

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5792316号
(P5792316)

(45) 発行日 平成27年10月7日(2015.10.7)

(24) 登録日 平成27年8月14日(2015.8.14)

(51) Int. Cl.	F I
C07D 401/14 (2006.01)	C O 7 D 401/14 C S P
A61K 31/497 (2006.01)	A 6 1 K 31/497
A61K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/513
A61K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337
A61K 31/17 (2006.01)	A 6 1 K 31/17

請求項の数 12 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-537756 (P2013-537756)	(73) 特許権者	594197872
(86) (22) 出願日	平成23年11月1日(2011.11.1)		イーライ リリー アンド カンパニー
(65) 公表番号	特表2013-541586 (P2013-541586A)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462
(43) 公表日	平成25年11月14日(2013.11.14)		85 インディアナポリス リリー コー
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/058692		ポレイト センター (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02012/064548	(74) 代理人	100068526
(87) 国際公開日	平成24年5月18日(2012.5.18)		弁理士 田村 恭生
審査請求日	平成26年10月30日(2014.10.30)	(74) 代理人	100100158
(31) 優先権主張番号	61/411, 137		弁理士 鮫島 睦
(32) 優先日	平成22年11月8日(2010.11.8)	(74) 代理人	100138900
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新田 昌宏
		(74) 代理人	100162684
			弁理士 呉 英燦
		(74) 代理人	100176474
			弁理士 秋山 信彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CHK 1 を阻害するのに有用な化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンである化合物、又はその薬学的に許容し得る塩。

【請求項 2】

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンである請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンメタンスルホン酸塩である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン酢酸塩である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミ

10

20

ンヘミシュウ酸塩である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンヘミコハク酸塩である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物又は塩と、薬学的に許容し得る担体、希釈剤、又は賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 8】

癌の治療のための請求項 7 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 9】

癌の治療において電離放射線と同時に、別々に、又は連続して併用して使用するための請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

癌の治療において 1 以上の化学療法剤と同時に、別々に、又は連続して併用して使用するための請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

1 以上の化学療法剤が、5 - フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、ゲムシタピン、メトトレキサート、ペメトレキサド、ドキシソルピシン、エトポシド、シスプラチン及びタキソールからなる群より選択される請求項 10 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 12】

癌が、膀胱癌、結腸癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、中皮腫、腎臓癌及び子宮癌からなる群より選択される請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Chk1 を阻害し、且つデオキシリボ核酸 (DNA) 複製、染色体の分配、及び / 又は細胞分裂の欠陥を特徴とする癌を治療するのに有用なアミノピラゾール化合物又はその薬学的に許容し得る塩に関する。

30

【背景技術】

【0002】

Chk1 は、DNA 損傷チェックポイントシグナル伝達経路においてAtm及び / 又はAtrの下流に存在するタンパク質キナーゼである。哺乳類細胞では、Chk1 は、電離放射線 (IR)、紫外 (UV) 光、及びヒドロキシ尿素を含むDNA損傷を引き起こす剤に反応してリン酸化される。哺乳類細胞においてChk1を活性化するこのリン酸化は、Atrに依存する。Chk1 は、Atr依存性DNA損傷チェックポイントにおいて何らかの役割を果たして、S期及びG2Mにおいて停止させる。Chk1 は、通常サイクリンE / Cdk2を脱リン酸化する二重特異性ホスファターゼであるCdc25Aをリン酸化及び不活化して、S期からの進行を停止させる。また、Chk1 は、サイクリンB / Cdk2 (Cdk1としても知られている) を脱リン酸化する二重特異性ホスファターゼであるCdc25Cをリン酸化及び不活化して、G2と有糸分裂との境界で細胞周期の進行を停止させる (非特許文献1)。いずれの場合も、Cdk活性の制御が細胞周期の停止を誘導して、DNA損傷又は非複製DNAの存在下で細胞が有糸分裂期に入るのを妨げる。

40

【0003】

Chk1 の様々な阻害剤が報告されている。更に、特許文献1には、グルコース代謝を調節すると主張されている特定のアミノピラゾール化合物について開示されている。

【0004】

しかし、DNA損傷剤の増強物質として有効に作用し得る細胞周期チェックポイントの強力な阻害剤であるChk1阻害剤が依然として必要とされている。本発明は、癌の治療

50

に有益であり得る C h k 1 の強力な阻害剤である化合物を提供する。前記化合物は、組織培養及びインビボにおいて DNA 損傷剤で処理することによって誘導される C h k 1 媒介性細胞周期停止を強力に抑止する。更に、本発明の化合物は、癌の治療に有益であり得る C h k 2 の阻害を提供する。更に、本発明の化合物は、C h k 1 阻害に依存する機序によって癌細胞の細胞増殖を阻害する。このような新規化合物は、癌の安全且つ有効な治療に関する要件に対処することができた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第2005/121121号パンフレット

10

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Furnari *et al.*, *Science*, 277:1495-7, 1997年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンである化合物、又はその薬学的に許容し得る塩を提供する。好ましい実施形態は、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンメタンスルホン酸塩、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン酢酸塩、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンヘミシュウ酸塩、及び(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンヘミコハク酸塩である。

20

30

【0008】

具体的な実施形態として、本発明は、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンである化合物を提供する。

【0009】

本発明は、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンのメタンスルホン酸塩、酢酸塩、ヘミシュウ酸塩、及びヘミコハク酸塩を提供する。

40

【0010】

別の実施形態は、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミンの水和物である。

【0011】

本発明は、結晶形の(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン水合物を提供する。

【0012】

また、本発明は、15.73、17.71及び20.12からなる群より選択されるピ

50

ークのうちの1以上と合わせて、5.17で2 ± 0.2のピークを有するX線粉末回折パターンを特徴とする結晶形の(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン水和物を提供する。

【0013】

本発明は、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩と、薬学的に許容し得る担体、希釈剤、又は賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

【0014】

本発明は、薬学的に許容し得る担体、希釈剤、又は賦形剤と、任意で他の治療成分と共に、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩を含む医薬組成物を提供する。

【0015】

本発明は、癌を治療する方法であって、有効な量の(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩を、それを必要としている患者に投与することを含む方法を提供する。更に、本発明は、癌を治療する方法であって、有効な量の(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩と電離放射線とを、それを必要としている患者に投与することを含む方法を提供する。更に、本発明は、癌を治療する方法であって、有効な量の(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩と1以上の化学療法剤とを、それを必要としている患者に投与することを含む方法を提供する。

【0016】

本発明は、癌を治療する医薬を製造するための、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩の使用を提供する。更に、本発明は、癌を治療する医薬を製造するための、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩の使用であって、前記治療が、電離放射線との併用療法を含む使用を提供する。更に、本発明は、併用療法によって癌を治療する医薬を製造するための、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩の使用であって、前記併用療法による治療が、同一の患者に対する前記医薬の投与及び1以上の化学療法剤の投与を含む使用を提供する。

【0017】

本発明は、治療において使用するための、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩を提供する。更に、本発明は、療法において使用するための、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に許容し得る塩、及び電離放射線を提供する。更に、本発明は、療法において使用するための、(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン又はその薬学的に

10

20

30

40

50

許容し得る塩、及び1以上の化学療法剤を提供する。

【0018】

本発明は、癌の治療において使用するための、(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン又はその薬学的に許容し得る塩を提供する。更に、本発明は、癌の治療において使用するための、(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン又はその薬学的に許容し得る塩、及び電離放射線も提供する。更に、本発明は、癌の治療において使用するための、(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン又はその薬学的に許容し得る塩、及び1以上の化学療法剤を提供する。

10

【0019】

本発明は、癌を治療する医薬を製造するための、(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン又はその薬学的に許容し得る塩の使用であって、前記医薬が、電離放射線と同時に、別々に、又は連続して投与される使用を提供する。

【0020】

本発明は、癌を治療する医薬を製造するための、(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン又はその薬学的に許容し得る塩の使用であって、前記医薬が、1以上の化学療法剤も含むか、又は1以上の化学療法剤と同時に、別々に、若しくは連続して投与される使用を提供する。

20

【0021】

本発明は、癌の治療において電離放射線と同時に、別々に、又は連続して併用するための、(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン又はその薬学的に許容し得る塩を提供する。

【0022】

本発明は、癌の治療において1以上の化学療法剤と同時に、別々に、又は連続して併用するための、(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン又はその薬学的に許容し得る塩を提供する。

