

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-508484

(P2016-508484A)

(43) 公表日 平成28年3月22日(2016.3.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07D 413/14 (2006.01)</b>	C07D 413/14 CSP	2G045
<b>A61K 31/497 (2006.01)</b>	A61K 31/497	4B063
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00	4C063
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A61P 43/00 111	4C086
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 116 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-554244 (P2015-554244)  
 (86) (22) 出願日 平成26年1月22日 (2014. 1. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月18日 (2015. 9. 18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/050163  
 (87) 国際公開番号 W02014/114928  
 (87) 国際公開日 平成26年7月31日 (2014. 7. 31)  
 (31) 優先権主張番号 13305078.1  
 (32) 優先日 平成25年1月23日 (2013. 1. 23)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 300022641  
 アストラゼネカ アクチボラグ  
 スウェーデン国 151 85 セーデル  
 テルイエ (無番地)  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100101373  
 弁理士 竹内 茂雄  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100122644  
 弁理士 寺地 拓己

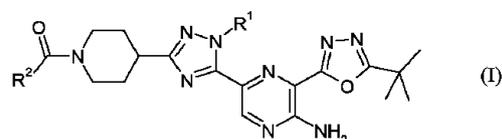
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物

## (57) 【要約】

本発明は、式 ( I ) の化合物 ( 式 ( I ) ) または薬学的に許容しうるその塩 [ 式中、 $R^1$  および  $R^2$  は、本明細書中の説明において先に定義した意味のいずれかを有する ] ; それらの調製プロセス、それらを含む医薬組成物、および細胞増殖疾患の処置におけるそれらの使用に関する。

【選択図】 なし

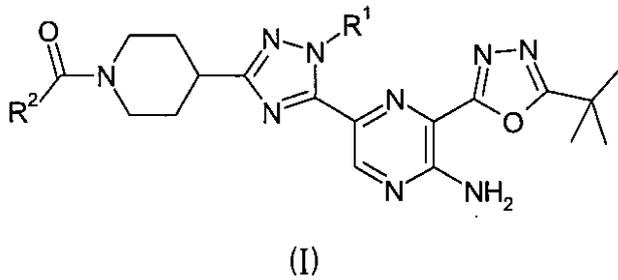


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 (I) の化合物

## 【化 1】



10

[ 式中 :

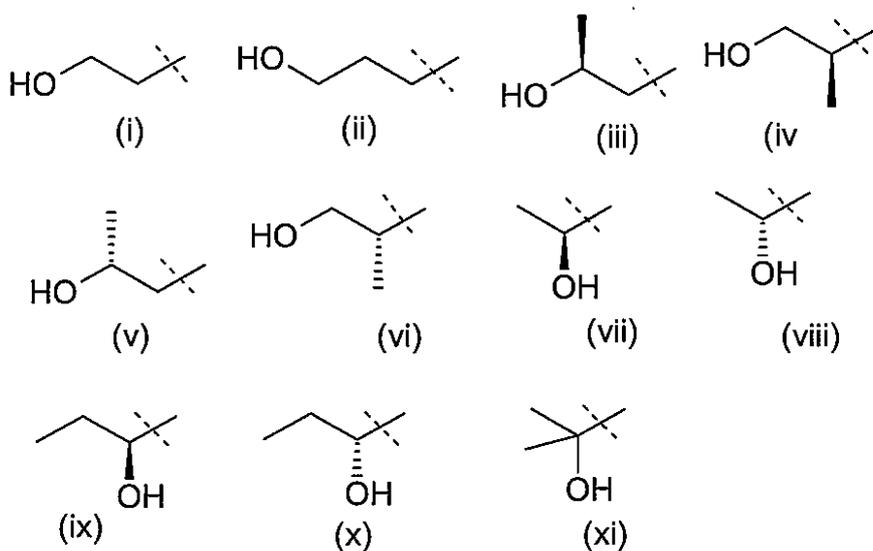
R<sup>1</sup> は、メチルまたはエチルであり ; そしてR<sup>2</sup> は、ヒドロキシにより置換されている ( C 2 - 3 ) アルキルである ] ;

または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 2】

R<sup>2</sup> が基 ( i ) ~ ( x i )

## 【化 2】



20

30

から選択される、請求項 1 に記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 3】

R<sup>2</sup> が請求項 2 で定義した基 ( i ) ~ ( v i ) から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 4】

R<sup>2</sup> が請求項 2 で定義した基 ( i ) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

40

## 【請求項 5】

R<sup>1</sup> がメチルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 6】

R<sup>1</sup> がエチルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 7】

以下の化合物 :

1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジア

50

ゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル] - 1 - メチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 3 - ヒドロキシ - プロパン - 1 - オン;  
 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル] - 1 - エチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 3 - ヒドロキシ - プロパン - 1 - オン;  
 ( 3 R ) - 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル] - 1 - メチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 3 - ヒドロキシ - ブタン - 1 - オン;  
 ( 3 S ) - 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル] - 1 - メチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 3 - ヒドロキシ - ブタン - 1 - オン;  
 ( 2 R ) - 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル] - 1 - メチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 3 - ヒドロキシ - 2 - メチル - プロパン - 1 - オン;  
 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル] - 1 - メチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 2 - ヒドロキシ - 2 - メチル - プロパン - 1 - オン  
 から選択される請求項 1 に記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

10

20

30

40

50

## 【請求項 8】

結晶形態にある、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 9】

医薬品として用いるための、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 10】

ヒトなどの温血動物における癌の予防または処置に用いるための、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の化合物または薬学的に許容しうるその塩。

## 【請求項 11】

癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、請求項 1 に記載の式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、他の抗腫瘍剤を含む組み合わせ。

## 【請求項 12】

請求項 1 に記載の式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーとを含む、医薬組成物。

## 【請求項 13】

式 ( I ) の化合物で処置するための患者の選択方法であって、該方法が、腫瘍由来 DNA または腫瘍細胞を含有する患者からの試料を提供し; 患者の腫瘍細胞または腫瘍由来 DNA 中の PIK3CA 遺伝子が野生型であるか変異体であるかを決定し; そして、それに基づき式 ( I ) の化合物で処置するための患者を選択することを含む、前記方法。

## 【請求項 14】

癌を患っている患者の処置方法であって、患者からの腫瘍細胞含有試料を提供し; 患者の腫瘍細胞中の PIK3CA 遺伝子が野生型であるか変異体であるかを決定し; そして、腫瘍細胞が変異体 PIK3CA 遺伝子を持つ場合、該患者に、有効量の請求項 1 に記載の式 ( I ) の化合物を投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 15】

変異体 PIK3CA 遺伝子を持つと確認されている腫瘍細胞を有する癌を処置するための、請求項 1 に記載の式 ( I ) の化合物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、抗癌活性を持ち、したがって人体または動物体の処置方法に有用である、特定の新規アミノピラジン誘導体または薬学的に許容しうるその塩に関する。本発明はまた、前記アミノピラジン誘導体の製造プロセス、それらを含む医薬組成物、および治療法におけるそれらの使用、例えば、癌の予防または処置における使用を含め、ヒトなどの温血動物における癌の予防または処置に用いるための医薬品の製造におけるそれらの使用に関する。

#### 【0002】

本発明はまた、PI3キナーゼファミリーの酵素（あるいは、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼファミリーまたはPI3Kファミリーとして知られる）、とりわけPI3K-およびPI3K-アイソフォームの選択的阻害剤であり、例えば抗腫瘍治療に有用である、アミノピラジン誘導体に関する。

10

#### 【背景技術】

#### 【0003】

近年、癌の分野において、細胞は、そのDNAの一部が、活性化により悪性腫瘍細胞の形成を引き起こす遺伝子である腫瘍遺伝子に形質転換することにより、癌になる可能性があることが発見された（Bradshaw, Mutagenesis, 1986, 1, 91）。そのような腫瘍遺伝子のいくつかは、キナーゼ、すなわち、タンパク質基質または脂質基質をリン酸化することができる酵素のクラスである、ペプチドの産生をもたらす。キナーゼにはいくつかのクラスがある。

#### 【0004】

第一にチロシンキナーゼであり、これは、受容体チロシンキナーゼまたは非受容体チロシンキナーゼであることができる。さまざまなクラスの受容体チロシンキナーゼが、異なる受容体チロシンキナーゼの細胞外表面に結合することができる成長因子ファミリーに基づき公知である（Wilks, Advances in Cancer Research, 1993, 60, 43-73）；一例として、分類は、EGFファミリーの受容体チロシンキナーゼを含むクラスI受容体チロシンキナーゼを包含する。非受容体チロシンキナーゼは細胞内に位置する；Src、Lyn、FynおよびYesチロシンキナーゼなどのSrcファミリーを含む、さまざまなクラスの非受容体チロシンキナーゼが公知である。

20

#### 【0005】

つぎに、特定のキナーゼは、同様に細胞内に位置するセリン/スレオニンキナーゼのクラスに属する。セリン/スレオニンキナーゼシグナル伝達経路は、Raf-MEK-ERKカスケード、ならびにPDK-1、AKTおよびmTORなどPI3キナーゼの下流のものを包含する（Blume-JensenおよびHunter, Nature, 2001, 411, 355）。

30

#### 【0006】

特定の他のキナーゼは脂質キナーゼのクラスに属することも知られている。これらは、細胞内に位置し、上記キナーゼと同様に、生化学的シグナル、例えば、腫瘍細胞の成長および侵襲性に影響を及ぼすシグナルの伝達に参与する。上記PI3キナーゼファミリーを含むさまざまなクラスの脂質キナーゼが公知である。

40

#### 【0007】

現在、腫瘍遺伝子および腫瘍抑制遺伝子の脱調節(deregulation)は、例えば増大した細胞増殖または増大した細胞生存により、悪性腫瘍の形成に寄与することが、十分に理解されている。現在、PI3キナーゼファミリーにより媒介されるシグナル伝達経路は、増殖および生存を含むいくつかの細胞プロセスにおいて中心的役割を有し、これらの経路の脱調節は、広範なヒトの癌および他の疾患の原因要素であることも、公知である（Katsou et al., Annual Rev. Cell Dev. Biol., 2001, 17: 615-617およびFoster et al., J. Cell Science, 2003, 116: 3037-3040）。

#### 【0008】

50

脂質キナーゼのPI3キナーゼファミリーは、ホスファチジルイノシトール(PI)のイノシトール環の3位をリン酸化する酵素の群である。PI3キナーゼ酵素の主要な3群が公知であり、これらは、その生理学的特異性に従って分類されている(Vanhaesebroeck et al., Trends in Biol. Sci., 1997, 22, 267; Engleman et al., Nature Review Genetics, 2006, 7, 607)。クラスIIIのPI3キナーゼ酵素は、PIだけをリン酸化する。対照的に、クラスIIのPI3キナーゼ酵素は、PIおよびPI4-リン酸[以下、PI(4)Pと略す]の両方をリン酸化する。クラスIのPI3キナーゼ酵素は、PI、PI(4)PおよびPI4,5-ビスリン酸[以下、PI(4,5)P2と略す]をリン酸化するが、生理学的細胞基質と考えられるのはPI(4,5)P2だけである。PI(4,5)P2のリン酸化は、脂質のセカンドメッセンジャーのPI3,4,5-三リン酸[以下、PI(3,4,5)P3と略す]をもたらす。このスーパーファミリーのより関連が遠いメンバーは、クラスIVのキナーゼ、例えば、タンパク質基質内のセリン/スレオニン残基をリン酸化するmTORおよびDNA依存性タンパク質キナーゼである。これら脂質キナーゼのうちもっとも研究され理解されているのは、クラスIのPI3キナーゼ酵素である。

#### 【0009】

クラスIのPI3キナーゼは、p110触媒サブユニットおよび調節サブユニットからなるヘテロ二量体であり、そのファミリーは、調節パートナーおよび調節機序に基づき、さらにクラスIaおよびクラスIbの酵素に分けられる(Engleman et al., Nature Review Genetics, 2006, 7, 607)。クラスIaの酵素は、5つの別個の調節サブユニット(p85、p55、p50、p85およびp55)と二量化する3つの別個の触媒サブユニット(p110、p110およびp110、命名法により、PI3キナーゼのアイソフォームをそれぞれ、と定義する)からなり、すべての触媒サブユニットはすべての調節サブユニットと相互作用して、さまざまなヘテロ二量体を形成することができる。クラスIaのPI3キナーゼ酵素は、一般に、受容体チロシンキナーゼの成長因子刺激に应答して、調節サブユニットSH2ドメインと、活性化受容体またはIRS-1などのアダプタータンパク質の特定のホスホチロシン残基との相互作用を介して、活性化される。p110およびp110は両方とも、複数の細胞タイプおよび組織に幅広く発現するが、p110の発現は、白血球集団およびいくつかの上皮細胞に、より限定されている。対照的に、単一のクラスIb酵素は、p101調節サブユニットと相互作用するp110触媒サブユニットからなる。さらに、クラスIb酵素は、Gタンパク質共役受容体(GPCR)系に应答して、および上記機序により、活性化される。

#### 【0010】

現在、クラスIaのPI3キナーゼ酵素が、多種多様なヒト癌における腫瘍形成に直接的または間接的に寄与することを示す、多くの証拠がある(VivanoおよびSawyers, Nature Reviews Cancer, 2002, 2, 489-501)。とりわけ、PI3キナーゼのp110触媒サブユニットをコードするPIK3CA遺伝子は腫瘍形成に広く関与する。p110のヘリカルドメインまたは触媒ドメインにもっともよく見いだされる活性化点変異は、ホロ酵素のPI3キナーゼ活性を向上させ、細胞を形質転換することができる。それらは、とりわけ、体細胞において広範な腫瘍タイプにかなりの頻度で生じる変異として報告されている(Samuels et al., Science, 2004, 304, 554; Samuels et al., Cancer Cell, 2005, 7, 561; Engleman et al., Nature Review Genetics, 2006, 7, 607; Zhao LおよびVogt PK, Oncogene, 2008, 27, 5486)。p85における腫瘍関連変異も、卵巣癌および結腸癌などの癌で確認されている(Philip et al., Cancer Research, 2001, 61, 7426-7429)。さらに、p110サブユニットは、卵巣腫瘍(Shayesteh et al., Natur

e Genetics, 1999, 21, 99 - 102) および子宮頸部腫瘍 (Ma et al., Oncogene, 2000, 19, 2739 - 2744) などいくつかの腫瘍において増幅される。

#### 【0011】

直接的作用に加え、クラスIaのPI-3キナーゼの活性化は、例えば、受容体チロシンキナーゼ、GPCR系またはインテグリンのリガンド依存型またはリガンド非依存型の活性化により、シグナル伝達経路の上流で起こる腫瘍形成事象に寄与すると考えられる (Vara et al., Cancer Treatment Reviews, 2004, 30, 193 - 204)。そのような上流のシグナル伝達経路の例としては、さまざまな腫瘍においてPI3キナーゼ媒介経路の活性化をもたらす受容体チロシンキナーゼErb2の過剰発現 (Harari et al., Oncogene, 2000, 19, 6102 - 6114) と、腫瘍遺伝子Rasの過剰発現 (Kaufmann - Zeh et al., Nature, 1997, 385, 544 - 548) が挙げられる。これに加えて、クラスIaのPI3キナーゼは、さまざまな下流のシグナル伝達事象により引き起こされる腫瘍形成に寄与する可能性がある。例えば、PI(3, 4, 5)P3からもとのPI(4, 5)P2への変換を触媒するPTEN腫瘍抑制ホスファターゼの作用の喪失は、PI3キナーゼが媒介するPI(3, 4, 5)P3の産生の脱調節を介して、非常に広範囲の腫瘍と関連づけられている (SimpsonおよびParsons, Exp. Cell Res., 2001, 264, 29 - 41)。さらに、PI3キナーゼが媒介する他のシグナル伝達事象の作用の増大は、例えばAktの活性化により、さまざまな癌に寄与すると考えられる (NicholsonおよびAnderson, Cellular Signalling, 2002, 14, 381 - 395)。

10

20

#### 【0012】

したがって、PI3キナーゼの一般的な脱調節は、上流および下流のシグナル伝達経路の脱調節とともに、集合的にヒト癌においてもっとも一般的な脱調節された経路の一つになる (Hennessey et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4, 988)。

#### 【0013】

腫瘍細胞において増殖および生存のシグナル伝達を媒介する役割に加えて、クラスIaのPI3キナーゼ酵素が、腫瘍関連間質細胞における機能を介して腫瘍形成にも寄与するという証拠も十分にある。例えば、PI3キナーゼのシグナル伝達は、VEGFなどの血管新生促進因子(pro-angiogenic factor)に応答して内皮細胞において血管新生事象を媒介することにおいて、重要な役割を果たすことが知られている (Abid et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2004, 24, 294 - 300)。クラスIのPI3キナーゼ酵素は運動および移動にも関与するので (Sawyer, Expert Opinion Investig. Drugs, 2004, 13, 1 - 19)、PI3キナーゼ阻害剤は、腫瘍細胞の侵襲および転移の阻害を介して治療上の利益をもたらすはずである。

30

#### 【0014】

これに加えて、クラスIのPI3キナーゼ酵素は、炎症細胞の腫瘍形成促進作用(pro-tumorigenic effect)に寄与するPI3キナーゼ活性を有する免疫細胞の調節において、重要な役割を果たす (CousensおよびWerb, Nature, 2002, 420, 860 - 867)。実際、クラスIaのPI3キナーゼ酵素であるPI3キナーゼは、血液学的悪性腫瘍、例えば、慢性リンパ球性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、およびマンツル細胞リンパ腫(MCL)における腫瘍形成に、特に関与している。PI3K(おもにp110)のシグナル伝達の増加が、広範な悪性リンパ球様細胞に報告されている (Herman et al., Blood, 2010, 116. 2078; Ikeda et al., Blood, 2010, 116, 1460; Uddin et al., Blood, 2006, 108, 4178; Rudelius et al., Blood, 2006, 108, 1668; Garcia - Marti

40

50

nez. , Br J Cancer , 2011 , 104 , 1116 ; Renne et al. , Leukemia , 2007 , 2 , 780 )。これにより、PI3キナーゼを標的とし、血液学的悪性腫瘍における初期臨床結果が有望な作用物質が開発された ( Castillo et al. , Expert Opinion on Investigational Drugs , 2012 , 21 , 15 )。

【0015】

これらの所見は、クラスIのPI3キナーゼ酵素の薬理的阻害剤が、癌腫および肉腫などの固形腫瘍ならびに白血病およびリンパ性悪性疾患を含むさまざまな形態の癌疾患の処置に、治療的有用性を有する可能性があることを示唆している。

【0016】

PI3キナーゼ酵素の生理学および病理学的役割を探求する初期の研究では、前臨床および臨床研究の両方で、より広範なキナーゼファミリー、PI3キナーゼファミリー、またはPI3キナーゼのクラス1ファミリーに、限定されたキナーゼ阻害選択性を有する作用物質が広く用いられていた。したがって、臨床に入っている初期の作用物質を超える改善された治療限界をもたらす可能性がある有用な治療薬を提供するために、より選択的な薬学的PI3キナーゼのクラス1の阻害剤が必要とされている。

【0017】

一般に、本発明の化合物は、クラスIのPI3キナーゼ酵素のサブセットに対し強力な阻害活性を持つ。とりわけクラスIaのPI3キナーゼ - および - アイソフォームに対し強力な阻害活性を持ち、 - およびとりわけ - アイソフォームに対する阻害活性は比較的低い。該化合物は、より広範なPI3キナーゼファミリーおよびより広範なキノームに対しても選択性を示す。そのような化合物は、クラスIのPI3キナーゼ酵素に対し十分な効力を持ち、クラスIのPI3キナーゼのアイソフォームのサブセットを阻害するのに十分な量、とりわけ、クラスIaのPI3キナーゼ酵素 - および - を阻害するのに十分な量で用いることができる一方、他のキナーゼに対してはほとんど活性を示さない。

【0018】

ヒトの癌および他の疾患におけるPI3キナーゼシグナル伝達の脱調節を理解することにより、個別化ヘルスケア (PHC) または個別化医療として知られるプロセスを通じて本特許に記載する作用物質の処置により恩恵を受ける可能性がもっとも高い患者のサブセットを、標的にする見通しが得られる。これらの作用物質では、増加または変更されたPI3K - シグナル伝達および/またはPI3K - シグナル伝達に依存する疾患を有する患者が、とりわけ処置から恩恵を受けることができる。応答 - 予測バイオマーカーの読み取りを提供するために診断を用いることができることは周知である。そのような診断により、経路の脱調節の1以上の読み取り、例えば、限定されるものではないが、PIK3CA、PTENもしくはp85 (PIK3R) 遺伝子における変異、PIK3CA遺伝子の増幅もしくは複製数増加、PI3K - および/もしくは - アイソフォームの過剰発現もしくは活性上昇、または、ホスホ - RTKもしくはホスホ - AKTなどの経路内でのホスホバイオマーカーの読み取りの使用を、評価することが可能である。これに加えて、異常または脱調節されたPIK3CAもしくはPI3K - を有する腫瘍における耐性の潜在的マーカーであるKrasなどの追加的遺伝子の変異状態または活性化状態の測定は ( Engelman et al. , Nature Medicine , 2008 , 14 , p1351 - 1355 ; Ihle et al. , Cancer Research , 2009 , 69 , p143 - 160 ; Janku et al. , Molecular Cancer Therapeutics , 2011 , 10 , p558 - 564 )、個別化医療アプローチの予測性の向上に役立つ可能性がある。あるいは、標的化しているがあまり特異的ではない他のアプローチにおいて、処置は、関連PI3Kアイソフォームの脱調節がもっとも多く見られることが公知の疾患サブセットに集中している可能性がある。

【0019】

記載する化合物は、単独または他の薬学的作用物質 (1以上) との組み合わせで、疾患

10

20

30

40

50

を標的にするために用いることができる。PI3キナーゼ阻害剤を他の治療と組み合わせると、先天性またはPI3キナーゼ作用物質に応答して誘発される耐性機序を克服することにより、効力を改善することができる。そのようなアプローチを裏付けるのに十分な前臨床データがある(Courtney et al., J Clin Oncol, 2010, 28, 1075; Engleman et al., Nature Review Genetics, 2006, 7, 607)。アプローチの1つは、PI3キナーゼシグナル伝達経路において他の軸を変調させる作用物質(例えば、mTOR、AKT、RTK、他のPI3-キナーゼ作用物質)との‘経路内部’の組み合わせである。第2のアプローチは、1より多くのシグナル伝達経路の阻害が単一経路の阻害より有益であり得る‘経路間’の組み合わせである(例えば、MEK阻害剤、Raf阻害剤、Bclファミリーモジュレーター、RTK阻害剤、またはPARP阻害剤などDNA損傷シグナル伝達モジュレーターとの組み合わせ)。他のアプローチとしては、PI3キナーゼ阻害剤を、臨床業務においてすでに確立されている作用物質もしくは治療方式、いわゆる標準治療(SOC)アプローチと組み合わせるか、腫瘍間質細胞などの非腫瘍細胞機序を標的にする作用物質と組み合わせるか、または免疫系を介することが挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0020】

腫瘍形成に加え、クラスIのPI3キナーゼ酵素が他の疾患の一因となる証拠がある(Wymann et al., Trends in Pharmacological Science, 2003, 24, 366-376)。クラスIaのPI3キナーゼ酵素の両方、とりわけPI3K-、および単一のクラスIb酵素(PI3K-)は、免疫系の細胞において重要な役割を有し(Koyasu, Nature Immunology, 2003, 4, 313-319)、したがって、炎症性およびアレルギー性の適応症の治療標的である。PI3キナーゼの阻害はまた、先に記載したように、抗炎症作用を介するか、心筋細胞に影響を及ぼすことにより直接的に、心臓血管疾患を処置するのに有用である(Prasad et al., Trends in Cardiovascular Medicine, 2003, 13, 206-212)。このように、クラスIのPI3キナーゼ酵素の阻害剤は、癌に加え多種多様な疾患の予防および処置に有用であることができる。

#### 【0021】

本発明の化合物、すなわちアミノピラジン誘導体は、強力な抗腫瘍活性を持つことが見いだされており、悪性疾患に起因する制御されていない細胞増殖の阻害に有用である。本発明に開示する化合物が薬理的活性を持つことを単一の生物学的プロセスに対する作用に基づいてのみ示唆しようとするものではないが、該化合物は、クラスIのPI3キナーゼ酵素の阻害により、とりわけクラスIaのPI3キナーゼ酵素のサブセットの阻害により、さらに特にPI3K-および-アイソフォームの阻害により、抗腫瘍作用をもたらすと考えられる。

#### 【0022】

本発明の化合物はまた、炎症性疾患(例えば、リウマチ様関節炎および炎症性腸疾患)、線維症(例えば、肝硬変および肺線維症)、腎炎、多発性硬化症、乾癬、良性前立腺肥大症(BPH)、皮膚の超過敏反応、血管疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症および再狭窄)、アレルギー性喘息、インスリン依存性糖尿病、糖尿病性網膜症および糖尿病性腎障害などさまざまな非悪性疾患に起因する、制御されていない細胞増殖の阻害に有用であることができる。

#### 【0023】

プロリンアミドは、国際特許出願WO2009/080705号、WO2010/029082号およびWO2011/000905号においてNovartisによりPI3K-選択性作用物質として開示されている。アミノピラジン含有ATRキナーゼ阻害剤は、WO2011/143426号およびWO2010/071837号(Vertex)に開示されている。

#### 【先行技術文献】

## 【特許文献】

【0024】

【特許文献1】WO2009/080705号

【特許文献2】WO2010/029082号

【特許文献3】WO2011/000905号

【特許文献4】WO2011/143426号

【特許文献5】WO2010/071837号

## 【非特許文献】

【0025】

【非特許文献1】Mutagenesis, 1986, 1, 91

10

【非特許文献2】Advances in Cancer Research, 1993, 60, 43-73

【非特許文献3】Nature, 2001, 411, 355

【非特許文献4】Annual Rev. Cell Dev. Biol., 2001, 17: 615-617

【非特許文献5】J. Cell Science, 2003, 116: 3037-3040

【非特許文献6】Trends in Biol. Sci., 1997, 22, 267

【非特許文献7】Nature Review Genetics, 2006, 7, 607

20

【非特許文献8】Nature Reviews Cancer, 2002, 2, 489-501

【非特許文献9】Science, 2004, 304, 554

【非特許文献10】Cancer Cell, 2005, 7, 561

【非特許文献11】Oncogene, 2008, 27, 5486

【非特許文献12】Cancer Research, 2001, 61, 7426-7429

【非特許文献13】Nature Genetics, 1999, 21, 99-102

【非特許文献14】Oncogene, 2000, 19, 2739-2744

【非特許文献15】Cancer Treatment Reviews, 2004, 30, 193-204

30

【非特許文献16】Oncogene, 2000, 19, 6102-6114

【非特許文献17】Nature, 1997, 385, 544-548

【非特許文献18】Exp. Cell Res., 2001, 264, 29-41

【非特許文献19】Cellular Signaling, 2002, 14, 381-395

【非特許文献20】Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4, 988

【非特許文献21】Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2004, 24, 294-300

40

【非特許文献22】Expert Opinion Investig. Drugs, 2004, 13, 1-19

【非特許文献23】Nature, 2002, 420, 860-867

【非特許文献24】Blood, 2010, 116, 2078

【非特許文献25】Blood, 2010, 116, 1460

【非特許文献26】Blood, 2006, 108, 4178

【非特許文献27】Blood, 2006, 108, 1668

【非特許文献28】Br J Cancer, 2011, 104, 1116

【非特許文献29】Leukemia, 2007, 2, 780

【非特許文献30】Expert Opinion on Investigation

50

al Drugs, 2012, 21, 15

【非特許文献31】Nature Medicine, 2008, 14, p1351-1355

【非特許文献32】Cancer Research, 2009, 69, p143-160

【非特許文献33】Molecular Cancer Therapeutics, 2011, 10, p558-564

【非特許文献34】J Clin Oncol, 2010, 28, 1075

【非特許文献35】Trends in Pharmacological Science, 2003, 24, 366-376

【非特許文献36】Nature Immunology, 2003, 4, 313-319

【非特許文献37】Trends in Cardiovascular Medicine, 2003, 13, 206-212

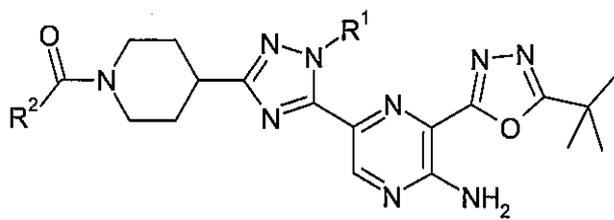
【発明の概要】

【0026】

本発明の一観点に従って、式(I)の化合物

【0027】

【化1】



(I)

【0028】

[式中:]

R<sup>1</sup>は、メチルまたはエチルであり；そして

R<sup>2</sup>は、ヒドロキシルにより置換されている(C2-3)アルキルである]；

または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

【0029】

本発明の他の観点において、先に定義した式(I)の化合物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】実施例1フォームAのX線粉末回折パターンを示す。

【図2】実施例1フォームAのDSCサーモグラムを示す。

【図3】実施例3フォームAのX線粉末回折パターンを示す。

【図4】実施例3フォームAのDSCサーモグラムを示す。

【図5】実施例3フォームBのX線粉末回折パターンを示す。

【図6】実施例3フォームBのDSCサーモグラムを示す。

【図7】実施例3フォームCのX線粉末回折パターンを示す。

【図8】実施例3フォームCのDSCサーモグラムを示す。

【図9】逐次投与でAKT阻害剤(AZD5363)と組み合わせた実施例3による腫瘍成長阻害を示す。

【図10】同時投与でAKT阻害剤(AZD5363)と組み合わせた実施例3による腫瘍成長阻害を示す。

【図11】BT474異種移植モデルにおけるPARP阻害剤(オラパリブ)と組み合わせた実施例3による腫瘍成長阻害を示す。

【図 1 2】M C F 7 異種移植モデルにおける P A R P 阻害剤（オラパリブ）と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害を示す。

【図 1 3】（A Z D 8 1 8 6）と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害を示す。

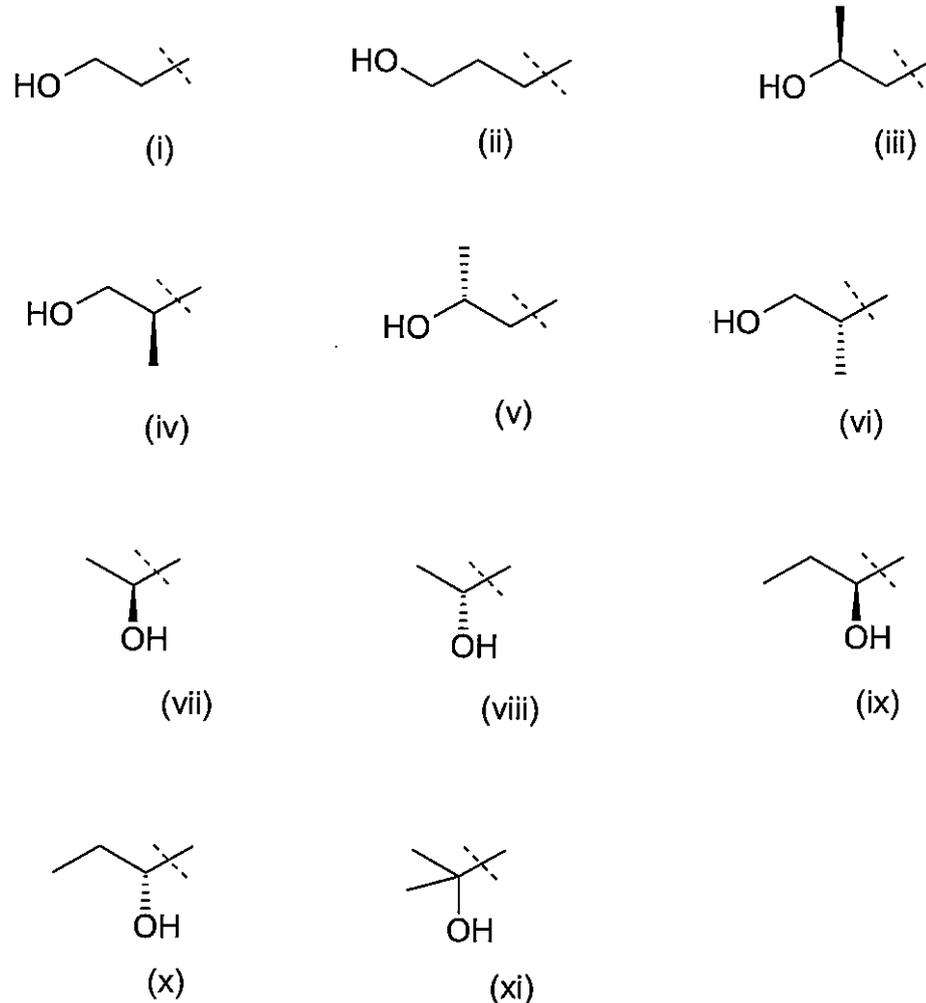
【発明を実施するための形態】

【0031】

“ヒドロキシルにより置換されている（C 2 - 3）アルキル”という用語が、直鎖および分枝アルキル基の両方、例えば基（i）～（xi）として以下に例示するものを包含することは、理解されるであろう：

【0032】

【化 2】



10

20

30

【0033】

先に定義した式（I）の化合物のいくつかは、1以上の不斉炭素原子に基づき光学活性形態またはラセミ形態で存在することができる場合、本発明は、P I 3 K - および - 阻害活性を持つあらゆる光学活性形態またはラセミ形態をその定義に包含することは、理解されるであろう。光学活性形態の合成は、当分野で周知の有機化学の標準的技術により、例えば、光学活性出発材料からの合成によるかラセミ形態の分割により、実施することができる。同様に、上記活性は、標準的な実験技術を用いて評価することができる。

40

【0034】

本明細書中に記載する化合物の特定のエナンチオマーは、同化合物の他のエナンチオマーより活性であることができる。

【0035】

本発明の他の観点に従って、95、98%または99%のエナンチオマー過剰率（% e e）にある単一エナンチオマーである式（I）の化合物または薬学的に許容しうる

50

その塩を提供する。単一エナンチオマーは、99%のエナンチオマー過剰率(%ee)で存在すると好都合である。

【0036】

本発明の他の観点に従って、95、98%または99%のエナンチオマー過剰率(%ee)にある単一エナンチオマーである式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、医薬組成物を提供する。単一エナンチオマーは、99%のエナンチオマー過剰率(%ee)で存在すると好都合である。

【0037】

いくつかの式(I)の化合物は結晶質であることができ、1より多くの結晶形を有することができる。本発明は任意の結晶質もしくは非晶質形態またはその混合物を包含し、該形態はPI3K-および-活性の阻害に有用な性質を持ち、PI3K-および/または-活性の阻害に関する結晶質または非晶質形態の効力を以下に記載する標準試験により決定する方法は当分野で周知であることを、理解すべきである。

10

【0038】

結晶質材料は、X線粉末回折(以下、XRPD)分析、示差走査熱量測定(以下、DSC)、熱重量分析(以下、TGA)、拡散反射フーリエ変換赤外(DRIFT)分光法、近赤外(NIR)分光法、溶液および/または固体状態核磁気共鳴分光法などの従来技術を用いて分析することができることが、一般に知られている。そのような結晶質材料の含水量は、カールフィッシャー分析により決定することができる。

20

【0039】

一例として、実施例1の化合物は結晶度を示し、1つの結晶形が同定された。

【0040】

したがって、本発明の他の観点は、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンのフォームAである。

【0041】

本発明の他の観点に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームAであって、約2シータ=5.1°に少なくとも1つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

30

【0042】

本発明の他の観点に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームAであって、約2シータ=18.0°に少なくとも1つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

40

【0043】

本発明の他の観点に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームAであって、約2シータ=5.1および18.0°に少なくとも2つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

【0044】

本発明の他の観点に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシ

50

プロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 5 . 1、18 . 0、10 . 2、11 . 7、19 . 4、18 . 5、14 . 8、26 . 7、26 . 6、17 . 8 ° に特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

【0045】

本発明に従って、図 1 に示す X 線粉末回折パターンと実質的に同じ X 線粉末回折パターンを有する結晶形、フォーム A を提供する。

【0046】

本発明の他の観点に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - メチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 5 . 1 ° プラスまたはマイナス 0 . 2 ° の 2 シータに少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

10

【0047】

本発明の他の観点に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - メチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 18 . 0 ° プラスまたはマイナス 0 . 2 ° の 2 シータに少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

20

【0048】

本発明の他の観点に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - メチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 5 . 1 および 18 . 0 ° プラスまたはマイナス 0 . 2 ° の 2 シータに少なくとも 2 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

【0049】

本発明の他の観点に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - メチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 5 . 1、18 . 0、10 . 2、11 . 7、19 . 4、18 . 5、14 . 8、26 . 7、26 . 6、17 . 8 ° プラスまたはマイナス 0 . 2 ° の 2 シータに特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

30

【0050】

実施例 3 も結晶質であり、3 つのフォーム (A、B および C) を本明細書中に記載する。

【0051】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 4 . 8 ° に少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

40

【0052】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 10 . 0 ° に少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

50

## 【0053】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 4.8° および 10.0° に少なくとも 2 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

## 【0054】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、約 2 シータ = 4.8、10.0、14.6、5.2、19.9、10.4、25.4、23.6、24.4、16.2° に特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

10

## 【0055】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、図 3 に示す X 線粉末回折パターンと実質的に同じ X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

20

## 【0056】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、2 シータ = 4.8° プラスまたはマイナス 0.2° の 2 シータに少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

## 【0057】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、2 シータ = 10.0° プラスまたはマイナス 0.2° の 2 シータに少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

30

## 【0058】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、2 シータ = 4.8° および 10.0° に少なくとも 2 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有し、前記値がプラスまたはマイナス 0.2° の 2 シータである可能性があるものを提供する。

40

## 【0059】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム A であって、2 シータ = 4.8、10.0、14.6、5.2、19.9、10.4、25.4、23.6、24.4、16.2° に特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有し、前記値がプラスまたはマイナス 0.2° の 2 シータである可能性があるものを提供する。

## 【0060】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1,

50

3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、約 2 シータ = 5.8° に少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

【0061】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、約 2 シータ = 10.9° に少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

10

【0062】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、約 2 シータ = 5.8° および 10.9° に少なくとも 2 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

【0063】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、約 2 シータ = 5.8、10.9、11.5、25.9、17.3、24.0、19.1、12.9、24.7、27.2° に特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

20

【0064】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、図 5 に示す X 線粉末回折パターンと実質的に同じ X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

【0065】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、2 シータ = 5.8° プラスまたはマイナス 0.2° の 2 シータに少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

30

【0066】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、2 シータ = 10.9° プラスまたはマイナス 0.2° の 2 シータに少なくとも 1 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有するものを提供する。

40

【0067】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォーム B であって、2 シータ = 5.8° および 10.9° に少なくとも 2 つの特異的ピークを有する X 線粉末回折パターンを有し、前記値がプラスまたはマイナス 0.2° の 2 シータである可能性があるものを提供する。

50

## 【0068】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームBであって、2シート=5.8、10.9、11.5、25.9、17.3、24.0、19.1、12.9、24.7、27.2°に特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有し、前記値がプラスまたはマイナス0.2°の2シートである可能性があるものを提供する。

## 【0069】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームCであって、約2シート=6.9°に少なくとも1つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

10

## 【0070】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームCであって、約2シート=12.3°に少なくとも1つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

20

## 【0071】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームCであって、約2シート=6.9°および12.3°に少なくとも2つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

## 【0072】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームCであって、約2シート=6.9、12.3、10.5、21.0、24.6、13.6、16.4、19.6、20.2、22.5°に特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

30

## 【0073】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームCであって、図7に示すX線粉末回折パターンと実質的に同じX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

## 【0074】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンの結晶形、フォームCであって、2シート=6.9°プラスまたはマイナス0.2°の2シートに少なくとも1つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

40

## 【0075】

本発明に従って、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-

50

1 - オンの結晶形、フォームCであって、2シート = 12.3°プラスまたはマイナス0.2°の2シートに少なくとも1つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有するものを提供する。

【0076】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォームCであって、2シート = 6.9°および12.3°に少なくとも2つの特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有し、前記値がプラスまたはマイナス0.2°の2シートである可能性があるものを提供する。

10

【0077】

本発明に従って、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル)ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンの結晶形、フォームCであって、2シート = 6.9、12.3、10.5、21.0、24.6、13.6、16.4、19.6、20.2、22.5°に特異的ピークを有するX線粉末回折パターンを有し、前記値がプラスまたはマイナス0.2°の2シートである可能性があるものを提供する。

【0078】

本発明が実施例1または実施例3のような本発明の化合物の結晶形に関連すると記載している場合、結晶化度は、好都合には約60%を超え、より好都合には約80%を超え、好ましくは約90%を超え、より好ましくは約95%を超える。もっとも好ましくは、結晶化度は約98%を超える。

20

【0079】

本発明が実施例1または実施例3のような本発明の化合物の結晶形に関連すると記載している場合、該結晶形は、同化合物の他の結晶形または非晶質形態を実質的に含まないことが好ましい。この文脈において、“実質的に含まない”は、純粋な単一結晶形が、好都合には約60%を超え、より好都合には約80%を超え、好ましくは約90%を超え、より好ましくは約95%を超え、さらにより好ましくは約98%を超え、さらにより好ましくは約99%を超えることを意味する。例えば、実施例3はフォームAの形態にあり、フォームBおよびCを実質的に含まないことができ；あるいは、実施例3はフォームBの形態にあり、フォームAおよびCを実質的に含まないことができ；あるいは、実施例3はフォームCの形態にあり、フォームAおよびBを実質的に含まないことができる。同様に、実施例3はフォームBの形態にあり、他の結晶質または非晶質形態を実質的に含まないことができる。

