

(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2018-521029

(P2018-521029A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 403/14 (2006.01)	C O 7 D 403/14 C S P	4 C O 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 6
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
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	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-564031 (P2017-564031)	(71) 出願人	398050098
(86) (22) 出願日	平成28年6月10日 (2016.6.10)		バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年1月26日 (2018.1.26)		Biogen MA Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/036952		アメリカ合衆国02142 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート225番
(87) 国際公開番号	W02016/201271	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成28年12月15日 (2016.12.15)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	62/173,896	(74) 代理人	100118902
(32) 優先日	平成27年6月10日 (2015.6.10)		弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ブルトン型チロシンキナーゼのピアリール阻害剤のアジピン酸塩形態及び組成物

(57) 【要約】

本発明は、ブルトン型チロシンキナーゼの阻害剤として有用であり、それに関する所望の特徴を示す化合物及びその組成物を提供する。

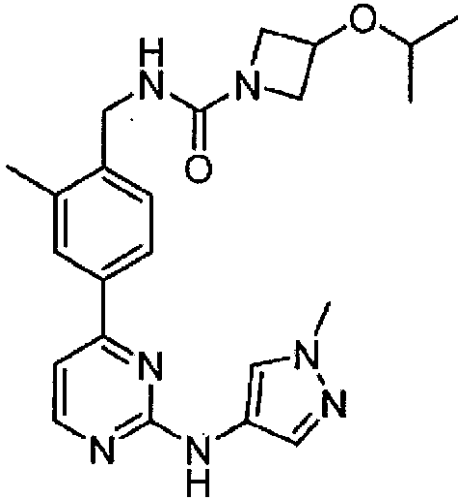
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

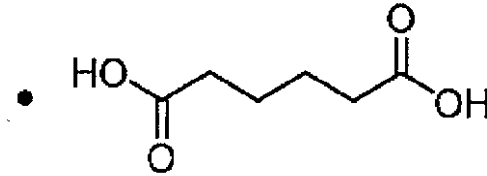
【請求項 1】

化合物 1 及びアジピン酸：

【化 1】



化合物 1



アジピン酸

10

20

を含む、固体の化合物 2。

【請求項 2】

前記固体が、化合物 1 及びアジピン酸の共結晶である結晶性固体である、請求項 1 に記載の固体。

【請求項 3】

前記結晶性固体が非晶質化合物 2 を実質的に含まない、請求項 2 に記載の固体。

【請求項 4】

前記固体が不純物を実質的に含まない、請求項 1 に記載の固体。

【請求項 5】

前記固体が I 型である、請求項 2 に記載の固体。

30

【請求項 6】

約 6.34 度、約 9.24 度及び約 27.37 度² から選択される、その XRPD の 1 つ以上のピークを有する、請求項 5 に記載の固体。

【請求項 7】

約 6.34 度、約 9.24 度及び約 27.37 度² から選択される、その XRPD の少なくとも 2 つのピークを有する、請求項 6 に記載の固体。

【請求項 8】

図 5 に示されるものと実質的に類似している XRPD を有する、請求項 5 に記載の固体

。

40

【請求項 9】

前記化合物が II 型である、請求項 2 に記載の固体。

【請求項 10】

約 7.04 度、約 20.08 度及び約 25.14 度² から選択される、その XRPD の 1 つ以上のピークを有する、請求項 9 に記載の固体。

【請求項 11】

約 7.04 度、約 20.08 度及び約 25.14 度² から選択される、その XRPD の少なくとも 2 つのピークを有する、請求項 10 に記載の固体。

【請求項 12】

図 10 に示されるものと実質的に類似している XRPD を有する、請求項 9 に記載の固

50

体。

【請求項 13】

前記固体が非晶質固体である、請求項 1 に記載の固体。

【請求項 14】

前記固体が結晶性の化合物 2 を実質的に含まない、請求項 13 に記載の固体。

【請求項 15】

前記固体が不純物を実質的に含まない、請求項 13 に記載の化合物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の固体、及び薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、組成物。

10

【請求項 17】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の固体またはその組成物の有効量をブルトン型チロシンキナーゼに接触させることを含む、ブルトン型チロシンキナーゼの酵素活性を減少させる方法。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の固体またはその組成物の有効量を対象に投与することを含む、ブルトン型チロシンキナーゼの阻害に反応する疾患を治療する方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の固体またはその組成物の有効量を対象に投与することを含む、自己免疫不全、炎症性疾患及び癌からなる群から選択される疾患を治療する方法。

20

【請求項 20】

前記疾患が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、アトピー性皮膚炎、白血病及びリンパ腫から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

プロテインキナーゼは、腫瘍学、神経学及び免疫学の多くのヒト疾患の発生及び治療で重要な役割を果たす、500以上のタンパク質からなる大きな多重遺伝子族である。Tecキナーゼは、5つの要素(Tec(肝細胞癌内で発現するチロシンキナーゼ)、Btk(ブルトン型チロシンキナーゼ)、Itk(インターロイキン-2(IL-2)誘発性T細胞キナーゼ、EmtまたはTskとしても知られる)、Rlk(静止期リンパ球キナーゼ、Txkとしても知られる)、及びBmx(染色体X上の骨髄チロシンキナーゼ遺伝子、Etkとしても知られる))からなる、非受容体型チロシンキナーゼであり、ならびにそれは主として造血細胞中で発現するが、Bmx及びTecの発現は、内皮細胞及び肝細胞において検出されている。Tecキナーゼ(Itk、Rlk及びTec)はT細胞内で発現し、すべてT細胞受容体(TCR)の下流で活性化される。Btkは、B細胞活性化、増殖、及び分化の調節に關与するB細胞受容体(BCR)シグナル伝達の下流メディエーターである。更に具体的にはBtkは、ホスファチジルイノシトール(3,4,5)-トリホスフェート(PIP3)に結合するPHドメインを含む。PIP3結合は、Btkを誘導してホスホリパーゼC(PLC)をリン酸化し、それによりPIP2を加水分解して2つの二次メッセンジャー、イノシトールトリホスフェート(IP3)及びジアシルグリセロール(DAG)を生成して、プロテインキナーゼPKCを活性化し、その後、追加的なB細胞シグナル伝達を誘導する。Btk酵素活性を不能にする突然変異により、原発性免疫不全であるXLA症候群(X連鎖型無ガンマグロブリン血症)を生じる。TecキナーゼがB細胞及びT細胞シグナル伝達の両方において果たす重大な役割を考慮すれば、Tecキナーゼは、自己免疫不全の目的とする対象になっている。

30

40

【0002】

したがって、Btkに効果的な阻害剤は当該技術分野において特に必要である。本発明はこれらの及び他の必要性も満足させるものである。

50

【発明の概要】

【0003】

本発明の新規な形態及びその組成物は、1つ以上のプロテインキナーゼの阻害剤として有用であり、それに関して望ましい特徴を示すことが、今では判明している。一般的に酸付加形態または遊離塩形態及びその薬学的に許容される組成物は、本明細書で詳述するとおり、様々な疾患もしくは障害の重篤度を治療するまたは軽減することによって有用である。

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】アジピン酸及び化合物1 A型と共に、化合物2 I型及び化合物2 II型のXRPDパターンを示す。 10

【図2】化合物2 I型のDSC/TGAデータを示す。

【図3】化合物2 II型のDSC/TGAデータを示す。

【図4】化合物2 II型のTGA/DSCデータを示す。

【図5】実施例4の手順により得られた化合物2 I型のスケールアップ試料のXRPDパターンを提供する。

【図6】実施例4の手順により得られた化合物2 I型のTGA及びDSCデータを提供する。

【図7】化合物2 I型がやや吸湿性であることを示す、25 / 相対湿度80%にて0.3%の水分取り込みを示すDVS結果を提供する。 20

【図8】実施例5の手順を使用して調製した化合物2 I型のXRPDパターンを示す。

【図9】実施例5の手順を使用して調製した化合物2 I型のTGA及びDSCデータを示す。

【図10】実施例6の手順により得られた化合物2 II型のXRPDパターンを提供する。

【図11】実施例6の手順により得られた化合物2 II型のTGA及びDSCデータを提供する。

【図12】化合物2 II型がやや吸湿性であることを示す、25 / 相対湿度80%にて0.3%の水分取り込みを示すDVS結果を提供する。

【図13】化合物2 II型及び化合物2 I型の溶解度データを示す。 30

【図14】化合物2 I型単結晶の3次元構造を示す。

【図15】化合物2 I型単結晶の単位格子を示す。

【図16】化合物2 II型単結晶の3次元構造を示す。

【図17】化合物2 II型単結晶の単位格子を示す。

【発明を実施するための形態】

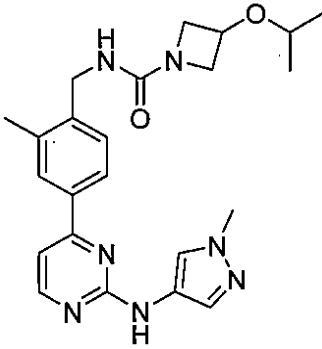
【0005】

本発明の特定の態様の概説：

PCT特許公開第WO2015/089337号(2014年12月11日出願のPCT出願PCT/US14/69853号(「出願853」))は特定のBtk阻害剤化合物を記載し、そのすべてを本明細書に参照により組み込む。このような化合物は、3-イソプロポキシ-N-(2-メチル-4-(2-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)アミノ)ピリミジン-4-イル)ベンジル)アゼチジン-1-カルボキサミド、化合物1を含む。 40

【0006】

【化 1】



化合物 1

10

【0007】

化合物 1 は遊離塩基であり、出願 853 では化合物番号 I - 21 として示す。化合物 1 の合成は出願 853 の実施例 21 で詳述されており、参照を容易にするために本明細書に再掲する。

【0008】

化合物 1 は、BTK 阻害の *in vitro* 及び *in vivo* アッセイで BTK に対して効力を示した（例えば、出願 853 の表 1 及び表 2 を参照）。例えば、化合物 1 が *in vitro* Btk キナーゼアッセイで測定した $IC_{50} < 10 \text{ nM}$ 、及び pBTK アッセイで測定した $IC_{50} < 500 \text{ nM}$ を有することを、出願 853 は報告する。したがって、化合物 1 は、BTK の活性と関連した 1 つ以上の疾患を治療するために有用である。

20

【0009】

改善された水溶解度、安定性、吸収性、生物学的利用能及び製剤の容易さなどの特性を付与する、化合物 1 の酸付加生成物または固体を提供することは、望ましい。したがって本発明は、化合物 1 の遊離塩基形態及び酸付加形態を提供する。

【0010】

1. 化合物 2 (アジピン酸 × 化合物 1)

30

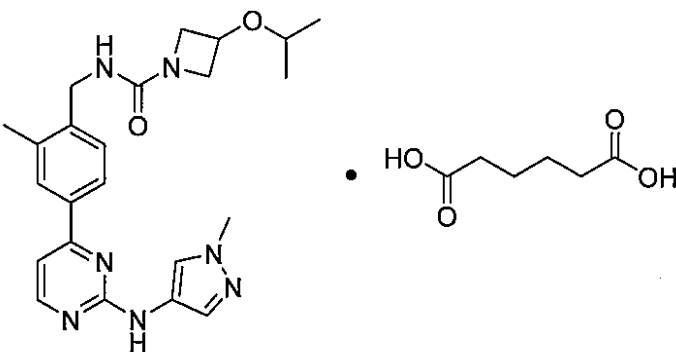
一実施形態によれば、本発明は、化合物 1 及びアジピン酸を含む化学種化合物 2 を提供する。

【0011】

いくつかの実施形態において、化合物 2 は

【0012】

【化 2】



化合物 2

40

【0013】

として示される。

50

化合物 2 は種々の形態で存在することができる、企図されている。化合物 2 が固体のとき、前記化合物は、非晶質、結晶性またはこれらの混合物であり得る。代表的な固体を、下で更に詳細に記載する。

【0014】

いくつかの実施形態で、本発明は、不純物を実質的に含まない化合物 2 を提供する。本明細書で使用する場合「不純物を実質的に含まない」という用語は、化合物が有意な量の異物を含まないことを意味する。このような異物は、過剰なアジピン酸、過剰な化合物 1、残留溶媒、または化合物 2 の調製及び/またはその単離から生じ得る他の任意の不純物を含むことができる。いくつかの実施形態で、化合物 2 の少なくとも約 95 重量%が存在する。本発明の更に他の実施形態では、化合物 2 の少なくとも約 99 重量%が存在する。

10

【0015】

一実施形態によれば、化合物 2 は、少なくとも約 97、97.5、98.0、98.5、99、99.5、99.8 重量%の量で存在し、パーセンテージは組成物の総重量を基準とする。別の実施形態によれば、化合物 2 は、HPLC クロマトグラムの総面積に対して、有機不純物全体の約 3.0 HPLC 面積%以下を含み、特定の実施形態で約 1.5 HPLC 面積%の有機不純物を含む。他の実施形態様において、化合物 2 は、HPLC クロマトグラムの総面積に対して、任意の単一不純物の約 1.0 HPLC 面積%以下、任意の単一不純物の約 0.6 HPLC 面積%以下、及び特定の実施形態で任意の単一不純物の約 0.5 HPLC 面積%以下を含む。

【0016】

化合物 2 で示す構造は、化合物 2 のすべての互変異性形態を含有することも意味する。そのうえ、本明細書に示された構造は、1つ以上の同位体標識原子の存在下でのみ異なる化合物を含有することも意味する。例えば重水素もしくは三重水素による水素の置換、または ^{13}C もしくは ^{14}C 標識炭素による炭素の置換を除いて、本発明の構造を有する化合物は本発明の範囲内である。

20

【0017】

化合物 2 は種々の形態で存在することができるということが見いだされた。代表的なそのような形態は、本明細書に記載のような多形体を含む。

いくつかの実施形態では、化合物 2 は非晶質である。いくつかの実施形態において、化合物 2 は非晶質であり、結晶性化合物 2 を実質的に含まない。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、化合物 2 は結晶性の固体である。他の実施形態において、化合物 2 は、非晶質化合物 2 を実質的に含まない結晶性の固体である。本明細書で使用する場合「非晶質化合物 2 を実質的に含まない」という用語は、化合物が有意な量の非晶質化合物 2 を含まないことを意味する。特定の実施形態で、少なくとも約 95 重量%の結晶性化合物 2 が存在する。本発明の更に他の実施形態において、少なくとも約 99 重量%の結晶性化合物 2 が存在する。

【0019】

一実施形態において、化合物 2 は、約 1 : 1 である (化合物 1) : (アジピン酸) の化学量論を有する。「モノアジペート」という用語は、このような化学量論を有する化合物を指す。

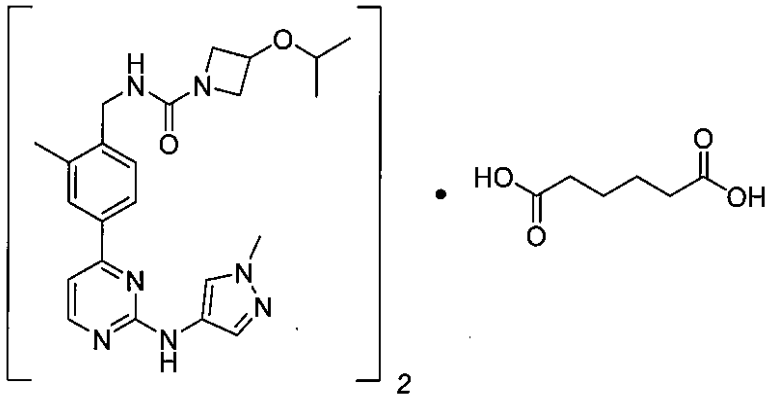
40

【0020】

別の実施形態で、化合物 2 は、約 2 : 1 である (化合物 1) : (アジピン酸) の化学量論を有する。「ヘミアジペート」という用語は、このような化学量論を有する化合物を指す。

【0021】

【化3】



化合物2ヘミアジペート

10

【0022】

化合物2は少なくとも2つの異なる固体で存在できるということが、見いだされた。

いくつかの実施形態では、約1:1の(化合物1):(アジピン酸)の化学量論である。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書でI型(すなわち、「モノアジペート」と称される化合物2の固体を提供する。

20

【0023】

いくつかの実施形態では、約2:1の(化合物1):(アジピン酸)の化学量論である。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書でII型(すなわち、「ヘミアジペート」と称される化合物2の固体を提供する。

【0024】

固体の調製のための塩基及び酸化合物の組み合わせにおいて、 pK_a (塩基) - pK_a (酸) = 1は、一般的に2つの化合物がイオン化される塩化合物の形成を可能にする。この閾値が満たさない場合、非イオン性相互作用(例えば、水素結合)は依然として、中性酸と塩基化合物の間に発生して、例えば共結晶を形成することができる。化合物1(塩基)の pK_a は、電位差滴定を介して3.31(±0.06)であると決定し、一方アジピン酸は、約4.4の pK_{a1} 及び約5.4の pK_{a2} を有する。

30

【0025】

いくつかの実施形態において、化合物2(例えば化合物2I型または化合物2II型)は、共結晶である。本明細書で使用する場合「共結晶」は、同じ結晶格子の2つ以上(例えば2)の分子からなる結晶性材料である固体である。共結晶において、水素結合、または他の非共有結合性もしくは非イオン性分子相互作用(例えば、ファンデルワールス力または π -相互作用)は、結晶格子中に存在する化合物の間に存在できる。

【0026】

化合物2I型

いくつかの実施形態では、化合物2I型は、下記の表1に記載されているピークから選択される少なくとも1、2、3、4または5スペクトルピーク(複数可)を有する。

40

【0027】

【表 1】

表 1 化合物 2 I¹型の XRPD ピーク位置

位置 (° 2θ)	位置 (° 2θ)
6.34	24.01
9.24	26.25
12.78	27.37
15.43	
18.26	
19.11	
19.56	
20.57	
21.76	
22.58	