30

【0023】

更に、本発明は、1以上の化学療法剤が5-フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、ゲムシタピン、メトトレキセート、ペメトレキセド、ドキシソルピシン、エトポシド、シスプラチン及びタキソールからなる群より選択される、本明細書に記載する方法及び使用の好ましい実施形態を提供する。更に、本発明は、2つの化学療法剤が5-フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、ゲムシタピン、メトトレキセート、ペメトレキセド、ドキシソルピシン、エトポシド、シスプラチン及びタキソールからなる群より選択される、本明細書に記載する方法及び使用のより好ましい実施形態を提供する。また、本発明は、化学療法剤が5-フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、ゲムシタピン、メトトレキセート、ペメトレキセド、ドキシソルピシン、エトポシド、シスプラチン及びタキソールからなる群より選択される、本明細書に記載する方法及び使用の更により好ましい実施形態を提供する。本明細書に記載する方法及び使用の好ましい実施形態は、膀胱癌、結腸癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、中皮腫、腎臓癌及び子宮癌からなる群より選択される癌である。

40

【発明を実施するための形態】

【0024】

50

上記で使用されたとき且つ本発明の明細書全体にわたって、特に指示されない限り、以下の用語は、以下の意味を有すると理解するものとする：

【0025】

「薬学的に許容し得る塩」は、本発明の化合物の比較的無毒な無機塩及び有機塩を指す。

【0026】

本発明の化合物は、例えば、多くの無機酸及び有機酸と反応して、薬学的に許容し得る塩を形成することができる。このような薬学的に許容し得る塩及びそれを調製する慣用的な方法は、当該技術分野において周知である。例えば、P. Stahlら、*Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, (VCHA/Wiley-VCH, 2002年); S. M. Bergeら、「Pharmaceutical Salts」, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, 1977年1月を参照されたい。

10

【0027】

本発明の化合物は、好ましくは、1以上の薬学的に許容し得る担体、希釈剤又は賦形剤を用いて医薬組成物として製剤化され、様々な経路によって投与される。好ましくは、このような組成物は、経口、皮下、又は静脈内投与用である。このような医薬組成物及びそれを調製する方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (A. G. 20
ennaroら編, 第21版, Mack Publishing Co., 2005年)を参照されたい。

20

【0028】

用語「治療」、「治療する」、「治療している」等は、障害の進行の遅延又は逆行を含むことを意味する。また、これら用語は、たとえ実際に障害又は状態を消失させなくても、たとえ障害又は状態の進行がそれ自体遅延又は逆行しなくても、障害又は状態のうちの1以上の症状を緩和、寛解、減弱、消失、又は低減することを含む。

【0029】

「治療上有効な量」又は「有効な量」は、研究者、獣医師、医師、又は他の臨床家によって求められている組織、系、動物、哺乳類、又はヒトに対する生物学的若しくは医学的応答、又は望ましい治療効果を誘発する本発明の化合物又はその薬学的に許容し得る塩、あるいは本発明の化合物又はその薬学的に許容し得る塩を含有する医薬組成物の量を意味する。

30

【0030】

実際に投与される本発明の化合物の量は、治療される状態、選択される投与経路、投与される実際の本発明の化合物、個々の患者の年齢、体重、及び応答、並びに患者の症状の重篤度を含む関連状況に基づいて医師が決定するであろう。1日当たりの投与量は、通常、約0.1~約10mg/kg体重の範囲内である。場合によっては、前述の範囲の下限を下回る投与量レベルでも適切な量を超えている場合もあり、更に多い投与量を使用される場合もある。

40

【0031】

本発明の化合物は、当該技術分野において公知である様々な手順、並びに以下の製造例及び実施例に記載される手順により調製され得る。記載される各経路の特定の合成工程を様々な方法で組み合わせる本発明の化合物を調製してもよい。

【0032】

試薬及び出発物質は、概して、当業者が容易に入手可能なものである。他の試薬及び出発物質は、有機化学及び複素環化学の標準的な技術、既知の構造的に類似する化合物の合成に類似する技術、並びに任意の新規手順を含む以下の製造例及び実施例に記載される手順によって作製され得る。以下の製造例及び実施例は、本発明を更に詳細に例証し、化合物の典型的な合成を示すために提供される。本発明の化合物の名称は、Autonomア

50

ドインを備える ISIS Draw 2.5 SP2 によって一般に提供される。

【0033】

本明細書で使用するとき、以下の用語は、指定の意味を有する：「BCA」は、ピシンコニン酸を指し；「BSA」は、ウシ血清アルブミンを指し；「DMSO」は、ジメチルスルホキシドを指し；「DPBS」は、二塩基性リン酸緩衝生理食塩水を指し；「DTT」は、ジチオトレイトールを指し；「EtOAc」は、酢酸エチルを指し；「FBS」は、ウシ胎児血清を指し；「HEPES」は、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸を指し；「MEM」は、最少必須培地を指し；「MeOH」は、メタノールを指し；「PBS」は、リン酸緩衝生理食塩水を指し；「PI」は、ヨウ化プロピジウムを指し；「RNAase」は、リボヌクレアーゼAを指し；「RPMI」は、ロズウェルパーク記念研究所を指し；「TBST」は、トリス緩衝生理食塩水 Tween-20 を指し；「THF」は、テトラヒドロフランを指し；「TR-FRET」は、時間分解蛍光エネルギー転移を指し；「トリス」は、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを指し；「トリトン-X」は、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェニル-ポリエチレングリコール t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノールポリエチレングリコール tert-オクチルフェニルエーテルを指し；「Tween-20」は、ポリソルベート20を指す。

10

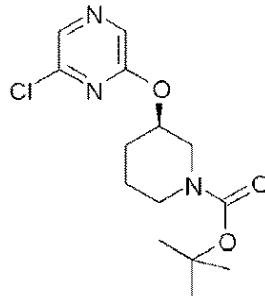
【0034】

製造例1

tert-ブチル(R)-3-(6-クロロピラジン-2-イル)オキシピペリジン-1-カルボキシレート

20

【化1】



30

水素化ナトリウム(225.6g、5.64mol)をTHF(3L)に分散させ、温度を0~5に低下させる。(R)-3-ヒドロキシ-1-bocピペリジン(891.6g、4.43mol)のTHF(3L)溶液を、0~5の温度を維持しながら1時間かけて添加する。反応物を1時間攪拌する。同じ温度を維持しながら、THF(3L)溶液として2,6-ジクロロピラジン(600g、4.03mol)を1.5時間かけて滴下する。反応物を25~30で2時間攪拌し、次いで、氷上に注ぐ。混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出する。抽出物を無水硫酸ナトリウムで乾燥させて、濾過し、濃縮する。残油をヘキサン中5%のジクロロメタンと共に粉碎して、白色の固体として生成物を得る。固体を濾過によって回収し、乾燥させて、1538gの粗物質を得る。粗生成物をヘキサン中5%のジクロロメタンと共に粉碎して、定量的収率で白色の固体を得る。ES

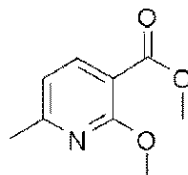
40

【0035】

製造例2

2-メトキシ-6-メチル-ニコチン酸メチルエステル

【化2】



50

窒素下で2-クロロ-6-メチル-ニコチン酸メチルエステル(10.4g、56.52mmol)のMeOH攪拌溶液に、室温のナトリウム(2.58g、113.04mmol)のメタノール(80.0mL)溶液(ナトリウム金属が、窒素雰囲気下でメタノールに溶解している)を添加する。反応混合物を一晩還流させる。反応物を室温に冷却し、酢酸を用いてpHを7に調整する。反応混合物を酢酸エチル(100mL)及び水(30mL)で希釈する。有機層を分離し、酢酸エチル(2×75mL)で水層を抽出する。合わせた有機抽出物をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して粗生成物を得る。収量: 7.25g(71%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃), 8.066-8.047(d, J=7.6Hz, 1H), 6.782-6.764(d, J=7.2Hz, 1H), 4.029(s, 3H), 3.879(s, 3H), 2.483(s, 3H); ES/MS m/z 182.2[M+H]⁺。