30

【0080】

X線粉末回折パターンの2シート値は、機械または試料によってわずかに変動する可能性があるので、引用する値を絶対的なものと解釈すべきではない。

【0081】

X線粉末回折パターンは、測定条件（用いる機器または機械など）に応じて1以上の測定誤差を有するものが得られる可能性があることが公知である。とりわけ、X線粉末回折パターンの強度が測定条件により変動する可能性があることは、一般に公知である。したがって、上記本発明の結晶形は、特記しない限り、図1、3、5に示すX線粉末回折パターンと同一のX線粉末回折パターンを提供する結晶に限定されず、これらの図に示すものと実質的に同じX線粉末回折パターンを提供する結晶は、本発明の範囲内にあることを、理解すべきである。X線粉末回折の分野の技術者なら、X線粉末回折パターンの実質的同一性を判断することができる。

40

【0082】

X線粉末回折の分野の技術者なら、ピークの相対強度が、例えば、30ミクロンより大きいサイズの粒子や試料の分析に影響を及ぼしうる非ユニタリーな (non-unitary) アス

50

ペクト比により影響を受ける可能性があることも、理解するであろう。当業者は、反射位置が、回折計の中で試料が置かれる位置の正確な高さと同軸のゼロ較正により影響を受ける可能性があることも、理解するであろう。試料表面の平面性もわずかな影響を有する可能性がある。したがって、提示する回折パターンデータは、絶対的な値とみなすべきではない (Jenkins, R & Snyder, R. L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons 1996; Bunn, C. W. (1948), Chemical Crystallography, Clarendon Press, ロンドン; Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), X-Ray Diffraction Procedures 参照)。

10

**【0083】**

一般に、X線粉末ディフトラムにおける回折角の測定誤差は、 $2\theta$ のおよそプラスまたはマイナス $0.2^\circ$ であり、そのような程度の測定誤差を、X線粉末回折データを検討する際は考慮すべきである。さらに、強度は、実験条件および試料調製 (選択配向 (preferred orientation)) に応じて変動しうることを理解すべきである。

**【0084】**

本発明の特定の化合物は各実施例であり、各実施例はさらに、本発明の独立した観点を提供する。本発明の他の特定の化合物は、各実施例の薬学的に許容しうる塩 (1以上) であり、各実施例はさらに、本発明の独立した観点を提供する。

20

**【0085】**

本発明の他の観点に従って、本明細書中に開示する実施例のいずれかに従って得ることができる式 (I) の化合物を提供する。

**【0086】**

他の特徴は、実施例 1、3、4 など具体的実施例を個別に放棄するという条件で、本明細書中で定義する範囲のいずれかである。

**【0087】**

当業者なら、式 (I) の特定の化合物は非対象に置換された炭素原子を含有し、したがって、光学活性形態およびラセミ形態で存在することができ、そのような形態で単離することができることを、理解するであろう。式 (I) のいくつかの化合物は、多形性を示す可能性がある。本発明は任意のラセミ形態、光学活性形態、多形形態もしくは立体異性形態、またはそれらの混合物を包含し、該形態が P I 3 K - および - 活性の阻害に有用な性質を持ち、光学活性形態の調製法 (例えば、再結晶化技術によるラセミ形態の分割によるか、光学活性出発材料からの合成によるか、キラル合成によるか、酵素的分割によるか、生体内変換によるか、キラル固定相を用いるクロマトグラフ分離による) および以下に記載する標準試験により P I 3 K - および - 活性の阻害に関する効力を決定する方法が当分野で周知であることを、理解すべきである。

30

**【0088】**

先に定義した式 (I) の特定の化合物は互変異性現象を示す可能性があることを、理解すべきである。本発明は、その定義に P I 3 K 阻害活性を持つそのような互変異性形態またはその混合物を包含し、化学式の図内で利用されているか実施例で名前を挙げられている任意の1つの互変異性形態のみに限定されるものではないことを、理解すべきである。一般に、任意のそのような互変異性形態の1つだけを、以下に続く実施例で名前を挙げてあり、または、以下に続く任意の関連する化学式の図に提示している。

40

**【0089】**

本発明は、本化合物で生じる原子のすべての同位体を包含するものとする。同位体が、同じ原子番号を有するが異なる質量数を有する原子を包含することは、理解されるであろう。例えば、水素の同位体として、トリチウムおよびジウテリウムが挙げられる。炭素の同位体としては  $C^{13}$  および  $C^{14}$  が挙げられる。

**【0090】**

式 (I) の化合物の適した薬学的に許容しうる塩は、例えば、式 (I) の化合物の酸付

50

加塩、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸またはトリフルオロ酢酸などの強い無機酸または有機酸との酸付加塩である。式 ( I ) の化合物の他の適した薬学的に許容しうる塩は、例えば、式 ( I ) の化合物の投与後にヒトまたは動物の体内で形成される塩である。

【 0 0 9 1 】

さらに、式 ( I ) の化合物の適した薬学的に許容しうる溶媒和物も本発明の観点を構成することを、理解すべきである。適した薬学的に許容しうる溶媒和物は、例えば、半水和物、一水和物、二水和物もしくは三水和物または他の量の水和物などの水和物である。

【 0 0 9 2 】

さらに、式 ( I ) の化合物の適した薬学的に許容しうるプロドラッグも本発明の観点を構成することを、理解すべきである。したがって、本発明の化合物は、ヒトまたは動物の体内で分解して本発明の化合物を放出する化合物であるプロドラッグの形態で投与することができる。プロドラッグは、本発明の化合物の物理的特性および/または薬物動態学的特性を変更するために用いることができる。本発明の化合物が、改質基が付着することができる適した基または置換基を含有する場合、プロドラッグを形成することができる。プロドラッグの例としては、式 ( I ) の化合物中のヒドロキシ基において形成することができる *in-vivo* 開裂性エステル誘導体、および式 ( I ) の化合物中のアミノ基において形成することができる *in-vivo* 開裂性アミド誘導体が挙げられる。

10

【 0 0 9 3 】

したがって、本発明は、有機合成により利用可能になる場合、およびプロドラッグの開裂によりヒトまたは動物の体内で利用可能になる場合の、先に定義した式 ( I ) の化合物を包含する。したがって、本発明は、有機合成手段により生じる式 ( I ) の化合物のほか、前駆体化合物の代謝によりヒトまたは動物の体内で生じる化合物を包含する、すなわち、式 ( I ) の化合物は、合成的に生成される化合物または代謝的に生成される化合物であることができる。

20

【 0 0 9 4 】

式 ( I ) の化合物の適した薬学的に許容しうるプロドラッグは、望ましくない薬理学的活性および不適切な毒性がなく、ヒトまたは動物の体に投与するのに適しているという、合理的な医学的判断に基づいたものである。

【 0 0 9 5 】

さまざまな形態のプロドラッグが、例えば以下の文書に記載されている： -

30

a) Methods in Enzymology, Vol. 42, p309 - 396

、K. Widder, et al. 編集 (Academic Press, 1985) ;

b) Design of Pro-drugs、H. Bundgaard 編集 (Elsevier, 1985) ;

c) A Textbook of Drug Design and Development、Krogsgaard-Larsen および H. Bundgaard 編集、H. Bundgaard による第5章 “Design and Application of Pro-drugs”、p113 - 191 (1991) ;

d) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1 - 38 (1992) ;

40

e) H. Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988) ;

f) N. Kakeya, et al., Chem. Pharm. Bull., 32, 692 (1984) ;

g) T. Higuchi および V. Stella, “Pro-Drugs as Novel Delivery Systems”, A.C.S. Symposium Series, Volume 14 ; および

h) E. Roche ( 編者 )、 “Bioreversible Carriers in Drug Design”、Pergamon Press、1987。

50

【 0 0 9 6 】

ヒドロキシ基を持つ式 (I) の化合物の適した薬学的に許容しうるプロドラッグは、例えば、その *in vivo* 開裂性エステルまたはエーテルである。ヒドロキシ基を含有する式 (I) の化合物の *in vivo* 開裂性エステルまたはエーテルは、例えば、ヒトまたは動物の体内で開裂して親ヒドロキシ化合物を生じる薬学的に許容しうるエステルまたはエーテルである。ヒドロキシ基に適した薬学的に許容しうるエステル形成基は、リン酸エステル (ホスホルアミド環状エステルを含む) などの無機エステルを包含する。ヒドロキシ基に適した他の薬学的に許容しうるエステル形成基としては、アセチル基、ベンゾイル基、フェニルアセチル基、置換ベンゾイル基および置換フェニルアセチル基などの (1 - 10 C) アルカノイル基、ならびに、エトキシカルボニル基、N, N - [ジ - (1 - 4 C) アルキル] カルバモイル基、2 - ジアルキルアミノアセチル基および 2 - カルボキシアセチル基などの (1 - 10 C) アルコキシカルボニル基が挙げられる。フェニルアセチル基およびベンゾイル基上の環置換基の例としては、アミノメチル、N - アルキルアミノメチル、N, N - ジアルキルアミノメチル、モルホリノメチル、ピペラジン - 1 - イルメチルおよび 4 - (1 - 4 C) アルキルピペラジン - 1 - イルメチルが挙げられる。ヒドロキシ基に適した薬学的に許容しうるエーテル形成基としては、アセトキシメチル基およびピパロイルオキシメチル基などの - アシルオキシアルキル基が挙げられる。

10

【0097】

アミノ基を持つ式 (I) の化合物の適した薬学的に許容しうるプロドラッグは、例えば、その *in vivo* 開裂性アミド誘導体である。アミノ基からの適した薬学的に許容しうるアミドとしては、例えば、アセチル基、ベンゾイル基、フェニルアセチル基、置換ベンゾイル基および置換フェニルアセチル基などの (1 - 10 C) アルカノイル基と形成されるアミドが挙げられる。フェニルアセチル基およびベンゾイル基上の環置換基の例としては、アミノメチル、N - アルキルアミノメチル、N, N - ジアルキルアミノメチル、モルホリノメチル、ピペラジン - 1 - イルメチルおよび 4 - (1 - 4 C) アルキルピペラジン - 1 - イルメチルが挙げられる。

20

【0098】

式 (I) の化合物の *in vivo* 作用は、式 (I) の化合物の投与後にヒトまたは動物の体内で形成される 1 以上の代謝産物により部分的に影響を受ける可能性がある。先に記載したように、式 (I) の化合物の *in vivo* 作用は、前駆体化合物 (プロドラッグ) の代謝によって影響を受ける可能性もある。

30

【0099】

式 (I) の化合物は、- C (O) R<sup>2</sup> [式中、R<sup>2</sup> は、ヒドロキシルにより置換されている (C2 - 3) アルキルである] により置換されているピペリジンサブユニットを含有する。これらの化合物の考える代謝経路の 1 つは、この基のヒドロキシル置換基の酸化による。一般に、これらの酸化化合物は、多少の PI3K - および - 阻害活性を保持している。

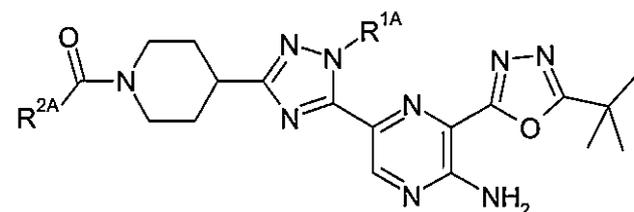
【0100】

したがって、本発明の他の観点に従って、式 (A) の化合物：

【0101】

【化3】

40



(A)

【0102】

[式中:]

50

R<sup>1A</sup> は、メチルまたはエチルであり；そして

R<sup>2A</sup> は、カルボキシにより置換されている（C1 - 2）アルキルである]；

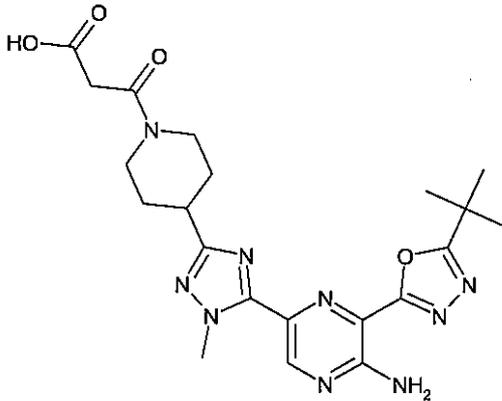
または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

【0103】

式（A）の化合物の例としては、実施例1の同定されている代謝産物である実施例8

【0104】

【化4】



10

実施例8

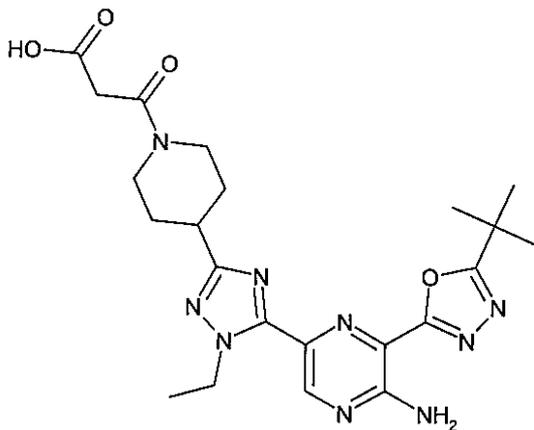
20

【0105】

および実施例3の同定されている代謝産物である実施例9：

【0106】

【化5】



30

実施例9

40

【0107】

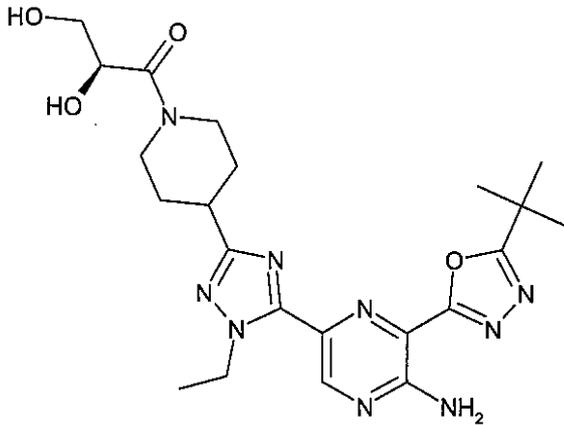
が挙げられる。

【0108】

実施例3の他の考えうる代謝産物は、以下に示し、実施例10および11でさらに記載する、別の2つの酸化生成物である：

【0109】

## 【化6】

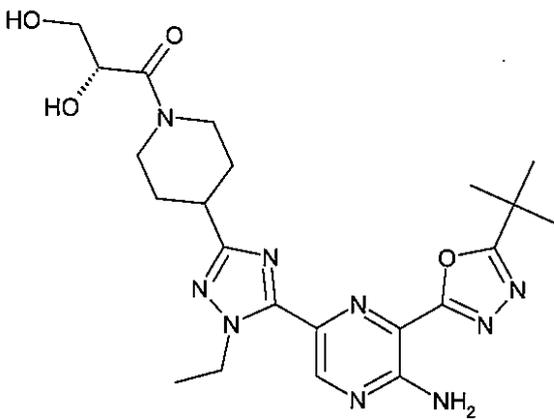


実施例10

10

## 【0110】

## 【化7】



実施例11

20

30

## 【0111】

式(A)の化合物の適した薬学的に許容しうる塩としては、例えば、カルシウムもしくはマグネシウム塩などのアルカリもしくはアルカリ土類金属塩、またはアンモニウム塩、またはメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ピペリジン、モルホリンもしくはトリス-(2-ヒドロキシエチル)アミンなどの有機塩基との塩が挙げられる。

## 【0112】

誤解を避けるために、本明細書中で、基が「先に定義した」または「上記で定義した」により修飾されている場合、前記基は、その基に関し最初に現れたもっとも広範囲の定義およびそれぞれすべての詳細な定義を包含することを、理解すべきである。

40

## 【0113】

本発明の特定の新規化合物としては、例えば、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩であって、特記しない限り、 $R^1$ および $R^2$ のそれぞれが、先に定義した意味または以下に記載する意味のいずれかを有するものが挙げられる：

$R^1$ はメチルである。

## 【0114】

$R^1$ はエチルである。

## 【0115】

$R^2$ は、先に定義した基(i)~(xi)のいずれかである。

## 【0116】

50

R<sup>2</sup> は、先に定義した基 ( i ) ~ ( v i ) である。

【 0 1 1 7 】

R<sup>2</sup> は基 ( i ) である。

【 0 1 1 8 】

本発明の化合物の特定の群は、上記式 ( I ) の化合物

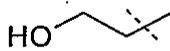
[ 式中： -

R<sup>1</sup> は、メチルまたはエチルであり；

R<sup>2</sup> は、基 ( i )：

【 0 1 1 9 】

【 化 8 】



(i)

【 0 1 2 0 】

である]

または薬学的に許容しうるその塩である。

【 0 1 2 1 】

本発明の特定の化合物は、例えば、以下に提示する実施例中に開示する式 ( I ) の化合物である。

【 0 1 2 2 】

例えば、本発明の特定の化合物は、以下のいずれか 1 つから選択される式 ( I ) の化合物である： -

1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 3 - ヒドロキシ - プロパン - 1 - オン ( 実施例 1 および 2 )；

1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - エチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 3 - ヒドロキシ - プロパン - 1 - オン ( 実施例 3 )；

( 3 R ) - 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 3 - ヒドロキシ - ブタン - 1 - オン ( 実施例 4 )；

( 3 S ) - 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 3 - ヒドロキシ - ブタン - 1 - オン ( 実施例 5 )；

( 2 R ) - 1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 3 - ヒドロキシ - 2 - メチル - プロパン - 1 - オン ( 実施例 6 )；

1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 2 - ヒドロキシ - 2 - メチル - プロパン - 1 - オン ( 実施例 7 )。

【 0 1 2 3 】

本発明の他の観点、式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩の調製プロセスを提供する。適したプロセスを、以下の代表的変形プロセスにより例示する。該プロセスにおいて、特記しない限り、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> は、先に定義した意味のいずれかを有する。必

10

20

30

40

50

要な出発材料は、有機化学の標準的手順により得ることができる。そのような出発材料の調製法は、以下の代表的変形プロセスと併せて、添付の実施例に記載する。あるいは、必要な出発材料は、有機化学者の一般的技術の範囲内にあり、例示する手順と類似の手順により、得ることができる。

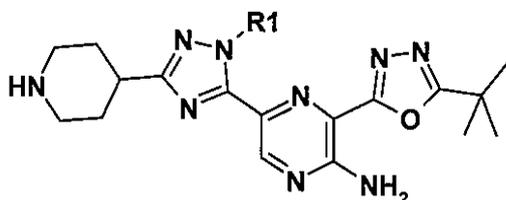
【0124】

適した変形プロセスとしては、例えば、以下が挙げられる：

(a) 好都合には適した活性化試薬の存在下で、式 I I の化合物

【0125】

【化9】



I I

10

【0126】

[式中、 $R^1$  は、先に定義した意味のいずれかを有する]を、必要に応じて任意の官能基が保護されている点を除きカルボン酸  $R^2 - COOH$  と、適した塩基の存在下で反応させた後、存在する任意の保護基を除去する。この反応に適したカップリング剤としては、例えば、2 - ヒドロキシ - ピリジン N - オキシド存在下での 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩、O - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、または TBTU (2 - (1H - ベンゾ [d] [1, 2, 3] トリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルイソウロニウムテトラフルオロボレート) が挙げられる。

20

【0127】

反応は、適した塩基の存在下で行うと好都合である。適した塩基は、例えば有機アミン塩基、例えば、ピリジン、2, 6 - ルチジン、コリジン、4 - ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン、N - メチルモルホリン、ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデク - 7 - エン、ジイソプロピルエチルアミンなど、あるいは、例えばアルカリまたはアルカリ土類金属の炭酸塩または水酸化物、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムであり；好ましくは N - エチル - N, N - ジイソプロピルアミンである。

30

【0128】

この反応は、適した不活性溶媒、例えば、アセトニトリル、N, N - ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドン、テトラヒドロフラン、1, 4 - ジオキサソラン、1, 2 - ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、メタノール、エタノール、または、ジクロロメタン、クロロホルムもしくは四塩化炭素などのハロゲン化溶媒などの存在下、例えば - 50 ~ 100 の範囲、好ましくは 0 ~ 30 の範囲の温度で行うと好都合である。

40

【0129】

あるいは、カルボン酸  $R^2 - COOH$  を活性化種に変換することができ、その後、これを、当分野で周知の条件下で式 I I の化合物と反応させることができる。

【0130】

ヒドロキシル基に適した保護基は、実施例 2 および 3 に記載するようなテトラヒドロピラン保護基である。この基を除去するのに適した条件としては、溶媒としてのアルコール、例えばメタノールまたはエタノールの存在下、20 ~ 70 の温度における弱酸性条件が挙げられる。用いられる典型的な弱酸は、p - トルエンスルホン酸ピリジンである。

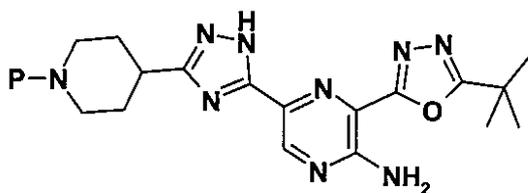
【0131】

50

式 I I の化合物は、適した塩基の存在下で、式 I I I の化合物：

【 0 1 3 2 】

【 化 1 0 】



I I I

10

【 0 1 3 3 】

[ 式中、P は tert - ブトキシカルボニルなどの保護基である ] を、式 R<sup>1</sup> - L の化合物 [ 式中、L は、適した脱離基、例えば、プロモ、ヨード基などのハロゲノ基 (ヨードが好都合である) などである ] と反応させた後、存在する任意の保護基を除去することにより、得ることができる。

【 0 1 3 4 】

適した塩基は、例えば、1, 8 - ジアザビシクロ [ 5 . 4 . 0 ] ウンデク - 7 - エンなどの有機アミン塩基である。

【 0 1 3 5 】

反応は、例えば 2 - メチルテトラヒドロフラン、テトラヒドロフラン、1, 4 - ジオキサン、1, 2 - ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエン、キシレンなど適した不活性溶媒の存在下、例えば - 50 ~ 60 の範囲、好ましくは - 10 ~ 0 の範囲の温度で行うと、好都合である。

20

【 0 1 3 6 】

tert - ブトキシカルボニルの脱保護に適した条件としては、ほぼ室温 ( 20 ~ 25 ) におけるジクロロメタンなどの不活性溶媒中のトリフルオロ酢酸といった酸性条件が挙げられる。

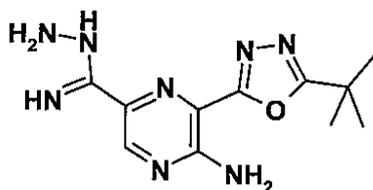
【 0 1 3 7 】

化合物 I I I は、適した活性化試薬の存在下で、式 I V の化合物

30

【 0 1 3 8 】

【 化 1 1 】



I V

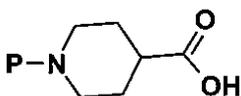
40

【 0 1 3 9 】

を、式 V の化合物

【 0 1 4 0 】

【 化 1 2 】



V

50

## 【0141】

と、好ましくは適した塩基の存在下でカップリング反応させた後、弱酸の存在下で環化反応させることにより、得ることができる。

## 【0142】

カップリング反応は、例えば、O - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートまたはTBTU (2 - (1H - ベンゾ [ d ] [ 1 , 2 , 3 ] トリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルイソウロニウムテトラフルオロボレート) などの適したカップリング剤の存在下で行うことができる。

## 【0143】

カップリング反応は、適した塩基の存在下で行うと好都合である。適した塩基は、例えば有機アミン塩基、例えば、ピリジン、2 , 6 - ルチジン、コリジン、4 - ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン、N - メチルモルホリン、ジアザビシクロ [ 5 . 4 . 0 ] ウンデク - 7 - エン、ジイソプロピルエチルアミンなど、あるいは、例えばアルカリまたはアルカリ土類金属の炭酸塩または水酸化物、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムであり；好ましくはN - エチル - N , N - ジイソプロピルアミンである。

## 【0144】

カップリング反応は、適した不活性溶媒、例えば、N , N - ジメチルアセトアミド、N , N - ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドン、テトラヒドロフラン、1 , 4 - ジオキサン、1 , 2 - ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、メタノール、エタノール、または、ジクロロメタン、クロロホルムもしくは四塩化炭素などのハロゲン化溶媒などの存在下、例えば - 50 ~ 100 の範囲、好ましくは0 ~ 30 の範囲の温度で行うと好都合である。

## 【0145】

環化条件は、弱酸、典型的には酢酸の存在下で実施する。反応は、適した不活性溶媒、例えば、N , N - ジメチルアセトアミド、N , N - ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドン、テトラヒドロフラン、1 , 4 - ジオキサン、1 , 2 - ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエン、キシレンなどの存在下、例えば50 ~ 150 の範囲、好ましくは80 ~ 100 の範囲の温度で行うと好都合である。

## 【0146】

化合物IVは、式VIの化合物とヒドラジンの反応から得ることができる。

## 【0147】

## 【化13】



VI

## 【0148】

この反応は、適した不活性溶媒、例えば、テトラヒドロフラン、1 , 4 - ジオキサン、1 , 2 - ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、またはエタノールもしくはイソプロパノールなどのアルコールの存在下、例えば20 ~ 70 の範囲、好ましくは約50 の温度で行うと好都合である。

## 【0149】

化合物VIは、式VIIの化合物とニシアン化亜鉛 (II) などのシアン化物源との金属触媒反応から得ることができる。

10

20

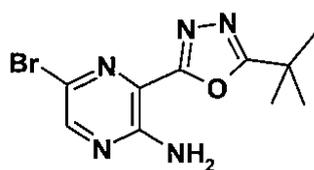
30

40

50

【 0 1 5 0 】

【 化 1 4 】



## V I I

10

【 0 1 5 1 】

該反応に適した触媒としては、例えば、パラジウム(0)などの金属触媒、例えばテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)；またはパラジウム(II)塩から *in-situ* で形成される触媒、例えば、酢酸パラジウム(II)、塩化パラジウム(II)、臭化パラジウム(II)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)クロリド、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)、もしくはトリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム、およびホスフィンリガンド、例えばジシクロヘキシル(2',4',6'-トリイソプロピルピフェニル-2-イル)ホスフィンが挙げられる。該反応は、N,N-ジメチルアセトアミド、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエンまたはキシレンなど適した溶媒中、例えば20 ~ 150 の範囲、好ましくは60 ~ 120 の範囲の温度で行うと好都合である。該反応は、亜鉛など追加的な金属の存在下で行うことも好都合である。

20

【 0 1 5 2 】

このタイプの適した反応は、'Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions'、第2版、Armin Meijere、Francis Diederich 編集、Wiley-VCH、2004に記載されている。

【 0 1 5 3 】

化合物VIIの合成は、実施例1および2に記載している。

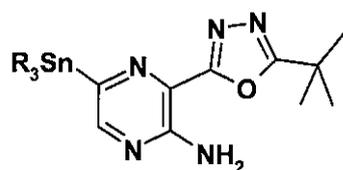
【 0 1 5 4 】

30

あるいは、式IIの化合物は、化合物VII [式中、Rは小さなアルキルである]と化合物IX [式中、Pは、tert-ブトキシカルボニルなどの保護基である]との金属触媒反応により得ることができる。

【 0 1 5 5 】

【 化 1 5 】

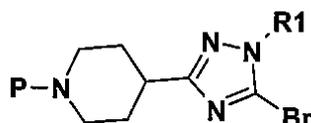


## V I I I

40

【 0 1 5 6 】

## 【化 16】



IX

## 【0157】

該反応に適した触媒としては、例えば、パラジウム(0)などの金属触媒、例えばテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)；またはパラジウム(II)塩から *in-situ* で形成される触媒、例えば、酢酸パラジウム(II)、塩化パラジウム(II)、臭化パラジウム(II)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)クロリド、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)、もしくはトリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム、およびホスフィンリガンド、例えばジシクロヘキシル(2',4',6'-トリイソプロピルピフェニル-2-イル)ホスフィンが挙げられる。

10

## 【0158】

該反応は、適した溶媒、例えば、N,N-ジメチルアセトアミド、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエンもしくはキシレン、または4-メチル-2-ペンタノールなどのアルコール中、例えば50 ~ 180 の範囲、好ましくは120 ~ 150 の範囲の温度で行うと好都合である。

20

## 【0159】

該反応は、塩化リチウムなど追加的な塩の存在下で行うことも好都合である。

## 【0160】

このタイプの適した反応は、'Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions'、第2版、Armin Meijere、Francis Diederich 編集、Wiley-VCH、2004に記載されている。

## 【0161】

式VIIの化合物は、化合物VIと適したヘキサアルキルジスタンナンとの金属触媒反応から得ることができる。該反応に適した触媒としては、例えば、パラジウム(0)などの金属触媒、例えばテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)；またはパラジウム(II)塩から *in-situ* で形成される触媒、例えば、酢酸パラジウム(II)、塩化パラジウム(II)、臭化パラジウム(II)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)クロリド、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)、もしくはトリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム、およびホスフィンリガンド、例えばジシクロヘキシル(2',4',6'-トリイソプロピルピフェニル-2-イル)ホスフィンが挙げられる。該反応は、適した溶媒、例えば、N,N-ジメチルアセトアミド、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、または4-メチル-2-ペンタノールなどのアルコール中、例えば50 ~ 100 の範囲、好ましくは70 ~ 80 の範囲の温度で行うと好都合である。

30

40

## 【0162】

式IXの化合物は、実施例1(R<sup>1</sup> = MeおよびP = tert-ブトキシカルボニルである)に例示するように、市販の材料から数段階で得ることができる。

## 【0163】

上記変形プロセスにおけるプロセス段階の他の並べ換えも可能であることを、理解すべきである。

## 【0164】

50

先に記載したプロセスのいずれかにより得られる任意の式 (I) の化合物は、必要に応じて他の式 (I) の化合物に転化することができることを、理解すべきである。

【0165】

式 (I) の化合物の薬学的に許容しうる塩、例えば酸付加塩が必要な場合、それは、例えば、前記化合物と適した酸との反応により得ることができる。

【0166】

式 (I) の化合物の薬学的に許容しうるプロドラッグが必要な場合、それは、従来の手順を用いて得ることができる。例えば、式 (I) の化合物の *in vivo* 開裂性エステルは、例えば、ヒドロキシ基を含有する式 (I) の化合物と、薬学的に許容しうるカルボン酸との反応により得ることができる。プロドラッグに関するさらなる情報は、先に提示してある。

10

【0167】

上記反応のいくつかでは、化合物中の任意の感受性の高い基を保護することが必要または望ましい可能性があることも、理解されるであろう。保護が必要または望ましい場合および保護に適した方法は、当業者に公知である。従来保護基を、標準的技法に従って用いることができる (例示のために、T. W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 1991 参照)。したがって、反応体がアミノ、カルボキシまたはヒドロキシなどの基を包含する場合、上記反応のいくつかでは該基を保護することが望ましい可能性がある。

20

【0168】

アミノまたはアルキルアミノ基に適した保護基は、例えば、アシル基、例えばアセチルなどのアルカノイル基、アルコキシカルボニル基、例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニルもしくは *t*-ブトキシカルボニル基、アリールメトキシカルボニル基、例えばベンジルオキシカルボニル、またはアロイル基、例えばベンゾイルである。上記保護基の脱保護条件は、保護基の選択に伴い必然的に変動する。したがって、例えば、アルカノイルもしくはアルコキシカルボニル基などのアシル基またはアロイル基は、例えば、アルカリ金属の水酸化物、例えば水酸化リチウムもしくは水酸化ナトリウムなど適した塩基との加水分解により除去することができる。あるいは、*t*-ブトキシカルボニル基などのアシル基は、例えば、塩酸、硫酸もしくはリン酸またはトリフルオロ酢酸などの適した酸との処理により除去することができ、ベンジルオキシカルボニル基などのアリールメトキシカルボニル基は、例えば、例えば、パラジウム担持カーボンなどの触媒上での水素化によるか、ルイス酸、例えばトリス (トリフルオロ酢酸) ホウ素での処理により、除去することができる。第一級アミノ基に適した他の保護基は、例えばフタロイル基であり、これは、アルキルアミン、例えばジメチルアミノプロピルアミンでの処理によるか、またはヒドラジンでの処理により、除去することができる。

30

【0169】

ヒドロキシ基に適した保護基は、例えば、アシル基、例えばアセチルなどのアルカノイル基、アロイル基、例えばベンゾイル、またはアリールメチル基、例えばベンジルである。上記保護基の脱保護条件は、保護基の選択に伴い必然的に変動する。したがって、例えば、アルカノイルなどのアシル基またはアロイル基は、例えば、アルカリ金属の水酸化物、例えば水酸化リチウムもしくは水酸化ナトリウムなど適した塩基との加水分解により除去することができる。あるいは、ベンジル基などのアリールメチル基は、例えば、パラジウム担持カーボンなどの触媒上での水素化により、除去することができる。

40

【0170】

カルボキシ基に適した保護基は、例えば、エステル化基、例えば、例えば水酸化ナトリウムなどの塩基での加水分解により除去することができるメチルもしくはエチル基、または、例えば、例えばトリフルオロ酢酸のような有機酸などの酸での処理により除去することができる *t*-ブチル基、または、例えば、例えばパラジウム担持カーボンなどの触媒上での水素化により除去することができるベンジル基である。

50

## 【0171】

保護基は、化学分野で周知の従来技術を用いて、合成中の任意の好都合な段階で除去することができる。

## 【0172】

本明細書中に定義する特定の間媒体（例えば、式 I I、I I I、I V、V I、V I I、V I I I の化合物）は新規であり、これらを、本発明のさらなる特徴として提供する。

生物学的アッセイ -

以下のアッセイを用いて、a) 生物学的アッセイにおける P I 3 キナーゼ酵素の阻害剤として、b) 生物学的アッセイにおける他のキナーゼの阻害剤として、c) B T 4 7 4 細胞におけるホスホ A K T ( T h r 3 0 8 ) の *in vitro* 阻害剤として、d) M D A - M B - 4 6 8 細胞におけるホスホ A K T ( S e r 4 7 3 ) の *in vitro* 阻害剤として、e) J E K O 細胞におけるホスホ A K T ( S e r 4 7 3 ) の *in vitro* 阻害剤として、f) H T 2 9 細胞におけるホスホ C h k 1 ( S e r 3 4 5 ) の *in vitro* 阻害剤として、g) 腫瘍細胞株パネル全体にわたる細胞増殖の阻害剤として、h) および i) ヒト乳がん細胞株 M C F 7 を移植した S C I D マウスにおけるそれぞれホスホ A K T ( S e r 4 7 3 ) の *in vivo* 阻害剤または腫瘍成長の *in vivo* 阻害剤としての、本発明の化合物の効果を測定した。

アッセイプロトコルに用いられる略語：

P I P 2 : P I ( 4 , 5 ) P 2、ホスファチジルイノシトール 4 , 5 - ビスホスフェート

s . c . : 皮下に

A T P : アデノシン三リン酸

D M S O : ジメチルスルホキシド

T R I S : トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン

C H A P S : 3 - [ ( 3 - コラミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] - 1 - プロパンスルホネート

D T T : ジチオトレイトール

F B S : ウシ胎仔血清

D M E M : ダルベッコ変法イーグル培地

E D T A : エチレンジアミン四酢酸

E G T A : エチレングリコール四酢酸

B S A : ウシ血清アルブミン

P B S : リン酸緩衝食塩液

H R P : ホースラディッシュペルオキシダーゼ

R P M I : ロズウェルパーク記念研究所培地 1 6 4 0

4 N Q O : 4 - ニトロキノリン N - オキシド

E M E M : イーグル最小必須培地

C O <sub>2</sub> : 二酸化炭素

P B S T : リン酸緩衝食塩液 / T w e e n

A b : 抗体

M T S 試薬 : [ 3 - ( 4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 3 - カルボキシメトキシフェニル ) - 2 - ( 4 - スルホフェニル ) - 2 H - テトラゾリウム、内塩 ; M T S ] および電子結合試薬 ( フェナジンメトスルフェート ) P M S 。

( a ) *in vitro* 酵素阻害アッセイ

P I 3 K - 、 P I 3 K - 、 P I 3 K - および P I 3 K - の阻害を、ヒト組み換え酵素を用いて、K i n a s e G l o に基づく酵素活性アッセイで評価した。アッセイプラットフォームは、酵素、P I P 2 基質、A T P および化合物とのインキュベーション後の A T P の減少を間接的に測定するものであった。

## 【0173】

酵素反応の終了後、残存する A T P を、発光下でルシフェラーゼがホタルルシフェリン

をオキシルシフェリンに変換する二次酵素反応で用いた。測定したルミネセンスと、完了したキナーゼ反応の残存ATPとの間には、直接的な関係があった。したがって、ルミネセンスは、キナーゼ活性に逆相関していた。典型的には、12種の異なる化合物濃度について試験し、PI3K-、PI3K-、PI3K- またはPI3K- の阻害からの生データを、阻害剤濃度に対してプロットした。

方法の詳細：

100% DMSO中の化合物を、音響分配(acoustic dispensing)によりアッセイプレートに加えた。PI3K酵素をトリス緩衝液(50mMトリス pH7.4、0.05% CHAPS、2.1mM DTT、および10mM塩化マグネシウム)に加え、そのまま化合物と20分間プレインキュベートした後、PIP2およびATPを含有する基質溶液を加えた。80分後に、ルシフェリンおよびルシフェラーゼを含有するKinase Glo検出溶液(Kinase Glo(R) Plus Luminescent Kinase Assayキット(Promega #V3772)から)の添加により、酵素反応を停止させた。プレートを室温で30分間放置した後、標準的なルミネセンスフィルターブロックを備えるPherastar Instrumentで読み取った。該アッセイにおけるDMSO、ATPおよびPIP2の最終濃度は、それぞれ1%、8μM、および80μMであった。

データ解析

非線形回帰適合に適合している対数曲線を用いて、IC<sub>50</sub>値を計算した。IC<sub>50</sub>値は、酵素活性の50%を阻害する試験化合物の濃度であった。

(b) PI3キナーゼ クラス1酵素以外のキナーゼ選択性の評価

キナーゼアッセイの大規模パネルは、Millipore、InvitrogenおよびProQinaseなどさまざまな商業的製造供給元により提供されている。そのようなパネルにより、所定の化合物の全体的キナーゼ選択率の評価が可能になる。正確な方法/技術は、製造供給元によりさまざまである。

【0174】

本明細書中に記載する化合物のいくつかに関する選択率データは、英国、ダンディーのMRC Protein Phosphorylation UnitのMRC-Division of Signal Transduction Therapy(DSTT)で実施される酵素アッセイを用いて得た。タンパク質キナーゼアッセイは、放射化学的フォーマットを用いて行った。アッセイは、室温において、マルチドロップ384ウェルプレート中、全アッセイ体積25.5μLで実施した。化合物を酵素およびペプチド/タンパク質基質存在下で5分間プレインキュベートした後、10μLのATP(最終濃度は、各キナーゼについて5、20または50μMで選択した)の添加により反応を開始させた。アッセイを室温で実施した後、5μLのオルトリン酸を加えることにより停止させた。その後、アッセイプレート内容物をPackard Harvester(洗浄緩衝液は50mMのオルトリン酸であった)によりWhatman-P81-Unifilter Plate上に採取し、風乾した。その後、乾燥UnifilterプレートをMicroScint Oの添加によって密封し、Packard Topcount NXトシンレーションカウンターで計数した。このプロトコルは、パネルのキナーゼの大部分に適した一般的フォーマットを占めるが、当業者ならよくわかるように、該プロトコルの修正が少数のキナーゼには必要であった。

【0175】

約18の脂質キナーゼに関する脂質キナーゼアッセイもDSTTで実施した。脂質キナーゼアッセイはすべて、室温において、384ウェルプレート中、全アッセイ体積40μLで行った。該アッセイは、ADP-GLOアッセイ(Promega、#V9101)に提供されているプロトコルに従って実施した。このプロトコルは、パネルのキナーゼの大部分に適した一般的フォーマットを占めるが、当業者ならよくわかるように、該プロトコルの修正が少数のキナーゼには必要であった。

【0176】

10

20

30

40

50

キナーゼ選択率も、Discover Xを介して入手可能なKINOMESCAN™スクリーニングプラットフォームを用いて評価した。これは、試験化合物と、450を超えるヒトキナーゼおよび疾患に関連する変異体バリエーション(mutant variant)との相互作用を定量的に測定するために、活性部位を対象とする競合結合アッセイを採用している。KINOMESCAN™アッセイではATPが必要なく、これにより、ATP濃度に依存する可能性があるIC50値とは対照的に、真の熱力学的相互作用の親和力が報告される。該手法は、キナーゼ活性部位と結合し、固定化リガンドに結合するキナーゼを直接的(立体的)または間接的(アロステリック)に妨げ、これにより、固体支持体上に捕獲されるキナーゼの量を減少させる化合物に基づく。反対に、キナーゼと結合しない試験分子は、固体支持体上に捕獲されるキナーゼの量に対し影響を有さない。スクリーニングの“ヒット”は、関連するDNA標識を検出する定量的qPCR法を用いて、試験で捕獲されるキナーゼの量を対照試料と対比して測定することにより確認する。同様に、試験化合物-キナーゼ相互作用の解離定数(K<sub>d</sub>)は、固体支持体上に捕獲されるキナーゼの量を試験化合物濃度の関数として測定することにより計算する。

#### (c) BT474細胞におけるリン酸化AKT(Tyr308)を測定するアッセイのプロトコル

このアッセイを用いて、細胞におけるPI3K-阻害を測定した。BT474細胞(ヒト乳管癌、ATCC HTB-20)を、10% FBSおよび1% グルタミンを含有するDMEM中に5600細胞/ウェルの密度で黒色384ウェルプレート(Costar、#3712)中に播種し、一晚放置して付着させた。