10

¹この及びすべての次の表で 2θ 位置は±0.2以内である。

【0028】

いくつかの実施形態では、化合物 2 I 型は、約 6.34、9.24、27.37 から選択される X 線粉末回折パターンの 1 つ以上のピークを有するという点を特徴とする。いくつかの実施形態では、化合物 2 I 型は、約 6.34、9.24、27.37 から選択される X 線粉末回折パターンの 2 つ以上のピークを有するという点を特徴とする。いくつかの実施形態では、化合物 2 I 型は、約 6.34、9.24、27.37 から選択される X 線粉末回折パターンの 3 つすべてのピークを有するという点を特徴とする。本明細書で使用する場合「約」という用語は、2 度値に関して使われるとき、表示値±0.2度2値を指す。

20

【0029】

特定の実施形態で、X 線粉末回折パターンは、図 5 に示される XRPD と実質的に類似している。

30

化合物 2 I 型を調製する方法は以下に記載されている。

【0030】

いくつかの実施形態では、約 1 : 1 である化合物 2 I 型の (化合物 1) : (アジピン酸) の化学量論である。

化合物 2 I I 型

いくつかの実施形態では、化合物 2 I I 型は、下記の表 2 に記載されているピークから選択される少なくとも 1、2、3、4 または 5 スペクトルピーク (複数可) を有する。

【0031】

【表 2】

表 2 化合物 2 I I 型の XRPD ピーク位置

位置 (° 2θ)	位置 (° 2θ)
7.04	21.23
8.79	22.43
11.17	23.43
12.72	24.58
13.08	25.14
14.12	25.72
17.65	27.17
18.48	28.48
19.38	
20.08	

10

¹この及びすべての次の表で、2θ 位置は±0.2 以内である。

【0032】

いくつかの実施形態では、化合物 2 I I 型は、約 7.04、20.08、25.14 から選択される X 線粉末回折パターンの 1 つ以上のピークを有するという点を特徴とする。いくつかの実施形態では、化合物 2 I I 型は、約 7.04、20.08、25.14 から選択される X 線粉末回折パターンの 2 つ以上のピークを有するという点を特徴とする。いくつかの実施形態では、化合物 2 I I 型は、約 7.04、20.08、25.14 から選択される X 線粉末回折パターンの 3 つすべてのピークを有するという点を特徴とする。

20

【0033】

特定の実施形態で、X 線粉末回折パターンは、図 10 に示される XRPD と実質的に類似している。

化合物 2 I I 型を調製する方法は以下に記載されている。

【0034】

いくつかの実施形態では、約 2 : 1 である化合物 2 I I 型の (化合物 1) : (アジピン酸) の化学量論である。

30

化合物を提供する一般的方法

化合物 1 は、出願 853 に詳細が記載された方法に従って調製されて、そのすべては参照により本明細書に組み込まれる。

【0035】

本明細書に記載されるように、化合物 2 及びその形態は、化合物 1 をアジピン酸と結合させて化合物 1 から調製して、生成物、化合物 2 を形成する。化合物 1 及びアジピン酸の化学量論は変化できる。したがって本発明の別の態様は、化合物 2 及びその形態を調製する方法を提供する。

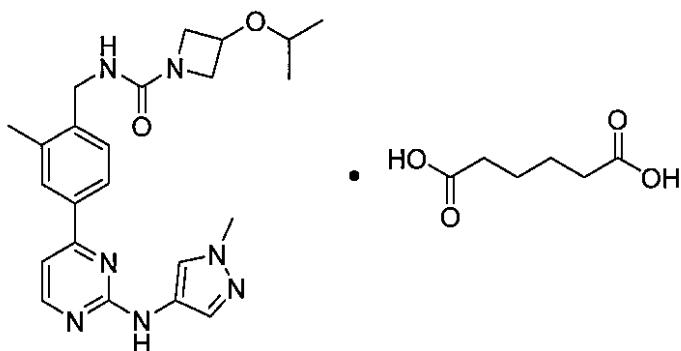
40

【0036】

一般的に上述したように、いくつかの実施形態において、本発明は、化合物 2

【0037】

【化4】



化合物 2

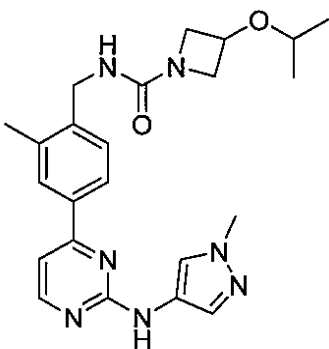
10

【0038】

を調製する方法であって、化合物 1

【0039】

【化5】



化合物 1

20

【0040】

を、化合物 2 を形成するのに好適な条件下でアジピン酸と、所望により好適な溶媒と結合する工程を含む、前記方法を提供する。

30

いくつかの実施形態では、本発明は、化合物 1 とアジピン酸を含む固体（すなわち化合物 2 I 型）を作成する方法を提供する。

【0041】

いくつかの実施形態では、本発明は、化合物 1 とアジピン酸を含む固体（すなわち化合物 2 II 型）を作成する方法を提供する。

いくつかの実施形態では、本発明は、化合物 1 とアジピン酸を含む固体（すなわち非晶質）を作成する方法を提供する。

40

【0042】

好適な溶媒は、化合物 1 及び / またはアジピン酸が可溶性である、または少なくとも部分的に可溶性である、任意の溶媒系（例えば、1 つの溶媒または溶媒混合物）であり得る。

【0043】

本発明に有用な好適な溶媒の例は、プロトン性溶媒、非プロトン性溶媒、極性非プロトン性溶媒またはこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態で、好適な溶媒は、エーテル、エステル、アルコール、ケトンまたはこれらの混合物を含む。いくつかの実施形態において、溶媒は 1 つ以上の有機アルコールである。いくつかの実施形態において、溶媒は塩素化されている。いくつかの実施形態で、溶媒は芳香族溶媒である。

50

【0044】

特定の実施形態で、好適な溶媒は、メタノール、エタノール、イソプロパノールまたはアセトンであり、前記溶媒は無水、または水もしくはヘプタンと結合している。いくつかの実施形態で、好適な溶媒は、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、グリム、ジグリム、メチル t - ブチルエーテル、t - ブタノール、n - ブタノール及びアセトニトリルを含む。いくつかの実施形態において、好適な溶媒はエタノールである。いくつかの実施形態において、好適な溶媒は無水エタノールである。いくつかの実施形態において、好適な溶媒は M T B E である。

【0045】

いくつかの実施形態において、好適な溶媒は酢酸エチルである。いくつかの実施形態において、好適な溶媒は、メタノール及び塩化メチレンの混合物である。いくつかの実施形態において、好適な溶媒は、アセトニトリル及び水の混合物である。いくつかの実施形態において、好適な溶媒は、酢酸メチル、酢酸イソプロピル、アセトンまたはテトラヒドロフランである。いくつかの実施形態において、好適な溶媒はジエチルエーテルである。いくつかの実施形態において、好適な溶媒は水である。いくつかの実施形態において、好適な溶媒はメチルエチルケトンである。いくつかの実施形態において、好適な溶媒はトルエンである。いくつかの実施形態において、好適な溶媒はテトラヒドロフランである。

10

【0046】

いくつかの実施形態では、本発明は、溶媒を除去する工程及び/または溶媒を添加する工程を含む、化合物 2 を調製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、添加した溶媒は、除去した溶媒と同じである。いくつかの実施形態では、添加した溶媒は、除去した溶媒と異なる。溶媒除去の方法は合成及び化学技術において周知であり、本明細書に記載のもの及び裏付けとなる実施例のものの中のいずれかを含むが、これらに限定されない。

20

【0047】

いくつかの実施形態では、化合物 2 を調製する方法は、調製物を加熱する工程及び/またはそれを冷却する工程を含む。

いくつかの実施形態では、化合物 2 を調製する方法は、調製物をかき混ぜる工程及び/または攪拌する工程を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、化合物 2 を調製する方法は、好適な酸を化合物 1 の溶液または懸濁液に加える工程を含む。

30

いくつかの実施形態では、化合物 2 を調製する方法は、加熱する工程を含む。

【0049】

いくつかの実施形態では、化合物 2 は混合物から沈殿させる。いくつかの実施形態において、化合物 2 は混合物から結晶化させる。いくつかの実施形態では、化合物 2 は、溶液へ種晶を入れた（すなわち、化合物 2 の結晶を溶液に加える）後、溶液から結晶化される。

【0050】

化合物 2 は、反応混合物から沈殿できる、または蒸発、蒸留、濾過（例えばナノ濾過、限外濾過）、逆浸透、吸収、及びヘプタンなどの逆溶媒を加えることによる、冷却による、もしくはこれらの方法の異なる組み合わせによる反応などの方法によって溶媒の一部もしくは全部の除去によって生成できる。

40

【0051】

一般的に上述されているように、化合物 2 は所望により単離される。化合物 2 が当業者に周知の任意の好適な物理的手段によって単離され得ることは、理解されるであろう。特定の実施形態で、沈殿した固体である化合物 2 は、濾過によって上清から分離される。他の実施態様において、沈殿した化合物 2 は、上清をデカントすることによって上清から分離される。

【0052】

50

特定の実施形態で、化合物 2 は、濾過によって上清みから分離される。

特定の実施形態で、単離された化合物 2 は空気乾燥される。他の実施形態において、単離した化合物 2 は、減圧下で、所望により高温で乾燥する。

【0053】

本明細書に記載されるように、化合物 2 は非晶質固体であり得る。非結晶固体は当業者に周知であり、種々の方法（例えば凍結乾燥、融解、沈殿（例えば超臨界流体から）、機械的処理（例えば製粉）、クエンチ冷却、脱溶媒和、回転蒸発、沈殿及び噴霧乾燥）により調製することができる。

【0054】

使用方法

特定の実施形態で、本発明の化合物（例えば化合物 2）は医薬品用である。いくつかの実施形態で、本発明の化合物は、キナーゼ阻害剤として有用である。特定の実施形態で、本発明の化合物は B t k の選択的阻害剤である。いくつかの実施形態では、本発明は、B t k 酵素活性を低減させる方法を提供する。このような方法は、提供される化合物の有効量を B t k に接触させることを含む。したがって本発明は、B t k を本発明の化合物と接触させることにより B t k 酵素活性を阻害する方法を更に提供する。

10

【0055】

いくつかの実施形態では、本発明は、B t k 酵素活性を低減させる方法を提供する。いくつかの実施形態において、そのような方法は、B t k を有効量の提供される化合物と接触させることを含む。したがって本発明は、B t k を本発明の化合物と接触させることにより B t k 酵素活性を阻害する方法を更に提供する。

20

【0056】

本明細書で使用する場合、B t k 酵素活性は、B t k キナーゼ酵素活性を指す。例えば B t k 酵素活性が低下すると、P L C の P I P 3 結合及び/またはリン酸化が減少する。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する半数阻害濃度（ IC_{50} ）は、 $1 \mu M$ 未満である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $500 nM$ 未満である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $100 nM$ 未満である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $10 nM$ 未満である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $1 nM$ 未満である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $0.1 nM \sim 10 \mu M$ である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $0.1 nM \sim 1 \mu M$ である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $0.1 nM \sim 100 nM$ である。いくつかの実施形態において、提供される化合物の B t k に対する IC_{50} は、 $0.1 nM \sim 10 nM$ である。

30

【0057】

いくつかの実施形態において、提供される化合物は、B t k 酵素活性を阻害すること（すなわち低下させること）によって緩和され得る疾患及び障害の治療に有用である。「疾患」とは、疾患または疾患の症状を指す。したがって本発明は、それを必要とする対象の自己免疫疾患、炎症性疾患及び癌を治療する方法を提供する。そのような方法は、治療に有効な量の提供される化合物を対象に投与することを含む。

40

【0058】

「自己免疫不全」という用語天然型は、急性散在性脳脊髄炎（A D E M）、アジソン病、円形脱毛症、抗リン脂質抗体症候群（A P S）、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性肝炎、水疱性類天疱瘡（B P）、セリアック病、皮膚筋炎、1型糖尿病、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギランバレー症候群（G B S）、橋本病、特発性血小板減少性紫斑病、紅斑性狼瘡、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、シェーグレン症候群、側頭動脈炎、及びウェゲナー肉芽腫症などの、天然抗原に対する不適切な免疫反応を含む、疾患または障害を含む。「炎症性疾患」という用語は、アレルギー、喘息、前立腺炎、糸球体腎炎、骨盤内炎症

50

性疾患（P I D）、炎症性腸疾患（I B D、例えばクローン病、潰瘍性大腸炎）、再灌流傷害、関節リウマチ、移植片拒絶及び血管炎などの急性または慢性炎症を含む疾患または障害を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、関節リウマチまたはループスを治療する方法を提供する。

【0059】

「癌」という用語は、異常細胞増殖及び/または増殖を含む、疾患または障害を意味する。いくつかの実施形態において、このような「癌」は、グリオーマ、甲状腺癌、乳癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌）、胃癌、消化管間葉性腫瘍、膵臓癌、胆管癌、卵巣癌、子宮内膜癌、前立腺癌、腎細胞癌、リンパ腫（例えば、未分化大細胞型リンパ腫）、白血病（例えば、急性骨髄性白血病、T細胞白血病、慢性リンパ性白血病）、多発性骨髄腫、悪性中皮腫、悪性黒色腫及び結腸癌（例えば、マイクロサテライト高不安定性大腸癌）を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、白血病またはリンパ腫を治療する方法を提供する。

10

【0060】

本明細書で使用する場合「対象」という用語は、医薬組成物が投与される哺乳動物を指す。代表的な対象としては、ヒトに加え、獣医学的動物及び実験動物、例えばウマ、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス及び水生哺乳動物が挙げられる。

【0061】

アッセイ

有用なT e cキナーゼ（例えばB T K）ファミリー阻害剤を開発するために、T e cキナーゼファミリーの酵素活性を低下させることが可能な候補阻害剤を、i n v i t r oで同定してもよい。当該技術分野において周知の方法及び/または本明細書で提示されたそれらの方法を利用して、阻害剤化合物の活性をアッセイすることができる。

20

【0062】

T e cキナーゼファミリーメンバーの酵素活性を低下させる化合物を、組換えまたは天然型のいずれかの生物活性のあるT e cキナーゼファミリーメンバーを使用して、同定及び試験してもよい。T e cキナーゼは、天然細胞で見いだされ得る、i n v i t r o単離され得る、または細胞内で同時発現もしくは発現され得る。阻害剤の非存在下でのT e cキナーゼファミリーメンバー（例えばB T K）の酵素活性に対する、阻害剤の存在下でのその活性の低下を測定することは、実施例で以下に記載されたP O L Y G A T - L Sアッセイなどの当該技術分野で周知の様々な方法を利用して実施されてもよい。B t k及び他のT e cキナーゼの活性をアッセイする他の方法は、当該技術分野で周知である。好適なアッセイ法の選択は、当業者の能力内で十分に行われる。

30

【0063】

T e cキナーゼファミリーメンバーの酵素活性を低下させることが可能な化合物が同定されたら、この化合物は、T e cキナーゼファミリーメンバーを他の酵素に対して選択的に阻害する能力について試験され得る。本発明の化合物による阻害は、当該技術分野において周知のもしくは本明細書に記載の別のものなどの標準的なi n v i t r oまたはi n v i v oアッセイを使用して測定される。

【0064】

T e cキナーゼファミリーメンバー（例えばB T K）の活性に関連する表現型で検出可能な変化を誘発する能力について、化合物を細胞モデルまたは動物モデルで更に試験してもよい。細胞培養に加えて、動物モデルを用いて、動物モデルの自己免疫不全、炎症性疾患または癌を治療する能力について、T e cキナーゼファミリーメンバー阻害剤を試験してもよい。

40

【0065】

医薬組成物

別の態様において、本発明は、化合物2を含む、または薬学的に許容される賦形剤（例えば、担体）と組み合わせた化合物2を含む、医薬組成物を提供する。

【0066】

50

この医薬組成物は、本明細書に開示された阻害剤の光学異性体、ジアステレオマー、または薬学的に許容される塩を含む。医薬組成物中に含まれる化合物 2 は、上述した担体部分に共有結合されてもよい。あるいは、医薬組成物中に含まれる化合物 2 は、担体部分に共有結合されていない。

【0067】

本明細書で使用する場合「薬学的に許容される担体」有害には、医薬賦形剤、例えば活性剤と有害に反応しない腸内または非経口投与に好適な医学的、生理学的に許容できる有機または無機担体物質を指す。好適な薬学に許容される担体としては、水、塩類溶液（リンガー液など）、アルコール、油、ゼラチン、及び炭水化物（例えばラクトース、アミロースまたはデンプン）、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ならびにポリビニルピロリジンが挙げられる。そのような調製物は、滅菌されて、所望する場合、本発明の化合物と有害に反応しない補助剤（例えば滑沢剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩、緩衝剤、着色剤及び/または芳香剤など）と混合させることができる。

10

【0068】

本発明の化合物は、対象に単独で投与することができる、または同時投与することができる。同時投与は、この化合物の個別でもしくは組み合わせ（2つ以上の化合物）での、同時または連続の投与を包含することを意味する。調製物は、所望する場合、他の活性物質（例えば、代謝分解を低下させるもの）と併用することもできる

20

製剤

本発明の化合物は、多種多様な経口、非経口及び局所投与剤形で調製ならびに投与することができる。したがって本発明の化合物は、注射により（例えば、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、十二指腸内または腹腔内に）投与することができる。更に本明細書に記載の化合物は、吸入により、例えば鼻孔内に投与することができる。そのうえ本発明の化合物は、経皮的に投与することができる。複数の投与経路（例えば、筋肉内、経口、経皮）を使用して、本発明の化合物を投与し得ることも想定される。したがって本発明は、薬学的に許容される担体または賦形剤、及び1つ以上の本発明の化合物を含有する、医薬組成物も提供する。

