

(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2015-533176

(P2015-533176A)

(43) 公表日 平成27年11月19日(2015.11.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 213/64 (2006.01)	C07D 213/64 CSP	4C055
A61K 31/4412 (2006.01)	A61K 31/4412	4C063
A61K 31/5377 (2006.01)	A61K 31/5377	4C086
C07D 405/14 (2006.01)	C07D 405/14	
A61K 31/4545 (2006.01)	A61K 31/4545	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-537018 (P2015-537018)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月15日 (2013.10.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年6月12日 (2015.6.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/065126
 (87) 国際公開番号 W02014/062732
 (87) 国際公開日 平成26年4月24日 (2014.4.24)
 (31) 優先権主張番号 61/714, 145
 (32) 優先日 平成24年10月15日 (2012.10.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/714, 140
 (32) 優先日 平成24年10月15日 (2012.10.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/780, 703
 (32) 優先日 平成25年3月13日 (2013.3.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513137330
 エピザイム, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, テクノロジー ス
 クエア 400, フォース フロア
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 クーンツ, ケビン・ウェイン
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ・01
 801, ウォーバン, ニュー・ビレッジ・
 ロード・8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 置換ベンゼン化合物

(57) 【要約】

本発明は置換ベンゼン化合物に関する。本発明はまた、これらの化合物を含有する医薬組成物、ならびにこれらの化合物および医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することによるガンの治療方法にも関する。本発明はまた、研究または他の非治療目的のためのそのような化合物の使用にも関する。

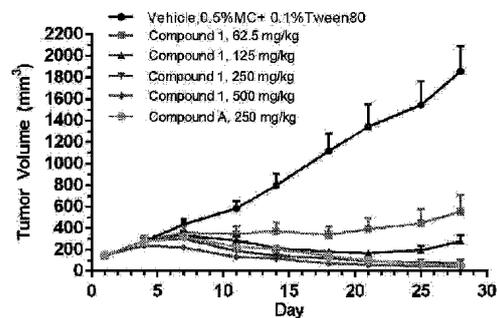
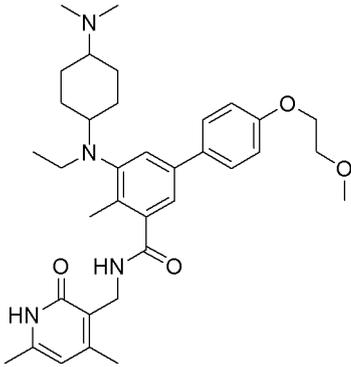


Figure 1

【特許請求の範囲】

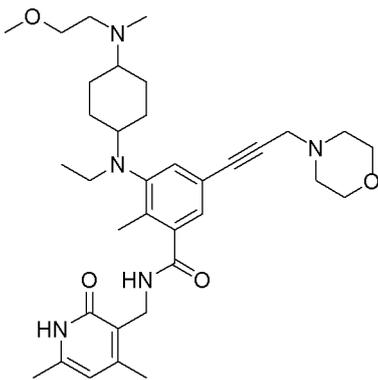
【請求項 1】

【化 1】



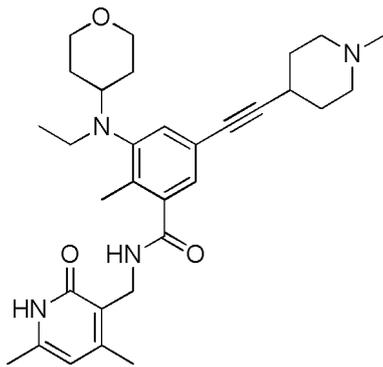
10

【化 2】



20

【化 3】

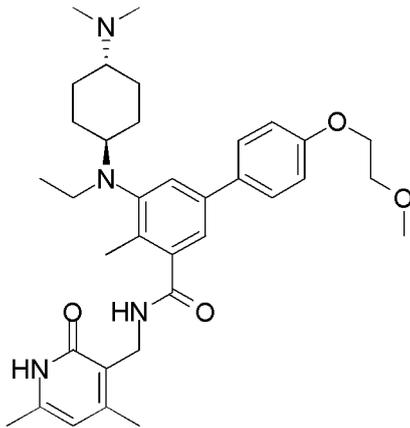


30

およびその医薬として許容される塩から選択される化合物。

【請求項 2】

【化 4】

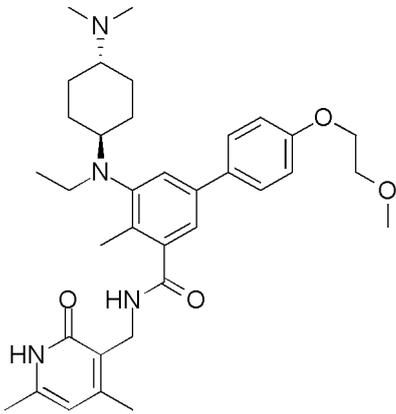


10

またはその医薬として許容される塩である、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

【化 5】



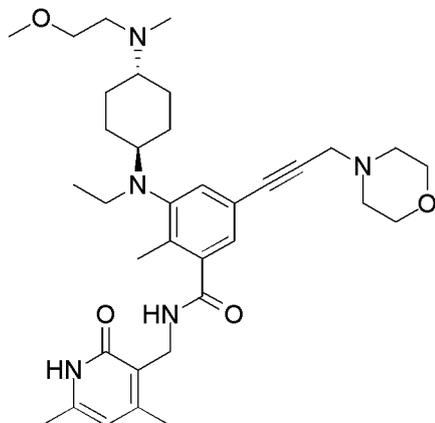
20

である、請求項 1 記載の化合物。

30

【請求項 4】

【化 6】



40

またはその医薬として許容される塩である、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 5】

【請求項 1 1】

前記ガンがリンパ腫、白血病または黒色腫である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ガンが、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、濾胞性リンパ腫、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、混合系統白血病、または骨髄異形成症候群 (MDS) である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ガンが悪性ラブドイド腫瘍または INI 1 欠損腫瘍である、請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

EZH2 介在性障害を治療するための方法で使用するための請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 1 5】

EZH2 介在性障害の前記治療における薬剤の製造のための請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 1 6】

EZH2 介在性障害を治療するための医薬組成物であって、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の化合物を主成分として含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2012年10月15日に出願された米国特許仮出願第61/714,140号、2012年10月15日に出願された同第61/714,145号、2013年3月13日に出願された同第61/780,703号、および2013年3月14日に出願された同第61/786,277号の優先権および利益を請求する。これらの仮出願のそれぞれの全内容は、参照により全体として本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

30

EZH2 介在性障害 (たとえばガン) を治療するために使用できる、EZH2 活性の阻害剤としての新規薬剤が継続的に必要とされる。

【発明の概要】

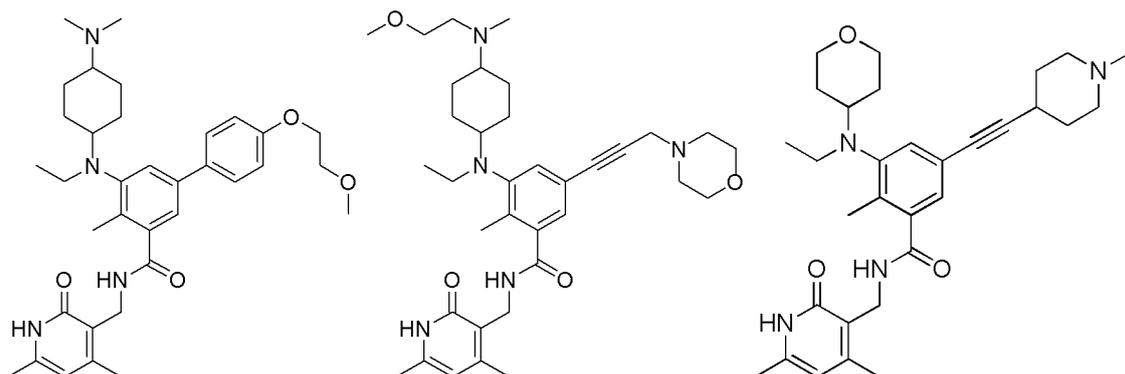
【発明が解決しようとする課題】

【0003】

1つの態様において、本発明は、

【0004】

【化 1】



40

から選択される置換ベンゼン化合物およびその薬剤的に許容される塩を特徴とする。

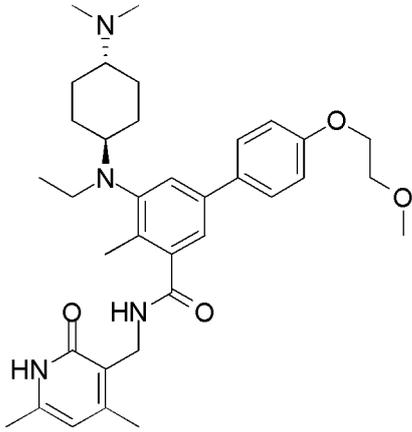
50

【 0 0 0 5 】

例えば、化合物は

【 0 0 0 6 】

【 化 2 】



10

またはその薬剂的に許容される塩である。

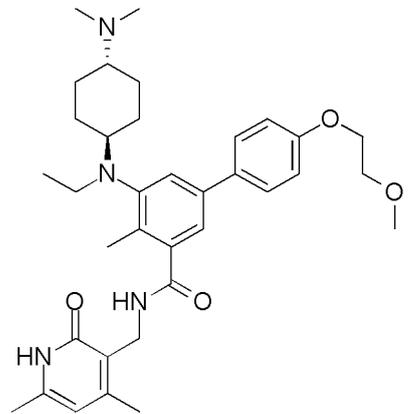
【 0 0 0 7 】

例えば、化合物は

20

【 0 0 0 8 】

【 化 3 】



30

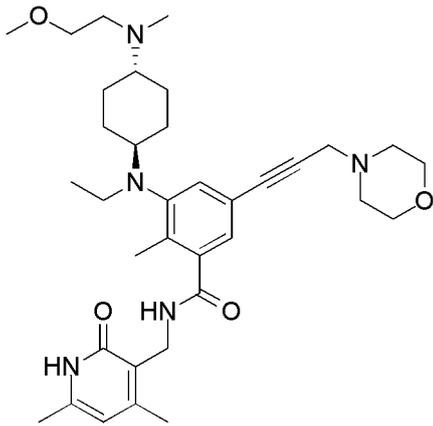
である。

【 0 0 0 9 】

例えば、化合物は

【 0 0 1 0 】

【化4】



10

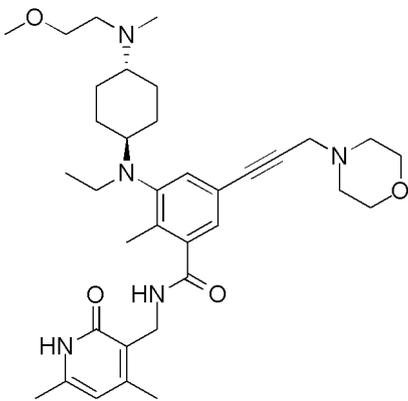
またはその薬剂的に許容される塩である。

【0011】

例えば、化合物は

【0012】

【化5】



20

30

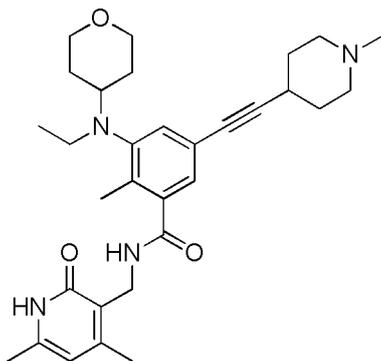
である。

【0013】

例えば、化合物は

【0014】

【化6】



40

またはその薬剂的に許容される塩である。

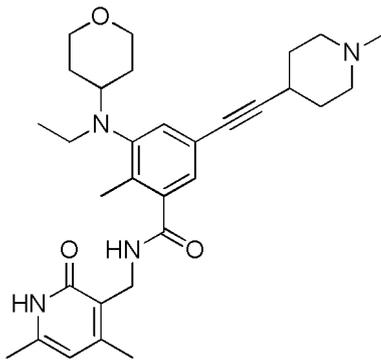
【0015】

例えば、化合物は

50

【 0 0 1 6 】

【 化 7 】



10

である。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、1以上の薬剂的に許容される担体と本明細書中で開示される1以上の化合物とを含む医薬組成物も提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明の別の態様は、EZH2介在性障害を治療または予防する方法である。方法は、それを必要とする対象に治療有効量の本明細書中で開示される1以上の化合物を投与することを含む。EZH2介在性障害は、少なくとも一つにはEZH2の活性が関与する疾患、障害、または状態である。一つの実施形態において、EZH2介在性障害は、増加したEZH2活性と関連する。一つの実施形態において、EZH2介在性障害はガンである。EZH2介在ガンは、リンパ腫、白血病または黒色腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBC)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、濾胞性リンパ腫、慢性骨髄性白血病(CML)、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、混合系統白血病、または骨髄異形成症候群(MDS)であり得る。一つの実施形態において、EZH2介在ガンは、悪性ラブドイド腫瘍またはINI1欠損腫瘍である。悪性ラブドイド腫瘍の組織学的診断は、特有のラブドイド細胞(偏在する核と豊富な好酸性細胞質とを有する大細胞)の同定およびビメンチン、ケラチンおよび上皮膜抗原に対する抗体に関する免疫組織化学に左右される。ほとんどの悪性ラブドイド腫瘍において、染色体バンド22q11.2に位置するSMARCB1/INI1遺伝子は、欠失および/または突然変異によって不活性化される。一つの実施形態において、悪性ラブドイド腫瘍はINI1欠損腫瘍であり得る。

20

30

【 0 0 1 9 】

特に指定のない限り、治療方法の任意の記載は、本明細書中で記載されるような治療または予防を提供するための化合物の使用、ならびにそのような状態を治療または予防するための薬剤を調製するための化合物の使用を包含する。治療は、ヒトまたはヒト以外の動物、例えばげっ歯類および他の疾患モデルの治療を包含する。

【 0 0 2 0 】

さらに、本明細書中で記載する化合物または方法を研究(例えばエピジェネティック酵素の研究)および他の非治療目的のために使用することができる。

40

【 0 0 2 1 】

ある実施形態において、本明細書中で開示される好ましい化合物は、望ましい薬理学的および/または薬物速度論的特性、例えば、低クリアランス率および/または例えばシトクロムP-450酵素の時間に依存し、かつ可逆的な阻害によって評価される併用療法における有害な薬物相互作用の限定的なリスクを有する。

【 0 0 2 2 】

別段の定めがない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。明細書中で、単数形は、文脈上そうでないとする明確な指示がない限り、複数形も包含する。本明細書

50

中で記載するものと類似または等しい方法および材料を本発明の実施または試験で使用できるが、好適な方法および材料を後述する。本明細書中で引用される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照により組み込まれる。本明細書中で引用される参考文献は、請求される発明の先行技術であると認められるものではない。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は単に例示的であり、限定を意図するものではない。本明細書中で開示される化合物の化学構造と名称との間に矛盾がある場合は、化学構造が優先する。

【0023】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、マウスにおけるリンパ腫 K A R P A S - 4 2 2 異種移植片に対する経口投与された化合物1または化合物Aの抗腫瘍効果を示す図である。データは平均±SDを表す(n=10)。

【図2】図2は、マウス体重に対する化合物1または化合物Aの効果を示す図である。データは平均±SDを表す(n=10)。

【図3】図3は、治療後7日もしくは28日での腫瘍における化合物1の濃度または治療後7日での腫瘍における化合物Aの濃度を示す図である。この図中、「A」~「G」は、それぞれ62.5、83.3、125、166.7、250、333.3、および500 mg/kgの投与量の化合物1の投与後7日を示す；「H」および「I」は、それぞれ125および250 mg/kgの投薬量の化合物Aの投与後7日を示す；そして「J」~「L」は、それぞれ62.5、125および250 mg/kgの投薬量の化合物1の投与後28日を示す。

【図4】図4は、治療後7日または28日の結晶中の化合物1または化合物Aの濃度を示す図である。上の破線は化合物Aの血漿タンパク質結合(PPB)補正LCCを示し、下の破線は化合物1のPPB補正LCCを示す。

【図5】図5は、化合物1または化合物Aで7日間治療されたマウス由来のK A R P A S - 4 2 2 腫瘍における全体的H3K27me3メチル化を示す図である。この図中、「A」はビヒクル治療を示す；「B」~「H」は、それぞれ62.5、83.3、125、166.7、250、333.3、および500 mg/kgの投薬量の化合物1での治療を示す；そして「I」および「J」は、それぞれ125および250 mg/kgの投薬量の化合物Aでの治療を示す。

【図6】図6は、化合物1で28日間治療したマウス由来のK A R P A S - 4 2 2 腫瘍における全体的なH3K27me3メチル化を示す図である。

【図7】図7は、化合物1または化合物Aで7日間治療した異種移植腫瘍を有するマウス由来の骨髄における全体的H3K27me3メチル化を示す図である。この図中、「A」はビヒクル治療を示す；「B」~「H」は、それぞれ62.5、83.3、125、166.7、250、333.3、および500 mg/kgの投薬量の化合物1での治療を示す；そして「I」および「J」は、それぞれ125および250 mg/kgの投薬量の化合物Aでの治療を示す。

【図8】図8は、化合物1で28日間治療した異種移植腫瘍を有するマウス由来の骨髄における全体的H3K27me3メチル化を示す図である。この図中、「A」はビヒクル治療を示す；「B」~「E」は、それぞれ62.5、125、250、および500 mg/kgの投薬量の化合物1での治療を示す；そして「F」は250 mg/kgの投薬量の化合物Aでの治療を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明は、新規置換ベンゼン化合物、この化合物を作製するための合成方法、それらを含む医薬組成物、およびこの化合物の様々な使用を提供する。

10

20

30

40

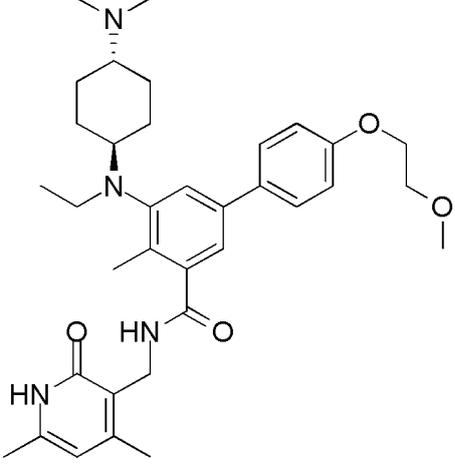
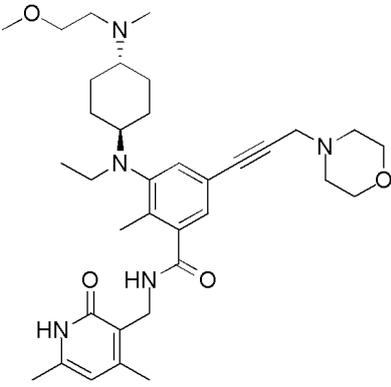
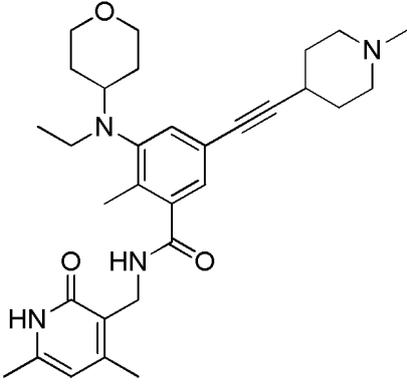
50

【 0 0 2 6 】

本発明の代表的な化合物は、表 1 で列挙した化合物を包含する。

【 0 0 2 7 】

【 表 1 】

化合物番号	構造
1	
2	
1 0 5	

10

20

30

40

【 0 0 2 8 】

本明細書において、化合物の構造式は、場合によっては簡便のためにある 1 つの異性体を表すが、本発明は、幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、立体異性体、互変異性体、エナンチオマー、回轉異性体、ジアステレオマー、ラセミ化合物などのあらゆる異性体を包含し得、すべての異性体が同じレベルの活性を有し得るとは限らないと理解される。加えて、結晶多形が式によって表される化合物について存在し得る。任意の結晶形態、結晶形態混合物、またはその無水物もしくは水和物が本発明の範囲内に含まれることに留

50

意する。

【0029】

「異性」とは、同じ分子式を有するが、それらの原子の結合の配列または空間におけるそれらの原子の配置が異なる化合物を意味する。空間におけるそれらの原子の配置が異なる異性体を「立体異性体」と称する。互いに鏡像でない立体異性体を「ジアステレオマー」と称し、たがに重ねあわすことができない鏡像である立体異性体を「エナンチオマー」または場合によっては光学異性体と称する。反対のキラリティーを有する個々のエナンチオマー形態の等量の混合物を「ラセミ混合物」と称する。

【0030】

「幾何異性体」は、それらの存在が二重結合またはシクロアルキルリンカー（例えば、1,3-シクロブチル）の周りの束縛回転に負うジアステレオマーを意味する。これらの立体配置は、カーン・インゴルド・プレローグ順位則にしたがって、その基が分子中の二重結合の同じ側または反対側にあることを示す、接頭語シスおよびトランス、またはZおよびEによってその名前が区別される。

10

【0031】

本発明の化合物は立体異性体として示すことができると理解すべきである。化合物が立体異性体を有する場合、全ての立体異性体が発明の範囲内に含まれるわけではないということも理解されるべきであり、全ての立体異性体と同じレベルの活性を有し得るとは限らないと理解すべきである。

【0032】

さらに、本明細書中で検討する構造および他の化合物はそのすべてのアトロピック (atropic) 異性体を包含し、全てのアトロピック異性体と同じレベルの活性を有し得るとは限らないと理解される。「アトロピック異性体」は、2つの異性体の原子が空間において異なって配置されている立体異性体の一種である。アトロピック異性体は、中心の結合の周りの大きな基の回転の妨害に起因する束縛回転にそれらの存在を負う。そのようなアトロピック異性体は特徴的には混合物として存在するが、クロマトグラフィ技術の近年の進歩の結果、限定された場合で2つのアトロピック異性体の混合物を分離することが可能になった。

20

【0033】

「互変異性体」は、平衡状態で存在し、1つの異性体から別の異性体へ容易に変換される2以上の構造異性体の1つである。この変換の結果、隣接する共役二重結合のスイッチに付随する水素原子のホルマール移動が起こる。互変異性体は、溶液中互変異性体のセットの混合物として存在する。互変異性化が可能な溶液中で、互変異性体の化学平衡が達成される。互変異性体の正確な比は、温度、溶媒およびpHをはじめとするいくつかの要因に左右される。互変異性化によって相互転換可能である互変異性体の概念は互変異性と呼ばれる。