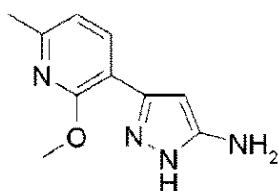
10

【0036】

製造例3

5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イルアミン

【化3】



20

n-BuLi(1.2M、96.0mL、115.6mmol)を-78℃のアセトニトリル(6.08mL、115.4mmol)のTHF(300mL)溶液に添加し、-78℃で30分間攪拌する。THF(200mL)中の2-メトキシ-6-メチル-ニコチン酸メチルエステル(20g、105.1mmol)を添加し、更に30分間-78℃で攪拌する。反応混合物を、水(500mL)を用いて-78℃で冷却し、EtOAc(2×250mL)で洗浄する。水層を分離し、蒸発させる。これをトルエンと共に2回共蒸留させて、3-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-3-オキソ-プロピオニトリルを得る。収量=21.4g(粗製物)。ES/MS m/z 191.1[M+H]⁺。

30

【0037】

3-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-3-オキソ-プロピオニトリル(21g、110.4mmol)のエタノール(200mL)溶液を、密閉したチューブに入れる。ヒドラジン水和物(32.1mL、662.4mmol)及び酢酸(21.0mL)を添加し、反応物を2時間100℃で加熱する。溶媒を蒸発させて除去し、反応混合物をEtOAc(500mL)及び飽和重碳酸ナトリウム溶液(100mL)で希釈する。有機層を分離し、水層をEtOAc(2×250mL)で抽出する。合わせた有機抽出物をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して、粗生成物を得、これを更に精製することなく次の工程で用いる。収量=16.5g(73%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) 11.50(bs, 1H), 7.90(d, J=7.6Hz, 1H), 6.86(d, J=7.6Hz, 1H), 5.88(s, 1H), 4.64(s, 2H), 3.91(s, 3H), 2.38(s, 3H)。

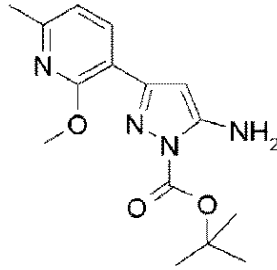
40

【0038】

製造例4

5-アミノ-3-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-ピラゾール-1-カルボン酸tertブチルエステル

【化4】



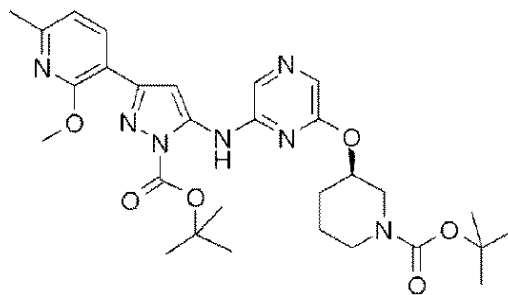
5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イ
 ルアミン (16.0 g、78.3 mmol) の THF (200 mL) 溶液を、0 の Na
 H (鉱油中 60%、3.4 g、85.0 mmol) の THF (200 mL) 攪拌懸濁液に
 ゆっくり添加する。0 で 15 分間後、ジ - tert - ブチルジカーボネート (19.8
 mL、86 mmol) を反応混合物にゆっくり添加し、0 で 30 分間攪拌する。反応混
 合物を氷水 (およそ 250 mL) で冷却し、生成物を酢酸エチル (2 × 500 mL) に抽
 出する。合わせた有機部分を水及び飽和 NaCl 溶液 (200 mL) で洗浄し、無水 Na
 2 SO 4 で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮して、粗物質を得る。この物質をヘキサンと
 共に 2 回粉碎して、18.5 g (78%) の表題化合物を得る。¹ H NMR (400 M
 Hz, DMSO - d 6) 8.05 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 6.90 (d, J =
 7.2 Hz, 1 H), 6.28 (s, 2 H), 5.85 (s, 1 H), 3.90 (s, 3
 H), 2.40 (s, 3 H), 1.56 (s, 9 H)。

【0039】

製造例 5

(R) - 3 - { 6 - [2 - tert - ブトキシカルボニル - 5 - (2 - メトキシ - 6 - メ
 チル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イルアミノ] - ピラジン - 2 - イ
 ルオキシ } - ピペリジン - 1 - カルボン酸 tert - ブチルエステル

【化5】



1,4 - ジオキサン (1.4 L) 中 5 - アミノ - 3 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピ
 リジン - 3 - イル) - ピラゾール - 1 - カルボン酸 tert - ブチルエステル (50.0
 g、164.5 mmol)、tert - ブチル (R) - 3 - (6 - クロロピラジン - 2 -
 イル) オキシピペリジン - 1 - カルボキシレート (56.6 g、180.9 mmol)、
 4,5 - ビス - ジフェニルホスファニル - 9,9 - ジメチル - 9 H - キサンテン (14.
 2 g、24.6 mmol) 及び Cs 2 CO 3 (85.5 g、263 mmol) の混合物を
 2 個の並んだ丸底フラスコに均等に分け、両方を 2 時間アルゴンでパージする。Pd (O
 Ac) 2 (5.4 g、24.6 mmol) を添加し (各容器に半分ずつ)、1 時間パージ
 し続ける。次いで、反応物を 1 時間 90 ~ 95 で加熱する。反応混合物を室温に冷却し
 、合わせ、酢酸エチル (1 L) で希釈する。次いで、混合物を珪藻土を通して濾過し、酢
 酸エチルで洗浄し、濾液を濃縮する。粗生成物を、溶離剤として 15% EtOAc / ヘキ
 サンを用いてシリカゲルで精製して、55 g (収量 57%) の白色粉末を得る。55 g の
 精製生成物を、15 g の同様に調製及び精製した物質 (20 g の 5 - アミノ - 3 - (2 -
 メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - ピラゾール - 1 - カルボン酸 tert -

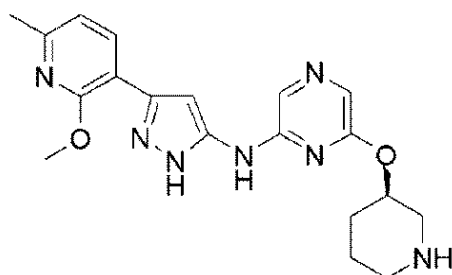
ブチルエステルから得た)と合わせる。合わせた70gの物質をTHF及びメタノール(1.4L)の4:1混合物に溶解させ、Quadrasil(商標)AP(140g)で2時間処理する。反応混合物を珪藻土を通して濾過し、酢酸エチル(4×100mL)で洗浄する。濾液を、再度Quadrasil(商標)AP(140g)と共に2時間攪拌し、上記の通り濾過する。溶媒を蒸発させて、白色の固体として表題化合物を得る。収量=70g(47%)。ES/MS m/z 582.5[M+H]⁺。

【実施例】

【0040】

実施例1

(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミン
【化6】



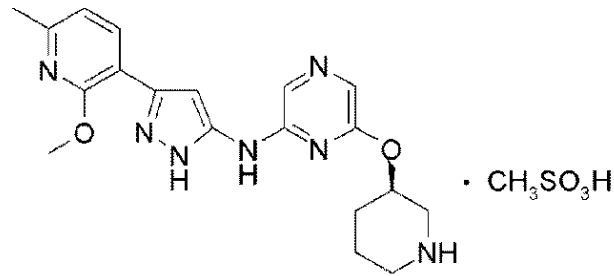
(R)-3-{6-[2-tert-ブトキシカルボニル-5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イルアミノ]-ピラジン-2-イルオキシ}-ピペリジン-1-カルボン酸tert-ブチルエステル(13.0g、22.3mmol)のジクロロメタン(150mL)攪拌溶液に、0で5分間にわたってトリフルオロ酢酸(12.4mL、167mmol)のジクロロメタン(20mL)溶液を添加する。反応物を室温に加熱し、3時間攪拌する。反応物をジクロロメタン(1000mL)で希釈し、次いで、飽和重炭酸ナトリウム溶液(250mL)を添加し、次いで、4時間攪拌する。有機部分を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、蒸発させる。得られる物質をイソプロパノールから結晶化させて、望ましい生成物を得る。収量=7.2g(85%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) 12.40(s, 1H), 9.71(s, 1H), 8.02(d, J=7.6Hz, 1H), 7.97(s, 1H), 7.46(s, 1H), 6.93(d, J=7.6Hz, 1H), 6.91(s, 1H), 4.94-4.86(m, 1H), 3.97(s, 3H), 3.20-3.13(m, 1H), 2.83-2.75(m, 1H), 2.57(dd, J=12.0, 8.4Hz, 1H), 2.53-2.45(m obscured, 1H), 2.42(s, 3H), 2.15-2.05(m, 1H), 1.71-1.63(m, 1H), 1.60-1.49(m, 1H), 1.49-1.40(m, 1H); ES/MS m/z 382.5[M+H]⁺。