【0069】

本発明の化合物から医薬組成物を調製するために、薬学的に許容される担体は、固体または液体のいずれかであり得る。固体の調製物としては、粉末、錠剤、丸剤、カプセル、カシェ剤、坐剤、及び分散性顆粒が挙げられる。固体担体は、希釈剤、香味剤、結合剤、防腐剤、錠剤崩壊剤または封入材料としても機能し得る、1つ以上の物質であり得る。

30

【0070】

粉末で、担体は、微粉化された活性成分との混合物中の微粉化固体である。錠剤で、活性成分は、必要な結合特性を有する担体と適切な割合で混合されて、所望の形状及びサイズに圧縮される。

【0071】

粉末及び錠剤は、好ましくは活性化合物を5%～70%含有する。好適な担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、カカオ脂などである。「調製物」という用語は、他の担体を含むまたは含まない活性化合物が担体によって取り囲まれ、つまり担体と会合されたカプセルを提供する、活性化合物と担体としての封入材料との配合物を包含することを意図する。同様に、カシェ剤及びトローチ剤が含まれる。錠剤、粉末、カプセル、丸剤、カシェ剤及びトローチ剤を、経口投与に好適な固体剤型として用いることができる。

40

【0072】

坐剤を調製するために、低融点ワックス（例えば脂肪酸グリセリドまたはカカオ脂の混合物）が最初に融解され、活性成分は攪拌などによりその中に均一に分散される。融解された均一混合物は、それから簡便なサイズの型中に注がれて、放置して冷却され、それに

50

より固化される。

【0073】

液体形態の調製物としては、溶液、懸濁液及びエマルション、例えば水または水/プロピレングリコール溶液が挙げられる。非経口注入の場合、液体調製物は、ポリエチレングリコール水溶液の液剤に製剤化することができる。

【0074】

非経口投与が必要または所望である場合、本発明の化合物に特に好適な混合物は、注射用滅菌溶液、好ましくは油性または水性溶液、及び懸濁液、エマルション、または坐剤を含む挿入物である。特に非経口投与用の担体としては、デキストロースの水溶液、生理食塩水、純水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ピーナッツオイル、ゴマ油、ポリオキシエチレンブロックポリマーなどが挙げられる。アンプルは、簡便な単位用量である。本発明の化合物は、リボソーム中に組み込ませること、または経皮ポンプもしくはパッチを介して投与することもできる。本発明で使用するための好適な医薬混合物は、例えば *Pharmaceutical Sciences (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA)* 及び国際特許第 WO 96/05309 号に記載されるものを含み、その両方の教示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0075】

経口使用に好適な水溶液は、活性成分を水に溶解させ、所望の場合、好適な着色剤、香料、安定剤及び増粘剤を添加することにより調製することができる。経口使用に適した水性懸濁液は、水中の微粉化活性成分を粘性材料（例えば天然または合成ゴム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び他の周知の懸濁化剤）に分散することにより作製することができる。

20

【0076】

使用の少し前に経口投与用の液体調製物に変化される固体調製物も、含まれる。そのような液体形態としては、溶液、懸濁液及びエマルションが挙げられる。これらの調製物は、活性成分に加えて、着色剤、香料、安定剤、緩衝剤、人工及び天然甘味料、分散剤、増粘剤、可溶化剤などを含有してもよい。

【0077】

医薬調製物は、好ましくは単位投与形態である。そのような形態において、調製物は、活性成分を適切な量で含有する単位用量に細分される。単位投与形態は、個別の量の調製物を含む包装された調製物（例えば包装された錠剤、カプセル及びバイアルまたはアンプル）中の粉末であり得る。単位投与形態は、カプセル、錠剤、カシェ剤もしくはトローチ剤そのものであってもよく、またはこれらのいずれかの適切な数が包装された形態でもよい。

30

【0078】

単位用量調製物中の活性成分の量は、活性成分の特定の用途及び効力に応じて 0.1 mg ~ 1000 mg、より一般的には 1.0 mg ~ 1000 mg、最も一般的には 10 mg ~ 500 mg で変えられ得る、または調整され得る。組成物は、所望する場合、他の適合性のある治療剤も含有し得る。

【0079】

いくつかの化合物は制限された水への溶解度を有することができ、したがって組成物中に界面活性剤または他の適切な共溶媒を必要とする場合がある。そのような共溶媒としては、ポリソルベート 20、60 及び 80、プルロニック F-68、F84 及び P-103、シクロデキストリン、ならびにポリオキシル 35 ヒマシ油が挙げられる。そのような共溶媒は通常、約 0.01 重量% ~ 約 2 重量% の間のレベルで用いられる。

40

【0080】

製剤を分散させる際の変動性を低下させるため、製剤の懸濁液もしくはエマルションの成分の物理的分離を減少させるため、及び/または別の方法で製剤を改善するために、単純な水溶液よりも大きな粘度が望ましい場合がある。そのような粘度上昇剤としては、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロ

50

ピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、コンドロイチン硫酸及びその塩、ヒアルロン酸及びその塩、ならびにこれらの組み合わせが挙げられる。そのような薬剤は通常、約0.01重量%～約2重量%の間のレベルで用いられる。

【0081】

本発明の組成物は、徐放性及び/または快適性を与える成分を追加として含んでいてもよい。そのような成分としては、高分子量のアニオン性粘液模倣ポリマー、ゲル化多糖類、及び微粉化薬物担体基質が挙げられる。これらの成分は、米国特許第4,911,920号、同第5,403,841号、同第5,212,162号、及び同第4,861,760号により詳細に議論されている。これらの特許の全内容は、参照によりですべての目的でその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0082】

有効な投与量

本発明により提供される医薬組成物は、有効成分が治療に有効な量、すなわち意図する目的を実現するのに効果的な量で含有される組成物を包含する。特定用途に効果的な実際の量は、とりわけ治療される状態に依存する。例えば癌を治療する方法で投与される場合、そのような組成物は、所望の結果を実現する（例えば、対象の癌細胞数を減少させる）のに効果的な有効成分の量を含む。

【0083】

投与される化合物の投与量及び頻度（単回または反復投与）は、投与経路；レシピエントのサイズ、年齢、性別、健康状態、体重、ボディマス指数及び食事；治療される疾患（例えば、Btk阻害に応答する疾患）の症状の性質及び程度；他の疾患または他の健康関連問題の存在；併用治療の種類；ならびに任意の疾患または治療レジメンによる合併症を含む、様々な要因に応じて変動することができる。他の治療レジメンまたは薬剤を、本発明の方法及び化合物と共に使用することができる。

20

【0084】

本明細書に記載の任意の化合物について、治療に有効な量は、最初に細胞培養アッセイから決定され得る。標的濃度は、例えば記載した方法を利用して、測定されたキナーゼ酵素活性を低下させることが可能な活性化化合物（複数可）の濃度である。

【0085】

ヒトに使用される治療に有効な量は、動物モデルから決定されてもよい。例えばヒト用の投与量を、動物に効果的であることがわかった濃度を得るために配合することができる。ヒトの投与量は、上述のように、キナーゼ阻害をモニタリングして、投与量を上方または下方に調整することにより、調整することができる。

30

【0086】

投用量は、患者の要件及び用いられる化合物に応じて変化し得る。本発明に関連して、患者に投与される投与量は、だんだんと患者の有益な治療反応を得るのに十分でなければならぬ。投与量のサイズも、任意の有害な副作用の存在、性質及び程度により決定される。一般的に治療は、化合物の最適投与量よりも少ない、少なめの投与量で開始される。その後、投与量は、環境下で最適な効果に到達するまで、少しの増分で増加される。いくつかの実施形態において、用量範囲は0.001～10w/v%である。いくつかの実施形態において、用量範囲は0.1～5w/v%である。投与量及び間隔は、治療される特定の臨床的適応に効果的な投与された化合物のレベルを提供するように、個別に調整することができる。これは、個々の疾患状態の重篤度に相応する治療レジメンを提供する。

40

【実施例】

【0087】

以下の実施例は本発明の特定の実施形態を説明することを意図するものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

一般実験

略語

50

MeOH	メタノール	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
NMP	1 - メチル - 2 - ピロリドン	
DMAc	N, N - ジメチルアセトアミド	
EtOH	エタノール	
IPA	イソプロピルアルコール	
ACN	アクリロニトリル	
DCM	ジクロロメタン	
THF	テトラヒドロフラン	
2 - MeTHF	2 - メチルテトラヒドロフラン	10
CHCl ₃	トリクロロメタン	
MIBK	メチルイソブチルケトン	
EtOAc	酢酸エチル	
IPAc	酢酸イソプロピル	
MTBE	メチル tert - ブチルエーテル	
DSC	示差走査熱量測定	
IC	イオンクロマトグラフィー	
NMR	核磁気共鳴	
TGA	熱重量分析	
XRPD	X線粉末回折	20

計器及び方法

A . X線粉末回折 (XRPD)

XRPD解析のために、PANalytical Empyrean X線粉末回折計を使用した。使用するパラメーターを表3に示す。

【0088】

【表3】

表3. XRPDパラメーター

パラメーター	値
X線波長	Cu, $k\alpha$, $K\alpha 1$ (A):1.540598, $K\alpha 2$ (A):1.544426 $K\alpha 2/K\alpha 1$ 強度比:0.50
X線管設定	45 kV, 40 mA
発散スリット	自動
スキャンモード	連続
スキャン範囲 ($^{\circ} 2\theta$)	3° - 40°
刻み幅 ($^{\circ} 2\theta$)	0.013
走査速度 (度/分)	約10

30

40

【0089】

B . 熱重量 (TGA) 及び示差走査熱量測定 (DSC)

TGAデータは、TA Instruments製TA Q500/Q5000 TGAを使用して収集した。DSCは、TA Instruments製TA Q200/Q2000 DSCを使用して実施した。詳細なパラメーターを表4に示す。

【0090】

【表4】

表4. TGA及びDSCパラメーター

パラメーター	TGA	DSC
方法	勾配	勾配
試料パン	プラチナ、開く	アルミニウム、曲げる
温度	室温～300℃	室温～250℃
加熱速度	10℃/分	10℃/分
パージガス	N ₂	N ₂

10

【0091】

C. HPLC

DAD検出器を備えたAgilent1100を使用し、詳細なクロマトグラフィー条件を表5に示す。

【0092】

【表5】

表5. クロマトグラフィー条件及びパラメーター

20

HPLC	DAD検出器を備えたAgilent1100	
カラム	Waters Xbridge C18 150×4.6 mm, 5μm	
移動相	A : H ₂ O中の0.1% TFA	
	B : アセトニトリル中の0.1% TFA	
勾配テーブル	時間 (分)	B%
	0	40
	4	60
	6	60
	6.1	40
	8	40
実行時間	8分	
送液時間	0分	
流速	1.0 mL/分	
注入量	10 μL	
検出器の波長	UV 300nm, 参照 500 nm	
カラム温度	40℃	
サンプラー温度	室温	
希釈剤	MeOH	

30

40

【0093】

D. DVS

DVSは、SMS (表面計測システム) DVS Intrinsicを介して測定した

50

。25 の相対湿度は、LiCl、Mg(NO₃)₂ 及びKClの潮解点に対して較正した。DVS試験の実際のパラメーターを表6に示す。

【0094】

【表6】

表6. DVS試験のパラメーター

パラメーター	DVS
温度	25 °C
試料サイズ	10~20 mg
ガス及び流速	N ₂ , 200 mL/分
dm/dt	0.002%/分
最小 dm/dt 安定期間	10 分
最大均衡時間	180 分
相対湿度範囲	相対湿度 0%~相対湿度 95%
相対湿度刻み幅	相対湿度 0%~相対湿度 90% 相対湿度 10% 相対湿度 90%~相対湿度 95% 相対湿度 5%

10

20

【0095】

E. 溶液 NMR

溶液 NMR は、DMSO-d₆ を使用した Bruker 400 M NMR 分光計で収集した。

【0096】

実施例 1 : 3 - イソプロポキシ - N - (2 - メチル - 4 - (2 - ((1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) アミノ) ピリミジン - 4 - イル) ベンジル) アゼチジン - 1 - カルボキサミド (化合物 1)

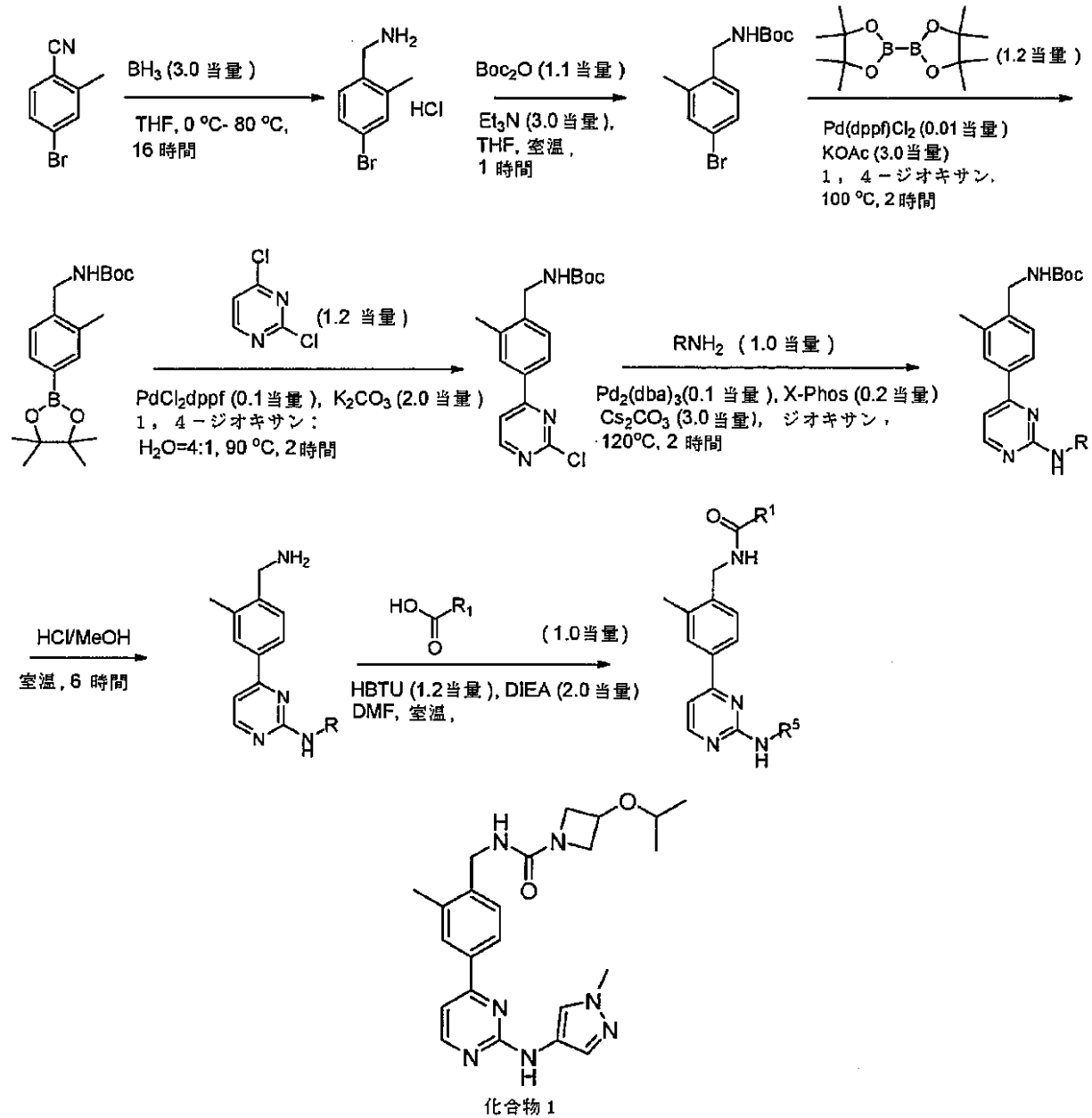
化合物 1 の合成は、出願 853 の実施例 21 に詳述されており、参照を容易にするために本明細書に再掲する。

30

スキーム 1

【0097】

【化6】



10

20

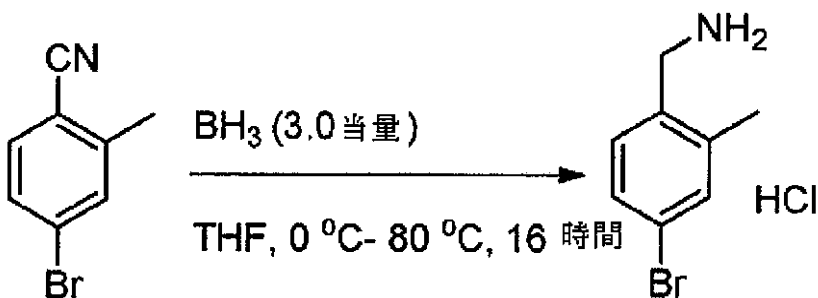
30

【0098】

(4-プロモ-2-メチルフェニル)メタンアミンの調製

【0099】

【化7】



40

【0100】

THF (20 mL) 中の 4-プロモ-2-メチルベンゾニトリル (3 g、15 mmol)

50

)の溶液に、 BH_3 THF (45 mL、45 mmol)を加えた。溶液を0℃にて1時間攪拌し、16時間80℃に加熱した。次に混合物を、MeOHでクエンチした。濃縮後、残留物を飽和HCl/EtOAc溶液と共に攪拌し、濾過した。濾塊をエーテル(20 mL×3)ですすぎ、真空下で乾燥して、(4-プロモ-2-メチルフェニル)メタンアミン(3.2 g、収率：90%)を白色固体として得た。ESI-MS (M+H)⁺：200.1。