##### 【0177】

翌朝、100% DMSO中の化合物を、音響分配によりアッセイプレートに加えた。37℃、5% CO<sub>2</sub>で2時間インキュベートした後、培地を吸引し、細胞を、25 mM トリス、3 mM EDTA、3 mM EGTA、50 mM フッ化ナトリウム、2 mM オルトバナジウム酸ナトリウム、0.27 M スクロース、10 mM β-グリセロホスフェート、5 mM ポリリン酸ナトリウム、0.5% Triton X-100およびコンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル錠剤(Roche #04693116001、溶解緩衝液50 mLあたり1錠使用)を含有する緩衝液で溶解させた。

##### 【0178】

20分後、細胞溶解物を、PBS緩衝液中の抗全AKT抗体で予めコーティングしてあるELISAプレート(Greiner #781077)に移し、非特異的結合を、0.05%のTween 20を含有するPBS中の1% BSAでブロックした。プレートを4℃で一晩インキュベートした。翌日、該プレートを、0.05%のTween 20を含有するPBS緩衝液で洗浄し、マウスモノクローナル抗ホスホAKT T308を用いてさらに2時間インキュベートした。プレートを再び上記のように洗浄した後、ウマ抗マウスHRP接合二次抗体を加えた。室温で2時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、QuantaBlu基質希釈標準溶液(Thermo Scientific #15169、供給元の指示に従って調製)を各ウェルに加えた。60分後、ウェルに停止液を加えることにより、発生した蛍光生成物を停止させた。325 nmの励起波長および420 nmの発光波長をそれぞれ使い、Tecan Safireプレートリーダーを用いて、プレートを読み取った。特記しない限り、Cell SignallingからのPath Scan Phospho AKT(Thr308) sandwich ELISAキット(#7144)に入っていた試薬を、このELISAアッセイで用いた。

#### (d) PI3キナーゼ-ベータ阻害の尺度としてのMDA-MB-468細胞におけるホスホAKT(Ser473)の検出プロトコル

このアッセイを用いて細胞におけるPI3K-阻害を測定し、このアッセイを上記アッセイ(c)と併せて用いて、細胞におけるアルファ対ベータ選択率を決定した。MDA-MB-468細胞(ヒト乳がん# ATCC HTB 132)を、Greiner 384ウェル黒色平底プレート中に、10% FBSおよび1% グルタミンを含有する40 μ

LのDMEM中に1500細胞/ウェルで播種した。細胞プレートを37℃のインキュベーターで18時間インキュベートした後、音響分配を用いて、100% DMSO中の化合物を投与した。

【0179】

無作為化したプレートマップ中に、化合物を12点の濃度範囲で投与した。100% DMSOを投与するか(最大シグナル)、pAKTシグナルを完全に排除する参照化合物(P13K-阻害剤)を添加する(最小対照)ことにより、対照ウェルを得た。プレートを37℃で2時間インキュベートした後、10μLの3.7%ホルムアルデヒド溶液を添加することにより細胞を固定した。30分後、Tecan PW384プレート洗浄機を用いてプレートをPBSで洗浄した。ウェルをブロックし、0.5% Tween 20 および1% Marvel<sup>TM</sup>(乾燥粉乳)を含有する40μLのPBSを添加して細胞を透過処理し、室温で60分間インキュベートした。該プレートを0.5%(v/v)のTween 20を含有するPBSで洗浄し、同PBS-Tween+1% Marvel<sup>TM</sup>中の20μLのウサギ抗ホスホAKT Ser473(Cell Signalling Technologies、#3787)を加え、4℃で一晩インキュベートした。

10

【0180】

Tecan PW384を用いて、プレートをPBS+0.05% Tween 20で3回洗浄した。1% Marvel<sup>TM</sup>を含有するPBS+0.05% Tween 20中に希釈した二次抗体Alexa Fluor 488抗ウサギ(Molecular Probes、#A11008)を各ウェルに20μL加え、室温で1時間インキュベートした。プレートを上記のように3回洗浄した後、各ウェルに20μLのPBSを加え、プレートを黒色プレートシーラーで密封した。

20

【0181】

プレートをできるだけ早くAcumenプレートリーダーで読み取り、488nmのレーザーで励起後の緑色蛍光を測定した。このシステムを用いてIC<sub>50</sub>値を得て、プレートの質を対照ウェルにより決定した。参照化合物を毎回操作して、アッセイ性能をモニタリングした。

(e) Jeko細胞におけるホスホAKT (ser473)の検出プロトコル

このアッセイを用いて、細胞におけるP13K-阻害を測定した。10μLの1%(v/v) DMSO中のx10の最終濃度の化合物を、Greiner V底96ウェルプレート(Sigma #M9686)のウェルに加えた。1μMまたは10μMの最大用量から10点の濃度範囲で化合物を投与し、8つの化合物を1つのプレート上に投与した。抗IgM(AffiniPure Fab')2フラグメントヤギ抗ヒトIgM(Stratech、#109-006-129)およびビヒクルを投与した最大シグナル対照がプレート1枚につき8ウェル、抗IgMおよび参照P13K-阻害剤を投与した最小シグナル対照が8ウェルであった。最終ビヒクル濃度は0.1% DMSOであった。各試験にP13K-選択性化合物の全用量反応曲線は包含されていた。Jeko B細胞(ヒトマントル細胞リンパ腫、ATCC #CRL-3006)を、化合物を含有するGreiner 96ウェルV底プレート中に播種した。細胞は、1%グルタミンを含有する70μLのRPMI中に100000細胞/ウェルで播種した。

30

40

【0182】

細胞プレートを化合物と一緒に37℃のインキュベーターで1時間インキュベートした。この化合物のプレインキュベーション時間の後、上記抗IgMを20μLのアッセイ緩衝液(1%グルタミンを含有するRPMI)中x5の最終濃度でプレートに加えた。最終抗IgM濃度は、0.06μg/mLまたはEC90用量と同等であった。プレートを37℃で10分間インキュベートした後、プレートをすぐに氷上に置き、12000rpmで4分間遠心分離した。氷上で、手動ピペットを用いて上澄みを慎重に除去し、40μLの溶解緩衝液を加えた。プレートを氷上で5分間インキュベートし、製造業者の指示に従ってリン光体(Ser473)/全Akt全細胞溶解液キット(Mesoscale D

50

i a g n o s t i c s、 # K 1 1 1 0 0 D - 3 ) でアッセイするまで - 8 0 で保管した。

( f ) H T 2 9 細胞におけるホスホ C h k 1 ( S e r 3 4 5 ) の検出プロトコル

A T R ( A t a x i a T e l a n g i e c t a s i a + R a d 3 関連キナーゼ ) は、DNA の損傷または複製のブロックに応答してセリンまたはスレオニン残基上の複数基質をリン酸化する P I 3 キナーゼ関連キナーゼである。C h k 1 は、A T R の下流タンパク質キナーゼであり、DNA 損傷のチェックポイント制御において重要な役割を果たす。C h k 1 の活性化は S e r 3 1 7 および S e r 3 4 5 のリン酸化を伴う ( 後者は、A T R によるリン酸化 / 活性化の選択的標的とみなされている ) 。

【 0 1 8 3 】

これは、化合物および紫外線模倣 4 N Q O ( S i g m a # N 8 1 4 1 ) で処理した後の H T 2 9 細胞における C h k 1 ( S e r 3 4 5 ) のリン酸化の減少を測定することにより、A T R キナーゼの阻害を測定するための、細胞に基づくアッセイであった。H T 2 9 細胞 ( E C A C C # 8 5 0 6 1 1 0 9 ) を、1 % L グルタミンおよび 1 0 % F B S を含有する 4 0 μ L の E M E M 培地中に 6 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で 3 8 4 ウェルアッセイプレート ( C o s t a r # 3 7 1 2 ) 中に播種し、一晩放置して付着させた。翌朝、1 0 0 % D M S O 中の化合物を音響分配によりアッセイプレートに加えた。3 7 °C および 5 % C O 2 で 1 時間インキュベートした後、無応答対照 ( n u l l r e s p o n s e c o n t r o l ) を作り出すために 4 N Q O で処理しないままにした最小対照ウェルを除き、すべてのウェルに 1 0 0 % D M S O 中の 3 m M 4 N Q O を音響分配により 4 0 n L 加えた。プレートをさらに 1 時間インキュベーターに戻した。その後、P B S 溶液中の 3 . 7 % ホルムアルデヒドを 2 0 μ L 加え、室温で 2 0 分間インキュベートすることにより、細胞を固定した。その後、P B S 中の 0 . 1 % T r i t o n X 1 0 0 を 2 0 μ L 加え、室温で 1 0 分間インキュベートして、細胞を透過処理した。その後、B i o t e k E L 4 0 5 プレート洗浄機を用いて、プレートを 5 0 μ L / ウェルの P B S で 1 回洗浄した。

【 0 1 8 4 】

ホスホ - C h k 1 S e r 3 4 5 抗体 ( C e l l S i g n a l l i n g T e c h n o l o g y # 2 3 4 8 ) を、0 . 0 5 % ポリソルベート / T w e e n を含有する P B S 中に 1 5 0 倍希釈し、1 5 μ L を各ウェルに加えて室温で一晩インキュベートした。翌朝、プレートを、B i o t e k E L 4 0 5 プレート洗浄機を用いて 5 0 μ L / ウェルの P B S で 3 回洗浄した後、P B S T 中に 5 0 0 倍希釈の A l e x a F l u o r 4 8 8 ヤギ抗ウサギ I g G ( M o l e c u l a r P r o b e s、# A - 1 1 0 0 8 ) および 0 . 0 0 2 m g / m L H o e s c h s t 染料 ( M o l e c u l a r P r o b e s # H - 3 5 7 0 ) を含有する二次 A b 溶液を 2 0 μ L 加えた。室温で 2 時間インキュベートした後、B i o t e k E L 4 0 5 プレート洗浄機を用いてプレートを 5 0 μ L / ウェルの P B S で 3 回洗浄した後、読み取るまで黒色プレートシールでプレートを密封した。1 0 × の対物レンズとともに X F 5 3 フィルターを用い、A r r a y S c a n V T I 機器を用いて、プレートを読み取った。H o e s c h s t ( 4 0 5 n M ) での核染色および p C h k 1 ( 4 8 8 n M ) の二次抗体染色を分析するために、2 つのレーザー装置を用いた。

( g ) 腫瘍細胞株における細胞増殖アッセイ ( 個別化医療の前提を実証するために用いる )

化合物の作用に対するヒト癌細胞株パネルの感受性を、標準的な増殖アッセイで決定した。細胞株は A s t r a Z e n e c a C e l l B a n k から得た。細胞株の大部分は、当業者に公知の細胞バンク保管所、例えば、A T C C、E C A C C、D M S Z、R I K E N、K C L B、J C R B ( H S R R B )、L B N L、C L S および I C L C から入手可能である。

【 0 1 8 5 】

細胞を、9 6 ウェルプレートに、1 0 % F B S を含有する R P M I 培地中に 1 ウェルあたり 1 0 0 0 ~ 6 0 0 0 細胞の密度で入れた。3 7 °C で 1 6 時間インキュベートした後、

さまざまな濃度の化合物をアッセイプレートに加えた。追加的に72時間インキュベートした後、2時間にわたりMTS試薬(Promega #3582)を各ウェルに添加することにより生存細胞を決定した。MTSは、電子カップリング試薬の存在下で代謝的に活性な細胞によりホルマザンに生物還元されるテトラゾリウム塩である。その後、生細胞の相対数の指標として、ホルマザン生成物を490nmにおける吸光度により定量した。GI50(細胞成長が50%阻害された濃度)を決定するために、薬物添加時に存在する細胞の相対数を、薬物添加前のMTSの読み取りと比較することにより決定し、この値を、アッセイ中の細胞成長の基準として、未処理細胞の72時間の値から差し引いた。

#### 【0186】

以下の「個別化ヘルスケア/個別化医療の例」に記載するこのデータの解析は、PI3K阻害剤が、PIK3CA遺伝子変異を有する細胞株の選択的成長阻害を示すことを明らかにするための、このデータの解析方法を例示している。応答予測バイオマーカーの読み取りを用いて、PIK3CA遺伝子に変異を含有する腫瘍を有し、本明細書中に記載する化合物に応答する可能性が高い患者を識別することができる場合、これは、個別化ヘルスケア(PHC)または個別化医療の適切な条件を例示している。

#### 【0187】

本明細書中に記載する化合物に応答する他の考えうるマーカーとしては、限定されるものではないが、複製数の増加、PIK3CA遺伝子の増幅または転座、およびPI3キナーゼ経路の活性化または依存性の基準を提供する他の遺伝子的、ゲノム的もしくはプロテオミクス的变化;例えば、限定されるものではないが、1以上の受容体チロシンキナーゼの活性化、またはPI3キナーゼの調節サブユニット(p85)をコードするPIK3R遺伝子の変異もしくは転座、またはpAKT、pS6もしくはFOXO状態などの下流シグナル伝達マーカーのリン酸化が挙げられる。これに加えて、他の遺伝子および/またはそれらのタンパク質生成物、例えばKrasのシグナル伝達の解析は、個別化医療アプローチの予測性の改善に役立つ可能性がある。

#### (h) 雄SCIDマウスにおいて成長したMCF-7腫瘍からのホスホAKT(ser473)の検出プロトコル

これは、動物モデルにおけるPI3K阻害の基準を提供する薬学的アッセイであった。雄SCIDマウス(英国AZ、英国Charles Riverからも入手可能)の皮下(s.c.)にヒト乳癌細胞株MCF7(ICRF London、ATCC #HTB-22からも入手可能)を移植して、PI3キナーゼ阻害剤でのAKTのリン酸化の阻害を決定した。細胞を埋め込む24時間前に、0.5mgの21日徐放エストロゲンペレット剤(Innovative Research of America、#E121)をマウスに埋め込んだ。50%マトリゲル(BD Bioscience)中の $5 \times 10^6$ 細胞を、動物の左側腹部に皮下注射した。腫瘍が $400 \text{ mm}^3$ の体積に達したら動物を無作為に8匹の対照群と4匹の処置群に分け、翌日投与を開始した。選択した時間点に腫瘍を取り出し、このときにPK測定のために血液試料も取り出した。

#### 【0188】

マウスから切除した腫瘍をFast Prep管(溶解マトリックスAを含有する2mL 畝付き管(ridged tube)、MP Biomedicals #6910-500)に入れ、即座に凍結した。1mLの溶解緩衝液(25mM Tris、3mM EDTA、3mM EGTA、50mMフッ化ナトリウム、2mMオルトバナジン酸塩、0.27Mスクロース、10mMベータ-グリセロホスフェート、5mMピロリン酸塩、0.5% Triton x-100)およびホスファターゼ阻害剤(Sigma #P2850およびSigma #5726、1:100希釈物)およびプロテアーゼ阻害剤(Sigma #P8340、1:200希釈物)を、各管に加えた。腫瘍をFast Prep-TM機(MP Biomedicals #116004500)で1分間ホモジナイズした後、氷上に5分間放置し、続いて、さらに2つの均質化段階を行い、各段階の後に氷上で5分間インキュベートした。試料を冷却遠心分離器において1300rpmで10分間スピンさせた。その後、澄んだ溶解物を未使用の管に取り、10μLをタンパク質決定アッ

10

20

30

40

50

セイに用いた。

【0189】

全AKTおよびリン酸化AKT (ser 473) の検出は、MSDマルチスポットアクセスキット (Meso Scale Discovery #K15100D-3) を用いて行った。プレートの各ウェルは4つのスポットを含有していた；これらのうち2つは、キットに付いているマウスモノクローナル抗体でコーティングされており；1つは、全AKT用の捕捉抗体でコーティングされており、1つはリン酸化AKT (ser 473) 用の抗体でコーティングされていた。プレートを、低温室において、1ウェルあたり150  $\mu$ L のブロッキング溶液を用いてシェーカー上で一晩ブロックした。該ブロッキング溶液は、20 mL の洗浄溶液の1  $\times$  溶液およびキットに付いていた600 mg のBlocker Aを用いて作製した。1ウェルあたり0.3 mL の洗浄溶液でプレートを3回洗浄した。溶解物のアリコートを各腫瘍から取り出し、溶解緩衝液で2 mg/mL の濃度に希釈した後、25  $\mu$ L の希釈溶解物を各ウェルに加え、1ウェルあたりの全量を50  $\mu$ g にした。プレートを室温において1時間シェーカー上に置いた後、プレートを3回洗浄した。検出抗体溶液は、ブロッキングおよび洗浄溶液の混合物、ならびに50  $\times$  SULFO-TAG-TM抗全AKT抗体の1対50希釈物を用いて調製した。プレートを室温において1時間シェーカー上に置いた後、プレートを3回洗浄した。キットに付いていた読み取り緩衝液150  $\mu$ L を脱イオン水で1:4に希釈して各ウェルに加えた後、プレートをMSDプレート分析器で読み取った。読み取り緩衝液は電気化学ルミネセンスに適した化学的環境をもたらすので、プレートリーダーでプレートに電圧を加えると、プレート底面上の電極により、検出抗体に結合している標識は発光する。発光した光の強度は、存在する全AKTまたはリン酸化AKTの定量的尺度である。リン酸化AKTと全AKTの比を計算するために、Meso Scaleにより提案されている計算を施用した：リン酸化シグナルを2倍したものを全シグナル+リン酸化シグナルで割った後、100をかけてリントンパク質の%を得る。値をLog<sub>10</sub>に変換した後、これらの値を用いて、各群のGeomeanおよび標準誤差を計算した。その後、両側検定の式(2 tailed formula)および不等分散を用いてスチューデントのt検定を施用して、有意性を確認した。試験により、8匹の動物の対照群と1処置群につき4匹が、試験を推進するのに十分であることが示された。

10

20

30

(i) SCIDマウスに移植したヒト乳がん細胞株MCF7における腫瘍成長の検出プロトコル

この方法は、PI3K-依存性モデルにおけるPI3キナーゼ阻害剤のin vivoでの抗腫瘍効力の評価を提供する。上記PD試験では、雄SCIDマウスにヒト乳がん細胞株MCF7を皮下移植した。細胞を埋め込む24時間前に、0.5 mgの21日徐放エストロゲンペレット剤をマウスに埋め込んだ。50%マトリゲル中の5  $\times$  10<sup>6</sup>細胞を、動物の左側腹部に皮下注射した。腫瘍が約200 ~ 300 mm<sup>3</sup>の体積に達したら動物を無作為に10 ~ 15匹の対照群に分け、処置を開始した。動物に、経口経路、静脈内経路または腹腔内経路により、保護要件(welfare requirements) (経口投与用懸濁液はpH範囲4 ~ 7、腹腔内/静脈内投与用溶液はpH範囲5.5 ~ 7.0)に適応し、所要経路を介した投与に適したビヒクル中の化合物を、定義した投与量で2 ~ 4週間にわたり投与した。通常、腫瘍はカリパスにより週に2回測定し、腫瘍体積は楕円の公式(パイ/6  $\times$  幅  $\times$  幅  $\times$  長さ)を用いて計算した。

40

【0190】

予想どおり、式(I)の化合物の薬理学的特性は構造変化に伴い変動するが、一般に、式(I)の化合物が持つ活性は、上記試験(a)および(c)の1以上において以下の濃度または用量で実証することができる：-

試験(a)：- 例えば1 nM ~ 100 nMの範囲における、IC<sub>50</sub>対PI3K-

;

試験(c)：- 例えば10 nM ~ 1  $\mu$ Mの範囲における、IC<sub>50</sub>対BT474細胞中の細胞ホスホAKT (Tyr 308)；

50

本発明の特定の化合物は、上記試験 ( a ) および ( c ) の 1 以上において以下の濃度または用量で活性を持つと好都合である： -

試験 ( a ) : - 例えば 1 n M ~ 1 0 0 n M の範囲における、 I C <sub>50</sub> 対 P I 3 K - ;

試験 ( c ) : - 例えば 1 0 n M ~ 1 μ M の範囲における、 I C <sub>50</sub> 対 B T 4 7 4 細胞中の細胞ホスホ A K T ( T y r 3 0 8 ) ;

本発明の特定の化合物は、上記試験 ( a ) 、 ( c ) 、 ( h ) および ( i ) の 1 以上において以下の濃度または用量で活性を持つと好都合である： -

試験 ( a ) : - 例えば 1 n M ~ 1 0 0 n M の範囲における、 I C <sub>50</sub> 対 P I 3 K - ;

試験 ( c ) : - 例えば 1 0 n M ~ 1 μ M の範囲における、 I C <sub>50</sub> 対 B T 4 7 4 細胞中の細胞ホスホ A K T ( T y r 3 0 8 ) ;

試験 ( h ) : - 例えば 1 ~ 2 0 0 m g / k g / 日の範囲における、 i n v i v o で のホスホ A K T ( s e r 4 7 3 ) の > 5 0 % 阻害；

試験 ( i ) : - 例えば 1 ~ 2 0 0 m g / k g / 日の範囲における異種移植片活性。

【 0 1 9 1 】

実施例に関し以下のデータを作成した：

【 0 1 9 2 】

【表 1】

表A

実施例番号	PI3K-α阻害 IC <sub>50</sub> (μM)*	PI3K-δ阻害 IC <sub>50</sub> (μM)*	PI3K-β阻害 IC <sub>50</sub> (μM)*	PI3K-α細胞 IC <sub>50</sub> (μM)**	ATR細胞 IC <sub>50</sub> (μM)#
1	0.023	<0.014	2.24	0.36	>30
3	0.007	<0.010	0.57	0.09	>30
4	0.025	<0.012	2.91	0.31	>30
5	0.030	0.012	3.31	0.27	>30
6	0.032	<0.012	3.42	0.53	>30
7	0.037	0.014	6.26	0.42	>30
8	0.024	0.012	1.52	0.59	>30
9	<0.010	<0.010	0.640	0.33	-
10	-	-	-	0.085	-
11	-	-	-	0.11	-

\* 試験プロトコル a: これらは、いくつかの重複試験から計算した平均値である。

\*\* 試験プロトコル c: これらは、いくつかの重複試験から計算した平均値である。

# 試験プロトコル f: 1 回の重複試験しか実施しなかった。

【 0 1 9 3 】

組み合わせ試験

材料および方法

M C F 7 は、 P I K C 3 C A 遺伝子 ( E 5 4 5 K ) に変異を有するエストロゲン受容体

10

20

30

40

50

陽性の乳房腫瘍細胞株である。雄 S C I D マウス ( 英国 A Z ) の皮下 ( s . c . ) にヒト乳腺癌細胞株 M C F 7 ( I C R F L o n d o n ) を移植して、P I 3 キナーゼ阻害剤の抗腫瘍活性を決定した。細胞を埋め込む 2 4 時間前に、0 . 5 m g の 2 1 日徐放エストロゲンペレット剤 ( I n n o v a t i v e R e s e a r c h o f A m e r i c a ) をマウスに埋め込んだ。5 0 % マトリゲル ( B D B i o s c i e n c e ) 中の  $5 \times 10^6$  細胞を、動物の左側腹部に皮下注射した。

【 0 1 9 4 】

B T 4 7 4 は、増加した H e r 2 発現を有し、P I K 3 C A 遺伝子 ( K 1 1 1 N ) に変異を有する、エストロゲン受容体陽性の乳房腫瘍細胞株である。マウスで継代培養したヒト上皮乳管癌細胞株 B T 4 7 4 c ( B T 4 7 4 - A T C C H T B - 2 0 から A Z で誘導 ) 腫瘍を、雌スイス無胸腺ヌードマウス ( スイス n u / n u - 英国 A Z ) に皮下移植した。細胞を埋め込む 2 4 時間前に、0 . 3 6 m g の 6 0 日徐放エストロゲンペレット剤 ( I n n o v a t i v e R e s e a r c h o f A m e r i c a ) をマウスに埋め込んだ。5 0 % マトリゲル ( B D B i o s c i e n c e ) 中の  $5 \times 10^6$  細胞を、動物の左側腹部に皮下注射した。

10

【 0 1 9 5 】

H C C 7 0 は、P T E N 遺伝子発現に欠ける乳房腫瘍細胞株である。乳管上皮腫瘍細胞株 H C C 7 0 ( A T C C - C R L 2 3 1 5 ) 細胞を、雌スイス無胸腺ヌードマウス ( スイス n u / n u - 英国 A Z ) に皮下移植した。5 0 % マトリゲル ( B D B i o s c i e n c e ) 中の  $1 \times 10^6$  細胞を、動物の左側腹部に皮下注射した。

20

【 0 1 9 6 】

腫瘍が約  $200 \sim 300 \text{ mm}^3$  の体積に達したら動物を無作為に 1 0 ~ 1 5 匹の群に分け、処置を開始した。適したピピクル中の化合物を、定義した用量およびスケジュールで経口経路により動物に 3 ~ 4 週間投与した。腫瘍をカリパスにより週に 2 ~ 3 回測定し、楕円の公式 ( パイ / 6 × 幅 × 幅 × 長さ ) を用いて腫瘍体積を計算した。

【 0 1 9 7 】

A Z D 5 3 6 3 は、単独で投与する場合、1 0 % D M S O 、 2 5 % K l e p t o s e 溶液中に配合した。( K l e p t o s e は R o q u e t t e - P h a r m a ( 商標 ) から供給されるヒドロキシプロピル ベータシクロデキストリンである - i n v i v o の使用および配合に適している)。

30

【 0 1 9 8 】

A Z D 5 3 6 3 は、実施例 3 と同時投与する場合、H P M C / T w e e n ( 0 . 5 % M e t h o c e l ( ヒドロキシプロピルメトセルロース ) / 0 . 1 % P o l y s o r b a t e 8 0 ) 中に配合した。該懸濁液を一晩ボールミル粉碎した。

【 0 1 9 9 】

実施例 3 は、H P M C / T w e e n ( 0 . 5 % M e t h o c e l ( ヒドロキシプロピルメトセルロース ) / 0 . 1 % P o l y s o r b a t e 8 0 ) 中に配合した。

【 0 2 0 0 】

A Z D 8 1 8 6 は、H P M C / T w e e n ( 0 . 5 % M e t h o c e l ( ヒドロキシプロピルメトセルロース ) / 0 . 1 % P o l y s o r b a t e 8 0 ) 中に配合した。

40

【 0 2 0 1 】

A Z D 8 1 8 6 は、実施例 3 と同時投与する場合、H P M C / T w e e n ( 0 . 5 % M e t h o c e l ( ヒドロキシプロピルメトセルロース ) / 0 . 1 % P o l y s o r b a t e 8 0 ) 中に配合した。該懸濁液を一晩ボールミル粉碎した。

【 0 2 0 2 】

オラパリブは、1 0 % D M S O / 3 0 % K l e p t o s e 溶液中に配合した。  
A K T 阻害剤 ( A Z D 5 3 6 3 ) と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害 - 逐次投与試験は、 B T 4 7 4 異種移植モデルで実施した。実施例 3 および A Z D 5 3 6 3 を、6 ~ 8 時間あけて 1 日 2 回 ( B I D ) 、週に 2 日投与 / 5 日非投与のサイクルで、A Z D 5 3 6 3 を週の 1 日目および 2 日目のサイクルで投与し、実施例 3 を週の 3 日目および 4 日

50

目のサイクルで投与するような順序で投与した。それぞれ H P M C / T w e e n 中および D M S O / K l o p t o s e 中、実施例 3 は 5 0 m g / k g B I D で投与し、A Z D 5 3 6 3 は 1 7 0 m g / k g B I D で投与した。

【 0 2 0 3 】

腫瘍成長曲線（図 9 に示す）は、実施例 3 または A Z D 5 3 6 3 の間欠投与が、ビヒクルのみの対照（H P M C / T w e e n）と比べ、腫瘍成長を部分的に阻害したことを示している。実施例 3 + A Z D 5 3 6 3 の組み合わせは、腫瘍退縮をもたらした。

A K T 阻害剤（A Z D 5 3 6 3）と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害 - 同時投与  
試験は、B T 4 7 4 異種移植モデルで実施した。実施例 3 および A Z D 5 3 6 3 を、6 ~ 8 時間あけて 1 日 2 回（B I D）、週に 2 日投与 / 5 日非投与のサイクルで、随伴して投与した。ともに H P M C / T w e e n 中、実施例 3 は 2 5 m g / k g B I D で投与し、A Z D 5 3 6 3 は 1 0 0 m g / k g B I D で投与した。

10

【 0 2 0 4 】

腫瘍成長曲線（図 1 0 に示す）は、実施例 3 または A Z D 5 3 6 3 の間欠投与が、ビヒクルのみの対照（H P M C / T w e e n）と比べ、腫瘍成長を部分的に阻害したことを示している。実施例 3 + A Z D 5 3 6 3 の組み合わせは、投与期間中は腫瘍退縮をもたらしたが、続く非投与期間中に腫瘍は再成長した。

P A R P 阻害剤（オラパリブ）と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害

試験は、B T 4 7 4 異種移植モデルで実施した。実施例 3 およびオラパリブを、試験期間を通して毎日、実施例 3 は 6 ~ 8 時間あけて 1 日 2 回（B I D）、各回 2 5 m g / k g の用量で、オラパリブは 1 日 1 回（Q D）、実施例 3 の最初の 1 日用量の 1 時間後に 1 0 0 m g / k g で投与した。どちらの作用物質も H P M C / T w e e n 中のものを投与した。

20

【 0 2 0 5 】

腫瘍成長曲線（図 1 1）は、オラパリブ単独は腫瘍成長に著しい効果を有さず、実施例 3 単独は部分的に成長を阻害したが、実施例 3 + オラパリブの組み合わせは腫瘍退縮をもたらしたことを示している。

P A R P 阻害剤（オラパリブ）と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害

試験は、M C F 7 異種移植モデルで実施した。実施例 3 およびオラパリブを、試験期間を通して毎日、実施例 3 は 6 ~ 8 時間あけて 1 日 2 回、各回 2 5 m g / k g の用量で、オラパリブは 1 日 1 回（Q D）、実施例 3 の最初の 1 日用量の 1 時間後に 1 0 0 m g / k g で投与した。どちらの作用物質も H P M C / T w e e n 中のものを投与した。

30

【 0 2 0 6 】

腫瘍成長曲線（図 1 2）は、オラパリブ単独は腫瘍成長に対し最小限の効果しか有さず、実施例 3 単独は多少の腫瘍退縮をもたらすが、実施例 3 + オラパリブの組み合わせは、より強い腫瘍退縮をもたらしたことを示している。

P I 3 K ベータ / デルタ阻害剤（A Z D 8 1 8 6）と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害

試験は、H C C 7 0 異種移植モデルで実施した。実施例 3 および A Z D 8 1 8 6 を、試験期間を通して毎日、1 日 2 回（B I D）、実施例 3 は各回 2 5 m g / k g の用量で、A Z D 8 1 8 6 は各回 5 0 m g / k g の用量で投与した。どちらの作用物質も H P M C / T w e e n 中のものを投与した。

40

【 0 2 0 7 】

腫瘍成長曲線（図 1 3）は、A Z D 8 1 8 6 は腫瘍成長を部分的に阻害し、実施例 3 単独はより強く成長を阻害したが、実施例 3 + A Z D 8 1 8 6 の組み合わせは腫瘍退縮をもたらしたことを示している。

【 0 2 0 8 】

本発明の他の観点に従って、先に定義した式（I）の化合物または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、医薬組成物を提供する。

50

## 【0209】

錠剤製剤に適した薬学的に許容しうる賦形剤としては、例えば、不活性希釈剤、顆粒化および崩壊剤、結合剤、潤滑剤、防腐剤ならびに酸化防止剤が挙げられる。錠剤製剤は、コーティングされていなくてもよく、あるいは、製剤の崩壊と、それに続く胃腸管内での活性構成成分の吸収を改変するために、または製剤の安定性および/もしくは外観を改善するために、どちらの場合も当分野で周知の従来のコーティング剤および手順を用いて、コーティングされていることができる。

## 【0210】

経口使用のための組成物は、選択的に、活性構成成分が不活性固体希釈剤と混合されている硬ゼラチンカプセルの形態にあるか、活性構成成分が水またはオイルと混合されている軟ゼラチンカプセルの形態にあることができる。

10

## 【0211】

水性懸濁液は一般に、微粉化形態にある活性構成成分を、1以上の懸濁化剤、分散剤または湿潤剤と一緒に含有する。水性懸濁液は、1以上の防腐剤、酸化防止剤、着色剤、香味剤、および/または甘味剤も含有することができる。

## 【0212】

油性懸濁液は、活性構成成分を植物油または鉱油に懸濁させることにより配合することができる。油性懸濁液は増粘剤を含有することもできる。口当たりの良い経口調製物を提供するために、上記のような甘味剤、および香味剤を加えてもよい。これらの組成物は、酸化防止剤を加えることにより保存することができる。

20

## 【0213】

水の添加により水性懸濁液を調製するのに適した分散性粉末および顆粒は、一般に、活性構成成分を、分散剤もしくは湿潤剤、懸濁化剤、および1以上の防腐剤と一緒に含有する。甘味剤、香味剤および着色剤などの追加的な賦形剤も、存在することができる。

## 【0214】

本発明の医薬組成物は、水中油型エマルジョンの形態で存在することもできる。油相は植物油もしくは鉱油またはこれらのいずれかの混合物であることができる。エマルジョンは、甘味剤、香味剤、および防腐剤も含有することができる。

## 【0215】

シロップおよびエリキシルは、甘味剤と一緒に配合することができ、粘滑剤、防腐剤、香味剤および/または着色剤を含有することもできる。

30

## 【0216】

該医薬組成物は、無菌の注射可能な水性または油性懸濁液の形態にあることもでき、これは、上記の適した分散剤または湿潤剤および懸濁化剤の1以上を用い、公知の手順に従って配合することができる。無菌の注射可能な調製物は、非毒性で非経口的に許容しうる希釈剤または溶媒中の無菌の注射可能な溶液または懸濁液であることもできる。

## 【0217】

吸入投与用の組成物は、微細な固体または液滴を含有するエアロゾルのいずれかとして活性構成成分が分配されるようになっている、従来の加圧エアロゾルの形態にあることができる。揮発性フッ素化炭化水素または炭化水素などの従来のエアロゾル噴射剤を用いることができ、エアゾール機器は、計量した分量の活性構成成分を分配するようになっている。

40

## 【0218】

製剤に関するさらなる情報については、Comprehensive Medicinal Chemistryの第5巻、25.2章(Corwin Hansch; 編集委員委員長)、Pergamon Press 1990を参照のこと。

## 【0219】

単一剤形をもたらすために1以上の賦形剤と組み合わせる活性構成成分の量は、処置される宿主および特定の投与経路に応じて必然的に変動する。例えば、ヒトへの経口投与では、一般に、例えば、1mg~2gの投与しようとする活性作用物質(より適切には10

50

0 mg ~ 2 g、例えば、250 mg ~ 1.8 g、例えば500 mg ~ 1.8 g、とりわけ500 mg ~ 1.5 g、好都合には500 mg ~ 1 g)を、全組成物の約3 ~ 約98重量パーセントであることができる適切で好都合な量の賦形剤と配合することが必要になる。大用量が必要な場合、活性構成成分の用量を好都合に分けて、多数の剤形、例えば、2以上の錠剤またはカプセルが必要となる可能性があることは、理解されるであろう。好都合には、単一剤形は、1 ~ 300 mgの活性構成成分を含有することができる。

【0220】

治療的または予防的目的での式(I)の化合物の用量サイズは、周知の医療の原理に準じて、疾患状態の性質および重症度、動物または患者の年齢および性別、ならびに投与経路に従って必然的に変動する。

10

【0221】

治療的または予防的目的での式(I)の化合物の使用において、それは、一般に、必要に応じて分割用量で、例えば1 mg / kg ~ 100 mg / kg体重の範囲にある1日用量が受領されるように投与する。一般に、非経口経路を採用する場合は、より低い用量を投与する。したがって、例えば静脈内投与の場合、例えば1 mg / kg ~ 25 mg / kg体重の範囲の用量を一般に用いる。同様に、吸入投与の場合、例えば1 mg / kg ~ 25 mg / kg体重の範囲の用量を用いる。しかしながら、とりわけ錠剤形態での経口投与が好ましい。典型的には、単位剤形は、約10 mg ~ 0.5 gの本発明の化合物を含有する。

【0222】

本発明の化合物は、毎日、または1日1回より多く、投与することができる。本発明の化合物は、適した投与スケジュールで投与することもでき、例えば、本発明の化合物を特定日数にわたり1日1回以上(例えば、1日1回、2回または3回)投与した後、一定期間投与しないことができる。その後、この投与サイクル(投与日および非投与日からなる)を繰り返すことができる。好都合には、投与サイクルは、5 ~ 14日間、例えば、5、7、10または14日間であり、より好都合には7日間である。一観点において、ある投与サイクルでは、式(I)の化合物を1日または連続した2もしくは3日間投与した後、3、4、5または6日間投与しない。

20

【0223】

一観点では、式(I)の化合物を1日投与した後、2、3または4日間投与しない。

【0224】

他の一観点では、式(I)の化合物を2日間投与した後、4、5または6日間投与しない。

30

【0225】

さらに他の一観点では、式(I)の化合物を3日間投与した後、3、4または5日間投与しない。

【0226】

他の一観点では、式(I)の化合物を4日間投与した後、2、3または4日間投与しない。

【0227】

他の一観点では、式(I)の化合物を5日間投与した後、1、2または3日間投与しない。

40

【0228】

他の一観点では、式(I)の化合物を1日おきに投与する。

【0229】

上記投与スケジュールは、本発明の化合物を単剤療法として用いるときに施用すると好都合である。併用療法として本発明の化合物を投与するための考えうる投与スケジュールの他の例は、以下に記載する。

【0230】

上記のように、PI3K - および - 酵素は、癌および他の細胞の増殖を媒介する作用、血管新生事象を媒介する作用、ならびに癌細胞の運動、移動および侵襲を媒介する作

50

用の1以上により、腫瘍形成に寄与することが知られている。われわれは、本発明の化合物が強い抗腫瘍活性を持ち、これが、腫瘍細胞の増殖および生存ならびに転移性腫瘍細胞の侵襲および移動能をもたらすシグナル伝達段階に関わるPI3K - および - 酵素の阻害により得られると考えられることを、見いだした。

【0231】

したがって、本発明の化合物は、抗腫瘍剤として、とりわけ、腫瘍の成長および生存の阻害ならびに転移性腫瘍の成長の阻害をもたらす哺乳類癌細胞の増殖、生存、運動、内転移および侵襲の選択的阻害剤として、有用である。とりわけ、本発明の化合物は、固形腫瘍疾患の封じ込めおよび/または処置における抗増殖剤および抗侵襲剤として有用である。とりわけ、本発明の化合物は、腫瘍細胞の増殖および生存ならびに転移性腫瘍細胞の移動能および侵襲をもたらすシグナル伝達段階に関わるPI3K - および/または - 酵素の阻害に対し感受性を示す腫瘍の予防または処置に有用であると予想される。さらに、本発明の化合物は、PI3K - および/もしくは - 酵素の阻害により単独でまたは部分的に媒介される腫瘍の予防または処置に有用であると予想される、すなわち、該化合物は、PI3K - および/または - 酵素阻害作用を、そのような処置を必要とする温血動物にもたすために、用いることができる。

10

【0232】

本発明の他の観点に従って、ヒトなどの温血動物において医薬品として用いるための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

【0233】

本発明の他の観点に従って、ヒトなどの温血動物における抗増殖作用の生成に用いるための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

20

【0234】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、ヒトなどの温血動物において固形腫瘍疾患の封じ込めおよび/または処置における抗侵襲剤として用いるための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

【0235】

本発明の他の観点に従って、ヒトなどの温血動物における抗増殖作用の生成のための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

【0236】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、ヒトなどの温血動物における抗増殖作用の生成に用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

30

【0237】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、ヒトなどの温血動物において固形腫瘍疾患の封じ込めおよび/または処置における抗侵襲剤として用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

【0238】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、抗増殖作用を、そのような処置を必要とするヒトなどの温血動物において生成するための方法であって、前記動物に、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

40

【0239】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、固形腫瘍疾患の封じ込めおよび/または処置による抗侵襲作用を、そのような処置を必要とするヒトなどの温血動物において生成するための方法であって、前記動物に、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0240】

本発明の他の観点に従って、ヒトなどの温血動物における癌の予防または処置に用いるための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

50

## 【0241】

本発明の他の観点に従って、ヒトなどの温血動物における癌の予防または処置に用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

## 【0242】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、癌の予防または処置を、そのような処置を必要とするヒトなどの温血動物において行うための方法であって、前記動物に、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

## 【0243】

本発明の他の観点に従って、ヒトなどの温血動物における固形腫瘍疾患の予防または処置に用いるための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

## 【0244】

本発明の他の観点に従って、ヒトなどの温血動物における固形腫瘍疾患の予防または処置に用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

## 【0245】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、固形腫瘍疾患の予防または処置を、そのような処置を必要とするヒトなどの温血動物において行うための方法であって、前記動物に、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

## 【0246】

本発明の他の観点に従って、腫瘍細胞の増殖、生存、侵襲および移動能をもたらすシグナル伝達段階に関わるPI3K - および/または - 酵素の阻害に対し感受性を示す腫瘍の予防または処置に用いるための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

## 【0247】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、腫瘍細胞の増殖、生存、侵襲および移動能をもたらすシグナル伝達段階に関わるPI3K - および/または - 酵素の阻害に対し感受性を示す腫瘍の予防または処置に用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

## 【0248】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、腫瘍細胞の増殖、生存、侵襲および移動能をもたらすシグナル伝達段階に関わるPI3K - および/または - 酵素の阻害に対し感受性を示す腫瘍の予防または処置に用いるための方法であって、前記動物に、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

## 【0249】

本発明の他の観点に従って、PI3K - および - 酵素阻害作用をもたらすのに用いるための、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

## 【0250】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、PI3K - および - 酵素阻害作用をもたらすのに用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

## 【0251】

本発明の他の観点に従って、PI3K - および - 酵素阻害作用をもたらすための方法であって、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法も提供する。