30

【0034】

可能な互変異性の様々な種類のうち、2つが通常観察される。ケト-エノール互変異性では、電子と水素原子の同時シフトが起こる。環-鎖互変異性は、糖鎖分子中のアルデヒド基 (-CHO) が同じ分子中のヒドロキシ基 (-OH) の1つと反応する結果として起こり、それをグルコースによって示されるような環状 (環の形状) 形態にする。

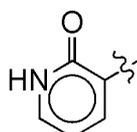
40

【0035】

本明細書中で用いられる場合、

【0036】

【化8】

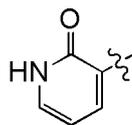


50

のいずれの場合も

【0037】

【化9】



と解釈されるべきである。

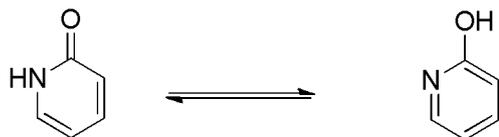
【0038】

一般的な互変異性体対は：ケトン - エノール、アミド - ニトリル、ラクタム - ラクチム、ヘテロ環中のアミド - イミド酸互変異性（例えば、グアニン、チミンおよびシトシンなどの核酸塩基中）、イミン - エナミンおよびエナミン - エナミンである。ケト - エノール平衡の一例は、以下で示すようなピリジン - 2 (1H) - オンと対応するピリジン - 2 - オール間である。

10

【0039】

【化10】



ピリジン-2 (1H) - オン

ピリジン-2-オール

20

【0040】

本発明の化合物は異なる互変異性体として示すことができると理解されるべきである。化合物が互変異性体を有する場合、全ての互変異性体は本発明の範囲内に含まれることが意図されることも理解すべきであり、化合物の命名は互変異性体を排除しない。ある互変異性体は他よりも高いレベルの活性を有し得ると理解される。

【0041】

「結晶多形」、「多形体」または「結晶形態」という語は、化合物（またはその塩もしくは溶媒和物）が異なる結晶充填配置 (packing arrangement) で結晶化することができ、そのすべてが同じ元素組成を有する結晶構造を意味する。異なる結晶形態は、通常、異なるX線回折パターン、赤外スペクトル、融点、密度硬度 (density hardness)、結晶形、光学および電気特性、安定性および溶解性を有する。再結晶溶媒、晶析速度、貯蔵温度および他の因子は、1つの結晶形態が優勢になる原因となり得る。化合物の結晶多形は、異なる条件下での結晶化によって調製できる。

30

【0042】

本発明の化合物は、例えば本明細書中で開示される式のいずれかなどの化合物自体を包含する。本発明の化合物は、妥当な場合、それらの塩、およびそれらの溶媒和物も包含する。塩は、例えば、アニオンと置換ベンゼン化合物上の正電荷を持つ基（例えばアミノ）との間に形成され得る。好適なアニオンとしては、クロリド、ブロミド、ヨージド、スルフェート、ビスルフェート、スルファメート、ニトレート、ホスフェート、シトレート、メタンサルホネート、トリフルオロアセテート、グルタメート、グルクロネート、グルタレート、マレート、マレエート、スクシネート、フマレート、タータレート (tartrate)、トシレート、サリチレート、ラクテート、ナフタレンサルホネート、およびアセテート（たとえば、トリフルオロアセテート）が挙げられる。「薬剤的に許容されるアニオン」という語は、薬剤的に許容される塩を形成するために好適なアニオンを指す。同様に、塩は、カチオンと置換ベンゼン化合物上の負電荷を有する基（例えば、カルボキシレート）との間にも形成され得る。好適なカチオンとしては、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、およびアンモニウムカチオン、例えばテトラメチルアンモニウムイオンが挙げられる。置換ベンゼン化合物はまた、第4窒素原子を含む塩も包含する。

40

50

【0043】

さらに、本発明の化合物、たとえば化合物の塩は、水和もしくは非水和（無水）形態で、または他の溶媒分子との溶媒和物として存在し得る。水和物の非限定的例としては、一水和物、二水和物などが挙げられる。溶媒和物の非限定的例としては、エタノール溶媒和物、アセトン溶媒和物などが挙げられる。

【0044】

「溶媒和物」とは、化学量論量または非化学量論量のいずれかの溶媒を含む溶媒付加形態を意味する。一部の化合物は結晶性固体状態で一定のモル比の溶媒分子をトラップする傾向があり、かくして溶媒和物を形成する。溶媒が水である場合、形成される溶媒和物は水和物であり；溶媒がアルコールである場合、形成される溶媒和物はアルコールートである。水和物は、1以上の水分子と、水がH₂Oとしてその分子状態を保持する物質1分子との組み合わせによって形成される。

10

【0045】

本明細書中で用いられる場合、「アナログ」という語は、構造的に互いに類似しているが、組成が若干異なる（1つの原子が異なる元素の原子によってもしくは特定の官能基の存在下で置換されているか、または1つの官能基が別の官能基によって置換されているような）化合物を指す。しがたって、アナログは、参考化合物に対して、機能および外観が類似または匹敵しているが、構造または起源が異なる化合物である。

【0046】

本明細書中で定義されるように、「誘導體」という語は、共通のコア構造を有し、本明細書中で記載される様々な基で置換されている化合物を指す。たとえば、表1中の化合物はすべて置換ベンゼン化合物であり、共通のコアを有する。

20

【0047】

「生物学的等価体 (bioisostere)」という語は、ある原子または原子団と、別の大まかに類似している原子または原子団との交換から得られる化合物を指す。生物学的等価体置換の目的は、親化合物に類似した特性を有する新規化合物を作製することである。生物学的等価体置換は、物理化学的またはトポロジー的ベースであり得る。カルボン酸生物学的等価体の例としては、限定されるものではないが、アシルスルホンイミド、テトラゾール、スルホネートおよびホスホネートが挙げられる。例えば、Patani and LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176, 1996を参照のこと。

30

【0048】

本発明は、本発明の化合物中に存在する原子のすべての同位体を包含することが意図される。同位体は、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。一般的な例として、限定されるものではないが、水素の同位体は、三重水素および重水素を包含し、炭素の同位体はC-13およびC-14を包含する。

【0049】

本発明は、本明細書中で開示する化合物を合成するための方法を提供する。本発明はまた、実施例で示すようなスキームにしたがって本発明の様々な開示された化合物を合成するための詳細な説明も提供する。

【0050】

記載全体にわたって、組成物が特定の成分を有する、包含する、または含むと記載されている場合、組成物はまた、記載された成分から本質的になる、または記載された成分からなることが想定される。同様に、方法またはプロセスが特定のプロセスステップを有する、包含する、または含むと記載されている場合、そのプロセスはまた、記載された加工ステップから本質的になるか、または記載された加工ステップからなる。さらに、本発明が操作可能なままである限り、ステップの順序またはある動作を実施する順序は重要ではない。さらに、2以上のステップまたは動作を同時に実施することができる。

40

【0051】

本発明の合成法は、様々な官能基を許容でき、したがって、様々な置換された出発物質を使用できる。プロセスは、概してプロセス全体の最後または最後付近で望ましい最終化

50

化合物を提供するが、場合によっては、化合物をその薬剂的に許容される塩にさらに変換することが望ましい可能性がある。

【0052】

本発明の化合物は、市販の出発物質、文献で公知の化合物を使用して、または容易に調製される中間体から、当業者に公知であるか、または本明細書中の教示を照らして当業者には明らかである標準的合成法および手順を使用することにより、様々な方法で調製することができる。有機分子および官能基変換および操作のための標準的合成法および手順は、関連する科学文献または当該技術分野の標準的な教科書から得ることができる。いずれか1つまたはいくつかの出典に限定されないが、古典的教科書、例えば、Smith, M. B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition, John Wiley & Sons: New York, 2001; Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999; R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); and L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) (参照により本明細書中に組み込まれる)は、当業者に公知の有機合成の有用で認識された参考教科書である。合成法の以下の説明は、説明のために設計され、本発明の化合物の調製のための一般的手順を限定するものではない。

10

20

【0053】

当業者は、ある基が保護基の使用により反応条件からの保護を必要とする場合があることを認めるであろう。保護基は、分子中の類似した官能基を区別するために使用することもできる。保護基のリストおよびこれらの基を導入し、除去する方法は、Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999で見いだすことができる。

【0054】

好ましい保護基としては、限定されるものではないが、以下のものが挙げられる：

【0055】

ヒドロキシル部分については：TBS、ベンジル、THP、Ac

30

【0056】

カルボン酸については：ベンジルエステル、メチルエステル、エチルエステル、アリルエステル

【0057】

アミンについては：Cbz、BOC、DMB

【0058】

ジオールについては：Ac(x2)TBS(x2)、または一緒になった場合アセトニド

【0059】

チオールについては：Ac

40

【0060】

ベンゾイミダゾールについては：SEM、ベンジル、PMB、DMB

【0061】

アルデヒドについては：ジメトキシアセタールまたはジエチルアセチルなどのジ-アルキルアセタール

【0062】

明細書中で記載する反応スキームで、複数の立体異性体が生じる可能性がある。特定の立体異性体が表示されていない場合、反応から生じ得るすべての可能な立体異性体を意味すると理解される。当業者は、1つの異性体が優先的に得られるように最適化することができる、または単一の異性体を製造するための新規スキームを考案できることを当業者は

50

認めるであろう。混合物が生じる場合、分取薄層クロマトグラフィー、分取HPLC、分取キラルHPLC、または分取SFCなどの技術を使用して異性体を分離することができる。

- 【0063】
以下の略語を明細書全体にわたって使用し、以下のように定義される：
- 【0064】
Ac アセチル
- 【0065】
AcOH 酢酸
- 【0066】 10
aq. 水性
- 【0067】
BIDまたはb.i.d. bis in die (1日2回)
- 【0068】
BOC tert - ブトキシカルボニル
- 【0069】
Cbz ベンジルオキシカルボニル
- 【0070】
CDCl₃ 重クロロホルム
- 【0071】 20
CH₂Cl₂ ジクロロメタン
- 【0072】
DCM ジクロロメタン
- 【0073】
DMB 2, 4 ジメトキシベンジル
- 【0074】
DMF N, N - ジメチルホルムアミド
- 【0075】
DMSO ジメチルスルホキシド
- 【0076】 30
EAまたはEtOAc 酢酸エチル
- 【0077】
EDCまたはEDCI N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミド
- 【0078】
ESI - エレクトロスプレー 陰イオンモード
- 【0079】
ESI+ エレクトロスプレー 陽イオンモード
- 【0080】 40
EtOH エタノール
- 【0081】
h 時間
- 【0082】
H₂O 水
- 【0083】
HOBT 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール
- 【0084】
HCl 塩化水素または塩酸
- 【0085】 50
HPLC 高性能液体クロマトグラフィー

【0086】		
K ₂ CO ₃	炭酸カリウム	
【0087】		
LC/MS	または LC - MS	液体クロマトグラフィー質量スペクトル
【0088】		
M	モル濃度	
【0089】		
MeCN	アセトニトリル	
【0090】		
min	分	10
【0091】		
Na ₂ CO ₃	炭酸ナトリウム	
【0092】		
Na ₂ SO ₄	硫酸ナトリウム	
【0093】		
NaHCO ₃	重炭酸ナトリウム	
【0094】		
NaHMDs	ナトリウムヘキサメチルジシラジド	
【0095】		
NaOH	水酸化ナトリウム	20
【0096】		
NaHCO ₃	重炭酸ナトリウム	
【0097】		
Na ₂ SO ₄	硫酸ナトリウム	
【0098】		
NMR	核磁気共鳴	
【0099】		
Pd(OH) ₂	二水酸化パラジウム	
【0100】		
PMB	パラメトキシベンジル	30
【0101】		
p . o .	per os	(経口投与)
【0102】		
ppm	100万分の1部	
【0103】		
prep HPLC	分取高性能液体クロマトグラフィー	
【0104】		
PYBOP	(ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート	
【0105】		40
Rt	または RT	室温
【0106】		
TBME	tert - ブチルメチルエーテル	
【0107】		
TFA	トリフルオロ酢酸	
【0108】		
THF	テトラヒドロフラン	
【0109】		
THP	テトラヒドロピラン	
【0110】		50

本発明の化合物は、当業者に周知の様々な方法によって都合よく調製することができる。本明細書中で開示される任意の式を有する本発明の化合物は、市販の出発物質または文献の手順を用いて調製できる出発物質から、下記実施例に示した手順にしたがって調製できる。

【0111】

本明細書中で記載される反応シーケンスおよび合成スキームの間、あるステップの順序、例えば保護基の導入および除去は変更できることに当業者は気づくであろう。

【0112】

本発明の化合物は、EZH2またはその突然変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害し、したがって、本発明の1つの態様では、本明細書中で開示されるある化合物は、EZH2が関与するある状態および疾患を治療または予防する候補である。本発明は、その過程がヒストンまたは他のタンパク質のメチル化状態を調節することによって影響を受ける可能性がある状態および疾患を治療するための方法を提供する。ヒストンのメチル化状態の調節は、今度はメチル化によって活性化される標的遺伝子、および/またはメチル化によって抑制される標的遺伝子の発現レベルに影響を及ぼす可能性がある。そのような治療を必要とする対象に、治療有効量の本発明の化合物、またはその薬剤的に許容される塩、多形体、溶媒和物、もしくは立体異性体を投与することを含む。

10

【0113】

特に指定のない限り、治療方法の任意の記載は、本明細書中で記載されるような治療または予防を提供するための化合物の使用、ならびにそのような状態を治療または予防するための薬剤を調製するための化合物の使用を包含する。治療は、ヒトまたはヒト以外の動物、例えばげっ歯類および他の疾患モデルの治療を包含する。

20

【0114】

さらに別の態様では、本発明は、それを必要とする対象において、ヒストンH3上のリジン27(H3-K27)のモノメチル化~トリメチル化を触媒するPRC2複合体の触媒サブユニットであるEZH2の活性を調節する方法に関する。例えば、方法は、変異EZH2を発現するガンと有する対象に治療有効量の本明細書中で記載される化合物を投与するステップを含み、ここで、化合物(複数可)は、EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害し、それによってガンを治療する。

【0115】

例えば、EZH2介在性ガンは、濾胞性リンパ腫および胚芽中心B細胞様(GCB)サブタイプのびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCl)からなる群から選択される。例えば、ガンはリンパ腫、白血病または黒色腫である。好ましくは、リンパ種は非ホジキンリンパ腫(NHL)、濾胞性リンパ腫またはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。あるいは、白血病は、慢性骨髄性白血病(CML)、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病または混合系統白血病である。

30

【0116】

例えば、EZH2介在性前ガン状態は骨髄異形成症候群(MDS、以前は前白血病と呼ばれていた)である。

【0117】

例えば、EZH2介在性ガンは血液がんである。

40

【0118】

本発明の化合物は、EZH2またはその突然変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害し、したがって、本発明はまた、その過程がヒストンまたは他のタンパク質のメチル化状態を調節することによって影響を受ける可能性がある状態および疾患を治療するための方法も提供し、ここで、前記メチル化状態は少なくとも1つにはEZH2の活性が介在する。本発明の1つの態様では、本明細書中で開示されるある化合物は、ある状態および疾患を治療、または予防するための候補である。ヒストンのメチル化状態の調節は、今度はメチル化によって活性化される標的遺伝子、および/またはメチル化によって抑制される標的遺伝子の発現レベルに影響を及ぼす可能性がある。方法は、そのような治

50

療を必要とする対象に、治療有効量の本発明の化合物を投与することを含む。

【0119】

本明細書中で用いられる場合、「対象」は「それを必要とする対象」と交換可能であり、どちらもEZH2が介在するタンパク質メチル化が関与する障害にかかっている対象、または集団全体に対してそのような障害を発症するリスクが増大している対象を指す。「対象」は哺乳類を包含する。哺乳類は、例えばヒトまたは適切なヒト以外の哺乳類、例えば霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ、ヒツジまたはブタであり得る。対象は、鳥または家禽でもあり得る。1つの実施形態において、哺乳類はヒトである。それを必要とする対象は、ガンまたは前ガン状態を有すると依然に診断または特定された対象であり得る。それを必要とする対象はまた、ガンまたは前ガン状態を有する（例えばかかっている）対象でもあり得る。別法として、それを必要とする対象は、集団全体に対してそのような障害を発症するリスクが増大した対象（すなわち、集団全体に対してそのような障害を発症する経口がある対象）であり得る。それを必要とする対象は前ガン状態を有し得る。それを必要とする対象は、難治性または耐性ガン（すなわち、治療に反応しない、またはまだ治療に反応していないガン）を有し得る。対象は、治療開始時に耐性であり得るか、または治療中に耐性になり得る。いくつかの実施形態では、それを必要とする対象は、ほとんどの最近の治療で寛解後にガンを再発している。いくつかの実施形態では、それを必要とする対象は、がん治療のあらゆる公知の有効な治療を受け、失敗した。いくつかの実施形態では、それを必要とする対象は少なくとも1つの前治療を受けた。好ましい実施形態では、対象はガンまたはガン性状態を有する。例えば、ガンは、リンパ腫、白血病、黒色腫、または横紋筋肉腫である。好ましくは、リンパ腫は、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫またはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。あるいは、白血病は慢性骨髄性白血病（CML）である。前ガン状態は、骨髄異形成症候群（MDS、以前は前白血病と呼ばれていた）である。

10

20

【0120】

本明細書中で用いられる場合、「治療する（treatingまたはtreat）」は、疾患、状態、または障害と闘うための患者の管理および看護を表し、本発明の化合物、またはその薬剤的に許容される塩、多形体もしくは溶媒和物を投与して、疾患、状態または障害の症状または合併症を軽減する、あるいは疾患、状態または障害を除去することを含む。「治療する」という語はまた、インビトロの細胞または動物モデルの処置も包含し得る。

30

【0121】

本発明の化合物、またはその薬剤的に許容される塩、多形体もしくは溶媒和物は、関連する疾患、状態または障害を予防するため、あるいはそのような目的のための好適な候補を特定するために使用することもできる。本明細書中で用いられる場合、「予防する（preventing、prevent）」または「～から保護する」は、そのような疾患、状態または障害の症状または合併症の開始を減少または除去することを記載する。

【0122】

EZH2の単一アミノ酸残基（たとえば、Y641、A677、およびA687）でのEZH2遺伝子の点突然変異はリンパ腫と関連づけられることが報告されている。EZH2突然変異体および突然変異の検出方法および突然変異関連障害の治療方法のさらなる例は、例えば、その全体が参照により全体として本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第US20130040906号で記載されている。

40

【0123】

当業者は、本明細書中で開示される公知技術または同等の技術の詳細な説明に関して一般的な参考書を参照できる。これらの教科書には、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000); Coligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna et al., Current Protocols in Pharmacology, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl

50

et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics (1975), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition (1990)が含まれる。これらの文書も、もちろん本発明の態様の作製または使用において参照することができる。

【0124】

本明細書中で用いられる場合、「併用療法」または「同地治療」は、本発明の化合物、またはその薬剤的に許容される塩、多形体もしくは溶媒和物、ならびにこれらの治療薬の相互作用から有益な効果を提供することを意図される特定の治療計画の一部として少なくとも第2の薬剤の投与を含む。組み合わせの有益な効果としては、限定されるものではないが、治療薬の組み合わせに起因する薬物動態または薬力学的相互作用があげられる。

10

【0125】

本発明はまた、少なくとも1つの薬剤的に許容される賦形剤または担体と組み合わせられた本明細書中で開示される化合物を含む医薬組成物も提供する。

「医薬組成物」は、対象への投与に適した形態の本発明の化合物を含む配合物である。1つの実施形態において、医薬組成物はバルクで、または単位投与形態である。単位投与形態は、例えば、カプセル、IVバッグ、錠剤、エアゾル吸入具上の単一ポンプ(single pump)またはバイアルをはじめとする様々な形態のいずれかである。単位用量の組成物の活性成分(たとえば、開示された化合物またはその塩、水和物、溶媒和物もしくは異性体の処方)の量は有効量であり、関連する特定の治療によって変わる。患者の年齢および状態に応じて投薬量に所定の変動を加える必要がある場合があることを当業者は理解するであろう。投薬量はまた、投与経路にも依存する。経口、肺、直腸、非経口、経皮、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、吸入、口腔、舌下、胸膜内、くも膜下腔内、鼻腔内などをはじめとする様々な経路が想定される。本発明の化合物の局所または経皮投与用の投与形態としては、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、貼付剤および吸入剤が挙げられる。1つの実施形態では、活性化合物を無菌条件下で薬剤的に許容される担体、必要とされる任意の防腐剤、緩衝液、またはプロペラントと混合する。

20

【0126】

本明細書中で用いられる場合、「薬剤的に許容される」という表現は、健全な医学的判断の範囲内であり、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症がなくヒトおよび動物の組織と接触した使用に好適であり、妥当な損益比で釣り合う化合物、アニオン、カチオン、材料、組成物、担体、および/または投与形態を指す。

30

【0127】

「薬剤的に許容される賦形剤」とは、一般的に安全、非毒性で、生物学的にも、またその他でも望ましくないものではない賦形剤を意味し、獣医学的用途ならびにヒト製薬学的用途について許容される賦形剤を包含する。明細書および特許請求の範囲で使用される「薬剤的に許容される賦形剤」は、1以上のそのような賦形剤を包含する。

【0128】

本発明の医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように処方される。投与経路の例としては、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口(例えば吸入)、経皮(局所)、および経粘膜投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る:滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒;抗菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン;抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム;キレート剤、例えばエチレンジアミンテトラ酢酸;緩衝液、例えばアセテート、市トレートまたはホスフェート、ならびに塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性調節剤。pHは酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムで調節することができる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または複数回投与用バイアル中に封入することができる。

40

【0129】

本発明の化合物または医薬組成物を、化学療法のために現在使用される周知の方法の多

50

くで対象に投与することができる。例えば、ガンの治療に関しては、本発明の化合物を腫瘍に直接注入、血流もしくは体腔中に注入または経口接種または貼付剤で皮膚を通して適用することができる。選択される用量は、有効な治療をもたらすために充分でなければならないが、許容されない副作用を引き起こすほど高くてはならない。疾患状態（例えば、ガン、前ガン状態、およびその他）ならびに患者の健康は、治療中または治療後妥当な期間、注意深くモニタリングしなければならない。

【0130】

「治療有効量」という語は、本明細書中で用いられる場合、特定された疾患もしくは状態を治療、改善、または予防する、あるいは検出可能な治療効果または阻害効果を示す医薬品の量を指す。効果は、当該技術分野で公知の任意のアッセイ法によって検出できる。対象に関する正確な有効量は、対象の体重、サイズ、および健康；状態の性質および程度；ならびに投与のために選択された治療または治療の組み合わせに左右される。所与の状況に関する治療有効量は、臨床医の技術および判断の範囲内である日常的な実験によって決定することができる。好ましい態様において、治療される疾患または状態はガンである。別の態様では、治療される疾患または状態は細胞増殖性障害である。