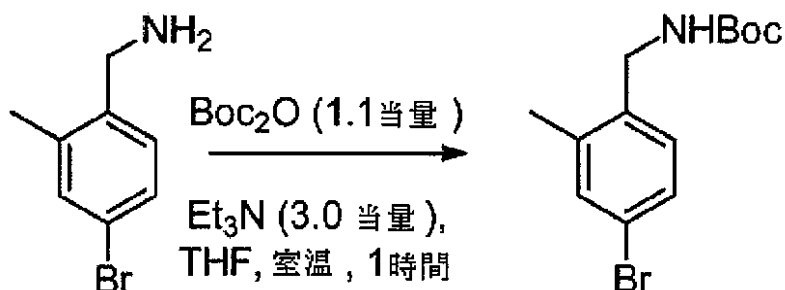
【0101】

tert-ブチル4-プロモ-2-メチルベンジルカルバメートの調製。

【0102】

【化8】

10



【0103】

20

DCM (30 mL)中の(4-プロモ-2-メチルフェニル)メタンアミン(1.2 g、6 mmol)の溶液に、TEA (1.82 g、18 mmol)及び Boc_2O (1.43 g、6.6 mmol)を加えた。混合物を室温にて1時間攪拌した。水(50 mL)で希釈した後、混合物をDCM (50 mL×2)で抽出した。混合有機物を、食塩水(50 mL)で洗浄し、乾燥(Na_2SO_4)して、濾過し、濃縮して、粗標題生成物(1.7 g、収率95%)を白色固体として得て、それは更に精製することなく、次工程にて直接使用した。ESI-MS (M+H)⁺：300.1。

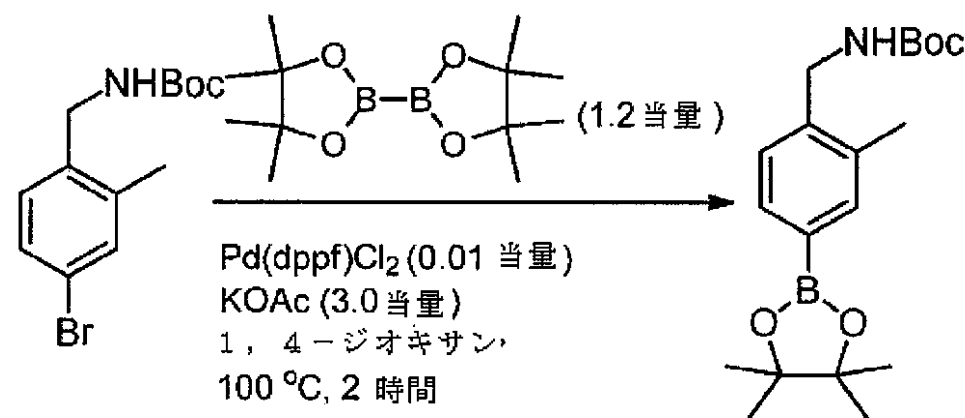
【0104】

tert-ブチル2-メチル-4-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)ベンジルカルバメートの調製

30

【0105】

【化9】



40

【0106】

1,4-ジオキサン(15 mL)中のtert-ブチル4-プロモ-2-メチルベンジルカルバメート(1.5 g、5.0 mmol)溶液に、窒素下で4,4,4',4',5,5,5',5'-オクタメチル-2,2'-ビ(1,3,2-ジオキサボロラン)(1.52 g、6.0 mmol)、KOAc (1.75 g、18 mmol)及びPd(dpp

50

f) Cl_2 DCM (407 mg、0.5 mmol) を加えた。混合物を 100 にて 2 時間攪拌した。室温に冷却した後、混合物を水 (50 mL) で希釈し、酢酸エチル (100 mL \times 3) で抽出した。混合有機層を食塩水で洗浄し、乾燥して、濃縮し、シリカゲルカラム (石油エーテル / EtOAc = 10 : 1) で精製して、tert-ブチル 2-メチル-4-(4,4,5,5-タートメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)ベンジルカルバメート (1.2 g、収率 69%) を白色固体として得た。ESI-MS (M+H)⁺: 348.2。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) : 7.61 - 7.59 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 4.68 (br, 1H), 4.33 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.34 (s, 12H)。

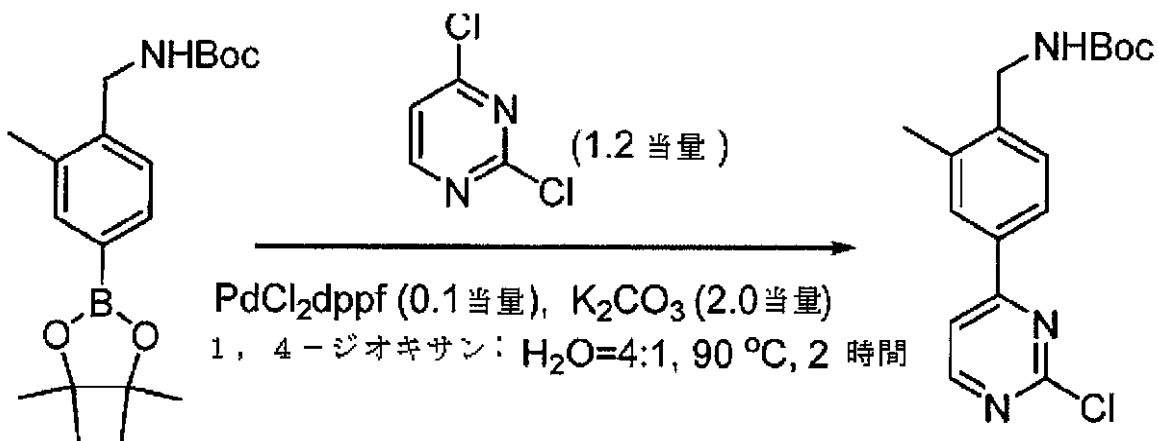
10

【0107】

tert-ブチル 4-(2-クロロピリミジン-4-イル)-2-メチルベンジルカルバメートの調製。

【0108】

【化10】



20

【0109】

1,4-ジオキサン (28 mL) 及び H_2O (7 mL) 中の tert-ブチル 2-メチル-4-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)ベンジルカルバメート (3.47 g、10 mmol) 及び 2,4-ジクロロピリミジン (1.79 g、12 mmol) 溶液に、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ DCM (815 mg、1.0 mmol) 及び K_2CO_3 (2.76 g、20 mmol) を N_2 下にて加えた。混合物を 90 で 2 時間攪拌した。室温に冷却した後、混合物を H_2O (80 mL) で希釈し、EA (80 mL \times 2) で抽出した。有機層を乾燥して、濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィー (シリカ、石油エーテル / EtOAc = 5 : 1 ~ 2 : 1) で精製して、tert-ブチル 4-(2-クロロピリミジン-4-イル)-2-メチルベンジルカルバメート (2.67 g、収率 80%) を白色固体として得た。ESI-MS (M+H)⁺: 334.1。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) : 8.12 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.84 (br, 1H), 4.38 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 1.47 (s, 9H)。

30

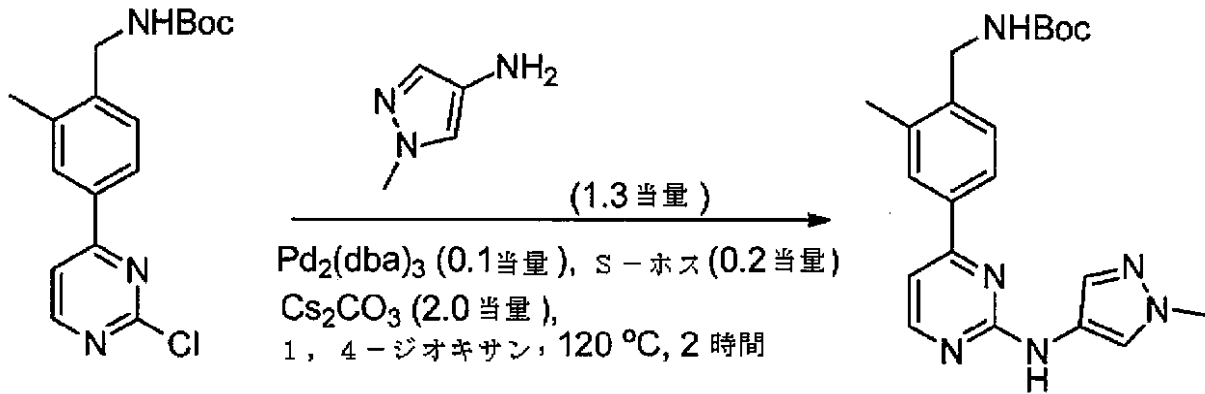
40

【0110】

tert-ブチル 2-メチル-4-(2-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)アミノ)ピリミジン-4-イル)ベンジルカルバメートの調製

【0111】

【化11】



10

【0112】

1, 4-ジオキサン (5 mL) 中の tert-ブチル 4-(2-クロロピリミジン-4-イル)-2-メチルベンジルカルバメート (333 mg、1.0 mmol) 及び 1-メチル-ピラゾール-4-アミン (126 mg、1.3 mmol) の溶液に、Pd₂(DBA)₃ (92 mg、0.1 mmol)、S-Phos (82 mg、0.2 mmol) 及び Cs₂CO₃ (650 mg、2.0 mmol) を N₂ 下にて添加した。混合物を 120 °C で 2 時間撹拌した。室温に冷却した後、混合物を H₂O (40 mL) で希釈し、EA (60 mL × 2) で抽出した。有機層を乾燥して、濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィー (シリカ、石油エーテル/EtOAc = 3:1 ~ 1:1) で精製して、tert-ブチル 2-メチル-4-(2-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)アミノ)ピリミジン-4-イル)ベンジルカルバメート (248 mg、収率 63%) を白色固体として得た。ESI-MS (M+H)⁺: 395.1。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) : 8.38 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.97 - 7.93 (m, 3H), 7.65 (s, 1H), 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.30 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.48 (s, 9H)。

20

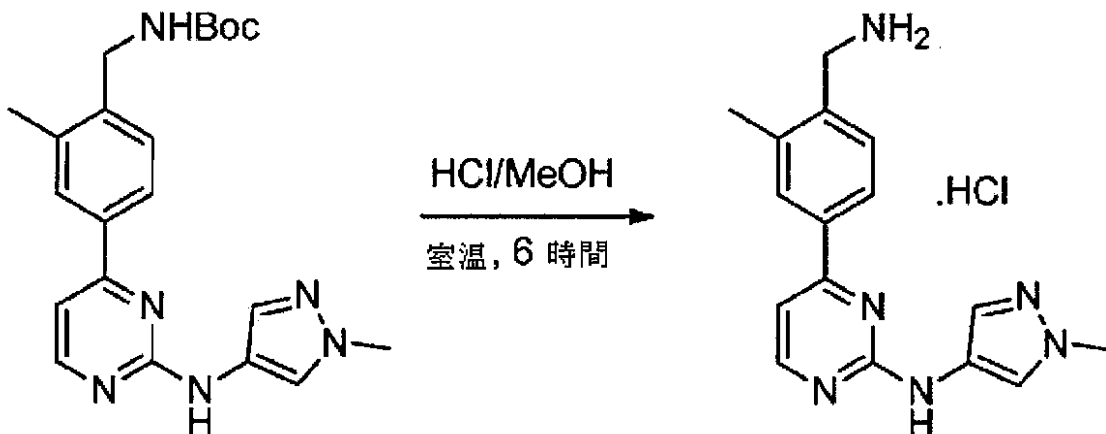
【0113】

4-(4-(アミノメチル)-3-メチルフェニル)-N-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)ピリミジン-2-アミンの調製

30

【0114】

【化12】



40

【0115】

メタノール中の HCl 溶液 (30 mL、ガス HCl から調製) 中の tert-ブチル 2-メチル-4-(2-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)アミノ)ピリミジ

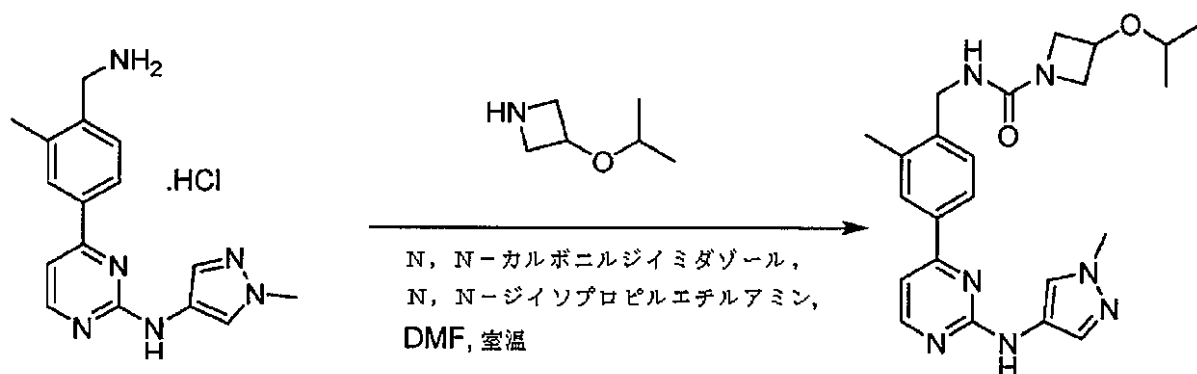
50

ン - 4 - イル) ベンジルカルバメート (3 . 9 4 g、 1 0 . 0 m m o l) の混合物を、 6 時間、 室温して攪拌した。 溶媒を除去して、 固体を冷ジエチルエーテル (1 0 0 m L) ですすいだ。 固体を真空下で乾燥して、 4 - (4 - (アミノメチル) - 3 - メチルフェニル) - N - (1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) ピリミジン - 2 - アミン (2 . 9 7 g、 収率 9 0 %) を黄色固体として得た。 E S I - M S (M + H) ⁺ : 2 9 5 . 1。 ¹ H N M R (4 0 0 M H z , D ₂ O) : 7 . 9 8 - 7 . 9 6 (m , 1 H) , 7 . 6 6 - 7 . 2 2 (m , 6 H) , 4 . 1 0 (s , 2 H) , 3 . 6 8 (s , 3 H) , 2 . 2 0 (s , 3 H)。

【 0 1 1 6 】

【 化 1 3 】

10



20

【 0 1 1 7 】

N, N - ジメチルホルムアミド (1 . 5 8 m L、 2 0 . 4 m m o l) 中の 4 - (4 - (アミノメチル) - 3 - メチルフェニル) - N - (1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) ピリミジン - 2 - アミン塩酸塩 (実施例 1 で調製) (2 0 0 m g、 0 . 7 m m o l)、 3 - イソプロポキシアゼチジン (1 1 3 m g、 0 . 7 4 7 m m o l) 及び N, N - カルボニルジイミダゾール (0 . 1 1 0 g、 0 . 6 7 9 m m o l) を、 N, N - ジイソプロピルエチルアミン (0 . 4 7 3 m L、 2 . 7 2 m m o l) にゆっくり加えて、 一晚室温にて攪拌した。 混合物をセライトに通して濾過し、 DMF で洗浄して、 分取 H P L C で精製し、 生成物を固体 (8 2 m g、 収率 : 3 0 %) として得た。 L C M S : 保持時間 = 1 . 0 5 分、 m / z 4 3 6 . 3。 ¹ H N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d 6) : 9 . 4 8 (s , 1 H) , 8 . 4 5 (d , J = 5 . 0 2 H z , 1 H) , 7 . 9 2 (s , 3 H) , 7 . 5 5 (b r . s . , 1 H) , 7 . 3 5 (d , J = 8 . 5 3 H z , 1 H) , 7 . 2 5 (d , J = 5 . 2 7 H z , 1 H) , 6 . 8 4 (s , 1 H) , 4 . 1 5 - 4 . 4 8 (m , 3 H) , 3 . 9 0 - 4 . 1 3 (m , 2 H) , 3 . 8 3 (s , 3 H) , 3 . 4 6 - 3 . 6 9 (m , 3 H) , 2 . 3 6 (s , 3 H) , 1 . 0 8 (d , J = 6 . 2 7 H z , 6 H)。

30

【 0 1 1 8 】

実施例 2 : 最初の添加剤スクリーニング

化合物 1 を、 新しい固体を調製するための添加剤スクリーニングの出発材料として使用した。 化合物 1 及び共結晶形成剤の混合物を、 混合後の観察に応じて異なる温度で攪拌した (表 7)。

40

- 1 . 可能性がある反応を示す明らかな変色のある懸濁液を、 室温にて攪拌した。
- 2 . 透明溶液を 4 にて攪拌し、 沈殿を生じさせた。
- 3 . 未溶解固体があつて明らかな変色がない懸濁液を、 5 0 にて攪拌し、 反応の速度を上げた。
- 4 . 攪拌後に得られた透明溶液を、 できるだけ多くの結晶を確認する可能性を最大にするため、 室温にてゆっくり蒸発させた。

【 0 1 1 9 】

50

【表 7】

表 7. 化合物 1 とアジピン酸の混合の実験の詳細

溶媒	温度	外観	得られた固体
MeOH/H ₂ O	4℃	C	化合物 2 I 型
アセトン	50℃	P	化合物 1 A 型
ACN	50℃	P	化合物 1 A 型
EtOH	4℃	P	化合物 1 A 型
THF	4℃	C	アジピン酸 + 化合物 2 I 型
DCM	4℃	P	化合物 1 B 型 化合物 2 II 型

P : 観察した沈殿物

C : 観察して、室温にて蒸発させた透明液

10

【0120】

表 7 に示すように、2 つの固体、化合物 2 I 型及び化合物 2 II 型を、スクリーニングから得た。これらの実験から得た固体は、TGA 及び DSC によって特性決定した。

20

図 1 は、アジピン酸及び化合物 1 A 型と共に、化合物 2 I 型及び化合物 2 II 型の XRPD パターンを示す。

【0121】

図 2 は、化合物 2 I 型の DSC / TGA データを示す。81.6 °C での吸熱、続いて 154.4 °C (開始温度) での融解 / 分解と明らかに関連する吸熱、その直後に 3 番目の吸熱が見えたことを、図は示す。150 °C までに 2.2 % の重量喪失が観察された。

