【図8D】図示の時間にわたって1.6  $\mu$ Mのt a s e l i s i bで処理した突然変異HCC 1 9 5 4 (PIK3CA H 1 0 4 7 R)乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10  $\mu$ MのMG 1 3 2を加えた(右レーン)。

30

【図8E】図示の時間にわたって1.6  $\mu$ Mのt a s e l i s i bで処理した突然変異HCC 1 9 5 4 (PIK3CA H 1 0 4 7 R)乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10  $\mu$ MのMG 1 3 2、クロロキン、又は塩化アンモニウム(右レーン)を加えた。

【図8F】動物細胞が経路特異的阻害剤によりタンパク質を分解する際の二つの異なる機序を説明する、p 1 1 0をユビキチン化するための経路図である。

【図9A】t a s e l i s i b及びアルペリシブ(BYL 7 1 9)で処理したPI3K野生型細胞及びBRAF突然変異SW 9 8 2細胞のウェスタンブロット分析を示している。T a s e l i s i bはp 1 1 0デルタを分解することも枯渇させることもない。

40

【図9B】G - 1 0 2(表1、米国特許第8 2 4 2 1 0 4号)及びGDC - 0 0 3 2(t a s e l i s i b)で処理したPI3K野生型細胞、B細胞リンパ腫SU - DHL - 1 0細胞のウェスタンブロット分析を示している。

【図10】様々な濃度、即ち100 nM、1  $\mu$ M、5  $\mu$ MのPI3K阻害剤とコントロール(DMSOビヒクル)によりPI3Kを阻害したPIK3CA野生型HDQP 1乳がん細胞の、1時間及び24時間経過時点でのウェスタンブロット分析を示している。

【図11A】様々な濃度、即ち3 nM、16 nM、60 nM、400 nM、2  $\mu$ MのG - 1 0 2(表1)とコントロール(DMSOビヒクル)によりPI3Kを阻害したMDA - MB 4 5 3(H 1 0 4 7 R)細胞の、1時間及び24時間経過時点でのウェスタンブロット分析を示している。

50

【図11B】様々な濃度、即ち3 nM、16 nM、60 nM、400 nM、2 μMの t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) とコントロール ( D M S O ビヒクル ) により P I 3 K を阻害した M D A - M B 4 5 3 ( H 1 0 4 7 R ) 細胞の、1時間及び24時間経過時点でのウェスタンブロット分析を示している。

【図12】様々な濃度、即ち1 nM、10 nM、100 nMの t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) 及び G - 1 0 2 ( 表 1 ) とコントロール ( D M S O ビヒクル ) により P I 3 K を阻害した S W 4 8 H 1 0 4 7 R 細胞の、1時間及び24時間経過時点でのウェスタンブロット分析を示している。

【図13】様々な濃度、即ち1 nM、10 nM、100 nMの t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) 及び G - 1 0 2 ( 米国特許第 8 2 4 2 1 0 4 号 ) とコントロール ( D M S O ビヒクル ) による P I 3 K 阻害で処理した、増殖因子リガンド N R G を含む及び含まない、 S W 4 8 P I K 3 C A H 1 0 4 7 R 細胞のウェスタンブロット分析を示している。

10

【図14A】親/突然変異選択性の E C 5 0 値を確立するために、様々な濃度の G - 1 8 1 での24時間経過時の、同質遺伝子的突然変異 ( E 5 4 5 K 、 H 1 0 4 7 R ) における p P R A S 4 0 の i n v i t r o での細胞増殖を野生型親 P I 3 K 細胞との対比で示している。

【図14B】親/突然変異選択性の E C 5 0 値を確立するために、様々な濃度の G D C - 0 0 3 2 での24時間経過時の、同質遺伝子的突然変異 ( E 5 4 5 K 、 H 1 0 4 7 R ) における p P R A S 4 0 の i n v i t r o での細胞増殖を野生型親 P I 3 K 細胞との対比で示している。

20

【図14C】親/突然変異選択性の E C 5 0 値を確立するために、様々な濃度の G - 1 0 2 での24時間経過時の、同質遺伝子的突然変異 ( E 5 4 5 K 、 H 1 0 4 7 R ) における p P R A S 4 0 の i n v i t r o での細胞増殖を野生型親 P I 3 K 細胞との対比で示している。

【図15】 S W 4 8 同質遺伝子的野生型及び突然変異 ( E 5 4 5 K 、 H 1 0 4 7 R ) 細胞株と、 t a s e l i s i b 及び p a n - P I 3 K 阻害剤であるピクチリシブ ( G D C - 0 9 4 1 ) の用量滴定による処理とに関する i n v i t r o での細胞増殖データを示すグラフである。

【図16】 P I K 3 C A の突然変異細胞株に対する4日間の細胞増殖 ( C e l l - T i t e r G l o R 、 P r o m e g a ) アッセイにおけるピクチリシブ ( G D C - 0 9 4 1 ) 、 B K M 1 2 0 ( プパリシブ、 N o v a r t i s A G 、 C A S R e g . N o . 9 4 4 3 9 6 - 0 7 - 0 ) 、 t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) 及び B Y L 7 1 9 ( アルペリシブ、 N o v a r t i s C A S # : 1 2 1 7 4 8 6 - 6 1 - 7 ) の有効性 ( I C 5 0 マイクロモル ) を示すグラフである。各点は異なるがん細胞株を表す。

30

【図17】細胞死 - N u c l e o s o m e E L I S A 検出による72時間の試験における、 P I K 3 C A 野生型細胞株及び突然変異 ( E 5 4 5 K 、 H 1 0 4 7 R ) 細胞株と、 t a s e l i s i b 、 及び P I 3 K アルファの選択的阻害剤である G D C - 0 3 2 6 ( 米国特許第 8 2 4 2 1 0 4 号 ) 、 及び B Y L 7 1 9 の用量滴定による処理とに関する i n v i t r o での細胞増殖データを示すグラフである。

40

【図18A】ビヒクル ( M C T ; 0 . 5 % のメチルセルロース / 0 . 2 % の T w e e n 8 0 ) 、 1 5 0 m g / k g のピクチリシブ ( G D C - 0 9 4 1 ) 、 及び 2 5 m g / k g の t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) を、一日一回100マイクロリットル ( u l ) で P O ( 経口 ) を投与された、 P I K 3 C A H 1 0 4 7 R ( P I 3 K a ) に突然変異を有する H C C 1 9 5 4 . x 1 乳房腫瘍異種移植片保有の 8 ~ 1 0 匹の免疫不全マウスのコホートにおける、21日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。用語 u l はマイクロリットルを意味する。

【図18B】ビヒクル ( M C T ; 0 . 5 % のメチルセルロース / 0 . 2 % の T w e e n 8 0 ) 、 4 0 m g / k g のアルペリシブ ( B Y L - 7 1 9 ) 、 及び 1 5 m g / k g の t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) を、一日一回100マイクロリットル ( u l ) で P

50

O (経口)投与された、PIK3CA H1047R (PI3K)に突然変異を有するHCC1954、x1乳房腫瘍異種移植片保有の8~10匹の免疫不全マウスのコホートにおける、21日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。

【図18C】ビヒクル(MCT; 0.5%のメチルセルロース/0.2%のTween 80)、及び15mg/kgのtaselisib(GDC-0032)を、一日一回100マイクロリットル(ul)でPO(経口)投与された、PIK3CA E542K (PI3K)に突然変異を有するWHIM20ホルモン受容体陽性患者由来の乳房腫瘍異種移植片保有の8~10匹の免疫不全マウスのコホートにおける、28日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。

【図18D】ビヒクル(MCT; 0.5%のメチルセルロース/0.2%のTween 80)、40mg/kgのアルペリシブ(BYL-719)、及び2.5、5.0、15mg/kgのtaselisib(GDC-0032)を、一日一回100マイクロリットル(ul)でPO(経口)投与された、PIK3CA H1047R (PI3K)に突然変異を有するHCC-003ホルモン受容体陽性患者由来の乳房腫瘍異種移植片保有の8~10匹の免疫不全マウスのコホートにおける、27日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。

【図19】様々な濃度、即ち16nM、80nM、400nMのtaselisibとコントロール(DMSOビヒクル)で処理した突然変異HCC1954(PIK3CA H1047R)乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。

【図20】H0147R突然変異p110アルファPI3Kアイソフォームのキナーゼドメインの立体配座のモデルを示している。

【図21】PIK3CAの突然変異を有する細胞株パネルに対する四日間の生存率アッセイにおけるGDC-0032力価(IC50)を示すグラフである。データは、PIK3CA内の突然変異の位置に従って示されている。

【図22】p110a及びp110aに並行なレベルを用いたp85免疫共沈降法(Co-IP)のウェスタンブロット(WB)分析を示しており、これは、安定なp110aがp85との複合体であり、有意な用量依存性のp110a分解がtaselisibによって誘導されることを示唆している。

【図23】定常状態のp110a mRNA発現を示している。

【図24A】実施例7による野生型PIK3CA HCC-1954(上)及びPIK3CA HCC-1954を発現するH1047R突然変異(下)のトリプシン切断を示している。

【図24B】実施例7による、消化後の野生型PIK3CA HCC-1954(左)及びPIK3CA HCC-1954を発現するH1047R突然変異(右)に対する液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)の分析と、p110アルファ(PIK3CA)タンパク質免疫沈降法とを示している。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明の特定の実施態様に関する言及がここで詳細になされる。その実施態様の例は、付随する構造及び式において示される。本発明は、多数の実施態様と組み合わせて記載されるが、本発明をそれらの実施態様に限定することは意図されない。むしろ、本発明は、すべての代替例、変形例、等価物を網羅することが意図され、これらは特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に包含されうる。当業者は、本明細書に記載の方法及び材料と類似もしくは等価である多くの方法及び材料を認識するであろうし、それらは本発明の実施に使用可能であろう。本発明は、記載されている方法及び材料に決して限定されない。一又は複数の引用文献、特許及び類似材料が、限定されないが、本願の用語の定義、用法、説明されている技術などと相違又は矛盾する場合、本願が優先される。

【0031】

定義

用語「含む(comprise、include)」は、本明細書及び特許請求の範囲

10

20

30

40

50

で使用する場合、記載される特徴、完全体、成分、又は工程の存在を特定することを意図してあるのであって、一つ以上の他の特徴、完全体、成分、工程若しくはそれらの群の存在又は付加を排除するものではない。

【0032】

用語「治療」及び「処置」は、治療的処置及び予防的処置の両方を含み、その目的は、がんの増殖、発生又は転移などの望ましくない生理学的変化又は障害を予防する、又は遅延させる（軽減する）ことである。本発明の目的のために、有益な又は所望の臨床結果は、限定しないが、症候の緩和、疾患の範囲の縮小、疾患の状態の安定（即ち、悪化以外）、疾患進行の遅延又は速度低下、病態の改善又は緩和、及び寛解（部分的又は完全な）を含み、検出可能であるか否かを問わない。「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較した、生存期間の延長を意味することができる。治療を必要とする者には、既にその状態若しくは障害を有している者、並びに、その状態若しくは障害を有し易い者、又はその状態若しくは障害を予防すべき者が含まれる。

10

【0033】

「治療的に有効な量（治療的有效量）」という表現は、本明細書に記載の（i）特定の疾患、状態、又は障害を治療する、（ii）特定の疾患、状態、又は障害の一又は複数の症候を軽減、改善又は排除する、又は（iii）特定の疾患、状態、又は障害の一又は複数の症候の開始を防止する又は遅らせる、本発明の化合物の量を意味する。がんの場合、治療的有效量の薬物は、がん細胞数を減少させ；腫瘍の大きさを縮小させ；末梢器官へのがん細胞浸潤を阻害し（即ち、ある程度遅らせ、好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害し（即ち、ある程度遅らせ、好ましくは停止させる）；腫瘍増殖をある程度阻害し；及び/又はがんに関連する一又は複数の症候をある程度緩和することができる。薬剤は、既存のがん細胞の増殖を防ぎ、及び/又は既存のがん細胞を死滅させうる範囲で、細胞増殖抑制性及び/又は細胞毒性でありうる。がん治療については、例えば、無増悪期間（TTP）を評価すること及び/又は奏効率（RR）を決定することによって効果を測定することができる。

20

【0034】

用語「生物学的試料」は、動物又はヒトから採取された組織、細胞及び体液のすべての試料を含む。

【0035】

医薬及び類似のものによる治療に対する患者の「有効な応答」又は患者の「応答性」という表現は、がんなどの疾患又は障害の危険を有する又はそのような疾患又は障害に罹患している患者にもたらされる臨床的又は治療的恩恵を指す。一実施態様では、このような恩恵は、生存期間の延長（全生存及び無増悪生存期間を含む）、客観的応答結果（完全寛解又は部分寛解を含む）、又はがんの徴候若しくは症候の改善のうちのいずれか一つ又は複数を含む。一実施態様では、バイオマーカー（例として、例えばIHCを用いて決定された突然変異p110アルファ）を用いて、バイオマーカーを発現しない患者と比較して、薬物、例えばtaselisib（GDC-0032）による治療への応答可能性の上昇が予測される患者が同定される。一実施態様では、IHCを用いて決定されるバイオマーカーを用いて、同じレベルのバイオマーカーを発現しない患者と比較して、薬物による治療への応答可能性の上昇が予測される患者が同定される。一実施態様では、バイオマーカーの存在を用いて、バイオマーカーの存在を有さない患者と比較して、薬物による治療への応答可能性の高い患者が同定される。別の実施態様では、バイオマーカーの存在を用いて、バイオマーカーの存在を有さない患者と比較して、薬物による治療の恩恵の可能性が大きいであろう患者が決定される。

30

40

【0036】

がん（例えば乳房又はNSCLC）患者の臨床的恩恵の増大に関連してバイオマーカーの「量」又は「レベル」という場合、バイオマーカーのレベルが患者の臨床的恩恵の増大に関連付けられている生物学的試料中の検出可能なレベルに言及している。これらは、当業者に既知の、発明によっても開示される方法により測定することができる。評価される

50

バイオマーカーの発現レベル又は量は、治療に対する応答を決定するために使用することができる。いくつかの実施態様では、バイオマーカーの量又はレベルは、IHC（例えば、生検又は血液由来の患者の腫瘍試料の）を用いて決定される。いくつかの実施態様では、がん患者の臨床的恩恵の増大に関連付けられるバイオマーカーの量又はレベルは、IHCスコア2、IHCスコア3、又はIHCスコア2若しくは3である。いくつかの実施態様では、がん患者の臨床的恩恵の増大に関連付けられるc-metバイオマーカーの量又はレベルは、中程度の染色強度、中程度の染色強度/高い染色強度の組み合わせ又は高い染色強度を有する腫瘍細胞の50%以上である。いくつかの実施態様では、がん患者の臨床的恩恵の増大に関連付けられるバイオマーカーの量又はレベルは、中程度又は高い染色強度を有する腫瘍細胞の50%以上である。

10

**【0037】**

用語「検出」は、直接的及び間接的な検出を含む検出する任意の手段を含む。

**【0038】**

用語「診断」は、本明細書では、分子又は病理学的状態、疾患又は病態の同定又は分類を意味するために用いられる。例えば、「診断」は、特定の種類のがん、例えば肺がんの同定を指す。「診断」は、例えば、組織学による（例えば、非小細胞肺癌）、分子の特徴による（例えば、特定の遺伝子又はタンパク質におけるヌクレオチド及び/又はアミノ酸の変異により特徴付けられる肺がん）、又はそれら両方による、特定の種類のがんの分類を指すこともある。

**【0039】**

20

本明細書において用語「予後」は、例えば、がんのような腫瘍性疾患の再発、転移性の広がり、及び薬物耐性を含む、がん起因する死又は進行の可能性の予測を指すために用いられる。

**【0040】**

本明細書において用語「予測」（及び予測するなどの変形）は、一つの薬物又は薬物の組に対して患者が好ましい応答又は好ましくない応答を有する可能性を指すために用いられる。一実施態様において、予測はこうした応答の程度に関する。別の実施態様では、予測は、患者が、以下の治療、例えば特定の治療剤及び/又は原発腫瘍の外科的除去、及び/又は化学療法の後で、がんの再発なしに生存するかどうか、及び/又は生存する可能性に関する。本発明の予測方法は、任意の特定の患者のために最も適切な治療法を選択することによって治療決定を行うために臨床的に使用されうる。本発明の予測方法は、患者が、例えば所定の治療剤の投与又は併用、外科手術、化学療法などを含む所定の治療法、例えば所与の治療レジメンに対して好ましい応答をしそうかどうか、又は治療レジメンの後に患者の長期生存がありそうかどうかを予測する上で貴重なツールである。

30

**【0041】**

特定の治療剤又は治療選択に対する「耐性の上昇」という用語は、本発明に従って用いられるとき、標準用量の薬物、又は標準的な治療プロトコールに対する応答の減少を意味する。

**【0042】**

特定の治療剤又は治療選択に対する「感受性の低下」という用語は、本発明に従って用いられるとき、標準用量の薬物、又は標準的な治療プロトコールに対する応答の減少を意味し、応答の減少は、薬剤の用量、又は治療の強度を増加させることにより（少なくとも部分的に）補償することができる。

40

**【0043】**

「患者の応答」は、限定されないが、（1）腫瘍成長の、減速及び完全な成長停止を含む、ある程度の阻害；（2）腫瘍細胞の数の減少；（3）腫瘍サイズの縮小；（4）腫瘍細胞の近隣末梢器官及び/又は組織への浸潤の阻害（例えば、低減、減速又は完全停止）；（5）転移の阻害（例えば、低減、減速又は完全停止）；（6）必須ではないが腫瘍の退縮や拒絶をもたらす抗腫瘍免疫応答の亢進；（7）腫瘍に関連付けられる一又は複数の症候のある程度の軽減；（8）治療後の生存期間の延長；及び/又は（9）治療後の

50

所定の時点での死亡率低下を含む、患者の恩恵を示す任意のエンドポイントを用いて評価することができる。

【 0 0 4 4 】

「バイオマーカー」は、客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、又は治療的介入に対する薬理的応答の指標として評価される。バイオマーカーには、予測、予後、又は薬力学（PD）という複数の種類がある。予測バイオマーカーは、特定の療法に反応する又は特定の療法の恩恵を受けると思われる患者を予測する。予後バイオマーカーは、患者の疾患に予想される過程を予測し、治療のガイドとなりうる。薬力学バイオマーカーは、薬物活性を確認し、用量及び投与スケジュールを最適化することができる。

10

【 0 0 4 5 】

*in vitro*又は*in vivo*で発生するPIK3CA突然変異又はPIK3CA突然変異の組を含むバイオマーカーの状態の「変化」又は「変調」は、薬力学（PD）を確立するうえで一般に採用される一又は複数の方法を用いる生物学的試料の分析により検出され、そのような方法には：（1）生物学的試料のゲノムDNA又は逆転写PCR産物を配列決定し、それにより一又は複数の突然変異を検出すること；（2）メッセージレベルの定量化又はコピー数の評価により遺伝子発現レベルを評価すること；及び（3）免疫組織化学、免疫細胞化学、ELISA、又は質量分析によるタンパク質の分析により、リン酸化又はユビキチン化といったタンパク質の分解、安定化、又は翻訳後修飾を検出することが含まれる。

20

【 0 0 4 6 】

用語「がん」及び「がん性」とは、無秩序な細胞増殖によって典型的に特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態を指す。「腫瘍」は、一又は複数のがん細胞を含む。がんの例は、限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病及びリンパ性腫瘍を含む。このようながんのより具体的な例には、扁平上皮細胞がん（例えば、上皮性扁平上皮細胞がん）、小細胞肺がんを含む肺がん、非小細胞肺がん（「NSCLC」）、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、腹膜のがん、肝細胞がん、消化管がんを含む胃（*gastric*又は*stomach*）がん、膵がん、神経膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳癌、大腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜又は子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓（*kidney*又は*renal*）がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝癌、肛門癌腫、陰茎癌、及び頭頸部がんが含まれる。本明細書で使用される胃（*gastric*）がんは、胃のあらゆる部位に発生しうる胃（*stomach*）がんを含み、これは胃全体及び他の器官、特に食道、肺、リンパ節及び肝臓に広がる可能性がある。

30

【 0 0 4 7 】

用語「造血器悪性腫瘍」は、白血球、リンパ球、ナチュラルキラー細胞、形質細胞、及び骨髄細胞、例えば好中球及び単球といった細胞に關与する、造血中に生じるがん又は過剰増殖性障害を指す。造血性悪性腫瘍には、非ホジキンリンパ腫、びまん性大造血性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、及び骨髄細胞白血病が含まれる。リンパ性白血病（又は「リンパ芽球性」）には、急性リンパ芽球性白血病（ALL）及び慢性リンパ球性白血病（CLL）が含まれる。骨髄性白血病（「骨髄」又は「非リンパ球性」とも）には、急性骨髄性（又は骨髄芽球性）白血病（AML）及び慢性骨髄性白血病（CML）が含まれる。

40

【 0 0 4 8 】

「化学療法剤」は、作用機序に関係なくがんの治療に有用な生物学的（大分子）又は化学的（小分子）化合物である。

【 0 0 4 9 】

用語「哺乳動物」には、限定されないが、ヒト、マウス、ラット、モルモット、サル、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、及びヒツジが含まれる。

【 0 0 5 0 】

50

「添付文書」という用語は、このような治療製品の使用に関する、指示、使用法、用量、投与、禁忌及び/又は注意事項についての情報を含む、治療製品の商品包装に通例含まれる説明書を指すために使用される。

【0051】

本明細書で使用される用語「薬学的に許容される塩」は、本発明の化合物の薬学的に許容される有機塩又は無機塩を指す。例示的な塩には、限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸フォスフェート、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、クエン酸、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酸性酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチアニン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカラート、ギ酸塩、ベンゾエート、グルタミン酸塩、スルホン酸塩「メシラート」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホナート、p-トルエンスルホナート、及びパモ酸塩（即ち、1, 1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸)）塩が含まれる。薬学的に許容される塩は、酢酸イオン、コハク酸イオン又は他の対イオンなどの別の分子の包含を伴ってもよい。対イオンは、親化合物の電荷を安定化する任意の有機又は無機部分でありうる。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造内に複数の荷電原子を有することができる。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である場合、複数の対イオンを有することができる。したがって、薬学的に許容される塩は、一又は複数の荷電原子及び/又は一又は複数の対イオンを有することができる。

【0052】

所望の薬学的に許容される塩は、当技術分野で利用可能な任意の適切な方法により調製することができる。例えば、遊離塩基の、無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、メタンスルホン酸、リン酸などによる処理、或いは有機酸、例えば酢酸、マレイン酸、コハク酸、マンデル酸、フマル酸、マロン酸、ビルビン酸、シュウ酸、グリコール酸、サリチル酸、ピラノシジル酸 (pyranosidyl acid)、例えば、グルクロン酸又はガラクトロン酸、アルファヒドロキシ酸、例えばクエン酸又は酒石酸、アミノ酸、例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸、芳香族酸、例えば、安息香酸又はケイ皮酸、スルホン酸、例えば、p-トルエンスルホン酸又はエタンスルホン酸などによる処理。塩基性薬学的化合物からの薬学的に有用な又は許容可能な塩の形成に適性と一般に考慮される酸は、例えば、P. Stahl et al, Camille G. (eds.) Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge et al, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66(1) 1 19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201 217; Anderson et al, The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, New York; Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton PA; and in The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D.C. on their website) によって議論されている。これら開示は、それらへの言及により本明細書に包含される。

【0053】

「薬学的に許容される」という表現は、物質又は組成物が、製剤を構成する他の配合成分と、及び/又はそれにより治療される哺乳動物と、化学的に及び/又は毒物学的に適合性でなければならないことを示す。

【0054】

本明細書で使用される用語「相乗的」は、二つ以上の単剤の加算的效果より有効性の高い治療的組み合わせを指す。突然変異選択的、PI3K結合化合物、又はその薬学的に許容される塩、及び一又は複数の化学療法剤間の相乗的相互作用の決定は、本明細書に記載されるアッセイから得られる結果に基づいてよい。これらアッセイの結果を、Chou及びTalalayの組み合わせ法と、CalcuSynソフトウェアによる用量-効果分析を用いて分析することにより、コンビネーションインデックスを得ることができる (Chou and Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22:27-55)。併用療法は、「相乗作用」を提供することができ、「相乗的」である、即ち活性成分を一緒に使用したときに達成

10

20

30

40

50



される効果が、化合物を別々に使用することにより得られる効果の和を上回ることが証明される。相乗効果は、活性成分が：(1) 共処方されて投与されるか又は組み合わせた単位投与製剤において同時に送達されるとき；(2) 別個の製剤として交互に又は並行して送達されるとき；又は(3) 他の何らかの投与計画によって、得られる可能性がある。交互療法で送達される場合、化合物が例えば別個の注射器での異なる注射によって又は別個の丸薬若しくは錠剤において順次的に投与又は送達されるときにも、相乗効果が得られる可能性がある。一般に、交互療法の間には、各活性成分の有効投薬量は順次的に、即ち連続して投与され、併用療法では、二以上の活性成分の有効投与量は一緒に投与される。また、組み合わせ効果が、B L I S S 独立モデルと最大単剤(H S A)モデル(Lehar et al. 2007, *Molecular Systems Biology* 3:80)を用いて評価されうる。