## 【0252】

10

20

30

40

50

上記のように、本発明の特定の化合物は、P I 3 K - および - 酵素に対し、他の P I 3 キナーゼ酵素または他のキナーゼに対してより、実質的に良好な効果を持つ。そのような化合物は、P I 3 K - および - 酵素に対し十分な効果を持ち、P I 3 K - および - 酵素を阻害するのに十分な量で用いることができるが、P I 3 K - 酵素および他のほとんどのキナーゼ酵素に対しては活性をほとんど示さない。そのような化合物は、P I 3 K - および - 酵素の選択的阻害に有用である可能性が高く、例えば P I 3 K - および / または - 酵素により促進される腫瘍の有効な処置に有用である可能性が高い。

【0253】

本発明のこの観点に従って、選択的 P I 3 K - および - 酵素阻害作用をもたらすのに使用するための、先に定義した式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

10

【0254】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、選択的 P I 3 K - および - 酵素阻害作用をもたらすのに用いるための医薬品の製造における、先に定義した式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

【0255】

本発明の他の観点に従って、選択的 P I 3 K - および - 酵素阻害作用をもたらすための方法であって、有効量の先に定義した式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法も提供する。

【0256】

“選択的 P I 3 K - および - 酵素阻害作用”は、式 ( I ) の化合物が、P I 3 K - および - 酵素に対し、他のクラス 1 P I 3 キナーゼに対してより効果が高く、一般に、より広い P I 3 キナーゼファミリーの他のメンバー、ならびにチロシンおよび s e r / t h r キナーゼを含むより広範なクラスのキナーゼ酵素にわたる他のメンバーと比較して、良好な選択性を示すことを意味する。

20

【0257】

本発明の他の特徴に従って、乳癌、胃(stomach) (胃(gastric)) および食道癌、扁平上皮癌 ( S C C ) および腺癌を含む非小細胞性肺癌 ( N S C L C )、頭頸部 ( H & N ) の S C C、婦人科癌 ( 子宮内膜癌、卵巣癌および子宮頸癌を含む )、ならびに、多発性骨髄腫、リンパ腫および白血病 ( 慢性リンパ球性白血病 ( C L L )、急性リンパ芽球性白血病 ( A L L ) およびマンツル細胞リンパ腫 ( M C L ) を含む ) などの血液癌の処置に用いるための、先に定義した式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

30

【0258】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、膀胱、脳 / C N S、結腸直腸、肺 ( すべての他の形態 )、胆嚢および胆管、ならびに皮膚の癌の処置に用いるための、先に定義した式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

【0259】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、前立腺、骨、腎臓、肝臓、黒色腫、胃腸組織、膵臓、睾丸、甲状腺、陰茎、外陰部の癌、および、変異、増幅または他の異常を通じて P I 3 キナーゼ依存性を示す他の腫瘍タイプの処置に用いるための、先に定義した式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

40

【0260】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、乳癌、胃(stomach) (胃(gastric)) および食道癌、S C C および腺癌を含む N S C L C、H & N の S C C、婦人科癌 ( 子宮内膜癌、卵巣癌および子宮頸癌を含む )、ならびに、多発性骨髄腫、リンパ腫および白血病 ( C L L、A L L および M C L を含む ) などの血液癌の処置を、そのような処置を必要とするヒトなどの温血動物において行うための方法であって、有効量の先に定義した式 ( I ) の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0261】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、膀胱、脳 / C N S、結腸直腸、肺 ( すべての他

50

の形態)、胆嚢および胆管、ならびに皮膚の癌の処置を、そのような処置を必要とするヒトなどの温血動物において行うための方法であって、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0262】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、前立腺、骨、腎臓、肝臓、黒色腫、胃腸組織、膵臓、睾丸、甲状腺、陰茎、外陰部の癌、および、変異、増幅または他の異常を通じてPI3キナーゼ依存性を示す他の腫瘍タイプの処置を、そのような処置を必要とするヒトなどの温血動物において行うための方法であって、有効量の先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0263】

本発明の他の特徴に従って、乳癌、胃(stomach)(胃(gastric))および食道癌、SCCおよび腺癌を含むNSCLC、H&NのSCC、婦人科癌(子宮内膜癌、卵巣癌および子宮頸癌を含む)、ならびに、多発性骨髄腫、リンパ腫および白血病(CLL、ALLおよびMCLを含む)などの血液癌の処置に用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

【0264】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、膀胱、脳/CNS、結腸直腸、肺(すべての他の形態)、胆嚢および胆管、ならびに皮膚の癌の処置に用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

【0265】

本発明のこの観点の他の特徴に従って、前立腺、骨、腎臓、肝臓、黒色腫、胃腸組織、膵臓、睾丸、甲状腺、陰茎、外陰部の癌、および、変異、増幅または他の異常を通じてPI3キナーゼ依存性を示す他の腫瘍タイプの処置に用いるための医薬品の製造における、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の使用を提供する。

【0266】

本発明の1つの特徴において、処置しようとする癌は乳癌である。この特徴の他の観点において、乳癌はエストロゲン受容体陽性である。この観点の一態様では、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を、本明細書中で定義する抗ホルモン剤と組み合わせて投与する。この観点の他の態様では、実施例3を、本明細書中で定義する抗ホルモン剤と組み合わせて投与する。この観点の他の態様では、実施例3を、オラパリブまたは薬学的に許容しうるその塩と組み合わせ、所望によりさらに本明細書中で定義する抗ホルモン剤と組み合わせて投与する。この観点の他の態様では、実施例3を、AZD5363または薬学的に許容しうるその塩と組み合わせ、所望によりさらに本明細書中で定義する抗ホルモン剤と組み合わせて投与する。

【0267】

癌の処置が示されている一観点において、これは、転移すなわち癌の拡散の予防および転移の処置をさすことができることを、理解すべきである。したがって、本発明の化合物は、転移を有さない患者を処置するのに用いると、転移の発生を阻止するか転移が発生するまでの期間を長くすることができる。既に転移を有する患者に用いると、転移それ自体を処置することができる。さらに、癌の処置は、確立された原発腫瘍(1以上)および進行性の原発腫瘍(1以上)の処置をさすことができる。したがって、一観点において、癌の処置は転移の予防に関する。本発明の他の観点において、癌の処置は転移の処置に関する。本発明の他の観点において、癌の処置は、確立された原発腫瘍(1以上)または進行性の原発腫瘍(1以上)の処置に関する。

【0268】

上記のように、式(I)の化合物の*in vivo*作用は、式(I)の化合物の投与後にヒトまたは動物の体内で形成される1以上の代謝産物(先に定義した式Aの化合物など)により部分的にもたらされる。

【0269】

本発明の特定の化合物は、PI3キナーゼ - および - に対し、他のクラスIのPI

10

20

30

40

50

3キナーゼアイソフォーム、例えば - および - に対してより、良好な効果を持つ。一観点において、本発明の化合物は、PI3K - および - に比べPI3K - および - に対し選択性が高い。

【0270】

したがって、本発明はまた、患者においてPI3キナーゼ - を阻害するための方法であって、患者においてホスホイノシチド3キナーゼ - を阻害するのに有効な量の式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を、患者に投与することを含む、前記方法を企図する。

【0271】

したがって、本発明はまた、患者においてPI3キナーゼ - および - を阻害するための方法であって、患者においてPI3キナーゼ - および - を阻害するのに有効な量の式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を、患者に投与することを含む、前記方法を企図する。

10

【0272】

PI3キナーゼの阻害剤である式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩は、さまざまな他の疾患状態における潜在的な治療上の用途も有する。例えば、PI3キナーゼは、血管樹、すなわち、血管平滑筋細胞 (Thyberg, European Journal of Cell Biology, 1998, 76(1), 33-42) および肺(気道平滑筋細胞) (Krymskaya, V. P., BioDrugs, 2007, 21(2), 85-95) における平滑筋増殖を促進するのに重要な役割を果たす。血管平滑筋細胞の過剰増殖は、アテローム斑の形成および侵襲的な血管処置後の新生内膜過形成の発現において、重要な役割を果たす (Schwartz et al., Progress in Cardiovascular Disease, 1984, 26, 355-372; Clowes et al., Laboratory Investigations, 1978, 39, 141-150)。さらに、気道平滑筋細胞の過剰増殖は、喘息および慢性気管支炎の状況においてCOPDの発現を引き起こす。したがって、PI3キナーゼ活性の阻害剤は、血管再狭窄、アテローム性動脈硬化症およびCOPDの予防に用いることができる。

20

【0273】

PI3キナーゼはまた、白血球機能 (Fuller et al., The Journal of Immunology, 1999, 162(11), 6337-6340; Eder et al., The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(43), 28025-31) およびリンパ球機能 (Vicente-Manzanares et al., The Journal of Immunology, 1999, 163(7), 4001-4012) において重要な役割を果たす。例えば、炎症を起こした内皮への白血球付着には、PI3キナーゼ依存性シグナル伝達プロセスによる内因性白血球インテグリンの活性化が関与する。さらに、好中球における酸化バースト (Nishioka et al., FEBS Letters, 1998, 441(1), 63-66 および Condliffe, A. M., et al., Blood, 2005, 106(4), 1432-40) および細胞骨格の再構築 (Kirsch et al., Proceedings National Academy of Sciences USA, 1999, 96(11), 6211-6216) に、PI3キナーゼシグナル伝達に関与すると思われる。好中球の遊走および方向性運動も、PI3キナーゼ活性に依存する (Camps, M., et al., Nat Med, 2005, 11(9), 936-43 および Sadhu, C. et al., J Immunol, 2003, 170(5), 2647-54)。したがって、PI3キナーゼの阻害剤は、炎症部位での白血球の付着および活性化を減少させるのに有用である可能性があり、したがって、急性および/または慢性的炎症性障害の処置に用いることができる。PI3キナーゼは、リンパ球の増殖および活性化においても重要な役割を果たす。Fruman et al., Science, 1999, 283(5400)

30

40

50

、393-397。とりわけ、PI3K- はB細胞の発生および機能、例えば、IgMに特異的な抗体により誘発されるB細胞増殖(Okkenhaug K et al., Science, 2002, 297(5583), 1031-1034)、B細胞受容体により誘発されるDNAの合成および増殖、ならびにIL-4により誘発される生存(Bilancio A et al., Blood, 2006, 107, 642-650)に必須である。これらの観察結果は、PI3K- が、B細胞の機能において、他のクラスIのPI3Kにより補われない極めて重要で重複しない役割を有することを示している。自己免疫疾患におけるリンパ球の重要な役割を考えると、PI3キナーゼ活性の阻害剤を、そのような疾患の処置に用いることができる(Rommel C, Camps MおよびJi H, Nat Rev Immunol, 2007, 1038, 191-201)

10

#### 【0274】

先に定義した抗癌処置は、単独療法として施用することができ、または、本発明の化合物に加えて、従来の外科手術もしくは放射線療法もしくは化学療法を包含することができる。そのような化学療法としては、以下のカテゴリーの抗腫瘍剤の1以上を挙げるができる:-

(i) 医学的腫瘍学で用いられるような抗増殖薬/抗新生物薬およびそれらの組み合わせ、例えば、アルキル化剤(例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルフalan、クロラムブシル、ブスルファン、テモゾロミド(temozolamide)およびニトロソウレア);代謝拮抗剤(例えば、ゲムシダピンおよび抗葉酸剤、例えば、5-フルオロウラシルおよびテガフルのようなフルオロピリミジン、ラルチトレキセド、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、およびヒドロキシウレア);抗腫瘍性抗生物質(例えば、アドリアマイシン、ブレオマイシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、エピルピシン、イダルピシン、マイトマイシンC、ダクチノマイシンおよびミトラマイシンのようなアントラサイクリン);抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンおよびビノレルピンのようなピンカルカロイド、ならびにタキソールおよびタキソテルのようなタキソイド、ならびにポロキナーゼ阻害剤);ならびにトポイソメラーゼ阻害剤(例えば、エトポシドおよびテニポシドのようなエピポドフィロトキシン、アムサクリン、トポテカン、ならびにカンプトセシン);

20

30

(ii) 抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲン剤(例えば、タモキシフェン、フルベストラント、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、およびヨードキシフェン)、抗アンドロゲン剤(例えば、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、および酢酸シプロテロン)、LHRHアンタゴニストまたはLHRHアゴニスト(例えば、ゴセレリン、リュープロレリン、およびブセレリン)、プロゲステゲン(例えば、酢酸メゲストロール)、アロマターゼ阻害剤(例えば、アナストロゾール、レトロゾール、ボロゾール(vorazole)、およびエキセメスタン)、ならびに5-レダクターゼの阻害剤、例えばフィナステリド;

(iii) 成長因子の機能およびそれらの下流のシグナル伝達経路の阻害剤:これには、Stern et al. Critical Reviews in Oncology / Haematology, 2005, 54, 11~29頁により検討されている任意の成長因子または成長因子受容体標的のAbモジュレーターが包含される;そのような標的の小分子阻害剤、例えば、キナーゼ阻害剤も包含される-例としては、抗erbB2抗体トラスツズマブ[Herceptin<sup>TM</sup>]、抗EGFR抗体パニツムマブ、抗EGFR抗体セツキシマブ[Erbitux, C225]のほか、erbB受容体ファミリーの阻害剤を含むチロシンキナーゼ阻害剤、例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブなどの上皮成長因子ファミリー受容体(EGFR/erbB1)チロシンキナーゼ阻害剤、ラパチニブなどのerbB2チロシンキナーゼ阻害剤、およびアファチニブ(afatanib)などの混合erbB1/2阻害剤が挙げられる;同様の戦略が、他のクラスの成長因子およびそれらの受容体、例えば、肝細胞成長因子ファミリーまたはc-metおよびronを含むそれ

40

50

らの受容体の阻害剤；インスリンおよびインスリン成長因子ファミリーまたはそれらの受容体（IGFR、IR）の阻害剤、血小板由来成長因子ファミリーまたはそれらの受容体（PDGFR）の阻害剤、ならびに、c-kit、AnLKおよびCSF-1Rなど他の受容体チロシンキナーゼにより媒介されるシグナル伝達の阻害剤に、利用可能である；より広範なPI3キナーゼシグナル伝達経路でシグナル伝達タンパク質を標的にするモジュレーター、例えば、PI3K- など他のPI3キナーゼアイソフォームの阻害剤、およびAKT、mTOR、PDK、SGK、PI4KまたはPIP5Kなどのser/thrキナーゼの阻害剤も包含される；

先に挙げていないセリン/スレオニンキナーゼの阻害剤、例えば、ベムラフェニブなどのraf阻害剤、セルメチニブ（AZD6244）などのMEK阻害剤、イマチニブまたはニロチニブなどのAbl阻害剤、イブルチニブなどのBkt阻害剤、フォスタマニチブなどのSyk阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤（例えばAZD1152）、JAK、STATおよびIRAK4など他のser/thrキナーゼの阻害剤、ならびにサイクリン依存性キナーゼ阻害剤も包含される；

(iv) DNA損傷シグナル伝達経路のモジュレーター、例えば、PARP阻害剤（例えばオラパリブ）、ATR阻害剤またはATM阻害剤；

(v) Bclファミリーモジュレーター（例えばABT-263/ナビトクラックス、ABT-199）などのアポトーシスおよび細胞死経路のモジュレーター；

(vi) 血管内皮成長因子の作用を阻害するような抗血管新生剤 [例えば抗血管内皮細胞成長因子抗体ベバシズマブ（Avastin<sup>TM</sup>）、ならびに、例えば、ソラフェニブ、アキシチニブ、パゾパニブ、スニチニブおよびバンデタニブなどのVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤（ならびに、他の機序により働く他の化合物（例えば、リノミド、インテグリン v<sub>3</sub>機能の阻害剤、およびアンギオスタチン）]；

(vii) コンプレタスタチンA4などの血管損傷剤；

(viii) 抗侵襲剤、例えば、ダサチニブ（J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661）およびボスチニブ（SKI-606）のようなc-Srcキナーゼファミリー阻害剤、ならびに、マリマスタットのようなメタロプロテイナーゼ阻害剤、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体機能の阻害剤、またはヘパラナーゼに対する抗体]；

(ix) 免疫療法アプローチ、例えば、インターロイキン2、インターロイキン4または顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子のようなサイトカインでのトランスフェクションなど、患者の腫瘍細胞の免疫原性を向上させるex-vivoおよびin-vivoアプローチ、T細胞アネルギーを低下させるアプローチ、サイトカイントランスフェクト樹状細胞などのトランスフェクト免疫細胞を用いるアプローチ、サイトカイントランスフェクト腫瘍細胞株を用いるアプローチ、ならびに抗イディオタイプ抗体を用いるアプローチなど。具体例としては、PD-1を標的にするモノクローナル抗体（例えばBMS-936558）またはCTLA4を標的にするモノクローナル抗体（例えば、イピリムマブおよびトレメリムマブ）が挙げられる；

(x) アンチセンスまたはRNAiに基づく治療、例えば、上記標的を対象とするもの。

(xi) 遺伝子療法アプローチ、例えば、異常p53または異常BRCA1もしくはBRCA2のような異常遺伝子を置換するアプローチ、シトシンジアミナーゼ、チミジンキナーゼまたは細菌性ニトロレダクターゼ酵素を用いるようなGDEPT（遺伝子を対象とする酵素プロドラッグ療法）アプローチ、ならびに多剤耐性遺伝子療法など化学療法または放射線療法に対する患者の耐容性を向上させるアプローチなど。

【0275】

本発明のこの観点に従って、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、他の抗腫瘍剤、とりわけ、上記(i)~(xi)に挙げた抗腫瘍剤のいずれか1つとを含む組み合わせを提供する。とりわけ、上記(i)~(xi)に挙げた抗腫瘍剤は、処置しようとする特定の癌の標準治療である；当業者なら、“標準治療”の意味を理解するであろう。

10

20

30

40

50

## 【0276】

したがって、本発明の他の観点において、他の抗腫瘍剤、とりわけ、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

## 【0277】

本発明の他の観点において、他の抗腫瘍剤、とりわけ、上記(i)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

## 【0278】

本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、上記(i)に挙げた抗腫瘍剤のいずれか1つとを含む、前記組み合わせを提供する。

10

## 【0279】

本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、例えばタキソールまたはタキソテルなどのタキソイド、好都合にはタキソテルとを含む、前記組み合わせを提供する。

## 【0280】

本発明の他の観点において、他の抗腫瘍剤、とりわけ、上記(ii)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

20

## 【0281】

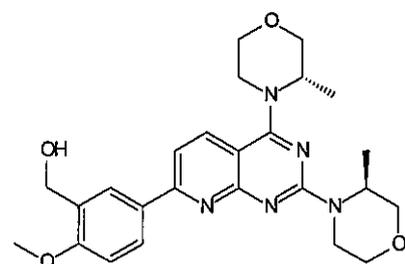
本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、上記(ii)に挙げた抗ホルモン剤、例えば、上記(ii)に挙げた抗エストロゲン剤のいずれか1つとを含む、前記組み合わせを提供する。

## 【0282】

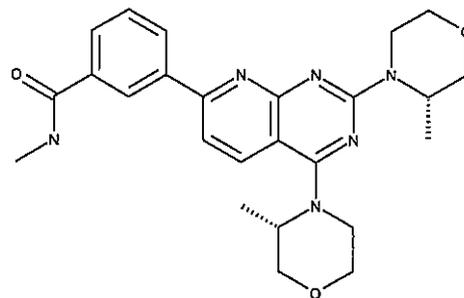
本発明の他の観点において、国際公開WO2008/023161号に開示されているようなmTOR阻害剤、例えば、

## 【0283】

## 【化17】



または



30

40

## 【0284】

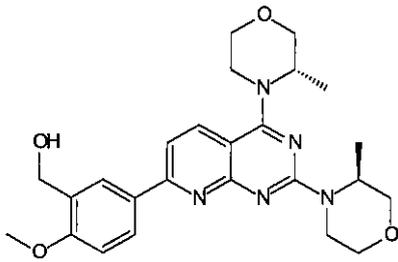
と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

## 【0285】

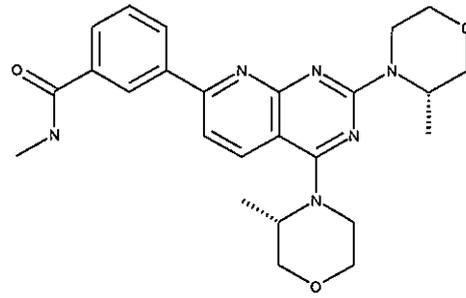
本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、国際公開WO2008/023161号に開示されているようなmTOR阻害剤、例えば、

## 【0286】

## 【化18】



または



10

## 【0287】

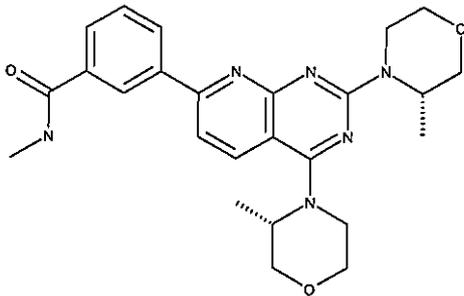
とを含む、前記組み合わせを提供する。

## 【0288】

とりわけ、mTOR阻害剤はAZD2014であり、これは以下の構造を有する：

## 【0289】

## 【化19】



20

## 【0290】

一観点において、式(I)の化合物とAZD2014の上記組み合わせは、所望により標準治療のホルモン療法と組み合わせて、エストロゲン受容体陽性の乳癌の処置に用いるのに適してゐる。

## 【0291】

本発明の他の観点において、PI3K- の阻害剤と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

30

## 【0292】

式(I)の化合物とPI3K- の阻害剤の組み合わせは、PTEN喪失に起因する腫瘍、例えば、前立腺癌、乳癌(例えばトリプルネガティブ乳癌)、扁平上皮NSCLCおよび腎癌の処置に、とりわけ有用であることができる。

## 【0293】

本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩とPI3K- の阻害剤とを含む組み合わせを提供する。

40

## 【0294】

一観点において、上記PI3K- の阻害剤は、PI3K- 阻害活性もいくらか有する。

## 【0295】

本発明の他の観点において、PI3K- の阻害剤、例えば、国際特許出願WO2011/051704号の実施例のいずれか1つと組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

## 【0296】

本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、PI3K- の阻害剤、例

50

例えば、国際特許出願WO2011/051704号の実施例のいずれか1つとを含む、前記組み合わせを提供する。

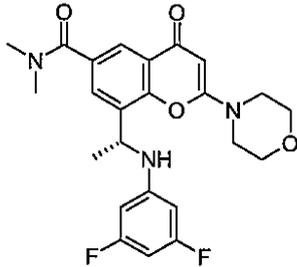
【0297】

本発明の他の観点において、PI3K- およびPI3K- の阻害剤、例えば、8-((1R)-1-(3,5-ジフルオロフェニルアミノ)エチル)-N,N-ジメチル-2-モルホリノ-4-オキソ-4H-クロメン-6-カルボキサミド(国際特許出願WO2011/051704号の実施例3.06b、AZD8186としても知られる)または薬学的に許容しうるその塩:

【0298】

【化20】

10



【0299】

と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

20

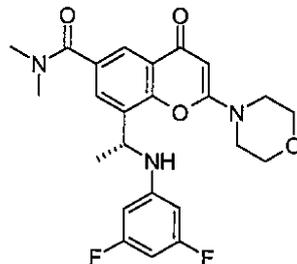
【0300】

本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、PI3K- およびPI3K- の阻害剤、例えば、8-((1R)-1-(3,5-ジフルオロフェニルアミノ)エチル)-N,N-ジメチル-2-モルホリノ-4-オキソ-4H-クロメン-6-カルボキサミド(国際特許出願WO2011/051704号の実施例3.06b、AZD8186としても知られる)または薬学的に許容しうるその塩:

【0301】

【化21】

30



【0302】

とを含む、前記組み合わせを提供する。

【0303】

40

本発明の他の観点において、AKTキナーゼの阻害剤、例えば、(S)-4-アミノ-N-(1-(4-クロロフェニル)-3-ヒドロキシプロピル)-1-(7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)ペペリジン-4-カルボキサミド(AZD5363)または薬学的に許容しうるその塩(例えば国際公開WO2009/047563号参照)と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

【0304】

式(I)の化合物とAKT阻害剤の組み合わせは、PIK3CA遺伝子の変異がより高率で出現している腫瘍、例えば、エストロゲン受容体陽性の乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、扁平上皮NSCLC、胃癌、膀胱癌、および胆道癌の処置に、とりわけ有用であることができる。

50

## 【0305】

本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、AKTキナーゼの阻害剤、例えば、(S)-4-アミノ-N-(1-(4-クロロフェニル)-3-ヒドロキシプロピル)-1-(7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)ペペリジン-4-カルボキサミド(AZD5363)または薬学的に許容しうるその塩(例えば国際公開WO2009/047563号参照)とを含む、前記組み合わせを提供する。

## 【0306】

本発明の他の観点において、オラパリブ(4-[3-(4-シクロプロパンカルボニル-ピペラジン-1-カルボニル)-4-フルオロ-ベンジル]-2H-フタラジン-1-オン)または薬学的に許容しうるその塩と組み合わせた、式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を提供する。

10

## 【0307】

式(I)の化合物とオラパリブの組み合わせは、BRCA野生型または欠損のいずれかのトリプルネガティブ乳癌と、エストロゲン受容体陽性(ER+)乳癌の両方、とりわけ、PIK3CA遺伝子に変異を有するものに、とりわけ有用であることができる。

## 【0308】

本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した組み合わせであって、先に定義した式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩と、オラパリブ(4-[3-(4-シクロプロパンカルボニル-ピペラジン-1-カルボニル)-4-フルオロ-ベンジル]-2H-フタラジン-1-オン)または薬学的に許容しうるその塩とを含む、前記組み合わせを提供する。

20

## 【0309】

本発明の特定の組み合わせは、本明細書中の実施例の化合物(または薬学的に許容しうるその塩)のいずれか1つと、上記のようなmTOR阻害剤、PI3K阻害剤、AKTキナーゼの阻害剤またはオラパリブとを含む。本発明の他の特定の組み合わせは、実施例3(または薬学的に許容しうるその塩)と、上記のようなmTOR阻害剤、PI3K阻害剤、AKTキナーゼの阻害剤またはオラパリブとを含む。本発明の他の特定の組み合わせは、実施例3(または薬学的に許容しうるその塩)と、上記のようなPI3K阻害剤、AKTキナーゼの阻害剤またはオラパリブ(または、これら3つのうちいずれか1つの薬学的に許容しうる塩)とを含む。本発明のさらに他の特定の組み合わせの例は、実施例3(または薬学的に許容しうるその塩)と、AZD8186、AZD5363およびオラパリブ(または、これら3つのうちいずれか1つの薬学的に許容しうる塩)とを含む。本発明の組み合わせの他の例は、実施例3とAZD2014を含む。

30

## 【0310】

上記組み合わせのすべてにおいて、該組み合わせは、当業者なら理解するように、上記(i)~(xi)からの他の処置などの標準治療の処置と一緒に投与することもできることは、理解されるであろう。例えば、エストロゲン受容体陽性乳癌の処置に上記組み合わせのいずれかを用いようとする場合、標準治療のホルモン療法(上記(ii)に挙げた作用物質など)を、本発明の組み合わせと併せて用いることができる。他の観点において、標準治療は、上記(i)から適切に選択することができる。

40

## 【0311】

したがって、本発明の他の観点において、癌の処置に用いるのに適した三重の組み合わせ

- a) 式(I)の化合物(実施例3など)または薬学的に許容しうるその塩；
  - b) mTOR阻害剤、PI3K阻害剤、AKTキナーゼの阻害剤またはオラパリブまたは薬学的に許容しうるそれらの塩；
  - c) 処置しようとする癌に関する標準治療の療法
- を提供する。

## 【0312】

50

標準治療の療方は、当業者なら理解するように、その通常の投与計画に従って適切に投与することができる。

【0313】

本発明の他の観点に従って、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、医薬組成物を提供する。

【0314】

本発明の他の観点に従って、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた実施例3または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、医薬組成物を提供する。

【0315】

本発明の他の観点に従って、AZD5363、AZD8186またはオラパリブ(または、これら3つのうちいずれか1つの薬学的に許容しうる塩)と組み合わせた実施例3または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、医薬組成物を提供する。

【0316】

本発明の他の観点に従って、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、癌の処置に用いるための医薬組成物を提供する。

【0317】

本発明の他の観点に従って、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた実施例3または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、癌の処置に用いるための医薬組成物を提供する。

【0318】

本発明の他の観点に従って、AZD5363、AZD8186またはオラパリブ(または、これら3つのうちいずれか1つの薬学的に許容しうる塩)と組み合わせた実施例3または薬学的に許容しうるその塩を、薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーと共同して含む、癌の処置に用いるための医薬組成物を提供する。

【0319】

本発明の他の特徴に従って、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩の、ヒトなどの温血動物における癌に用いるための医薬品の製造における使用を提供する。

【0320】

本発明の他の特徴に従って、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた実施例3または薬学的に許容しうるその塩の、ヒトなどの温血動物における癌に用いるための医薬品の製造における使用を提供する。

【0321】

本発明の他の特徴に従って、AZD5363、AZD8186またはオラパリブ(または、これら3つのうちいずれか1つの薬学的に許容しうる塩)と組み合わせた実施例3または薬学的に許容しうるその塩の、ヒトなどの温血動物における癌に用いるための医薬品の製造における使用を提供する。

【0322】

したがって、本発明の追加的特徴において、癌の処置を必要とするヒトなどの温血動物における癌の処置方法であって、前記動物に、上記(i)~(xi)に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた有効量の式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0323】

したがって、本発明の追加的特徴において、癌の処置を必要とするヒトなどの温血動物における癌の処置方法であって、前記動物に、上記(i)~(xi)に挙げたものから選

10

20

30

40

50

扱われる抗腫瘍剤と組み合わせた有効量の実施例 3 または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0324】

したがって、本発明の追加的特徴において、癌の処置を必要とするヒトなどの温血動物における癌の処置方法であって、前記動物に、AZD5363、AZD8186 またはオラパリブ（または、これら3つのうちいずれか1つの薬学的に許容しうる塩）と組み合わせた有効量の実施例 3 または薬学的に許容しうるその塩を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0325】

本発明の他の観点に従って、上記(i) ~ (xi) に挙げたものから選択される抗腫瘍剤と組み合わせた式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩を含む、キットを提供する。

10

【0326】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
  - b) 第2の単位剤形にある上記(i) ~ (xi) に挙げたものから選択される抗腫瘍剤；
- ならびに
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段。

【0327】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
  - b) 第2の単位剤形にある上記(i) ~ (xi) に挙げたものから選択される抗腫瘍剤；
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段；ならびに、
- d) 使用説明書。

20

【0328】

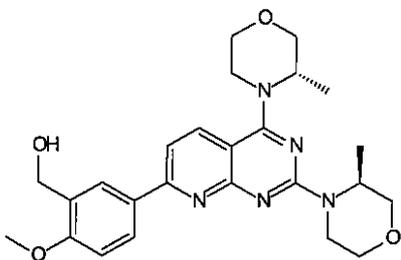
本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
- b) 第2の単位剤形にあるmTOR阻害剤、例えば国際公開WO2008/023161号に開示されているもの、例えば

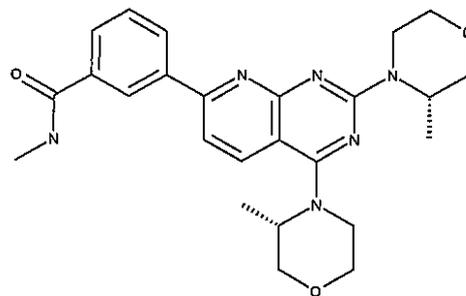
30

【0329】

【化22】



または



40

【0330】

；ならびに

- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段。

【0331】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
  - b) 第2の単位剤形にあるPI3K- の阻害剤、例えば、国際特許出願WO2011/051704号の実施例のいずれか1つ、または薬学的に許容しうるその塩；ならびに
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段。

【0332】

50

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
- b) 第2の単位剤形にあるPI3K- の阻害剤、例えば、国際特許出願WO2011/051704号の実施例のいずれか1つ、または薬学的に許容しうるその塩；
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段；ならびに、所望により
- d) 使用説明書。

【0333】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
- b) 第2の単位剤形にある、8 - ((1R) - 1 - (3, 5 - ジフルオロフェニルアミノ)エチル) - N, N - ジメチル - 2 - モルホリノ - 4 - オキソ - 4H - クロメン - 6 - カルボキサミド (国際特許出願WO2011/051704号の実施例3.06b、AZD8186としても知られる) または薬学的に許容しうるその塩であるPI3K- およびPI3K- の阻害剤；ならびに
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段。

【0334】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
- b) 第2の単位剤形にある、8 - ((1R) - 1 - (3, 5 - ジフルオロフェニルアミノ)エチル) - N, N - ジメチル - 2 - モルホリノ - 4 - オキソ - 4H - クロメン - 6 - カルボキサミド (国際特許出願WO2011/051704号の実施例3.06b、AZD8186としても知られる) または薬学的に許容しうるその塩であるPI3K- およびPI3K- の阻害剤；
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段；ならびに、所望により
- d) 使用説明書。

【0335】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
- b) 第2の単位剤形にある、AKTキナーゼの阻害剤、例えば、(S) - 4 - アミノ - N - (1 - (4 - クロロフェニル) - 3 - ヒドロキシプロピル) - 1 - (7H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 4 - イル)ピペリジン - 4 - カルボキサミドまたは薬学的に許容しうるその塩 (AZD5363、例えば国際公開WO2009/047563号参照)；
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段；ならびに、所望により
- d) 使用説明書。

【0336】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
- b) 第2の単位剤形にある、AKTキナーゼの阻害剤、例えば、(S) - 4 - アミノ - N - (1 - (4 - クロロフェニル) - 3 - ヒドロキシプロピル) - 1 - (7H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 4 - イル)ピペリジン - 4 - カルボキサミドまたは薬学的に許容しうるその塩 (AZD5363、例えば国際公開WO2009/047563号参照)；
- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段。

【0337】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；
- b) 第2の単位剤形にある、AKTキナーゼの阻害剤、例えば、(S) - 4 - アミノ - N - (1 - (4 - クロロフェニル) - 3 - ヒドロキシプロピル) - 1 - (7H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 4 - イル)ピペリジン - 4 - カルボキサミドまたは薬学的に許容しうるその塩 (AZD5363、例えば国際公開WO2009/047563号参照)；

- c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段；ならびに、所望により  
d) 使用説明書。

## 【0338】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；  
b) 第2の単位剤形にある、オラパリブ(4-[3-(4-シクロプロパンカルボニル-  
ピペラジン-1-カルボニル)-4-フルオロ-ベンジル]-2H-フタラジン-1-オン)または薬学的に許容しうるその塩；ならびに  
c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段。

## 【0339】

本発明の他の観点に従って、以下を含むキットを提供する：

- a) 第1の単位剤形にある式(I)の化合物または薬学的に許容しうるその塩；  
b) 第2の単位剤形にある、オラパリブ(4-[3-(4-シクロプロパンカルボニル-  
ピペラジン-1-カルボニル)-4-フルオロ-ベンジル]-2H-フタラジン-1-オン)または薬学的に許容しうるその塩；  
c) 前記第1および第2の剤形を含有するための容器手段；ならびに、所望により  
d) 使用説明書。

## 【0340】

上記組み合わせ、使用、処置方法およびキットのすべてにおいて、AZD5363、AZD8186およびオラパリブは、遊離塩基の形態または薬学的に許容しうる塩の形態にあることができる。したがって、一態様においてAZD5363は遊離塩基の形態にあり；別の態様においてAZD5363は薬学的に許容しうる塩の形態にある。他の態様においてAZD8186は遊離塩基の形態にあり；別の態様においてAZD8186は薬学的に許容しうる塩の形態にある。他の態様においてオラパリブは遊離塩基の形態にあり；別の態様においてオラパリブは薬学的に許容しうる塩の形態にある。

## 【0341】

式(I)の化合物は主に温血動物(ヒトを含む)において用いるための治療薬として有用であるが、それらはまた、PI3キナーゼ-および-の作用を阻害することが必要な場合はつねに有用である。したがって、それらは、新規生物学的試験の開発および新規薬理学的作用物質の探索に用いるための薬理学的標準物質として有用である。

## 【0342】

本明細書中、“組み合わせ”という用語を用いる場合、これは同時、個別または逐次投与をさすことを理解すべきである。本発明の一観点において、“組み合わせ”は同時投与をさす。本発明の他の観点において、“組み合わせ”は個別投与をさす。本発明の別の観点において、“組み合わせ”は逐次投与をさす。投与が逐次投与または個別投与である場合、第2の成分の投与における遅延は、有益な効果が失われないようなものであるべきである。

## 【0343】

一態様において、逐次処置は、組み合わせの各成分を11日の期間以内に投与することを包含する。他の態様において、この期間は10日である。他の態様において、この期間は9日である。他の態様において、この期間は8日である。他の態様において、この期間は7日である。他の態様において、この期間は6日以内である。他の態様において、この期間は5日以内である。他の態様において、この期間は4日以内である。他の態様において、この期間は3日以内である。他の態様において、この期間は2日以内である。他の態様において、この期間は24時間以内である。他の態様において、この期間は12時間以内である。

## 【0344】

本明細書では、逐次投与および同時投与の両方を、BT474モデルにおける実施例3およびAZD5363の組み合わせ実験で実証する。この実施例において、逐次投与は、AZD5363を2日間、続いて実施例3を2日間投与した後、どちらの作用物質も3日

10

20

30

40

50

間投与せず、その後、該パターンを繰り返す（“投与サイクル”）ことにより例示する。同時投与は、A Z D 5 3 6 3 および実施例 3 の両方を 2 日間投与した後、どちらの作用物質も 5 日間投与しない投与計画で例示する。これら 2 つの実施例において、逐次投与は、腫瘍退縮をもたらすのにより有効であると思われ、計画の最適化の潜在的な重要性を例示している。他の考えうる同時投与計画としては、以下が挙げられる：

- 1) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を両方とも 2 日間投与した後、どちらの作用物質も 3 日間投与しない投与サイクル；
- 2) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を両方とも 3 日間投与した後、どちらの作用物質も 4 日間投与しない投与サイクル；
- 3) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を両方とも 4 日間投与した後、どちらの作用物質も 3 日間投与しない投与サイクル；
- 4) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を両方とも 5 日間投与した後、どちらの作用物質も 2 日間投与しない投与サイクル；
- 5) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を 1 日おきに投与する投与サイクル；
- 6) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を 3 日ごとに投与する投与サイクル；
- 7) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を、投与間隔が 3 日および 4 日の週間スケジュール（例えば、月曜日 / 木曜日）で投与する投与サイクル；
- 8) A Z D 5 3 6 3 と実施例 3 を、投与間隔が 2 日および 3 日の週間スケジュール（例えば、月曜日 / 水曜日 / 金曜日）で投与する投与サイクル。

10

20

【0345】

式 (I) の化合物、とりわけ実施例 3 と、m T O R 阻害剤、例えば A Z D 2 0 1 4 または P I 3 K - 阻害剤（ / 阻害剤 A Z D 8 1 8 6 など）の組み合わせは、実施例 3 と A Z D 5 3 6 3 の組み合わせに関し上記したものと同様の計画で、適切に投与することができる。

【0346】

式 (I) の化合物とオラパリブの組み合わせは、オラパリブは毎日投与することができ、式 (I) の化合物は間欠投与スケジュール（例えば、2 日間投与した後、3 ~ 5 日間投与しないなど）に従って投与する。

【0347】

これらの各例示的投与計画は、本発明の他の観点を構成する。これらの各例示的投与計画は、上記 (i) ~ (x i) に挙げた他の抗腫瘍剤との組み合わせに施用することもできる。

30

【0348】

所定の投与サイクル内に、組み合わせの特定の一成分を他に先立ち投与する - すなわち、逐次投与が有利である可能性がある。

【0349】

したがって、一態様において、逐次投与は、投与サイクル内に、式 (I) の化合物（とりわけ実施例 3）の後、上記 (i) ~ (x i) に挙げた他の抗腫瘍剤、とりわけ、A Z D 5 3 6 3、A Z D 8 1 8 6 およびオラパリブから選択される抗腫瘍剤を投与する、逐次投与を含む。

40

【0350】

他の態様において、逐次投与は、投与サイクル内に、上記 (i) ~ (x i) に挙げた抗腫瘍剤、とりわけ、A Z D 5 3 6 3、A Z D 8 1 8 6 およびオラパリブから選択される抗腫瘍剤の後、式 (I) の化合物（とりわけ実施例 3）を投与する、逐次投与を含む。

【0351】

一態様では、上記 (i) ~ (x i) に挙げた抗腫瘍剤および式 (I) の化合物を、最大 2 日間あけて投与する。他の態様では、上記 (i) ~ (x i) に挙げた抗腫瘍剤および式 (I) の化合物を、最大 1 日あけて投与する。他の態様では、上記 (i) ~ (x i) に挙げた抗腫瘍剤および式 (I) の化合物を、最大 1 8 時間あけて投与する。他の態様では、上記 (i) ~ (x i) に挙げた抗腫瘍剤および式 (I) の化合物を、最大 1 2 時間あけて

50

投与する。他の態様では、上記 (i) ~ (xi) に挙げた抗腫瘍剤および式 (I) の化合物を、最大 6 時間あけて投与する。他の態様では、上記 (i) ~ (xi) に挙げた抗腫瘍剤および式 (I) の化合物を、最大 3 時間あけて投与する。