【0122】

図 3 は、化合物 2 II 型の DSC / TGA データを示す。166.1 °C (開始温度) での融解 / 分解と明らかに関連する吸熱を、図は示す。150 °C までに 1.2 % の重量喪失が観察された。

30

【0123】

実施例 3 : 化合物 2 II 型のスケールアップ調製

化合物 2 II 型の調製は、以下の手順に従ってスケールアップした。

1. 43 mL の THF 及び 1.0 g の化合物 1 を、100 mL の容器に加えた。
2. 懸濁液を、攪拌 (500 rpm) しながら 45 °C まで加熱した。
3. アジピン酸 0.35 g を容器に加えた。
4. 透明溶液が得られるまで、反応物を 45 °C で攪拌した。
5. 42 mL の n-ヘプタン (逆溶媒) を加えて、沈殿を生じさせた。
6. 懸濁液を、ゆっくりと 1 時間以内で室温まで冷却した。
7. n-ヘプタン 43.4 mL を 5 時間以内で徐々に加えて、混合物を 12 時間の室温にて攪拌した。
8. 混合物を真空濾過し、湿塊を 50 °C にて真空下で乾燥した。
9. 固体を収集した (1.3 g 得て、収率約 96.3%) 。

40

【0124】

図 4 は、化合物 2 II 型の TGA / DSC データを示す。150 °C までに 1.2 % の重量喪失、及び 166.1 °C (開始温度) での明らかな融解 / 分解吸熱を、データは示した。

【0125】

実施例 4 : 化合物 2 I 型のスケールアップ調製 (手順 1)

化合物 2 I 型の調製は、以下の手順を使用してスケールアップした。

50

1. 80 mg の化合物 1 及び 80 mg のアジピン酸（荷電モル比 1 : 3、化合物 1 / 酸）を、20 mL のガラスバイアル内に量り入れた。
2. 5 mL の THF をバイアルに加えて、混合物を 50 で攪拌し、透明溶液を得た。
3. 溶液を 8 mL の n - ヘプタン内に完全に注いで、沈殿を生じさせた。混合物を室温にて 1 時間攪拌し、ゲルを最初に観察した。
4. 約 5 分間の攪拌後、黄色固体が発生して、更に 2 時間攪拌した。
5. 混合物を真空濾過し、濾塊を移して、2 時間 50 にて乾燥した。特性決定のために固形物を収集する。

【0126】

図 5 は、以前に調製した化合物 2 I 型と一致する、スケールアップ試料の XRPD パターンを提供する。

10

図 6 は、スケールアップ手順により得られた化合物 2 I 型の TGA 及び DSC データを提供する。0.6% の重量喪失が TGA で 120 までに観察されて、DSC 結果は 155.4（開始温度）での急な融解吸熱を示し、化合物 2 I 型が無水物であることを示唆する。

【0127】

図 7 は、化合物 2 I 型がやや吸湿性であることを示す、25 / 相対湿度 80% にて 0.3% の水分取り込みを示す DVS 結果を提供する。

更に XRPD データは、形態変化が DVS 試験後に観察されないことを示した。

【0128】

20

実施例 5：化合物 2 I 型のスケールアップ調製（手順 2）

3 g 規模の化合物 2 I 型の調製は、下記の手順に従った。

1. 2.4 g の化合物 1 及び 3.1 g のアジピン酸（荷電モル比 1 : 4、遊離塩基 / 酸）を 500 mL の晶析装置内に量り入れた。
2. 116 mL の THF を加えて、混合物を 50 で攪拌し、透明溶液を得た。
3. 58 mL の n - ヘプタンを溶液内に充填して、続いて 120 mg の化合物 2 I 型の種を添加した。混濁材料が直ちに発生した。
4. 116 mL の n - ヘプタンと続けて充填して、油状系を生じさせた。
5. 反応物を室温まで冷却し、18 時間攪拌した。反応物をサンプリングして、XRPD 及び DSC で解析して、過剰な酸が発生したことを示した。
6. 20 mL の THF を晶析装置に加えて、2 時間攪拌した。反応物をサンプリングして、XRPD 及び DSC で解析して、純粋な化合物 2 I 型を得たことを示した。
7. 反応物を濾過し、それから室温にて 1 時間、真空乾燥した。
8. 固体 3.2 g を収集した（収率約 99%）。

30

【0129】

図 8 は、本方法を使用して調製した化合物 2 I 型の XRPD パターンを示し、所望の生成物がうまく調製されたことを示す。

図 9 は、本方法を使用して調製した化合物 2 I 型の TGA 及び DSC データを示す。この図において、120 までに 0.5% の重量喪失が TGA で観察されて、DSC 結果は 155.2（開始温度）での急な融解吸熱を示した。

40

【0130】

実施例 6：化合物 2 II 型の調製

化合物 2 II 型を、以下の手順に従って調製した。

1. 150 mL の THF 及び 3.5 g の化合物 1 を、45 にて 500 mL の晶析装置内に加えて、透明溶液を得て、続いて 1.24 g のアジピン酸を添加した。
2. 100 mL の n - ヘプタン及び 0.88 g の種化合物を、晶析装置に加えて、5 時間かけて 200 mL の n - ヘプタンを添加した。
3. パッチを 5 に冷却し、1.5 時間 5 に維持した。
4. パッチを濾過し、それから室温にて 2 時間、真空乾燥した。
5. 固体 3.7 g を収集した（収率約 92%）。

50

【0131】

図10は、スケールアップ調製により得られた化合物2 I I型のXRPDパターンを提供する。

図11は、化合物2 I I型のTGA及びDSCデータを提供する。0.4%の重量喪失がTGAで120 までに観察されて、DSC結果は164.7 (開始温度)での急な融解吸熱を示し、化合物2 I I型が無水物であることを示唆する。

【0132】

図12は、化合物2 I I型がやや吸湿性であることを示す、25 / 相対湿度80%にて0.3%の水分取り込みを示すDVS結果を提供する。

更にXRPDデータは、形態変化がDVS試験後に観察されないことを示した。

10

【0133】

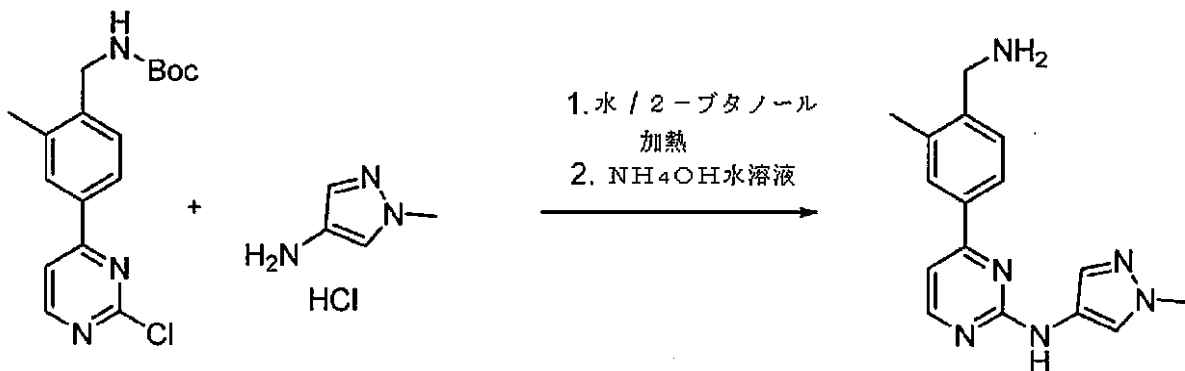
実施例7：化合物2 I I型の調製(手順2)

化合物2 I I型を、以下の手順に従って調製した。

4-(4-(アミノメチル)-3-メチルフェニル)-N-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)ピリミジン-2-アミンの調製

【0134】

【化14】



20

【0135】

1. 5.0 kgの1-メチル-ピラゾール-4-アミン塩酸塩及び9.2 kgの水を、フラスコ(「フラスコ1」)に加えた。

2. フラスコ1の内容物を、溶解するまで15~25 で撹拌した。

3. 9.6 kgのtert-ブチル4-(2-クロロピリミジン-4-イル)-2-メチルベンジルカルバメート、15.6 kgの2-ブタノール及び14.6 kgの水を、別のフラスコ(「フラスコ2」)に加えた。

4. フラスコ2の内容物を、透明溶液が観察されるまで55~65 で撹拌した。

5. フラスコ1の内容物をフラスコ2に加えて、フラスコ1を5 kgの水ですすぎ、すすぎ液をフラスコ2へ移した。

6. フラスコ2の内容物を80~90 まで加熱して、少なくとも16時間の80~90 で撹拌した。

40

7. フラスコ2の内容物を30~40 まで冷却した。

8. 温度を30~40 に維持しつつ、水46.1 gをフラスコ2に加えた。

9. 水酸化アンモニウム(28~30%)24.2 kgを、25.7 kgの水で希釈し、少なくとも1時間かけてフラスコ2に加えた。

10. 5 kgの水をフラスコ2に加えた。

11. フラスコ2の内容物を少なくとも1時間かけて10~20 まで冷却した。

12. フラスコ2の内容物を、少なくとも1時間10~20 で撹拌した。

13. フラスコ2の内容物を真空濾過し、固体生成物を単離した。

14. 生成物を75 以下にて真空下で乾燥した。

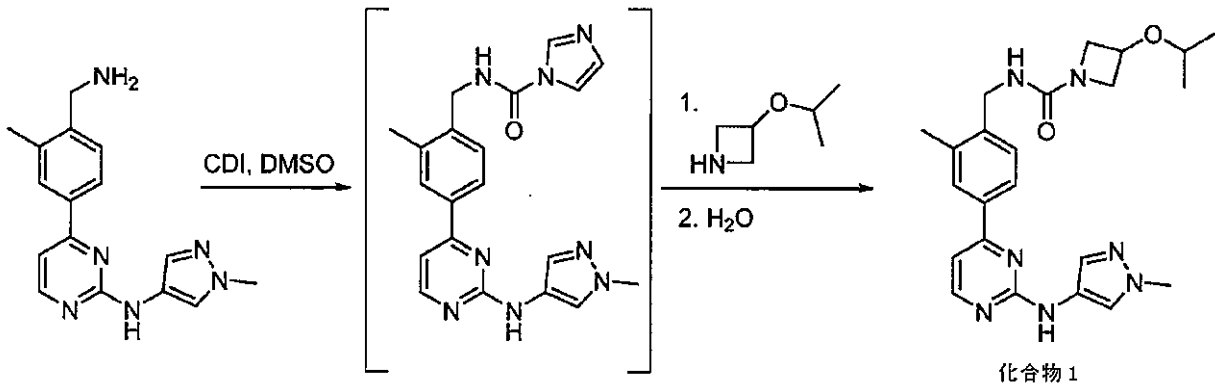
50

15. 生成物 7.65 kg が得られ (収率 90.0%)、NMR は事前の割当と一致した。

化合物 I の調製

【0136】

【化15】



10

【0137】

1. 22.0 kg ジメチルスルホキシド (DMSO) 及び 6.6 kg の 4-(4-(アミノメチル)-3-メチルフェニル)-N-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)ピリミジン-2-アミンをフラスコ (「フラスコ3」) に加えた。

20

2. フラスコ3の内容物を、固形物が溶解するまで 28~32 で撹拌した。

3. 22.0 kg の DMSO を、別のフラスコ (「フラスコ4」) に加えた。

4. 4.4 kg の 1,1'-カルボニルジイミダゾール (CDI) をフラスコ4に加えた。

5. フラスコ4の内容物を、固形物が溶解するまで 28~32 で撹拌した。

6. フラスコ3の内容物を、28~32 にて少なくとも1時間かけてフラスコ4内に加えて、フラスコ3を 2.1 kg の DMSO ですすぎ、すすぎ液をフラスコ4へ移した。

7. フラスコ4の内容物を、少なくとも30分間 28~32 で撹拌した。

8. 3.4 kg の 3-イソプロポキシアゼチジン をフラスコ4に加え、移動容器及びラインを 1 kg の DMSO ですすぎ、すすぎ液をフラスコ4に加えた。

30

9. フラスコ4の内容物を、少なくとも4時間 28~32 で撹拌した。

10. フラスコ4の内容物を 20 以下に冷却した。

11. 23.2 kg の水を、フラスコ4の内容物の温度を 30 以下に維持する速度で、フラスコ4に 0~5 の間の温度で加えた。

12. フラスコ4の内容物を 18~20 まで冷却した。

13. 0.132 kg の化合物1の種結晶を、フラスコ4に充填した。

14. フラスコ4の内容物を、少なくとも1時間撹拌して、生成物を沈殿させた。

15. 23.1 kg の水を、温度を 30 以下に制限する速度で、フラスコ4に充填した。

40

16. フラスコ4の内容物を、少なくとも30分間 15~25 で撹拌した。

17. フラスコ4の内容物を真空濾過し、固体生成物を単離した。

18. 生成物を、19.8 kg の水で3回洗浄した。

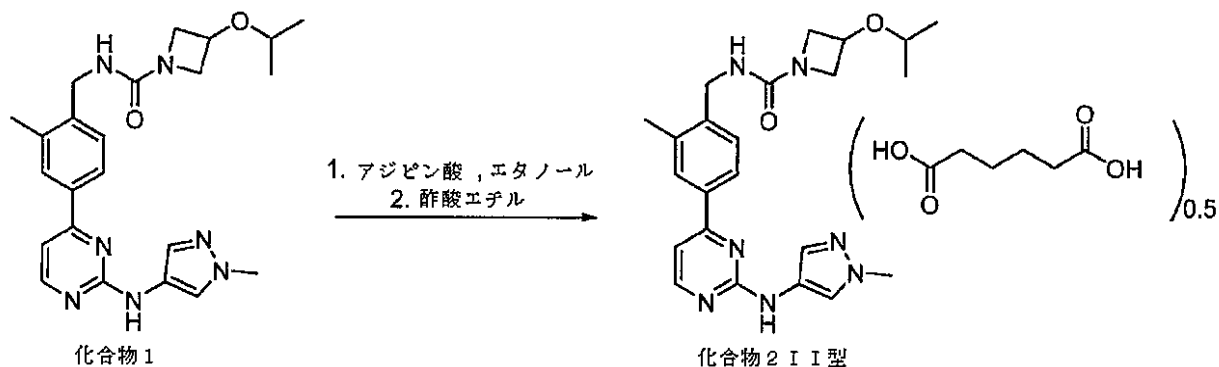
19. 生成物をトレイに移し、60 以下にて水 2%まで真空下で乾燥した。

20. 9.7 kg の化合物1が得られ (収率 99.0%)、NMR は事前の割当と一致した。

化合物 2 II 型の調製

【0138】

【化16】



10

【0139】

1. エタノール 18.4 L 及び 4.6 kg の化合物 1 を、2 つのフラスコ (「フラスコ 5」及び「フラスコ 6」) にそれぞれ加えた。
2. フラスコ 5 及びフラスコ 6 の内容物を 70 ~ 75 に加熱した。
3. エタノール 13.8 L 及びアジピン酸 1.4 kg を、2 つのフラスコ (「フラスコ 7」及び「フラスコ 8」) にそれぞれ加えた。
4. フラスコ 7 及びフラスコ 8 の内容物を 70 ~ 75 に加熱した。
5. フラスコ 7 の内容物をフラスコ 5 内に加えて、フラスコ 7 を 2.3 L のエタノールですすぎ、すすぎ液をフラスコ 5 へ加えた。
6. フラスコ 8 の内容物をフラスコ 6 内に加えて、フラスコ 8 を 2.3 L のエタノールですすぎ、すすぎ液をフラスコ 6 へ加えた。
7. フラスコ 5 及びフラスコ 6 の内容物を、少なくとも 30 分間 70 ~ 75 で撹拌した。
8. フラスコ 5 及びフラスコ 6 の内容物を、0.45 μm の研磨濾過フィルターに通して濾過して別のフラスコ (「フラスコ 9」) に入れて、フラスコ 5 及びフラスコ 6 をそれぞれ 2.3 L のエタノールですすぎ、すすぎ液をフラスコ 9 に加えた。
9. フラスコ 9 の内容物を、少なくとも 30 分間 70 ~ 75 で撹拌した。
10. フラスコ 9 の内容物を 60 ~ 64 まで冷却した。
11. 120 g の化合物 2 I I 型及び 5 L のエタノールを、フラスコ (「フラスコ 10」) に加えた。
12. フラスコ 10 の内容物を、少なくとも 2 時間 15 ~ 25 で撹拌した。
13. フラスコ 10 の内容物を濾過して、固形物を除去し、濾液を得た (「フラスコ 10 濾液」)。
14. 184 g の化合物 2 I I 型の種を、フラスコ (「フラスコ 11」) に加えた。
15. 2 L のフラスコ 10 濾液を、フラスコ 11 に加えた。
16. フラスコ 11 の内容物をフラスコ 9 に加えて、フラスコ 11 を 2 L のフラスコ 10 濾液ですすぎ、すすぎ液をフラスコ 9 へ移した。
17. フラスコ 9 の内容物を、少なくとも 1 時間 55 ~ 65 で撹拌した。
18. フラスコ 9 の得られた懸濁液を少なくとも 3 時間かけて 0 ~ 10 まで冷却した。
19. フラスコ 9 の懸濁液を、少なくとも 30 分間 0 ~ 10 で撹拌した。
20. フラスコ 9 の懸濁液の吸引物を濾過して、固体生成物を収集した。
21. 生成物塊を、25 kg の研磨濾過した酢酸エチルで 3 回洗浄した。塊を少なくとも 15 分間すすぎ溶媒に浸漬して、その後各すすぎ液を吸引した。
22. 生成物をトレイに移し、50 以下にて一定重量まで真空下で乾燥した。
23. 生成物 9.65 kg が得られ (収率 90.0%)、HPLC は純度 99.5% を示した。