【0041】

実施例2

(R)-[5-(2-メトキシ-6-メチル-ピリジン-3-イル)-2H-ピラゾール-3-イル]-[6-(ピペリジン-3-イルオキシ)-ピラジン-2-イル]-アミンメタンスルホン酸塩

【化7】



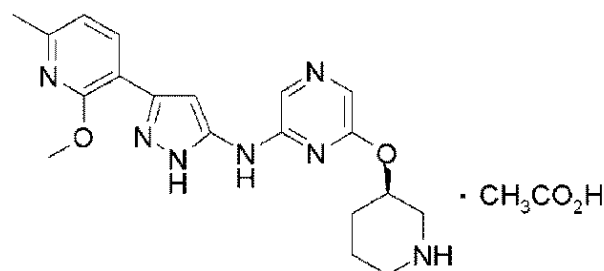
メタンスルホン酸 (0.247 g、2.57 mmol) を、0 の (R) - [5 - (2 -
 -メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6
 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン (0.982 g、2
 . 57 mmol) のジクロロメタン (25 mL) 攪拌溶液に添加する。反応物を室温に加
 温し、45 分間攪拌する。溶媒を蒸発させ、得られる塩をエーテル (10 mL) 及びペン
 タン (10 mL) で連続して洗浄して、望ましい生成物を得る。収量 = 1.139 g (9
 2.6%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆) , 12.5 (bs, 1H)
 , 9.81 (s, 1H) , 8.73 (bs, 1H) , 8.54 (bs, 1H) , 8.0
 7 (s, 1H) , 7.96 (d, J = 7.6 Hz, 1H) , 7.56 (s, 1H) , 6.
 95 (d, J = 7.6 Hz, 1H) , 6.81 (s, 1H) , 5.31 - 5.24 (m,
 1H) , 3.97 (s, 3H) , 3.48 - 3.39 (m, 1H) , 3.39 - 3.30
 (m, 1H) , 3.18 - 3.10 (m, 1H) , 3.10 - 3.01 (m, 1H) , 2
 . 43 (s, 3H) , 2.32 (s, 3H) , 2.03 - 1.85 (m, 3H) , 1.7
 3 - 1.65 (m, 1H) ; ES/MS m/z 382.4 [M+H]⁺。

【0042】

実施例 3

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール
 - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン
 酢酸塩

【化8】



(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾー
 ル - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミ
 ン (0.100 g、0.26 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に、0 のジ
 クロロメタン (1 mL) に溶解している酢酸 (0.015 mL、0.26 mmol) を添
 加する。反応混合物を室温で60分間攪拌し、次いで、溶媒を蒸発させて、残渣を得る。
 残渣を、ジエチルエーテル (20 mL)、次いで n - ペンタン (20 mL) と共に粉砕す
 る。物質を高真空下で4時間乾燥させて、望ましい生成物を得る。収量 = 0.060 g (
 51.8%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆) 12.40 (bs, 1
 H) , 9.70 (s, 1H) , 8.02 (d, J = 7.6 Hz, 1H) , 7.98 (s,
 1H) , 7.46 (s, 1H) , 6.94 (d, J = 7.6 Hz, 1H) , 6.90 (s,
 1H) , 4.97 - 4.38 (m, 1H) , 3.98 (s, 3H) , 3.20 - 3.1
 3 (m, 1H) , 2.83 - 2.74 (m, 1H) , 2.66 - 2.56 (m, 1H) ,
 2.42 (s, 3H) , 2.14 - 2.03 (m, 1H) , 1.89 (s, 3H) , 1.

7.4 - 1.62 (m, 1H), 1.61 - 1.51 (m, 1H), 1.50 - 1.40 (m, 1H), 1.30 - 1.20 (m, 1H); ES/MS m/z 382.5 [M+H]⁺.

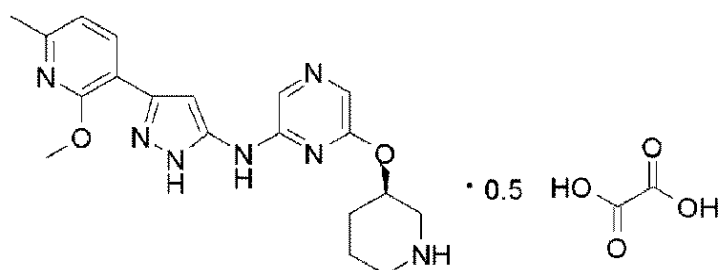
【0043】

実施例 4

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン

ヘミシュウ酸塩

【化 9】



10

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン (0.100 g, 0.26 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に、0 の MeOH (0.1 mL) に溶解しているシュウ酸 (0.012 mg, 0.13 mmol) を添加する。反応混合物を室温で 60 分間攪拌し、次いで、溶媒を蒸発させて、残渣を得る。残渣を、ジエチルエーテル (20 mL)、次いで n - ペンタン (20 mL) と共に粉碎する。物質を高真空下で 4 時間乾燥させて、表題化合物を得る。収量 = 0.095 g (77%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆) 9.77 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.95 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 6.95 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 5.33 - 5.24 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.45 - 3.30 (m, 2H), 3.18 - 3.09 (m, 1H), 3.08 - 2.98 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.05 - 1.85 (m, 2H), 1.74 - 1.63 (m, 1H), 1.18 - 1.10 (m, 1H); ES/MS m/z 382.4 [M+H]⁺.

20

30

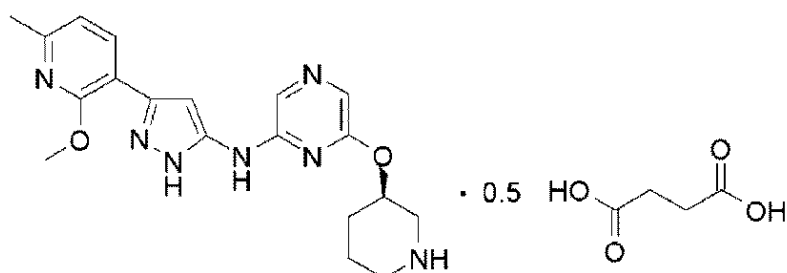
【0044】

実施例 5

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン

ヘミコハク酸塩

【化 10】



40

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン (0.1 g, 0.26 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に、室温のエタノール (1 mL, 50 で溶解) に溶解しているコハク酸 (0.015 g, 0.13 mmol) を添加する。反応混合物を室温で 2 時間攪拌する。溶媒を蒸発させ、得られた残渣を

50

ジエチルエーテル (20 mL)、次いで n - ペンタン (20 mL) と共に粉碎する。物質を高真空下で 8 時間乾燥させて、表題化合物を得る。収量 = 0.102 g (78%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆) 12.4 (bs, 1H), 9.72 (s, 1H), 8.05 - 7.96 (m, 2H), 7.48 (s, 1H), 6.93 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.06 - 4.97 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 2.90 - 2.81 (m, 1H), 2.74 - 2.62 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.30 (s, 2H), 2.09 - 2.01 (m, 1H), 1.80 - 1.60 (m, 2H), 1.57 - 1.46 (m, 1H), 1.14 - 1.10 (m, 1H), 1.10 - 1.00 (m, 1H); ES / MS m / z 382.4 [M + H]⁺。

10

【 0045 】

実施例 6

(R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン水和物

48 時間周囲温度で、5 : 95 水 - エタノール混合物 (10 mL) に (R) - [5 - (2 - メトキシ - 6 - メチル - ピリジン - 3 - イル) - 2 H - ピラゾール - 3 - イル] - [6 - (ピペリジン - 3 - イルオキシ) - ピラジン - 2 - イル] - アミン (52.1 mg ; ES / MS m / z 382.2 [M + H]⁺) を懸濁させ、スラリー状にする。白色の結晶質固体を吸引濾過によって回収する。

20

【 0046 】

35 kV 及び 50 mA で稼働する、Cu K α 源 (λ = 1.54060) 及び Vantec 検出器を備える Bruker D4 Endeavor X 線粉末回折計で結晶質固体の X 線粉末回折 (XRD) パターンを得る。2 θ において 0.009 $^\circ$ の刻み幅で、2 θ において 4 ~ 40 $^\circ$ でサンプルをスキャンする。乾燥粉末を石英サンプルホルダに充填し、スライドガラスを用いて平滑表面を得る。この場合、2 θ における ± 0.2 のピーク位置変動は、指定の結晶形の絶対的同定を妨げることのない電位変化を考慮に入れる。結晶形の確認は、ピーク (単位 : $^\circ 2\theta$)、典型的にはより顕著なピークを識別する任意の独自の組合せに基づいて行ってよい。周囲温度及び相対湿度で回収した結晶形回折パターンを、8.85 及び 26.77 $^\circ 2\theta$ の NIST 675 基準ピークに基づいて調整した。