10

## 【0055】

「E L I S A」(酵素結合免疫吸着法)は、液体試料又は湿潤試料中の物質の存在を検出する異種固相酵素イムノアッセイ(E I A)の一つのサブタイプを使用する「ウェットラボ」型解析の生化学アッセイの一般的フォーマットである(Engvall E, Perlman P (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G". *Immunochemistry* 8 (9): 871-4; Van Weemen BK, Schuurs AH (1971). "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates". *FEBS Letters* 15 (3): 232-236)。E L I S Aは、この方法の一般的な使用及び開発の歴史により名称に元の「免疫」を含んでいるが、厳密に「免疫」のアッセイの代わりに他の形態のリガンド結合アッセイを実施することができる。この技術は本質的に、固体相に固定化することのできるいずれかの結紮試薬を、特異的に結合し、適切に定量化することの可能なシグナルを生成する酵素を使用する検出試薬と併せて必要とする。洗浄の間に、リガンドとその特異的結合対応物とは、特異的に結合したままであるか、又は抗原-抗体相互作用により固体相に「免疫吸着」されたままであるが、非特異的又は未結合成分は洗い流される。洗浄後に同じ反応ウェル(例えばキュベット)を再使用できる他の分光光度のウェットラボアッセイのフォーマットとは異なり、E L I S Aプレートは、プレートの一部である固体相に免疫吸着した反応生成物を有し、したがって容易に再使用されない。E L I S Aを実施することは、特定の抗原に対する特異性を有する少なくとも一の抗体を使用する。不明な量の抗原を有する試料は、非特異的に(表面への吸着により)又は特異的に(「サンドイッチ」E L I S Aにおいて同じ抗原に特異的な別の抗体による捕捉により)、固体支持体(通常はポリスチレンマイクロタイタープレート)に固定化される。抗原が固定化された後、検出抗体を加え、抗原との複合体を形成する。検出抗体は、酵素に共有結合的に結合することができるか、又はそれ自体が生体共役反応により酵素に結合する二次抗体により検出可能である。各工程の間に、プレートは通常弱い洗剤溶液で洗浄され、特異的に結合しないすべての抗体又はタンパク質は除去される。最終洗浄工程の後、酵素的基質を加え、試料中の抗原の量を示す可視シグナルを生成することにより、プレートを発色させる。

20

30

## 【0056】

「免疫組織化学」(I H C)は、生物学的組織中の抗原に特異的に結合する抗体の原理を利用することによる、組織切片の細胞中の抗原(例えば、タンパク質)検出の方法を指す。免疫組織化学的染色は、がん性腫瘍に見られるもののような異常細胞の診断に広く使用されている。特異的分子マーカーは、増殖又は細胞死(アポトーシス)といった特定の細胞事象の特徴である。また、I H Cは、バイオマーカーの分布及び局在化と、生物学的組織の異なる部分に差次的に発現するタンパク質を理解するために広く使用されている。抗体-抗原相互作用の可視化は、複数の方法で達成されうる。最も一般的には、抗体は、発色反応を触媒することのできる、ペルオキシダーゼなどの酵素にコンジュゲートする(免疫ペルオキシダーゼ染色参照)。或いは、抗体は、フルオレセイン又はローダミン(免疫蛍光参照)といったフルオロフォアにタグ付けすることもできる。

40

## 【0057】

「免疫細胞化学」(I C C)は、細胞中の特異的なペプチド又はタンパク質抗原を特異的エピトープを介して標的化する抗体を用いる一般的な試験室技術である。これら結合抗

50

体は、次いでいくつかの異なる方法を用いて検出することができる。I C C は、特定の試料中の細胞が問題の抗原を発現するか否かを評価することができる。免疫陽性のシグナルが見つかった場合、I C C は、いずれの細胞内区画が抗原を発現しているかも決定する。

【 0 0 5 8 】

「同質遺伝子的」細胞株及びヒト疾患モデルは、*in vitro* (人工的環境における「実験室内での」) で特定の患者集団の遺伝学的特質を正確にモデル化するために選択又は操作される細胞のファミリーである。それらは遺伝的にマッチした「正常細胞」を備え、疾患生物学及び新規治療剤を研究するための同質遺伝子的系を提供する (Bardelli A, et al (2003) Science 300 (5621): 949)。同質遺伝子的細胞株は、遺伝的基礎を有する任意の疾患をモデル化するために使用することができる。がんは、同質遺伝子的ヒト疾患モデルが広く使用されてきたそのような疾患の一つである。同質遺伝子的細胞株は、相対的遺伝子標的化と呼ばれる方法を介して生成される。相対的組み換えを利用する標的化ベクトルは、試験対象の突然変異又は S N P (一塩基多型) を生じさせる所望の疾患をノックイン又はノックアウトするために使用されるツール又は技術である。疾患突然変異はがん患者から直接回収することができるが、これら細胞は通常、対象の特異的突然変異に加えて多数のバックグラウンド突然変異を含んでおり、マッチした正常細胞株は典型的には取得されない。その後、標的化ベクトルは、特徴付けされたヒトがん細胞株において、正常からがん性への遺伝子型のスイッチ、又はその逆の両方向のスイッチを可能にする遺伝子突然変異を「ノックイン」又は「ノックアウト」するために使用される。

【 0 0 5 9 】

用語「アジュバント」及び「アジュバント設定」は、一次的治療、主要な治療、又は最初の治療に加えて行われるケア又は治療を指す。外科手術及び複合治療レジメンががん療法に用いられることにより、この用語は主にアジュバントがん治療を説明するために使用されるようになった。アジュバント療法の一例は通常、すべての検出可能な疾患が除去されたものの、潜在的疾患に起因する再発の統計的リスクが残っている、外科手術の後に実施される追加的治療である。既知の疾患が外科手術後に残る場合、さらなる治療は技術的にアジュバントではない。例えば、乳がんの外科手術後には、放射線療法又は全身療法がアジュバント療法として一般に行われる。全身療法は、化学療法、免疫療法若しくは生物学的応答修飾剤、又はホルモン療法からなる。がん専門医は、特定のアジュバント療法を決める前に、疾患再発の危険を評価するために統計的証拠を使用する。アジュバント療法の目的は、疾患に特異的な症候及び全生存を改善することである。治療は本質的に、証明可能な疾患ではなくリスクのためであるので、アジュバント療法を受ける患者の一部が一次的な外科手術により既に治癒済みであることも許容される。アジュバント全身療法と放射線療法は、多くの種類のがんについて外科手術後に行われることが多い。

【 0 0 6 0 】

用語「野生型 P I 3 K p 1 1 0 アルファアイソフォーム」は、突然変異が P I 3 K p 1 1 0 アルファ遺伝子に存在しないことを意味する。

【 0 0 6 1 】

用語「突然変異 P I 3 K p 1 1 0 アルファアイソフォーム」は、一又は複数の活性化突然変異が P I 3 K p 1 1 0 アルファの対立遺伝子内に存在することを意味する。

【 0 0 6 2 】

パラメーター「 $IC_{50}$ 」は、最大阻害濃度の半分を意味し、特定の生物学的又は生化学的機能を阻害するうえでの物質の有効性の物差しである。この定量的物差しは、どの程度の特定の薬物又は他の物質 (阻害剤) が、所与の生物学的過程 (又は過程の成分、即ち酵素、細胞、細胞受容体又は微生物) を半分だけ阻害するために必要かを示す。一般に、これは、薬理的研究においてアンタゴニスト薬の力価の物差しとして使用される。 $IC_{50}$  は、*in vitro* での 50% 阻害に必要な薬物の濃度を表し、アゴニスト薬の  $EC_{50}$  に相当する。 $EC_{50}$  は、*in vivo* で最大効果の 50% を得るために必要な血漿濃度も表す。パラメーター  $K_i$  は、 $IC_{50}$  と相関している (Cer RZ et al (2009) Nucl. Acids Res. 37:W441-W445)。 $K_i$  は阻害剤の結合親和性であり、 $IC_{50}$  は阻害

10

20

30

40

50

剤の機能的強度である。

【0063】

TASELISIBによるp110アルファの枯渇

taselisibによるp110アルファ(p110a)の分解は、用量依存性、時間依存性、プロテアソーム依存性、及びユビキチン依存性に起こる。taselisibによる分解は、PIK3CAの突然変異細胞中のp110aに特異的であり；p85、p110デルタアイソフォーム、又はp110aは野生型細胞において観察されない。フィードバックに直面した経路抑制の予期されていなかった驚くべき恩恵は、1及び24時間経過時のpAKT及びpPRAS40のレベルにより測定される。これらの相関的観察は、taselisibによる治療選択の治療濃度域を広げうる(治療指数の上昇)。

10

【0064】

taselisibによるp110aの分解は、taselisibの漸増用量の存在下において、p110のp85/ウェスタンプロットの免疫沈降法(IP)、又はその逆により試験することができる。無視できるp110の分解が治療2時間目に起こるため、これは、解釈を複雑にする有意なp110の分解なしでp110/p85の解離を評価し、それによりtaselisibによる治療に应答するであろうがん患者を予測する診断機会を提供する妥当な濃度域である。

【0065】

突然変異と野生型のp110アルファの分解の定量化は、突然変異及び野生型細胞株におけるtaselisibのオフレート、野生型及び突然変異タンパク質の半減期の確定、及びユビキチン化部位及び細胞機構の同定を含むプロテオミクス手法により実施される。このように、p110aの分解は、p110aの枯渇として測定されうる。

20

【0066】

Taselisibは、突然変異p110aタンパク質を特異的に分解するため、突然変異細胞において他のPI3K阻害剤より有効である。図1は、taselisibによるp110aタンパク質分解のウェスタンプロット分析が、用量依存性であり、PI3Ka突然変異細胞に特異的であることを示している。本発明はいずれか特定の作用機序によって限定されないが、活性に関するこの理論的根拠は、taselisibが、そうでなければ抗腫瘍活性を弱めてしまうRTKによるフィードバックの影響を縮小することを可能にする。図2は、taselisib、ピクチリシブ(GDC-0941、Genentech)、及びアルペリシブ(BYL719、Novartis CAS#:1217486-61-7)で24時間処理したHCC1954細胞(PIK3CA H1047R)のウェスタンプロット分析を示している。臨床開発中の他の経口PI3K阻害剤であるピクチリシブ及びアルペリシブは、突然変異p110aタンパク質を分解しない。

30

【0067】

Taselisibは、p85のレベルに影響を及ぼすことなくPIK3CAの突然変異細胞株中のp110aを枯渇させる。このことは、p110aモノマー分解をもたらすp110a/p85の解離の機序と一貫性を有する(図3)。p110アルファがp85から解離するとき、モノマーとしてp110アルファは不安定であり、急速に転倒する(Yu et al (1998) Mol. Cell Bio. 18:1379-1387; Wu et al (2009) Proc. Natl. Aca

40

【0068】

突然変異p110aは、taselisibによる分解に対し、野生型より感受性である。図4は、様々な濃度、即ち0.2µM、1µM、5µMのtaselisibとコントロール(DMSOビヒクル)とを用いた、SW48親PIK3CA野生型、突然変異同質遺伝子的SW48E545Kヘテロ接合体(het)、及びPIK3CA突然変異同質遺伝子的SW48H1047Rヘテロ接合体細胞を含むSW48同質遺伝子株のウェスタンプロット分析を示している。

【0069】

50

p 1 1 0 a E 5 4 5 K 突然変異タンパク質は、野生型タンパク質より安定性が低いと思われる（図 5 A 及び 5 B）。突然変異 p 1 1 0 アルファの RNA 発現は、E 5 4 5 K 操作細胞において変化しない。図 5 A は、1 8 S に対する相対的 p 1 1 0 アルファ mRNA 発現 RNA レベルにより測定した細胞内 p 1 1 0 アルファ mRNA 発現のグラフである。薬物は、p 1 1 0 a の mRNA 発現を変化させない。図 5 B は、CRISPR（クラスター化された規則的に間隔を空けた短いパンドローム反復）生成 SW 4 8 E 5 4 5 K ヘミ接合株（重複する二つのクローン）のウェスタンブロット分析を示している。このウェスタンブロットは、SW 4 8 E 5 4 5 K ヘテロ接合株と比較して有意に低下した突然変異 p 1 1 0 a のレベルを示し、このことは、突然変異 p 1 1 0 a の安定性が WT p 1 1 0 a より低いことを示唆している。レーンは、左から右へ、SW 4 8 E 5 4 5 K ヘミ接合クローン 1、SW 4 8 E 5 4 5 K ヘミ接合クローン 2、SW 4 8 親、SW 4 8 E 5 4 5 K ヘテロ接合、SW 4 8 E 5 4 5 K ヘテロ接合である。

10

【 0 0 7 0 】

P 1 1 0 アルファは、時間依存性に枯渇する。図 6 は、1 μ M 及び 5 μ M の t a s e l i s i b で処理した突然変異 H C C 1 9 5 4 ( P I K 3 C A H 1 0 4 7 R ) 乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。t a s e l i s i b は、患者試料から測定した場合に約 4 0 時間という長い臨床的薬物動態学的半減期を有するため、突然変異 p 1 1 0 a の分解は腫瘍中で起こっているはずである。

【 0 0 7 1 】

T a s e l i s i b は、p 1 1 0 a RNA を減少させないが、タンパク質は減少する。図 7 A は、H C C 1 9 5 4 野生型及び突然変異 p 1 1 0 アルファ細胞の相対的 RNA レベル対 1 8 S コントロールの測定におけるリアルタイム Q P C R の結果を示している。D M S O 対 G D C - 0 0 3 2 処理細胞の p 1 1 0 a mRNA レベルに差異は検出されなかった。突然変異対立遺伝子の発現は約 8 倍高かった。P I K 3 C A の DNA コピー数は 4 ~ 5 であり、WT は 1、及び突然変異対立遺伝子は 3 ~ 4 である（エクソーム配列）。突然変異と野生型 RNA の比率により、薬物に誘導される p 1 1 0 a 分解の量が予測される。p 1 1 0 a の減少は、転写段階では起こらない。図 7 B は、t a s e l i s i b ( G D C 0 0 3 2 ) で処理した H C C 1 9 5 4 p 1 1 0 アルファ野生型（左）及び p 1 1 0 アルファ H 1 0 4 7 R 突然変異（右）p 1 1 0 アルファ細胞の、R P L 1 9 コントロールに対する p 1 1 0 a mRNA 発現の測定における、リアルタイム Q P C R の結果を示す。図 7 C は、アルペリシブ（B Y L - 7 1 9）で処理した H C C 1 9 5 4 p 1 1 0 アルファ野生型（左）及び p 1 1 0 アルファ H 1 0 4 7 R 突然変異（右）p 1 1 0 アルファ細胞の、R P L 1 9 コントロールに対する p 1 1 0 a mRNA 発現の測定における、リアルタイム Q P C R の結果を示している。野生型及び突然変異細胞における mRNA レベルの比率は、p 1 1 0 a の減少が転写段階で起こらないことを確認するものである。

20

30

【 0 0 7 2 】

アッセイ名:	PIK3CA, H1047R, WT	
FAM プローブ配列:	ATGATGCACATCATGGT	(配列番号 1)
フォワードプライマー配列:	GGCTTTGGAGTATTTTCATGAAACA	(配列番号 2)
リバースプライマー配列:	GAAGATCCAATCCATTTTTGTTGTC	(配列番号 3)
アッセイ名:	PIK3CA, H1047R, 突然変異	
FAM プローブ配列:	TGATGCACGTCATGGT	(配列番号 4)
フォワードプライマー配列:	GGCTTTGGAGTATTTTCATGAAACA	(配列番号 5)
リバースプライマー配列:	GAAGATCCAATCCATTTTTGTTGTC	(配列番号 6)

40

【 0 0 7 3 】

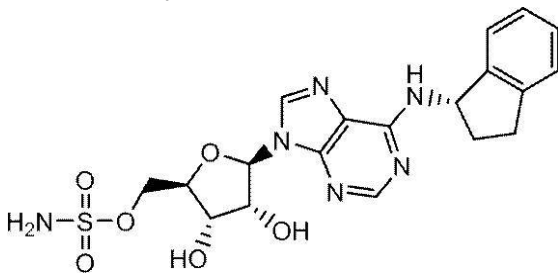
t a s e l i s i b による p 1 1 0 a の枯渇は、プロテアソーム媒介性であり（図 8 A

50

- 8 E)、E1 ユビキチン活性化酵素を必要とする(図8 Fに示す)。図8 Aは、図示の時間にわたって1.6 μMの t a s e l i s i b で処理した突然変異HCC1954 (P I K 3 C A H 1 0 4 7 R) 乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10 μMのプロテアソーム阻害剤MG132 (N - (ベンシルオキシカルボニル) l e u c i n y l l e u c i n y l l e u c i n a l Z - L e u - L e u - L e u - a l、C A S R e g . N o . 1 3 3 4 0 7 - 8 2 - 6) を加えた(右レーン)。M G - 1 3 2 プロテアソーム阻害剤は、t a s e l i s i b (G D C - 0 0 3 2) による p 1 1 0 a の分解を救済する。プロテアソーム阻害剤を24時間経過時点で加えることは、薬物により誘導される分解からの保護には遅すぎる。

【0074】

P 1 1 0 アルファの枯渇は、プロテアソーム媒介性であり、E1 ユビキチン活性化酵素を必要とする。図8 Bは、図示の時間にわたって1.6 μMの t a s e l i s i b で処理した突然変異HCC1954 (P I K 3 C A H 1 0 4 7 R) 乳がん細胞の溶解物のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10 μMのMG132 (中央レーン)、10 μMのUAE1阻害剤である、以下の構造:



を有する((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6 - ((S) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イル) アミノ) - 9 H - プリン - 9 - イル) - 3, 4 - ジヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル スルファメート、C A S R e g . N o . 9 0 5 5 7 8 - 7 7 - 0 を加えた。

【0075】

図8 Cは、図示の時間にわたって1.6 μMの t a s e l i s i b で処理した突然変異HCC1954 (P I K 3 C A H 1 0 4 7 R) 乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10 μMのMG132を加えた(右レーン)。T a s e l i s i b は、p 1 1 0 a のポリユビキチン化を媒介し、ポリユビキチン化された p 1 1 0 a は M G 1 3 2 で蓄積する。E1 阻害剤 (U A E 1 阻害剤) による処理 (図8 E 参照) は、オートラジオグラムの高分子量帯を崩壊させた。このことは抗体の特異性を確認するものである。

【0076】

図8 Dも、図示の時間にわたって1.6 μMの t a s e l i s i b で処理した突然変異HCC1954 (P I K 3 C A H 1 0 4 7 R) 乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10 μMのMG132を加えた(右レーン)。細胞膜及びサイトゾルに基づいて行われた測定値の比較により、p 1 1 0 a のユビキチン化が主に膜において起こることが実証された。膜関連 p 1 1 0 a は、t a s e l i s i b によりサイトゾルの p 1 1 0 a より効率的にユビキチン化される。T a s e l i s i b は素早く原形質膜における突然変異 p 1 1 0 a の分解を媒介する。膜関連 p 1 1 0 a の分解速度は、サイトゾル p 1 1 0 a の分解よりはるかに速い。t a s e l i s i b による細胞の短期処理は、膜の用量依存性の分解を媒介するが、サイトゾル p 1 1 0 a については媒介しない。これと比較して、アルペリシブ (B Y L - 7 1 9) のみは膜において弱い効果を有し、溶解物全体では効果を有さない。アルペリシブは、膜において弱い初期応答を示したが、p 1 1 0 a の経時的分解を引き起こさなかった。T a s e l i s i b は、アルペリシブより優れた p 1 1 0 a のディグレーダーである。

【0077】

図8 Eは、図示の時間にわたって1.6 μMの t a s e l i s i b で処理した突然変異

10

20

30

40

50

HCC1954 (PIK3CA H1047R) 乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。回収の4時間前に、10 μMのMG132、クロロキン、又は塩化アンモニウムを加えた(右レーン)。Taselisibによって媒介されたp110αの枯渇はリソソーム阻害剤による影響を受けず、このことは、p110αの分解がエンドソーム/リソソーム媒介性でないことを示唆している。プロテアソーム阻害剤MG132はポジティブコントロールである。

【0078】

図8Fは、p110αのユビキチン化までの経路図であり、経路特異的阻害剤で動物細胞がタンパク質を分解する二つの異なる機序を説明する(Jadhav, T. et al (2009) “Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination” J. Proteomics Bioinform, Vol 2(7):316-333; Wang, G. et al (2012) (“K63-linked ubiquitination in kinase activation and cancer” Frontiers in Oncology, Vol 2(5):1-13)。プロテアソーム阻害剤MG132はp110αの分解を助けることができたが、リソソーム阻害剤であるクロロキン又は塩化アンモニウムNH<sub>4</sub>Clはそれができなかったため、GDC-0032媒介性のp110α分解は、リソソーム分解装置依存性というよりはむしろ、ユビキチンプロテアソーム依存性の分解経路である。

【0079】

したがって、taselisib媒介性のp110αタンパク質分解は、時間依存性且つ用量依存性で、非転写、突然変異細胞に特異的且つユビキチン依存性であり、プロテアソームによって媒介され、膜関連p110αの場合に速い。

【0080】

taselisibもアルペリシブも膜の肝臓p110αに影響を及ぼさない。

【0081】

Taselisibはp110δを分解することも枯渇させることもない(図9A及び9B)。図9Aは、taselisib及びアルペリシブ(BYL719, Novartis, CAS#: 1217486-61-7, (S)-N1-(4-メチル-5-(2-(1,1,1-トリフルオロ-2-メチルプロパン-2-イル)ピリジン-4-イル)チアゾール-2-イル)ピロリジン-1,2-ジカルボキシアミド)で処理したPI3K野生型細胞及びBRAF突然変異SW982細胞のウェスタンブロット分析を示している。Taselisibはp110δを分解することも枯渇させることもない。図9Bは、taselisib及びG-102(表1、米国特許第8242104号)で処理したPI3K野生型細胞、B細胞リンパ腫SU-DHL-10細胞のウェスタンブロット分析を示している。

【0082】

PI3Kシグナル伝達経路において、PI3K阻害剤は、負のフィードバックを軽減し、再活性化のための経路を準備する。負のフィードバックがブロックされると、ホスホ-RTK(ErbB2, EGFR, ErbB3)活性が増大し、PI3K阻害の有効性が低下し、pAKTが増大する。図10は、様々な濃度、即ち100 nM、1 μM、5 μMのPI3K阻害剤とコントロール(DMSOビヒクル)によりPI3Kを阻害したPIK3CA野生型HDQP1細胞の、1時間及び24時間経過時点でのウェスタンブロット分析を示している。

【0083】

Taselisibは、遅い時点でのシグナル伝達の抑制の維持において別のPI3K阻害剤G-102(米国特許第8242104号)より優れている。図11Aは、様々な濃度、即ち3 nM、16 nM、60 nM、400 nM、2 μMのG-102とコントロール(DMSOビヒクル)によりPI3Kを阻害したMDA-MB 453(H1047R)細胞の、1時間及び24時間経過時点でのウェスタンブロット分析を示している。図11Bは、様々な濃度、即ち3 nM、16 nM、60 nM、400 nM、2 μMのtaselisib(GDC-0032)とコントロール(DMSOビヒクル)によりPI3Kを阻害したMDA-MB 453(H1047R)細胞の、1時間及び24時間経過時点で

10

20

30

40

50

のウェスタンブロット分析を示している。

【0084】

Taselisibは、RTK駆動経路の再活性化からの保護を行う。1時間経過時点において、pAktノックダウンは両PI3K阻害剤についてほぼ同等である。24時間経過時点では、pRTKが増加していた。Taselisibは、24時間経過時のシグナル伝達の抑制について、非ディグレーダーPI3K阻害剤であるG-102より優れている。図12は、様々な濃度、即ち1nM、10nM、100nMのtaselisib (GDC-0032) 及びG-102とコントロール(DMSOビヒクル)によりPI3Kを阻害したSW48H1047R細胞の、1時間及び24時間経過時点でのウェスタンブロット分析を示している。

10

【0085】

増殖因子リガンドで刺激した細胞において、taselisibは、シグナル伝達の抑制について非ディグレーダーG-102より優れている。この効果の理論的根拠は、pRTKが増加するとき、突然変異PI3Kaの分解に対する感受性がより高いことである。pRTKの結合はp110 に対してp85をシフトさせると考えられ、これによりp110 (アルファ) がさらに活性化する。ホットスポットp110 突然変異がp110 とp85の間の接触面で起こることがあり、p85/p110相互作用を緩和させる。図13は、様々な濃度、即ち1nM、10nM、100nMのtaselisib (GDC-0032) 及びG-102とコントロール(DMSOビヒクル)によるPI3K阻害で処理した、増殖因子リガンドNRGを含む及び含まない、SW48 PIK3CA H1047R細胞のウェスタンブロット分析を示している。

20

【0086】

in vitroでの細胞増殖、同質遺伝子的突然変異細胞と野生型細胞のpPRAS40を24時間経過時点で測定することは、分解アッセイにおいてPI3K阻害化合物を選択するために有用である。図14A~Cは、親/突然変異選択性のEC50値を確立するために、G-181、GDC-0032及びG-102の様々な濃度における24時間経過時の、同質遺伝子的突然変異(E545K、H1047R)におけるpPRAS40のin vitroでの細胞増殖を、野生型親PI3K細胞との対比で示している。