20

30

40

【0140】

50

実施例 8 : 溶解度測定を介した熱力学的関係試験

リード処理溶媒系は、EtOH、またはEtOH及び水の共溶媒である。種々の温度（10及び50）、酸と化合物1の荷電モル比（1、2、3及び4）及びEtOHと水の溶媒比（ $v/v = 1/0$ 、 $7/3$ 及び $1/1$ ）を試験した。70~100mgの化合物2 I型またはII型を計量して、1.5mLのガラスバイアルに計算量の酸と、併せてバイアルへ0.5mLの対応する溶媒も加えた。混合物を、4日間、所望の条件下で磁気的に攪拌した。残留する固体をXRPD解析のために単離し、濾過した母液の濃度をHPLCを介して測定した。溶解度データを表8に示し、図13に示す。高温、酸と遊離塩基の低荷電比及び減少した含水量が化合物2 I I型を安定させるのに好ましいことを、結果は示した。

10

【0141】

【表8】

表8. 化合物2 I型及びII型の溶解度の概要

出発材料	溶媒 (v/v)	温度 (°C)	荷電比(酸/遊離塩基)			
			1:1	2:1	3:1	4:1
化合物2 I型	EtOH	10	9.7 mg/mL	3.2 mg/mL	5.3 mg/mL	--
		50	21.5 mg/mL	13.4 mg/mL	11.2 mg/mL	--
	EtOH/H ₂ O (7:3)	10	--	7.8 mg/mL	5.9 mg/mL	4.5 mg/mL
		50	--	55.9 mg/mL	34.3 mg/mL	25.1 mg/mL
	EtOH/H ₂ O (1:1)	10	--	1.8 mg/mL	1.2 mg/mL	1.3 mg/mL
		50	--	9.0 mg/mL	5.7 mg/mL	6.1 mg/mL
化合物2 II型	EtOH	10	4.8 mg/mL	3.9 mg/mL	4.6 mg/mL	--
		50	13.0 mg/mL	14.0 mg/mL	14.2 mg/mL	--
	EtOH/H ₂ O (7:3)	10	--	10.6 mg/mL	11.7 mg/mL	11.1 mg/mL
		50	--	41.4 mg/mL	30.6 mg/mL	31.2 mg/mL
	EtOH/H ₂ O (1:1)	10	--	2.8 mg/mL	3.1 mg/mL	3.0 mg/mL
		50	--	9.2 mg/mL	7.4 mg/mL	8.4 mg/mL

20

30

40

--: 関連実験を開始しなかった。

【0142】

実施例 9 : 化合物2 II型の多形体スクリーニング

化合物2 II型の溶解度を、室温（ 20 ± 3 ）で20つの溶媒で試験した。約2mg

50

の固体を、3 mLのガラスバイアルに加えた。それから表9の溶媒を、固体が溶解するまたは総体積2 mLになるまで、段階的(1回当たり100 μ L)にバイアルに加えた。結果を表9にまとめ、多形体スクリーニングの溶媒選択を導くために使用する。

【0143】

化合物2 I I型の多形体スクリーニングは、異なる溶液結晶化または固体転移法を使用して実施した。スクリーニングで利用した方法及び同定した結晶形状を、表10にまとめた。表が示すように、化合物2 I I型の新規な結晶形状はスクリーニングで発見されなかった。

【0144】

【表9】

表9. 室温での化合物2 I I型のおよその溶解度

溶媒	溶解度 (mg/mL)	溶媒	溶解度 (mg/mL)
MeOH	S > 19.0	2-MeTHF	6.3 < S < 9.5
EtOH	10.5 < S < 21.0	1,4-ジオキサソ	9.5 < S < 19.0
IPA	5.0 < S < 6.7	NMP	S > 22.0
ACN	2.3 < S < 2.6	DMSO	S > 19.0
アセトン	5.5 < S < 7.3	DCM	4.4 < S < 5.5
MIBK	1.1 < S < 1.2	トルエン	S < 0.9
EtOAc	1.1 < S < 1.2	n-ヘプタン	S < 0.9
IPAc	S < 1.0	DMAc	S > 36.0
MTBE	S < 1.0	H ₂ O	S < 1.0
THF	9.5 < S < 19.0	CHCl ₃	10.5 < S < 21.0

10

20

【0145】

【表 10】

表 10. 化合物 2 I I 型の多形体スクリーニングの概要

方法	実験数	結晶形状
逆溶媒の添加	21	化合物 1 A 型 化合物 1 B 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
固体蒸気拡散	13	化合物 2 II 型
溶液蒸気拡散	12	化合物 1 A 型
ポリマー誘導結晶化	10	化合物 2 I 型
緩徐な蒸発	10	化合物 2 II 型
室温での懸濁液	12	化合物 1 B 型 化合物 2 II 型
5℃での懸濁液	12	化合物 1 A 型 化合物 1 B 型 化合物 2 II 型
緩徐な冷却	8	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
粉碎	2	化合物 2 II 型
合計	100	化合物 1 A 型 化合物 1 B 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型

10

20

30

【0146】

1. 逆溶媒の添加

合計 21 つの逆溶媒添加実験を実施した。約 15 mg の化合物 2 I I 型を、0.1 ~ 2.4 mL の溶媒中に溶解させて、透明溶液を得た。溶液を磁氣的に攪拌し、それから沈殿物が現れるまたは逆溶媒の合計量が 15.0 mL になるまで、1 回当たり 0.1 mL の逆溶媒を添加した。沈殿物を XRPD 解析のために単離した。透明溶液を移して、1 日間 5℃にて攪拌し、それから固体を XRPD によって試験した。最終の透明溶液を移して、室温にて蒸発させた。結果を表 11 にまとめる。

【0147】

【表 1 1】

表 1 1. 逆溶媒添加実験の概要

溶媒	逆溶媒	固体
MeOH	H ₂ O	化合物 1 B 型
THF		化合物 1 B 型
EtOH*	n-ヘプタン	化合物 1 A 型
IPA*		化合物 1 A 型
アセトン		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
THF		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
2-MeTHF		化合物 1 B 型+ 化合物 2 II 型
1,4-ジオキサン		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
DCM		化合物 2 II 型
CHCl ₃		化合物 1 A 型 化合物 2 I 型
MeOH**	トルエン	化合物 1 A 型 化合物 2 I 型
THF*		化合物 2 II 型
CHCl ₃		化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
アセトン*		化合物 2 II 型
DMSO*		化合物 1 B 型
NMP**	IPAc	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
THF**		化合物 2 II 型
EtOH**		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
MeOH*	MTBE	化合物 2 II 型
DMAc*		化合物 1 A 型
CHCl ₃	MTBE	化合物 1 A 型

10

20

30

40

*:固体は、5℃で冷却するにより得られた。

**:固体は、蒸発により得られた。

【 0 1 4 8 】

2. 固体蒸気拡散

固体蒸気拡散実験を、異なる 13 種類の溶媒を使用して実施した。約 10 mg の化合物 2 II 型を 3 mL バイアルに量り入れ、それを 2 mL の前記溶媒入りの 20 mL バイアル

50

に入れた。20 mLバイアルはキャップで封止して、室温に維持して、溶媒蒸気を7日間試料と相互作用させた。固体はXRPDで試験し、結果は、化合物2 II型だけが観察されることを示す表12にまとめた。

【0149】

【表12】

表12. 固体蒸気拡散実験の概要

溶媒	固体
H ₂ O	化合物2 II型
DCM	化合物2 II型
EtOH	化合物2 II型
MeOH	化合物2 II型
ACN	化合物2 II型
THF	化合物2 II型
CHCl ₃	化合物2 II型
アセトン	化合物2 II型
DMF	化合物2 II型
EtOAc	化合物2 II型
1,4-ジオキサン	化合物2 II型
IPA	化合物2 II型
DMSO	化合物2 II型

10

20

【0150】

3. 溶液蒸気拡散

12つの溶液蒸気拡散実験を実施した。約15 mgの化合物2 II型を、0.6 ~ 2.4 mLの適切な溶媒中に溶解させて、3 mLバイアルに透明溶液を得た。この溶液を3 mLの前記溶媒入りの20 mLバイアル内に入れた。20 mLバイアルはキャップで封止して、室温に維持して、有機蒸気を試料と十分な時間、相互作用させた。沈殿物をXRPD解析のために単離した。結果は表13にまとめ、それは化合物1 A型ならびに化合物2 I型及びII型が観察されたことを示した。

30

【0151】

【表 1 3】

表 1 3. 溶液蒸気拡散実験の概要

溶媒	逆溶媒	固体
MeOH	トルエン	化合物 2 II 型
THF		化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
DCM		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
アセトン	n-ヘプタン	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
2-MeTHF		化合物 1 A 型
EtOH		化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
CHCl ₃		化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
EtOH	IPAc	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
THF	MTBE	化合物 2 II 型
CHCl ₃		化合物 2 II 型

10

20

30

【 0 1 5 2】

4. ポリマー誘導結晶化

ポリマー誘導結晶化実験は、5つの異なる溶媒の2セットのポリマー混合物で実施した。約15mgの化合物2II型試料を、0.8~2.0mLの適切な溶媒中に溶解させて、3mLバイアルに透明溶液を得た。約2mgのポリマー混合物を、3mLのガラスバイアルに加えた。すべての試料はパラフィルムを使用して封止されて、それから移されて、室温で蒸発させ、沈殿を誘発した。固形物をXRPD解析のために単離した。結果は表14にまとめ、それは化合物1A型ならびに化合物2I型及びII型が生成されたことを示した。

40

【 0 1 5 3】

【表 1 4】

表 1 4. ポリマー誘導結晶化実験の概要

溶媒 (v/v)	ポリマー	固体
EtOH	混合物 A	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
アセトン		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
THF		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
DCM		化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
MeOH/ トルエン (4:1)		化合物 2 II 型
EtOH	混合物 B	化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
アセトン		化合物 2 II 型
THF		化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
DCM		化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
MeOH/ トルエン (4:1)		化合物 2 II 型

10

20

30

ポリマー混合物 A：ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリ塩化ビニル (PVC)、ポリ酢酸ビニル (PVAc)、ヒプロメロース (HPMC)、メチルセルロース (MC) (1:1:1:1:1:1の質量比)

ポリマー混合物 B：ポリカプロラクトン (PCL)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリ (メチルメタクリレート) (PMMA)、アルギン酸ナトリウム (SA)、及びヒドロキシエチルセルロース (HEC) (1:1:1:1:1の質量比)。

40

【 0 1 5 4】

5. 緩徐な蒸発

蒸発実験は 10 つの条件下で実施した。簡潔には約 15 mg の化合物 2 II 型を、3 mL ガラスバイアルの 0.7 ~ 2.5 mL の対応する溶媒中に溶解させた。視覚的な透明溶液を室温にて蒸発させ、沈殿を生じさせた。固形物を XRPD 解析のために単離し、結果は表 15 にまとめ、それは化合物 1 A 型ならびに化合物 2 I 型及び II 型が生成されたことを示した。

【 0 1 5 5】

【表 15】

表 15. 蒸発実験の概要

溶媒 (v/v)	固体
MeOH	化合物 2 II 型
EtOH	化合物 1 A 型
IPA	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
アセトン	化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
THF	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
2-MeTHF	化合物 1 A 型
1,4-ジオキサン	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
DCM	化合物 1 B 型 化合物 2 II 型
CHCl ₃ /トルエン (4:1)	化合物 1 A 型 化合物 2 I 型 化合物 2 II 型
THF/ n - ヘプタン (4:1)	化合物 1 A 型

10

20

【0156】

6. 室温での懸濁液

30

懸濁液転換実験は、異なる 12 つの溶媒系で室温にて実施した。約 15 mg の化合物 2 II 型を、1.5 mL ガラスバイアルの 0.5 mL の溶媒に懸濁させた。懸濁液を約 4 日間の室温にて攪拌した後、残留する固形物を XRPD 解析のために単離した。結果は表 16 にまとめ、それは化合物 1 B 型及び化合物 2 II 型が生成されたことを示した。

【0157】

【表 1 6】

表 1 6. 室温での懸濁液転換実験の概要

溶媒 (v/v)	固体
H ₂ O	化合物 1 B 型 化合物 2 II 型
IPA	化合物 2 II 型
アセトン	化合物 2 II 型
2-MeTHF	化合物 2 II 型
DCM	化合物 2 II 型
MTBE	化合物 2 II 型
EtOAc	化合物 2 II 型
ACN	化合物 2 II 型
THF/n-ヘプタン (1:5)	化合物 2 II 型
CHCl ₃ /トルエン (1:5)	化合物 2 II 型
MeOH/トルエン (1:9)	化合物 2 II 型
EtOH/n-ヘプタン (1:5)	化合物 2 II 型

10

20

【 0 1 5 8】

7.50 での懸濁液

懸濁液転換実験を、異なる 12 つの溶媒系で 50 度でも実施した。約 15 mg の化合物 2 II 型を、1.5 mL ガラスバイアルの 0.5 mL の溶媒に懸濁させた。懸濁液を約 4 日間の 50 度にて攪拌した後、残留する固形物を XRPD 解析のために単離した。結果は表 17 にまとめ、それは化合物 1 A 型及び B 型ならびに化合物 2 II 型が生成されたことを示した。

30

【 0 1 5 9】

【表 17】

表 17. 50℃での懸濁液転換実験の概要

溶媒 (v/v)	固体
H ₂ O	化合物 1 B 型 化合物 2 II 型
MIBK	化合物 2 II 型
EtOAc	化合物 2 II 型
ACN	化合物 2 II 型
n-オクタナール	化合物 2 II 型
シクロヘキサン	化合物 2 II 型
MTBE	化合物 2 II 型
アセトン/n-ヘプタン (1:5)	化合物 2 II 型
THF/n-ヘプタン (1:5)	化合物 2 II 型
CHCl ₃ /トルエン (1:5)	化合物 2 II 型
MeOH/トルエン (1:9)	化合物 2 II 型
EtOH/n-ヘプタン (1:5)	化合物 2 II 型

10

20

【0160】

8. 緩徐な冷却

徐冷実験を 8 つの溶媒系で実施した。約 20 mg の化合物 2 II 型を、室温にて 3 mL ガラスバイアルの 1.0 mL の溶媒に懸濁させた。それから懸濁液を 50℃まで加熱し、2 時間平衡させて、ナイロン膜 (孔径 0.45 μm) を使用して新しいバイアルに濾過した。濾液を 0.1℃/分の速度でゆっくりと 5℃に冷却した。得られた固体を 5℃の等温で維持し、XRPD 解析のために単離した。透明溶液を蒸発させて、5℃で乾燥し、それから固形物を XRPD で試験した。結果は表 18 にまとめ、それは化合物 1 A 型及び化合物 2 II 型が得られたことを示した。

30

【0161】

【表 18】

表 18. 徐冷実験の概要

溶媒 (v/v)	固体
IPA*	化合物 2 II 型
アセトン	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
2-MeTHF	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
IPAc*	化合物 1 A 型
THF/n-ヘプタン (1:1)	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
THF/トルエン (1:5)*	化合物 1 A 型 化合物 2 II 型
CHCl ₃ /n-ヘプタン (1:3)	N/A
CHCl ₃ /トルエン (1:3)*	化合物 1 A 型

10

N/A: 固体は得られなかった。

*: 固体は、蒸発により得られた。

20

【0162】

9. 粉碎

粉碎誘導相移行実験を、添加物有り / 無しの2つの条件で実施した。約 15 mg の化合物 2 II 型を、乳鉢に量り入れ、それから5分間、乳棒を使用して手動で粉碎した。固形物を XRPD で解析し、新規な結晶形態は発生していなかった (表 19)。

【0163】

【表 19】

表 19. 粉碎実験の概要。

30

添加物	固体
N/A	化合物 2 II 型
H ₂ O	化合物 2 II 型

N/A: 添加物を加えなかった。

【0164】

実施例 10: ヒト B 細胞刺激のためのプロトコル。

ヒト B 細胞は、150 ml の血液から精製される。簡潔には、血液は PBS で 1/2 に希釈され、Ficoll 密度勾配で遠心されることができる。B 細胞は、Milenyi (Auburn, CA) 製 B 細胞分離キット II を使用した負の選択によって、単核球細胞から分離することができる。それからウェル当たり 50,000 B 細胞を、96 ウェルプレートのヤギ F(ab')₂ 抗ヒト IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) の 10 µg/ml によって刺激できる。化合物は DMSO で希釈して、細胞に加えることができる。DMSO の最終濃度は、0.5% である。増殖は、3 日後に Promega Cell Titer-Glo (Madison, WI) を使用して測定することができる。

40

【0165】

実施例 11: *in vitro* Btk キナーゼアッセイ BTK-polyGAT-LS

50

アッセイ。

BTK *in vitro* アッセイでの目的は、 IC_{50} の測定を通して BTK に対する化合物の能力を決定することである。化合物の阻害は、活性 BTK 酵素 (Upstate 14-552)、ATP 及び阻害剤の存在下で、フルオレセイン標識 polyGAT ペプチド (Invitrogen PV3611) のリン酸化量をモニタリングした後に測定できる。BTK キナーゼ反応は、黒色 96 ウェルプレート (Costar 3694) で実施できる。典型的なアッセイでは、キナーゼ緩衝液 (10 mM のトリス-HCl pH 7.5、10 mM の $MgCl_2$ 、200 μM の Na_3PO_4 、5 mM の DTT、0.01% Triton X-100、及び 0.2 mg/ml カゼイン) 中の ATP / ペプチドマスター混合物 (最終濃度: ATP 10 μM 、polyGAT 100 nM) のアリコット 24 μL を、各ウェルに添加できる。次に 100% DMSO 溶媒中の 4 倍の 40 \times 化合物滴定液 1 μL を添加し、続いて 1 \times キナーゼ緩衝液中の BTK 酵素混合物 15 μL (最終濃度 0.25 nM) を添加できる。このアッセイを 30 分間インキュベートし、その後 50 mM の EDTA 溶液 28 μL で停止させた。キナーゼ反応物のアリコット (5 μL) を低容量の白色 384 ウェルプレート (Corning 3674) に移して、2 \times 検出緩衝液 (4 nM の Tb-PY20 抗体を含む Invitrogen PV3574: Invitrogen PV3552) 5 μL を添加できる。プレートを覆って、室温で 45 分間インキュベートできる。Molecular Devices M5 (332 nm 励起、488 nm 発光、518 nm フルオレセイン発光) での時間分解蛍光 (TRF) を測定できる。 IC_{50} 値を、DMSO 対照から決定された 100% 酵素活性と、EDTA 対照からの 0% 活性との 4 パラメーターフィッティングを利用して計算できる。