10

【0131】

任意の化合物について、治療有効量は、例えば新生細胞の細胞培養において、または動物モデル、通常はラット、ウサギ、イヌ、もしくはブタにおいてのいずれかですまず推定することができる。動物モデルは、適切な濃度範囲および投与経路を決定するためにも使用できる。そのような情報は次いでヒトにおける投与のために有用な用量および経路を決定するために使用できる。治療/予防効果および毒性、例えばED₅₀（集団の50%で治療上有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%に対して致死的な用量）は、細胞培養または実験動物における標準的な調剤手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との用量比は治療指数であり、これは比LD₅₀/ED₅₀として表すことができる。大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。投薬量は、用いられる投与形態、患者の感受性、および投与経路に応じて個々の範囲内で変動し得る。

20

【0132】

十分なレベルの活性剤（複数可）を提供するため、または所望の効果を維持するために、投薬量および投与を調節する。考慮され得る因子としては、疾患状態の重篤度、対照の全体的健康状態、対照の年齢、体重、および性別、食事、投与時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応感受性、ならびに治療に対する寛容性/応答が挙げられる。長時間作用型医薬組成物は、特定の処方半減期およびクリアランス率に応じて、3～4日ごと、毎週、または2週間ごとに1回投与することができる。

30

【0133】

本発明の活性化合物を含む医薬組成物は、一般的に公知の方法で、例えば通常の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、ゲル化（levigating）、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥法によって製造することができる。医薬組成物は、活性化合物を薬剤敵意使用できる製剤に加工するのを促進する賦形剤および/または補助薬を含む1以上の薬剤的に許容される担体を使用する通常の方法で処方することができる。もちろん、適切な処方、選択された投与経路に左右される。

40

【0134】

注射用途に好適な医薬組成物は、無菌注射溶液もしくは分散液の即時調製のための無菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および無菌粉末を含む。静脈内投与に関して、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremonophor EL（商標）（BASF、ニュージャージー州パーシパニー）またはリン酸塩緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は無菌でなければならない、容易に注射針に通過する程度まで流動性でなければならない。それは、製造および貯蔵条件下で安定でなければならない、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、ならびにそれらの好適な混合物を含む溶媒また

50

は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合は必要とされる粒子サイズの維持、そして界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の予防は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの様々な抗菌剤および抗真菌剤によって達成できる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば糖、マンニトールおよびソルビトールなどのポリアルコール、ならびに塩化ナトリウムを含むのが好ましい。注射可能な組成物の持続的吸収は、組成物中に、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによってもたすことができる。

【0135】

無菌注射溶液は、活性化化合物を必要とされる柳雄で適切な溶媒中、上述の成分の1つまたは組み合わせとともに組み入れ、続いて濾過滅菌することによって調製できる。概して、分散液は、塩基性分散媒および上述のものからの必要とされる他の成分を含む無菌ビヒクル中に活性化化合物を組み入れることによって調製される。無菌注射溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これによって活性成分の粉末と、あらかじめ滅菌濾過されたその溶液からの任意のさらなる所望の成分が得られる。

【0136】

経口組成物は概して不活性希釈剤または可食性の薬剂的に許容される担体を含む。それらはゼラチンカプセル中に封入することができるか、または圧縮して錠剤にすることができる。経口治療投与のために、活性化化合物を賦形剤とともに組み入れることができ、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用することができる。経口組成物は、洗口剤として使用される流体担体を使用して調製することもでき、この場合、流体担体中の化合物を経口適用し、くちゅくちゅし、吐き出すかまたは飲み込む。薬剂的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料を組成物の一部として含めることができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは、以下の成分のいずれか、または類似の性質の化合物を含み得る：バインダー、例えば微結晶セルロース、トラガカントガムもしくはゼラチン；賦形剤、例えばデンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、Primogel、もしくはコーンスターチ；潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムまたはSterotes；流動促進剤、例えばコロイド状二酸化珪素；甘味剤、例えばスクロースもしくはサッカリン；または香味剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジフレーバー。

【0137】

吸入による投与のために、化合物は、好適なプロペラント、例えば二酸化炭素などのガスを含む加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアゾルスプレーの形態で送達される。

【0138】

全身投与は、経粘膜または経皮手段によるものでもあり得る。経粘膜または経皮投与に関しては、透過されるバリヤに適切な浸透剤を処方で使用する。そのような浸透剤は、概して当該技術分野で公知であり、例えば経粘膜投与については、洗剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用により達成することができる。経皮投与のために、活性化化合物は、当該技術分野で一般的に公知の軟膏、軟膏(salve)、ゲル、またはクリームに処方される。

【0139】

活性化化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムをはじめとする制御放出処方などの、身体からの迅速排除から化合物を保護する薬剂的に許容される担体を用いて、活性化化合物を調製できる。生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を使用できる。そのような処方の調製のための方法は、当業者には明らかである。材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手することもできる。リボソーム懸濁液(ウイル

10

20

30

40

50

ス抗原に対するモノクローナル抗体で感染した細胞を標的とするリボソームを含む)は、薬剂的に許容される担体として使用することもできる。これらは、当業者に公知の方法、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されているようにして調製することができる。

【0140】

投与の容易性および投薬量の均一性のために、単位投与形態の経口または非経口組成物に処方することが特に有利である。本明細書中で用いられる場合、単位投与形態は、治療される対象に単位投薬量として適した物理的に独立した単位を指す；各単位は、必要とされr 鵜医薬担体と組み合わせて所望の治療効果をもたらすように計算されたあらかじめ決められた量の活性化化合物を含む。本発明の単位投与形態についての明細は、活性化化合物の独自の特性および達成される特定の治療効果によるか、または直接依存して決定される。

10

【0141】

治療への応用で、本発明にしたがって使用される医薬組成物の投薬量は、選択された投薬量に影響を及ぼす他の因子の中でも、薬剤、受容患者の年齢、体重、および臨床症状、ならびに治療を施す臨床医または開業医の経験および判断によって変わる。概して、用量は、腫瘍成長の遅延、およびこのましくは退行をもたらす、そしてまた好ましくはガンの完全縮小を引き起こすのに充分でなければならない。投薬量は、1日あたり約0.01mg/kgから1日あたり約5000mg/kgの範囲であり得る。好ましい態様において、投薬量は1日あたり約1mg/kgから1日あたり約1000mg/kgの範囲であり得る。1つの態様では、用量は、単回、分割、または持続投与量で、約0.1mg/日~約50g/日；約0.1mg/日~約25g/日；約0.1mg/日~約10g/日；約0.1mg~約3g/日；または約0.1mg~約1g/日の範囲内である（この用量は、患者の体重(kg)、体表面積(m²)、および年齢(歳)について調節することができる)。医薬品の有効量は、臨床医または他の資格のある観察者によって指摘される客観的に確認可能な改善を提供するものである。例えば、患者における腫瘍の退縮は、腫瘍の直径に関連して測定することができる。腫瘍の直径の減少は退縮を意味する。退縮は、治療をやめた後に腫瘍が再発しないことによっても示される。本明細書中で用いられる場合、「効果的な投薬量(dosage effective manner)」とは、対象または細胞において所望の生物学的効果をもたらす活性化化合物の量を指す。

20

【0142】

医薬組成物を容器、パック、またはディスペンサー中に投与のための使用説明書とともに含めることができる。

30

【0143】

本発明の化合物はさらに塩を形成する可能性がある。これらの形態のいずれも請求される発明の範囲内に含まれることが想定される。

【0144】

本明細書中で用いられる場合、「薬剂的に許容される塩」は、親化合物がその酸または塩基塩を作製することによって修飾される本発明の化合物の誘導体を指す。薬剂的に許容される塩の例としては、限定されるものではないが、アミン、アルカリなどの塩基性残基の鉱酸もしくは有機酸塩またはカルボン酸などの酸性残基の有機塩などが挙げられる。薬剂的に許容される塩としては、例えば非毒性無機または有機酸から形成される親化合物の通常非毒性塩または第4アンモニウム塩が挙げられる。例えば、そのような通常非毒性塩としては、限定されるものではないが、2-アセトキシ安息香酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、酢酸、アスコルビン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、重炭酸、炭酸、クエン酸、エドト酸、エタンジスルホン酸、1,2-エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、グリコール酸、グリコリルアルサルニル酸(glycollyarsanilic)、ヘキシルレゾルシン酸、ヒドラバミン酸、臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロキシナフトエ酸、イソチオン酸、乳酸、ラクチオン酸、ラウリルスルホン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ナブシル酸、硝酸、シュウ酸、パモ酸、パントテン酸、フェニル酢酸

40

50

、リン酸、ポリガラクトロン酸、プロピオン酸、サリチル (salicylic) 酸、ステアリン酸、スパセチン酸、コハク酸、スルファミン酸、スルファニリン酸、硫酸、タンニン酸、酒石酸、トルエンスルホン酸、および一般的に存在するアミン酸、例えばグリシン、アラニン、フェニルアラニン、アルギニンなどから選択される無機および有機酸由来のものが挙げられる。

【0145】

薬剂的に許容される他の例としては、ヘキサン酸、シクロペンタンプロピオン酸、ピルビン酸、マロン酸、3 - (4 - ヒドロキシベンゾイル) 安息香酸、桂皮酸、4 - クロロベンゼンスルホン酸、2 - ナフタレンスルホン酸、4 - トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、4 - メチルピシクロ - [2.2.2] - オクト - 2 - エン - 1 - カルボン酸、3 - フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、第3ブチル酢酸、ムコ酸などが挙げられる。本発明はまた、親化合物中に存在する酸性プロトンが、金属イオン、例えばアルカリ金属イオン、アルカリ土類金属、またはアルミニウムイオンによって置換されている場合に形成される塩；またはエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N - メチルグルカミンなどの有機塩基との配位体を包含する。塩形態において、化合物と塩のカチオンまたはアニオンとの比は、1 : 1、または1 : 1以外の任意の他の比、例えば3 : 1、2 : 1、1 : 2、または1 : 3であり得ると理解される。

10

【0146】

薬剂的に許容される塩に関するすべての言及は、同じ塩の本明細書中で定義されるような溶媒付加形態 (溶媒和物) または結晶形態 (多形体) を包含すると理解されるべきである。

20

【0147】

化合物、またはその薬的に許容される塩は、経口、経鼻、経皮、肺、吸入、口腔、舌下、腹腔内 (intraperitoneally)、皮下、筋肉内、静脈内、直腸、胸膜内、くも膜下腔内および非経口投与される。1つの実施形態では、化合物を経口投与する。当業者はある投与経路の利点を認めるであろう。

【0148】

化合物を利用する投薬計画は、患者のタイプ、種、年齢、体重、性別および医学的状態；治療される状態の重篤度；投与経路；患者の腎機能および肝機能；および用いられる特定の化合物またはその塩をはじめとする様々な因子にしたがって選択される。通常の技術を有する医師または獣医師は状態を予防、対抗または進行を阻止するために必要な薬物の有効量を容易に決定し、処方することができる。

30

【0149】

開示された本発明の化合物の処方および投与のための技術は、Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995)で見出すことができる。1つの実施形態において、本明細書中で記載される化合物、およびその薬剂的に許容される塩を、薬剂的に許容される担体または希釈剤と組み合わせた製剤で使用する。好適な薬剂的に許容される担体には、不活性固体フィラーまたは希釈剤および水溶液または有機溶液が含まれる。化合物は、そのような組成物中、本明細書中で記載される範囲内の所望の投与量を提供するために十分な量で存在する。

40

【0150】

本明細書中で用いられるすべてのパーセンテージおよび比は、別段の指示がない限り、重量基準である。本発明の他の特徴および利点は、様々な実施例から明らかである。提供した実施例は、本発明の実施に有用な様々な成分および方法を示す。実施例は請求される発明を限定しない。本開示に基づいて、当業者は、本発明の実施に有用な他の成分および方法を特定でき、利用できる。

【0151】

本明細書中で記載される合成スキームおよび化学構造において、化合物は、簡単にするために1つの特定の立体配置 (例えば1つの特定の立体異性体を表示または非表示) で描くことができる。そのような特定の立体配置は、本発明を1つまたは別の異性体、互変異

50

性体、位置異性体または立体異性体に限定すると解釈されるべきではなく、また異性体、互変異性体、位置異性体または立体異性体を排除するものでもない；しかしながら、所与の異性体、互変異性体、位置異性体または立体異性体は、別の異性体、互変異性体、位置異性体、または立体異性体よりも高い活性レベルを有し得ると理解される。

【0152】

上述の方法によって設計、選択および/または最適化された化合物は、一旦製造されると、化合物が生物学的活性を有するかどうかを判定する当業者に公知の様々なアッセイを使用して特徴づけることができる。例えば、分子は、限定されるものではないが、それらが予想される活性、結合活性、および/または結合特異性を有するかどうかを判定するための後述するアッセイをはじめとする通常のアッセイによって特徴づけることができる。

10

【0153】

さらに、ハイスループットスクリーニングを使用して、そのようなアッセイを用いる分析を迅速化することができる。その結果、本明細書中に記載される分子を活性について、当該技術分野で公知の技術を用いて迅速にスクリーニングすることが可能であり得る。

ハイスループットスクリーニングを実施するための一般的な方法は、例えば、Devlin (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; and U.S. Patent No. 5,763,263; および米国特許第5,763,263号に記載されている。ハイスループットアッセイは、限定されるものではないが、後述するものをはじめとする1以上の異なるアッセイ技術を使用できる。

20

【0154】

本明細書中で言及されるすべての刊行物および特許文書は、そのような刊行物または文書のそれぞれが、参照により本明細書中に組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、参照により本明細書中に組み込まれる。刊行物および特許文書の言及は、いずれも関連のある先行技術であることを認めることを意図せず、またその内容または日付に関する承認を構成するものでもない。本発明を明細書によって説明してきたが、当業者は、本発明を様々な実施形態で実施することができ、前述の記載事項および後述の実施例は説明のためであり、以下の特許請求の範囲を限定するものではないことを理解するであろう。

実施例

実施例1 本発明の化合物の合成

30

一般的実験

NMR

【0155】

特に指定のない限り、 $CDCl_3$ を使用して 1H -NMR スペクトルを取得し、そして Varian または Oxford Instruments magnet (500 MHz) 装置を使用して 400 MHz または 500 MHz で記録した。表示された多重度は、s = 一重項、d = 二重項、t = 三重項、q = 四重項、quint = 五重項、sxt = 六重項、m = 多重項、dd = 二重項の二重項、dt = 三重項の二重項である；br はブロードなシグナルを示す。

40

【0156】

LCMS および HPLC

質量: Waters Acquity Ultra Performance LC。HPLC: 生成物を、 150×4.5 mm の YMC ODS-M80 カラムまたは 150×4.6 mm の YMC-パック Pro C18 カラムを有する Shimadzu SPD-20A で 1.0 ml / 分にて分析した。移動相は、MeCN : H_2O = 3 : 2 (0.3% の SDS および 0.05% の H_3PO_4 を含む)。生成物を、3100 Mass Detector を有する Waters Auto 精製 System を使用する HPLC/MS (0.1% 水酸化アンモニウムを含む MeOH - H_2O) によって精製した。

【0157】

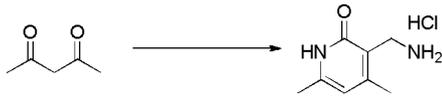
3 - (アミノメチル) - 4,6 - ジメチル - 1,2 - ジヒドロピリジン - 2 - オン HC

50

1 塩

【 0 1 5 8 】

【 化 1 1 】



2 - シアノアセトアミド (8 . 4 0 g 、 1 0 0 ミリモル) およびアセチルアセトン (1 0 . 0 g 、 1 0 0 ミリモル) の H₂O (2 0 0 m L) 中溶液に、K₂CO₃ (4 . 0 0 g 、 2 8 . 9 ミリモル) を添加した。混合物を室温で 2 2 時間攪拌した。次いで沈殿した固体をブフナー漏斗でろ過し、氷冷 H₂O で洗浄し、そして真空下で乾燥して、4 , 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - カルボニトリル (1 3 . 5 g 、 9 1 % 収率) を得た。

10

【 0 1 5 9 】

4 , 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - カルボニトリル (1 0 . 0 g 、 6 7 . 5 ミリモル) の MeOH (1 . 5 0 L) および濃 HCl (3 0 m L) 中溶液 1 0 % Pd (OH)₂ (1 9 g) を N₂ 雰囲気下で添加した。N₂ ガスを H₂ ガスで置換し、混合物を 2 6 時間室温にて水素雰囲気下で攪拌した。H₂ ガスを N₂ ガスで置換した。混合部宇と、セライトを通して濾過し、MeOH で洗浄し、濃縮した。残留物を EtOH で摩砕し、ブフナー漏斗で集め、そして真空下で乾燥して、表題化合物を白色固体として得た (1 1 . 5 g 、 9 0 %) 。¹H NMR (4 0 0 MHz , DMSO-d₆) : ppm 11.86 (brs , 1H) , 5.98 (s , 1H) , 3.78 (m , 2H) , 2.20 (s , 3H) , 2.16 (s , 3H)

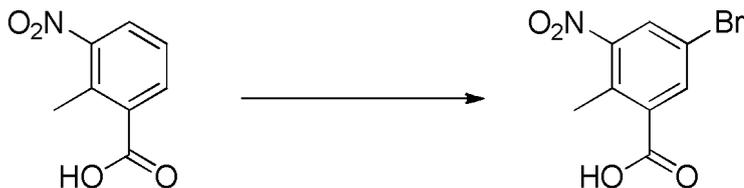
20

【 0 1 6 0 】

5 - ブロモ - 2 - メチル - 3 - ニトロ安息香酸

【 0 1 6 1 】

【 化 1 2 】



30

2 - メチル - 3 - ニトロ安息香酸 (5 . 0 0 g 、 2 7 . 6 ミリモル) の H₂SO₄ (2 0 m L) 中攪拌溶液に、1 , 3 - ジブromo - 5 , 5 - ジメチルヒダントイン (4 . 3 4 g 、 1 5 . 2 0 ミリモル) を 0 で添加した。反応混合物を 0 で 5 時間攪拌した。反応混合物を氷冷水上に注ぎ、結果としての析出した固体を集め、水で洗浄し、真空中で乾燥させて、表題化合物を白色固体として得た (7 . 2 8 g 、 定量的収率) 。¹H-NMR (4 0 0 MHz , DMSO-d₆) ppm ; 8.31 (s , 1H) , 8.17 (s , 1H) , 2.43 (s , 3H) .

40

【 0 1 6 2 】

5 - ブロモ - 2 - メチル - 3 - ニトロ安息香酸メチル

【 0 1 6 3 】

【 化 1 3 】



5 - ブロモ - 2 - メチル - 3 - ニトロ安息香酸 (7 . 2 8 g 、 2 8 . 0 ミリモル) の DMF (1 0 0 m L) 中攪拌溶液に、炭酸ナトリウム (1 1 . 9 g 、 1 1 2 ミリモル) およ

50

びヨウ化メチル (15.9 g、112 ミリモル) を添加した。反応混合物を 60 で 8 時間攪拌した。反応完了後、反応混合物をろ過し、酢酸エチルで洗浄した。合した濾液を水で洗浄し、水相を酢酸エチルで再抽出した。合した有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮して、表題化合物を固体として得た。(7.74 g、定量的収率)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm); 8.17 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

【0164】

3 - アミノ - 5 - ブロモ - 2 - メチル安息香酸メチル

【0165】

【化14】



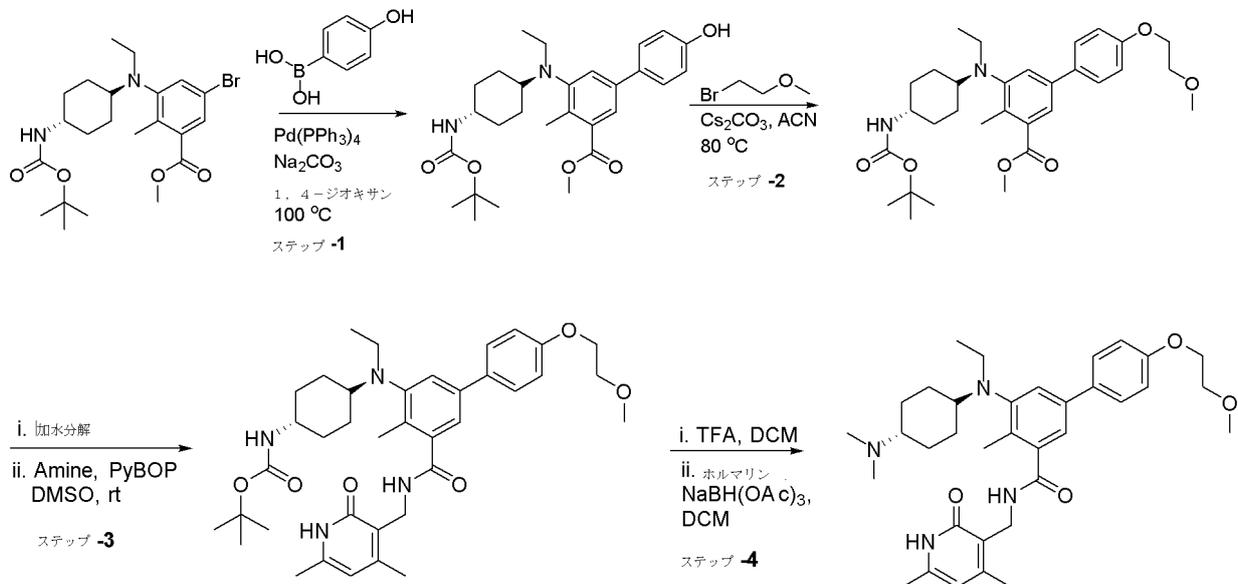
5 - ブロモ - 2 - メチル - 3 - ニトロ安息香酸メチル (7.60 g、27.7 ミリモル) の EtOH 水溶液 (100 mL の EtOH および 20 mL の H₂O) 中攪拌溶液に、塩化アンモニウム (4.45 g、83.1 ミリモル) および鉄 (4.64 g、83.1 ミリモル) を添加した。反応混合物を 80 で 5 時間攪拌した。次いでセライトを通して混合物をろ過し、セライト床を酢酸エチルで洗浄した。合した濾液を真空中で濃縮した。結果としての残留物を酢酸エチルおよび水中に溶解させた。水層を酢酸エチルで抽出した (2 回)。合した有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして減圧下で濃縮して、表題化合物を褐色油として得た (6.67 g、99%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm; 7.37 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.80 (brs, 2H), 2.31 (s, 3H).