【0087】

突然変異PI3Kaノックイン細胞において、pan-PI3K阻害剤であるピクチリシブ(GDC-0941)に対するtaselisibの細胞力価の増大が観察される。図15は、SW48同質遺伝子的野生型及び突然変異(E545K、H1047R)細胞株とtaselisib及びピクチリシブの用量滴定による処理とに関するin vitroでの細胞増殖データを示すグラフである。

30

【0088】

Taselisibは、PIK3CAの突然変異がん株において力価の増強を有する。図16は、PIK3CAの突然変異細胞株に対する4日間の細胞増殖(Cell-Titer GloR, Promega)アッセイにおける、ピクチリシブ(GDC-0941)、BKM120(ブパリシブ、Novartis AG, CAS Reg. No. 944396-07-0、5-(2,6-ジモルホリノピリミジン-4-イル)-4-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-アミン)、taselisib(GDC-0032)及びBYL719(アルペリシブ、Novartis CAS#: 1217486-61-7)の有効性(IC50マイクロモル)を示すグラフである。各点は異なるがん細胞株を表す。ピクチリシブ、BKM120(ブパリシブ、Novartis AG, CAS Reg. No. 944396-07-0)、及びBYL719は、PI3Kの非ディグレーダーである。

40

【0089】

Taselisibはアポトーシスアッセイにおいて力価の増強を有する。図17は、細胞死-ヌクレオソームELISA検出による72時間の試験における、PIK3CA野生型及び突然変異(E545K、H1047R)細胞株と、taselisib、及びP

50

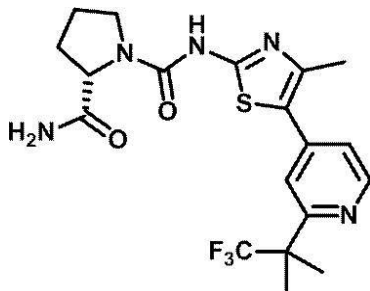
I 3 K アルファの選択的阻害剤である G D C - 0 3 2 6 ( 米国特許第 8 2 4 2 1 0 4 号 ) 、及び B Y L 7 1 9 の用量滴定による処理とに関する *in vitro* での細胞増殖データを示すグラフである。

【 0 0 9 0 】

T a s e l i s i b は、マウスの P I 3 K 突然変異異種移植片において、他の非ディグレーダーより大きな最大 *in vivo* 有効性を有する。最大耐量 ( M T D ) において、t a s e l i s i b は腫瘍を縮小させることができる。図 1 8 A は、ビヒクル ( M C T ; 0 . 5 % のメチルセルロース / 0 . 2 % の T w e e n 8 0 ) 、1 5 0 m g / k g のピクチリシブ ( G D C - 0 9 4 1 ) 、及び 2 5 m g / k g の t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) を、一日一回 1 0 0 マイクロリットル ( u l ) で P O ( 経口 ) 投与された、P I K 3 C A H 1 0 4 7 R ( P I 3 K a ) 突然変異を有する H C C 1 9 5 4 . x 1 乳房腫瘍異種移植片保有の 8 ~ 1 0 匹の免疫不全マウスのコホートにおける、2 1 日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。用語 u l はマイクロリットルを意味する。両方の薬物の最大耐量において、G D C - 0 0 3 2 は G D C - 0 9 4 1 より効果的であり、腫瘍縮小を誘導する。したがって、G D C - 0 0 3 2 は、P I 3 K 突然変異異種移植モデルにおいて非突然変異選択的 P I 3 K a 阻害剤より効果的である。図 1 8 B は、ビヒクル ( M C T ; 0 . 5 % のメチルセルロース / 0 . 2 % の T w e e n 8 0 ) 、4 0 m g / k g のアルペリシブ ( B Y L - 7 1 9 ) 、及び 1 5 m g / k g の t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) を、一日一回 1 0 0 マイクロリットル ( u l ) で P O ( 経口 ) 投与された、P I K 3 C A H 1 0 4 7 R ( P I 3 K a ) 突然変異を有する H C C 1 9 5 4 . x 1 乳房腫瘍異種移植片保有の 8 ~ 1 0 匹の免疫不全マウスのコホートにおける、2 1 日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。2 1 日間 G D C - 0 0 3 2 を毎日経口投与した結果、治療 ( R x ) 期間にわたって腫瘍が縮小した。その代わりに、2 1 日間非突然変異選択的 P I 3 K a 阻害剤である B Y L - 7 1 9 を毎日経口投与した結果、腫瘍の停滞が誘導された。したがって、G D C - 0 0 3 2 は、P I 3 K 突然変異異種移植モデルにおいて、非突然変異選択的 P I 3 K a 阻害剤より効果的である。G D C - 0 0 3 2 及び B Y L - 7 1 9 による治療は、ビヒクルコントロールと比較したときの又は研究開始からのマウス体重における最小変化に基づいて、良好な耐容性を示した。

【 0 0 9 1 】

アルペリシブとして知られる化合物 ( B Y L 7 1 9 、 N o v a r t i s 、 C A S # : 1 2 1 7 4 8 6 - 6 1 - 7 ) は、P I 3 K アルファアイソフォームの選択的経口阻害剤であり、臨床治験において、セカンドラインのホルモン受容体陽性、H E R 2 - 進行性転移性乳がん用のフルベストラントと組み合わせた第 I I I 相試験を含む、様々な腫瘍種類の治療可能性を有する ( F u r e t , P . e t a l ( 2 0 1 3 ) B i o o r g . M e d . C h e m . L e t t . 2 3 : 3 7 4 1 - 3 7 4 8 ; 米国特許第 8 2 2 7 4 6 2 号 ; 米国特許第 8 4 7 6 2 6 8 号 ; 米国特許第 8 7 1 0 0 8 5 号 ) 。アルペリシブは、( S ) - N 1 - ( 4 - メチル - 5 - ( 2 - ( 1 , 1 , 1 - トリフルオロ - 2 - メチルプロパン - 2 - イル ) ピリジン - 4 - イル ) チアゾール - 2 - イル ) ピロリジン - 1 , 2 - ジカルボキシアミド ) という名称と、以下の構造を有する。



アルペリシブ ( B Y L - 7 1 9 )

【 0 0 9 2 】

図 1 8 C は、ビヒクル ( M C T ; 0 . 5 % のメチルセルロース / 0 . 2 % の T w e e n 8 0 ) 、及び 1 5 m g / k g の t a s e l i s i b ( G D C - 0 0 3 2 ) を、一日一回



100マイクロリットル(ul)でPO(経口)投与された、PIK3CA E542K(P I 3 K)に突然変異を有するWHIM20ホルモン受容体陽性患者由来の乳房腫瘍異種移植片保有の8~10匹の免疫不全マウスのコホートにおける、28日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。28日間GDC-0032を毎日経口投与した結果、投薬終了後に持続された治療(Rx)期間にわたって腫瘍が縮小した。GDC-0032による治療は、ビヒクルコントロールと比較したときの又は研究開始からのマウス体重における最小変化に基づいて、良好な耐容性を示した。

【0093】

図18Dは、ビヒクル(MCT; 0.5%のメチルセルロース/0.2%のTween 80)、40mg/kgのアルペリシブ(BYL-719)、及び2.5、5.0、15mg/kgのtaselisib(GDC-0032)を、一日一回100マイクロリットル(ul)でPO(経口)投与された、PIK3CA H1047R(P I 3 K)に突然変異を有するHCI-003ホルモン受容体陽性患者由来の乳房腫瘍異種移植片保有の8~10匹の免疫不全マウスのコホートにおける、27日間にわたる腫瘍体積の変化のフィッティングを示している。27日間GDC-0032を毎日経口投与した結果、治療(Rx)期間にわたって腫瘍縮小が用量依存性に亢進した。その代わりに、27日間非突然変異選択的PI3Ka阻害剤であるBYL-719を毎日経口投与した結果、腫瘍の停滞が誘導された。したがって、GDC-0032は、PI3K突然変異異種移植モデルにおいて、非突然変異選択的PI3Ka阻害剤より効果的である。GDC-0032及びBYL-719による治療は、ビヒクルコントロールと比較したときの又は研究開始からのマウス体重における最小変化に基づいて、良好な耐容性を示した。

【0094】

GDC-0032の有効性を、PIK3CA E542Kホットスポット突然変異を有するWHIM20ホルモン受容体陽性患者由来の乳がん異種移植モデルにおいて評価した。28日間GDC-0032を毎日経口投与した結果、投薬終了後に持続された治療(Rx)期間にわたって腫瘍が縮小した。GDC-0032による治療は、ビヒクルコントロールと比較したときの又は研究開始からのマウス体重における最小変化に基づいて、良好な耐容性を示した。

【0095】

GDC-0032の有効性を、PIK3CA H1047Rホットスポット突然変異を有するHCI-003ホルモン受容体陽性患者由来の乳がん異種移植モデルにおいて評価した。27日間GDC-0032を毎日経口投与した結果、治療(Rx)期間にわたって腫瘍縮小が用量依存性に亢進した。その代わりに、27日間非突然変異選択的PI3Ka阻害剤であるBYL-719を毎日経口投与した結果、腫瘍の停滞が誘導された。したがって、GDC-0032は、PI3K突然変異異種移植モデルにおいて非突然変異選択的PI3Ka阻害剤より効果的である。GDC-0032及びBYL-719による治療は、ビヒクルコントロールと比較したときの又は研究開始からのマウス体重における最小変化に基づいて、良好な耐容性を示した。

【0096】

taselisibで処理した突然変異HCC1954(PIK3CA H1047R)乳がん細胞において、シグナル伝達はtaselisibのウォッシュアウト後素早く正常に戻り、p110aレベルは8~24時間後に戻り始める。図19は、様々な濃度、即ち16nM、80nM、400nMのtaselisibとコントロール(DMSOビヒクル)で処理した突然変異HCC1954(PIK3CA H1047R)乳がん細胞のウェスタンブロット分析を示している。

【0097】

一実施態様では、p110アルファタンパク質の枯渇は、細胞増殖、細胞シグナル伝達、又はアポトーシスレベルによって測定することができる。

【0098】

一実施態様では、p110アルファタンパク質の枯渇は、患者から採取された生物学的

試料由来の測定可能なバイオマーカーと関連している。p 1 1 0 アルファタンパク質の枯濁は、Protein Simple IEF (等電点電気泳動法) 技術により臨床設定において検出されうる。十分に利用可能な患者組織を用いて、ウェスタンブロット分析、又は質量分析法により p 1 1 0 アルファタンパク質レベルを測定することができる。質量分析は、ユビキチン化の検出を含め、単一細胞のプロテオムの照合を可能にする。NMR (核磁気共鳴) 分光法は、p 1 1 0 アルファ及び p 8 5 の解離又は p 1 1 0 アルファの分解を検出及び測定するための、別の生物物理学的ツールである。

【 0 0 9 9 】

別法として、特異的抗 p 1 1 0 アルファ抗体が免疫組織化学 ( I H C ) 又は免疫蛍光 ( I F ) に基づく試験において有用でありうる。

10

【 0 1 0 0 】

P I 3 K タンパク質の免疫沈降法 ( I P ) 及びタンパク質の局在化により p 8 5 及び p 1 1 0 アルファの解離の変化を検出することができるか、又は p 1 1 0 アルファが t a s e l i s i b による処置の前及び後のいつ分解されるかにより患者の応答を同定及び予測することができる。

【 0 1 0 1 】

突然変異同質遺伝子の P I 3 K 細胞株における t a s e l i s i b の活性は、野生型同質遺伝子の P I 3 K 細胞株における活性より大きい。同質遺伝子の P I 3 K 突然変異細胞株は、H 1 0 4 7 R、C 4 2 0 R、H 1 0 4 7 L、E 5 4 2 K、E 5 4 5 K 及び Q 5 4 6 R から選択される突然変異を有しうる。

20

【 0 1 0 2 】

T a s e l i s i b は、A T P - K m、P I P 2 - K m、P I P 2 から P I P 3 への変換の比率若しくは範囲、膜局在化、脂質膜親和性、及び受容体チロシンキナーゼ結合により測定又は検出した場合、突然変異 p 8 5 / p 1 1 0 アルファ複合体の A T P - K m と比較して、野生型 p 8 5 / p 1 1 0 アルファ複合体に差次的に影響する。

【 0 1 0 3 】

T a s e l i s i b は、突然変異 p 8 5 / p 1 1 0 アルファ複合体と比較して、野生型 p 8 5 / p 1 1 0 アルファ複合体の立体構造の変化を差次的に誘導する。立体構造の変化には、t a s e l i s i b と野生型 p 8 5 / p 1 1 0 アルファ複合体の間に存在しない突然変異 p 8 5 / p 1 1 0 アルファ複合体との結合相互作用が含まれる。

30

【 0 1 0 4 】

一実施態様では、t a s e l i s i b は、単離された P I 3 K アルファの突然変異形態に選択的に結合し、突然変異 P I 3 K アルファに対する結合の I C 5 0 は、野生型 P I 3 K アルファに対する結合の I C 5 0 より小さい。

【 0 1 0 5 】

一実施態様では、t a s e l i s i b は、P I 3 K アルファ同質遺伝子のがん細胞株の野生型形態の阻害より、突然変異 - P I 3 K アルファ同質遺伝子のがん細胞株の阻害において高い活性を有する。

【 0 1 0 6 】

一実施態様では、t a s e l i s i b は、H 1 0 4 7 R、C 4 2 0 R、H 1 0 4 7 L、E 5 4 2 K、E 5 4 5 K 及び Q 5 4 6 R から選択される突然変異 P I 3 K のアルファ - サブユニットに対する結合について選択的であり、突然変異 P I 3 K p 1 1 0 アルファアイソフォーム細胞株において I C <sub>50</sub> によって測定した場合、野生型 P I 3 K p 1 1 0 アルファアイソフォーム細胞株における t a s e l i s i b の I C <sub>50</sub> 阻害活性より低い阻害活性を有する。突然変異 P I 3 K p 1 1 0 アルファアイソフォームは、H 1 0 4 7 R、C 4 2 0 R、H 1 0 4 7 L、E 5 4 2 K、E 5 4 5 K 及び Q 5 4 6 R から選択される。

40

【 0 1 0 7 】

トリプシン切断及び質量分析法による P 1 1 0 アルファ枯濁の検出

t a s e l i s i b によって処理した生物学的試料における p 1 1 0 アルファの枯濁を

50

検出及び測定するための上記方法に加えて、質量分析により直接的な検出を達成することができる。野生型及びH1047R突然変異型p110aタンパク質の混合物を発現するHCC1954乳がん細胞を、DMSO中500nMのtaselisib(GDC-0032)で24時間処理した。p110アルファタンパク質の免疫沈降法を実施し、SDS-PAGEにより分離されてクーマシー染色されたタンパク質を補足した。p110アルファを含むGelブレンドを、ゲル内トリプシン消化に供し、分析用のトリプシンペプチドを生成した。DMSO(コントロール)又はtaselisibで処理した細胞由来のトリプシンペプチドは、対応する749.8282m/z(+/-10ppm)イオンの定量化に基づき、同等のレベルのQM(ox)NDAHGGWTTKペプチド配列(配列番号7)を示した。taselisib処理した細胞由来のトリプシンペプチドは、DMSO処理細胞と比較して、393.6983m/z(+/-10ppm)のイオンによって特徴づけられる、突然変異特異的ペプチドHGGWTTK(配列番号8)の欠損を示した。したがって、p110a H1047Rといった突然変異腫瘍に特異的なネオトリプシンペプチドを使用して、野生型形態と比較した場合の突然変異p110aの枯渇を実証することができる。

10

野生型トリプシンペプチド QM(ox)NDAHGGWTTK (配列番号7)  
突然変異トリプシンペプチド HGGWTTK (配列番号8)

【0108】

図24Aは、実施例7による野生型PIK3CA HCC-1954(上)及びPIK3CA HCC-1954を発現するH1047R突然変異(下)のトリプシン切断を示している。

20

【0109】

図24Bは、実施例7による、消化後の野生型PIK3CA HCC-1954(左)及びPIK3CA HCC-1954を発現するH1047R突然変異(右)に対する液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)の分析と、p110アルファ(PIK3CA)タンパク質免疫沈降法とを示している。

【0110】

突然変異の選択性

表1は複数のPI3K結合化合物の生物学的特性をまとめたものである。GDC-0032(Ndubaku et al(2013)Jour. Med. Chem. 56(11):4597-4610;Staben et al(2013)Bio org. Med. Chem. Lett. 23 2606-2613;国際公開第2011/036280号;米国特許第8242104号;米国特許第8343955号)は、pan-PI3K阻害化合物GDC-0941よりPI3Kアルファ突然変異がん細胞に対して強力である(Folkes et al(2008)Jour. of Med. Chem. 51(18):5522-5532;米国特許第7781433号;米国特許第8324206号)。表1の四つのPI3K阻害剤は、PI3Kアルファに対する結合の生化学的力価(Ki値)及びPI3Kの四つの野生型クラス1アイソフォームに対する相対的力価において異なっている。GDC-0326は、アルファ選択的PI3K阻害化合物であり、ベータ、デルタ、及びガンマアイソフォームに弱く結合する(米国特許第8242104号)。GDC-0941は、四つすべてのアイソフォームに対して比較的良好に結合する「pan」阻害剤である。GDC-0032は、アルファ、デルタ、及びガンマアイソフォームによく結合し、ベータに弱く結合する「ベータ節約型」である。

30

40

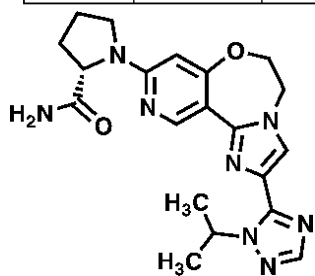
【0111】

表1 PI3K結合化合物の活性

化合物	野生型 -PI3K $\alpha$ $K_i$ nM	突然変異 -p110 $\alpha$ H1047R $K_i$ nM	突然変異 -p110 $\alpha$ E545K $K_i$ nM	PI3K $K_i$ nM ( $\beta/\alpha$ )	PI3K $K_i$ nM ( $\delta/\alpha$ )	PI3K $K_i$ nM ( $\gamma/\alpha$ )	野生型 PI3K $\alpha$ / 突然変異 PI3K $\alpha$	MCF7 $IC_{50\mu}$ M	PC3 $IC_{50\mu}$ M
G-102	0.14			39.7 (282) .	3.7 (27). .	16 (111) .		0.05 6	1.6
GDC-0326	0.23			31 (133) .	4.8 (20). .	12 (51). .	1		
GDC-032	0.29	0.11	0.14	9.1 (31). .	0.092 (0.36 ).	0.89 (3.5) .	2.6	0.02 5 (Mut E545 K)	不活性
GDC-0941	3			33 (11). .	3 (1). .	75 (25). .			

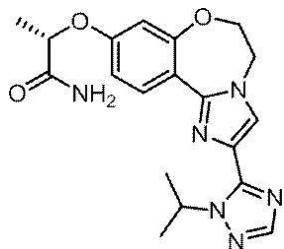
10

20



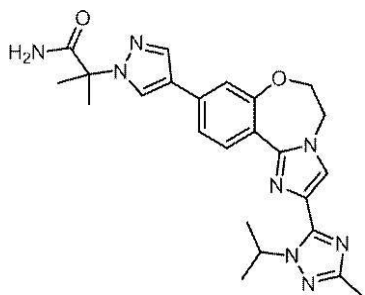
G - 1 0 2

30



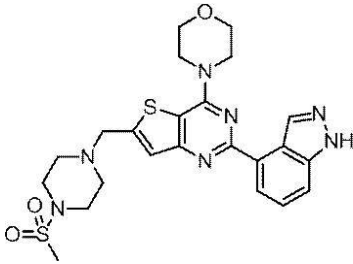
G D C - 0 3 2 6

40



50

GDC - 0032 (taselelisib)



GDC - 0941 (ピクチリシブ)

## 【0112】

10

突然変異PI3Kアルファのノックインは、SW48同質遺伝子株、PI3Kアルファ野生型(親)及びヘリカルドメイン突然変異E545Kとキナーゼドメイン突然変異H1047Rに示すように、taselelisib(GDC-0032)に関する細胞力価を上昇させるが、GDC-0941はそのような突然変異選択的効果を示さない。GDC-0032の突然変異タンパク質との相互作用は、GDC-0941とは異なっていると推定される。このような予想外の結果は、特定の強力なPI3K阻害剤の固有の結合機序又はモードを示唆するが、他については示さない。GDC-0032の突然変異選択特性は、GDC-0941にはないものであり、これによりGDC-0032は、PI3Kアルファ突然変異異種移植片腫瘍モデルであるキナーゼドメインのH1047R突然変異を有するHCC1954乳がんにおいて、GDC-0941より大きな最大有効性を有する。21日間にわたる毎日の経口投与の後、最大耐量25mg/kgでGDC-0032は腫瘍の縮小を誘導し、最大耐量150mg/kgでGDC-0941は腫瘍増殖を阻害した。

20

## 【0113】

*in vitro*での腫瘍細胞増殖を、GDC-0032、GDC-0326(米国特許第8242104号)又はGDC-0941で処理したがん細胞株において測定した。GDC-0032は、低濃度でPI3K突然変異細胞にアポトーシスを誘導する。GDC-0032の突然変異の力価の上昇は、野生型PI3Kアルファに対する生化学的結合力価と相関していない。PI3K阻害化合物によるPI3K突然変異細胞株及び腫瘍に対する力価の上昇は、物理化学的又は浸透性特性、細胞内レベル、アイソフォーム選択性、及び野生型p110アルファ又は野生型p110デルタに対する絶対力価により影響される。細胞生存率アッセイでは、p110アルファ選択的阻害剤GDC-0326(表1)の強度は、H1047R p110アルファ細胞株であるHCC1954に対し、GDC-0032より弱く、その6分の1であった。GDC-0032は、ベータ、ガンマ、及びデルタアイソフォームに対し、GDC-0326(米国特許第8242104号)より低いアルファ選択性を有する。突然変異PI3Kアルファのノックインは、突然変異選択的GDC-0032に関して細胞力価の細胞力価を上昇させるが、G-102のようなPI3Kアルファ特異的阻害剤に関しては上昇させない。同様の細胞生存率アッセイにより、p110デルタの阻害がPI3K突然変異細胞株の生存率を低下させないことが決定された。また、それに相当するGDC-0032の細胞内レベルを、様々な野生型及びPI3K突然変異細胞において測定した(pmol/mg)。結果は、細胞内の蓄積ではGDC-0032の突然変異力価の上昇が説明されないことを示すものである。

30

40

## 【0114】

GDC-0032、GDC-0326又はGDC-0941で処理した突然変異同質遺伝子のSW48 PI3KアルファH1047R細胞株及び野生型SW48親細胞由来の、放射標識した溶解物のゲル電気泳動のオートラジオグラフィーは、ウェスタンブロット分析により、切断されたPARP、pS6(S235/236)、pAKT<sup>T308</sup>、pAKT<sup>S473</sup>、ベータ-アクチン及びGAPDHを測定した。PI3K経路のノックダウンは、アポトーシスの誘発と用量依存性に相関する。Taselelisibは、極めて低い化合物濃度においてPI3K突然変異を有する細胞にアポトーシスを誘導する。同様の効果が、MCF10A乳房細胞株及びHCC1954、PI3KアルファH1047R乳

50

がん細胞株由来の同質遺伝子の細胞に見られた。同等の化合物特性にも関わらず、経路ノックダウンは、非突然変異選択的 GDC - 0326 よりも、突然変異選択的 GDC - 0032 に強力である。GDC - 0032 の突然変異の力価の上昇は、野生型 PI3K アルファに対する生化学的力価によって説明されない。

#### 【0115】

これらアッセイにより、PI3K アルファ突然変異の選択性に対する構造的変化の影響を試験するために、化合物を評価することができる。特定領域における大きさ及び水素結合能の変化は、選択性の向上と相関しうる。

#### 【0116】

予備臨床試験データは、PIK3CA 突然変異腫瘍を有する十名の患者のうち五名において、及び PIK3CA 突然変異乳房腫瘍を有する五名の患者のうち四名において、taselisib が部分寛解を達成したことを示した (Olivero and Juric (2013) AACR)。

#### 【0117】

TASELISIB と PI3K の相互作用

Taselisib (GDC - 0032) は、PI3K 野生型アイソフォームとの相互作用とは異なる PI3K アルファ突然変異アイソフォームとの重要な相互作用に起因して、PI3K 野生型アイソフォームより PI3K アルファ突然変異アイソフォームについて高い選択性を有し、PI3K アルファ突然変異アイソフォームの重要な突然変異的特徴と相互作用するための、原子及び官能基の精確な位置づけ及び配置を含みうる。このような相互作用は、PI3K アルファ突然変異アイソフォームタンパク質との水素結合 - ドナー、水素結合 - アクセプター及び / 又はファンデルワースカパートナーとして作用する官能基によって達成される (Staben et al (2013) Bioorg. Med. Chem. Lett. 23:2606-2613; Ndubaku et al (2013) Jour. Med. Chem. 56 (11), 4597-4610)。Taselisib は、低エネルギー立体構造での結合トポロジーに適合することができ、リガンド結合部位に効率的な極性及びファンデルワース相互作用をつくることができる。