30

【 0047 】

したがって、化合物のサンプル結晶形は、以下の表 1 に記載する通り、Cu K α 放射を使用する XRD パターンにより、回折ピーク (2 - シータ値) を有すると特徴付けられる。具体的には、パターンは、回折角 0.2 $^\circ$ の許容差で、15.73、17.71 及び 20.12 からなる群より選択されるピークの 1 以上と合わせて 5.17 にピークを含む。

【 0048 】

【表 1】

ヒーク	角度(2- θ °)	強度(%)
1	5.17	100.0
2	8.44	6.3
3	9.58	6.3
4	10.44	6.4
5	13.21	4.4
6	15.73	47.9
7	16.17	6.4
8	17.71	28.1
9	18.00	9.2
10	20.12	15.1
11	23.31	4.9
12	24.52	4.3
13	32.95	4.2

10

【0049】

20

Chk1 生化学アッセイ

Chk1 の生化学的活性に対する化合物の影響は、CHK1 / 基質ペプチドフィルタ結合アッセイを使用して測定することができる。このアッセイでは、Cdc25 のアミノ酸配列残基 206 ~ 225 に基いた合成ペプチドを、組換え型 Chk1 タンパク質キナーゼのホスホ - アクセプター基質として使用する。ホスホ - ドナー基質として ^{33}P - ATP を用いて、Chk1 は、放射性 ^{33}P リン酸基を前記合成ペプチドに転移させる。反応は、陽イオン交換濾紙プレートにペプチド基質を捕捉し、放射される粒子をシンチレーション計数することによって測定される。

【0050】

96 ウェル V 底ポリスチレンプレートでキナーゼ反応 (反応容積 40 μL) を実施する。Chk1 酵素の添加によって反応を開始させる。最終反応条件は、67 mM の HEPES ナトリウム塩 (pH 7.4)、0.007% (v/v) の TRITON (商標) X-100、2.7 mM の DTT、2.7 mM の MgCl_2 、12 μM のペプチド基質、60 μM の ATP ニナトリウム塩、0.75 μCi の ^{33}P - ATP、0.75 nM の活性 Chk1 酵素、4% (v/v) の DMSO、及び化合物の段階希釈物 (1 : 3 段階希釈、20 μM で開始、10 点) である。

30

【0051】

Chk1 酵素の添加に続いて、反応物を 90 分間室温でインキュベートし、次いで、140 μL のリン酸を添加して反応を終了させる。反応混合物をホスホセルロース陽イオン交換紙不透明濾板の対応するウェルに移して、30 分間静置する。濾板を、真空マニホールド中にて、0.5% のリン酸 (v/v) 200 μL で 5 回洗浄する。濾板を一晚乾燥させた後、40 μL の Microscint (商標) - 20 を板の各ウェルに添加する。室温で 4 時間攪拌した後、MicroBeta Trilux マイクロプレートシンチレーションカウンター (Perkin Elmer) を用いて板の放射活性を測定する。

40

【0052】

IC_{50} の測定については、各板において実行した対照から得られるシンチレーション計数比を用いて各濃度の阻害率 (%) を計算する。次いで、Activity Base 4.0 を使用して、10 点化合物濃度データを 4 - パラメータロジスティック方程式に適合させる。得られる曲線から絶対的な IC_{50} 値を計算する。本発明の化合物を、実質的に上記の通り実行するこのアッセイにおいて試験する。例えば、実施例 1 の化合物を試験

50

すると、 $< 0.001 \mu\text{M}$ ($n = 6$) の IC_{50} を有することが見出される。更に、実施例 2 の化合物を試験すると、 $< 0.001 \mu\text{M}$ ($n = 3$) の IC_{50} を有することが見出される。これら結果は、本発明の範囲内の化合物が Chk 1 の強力な阻害剤であることを示す。

【0053】

Chk 2 生化学アッセイ

Chk 2 の生化学的活性に対する化合物の影響は、CHK 2 / 基質ペプチドフィルタ結合アッセイを使用して測定することができる。このアッセイでは、Cdc 25 C のアミノ酸配列残基 206 ~ 225 に基いた合成ペプチドを、組換え型 Chk 2 タンパク質キナーゼのホスホ - アクセプター基質として使用する。ホスホ - ドナー基質として ^{-33}P - ATP を用いて、Chk 2 は、放射性 ^{-33}P リン酸基を前記合成ペプチドに転移させる。反応は、陽イオン交換濾紙プレートにペプチド基質を捕捉し、放射される粒子をシンチレーション計数することによって測定される。

10

【0054】

96 ウェル V 底ポリスチレンプレートでキナーゼ反応 (反応容積 $40 \mu\text{L}$) を実施する。Chk 2 酵素の添加によって反応を開始させる。最終反応条件は、67 mM の HEPES ナトリウム塩 ($\text{pH} 7.4$)、0.007% (v/v) の TRITON (商標) X-100、2.7 mM の DTT、2.7 mM の MgCl_2 、 $12 \mu\text{M}$ のペプチド基質、60 μM の ATP ニトリウム塩、0.75 μCi の ^{-33}P - ATP、1.4 nM の活性 Chk 2 酵素、4% (v/v) の DMSO、及び化合物の段階希釈物 (1 : 3 段階希釈、20 μM で開始、10 点) である。

20

【0055】

Chk 2 酵素の添加に続いて、反応物を 90 分間室温でインキュベートし、次いで、 $140 \mu\text{L}$ のリン酸を添加して反応を終了させる。反応混合物をホスホセルロース陽イオン交換紙不透明濾板の対応するウェルに移して、30 分間静置する。濾板を、真空マニホールド中にて、0.5% のリン酸 (v/v) $200 \mu\text{L}$ で 5 回洗浄する。濾板を一晩乾燥させた後、 $40 \mu\text{L}$ の Microscint (登録商標) - 20 を板の各ウェルに添加する。室温で 4 時間攪拌した後、MicroBeta Trilux マイクロプレートシンチレーションカウンター (Perkin Elmer) を用いて板の放射活性を測定する。

30

【0056】

IC_{50} の測定については、各板において実行した対照から得られる TR - FRET 比を用いて各濃度の阻害率 (%) を計算する。次いで、Activity Base 4.0 を使用して、10 点化合物濃度データを 4 - パラメータロジスティック方程式に適合させる。得られる曲線から絶対的な IC_{50} 値を計算する。本発明の化合物を、実質的に上記の通り実行するこのアッセイにおいて試験する。例えば、実施例 1 の化合物を試験すると、 $0.011 \mu\text{M}$ ($\text{SE} = 0.002$ 、 $n = 6$) の IC_{50} を有することが見出される。更に、実施例 2 の化合物を試験すると、 $0.012 \mu\text{M}$ ($\text{SE} = 0.008$ 、 $n = 3$) の IC_{50} を有することが見出される。これら結果は、本発明の範囲内の化合物が Chk 2 の強力な阻害剤であることを示す。

40

【0057】

Chk 1 の自己リン酸化細胞に基づくアッセイ

Chk 1 の阻害剤は、タンパク質のキナーゼ活性によって、DNA 損傷応答が活性化されている細胞において基質がリン酸化されるのを防ぐ。Chk 1 の容易に検出できる基質は、Chk 1 自体の自己リン酸化部位であるセリン 296 である。以下の免疫プロットアッセイを用いて、Chk 1 のセリン 296 のリン酸化の量、及び間接的に Chk 1 タンパク質キナーゼの活性レベルを測定することができる。10% (v/v) の熱不活化ウシ胎児血清、 $1 \times \text{MEM}$ 非必須アミノ酸、 $1 \times \text{ピルビン酸ナトリウム}$ を添加した、L - グルタミンと共にアール平衡塩類溶液を含有する MEM 中で HeLa 細胞を培養し、24 ウェル細胞培養プレートの 1 ウェル当たり $600 \mu\text{L}$ の MEM 培養培地中に 1×10^5 個の細胞をプレーティングした。37、5% CO_2 及び湿度 95% ~ 100% で 24 時間細胞を