【0352】

他の態様において、投与サイクルは長さが 5 ~ 10 日間であることができる。

【0353】

他の態様において、投与サイクルは長さが 6 ~ 10 日間であることができる。

【0354】

他の態様において、投与サイクルは長さが 7 ~ 9 日間であることができる。

【0355】

他の態様において、投与サイクルは長さが 6 ~ 8 日間であることができる。

【0356】

他の態様において、投与サイクルは長さが 10 日間であることができる。

【0357】

他の態様において、投与サイクルは長さが 9 日間であることができる。

【0358】

他の態様において、投与サイクルは長さが 8 日間であることができる。

【0359】

他の態様において、投与サイクルは長さが 7 日間であることができる。

【0360】

他の態様において、投与サイクルは長さが 6 日間であることができる。

【0361】

他の態様において、投与サイクルは長さが 5 日間であることができる。

【0362】

他の態様において、投与サイクルは、式 (I) の化合物 (とりわけ実施例 3) を連続 2 ~ 4 日間投与し、長さが 6 ~ 9 日間の投与サイクル内の残りの日は投与しないことを包含することができる。

【0363】

他の態様において、投与サイクルは、式 (I) の化合物 (とりわけ実施例 3) を連続 3 ~ 4 日間投与し、長さが 6 ~ 9 日間 (例えば長さ 7 日間) の投与サイクル内の残りの日は投与しないことを包含することができる。

【0364】

他の態様において、投与サイクルは、式 (I) の化合物 (とりわけ実施例 3) を連続 3 ~ 5 日間投与し、長さが 7 ~ 10 日間の投与サイクル内の残りの日は投与しないことを包含することができる。

【0365】

他の態様において、投与サイクルは、式 (I) の化合物 (とりわけ実施例 3) を連続 5 日間投与し、長さが 6 ~ 9 日間の投与サイクル内の残りの日は投与しないことを包含することができる。

【0366】

他の態様において、投与サイクルは、式 (I) の化合物 (とりわけ実施例 3) を連続 4 日間投与し、長さが 6 ~ 9 日間 (例えば長さ 7 日間) の投与サイクル内の残りの日は投与しないことを包含することができる。

【0367】

他の態様において、投与サイクルは、式 (I) の化合物 (とりわけ実施例 3) を連続 3 日間投与し、長さが 6 ~ 9 日間の投与サイクル内の残りの日は投与しないことを包含することができる。

【0368】

投与サイクルは、活性な組み合わせの成分を投与しない数日間により分離されていてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0369】

上記併用療法は、典型的には通常の処方投薬スケジュールに従って実行される標準治療療法に加えることができる。

個別化ヘルスケア

本発明の他の観点は、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ触媒アルファポリペプチド (PIK3CA) をコードする遺伝子の状態と、式 (I) の化合物での処置に対する感受性との関連の確認に基づく。したがって、これは、式 (I) の化合物で処置するための患者、とりわけ癌患者を選択するため、ならびに / または、該処置に治療的に応答する可能性が高くない患者の処置を回避し、これにより、不必要な処置、およびそのような非効果的な処置に付随しうるあらゆる副作用を回避するための、条件、方法およびツールを提供する。

10

## 【0370】

本発明は、患者の選択ツールおよび選択方法 (個別化医療を含む) に関する。選択は、処置しようとする腫瘍細胞が野生型 PIK3CA 遺伝子を持つか変異体 PIK3CA 遺伝子を持つかに基づく。したがって、PIK3CA 遺伝子状態は、PI3K - および - 阻害剤での処置に対する感受性のバイオマーカーとして用いることができる。

## 【0371】

腫瘍が PI3K - および - 阻害剤、例えば式 (I) の化合物での処置に応答する患者をエンリッチ化(enrich)または選択するバイオマーカーが、明らかに必要とされている。作用物質に応答する可能性がもっとも高い患者を識別する患者選択バイオマーカーは、癌の処置に理想的である。これは、応答しない腫瘍を有する患者における、そのような作用物質の潜在的副作用に対する不必要な処置が減少するためである。

20

## 【0372】

バイオマーカーは、“正常な生物学的プロセス、発病プロセス、または治療的介入に対する薬理的応答の指標として客観的に測定および評価される特性”として説明することができる。バイオマーカーは、特定の状態または疾患に関連する識別および測定可能な任意の指標であり、バイオマーカーの存在またはレベルと、状態または疾患のいくつかの観点 (状態または疾患の存在、レベルもしくは変化レベル、タイプ、段階、状態または疾患に対する感受性、あるいは状態または疾患を処置するのに用いられる薬剤に対する応答性を含む) との間には相互関係がある。該相互関係は、定性的、定量的、または定性的および定量的の両方であることができる。典型的には、バイオマーカーは、化合物、化合物フラグメント、または化合物群である。そのような化合物は、生体中に見いだされるか生体により産生される任意の化合物、例えば、タンパク質 (およびペプチド)、核酸および他の化合物であることができる。

30

## 【0373】

バイオマーカーは予測力を有することができ、したがって、特定の状態または疾患の存在、レベル、タイプまたは段階 (特定の微生物または毒素の存在またはレベルを含む)、特定の状態または疾患に対する感受性 (遺伝的感受性を含む)、あるいは特定の処置 (薬物処置を含む) に対する応答を、予測または検出するのに用いることができる。バイオマーカーは、研究開発プログラムの効率を改善することにより、薬物の発見および開発において今後ますます重要な役割を果たすようになると考えられる。バイオマーカーは、診断薬、疾患進行のモニター、処置のモニター、および臨床転帰の予測因子として用いることができる。例えば、さまざまなバイオマーカー研究プロジェクトで、特定の癌ならびに特定の心臓血管疾患および免疫学的疾患のマーカーの識別が試みられている。新規の有効なバイオマーカーの開発により、ヘルスケアおよび薬剤開発のコストの著しい低下、ならびに多種多様な疾患および状態の処置の著しい改善の両方がもたらされると考えられる。

40

## 【0374】

臨床試験を最適に設計し、これらの試験からもっとも多くの情報を得るために、バイオマーカーが必要になる可能性がある。マーカーは、代用組織および腫瘍組織において測定可能であることができる。理想的には、これらのマーカーは効力にも関連し、したがって

50

、最終的に患者の選択に用いることができる。

【0375】

したがって、本発明のこの観点の根底にある技術的問題は、式(I)の化合物で処置するための患者の階層化手段の識別である。該技術的問題は、本明細書中の特許請求の範囲および/または説明で特徴付けられる態様を提供することにより解決される。

【0376】

本明細書中の実施例で詳述するように、PIK3CAに変異を持つ細胞は、一般に式(I)の化合物による成長阻害の影響をより受けやすいことが見いだされた。

【0377】

本発明は、式(I)の化合物に対する細胞の感受性を決定する方法を提供する。該方法は、前記細胞中のPIK3CA遺伝子の状態を決定することを含む。細胞は、該細胞が変異PIK3CA遺伝子を持つ場合、式Iの化合物に対し感受性を示す可能性が高いと識別される。したがって、変異PIK3CA遺伝子を有する患者は、式(I)の化合物での処置の影響をとりわけ受けやすいと予測される。細胞は、細胞成長アッセイにおいて細胞数の増加が式(I)の化合物により阻害される場合(細胞増殖の阻害により、および/または細胞死の増加により)、式(I)の化合物に対し感受性を示すと定義される。本発明の方法は、成長阻害により式(I)の化合物に応答する可能性が高い細胞を予測するのに有用である。

10

【0378】

本発明はさらに、式(I)の化合物を投与するか否かの決定を含め、式(I)の化合物に対する患者の応答性を決定するのに用いることができる方法に、部分的に基づく。具体的には、本発明の方法は、PIK3CAの遺伝子状態の決定を包含する。変異PIK3CA遺伝子の存在は、式(I)の化合物と接触したときに腫瘍細胞が成長阻害により応答する可能性が高いことを示す。したがって、PIK3CA遺伝子状態は、式(I)の化合物で処置するための患者の選択に用いることができる。

20

【0379】

さらに、式(I)の化合物に対し感受性を示す可能性がある患者を識別するための*in vitro*法を開示する。PIK3CA遺伝子の変異状態を検出することができるオリゴ-またはポリヌクレオチドプライマーまたはプローブの使用も開示する。PIK3CA変異の検出用キット、例えば、限定されるものではないが、QiagenおよびRoche Molecular Systemsなどの診断会社により市販されているPIK3CA変異検出キットの使用も開示する。他の態様において、本発明は、癌を患っている患者が式(I)の化合物での薬学的処置に対する応答者である可能性があるか否かを決定するための*in vitro*法に関連する。前記方法は、以下の段階を含む：(i)前記患者から予め収集した腫瘍の代表的試料を得る段階；および(ii)PIK3CA遺伝子が前記試料中に変異を含有するか否かを決定する段階。PIK3CA遺伝子における変異は、式(I)の化合物での処置に応答する可能性の増大を示す。単一遺伝子バイオマーカー試験として、PIK3CA変異を含有する腫瘍の識別は、式(I)の化合物への応答をエンリッチ化する。PIK3CA変異を含有する個々の腫瘍は、式(I)の化合物に応答する可能性がもっとも高い。

30

40

【0380】

“腫瘍の代表的”試料は、単離した実際の腫瘍試料であることができ、または、さらに処理してある試料、例えば、腫瘍試料からのPCR増幅核酸の試料であることができる。定義：

この個別化ヘルスケアの節において：

“アレル”は、特定のヌクレオチドまたはアミノ酸配列により他の形態と区別される、遺伝子座の特定の形態をさす。

【0381】

“増幅反応”は、非標的核酸に対し標的核酸の特異的増幅をもたらす核酸反応である。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、周知の増幅反応である。

50

## 【0382】

“癌”は、本明細書中では、新生物表現型への細胞形質転換により生じる新生物成長をさす。

## 【0383】

“遺伝子”は、プロモーター、エクソン、イントロン、および5'または3'隣接領域内（遺伝子の転写部分内ではなく）に位置することができ発現を制御する他の配列因子を含む、RNA産物の調節された生合成のためのすべての情報を含むDNA断片である。

## 【0384】

“遺伝子状態”は、遺伝子が野生型であるか否か（すなわち変異体）をさす。

10

## 【0385】

“標識”は、アッセイ試料中の標的ポリヌクレオチドの存在を示す検出可能なシグナルを生成することができる組成物をさす。適した標識としては、放射性同位体、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光性分子、化学発光部分、磁性粒子、生物発光部分などが挙げられる。したがって、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出することができる任意の組成物である。

## 【0386】

“非同義バリエーション(variation)”は、別個の（変更された）ポリペプチド配列の生成をもたらす、遺伝子のコード配列における、またはこれと部分的に一致するバリエーション（バリエーション(variance)）をさす。これらのバリエーションは、タンパク質機能に影響を及ぼす可能性があってもなくてもよく、ミスセンスバリエーション（アミノ酸1つが他のものにより置換される）、ナンセンスバリエーション（未成熟終止コドンの発生により短縮型(truncated)ポリペプチドがもたらされる）および挿入/欠損バリエーションを包含する。

20

## 【0387】

“同義バリエーション”は、コードされたポリペプチドの配列に影響を及ぼさない、遺伝子のコード配列におけるバリエーション（バリエーション）をさす。これらのバリエーションは、間接的に（例えば、遺伝子発現の変更により）タンパク質機能に影響を及ぼす可能性があるが、不利な証拠がない場合、一般に無害であると推定される。

## 【0388】

“核酸”は、自然界で見いだされる天然核酸、および/または修飾された主鎖もしくは塩基を有する当分野で公知の人工の修飾核酸を含む、一本鎖または二本鎖のDNAおよびRNA分子をさす。

30

## 【0389】

“プライマー”は、複製しようとする核酸鎖に相補的なプライマー伸長生成物の合成に関し開始点として働くことができる一本鎖DNAオリゴヌクレオチド配列をさす。プライマーの長さおよび配列は、伸長生成物の合成を始動させることができるようなものでなければならない。典型的なプライマーは、標的配列に実質的に相補的で長さが少なくとも約7ヌクレオチドの配列を含有するが、いくぶん長いプライマーが好ましい。通常、プライマーは約15~26ヌクレオチドを含有するが、これより長いまたは短いプライマーを採用することもできる。

40

## 【0390】

“多型部位”は、ある集団において少なくとも2つの代替的配列が見いだされる、座位内の位置である。

## 【0391】

“多型”は、個体の多型部位で観察される配列バリエーションをさす。多型は、ヌクレオチドの置換、挿入、欠失およびマイクロサテライトを包含し、遺伝子発現またはタンパク質機能に、必ずではないが、検出可能な差をもたらす可能性がある。発現またはタンパク質機能に対する作用の証拠がない場合、非同義バリエーションを含む一般的な多型は、一般に、野生型の遺伝子配列の定義に包含されると考えられる。ヒト多型のカタログおよび関連注釈、例えば、パリデーション、観測頻度および疾病関連性は、NCBI (dbSNP

50

: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)により維持されている。遺伝子配列の文脈で用いられる場合の“多型”という用語をは、固体状態の形の化合物の文脈で用いられる場合の“多形”、すなわち化合物の結晶質または非晶質の性質と混同すべきでないことに、留意されたい。当業者なら、文脈により意図する意味を理解するであろう。

【0392】

“プローブ”は、検出しようとするアレルの標的配列に対し正確に相補的な配列を有する、一本鎖配列に特異的なオリゴヌクレオチドをさす。

【0393】

“応答”は、患者を2つの主要群、すなわち、部分的応答または安定な疾患を示す群と、進行性疾患の徴候を示す群とに分類することを包含する、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン(RECIST)に従って決定される測定値により定義される。

10

【0394】

“ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件”は、50%ホルムアミド、5×SSC(750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、および20pg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中、42℃で一晩インキュベートした後、約65℃において0.1×SSC中でフィルターを洗浄することをさす。

【0395】

“生存”は、患者の全生存および無進行生存を包含する。

20

【0396】

“全生存”(OS)は、投薬開始から何らかの原因による死亡までの時間と定義される。“無進行生存”(PFS)は、投薬開始から、進行性疾患の最初の出現または何らかの原因による死亡までの時間と定義される。

【0397】

本発明の一観点に従って、式(I)の化合物で処置するための患者の選択方法であって、該方法が、患者からの腫瘍細胞含有試料を提供し；患者の腫瘍細胞含有試料中のPIK3CA遺伝子が野生型であるか変異体であるかを決定し；そして、それに基づき式(I)の化合物で処置するための患者を選択することを含む、前記選択方法を提供する。

【0398】

該方法は、実際の患者の試料の単離段階を包含することができ、または排除することができる。したがって、本発明の一観点に従って、式(I)の化合物で処置するための患者の選択方法であって、該方法が、患者から予め単離した腫瘍細胞含有試料中のPIK3CA遺伝子が野生型であるか変異体であるかを決定し；そして、それに基づき式(I)の化合物で処置するための患者を選択することを含む、前記選択方法を提供する。

30

【0399】

一態様において、腫瘍細胞のDNAが変異体PIK3CA遺伝子を有する場合、患者を、式(I)の化合物での処置に選択する。他の態様において、腫瘍細胞のDNAが野生型PIK3CA遺伝子を持つ患者は、式(I)の化合物での処置に選択しない。

【0400】

本発明の他の観点に従って、式(I)の化合物に対する患者の応答性を予測するための方法であって、該方法が、患者の腫瘍細胞中のPIK3CA遺伝子が野生型であるか変異体であるかを決定し、それに基づき、式(I)の化合物での処置に対する患者の応答性を予測することを含む、前記方法を提供する。

40

【0401】

本発明の他の観点に従って、癌に罹患しているヒト患者において式Iの化合物での処置の有効性の可能性を決定するための方法であって、患者の腫瘍細胞中のPIK3CA遺伝子(1以上)が野生型であるか変異体であるかを決定し、それに基づき、式(I)の化合物での処置に対する患者の応答性を予測することを含む、前記方法を提供する。

【0402】

50

本発明の目的に関し、野生型の遺伝子状態は、遺伝子が正常または適切に発現し、コードされたタンパク質の機能が正常であることを示すものとする。対照的に、変異体状態は、遺伝子発現が異常もしくは不適切であるか、または、癌における変異体 P I K 3 C A の公知の役割（上記のような）と一致する、変更された機能を有するタンパク質が発現していることを示すものとする。いくつもの遺伝子的または非遺伝子的な変更、例えば、限定されるものではないが、変異、増幅、欠失、ゲノム再編成、またはメチル化プロファイルにおける変化が、変異体状態をもたらす可能性がある。しかしながら、そのような変更が、それでもなお正常なタンパク質の適切な発現または機能的に同等の変異体をもたらす場合、その遺伝子状態は野生型とみなす。機能的変異体遺伝子状態を典型的にはもたらさない変異体の例としては、同義コード変異体および一般的多型（同義または非同義）が挙げられる。以下で検討するように、遺伝子状態は、機能性アッセイにより評価することができ、または、検出された参照配列からの逸脱の性質から推察することができる。

10

## 【0403】

特定の態様において、P I K 3 C A 遺伝子の野生型または変異体の状態は、遺伝子中に非同義核酸バリエーションが存在するか存在しないかにより決定される。観察される非同義バリエーションは、注釈付きの機能効果のない公知の一般的な多型に対応する場合、変異体の遺伝子状態に寄与しない。

## 【0404】

変異状態を示す P I K 3 C A 遺伝子における他のバリエーションは、pre-mRNA から mRNA への処理中のイントロン/エクソン接合部の認識を低下させる、スプライス部位のバリエーションを包含する。これは、エクソンのスキッピング、またはスプライシングされた mRNA における正常なイントロン配列の包含（イントロン保持または隠蔽された (cryptic) スプライス接合部の利用）をもたらす可能性がある。同様に、これは、正常なタンパク質と比べ挿入および/または欠失を有する異常なタンパク質の生成をもたらす可能性がある。したがって、他の態様において、遺伝子は、イントロン/エクソン接合部におけるスプライス部位認識配列を変更するバリエーションが存在する場合、変異体状態を有する。

20

## 【0405】

これに加えて、異常または脱調節された P I K 3 C A または P I 3 K - を有する腫瘍における耐性の潜在的マーカーである K r a s などの追加的遺伝子の変異状態または活性化状態の測定は、個別化医療アプローチの予測性の向上に役立つ可能性がある。

30

## 【0406】

われわれが A s t r a Z e n e c a で行った乳癌に関する調査（C O S M I C データベース（W e l c o m e T r u s t S a n g e r I n s t i t u t e、2011年9月）に基づく）では、P I K 3 C A 遺伝子における > 55 の異なる変異が、> 5 K のヒト腫瘍を対象とするデータセットから識別された。変異の大部分は < 1% の頻度で発生し、3 つは 1 ~ 3% の頻度で発生したが、4 つの変異は P I K 3 C A の全変異の約 88% を占めた。これらは、C 末端キナーゼドメイン、すなわち H 1 0 4 7 R (55%) および H 1 0 4 7 L (5%)、ならびにヘリカルドメイン残留物、すなわち E 5 4 5 K (18%) および E 5 4 2 K (11%) における、キナーゼドメインのミスセンス変異であった。他の一般的な乳癌変異のより長いリストは、網羅的なわけではないが、R 3 8 H、R 3 8 C、R 8 8 Q、N 3 4 5 K、C 4 2 0 R、E 4 5 3 Q、P 5 3 9 R、E 5 4 2 K、E 5 4 5 K、E 5 4 5 A、Q 5 4 6 K、Q 5 4 6 P、M 1 0 4 3 I、M 1 0 4 3 V、H 1 0 4 7 R、H 1 0 4 7 L、H 1 0 4 7 Y を包含する。したがって、もっとも一般的な変異の検出に焦点を合わせ、これにより大部分の P I K 3 C A 変異の識別を可能にする診断アッセイを、構築することができる。例えば、R o c h e M o l e c u l a r S y s t e m s からの C o b a s (T M) P I K 3 C A 変異試験は、ホルマリンで固定しパラフィンで包埋した腫瘍試料から単離した DNA 中の P I K 3 C A 遺伝子のエクソン 1、4、7、9 および 20 における 17 の変異（E 5 4 2 K、E 5 4 5 A、E 5 4 5 G、E 5 4 5 K、E 5 4 5 D、E 5 4 6 K、Q 5 4 6 R、Q 5 4 6 E、Q 5 4 6 L、N 3 4 5 K、C 4 2 0 R、R

40

50

88Q、H1047L、H1047R、H1047Y、G1049RおよびM1043I)を検出するように設計されている。このキットは、エストロゲン受容体陽性乳癌における変異の最高約95%を捕捉することができる。変異の分布は他の腫瘍タイプでは異なり、それに応じて診断上の戦略を適応させることができる。例えば、子宮内膜癌では、乳癌と比べ、より均一な変異の分布がPIK3CA遺伝子コード配列の全体に広がり、より多数の変異がタンパク質のN末端領域にみられる(Douglas A. Levine, M.D.による情報、TCGA 2nd Annual Symposium, 2012年12月28日)。

#### 【0407】

PIK3CAの場合、参照配列は、遺伝子(GenBankアクセッション番号:NG\_\_012113)、mRNA(GenBankアクセッション番号:NM\_\_006218)、およびタンパク質(GenBankアクセッション番号:NP\_\_006209またはSwiss-Protアクセッション:P42336)で使用可能である。参照遺伝子(ゲノム領域)配列は、上流配列の5000塩基および下流配列の2000塩基を包含する。PIK3CA内での変異は周知であり(COSMICデータベース-Wellcome Trust Sanger Institute)、当業者なら、PIK3CAの遺伝子状態、すなわち、特定のPIK3CA遺伝子が野生型であるか変異体であるかを、野生型のDNAまたはタンパク質配列との比較に基づき決定することができる。

#### 【0408】

PIK3CAについて開示されている遺伝子およびmRNA配列ならびにPI3キナーゼアルファタンパク質配列のp110触媒サブユニットは、それぞれ代表的な配列であることは明らかであろう。正常な個体では、各遺伝子の2つの複製、すなわち母方および父方の複製が存在し、これらが配列の差異をいくらか有すると思われ、さらに個体群内では、遺伝子配列のアレルバリエーションが非常に多く存在する。野生型とみなされる他の配列としては、核酸配列に1以上の同義変化をもつもの(この変化は、コードされたタンパク質配列を変更しない)、タンパク質配列を変更するがタンパク質機能には影響を及ぼさない一般的な非同義多型(例えば、生殖細胞株多型)、およびイントロン非スプライス部位の配列変化が挙げられる。

#### 【0409】

本発明の他の観点に従って、癌に罹患しているヒト患者において式(I)の化合物での処置の有効性の可能性を決定するための方法であって、前記患者のPIK3CA遺伝子中に野生型と比べて少なくとも1つの非同義核酸バリエーションが存在するか存在しないかを検出することを含む方法を提供する。これに関し、PIK3CA遺伝子における少なくとも1つの体細胞非同義核酸バリエーションの存在は、式(I)の化合物での処置が有効である可能性があることを示す。

#### 【0410】

本発明の他の観点に従って、式(I)の化合物での処置に対する個体の感受性を評価するための方法を提供する。これに関し、該方法は、

(i) 個体からの腫瘍細胞DNA中のPIK3CA遺伝子の非同義変異状態を決定し;そして、

(ii) 腫瘍細胞中のPIK3CA遺伝子の非同義変異状態を参照することにより、式(I)の化合物での処置に対する個体の推定感受性を決定する、ことを含む。

#### 【0411】

PIK3CAの遺伝子状態を決定するために当業者が利用することができる技術は数多くある。遺伝子状態は、核酸配列の決定により決定することができる。これは、全長遺伝子の直接的配列決定または遺伝子内の特定部位、例えば、一般に変異部位の分析により行うことができる。

#### 【0412】

PIK3CA遺伝子が野生型または変異体であるか否かを決定するための他の手段は、

10

20

30

40

50

転写遺伝子の機能の評価である。このPIK3CA遺伝子の機能的変異は、脂質キナーゼ活性が向上したタンパク質をもたらして、細胞における経路の下流でのシグナル伝達の増大、例えば、限定されるものではないが、AktおよびS6キナーゼの活性化をもたらす。細胞中に発現した場合にPIK3CAパリアントの機能状態を評価するためのアッセイとしては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：

- (i) PIK3CA遺伝子、ホスファチジルイノシトール - 三リン酸 (PI(3, 4, 5)P3)のキナーゼ活性の生成物の生成の増大；
- (ii) リン酸化AktまたはS6キナーゼのレベルの増大；
- (iii) PIK3CAのパリアントをトランスフェクトしたNIH-3T3細胞のフォーカスおよびコロニー形成性の増大；(Ikenoue T et al., Cancer Res., 2005, 65, 4562 - 4567)。

10

#### 試料

遺伝子状態を試験する患者の試料は、個体から得た、または得ることができる、任意の腫瘍組織または腫瘍細胞含有試料であることができる。試験試料は、個体から得た血液、口腔スワブ、生検材料、または他の体液もしくは体組織の試料であると好都合である。特定の実施例は以下を包含する：循環腫瘍細胞、血漿もしくは血清中の循環DNA、卵巣癌患者の腹水から単離した細胞、肺内に腫瘍を有する患者の肺喀痰、乳癌患者からの細針吸引物、尿、末梢血、細胞剥離物、毛嚢、皮膚穿刺物または類試料。

#### 【0413】

試験試料は、同等に、試験試料中の配列に対応する核酸配列であることができる、すなわち、核酸試料中の領域のすべてまたは一部を、最初に任意の従来技術、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅してから分析することができることは、理解されるであろう。核酸は、ゲノムDNAまたは断片化もしくは全細胞RNAであることができる。特定の態様において、RNAは全細胞RNAであり、ランダムプライマーまたはポリAプライマーを用いて第1鎖cDNAを標識するための鋳型として直接用いられる。試験試料中の核酸またはタンパク質は、標準的手順に従って試料から抽出することができる(Green & Sambrook 編集, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 第4版, 1~3巻, ISBN 9781936113422)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 参照)。

20

30

#### 【0414】

本発明の診断方法は、個体または患者から予め採取しておいた試料を用いて開始することができる。そのような試料は、凍結させるか、ホルマリン - パラフィンもしくは他の媒体に固定し包埋することにより、保存することができる。あるいは、新しい腫瘍細胞含有試料を入手して用いてもよい。

#### 【0415】

本発明の方法は、任意の腫瘍からの細胞を用いて施用することができる。式(I)の化合物での処置に適した腫瘍については、本明細書中で先に記載している。

#### 【0416】

PIK3CAの変異は臨床腫瘍において広く見いだされるが、各遺伝子の変異出現率は、腫瘍組織のタイプにより著しく変動する。例えば、PIK3CA変異は乳癌では比較的一般的であるが、腎腫瘍では比較的まれである。

40

#### 【0417】

【表 2】

表 1.

組織	PIK3CA 変異出現率 (%)
陰茎	29
子宮内膜	26
乳房	26
小腸	20
尿路	17
皮膚	13
大腸	12
胃	9
胆管	9
卵巢	9
子宮頸部	8
食道	6
肝臓	6
上気道消化管	6
CNS	5
NS	5
肺	4
甲状腺	4
下垂体	3
軟組織	3
膵臓	3
腎臓	2
前立腺	2
髄膜	1
眼	1

10

20

30

40

【表 3】

自立神経節	1
造血組織／リンパ組織	1
副腎	0
骨	0
卵管	0
胃腸管（部位は不確定）	0
腹膜	0
唾液腺	0
精巣	0
胸腺	0
膣	0

10

20

表 1：臨床試料における P I K 3 C A 変異の出現率。P I K 3 C A の情報源は COSMIC データベース（公開 v 6 2）である。本発明の患者選択方法は、P I K 3 C A 変異の発生率が高い疾患（組織）部分（例えば、乳房、尿路、子宮内膜、大腸、子宮頸部など）にとりわけ有用であることができる。

## 【 0 4 1 9 】

当業者には明らかになるように、この頻度データは、TCGA (The Cancer Genoma Atlas) および ICGC (International Cancer Genome Consortium) などのヒト癌ゲノムプロファイリングコンソーシアムから新規およびより包括的なデータが出ると、継続的に改善および更新される。したがって、P I K 3 C A 依存性の追加的な腫瘍タイプを識別し、本明細書中に記載する化合物での処置に望ましいとすることができる。

30

## 核酸の検出方法

本発明の状況では、変異体 P I K 3 C A 核酸の検出を採用して薬物処置に対する応答を予測することができる。これらの遺伝子の変異は DNA レベルで起こるので、本発明の方法は、ゲノム DNA における変異またはバリエーション、ならびに転写産物およびタンパク質自体の検出に基づくことができる。検出した変異が実際に被検体に発現していることを保証するために、転写産物および/またはポリペプチドの分析によりゲノム DNA の変異を確認することが望ましい可能性がある。

40

## 【 0 4 2 0 】

遺伝子の 1 以上の位置にバリエーションヌクレオチドが存在するか存在しないかを検出するために用いることができる分析手順は非常に多くあることが、当業者には明らかであろう。一般に、アレルバリエーションの検出は、変異判別技術、所望により増幅反応（ポリメラーゼ連鎖反応に基づくものなど）および所望によりシグナル発生システムを必要とする。当分野で利用可能な変異検出技術は数多くあり、これらは、当分野で利用可能なものが多数あるシグナル発生システムと組み合わせる用いることができる。アレルバリエーションを検出するための多くの方法が、Nollau et al., Clin. Chem., 1997, 43, 1114 - 1120; Anderson SM. Expert Rev Mol Diagn., 2011, 11, 635 - 642; Meyerson M.

50

et al., Nat Rev Genet., 2010, 11, 685 - 696 により ; ならびに、標準的教科書、例えば “Laboratory Protocols for Mutation Detection”, U. Landegren 編集, Oxford University Press, 1996 および “PCR”, Newton & Graham による第二版, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997 に、概説されている。

#### 【0421】

上記のように、癌を有する患者の PIK3CA 遺伝子に特定のバリエーションまたは複数のバリエーションが存在するか存在しないかの決定は、さまざまな方法で実施することができる。そのような試験は、一般に、生物学的試料、例えば、組織生検材料、尿、便、喀痰、血液、細胞、組織剥離物、胸部吸引物または他の細胞材料から収集した DNA または RNA を用いて実施し、さまざまな方法、例えば、限定されるものではないが、PCR、アレルト異性プローブを用いるハイブリダイゼーション、酵素変異検出、ミスマッチの化学開裂、質量分析法、またはミニ配列決定を含む DNA 塩基配列決定法により、実施することができる。

10

#### 【0422】

適した変異検出技術としては、増幅不応性変異システム (amplification refractory mutation system) (ARMS<sup>TM</sup>)、増幅不応性変異システム線形延長 (ALEX<sup>TM</sup>)、競合的オリゴヌクレオチドプライミングシステム (COPS)、Taqman、Molecular Beacon、制限断片長多型 (RFLP)、ならびに制限部位に基づく PCR および蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 技術が挙げられる。

20

#### 【0423】

特定の態様において、バイオマーカー遺伝子内のヌクレオチド (1 以上) を決定するために採用される方法は、以下から選択される：アレルト異性増幅 (アレルト異性 PCR) - 例えば、増幅不応性変異システム (ARMS)、配列決定、アレルト判別アッセイ、ハイブリダイゼーション、制限断片長多型 (RFLP) またはオリゴヌクレオチド連結反応アッセイ (OLA)。

#### 【0424】

特定の態様において、アレルト異性プローブを用いるハイブリダイゼーションは、以下により行うことができる：(1) 例えば多くの DNA チップでの施用のように、溶液中の標識試料と一緒に固相 (例えば、ガラス、シリコン、ナイロン膜) に結合しているアレルト異性オリゴヌクレオチド ; または (2) 結合試料 (クローン化 DNA または PCR 増幅 DNA であることが多い) および溶液中の標識オリゴヌクレオチド (アレルト異性であるか、ハイブリダイゼーションによる配列決定が可能になるように短い)。診断試験は、固体支持体上にあることが多いバリエーションのパネルを包含することができ、該パネルにより、1 より多くのバリエーションを同時に決定することが可能になる。そのようなハイブリダイゼーションプローブは、当分野で周知であり (例えば、Green & Sambrook 編集, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012 年, 第 4 版, Vol. 1 - 3, ISBN 9781936113422)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)、2 以上のバリエーション部位に及ぶことができる。

30

40

#### 【0425】

したがって、一態様において、少なくとも 1 つの変異が存在するか存在しないかの検出は、推定変異部位を含有する PIK3CA 核酸を、少なくとも 1 つの核酸プローブと接触させることを提供する。バリエーション部位を包含し、該バリエーション部位に相補的ヌクレオチド塩基を含有する核酸配列と、プローブは、選択的ハイブリダイゼーション条件下で優先的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションは、当業者に公知の標識を用いて、検出可能な標識で検出することができる。そのような標識としては、限定されるものではないが、放射性標識、蛍光標識、染料標識および酵素標識が挙げられる。

50

## 【0426】

他の態様において、少なくとも1つの変異が存在するか存在しないかの検出は、推定変異部位を含有するPIK3CA核酸を、少なくとも1つの核酸プライマーと接触させることを提供する。パリアンス部位を包含し、該パリアンス部位に相補的ヌクレオチド塩基を含有する核酸配列と、プライマーは、選択的ハイブリダイゼーション条件下で優先的にハイブリダイズする。

## 【0427】

特異的増幅のためのプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において(これにより、増幅は示差的ハイブリダイゼーションに依存する;例えば、Gibbs, et al., 1989, Nucl. Acids Res., 17, 2437-248参照)、または、適切な条件下でミスマッチがポリメラーゼ伸長を抑えるか減少させることができる、1つのプライマーの3'最末端(extreme 3'-terminus)において(例えば、Prossner, 1993, Tibtech, 11, 238参照)、相補的ヌクレオチド塩基を対象となる変異に進めることができる。

10

## 【0428】

さらに他の態様において、少なくとも1つの変異が存在するか存在しないかの検出は、少なくとも1つの核酸配列を配列決定し、得られた配列を公知の野生型核酸配列と比較することを含む。

## 【0429】

あるいは、少なくとも1つの変異が存在するか存在しないかは、少なくとも1つの核酸配列の質量分光測定を含む。

20

## 【0430】

一態様において、少なくとも1つの核酸パリアンスが存在するか存在しないかの検出は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の実施を含む。仮定的パリアンスを含有する標的核酸配列を増幅し、増幅核酸のヌクレオチド配列を決定する。増幅核酸のヌクレオチド配列の決定は、少なくとも1つの核酸セグメントの配列決定を含む。あるいは、増幅産物をサイズに従って分離することができる任意の方法、例えば、自動および手動でのゲル電気泳動法などを用いて、増幅産物を分析することができる。

## 【0431】

ゲノム核酸における変位は、増幅核酸断片の移動度シフトに基づく技術により有利に検出される。例えば、Chen et al., Anal Biochem 1996, 239, 61-9には、競合的移動度シフトアッセイによる単一塩基変異の検出が記載されている。さらに、Marcelino et al., BioTechniques 1999, 26, 1134-1148の技術に基づくアッセイは、商業的に利用可能である。

30

## 【0432】

特定の例では、キャピラリーヘテロ二本鎖分析を用いて、ミスマッチの存在の結果として、キャピラリー系における二本鎖核酸の移動度シフトに基づき、変異の存在を検出することができる。

## 【0433】

試料からの分析用核酸の生成には、一般に核酸増幅が必要である。多くの増幅方法は、酵素連鎖反応(ポリメラーゼ連鎖反応、リカーゼ連鎖反応、または自立配列複製など)に依存するか、それがクローニングされているベクターのすべてまたは一部の複製に由来する。好ましくは、本発明に従った増幅は、例えばポリメラーゼ連鎖反応により示されるような、指数関数的増幅である。

40

## 【0434】

多くの標的およびシグナル増幅方法が文献に記載されており、例えば、Landegren, U., et al., Science, 1988, 242, 229-237およびLewis, R., Genetic Engineering News 1990, 10, 54-55には、これらの方法の一般的概説が記載されている。これらの増幅方法は

50

、われわれの発明の方法に用いることができ、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、*in situ* PCR、リガーゼ増幅反応（LAR）、リガーゼハイブリダイゼーション、Qバクテリオファージレプリカーゼ、転写に基づく増幅システム（TAS）、転写産物配列決定を伴うゲノム増幅（GAWTS）、核酸配列に基づく増幅（NASBA）、および *in situ* ハイブリダイゼーションを包含する。さまざまな増幅技術に用いるのに適したプライマーは、当分野で公知の方法に従って調製することができる。

【0435】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）PCRは、とりわけ米国特許公報第4683195号および第4683202号に記載されている核酸増幅方法である。PCRは、DNAポリメラーゼが引き起こすプライマー伸長反応の繰り返しサイクルからなる。標的DNAを熱変性し、増幅しようとするDNAの逆鎖の標的配列を挟む2つのオリゴヌクレオチドをハイブリダイズする。これらのオリゴヌクレオチドが、DNAポリメラーゼと一緒に用いるためのプライマーになる。プライマー伸長によりDNAが複製されて、両方の鎖の第2の複製が作られる。熱変性、プライマーのハイブリダイゼーション、および伸長のサイクルを繰り返すことにより、標的DNAを約2～4時間で100万倍以上に増幅することができる。PCRは、増幅結果を決定するための検出技術と併せて用いなければならない分子生物学的ツールである。PCRの利点は、それが、約4時間で標的DNAの量を100万から10億倍に増幅することにより感度を向上させる点である。PCRは、診断の状況であらゆる公知の核酸を増幅するのに用いることができる（Mok et al., Gynaecologic Oncology, 1994, 52: 247-252）。

10

20

【0436】

増幅不応性変異システム（ARMS<sup>TM</sup>）などのアレル特異性増幅技術（Newton et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 2503-2516）も、単一塩基変異の検出に用いることができる。適したPCR増幅条件下において、プライマーの3'末端に位置する単一塩基ミスマッチは、完全にマッチしたアレルの優先的増幅に十分であり（Newton et al., 1989, supra）、近縁種の判別が可能になる。上記プライマーを用いる増幅システムの基礎は、3'残基がミスマッチしているオリゴヌクレオチドが、適切な条件下でのPCRにおいてプライマーとして機能しないということである。この増幅システムにより、アガロースゲル電気泳動後の反応混合物の検査のみによる遺伝子型決定が可能になる。

30

【0437】

増幅産物の分析は、増幅産物をサイズに従って分離することができる任意の方法、例えば、自動および手動でのゲル電気泳動法、質量分析法などを用いて、実施することができる。

【0438】

核酸の単離、増幅および分析の方法は当業者にとって日常的なものであり、プロトコルの例は、例えば、Green & Sambrook編集、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 第4版, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)に見いだすことができる。PCR増幅に用いられる方法にとりわけ有用なプロトコル源は、M. J. McPherson, S. G. Mailer, P. Beynon, C. HoweによるPCR (Basics: From Background to Bench), Springer Verlag; 第1版(2000年10月15日), ISBN: 0387916008である。

40

【0439】

本発明はまた、PIK3CA遺伝子中の標的核酸を増幅するための縮重プライマーと、増幅プロトコルおよび結果の分析を含む使用説明書とを含む、予測的および診断的なキットを提供する。あるいは、該キットは、増幅産物の増幅および分析を実施するための緩衝液、酵素、および容器も含むことができる。該キットは、スクリーニングの構成要素、ま

50

たはDNAマイクロアレイなどの他のツールもしくは他の支持体を含む診断キットであることもできる。好ましくは、該キットは、1以上の対照鋳型、例えば、正常な組織試料および/または参照遺伝子にさまざまなバリエーションを示す一連の試料から単離した核酸も提供する。

【0440】

一態様において、該キットは、2以上のプライマー対を提供する。これに関し、各対は参照(P I K 3 C A)遺伝子の異なる領域を増幅することができ(各領域は潜在的バリエーションの部位である)、これにより、1つの反応またはいくつかの並列反応での生物学的試料におけるいくつかの遺伝子バリエーションの発現を分析するためのキットがもたらされる。

【0441】

キット中のプライマーは、増幅産物の検出および核酸バリエーションの必然的な分析を促進するために、標識、例えば蛍光標識されていてもよい。また、該キットにより、1より多くのバリエーションを1つの分析で検出することが可能になる。したがって、組み合わせキットは、参照遺伝子の異なるセグメントを増幅することができるプライマーを含む。プライマーは、バリエーションが差別化されるように、例えば異なる蛍光標識を用いて、異なった形で標識することができる。

【0442】

P I K 3 C A 変異の検出用キット、例えば、限定されるものではないが、Q i a g e n およびR o c h e M o l e c u l a r S y s t e m s などの診断会社により市販されているP I K 3 C A 変異検出キットの使用も開示する。

【0443】

他の観点において、本発明は、以下を含む、癌を患っている患者の処置方法を提供する：患者の腫瘍細胞中のP I K 3 C A 遺伝子の変異体状態であるか野生型状態であるかを決定し、P I K 3 C A 遺伝子の変異体である場合、患者に有効量の式(I)の化合物を投与する。

【0444】

本明細書中で用いる場合、“有効な”および“有効性”という用語は、薬理的有効性と生理学的安全性の両方を包含する。薬理的有効性は、処置が、患者に望ましい生物学的効果をもたらす能力をさす。生理学的安全性は、処置の投与に起因する毒性のレベル、または細胞、臓器および/もしくは生命体レベルでの他の有害な生理学的作用(しばしば副作用とよばれる)をさす。“より低い有効性”は、処置が、治療的に著しくより低いレベルの薬理的有効性および/または治療的により高いレベルの有害な生理学的作用をもたらすことを意味する。

【0445】

本発明の他の観点に従って、腫瘍細胞が変異体P I K 3 C A 遺伝子を持つと確認されている癌患者を処置するための、式(I)の化合物の使用を提供する。

【0446】

本発明の他の観点に従って、変異体P I K 3 C A 遺伝子を持つと確認されている腫瘍細胞を有する癌を処置するための式(I)の化合物を提供する。

【0447】

さらに他の態様において、本発明は、変異体P I K 3 C A 遺伝子を持つと確認されている腫瘍細胞を有する癌の予防および処置に用いるための、式(I)の化合物を含む医薬組成物に関する。