10

20

【0166】

実施例 12: マウス全血の BTK 活性の *in vitro* 阻害

抗ウサギ MSD プレート (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) を、PBS で 1:50 に希釈したウサギ抗 BTK C82B8 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) の 35 μL / ウェルでコーティングした。プレートを、2 時間 \pm 1 時間、室温にて振り混ぜながら (設定 3~5)、または一晩 4 にて、インキュベートすることができる。プレートを、TBS 中の 3% MSD ブロッカー A を使用して、MSD ブロッカー A (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) で遮断できる。コーティングしたプレートを最初に 250 μL / ウェル TBS で 3 回洗浄して、続いて 200 μL / ウェル 3% ブロッカー A / TBS を添加できる。プレートを、室温にて 2 時間より長く振り混ぜながら、または一晩 4 にて遮断することができる。

30

【0167】

全血を、16 \times 100 のナトリウムヘパリン管の DBA / 1 マウスから採取することができる (Becton Dickinson、カタログ番号 367874)。複数の DBA / 1 マウスからの血液をプールすることができる。ウェル当たりの 96 μL の全血を、毎回先端を変えて 96 丸底プレートへ分取することができる。4 μL の希釈試験化合物を、各試料に加えて、混合し、37 で 30 分間インキュベートすることができる。

40

【0168】

試験化合物の連続希釈において、1000 \times プレートは、100% DMSO 中の試験化合物の連続希釈によって生成することができる。10 つの希釈 (10 mM で開始して 1:3 で終了) を、ウェル A1 に 100% DMSO 中の 10 mM で 15 μL 試験化合物を添加する; ウェル A2 ~ A12 に 10 μL の 100% DMSO を添加する; ウェル A1 ~ ウェル A2 の 5 μL を希釈して混合することによって作成し、1:3 の連続希釈を続け、ウェル A10 への移動の間に先端を変える。ウェルズ A11 及び A12 は、試験化合物を含有しない 100% DMSO を含むことができる。

【0169】

希釈 1 において、1:40 のプレートを作製できる。12 ウェルマルチチャンネルピペットを使用して、各試験化合物または DMSO 濃度を、1000 \times 原液プレートの各ウェ

50

ルから 2 μ L を 78 μ L の水に加えて混合することによって、1 : 40 に希釈することができる。

【0170】

希釈 2 において、試験化合物または DMSO を、1 : 25 に希釈することによって全血に添加することができる。12 ウェルマルチチャンネルピペットを使用して、1 : 40 プレート (B) からの 4 μ L を、96 μ L の全血に加えて混合することができる。

【0171】

全血を溶解させるために使用する溶解緩衝液は、以下のとおり調製することができる。10 \times 溶解緩衝液は、1500 mM の NaCl ; 200 mM のトリス、pH 7.5 ; 10 mM の EDTA ; 10 mM の EGTA 及び 10 % のトリトン - X - 100 を使用して調製することができる。10 \times 溶解緩衝液は dH₂O 中 1 倍に希釈でき、完全溶解緩衝液 (+ / - ホスファターゼ阻害剤) は以下のとおり調製することができる。

10

【0172】

【表 20】

	+PPi (mL)	-PPi (mL)
1 \times 溶解緩衝液	10	10
DMSO 中の 500mM PMSF	0.02	0.02
ホスファターゼ阻害剤 3	0.1	
ホスファターゼ阻害剤 2	0.1	
プロテアーゼ阻害剤 (完全) (10mL につき 1 錠剤)	1 錠剤	1 錠剤
PhosStop (10mL につき 1 錠剤)	1 錠剤	
オルトバナジウム酸ナトリウム (Na ₃ VO ₄) (最終 50 μ M)	0.1	
フッ化ナトリウム (NaF) (最終 10mM)	0.005	
1% デオキシコール酸塩 (最終 0.25%)	2.5	2.5

20

30

【0173】

100 μ L の完全溶解緩衝液 (+ / - ホスファターゼ阻害剤) を各ウェルに加えて、数回上下に分注することによってよく混合することができる。ウェル 1 ~ 10 及び 12 はホスファターゼ阻害剤を含有する (+ PPi) 1 \times 溶解緩衝液を受け、ウェル 11 はホスファターゼ阻害剤を含有しない (- PPi) 1 \times 溶解緩衝液を受けることができる。試料を 1 時間、氷上でまたは 4 $^{\circ}$ C でインキュベートすることができる。試料を、完全溶解の半分の時点で再び混合することができる。

【0174】

ブロッキング緩衝液を、各ウェル当たり 250 μ L の TBST で 3 回、ブロックした MSD プレート を洗淨することができる。100 ~ 150 μ L の全血溶解物をコーティング及びブロックした MSD プレートの各ウェルに加えて、続いて振り混ぜながら低温室で一晩インキュベートすることができる。

40

【0175】

それからプレートを、各ウェル当たり 250 μ L の TBST で 4 回洗淨できる。ビオチン化ホスホチロシンマウス mAb (pY100、Cell Signaling Technology、Danvers、MA) を、1 % のブロッカー A に 1 : 125 に希釈できる。マウス抗 BTK mAb (Fitzgerald Industries International、Acton、MA) を、1 % のブロッカー A に 1 : 900 に希釈できる。35 μ L の希釈 pY100 または希釈抗 BTK mAb を各ウェルに加えて、2 時間、室温にて振り混ぜながらインキュベートすることができる。

50

【 0 1 7 6 】

それからプレートに250 µLのTBST/ウェルで3回洗浄することができる。3%のブロッカーA中の35 µLの1:500のストレプトアビジン-スルホ-タグ標識抗体を、各ウェルに加えることができる。抗BTKにおいて、3%のブロッカーA中の1:500の抗マウス-タグ標識抗体の35 µLを、各ウェルに加えることができる。プレートを、1時間、室温にて振り混ぜながらインキュベートすることができる。

【 0 1 7 7 】

プレートを発現させて読み取るために、dH₂O中の1×読み取り緩衝剤を、4×原液から調製することができる。プレートを250 µLのTBST/ウェルで3回、洗浄することができる。150 µLの1×MSD読み取り緩衝剤を、各ウェルに加える。プレートは、SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery、Rockville、MD)で読み取ることができる。

材料

【 0 1 7 8 】

【表 2 1】

品目	供給元	カタログ番号
抗ウサギMSDプレート	MSD	L45RA-1
ウサギ抗BTK (C82B8)	Cell Signaling	3533S
PBS	Media Prep	
MSD ブロッカーA	MSD	R93BA-4
TBST (1xTBS/0.1%Tween20)	Media Prep	
10X 溶解緩衝液	Media Prep	
DMSO 中の PMSF (500mM)	Media Prep	
ホスファターゼカクテル阻害剤 3	Sigma Aldrich	P0044-5ML
ホスファターゼカクテル阻害剤 2	Sigma Aldrich	P5726-1ML
cOmplete Mini	Roche	11 836 153 001
PhosStop 阻害剤	Roche	04 906 837 001
オルトバナジン酸ナトリウム 100 mM	Media Prep	
フッ化ナトリウム 1M	Media Prep	
1% デオキシコール酸塩	Media Prep	
ビオチン化 pTyr100 ms mAb	Cell Signaling	9417S
ストレプトアビジンスルホ-タグ	MSD	R32AD-1
MSD 読み取り緩衝剤 4X	MSD	R92TC-1
Costar 96-丸底	Costar/Fisher	3799
マウス抗BTK (7F12H4)	Fitzgerald	10R-1929
抗マウススルホ-タグ	MSD	R32AC-5

【 0 1 7 9 】

実施例 13 : DBA1マウスのPK/PD 相関

マウスはCMC-Tween中の試験化合物を経口投与(PO)されることができて(PO)、投与後に種々の時間で、CO₂窒息によって屠殺することができる。ヘパリン加

全血を心穿刺によって直ちに採取して、2つの試料に分割することができる。1つの試料は存在する試験化合物の量を定量化するために使用することができ、残りは、ホスファターゼ阻害剤の存在下で、MSD溶解緩衝液中に溶解させる。溶媒(CMC-Tween)を投与されたマウスの心穿刺からのヘパリン加全血は、ホスファターゼ阻害剤の存在(高制御)下または不存在(低制御)下で溶解させることができる。溶解全血試料は、上述のとおりホスホBTKについて解析されることができる。投与されたマウスからの各血液試料のホスホBTKの阻害%は、以下のとおり計算することができる。 $(1 - ((pBTK(x + PPI) - pBTK(溶媒 - PPI)) / pBTK(溶媒 + PPI))) * 100$ 、式中、 $pBTK(x + PPI)$ は、各試料化合物処理済みマウスからの全血のECLシグナルであり、 $pBTK(溶媒 - PPI)$ は、ホスファターゼ阻害剤の不存在(低制御)下での溶媒処理済みマウスの溶解した全血の平均的ECLシグナルであり、及び $pBTK(溶媒 + PPI)$ は、ホスファターゼ阻害剤の存在(高制御)下での溶媒処理済みマウスの溶解した全血の平均的ECLシグナルであり得る。

10

20

30

40

【0180】

実施例14：ヒト全血のin vitro PDアッセイ

ヒトヘパリン加静脈血は、Bioreclamation, Inc.またはSereCare Life Sciencesから購入して、一晩輸送されることができる。全血は96ウェルプレートに分取されて、DMSO中の試験化合物の連続希釈によって、または薬物のないDMSOを「添加する」ことができる。すべてのウェルのDMSOの最終濃度は0.1%であり得る。プレートを37で30分間インキュベートできる。プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤を含有する溶解緩衝液を、薬物含有試料及びDMSOのみの試料(+PPI、高制御)の1つに加えることができ、その一方で、プロテアーゼ阻害剤を含有する溶解緩衝液を、他のDMSOのみの試料(-PPI、低制御)に加えることができる。すべての溶解全血試料は、総BTK捕捉及び実施例12に記載されたホスホチロシン検出方法に供与され得る。ECL値は、+PPI高制御及び-PPI低制御によって定義される最大及び最低の制限を有する、柱状ならびに最適な曲線でグラフで示されることができ、補間法によってECLシグナルの50%阻害になる試験化合物濃度を推定するために用いることができる。

【0181】

実施例15：化合物2I型の単結晶の調製

10.2mgの化合物2II型及び3.6mgのアジピン酸を、0.6mLのジクロロメタン/アセトニトリル(1/5、v/v)混合溶媒を添加した3mLバイアルに量り入れた。溶液をボルテックスして、3分間超音波処理した。バイアルを50のオープンに保存して0.5時間加熱し、それから溶液を0.45µmのフィルターで濾過して、50で予熱した別の2つの3mLバイアルに入れた。化合物2I型の種を濾液入りのバイアルに入れた。それからバイアルを50のバイオ化学インキュベーターに置いて、0.01/分の速度で50から5まで冷却した。5日後に、棒状結晶が得られた。化合物2I型の単結晶の3次元構造体及び化合物2I型単結晶の単位格子を、それぞれ図14及び図15に示す。結晶データ及び構造精密化の詳細を表20に示す。

【0182】

【表 2 2】

表 2 0 . 結晶データ及び構造精密化の概要

実験式	$C_{29}H_{39}N_7O_6$	
式量	581.67	
温度	298 (2) K	
波長	0.71073 Å	
結晶系、空間群	三斜晶, P 1	10
単位格子寸法	a = 5.2557 (8) Å b = 14.935 (3) Å c = 20.489 (3) Å $\alpha = 70.370 (6)^\circ$ $\beta = 85.120 (4)^\circ$ $\gamma = 84.901 (4)^\circ$	
体積	1506.2 (4) Å ³	
Z, 計算密度	2, 1.283 Mg/m ³	20
吸収係数	0.092 mm ⁻¹	
F (000)	620	
結晶サイズ	0.30 x 0.26 x 0.24 mm	
データ収集の θ 範囲	2.13 ~ 25.00 °	
制限指数	-6 ≤ h ≤ 6 -17 ≤ k ≤ 17 -24 ≤ l ≤ 24	
反射収集/ 独立	47593 / 5261 [R(int) = 0.0766]	30
完全性	98.9 %	
精密化方法	F ² の完全マトリックスの最小二乗法	
データ/ 抑制/ パラメーター	5261 / 24 / 759	
F ² のフィッティング度合	1.057	
最終 R インデックス [I > 2σ (I)]	R ₁ = 0.0581, wR ₂ = 0.1439	
最大微分ピークとホール	0.271 及び -0.226 e. Å ⁻³	40

【 0 1 8 3】

実施例 1 6 : 化合物 2 I I 型の単結晶の調製

5.0 mg の化合物 2 I I 型を、0.8 mL のメチルイソブチルケトンを追加した 3 mL バイアルに量り入れた。溶液をボルテックスして、3 分間超音波処理した。それからバイアルを 50 ° のオープンに保存して 0.5 時間加熱し、次に溶液を 0.45 μm のフィルターで濾過して、50 ° で予熱した別の 3 mL バイアルに入れて、化合物 2 I I 型の種を濾液入りのバイアルに入れて、結晶成長を生じさせた。それからバイアルを 50 ° のバイオ化学インキュベーター内に移動して、0.01 / 分の速度で 50 ° から 5 ° まで冷

却した。3日後に、棒状結晶が得られた。化合物 2 I I 型の単結晶の 3 次元構造体及び化合物 2 I I 型単結晶の単位格子を、それぞれ図 1 6 及び図 1 7 に示す。結晶データ及び構造精密化の詳細を表 2 1 に示す。

【 0 1 8 4 】

【 表 2 3 】

表 2 1 . 結晶データ及び構造精密化の概要

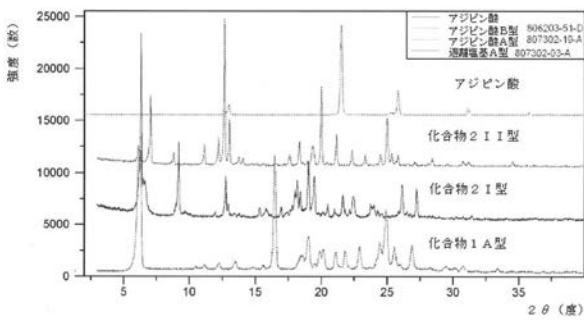
実験式	$C_{26}H_{34}N_7O_4$	
式量	508.60	
温度	123 (2) K	10
波長	0.71073 Å	
結晶系、空間群	単斜晶, $P2_1/n$	
単位格子寸法	a = 6.7183 (6) Å b = 13.8744 (11) Å c = 28.383 (2) Å $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 91.220 (3)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	20
体積	2645.0 (4) Å ³	
Z, 計算密度	4, 1.277 Mg/m ³	
吸収係数	0.089 mm ⁻¹	
F (000)	1084	
結晶サイズ	0.32 x 0.24 x 0.23 mm	
データ収集の θ 範囲	2.94 ~ 25.00 °	30
制限指数	$-7 \leq h \leq 7$ $-16 \leq k \leq 16$ $-33 \leq l \leq 33$	
反射収集/ 独立	60197 / 4634 [R(int) = 0.0462]	
完全性	99.8 %	
精密化方法	F ² の完全マトリックスの最小二乗法	
データ/ 抑制/ パラメーター	4634 / 0 / 336	40
F ² のフィッティング度合	0.995	
最終 R インデックス [I>2 σ (I)]	R ₁ = 0.0797, wR ₂ = 0.2189	
最大微分ピークとホール	1.749 及び -0.523 e. Å ⁻³	

【 0 1 8 5 】

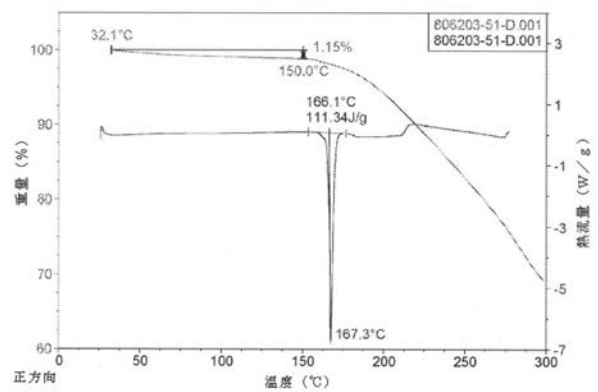
本開示がこの詳細な説明と関連して記載されると共に、前述の説明は本発明の範囲を例示したものであって、発明の範囲を限定することを意図したのではなく、発明の範囲は添付の特許請求の範囲により定義されることを理解すべきである。他の態様、利点及び変