【0166】

化合物 1 :

【0167】

【化15】



ステップ 1 : 5 - (((トランス) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) アミノ) シクロヘキシル) (エチル) アミノ) - 4' - ヒドロキシ - 4 - メチル - [1 , 1' - ビフェニル] - 3 - カルボン酸メチルの合成

【0168】

5 - ブロモ - 3 - (((トランス) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) アミノ)

10

20

30

40

50

)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-2-メチル安息香酸メチル(10g、21.3ミリモル、例えば、WO2012142504(代理人整理番号41478-507001WO)を参照のこと)および(4-ヒドロキシフェニル)ボロン酸(3.5g、25.3ミリモル)のジオキサン(225mL)および水(75mL)の混合物中攪拌溶液に、 Na_2CO_3 (8.01g、75.5ミリモル)を添加し、そして溶液にアルゴンを30分間パージした。次いで $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2.4g、2.07ミリモル)を添加し、そしてアルゴンを再度さらに15分間パージした。反応生成物を100で4時間加熱した。完了したら、反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。合した有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、続いてカラムクロマトグラフィー精製をおこなって、表題化合物を得た(8.9g、87%収率)。

10

【0169】

ステップ2: 5-(((トランス)-4-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-4'-(2-メトキシエトキシ)-4-メチル-[1,1'-ピフェニル]-3-カルボン酸メチルの合成

【0170】

5-(((トランス)-4-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-4'-ヒドロキシ-4-メチル-[1,1'-ピフェニル]-3-カルボン酸メチル(0.6g、1.24ミリモル)および1-プロモ-2-メトキシエタン(0.519g、3.73ミリモル)のアセトニトリル(6mL)中攪拌溶液に、 Cs_2CO_3 (0.485g、1.49ミリモル)を添加し、そして反応を80で12時間攪拌した。完了したら、水をそれに添加し、酢酸エチルで抽出した。合した有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗化合物をカラムクロマトグラフィーによって精製して、表題化合物を得た(0.6g、76.5%収率)。

20

【0171】

ステップ3: ((トランス)-4-((5-(((4,6-ジメチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)カルバモイル)-4'-(2-メトキシエトキシ)-4-メチル-[1,1'-ピフェニル]-3-イル(エチル)-アミノ)-シクロヘキシル)カルバミン酸tert-ブチルの合成

【0172】

NaOH 水溶液(0.066g、5mLの H_2O 中1.66ミリモル)を5-(((トランス)-4-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-4'-(2-メトキシエトキシ)-4-メチル-[1,1'-ピフェニル]-3-カルボン酸メチル(0.6g、1.11ミリモル)の EtOH (10mL)中溶液に添加し、そして60で1時間攪拌した。反応完了後、エタノールを減圧下で除去し、クエン酸を用いて残留物をpH4に酸性化した。10%DCM中メタノールを使用して抽出を実施した。合した有機層を乾燥させ、濃縮して、各酸を得た(0.5g、85.6%収率)。

30

【0173】

上記酸(0.5g、0.95ミリモル)を次いでDMSO(5mL)中に溶解させ、3-(アミノメチル)-4,6-ジメチルピリジン-2(1H)-オン(0.288g、1.90ミリモル)およびトリエチルアミン(0.096g、0.950ミリモル)をそれに添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌した後、PyBop(0.741g、1.42ミリモル)をそれに添加し、攪拌を一晩室温で続けた。反応完了後、反応生成物を氷中に注ぎ、10%MeOH/DCMを使用して抽出を実施した。合した有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮して、粗物質を得、これを次いでカラムクロマトグラフィーによって精製して、表題化合物を得た(0.45g、71.8%収率)。

40

【0174】

ステップ4: N-((4,6-ジメチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-5-(((トランス)-4-((ジメチルアミノ)-シクロヘキシル)(エチル)-アミノ)-4'-(2-メトキシエトキシ)-4-メチル-[1,1'-ピ

50

フェニル] - 3 - カルボキサミドの合成

【0175】

0 で ((トランス) - 4 - ((5 - (((4 , 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル)メチル)カルバモイル) - 4 ' - (2 - メトキシエトキシ) - 4 - メチル - [1 , 1 ' - ビフェニル] - 3 - イル) (エチル)アミノ)シクロヘキシル)カルバミン酸 tert - ブチル (0 . 4 5 g、0 . 6 8 1 ミリモル) の D C M (5 m L) 中攪拌溶液に、T F A (1 m L) を添加し、反応を 2 時間室温で攪拌した。完了後、反応を濃縮乾固した。残留物を次いで Na_2CO_3 (水溶液) で pH 8 に塩基性化し、水層を D C M 中 2 0 % メタノールで抽出した。合した有機層を Na_2SO_4 上で乾燥し、溶媒を減圧下で除去して、B o c 脱保護された化合物を得た (0 . 3 g、7 8 . 7 % 収率)。

10

【0176】

B o c 脱保護された化合物 (0 . 3 g、0 . 5 3 5 ミリモル) のジクロロメタン (3 m L) 中攪拌溶液に、ホルムアルデヒド溶液 (3 5 ~ 4 1 % 水溶液) (0 . 0 5 6 g、1 . 8 7 ミリモル) を 0 で添加し、2 0 分間攪拌した。次いで、 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (0 . 2 8 g、1 . 3 3 ミリモル) を添加し、そして 2 時間 0 で攪拌した。反応が完了したら、水を添加し、D C M 中 2 0 % メタノールで抽出した。合した有機層を Na_2SO_4 上で乾燥し、溶媒を減圧下で除去した。粗化合物を分収 H P L C によって精製して、表題化合物を得た (0 . 1 g、3 1 . 7 % 収率)。

20

【0177】

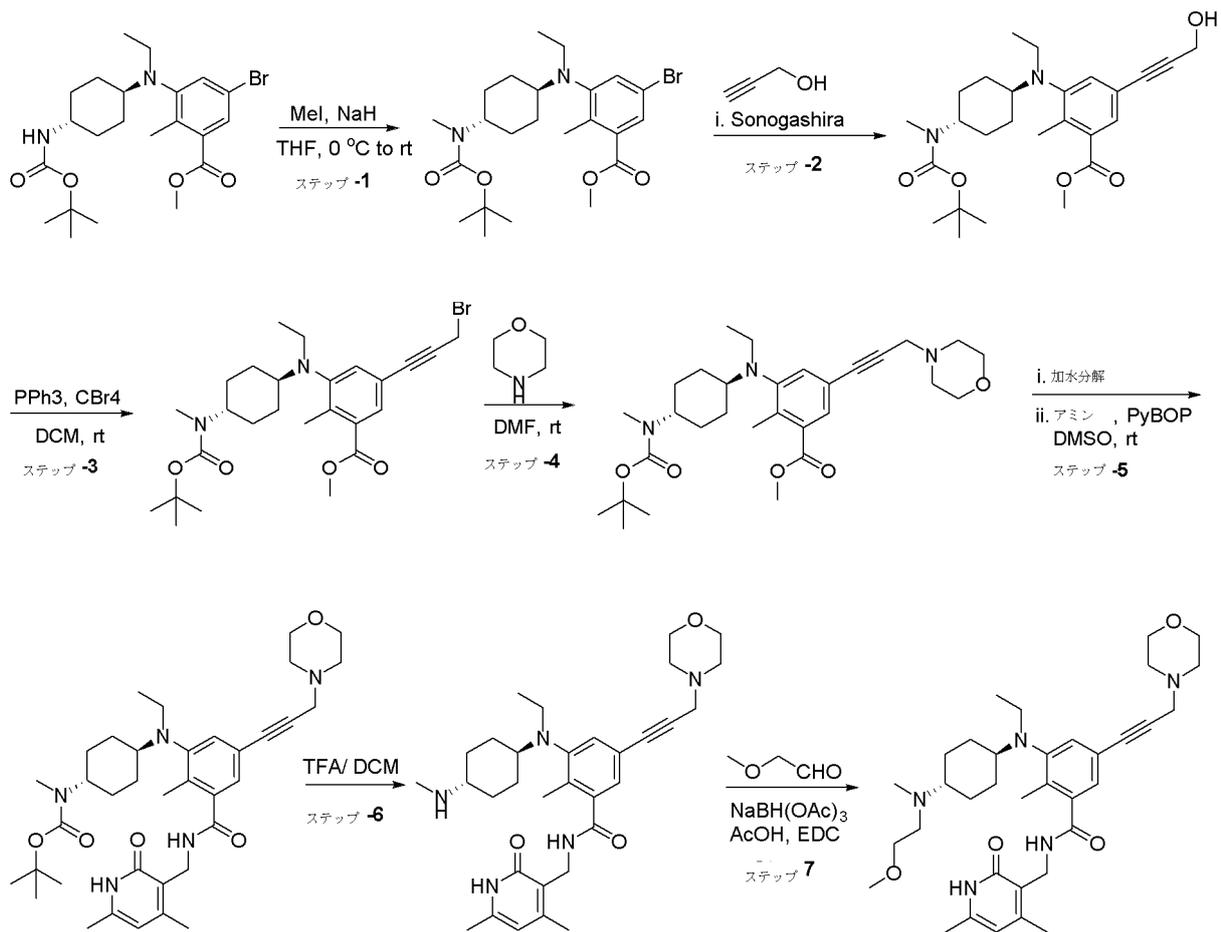
LCMS: 589.75(M+1)⁺; TFA-塩: ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 11.47 (brs, 1H), 9.48 (brs, 1H), 8.21 (brs, 1H), 7.57 (d, 2H, J=8.0 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.03 (d, 2H, J=8.8 Hz), 5.87 (s, 1H), 4.29 (d, 2H, J=4.4 Hz), 4.14-4.12 (m, 2H), 3.69-3.66 (m, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.13 (m, 4H), 2.69-2.68 (m, 6H), 2.24 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.96 (m, 4H), 1.44 (m, 4H), 0.85 (t, 3H, J=6.8 Hz).

【0178】

化合物 2 :

【0179】

【化16】



10

20

【0180】

ステップ1：5 - プロモ - 3 - (((トランス) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) - (メチル) - アミノ) シクロヘキシル) (エチル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチルの合成

30

【0181】

5 - プロモ - 3 - (((トランス) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) アミノ) シクロヘキシル) (エチル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチル (3 g、6.41ミリモル、例えば、WO2012142504を参照のこと) の THF (30 mL) 中撹拌溶液に、NaH (0.184 g、7.69ミリモル) を 0 で添加し、それを同じ温度で 20 分間撹拌した。次いで、ヨウ化メチル (9.10 g、64.10ミリモル) を 0 で添加し、反応を一晩室温で撹拌した。完了したら、反応を氷水でクエンチし、ジクロロメタンで抽出した。合した有機層を水で洗浄し、乾燥し、減圧下で濃縮した。粗化合物をカラムクロマトグラフィーによって精製して、粗表題化合物を得、これをさらに精製することなく使用した (3 g、97.4% 収率)。

40

【0182】

ステップ2：3 - (((トランス) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) - (メチル) アミノ) シクロヘキシル) (エチル) アミノ) - 5 - (3 - ヒドロキシプロパ - 1 - イン - 1 - イル) - 2 - メチル安息香酸メチルの合成

【0183】

5 - プロモ - 3 - (((トランス) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) (メチル) アミノ) シクロヘキシル) (エチル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチル (2 g、4.14ミリモル) の乾燥トルエン中撹拌溶液に、CuI (0.015 g、0.079ミ

50

リモル)、 PPh_3 (0.043 g、0.165ミリモル)、 $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0.058 g、0.082ミリモル)、 N,N -ジイソプロピルアミン(1.08 g、10.78ミリモル)を添加し、反応をアルゴンで15分間バージした。プロブ-2-イン-1-オール(0.46 g、8.29ミリモル)をそれに添加し、反応を80 にて密封状態で5時間加熱した。完了したら、それを水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。有機層を Na_2SO_4 上で乾燥した。粗化合物をカラムクロマトグラフィーによって精製して、表題化合物を得た(1.2 g、63.2%収率)。

【0184】

ステップ3: 5-(3-プロモプロブ-1-イン-1-イル)-3-((トランス)-4-(tert-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-2-メチル安息香酸メチルの合成:

【0185】

3-((トランス)-4-(tert-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-5-(3-ヒドロキシプロブ-1-イン-1-イル)-2-メチル安息香酸メチル(1.2 g、2.62ミリモル)のDCM(15 mL)中攪拌溶液に、 PPh_3 (1.37 g、5.22ミリモル)および CBr_4 (1.7 g、5.10ミリモル)を0 で添加し、反応を4時間室温で攪拌した。完了したら、反応を氷水でクエンチし、ジクロロメタンで抽出した。合した有機層を水で洗浄し、乾燥し、減圧下で濃縮した。粗物質をカラムクロマトグラフィーによって精製して、表題化合物を得た(0.5 g、38.5%収率)。

【0186】

ステップ4: 3-((トランス)-4-(tert-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-2-メチル-5-(3-モルホリノプロブ-1-イン-1-イル)安息香酸メチルの合成

【0187】

5-(3-プロモプロブ-1-イン-1-イル)-3-((トランス)-4-(tert-ブトキシカルボニル)-(メチル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-2-メチル安息香酸メチル(1当量)のDMF中攪拌溶液に、モルホリン(5当量)を添加し、そして反応を12時間室温で攪拌した。完了したら、反応を氷水でクエンチし、ジクロロメタンで抽出した。合した有機層を水で洗浄し、乾燥し、減圧下で濃縮して、粗表題化合物を得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した(98.7%収率)。

【0188】

ステップ5: ((トランス)-4-(3-((4,6-ジメチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)カルバモイル)-2-メチル-5-(3-モルホリノプロブ-1-イン-1-イル)フェニル)(エチル)アミノ)シクロヘキシル)(メチル)カルバミン酸tert-ブチルの合成

【0189】

$NaOH$ (1.5当量)を3-((トランス)-4-(tert-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)(エチル)アミノ)-2-メチル-5-(3-モルホリノプロブ-1-イン-1-イル)安息香酸メチル(1当量)のEtOH: H_2O (9:1)中溶液に添加し、そして60 で1時間攪拌した。反応完了後、エタノールを減圧下で除去し、希HClを使用してpH6まで酸性化し、そしてクエン酸を使用してpH4を調節した。10%DCM中メタノールを使用して抽出を実施した。合した有機層を乾燥し、濃縮して、各酸を得た。

【0190】

上記酸(1当量)を次いでDMSO中に溶解させ、3-(アミノメチル)-4,6-ジメチルピリジン-2(1H)-オン(2当量)およびトリエチルアミン(1当量)をそれに添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌した後、PyBop(1.5当量)をそれに添加し、攪拌を一晩室温で続けた。反応完了後、反応生成物を氷中に注ぎ、10%MeO

10

20

30

40

50

H / D C Mを使用して抽出を実施した。合した有機層を Na_2SO_4 上で乾燥し、溶媒を減圧下で除去し、減圧下で濃縮して、粗物質を得、これを次いでまず水で、続いてアセトニトリル洗浄で精製して、所望の表題化合物を得た (69.4% 収率)。

【0191】

ステップ6: N - ((4, 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) - 3 - (エチル ((トランス) - 4 - (メチルアミノ) シクロヘキシル) アミノ) - 2 - メチル - 5 - (3 - モルホリノプロブ - 1 - イン - 1 - イル) ベンズアミドの合成

【0192】

0 で ((トランス) - 4 - ((3 - ((4, 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) カルバモイル) - 2 - メチル - 5 - (3 - モルホリノプロブ - 1 - イン - 1 - イル) フェニル) (エチル) アミノ) シクロヘキシル) (メチル) カルバミン酸 tert - ブチル (1 当量) の D C M 中攪拌溶液に、T F A (3 当量) を添加し、反応を室温で2時間攪拌した。完了後、反応を濃縮乾固した。残留物を次いで Na_2CO_3 (水溶液) で pH 8 に塩基性化し、水層を20% D C M 中メタノールで抽出した。合した有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させ、溶媒を減圧下で除去して、表題化合物を得 (99% 収率)、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。

10

【0193】

ステップ7: N - ((4, 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) - 3 - (エチル ((トランス) - 4 - ((2 - メトキシエチル) (メチル) アミノ) シクロヘキシル) アミノ) - 2 - メチル - 5 - (3 - モルホリノプロブ - 1 - イン - 1 - イル) ベンズアミドの合成

20

【0194】

N - ((4, 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) - 3 - (エチル ((トランス) - 4 - (メチルアミノ) シクロヘキシル) アミノ) - 2 - メチル - 5 - (3 - モルホリノプロブ - 1 - イン - 1 - イル) ベンズアミド (1 当量) のジクロロエタン中攪拌溶液に、2 - メトキシアセトアルデヒド (10 当量) および酢酸 (6 当量) を 0 で添加し、20分間攪拌した。次いで $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (3 当量) を添加し、そして2時間 0 で攪拌した。反応が完了したら、水を添加し、D C M 中20%メタノールで抽出した。合した有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させ、そして溶媒を減圧下で除去した。粗化合物を分収 H P L C によって精製して、標的分子を得た (0.1 g、33.6% 収率)。

30

【0195】

LCMS: 606.65(M+1)⁺; TFA塩: ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 11.50 (brs, 1H), 9.22 (brs, 1H), 8.18 (t, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.26-4.25 (m, 4H), 3.66-3.59 (m, 4H), 3.48-3.36 (m, 3H), 3.29-3.17 (m, 7H), 3.04-3.01 (m, 3H), 2.69-2.68 (m, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.00-1.92 (m, 2H), 1.82-1.73 (m, 3H), 1.46 (m, 4H), 0.78 (t, 3H, J=6.4 Hz).

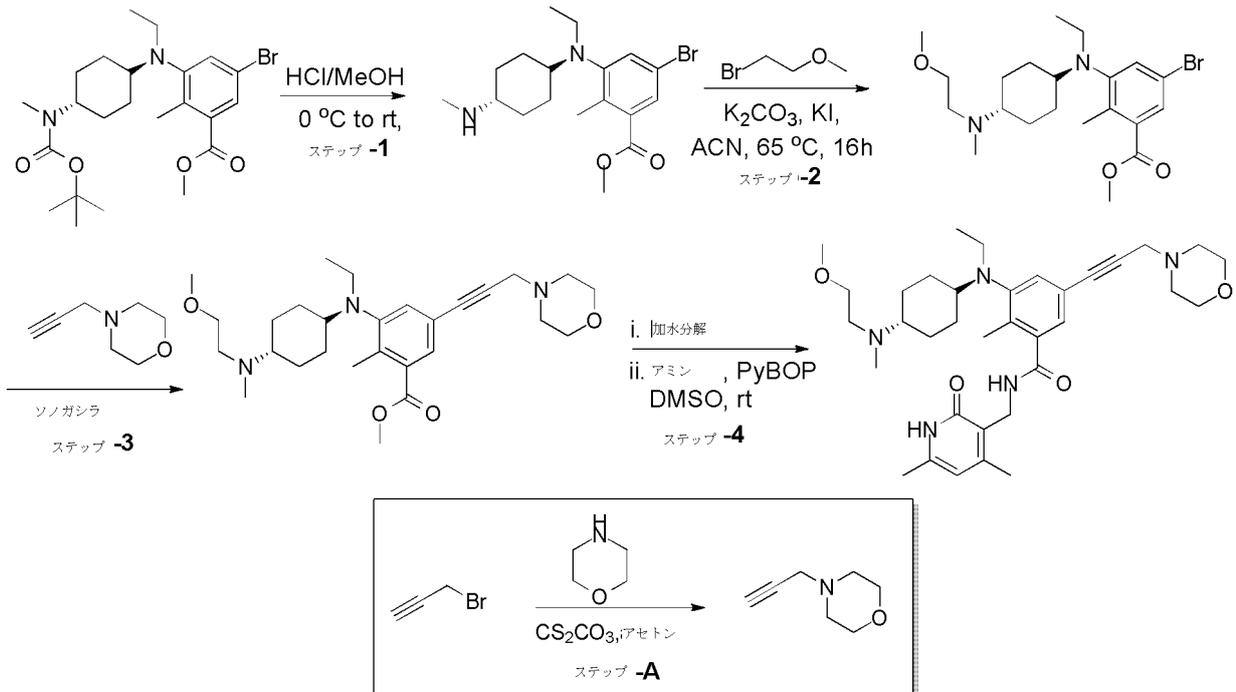
40

【0196】

化合物2の別の合成スキーム:

【0197】

【化17】



10

20

【0198】

ステップ A : 4 - (プロポ - 2 - イン - 1 - イル) モルホリンの合成 :

【0199】

プロパルギルプロミド (50 g、420ミリモル) のアセトン (300 mL) 中搅拌溶液に、 CS_2CO_3 (136.5 g、420ミリモル) を 0 で添加した。次いで、アセトン (200 mL) 中モルホリン (36.60 g、420ミリモル) を滴加し、反応を室温で 16 時間搅拌した。完了したら、反応生成物を濾過し、ろ液を減圧下で濃縮して、表題化合物を得た (50 g、粗)。単離された化合物をさらに精製することなくその後のカップリングで直接使用した。

【0200】

ステップ 1 : 5 - プロモ - 3 - (エチル (トランス) - 4 - (メチルアミノ) シクロヘキシル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチルの合成 :

【0201】

0 で 5 - プロモ - 3 - ((トランス) - 4 - (tert - ブトキシカルボニル) (メチル) アミノ) シクロヘキシル) (エチル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチル (30 g、62.24ミリモル) のメタノール (100 mL) 中搅拌溶液に、メタノール性 HCl (500 mL) を添加し、反応を室温で 2 時間搅拌した。完了後、反応を濃縮乾固した。残留物を Na_2CO_3 (水溶液) で pH 8 に塩基性化し、水層を DCM 中 10% メタノール (200 mL \times 3) で抽出した。合した有機層を Na_2SO_4 上で乾燥し、溶媒を減圧下で除去して、表題化合物を無色油として得た (25 g、粗)。単離された化合物をさらに精製することなく次のステップで使用した。

【0202】

ステップ 2 : 5 - プロモ - 3 - (エチル (トランス) - 4 - (2 - メトキシエチル) (メチル) アミノ) シクロヘキシル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチルの合成 :

【0203】

粗 5 - プロモ - 3 - (エチル (トランス) - 4 - (メチルアミノ) シクロヘキシル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチル (25 g、65.44ミリモル)、1 - プロモ - 2 - メトキシエタン (18.19 g、130.8ミリモル) のアセトニトリル (250 mL) 中搅拌溶液に、 K_2CO_3 (18.06 g、130.8ミリモル) および KI (6.51 g、39.21ミリモル) を添加した。結果として得られた反応生成物を 65 で 16

30

40

50

時間攪拌した。完了したら、反応混合物を水(300 mL)で希釈し、DCM(500 mL × 3)で抽出した。合した有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥し、減圧下で濃縮した。粗化合物をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製して、表題化合物を得た(20 g、69.3%収率)。

【0204】

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 7.55 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.32 (m, 4H), 3.20 (s, 3H), 3.05 (q, 2H), 2.61 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.30 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.77-1.67 (m, 4H), 1.37-1.31 (m, 2H), 1.24-1.18 (m, 2H), 0.78 (t, 3H, J=6.8 Hz).