【0448】

上記観点のすべてに関し、決定/確認されたP I K 3 C A の変異体形態は、遺伝子全体のすべての位置に存在する。

【0449】

上記観点のすべてに関し、一例として乳癌などの腫瘍を用いる場合、決定/確認されたP I K 3 C A の特定の変異体形態は、R 3 8、R 8 8、N 3 4 5、C 4 2 0、E 4 5 3、P 5 3 9、E 5 4 2 K、E 5 4 5 K、Q 5 4 6、M 1 0 4 3、M 1 0 4 3 およびH 1 0 4

10

20

30

40

50

7 R の位置にあるものである。

#### 【0450】

上記観点のすべてに関し、一例として乳癌などの腫瘍を用いる場合、決定/確認された P I K 3 C A の特定の変異形態は、E 5 4 2、E 5 4 5 および H 1 0 4 7 の位置にあるものである。

#### 個別化ヘルスケア/個別化医療の例

##### 腫瘍細胞株における細胞増殖アッセイ

化合物の作用に対するヒト癌細胞株パネルの感受性を、標準的な増殖アッセイで決定した。アッセイプロトコルの詳細は、上記生物学的アッセイ (g) に記録している。

##### 変異の相関分析

##### 方法

実施例 3 での処置に応答した細胞成長阻害を測定する薬理学データを、さまざまな組織および多数の供給源からの 209 個の癌細胞株のコレクション (collection) について得た。各細胞株を、感受性 ( $GI_{50} \leq 1.0 \mu M$ ) または耐性 ( $GI_{50} > 1.0 \mu M$ ) として分類した。

#### 【0451】

各細胞株の遺伝子の変異状態は、内部 (AstraZeneca) および公共の情報源からの結果を統合することにより得た。公共のデータは、Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Project リリース 3 (Garrett MJ, et al. Nature, 2012, Mar 483, 570-5)、Cancer Cell Line Encyclopedia プロジェクト (Barretina J, et al., Nature 2012, 483, 603-7) および Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) データベース (リリース v61; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>; Forbes SA, et al. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (データベース発行): D945-50; Forbes SA, et al. Curr Protocol Hum Genet. 2008; 10 章: 単元 10.11.)、および選択した学術論文からの全細胞株データを包含していた。サイレントコーディング領域変異 (同義バリエーション) および非同義多型は除外し、この分析の目的に関し、変異の接合性は無視した。細胞株と遺伝子の各組み合わせについて、状態を、変異体 (MUT)、野生型 (WT)、または不一致 (INCON) としてまとめた。最初に不一致であったいくつかの例 (同じ細胞株の同じ遺伝子に関する独立した WT および MUT の観察) は、内部観察結果および COSMIC の Cancer Cell Line Project (CCLP) サブセットの観察結果に加重するか、マニュアルレビュー (manual review) 後に状態を選択することにより解決した。不一致の観察結果を解決することができなかった場合、INCON 標識を保持し、分析中の遺伝子状態は未知とみなした。

#### 【0452】

変異状態と応答との関連を、各遺伝子について分割表を構築し、対応するオッズ比およびフィッシャーの正確確率検定の両側検定 p 値を決定することにより確認した。応答に不十分と分類された細胞株は初期分析から除外して、対象となるバイオマーカーを識別した。変異状態に関し、MUT または WT 所見を計数し、4 未満の WT または 4 未満の MUT を有する遺伝子の細胞株も排除した。

##### 結果および考察

変異状態と応答との関連を、方法に記載したように確認した。実施例 3 に対する細胞株の応答と、これに対応する P I K 3 C A 遺伝子の遺伝子状態を表 3 に示す。

#### 【0453】

10

20

30

40

【表4】

表3. 本試験で用いた細胞株のPIK3CA遺伝子の薬理学データ、応答分類および変異状態。

細胞株	カテゴリー	組織	GI50 $\mu$ M	PIK3CA
RS411	感受性	血液/リンパ液	9.03E-02	WT
T47D	感受性	乳房	0.1982	MUT
H596	感受性	肺	0.3018	MUT
MCF7	感受性	乳房	0.3094	MUT
MV411	感受性	血液/リンパ液	0.3816	WT
HRA19	感受性	直腸	0.3926	MUT
IM95M	感受性	胃	0.4359	MUT
MDAMB453	感受性	乳房	0.4564	MUT
JEK01	感受性	血液/リンパ液	0.4994	WT
SNU601	感受性	胃	0.5063	MUT
HCC1187	感受性	乳房	0.5088	WT
SW48	感受性	結腸	0.5131	MUT
H1703	感受性	肺	0.5144	WT
THP1	感受性	血液/リンパ液	0.5281	WT
LK2	感受性	肺	0.5884	WT
HUPT4	感受性	膵臓	0.6408	WT
L363	感受性	血液/リンパ液	0.6812	MUT
TCCSUP	感受性	膀胱	0.7237	MUT
VMCUB1	感受性	膀胱	0.7319	MUT
RERFLCSQ1	感受性	肺	0.7711	MUT
HCC1419	感受性	乳房	0.7799	WT
LNCAPCASRES	感受性	前立腺	0.7924	WT
CCK81	感受性	結腸	0.8031	MUT
HCC1954	感受性	乳房	0.8794	MUT
SW948	感受性	結腸	0.9111	MUT

10

20

30

40

【0454】

【表 5】

PANC0203	感受性	膵臓	0.9628	WT
BFTC905	感受性	膀胱	0.9662	WT
REH	耐性	血液／リンパ液	1.047	WT
SNU216	耐性	胃	1.072	WT
SKC01	耐性	結腸	1.128	WT
SUM52PE	耐性	乳房	1.145	WT
RT11284	耐性	膀胱	1.171	WT
OVCAR3	耐性	卵巣	1.179	WT
MOLM13	耐性	血液／リンパ液	1.22	WT
C99	耐性	結腸	1.224	WT
CALU3	耐性	肺	1.296	WT
N87	耐性	胃	1.301	WT
2313287	耐性	胃	1.339	WT
PAMC82	耐性	胃	1.366	WT
HCC1569	耐性	乳房	1.369	WT
AGS	耐性	胃	1.414	MUT
JIMT1	耐性	乳房	1.46	MUT
HGC27	耐性	胃	1.501	MUT
MKN1	耐性	胃	1.579	MUT
SKBR3	耐性	乳房	1.588	WT
SNU368	耐性	肝臓	1.597	WT
PANC89	耐性	膵臓	1.618	WT
ASPC1	耐性	膵臓	1.74	WT
SNU484	耐性	胃	1.785	WT
H2085	耐性	肺	1.835	WT
HARA	耐性	肺	1.906	WT
AZ521	耐性	十二指腸	2.063	WT

【表 6】

HPAC	耐性	膵臓	2.162	WT
NOMO1	耐性	血液／リンパ液	2.167	WT
PNT1A	耐性	前立腺	2.17	WT
H1975	耐性	肺	2.262	MUT
OCUM1	耐性	胃	2.332	WT
BT20	耐性	乳房	2.36	MUT
HCT8	耐性	結腸	2.51	MUT
COLO320DM	耐性	結腸	2.512	WT
PANC1005	耐性	膵臓	2.607	WT
SW403	耐性	結腸	2.61	MUT
MONOMAC6	耐性	血液／リンパ液	2.622	WT
HPAFII	耐性	膵臓	2.63	WT
HT1197	耐性	膀胱	2.8	MUT
LNCAPCLONEFGC	耐性	前立腺	3.007	WT
HCC95	耐性	肺	3.107	WT
SNU620	耐性	胃	3.144	WT
MOLP8	耐性	血液／リンパ液	3.289	WT
H2291	耐性	肺	3.291	WT
DMS114	耐性	肺	3.294	WT
MHCC97L	耐性	肝臓	3.353	WT
CFPAC1	耐性	膵臓	3.384	WT
HS766T	耐性	膵臓	3.467	WT
ZR751	耐性	乳房	3.558	WT
PC3	耐性	前立腺	3.833	WT
22RV1	耐性	前立腺	4.144	MUT
RK0	耐性	結腸	4.323	MUT
977	耐性	膀胱	4.42	WT

10

20

30

40

【表 7】

MOLM16	耐性	血液／リンパ液	4.601	WT	
H358	耐性	肺	4.642	WT	
LUDLU1	耐性	肺	4.646	WT	
QGP1	耐性	膵臓	4.865	WT	
OE19	耐性	食道	5.129	WT	10
SW1710	耐性	膀胱	5.339	WT	
PANC1	耐性	膵臓	5.344	WT	
SNU449	耐性	肝臓	5.41	WT	
647V	耐性	膀胱	5.464	WT	
HT29	耐性	結腸	5.483	MUT	
SNU354	耐性	肝臓	5.604	WT	20
HS746T	耐性	胃	5.978	WT	
H1869	耐性	肺	6.044	WT	
UMUC3	耐性	膀胱	6.217	WT	
PANCO403	耐性	膵臓	6.468	WT	
KG1	耐性	血液／リンパ液	6.588	WT	
H520	耐性	肺	6.619	WT	30
HEP3B	耐性	肝臓	6.687	WT	
HCT15	耐性	結腸	7.268	MUT	
H1793	耐性	肺	7.329	WT	
U937	耐性	血液／リンパ液	7.345	WT	
H2170	耐性	肺	7.644	WT	
PANC0327	耐性	膵臓	8.025	WT	40
BEL7405	耐性	肝臓	8.11	WT	
HT1376	耐性	膀胱	8.199	WT	
SNU638	耐性	胃	8.221	WT	
H322	耐性	肺	8.227	WT	

【表 8】

DU145	耐性	前立腺	8.239	WT
EBC1	耐性	肺	8.566	WT
JURKAT	耐性	血液／リンパ液	8.691	WT
COLO205	耐性	結腸	8.934	WT
RT4	耐性	膀胱	8.936	WT
KATOIII	耐性	胃	9.155	WT
MDAMB468	耐性	乳房	9.325	WT
5637	耐性	膀胱	9.627	WT
OE33	耐性	食道	9.856	WT
LS180	耐性	結腸	9.942	MUT
HCCC9810	耐性	胆管	10.02	WT
H226	耐性	肺	10.1	WT
A549	耐性	肺	10.15	WT
QGY7703	耐性	肝臓	11.07	WT
H647	耐性	肺	11.34	WT
MGHU3	耐性	膀胱	11.5	WT
H23	耐性	肺	12.3	WT
SCABER	耐性	膀胱	12.4	WT
H2126	耐性	肺	12.91	WT
HUPT3	耐性	膵臓	13.39	WT
SW620	耐性	結腸	13.4	WT
CAPAN2	耐性	膵臓	13.42	WT
J82	耐性	膀胱	13.42	MUT
HLE	耐性	肝臓	13.47	WT
BXPC3	耐性	膵臓	14.08	WT
MCF7MDR+	耐性	乳房	14.45	WT
BEL7404	耐性	肝臓	14.9	WT

10

20

30

40

【表 9】

SNU1	耐性	胃	14.97	WT
KP4	耐性	膵臓	15.05	WT
CAMA1	耐性	乳房	15.47	WT
HCA7	耐性	結腸	15.49	WT
SNU668	耐性	胃	15.51	WT
H522	耐性	肺	15.55	WT
SNU886	耐性	肝臓	15.6	WT
SW480	耐性	結腸	15.9	WT
HUH7	耐性	肝臓	15.97	WT
CALU1	耐性	肺	16.03	WT
SNU878	耐性	肝臓	16.06	WT
HCC1806	耐性	乳房	16.71	WT
SNU16	耐性	胃	16.76	WT
GTL16	耐性	胃	17.38	WT
BT549	耐性	乳房	17.44	WT
NAMALWA	耐性	血液／リンパ液	17.55	WT
WSUDLCL2	耐性	血液／リンパ液	17.71	WT
SU8686	耐性	膵臓	17.97	WT
H460DNP53	耐性	肺	17.98	WT
SNU761	耐性	肝臓	18.49	WT
LOVO	耐性	結腸	18.64	WT
SW780	耐性	膀胱	19.23	WT
SKMES1	耐性	肺	19.54	WT
H2286	耐性	肺	20.03	WT
SNU5	耐性	胃	21.19	WT
HCC1395	耐性	乳房	21.81	WT
HUH1	耐性	肝臓	22.34	WT

10

20

30

40

【表 1 0】

MDAMB231	耐性	乳房	23.61	WT	
NUGC3	耐性	胃	24.15	WT	
MIAPACA2	耐性	膵臓	24.2	WT	
SNU739	耐性	肝臓	25.91	WT	
CALU6	耐性	肺	26.15	WT	10
AMO1	耐性	血液／リンパ液	26.93	WT	
SW1990	耐性	膵臓	28.28	WT	
CMK	耐性	血液／リンパ液	28.91	WT	
IA6	耐性	膀胱	30	WT	
A2058	耐性	皮膚	30	WT	
ARH77	耐性	血液／リンパ液	30	WT	20
CAPAN1	耐性	膵臓	30	WT	
CC20	耐性	結腸	30	WT	
H1299	耐性	肺	30	WT	
H1437	耐性	肺	30	WT	
H460	耐性	肺	30	MUT	
H526	耐性	肺	30	WT	30
H838	耐性	肺	30	WT	
HCC15	耐性	肺	30	WT	
HCC1937	耐性	乳房	30	WT	
HCT116	耐性	結腸	30	MUT	
HEL9217	耐性	血液／リンパ液	30	INCON	40
HEPG2	耐性	肝臓	30	WT	
HLF	耐性	肝臓	30	WT	
HX147	耐性	肺	30	WT	
IM9	耐性	血液／リンパ液	30	WT	

【表 1 1】

JJN3	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
JVM3	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
K562	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
KU1919	耐性	膀胱	30	WT	
MDAMB157	耐性	乳房	30	WT	10
MDAMB436	耐性	乳房	30	WT	
MEC1	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
MKN74	耐性	胃	30	WT	
NUGC4	耐性	胃	30	WT	
OCIAML2	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
OCILY19	耐性	血液／リンパ液	30	WT	20
PC9	耐性	肺	30	WT	
RAJI	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
RAMOS	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
RERFLCAI	耐性	肺	30	WT	
RPMI8226	耐性	血液／リンパ液	30	WT	
SC1	耐性	血液／リンパ液	30	WT	30
SKHEP1	耐性	肝臓	30	WT	
SMMC7721	耐性	肝臓	30	WT	
SNU398	耐性	肝臓	30	WT	
SW900	耐性	肺	30	WT	
T24	耐性	膀胱	30	WT	40
YAPC	耐性	膵臓	30	WT	

## 【 0 4 6 1 】

変異が実施例 3 に対する感受性ともっとも強く相関していた遺伝子は、PIK3CA であった。PIK3CA WT 細胞株は 177 個のうち 12 個 (7.7%) だけが実施例 3 に対し感受性を示したが、PIK3CA の変異体である細胞株は 32 個のうち 15 個 (46.9%) が感受性を示した。これは、12.1 のオッズ比および  $1.2 \times 10^{-7}$  の p 値に対応する (表 4 参照)。

## 【 0 4 6 2 】

【表 1 2】

変異状態 (PIK3CA)	応答	
	感受性	耐性
MUT	15	17
WT	12	165

オッズ比: 12.1

p 値:  $1.2 \times 10^{-7}$

10

表4. P I K 3 C A変異状態および実施例 3 に対する応答に関する分割表。

【 0 4 6 3】

本明細書中に示すように、異常または脱調節された P I K 3 C A または P I 3 K - を有する腫瘍における耐性の潜在的マーカーである K R A S などの追加的遺伝子の変異状態または活性化状態の測定は、個別化医療アプローチの予測性の向上に役立つ可能性があることが、報告されている。

【 0 4 6 4】

われわれは、これを、P I K 3 C A 変異体細胞中の K R A S 変異のエンリッチメント(enrichment)を、阻害に対する細胞株の応答と比較することにより、上記データセットに関し実証した。分析は、2つの遺伝子の‘ホットスポット’変異を含有する細胞株に限定した(P I K 3 C A についてはコドン E 5 4 2、E 5 4 5 および H 1 0 4 7、K R A S についてはコドン K 1 2、1 3 および Q 6 1)。これにより、P I K 3 C A 変異体細胞株では、K R A S における変異が、実施例 3 による阻害に対する耐性を与えることが示された。

20

- 28 個の細胞株は P I K 3 C A に活性化変異を含有していた。
- 活性化 P I K 3 C A 変異および野生型 K R A S 遺伝子を含有する 19 個の細胞株のうち 6 個 (31.6%) は、実施例 3 に対し耐性を示した。
- 9 個の P I K 3 C A 変異体細胞株のうち 7 個 (77.8%) が、共存する K R A S 変異を含有し、実施例 3 に対し耐性を示した。

これは、7.5 のオッズ比および 0.042 の p 値に変換される (表 5 参照)。

30

【 0 4 6 5】

【表 1 3】

変異状態	応答	
	感受性	耐性
KRAS および PIK3CA MUT	2	7
PIK3CA MUT および KRAS WT	13	6

オッズ比: 7.5

p 値: 0.042

40

表5. P I K 3 C A および K R A S 変異状態ならびに実施例 3 に対する応答に関する分割表。

【実施例】

【 0 4 6 6】

50

## 実施例

ここで、本発明を以下の実施例で例示する。これに関し、一般に：

(i) 操作は、特記しない限り、周囲温度、すなわち17~25において、窒素などの不活性ガスの雰囲気下で行った；

(ii) 蒸発は、回転蒸発によるか真空下でGenevac装置を利用して行い、後処理手順は、濾過により残留固体を除去した後に行った；

(iii) フラッシュクロマトグラフィー精製は、自動Armen Glider Flashで実施した：ドイツ、DarmstadtのMerckから得た予め充填されているMerck順相Si60シリカカートリッジ（粒度分布：15~40または40~63 $\mu\text{m}$ ）を用いるSpot II Ultimate (Armen Instrument, Saint-Ave, フランス)；

(iv) 分取クロマトグラフィーは、ZMDまたはZQ ESCi質量分析計およびWaters X-TerraまたはWaters X-BridgeまたはWaters SunFire逆相カラム（C-18、5 $\mu\text{m}$ シリカ、直径19mm、長さ100mm、流速40mL/分）を取り付けたWaters機器（600/2700または2525）で、極性が低下する水（0.2%炭酸アンモニウムを含有する）とアセトニトリルの混合物を溶離液として用いて実施した；

(v) 収量は、存在する場合、必ずしも到達可能な最大値ではない；

(vi) 一般に、式Iの最終生成物の構造は、核磁気共鳴（NMR）分光法により確認した；NMR化学シフト値はデルタスケールで測定した[プロトン磁気共鳴スペクトルは、Bruker Avance 500（500MHz）機器を用いて決定した]；特記しない限り、測定は周囲温度で行った；以下の略語を用いた：s、シングレット；d、ダブルレット；t、トリプレット；q、カルテット；m、マルチプレット；dd、ダブルレットのダブルレット；ddd、ダブルレットのダブルレットのダブルレット；dt、トリプレットのダブルレット；bs、ブロードシグナル；

(vii) 一般に、式Iの最終生成物は、液体クロマトグラフィーに続く質量分析（LCMS）による特性決定も行った；LCMSは、Waters ZQ ESCiまたはZMD ESCi質量分析計およびX-Bridge 5 $\mu\text{m}$  C-18カラム（2.1x50mm）を取り付けたWaters Alliance HT（2790 & 2795）を用い、95%A+5%C~95%B+5%Cの溶媒系を2.4mL/分の流速で4分間にわたって用いて行った。これに関し、A=水、B=メタノール、C=1:1メタノール:水（0.2%炭酸アンモニウムを含有する）である；

(viii) 中間体は、一般に完全には特性を決定せず、薄層クロマトグラフィー、質量スペクトル、HPLCおよび/またはNMR分析により純度を評価した；

(ix) X線粉末回折スペクトルは、結晶質材料の試料をBrukerシリコン単結晶（SSC）ウエハマウント上に載せ、顕微鏡スライドを用いて該試料を薄層へ広げることにより決定した（Bruker D4分析機器を用いる）。試料を1分あたり30回転でスピンさせ（計数統計を向上させるために）、40kVおよび40mAで操作した銅ロングファインフォーカス管(long-fine focus tube)により発生させた波長1.5418オングストロームのX線を照射した。コリメートしたX線源を、V20に設定した自動可変発散スリットに通し、反射した放射線を5.89mmの散乱防止スリット(antiscatter slit)および9.55mmの検出器スリットに通して方向付けた。試料を、シータ-シータモードで2度~40度の2シータ範囲にわたり、0.00570°の2シータ増分につき0.03秒間暴露した（連続走査モード）。実行時間は3分36秒であった。該機器に、位置感応検出器(Lynxeye)を備え付けた。対照およびデータの捕捉には、Dell Optiplex 686 NT4.0 WorkstationをDiffractionソフトウェアで操作して用いた。X線粉末回折分野の技術者なら、ピークの相対強度が、例えば、30 $\mu\text{m}$ より大きいサイズの粒子や試料の分析に影響を及ぼしうる非ユニタリーなアスペクト比により影響を受ける可能性があることを、理解するであろう。当業者は、反射の位置が、回折計の中で試料が置かれる位置の正確な高さと同様に

10

20

30

40

50

より影響を受ける可能性があることも、理解するであろう。試料表面の平面性もわずかな影響を有する可能性がある。したがって、提示する回折パターンデータは、絶対的な値とみなすべきではない；

( x ) 示差走査熱量測定は、T A I n s t r u m e n t s Q 1 0 0 0 D S C 機器を用いて実施した。典型的には、蓋付きの標準的なアルミニウム製パンに入れた 5 m g 未満の材料を、1分あたり 1 0 の一定の加熱速度で 2 5 ~ 3 0 0 の温度範囲にわたり加熱した。窒素を用いるパージガスを、1分あたり 5 0 m L の流速で用いた；そして

( x i ) 以下の略語を用いた： -

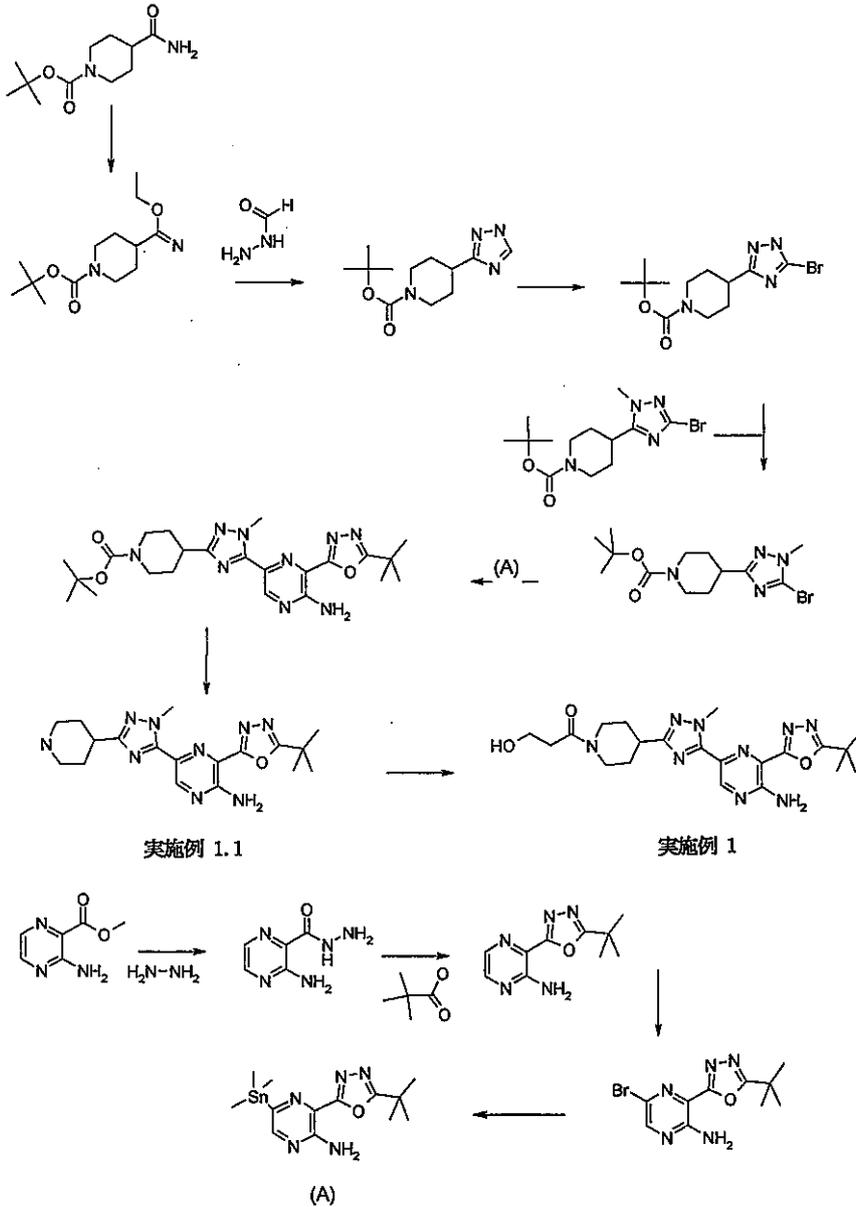
aq .	水性	
C D C l <sub>3</sub>	ジュウテロクロロホルム	10
C H C l <sub>3</sub>	クロロホルム	
D B U	1 , 8 - ジアザビシクロ [ 5 . 4 . 0 ] ウンデク - 7 - エン	
D C M	ジクロロメタン	
D E A	ジエチルアミン	
D I P E A	N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン	
D M A	N , N - ジメチルアセトアミド	
D M F	N , N - ジメチルホルムアミド	
D M S O	ジメチルスルホキシド	
D S C	示差走査熱量測定	
D T A D	( E ) - ジ - t e r t - プチルジアゼン - 1 , 2 - ジカルボキ	20
シレート		
E D C I	1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイ	
ミド塩酸塩		
E t h e r	ジエチルエーテル	
E t O H	エタノール	
E t O A c	酢酸エチル	
% e e	エナンチオマー過剰率 %	
H O P O	2 - ヒドロキシ - ピリジン N - オキシド	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー	
I P A	イソプロピルアルコール	30
M e C N	アセトニトリル	
M e O H	メタノール	
M I B K	メチルイソプチルケトン	
M T B E	メチル t e r t - プチルエーテル	
N M P	1 - メチル - 2 - ピロリドン	
r t	室温	
s a t .	飽和	
s o l .	溶液	
T H F	テトラヒドロフラン	
T E A	トリエチルアミン	40
T B T U	2 - ( 1 H - ベンゾ [ d ] [ 1 , 2 , 3 ] トリアゾール - 1 -	
イル ) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルイソウロニウムテトラフルオロボレート		
v / v	体積 / 体積	
T F A	トリフルオロ酢酸	

#### 実施例 1

1 - ( 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - t e r t - プチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - メチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - イル ) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オン

**【 0 4 6 7 】**

## 【化 2 3】



## 【 0 4 6 8】

3 - ヒドロキシプロパン酸 (水中の 30% v/v 溶液) (200  $\mu$ L、47.0 mg、0.52 mmol) を蒸発乾固した後、トルエンと共沸させた。該酸を NMP (1 mL) に溶解し、モレキュラーシーブ (100 mg、0.26 mmol)、N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン (0.136 mL、0.78 mmol) を加えた後、2 - (1H - ベンゾ [d] [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルイソウロニウムテトラフルオロボレート (209 mg、0.65 mmol) を加えた。30 分間攪拌した後、3 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) - 5 - (1 - メチル - 3 - (ピペリジン - 4 - イル) - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - イル) ピラジン - 2 - アミン (100 mg、0.26 mmol) を加え、混合物を 2 時間攪拌した。反応混合物を、Waters X - Bridge 逆相カラム (C - 18、5  $\mu$ m シリカ、直径 19 mm、長さ 100 mm、流速 40 mL / 分) および極性が低下する水 (0.2% 炭酸アンモニウムを含有する) とアセトニトリルの混合物を溶離液として用いて、分取 HPLC により精製した。

40

## 【 0 4 6 9】

望ましい化合物を含有する画分を蒸発乾固して、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イ

50

ル) - 1 - メチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オン ( 4 5 . 0 m g 、 3 7 . 9 % ) を透明な黄色固体として得た :  $^1\text{H NMR}$ スペクトル ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.52 (9H, s), 1.79 - 1.94 (2H, m), 2.07 - 2.15 (2H, m), 2.58 (2H, t), 2.84 - 2.94 (1H, m), 3.00 - 3.10 (1H, m), 3.17 - 3.26 (1H, m), 3.53 (1H, t), 3.86 - 3.94 (3H, m), 4.30 (3H, s), 4.56 - 4.62 (1H, m), 9.02 (1H, s) ; 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 456$ .

3 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 1 - メチル - 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) ピラジン - 2 - アミン ( 実施例 1 . 1 ) は、以下のように調製した :

20 において、ジクロロメタン ( 5 0 0 m L ) 中の tert - ブチル 4 - カルバモイルピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 4 7 g 、 2 0 5 . 8 8 m m o l ) を、ジクロロメタン ( 5 0 0 m L ) 中のトリエチルオキソニウムヘキサフルオロホスフェート ( V ) ( 5 6 . 2 g 、 2 2 6 . 4 7 m m o l ) の攪拌溶液に、窒素下で 4 5 分間にわたり滴下して加えた。得られた溶液を 20 で一晩攪拌した。その後、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  の飽和水溶液を、pH 8 が得られるまで加えた。相をデカントし、水相を再び 2 0 0 m L の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で抽出した後、有機相を  $\text{MgSO}_4$  上で乾燥し、濾過し、濃縮して、tert - ブチル 4 - ( エトキシ ( イミノ ) メチル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 5 1 . 0 g 、 9 7 % ) を無色液体として得た :

【 0 4 7 0 】

【 数 1 】

$^1\text{H NMR}$ スペクトル ; ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.28 (3H, t), 1.46 (9H, s), 1.47 (2H, m), 1.79 - 1.93 (2H, m), 2.28 (1H, m), 2.73 (2H, m), 4.10 (2H, q), 4.13 - 4.18 (2H, m) ; 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ =$  質量イオンなし。

【 0 4 7 1 】

ジオキササン ( 5 0 0 m L ) 中の tert - ブチル 4 - ( エトキシ ( イミノ ) メチル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 5 1 g 、 1 9 8 . 9 5 m m o l ) の攪拌溶液に、ホルモヒドラジド ( 1 7 . 9 2 g 、 2 9 8 . 4 3 m m o l ) を加えた。この溶液を  $\text{N}_2$  下、40 でそのまま一晩攪拌すると、白色固体 ( ヒドラジド中間体 ) の沈殿が生じた。その後、反応混合物を 6 時間にわたり 80 に加熱し、室温に冷却し、濃縮した。残渣を 5 0 0 m L の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  に溶解し、3 0 0 m L の水を加えた。相をデカントし、有機相をブラインで洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  上で乾燥し、濾過し、濃縮して、tert - ブチル 4 - ( 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 4 6 . 0 g 、 9 2 % ) を白色固体として得た :

【 0 4 7 2 】

【 数 2 】

$^1\text{H NMR}$ スペクトル ; ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.47 (9H, s), 1.76 (2H, m), 1.98 - 2.11 (2H, m), 2.91 (2H, s), 2.97 - 3.08 (m, 1H), 4.06 - 4.23 (2H, m), 8.05 (1H, s) ; 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ =$  質量イオンなし。

【 0 4 7 3 】

ジクロロメタン ( 2 5 0 m L ) 中の tert - ブチル 4 - ( 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 2 2 g 、 8 7 . 1 9 m m o l ) の攪拌溶液に、水酸化ナトリウム 2 N ( 1 3 1 m L 、 2 6 1 . 5 8 m m o l ) を加えた。反応混合物を機械的攪拌で激しく攪拌した後、温度を約 1 5 に維持しつつ、ジクロロメタン ( 2 5 0 m L ) 中のベンジルトリメチルアンモニウムトリプロミド ( 3 7 . 4 g 、 9

10

20

30

40

50

5.91 mmol) の溶液を滴下して加えた。反応混合物をそのまま室温で1時間攪拌し、2N HClを加えてpH5を得た(温度は約15 に維持した)。相をデカントし、有機相をH<sub>2</sub>O(2×1L)で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥し、濾過し、濃縮して、tert-ブチル4-(5-プロモ-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート(25.00g、87%)を灰色がかった白色の固体として得た:

【0474】

【数3】

<sup>1</sup>H NMRスペクトル; (CDCl<sub>3</sub>) 1.46 (9H, s), 1.67 – 1.84 (2H, m), 1.90 – 2.13 (2H, m), 2.77 – 2.96 (2H, m), 2.98 – 3.10 (1H, m), 3.94 – 4.35 (2H, m); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 質量イオンなし。

10

【0475】

トルエン(200mL)およびメタノール(50mL)中のtert-ブチル4-(5-プロモ-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート(26g、78.50mmol)の攪拌懸濁液に、温度を約20 に維持しつつ、N<sub>2</sub>下でヘキサン(43.2mL、86.35mmol)中の(ジアゾメチル)トリメチルシラン2M溶液を滴下して加えた:ガスの発生およびわずかな発熱が観察された。得られた黄色溶液を室温で1時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、得られたオイルをシリカ上で精製し、石油エーテル中の40% EtOAcで溶離して、tert-ブチル4-(5-プロモ-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート(15.00g、55.3%)をオイルとして得た:

20

【0476】

【数4】

<sup>1</sup>H NMRスペクトル; (CDCl<sub>3</sub>) 1.46 (9H, s), 1.65 – 1.78 (2H, m), 1.90 – 2.01 (2H, m), 2.68 – 3.02 (3H, m), 3.83 (3H, s), 3.94 – 4.31 (2H, m); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 質量イオンなし。

30

【0477】

ヒドラジン-水和物(34mL、1094.95mmol)を、エタノール(65mL)中のメチル3-アミノピラジン-2-カルボキシレート(21.3g、139.09mmol)の攪拌懸濁液に室温で少しずつ加えた。得られたスラリーを60 で2時間攪拌し、室温に冷却し、濾過した。固体を冷エタノール(2×25mL)で洗浄し、恒量まで乾燥して、3-アミノピラジン-2-カルボヒドラジド(20.75g、97%)をベージュ色の固体として得た: <sup>1</sup>H NMRスペクトル; (DMSO-d<sub>6</sub>) 4.49 (2H, d), 7.46 (2H, br s), 7.78 (1H, d), 8.17 (1H, d), 9.79 (1H, t); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 154。

40

【0478】

2-(1H-ベンゾ[d][1,2,3]トリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルイソウロニウムテトラフルオロボレート(47.7g、148.69mmol)を、アセトニトリル(350mL)中のN-エチル-N-イソプロピルプロパン-2-アミン(70.6mL、405.51mmol)、ピバル酸(17.08mL、148.69mmol)および3-アミノピラジン-2-カルボヒドラジド(20.7g、135.17mmol)の攪拌懸濁液に15分かけて少しずつ加え、反応混合物を80 で20分間攪拌した(溶液を得た)。反応混合物を0 に冷却し、N-エチル-N-イソプロピルプロパン-2-アミン(70.6mL、405.51mmol)、続いて4-メチルベンゼン-1-スルホニルクロリド(77g、405.51mmol)を15分間にわ

50

たり加えた。反応混合物（黄色懸濁液）を還流（可溶化）した後、そのまま室温で14時間攪拌して、暗い橙色の溶液を得た。該溶液を濃縮した。残渣をジクロロメタンで希釈し、水、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、濃縮した。粗生成物を、ジクロロメタン中の0～40%酢酸エチルで溶離してシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。溶媒を蒸発乾固した。得られた混合物をエーテル（100mL）で粉碎し、濾過し、最低限のエーテルで洗浄し、乾燥して、3-（5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル）ピラジン-2-アミン（20.8g、70.2%）を淡黄色固体として得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル；( $\text{CDCl}_3$ ) 1.53 (9H, s), 1.58 - 1.68 (2H, m), 6.67 (2H, s), 8.13 (2H, dt)；質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 220$ 。

【0479】

1-プロモピロリジン-2,5-ジオン（18.57g、104.36mmol）を、THF（320mL）中の3-（5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル）ピラジン-2-アミン（20.8g、94.87mmol）に少しずつ加え、溶液を室温で16時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、残渣をジクロロメタン（300mL）に溶解し、水（ $2 \times 150\text{mL}$ ）、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、濃縮した。溶媒を蒸発させ、粗生成物を、ジクロロメタン中の0～10%酢酸エチルで溶離してシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。溶媒を蒸発乾固して、5-プロモ-3-（5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル）ピラジン-2-アミン（25.5g、90%）をベージュ色の固体として得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル；( $\text{CDCl}_3$ ) 1.52 (9H, s), 8.23 (1H, s)；質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 300$ 。

【0480】

トルエン（450mL）中の5-プロモ-3-（5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル）ピラジン-2-アミン（45g、150.94mmol）の懸濁液に、1,1,1,2,2,2-ヘキサメチルジスタンナン（37.6mL、181.12mmol）およびビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（II）クロリド（5.30g、7.55mmol）を加えた。反応混合物をアルゴンで脱ガスし、80で2時間加熱した。（加熱により可溶化した後、橙色溶液が再沈殿して黒色になる。これは、反応が終了したことを示している。）反応混合物を冷却し、濃縮し、残渣を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ に溶解し、Decalite上で濾過して、不溶性不純物を除去した。濾液を濃縮し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中の0～10%EtOAcで溶離してシリカ上で精製した。溶媒を濃縮して、3-（5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル）-5-（トリメチルスタンニル）ピラジン-2-アミン（22.63g、39.2%）を橙色固体として得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル；( $\text{CDCl}_3$ ) 0.38 (9H, s), 1.53 (9H, s), 6.49 (2H, br s), 8.13 (1H, s)；質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 384$ 。

【0481】

4-メチル-2-ペンタノール（28mL）中のtert-ブチル4-（5-プロモ-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル）ピペリジン-1-カルボキシレート（2700mg、7.82mmol）および3-（5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル）-5-（トリメチルスタンニル）ピラジン-2-アミン（2988mg、7.82mmol）の攪拌懸濁液に、塩化リチウム（995mg、23.46mmol）およびビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（II）クロリド（220mg、0.31mmol）を加えた。該混合物をアルゴンで脱ガスし、140で2時間加熱した。反応物を冷却し、得られた沈殿物を濾過により収集し、イソプロパノール（25mL）、水（25mL）で洗浄し、吸引乾燥した。イソプロパノール有機画分を濃縮し、形成した沈殿物を収集し、主な沈殿物と組み合わせて、tert-ブチル4-（5-（5-アミノ-6-（5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル）ピラジン-2-イル）-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル）ピペリジン-1-カルボキシレート（3.0g、79%）を得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル；( $\text{DMSO}-d_6$ ) 1.41 (9H, s), 1.45 (9H, s), 1.50 - 1.68 (2H, m), 1.95 (3H, dd), 2

10

20

30

40

50

.78 - 3.05 (1H, m), 3.96 (3H, d), 4.21 (3H, s), 8.86 (1H, s); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 484。

【0482】

TFA (15 mL) および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) 中の tert-ブチル 4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ペリジン-1-カルボキシレート (3 g, 6.20 mmol) の溶液を 25 で 1 時間攪拌した。該混合物をトルエンと共沸させ、メタノールおよびジクロロメタン中のアンモニアの 7 N 溶液を加え、混合物をシリカゲル上に吸着させた。粗生成物を、ジクロロメタン中の 0 ~ 8 % メタノール、続いてジクロロメタン中の 0 ~ 10 % メタノール性アンモニアで溶離してシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。溶媒を蒸発乾固して、3-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)-5-(1-メチル-3-(ペリジン-4-イル)-1H-1,2,4-トリアゾール-5-イル)ピラジン-2-アミン (2.040 g, 86%) を黄色結晶質固体として得た：<sup>1</sup>H NMR スペクトル : (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 1.55 - 1.66 (2H, m), 1.86 (2H, dd), 2.52 - 2.61 (2H, m), 2.69 - 2.78 (1H, m), 2.95 - 3.02 (2H, m), 4.20 (3H, s), 8.86 (1H, s); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 384。

10

実施例 1 の単結晶形の単離

上記で単離した材料の X 線粉末回折スペクトルは、材料が、結晶質であるが、多形形態の混合物であることを示した。この材料は 226.4 の融点 (開始) を有していた。

20

【0483】

フォーム A の材料は、25 において原材料をアセトニトリル中でスラリー化することにより生成した。約 20 mg の原材料をマグネティックスターラーと一緒にバイアルに入れ、約 2 mL のアセトニトリルを加えた後、バイアルを蓋でしっかり密封し、マグネティックスターラープレート上でそのまま攪拌した。約 5 日後、試料をプレートから除去し、蓋を外し、スラリーを、周囲条件下で放置して乾燥した後、XRPD および DSC により分析した。この形態 (フォーム A) は、XRPD により結晶質であると決定された。この材料は 227.2 の融点 (開始) を有していた。

【0484】

同じ結晶形を、室温において粗材料をアセトニトリル中で一晚スラリー化した後、得られた固体を濾過し、冷アセトニトリルで洗浄し、乾燥することにより、作製することができる。

30

【0485】

本発明の一観点において、化合物試料をアセトニトリル中でスラリー化することにより実施例 1 の結晶形 (フォーム A) を形成するためのプロセスを提供する。X 線粉末回折の 10 個のピークを以下の表に示す：

【0486】

【表 1 4】

実施例 1 形態 A の 1 0 個の X 線粉末回折ピーク

角度 2 シータ ( $2\theta$ )	強度 %
5.1	100.0
18.0	22.5
10.2	22.0
11.7	17.8
19.4	14.5
18.5	14.2
14.8	12.6
26.7	11.0
26.6	10.6
17.8	9.9