更は、以下の特許請求の範囲内である。

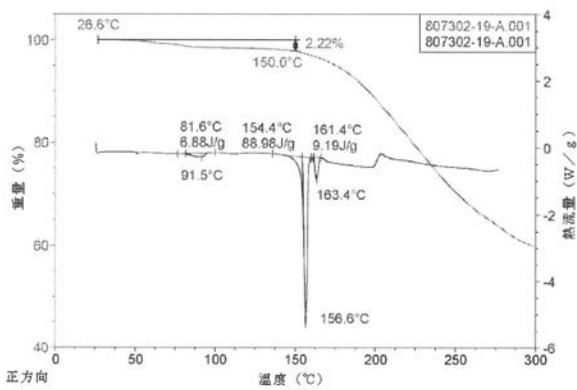
【 図 1 】



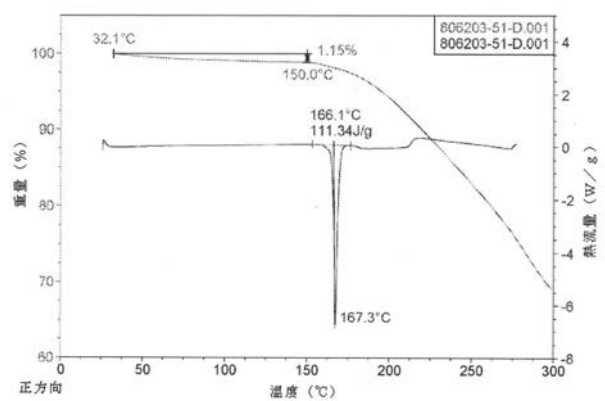
【 図 3 】



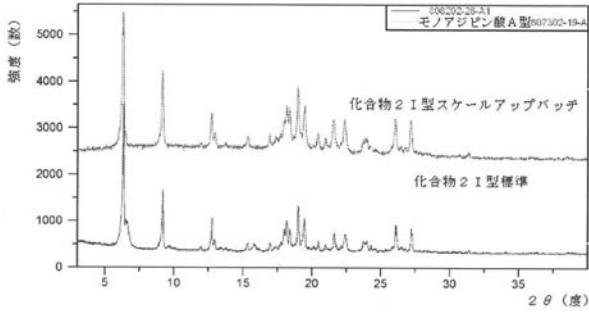
【 図 2 】



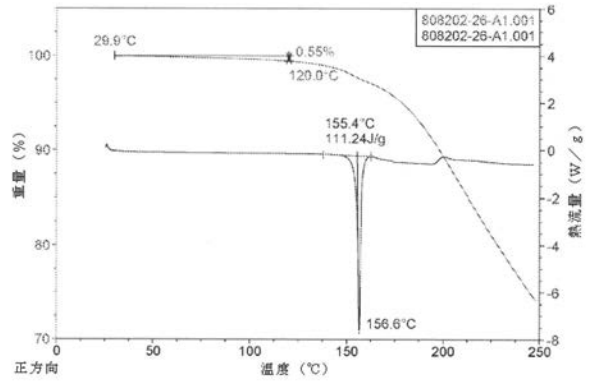
【 図 4 】



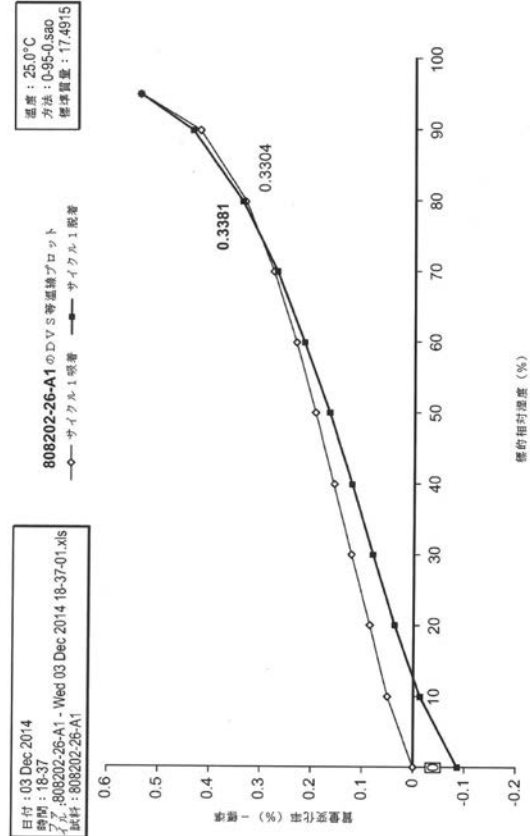
【 図 5 】



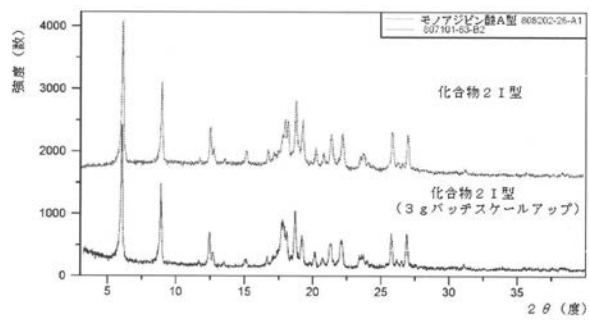
【 図 6 】



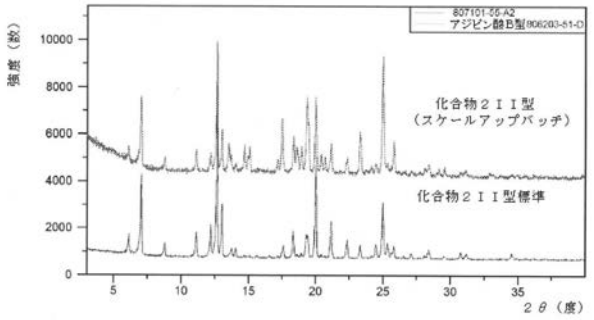
【 図 7 】



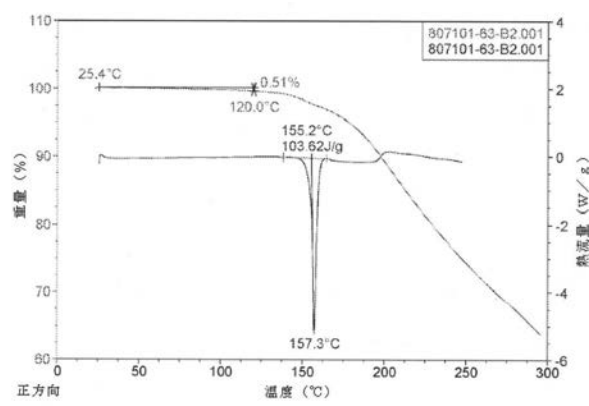
【 図 8 】



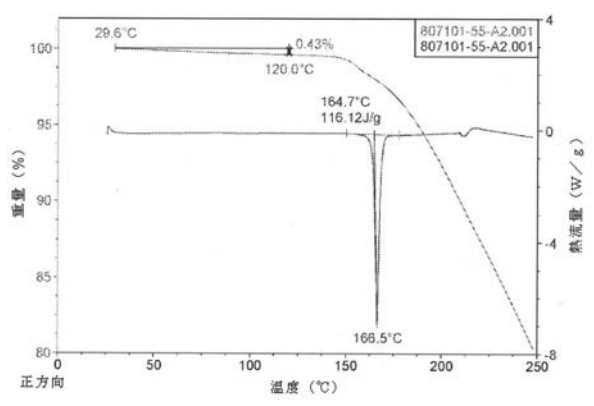
【 図 10 】



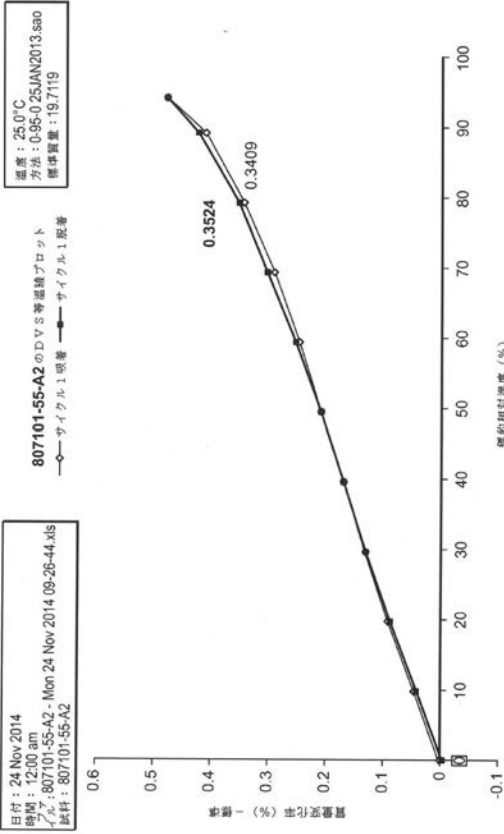
【 図 9 】



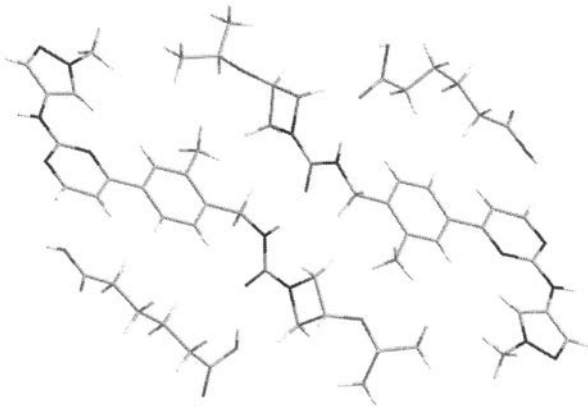
【 図 11 】



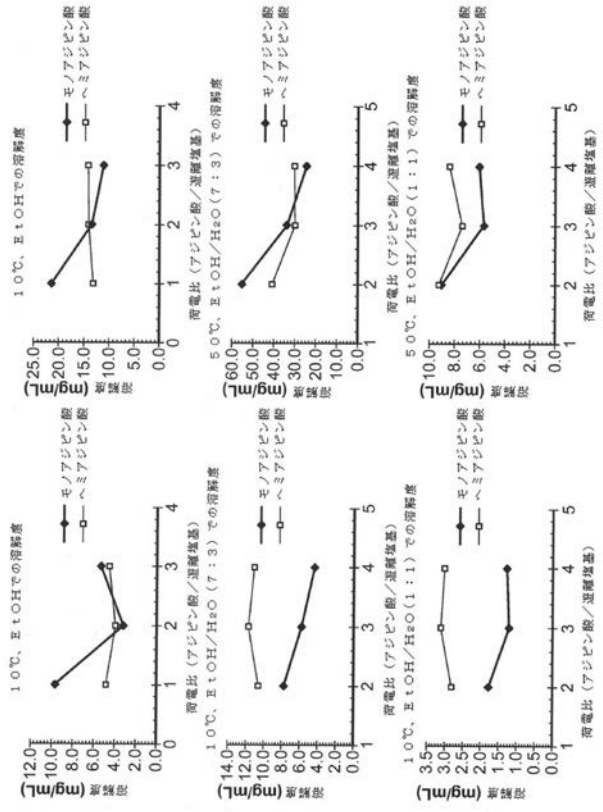
【 図 1 2 】



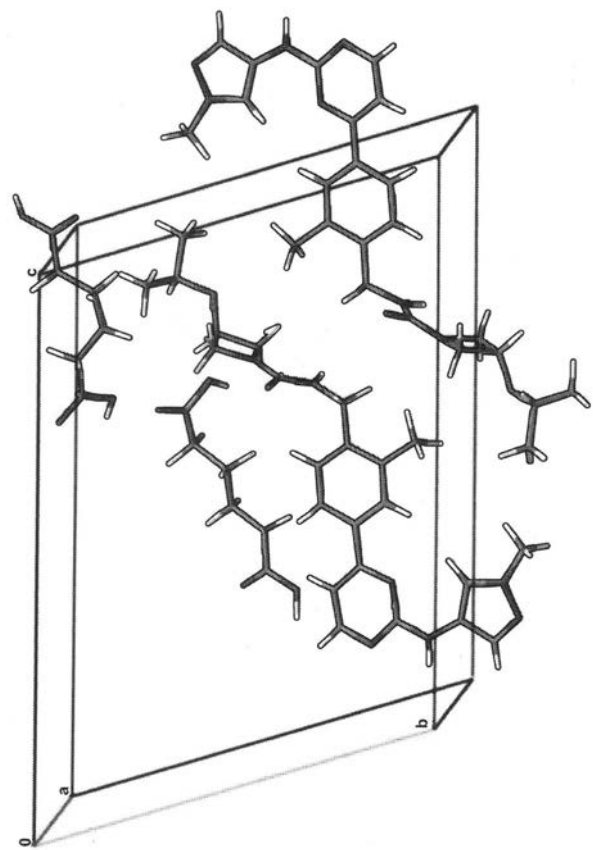
【 図 1 4 】



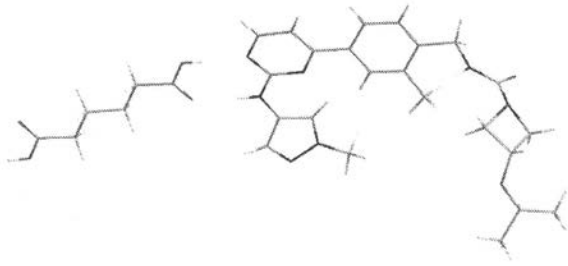
【 図 1 3 】



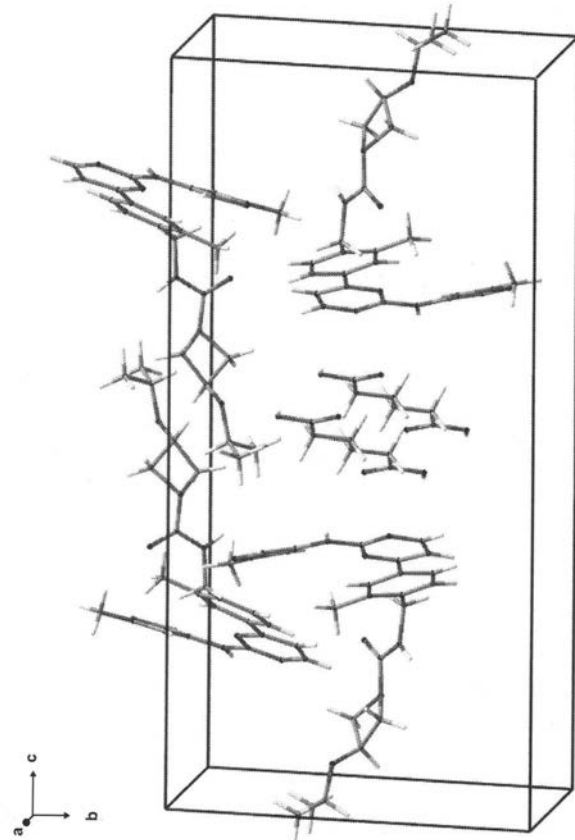
【 図 1 5 】



【図 16】



【図 17】



【手続補正書】

【提出日】平成30年2月9日(2018.2.9)

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年6月10日出願の米国仮特許出願第62/173,896号の優先権を主張するものであり、その内容を参照により本明細書に組み込む。

発明の背景

プロテインキナーゼは、腫瘍学、神経学及び免疫学の多くのヒト疾患の発生及び治療で重要な役割を果たす、500以上のタンパク質からなる大きな多重遺伝子族である。Tecキナーゼは、5つの要素(Tec(肝細胞癌内で発現するチロシンキナーゼ)、Btk(ブルトン型チロシンキナーゼ)、Itk(インターロイキン-2(IL-2)誘発性T細胞キナーゼ、EtkまたはTskとしても知られる)、Rlk(静止期リンパ球キナーゼ、Txxkとしても知られる)、及びBmx(染色体X上の骨髄チロシンキナーゼ遺伝子、Etkとしても知られる))からなる、非受容体型チロシンキナーゼであり、ならびにそれは主として造血細胞中で発現するが、Bmx及びTecの発現は、内皮細胞及び肝細胞において検出されている。Tecキナーゼ(Itk、Rlk及びTec)はT細胞内で発現し、すべてT細胞受容体(TCR)の下流で活性化される。Btkは、B細胞活性化、増殖、及び分化の調節に関するB細胞受容体(BCR)シグナル伝達の下流メディエーターである。更に具体的にはBtkは、ホスファチジルイノシトール(3,4,5)-トリホスフェート(PIP3)に結合するPHドメインを含む。PIP3結合は、Btk

を誘導してホスホリパーゼC (PLC) をリン酸化し、それによりPIP₂を加水分解して2つの二次メッセンジャー、イノシトールトリホスフェート (IP₃) 及びジアシルグリセロール (DAG) を生成して、プロテインキナーゼPKCを活性化し、その後、追加的なB細胞シグナル伝達を誘導する。Btk酵素活性を不能にする突然変異により、原発性免疫不全であるXLA症候群 (X連鎖型無ガンマグロブリン血症) を生じる。TecキナーゼがB細胞及びT細胞シグナル伝達の両方において果たす重大な役割を考慮すれば、Tecキナーゼは、自己免疫不全の目的とする対象になっている。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/036952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D403/14 A61K31/506 A61P35/00 A61P37/00 ADD.		
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) C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PETER NORMAN: "Inducible tyrosine kinase inhibitors: a review of the patent literature (2010 - 2013)", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS., vol. 24, no. 9, 3 July 2014 (2014-07-03), pages 979-991, XP55288604, GB ISSN: 1354-3776, DOI: 10.1517/13543776.2014.936381 the whole document	1-20
X,P	----- WO 2015/089337 A1 (BIOGEN IDEC INC [US]; SUNESIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 18 June 2015 (2015-06-18) cited in the application page 100; example 21 -----	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 July 2016		26/07/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Lauro, Paola

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/036952

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(a)	Publication date
WO 2015089337 A1	18-06-2015	CA 2932608 A1	18-06-2015
		TW 201536765 A	01-10-2015
		WO 2015089337 A1	18-06-2015

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 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 K 31/506	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
		A 6 1 K	31/506	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74) 代理人 100188374

弁理士 一宮 維幸

(72) 発明者 マクフィー, ジェイ・マイケル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ, ビニー・ストリート 2 2 5 , バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72) 発明者 チェン, ロビー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ, ビニー・ストリート 2 2 5 , バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72) 発明者 ファーガソン, スティーヴン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ, ビニー・ストリート 2 2 5 , バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72) 発明者 フランクリン, ロイド

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ, ビニー・ストリート 2 2 5 , バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72) 発明者 マック, タメラ・エル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ, ビニー・ストリート 2 2 5 , バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4C063 AA03 BB09 CC29 DD22 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 BC42 GA07 GA14 GA15 MA01 MA02 MA04

MA05 NA02 NA03 NA11 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB26

ZB27 ZC20