#### 【0118】

PIK3CA の突然変異が脂質の結合及び PI3K の基礎活性を増大させることが確立された (Burke et al (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. 109:15259-15264)。突然変異は、PI3K アルファの閉環したサイトゾルの不活性形態を不安定にし、脂質結合の増大を促進する。突然変異選択的な本発明の PI3K 結合化合物は、PI3K アルファの閉環形態の安定を増大させ、脂質結合を増大させる立体構造の変化を妨げる。ホットスポット突然変異は、H1047R 突然変異の水素 - 重水素交換においてキナーゼドメインの領域のさらなる重水素化を誘導し、このことは、そのような突然変異がより動的 (不安定化されている) で交換のために利用可能であることを示している。このような変化は、脂質膜に対する親和性の上昇を伴っており、活性化及び下流でのシグナル伝達の増大を説明しうる。このような動的な領域である残基 848 ~ 859 (図 20) は、本発明の化合物に重要な結合相互作用を提供しうる。

#### 【0119】

図 21 は、PIK3CA 内での突然変異の位置による、PIK3CA の突然変異を有する細胞株における GDC - 0032 生存率の結合力価を示すグラフである。GDC - 0032 は、突然変異の位置に関わらず、PI3K 突然変異を有する細胞株に対して有効である。細胞株のいくつかは、耐性マーカーとして B-Raf 及び Ras といった追加の突然変異を有する。

#### 【0120】

図 22 は、p110a 及び p110a に並行なレベルを用いた p85 免疫共沈降法 (Co-IP) のウェスタンブロット (WB) 分析を示しており、これは、安定な p110a が p85 との複合体であり、有意な用量依存性の p110a 分解が taselisib によって誘導されることを示唆している。細胞を、その時点で p110a が明らかに分解している 24 時間にわたって GDC - 0032 で処理した。代替的実験では、もっと短い時

10

20

30

40

50

点（2時間、4時間など）でサンプリングした細胞を処理してよく、その時点で p 1 1 0 アルファはまだ分解されていないが、p 8 5 から解離している。t a s e l i s i b による治療の後に、p 8 5 からは突然変異の解離が検出されるが野生型 p 1 1 0 アルファの解離は検出されないことは、t a s e l i s i b による治療に应答すると思われる突然変異 P I 3 K 腫瘍保有患者の予測バイオマーカーでありうる。

#### 【 0 1 2 1 】

図 2 3 は、定常状態の p 1 1 0 a mRNA 発現を示している。G D C 0 0 3 2 による p 1 1 0 a の分解に最も感受性である細胞株は、W T p 1 1 0 a より H 1 0 4 7 R 突然変異を多く有する。突然変異と W T p 1 1 0 a 対立遺伝子の比率は、G D C - 0 0 3 2 媒介性の p 1 1 0 a の分解に対する感受性を決定しうる。

#### 【 0 1 2 2 】

P I 3 K ベータ (Zhang, X. et al (2011) Mol. Cell 41:567-5789), PI3K アルファ (Huang, C.-H. et al (2007) Science 318:1744), PI3K デルタ (Berndt, A. et al (2010) Nat. Chem. Biol. 6:11)、及び P I 3 K ガンマ ("Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine", Walker, E.H. et al (2000) Mol. Cell 6:909) の X 線構造が報告されている。注意すべき一つの違いは、すべてのアイソフォーム (アルファ - T r p 7 8 0、ベータ - T r p 7 8 1、デルタ - T r p 7 6 0、ガンマ - T R P 8 1 2) 中に存在するトリプトファン残基の立体配座である。これは、阻害剤による隣接残基の「誘導適合」又は特異的相互作用の結果として P I 3 K デルタに対するアイソフォーム特異性を取得するために重要と考えられる同じトリプトファン残基である。この T r p 残基のインドルの立体配座は、P I 3 K ベータにおいて特有であり、P I 3 K ベータに対する低度且つ弱い結合を有する「ベータ節約型」P I 3 K 阻害剤の設計の基礎を提供しうる。ベータ - T r p 7 8 1 の C - C に沿った回転は、別の配向を提示する。第 2 のシエル残基の差異は、P I 3 K ベータにおいてこの T r p の特有の配向を促進する。第 1 に、インドル N - H は、結合部位の同様の領域を占めるが P I 3 K ベータ又はデルタには存在しない P I 3 K アルファ (G l u 7 9 8) 及び P I 3 K ガンマ (G l u 8 1 4) の両方において、酸性残基に H 結合を供与する。このような相互作用は、これらアイソフォーム中のインドルに観察される配向に有利でありうる。G l u 8 1 4 の代わりに、P I 3 K ベータ及びデルタは、非極性の側鎖を有する中性の残基 (それぞれベータ - V a l 7 8 3 及びデルタ - M e t 7 6 2) を有し、したがってインドルは他のエネルギー的に好ましい配向を占有することができる。P I 3 K ベータの分枝状バリン残基が、アルファ、デルタ及びガンマに観察されるものと同様の配向に不利である可能性がある ; C ガンマメチルが代わりにインドル 4 / 5 位置までファンデルワース距離に接近する。構造 - 活性関係 (S A R) のこのような解釈の下に、この特有の立体配座では、T r p 側鎖が、阻害剤の立体容積による損傷を受け易い。さらに注意すべきは、ベータと比較した場合に P I 3 K アルファ、デルタ及びガンマ中のインドルによるパイスタッキングのために提示された差次的角度及び原子である。トリプトファン環と芳香族アミノ酸側鎖 (P h e、T y r、H i s) との間のパイ相関の P D B 分析については : Samanta, U. et al (1999) Biol. Crystallogr., D55:1421 を参照されたい。このような観察は、同じ領域内の非芳香族置換により分子の全体的選択性が P I 3 K b より低くなる理由を部分的に説明しうる (Staben et al (2013) Bioorg. Med. Chem. Lett. 23:2606-2613)。

#### 【 0 1 2 3 】

突然変異 P 1 1 0 アルファのバイオマーカー検出

特定の実施態様では、試料中のバイオマーカータンパク質の存在及び / 又は発現レベル / 量が、免疫組織化学 (I H C) 及び染色プロトコールを用いて試験される。組織切片の I H C 染色は、試料中のタンパク質の存在を決定又は検出する信頼性の高い方法であることが示された。方法、アッセイ及び / 又はキットのいずれかのいくつかの実施態様では、関連のバイオマーカーは突然変異 p 1 1 0 アルファタンパク質である。いくつかの実施態様では、突然変異 p 1 1 0 アルファは免疫組織化学により検出される。いくつかの実施態

10

20

30

40

50

様では、個体由来の試料中における突然変異 p 1 1 0 アルファバイオマーカーの発現の増大は、タンパク質発現の増大であり、さらなる実施態様では、IHCを用いて決定される。一実施態様では、バイオマーカーの発現レベルは、(a)抗体を用いて試料(例えば対象のがん試料)のIHC分析を実施すること;及びb)試料中のバイオマーカーの発現レベルを決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施態様では、IHC染色強度は基準との比較において決定される。いくつかの実施態様では、基準は参照値である。いくつかの実施態様では、基準は基準試料(例えば、コントロール細胞株染色試料又は非がん性患者由来の組織試料)である。

#### 【0124】

IHCは、形態染色及び/又は蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションといった追加的技術と組み合わせて実施されうる。IHCの二つの一般的な方法、即ち直接的及び間接的アッセイが利用可能である。第1のアッセイによれば、標的抗原に対する抗体の結合が直接的に決定される。この直接的アッセイは、さらなる抗体相互作用なしで可視化することが可能な、標識された試薬、例えば蛍光性タグ又は酵素標識された一次抗体を用いる。典型的な間接的アッセイでは、非コンジュゲート一次抗体が抗原に結合し、次いで標識された二次抗体が一次抗体に結合する。二次抗体が酵素標識にコンジュゲートしている場合、抗原を可視化するために発色性又は発蛍光性基質が付加される。複数の二次抗体が一次抗体上の異なるエピトープと反応しうるため、シグナル増幅が起こる。IHCのために使用される一次及び/又は二次抗体は、典型的に、検出可能部分を用いて標識される。多数の標識が利用可能であり、それらは一般に以下のカテゴリーに分類される:(a)放射性同位体、例えば<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、及び<sup>131</sup>I;(b)コロイド金粒子;(c)限定されないが、希土類キレート(ユーロピウムキレート)、Texas Red、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコエリトリン(*phycoerythrin*)、フィコシアニン、又は市販のフルオロフォア、例えばSPECTRUM ORANGE 7及びSPECTRUM GREEN 7及び/又は上記のいずれか一つ又は複数の誘導体を含む蛍光標識;(d)様々な酵素-基質標識が利用可能である(米国特許第4275149号;米国特許第4318980号)。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ類(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン類、マレートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、セイヨウウサビペルオキシダーゼ(HRP O)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ類(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環式オキシダーゼ(ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなど)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。酵素-基質の組み合わせの例には、例えば、基質として水素ペルオキシダーゼを有するホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP O);発色性基質としてパラ-ニトロフェニル ホスフェート(有するアルカリホスファターゼ(AP));及び発色性基質(例えば、p-ニトロフェニル-.ベータ.-D-ガラクトシダーゼ)又は発蛍光性基質(例えば、4-メチルウンベリフェリル-.ベータ.-D-ガラクトシダーゼ)を有するベータ-D-ガラクトシダーゼ(ベータ-D-Gal)が含まれる。方法のいずれかのいくつかの実施態様では、突然変異 p 1 1 0 アルファタンパク質といったバイオマーカーは、抗突然変異 p 1 1 0 アルファ診断用抗体(即ち、一次抗体)を用いる免疫組織化学によって検出される。いくつかの実施態様では、抗突然変異 p 1 1 0 アルファ診断用抗体は、ヒト突然変異 p 1 1 0 アルファに特異的に結合する。いくつかの実施態様では、抗突然変異 p 1 1 0 アルファ抗体は、ラット、マウス、又はウサギ抗体といった非ヒト抗体である。いくつかの実施態様では、抗突然変異 p 1 1 0 アルファ診断用抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施態様では、抗突然変異 p 1 1 0 アルファ診断用抗体は直接的に標識される。

#### 【0125】

このように調製された標本は取り付けられてカバーで覆われうる。次いで、スライドの

10

20

30

40

50



評価が、例えば顕微鏡を用いて決定され、当技術分野で常套的に使用される染色強度基準が利用されうる。一実施態様では、腫瘍由来の細胞及び/又は組織がIHCを用いて試験されるとき、染色は一般的に、腫瘍細胞及び/又は組織において(試料中に存在しうる間質又は周囲組織とは対照的に)決定又は評価されると理解される。いくつかの実施態様では、腫瘍由来の細胞及び/又は組織がIHCを用いて試験されるとき、染色は、腫瘍内又は腫瘍周囲の免疫細胞を含め、免疫細胞に浸潤する腫瘍において決定すること又は評価することを含む。いくつかの実施態様では、突然変異p110アルファバイオマーカの存在が、試料の>0%、少なくとも試料の1%、少なくとも試料の5%、少なくとも試料の10%において、IHCによって検出される。いくつかの実施態様では、突然変異p110アルファバイオマーカは、腫瘍細胞において、IHCによって検出される。

10

## 【0126】

代替的方法では、患者由来の生物学的試料、例えば腫瘍生検又は循環性腫瘍細胞を、バイオマーカに特異的な抗体と、抗体-バイオマーカ複合体が形成されるために十分な条件下で接触させ、次いで前記複合体を検出する。バイオマーカの存在は、複数の方法で、例えば血漿又は血清を含む多種多様の組織及び試料をアッセイするためのウェスタンブロット法及びELISA手順により検出可能である。このようなアッセイフォーマットを用いる幅広いイムノアッセイ技術が利用可能であり(米国特許第4016043号;米国特許第4424279号;米国特許第4018653号)、これには、非競合タイプの単一部位及び二部位又は「サンドイッチ」アッセイ、並びに伝統的な競合結合アッセイが含まれる。これらアッセイは、標的バイオマーカに対する標識化抗体の直接的結合も含む。組織又は細胞試料中の選択されたバイオマーカの存在及び/又は発現レベル/量は、機能アッセイ又は活性に基づくアッセイによっても試験することができる。例えば、バイオマーカが酵素である場合、当技術分野で既知のアッセイを実施して、組織又は細胞試料中の所与の酵素活性の存在を決定又は検出することができる。

20

## 【0127】

抗突然変異p110アルファ抗体又はその抗原結合断片は、当技術分野において既知の方法、例えば発現に適した形態の先述の抗突然変異p110アルファ抗体又は抗原結合断片のいずれかをコードする核酸を含む宿主細胞を、そのような抗体又は断片を生成するために適した条件下で培養すること、及び抗体又は断片を回収することを含む方法により、作製することができる。

30

## 【0128】

## 治療の方法

Taselisib(GDC-0032)は、がんを含む過剰増殖性疾患の治療において有用である。一実施態様では、突然変異PI3K腫瘍を有する患者がtaselisibで治療される。突然変異PI3K腫瘍は、乳房腫瘍、肺腫瘍、又は他の器官に見られる腫瘍である。

## 【0129】

本発明の一実施態様は、患者にtaselisibを投与することを含むがんの治療のための方法であり、突然変異同質遺伝子的PI3K細胞株におけるtaselisibの活性は、野生型同質遺伝子的PI3K細胞株におけるtaselisibの活性より大きい。

40

## 【0130】

本発明の別の実施態様によれば、患者にtaselisibを投与することを含むがんの治療のための方法では、突然変異PI3K p110アルファアイソフォームに対するtaselisibのIC50結合活性は、野生型PI3K p110アルファアイソフォームに対するtaselisibのIC50結合活性より低い。

## 【0131】

一実施態様では、PI3K p110アルファアイソフォーム突然変異は、H1047R、H1047L、E542K、E545K及びQ546Rより選択される。

## 【0132】

50

－実施態様では、t a s e l i s i bの投与に先立って患者から得られた生物学的試料は、P I K 3 C A又はP T E N突然変異状態について試験されおり、ここでP I K 3 C A又はP T E N突然変異状態は、t a s e l i s i bに対する患者の治療的応答性を示す。

【0133】

－実施態様では、突然変異状態には、H 1 0 4 7 R、H 1 0 4 7 L、C 4 2 0 R、E 5 4 2 K、E 5 4 5 K又はQ 5 4 6 Rより選択される突然変異を検出することが含まれる。

【0134】

－実施態様では、過剰増殖性疾患は、H E R 2発現乳がん又はエストロゲン受容体陽性(E R +)乳がんであり、乳がんは転移性でありうる。

【0135】

－実施態様では、t a s e l i s i bはアジュバント設定において患者に投与される。

【0136】

－実施態様では、患者は以前にタモキシフェン、フルベストラント、又はレトロゾールで治療されたことがある。

【0137】

本発明の方法はさらに：

- ・バイオマーカーの同定に基づく診断の方法；
- ・患者がt a s e l i s i b、又はt a s e l i s i bと化学療法剤の組み合わせに反応すると思われるかどうかを決定する方法；
- ・t a s e l i s i b、又はt a s e l i s i bと化学療法剤の組み合わせの除去を監視することにより治療有効性を最適化する方法；
- ・治療抵抗性突然変異の発生を監視することによりt a s e l i s i b、又はt a s e l i s i bと化学療法剤の組み合わせの治療レジメンを最適化する方法；及び
- ・t a s e l i s i b又はt a s e l i s i bと化学療法剤療法の組み合わせによる治療から最大の恩恵を受けるであろう患者を同定し、t a s e l i s i b又はt a s e l i s i bと化学療法剤療法の組み合わせによる治療に対する感受性及び応答性について患者を監視するための方法を含む。

【0138】

本発明の方法は、哺乳動物(例えば、ヒト患者)において、異常な細胞増殖を阻害するため又はがんなどの過剰増殖性疾患を治療するために有用である。例えば、方法は、哺乳動物(例えば、ヒト)の多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病、前立腺がん、乳がん、肝細胞癌、膵臓がん、及び/又は結腸直腸がんを診断、監視、及び治療するために有用である。

【0139】

(1) t a s e l i s i bと(2)化学療法剤の治療的組み合わせは、P I 3キナーゼ経路の活性化によって特徴づけられるものを含むがそれに限定されない疾患、状態及び/又は障害を治療するために有用である。したがって、この発明の別の態様は、P I 3Kを含む脂質キナーゼを阻害することにより治療することのできる疾患又は状態を治療する方法を含む。－実施態様では、固形腫瘍又は造血性悪性腫瘍の治療のための方法は、組み合わせ製剤として又は交換によりt a s e l i s i bを含む治療的組み合わせを哺乳動物に投与することを含み、この治療的組み合わせは、治療的有效量のt a s e l i s i bと、治療的有效量の、5 - F U、ドセタキセル、エリブリン、ゲムシタピン、コピメチニブ(G D C - 0 9 7 3、X L - 5 1 8、C A S R e g . N o . 9 3 4 6 6 0 - 9 3 - 2)、G D C - 0 6 2 3(C A S R e g . N o . 1 1 6 8 0 9 1 - 6 8 - 6)、パクリタキセル、タモキシフェン、フルベストラント、デキサメタゾン、ペルツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、トラスツズマブ及びレトロゾールより選択される－又は複数の化学療法剤とを含む。(1) t a s e l i s i bと(2)化学療法剤の治療的組み合わせは、前悪性及び非腫瘍性又は非悪性過剰増殖性疾患と共に、造血性悪性腫瘍、腫瘍、がん、及び腫瘍性組織を含む、過剰増殖性疾患又は障害の治療のために使用されうる。－実施態様では、ヒト患者は、治療的組み合わせと薬学的に許容される担体、アジュバント、又はビヒクル

10

20

30

40

50

で治療され、前記治療的組み合わせの *t a s e l i s i b*、又はその代謝物は、PI3キナーゼ活性を検出可能に阻害する量で存在する。

【0140】

造血性悪性腫瘍には、非ホジキンリンパ腫、びまん性大造血性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、AML、及びMCLが含まれる。

【0141】

この発明の別の態様は、本明細書に記載される疾患又は状態に罹患した哺乳動物、例えばヒトにおける、そのような疾患又は状態の治療に使用される薬学的組成物又は治療的組み合わせを提供する。さらに提供されるのは、本明細書に記載される疾患又は状態に罹患した恒温動物、例えばヒトなどの哺乳動物におけるそのような疾患の治療のための医薬の調製における薬学的組成物の使用である。

10

【0142】

この発明の別の態様は、治療対象の患者がPIK3CA突然変異を有する、がんの治療に使用される *t a s e l i s i b*を提供し、この場合突然変異は、H1047R、C420R、H1047L、E542K、E545K及びQ546Rより選択される突然変異を含む。

【0143】

この発明の別の態様は、治療対象の患者が、*t a s e l i s i b*とPIK3CA突然変異状態を有する生物学的試料とを接触させた後にp110アルファアイソフォームの枯渇を伴うPIK3CA突然変異を有する、がんの治療に使用される *t a s e l i s i b*を提供し、この場合突然変異はH1047R、C420R、H1047L、E542K、E545K及びQ546Rより選択される突然変異を含む。

20

【0144】

この発明の別の態様は、治療対象がPIK3CA突然変異を有する、がんの治療のための医薬の製造における *t a s e l i s i b*の使用を提供する。

【0145】

この発明の別の態様は、治療対象の患者が、*t a s e l i s i b*とPIK3CA突然変異状態を有する生物学的試料とを接触させた後にp110アルファアイソフォームの枯渇を伴うPIK3CA突然変異を有する、がんの治療のための医薬の製造における *t a s e l i s i b*の使用を提供し、この場合突然変異はH1047R、C420R、H1047L、E542K、E545K及びQ546Rより選択される突然変異を含む。

30

【0146】

この発明の別の態様は、患者が *t a s e l i s i b* との接触後にp110アルファアイソフォームの枯渇を有するがんの治療に使用される *t a s e l i s i b*を提供する。

【0147】

この発明の別の態様は、*t a s e l i s i b*に対する応答性を決定する方法を提供し、この方法は：

a) *t a s e l i s i b*を投与すること；及び

b) 患者から得られた生物学的試料中のp110アルファのレベルと関連したp110アルファ又はバイオマーカーのレベルの変化を測定することを含む。

40

【0148】

本発明の別の態様は、上述に記載される発明を提供する。

【0149】

薬学的組成物及び製剤

本発明の化合物の薬学的組成物又は製剤は、*t a s e l i s i b*と、薬学的に許容される担体、流動促進剤、希釈剤、及び賦形剤のうちの一又は複数とを含む。

【0150】

本発明の化合物の薬学的組成物又は製剤は、第2の化学療法剤をさらに含む。

50

## 【0151】

本発明の突然変異選択的なPI3K結合化合物及び化学療法剤は、非溶媒和形態で存在しても、水、エタノールなどの薬学的に許容される溶媒を用いた溶媒和形態で存在してもよく、本発明は溶媒和形態及び非溶媒和形態の両方を含むことが意図される。

## 【0152】

本発明の化合物は、異なる互変異性形態で存在してもよく、すべてのそのような形態は本発明の範囲内に包含される。用語「互変異性体」又は「互変異性形態」は、低いエネルギー障壁を介して相互変換可能な、異なるエネルギーの構造異性体を指す。例えば、プロトン互変異性体（プロトン移動互変異性体としても知られる）は、プロトンの移動を介する相互変換、例えば、ケト-エノール及びイミン-エナミン異性化反応を含む。原子価互変異性体は、結合電子のうちのいくつかの再編成による相互変換を含む。

10

## 【0153】

薬学的組成物は、突然変異選択的なPI3K結合化合物と、本明細書に記載される追加的薬剤のリストより選択される化学療法剤とを、薬学的に不活性の任意の賦形剤、希釈剤、担体、又は流動促進剤と共に含む複数の（例えば二つの）薬学的に活性の薬剤から構成される、バルク組成物及び個々の投薬単位の両方を包含する。バルク組成物と各個別投薬単位は、固定量の前記薬学的に活性な薬剤を含有することができる。バルク組成物は、個別投薬単位に未だ成形されていない物質である。一の例示的投薬単位は、錠剤、ピル、カプセルなどといった経口投薬単位である。同様に、薬学的組成物を投与することにより患者を治療する方法は、バルク組成物及び個別投薬単位の投与を包含することも意図している。

20

## 【0154】

薬学的組成物は、本明細書において引用されるものと同一であるが、但し一又は複数の原子が、自然界に通常みられる原子質量又は質量数とは異なる原子質量又は質量数を有する原子によって置き換えられている、本発明の同位体標識された化合物も含む。特定される任意の特定の原子又は元素のすべての同位体は、本発明の化合物、及びそれらの使用の範囲内と考慮される。本発明の化合物に包含することができる例示的同位体には、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素、塩素及びヨウ素の同位体、例えば $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{123}\text{I}$ 及び $^{125}\text{I}$ が含まれる。特定の同位体標識された本発明の化合物（例えば、 $^3\text{H}$ 及び $^{14}\text{C}$ で標識されたもの）は、化合物及び/又は基質組織分散アッセイにおいて有用である。トリチウム化（ $^3\text{H}$ ）及び炭素-14（ $^{14}\text{C}$ ）同位体は、それらの調製容易性及び検出可能性のために有用である。さらに、重水素（ $^2\text{H}$ ）といったもっと重い同位体による置換は、代謝安定性の向上（例えば、*in vivo*での半減期の延長又は投薬関連要件の低減）に起因する特定の治療上の利益を提供し、したがって状況によっては好まれうる。 $^{15}\text{O}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{11}\text{C}$ 及び $^{18}\text{F}$ といった陽電子放出同位体は、基質受容体占有状態を調べるためのポジトロン断層撮影（PET）の研究において有用である。同位体標識された本発明の化合物は、一般に、以下の実施例に記載されるものと類似の手順に従って、同位体標識された試薬で非同位体標識試薬を置換することにより、調製することができる。

30

40

## 【0155】

Taselisibは、ヒトを含む哺乳動物の過剰増殖障害の治療的処置（予防的処置を含む）のための治療的組み合わせにおいて使用される、標準の薬務に従って製剤設計される。本発明は、一又は複数の薬学的に許容される担体、流動促進剤、希釈剤、添加剤、又は賦形剤と併せて突然変異選択的なPI3K結合化合物を含む薬学的組成物を提供する。

## 【0156】

好適な担体、希釈剤、添加剤、及び賦形剤は当業者に周知であり、例えば、炭水化物、ワックス、水溶性及び/又は膨潤性ポリマー、親水性又は疎水性材料、ゼラチン、油、溶媒、水などの材料を含む。使用される特定の担体、希釈剤又は賦形剤は、本発明の化合物

50

が適用される手段および目的に依存するであろう。溶媒は、哺乳動物に投与することが安全であると当業者によって認識されている（GRAS）溶媒に基づいて通常選択される。一般に、安全な溶媒は非毒性の水性溶媒、例えば水、及び水に可溶性又は混和性である他の非毒性溶媒である。適切な水性溶媒は、水、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール（例えば、PEG 400、PEG 300）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、クレモホール（例えばクレモホールEL（登録商標）、BASF）、及びこれらの混合物を含む。製剤は、薬物（すなわち、本発明の化合物又はその薬学的組成物）を見栄え良く提供するため又は薬学的製品（すなわち、医薬）の製造を補助するための、一又は複数のバッファー、安定剤、界面活性剤、湿潤剤、平滑剤、乳化剤、懸濁化剤、保存料、酸化防止剤、不透明化剤、流動促進剤、加工助剤、着色料、甘味料、香料、香味料及びその他既知の添加剤も含みうる。