50

インキュベートする。培養培地中 $4 \mu\text{M}$ のドキシソルピシン原液のうちの $16 \mu\text{L}$ を各適切なウェルに添加して、ドキシソルピシンの最終濃度を 100 nM にする。プレートをインキュベータに戻して、更に 24 時間インキュベートした後、 Chk1 阻害剤化合物を添加する。化合物を 100% の DMSO で 10 mM になるように溶解させ、次いで、 40% (v/v) の DMSO で 2 mM に希釈し、次いで、培養培地及び 4% (v/v) の DMSO で $100 \mu\text{M}$ に希釈する。次いで、 $100 \mu\text{M} \sim 0.005 \mu\text{M}$ の範囲の前記化合物の段階希釈物 ($1:3$) を調製する。 $66 \mu\text{L}$ の化合物原液をプレートの適切なウェルに添加して、最終 DMSO 濃度を 0.4% (v/v) に、最終化合物濃度範囲を $1 \mu\text{M} \sim 0.0005 \mu\text{M}$ にする。プレートをインキュベータに戻して、更に 2 時間インキュベートし、次いで、細胞溶解及び処理のために取り出す。次いで、プレートから培地を除去し、各ウェルを氷冷ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) 0.5 mL で一回洗浄し、全ての液体を除去し、残りの手順のためにプレートを氷上に置く。各ウェルに、ホスファターゼ阻害剤カクテル (Sigma 、カタログ番号 $\text{P0044} + \text{P5725}$) 及びプロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤 (Roche Diagnostics 、カタログ番号 11836153001) を含有する細胞抽出バッファからなる $75 \mu\text{L}$ の氷冷溶解バッファを添加する。 10 分間後、各ウェルからこすり取り、氷上の 1.5 mL ポリプロピレン微小遠心管に溶解物を移す。各溶解物を、水/氷浴に懸濁させながら、プレートカップホーンソニケータ (Misonix) で 45 秒間超音波処理する。各サンプル $50 \mu\text{L}$ を、 $4 \times \text{Laemmli}$ サンプルバッファを $25 \mu\text{L}$ 含有する 0.5 mL のポリプロピレン微小遠心管に移し、 5 分間 95°C で加熱し、 -80°C で凍結保存する。残りの溶解物は、タンパク質濃度の測定 (BCA タンパク質アッセイキット、 Thermo Scientific) に使用する。サンプルバッファ中各細胞溶解物 $5 \mu\text{g}$ を E-Page 96 ウェルゲルに適用し、電気泳動に供する。当技術分野において十分に理解されている手順に従って、ゲルから Immobilion-P メンブレン PVDF ($0.45 \mu\text{m}$) にタンパク質を電気転写する (Towbin ら, PNAS (1979 年) 76 (9), $4350-4$)。メンブレンを 10 mM のトリス/ HCl ($\text{pH} 8.0$)、 150 mM の NaCl 及び 0.05% (v/v) の Tween 20 (TBST) で短時間すぎ、 $\text{TBST}/5\%$ (v/v) で再構成した Carnation (登録商標) インスタントミルク中に 25°C で 1 時間浸漬する。メンブレンを 5 分間 TBST で 4 回洗浄し、次いで、ウサギ抗-ホスホ- Chk1 (セリン 296) を適切に希釈した $\text{TBST}/5\%$ (w/v) ウシ血清アルブミン中に 24 時間 4°C で浸漬する。メンブレンを 25°C にて 5 分間 TBST で 4 回洗浄し、次いで、ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしているロバ抗ウサギ IgG (GE Healthcare 、カタログ番号 NA9340) の適切な希釈物を含有する $\text{TBST}/5\%$ ミルク中に 2 時間 25°C で浸漬して、自己リン酸化された Chk1 タンパク質を検出する。メンブレンを、再度 25°C にて 5 分間 TBST で 4 回洗浄する。メンブレンに固定された抗原-抗体-レポーターコンジュゲートを、 FUJIFILM LAS-4000 イメージングシステムを使用して $\text{Super Signal Western FEMTO HRP}$ -検出試薬で検出する。ホスホ- Chk1 (ser 296) のバンド強度を「 Total Lab 」ソフトウェア ($\text{Nonlinear Dynamics}$) を用いて計算する。ドキシソルピシン誘導性 Chk1 自己リン酸化の阻害率 (%) を、以下の式を用いることによって計算する：阻害率 (%) = (サンプルのホスホ Chk1 バンド強度 - ドキシソルピシン無しのネガティブコントロールのホスホ Chk1 バンド強度) / (ドキシソルピシンポジティブコントロールのホスホ Chk1 バンド強度 - ドキシソルピシン無しのネガティブコントロールのホスホ Chk1 バンド強度) $\times 100$ 。本発明の化合物を、実質的に上記の通り実行したこのアッセイにおいて試験する。例えば、実施例 1 の化合物をこのアッセイで試験すると、 $< 0.001 \mu\text{M}$ ($n = 1$) の EC_{50} を有することが見出される。例えば、実施例 3 の化合物をこのアッセイで試験すると、 $< 0.001 \mu\text{M}$ ($n = 1$) の EC_{50} を有することが見出される。これら結果は、本発明の範囲内の化合物が Chk1 の強力な阻害剤であることを示す。

【0058】

10

20

30

40

50

ドキシソルピシン誘導性G2Mチェックポイント廃止のHeLa細胞に基づくAcumenアッセイ

Chk1の阻害剤は、トポイソメラーゼII阻害剤であるドキシソルピシンで処理されたp53-マイナス腫瘍細胞におけるG2M DNA損傷チェックポイントを無効にする。G2Mチェックポイント廃止の指標は、細胞がG2Mチェックポイントを通過し、有糸分裂に入った後に生じるセリン10におけるヒストンH3のリン酸化である。以下のハイコンテンツイメージングアッセイを用いて、細胞におけるヒストンH3のリン酸化を測定することができる。HeLa細胞を、10% (v/v)のFBSを添加したMEM培地で培養し、1ウェル当たり100μLの体積のポリD-リシンでコーティングされた透明底黒色プレートに1ウェル当たり2000個の細胞をプレーティングする。次いで、18~24時間(37℃、5%CO₂及び相対湿度95%)、細胞培養インキュベータにおいてプレートをインキュベートする。最初のインキュベーション後、20μLのMEM培地と625nMのドキシソルピシンを含有している10%のFBSとをプレートの適切なウェルに添加して、最終濃度を125nMにする。プレートを、インキュベータに戻し、G2Mチェックポイントで細胞を停止させるのに十分な24時間インキュベートする。次の日、細胞を化合物で処理する。化合物を10mMになるように100%のDMSOに溶解させ、次いで、50μMで始めて、MEMと4% (v/v) DMSOとで10倍原液に希釈する。次いで、50μM~0.39μMの範囲の化合物の段階希釈物(1:2)を調製する。13μLの化合物原液をプレートの適切なウェルに添加して、最終DMSO濃度を0.4% (v/v)に、最終化合物濃度範囲を5μM~0.039μMにする。プレートをインキュベータに戻して更に7時間インキュベートし、次いで、固定するために取り出す。液体を各ウェルから慎重に除去し、100μLのPREFER(商標)固定剤を添加する。プレートを室温で20分間保持し、固定剤を除去し、次いで、10分間かけてDPBS中0.1% (v/v)のTriton(登録商標)X100を100μL/ウェル添加することにより細胞を透過処理する。溶液を除去し、プレートを1ウェル当たり100μLのDPBSで2回洗浄し、次いで、室温で1時間かけて50μg/mLのリボヌクレアーゼA(RNAase、ウシの膵臓由来)を含有しているDPBS100μLを添加する。RNAase溶液を除去し、ウサギ抗pHH3(ser10)及び1% (w/v)のBSAの1:500希釈物を含有しているRNAase溶液50μLを各ウェルに添加することによって、セリン10(pHH3)においてリン酸化されたヒストンH3の存在について細胞を染色する。プレートを密閉し、一晚4℃で維持する。各プレートを1ウェル当たり100μLのDPBSで2回洗浄することにより一次抗体を除去し、DPBS及び1% (w/v)BSA中Alexa Fluor(登録商標)488ヤギ抗ウサギIgG(H+L)(2mg/mL)の1:750希釈物50μLで置換する。プレートを室温で1時間、光から保護するためにアルミニウム箔で被覆した状態で維持する。プレートを、再度1ウェル当たり100μLのDPBSで2回洗浄し、15nMのヨウ化プロピジウム(原液からPBSで1:100希釈)100μLで置換する。光からプレートを保護するためにプレートを黒いシールで密閉する。プレートを30分間でインキュベートして、核を染色する。488nmの励起(TTP LABTECH LTC)を用いてACUMEN EXPLORER(商標)レーザー走査型蛍光マイクロプレートサイトメーターを用いてプレートをスキャンして、pHH3、並びに2N及び4Nを含むDNA含量を測定する。pHH3陽性細胞は、Alexa488からの519nmにおける平均強度によって同定される。ヨウ化プロピジウム/DNAからの655~705nmにおける合計強度を用いて、細胞周期(2N細胞、4N細胞)における個別細胞及び亜集団を同定する。各集団の最終読出し値は、合計細胞%を正規化し、%pHH3、%2N及び%4Nの最終アッセイ出力を作成することによって決定される。次いで、100nMで阻害剤対照化合物の最大濃度で細胞を処理して、各化合物の最終の活性%を決定することによって、100%の活性を決定する。0%の活性は、化合物未処理に基づく。相対EC₅₀は、ACTIVITY BASE(商標)、エクセルフィット、4パラメータロジスティック適合を用いる曲線適合、equation 205を用いて、100%の対照最大に対する%pHH3を測定