10

20

【0487】

実施例 1 フォーム A の X 線粉末回折スペクトルを図 1 に示す。

【0488】

実施例 1 フォーム A の DSC 分析は、227.2 で開始し 228.6 にピークを有する融解吸熱を示している (図 2)。

30

【0489】

したがって、DSC 分析は、実施例 1 フォーム A が、約 227.2 で融解を開始し 228.6 にピークを有する高融点固体であることを示している。

【0490】

実施例 1 フォーム A の DSC を図 2 に示す。

X 線粉末回折

分析機器：Bruker D4。

【0491】

X 線粉末ディフラクトグラムは、結晶質材料の試料を Bruker シリコン単結晶 (SC) ウエハマウント上に載せ、顕微鏡スライドを用いて該試料を薄層へ広げることにより決定した。試料を 1 分あたり 30 回転でスピンさせ (計数統計を向上させるために)、40 kV および 40 mA で操作した銅ロングファインフォーカス管により発生させた波長 1.5418 Å の X 線を照射した。コリメートした X 線源を、V20 に設定した自動可変発散スリットに通し、反射した放射線を 5.89 mm の散乱防止スリットおよび 9.55 mm の検出器スリットに通して方向付けた。試料を、シタ - シタモードで 2 度 ~ 40 度の 2 シータ範囲にわたり、0.00570° の 2 シータ増分につき 0.03 秒間暴露した (連続走査モード)。実行時間は 3 分 36 秒であった。該機器に、位置感応検出器 (Lynxeye) を備え付けた。対照およびデータの捕捉には、Dell Optiplex 686 NT4.0 Workstation を Diffrac+ ソフトウェアで操作して用いた。X 線粉末回折分野の技術者なら、ピークの相対強度が、例

40

50

えば、30ミクロンより大きいサイズの粒子や試料の分析に影響を及ぼしうる非ユニタリーなアスペクト比により影響を受ける可能性があることを、理解するであろう。当業者は、反射の位置が、回折計の中で試料が置かれる位置の正確な高さと同軸のゼロ校正により影響を受ける可能性があることも、理解するであろう。試料表面の平面性もわずかな影響を有する可能性がある。したがって、提示する回折パターンデータは、絶対的な値とみなすべきではない。

示差走査熱量測定

分析機器：TA Instruments Q1000 DSC。

【0492】

典型的には、蓋付きの標準的なアルミニウム製パンに入れた5mg未満の材料を、1分あたり10の一定の加熱速度で25～300の温度範囲にわたり加熱した。窒素を用いるパージガスを、1分あたり50mLの流速で用いた。

10

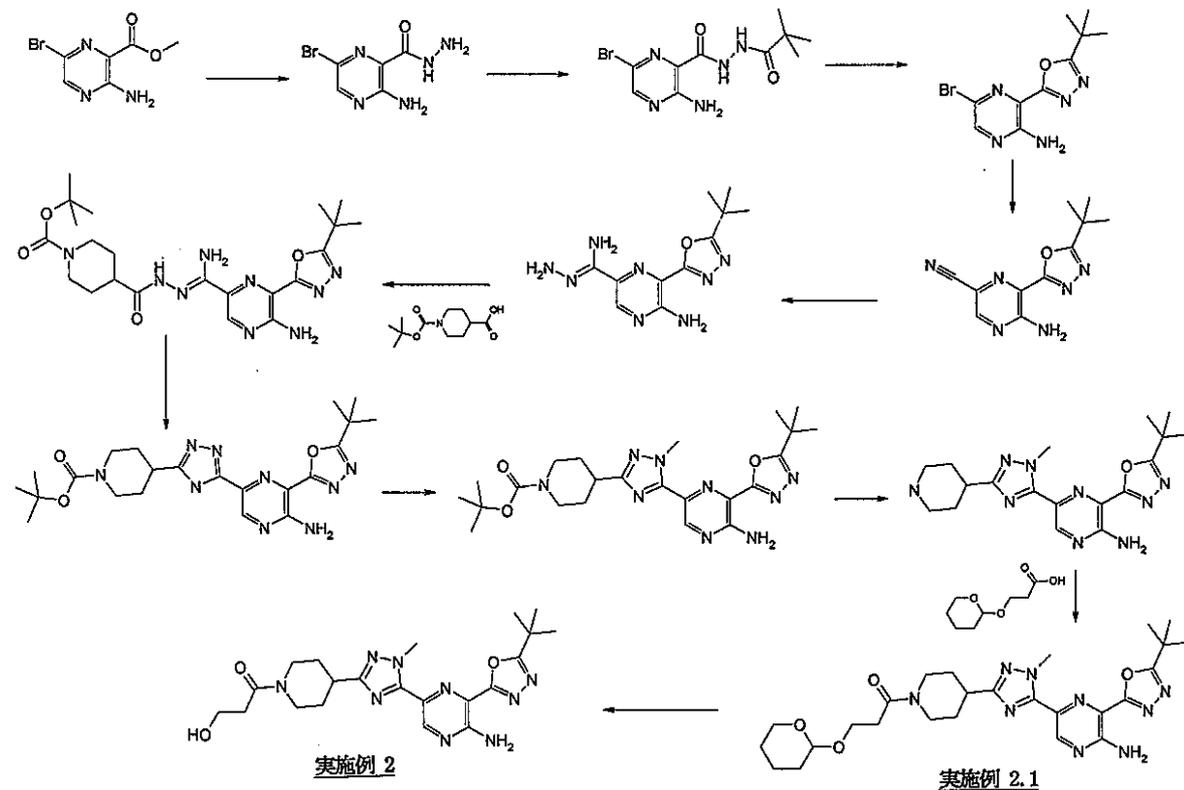
【0493】

実施例1の化合物の他の合成法を、実施例2として以下に提供する。

実施例2：1-(4-(5-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オン

【0494】

【化24】



20

30

40

【0495】

ピリジン4-メチルベンゼンスルホネート(3.58g、14.25mmol)を、窒素下でメタノール(275mL)中の1-(4-(5-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパン-1-オン(37g、68.57mmol)の懸濁液に加えた。混合物を60で1.5時間攪拌した。該混合物は5分後に溶解性を示した。該混合物を50で一晩保持すると、その間に沈殿物が形成した。反応混合物をジクロロメタン(400mL)に溶解し、水(300mL)およびブライン(100mL)で洗浄した。水性抽出物をDCM(100mL)で逆洗し、有機相を組み合

50

わせたものを  $MgSO_4$  上で乾燥し、濃縮した。粗生成物を、100%酢酸エチル～10：50：40メタノール/酢酸エチル/DCMで溶離してシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。複数の画分を含有する生成物を蒸発乾固して、ベージュ色の固体(24.5g)を得た。固体をアセトニトリル(500mL)中で一晚スラリー化し、濾過し、高真空下で乾燥して、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オン(実施例2)(24g、78%)をクリーム色の固体として得た： $^1H$  NMRスペクトル：(DMSO- $d_6$ ) 1.51 (9H, s), 1.55 - 1.68 (1H, m), 1.68 - 1.84 (1H, m), 1.96 - 2.13 (2H, m), 2.78 - 2.93 (1H, m), 2.98 - 3.1 (1H, m), 3.19 - 3.3 (1H, m), 3.71 (2H, q), 3.93 - 4.04 (1H, m), 4.27 (3H, s), 4.35 - 4.48 (1H, m), 4.54 (1H, t), 7.96 (2H, s), 8.92 (1H, s)；質量スペクトル  $[M+H]^+ = 456$

(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパン-1-オン(実施例2.1)は、以下のように調製した：

ヒドラジン水和物(23.59mL、480.75mmol)を、EtOH(2L)中のメチル3-アミノ-6-プロモピラジン-2-カルボキシレート(100g、418.04mmol)の攪拌混合物に滴下して加えた。混合物を、窒素下、50℃で加熱した。得られた濃厚懸濁液を50℃で16時間攪拌した。さらにヒドラジン(2.5mL)を1回で加え、懸濁液を50℃でさらに24時間攪拌した。エタノール(500mL)を濃厚反応混合物に入れ、該混合物をそのまま室温まで冷却した。得られた懸濁液を濾過し、固体をエタノール(1L)で洗浄し、真空乾燥して、3-アミノ-6-プロモピラジン-2-カルボヒドラジド(98g、定量的)をクリーム色の固体として得た： $^1H$  NMRスペクトル；(DMSO- $d_6$ ) 4.52 (2H, s), 7.59 (2H, s), 8.30 (1H, s), 9.74 (1H, s)；質量スペクトル  $[M+H]^+ = 232$ 。

#### 【0496】

無水ピバル酸(165mL、815.38mmol)をアセトニトリル(1.8L)中の3-アミノ-6-プロモピラジン-2-カルボヒドラジド(172g、741.26mmol)の攪拌混合物に加え、混合物を80℃で1時間加熱した。反応物を放置して16時間攪拌した。必要な黄色固体材料を濾過により単離した。濾液をEtOAc(2L)と水性重炭酸ナトリウム(2L)に分配した。有機相を飽和ブラインで洗浄し、 $MgSO_4$ 上で乾燥した。溶液を濾過して濃縮すると橙色の粘性固体を得られ、これをMTBE(250mL)で粉砕した。不溶性黄色固体を濾過により単離した。この材料は最初の固体と同一であることが示された。固体を組み合わせたものを50℃の真空オーブンで3日間乾燥して、3-アミノ-6-プロモ-N'-ピバロイルピラジン-2-カルボヒドラジド(224g、96%)を黄色固体として得た： $^1H$  NMRスペクトル：(DMSO- $d_6$ ) 1.17 (9H, s), 7.62 (2H, s), 8.37 (1H, s), 9.42 - 9.56 (1H, m), 10.09 - 10.23 (1H, m)；質量スペクトル  $[M+H]^+ = 318$ 。

#### 【0497】

p-トルエンスルホニルクロリド(164g、861.60mmol)を、アセトニトリル(2200mL)中の3-アミノ-6-プロモ-N'-ピバロイルピラジン-2-カルボヒドラジド(227g、718.00mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(297mL、1795.01mmol)の懸濁液に少しずつ加えた。混合物を70℃で2時間攪拌した。反応物を一晚放置して室温まで冷却した。反応混合物を酢酸エチル(2L)と重炭酸ナトリウム溶液(2L)に分配した。有機層を飽和ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、減圧濃縮した。得られた褐色/ベージュ色の固体を高温のMTBE(1000mL)で粉砕し、濾過により単離し、乾燥して、5-プロモ-3-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-アミンを黄色固体(187g、87%)として得た。母液を蒸発乾固した。粗製固

体をMTBE (500 mL)で粉砕し、濾過し、100 mLのMTBEで洗浄した。得られた固体を一晩風乾して、5 - ブロモ - 3 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - アミンの第2の収穫物(crop) (36 g, 17%)を得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル：(DMSO- $d_6$ ) 1.43 (9H, s), 7.70 (2H, s), 8.39 (1H, s)；質量スペクトル [M+H] $^+$  = 298。

## 【0498】

他の調製法では、50 において、MeCN (10.8 L)中の3 - アミノ - 6 - ブロモ - N' - ピパロイルピラジン - 2 - カルボヒドラジド (2301 g, 7.28 mol)に、DIPEA (3.044 L, 17.48 mol)およびp - トルエンシルホニルクロリド (1665 g, 8.73 mol)を30分間かけて少しずつ(約280 g × 6)加えた。反応温度は、添加速度を制御することにより65 ~ 70 に維持した。添加終了後、反応混合物を70 で1時間攪拌した。混合物を室温に冷却し、5% NaHCO<sub>3</sub> (水性、24.2 L)で急冷した。得られた懸濁液を30分間攪拌した後、濾過した。生成物を水(14.8 L)で洗浄し、吸引乾燥し、50 で16時間乾燥した。生成物をDCM (12 L)に溶解し、相を分離した。有機相をシリカパッド(6 kg)上に載せ、生成物を20% EtOAc / DCM (8 × 10 L)で溶離した。複数の画分を含有する生成物を濃縮して、1987 g (収率92%)をHPLCによる純度99.8%で得た。

10

## 【0499】

窒素ガス流を、DMA (1.2 L)中の5 - ブロモ - 3 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - アミン (89.35 g, 239.75 mmol)の溶液に20分間通した。ジシクロヘキシル(2', 4', 6' - トリイソプロピルピフェニル - 2 - イル)ホスフィン(11.43 g, 23.98 mmol)、トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(0) (5.49 g, 5.99 mmol)、亜鉛(1.568 g, 23.98 mmol)およびジシアノ亜鉛(16.89 g, 143.85 mmol)を、攪拌混合物に逐次的に加えた。該混合物を100 に加熱し、1時間攪拌した。混合物を冷却し、DCM (3 L)と水(1 L)に分配した。黒色混合物をセライトに通して濾過し、有機層を分離した。溶液を、水、次にブラインで洗浄した。該溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をMTBEで粉砕し、濾過により単離し、MTBEで洗浄した。濾過ケーキを真空乾燥して、5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - カルボニトリル(55.7 g, 95%)を淡橙色固体として得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル：(DMSO- $d_6$ ) 1.46 (9H, s), 6.02 (1H, s), 8.38 (2H, s)；質量スペクトル [M-H] $^-$  = 242。

20

30

## 【0500】

MTBEでの粉砕の代わりに、生成物をヘプタン中でスラリー化した後、濾過し、乾燥してもよい。

## 【0501】

ヒドラジン水和物(82 mL, 1.69 mol)をIPA (200 mL)中の5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - カルボニトリル(55 g, 225.18 mmol)に加え、混合物を窒素下、50 で16時間加熱した。混合物を氷浴で冷却した。得られた沈殿物を濾過により収集し、IPAおよびジエチルエーテルで洗浄し、恒量まで乾燥して、(Z) - 5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル)ピラジン - 2 - カルボヒドラゾンアミド(49.2 g, 79%)を黄色固体として得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル：(DMSO- $d_6$ ) 1.45 (9H, s), 5.26 (2H, s), 5.58 (2H, s), 7.56 (2H, s), 8.75 (1H, s)；質量スペクトル [M+H] $^+$  = 277。

40

## 【0502】

O - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(74.3 g, 195.44 mmol)を、DMA (800 mL)中のN - Boc - イソニペコチン酸(41.1 g, 179.15 mmol)および4 - メチルモルホリン(35.9 mL, 325.74 mmol)の溶液に加え

50

た。混合物を10分間攪拌した後、該溶液に(Z)-5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-カルボヒドラゾンアミド(45g、162.87mmol)を1回で加えた(22~27に発熱が観察された)。数分後、生成物が反応混合物から晶出した。反応混合物を容器から取り出し、シンターに通して濾過した。追加的なDMAを容器の側面から洗浄生成物に加え(150mL)、これを濾過ケーキ上に注ぎ入れた。イソプロパノール(600mL)を容器に加え、容器中の生成物の残りを、激しい攪拌を用いてこの溶媒に懸濁させた。該イソプロパノール懸濁液を、DMAを吸引除去した後すぐに濾過ケーキを洗浄するために用いた。濾過ケーキを吸引乾燥した後、MTBEで洗浄し、もう一度吸引乾燥した。濾過ケーキを真空乾燥して、(Z)-tert-ブチル4-(2-(アミノ(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)メチレン)ヒドラジンカルボニル)ピペリジン-1-カルボキシレート(76g、95%)を黄色固体として得た：<sup>1</sup>H NMRスペクトル：(DMSO-d<sub>6</sub>) 1.40 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.63 - 1.9 (2H, m), 2.33 - 2.6 (2H, m, DMSOシグナルにより不明瞭になった), 2.63 - 3.03 (2H, m), 3.18 - 3.48 (4H, m, 水シグナルにより不明瞭になった), 3.88 - 4.11 (2H, m), 6.43 (2H, s), 7.76 (2H, br), 8.84 (0.5H, s), 8.87 (0.5H, s), 9.85 (1H, s)；質量スペクトル[M+H]<sup>+</sup> = 488

10

他の調製法では、N-Boc-イソニペコチン酸を*in situ*で以下のように作製することができる：イソニペコチン酸(858g、3.74mol)をDMA(25.3L)に溶解し、4-メチルモルホリン(393mL、3.74mol)を加えた。5分間攪拌し、クロロギ酸イソブチル(489mL、3.74mol)を加えた。反応混合物を25で2時間攪拌し、15に冷却してから、(Z)-5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-カルボヒドラゾンアミド(940g、3.4mol)を10分かけて少しずつ加えた。反応混合物を15で1~2時間攪拌した。水(20.5L)を1時間かけて少しずつ加え、さらに1時間攪拌した後、濾過した。その後、濾過ケーキを水(4x4L)で洗浄し、フィルター上で吸引乾燥した後、乾燥するまで50の真空オープンで乾燥して、望ましい生成物を得た。

20

#### 【0503】

3Lの固定二重ジャケット付き容器中のジオキサン(500mL)に酢酸(200mL)を加え、溶液を窒素下で70に加熱した。(Z)-tert-ブチル4-(2-(アミノ(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)メチレン)ヒドラジンカルボニル)-ピペリジン-1-カルボキシレート(74.5g、152.80mmol)を、加温した混合物に少しずつ加えた。10分後、温度を100に上昇させた(わずかに還流した)。反応混合物を100で1.5時間攪拌した後(懸濁液)、80で一晩保持した(一晩保持した後、溶液が形成した)。得られた溶液を減圧濃縮した後、トルエンで希釈し、蒸発乾固し、トルエンで溶解し、再び濃縮した。残留オイルを多少の酢酸エチルと混合し、乾燥するまで濃縮した。固体が溶液から晶出し、これをMTBE(200mL)で粉碎し、濾過により単離した。濾過ケーキを水およびMTBEで洗浄して、tert-ブチル4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート(50g、70%)を灰色固体として得た。濾液を減圧濃縮して黄色固体を得た。この材料をMTBEで粉碎し、濾過した。濾過ケーキを、酢酸エチル、次にMTBEで洗浄して、淡黄色固体として第2の収穫物を得た(4.93g、7%)。この材料は、第1の収穫物と同一であった：

30

40

#### 【0504】

## 【数5】

$^1\text{H NMR}$ スペクトル: ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 1.17 (9H, s), 1.22 (9H, s), 1.29 – 1.47 (2H, m), 1.67 – 1.78 (2H, m), 2.57 – 2.87 (3H, m), 3.57 – 3.92 (2H, m), 7.56 (2H, br), 8.56 (1H, s), 13.47 (2H, br s); 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ .

## 【0505】

1, 8 - ジアザピシクロ [ 5 . 4 . 0 ] ウンデク - 7 - エン ( 19 . 87 mL、132 . 90 mmol ) を、2 - メチル THF ( 300 mL ) 中の tert - ブチル 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 48 g、102 . 23 mmol ) の懸濁液に加えた。5分後に暗色溶液が得られた。これを木炭で処理し、セライトパッドに通して濾過し、木炭と木炭を追加的な 2 - メチル THF ( 100 mL ) で洗浄した。濾液を、3 L のジャケット付き固定容器内で、窒素雰囲気下、- 5 °C において、エアスターラーを用いて攪拌した。黄色懸濁液の攪拌を促すために 2 - メチル THF ( 100 mL ) を加えた。ヨードメタン ( 7 . 96 mL、127 . 78 mmol ) を 15 分かけて滴下して加えた。該混合物を 2 時間攪拌し、反応混合物を室温まで温めた。16 時間後、追加的なヨードメタン ( 6 mL ) および DBU ( 20 mL ) を加え、16 時間にわたり攪拌を継続した。該混合物を水中に注ぎ入れ、5 分間攪拌した。不溶性材料をベージュ色の固体として単離し、真空乾燥して、tert - ブチル 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - メチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 24 . 77 g、50 . 1 % ) を得た。母液を減圧濃縮し、残渣を、MTBE を溶離液として用いてシリカ上でのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。このようにして、望ましい生成物の第 2 の収穫物 ( 13 . 04 g、26 % ) を黄色固体として得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル: ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 1.47 (9H, s), 1.51 (9H, s), 1.57 - 1.76 (2H, m), 1.94 - 2.1 (2H, m), 2.87 - 3.09 (3H, m), 3.9 - 4.08 (2H, m), 4.26 (3H, s), 7.97 (2H, br, s), 8.92 (1H, s); 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 484$ .

10

20

30

## 【0506】

tert - ブチル 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - メチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート ( 36 . 81 g、76 . 12 mmol ) を、DCM ( 100 mL ) 中の 2 , 2 , 2 - トリフルオロ酢酸 ( 100 mL、1305 . 87 mmol ) の溶液に加えた。混合物を室温で 3 時間攪拌した。該混合物を減圧濃縮した。残渣を DCM ( 1 . 5 L ) に溶解し、水 ( 400 mL ) 中で激しく攪拌している濃アンモニア ( 150 mL ) に加えた。水性物を DCM ( 400 mL ) で洗浄し、有機溶液を組み合わせたものを硫酸マグネシウム上で乾燥し、濾過し、乾燥するまで濃縮して、3 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 1 - メチル - 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) ピラジン - 2 - アミン ( 30 . 0 g、103 % ) を黄色固体として得た： $^1\text{H NMR}$ スペクトル: ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 1.44 (9H, s), 1.54 - 1.69 (2H, m), 1.8 - 1.92 (2H, m), 2.53 - 2.63 (2H, m), 2.68 - 2.83 (1H, m), 2.93 - 3.05 (2H, m), 4.19 (3H, s), 7.89 (2H, br), 8.85 (1H, s); 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 384$ .

40

## 【0507】

O - ( 7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート ( 30 . 4 g、80 . 04 mmol ) を、25 °C において、アセトニトリル ( 200 mL ) に溶解した 3 - ( テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イルオキシ ) プロパン酸 ( 12 . 67 g、72 . 76 mmol ) および N - エチル

50

- N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン ( 25 . 3 mL、145 . 52 mmol ) の攪拌溶液に少しずつ加えた。得られた溶液を 25 で 20 分間攪拌した後、3 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 1 - メチル - 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - イル ) ピラジン - 2 - アミン ( 30 g、72 . 76 mmol ) を少しずつ加え、最後のポーションをアセトニトリル ( 100 mL ) 中のスラリーとして混合物中に洗い流した。1 時間攪拌した後、沈殿物を濾過により収集し、アセトニトリルで洗浄し、真空乾燥して、1 - ( 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - メチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - イル ) - 3 - ( テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イルオキシ ) プロパン - 1 - オン ( 35 . 0 g、89 % ) をベージュ色の固体として得た。濾液を DCM ( 600 mL ) で希釈し、水洗し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、濃縮した。残渣を、ジクロロメタンを用いて 2 ~ 2 . 5 % のメタノール中の 7 N アンモニアの勾配で溶離するシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物の第 2 の収穫物 ( 3 . 31 g、6 . 13 mmol、8 . 43 % ) も、クリーム色固体として得られた。両方の試料を組み合わせてベージュ色の固体を得た：<sup>1</sup>H NMR スペクトル ( DMSO-d<sub>6</sub> ) 1.44 (9H, s), 1.52 - 1.79 (4H, m), 1.88 - 2.04 (2H, m), 2.53 - 2.73 (2H, m), 2.73 - 2.87 (1H, m), 2.91 - 3.05 (1H, m), 3.13 - 3.24 (1H, m), 3.37 - 3.47 (1H, m), 3.53 - 3.65 (1H, m), 3.7 - 3.8 (1H, m), 3.81 - 3.89 (1H, m), 3.89 - 3.99 (1H, m), 4.20 (3H, s), 4.29 - 4.4 (1H, m), 4.54 - 4.61 (1H, m), 7.60 - 8.20 (2H, br), 8.85 (1H, s) ; 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 540。

10

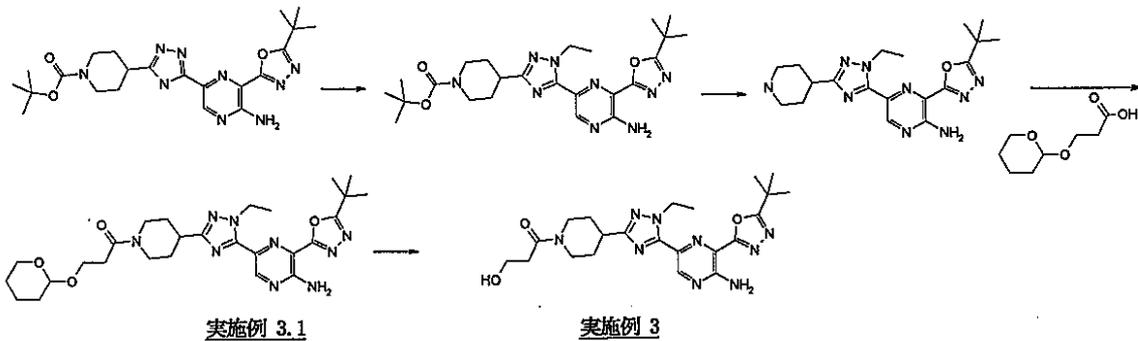
20

### 実施例 3

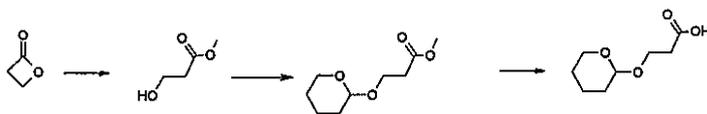
1 - ( 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - イル ) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オン

【 0508 】

【 化 25 】



30



40

【 0509 】

ピリジン 4 - メチルベンゼンスルホネート ( 11 . 62 g、46 . 24 mmol ) を、窒素下でメタノール ( 1 L ) 中の 1 - ( 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - イル ) - 3 - ( テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イルオキシ ) プロパン - 1 - オン ( 128 g、231 . 19 mmol ) の懸濁液に加えた。混合物を 60 で 1 . 5 時間攪拌した。該混合物は 5 分後に溶解性を示した。該混合物を 50 で一晩保持すると、その間に沈殿物が形成した。固体材料を濾過により単離し、水およびアセトニトリルで洗浄した。この材料はまだ前段階からの少量の不純物を含含有しており、さらに精製する必要があった。該材料をジクロロメ

50

タンに溶解し、シリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィー（0%メタノール/DCM~10%メタノール/DCM）により精製した。このようにして、望ましい生成物である1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オン(実施例3)(92g、85%)をクリーム色固体として単離した(フォームA):<sup>1</sup>H NMRスペクトル: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.4 - 1.51 (12H, m), 1.51 - 1.78 (2H, m), 1.89 - 2.05 (2H, m), 2.72 - 2.86 (1H, m), 2.91 - 3.05 (1H, m), 3.12 - 3.24 (1H, m), 3.64 (2H, q), 3.83 - 4.01 (1H, m), 4.29 - 4.41 (1H, m), 4.47 (1H, t), 4.58 (2H, q), 8.26 (2H, s), 8.85 (1H, s); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 470。

10

## 【0510】

1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパン-1-オン(実施例3.1)は、以下のように調製した:

1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデク-7-エン(76mL、511.14mmol)を、2-メチルTHF(1.2L)中のtert-ブチル4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート(150g、319.46mmol)の懸濁液に加えた。ヨードエタン(46mL、575.03mmol)を加え、混合物を35°Cで16時間攪拌した。さらにヨードエタン(46mL、575.03mmol)および1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデク-7-エン(76mL、511.14mmol)を加え、攪拌を35°Cで24時間継続した。混合物を水中に注ぎ入れ、不溶性材料を濾過により単離し、水およびMTBEで洗浄し、真空乾燥して、tert-ブチル4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート(116g、73.0%)を黄色固体として得た。濾液をDCMで抽出し、有機溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、減圧濃縮した。残渣を、勾配溶離(30%MTBE/ヘプタン~100%MTBE)を用いてシリカ上でのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。このようにして、望ましい生成物の第2の収穫物(12g、24.12mmol、7.55%)を黄色固体として単離し、これを後で第1の収穫物と組み合わせた:<sup>1</sup>H NMRスペクトル: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.41 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.48 (3H, t), 1.52 - 1.69 (2H, m), 1.87 - 2.04 (2H, m), 2.79 - 3.03 (3H, m), 3.86 - 4.03 (2H, m), 4.59 (2H, q), 7.89 (2H, s), 8.85 (1H, s); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 498。

20

30

## 【0511】

THFも上記反応に適した溶媒である可能性がある。

## 【0512】

TFA(400mL)を、DCM(400mL)中のtert-ブチル4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-カルボキシレート(126g、253.22mmol)の溶液に少しずつ加えた。混合物を室温で16時間攪拌した。該混合物を減圧濃縮し、DCM(1L)に溶解し、0°Cにおいて、水中の濃水性アンモニア(500mL)の激しく攪拌している溶液に徐々に加えた。有機溶液を水性物から分離し、減圧濃縮\*して、3-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)-5-(1-エチル-3-(ピペリジン-4-イル)-1H-1,2,4-トリアゾール-5-イル)ピラジン-2-アミン(101g、100%)を黄色固体として得た:<sup>1</sup>H NMRスペクトル: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.4 - 1.52 (12H, m), 1.57 - 1.73 (2H, m), 1.83 - 1.93 (2H, m), 2.57 - 2.7 (2H, m), 2.71 - 2.84 (1H, m), 2.96 - 3.09 (2H, m), 4.58 (2H, q), 8.06 (2H, s), 8.84 (1H, s); 質量

40

50

スペクトル  $[M+H]^+ = 398$ 。

\* 同様の規模（約 170 g の出発材料）での他の実験では、以下の単離手順を用いた：層を分離し、上層（固体を含むエマルジョン）を濾過した。固体を DCM（0.5 L）で洗浄し、濾液を分液漏斗に移した。層を分離し、水層を DCM（0.5 L）で抽出した。有機層を  $MgSO_4$  上で乾燥し、濾過し、濃縮した。生成物を 50 で一晩乾燥した（81.75 g）。抽出物からの固体を室温において水（200 mL）中で 30 分間スラリー化し、濾過により取り出した。生成物を 50 で真空乾燥した（61.8 g）。

【0513】

他の変法は以下のとおりである；

DCM（9 L）中の tert - ブチル 4 - （5 - （5 - アミノ - 6 - （5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル）ピラジン - 2 - イル） - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル）ピペリジン - 1 - カルボキシレート（3009.5 g、6.05 mol）の懸濁液を、 $N_2$  下で 5 ~ 10 に冷却した。温度を < 30 に維持しつつ、TFA（9 L）を懸濁液に少しずつ加えた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。混合物を濃縮し、得られた残渣を水（30 L）に溶解し、0 ~ 5 で 35 % アンモニア水溶液（12 L）に徐々に加えた。懸濁液を 30 分間攪拌した後、生成物を濾過により取り出し、水（2 × 6 L）で洗浄した。生成物を 50 で 2 日間にわたり真空乾燥した（2496 g）。

【0514】

O - （7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル） - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU、106 g、279.51 mmol）を、25 において、アセトニトリル（600 mL）に溶解した 3 - （テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イルオキシ）プロパン酸（44.3 g、254.10 mmol）および N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン（89 mL、508.21 mmol）の攪拌溶液に少しずつ加えた。得られた溶液を 25 で 20 分間攪拌した後、3 - （5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル） - 5 - （1 - エチル - 3 - （ピペリジン - 4 - イル） - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - イル）ピラジン - 2 - アミン（101 g、254.10 mmol）を少しずつ加え、最後のポーションをアセトニトリル（300 mL）中のスラリーとして混合物中に洗い流した。1 時間攪拌した後、沈殿物を濾過により収集し、アセトニトリルで洗浄し、真空乾燥して、1 - （4 - （5 - （5 - アミノ - 6 - （5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル）ピラジン - 2 - イル） - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル）ピペリジン - 1 - イル） - 3 - （テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イルオキシ）プロパン - 1 - オン（128 g、91%）をベージュ色の固体として得た。濾液を DCM（600 mL）で希釈し、水洗し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、濃縮した。残渣を、ジクロロメタンを用いて 2 ~ 2.5 % のメタノール中の 7 N アンモニアの勾配で溶離するシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。望ましい生成物の第 2 の収穫物（40 g、72.2 mmol、28.4%）をクリーム色固体として得た。これを第 1 の収穫物と組み合わせた： $^1H$  NMR スペクトル：(DMSO- $d_6$ ) 1.29 - 1.48 (16H, m), 1.48 - 1.75 (4H, m), 1.83 - 1.99 (2H, m), 2.48 - 2.68 (2H, m), 2.68 - 2.79 (1H, m), 2.87 - 2.99 (1H, m), 3.07 - 3.19 (1H, m), 3.32 - 3.42 (1H, m), 3.47 - 3.6 (1H, m), 3.64 - 3.75 (1H, m), 3.75 - 3.84 (1H, m), 3.84 - 3.95 (1H, m), 4.24 - 4.39 (1H, m), 4.47 - 4.6 (3H, m), 7.84 (2H, s), 8.79 (1H, s)；質量スペクトル  $[M+Na]^+ = 577$ 。

他の調製法：

THF（552 mL）中の 3 - （テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イルオキシ）プロパン酸（48.80 g、0.2774 mol）および N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン（86.96 mL、0.4993 mol）の溶液に、O - （7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル） - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（115.73 g、0.3051 mol）を、窒素下、室温において

少しずつ加えた。得られた混合物を20分間攪拌した後、3-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)-5-(1-エチル-3-(ピペリジン-4-イル)-1H-1,2,4-トリアゾール-5-イル)ピラジン-2-アミン(122.5g(110.25g活性)、0.2774mol)を1時間かけて少しずつ加えた。3.5時間後、混合物を濃縮し、残渣を室温で15分間にわたりMeCN(275mL)中でスラリー化した。生成物を濾過により取り出し、MeCN(3×110mL)で洗浄し、50で一晚真空乾燥した。これにより、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパン-1-オン(131.9g、96%)を得た。さらに他の調製法では、THF中のHBTU(O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)を、HATUの代わりにカップリング剤として用いてもよい。

### 実施例3の他の調製法

メタノール(1045mL)中の1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパン-1-オン(131.9g、0.2382mol)の懸濁液に、N<sub>2</sub>下でp-トルエンスルホン酸ピリジニウム(11.97g、47.7mmol)を加えた。反応混合物を、60で5.5時間、その後50で一晩攪拌した。反応混合物を0に冷却し、固体を濾過により取り出した。生成物を室温において水(250mL)中で20分間スラリー化し、濾過により取り出し、水(3×40mL)で洗浄し、50で真空乾燥した。これにより、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オン(21.4g)をフォームAとして得た(以下参照)。

#### 【0515】

メタノール液を濃縮し、得られた固体を室温において水(0.6L)中で20分間スラリー化した。固体を濾過により単離し、水(3×100mL)で洗浄した。濾過ケーキの2回目のスラリー化を、水(0.5L)中でさらに20分間行った。生成物を濾過により単離し、水(100mL)で洗浄し、50で真空乾燥した。これにより、81.9gの1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オン(81.9g)をフォームAとして得た。

#### 【0516】

両方の収穫物を組み合わせ(103.3g)、フォームB(16.68g)を種入れ(seed)し、室温においてMeCN(826mL)中で一晚スラリー化した。これにより、117.4gの1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オンを淡黄色固体(117.4g)、フォームB(以下参照)として得た。この材料を、ヘプタン(7.5相対体積)中で1時間スラリー化することにより、さらに精製した。混合物を濾過し、フィルター上で吸引乾燥し、50の真空オーブンで一晩乾燥して、1-(4-(5-(5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル)-1-エチル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)ピペリジン-1-イル)-3-ヒドロキシプロパン-1-オン(102.5g)をフォームBとして得た。

#### 【0517】

10

20

30

40

50

フォーム B は、種入れすることなく、MeCN 中でフォーム A をスラリー化することにより作製することもできる。

【0518】

フォーム A または B は、以下のようにフォーム C に転化することもできる：

I PA (12 体積) 中の 1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オン (例えば、先に概説したプロセスにより作製したフォーム B) の懸濁液を、固体が溶解するまで加熱還流した。溶液を熱濾過した後、室温に冷却した。これにより、フォーム C として、1 - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1 H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) - 3 - ヒドロキシプロパン - 1 - オンを淡黄色固体 (99.3 g, 97%) として得た。

10

【0519】

フォーム C は、以下のようにフォーム B に転化することもできる。

【0520】

10 L のフランジフラスコ中で、MIBK (7900 mL) 中のフォーム C (377.8 g ポーション 1) を 110 ~ 115 に加熱して溶液を得た。該溶液をそのまま 97 ~ 103 に冷却し、-15 で攪拌しているアセトニトリル (8220 mL) 中のフォーム B の種 (0.8 g) を含有する 50 L 容器中に速やかに研磨濾過 (polish filter) した。添加中、50 L 容器中の温度は、ジャケット冷却により -15 ~ 25 に維持した。MIBK に溶解した化合物の他の 3 つのポーションを、同様の方法により加えた。得られたスラリーにフォーム B の種 (0.8 g) を加えた後、混合物を 10 ~ 20 で一晩攪拌した。プロセス中、分析により望ましい形態 (フォーム B) が確認され、フォーム C または可視的非晶質は確認されなかった。混合物を濾過し、アセトニトリル (3340 mL) で洗浄した。固体を、恒量が得られるまで 2 日間オープン乾燥した (乾燥中に、固体は、粉末およびサイズが約 1 mm ~ 約 3 ~ 4 mm の小さな塊の混合物に崩壊した)。収量 = 1532.8 g (93.5%)

20

3 - (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イルオキシ) プロパン酸は、以下のように調製した：

30

窒素下、0 において、メタノール (2.4 L) および濃硫酸 (44.4 mL, 832.61 mmol) の攪拌溶液に、ベータ - プロピオラクトン (175 mL, 2.78 mol) を滴下して加えた。この溶液をそのまま室温で 2 日間攪拌した。反応混合物を 10 に冷却した後、重炭酸ナトリウム (145 g, 1.72 mol) を少しずつ加え、得られた懸濁液を放置して室温で 75 分間攪拌した。この溶液を濾過し、濾過ケーキをメタノール (800 mL) で洗浄した。濾液を蒸発させてオイルを得、これをジクロロメタン (1.2 L) に再溶解し、60 分間攪拌した後、再び濾過した。この溶液を濾過した後、蒸発させて、3 - ヒドロキシプロパン酸メチル (219 g, 76%) をオイルとして得た。<sup>1</sup>H NMR スペクトル：(CDCl<sub>3</sub>) 2.50 (2H, t), 3.63 (3H, s), 3.78 (2H, t)。

40

【0521】

p - トルエンスルホン酸ピリジニウム (7.65 g, 30.45 mmol) を、窒素下の室温においてジクロロメタン (650 mL) 中の 3 - ヒドロキシプロパン酸メチル (63.4 g, 609.00 mmol) および 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ピラン (78 mL, 852.60 mmol) の透明溶液に加えて、濁った溶液を得た。これを、そのまま室温で一晩攪拌した。反応混合物を水 (250 mL) およびブライン (250 mL) で洗浄した後、乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) し、蒸発させて、オイルを得た。この粗生成物を、ヘプタン中の 15 ~ 30% EtOAc の溶離勾配でフラッシュシリカクロマトグラフィーにより精製した。純粋な画分を蒸発乾固して、メチル 3 - (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イルオキシ) プロパノエート (67.7 g, 59.0%) を無色オイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR スペクトル：(CDCl<sub>3</sub>) 1.47 (4H, dddd), 1.55 - 1.84 (2H, m), 2.55 (2H, t), 3.33 - 3

50

.53 (1H, m), 3.53 - 3.7 (4H, m), 3.78 (1H, ddd), 3.93 (1H, dt), 4.42 - 4.72 (1H, m); 質量スペクトル  $[MH]^+ = 189$ 。

【0522】

水酸化ナトリウム (2 M、349 mL、697.58 mmol) を、室温において、THF (680 mL) 中のメチル3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパノエート (67.68 g、359.58 mmol) の溶液に加えた。反応混合物を室温で3時間攪拌した。THFを真空除去し、つぎに水層を酢酸エチル (260 mL) で洗浄した後、0 に冷却し、塩酸 (2 M) の添加により pH 5 に慎重に酸性化した。生成物を酢酸エチル (3 × 250 mL) で抽出した後、乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) し、蒸発させて、3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパン酸 (57.0 g、91%) を透明オイルとして得た。この材料を酢酸エチル (750 mL) に溶解した後、水 (3 × 250 mL) およびブライン (250 mL) で洗浄して、残存する酢酸を除去した。有機溶液を乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) し、蒸発させて、3-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イルオキシ)プロパン酸 (45.67 g、72.9%) を無色オイルとして得た：<sup>1</sup>H NMRスペクトル：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.43 - 1.67 (4H, m), 1.65 - 1.95 (2H, m), 2.68 (2H, t), 3.48 - 3.58 (1H, m), 3.73 (1H, dt), 3.88 (1H, ddd), 4.02 (1H, dt), 4.59 - 4.7 (1H, m); 質量スペクトル  $[M-H]^- = 173$ 。上記で単離した実施例3は、本明細書中ではフォームA、BおよびCと記載する、3つの異なる結晶形にある結晶質固体であった。

10

【0523】

実施例3のフォームAの結晶構造は、XRPDおよびDSCにより特性決定することができる。

20

【0524】

これらの技術を実施するための方法は、実施例1について記載したとおりである。

【0525】

【表15】

実施例3形態Aの10個のX線粉末回折ピーク

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

30

40

【0526】

50

実施例 3 フォーム A の X R P D を図 3 に示す。

【 0 5 2 7 】

実施例 3 フォーム A の D S C 分析は、27.0 で開始し 63.0 にピークを有する初期吸熱を示している。以下の温度に、開始およびピークを有する他の吸熱シフトが見られる；166.5 および 168.7、172.2 および 173.2、ならびに 174.8 の最終融解および 175.7 のピーク（図 4）。

【 0 5 2 8 】

したがって、D S C 分析は、実施例 3 フォーム A が、約 27.0 で脱溶媒和を開始し約 63.0 にピークを有する溶媒和材料であることを示している。

【 0 5 2 9 】

実施例 3（フォーム A）の X 線粉末回折スペクトルは、該材料が結晶質であることを示した。この材料は 28.0 の脱溶媒和点（開始）を有していた。

【 0 5 3 0 】

実施例 3 は、本明細書中でフォーム B とよぶ他の多形形態で存在することもできる。フォーム B の調製法は先に記載した。

【 0 5 3 1 】

この材料は 172.5 の融点（開始）を有していた。

【 0 5 3 2 】

本発明の他の観点では、実施例 3 の試料をアセトニトリル中でスラリー化することにより、実施例 3 のフォーム B を作製するためのプロセスを提供する。本発明の他の観点では、実施例 3 のフォーム B を、M I B K 中の実施例 3 フォーム C の溶液から作製するためのプロセスを提供する。