10

## 【0157】

本発明の化合物の薬学的製剤は、種々の投与経路及び投与タイプのために調製されうる。例えば、所望の純度を有する突然変異選択的なPI3K結合化合物は、凍結乾燥製剤、破砕粉体、又は水溶液の形態において、任意選択的に、薬学的に許容される希釈剤、担体、賦形剤又は安定剤と混合することができる（Remington's Pharmaceutical Sciences（1995）18th edition, Mack Publ. Co., Easton, PA）。

## 【0158】

本発明の薬学的製剤は、医学行動規範に則った様式、即ち、量、濃度、予定、過程、ピヒクル及び投与経路で投薬及び投与される。

20

## 【0159】

一用量当たりの経口又は非経口投与されるtaselisibの初期薬学的有効量は、約0.01～1000mg/kgの範囲、即ち患者の体重1kg当たり一日約0.1から20mgであり、使用される化合物の典型的な初期範囲は0.3から15mg/kg/日である。投与されるtaselisibの用量と化学療法剤の用量は、それぞれについて単位投与形態当たり約1mgから約1000mg、又は単位投与形態当たり約10mgから約100mgの範囲とすることができる。taselisibと化学療法剤の用量は、重量で約1：50から約50：1の比率で、又は重量で1：10から約10：1の比率で投与されうる。

## 【0160】

許容可能な希釈剤、担体、賦形剤及び安定剤は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のようなバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む、単糖類、二糖類及び他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；及びノ又はTWEEN<sup>TM</sup>、CREMOPHOR<sup>EL</sup>（登録商標）、PLURONICS<sup>TM</sup>若しくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。活性薬剤成分はまた、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合により調製したマイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）において又はマクロエマルジョンにおいて、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンのマイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に封入されてもよい。このような技術はRemington's Phar

30

40

50

maceutical Sciences 18th edition, (1995) Mack Publ. Co., Easton, PAに開示されている。

【0161】

t a s e l i s i b及び化学療法化合物の徐放性調製物を調製することができる。徐放性調製物の好適な例は、t a s e l i s i bを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、このマトリックスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とガンマ-エチル-L-グルタメートとの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOSIT<sup>TM</sup>（乳酸-グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフェア）のような分解性乳酸-グリコール酸共重合体、並びにポリ-D-( )<sub>3</sub>-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

10

【0162】

薬学的製剤は、本明細書に詳述される投与経路に適したものを含む。製剤は、好都合には、単位投与形態で提供され、薬学分野で周知の任意の方法によって調製することができる。技術及び製剤は、一般に、Remington' Pharmaceutical Sciences 18<sup>th</sup> Ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PAに見出される。このような方法は、活性成分を、一又は複数の副成分を構成する担体と会合させることを含む。一般に、製剤は、活性成分を、液体の担体、又は微細に分割された固体の担体、又はそれら両方と均一に及び緊密に会合させ、次いで必要に応じて製品を成形することにより調製される。

20

【0163】

経口投与に適したt a s e l i s i b及び/又は化学療法剤の製剤は、ピル、硬性若しくは軟性（例えば、ゼラチン）のカプセル、カシェ剤、トローチ、ロゼンジ、水性若しくは油性の懸濁液、分散可能な粉末又は顆粒、乳剤、シロップ剤又はエリキシル剤といった個別の単位として調製することができる。これらの各々は所定量のt a s e l i s i b及び/又は化学療法剤を含有する。t a s e l i s i bの量と化学療法剤の量は、組み合わせ製剤としてピル、カプセル、溶液又は懸濁液に製剤化することができる。代替的に、t a s e l i s i b及び化学療法剤は、交互に投与するためのピル、カプセル、溶液又は懸濁液に別々に製剤化されてもよい。

30

【0164】

製剤は、薬学的組成物の製造のための当技術分野で既知の任意の方法に従って調製ことができ、このような組成物は、口触りのよい調製物を提供するために、甘味剤、香味剤、着色剤及び保存剤を含む一又は複数の薬剤を含有することができる。圧縮錠剤は、結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、防腐剤、表面活性剤又は分散剤と任意選択的に混合された、粉末又は顆粒といった易流動性形態に、例えば、好適な機械において活性成分を圧縮することにより、調製される。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状の活性成分の混合物を、適切な機械において成形することにより製造することができる。これらの錠剤は、任意選択的にコーティングされても刻み目を入れられてもよく、任意選択的に錠剤からの活性成分の徐放又は制御放出をもたらすように製剤化される。

40

【0165】

本発明の薬学的製剤の錠剤型賦形剤には：錠剤を形成する粉末薬のバルク体積を増加させるための充填剤（又は希釈剤）；摂取されて薬物の急速な分解及び吸収を促進するとき、錠剤を、小さな断片、理想的には個々の薬物粒子に分解することを助ける崩壊剤；顆粒と錠剤が必要な機械的強度を有するように形成されて、圧密化後に錠剤を一体に保持することにより、包装、輸送及び常套的取扱い中にその成分粉末に分解することを確実に防止できるようにするための結合剤；製造の間に錠剤を形成する粉末の流動性を改善するための流動促進剤；錠剤成形用粉末が、製造の間に錠剤をプレス加工するために使用される機器に付着することを確実に防ぐための潤滑剤が含まれる。これら錠剤賦形剤は、プレス機を通る粉末混合物の流れを改善して、完成した錠剤が機器から送出される際の摩擦及び

50

損傷を最小化するもので；流動促進剤の機能と同様の機能を有する抗被着材は、錠剤を形成する粉末と、製造の間に錠剤の形状を穿孔するために使用される機械との接着を低減し；香味剤は、味をさらに良くするか、又は不快な味を隠すために錠剤に取り込まれ；着色剤は識別及び患者のコンプライアンスを補助する。

【 0 1 6 6 】

錠剤の製造に適した薬学的に許容される非毒性の賦形剤を含む混合剤中に活性成分を含有する錠剤は許容可能である。これら賦形剤は、例えば、炭酸カルシウム又は炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウムなどの不活性希釈剤；トウモロコシでんぷん又はアルギン酸などの造粒剤及び崩壊剤；でんぷん、ゼラチン又はアカシアなどの結合剤；及びステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクなどの潤滑剤であってよい。錠剤はコーティングされていなくてもよいが、胃腸管内の崩壊及び吸着を遅延させ、それによってより長期間にわたる持続的作用を提供するために、マイクロカプセル化を含む既知の技術によってコーティングされていてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリルなどの時間遅延材料が、単独で又はワックスとともに用いられてもよい。

10

【 0 1 6 7 】

薬学的組成物は、滅菌注射用水性又は油性懸濁液といった、無菌注射用製剤の形態であってもよい。この懸濁液は、従来技術に従い、上述した好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を用いて製剤化することができる。無菌注射用製剤は、例えば 1, 3 - ブタンジオール中の溶液など、非経口投与可能な非毒性の希釈剤又は溶媒中の溶液又は懸濁液であるか、又は凍結乾燥粉末から調製されてよい。使用されうる許容可能なビヒクル及び溶媒には、水、リンゲル液及び等張食塩水がある。さらに、滅菌不揮発性油が、溶媒又は懸濁媒として一般に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリド又は合成ジグリセリドを含め、任意の無刺激不揮発性油を用いることができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸を、同様に注射物の調製に用いることができる。

20

【 0 1 6 8 】

製剤は、単位用量又は複数用量の容器、例えばシールされたアンプル及びバイアルの中に包装することができ、注射のためには使用直前に滅菌された液体担体、例えば水を添加するだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で貯蔵することができる。即席の注射溶液及び懸濁液は、前述の種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製される。好ましい単位投与製剤は、本明細書において上述の、一日の用量若しくはサブ用量（*sub-dose*）、又はその適切な部分用量の活性成分を含有するものである。

30

【 0 1 6 9 】

本発明は、上に定義した少なくとも一の活性成分を、そのための獣医学用担体とともに含む、獣医学的組成物をさらに提供する。獣医学的担体は、組成物を投与する目的に有用な物質であり、それ以外の場合に不活性であるか又は獣医学の分野で許容される、活性成分と適合性の固体、液体又は気体物質とすることができる。これら獣医学的組成物は、非経口、経口で、又は他のいずれかの所望の経路によって投与することができる。

【 0 1 7 0 】

併用療法

40

*T a s e l i s i b* は、前悪性及び非腫瘍性又は非悪性の過剰増殖性疾患と共に、固形腫瘍又は造血性悪性腫瘍を含む過剰増殖性疾患の治療のための特定の化学療法剤と組み合わせることができる。特定の実施態様では、*t a s e l i s i b* は、組み合わせの同時投与のための単一の錠剤、ピル、カプセル、又は溶液として、化学療法剤と単剤に組み合わせられる。他の実施態様では、*t a s e l i s i b* と化学療法剤は、投薬レジメン又は治療法の過程に従って、*t a s e l i s i b* と、5 - F U、ドセタキセル、エリブリン、ゲムシタピン、G D C - 0 9 7 3、G D C - 0 6 2 3、パクリタキセル、タモキシフェン、フルベストラント、デキサメタゾン、ペルツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、トラスツズマブ及びレトロゾールより選択される化学療法剤との順次的投与のための、別個の錠剤、ピル、カプセル、又は溶液としての別個の製剤で投与される。化学療法剤は

50

、抗過剰増殖特性を有するか、又は過剰増殖性疾患の治療に有用である。taselisibと化学療法剤の組み合わせは、相乗的特性を有しうる。薬学的組み合わせ製剤又は投与レジメンの化学療法剤は、好ましくは、互いに悪影響を与えないような、taselisibを補完する活性を有する。治療的組み合わせのこのような化合物は、意図した目的に有効な量で投与される。一実施態様では、この発明の薬学的製剤は、taselisibと本明細書に記載されるような化学療法剤とを含む。別の実施態様では、治療的組み合わせは、治療的有効量のtaselisibが一日二回から三週毎(q3wk)の範囲で投与され、治療的有効量の化学療法剤が、一日二回から三週毎の範囲で別個に、交互に投与される投与レジメンにより投与される。

【0171】

本発明の治療的組み合わせは、過剰増殖性疾患の治療における別個の、同時の又は順次的使用のための、taselisibと、5-FU、ドセタキセル、エリブリン、ゲムシタピン、GDC-0973、GDC-0623、パクリタキセル、タモキシフェン、フルベストラント、デキサメタゾン、ペルツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、トラスツズマブ及びレトロゾールより選択される化学療法剤とを含む。

【0172】

併用療法は、同時の又は順次的な投与レジメンとして投与されてよい。順次的に投与される場合、組み合わせは、二回以上の投与において投与されうる。併用投与には、別個の製剤又は単一の薬学的製剤を使用する同時投与、及び任意の順序での連続投与が含まれ、その際、両方の(又はすべての)活性剤がそれらの生物学的活性を同時に発揮する期間があることが好ましい。

【0173】

上記の同時投与される任意の薬剤の好適な投与量は、現在使用されているものであり、新たに同定される薬剤及び他の化学療法剤、又は例えば治療インデックスを上昇させる又は毒性若しくは他の副作用又は結果を軽減するための、他の化学療法剤治療の複合作用(相乗効果)により減じられる可能性がある。

【0174】

抗がん療法の特定の実施態様では、治療的組み合わせは、アジュバント療法としての外科的療法及び放射線療法と組み合わせることができる。本発明による併用療法は、taselisibの投与と、一又は複数の他のがん治療方法若しくは様式とを含む。taselisibと(一又は複数の)化学療法剤の量と、それぞれの投与タイミングは、所望の併用治療効果を達成するために選択されるだろう。

【0175】

薬学的組成物の投与

本発明の治療的組み合わせは、治療される状態に適した任意の経路により投与することができる。適切な経路には、経口、非経口(皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、吸入、皮内、髄腔内、硬膜外、及び点滴技術を含む)、経皮、直腸内、鼻腔内、局所(頬側及び舌下を含む)、腔内、腹腔内、肺内及び鼻腔内が含まれる。局所投与は、経皮パッチ又はイオントホレシス装置といった経皮投与の使用も含むことができる。薬物の製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton, PAにおいて議論されている。薬物の他の例は、Lieberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol 3, 2<sup>nd</sup> Ed., New York, NYに見ることができる。局所的な免疫抑制治療のために、化合物は、移植前に移植片を灌流適用するか、又は他の方法で阻害剤と接触させることを含む病巣内投与によって投与されうる。好ましい経路は、例えばレシピエントの状態によって変わりうることを理解されよう。化合物は、経口投与される場合、薬学的に許容される担体、流動促進剤、又は賦形剤とピル、カプセル、錠剤などとして製剤化されうる。化合物は、非経口投与される場合、薬学的に許容される非経口ビヒクル又は希釈剤と共に、後述のような注射可能な単位投与形態で製剤化されうる。

【0176】



ヒト患者を治療するための用量は、約1 mgから約1000 mgのtaselisib、例えば約5 mgから約20 mgの化合物とすることができる。用量は、特定の化合物の吸収、分布、代謝、及び排泄を含む薬物動態学的(PK)及び薬力学的(PD)特性に応じて、一日一回(QD)、一日二回(BID)、又はそれよりも頻りに投与されうる。加えて、毒性係数が、投薬量及び投与用量投与レジメンに影響を及ぼしうる。経口投与されるとき、ピル、カプセル、又は錠剤は、一日二回、毎日、又はそれよりも少ない頻度で、例えば毎週又は二若しくは三週毎に、特定の期間にわたって摂取されうる。レジメンは、療法の複数周期にわたって繰り返されてよい。

#### 【0177】

##### 製造品

本発明の別の実施態様において、上記の疾患及び障害の治療に有用なtaselisibを含む製品又は「キット」が提供される。一実施態様では、キットはtaselisibを含む容器を備える。キットは、容器上に又は容器に付属するラベル又は添付文書をさらに含む。「添付文書」という用語は、このような治療製品の使用に関する、指示、使用法、用量、投与、禁忌及び/又は注意事項についての情報を含む、治療製品の商品包装に通例含まれる説明書を指すために使用される。適切な容器は、例えばボトル、バイアル、シリンジ、プリスターバッグなどを含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成されうる。容器は、病態を治療するのに有効なtaselisib又はその製剤を保持することができ、無菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は、皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有する静脈注射用溶液のバッグ又はバイアルとすることができる)。組成物中の少なくとも一の活性剤はtaselisibである。ラベル又は添付文書には、組成物が、がんなどの選択した病態の治療のために使用されることが示される。一実施態様において、ラベル又は添付文書に、式Iの化合物を含む組成物が、異常な細胞増殖から生じる障害を治療するために使用されることが示される。ラベル又は添付文書には、この組成物が、他の障害を治療するために使用できることが示されてもよい。代替的に、又は追加的に、製造品は、薬学的に許容可能なバッファー、例えば注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液を含む第二の容器をさらに含んでもよい。製造品は、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含め、商業的及び使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含んでもよい。

#### 【0178】

キットは、taselisibと、存在する場合、第2の薬学的製剤の投与のための説明書をさらに含むことができる。例えば、キットがtaselisib及び第2の薬学的製剤を含む第1の組成物を含む場合、キットは、第1及び第2の薬学的組成物を、それを必要とする患者に、同時投与、連続投与又は個別投与するための説明書をさらに含むことができる。

#### 【0179】

別の実施態様において、キットは、錠剤又はカプセル剤などのtaselisibの固体経口形態の送達に適している。このようなキットは、複数の単位投与量を含むことが好ましい。このようなキットは、意図された使用のための投薬量を記載したカードを含むことができる。このようなキットの例は「プリスターパック」である。プリスターパックは、包装産業において周知であり、薬学的単位投与形態を包装するために広く使用されている。必要であれば、記憶の助けとなるものを、例えば数字、文字、若しくは他のマーキングの形態で、又は投薬量を投与できる治療スケジュールの日にちを示すカレンダー挿入物と共に、提供することができる。

#### 【0180】

一実施態様によれば、キットは、(a)taselisibが中に含まれる第1の容器；及び任意選択的に(b)第2の薬学的製剤が中に含まれる第2の容器を含み、この場合第2の薬学的製剤は、抗過剰増殖活性を有する第2の化合物を含む。代替的に、又は追加的に、キットは、薬学的に許容可能なバッファー、例えば注射用静菌水(BWFI)、リ

10

20

30

40

50

ン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液を含む第三の容器をさらに含んでもよい。製造品は、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及び使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含んでもよい。

#### 【0181】

キットは、taselisibと第2の治療剤、即ち化学療法剤を含む場合、例えば分けられた瓶又は分けられたホイル小包(packet)など、別個の組成物を収容するための容器を含むことができるが、別個の組成物は、分けられていない単一の容器の中に収容されてもよい。一般的に、キットは、別個の成分を投与するための説明書を含む。キットの形態は、別個の成分を異なる投与形態(例えば経口と非経口)で投与することが好ましいとき、異なる投与間隔で投与するとき、又は処方医師が組み合わせられる個々の成分の滴定を望むとき、特に有利である。

10

#### 【実施例】

#### 【0182】

実施例1 p110 (アルファ)PI3K結合アッセイ

結合アッセイ:最初の偏光実験は、Analyst HT 96-384 (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA)において実施された。蛍光偏光親和性測定のための試料を、偏光バッファー(10mMのTris(pH7.5)、50mMのNaCl、4mMのMgCl<sub>2</sub>、0.05%のChaps、及び1mMのDTT)中最終濃度20ug/mLから開始して10mMのPIP<sub>2</sub> (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT)最終濃度まで1:3に段階希釈したp110アルファPI3K (Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, VA)の付加により調製した。室温で30分のインキュベーション時間の後、GRP-1及びPIP3-TAMRAプローブ(Echelon-Inc., Salt Lake City, UT)の付加により反応を止めた。最終濃度はそれぞれ100nM及び5nMであった。384ウェルのブラックローボリュームProxiplates (登録商標) (PerkinElmer, Wellesley, MA.)においてローダミンフルオロフォア用の標準のカットフィルター(ex=530nm; em=590nm)により読み取りを行った。蛍光偏光の値をタンパク質濃度の関数としてグラフ化した。EC<sub>50</sub>値は、KaleidaGraph (登録商標)ソフトウェア(Synergy software, Reading, PA)を用いて4パラメーター方程式にデータを当てはめることにより得られた。この実験は、続いて行われる阻害剤を用いた競合実験に用いられる適切なタンパク質濃度も確立する。

20

30

#### 【0183】

阻害剤のIC<sub>50</sub>値は、PIP<sub>2</sub> (10mMの最終濃度)と組み合わせた0.04mg/mLのp110アルファPI3K (最終濃度)を、偏光バッファー中最終濃度25mMのATP (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA)中で1:3に段階希釈したアンタゴニストを含むウェルに対して付加することにより決定された。室温で30分のインキュベーション時間の後、GRP-1及びPIP3-TAMRAプローブ(Echelon-Inc., Salt Lake City, UT)の付加により反応を止めた。最終濃度はそれぞれ100nM及び5nMであった。384ウェルのブラックローボリュームProxiplates (登録商標) (PerkinElmer, Wellesley, MA)においてローダミンフルオロフォア用の標準のカットフィルター(ex=530nm; em=590nm)により読み取りを行った。蛍光偏光の値をアンタゴニスト濃度の関数としてグラフ化し、Assay Explorerソフトウェア(MDL, San Ramon, CA)においてデータを4パラメーター方程式に当てはめることによりIC<sub>50</sub>値を得た。

40

#### 【0184】

代替的に、PI3Kの阻害を、精製した組み換え酵素及びATPを濃度1μM(マイクロモル)で用いる放射測定アッセイにおいて決定した。化合物は100%のDMSO中において段階希釈した。キナーゼ反応を室温で1時間インキュベートし、PBSの付加によ

50

り反応を終了させた。その後、 $IC_{50}$  値を、シグモイド用量反応曲線フィッティング（可変スロープ）を用いて決定した。

【0185】

実施例2 *in vitro*での細胞増殖アッセイ

細胞の培養：細胞株を、10%のウシ胎児血清、100 U/mLのペニシリン、及び100 µg/mLのストレプトマイシンを含むRPMI培地において、標準の組織培養条件下で増殖させた。HCC-1954及びHDQ-P1は、乳がん細胞株（American Type Culture Collection; Manassas, VA）である。HCC-1954及びHDQ-P1細胞を、6ウェルの組織培養プレートの各ウェルに、800,000細胞/ウェルで配置し、37℃で一晩インキュベートした。細胞を、各化合物に示された濃度で24時間インキュベートした。インキュベーションに続いて、細胞を、冷たいリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で一度洗浄し、プロテアーゼ阻害剤（F. Hoffman-Laroché; Mannheim, Germany）、1mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド、及びホスファターゼ阻害剤カクテル1及び2（Sigma-Aldrich; St. Louis, MO）を補充したBiosource™ Cell Extraction Buffer（Invitrogen; Carlsbad, CA）中に溶解した。タンパク質濃度を、Pierce BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL）を用いて決定した。

10

【0186】

PI3K結合化合物の有効性を、以下のプロトコルを用いる細胞増殖アッセイ（Mendoza et al. (2002) Cancer Res. 62 (5485-5488)）により測定した。

20

【0187】

Cell Titer - Glo（登録商標）Luminescent Cell Viability Assayは、代謝的に活性な細胞の存在を示す、存在するATPの定量化に基づいて培養物中における生細胞の数を決定する均一な方法である。Cell Titer - Glo（登録商標）Assayは、マルチウェルプレートフォーマットに使用するために設計されており、自動ハイスループットスクリーニング（HTS）、細胞増殖及び細胞傷害性アッセイのために理想的である。均一なアッセイの手順には、単一試薬（Cell Titer - Glo（登録商標）Reagent）を、血清を補充した培地において培養された細胞に直接付加することが含まれる。細胞洗浄、培地の除去又は複数のピペティングの工程は不要である。試薬及びプロトコルを含め、The Cell Titer - Glo（登録商標）Luminescent Cell Viability Assayは市販されている（Promega Corp., Madison, WI, Technical Bulletin TB288）。

30

【0188】

このアッセイは、細胞に入り込んで細胞増殖を阻害する化合物の能力を評価する。アッセイの原理は、Cell Titer - Glo（登録商標）試薬の付加により細胞が溶解し、ルシフェラーゼ反応により発光性シグナルが生成される均一アッセイにおいて、存在するATPを定量化することによる、存在する生細胞の数の決定に基づいている。発光性シグナルは、存在するATPの量に比例している。

40

【0189】

手順：1日目 - 細胞プレートの播種（Falcon #353962：384ウェル、ブラック、透明底、マイクロクリア、蓋付きTCプレート）、細胞回収、3日間のアッセイのために1ウェル54 µl当たり1000個の細胞を384ウェルのセルプレートに播種。細胞培地：RPMI又はDMEM高グルコース、10%のウシ胎児血清、2mMのL-グルタミン、P/S。37℃、5%のCO<sub>2</sub>でO/N（一晩）インキュベート。

【0190】

2日目 - 細胞への薬物付加、化合物希釈、DMSOプレート（9ポイントについて1：2の段階）。96ウェルプレートの第2のカラム内で20 µlの化合物を10mMで付加

50

。全部で9のポイントについて、NuncのPrecision Media Plates 96ウェル円錐底ポリプロピレンプレート (cat. # 249946) を用いて、プレート全体に1:2の段階を実施する(10 $\mu$ l + 20 $\mu$ lの100% DMSO) (1:50希釈)。147 $\mu$ lの培地をすべてのウェルに加える。3 $\mu$ lのDMSO + 化合物を、Rapid plate (登録商標) (Calipe, a Perkin-Elmer Co.) を用いてDMSOプレートの各ウェルからMedia Plate上のそれぞれに対応するウェルに移す。2つの薬物の組み合わせの試験のために、一方の薬物である1.5 $\mu$ lのDMSO + 化合物を、Rapid plateを用いてDMSOプレートの各ウェルからMedia Plate上のそれぞれに対応するウェルに移す。次いで、他方の薬物1.5 $\mu$ lを培地プレートに移す。

10

## 【0191】

細胞への薬物付加、細胞プレート(1:10の希釈): 6 $\mu$ lの培地 + 化合物を細胞に直接付加する(細胞には既に54 $\mu$ lの培地)。頻繁に開閉されないインキュベーター内で3日間37、5%のCO<sub>2</sub>でインキュベートする。

## 【0192】

5日目 - プレートの増殖、室温でのCell Titer Gloバッファ-解凍: 細胞プレートを37 から除去し、約30分間室温に均衡させる。Cell Titer - Glo (登録商標) バッファ-をCell Titer - Glo (登録商標) 基質に付加する(ボトルからボトルへ)。30 $\mu$ lのCell Titer - Glo (登録商標) Reagent (Promega cat. # G7572) を各ウェルの細胞に付加する。プレートシェーカーに約30分間置く。Analyst HT Plate Readerで発光を読み取る(1ウェル当たり1/2秒)。