10

20

30

40

50

することによって決定される。本発明の化合物を、実質的に上記の通り実行するこのアッセイにおいて試験する。実施例1の化合物を試験すると、 $0.029 \mu\text{M}$ ($n=1$)の EC_{50} を有することが見出される。実施例2及び実施例3の化合物を試験すると、それぞれ $0.033 \mu\text{M}$ ($n=1$)及び $0.019 \mu\text{M}$ ($n=1$)の EC_{50} 結果を有することが見出される。これら結果は、本発明の範囲内の化合物が、G2M DNA損傷チェックポイントを無効にすることを示す。

【0059】

EC_{tfs} (二倍感作)アッセイ

Chk1の阻害剤は、S期内のチェックポイントを廃止することを通してゲムシタピン (又は他の細胞毒)の抗増殖性活性を増強して、DNA損傷を維持及び増加させることができる。DNA損傷後に腫瘍細胞が継続して増殖する能力は、そのDNAを複製する細胞の能力を測定することにより分析することができる。このアッセイは、細胞がDNA損傷を修復する機会を有した後、細胞がそのDNAを複製する能力を評価する。このアッセイでは、ゲムシタピンの希釈系列で細胞を処理し、次いで、22時間後、実施例3の化合物で処理する。更に44時間後、MTS (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)-2H-テトラゾリウム)色素還元アッセイによって相対的な細胞数を評価する。 EC_{tfs} パラメータは、Chk1阻害が存在しない状態でこのアッセイにおいて測定される、ゲムシタピンのGI90濃度を半分に減少させるのに必要なChk1阻害剤の濃度の尺度である。HT-29細胞(ATCCから入手した)を、RPMI1640及び10% (v/v)の熱不活化FBS中で増殖させる。96ウェル組織培養プレートに100 μL の体積で1ウェル当たり 2.5×10^3 個の細胞をプレーティングし、24時間インキュベートする。マッコイの5A培地(改変)(1x)を用いて6倍濃度のゲムシタピン希釈物を調製し、1ウェル当たり20 μL をウェルに添加する。ゲムシタピン希釈物を、ゲムシタピンの最高最終濃度が1.0 μM になるように設定し、3倍刻みで0.5nMまで希釈する。

【0060】

Chk1阻害剤は、4000x最終濃度になるまでDMSOで希釈し、次いで、マッコイ培地で666倍希釈して、6倍原液を作製することによって調製する。Chk1阻害剤の希釈は、25nMから始めて0.3nMまで2.5倍刻みで進める。ゲムシタピン添加の22時間後に、120 μL の培地及びゲムシタピンを含有するウェルに24 μL の体積のChk1阻害剤を添加する。各ゲムシタピン希釈物に、単一のChk1阻害剤希釈物を添加する。対照ウェルにはDMSO、ゲムシタピン又はChk1阻害剤のみを添加する。Chk1阻害剤の添加の44時間後、CellTiter 96(登録商標)AQueousアッセイ試薬30 μL を各ウェルに添加し、1時間45分間室温で保持する。490nmでSpectraMax 250(Molecular Devices)分光光度計を用いて吸光度を読み取る。SpectraMax分光光度計から得られたデータをGraphPad Prism4.0で分析する。まず、各プレートから得られたデータのマトリクスにおいて全ての他の値から平均した細胞無し(対照)の吸光度を減じる。次に、デュプリケートのデータ点を平均する。各Chk1阻害剤濃度についてデータを正規化し、0%細胞数を補正された $A_{490} = 0$ として設定し、100%細胞数を0nMのゲムシタピン平均値として設定する。次いで、これら結果を変換する。ゲムシタピン濃度をlog濃度に変換し、正規化した細胞数値を阻害率(%)に変換する(阻害率(%) = 100 - 正規化した値)。変換したデータをプロットし、非線形回帰を実施して、各Chk1阻害剤濃度におけるゲムシタピンの IC_{50} 値を推定する。非線形回帰を計算して、傾斜を変化させ、用量応答曲線の頂部又は底部については制約されない。 EC_{tfs} 値を以下の通り計算する: 各Chk1阻害剤濃度におけるゲムシタピンの GI_{50} 値を決定し、プロットし、ゲムシタピン単独の GI_{50} を2分の1に減少させるのに必要なChk1阻害剤の濃度を内挿によって決定する。

【0061】

本発明の範囲内の化合物を、実質的に上記の通り実行するこのアッセイにおいて試験す

10

20

30

40

50

る。例えば、実施例3の化合物を試験すると、 1.0 nM ($SE = 0.1$, $n = 3$)の EC_{50} 値を有することが見出される。更に、 25 nM の化合物が、HT-29結腸癌細胞においてゲムシタピンの EC_{50} を 22 nM から 3 nM へ7分の1に減少させる。単独では、 25 nM の実施例3の化合物は、HT-29細胞の増殖に対する効果をほとんど有しない。これら結果は、本発明の範囲内の化合物が、低濃度でゲムシタピンの抗増殖活性を有効に増強することを示す。

【0062】

【表2】

実施例3の様々な濃度の処理で得られたゲムシタピンの IC_{50} 値

[実施例3], nM	IC_{50} (nM)
0	22
0.256	23
0.64	19
1.60	14
4.0	10
10	4
25	3

10

【0063】

Chk1インビボ標的阻害アッセイ

Calu-6細胞を、増殖培地(10%(v/v)の熱不活化FBS、 $1 \times MEM$ 非必須アミノ酸、 $1 \times$ ピルビン酸ナトリウムを添加した、L-グルタミンと共にアール平衡塩類溶液を含有するMEM)中で培養し、拡大する。細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、増殖培地(血清を含まない)中 1×10^6 個の細胞を等体積のBD Matrigel(商標)マトリクスと混合し、次いで、前照射した(4.5 Gy)ヌードマウス(無胸腺ヌードマウス)の側腹部に皮下注射する。移植(腫瘍サイズ = $150 \sim 200 \text{ mm}^3$)後15日目に、毎日生理食塩水で新たに製剤化したゲムシタピンを、 150 mg/kg の用量で腹腔内経路によって動物に投与する。6時間後、希NaOHの添加によってpHを6.8に調整した0.2% Tween-80/0.5%メチルセルロースで製剤化したChk1化合物を経口投与する。Chk1阻害剤投与の2時間後に動物を屠殺し、腫瘍を摘出し、ホスファターゼ阻害剤カクテル(Sigma、カタログ番号P0044 + P5725)及びプロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤(Roche Diagnostics、カタログ番号11836153001)を含有する氷冷細胞抽出バッファ中で直ちに処理する。15秒間highに設定した電動組織ホモジナイザーを使用して、氷冷した15mLのポリプロピレンコニカルチューブ中にて、 $1.5 \sim 2.0 \text{ mL}$ の溶解バッファで腫瘍を処理する。氷上でサンプルを維持したまま、25ゲージの針を備える1mLのシリンジを通して溶解物を4回吸い出す。0.35mLの腫瘍溶解物を、 $4 \times Laemmli$ サンプルバッファ0.15mLを含有している1.5mLのポリプロピレン微小遠心管に移す。次いで、サンプルを混合し、95°Cで5分間加熱し、Misonix 3000プレートホーンソニケーターで高出力を用いて1分間超音波処理する。次いで、ウエスタンブロットによる標的阻害評価のためにサンプルを氷上で保存するか又は -80°C で保存する。サンプルバッファ中各腫瘍溶解物5 μg をE-Page 96ウェルゲルに適用し、電気泳動に供する。当技術分野において十分に理解されている手順に従って、ニトロセルロースBA83 Protranメンブレン(Whatman、カタログ番号10402405)にタンパク質を転写する(Towbinら, PNAS(1979年)76(9), 4350-4)。次いで、メンブレンを処理して、セリン296が自己リン酸化されているChk1タンパク質を測定する。メンブレンを水、次いで10mMのトリス/HCl(pH 8.0)、150mMのNaCl及び0.05%(v/v)のTween 20(TBST)で短時間すすぎ、TBST/5%(w/v)で再構成したCarnationイン