【0205】

ステップ3: 3-(エチル(トランス)-4-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)アミノ)-2-メチル-5-(3-モルホリノプロプ-1-イン-1-イル)安息香酸メチルの合成:

【0206】

5-プロモ-3-(エチル(トランス)-4-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)アミノ)-2-メチル安息香酸メチル(30 g、68.02ミリモル)、4-(プロプ-2-イン-1-イル)モルホリン(25.51 g、204ミリモル)およびトリエチルアミン(20.61 g、204ミリモル)のDMF(300 mL)中溶液に、アルゴンを20分間吹き込んだ。Then CuI(3.87 g、20.36ミリモル)およびPd(PPh₃)₄(7.85 g、6.79ミリモル)を添加し、アルゴンをさらに20分間吹き込んだ。反応混合物を105で4時間加熱し、次いで室温まで冷却した。反応を水(100 mL)でクエンチし、水相を10% MeOH/DCM(400 mL × 3)で抽出した。合した有機抽出物をNa₂SO₄上で乾燥し、濾過し、濃縮した。ろ過し、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、表題化合物を得た(21 g、63.7%収率)。

【0207】

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 7.46 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.62-3.57 (m, 6H), 3.50 (s, 2H), 3.35-3.32 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 3.17 (m, 1H), 3.05 (q, 2H), 2.61-2.58 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.33 (m, 1H), 2.18 (m, 2H), 1.77-1.70 (m, 4H), 1.36-1.20 (m, 4H), 0.77 (t, 3H, J=6.8 Hz), 3Hは溶媒ピークに統合した。

【0208】

ステップ4: N-(4,6-ジメチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-3-(エチル(トランス)-4-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)アミノ)-2-メチル-5-(3-モルホリノプロプ-1-イン-1-イル)ベンズアミドの合成:

【0209】

NaOH水溶液(2.59 g、64.91ミリモル、10 mLのH₂O中)を3-(エチル(トランス)-4-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)シクロヘキシル)アミノ)-2-メチル-5-(3-モルホリノプロプ-1-イン-1-イル)安息香酸メチル(21 g、43.29ミリモル)のEtOH(100 mL)中溶液に添加し、そして60で1時間攪拌した。反応完了後、エタノールを減圧下で除去し、希HClを使用して残留物を酸性化し、クエン酸を使用してpHまでにした。10% MeOH/DCM(200 mL × 3)を使用して抽出を実施した。合した有機層を乾燥し、濃縮して、各酸を得た(15.5 g、76%収率)。

【0210】

上記酸(15.5 g、32.90ミリモル)のDMSO(50 mL)中溶液に、3-(アミノメチル)-4,6-ジメチルピリジン-2(1H)-オン(10 g、65.80ミリモル)およびトリエチルアミン(23 mL、164.5ミリモル)を添加した。反応混合物を室温で15分間攪拌した後、PyBop(25.66 g、49.34ミリモル)を

10

20

30

40

50

それに 0 で添加し、一晚室温でさらに攪拌した。完了後、反応生成物を氷水 (100 mL) 中に注ぎ、10% MeOH / DCM (200 mL x 3) を使用して抽出を実施した。合わせた有機層を Na₂SO₄ 上で乾燥し、減圧下で濃縮した。粗化合物を塩基性アルミナ上カラムクロマトグラフィーにより精製し、MeOH : DCM で溶出させて、表題化合物 (11 g、55.3% 収率) を得た。

【0211】

LCMS: 606.50(M+1)⁺; ¹H NMR (MeOD, 400 MHz) 7.23 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 3.74-3.72 (m, 4H), 3.51 (s, 2H), 3.47 (t, 2H, J=5.6 Hz), 3.32 (s, 3H), 3.07 (q, 2H, J=7.2 Hz), 2.64-2.63 (m, 7H), 2.38 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.89-1.86 (m, 4H), 1.50-1.30 (m, 4H), 0.83 (t, 3H, J=7.2 Hz).

10

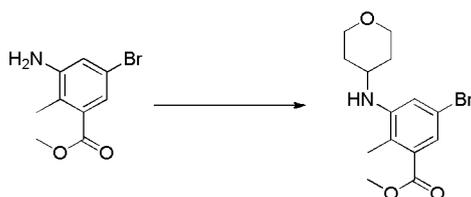
【0212】

化合物 105 :

5 - プロモ - 2 - メチル - 3 - [(オキサン - 4 - イル) アミノ] 安息香酸メチル

【0213】

【化18】



20

【0214】

3 - アミノ - 5 - プロモ - 2 - メチル安息香酸メチル (40.2 g、165ミリモル) の CH₂Cl₂ (500 mL) および AcOH (60 mL) 中攪拌溶液に、ジヒドロ - 2H - ピラン - 4 - オン (17.3 g、173ミリモル) およびナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (73.6 g、330ミリモル) を添加した。反応混合物を RT で 20 時間攪拌した。次いで飽和 NaHCO₃ 水溶液を添加し、混合物を分離した。水層を CH₂Cl₂ で抽出し、合した有機層を真空中で濃縮した。残留物をエチルエーテルで摩砕し、結果としての析出物を集めて表題化合物を白色固体として得た (39.1 g、72%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm; 7.01 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.00 (d, J=7.6 Hz, 1H), 3.84-3.87 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.54-3.56 (m, 1H), 3.43 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.81-1.84 (m, 2H), 1.47-1.55 (m, 2H).

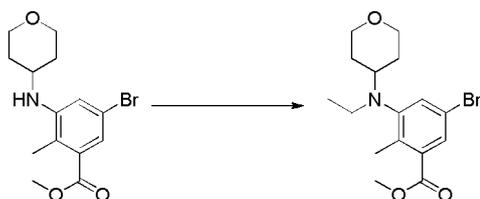
30

【0215】

5 - プロモ - 3 - [エチル (オキサン - 4 - イル) アミノ] - 2 - メチル安息香酸メチル

【0216】

【化19】



40

【0217】

5 - プロモ - 2 - メチル - 3 - [(オキサン - 4 - イル) アミノ] 安息香酸メチル (39.1 g、119ミリモル) の CH₂Cl₂ (400 mL) および AcOH (40 mL) 中攪拌溶液に、アセトアルデヒド (24.7 g、476ミリモル) およびナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (79.6 g、357ミリモル) を添加した。反応混合物を RT

50

で24時間攪拌した。次いで飽和NaHCO₃水溶液を添加し、混合物を分離した。水層をCH₂Cl₂で抽出し、合した有機層を真空中で濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(SiO₂ヘプタン/EtOAc=3/1)により精製して、表題化合物を粘稠性油として得た(44.1g、定量的収率)。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) ppm; 7.62 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 3.80 (m, 5H), 3.31 (m, 2H), 2.97-3.05 (m, 2H), 2.87-2.96 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.52-1.61 (m, 2H), 1.37-1.50 (m, 2H), 0.87 (t, J=6.8 Hz, 3H).

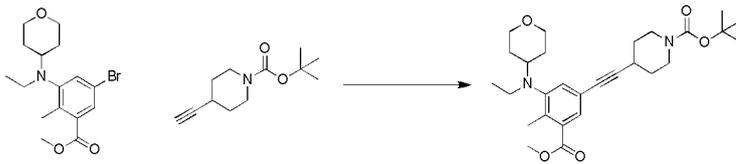
【0218】

4 - ((3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 5 - (メトキシカルボニル) - 4 - メチルフェニル) エチニル) ピペリジン - 1 - カルボン酸 tert - ブチル

10

【0219】

【化20】



【0220】

5 - プロモ - 3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸メチル (1.80g、5.05ミリモル) および 4 - エチニルピペリジン - 1 - カルボン酸 tert - ブチル (1.80g、8.59ミリモル) の DMF (40 mL) 中攪拌溶液に、トリエチルアミン (2.82 mL、20.2ミリモル) およびヨウ化銅 (I) (0.096g、0.505ミリモル) を添加した。窒素を15分間吹き込むことによって反応混合物を脱気した。次いで、テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) (0.292g、0.253ミリモル) を導入し、窒素を吹き込むことによってさらに10分間脱気した。反応混合物を80℃で6時間加熱した。反応を飽和NaHCO₃でクエンチし、TBME (3 × 40 mL) で抽出し、Na₂SO₄上で乾燥し、ろ過し、濃縮した。残留物をクロマトグラフィー (0% から 40% AcOEt / ヘプタン) によって精製して、表題化合物を得た (2.40g、98% 収率) 。¹H-NMR (500 MHz) ppm; 7.65 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 3.97 (brd, J=11.3 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.76 (m, 2H), 3.34 (dt, J=2.0, 11.7 Hz, 2H), 3.24 (ddd, J=3.4, 8.8, 12.2 Hz, 2H), 3.08 (brs, 2H), 2.98 (brs, 1H), 2.80 (dd dd, J=3.9, 3.9, 3.9, 3.9 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 1.87 (m, 2H), 1.60-1.74 (m, 6H), 1.48 (s, 9H), 0.89 (t, J=6.8 Hz, 3H); MS (ESI) [M+H]⁺ 485.4.

20

30

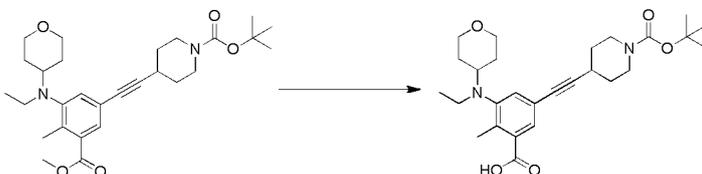
【0221】

5 - ((1 - (tert - ブトキシカルボニル) ピペリジン - 4 - イル) エチニル) - 3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸

40

【0222】

【化21】



【0223】

4 - ((3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 5 - (メ

50

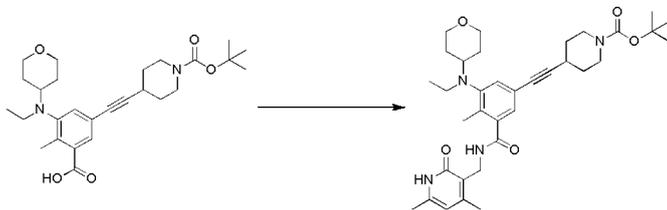
トキシカルボニル) - 4 - メチルフェニル) エチニル) ピペリジン - 1 - カルボン酸 tert - ブチル (2 . 4 g、 4 . 9 5 ミリモル) のエタノール (2 0 . 0 m L) 中溶液に、水酸化ナトリウム (0 . 5 6 5 g、 1 4 . 1 ミリモル) の水 (3 . 0 m L) 中溶液を室温で添加した。反応混合物を 6 0 で 6 時間加熱した。反応を 1 M H C l (5 m L)、次いで過剰のクエン酸溶液でクエンチして、pH を 5 に調節した。混合物を濃縮して E t O H を除去し、残存する水相を A c O E t (2 x 4 0 m L) で抽出した。有機層を合し、N a ₂ S O ₄ 上で乾燥し、ろ過し、濃縮した。残留物をクロマトグラフィー (1 0 % ~ 1 0 0 % の A c O E t / ヘプタン) によって精製して、表題化合物を得た (2 . 3 0 g、 9 9 % 収率)。¹H-NMR (5 0 0 M H z) ppm; 7.82 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 3.98 (brd, J=11.3Hz, 2H), 3.77 (m, 2H), 3.35 (dt, J=1.5, 11.3Hz, 2H), 3.25 (ddd, J=3.4, 8.3, 12.2 Hz, 2H), 3.11 (brs, 2H), 3.00 (brs, 1H), 2.81 (dddd, J=3.9, 3.9, 3.9, 3.9 Hz, 1H), 2.60 (s, 3H), 1.88 (m, 2H), 1.60-1.78 (m, 6H), 1.48 (s, 9H), 0.90 (t, J=6.8Hz, 3H); MS (ESI) [M+H]⁺ 471.4.

【 0 2 2 4 】

4 - ((3 - ((4 , 6 - ジメチル - 2 - オキシ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) カルバモイル) - 5 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 4 - メチルフェニル) エチニル) ピペリジン - 1 - カルボン酸 tert - ブチル

【 0 2 2 5 】

【 化 2 2 】



【 0 2 2 6 】

室温で 5 - ((1 - (tert - ブトキシカルボニル) ピペリジン - 4 - イル) エチニル) - 3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 2 - メチル安息香酸 (1 . 0 6 g、 2 . 2 5 ミリモル) の D M S O (5 . 8 m L) 中溶液に、トリエチルアミン (0 . 9 0 m L、 6 . 4 4 ミリモル) および (4 , 6 - ジメチル - 2 - オキシ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メタンアミニウムクロリド (0 . 4 0 5 g、 2 . 1 5 ミリモル) を添加した。透明溶液は不均一になる。H O B T (0 . 4 9 3 g、 3 . 2 2 ミリモル) および E D C (0 . 6 1 7 g、 3 . 2 2 ミリモル) を添加し、結果として得られた反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応を水 (8 0 m L) でクエンチし、スラリーを 1 時間室温で撹拌した。スラリーを濾過し、ケーキを水で洗浄した (2 x 2 0 m L)。集めた固体を真空下で乾燥して、表題化合物を得た (1 . 2 7 g、 9 8 % 収率)。¹H-NMR (5 0 0 M H z , C D ₃ O D) ppm; 7.22 (s, 1H), 7.08 (d, J=1.0 Hz 1H), 6.11 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.92 (brd, J=10.8 Hz, 2H), 3.78 (dd, J = 4.4, 5.4 Hz, 1H), 3.75 (dd, J = 4.4, 5.4 Hz, 1H), 3.36 (t, J=11.7 Hz, 2H), 3.21 (br t, J=8.3 Hz, 2H), 3.07 (q, J=7.3 Hz, 2H), 3.01 (dd dd, J=3.9, 3.9, 11.3, 11.3 Hz, 1H), 2.84 (dddd, J=3.4, 3.4, 3.9, 3.9 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.88 (m, 2H), 1.70 ((brd, J=12.2 Hz, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 0.87 (t, J=7.3 Hz, 3H); MS (ESI) [M+H]⁺ 605.6.

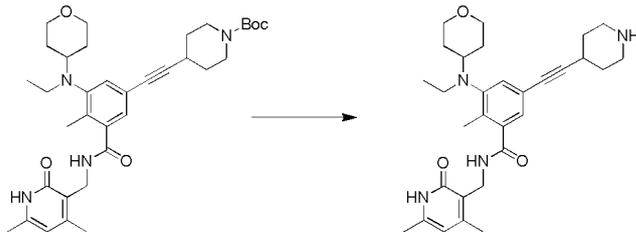
【 0 2 2 7 】

N - ((4 , 6 - ジメチル - 2 - オキシ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) - 3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 2 - メチル -

5 - (ピペリジン - 4 - イルエチニル) ベンズアミド

【0228】

【化23】



10

【0229】

4 - ((3 - ((4 , 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) カルバモイル) - 5 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 4 - メチルフェニル) エチニル) ピペリジン - 1 - カルボン酸 tert - ブチル (250 mg、0.413ミリモル) の DCM (3 mL) 中溶液に、20 で 1 , 4 - ジオキサン中 4 M HCl (3 mL、12.0ミリモル) を添加した。混合物を 20 で 1 時間攪拌した。LCMSは反応が完了したことを示した。反応混合物を直接濃縮し、残留物を DCM 中に溶解させ、次いで飽和 NaHCO₃ / 塩水で中和した。有機層を乾燥 (Na₂SO₄) し、濾過した。そしてろ液を濃縮した。残留物をさらに精製することなくアルキル化のために使用した (209 mg、100%)。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) ppm 7.21 (brs, 1H), 7.07 (brs, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 3.95-3.89 (m, 2H), 3.39-3.34 (m, 2H), 3.08 (q, J=7.0 Hz, 2H), 3.06-2.98 (m, 3H), 2.79-2.72 (m, 1H), 2.72-2.65 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.94-1.88 (m, 2H), 1.73-1.68 (m, 2H), 1.68-1.56 (m, 4H), 0.85 (t, J=7.0 Hz, 3H); MS (ESI) [M+H]⁺ 505.5.

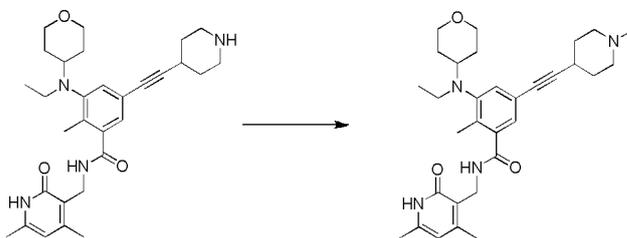
20

【0230】

N - ((4 , 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) - 3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 2 - メチル - 5 - ((1 - メチルピペリジン - 4 - イル) エチニル) ベンズアミド

【0231】

【化24】



30

【0232】

N - ((4 , 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) メチル) - 3 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 2 - メチル - 5 - (ピペリジン - 4 - イルエチニル) ベンズアミド (100 mg、0.198ミリモル) のメタノール (5 mL) 中溶液に、H₂O中 35%ホルムアルデヒド (0.155 mL、1.98ミリモル) を 0 で添加した。0 で 10 分間攪拌した後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (24.9 mg、0.396ミリモル) を添加した。結果として得られた混合物を 0 で 1 時間攪拌した。LCMSは反応が完了したことを示した。反応を飽和 NaHCO₃ / 塩水でクエンチし、EtOAc / ヘプタンで抽出した。有機層を乾燥し (Na₂SO₄)、ろ過し、濃縮した。残留物をクロマトグラフィー (10 g カラム、MeOH / DCM = 1 : 9、次いで MeOH / MeOH 中 7 M NH₃ / DCM = 1 : 1 : 8) に

40

50

よって精製して、表題化合物を得た (96.0 mg、93%)。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) ppm 7.22 (brs, 1H), 7.08 (brs, 1H), 6.10 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 3.94-3.87 (m, 2H), 3.35-3.30 (m, 2H), 3.07 (q, J=7.0 Hz, 2H), 3.04-2.97 (m, 1H), 2.79-2.71 (m, 2H), 2.67-2.58 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.28-2.21 (m, 2H), 1.97-1.91 (m, 2H), 1.78-1.67 (m, 4H), 1.64-1.54 (m, 2H), 0.85 (t, J=7.0 Hz, 3H); MS (ESI) [M+H]⁺ 519.4.

【0233】

実施例2：バイオアッセイプロトコルおよび一般的方法

野生型および突然変異体PRC2酵素アッセイのためのプロトコル

10

一般的材料。S-アデノシルメチオニン (SAM)、S-アデノシルホモシステイン (SAH)、ピシン、KCl、Tween 20、ジメチルスルホキシド (DMSO) および牛皮ゼラチン (BSG) を Sigma-Aldrich から可能な最高レベルの純度で購入した。ジチオトレイトール (DTT) を EMD から購入した。³H-SAM を 80 Ci/mmol の比活性で American 放射性標識 Chemicals から購入した。384 ウェルストレプトアビジン Flash プレート を PerkinElmer から購入した。

【0234】

基質。非修飾リジン27 (H3K27me0) またはジメチル化リジン27 (H3K27me2) のいずれかを含むヒトヒストンH3残基21~44に代表的なペプチドを 21st Century Biochemicals 製のC末端G (K-ビオチン) リンカー-親和性標識モチーフおよびC末端アミドキャップで合成した。ペプチドを高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 精製して95%を超える純度にし、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) によって確認した。配列を以下に記載する。

20

H3K27me0: ATKAAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK (ビオチン) - アミド (配列番号101)

H3K27me2: ATKAAARK (me2) SAPATGGVKKPHRYRPGGK (ビオチン) - アミド (配列番号102)

【0235】

ニワトリ赤血球オリゴヌクレオソームをニワトリ血液から確立された手順にしたがって精製した。

30

【0236】

組換えPRC2複合体。ヒトPRC2複合体を、バキュロウイルス発現系を使用して Spodoptera frugiperda (sf9) 細胞において同時発現された4-成分酵素複合体として精製した。発現されたサブユニットは、野生型EZH2構築物、EED (NM_003797)、Suz12 (NM_015355) およびRbAp48 (NM_005610) から生成された野生型EZH2 (NM_004456) またはEZH2 Y641F、N、H、S またはC突然変異体であった。EEDサブユニットはN末端FLAGタグを含み、これを使用して全4-成分複合体をsf9細胞溶解物から精製した。複合体の純度は、SDS-PAGEおよびAgilent Bioanalyzer 分析によって測定して95%を満たすかまたは超過した。酵素ストック濃度の濃度 (概して0.3~1.0 mg/mL) を、Bradfordアッセイをウシ血清アルブミン (BSA) 標準に対して使用して測定した。

40

【0237】

ペプチド基質に関するPRC2酵素アッセイの一般的手順。アッセイはすべて、20 mMピシン (pH=7.6)、0.5 mMのDTT、0.005% BSG および0.002%のTween 20 からなり、使用当日に調製された緩衝液中で実施した。100% DMSO (1 μL) 中化合物をポリプロピレン製384ウェルV底プレート (Greiner) 中に、384チャンネルピペットヘッド (Thermo) を装備したプレートmate 2 X 3 を使用してスポットした。DMSO (1 μL) を最大シグナル制御について、11