20

## 【0193】

細胞生存率アッセイ及び組み合わせアッセイ: 384ウェルプレートにおいて細胞を1000 ~ 2000細胞/ウェルで16時間播種した。二日目に、9つの連続した1:2の化合物希釈物を、96ウェルプレートにおいてDMSO中で作製した。Rapid plate (登録商標) ロボット (Zymark Corp., Hopkinton, MA) を用いて化合物をさらに増殖培地中に希釈した。希釈した化合物を、次いで384ウェル細胞プレートの4つ一組のウェルに加え、37 及び5%のCO<sub>2</sub>でインキュベートした。4日後、生細胞の相対数を、製造者の指示に従ってCell Titer - Glo (登録商標) (Promega) を用いて発光により測定し、Wallac Multilabel Reader (登録商標) (PerkinElmer, Foster City) で読み取った。EC50値を、Prism (登録商標) 4.0 ソフトウェア (GraphPad, San Diego) を用いて計算した。組み合わせアッセイにおける薬物の投与は、4X EC<sub>50</sub> 濃度から開始された。薬物のEC50が> 2.5 $\mu$ Mである場合、用いた最大濃度は10 $\mu$ Mであった。PI3K結合化合物及び化学療法剤は、すべてのアッセイにおいて、同時に又は4時間の間隔を空けて(順に)付加された。

30

## 【0194】

追加的且つ例示的な *in vitro* での細胞増殖アッセイは、以下の工程を含む:

1. 培地中に約10<sup>4</sup>個の細胞を含む細胞培養物100 $\mu$ lのアリコート(細胞株及び腫瘍種類については表3を参照)を、384ウェルの不透明な壁を有するプレートの各ウェルに配した。

40

2. 培地のみで細胞を含まないコントロールウェルを準備した。

3. 化合物を実験ウェルに加え、3 ~ 5日間インキュベートした。

4. プレートを、約30分間室温に平衡化した。

5. 各ウェル中に存在する細胞培養培地の体積に等しい体積のCell Titer - Glo (登録商標) 試薬を加えた。

6. 内容物をオービタルシェーカーで2分間混合し、細胞溶解を誘導した。

7. プレートを室温で10分間インキュベートし、発光シグナルを安定化させた。

8. 発光を記録し、RLU = 相対発光単位としてグラフに報告した。

50

9. ChouとTalalayの組み合わせ方法及びCalcuSyn(登録商標)ソフトウェアを用いるDose-Effect Analysis(Biosoft、Cambridge、UK)を使用して分析し、組み合わせ指標を得る。

【0195】

代替的に、細胞を最適な密度で96ウェルプレートに播種し、4日間試験化合物の存在下でインキュベートした。その後Alamar Blue<sup>TM</sup>をアッセイ培地に加え、細胞を6時間インキュベートした後に544nm励起、590nm放出において読み取った。EC<sub>50</sub>値を、シグモイド用量応答曲線フィッティングを用いて計算した。

【0196】

代替的に、増殖/生存率を、Cell Titer-Glo(登録商標)試薬(Pro-mega Inc.、Madison、WI)を用いて薬物処理の48時間後に分析した。すべての生存率アッセイにおいてDMSO処理をコントロールとして用いた。IC<sub>50</sub>値を、XLフィッティングソフトウェア(IDBS、Alameda、CA)を用いて計算した。

10

【0197】

細胞株は、ATCC(American Type Culture Collection、Manassas、VA)又はDSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、Braunschweig、DE)から得た。細胞を、10%のウシ胎児血清、100単位/mlのペニシリン、2mMのL-グルタミン、及び100mg/mlのストレプトマイシン(Life Technology、Grand Island、NY)を補充したRPMI 1640培地で、5%のCO<sub>2</sub>下において37℃で培養した。

20

【0198】

実施例3 SW48同質遺伝子的細胞株生存率アッセイ

細胞の培養：細胞株は、American Type Culture Collection(ATCC、VA)又はDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ、Germany)から得た。細胞株を、10%のウシ胎児血清、100単位/mlのペニシリン、及び100µg/mlのストレプトマイシンを補充したDMEM又はRPMI中で、5%のCO<sub>2</sub>下において37℃で培養した。MCF7-neo/HER2は、Genentech社で開発された、*in vivo*で選択される腫瘍細胞株であり、親MCF7ヒト乳がん細胞株に由来する。同質遺伝子的細胞株(SW48親、SW48E545K、及びSW48H1047R)を、Horizon Discovery Ltd.(Cambridge、UK)からライセンスし、10%のウシ胎児血清、100単位/mlのペニシリン、及び100µg/mlのストレプトマイシンを補充したMcCoy's 5Aにおいて、5%のCO<sub>2</sub>下において37℃で培養した。

30

【0199】

細胞生存率アッセイ：384ウェルプレートに、1ウェル当たり54µlの容積において1000から2000細胞/ウェルで播種した後、5%のCO<sub>2</sub>下において一晚(~16時間)37℃でインキュベートした。化合物をDMSO中において希釈し、所望のストック濃度を生成し、次いで1ウェル当たり6µLの容積に加えた。すべての処理は4つ一組で試験された。4日間のインキュベーション後、Cell Titer-Glo(Pro-mega、Madison、WI)を用いて生細胞の相対数を予測し、全発光をWallac Multilabel Reader(PerkinElmer、Foster City、CA)で測定した。細胞生存率の50%阻害をもたらした薬物の濃度(IC<sub>50</sub>)又は50%最大有効濃度(EC<sub>50</sub>)を、Prismソフトウェア(GraphPad、La Jolla、CA)を用いて決定した。IC<sub>50</sub>を達成できなかった細胞株については、試験した最大濃度(10µM)を記録する。

40

【0200】

実施例4 *in vivo*でのマウス腫瘍異種移植片有効性

50

マウス：雌の重症複合免疫不全マウス (Fox Chase SCID (登録商標), C. B - 17 / Icr Hsd, Harlan) 又はヌードマウス (Taconic Farms, Harlan) は、週齢8から9であり、試験0日目の体重範囲は15.1から21.4グラムであった。動物に水 (逆浸透、1 ppm Cl) 及び18.0%の粗タンパク質、5.0%の粗脂肪、及び5.0%の粗繊維からなる NIH 31 Modified and Irradiated Lab Diet (登録商標) を自由に摂らせた。マウスを、12時間の照明サイクル及び21~22 (華氏70~72度) 及び湿度40~60%で静止マイクロアイソレーター内の照射 ALPHA - Dri (登録商標) bed - o'cobs (登録商標) Laboratory Animal Bedding に收容した。PRCは、具体的には、耐性、飼育、外科手技、給餌及び流体の管理、並びに動物医薬ケアに関して、Guide for Care and Use of Laboratory Animalsの推奨に準拠する。PRCの動物のケア及び使用プログラムは、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC) によって認証されており、これは実験動物のケア及び使用の許容基準への準拠を保証する。

10

## 【0201】

腫瘍移植：異種移植をがん細胞で開始した。細胞を、10%のウシ胎児血清、2 mMのグルタミン、100単位/mLのペニシリン、100 µg/mLの硫酸ストレプトマイシン及び25 µg/mLのゲンタマイシンを補充したRPMI 1640培地で培養した。細胞を、指数増殖期の中に回収し、細胞株の倍加時間に応じて $5 \times 10^6$ 又は $10 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に再懸濁した。腫瘍細胞を右側腹部に皮下移植し、平均サイズが100から150 mm<sup>3</sup>の標的範囲に近づく際の腫瘍増殖を監視した。試験の0日目として設計された、腫瘍移植の21日後、マウスを四群に分けた。各群は、それぞれが75~172 mm<sup>3</sup>の範囲の腫瘍体積及び120~121 mm<sup>3</sup>の群の平均腫瘍体積を有する10匹のマウスからなっていた (付録A参照)。体積は、式：

20

腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) = (w<sup>2</sup> × l) / 2 [ w = 腫瘍の幅、l = 腫瘍の長さ (mm) ] を用いて計算した。腫瘍重量は、1 mg が腫瘍体積 1 mm<sup>3</sup> と等しいと仮定して予測される。

30

## 【0202】

治療剤：PI3K結合化合物を、73%の活性剤を含む塩形態の乾燥粉末として供給し、室温で光から保護した状態で貯蔵した。薬物用量を、0.5%のメチルセルロース中において毎週調製した：脱イオン水 (「ビヒクル」) 中0.2%のTween 80を4で貯蔵した。73%の活性剤を含む塩形態が、G-033829用量の製剤に含まれた。PI3K結合化合物の用量は、各投薬日に、ストックのアリコートを滅菌生理食塩水 (0.9%のNaCl) で希釈することにより調製された。すべての用量は、体重20グラムにつき0.2 mL (10 mL / kg) の容量で前述のmg / kg用量を送達するために製剤化された。

## 【0203】

処置：すべての用量は、個々の動物の体重に比例し、各図に示される経路により提供された。

40

## 【0204】

エンドポイント：腫瘍体積を、Ultra Cal IVノギス (Model 5410 111; Fred V. Fowler Company) を用いて、腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) = (長さ × 幅<sup>2</sup>) × 0.5により2次元 (長さ及び幅) において測定し、Excel version 11.2 (Microsoft Corporation) を用いて分析した。線形混合効果 (LME) モデル化手法を用いて、同じ動物から経時的に得た腫瘍体積の繰り返し測定を分析した (Pinheiro J, et al. nlme: linear and non-linear mixed effects models. R package version 3.1 92. 2009; Tan N, et al. Navitoc

50

lax enhances the efficacy of taxanes in non-small cell lung cancer models. Clin. Cancer Res. 2011;17(6):1394-1404)。この手法は、繰り返し測定と、試験終了前の動物の非処理関連死に起因するわずかな脱落の両方に対処する。キュービック回帰スプライン(cubic regression spline)を用いて、非線形プロファイルを、各用量レベルにおけるlog<sub>2</sub>腫瘍体積の経時変化に適合させた。次いでこれら非線形プロファイルを、混合モデル内の用量に関連させた。ビヒクルコントロールのパーセント(% TGI)としての腫瘍増殖阻害を、以下の式を用いて、各用量群について、ビヒクルに対する1日当たりの近似曲線下面積(AUC)のパーセンテージとして計算した： $\% TGI = 100 \times (1 - AUC_{\text{用量}} / AUC_{\text{ビヒクル}})$ 。この式を用いて、100%のTGI値は腫瘍静止を示し、>1%且つ<100%のTGI値は腫瘍増殖の減速を、>100%のTGI値は腫瘍縮小を、それぞれ示す。動物の部分寛解(PR)は、開始腫瘍体積の>50%且つ<100%の腫瘍縮小と定義された。完全寛解(CR)は、試験中の任意の日における100%の腫瘍縮小(即ち、測定可能な腫瘍がないこと)と定義された。

10

## 【0205】

毒性：動物の体重は、試験のはじめの五日間は毎日測定し、その後は週に二回測定した。動物の体重は、Adventurer Pro(登録商標)AV812ハカリ(Ohaus Corporation)を用いて測定した。パーセント重量変化を：体重の変化(%) = [(重量<sub>当日</sub> - 重量<sub>0日目</sub>) / 重量<sub>0日目</sub>] × 100に従って計算した。マウスを、あらゆる有害な治療関連副作用の徴候について頻繁に観察し、毒性の臨床徴候が観察されたとき記録した。許容可能な毒性は、試験中における20%未満の群平均体重(BW)の減少、及び10匹の処理済み動物に複数の治療関連(TR)死がないことと定義される。それよりも大きな毒性をもたらすいずれの投与レジメンも、最大耐量(MTD)を上回るものと考慮される。死亡は、臨床徴候及び/又は屍検により証明される処理の副作用に帰することができる場合にTRとして分類されるか、又は、投与期間中若しくは最終投与から10日以内の既知の理由に起因する場合もTRとして分類されうる。死亡は、治療の副作用に関連していたという証拠が存在しない場合、NTRとして分類される。

20

## 【0206】

実施例5 p110αタンパク質のウェスタンブロット分析

タンパク質アッセイ：タンパク質濃度を、Pierce BCA Protein Assay Kit(Rockford, IL)を用いて決定した。免疫ブロットの場合、等しいタンパク質の量を、NuPage Bis-Tris 4-12%勾配ゲル(Invitrogen; Carlsbad, CA)を用いた電気泳動により分離した；タンパク質を、Invitrogen社のiBlotシステム及びプロトコールを用いてニトロセルロース膜上に移した。ホスホ-Akt(Ser473)及びp110アルファに対する抗体はCell Signaling(Danvers, MA)から取得した。GAPDH及びベータ-アクチンに対する抗体はSigmaから取得した。

30

## 【0207】

ウェスタンブロットの場合、等量のタンパク質を、NuPage Tris-アセテート3-18%勾配ゲル(Invitrogen)を用いた電気泳動により分離した。タンパク質を、Invitrogen(Carlsbad, CA)のiBlotシステム及びプロトコールを用いてニトロセルロース細孔膜上に移した。pAkt(Ser<sup>473</sup>)、及びp110アルファ、及びp85抗体は、Cell Signaling Technology(Danvers, MA)から取得した。ベータアクチン抗体はSigma-Aldrich(St. Louis, MO)から取得した。特異的な抗原-抗体相互作用を、強化した化学発光ウェスタンブロット法検出試薬(GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)を用いて、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートした二次抗体IgGにより検出した。

40

## 【0208】

ポリクローナルウサギ抗PI3K p110アルファ抗体を用いるウェスタンブロット

50

分析を、製造者のプロトコールに従って実施した ( P I 3 K i n a s e p 1 1 0 A n t i b o d y # 4 2 5 5、P I 3 K i n a s e p 1 1 0 ( C 7 3 F 8 ) R a b b i t m A b # 4 2 4 9、C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y )。モノクローナル及びポリクローナル P I 3 K p 1 1 0 アルファ抗体は市販されている ( S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y )。Popkie et al ( 2 0 1 0 ) J B i o l C h e m . ; 2 8 5 ( 5 3 ) : 4 1 3 3 7 - 4 7 ; Y o s h i o k a e t a l ( 2 0 1 2 ) N a t M e d . O c t ; 1 8 ( 1 0 ) : 1 5 6 0 - 9 ; B i s w a s e t a l ( 2 0 1 3 ) J B i o l C h e m . J a n 2 5 ; 2 8 8 ( 4 ) : 2 3 2 5 - 3 9 ; R a m a d a n i e t a l ( 2 0 1 0 ) S c i S i g n a l . A u g 1 0 ; 3 ( 1 3 4 ) 参照。

#### 【 0 2 0 9 】

ウェスタンブロット法プロトコール ( C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y ) : 10

ウェスタンブロットの場合、4 の 5 % w / v の B S A、1 X T B S、0 . 1 % の T w e e n ( 登録商標 ) 2 0 中で希釈した一次抗体と共に、穏やかに振とうしながら膜を一晚インキュベートする。

希釈 :

ウェスタンブロット法、1 : 1 0 0 0 ,

免疫沈降法、1 : 5 0

免疫組織化学、1 : 4 0 0

1 0 m M のナトリウム H E P E S ( p H 7 . 5 )、1 5 0 m M の N a C l、1 0 0 μ g / m l の B S A、5 0 % のグリセロール及び 0 . 0 2 % 未満のアジ化ナトリウムにおいて 20 供給。- 2 0 で貯蔵。抗体は等分しない。

#### 【 0 2 1 0 】

A . 溶液及び試薬

注意 : 逆浸透脱イオン化 ( R O D I ) 水又は等級の水を用いて溶液を調製する。

1 . 2 0 X のリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) : ( # 9 8 0 8 ) 1 L の 1 X P B S の調製 : 5 0 m l の 2 0 X P B S を 9 5 0 m l の d H <sub>2</sub> O に付加、混合。

2 . 1 0 X の T r i s 緩衝生理食塩水 ( T B S ) : ( # 1 2 4 9 8 ) 1 L の 1 X T B S の調製 : 1 0 0 m l の 1 0 X を 9 0 0 m l の d H <sub>2</sub> O に付加、混合。

3 . 1 X S D S の試料バッファー : B l u e L o a d i n g P a c k ( # 7 7 2 2 ) 又は R e d L o a d i n g P a c k ( # 7 7 2 3 ) 1 / 1 0 容積の 3 0 X D T T を 1 容積の 3 X S D S ローディングバッファーに加えることにより新鮮な 3 X 還元ローディングバッファーを調製。d H <sub>2</sub> O で 1 X に希釈。 30

4 . 1 0 X T r i s - G l y c i n e S D S ランニングバッファー : ( # 4 0 5 0 ) 1 L の 1 X ランニングバッファーの調製 : 1 0 0 m l の 1 0 X ランニングバッファーを 9 0 0 m l の d H <sub>2</sub> O に付加、混合。

5 . 1 0 X T r i s - G l y c i n e 転写バッファー : ( # 1 2 5 3 9 ) 1 L の 1 X 転写バッファー : 1 0 0 m l の 1 0 X 転写バッファーを 2 0 0 m l のメタノール + 7 0 0 m l の d H <sub>2</sub> O に付加、混合。

6 . T w e e n ( 登録商標 ) 2 0 ( T B S T ) を含む 1 0 X の T r i s 緩衝生理食塩水 : ( # 9 9 9 7 ) 1 L の 1 X T B S T の調製 : 1 0 0 m l の 1 0 X T B S T を 9 0 0 m l の d H <sub>2</sub> O に付加、混合。 40

7 . 脱脂粉乳 : ( 9 9 9 9 ) 。

8 . ブロッキングバッファー : 5 % w / v の脱脂粉乳を含む 1 X T B S T ; 1 5 0 m l につき、7 . 5 g の脱脂粉乳を 1 5 0 m l の 1 X T B S T に付加、よく混合。

9 . 洗浄バッファー : ( # 9 9 9 7 ) 1 X T B S T 。

1 0 . ウシ血清アルブミン ( B S A ) : ( 9 9 9 8 ) 。

1 1 . 一次抗体希釈バッファー : 5 % の B S A を含む 1 X T B S T ; 2 0 m l につき、1 . 0 g の B S A を 2 0 m l の 1 X T B S T に付加、よく混合。

1 2 . ピオチン化タンパク質ラダー検出パック : ( # 7 7 2 7 ) 。

1 3 . 事前染色タンパク質マーカー、広範囲 ( 事前混合フォーマット ) : ( # 7 7 2 0 50



)。

14. プロットニング用膜及び紙：(Cell Signaling Technology #12369) このプロトコールはニトロセルロース膜のために最適化された。孔サイズ0.2 μmが一般に推奨される。

15. HRPにコンジュゲートした二次抗体：抗ウサギIgG、HRP結合抗体(#7074)。

16. 検出試薬：Signal Fire<sup>TM</sup> ECL試薬(#6883)。

#### 【0211】

##### B. タンパク質プロットニング

試料調製のための一般的プロトコール

1. 制御因子を含む新鮮な培地を所望の時間にわたって加えることにより細胞を処理する。

2. 培養物から培地を吸引；細胞を1X PBSで洗浄；吸引する。

3. 1X SDS試料バッファを加えることにより(6ウェルプレートの1ウェルにつき100 μl又は直径10cmのプレートにつき500 μl)細胞を溶解させる。直ちにプレートから細胞をこすり取り、抽出物をエッペンチューブに移す。氷上に維持する。

4. 10~15秒間超音波処理して細胞溶解を完了させ、DNAをせん断する(試料粘度を低下させるため)。

5. 20 μlの試料95~100℃に5分間加熱；氷上で冷却する。

6. 5分間微量遠心分離する。

7. 20 μlをSDS-PAGEゲルにローディングする(10cm×10cm)。

注意：事前染色した分子量マーカーをローディング(#7720、10 μl/レーン)し、電気泳動転写及びビオチン化タンパク質ラダー(#7727、10 μl/レーン)を確認して分子量を決定することが推奨される。

8. ニトロセルロース膜への電気泳動転写(#12369)。

#### 【0212】

##### C. 膜のプロッキング及び抗体のインキュベーション

注意：容積は10cm×10cm(100cm<sup>2</sup>)の膜のものである；異なる大きさの膜については、容積を適宜調節されたい。

##### I. 膜のプロッキング

1. (任意)転写後、ニトロセルロース膜を、25mlのTBSで5分間室温で洗浄する。

2. 膜を25mlのプロッキングバッファ中において1時間室温でインキュベートする。

3. 15mlのTBSTを用いて三回、それぞれ5分間洗浄する。

##### II. 一次抗体のインキュベーション

1. 膜及び一次抗体を、10mlの一次抗体希釈バッファ中において(製品データシートにおいて推奨される適切な希釈及び希釈剤で)、穏やかに振とうさせながら一晩4でインキュベートする。

2. 15mlのTBSTを用いて三回、それぞれ5分間洗浄する。

3. 10mlのプロッキングバッファ中において、穏やかに振とうさせながら、1時間室温で抗ウサギIgG、HRP結合抗体(1:2000の#7074)及び抗ビオチン、HRP結合抗体(1:1000-1:3000の#7075)と共に膜をインキュベートし、ビオチン化タンパク質マーカーを検出する。

4. 15mlのTBSTを用いて三回、それぞれ5分間洗浄する。

5. 検出(セクションD)を進める。

#### 【0213】

##### D. タンパク質の検出

使用方法：

1. 膜結合HRP(抗体コンジュゲート)を、TBSTにおいて三回、5分間洗浄する

10

20

30

40

50

。 2. 一部分 2 X の試薬 A 及び一部分 2 X の試薬 B (例えば 10 ml につき、5 ml の試薬 A と 5 ml の試薬 B を加える) を希釈することにより 1 X Signal Fire<sup>TM</sup> ECL 試薬 (# 6883) を調製する。よく混合する。

3. 膜と共に基質を 1 分間インキュベートし、余分な溶液を除去し (膜は濡れたまま)、プラスチックに包んで X-ray 線フィルムに曝露する。

\* 肌に繰り返し曝露することは避ける。

#### 【0214】

##### ウェスタンブロット再検出プロトコール

既存の膜の再検出は、利用できる試料の量が限られているとき、複数のタンパク質を独立して免疫ブロットするために便利な手段である。最良の結果のためには、新鮮なブロットが常に推奨されることに注意されたい。再検出は、有効な方法でありうるが、ブロットの各再検出において、バックグラウンドシグナルが増加する可能性が存在する。加えて、新規抗体の結合に起因するシグナルが最初の免疫ブロットング実験の残存シグナルではないように、再検出に先立って最初の抗体複合体の除去を確認することが推奨される。これは、ブロットを ECL 試薬に再曝露し、次の一次抗体を加える前にシグナルが存在しないことを確認することにより行うことができる。

#### 【0215】

##### A. 溶液及び試薬

注意：逆浸透脱イオン化 (RODI) 水又は同等に精製された水を用いて溶液を調製する。

1. 洗浄バッファー：Tween (登録商標) 20 (TBST-10X) (#9997) を含む Tris 緩衝生理食塩水

2. ストリップバッファー：100 ml を調製するために、0.76 g の Tris ベース、2 g の SDS 及び 700 µl の  $\beta$ -メルカプトエタノールを混合する。脱イオン化 H<sub>2</sub>O を用いて 100 ml にする。HCl を用いて pH を 6.8 に調整する。

#### 【0216】

##### B. プロトコール

1. フィルム曝露の後、膜を 4 回、それぞれ 5 分間 TBST 中で洗浄する。膜を乾燥させない場合に最良の結果が得られる。

2. ストリップバッファー中において (軽く振とうさせながら) 膜を 30 分間 50 でインキュベートする。

3. 膜を 6 回、それぞれ 5 分間 TBST 中で洗浄する。

4. (任意) 元のシグナルが除去されたことを確認するために、膜を 2 回、それぞれ 5 分間 10 ml の TBST を用いて洗浄する。膜を LumiGLO (登録商標) と共に、穏やかに振とうさせながら 1 分間室温でインキュベートする。膜から余分な現像液を排出させる。乾燥させない。プラスチックラップに包み、X 線フィルムに曝露する。

5. 再度膜を 4 回、それぞれ 5 分間 TBST 中において洗浄する。

6. ここで膜は再使用の準備が整う。ウェスタン免疫ブロット法プロトコールの「膜のプロットング及び抗体のインキュベーション」工程において検出を開始する。

#### 【0217】

##### 実施例 6 突然変異 p110 アルファの免疫組織化学 (IHC) 検出

患者の腫瘍生検試料中における突然変異 p110 アルファのレベルを決定するために、様々な診断アッセイが利用可能である。一実施態様では、突然変異 p110 アルファのレベルは、免疫組織化学 (IHC) により分析できる。腫瘍生検由来のパラフィン包埋組織切片を IHC アッセイに供し、以下の染色強度基準に合わせる：

スコア 0 - 染色は観察されない、又は腫瘍細胞の 10% 未満に膜染色が観察される。

スコア 1+ - わずかな / ほとんど知覚できない膜染色が 10% を上回る腫瘍細胞に観察される。細胞の膜の一部のみが染色される。

スコア 2+ - 弱 ~ 中程度の完全な膜染色が 10% を上回る腫瘍細胞に観察される。

10

20

30

40

50

スコア 3 + - 中 ~ 強の完全な膜染色が 10 % を上回る腫瘍細胞に観察される。

【0218】

腫瘍試料はそれぞれのスコアに従って特徴付けされる。

【0219】

いくつかの実施態様では、突然変異 p 1 1 0 アルファバイオマーカーは、抗突然変異 p 1 1 0 アルファ抗体を用いて検出される。いくつかの実施態様では、突然変異 p 1 1 0 アルファバイオマーカーは、IHCにより弱い染色強度として検出される。いくつかの実施態様では、突然変異 p 1 1 0 アルファバイオマーカーは、IHCにより中程度の染色強度として検出される。いくつかの実施態様では、突然変異 p 1 1 0 アルファバイオマーカーは、IHCにより強い染色強度として検出される。