20

30

40

50

スタントミルク中に25℃で1時間浸漬する。次いで、メンブレンを5分間TBS-Tで4回洗浄する。メンブレンをウサギホスホC h k 1抗-ホスホ-C h k 1(セリン296)の適切な希釈物中TBS-T/5%(w/v)BSAに16時間4℃で浸漬する。次いで、メンブレンを25℃にて5分間TBS-Tで4回洗浄し、次いで、ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしているロバ抗ウサギIgGの適切な希釈物を含有するTBS-T/5%ミルク中に2時間25℃で浸漬して、ホスホ-C h k 1(ser296)を検出する。メンブレンを25℃にて5分間TBS-Tで4回再度洗浄する。メンブレン上に固定された抗原-抗体-リポーターコンジュゲートを、Super Signal Western F emto HRP-検出試薬で検出する。

【0064】

シグナルをFUJIFILM LAS-4000イメージングシステムを使用して検出及び捕捉する。「Total Lab」ソフトウェア(Nonlinear Dynamics)を用いてホスホ-C h k 1(ser296)バンドの強度を計算する。ゲムシタピン誘導性C h k 1自己リン酸化の阻害率(%)を、以下の式を用いることによって計算する:阻害率(%)=(サンプルのホスホC h k 1バンド強度-平均ゲムシタピン(Max)ポジティブコントロールのホスホC h k 1バンド強度)/(平均ネガティブコントロール(Min)のホスホC h k 1バンド強度-平均ゲムシタピン(Max)ポジティブコントロールのホスホC h k 1バンド強度)×100。

【0065】

本発明の範囲内の化合物を、実質的に上記の通り実行するこのアッセイにおいて試験する。例えば、実施例3の化合物を試験すると、1.3mg/kg(n=1)のC h k 1自己リン酸化の標的調節50%有効量(TMED₅₀)を有することが見出される。この結果は、本発明の範囲内の化合物が、インビボにおいてC h k 1タンパク質キナーゼの活性化を強力に阻害することを示す。

【0066】

ヒト腫瘍異種移植片モデル

DNA損傷剤による殺腫瘍を強化するC h k 1阻害剤の能力は、Calu-6肺及びHT-29結腸腫瘍異種移植片有効性モデルを使用してインビボで測定することができる。Calu-6肺癌細胞は、増殖培地(10%(v/v)の熱不活化FBS、1×MEM非必須アミノ酸、1×ピルビン酸ナトリウムを添加したL-グルタミンと共にアール平衡塩類溶液を含有するMEM)中で培養し、HT-29結腸癌細胞(ATCC)は、増殖培地(10%のFBSを添加したマッコイの5A培地)中で培養し、拡大する。

【0067】

細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、増殖培地(血清を含まない)中で5×10⁶個の細胞(HT-29)又は1×10⁶個の細胞(Calu-6)を、等体積のBD Matrigel(商標)マトリクスと混合し、次いで、ヌードマウス(CD-1nu/nu)の側腹部へ皮下注射する。

【0068】

C h k 1阻害剤の皮下投与

移植(150~200mm³)後約16日目に、ゲムシタピンを毎日生理食塩水で新たに製剤化し、60mg/kgの用量で腹腔内経路によって動物に投与する。24時間後、動物に、0.2%Tween-80/0.5%メチルセルロース中の実施例3の化合物を1日2回皮下投与する。2日間の休息後、投与を更に3周期繰り返す(実施例3の化合物を4日間毎に合計4回(Q4D×4)オフセット+24時間)。ビヒクル処理対照群の平均腫瘍サイズからの化合物処理群の平均腫瘍サイズの減少率(%)として腫瘍増殖阻害(TGI)を計算する。本発明の範囲内の化合物を、実質的に上記の通り実行するこのアッセイにおいて試験する。例えば、ゲムシタピンと組み合わせて投与された実施例3の化合物は、HT-29及びCalu-6腫瘍異種移植片モデルの両方において優れた用量依存的な抗腫瘍活性を示すことが見出され、ゲムシタピンのみに対して腫瘍成長阻害が最高6倍増加する。この結果は、皮下に投与された本発明の範囲内の化合物が、ヒト腫瘍異種移

10

20

30

40

50

植片モデルにおけるゲムシタピンの抗腫瘍活性を著しく増加させることを示す。

【 0 0 6 9 】

【表 3】

H T 2 9 皮下

処理	38 日目における %TGI	gem に対する p
ヒヒクル	0	ns
ゲムシタピン 60mpk	11	-
実施例 3 40mpk	26	ns
Gem/Ex3 5mpk	47	0.0226
Gem/Ex3 10mpk	55	0.0024
Gem/Ex3 20mpk	58	0.0008
Gem/Ex3 40mpk	72	<0.0001

ns = 統計的に有意でない

10

20

【 0 0 7 0 】

【表 4】

C a l u 6 皮下

処理	47 日目における %TGI	gem に対する p
ヒヒクル	0	ns
Gem 60mpk	-41	-
実施例 3 40mpk	-19	ns
Gem/Ex3 5mpk	40	0.0049
Gem/Ex3 10mpk	32	0.0156
Gem/Ex3 20mpk	68	<0.0001
Gem/Ex3 40mpk	81	<0.0001

ns = 統計的に有意でない

30

【 0 0 7 1 】

C h k 1 阻害剤の経口投与

移植 (150 ~ 200 mm³) 後約 16 日目に、ゲムシタピンを毎日生理食塩水で新たに製剤化し、40 mg / kg の用量で腹腔内経路によって動物に投与する。24 時間後、動物に、0.2% Tween - 80 / 0.5% メチルセルロース中の Chk1 化合物を 1 日 2 回経口経路により投与する。3 日間の休息後、投与を更に 3 周期繰り返した (実施例 3 の化合物を 5 日間毎に合計 4 回 (Q5D x 4) オフセット + 24 時間)。前段落に記載の通り、腫瘍増殖阻害 (TGI) を計算する。本発明の範囲内の化合物を、実質的に上記の通り実行するこのアッセイにおいて試験する。例えば、実施例 3 の化合物をゲムシタピンと組み合わせて投与すると、HT - 29 及び Calu - 6 腫瘍異種移植片モデルの両方において優れた用量依存的な抗腫瘍活性を示すことが見出され、ゲムシタピンのみに対して腫瘍増殖阻害が最高 2.9 倍増加する。この結果は、経口投与された本発明の範囲内の

40

50

化合物が、ヒト腫瘍異種移植片モデルにおけるゲムシタピンの抗腫瘍活性を著しく増加させることを示す。

【0072】

【表5】

Calu6 経口

処理	37 日目における %TGI	gem に対する p
ビヒクル	0	0.0171
Gem 40mpk	32	-
実施例 3 30mpk	37	ns
Gem/Ex3 15mpk	48	0.0652
Gem/Ex3 30mpk	75	<0.0001

ns = 統計的に有意でない

10

【0073】

【表6】

HT29 経口

処理	50 日目における %TGI	gem に対する p
ビヒクル	0	ns
Gem 40mpk	25	-
実施例 3 30mpk	39	ns
Gem/Ex3 15mpk	68	<0.0001
Gem/Ex3 30mpk	73	<0.0001

ns = 統計的に有意でない

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/7068 (2006.01)	A 6 1 K	31/7068
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/519
A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/704
A 6 1 K	31/7048 (2006.01)	A 6 1 K	31/7048
A 6 1 K	33/24 (2006.01)	A 6 1 K	33/24
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1

- (72)発明者 サジャン・ジョセフ
 アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
- (72)発明者 スサンタ・サマジャール
 アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

審査官 早乙女 智美

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 0 / 0 7 7 7 5 8 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 7 0 5 0 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 6 - 5 2 8 6 6 1 (J P , A)
 特表 2 0 0 7 - 5 1 7 8 4 3 (J P , A)
 特表 2 0 0 8 - 5 4 3 7 5 4 (J P , A)
 特表 2 0 0 8 - 5 0 1 6 9 8 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
 C 0 7 D 4 0 1 / 1 4
 A 6 1 K 3 1 / 4 9 7
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)