50

、12、23、24行、A～H列に添加し、公知製品であり、PCR2の阻害剤であるSAH(1 μ L)を最小シグナル制御について、11、12、23、24列、I～P行に添加した。野生型PRC2酵素およびH3K27me0ペプチドまたはY641突然変異体酵素およびH3K27me2ペプチドのいずれかを含むカクテル(40 μ L)を、Multidrop Combi(Thermo)によって添加した。化合物をPRC2と30分間25 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、次いで非放射性および 3 H-SAMの混合物を含むカクテル(10 μ L)を添加して、反応を開始した(最終体積=51 μ L)。全ての場において、最終濃度は次のとおりであった：野生型または突然変異体PRC2酵素は4nMであり、最小シグナル制御ウェル中のSAHは1mMであり、DMSO濃度は1%であった。残りの成分の最終濃度は以下の表2に示す。非放射性SAM(10 μ L)を600 μ Mの最終濃度まで添加し、それにより 3 H-SAMを、ペプチド基質中へのその取り込みがもはや検出可能でなくなるレベルまで希釈することによって、アッセイを停止した。384ウェルポリプロピレンプレート中の50 μ Lの反応を次いで384ウェルFlashプレートに移し、ビオチニル化ペプチドをストレプトアビジン表面に少なくとも1時間結合させた後、Biotek ELx405プレートウォッシャー中0.1%Tween20で3回洗浄した。プレートを次いでPerkinElmer TopCountプレートリーダーで読み取って、1分あたりの崩壊(dpm)で測定されるか、あるいは1分あたりのカウント(cpm)と称される、Flashプレート表面に結合した 3 H標識ペプチドの量を測定した。

10

【0238】

20

【表2】

EZH2同一性に基づく各アッセイ変動についての成分の最終濃度(野生型またはY641変異EZH2)

PRC2酵素 (EZH2同一性によって表示)	ペプチド(nM)	非放射性SAM(nM)	3 H-SAM(nM)
野生型	185	1800	150
Y641F	200	850	150
Y641N	200	850	150
Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

30

【0239】

オリゴヌクレオソーム基質に対する野生型PRC2酵素アッセイの一般的手順。20mMのピシン(pH=7.6)、0.5mMのDTT、0.005%BSG、100mMのKClおよび0.002%のTween20からなり、使用当日に調製された緩衝液中でアッセイを実施した。100%DMSO(1 μ L)中化合物をポリプロピレン製384ウェルV底プレート(Greiner)中に、384チャンネルピペットヘッド(Thermo)を装備したプレートmate2X3を使用してスポットした。DMSO(1 μ L)を最大シグナル制御について、11、12、23、24行、A～H列に添加し、公知製品であり、PCR2の阻害剤であるSAH(1 μ L)を最小シグナル制御について、11、12、23、24列、I～P行に添加した。野生型PRC2酵素およびニワトリ赤血球オリゴヌクレオソームを含むカクテル(40 μ L)をMultidrop Combi(Thermo)で添加した。化合物をPRC2と30分間25 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、次いで非放射性および 3 H-SAMの混合物を含むカクテル(10 μ L)を添加して、反応を

40

50

開始した（最終体積 = 51 μ L）。最終濃度は次のとおりであった：野生型 PRC2 酵素は 4 nM であり、非放射性 SAM は 430 nM であり、³H-SAM は 120 nM であり、ニワトリ赤血球オリグヌクレオソーム (oligonucleosome) は 120 nM であり、最小シグナル制御ウェル中の SAH は 1 mM であり、そして DMSO 濃度は 1% であった。非放射性 SAM (10 μ L) を 600 μ M の最終濃度まで添加し、これによって ³H-SAM を、ニワトリ赤血球オリグヌクレオソーム (oligonucleosome) 基質中へのその取り込みがもはや検出可能でないレベルまで希釈することによって、アッセイを停止した。384 ウェルポリプロピレンプレート中の 50 μ L の反応を 384 ウェル Flash プレートに移し、ニワトリ赤血球ヌクレオソームをプレートの表面に固定し、これを Biotek ELx405 プレートウォッシャー中 0.1% Tween 20 で 3 回洗浄した。プレートを次いで PerkinElmer TopCount プレートリーダーで読み取って、Flash プレート表面に結合した ³H 標識ニワトリ赤血球オリグヌクレオソームの量を測定し、1 分あたりの崩壊 (dpm) として測定するか、または 1 分あたりのカウントと称する。

10

【0240】

% 阻害計算

【0241】

【数1】

$$\% \text{ inh} = 100 - \left(\frac{\text{dpm}_{\text{cmpd}} - \text{dpm}_{\text{min}}}{\text{dpm}_{\text{max}} - \text{dpm}_{\text{min}}} \right) \times 100$$

20

【0242】

式中、dpm = 1 分あたりの崩壊、cmpd = アッセイウェル中のシグナル、min および max はそれぞれ最小および最大シグナル制御である。

【0243】

4 パラメータ IC₅₀ 適合

【0244】

【数2】

30

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + \left(\frac{X}{\text{IC}_{50}} \right)^{\text{ヒル係数}}}$$

【0245】

式中、top および bottom は通常変動してもよいが、3 パラメータ適合ではそれぞれ 100 または 0 に固定される可能性がある。ヒル係数は通常変動してもよいが、これもまた 3 パラメータ適合では 1 に適合され得る。Y は % 阻害であり、X は化合物濃度である。

40

【0246】

ペプチド基質（たとえば、EZH2 野生型および Y641F）に関する PRC2 酵素アッセイの IC₅₀ 値を以下の表 3 に提示する。

【0247】

WSU-DLCL2 メチル化アッセイ

WSU-DLCL2 懸濁細胞を DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (独国ブランシュヴァイク)) から購入した。RPMI/Glutamax 培地、ペニシリン-ストレプトマイシン、熱不活性化ウシ胎仔血清、および D-PBS は Life Technologies (米国ニューヨーク州グランドアイランド) から購入した。抽出緩衝液および中

50

和緩衝液 (5 X) は Active モチーフ (米国カリフォルニア州カールスバッド) から購入した。ウサギ抗ヒストン H3 抗体は Abcam (米国マサチューセッツ州ケンブリッジ) から購入した。ウサギ抗 H3 K27me3 および HRP 結合型抗ウサギ IgG は、Cell Signaling Technology (米国マサチューセッツ州ダンバース) から購入した。TMB 「超感受性の」基質は BioFX Laboratories (米国メリーランド州オウイングズミルズ) から調達した。IgG を含まないウシ血清アルブミンは Jackson Immuno 研究 (米国ペンシルベニア州ウェストグローブ) から購入した。Tween を含む PBS (10 X PBST) は KPL (米国メリーランド州ゲイサズバーグ) から購入した。硫酸を Ricca Chemical (米国テキサス州アーリントン) から購入した。Immulon ELISA プレートは Thermo (米国ニューヨーク州ロchester) から購入した。V 底細胞培養プレートは、Corning Inc. (米国ニューヨーク州コーニング) から購入した。V 底ポリプロピレンプレートは、Greiner Bio-オン (米国ノースカロライナ州モンロー) から購入した。

【0248】

WSU-DLCL2 懸濁細胞を成長培地 (10% v/v 熱不活性化ウシ胎仔血清および 100 単位/mL のペニシリン - ストレプトマイシンを添加した RPMI 1640) 中で維持し、そして 37 °C にて 5% CO₂ 下で培養した。アッセイ条件下で、細胞をアッセイ培地 (20% 熱不活性化ウシ胎仔血清および 100 単位/mL ペニシリン - ストレプトマイシンを添加した RPMI 1640) 中、37 °C にて 5% CO₂ 下、プレートシェーカー上でインキュベートした。

【0249】

WSU-DLCL2 細胞を、1 ウェルあたり 200 μL の 96 ウェル V 底細胞培養プレートに 50,000 細胞/mL の濃度でアッセイ培地中に蒔いた。96 ウェルソースプレートからの化合物 (1 μL) を V 底細胞プレートに直接添加した。プレートをタイタープレートシェーカーで 37 °C、5% CO₂ にて 96 時間インキュベートした。4 日のインキュベーション後、プレートを 241 × g で 5 分間スピンさせ、細胞ペレットを乱すことなく細胞プレートの各ウェルから培地を穏やかに吸引した。ペレットを 200 μL の DPBS 中に再懸濁させ、プレートを 241 × g で 5 分間再度スピンさせた。上清を吸引し、冷 (4 °C) 抽出緩衝液 (100 μL) をウェルごとに添加した。プレートを 4 °C にてオービタルシェーカーで 2 時間インキュベートした。プレートを 3427 × g × 10 分間でスピンさせた。上清 (80 μL / ウェル) を 96 ウェル V 底ポリプロピレンプレート中のそれぞれのウェルに移した。中和緩衝液 5 X (20 μL / ウェル) を、上清を含む V 底ポリプロピレンプレートに添加した。粗ヒストン調製物 (CHP) を含む V 底ポリプロピレンプレートをオービタルシェーカーで 5 分間インキュベートした。粗ヒストン調製物を、100 μL の Coating 緩衝液 (1 X PBS + BSA 0.05% w/v) を含む 2 連の 96 ウェル ELISA プレート中の各ウェルに添加した (2 μL / ウェル)。ウェルを密封し、一晚 4 °C でインキュベートした。翌日、プレートを 300 μL / ウェルの 1 X PBST で 3 回洗浄した。ウェルを 2 時間、300 μL / ウェルの ELISA 希釈剤 ((PBS (1 X) BSA (2% w/v) および Tween 20 (0.05% v/v)) でブロックした。プレートを 1 X PBST で 3 回洗浄した。ヒストン H3 検出プレートについて、ELISA 希釈剤中で 1 : 10,000 に希釈した抗ヒストン - H3 抗体 (Abcam、ab1791) を 1 ウェルあたり 100 μL 添加した。H3K27トリメチル化検出プレートについて、ELISA 希釈剤中で 1 : 2000 に希釈した抗 H3K27me3 を 1 ウェルあたり 100 μL 添加した。プレートを室温で 90 分間インキュベートした。プレートを 1 ウェルあたり 300 μL の 1 X PBST で 3 回洗浄した。ヒストン H3 検出に関して、ヒストン H3 検出に関して、ELISA 希釈剤中 1 : 6000 に希釈した HRP 結合型抗ウサギ IgG 抗体を 1 ウェルあたり 100 μL 添加した。H3K27me3 検出に関して、ELISA 希釈剤中で 1 : 4000 に希釈された HRP 結合型抗ウサギ IgG 抗体を 1 ウェルあたり 100 μL 添加した。プレートを室温で 90 分間インキュベートした

10

20

30

40

50

。プレートに1ウェルあたり1 X P B S T 3 0 0 μ Lで4回洗浄した。1ウェルあたりT M B 基質1 0 0 μ Lを添加した。ヒストンH 3 プレートを5分間室温でインキュベートした。H 3 K 2 7 m e 3 プレートを室温で1 0 分間インキュベートした。硫酸1 N (1 0 0 μ L / ウェル) で反応を停止させた。各ウェルの吸光度を4 5 0 n m で読み取った。

【 0 2 5 0 】

まず、各ウェルの比を：

【 0 2 5 1 】

【 数 3 】

$$\left(\frac{\text{H3K27me3 OD450 value}}{\text{Histone H3 OD450 value}} \right)$$

10

によって決定した。

【 0 2 5 2 】

各プレートは、D M S O のみの治療 (最小阻害) の 8 つの対照ウェルならびに最大阻害 (バックグラウンドウェル) の 8 つの対照ウェルを含んでいた。

【 0 2 5 3 】

各対照タイプの比の値の平均を算出し、使用して、プレート中の各試験ウェルについての阻害パーセントを決定した。試験化合物を、2 5 μ M から始めて、合計 1 0 の試験濃度について D M S O 中で連続して 3 倍希釈した。化合物の濃度ごとに 2 連のウェルを使用して、パーセント阻害を決定し、I C ₅₀ 曲線を作製した。このアッセイの I C ₅₀ 値を以下の表 3 に提示する。

20

【 0 2 5 4 】

【 数 4 】

パーセント阻害 = 1 0 0 -

$$\left(\left(\frac{(\text{Individual Test Sample Ratio}) - (\text{Background Avg Ratio})}{(\text{Minimum Inhibition Ratio}) - (\text{Background Average Ratio})} \right) * 100 \right)$$

【 0 2 5 5 】

細胞増殖分析

30

【 0 2 5 6 】

W S U - D L C L 2 懸濁細胞を D S M Z (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (独 国 プ ラ ン シ ュ ヴ ァ イ ク)) から購入した。R P M I / G l u t a m a x 培地、ペニシリン - ストレプトマイシン、熱不活性化ウシ胎仔血清は L i f e T e c h n o l o g i e s (米 国 ニ ュ ー ヨ ー ク 州 グ ラ ン ド ア イ ラ ン ド) から購入した。V 底ポリプロピレン 3 8 4 ウェルプレートは G r e i n e r B i o - O n (米 国 ノ ー ス カ ロ ラ イ ナ 州 モ ン ロ ー) から購入した。細胞培養 3 8 4 ウェル乳白色プレートは、P e r k i n E l m e r (米 国 マ サ チ ュ ー セ ッ ツ 州 ウ ォ ル サ ム) から購入した。C e l l - T i t e r G l o (登 録 商 標) は、P r o m e g a C o r p o r a t i o n (米 国 ウ イ ス コ ン シ ン 州 マ デ イ ソ ン) から購入した。S p e c t r a M a x M 5 プレートのリーダーは、M o l e c u l a r D e v i c e s L L C (米 国 カ リ フ ォ ル ニ ア 州 サ ニ ー ベ ー ル) から購入した。

40

【 0 2 5 7 】

W S U - D L C L 2 懸濁細胞を成長培地 (1 0 % v / v 熱不活性化ウシ胎仔血清を添加した R P M I 1 6 4 0 中で維持し、そして 3 7 にて 5 % C O ₂ 下で培養した。アッセイ条件下で、細胞をアッセイ培地 (2 0 % 熱不活性化ウシ胎仔血清および 1 0 0 単位 / m L ペニシリン - ストレプトマイシンを添加した R P M I 1 6 4 0) 中、3 7 にて 5 % C O ₂ 下でインキュベートした。

【 0 2 5 8 】

W S U - D L C L 2 細胞系の増殖に関する化合物の効果の評価のために、対数増殖期細

50

胞を50 μ lのアッセイ培地の最終体積中1250細胞/mlの密度で384ウェル乳白色プレート中に蒔いた。10mMから開始して、DMSO中で3連の9点3倍連続希釈を実施することによって化合物ソースプレートを調製した(アッセイ中の化合物の最終最高濃度は20 μ Mであり、DMSOは0.2%であった)。細胞プレート中の各ウェルに化合物ストックプレートからの100nLアリコートを追加した。100%阻害対照は、200nMの最終濃度のスタウロsporinで処理された細胞から構成され、0%阻害対照はDMSO処理された細胞から構成されていた。化合物の添加後、アッセイプレートを6日間37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、相対湿度90%未満でインキュベートした。細胞培養中に存在するATPの定量化、35 μ lのCell Titer Glo(登録商標)試薬を細胞プレートに追加することによって、細胞の生存を測定した。SpectraMax M5で発光を読み取った。正規化用量応答曲線の4パラメータ適合を用いて細胞の生存を50%阻害する濃度を決定した。このアッセイのIC₅₀値も以下の表3に提示する。これらの化合物の質量スペクトルデータも以下の表3に提示する。

10

20

30

40

【0259】

【表3】

化合物番号	ELISA H3K27 me3 I	WSU増殖I C50 (uM)	WT EZ H2 IC 50 (uM)	EZH2 IC ₅₀ ペプ チドv2(・	MS (遊離形態)
1	0.077	0.0230		<0.005	588.37
2	0.1104 3	0.3853 3		0.0149 8	605.81
105	0.058- 0.150	0.325	<0.01	0.0084	518.325 7

【0260】

実施例3：最低中毒濃度(LCC)の誘導

細胞増殖は、細胞分裂によって進行し、この結果、分裂前の細胞数に対して、分裂後の細胞数が倍増することは十分に確立されている。一定の環境条件(例えば、pH、イオン強度、温度、細胞密度、タンパク質の培地含有量および成長因子など)下で、細胞は、次式にしたがった連続的倍加(すなわち分裂)によって増殖するが、ただし、十分な栄養および他の必要とされる因子が入手可能であるものとする。

【0261】

【数5】

$$N_t = N_0 \times 2^{\frac{t}{t_D}} \quad (\text{A. 1})$$

式中、N_tは、観察期間開始後のある時点(t)での細胞数であり、N₀は、観察期間開始時の細胞数であり、tは観察期間開始後の時間であり、そしてt_Dは、細胞倍増に必要な期間であり、増殖期間とも称される式A.1は、式0.693 = ln(2)を利用して、底eの指数式のより看板な形態に変換することができる。

【0262】

【数 6】

$$N_t = N_0 e^{\frac{0.693t}{t_D}} \quad (\text{A. 2})$$

【0263】

細胞増殖 (k_p) の速度定数は、次のように倍增時間に反比例する。

【0264】

【数 7】

$$k_p = \frac{0.693}{t_D} \quad (\text{A. 3})$$

10

【0265】

式 A . 2 と A . 3 とを組み合わせると、

【0266】

【数 8】

$$N_t = N_0 e^{k_p t} \quad (\text{A. 4})$$

20

となる。

【0267】

したがって、式 A . 4 によると、細胞数は対数期成長と称される細胞成長の初期の間で時間とともに指数関数的に増加することが予想される。式 A . 4 のような指数方程式は、両側の自然対数をとることによって線形化することができる。

【0268】

【数 9】

$$\ln(N_t) = \ln(N_0) + k_p t \quad (\text{A. 5})$$

30

【0269】

したがって、時間の関数としての $\ln(N_t)$ のプロットによって、 k_p に等しい勾配と (N_0) に等しい y 切片とを有する上昇する直線が得られることが予想される。

【0270】

環境条件の変化は、増殖速度定数 k_p における変化として定量化可能な細胞増殖率の変化をもたらし得る。増殖率の変化をもたらし得る条件には、観察期間の最初 (すなわち $t = 0$) での抗増殖性化合物の系への導入が含まれる。抗増殖性化合物が細胞増殖に対して直接的影響を及ぼす場合、時間の関数としての $\ln(N_t)$ のプロットは、全ての化合物濃度で引き続き線形であり、化合物の濃度の増加で k_p の値が減少することが予想される。

40

【0271】

抗増殖性作用の基本メカニズムに応じて、一部の化合物は増殖速度の変化に即効性がない可能性がある。その代わりに、化合物の影響が認識される前に潜伏期間があり得る。そのような場合、時間の関数としての $\ln(N_t)$ のプロットは二相のようであり、化合物の影響が始まる時点が相間の分断点として特定され得る。増殖に対する化合物の影響が即効性であるか、または潜伏期後に始まるかに関わらず、各化合物濃度での増殖の速度定数は、化合物の影響が始まる時点から実験の観察期間の最後まで $\ln(N_t)$ 対時間曲線の勾配によって最もよく定義される。

【0272】

50

増殖細胞に適用された化合物は2つの一般的な方法にうちの1つ、すなわち、さらなる細胞分裂の阻害（細胞分裂停止）によるか、または細胞死滅（細胞毒性）によって、観察される増殖に対して影響を及ぼす可能性がある。化合物が細胞分裂停止性である場合、化合物の濃度を増加させることによって、さらなる細胞分裂がなくなるまで k_p の値が減少する。この時点で、細胞成長速度、したがって k_p の値は0になる。一方、化合物が細胞毒性である場合、 k_p の値は、2つの速度定数、すなわち化合物（ k_g ）の存在下での継続した細胞成長の速度定数および化合物（ k_d ）による細胞死滅の速度定数から構成される。化合物の一定濃度での増殖の全体的な速度定数は、したがってこれらの相対する速度定数の絶対値の差になる。

【0273】

10

【数10】

$$k_p = |k_g| - |k_d| \quad (\text{A. 6})$$

【0274】

細胞成長速度が細胞死滅速度を上回る化合物濃度で、 k_p の値は正値を有する（すなわち、 $k_p > 0$ ）。細胞成長速度が細胞死滅速度よりも低い化合物濃度で、 k_p の値は負の値を有し（すなわち、 $k_p < 0$ ）、細胞数は時間とともに減少し、このことは強力な細胞毒性を示す。 k_g が k_d とちょうど一致する場合、全体的な増殖速度定数 k_p は0の値を有するであろう。したがって、これよりも高い濃度は明らかに観察できる細胞毒性をもたらすので、最低中毒濃度（LC₅₀）は、 k_p の値が0に等しくなるような化合物の濃度と定義できる。注：LC₅₀より低い濃度で細胞死滅が起こる可能性があるが、残存細胞増殖よりも低い速度である。ここでの治療は、化合物の作用の生物学的詳細を規定することを意図しない。むしろ、ここでの目標は、細胞死滅速度が新しい細胞成長を上回る化合物の濃度を客観的に定量する実際的なパラメータを単に規定することである。実際、LC₅₀は、細胞毒性濃度自体ではなく、それを上回ると真の細胞毒性が観察される分断または臨界濃度を表す。これに関して、LC₅₀は、それよりも高いとすべての分子がミセル構造に組み入れられる、脂質、洗剤または他の界面活性剤種の濃度を規定するために使用される臨界ミセル濃度（CMC）などの他の物理的分断点法（physical breakpoint metrics）と同様にみなすことができる。

20

30

【0275】

伝統的には、細胞成長に対する抗増殖性化合物の影響は、細胞増殖速度が化合物の非存在下（すなわち、ビヒクルまたは溶媒対照サンプルについて）で観察される速度の半分に減少する化合物の濃度と定義される、IC₅₀値によって最も一般的に定量される。しかしながら、IC₅₀は細胞分裂停止性と細胞毒性化合物とを調査員に区別させない。対照的に、LC₅₀はそのような区別すること、および強力な細胞毒性挙動への遷移が起こる濃度をさらに定量することを容易に可能にする。

【0276】

観察期間に影響の開始から実験の終わりに限定する場合、データは時間の関数としての $\ln(N_t)$ としてプロットすると線形式に概して充分適合する（上記参照）。この種類の適合から、 k_p の値を試験した化合物の各濃度で決定することができる。化合物濃度（[I]）の関数としての k_p の値の再プロットは、下降する等温線の形態を有し、[I] = 0で k_{max} の最大値（ビヒクルまたは溶媒対照サンプルによって定義される）および無限化合物濃度で k_{min} の最小値を有する。

40

【0277】

【数 1 1】

$$k_p = \frac{(k_{\max} - k_{\min})}{1 + \frac{[I]}{I_{mid}}} + k_{\min} \quad (\text{A. 7})$$

式中、 I_{mid} は k_{\max} および k_{\min} の値の間である k_p 値をもたらす化合物濃度である（完全かつ純粋に細胞分裂停止性化合物の場合を除いて、 I_{mid} の値は IC_{50} と同じではないことに注意する）。しがたって、再プロットデータを式 A. 7 に適合させることによって、 k_{\max} 、 k_{\min} および I_{mid} の推定値が得られる。化合物が細胞分裂停止性（本明細書中で定義のとおり）である場合、 k_{\min} の値は 0 未満であり得ない。細胞毒性化合物について、 k_{\min} は 0 未満であり、 k_{\min} の絶対値は死滅細胞における化合物の有効性に直接関係がある。