10

【0220】

Ventana Benchmark XT (登録商標) 又は Benchmark Ultra (登録商標) システムを使用して IHC 染色が実施されうる。

【0221】

実施例 7 p 1 1 0 アルファ細胞株の質量分析

液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 (LC - MS / MS) 分析を、それぞれ DMSO (ビヒクル) 又は GDC - 0032 (500 nM) で 24 時間処理した三つの細胞株: HCC1954、HCC202 及び HDQP1 から免疫沈降させた p 1 1 0 アルファ (PIK3CA) タンパク質に対して実施した。各実験は、n = 4 の生物学的複製物について、一つの細胞株 / 処理当たり 4 ~ 6 mg のタンパク質溶解物 (合計 6 の試料 / 実験) から開始して実施された。PIK3CA の予想される移動に対応して、一つの試料当たり一つのゲル領域を、隣接レーンの精製済み p 1 1 0 アルファタンパク質の移動に基づいて切除した。ゲル片を ~ 1 mm<sup>3</sup> の片に切断し、以下のようにしてゲル内消化させた。ゲル片を、50 mM の炭酸水素アンモニウム / 50 % のアセトニトリルを用いて脱染し、100 % のアセトニトリルを用いて脱水した後、50 mM のジチオスレイトール (30 分、50 ) 及び 50 mM のヨードアセトミド (20 分、室温) を用いてそれぞれ還元及びアルキル化した。ゲル片を再度脱水し、次いで氷上で 2 時間にわたり 50 mM の炭酸水素アンモニウム / 5 % のアセトニトリル消化バッファー中の 20 ng / µl のトリプシンで再度膨張させ、次いで 37 のオープンに移して一晩インキュベーションした。消化されたペプチドをエッペンチューブに移し、ゲル片を、一度は 50 % のアセトニトリル / 0.5 % のトリフルオロ酢酸で、二回目は 100 % のアセトニトリルで、計二回抽出した。抽出物を消化されたペプチドと混合し、高速真空 (speed - vac) 乾燥させて完了した。試料を 5 % のギ酸 / 0.1 % のヘプタフルオロ酢酸 / 0.01 % の過酸化水素中において 30 分間再構成した後、LC - MS / MS 分析した。

20

30

【0222】

試料を、Waters nanoAcquity UPLC に接続された Thermo LTQ Orbitrap Elite 上において、重複注入を用いる LC - MS / MS により分析した (試料が一度注入された第 1 の複製物を除いて)。ペプチドを、1.7 µm の BEH - 130 樹脂をパッキングした 0.1 mm X 100 mm Waters Symmetry C18 カラムにローディングし、溶媒 B (98 % のアセトニトリル、2 % の水) を 20 分かけて 5 % から 25 % まで、次いで 2 分かけて 25 % から 50 % まで傾斜させた二段階式直線勾配により分離した。データは、60,000 の分解能で収集された Orbitrap フル MS スキャンと、イオントラップにおける CID MS / MS 断片化のために選択された上位 15 の強力な前駆体とを用いたデータ依存モードで取得した。MS2 スペクトルを、ヒトタンパク質の連結されたターゲット - デコイ Uniprot データベースに対して、並びに野生型、E545K 及び H1047R 突然変異 PIK3CA 配列を含む小規模データベースに対して、Mascot を用いて検索し、突然変異ペプチドを同定した。Uniprot 検索のスペクトルマッチは、手検測の前に線形判別分析を用いて、10 % の許容偽発見率でフィルタリングした。

40

【0223】

50

PIK3CA ペプチドの抽出されたイオンクロマトグラム及びピーク面積の統合は、社内ソフトウェア (MSPlorer) を用いて 10 ppm の質量許容差で生成された。14 のペプチドの各々に関するピーク面積データは、六つの試料の中で最も豊富なピーク面積にブロック単位で正規化された。重複注入 (技術的複写物) が利用可能である場合、二つの複写物について正規化されたデータを平均し、ペプチド - 条件 - 実験毎に単一の正規化ピーク面積を生成し (即ち定量化フィーチャ)、タンパク質配列プロットを生成した。

【0224】

統計的分析のために、元の、四つの生物学的複写物の非正規化ピーク面積を、線形混合効果モデル化 (lme4 パッケージ) を用いる R で統合し、総 PIK3CA、野生型 PIK3CA、及び突然変異 PIK3CA の各々について、DMSO (ビヒクル) と GDC-0032 (500 nM) とによる処理の比較のための相対比及び p 値を決定した。総 PIK3CA は、以下のペプチドから生成されるデータに基づいて決定された：

EATLITIK	(残基 39~46; 444.77481m/z)	(配列番号 9)	
DLNSPHSR	(155~162; 463.22945m/z)	(配列番号 10)	
LCVLEYQGK	(241~249)	(配列番号 11)	
VCGCDEYFLEK	(254~264; 710.30246m/z)	(配列番号 12)	
VPCSNPR	(376~382)	(配列番号 13)	20
EAGFSYSHAGLSNR	(503~516; 748.35281m/z)	(配列番号 14)	
YEQYLDNLLVR	(641~651; 713.37540m/z)	(配列番号 15)	
FGLLLESYCR	(684~693; 629.32042m/z)	(配列番号 16)	
LINLTDILK	(712~720; 521.83039m/z).	(配列番号 17)	
QMNDAR	(1042~1047; 375.66360m/z)	(配列番号 18)	
DPLSEITEQEK	(538~548; 644.81917m/z)	(配列番号 19)	
DPLSEITK	(538~545; 451.74627m/z)	(配列番号 20)	30

【0225】

H1047R 突然変異 (即ち HCC-1954) を有する (一又は複数の) 細胞株について、野生型 PIK3CA を、QMNDAHHGWTTK (1042~1054; 749.82824m/z) ペプチド (配列番号 7) に基づいて、突然変異 PIK3CA を、1047 位 (図 24A 及び 24B) をカバーする QMNDAR (1042~1047; 375.66360m/z) (配列番号 18) 及び HGGWTTK (1048~1054; 393.6983m/z) (配列番号 8) ペプチドに基づいて、それぞれ決定した。E545K 突然変異 (即ち HCC-202) を有する (一又は複数の) 細胞株について、野生型 PIK3CA を、DPLSEITEQEK (538~548; 644.81917m/z) (配列番号 19) ペプチドに基づいて、突然変異 PIK3CA を、545 位をカバーする DPLSEITK (538~545; 451.74627m/z) (配列番号 20) ペプチドに基づいて、それぞれ決定した。これら二つの座位に由来するペプチドは、総 PIK3CA を決定するときには考慮しなかった。適用可能であれば、PIK3CA ペプチド内のシステイン残基を、それらのカルバミドメチル化形態 (+57.021 Da) において分析し、メチオニン残基をそれらの単一酸化 (メトスルホキシド) 形態 (+15.9949 Da) に基づいて定量化した。総 PIK3CA、野生型 PIK3CA、及び突然変異 PIK3CA の  $\log_2$  比 (GDC-0032 / DMSO) 及び対応する p 値を使用して、質量保存の法則を適用することにより、各条件及び細胞株における野生型 PIK3CA と突然変異 PIK3CA の比存在度 (及びそれに関連する 95% 信頼区間) を決定

10

20

30

40

50

した。明確には：

$WT\_PI3KCA\_DMSO + MUT\_PI3KCA\_DMSO = 総\_PI3KCA\_DMSO$

$WT\_PI3KCA\_GDC + MUT\_PI3KCA\_GDC = 総\_PI3KCA\_GDC$

比率  $WT\_PI3KCA = p = WT\_PI3KCAc / 総\_PI3KCA$

比率  $MUT\_PI3KCA = 1 - p = MUT\_PI3KCA / 総\_PI3KCA$

【0226】

データは、線形効果モデルに基づいて総  $PI3KCA\_DMSO$  が 1.0 に正規化され、エラーバーが各測定値の 95% 信頼区間を表す相対的強度値としてプロットされる。

10

【0227】

前述の発明は理解を明確にするために図示及び実施例を用いてある程度詳細に説明されているが、記載及び実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用されるすべての特許及び科学文献の開示内容は、参照によりその全体が本明細書に包含される。

#### さらなる実施態様

[実施態様 1] taselesib による治療のための患者を選択する方法であって：

(a) 患者から得られた生物学的試料を taselesib により処理すること；及び

(b) p110 アルファタンパク質の枯渇を検出すること；

を含み、生物学的試料における p110 アルファタンパク質の枯渇が、taselesib による治療に応答するであろう患者を同定する、方法。

20

[実施態様 2] p110 アルファタンパク質の枯渇が、患者による当該化合物への治療的応答性を示す、実施態様 1 に記載の方法。

[実施態様 3] p110 アルファタンパク質の枯渇が、抗 p110 アルファ抗体への結合により測定される、実施態様 1 に記載の方法。

[実施態様 4] 試料中の p110 アルファタンパク質に対する抗 p110 アルファ抗体の結合が、ウェスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、免疫組織化学 (IHC)、蛍光活性化セルソーティング (FACS)、又は逆相タンパク質アレイにより決定される、実施態様 3 に記載の方法。

30

[実施態様 5] p110 アルファタンパク質の枯渇が質量分析法により検出される、実施態様 1 に記載の方法。

[実施態様 6] (a) 患者から得られた生物学的試料を、H1047R、C420R、H1047L、E542K、E545K 及び Q546R から選択される突然変異を含む PIK3CA 突然変異状態について試験すること；

(b) PIK3CA 突然変異を有する患者由来の生物学的試料を taselesib と接触させ、p110 アルファアイソフォームの枯渇を検出すること；及び

(c) taselesib を、PIK3CA 突然変異を有する患者に投与することを含む、患者の治療方法。

40

[実施態様 7] 生物学的試料が、患者への taselesib の投与に先立って取得される、実施態様 6 に記載の方法。

[実施態様 8] 生物学的試料が循環性腫瘍細胞である、実施態様 6 に記載の方法。

[実施態様 9] PIK3CA 突然変異を有する患者に対し、5-FU、ドセタキセル、エリブリン、ゲムシタピン、GDC-0973、GDC-0623、パクリタキセル、タモキシフェン、フルベストラント、デキサメタゾン、ペルツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、トラスツズマブ及びレトロゾールから選択される化学療法剤を投与することをさらに含む、実施態様 6 に記載の方法。

[実施態様 10] 化学療法剤がフルベストラントである、実施態様 9 に記載の方法。

[実施態様 11] 患者が HER2 発現乳がんを有する、実施態様 6 に記載の方法。

50

[実施態様12] 患者がエストロゲン受容体陽性 (ER+) 乳がんを有する、実施態様6に記載の方法。

[実施態様13] エストロゲン受容体陽性 (ER+) 乳がんが転移性である、実施態様12に記載の方法。

[実施態様14] t a s e l i s i b がアジュバント設定で患者に投与される、実施態様6に記載の方法。

[実施態様15] 患者が以前にタモキシフェン、フルベストラント、又はレトロゾールで治療されたことがある、実施態様14に記載の方法。

[実施態様16] t a s e l i s i b による治療のための、P I K 3 C A 突然変異を有する患者を選択する方法であって：

( a ) 患者から得られた生物学的試料中の P I K 3 C A 突然変異を検出すること；及び

( b ) t a s e l i s i b の投与に先立って患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと、t a s e l i s i b の投与後に同患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルとを比較すること

を含み、t a s e l i s i b の投与後に患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルの枯渇が、t a s e l i s i b による治療に応答するであろう患者を同定する、方法。

[実施態様17] ( a ) t a s e l i s i b の投与に先立ってがん患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと、t a s e l i s i b の投与後に同患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルとを比較すること、及び

( b ) 患者に投与される t a s e l i s i b 療法の投薬量、投与頻度、又は過程を変更すること

を含む、がんの治療方法。

[実施態様18] がん患者における治療有効性の監視方法であって：

( a ) 患者に t a s e l i s i b を投与すること；

( b ) t a s e l i s i b の投与後に患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファを測定すること；及び

( c ) 患者に投与される t a s e l i s i b 療法の投薬量、投与頻度、又は過程を変更すること

を含む方法。

[実施態様19] がんを有すると診断された患者のための治療レジメンを選択する方法であって、患者のがん細胞を有効量の t a s e l i s i b と接触させること、及び t a s e l i s i b に応答した p 1 1 0 アルファのレベルを検出することを含み、p 1 1 0 アルファの枯渇の検出は、がんが t a s e l i s i b による治療に感受性であることを示し、治療レジメンは、がんが t a s e l i s i b による治療に感受性であると決定された場合に患者に t a s e l i s i b を投与することを含む方法。

[実施態様20] がん細胞が P I K 3 C A 突然変異がん細胞である、実施態様19に記載の方法。

[実施態様21] a ) 患者に t a s e l i s i b を投与すること；

b ) 患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベル又は p 1 1 0 アルファのレベルと相関するバイオマーカーにおける変化を測定すること；及び

c ) 患者から得られた生物学的試料中に p 1 1 0 アルファの枯渇を示す患者に投与される t a s e l i s i b 療法の投薬量、投与頻度、又は過程を選択すること

を含む、がんの治療方法。

[実施態様22]

p 1 1 0 アルファのレベルの変化が p 1 1 0 アルファのレベルの枯渇である、実施態様21に記載の方法。

[実施態様23] がんの治療において t a s e l i s i b に対する応答性を監視するためのバイオマーカーを同定する方法であって：

( a ) 少なくとも一用量の t a s e l i s i b を投与された患者から得られた生物学的

10

20

30

40

50

試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと相関するバイオマーカーの発現、変調、又は活性を検出すること；及び

( b ) バイオマーカーの発現、変調、又は活性を、 t a s e l i s i b の投与に先立って患者から得られた生物学的試料である基準試料中のバイオマーカーの状態と比較すること；

を含み、基準試料と比較して、バイオマーカーの変化が少なくとも2分の1への低下又は少なくとも2倍への増加に相当する変調が、 t a s e l i s i b に対する応答性を監視するために有用なバイオマーカーとして同定される、方法。

[実施態様24] がんがHER2発現乳がんである、実施態様23に記載の方法。

[実施態様25] 患者に治療的有効量の t a s e l i s i b を投与することを含む、患者のがんの治療方法であって、治療が、患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファのレベルと相関するバイオマーカーを検出することに基づいている、方法。

[実施態様26] 生物学的試料が腫瘍生検試料又は循環性腫瘍細胞である、実施態様25に記載の方法。

[実施態様27] 治療対象の患者がPIK3CA突然変異を有する、がんの治療に使用される t a s e l i s i b であって、突然変異がH1047R、C420R、H1047L、E542K、E545K及びQ546Rより選択される突然変異を含む、 t a s e l i s i b 。

[実施態様28] t a s e l i s i b とPIK3CA突然変異状態を有する生物学的試料とを接触させた後に p 1 1 0 アルファアイソフォームの枯渇を伴うPIK3CA突然変異を治療対象の患者が有する、がんの治療に使用される t a s e l i s i b であって、突然変異がH1047R、C420R、H1047L、E542K、E545K及びQ546Rより選択される突然変異を含む、 t a s e l i s i b 。

[実施態様29] 治療対象がPIK3CA突然変異を有する、がんの治療のための医薬の製造における t a s e l i s i b の使用。

[実施態様30] t a s e l i s i b とPIK3CA突然変異状態を有する生物学的試料とを接触させた後に p 1 1 0 アルファアイソフォームの枯渇を伴うPIK3CA突然変異を治療対象の患者が有する、がんの治療のための医薬の製造における t a s e l i s i b の使用であって、突然変異がH1047R、C420R、H1047L、E542K、E545K及びQ546Rより選択される突然変異を含む、使用。

[実施態様31] t a s e l i s i b との接触後に p 1 1 0 アルファアイソフォームの枯渇を患者が有する、がんの治療に使用される t a s e l i s i b 。