【 0 5 3 3 】

【表 16】

### 実施例 3 形態 B の 10 個の X 線粉末回折ピーク

角度 2 シータ ( $2\theta$ )	強度 %
5.8	100.0
10.9	59.8
11.5	33.8
25.9	18.2
17.3	15.8
24.0	14.1
19.1	13.4
12.9	11.7
24.7	11.1
27.2	9.7

【 0 5 3 4 】

実施例 3 フォーム B の X R P D を図 5 に示す。

## 【0535】

実施例3フォームBのDSC分析は、172.5 で開始し174.2 にピークを有する融解吸熱を示している(図6)。

## 【0536】

したがって、DSC分析は、実施例3Bが、約172.5 で融解を開始し約174.2 にピークを有する高融点固体であることを示している。

## 【0537】

実施例3は、本明細書中ではフォームCとよぶ第3の結晶形で存在することもできる。例えばフォームB材料からフォームC材料をイソプロピルアルコール(IPA)からの晶出により作製するためのプロセスを、先に記載している。

10

## 【0538】

したがって、本発明の他の観点において、実施例3をIPAから晶出させることにより実施例3フォームCを作製するためのプロセスを提供する。

## 【0539】

実施例3フォームCは、CuKa線を用いて測定して以下の2 値の少なくとも1つを提供することを特徴とする：6.9および12.3。実施例3フォームCは、実質的に図7に示すようなX線粉末回折パターンを提供することを特徴とする。10個のX線粉末回折ピークを以下に示す：

## 【0540】

## 【表17】

20

実施例3形態Cの10個のX線粉末回折ピーク

角度2シータ ( $2\theta$ )	強度 %
6.9	40.1
12.3	100.0
10.5	23.8
21.0	67.9
24.6	36.1
13.6	21.4
16.4	19.9
19.6	18.1
20.2	17.5
22.5	18.4

30

40

## 【0541】

実施例3フォームCのDSC分析は、183.0 で開始し185.6 にピークを有する融解吸熱を示している(図8)。

## 【0542】

したがって、DSC分析は、実施例3フォームCが、約183.0 で融解を開始し約185.6 にピークを有する高融点固体であることを示している。

50

## フォームCの分析に用いた技術の詳細

### X線粉末回折

分析機器：Panalytical Cubix。

#### 【0543】

X線粉末ディフラクトグラムは、結晶質材料の試料をPanalyticalシリコン単結晶(SSC)ウエハマウント上に載せ、顕微鏡スライドを用いて該試料を薄層へ広げることにより決定した。試料を1分あたり30回転でスピンさせ(計数統計を向上させるために)、45kVおよび40mAで操作した銅ロングファインフォーカス管により発生させた波長1.5418オングストロームのX線を照射した。X線ビームを、0.04radのソーラスリット、次に20mmに設定した自動可変発散スリット、最後に20mmのビームマスクに通した。反射した放射線を20mmの散乱防止スリットと0.04radのソーラスリットに通して方向付けた。試料を、シータ-シータモードで2度~40度の2シータ範囲にわたり、0.0025067°の2シータ増分につき1.905秒間暴露した(連続走査モード)。該機器にX-Celerator検出器を備え付けた。対照およびデータの捕捉には、Dell Pentium 4HT WorkstationをX'Pert Industryソフトウェアで操作して用いた。X線粉末回折分野の技術者なら、ピークの相対強度が、例えば、30ミクロンより大きいサイズの粒子や試料の分析に影響を及ぼしうる非ユニタリーなアスペクト比により影響を受ける可能性があることを、理解するであろう。当業者は、反射の位置が、回折計の中で試料が置かれる位置の正確な高さと同折計のゼロ較正により影響を受ける可能性があることも、理解するであろう。試料表面の平面性もわずかな影響を有する可能性がある。したがって、提示する回折パターンデータは、絶対的な値とみなすべきではない。

### 示差走査熱量測定

分析機器：TA Instruments Q1000 DSC。

#### 【0544】

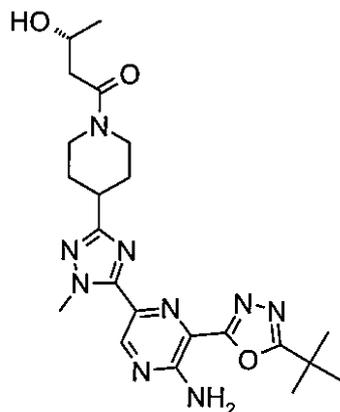
典型的には、蓋付きの標準的なアルミニウム製パンに入れた5mg未満の材料を、1分あたり10の一定の加熱速度で25~300の温度範囲にわたり加熱した。窒素を用いるパージガスを、1分あたり50mLの流速で用いた。

### 実施例4

(3R)-1-[4-[5-[5-アミノ-6-(5-tert-ブチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)ピラジン-2-イル]-1-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル]-1-ピペリジル]-3-ヒドロキシ-ブタン-1-オン

#### 【0545】

#### 【化26】



#### 【0546】

2-(1H-ベンゾ[d][1,2,3]トリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルイソウロニウムテトラフルオロボレート(201mg、0.63mmol)を、N,N-ジメチルホルムアミド(3mL)中の3-(5-tert-ブチル-1,

3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) - 5 - (1 - メチル - 3 - (ピペリジン - 4 - イル) - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - イル) ピラジン - 2 - アミン (200 mg、0.52 mmol、実施例 1 に記載)、N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン (0.273 mL、1.56 mmol) および (R) - 3 - ヒドロキシブタン酸 (65.2 mg、0.63 mmol) の攪拌懸濁液に加えた。得られた懸濁液を室温で 2 時間攪拌した。得られた混合物を、Waters X - Bridge 逆相カラム (C - 18、5 ミクロンシリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、流速 60 mL / 分) を使い、水 (炭酸アンモニウムを含有する (2 g / L)) 中の 31% アセトニトリルの無勾配混合物を用いて、分取 HPLC により精製した。望ましい化合物を含有する画分を蒸発乾固して、淡黄色固体を得た。この固体を室温においてアセトニトリル (3 mL) 中で攪拌した。得られた固体を濾過し、冷アセトニトリルで洗浄し、乾燥して、表題化合物 (125 mg、51.0%) を淡黄色固体として得た。

10

$^1\text{H}$  NMR スペクトル: ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35 (1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H, m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 質量スペクトル  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 470$ 。

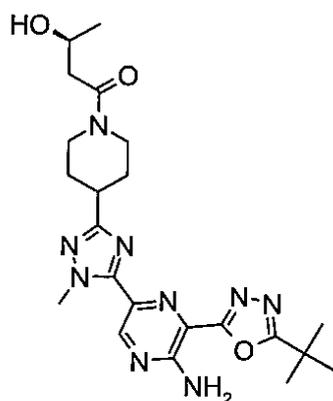
#### 実施例 5

(3S) - 1 - [4 - [5 - [5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル] - 1 - メチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 3 - ヒドロキシ - ブタン - 1 - オン

20

【0547】

【化27】



30

【0548】

実施例 4 と同様の手順を用いて、3 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) - 5 - (1 - メチル - 3 - (ピペリジン - 4 - イル) - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - イル) ピラジン - 2 - アミンを (S) - 3 - ヒドロキシブタン酸と反応させて、表題化合物 (167 mg、68.2%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H}$  NMR スペクトル: ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35 (1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H, m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 質量スペクトル  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 470$ 。

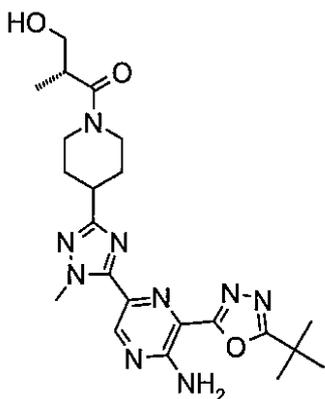
40

#### 実施例 6

(2R) - 1 - [4 - [5 - [5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル] - 1 - メチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 3 - ヒドロキシ - 2 - メチル - プロパン - 1 - オン

【0549】

## 【化 28】



10

## 【0550】

実施例 4 と同様の手順を用いて、3 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 1 - メチル - 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) ピラジン - 2 - アミンを ( R ) - 3 - ヒドロキシ - 2 - メチルプロパン酸と反応させて、表題化合物 ( 87 mg、47.4% ) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ スペクトル : (  $\text{CDCl}_3$  ) 1.55 (9H, s), 1.61 (3H, s br), 1.8-2.0 (2H, m), 2.10-2.25 (2H, m), 2.90 (2H, m), 3.10 (1H, m), 3.3 (2H, m), 3.77 (2H, m), 4.33 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.05 (1H, s); 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ 。

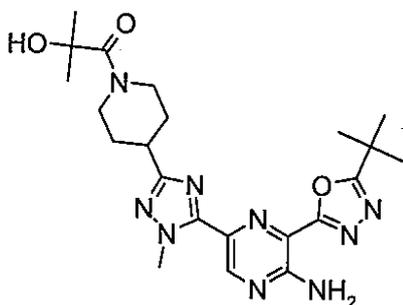
20

## 実施例 7

1 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 2 - ヒドロキシ - 2 - メチル - プロパン - 1 - オン

## 【0551】

## 【化 29】



30

## 【0552】

1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミドヒドロクロリド ( 100 mg、0.52 mmol ) を、アルゴン下で、NMP ( 1.2 mL ) に溶解した 2 - ヒドロキシ - 2 - メチルプロパン酸 ( 38.0 mg、0.37 mmol )、3 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 1 - メチル - 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) ピラジン - 2 - アミン ( 100 mg、0.26 mmol ) および 2 - ヒドロキシ - ピリジン N - オキシド ( 57.9 mg、0.52 mmol ) に 1 回で加えた。得られた溶液を 25 で 3 時間攪拌した。ピリジン ( 100  $\mu\text{L}$ 、1.24 mmol ) を加え、混合物を 18 時間攪拌した。追加的な 2 - ヒドロキシピリジン 1 - オキシド ( 57.9 mg、0.52 mmol ) および 1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミドヒドロクロリド ( 100 mg、0.52 mmol ) を加えた。その後、混合物を 48 時間かけて最高 70 に加熱し、さらに 2 - ヒドロキシ - 2 - メチルプロパン酸 ( 15 mg、0.14 mmol )、1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミドヒドロクロリド

40

50

(50.0 mg、0.26 mmol) および 2-ヒドロキシピリジン 1-オキシド (25.0 mg、0.23 mmol) を加えた後、混合物を 70 に 8 時間維持した。該溶液を、Waters X-Bridge 逆相カラム (C-18、5 ミクロンシリカ、直径 1.9 mm、長さ 100 mm、流速 40 mL/分) および極性が低下する水 (0.2% 炭酸アンモニウムを含有する) とアセトニトリルの混合物を溶離液として用いて分取 HPLC により精製して、表題化合物 (71 mg、58%) を淡黄色固体として得た。

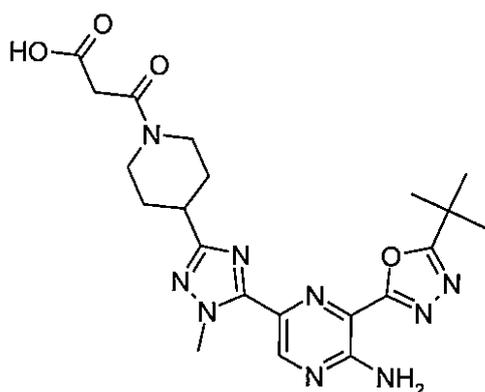
$^1\text{H NMR}$  スペクトル: ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.55 (15H, s br), 1.90 (2H, m), 2.15 (2H, m), 3.05-3.3 (4H, m), 4.32 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ 。

#### 実施例 8

3 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 3 - オキソ - プロパン酸

【 0 5 5 3 】

【 化 3 0 】



【 0 5 5 4 】

エチル 3 - クロロ - 3 - オキソプロパノエート (0.037 mL、0.29 mmol) を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) に溶解した 3 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 1 - メチル - 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) ピラジン - 2 - アミン (100 mg、0.26 mmol) およびトリエチルアミン (0.047 mL、0.34 mmol) の攪拌溶液に、窒素下、0 において 2 分間かけて滴下して加えた。混合物を 0 で 10 分間攪拌した後、そのまま室温まで温め、1 時間攪拌した。該混合物を蒸発させ、DMF に溶解した；白色固体を濾過により取り出し、濾液を、水 (0.2% 炭酸アンモニウムを含有する) とアセトニトリルの混合物で溶離する Waters X-Terra 逆相カラムを用いて分取 HPLC により精製して、エチル 3 - ( 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - メチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - イル ) - 3 - オキソプロパノエート (80 mg、61.7%) を黄色固体として得た。この材料を THF (2 mL) に懸濁させた。2 N 水酸化ナトリウム (0.235 mL、0.47 mmol) および水 (0.5 mL) を加えた。混合物を室温で一晩攪拌した。2 N 塩酸 (230  $\mu\text{L}$ ) を混合物に加えた。溶媒を蒸発させた。残渣を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) および水 (5 mL) で希釈した。有機相をブラインで洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  上で乾燥した。溶媒を蒸発させた。得られたフォームをエーテル中で粉砕した。得られた黄色固体を濾過し、乾燥し、アセトニトリル (3 mL) 中で粉砕した。黄色固体を濾過により収集し、40 で乾燥して、表題化合物 (50 mg、68%) を黄色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$  スペクトル: ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 1.46 (9H, s), 1.58 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.98 (2H, m), 2.84 (1H, m), 3.0 (1H, m), 3.21 (1H, m), 3.46 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.22 (3H, s), 4.34 (1H, m), 7.8-8.2 (1H, m), 8.87 (1H, s); 質量スペクトル  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$ 。

。

10

20

30

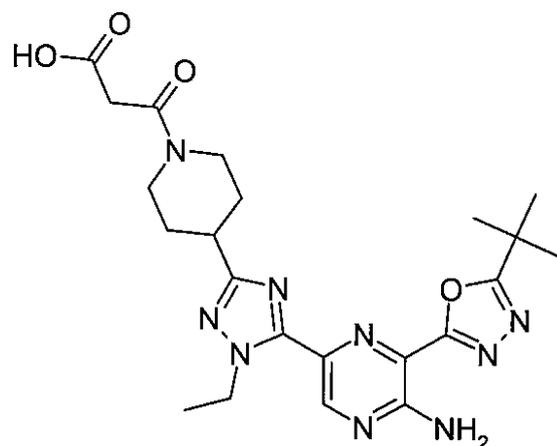
40

50

実施例 9 : 3 - [ 4 - [ 5 - [ 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ] - 1 - エチル - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ] - 1 - ピペリジル ] - 3 - オキソ - プロパン酸

【 0 5 5 5 】

【 化 3 1 】



10

【 0 5 5 6 】

O - ( 7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - N , N , N ' , N ' - テトラメチル  
ウロニウムヘキサフルオロホスフェート ( 4 7 4 m g 、 1 . 2 5 m m o l ) を、DMF ( 2 0 m L ) に溶解した 3 - エトキシ - 3 - オキソプロパン酸 ( 1 5 0 m g 、 1 . 1 3 m m o l ) 、 N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン ( 0 . 3 9 4 m L 、 2 . 2 6 m m o l ) および 3 - ( 5 - ( tert - ブチル ) - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 1 - エチル - 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 5 - イル ) ピラジン - 2 - アミン ( 4 5 0 m g 、 1 . 1 3 m m o l ) の攪拌溶液に、5 0 において 3 0 秒かけて少しずつ加えた。得られた溶液を 1 分後 ( 反応終了 ) サンプルングし、そのまま速やかに周囲温度まで冷却した。反応混合物を濃縮し、EtOAc ( 1 0 0 m L ) で希釈し、水 ( 2 0 m L ) および飽和ブライン ( 2 0 m L ) で順次洗淨した。有機層を MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥し、濾過し、蒸発させて、粗製エチル 3 - ( 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - ( tert - ブチル ) - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - エチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - イル ) - 3 - オキソプロパノエート ( 8 5 0 m g ) を得た。該材料の一部 ( 7 8 0 m g ) を THF ( 2 0 m L ) に溶解した。この溶液に、2 N 水性水酸化ナトリウム ( 2 . 3 m L 、 4 . 5 7 m m o l ) および水 ( 5 m L ) 、続いてメタノール ( 5 m L ) を加えて、透明溶液を得た。混合物を室温で 3 時間攪拌した。THF を蒸発させた。水層を 2 N 水性塩酸 ( 2 . 5 m L ) で pH 3 に酸性化した。ジクロロメタン ( 5 0 m L ) を加え、有機相を抽出した。該有機相をブライン ( 1 0 m L ) で洗淨し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥した。溶媒を蒸発させた。得られたガムを、極性が低下する水 ( 1 % アンモニアを含有する ) とアセトニトリルの混合物を溶離液として用い、分取 HPLC ( Waters X - Bridge Prep C18 OBD カラム、5 μ シリカ、直径 5 0 m m 、長さ 1 0 0 m m ) により精製した。望ましい化合物を含有する画分を蒸発乾固して、純粋なアンモニウム塩を得た。これを水中で可溶化し、2 N 塩酸 ( 約 0 . 3 m L ) で pH 3 に酸性化した。ジクロロメタン ( 5 0 m L ) を加え、有機相を分離し、ブライン ( 5 m L ) で洗淨し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥した。濾過後、得られた溶液を蒸発乾固し、残渣をジエチルエーテル ( 5 m L ) で粉碎し、濾過して、3 - ( 4 - ( 5 - ( 5 - アミノ - 6 - ( 5 - tert - ブチル ) - 1 , 3 , 4 - オキサジアゾール - 2 - イル ) ピラジン - 2 - イル ) - 1 - エチル - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール - 3 - イル ) ピペリジン - 1 - イル ) - 3 - オキソプロパン酸 ( 1 9 5 m g 、 2 6 . 5 % ) をクリーム色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR スペクトル : ( DMSO - d<sub>6</sub> ) 1.45 ( 9H , s ) , 1.48 ( 3H , m ) , 1.55 - 1.62 ( 1H , m ) , 1.70 - 1.80 ( 1H , m ) , 1.95 - 2.05 ( 2H , m ) , 2.80 - 2.90 ( 1H , m ) , 2.95 - 3.05 ( 1H , m ) , 3

20

30

40

50

.15 - 3.25 (1H, m), 3.45 (2H, s), 3.78 - 3.85 (1H, m), 4.30 - 4.40 (1H, m), 4.55 - 4.65 (2H, m), 7.80 - 8.00 (2H, br s), 8.88 (1H, s), 12.60 (1H, s); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 484

実施例 10: (2S) - 1 - [4 - [5 - [5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル] - 1 - エチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 2, 3 - ジヒドロキシ - プロパン - 1 - オン

DCM (5 mL) 中の 3 - (5 - (tert - ブチル) - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) - 5 - (1 - エチル - 3 - (ピペリジン - 4 - イル) - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - イル) ピラジン - 2 - アミン (257 mg、0.50 mmol、TFA 塩)、カリウム (S) - 2, 2 - ジメチル - 1, 3 - ジオキソラン - 4 - カルボキシレート (101 mg、0.55 mmol) および EDCI (105 mg、0.55 mmol) の混合物に、1 - ヒドロキシ - 1H - ベンゾトリアゾール水和物 (85 mg、0.56 mmol) および DIPEA (194 mg、1.50 mmol) を加えた。混合物を室温で 16 時間攪拌した。水を混合物に加え、該混合物を DCM で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥し、濾過し、濃縮して、(S) - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - (tert - ブチル) - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) (2, 2 - ジメチル - 1, 3 - ジオキソラン - 4 - イル) メタノン (320 mg) を得た。質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 526。DCM (10 mL) 中の (S) - (4 - (5 - (5 - アミノ - 6 - (5 - (tert - ブチル) - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル) - 1 - エチル - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル) ピペリジン - 1 - イル) (2, 2 - ジメチル - 1, 3 - ジオキソラン - 4 - イル) メタノン (320 mg) の混合物に、室温で TFA (1.6 mL、20.77 mmol) を滴下して加えた。混合物を室温で 16 時間攪拌し、濃縮し、極性が低下する水 (0.1% NH<sub>3</sub> を含有する) と MeCN の混合物を溶離液として用いて分取 HPLC (Waters XBridge Prep C18 OBD カラム、5 μ シリカ、直径 19 mm、長さ 100 mm) により精製した。望ましい化合物を含有する画分を蒸発乾燥して、表題化合物 (142 mg、48%) を白色固体として得た：<sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>, 30°C): 1.45 (12H, m), 1.56 (1H, m), 1.70 (1H, m), 1.98 (2H, m), 2.85 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.45 (1H, s), 3.55 (1H, s), 4.05 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.60 (2H, m), 4.70 (1H, m), 4.85 (1H, m), 7.90 (2H, m), 8.85 (1H, s); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 486。

実施例 11: (2R) - 1 - [4 - [5 - [5 - アミノ - 6 - (5 - tert - ブチル - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) ピラジン - 2 - イル] - 1 - エチル - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル] - 1 - ピペリジル] - 2, 3 - ジヒドロキシ - プロパン - 1 - オン

3 - (5 - (tert - ブチル) - 1, 3, 4 - オキサジアゾール - 2 - イル) - 5 - (1 - エチル - 3 - (ピペリジン - 4 - イル) - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - イル) ピラジン - 2 - アミンを、実施例 10 に記載した手順と同様の手順を用いてカリウム (R) - 2, 2 - ジメチル - 1, 3 - ジオキソラン - 4 - カルボキシレートと反応させて、表題化合物 (0.145 g、40%) を固体として得た：<sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>, 30°C): 1.45 (12H, m), 1.60 (2H, m), 1.98 (2H, m), 2.85 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.17 (1H, m), 3.45 (1H, s), 3.55 (1H, s), 4.05 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.60 (2H, m), 4.70 (1H, m), 4.85 (1H, m), 7.90 (2H, m), 8.85 (1H, s); 質量スペクトル [M+H]<sup>+</sup> = 486。

【 図 1 】

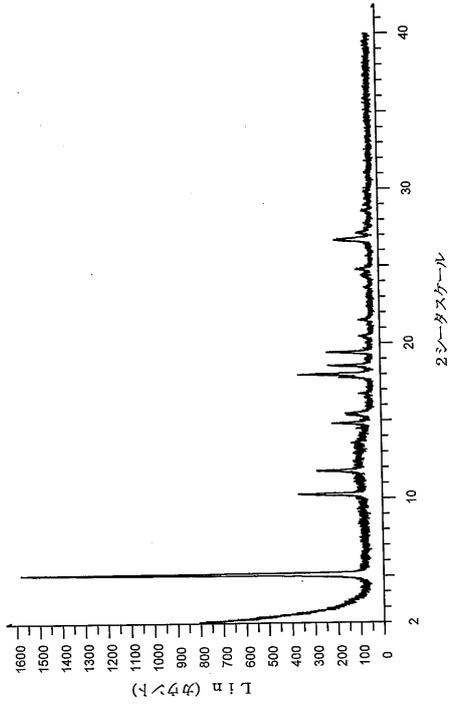


図1：実施例1形態AのX線粉末回折パターン

【 図 2 】

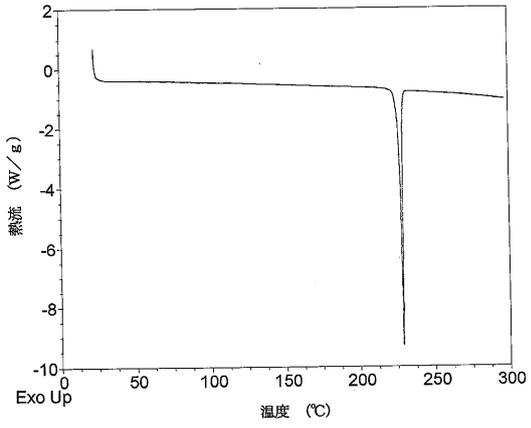


図2：実施例1形態AのDSCサーモグラム

【 図 3 】

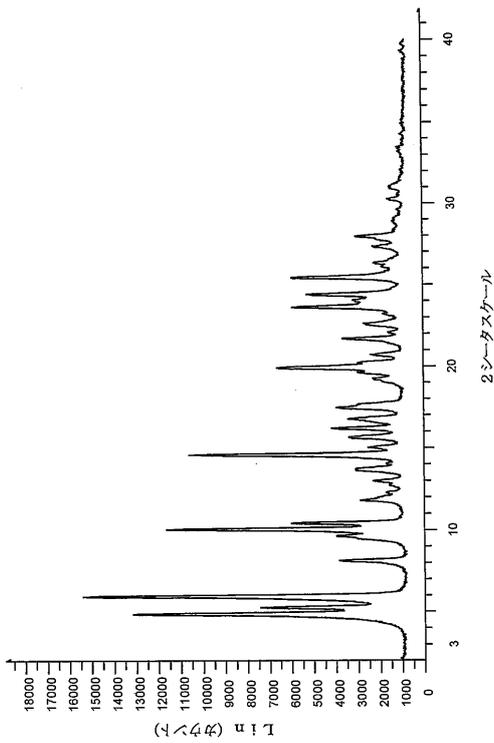


図3：実施例3形態AのX線粉末回折パターン

【 図 4 】

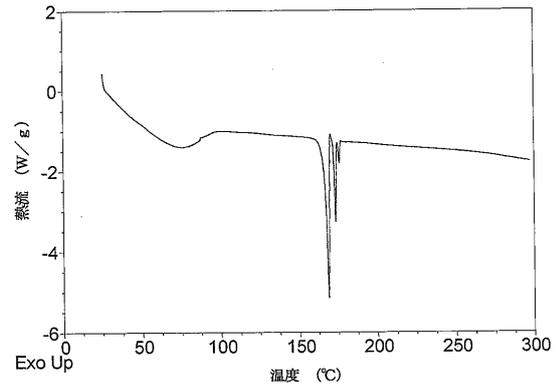


図4：実施例3形態AのDSCサーモグラム

【 図 5 】

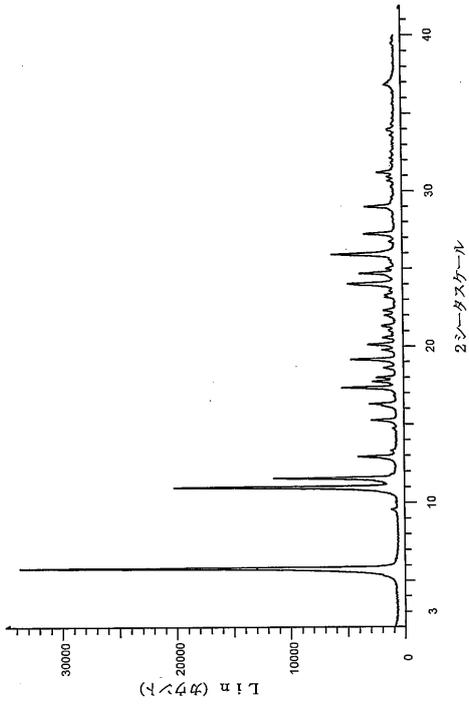


図5：実施例3形態BのX線粉末回折パターン

【 図 6 】

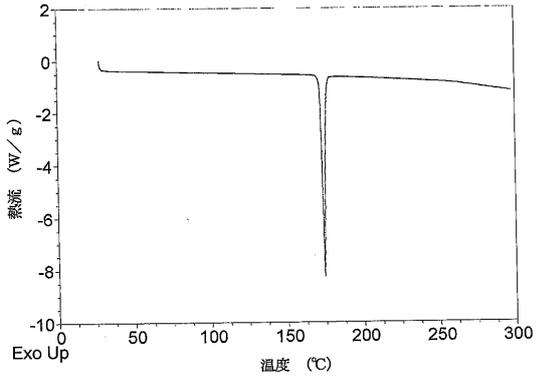


図6：実施例3形態BのDSCサーモグラム

【 図 7 】

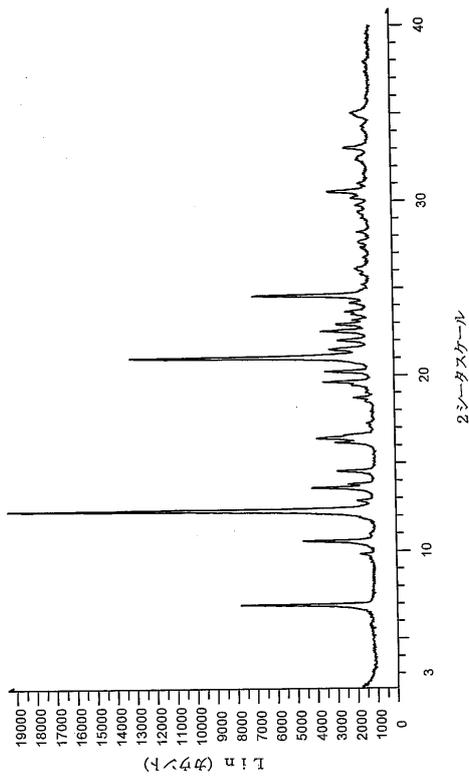


図7：実施例3形態CのX線粉末回折パターン

【 図 8 】

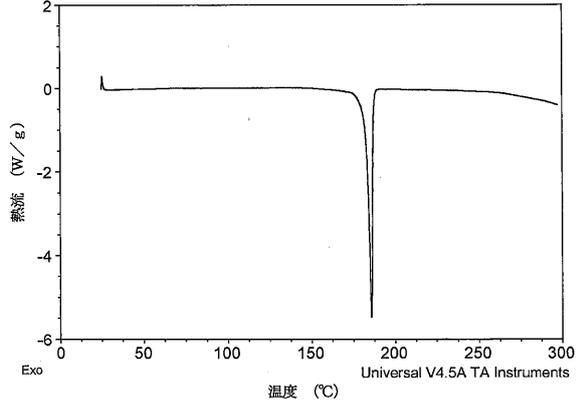


図8：実施例3形態CのDSCサーモグラム

【 図 9 】

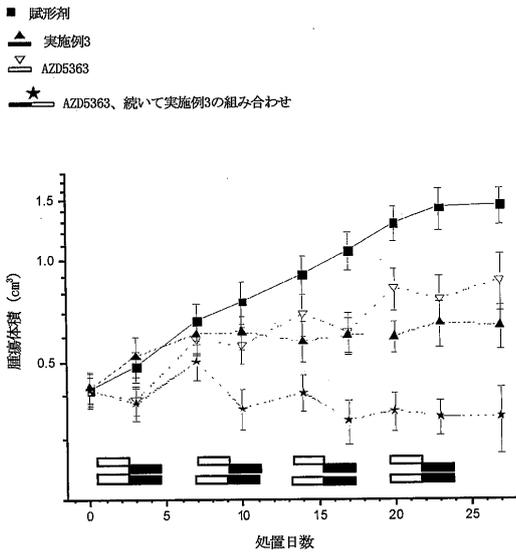


図9： AKT阻害剤 (AZD5363) と組み合わせた実施例3による腫瘍成長阻害—逐次投与

【 図 10 】

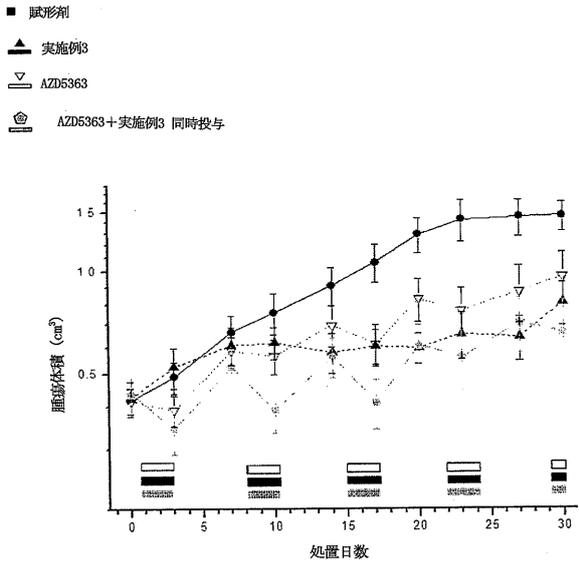


図10： AKT阻害剤 (AZD5363) と組み合わせた実施例3による腫瘍成長阻害、同時投与

【 図 11 】

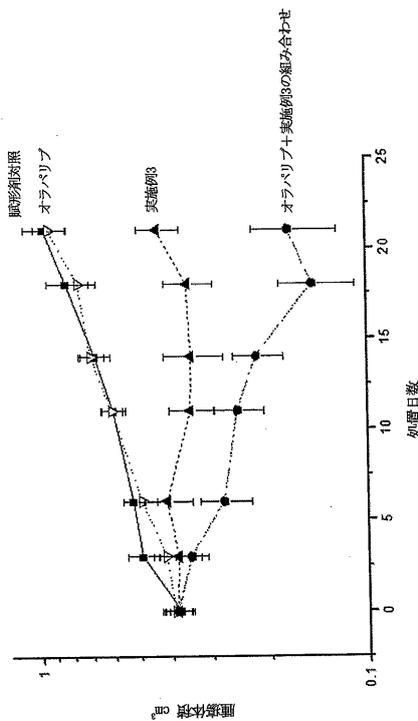


図11： BT 474 異種移植モデルにおけるPARP阻害剤 (オラパリブ) と組み合わせた実施例3による腫瘍成長阻害

【 図 12 】

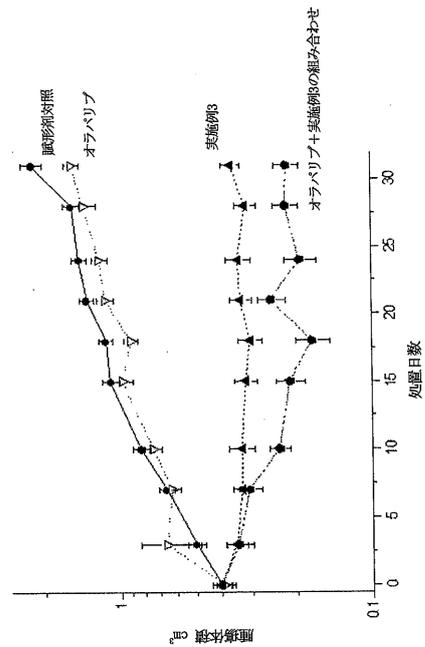


図12： MCF 7 異種移植モデルにおけるPARP阻害剤 (オラパリブ) と組み合わせた実施例3による腫瘍成長阻害

【 図 1 3 】

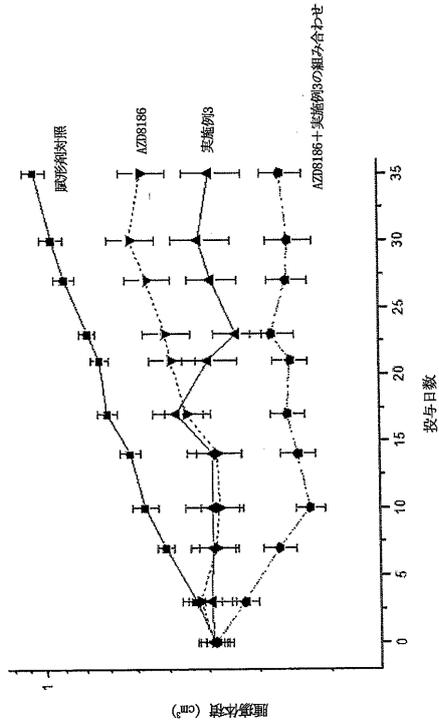


図 1 3 : AZD8186 と組み合わせた実施例 3 による腫瘍成長阻害

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/050163
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07D413/14 A61K31/4245 A61K31/4196 A61K31/497 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/157880 A1 (S BIO PTE LTD [SG]; NAGARAJ HARISH KUMAR MYSORE [SG]; WILLIAMS MEREDIT) 30 December 2009 (2009-12-30) page 81; claim 33 -----	1-15
A	WO 2010/091824 A1 (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; VENNEMANN MATTHIAS [DE]; BAER THOMAS [D] 19 August 2010 (2010-08-19) page 88; example 11.0 -----	1-15
A	WO 2012/037226 A1 (EXELIXIS INC [US]; PATRICK KEARNEY [US]) 22 March 2012 (2012-03-22) page 66; compounds 174, 177 -----	1-15
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 February 2014		04/03/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Jeanjean, Fabien

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/050163

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/029082 A1 (NOVARTIS AG [CH]; CARAVATTI GIORGIO [CH]; FAIRHURST ROBIN ALEC [GB]; F) 18 March 2010 (2010-03-18) page 112; example 69 -----	1-15
A	WO 2010/071837 A1 (VERTEX PHARMA [US]; CHARRIER JEAN-DAMIEN [GB]; DURRANT STEVEN [GB]; KA) 24 June 2010 (2010-06-24) page 362; claims 1, 5 page 472; claim 225 -----	1-15
A	BIAO JIANG ET AL: "synthesis and cytotoxicity evaluation of novel indolylpyrimidines and indolylpyrazines as potential antitumor agents", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 9, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1149-1154, XP002665650, ISSN: 0968-0896 page 1150; compound 17 -----	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/050163

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2009157880 A1	30-12-2009	EP 2310391 A1	20-04-2011		
		US 2011105500 A1	05-05-2011		
		WO 2009157880 A1	30-12-2009		
WO 2010091824 A1	19-08-2010	CA 2752114 A1	19-08-2010		
		CN 102361872 A	22-02-2012		
		EP 2396331 A1	21-12-2011		
		ES 2435804 T3	23-12-2013		
		JP 2012517965 A	09-08-2012		
		US 2013310362 A1	21-11-2013		
		WO 2010091824 A1	19-08-2010		
		WO 2012037226 A1	22-03-2012	AR 082986 A1	23-01-2013
AU 2011302124 A1	04-04-2013				
CA 2812091 A1	22-03-2012				
EP 2616469 A1	24-07-2013				
JP 2013537231 A	30-09-2013				
TW 201219391 A	16-05-2012				
WO 2012037226 A1	22-03-2012				
WO 2010029082 A1	18-03-2010			AR 073369 A1	03-11-2010
		AU 2009290904 A1	18-03-2010		
		CA 2734819 A1	18-03-2010		
		CN 102149711 A	10-08-2011		
		CO 6351738 A2	20-12-2011		
		DO P2011000070 A	31-03-2011		
		EA 201100447 A1	31-10-2011		
		EC SP11010880 A	29-04-2011		
		EP 2331537 A1	15-06-2011		
		JP 2012502080 A	26-01-2012		
		KR 20110038737 A	14-04-2011		
		MA 32604 B1	01-09-2011		
		NZ 590754 A	31-08-2012		
		PA 8841901 A1	28-06-2010		
		PE 07962011 A1	04-11-2011		
		SM AP201100019 A	06-05-2011		
		SV 2011003853 A	16-05-2011		
		TW 201014851 A	16-04-2010		
		US 2010105711 A1	29-04-2010		
		US 2012263712 A1	18-10-2012		
		US 2014005232 A1	02-01-2014		
		UY 32096 A	30-04-2010		
		WO 2010029082 A1	18-03-2010		
		WO 2010071837 A1	24-06-2010	AR 074822 A1	16-02-2011
				AU 2009327357 A1	28-07-2011
				CA 2747252 A1	24-06-2010
				CN 102300862 A	28-12-2011
EP 2376485 A1	19-10-2011				
JP 2012512906 A	07-06-2012				
KR 20110096158 A	29-08-2011				
NZ 593969 A	29-11-2013				
RU 2011129761 A	20-05-2013				
SG 172248 A1	28-07-2011				
TW 201028404 A	01-08-2010				
US 2010222318 A1	02-09-2010				
WO 2010071837 A1	24-06-2010				

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50	P
C 1 2 Q 1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z

(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 バルラーム, ベルナール・クリストフ  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 4 ティーザー, マックルズフィールド, オルダリー・パー  
ク, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・オルダリー

(72) 発明者 ベリー, ダーヴィッド  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 4 ティーザー, マックルズフィールド, オルダリー・パー  
ク, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・オルダリー, ケア・オブ・アストラゼネカ・イン  
テレクチュアル・プロパティ

(72) 発明者 ドルーブリエ, ベネディクト  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 4 ティーザー, マックルズフィールド, オルダリー・パー  
ク, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・オルダリー, ケア・オブ・アストラゼネカ・イン  
テレクチュアル・プロパティ

(72) 発明者 ハリス, クレイグ・スティーブン  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 4 ティーザー, マックルズフィールド, オルダリー・パー  
ク, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・オルダリー, ケア・オブ・アストラゼネカ・イン  
テレクチュアル・プロパティ

(72) 発明者 ランベルト・ファン・デア・ブレムプト, クリスティーネ・マリー・パウル  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 4 ティーザー, マックルズフィールド, オルダリー・パー  
ク, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・オルダリー, ケア・オブ・アストラゼネカ・イン  
テレクチュアル・プロパティ

(72) 発明者 ウーヴリー, ジル  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 4 ティーザー, マックルズフィールド, オルダリー・パー  
ク, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・オルダリー, ケア・オブ・アストラゼネカ・イン  
テレクチュアル・プロパティ

(72) 発明者 レイド, ゲイリー・パトリック  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 4 ティーザー, マックルズフィールド, オルダリー・パー  
ク, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・オルダリー, ケア・オブ・アストラゼネカ・イン  
テレクチュアル・プロパティ

(72) 発明者 トムキンソン, ゲイリー・ピーター  
イギリス国チェシャー エスケイ 1 0 ・ 2 エヌエイ, マックルズフィールド, チャーター・ウェイ  
, アストラゼネカ

F ターム (参考) 2G045 AA26 CB02 DA13

4B063 QA05 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR07 QS25 QS34 QX02

4C063 AA05 BB01 CC58 DD34 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 BC71 GA07 GA08 GA09 NA14 ZB26 ZC20