10

【0 2 7 8】

式 A. 7 から誘導される近似値は、LCC の値を決定するためにも使用できる。定義により、 $[I] = LCC$ である場合、 $k_p = 0$ である。しがたって、これらの条件下で、式 A. 7 は

【0 2 7 9】

【数 1 2】

$$0 = \frac{(k_{\max} - k_{\min})}{1 + \frac{LCC}{I_{mid}}} + k_{\min} \quad (\text{A. 8})$$

20

になる。

【0 2 8 0】

式 A. 8 を代数的に並べ替えて LCC についての式を得る。

【0 2 8 1】

30

【数 1 3】

$$LCC = I_{mid} \left[\left(\frac{k_{\max} - k_{\min}}{-k_{\min}} \right) - 1 \right] \quad (\text{A. 9})$$

【0 2 8 2】

この分析は、非線形曲線適合ソフトウェアで実施するのが簡単であり、薬物発見および開発過程全体にわたる化合物活性の細胞アッセイの間に適用することができる。このようにして、LCC は化合物 SAR（構造活性相関）の評価のための有益な方法を提供し得る。

40

【0 2 8 3】

実施例 4：インビボアッセイ

マウス

Female Fox Chase SCID（登録商標）マウス（CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCr1、Charles River Laboratories）または無胸腺ヌードマウス（Cr1:NU(Ncr)-Foxn1nu, Charles River Laboratories）は 8 週令であり、実験の第 1 日で 16.0 ~ 21.1 g の範囲の体重（BW）を有していた。動物に水を自由に与え（逆浸透 1 ppm Cl）、NIH31Modified および Irradiate

50

d Lab Diet (登録商標)は、18.0%の粗タンパク質、5.0%の粗脂肪、および5.0%の粗繊維から構成されていた。マウスを、20~22 (68~72 °F) および湿度40~60%で12時間光サイクルで静的マイクロアイソレーター中、照射されたEnrich-o'cobs (商標) 寝床上で飼育した。すべての手順は、拘束、畜産、外科手術、餌および水分規制、および獣医医療に関するthe Guide for Care and Use of Laboratory Animals の勧告にしたがった。

【0284】

腫瘍細胞培養

ヒトリンパ腫細胞系を異なる供給源(ATCC、DSMZ)から入手し、例えば、Karpas-422はDSMZから入手した。細胞系を、100単位/mLのペニシリンG ナトリウム塩、100g/mLのストレプトマイシン、1%のHEPES、および1%のL-グルタミンを含むRPMI-1640培地中懸濁培養として維持した。培地に20%ウシ胎仔血清を添加した。細胞を、5%CO₂および95%空気の雰囲気中、37 °Cの加湿インキュベーター中の組織フラスコ中で培養した。

10

【0285】

インビボ腫瘍移植

ヒトリンパ腫細胞系、例えば、Karpas-422細胞を対数中期(mid-log phase)成長中に収集し、そしてRPMI-1640基礎培地(base media)および50%Matrigel (商標)(BD Biosciences)(RPMI:Matrigel = 1:1)中に再懸濁させた。各マウスに 1×10^7 細胞(0.2mL細胞懸濁液)を右脇腹で皮下投与した。腫瘍を二次元でカリパスにて測定して、所望の80~120mm³の範囲に到達した平均体積として成長をモニタリングした。腫瘍サイズ(mm³)を:

20

【0286】

【数14】

$$\text{腫瘍体積} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

(式中、w = 腫瘍の幅(mm)およびl = 腫瘍の長さ(mm))から算出した。腫瘍重量は、1mgが1mm³の腫瘍体積に等しいと仮定して推定することができる。1~30日後、145~150mm³の腫瘍を有するマウスを、147mm³の平均腫瘍体積を有する治療群に分類した。

30

【0287】

被験物質

試験化合物を室温で保存し、光から保護した。各治療日に、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(NaCMC)中に懸濁させ、0.1%Tween (登録商標)80を脱イオン水中に懸濁させることによって、新鮮な化合物配合物を調製した。脱イオン水中ピヒクル、0.5%NaCMCおよび0.1%Tween (登録商標)80を使用して、対照群を同じスケジュールで処理した。配合物を投与まで光から遠ざけて4 °Cにて保存した。特別の定めのない限り、この実験で参照され、試験される化合物は、この段落でふれた、それらの特定の塩形態であった。

40

【0288】

治療プラン

62.5~500mg/kgの範囲の化合物用量にてBID(1日2回、12時間ごと)スケジュールで様々な日数、経口栄養投与(oral gavage)によりマウスを治療した。各用量を0.2mL/20gマウス(10mL/kg)の体積で送達し、個々の動物の最後に記録された重量について調節した。最長治療期間は28日であった。

【0289】

中央腫瘍体積(MTV)および腫瘍成長阻害(TGI)分析

治療効果を最終治療日に測定した。最終日に評価可能な、動物n匹についての中央腫瘍体積MTV(n)を各群について測定した。パーセント腫瘍成長阻害(%TGI)はいく

50

つかの方法で定義することができる。まず、指定の対照群のMTV(n)と薬物治療群のMTV(n)との差を、対照群のMTV(n)のパーセンテージとして表す：

【0290】

【数15】

$$\%TGI = \left(\frac{MTV(n)_{\text{対照}} - MTV(n)_{\text{治療}}}{MTV(n)_{\text{対照}}} \right) \times 100$$

【0291】

%TGIを算出する別の方法は、第1日から第n日までの腫瘍サイズの変化を考慮し、nは最終治療日である。

10

【0292】

【数16】

$$\%TGI = \left(\frac{\Delta MTV_{\text{対照}} - \Delta MTV_{\text{治療}}}{\Delta MTV_{\text{対照}}} \right) \times 100$$

【0293】

【数17】

$$\Delta MTV_{\text{対照}} = MTV(n)_{\text{対照}} - MTV(1)_{\text{対照}}$$

20

【0294】

【数18】

$$\Delta MTV_{\text{治療}} = MTV(n)_{\text{治療}} - MTV(1)_{\text{治療}}$$

【0295】

毒性

動物を第1日～第5日で毎日計量し、その後、実験完了まで1週間に2回計量した。マウスを、文書化された、治療に関連する有害な副作用の明白な徴候について頻りに調査した。最大耐量(MTD)についての許容される毒性は、試験中の20%未満の群平均BW損失、および10%以下のTR死による死亡率と定義された。死は、臨床的兆候および/もしくは解剖によって証明される治療副作用に起因するか、または投薬期間中原因不明の場合、TRとして分類される。死が治療の副作用と無関係であるという証拠がある場合、死はNTRと分類される。投薬期間中のNTR死は、典型的にはNTRa(事故または人的ミスによる)またはNTRm(解剖で確認される浸潤および/または転移による腫瘍伝播)として分類される。投薬期間中に原因不明で死ぬ経口治療された動物は、グループ性能がTR分類を支持せず、投薬過誤を排除するためにTR分類が実行可能でない場合はNTRuと分類することができる。

30

40

【0296】

サンプリング

実験中の第7日または第28日に、マウスをあらかじめ特定された方法でサンプリングして、腫瘍における標的阻害を評価する。腫瘍を特定のマウスからRNAseのない条件下で収集し、2等分する。各動物からの凍結腫瘍組織を液体N₂中で急速冷凍し、乳鉢および乳棒で微粉化する。

【0297】

統計およびグラフ分析

全ての統計およびグラフ分析をWindows用Prism 3.03(GraphPad)で実施する。治療期間全体にわたって対照と治療群との統計的有意性を試験するた

50

めに、反復測定ANOVA試験とそれに続く試験後のDunnett's多重比較後試験または2ウェイANOVA試験を用いた。Prismは結果を、 $P > 0.05$ で非有意(*ns*)、 $0.01 < P < 0.05$ で有意(「*」で記号化)、 $0.001 < P < 0.01$ で非常に有意(「**」)、および $P < 0.001$ で極度に有意(「***」)として報告する。

【0298】

ヒストン抽出

ヒストンの単離のために、60~90mgの腫瘍組織を1.5mlの核抽出緩衝液(10mMのトリス-HCl、10mMのMgCl₂、25mMのKCl、1%のTriton X-100、8.6%のスクロース、+Rocheプロテアーゼ阻害剤錠剤1836145)中で均質化し、5分間氷上でインキュベートする。核を、600gで5分間4にて遠心分離することによって集め、PBS中で1回洗浄した。上清を除去し、15分ごとにボルテックスしながら、0,4Nの冷硫酸で1時間抽出した。抽出物を10,000rpmで10分間4にて遠心分離することによって清澄化し、10×体積の氷冷アセトンを含む新しいマイクロ遠心管に移す。ヒストンを-20で2時間~一晩析出させ、10,000gで10分間遠心分離によってペレット化し、そして水中に再懸濁させた。

10

【0299】

ELISA

ヒストンをコーティング緩衝液(PBS+0.05%BSA)中糖濃度で調製して、0.5ng/uLのサンプルを得、そして100uLのサンプルまたは標準を2連で296ウェルELISAプレート(Thermo Lab systems, Immulon 4HBX #3885)に添加した。プレートを密封し、一晩4でインキュベートした。翌日、プレートをBio Tekプレートウォッシャーにより300uL/ウェルのPBST(PBS+0.05%Tween 20; 10XPBST, KPL #51-14-02)で3回洗浄した。プレートを300uL/ウェルの希釈剤(PBS+2%BSA+0.05%Tween 20)でブロックし、室温で2時間インキュベートし、そしてPBSTで3回洗浄した。すべての抗体を希釈剤中で希釈した。100uL/ウェルの抗H3K27me3(CST #9733、50%グリセロールストック1:1,000)または抗全H3(Abcam ab1791、50%グリセロール1:10,000)を各プレートに添加した。プレートを90分間室温にてインキュベートし、そしてPBSTで3回洗浄した。100uL/ウェルの抗Rb-IgG-HRP(Cell Signaling Technology, 7074)を1:2,000でH3K27Me3プレートに添加し、1:6,000でH3プレートに添加し、そして90分間室温でインキュベートした。プレートを4回PBSTで洗浄した。検出のために、100uL/ウェルのTMB基質(BioF x Laboratories, #TMB5)を添加し、そしてプレートを暗所で室温にて5分間インキュベートした。反応を100uL/ウェルの1N H₂SO₄で停止させた。450nmでの吸光度をSpectraMax M5 Microプレートリーダーで読み取った。

20

30

【0300】

7日PD研究

化合物がインビボで腫瘍におけるH3K27me3ヒストンマークを調節できるかどうかを試験するために、異種移植腫瘍を有するマウスを62.5、83.3、125、166.7、250、333.3、または500mg/kg BIDまたはビクル(BIDスケジュール)の化合物で7日間治療した。1群あたり5匹の動物であった。動物を最終投与の3時間後に安楽死させ、腫瘍を上述のように凍結状態で保存した。ヒストン抽出後、ヒストンH3K27(H3K27me3)または全ヒストンH3のトリメチル化状態に対する抗体を使用したELISAアッセイにサンプルを適用した。これらのデータに基づいて、全H3K27に対する全体的メチル化の比を算出した。ELISAによって測定される全群についての平均全体的メチル化比は、ビクルと比較した標的阻害範囲を示す。この実験のデザインを表4Aに示す。

40

50

【 0 3 0 1 】

【 表 4 】

表 4 A 投与スキーム

群	N	治療	用量 (m g /k g)	投与体積	投与経路	スケジュー ール
1	5	ビヒクル	—	1 0 μ l /g.	p. o.	B I D x 7
2	5	化合物 1	6 2. 5	1 0 μ l /g	p. o.	B I D x 7
3	5	化合物 1	8 3. 3	1 0 μ l /g	p. o.	B I D x 7
4	5	化合物 1	1 2 5	1 0 μ l /g	p. o.	B I D x 7
5	5	化合物 1	1 6 6. 7	1 0 μ l /g	p. o.	B I D x 7
6	5	化合物 1	2 5 0	1 0 μ l /g	p. o.	B I D x 7
7	5	化合物 1	3 3 3. 3	1 0 μ l /g	p. o.	B I D x 7
8	5	化合物 1	5 0 0	1 0 μ l /g	p. o.	B I D x 7
9	5	化合物 A *	1 2 5	1 0 μ l /g.	p. o.	B I D x 7
1 0	5	化合物 A	2 5 0	1 0 μ l /g.	p. o.	B I D x 7

*化合物 A は N - ((4 , 6 - ジメチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 3 - イ
ル) メチル) - 5 - (エチル (テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) アミノ) - 4 -
メチル - 4 ' - (モルホリノメチル) - [1 , 1 ' - ビフェニル] - 3 - カルボキサミド
である。

【 0 3 0 2 】

実施例 5 : K a r p a s - 4 2 2 異種移植片モデルにおいて用量を増加させる有効性研
究

化合物がインビボで抗腫瘍効果を誘導できるかどうかを試験するために、異種移植腫瘍
を有するマウスを、例えば、6 2 . 5、1 2 5、2 5 0、または 5 0 0 m g / k g B I D
の化合物で 2 8 日間治療した。実験の有効性群については 1 群あたり 1 0 匹のマウスであ
った。ビヒクルおよび試験化合物治療群について 2 8 日の治療期間にわたる腫瘍成長を測
定した。

【 0 3 0 3 】

有効性コホートについては第 2 8 日の実験の最後で集めた腫瘍からヒストンを抽出した

10

20

30

40

50

(両コホートについて最終投薬の3時間後)。H3K27me3メチルマークを用量に依存した方法で治療での調節について評価した。

【0304】

この実験のデザインを表4Bに示す。

【0305】

【表5】

表4B 投与スキーム

群	N	治療	用量 (mg /kg)	投与体積	投与経路	スケジュール
1	10	ビヒクル	--	10 μ l /g.	p. o.	BID x 28
2	10	化合物1	62.5	10 μ l /g	p. o.	BID x 28
3	10	化合物1	125	10 μ l /g.	p. o.	BID x 28
4	10	化合物1	250	10 μ l /g.	p. o.	BID x 28
5	10	化合物1	500	10 μ l /g.	p. o.	BID x 28
6	10	化合物A*	250	10 μ l /g.	p. o.	BID x 28

*化合物Aは、N-((4,6-ジメチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-5-(エチル(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アミノ)-4-メチル-4'-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキサミドである。

【0306】

TVを、楕円体の体積についての式($L \times W^2$)/2(式中、LおよびWはそれぞれ直交するながらおよび幅の測定値(mm)である)によりキャリパー測定から算出した。

【0307】

データを平均 \pm 標準偏差(SD)として表した。ビヒクル処置群と化合物治療群とのTVにおける差を反復測定分散分析(ANOVA)とそれに続くダネット型多重比較検定によって分析した。0.05未満のP値(両側)は統計的に有意と見なされる。Prism 5ソフトウェアパッケージバージョン5.04(GraphPad Software, Inc., CA, USA)を用いて統計分析を実施した。

【0308】

上記研究は、化合物1および化合物AがどちらもKarpas-422異種移植片モデルにおいて腫瘍停止および退縮を示し、十分に耐受性であることを示した。例えば、図1および2を参照のこと。さらに、上記研究からの化合物1または化合物Aの薬物動態学的および薬力学的特性を図3~8に示す。図3は、治療後7日もしくは28日での腫瘍における化合物1の濃度または治療後7日での腫瘍における化合物Aの濃度を示す図である。この図中、「A」~「G」は、それぞれ62.5、83.3、125、166.7、250、333.3、および500mg/kgの投与量で化合物1投与後7日を示す「H」お

よび「I」は、それぞれ125および250 mg/kgの投薬量の化合物Aの投与後7日を示す；そして「J」～「L」は、それぞれ62.5、125および250 mg/kgの投薬量の化合物1の投与後28日を示す。注：第28日のサンプルについて、250 mg/kgの化合物Aおよび500 mg/kgの化合物1で治療した群からの腫瘍は、分析には小さすぎた；それぞれ250 mg/kgの化合物1および125 mg/kg化合物1で治療された群から10のうち1つだけ、10のうちの5だけが分析に十分な大きさであった。図4は、治療後7日または28日の結晶中の化合物1または化合物Aの濃度を示す図である。上の破線は化合物Aの血漿タンパク質結合（PPB）補正LCCを示し、下の破線は化合物1のPPB補正LCCを示す。図5は、化合物1または化合物Aで7日間治療されたマウス由来のKARPAS-422腫瘍における全体的H3K27me3メチル化を示す図である。この図中、「A」はビヒクル治療を示す；「B」～「H」は、それぞれ62.5、83.3、125、166.7、250、333.3、および500 mg/kgの投薬量の化合物1での治療を示す；そして「I」および「J」は、それぞれ125および250 mg/kgの投薬量の化合物Aでの治療を示す。図6は、化合物1で28日間治療したマウス由来のKARPAS-422腫瘍における全体的なH3K27me3メチル化を示す図である。図7は、化合物1または化合物Aで7日間治療した異種移植腫瘍を有するマウス由来の骨髄における全体的H3K27me3メチル化を示す図である。この図中、「A」はビヒクル治療を示す；「B」～「H」は、それぞれ62.5、83.3、125、166.7、250、333.3、および500 mg/kgの投薬量の化合物1での治療を示す；そして「I」および「J」は、それぞれ125および250 mg/kgの投薬量の化合物Aでの治療を示す。図8は、化合物1で28日間治療した異種移植腫瘍を有するマウス由来の骨髄における全体的H3K27me3メチル化を示す図である。この図中、「A」はビヒクル治療を示す；「B」～「E」は、それぞれ62.5、125、250、および500 mg/kgの投薬量の化合物1での治療を示す；そして「F」は250 mg/kgの投薬量の化合物Aでの治療を示す。

10

20

30

40

50

【0309】

以下の実施例6～8では、実験および分析は、例えば、J. Lin, *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6):1089-1116; L. Di et al., *Comb Chem High Throughput Screen.* 2008, 11(6):469-76; M. Fonsi et al., *Journal of Biomolecular Screening*, 2008, 13:862; E. Sjogren et al., *Drug Metab. Dispos.* 2012, 40:2273-2279; T.D. Bjornsson, et al., *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(7):815-832; J.B. Houston and K.E. Kenworthy, *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(3):246-254; and S.W. Grimm et al., *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(7):1355-1370（それぞれの内容は全体として参照により本明細書中に組み込まれる）で記載されているものと類似の方法および技術で実施した。

【0310】

実施例6：肝臓ミクロソームにおける代謝的安定性の評価

【0311】

化合物1、2、および105の代謝的安定性を、マウス、ラット、イヌ、サル、およびヒトを含む5種からの肝臓ミクロソームにおいて評価した。

【0312】

方法：インキュベーションを、100ミリモル/Lのリン酸カリウム緩衝液（pH7.4）、1 mg/mLの肝臓ミクロソーム、8濃度の試験化合物（すなわち、化合物1、2、または105）、および2 mg/mLのNADPHから構成される合計250 μLを含む96ウェルプレートで実施した。インキュベーションに使用した化合物の濃度は、45.7 nM～100 μMの範囲であった。NADPHの添加を使用して反応を開始し、インキュベーションを37で振盪水浴中で最高60分間実施した。内部標準（IS）を含む等体積の停止溶液を添加することによって、反応を停止させた。サンプルを次いで分析前に3000 RPMにて最低5分間冷蔵遠心分離機でスピンさせた。LC/TOFMSを使用することによって測定される、試験化合物のインキュベーションミックス中の喪失量を

使用して、肝臓マイクロソームでの固有クリアランス値を推定した。LC/TOFMSシステムは、Shimadzu SIL-HTCオートサンプラー（日本国京都府）、2つのポンプLC-20AD； Shimadzu Corp.）、および飛行時間型質量分析計（AB SCIEX Qstar Elite, AB Sciex（カリフォルニア州フォスター・シティー））を有するカラムオープン（CTO-20AC； Shimadzu Corp.）から構成されていた。試験化合物およびアッセイ用のISのピーク面積をAnalyst QS（version 2.0, Applied Biosystems（カリフォルニア州フォスター・シティー））によって積分した。窒素での衝突活性化分解（CAD）を使用して生成物イオンを発生させた。最適化された計器状態は、陽イオン化モード下であった。

10

【0313】

LC/MS/MS定量化は、試験化合物のピーク面積とISのピーク面積との比に基づいた。化合物1、2、または105およびISのピーク面積計算および積分はAnalyst QS 2.0（AB Sciex（カリフォルニア州フォスター・シティー））を使用した。計算は、Excel（Office 2010, Microsoft Corp., Redmond, WA）およびGraphPad Prism v. 5.02（GraphPad Software Inc., La Jolla, CA）を使用して実施した。データを分析し、J. Lin, Pharmaceutical Research, 2006, 23(6):1089-1116; and Di Let al., Comb Chem High Throughput Screen. 2008 11(6):469-76で記載されているものなど適切なSOPに基づいて分析し、報告した。

20

【0314】

K_m および V_{max} 値について使用した試験化合物の肝臓マイクロソームで枯渇は、時間に対してプロットすることによって算出して、枯渇速度を決定した。枯渇速度を次いで、適切な動力学モデルを使用してプロットした。データを次式に基づいて算出した：

【0315】

ミカエリス・メンテン： $Cl_{int} (\mu L / min / mg \text{ 肝臓マイクロソーム}) = V_{max} / K_m$

【0316】

ヒル： $Cl_{int} (\mu L / min / mg \text{ 肝臓マイクロソーム}) = Cl_{max} = V_{max} / K_s \cdot (n - 1) / (n(n - 1)^{1/n})$

30

【0317】

$Cl_{int} (\mu L / min / g \text{ 肝臓}) = Cl_{int} (\mu L / min / mg \text{ ミクロソーム}) \cdot \text{倍率}$ または $Cl_{int} (\mu L / min / 10^6 \text{ 細胞}) \cdot \text{倍率}$

【0318】

結果を以下の表5で提示する

【0319】

【表 6】

表 5

	推定固有クリアランス (mL/min/kg)				
	マウス	R a t	D o g	C y n o	ヒト
化合物 1	1 5 . 4	1 4 . 8	8 . 1	5 8 . 6	1 0 . 5
化合物 1 0 5	5 4 . 7	4 7 . 5	6 4 . 2	7 4 . 8	4 2 . 1
化合物 2	1 7 . 6	1 4 . 8	3 4 . 3	3 2 . 8	8 . 8

10

【 0 3 2 0 】

3つの試験した化合物、すなわち化合物 1、2、および 105 はすべてヒト肝臓ミクロソーム (HLM) において低い代謝的クリアランスを示した。代謝的クリアランスにおける種差も観察された。カニクイザルは概して他の種よりも高いクリアランスを示した。

20

【 0 3 2 1 】

実施例 7 : CYP 誘導の評価

【 0 3 2 2 】

化合物 1、2、および 105 のそれぞれの誘導を単一ドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞で評価した。

【 0 3 2 3 】

方法：肝細胞を BD Biosciences (Woburn, MA) から入手し、適切な培地および DAPI 核染色を Life Technologies (Durham, NC) から購入した。ダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM)、ダルベッコリン酸塩緩衝食塩水 (DPBS)、100x MEM 非必須アミノ酸、100x ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン溶液、2x トリパンブルーを Mediatech (Manassas, VA) から購入した。ウシ胎仔血清 (FBS) を組織培養生物学的 (Tulara, CA) から取得した。mRNA 分析用の 24 ウェルコラーゲンでコーティングしたプレートを BD Biosciences (San Jose, CA) から取得した。あらかじめ指定されたプローブおよびプライマーを 2 つの triplex アッセイで使用して、mRNA における変化を評価した。正の対照は、CYP1A については - ナフトフラボン (1 および 10 $\mu\text{mol/L}$)、CYP2B6 についてはフェノバルビタール (100 $\mu\text{mol/L}$ および 1 ミリモル/L)、そして CYP2C9 および CYP3A についてはリファンピシン (1 および 10 $\mu\text{mol/L}$) であった。DMSO をビヒクル (負) 対照として使用した。CYP 形態特異的アッセイを治療期間後に実施し、そして細胞を計数して、生存率を測定した。

30

40

【 0 3 2 4 】

凍結保存肝細胞を 37 水浴中で解凍し、メーカーの使用説明書にしたがって播種した。チューブ 1 本分の肝細胞を、Life Technologies 凍結保存肝細胞回復培地 (CHRM) を含む 50 mL の円錐管に添加した。細胞を、GH 3.8 ローターを有する Beckman 遠心機中 800 RPM にて 10 分間スピンさせた。上清を除去し、計数のために細胞を平板培地中に再懸濁させた。計数後、細胞を 750000 生存細胞/mL で再懸濁させた。懸濁液 (0.5 mL/ウェル) を 24 ウェルコラーゲンでコーティングされたプレート中に添加するか、または 10% FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン、および MEM 非必須アミノ酸を含む 60 μL の DMEM の添加後、80 μL の懸濁液を 96 ウェルのコラーゲンでコーティングされたプレートの各ウェルに添

50

加した。より良好なプレート被覆を提供するために旋回および揺動した後、細胞を5% CO₂ および37 °Cの組織培養インキュベーター中に入れ、一晚付着させた。細胞を次いで、CellzDirect肝細胞維持培地を用いて処理した。細胞を化合物1、2、または105 (1もしくは10 μmol/L)あるいはビヒクルに48時間暴露した。処理中、維持培地および試験化合物を24時間ごとに補充した。

【0325】

インキュベーション完了後、細胞をDPBSで洗浄した。DPBSで洗浄した後、DPBS中3.7% p-ホルムアルデヒドを使用して細胞を1時間固定した。ホルムアルデヒドを除去し、DPBS中0.6 μmol/LのDAPIを添加した。細胞をDAPIで20分間染色し、次いでDPBSで3回洗浄した。5X対物レンズを有するArrayScan II (Cellomics, Pittsburgh, PA)を用いて細胞を計数した。処理条件で見られる細胞の数をビヒクル対照で見いだされた細胞でわたったものを用いて残存する肝細胞の分率を算出した。

10

【0326】

処理後、Qiagen RNeasyキットからの緩衝液RLTを使用して細胞を溶解させた。製造業者のプロトコルを使用し、DNase処理を含むRNeasyキットを用いてmRNAを単離した。mRNA濃度をNanodrop ND-1000 (Wilmington, DE)によって測定した。mRNA濃度をドナー内のすべてのサンプルについて正規化した。製造業者の指示に従って、Life TechnologiesからのSuperscript VIL0 cDNA合成キットで逆転写を実施した。cDNA合成後、定量的リアルタイムPCRを、Life Technologies Applied Biosystemsの株式移転完全子会社からの7500 Fast Real Time PCRを使用して実施した。リアルタイムPCRの反応成分は次のものから構成されていた：10 μLのTaqman Fast Advanced Master Mix (Life Technologies)、2 μLのcDNA、5 μLの無ヌクレアーゼ水 (Life Technologies)、-2マイクログロブリンについて1 μLのプライマー限定FAM標識アッセイHS00984230__m1、CYP1A2について1 μLのプライマー限定VIC標識アッセイHS00167927__m1またはCYP2B6についてHS04183483__g1、およびCYP2C9について1 μLのプライマー限定NED標識アッセイHS04260376__m1またはCYP3A4についてHS00604506__m1。ビヒクル対照と比較した倍数の差の計算を、C_t法を用いた7500 Software version 2.0.5 (Life Technologies)によって実施した。GraphPad Prismを使用してE_{max} およびEC₅₀ の計算をおこなった。

20

30

【0327】

【表 7】

表 6

化合物	濃度 (μ M)	CYP1A		CYP2B6		CYP2C9		CYP3A		対照に 対する残 存細胞%
		誘導 (倍)	%正の 対照	誘導 (倍)	%正の 対照	誘導 (倍)	%正の 対照	誘導 (倍)	%正の 対照	
1	1	1.0 4	2.8	0.9 8	18. 0	1.0 4	43. 5	1.0 4	13. 9	107. 44
	10	1.1 4	3.0	1.4 3	26. 3	1.2 6	52. 6	0.9 9	13. 3	99.0 0
2	1	0.7 3	NA	0.6 1	NA	0.5 7	NA	0.5 9	NA	124. 70
	10	0.8 3	NA	0.6 4	NA	0.7 3	NA	0.7 3	NA	120. 90
105	1	1.1 4	3.0	1.3 9	25. 5	1.2 0	50. 4	1.3 5	18. 1	103. 19
	10	1.6 5	4.4	2.8 4	52. 2	1.8 2	76. 3	2.5 2	33. 8	97.4 9

10

20

【0328】

上記表 6 で示されるように、化合物 1 は顕著な誘導を示さない（潜在的に CYP2C9 を除く）；化合物 2 は誘導を示さない（活性は若干低い）；そして化合物 105 は CYP2B6、CYP2C9、および CYP3A の誘導を示した。細胞生存性の顕著な喪失は観察されなかった。

【0329】

実施例 8：CYP 阻害の評価

プールしたヒト肝臓ミクロソームを使用して、化合物 1、2、または 105 のヒトシトクロム P450 (CYP) の酵素活性の潜在的阻害を評価した。

30

【0330】

方法：複数の濃度でそれぞれの K_m 値付近でのプローブ CYP 反応に対して評価することによって化合物 1、2、および 105 の競合的阻害能を測定して、ヒト肝臓ミクロソーム (HLM) において IC_{50} 曲線を作製した。適切な場合、 K_I および k_{inact} 値を評価することによって、時間依存性不活性化 (TDI) 可能性も CYP3A4/5 について評価した。

【0331】

PB、HLM、CYP 選択的プローブ基質、および試験される阻害剤を含む懸濁液を 96 ウェルプレートに添加した。プレート 3 を 37 の水浴中で約 2 分間ブレインキュベートした。NADPH を 96 ウェルプレートの各ウェルに添加することによって反応を開始した。PB、HLM、および NADPH の最終濃度はそれぞれ 100 ミリモル/L (pH 7.4)、0.1 mg/mL、および 2.3 ミリモル/L であった。使用した CYP プローブ基質および CYP 阻害剤ならびにそれぞれの濃度を以下に記載する。各インキュベーションで使用した最終 MeOH 濃度は 0.8% を越えなかった。

40

【0332】

適切なインキュベーション時間後、IS を含有する等体積のクエンチ溶液を適切なウェルに添加した。試験サンプルと同様の成分を用いて標準サンプルおよび品質管理 (QS) サンプルを調製した。IS を含まないこと以外は他のサンプルと同様のクエンチ溶液で

50

ランクを調製した。プレートを5分間卓上遠心分離機で3000rpmにてスピさせた。サンプルをLC/MS/MSによって分析した。インキュベーション条件および正の対照を以下の表7に記載する。

【0333】

【表8】

表7

試験した CYP	CYP プローブ 基質	Sub. Conc. ($\mu\text{mol/L}$)	CYP 阻害剤 (正の対照)	最大阻 害濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	イン キュ ベー ション時 間. (分)	内標 (LC/MS/MS)
CYP1 A2	フェナセチン	40	フラフィリン	20	10	$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -アセトアミノフェン
CYP2 B6	ブプロピオン	140	チクロピジン	5	10	$^2\text{H}_6$ -ヒドロキシブプロピオン
CYP2 C8	アモジアキン	10	モンテルカスト	12	10	$^2\text{H}_3$ -デスエチルアモジアキン
CYP2 C9	トルブタミド	100	スルファフェナゾール	20	10	$^2\text{H}_9$ -ヒドロキシトルブタミド
CYP2 C19	(S)-メフェニトイン	30	(S)-ベンジルニルバノール	8	10	$^2\text{H}_3$ -4'-ヒドロキシメフェニトイン
CYP2 D6	(±)-ブフラロール	20	キニジン	2	5	$^2\text{H}_9$ -1'-ヒドロキシブフラロール
CYP3 A4/5	ミダゾラム テストステロン	3 70	ケトコナゾール	1	5	$^{13}\text{C}_3$ -1'-ヒドロキシミダゾラム (R)-プロプラノロール

10

20

30

40

50

【0334】

TDIを評価するために、第1インキュベーション、PB、HLM、および阻害剤ストックを含む懸濁液を96ウェルプレートに添加した。プレート3を37℃の水浴中で約2分間プレインキュベートした。NADPHを96ウェルプレートの各ウェルに添加することによって反応を開始し、0、5、10、15、20、および30分間実施した。NADPHなしの対照について、PB溶液をNADPHストック溶液と置換した。PB、HLM、およびNADPHの最終濃度は、それぞれ、100mmol/L (pH7.4)、0.2mg/mL、および2.3mmol/Lであった。各時点で、12.5 μL の第1インキュベーション懸濁液を、残存活性を評価するために、あらかじめインキュベートしたCYP選択的プローブ基質を含む第2インキュベーション混合物中で20倍に希釈した。使用したプローブ基質はテストステロン(250 $\mu\text{mol/L}$)であり、正の対照はトロレアンドマイシンであった。

【0335】

使用したHPLCシステムは、SIL-HTCオートサンプラー、DGU-14A脱気装置、3つのLC-10ADvpポンプ、およびCTO-10ACvpカラムオープンからなるShimadzu HPLCシステム（日本国京都）であった。サンプルを、API4000QTrap（AB Sciex（カリフォルニア州フォスター・シティー））三連四重極質量分析計で陽イオンモードでターボスプレーイオン化を使用して分析した。

【0336】

全てのモニタリングされた代謝産物およびISのピーク面積計算および積分を、Analyst 1.6（AB Sciex（カリフォルニア州フォスター・シティー））によって処理した。定量化は、校正標準の濃度に対して代謝産物対ISのピーク面積比をプロットすることによって作成された校正曲線を使用して達成され、 $1/x^2$ 重みづけでの二次回帰によって得た（ $y = ax^2 + bx + c$ ）パーセント阻害計算はExcel（Office 2010, Microsoft Corp., Redmond, WA）を利用し、1つの結合部位の仮定に基づきGraphPad Prism（Version 5.02, GraphPad Software, Inc.（カリフォルニア州ラホヤ））を使用してプロットした。試験化合物および正の対照の名目濃度GraphPad Prismでlog変換した。残存CYP3A4/5活性対プレインキュベーション時間のプロットを使用して、CYP活性損失率（ ）を非線形回帰によって推定した。パラメータ k_{ina} および K_I を次に、次式：

10

【0337】

【数19】

20

$$\lambda = \frac{k_{ina}}{c_t} \times \frac{[I]}{K_I + [I]}$$

（式中、[I]は化合物1、2、または105の初期濃度である）に適合させることによって推定した。

【0338】

【表9】

表8 可逆阻害

30

化合物	IC ₅₀ (μM)						
	CYP1A	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5ミダゾラム	CYP3A4/5テストステロン
1	>100	>100	>100	89.57	22.94	40.46	>100
2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
105	>100	47.43	75.66	33.65	2.95	9.67	>100

40

【0339】

【表 10】

表9 時間依存性不活性化 (TDI) 評価

化合物	K_I (μM)	k_{inact} (min^{-1})	k_{inact}/K_I ($\mu M^{-1} \cdot min^{-1}$)
1	6.4 (3.3**)	0.0277	0.0043
105	10.2	0.0214	0.0021
2	22.3	0.0376	0.0017

10

【0340】

上記表8で示されるように、化合物1および2は顕著な可逆阻害を示さず、そして化合物105はCYP2D6およびCYP3A4(ミダゾラム)の潜在的に顕著な阻害を示した。また、上記表9で示されるように、化合物1、2、および105のすべてはCYP3A4/5の時間、濃度、およびNADPHに依存した不活性化を示した(プローブとしてミダゾラムを使用)。

【0341】

本明細書中で言及される特許文書および科学論文のそれぞれの全開示はあらゆる目的のために参照により本明細書中に組み込まれる。

20

【0342】

本発明は、その主旨または本質的な特性から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化することができる。前記実施形態は、したがって、本明細書中で記載する本発明に関して限定的であるよりもむしろあらゆる点で例示的であると見なされるべきである。したがって、本発明の範囲は、前記事項によってではなく、むしろ添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の等価物の意味および範囲内にあるすべての変更はその中に含まれることが意図される。

【 図 1 】

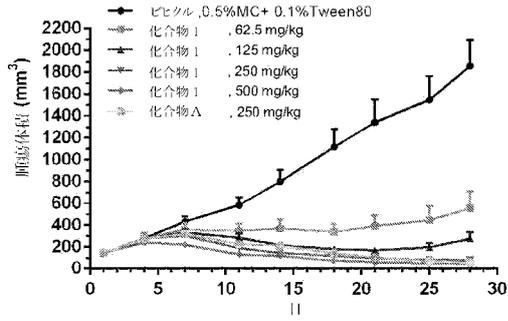


図 1

【 図 2 】

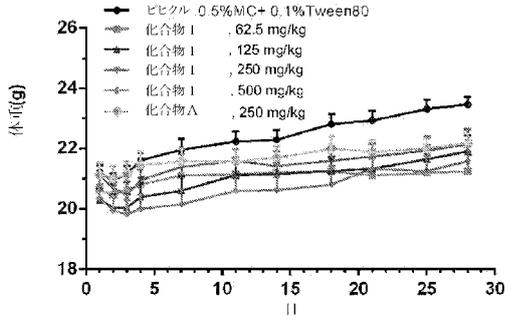


図 2

【 図 3 】

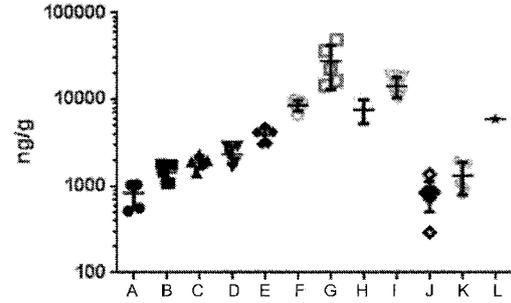


図 3

【 図 4 】

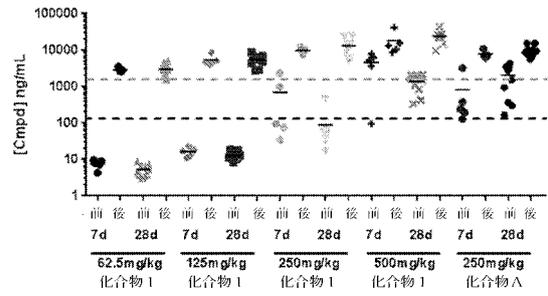


図 4

【 図 5 】

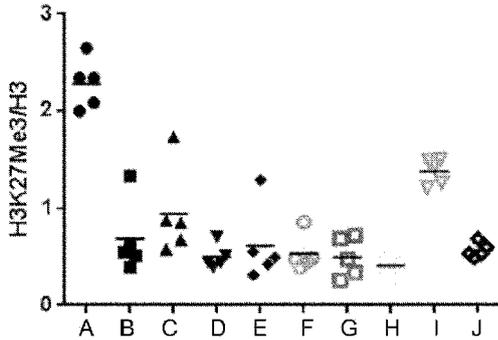


図 5

【 図 7 】

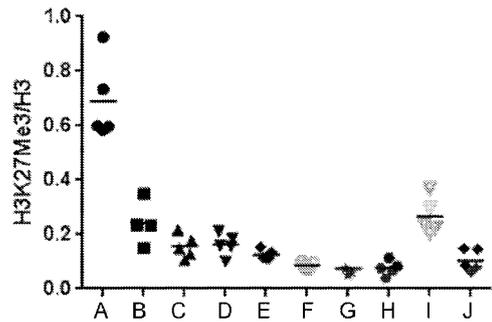


図 7

【 図 6 】

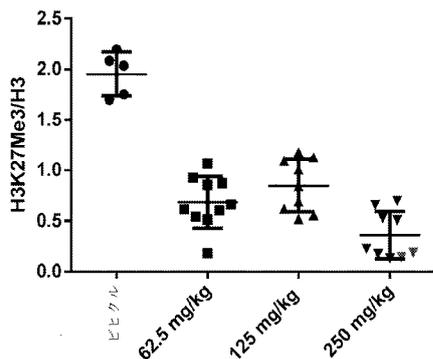


図 6

【 図 8 】

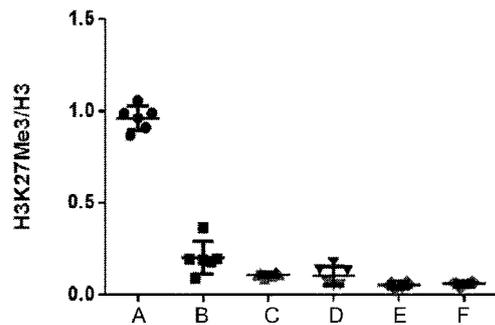


図 8

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月6日(2015.8.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0234

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0234】

基質。非修飾リジン27(H3K27me0)またはジメチル化リジン27(H3K27me2)のいずれかを含むヒトヒストンH3残基21~44に代表的なペプチドを21st Century Biochemicals製のC末端G(K-ビオチン)リンカー-親和性標識モチーフおよびC末端アミドキャップで合成した。ペプチドを高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)精製して95%を超える純度にし、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)によって確認した。配列を以下に記載する。

H3K27me0: ATKAAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(ビオチン)-アミド(配列番号1)

H3K27me2: ATKAAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(ビオチン)-アミド(配列番号2)

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2015533176000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/065126
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D 213/50 (2006.01) C07D 401/12 (2006.01) C07D 405/12 (2006.01) C07D 407/12 (2006.01) C07D 413/12 (2006.01) C07D 413/14 (2006.01) A61K 31/4412 (2006.01) A61K 31/444 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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)		
File: Registry and CAPLUS structure search of claim 1 compounds.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<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 27 March 2014	Date of mailing of the international search report 27 March 2014	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999	Authorised officer Pina Potenza AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 6399359614	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/US2013/065126
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0071418 A1 (COPELAND ET AL) 22 March 2012 Abstract, Claims 11-23	1-16
P,X	WO 2012/142513 A1 (EPIZYME, INC.) 18 October 2012 Abstract, pages 17-21, paragraphs [080]-[0104], Table 1 Compound Numbers 153, 160-161, 167, 225-227, 277-278, 283, 290, 315, 346 and Claims 1-68.	1-16
P,X	WO 2012/142504 A1 (EPIZYME, INC.) 18 October 2012 Abstract, pages 10-15, paragraphs [064]-[086], Table 1, Compound Numbers 42-43, 47, 108, 112, 128, 141, 146-148, 182 and Claims 1-63	1-3, 8-16
P,X	WO 2013/138361 A1 (EPIZYME, INC.) 19 September 2013 Abstract, Table 1, Compound Number 147, page 104	1-3, 8-16
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2013/065126	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2012/0071418 A1	22 Mar 2012	CA 2810998 A1	15 Mar 2012
		CN 103261890 A	21 Aug 2013
		EP 2614369 A2	17 Jul 2013
		JP 2013543114 A	28 Nov 2013
		KR 20140019770 A	17 Feb 2014
		US 2012071418 A1	22 Mar 2012
		US 2013040906 A1	14 Feb 2013
		US 2013303555 A1	14 Nov 2013
		WO 2012034132 A2	15 Mar 2012
		WO 2013138361 A1	19 Sep 2013
		WO 2012/142513 A1	18 Oct 2012
CA 2832846 A1	18 Oct 2012		
EP 2697198 A1	19 Feb 2014		
TW 201305107 A	01 Feb 2013		
WO 2012142513 A1	18 Oct 2012		
WO 2012/142504 A1	18 Oct 2012	AU 2012242595 A1	02 May 2013
		CA 2832843 A1	18 Oct 2012
		EP 2697199 A1	19 Feb 2014
		SG 194447 A1	30 Dec 2013
		TW 201302704 A	16 Jan 2013
		US 2012264734 A1	18 Oct 2012
		US 8410088 B2	02 Apr 2013
		US 2013123234 A1	16 May 2013
		WO 2012142504 A1	18 Oct 2012
WO 2013/138361 A1	19 Sep 2013	CA 2810998 A1	15 Mar 2012
		CN 103261890 A	21 Aug 2013
		EP 2614369 A2	17 Jul 2013
		JP 2013543114 A	28 Nov 2013
		KR 20140019770 A	17 Feb 2014
		US 2012071418 A1	22 Mar 2012
		US 2013040906 A1	14 Feb 2013
		US 2013303555 A1	14 Nov 2013
		WO 2012034132 A2	15 Mar 2012
		WO 2013138361 A1	19 Sep 2013

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2013/065126	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
End of Annex			
<p><small>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)</small></p>			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)			A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)			A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)			A 6 1 P	35/02		

- (31)優先権主張番号 61/786,277
 (32)優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(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, TM), 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, RS, 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, HR, 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 キャンベル, ジョン・エマーソン
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 2 1 3 8、ケンブリッジ、マウント・オーバーン・ストリート・5 8 1、ユニット・ナンバー・1

(72)発明者 関 雅史
 茨城県つくば市東光台5 - 1 - 3 エーザイ株式会社筑波研究所

Fターム(参考) 4C055 AA01 BA03 BA06 BA42 CA28 CB03 CB04 CB08 CB10 DA06
 4C063 AA03 BB09 CC78 DD10 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 BC17 BC21 BC73 GA01 GA02 GA07 GA08
 GA16 MA01 MA04 ZB26 ZB27