[実施態様32] t a s e l i s i b に対する応答性を決定する方法であって：

a ) t a s e l i s i b を投与する工程；及び

b ) 患者から得られた生物学的試料中の p 1 1 0 アルファ又は p 1 1 0 アルファのレベルと相関したバイオマーカーのレベルの変化を測定する工程

を含む方法。

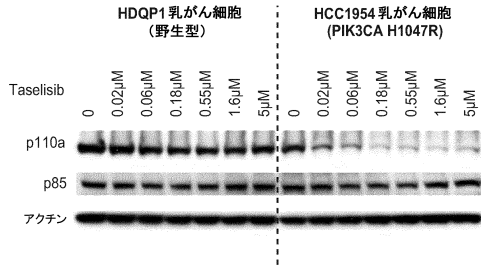
[実施態様33] 上に記載の発明。

10

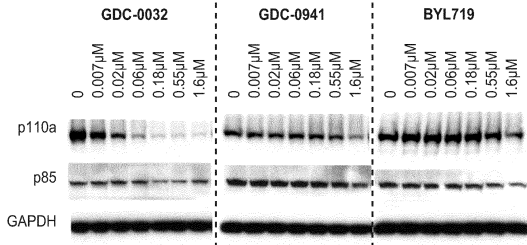
20

30

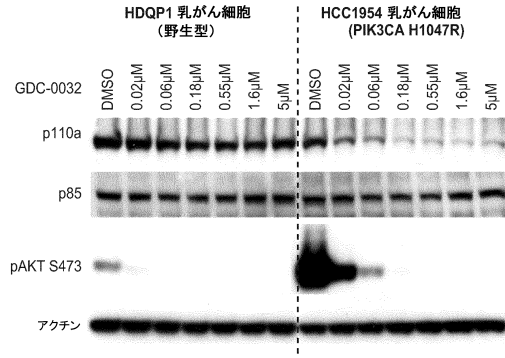
【 図 1 】



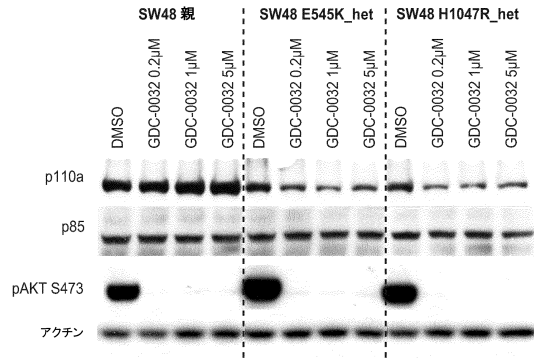
【 図 2 】



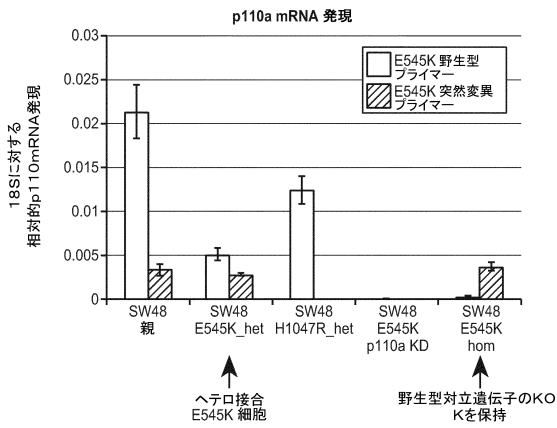
【 図 3 】



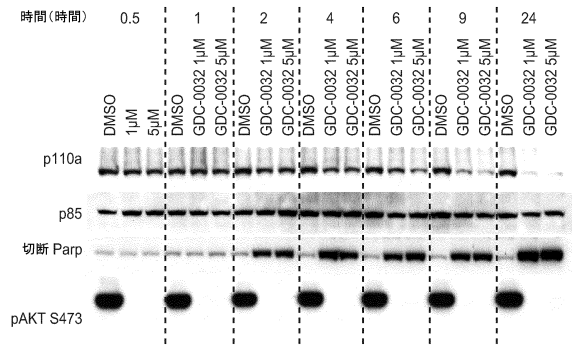
【 図 4 】



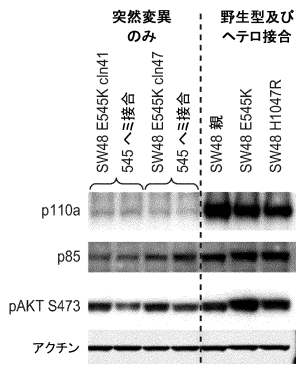
【 図 5 A 】



【 図 6 】

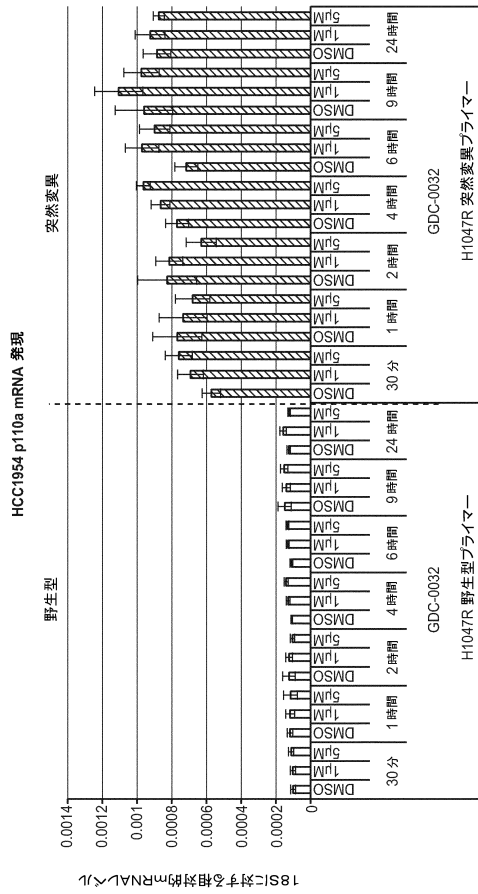


【 図 5 B 】

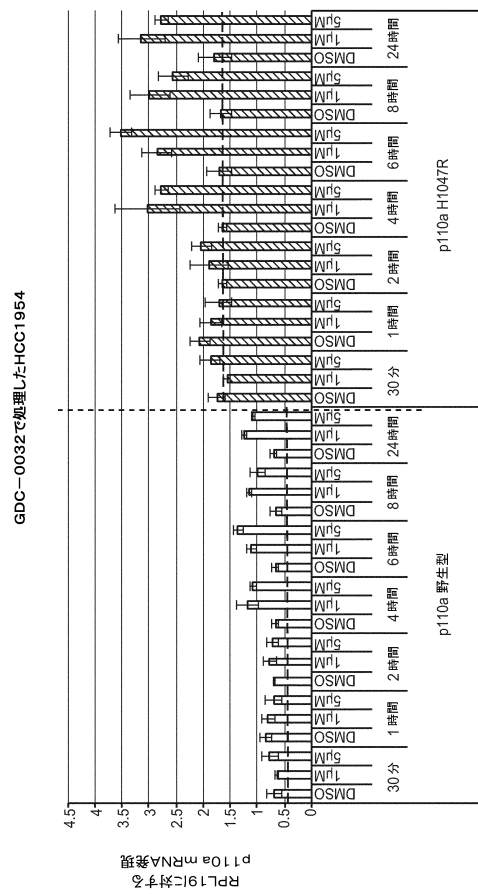




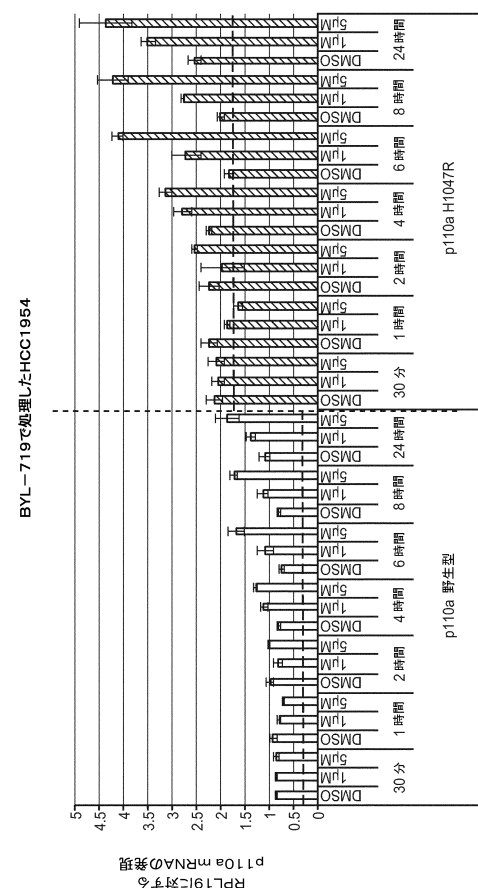
【図7A】



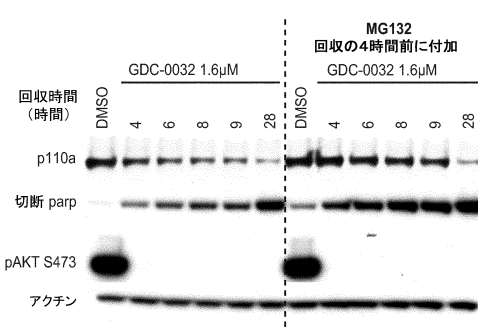
【図7B】



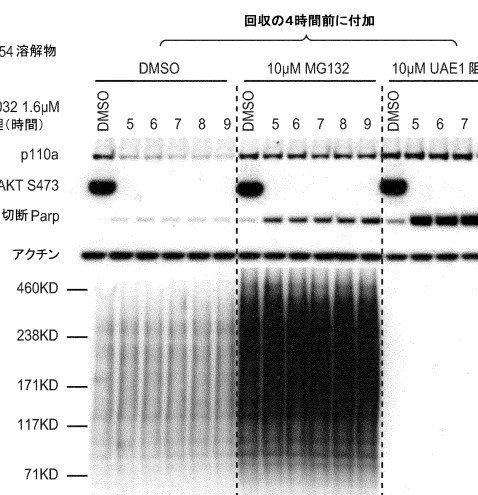
【図7C】



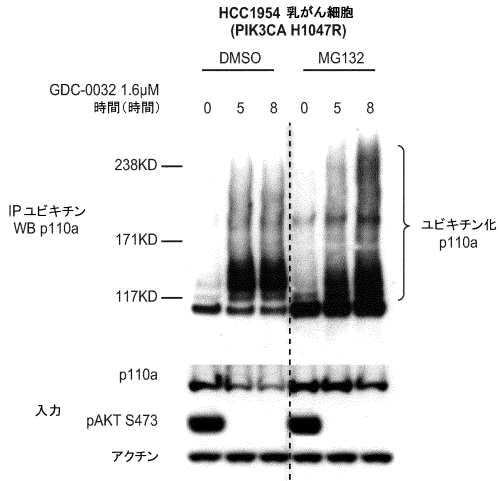
【図8A】



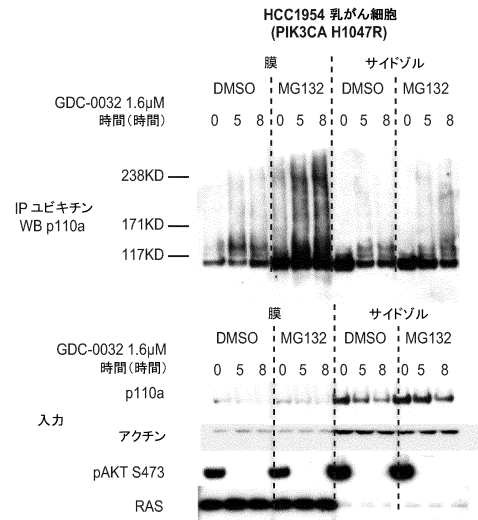
【図8B】



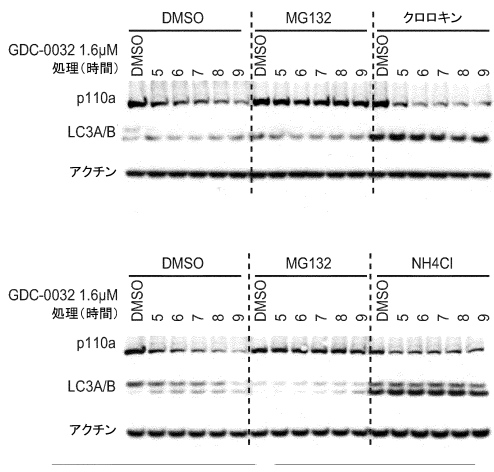
【 図 8 C 】



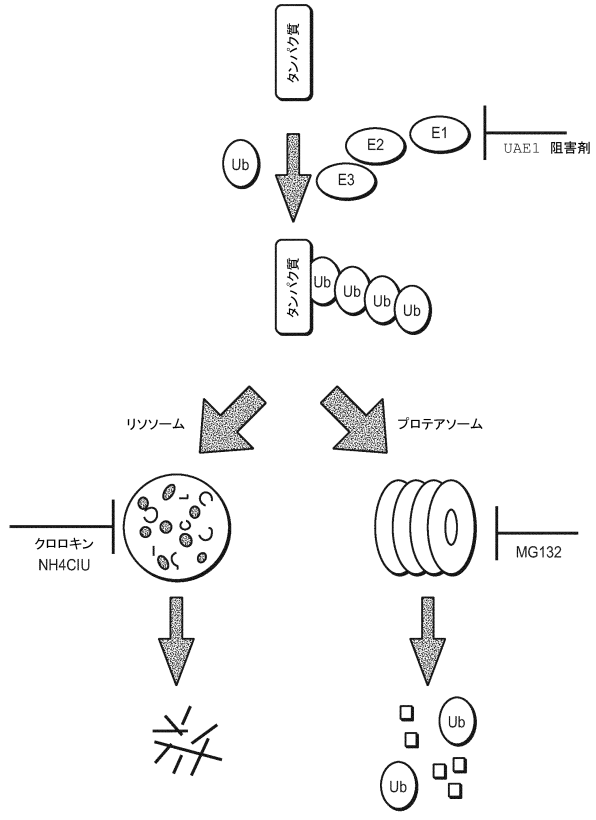
【 図 8 D 】



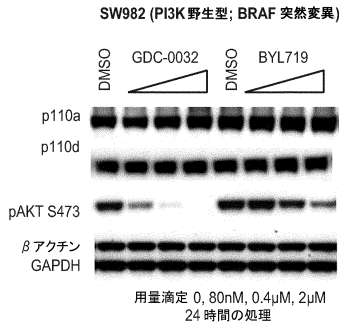
【 図 8 E 】



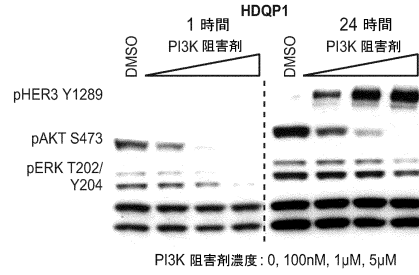
【 図 8 F 】



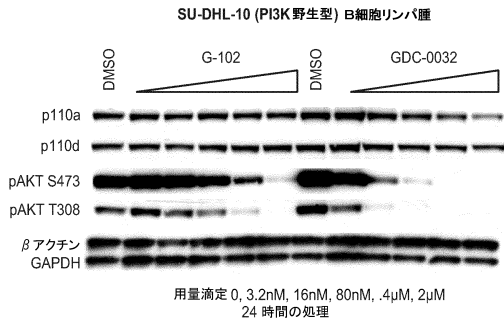
【 図 9 A 】



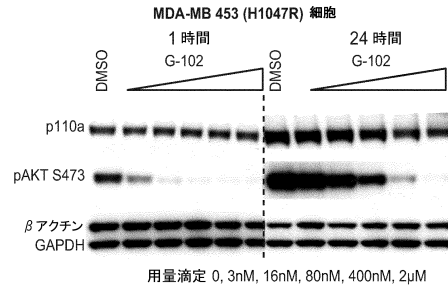
【 図 10 】



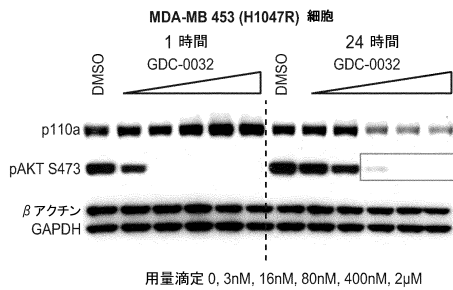
【 図 9 B 】



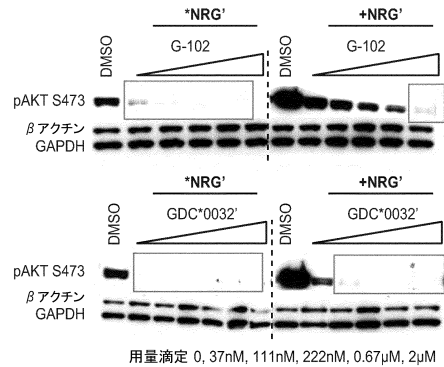
【 図 11 A 】



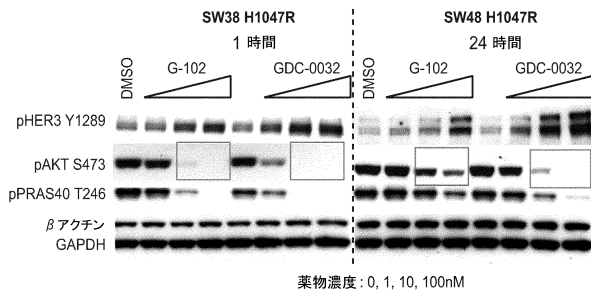
【 図 11 B 】



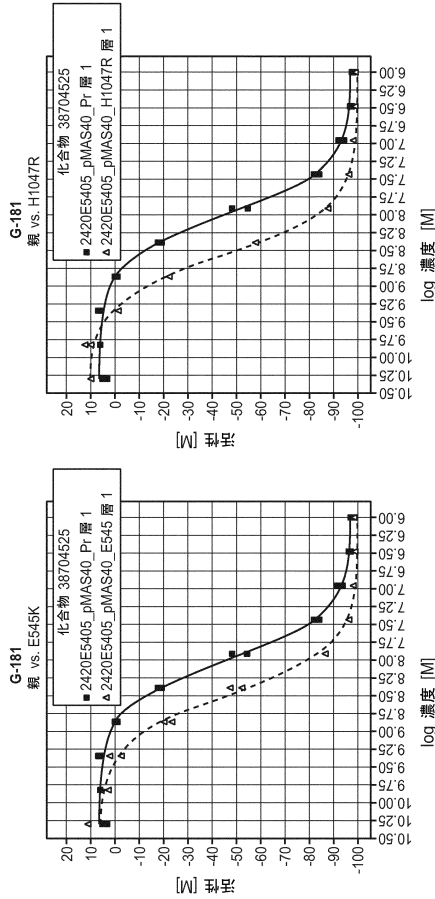
【 図 13 】



【 図 12 】

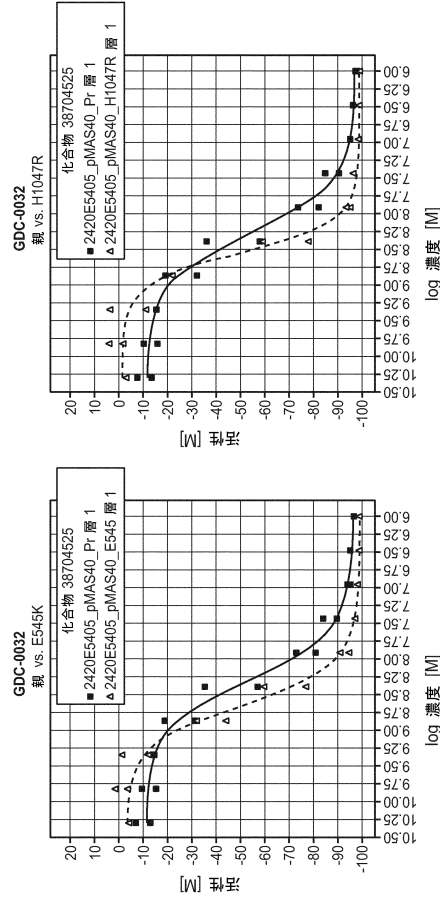


【 図 1 4 A 】



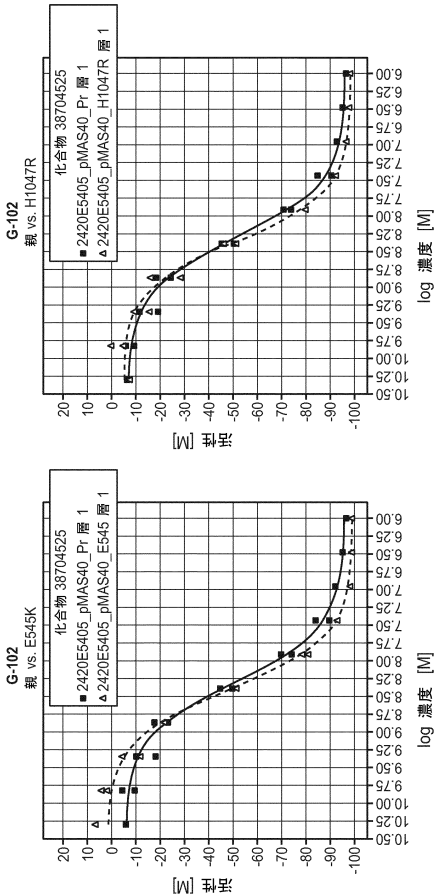
EC50 (nM)	親/突然変異
親	10.2
E545K	3.4
H1047R	2.6
	3.9

【 図 1 4 B 】



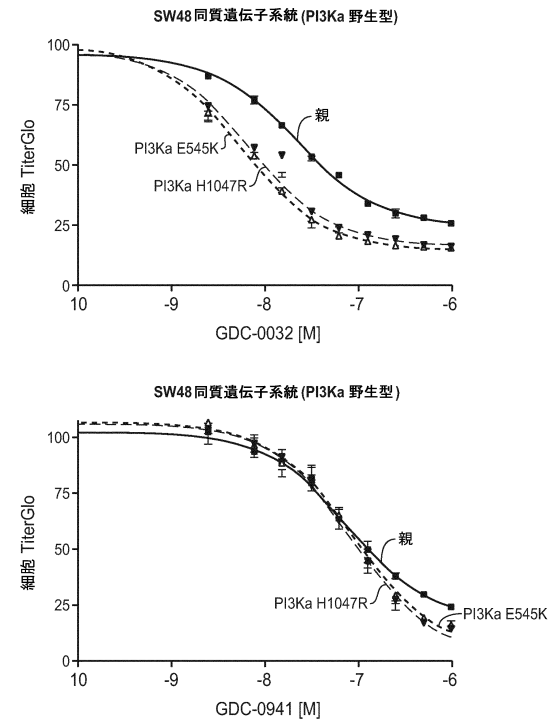
EC50 (nM)	親/突然変異
親	5.1
E545K	2.3
H1047R	2.7
	1.9

【 図 1 4 C 】

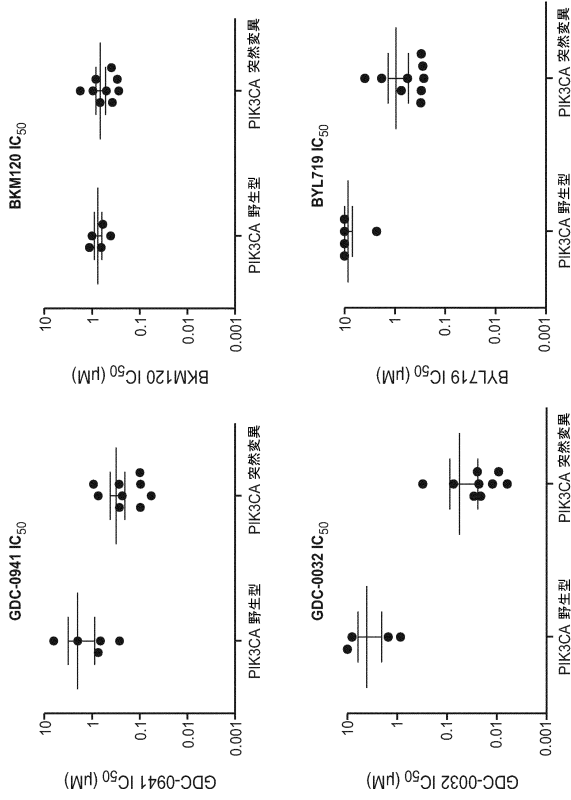


EC50 (nM)	親/突然変異
親	4.9
E545K	3.9
H1047R	4.4
	1.3
	1.1

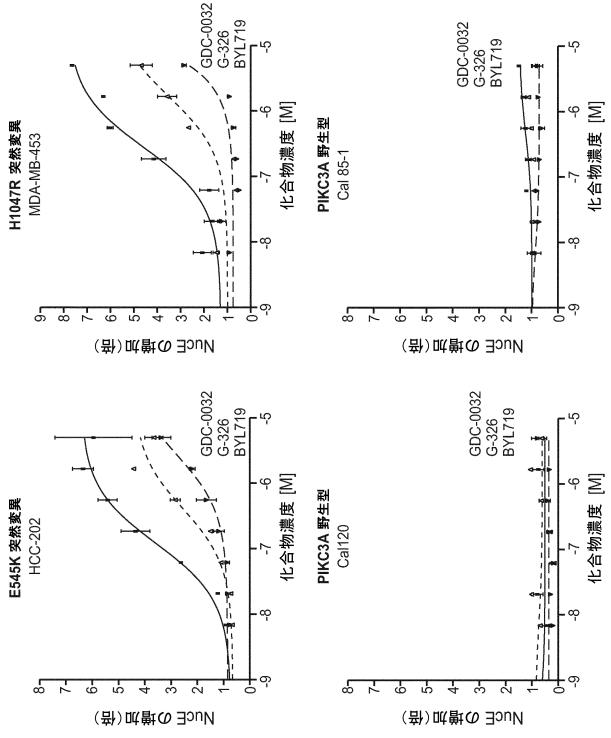
【 図 1 5 】



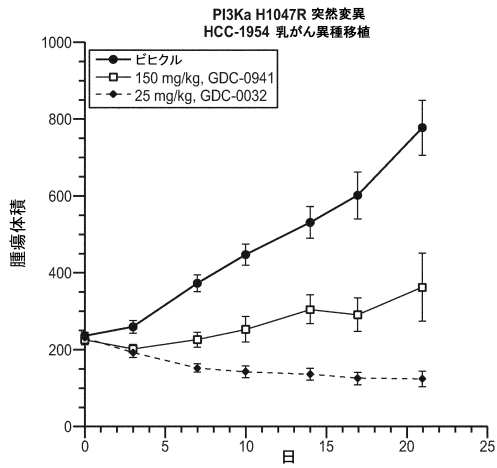
【 図 1 6 】



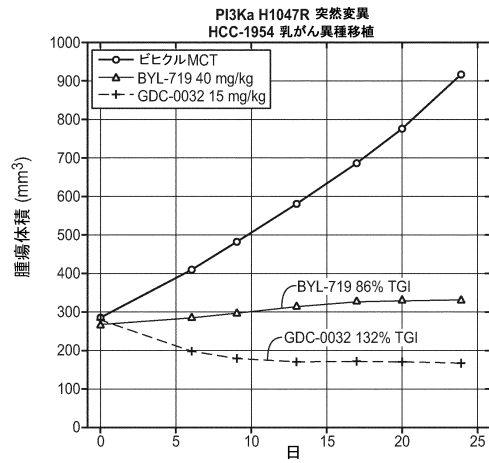
【 図 1 7 】



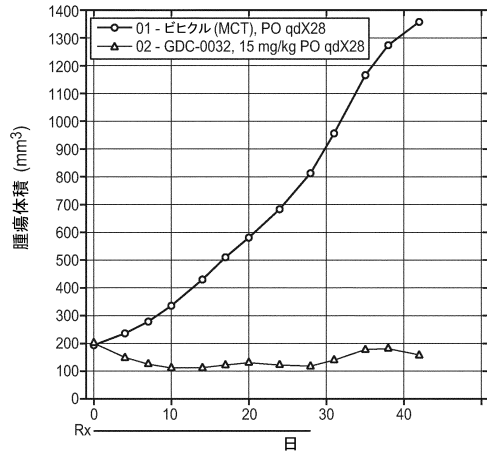
【 図 1 8 A 】



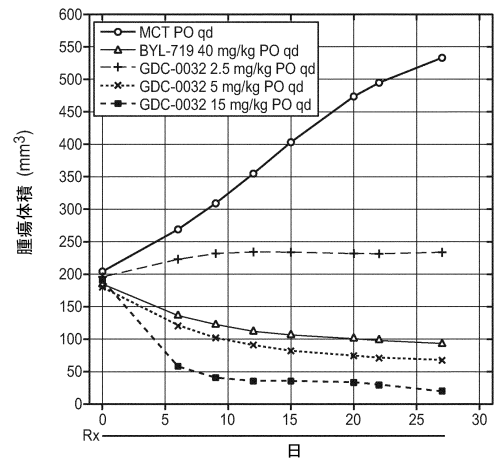
【 図 1 8 B 】



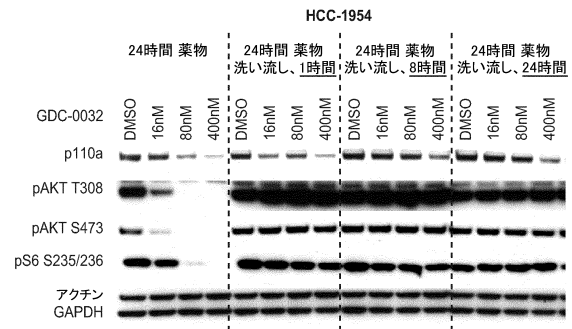
【 図 18 C 】



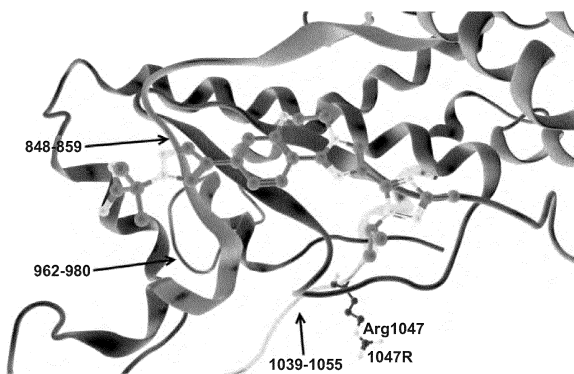
【 図 18 D 】



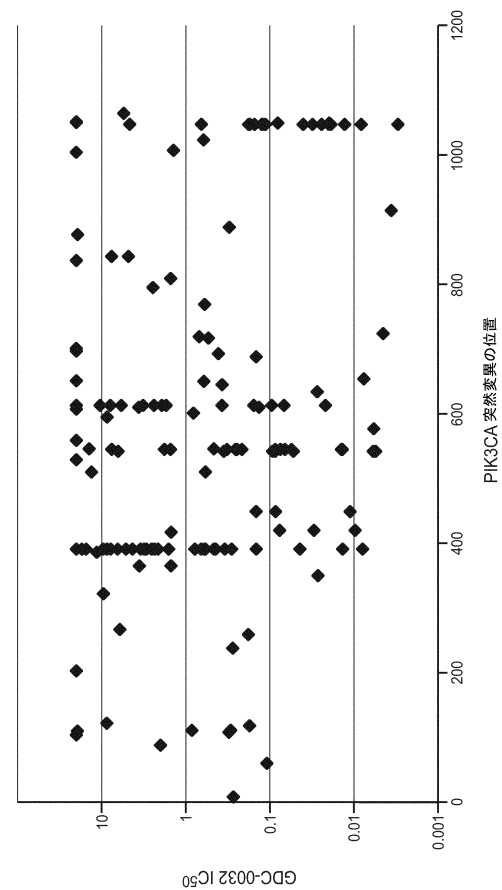
【 図 19 】



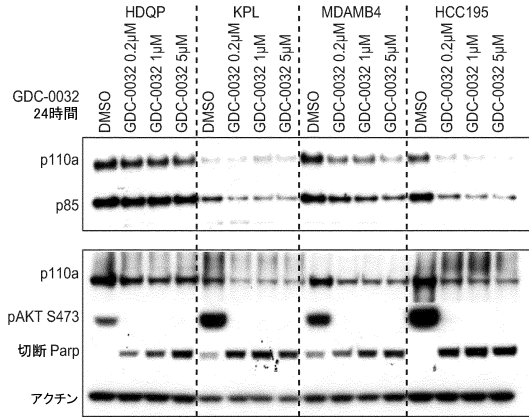
【 図 20 】



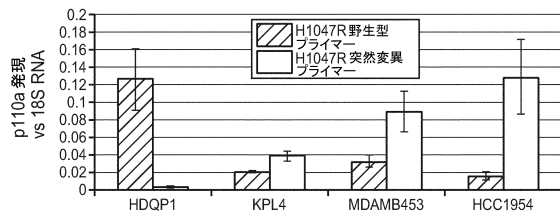
【 図 21 】



【 図 2 2 】



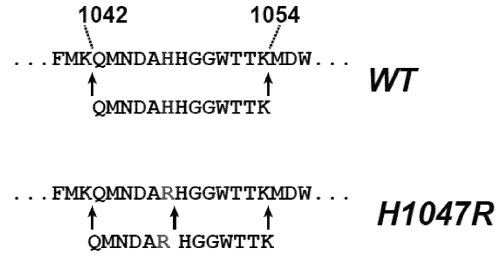
【 図 2 3 】



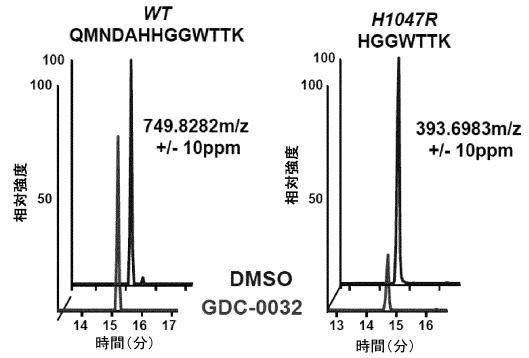
【 配列表 】

0006698712000001.app

【 図 2 4 A 】



【 図 2 4 B 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/6886	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6886 Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 Y
G 0 1 N	27/62	(2006.01)	G 0 1 N	27/62 V

- (72)発明者 サンパス, ディーパク  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ソン, キョン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ワーツ, イングリッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ウィルソン, ティモシー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 8 2 6 6 8 ( W O , A 1 )  
 特表 2 0 1 1 - 5 2 8 8 0 4 ( J P , A )  
 Gasch C、外 9 名、Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer., Clin Chem., 2 0 1 3 年, Vol.59, No.1, Page.252-260, doi: 10.1373/clinchem.2012.188557. Epub 2012 Nov 7.

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )