(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119403571 A
(43)申请公布日 2025.02.07

(21)申请号 202380043023.8
(22)申请日 2023.05.26
(30)优先权数据
2022-087166 2022.05.27 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/019755 2023.05.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/229032 JA 2023.11.30
(71)申请人 住友制药株式会社
地址 日本大阪府大阪市中央区道修町二丁目6番8号
(72)发明人 熊谷悠香 梅原宏纪 大石润 川上隆兵 稻垣良作 大江星菜 清水果奈 太田阳介
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 马倩 蔡晓菡
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61K 9/127(2025.01)
A61K 31/497(2006.01)
A61K 31/506(2006.01)
A61K 31/5377(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/02(2006.01)
A61K 47/24(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)
A61K 47/28(2006.01)
A61K 47/32(2006.01)
A61K 47/10(2017.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)

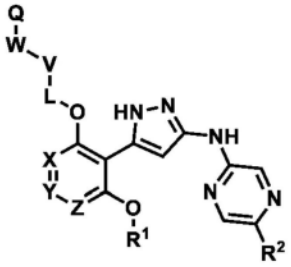
权利要求书10页 说明书178页 附图9页

(54)发明名称

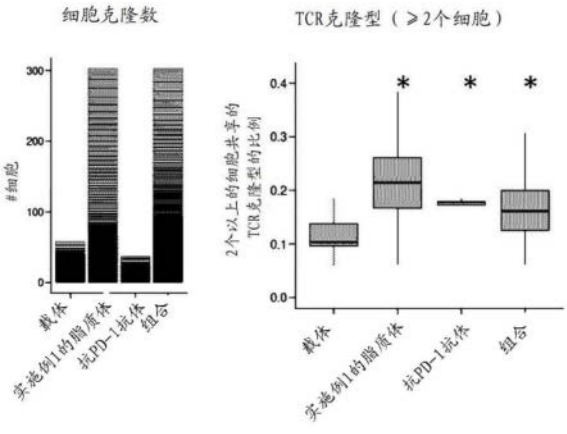
对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症的治疗药

(57)摘要

本发明提供基于CHK1抑制发挥抗癌作用的化合物。发现下述式(1)所示的化合物或其制药学可接受的盐具有对CHK1的强抑制作用,由此示出优异的抗肿瘤作用,从而完成本公开:



(1)[式中,R^1、R^2、L、V、W、Q如说明书中定义所示,X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子,其中,X、Y和Z不同时为CR^8,R^8如说明书中定义所示]。



CN 119403571 A

1.对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的治疗剂和/或预防剂,其含有CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体作为有效成分。

2.根据权利要求1所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

3.根据权利要求2所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂被同时施用。

4.根据权利要求2或3中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,在施用前述CHK1抑制剂后,施用前述免疫检查点抑制剂。

5.根据权利要求2～4中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再施用前述抗PD-1抗体。

6.根据权利要求2～4中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再在3天后施用前述抗PD-1抗体。

7.根据权利要求2～6中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

8.根据权利要求2～6中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

9.根据权利要求2～6中任一项所述的记载的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD3阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

11.根据权利要求1～10中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

12.根据权利要求1～11中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数为0.135以下。

13.根据权利要求1～12中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的巨噬细胞的M1-M2比为21以下。

14.根据权利要求1～13中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD206阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

15.根据权利要求1～14中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的IAd阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比减少。

16.根据权利要求1～15中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的淋巴结内的CD62L阴性CD44阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的淋巴结相比减少。

17.根据权利要求1～16中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的PD-L1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

18.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的VEGFa表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

19.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的颗粒酶B表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

20.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的干扰素γ表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

21.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的H2ab1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

22.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD80表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

23.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的Mrc1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

24.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的精氨酸酶1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

25.根据权利要求1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的DNA复制应激与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

26.用于预防已缓解的癌症复发的治疗剂和/或预防剂,其含有CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体作为有效成分。

27.根据权利要求26所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

28.根据权利要求26或27中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

29.根据权利要求26或27中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

30.根据权利要求26或27中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

31.根据权利要求26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为选自扁平上皮癌、黑色素瘤、急性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、恶性淋巴瘤、浆细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、脑肿瘤、头颈癌、头颈扁平上皮癌、食道癌、甲状腺癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤・胸腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、胆囊・胆管癌、肝癌、肝细胞癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、MSI-高型大肠癌、肛门癌、胃肠道间质瘤、绒毛膜上皮癌、子宫体癌、宫颈癌、卵巢癌、铂制剂耐药铂制剂耐药性卵巢癌、PARP抑制剂耐药性卵巢癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肾癌、肾细胞癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、肾母细胞肿瘤、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、尤文肉瘤、软骨肉瘤、软组织肉瘤、或皮肤癌中的至少一种癌症。

32.根据权利要求26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为黑色素瘤、扁平上皮癌、非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌、头颈扁平上皮癌、尿路上皮癌、非肌层浸润性膀胱癌、肾癌、肝细胞癌、MSI-高型大肠癌、食道癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、子宫体癌或卵巢癌。

33.根据权利要求26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症为选自头颈癌、扁平上皮癌、非小细胞肺癌、肛门癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、或子宫体癌中的至少一种癌症。

34.根据权利要求26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为具有

高肿瘤突变负荷(Tumor Mutation Burden-High;TMB-High)的实体瘤。

35.根据权利要求1～34中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含磷脂。

36.根据权利要求35所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述磷脂为选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、和氢化大豆卵磷脂中的一种或它们中的二种以上的组合物。

37.根据权利要求1～36中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含甾醇类。

38.根据权利要求1～37中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述甾醇类为胆固醇。

39.根据权利要求1～38中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含聚合物修饰脂质。

40.根据权利要求39所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述聚合物修饰脂质的聚合物部分为聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、甲氧基聚乙二醇、甲氧基聚丙二醇、甲氧基聚乙烯醇、甲氧基聚乙烯基吡咯烷酮、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、乙氧基聚乙烯醇、乙氧基聚乙烯基吡咯烷酮、丙氧基聚乙二醇、丙氧基聚丙二醇、丙氧基聚乙烯醇、或丙氧基聚乙烯基吡咯烷酮。

41.根据权利要求39或40所述的治疗剂和/或预防剂,其中,聚合物修饰脂质的脂质部分为磷脂酰乙醇胺或二酰基甘油。

42.根据权利要求1～41中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,

前述包封有CHK1抑制剂的脂质体包含

(1)40～70摩尔%的磷脂、

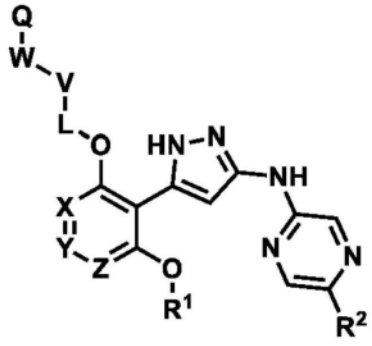
(2)30～50摩尔%的胆固醇、和

(3)1～10摩尔%的聚合物修饰脂质。

43.根据权利要求1～42中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含选自无机酸、无机酸盐、有机酸、有机酸盐、糖类、缓冲剂、抗氧化剂、和聚合物类中的添加物。

44.根据权利要求1～43中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述CHK1抑制剂为式(1)所示的化合物或其制药学可接受的盐:

[化1]



(1)

式中,

R^1表示氢原子、任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{3-10}环烷基、任选取代的3～10元的饱和杂环基、任选取代的C_{6-10}芳基、或任选取代的5～12元的杂芳基，

R^2表示氢原子、卤素原子、氰基、硝基、羧基、磺酸、磷酸、$-OR^3$、$-SR^3$、$-COR^4$、$-CO_2R^4$、$-CONR^5R^6$、$-SO_2R^4$、$-SO_2NR^5R^6$、$-OCOR^4$、$-OCO_2R^4$、$-OCONR^5R^6$、$-NR^5R^6$、$-NR^7COR^4$、$-NR^7CO_2R^4$、$-NR^7CONR^5R^6$、$-NR^7SO_2R^4$、$-NR^7SO_2NR^5R^6$、任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{2-6}烯基、任选取代的C_{2-6}炔基、任选取代的C_{3-10}环烷基、任选取代的3～10元的饱和杂环基、任选取代的C_{6-10}芳基、或任选取代的5～12元的杂芳基，

R^3表示氢原子或C_{1-6}烷基，

R^4表示C_{1-6}烷基，

R^5、R^6和R^7各自独立地表示氢原子、或C_{1-6}烷基，其中，与同一氮原子键合的R^5和R^6均为C_{1-6}烷基时，它们任选与各自键合的氮原子一起形成3～8元的含氮饱和杂环，

X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子，其中，X、Y和Z不同时为CR^8，

R^8为多个时，各自独立地表示氢原子、卤素原子、氰基、硝基、羧基、磺酸、磷酸、$-OR^9$、$-SR^9$、$-COR^{10}$、$-CO_2R^{10}$、$-CONR^{11}R^{12}$、$-SO_2R^{10}$、$-SO_2NR^{11}R^{12}$、$-OCOR^{10}$、$-OCO_2R^{10}$、$-OCONR^{11}R^{12}$、$-NR^{11}R^{12}$、$-NR^{13}COR^{10}$、$-NR^{13}CO_2R^{10}$、$-NR^{13}CONR^{11}R^{12}$、$-NR^{13}SO_2R^{10}$、$-NR^{13}SO_2NR^{11}R^{12}$、任选取代的$C_{1-6}$烷基、任选取代的$C_{2-6}$烯基、任选取代的$C_{2-6}$炔基、任选取代的$C_{3-10}$环烷基、任选取代的3～10元的饱和杂环基、任选取代的C_{6-10}芳基、或任选取代的5～12元的杂芳基，

R^9表示氢原子或C_{1-6}烷基，

R^{10}表示C_{1-6}烷基，

R^{11}、R^{12}和R^{13}各自独立地表示氢原子或C_{1-6}烷基，其中，与同一氮原子键合的R^{11}和R^{12}均为C_{1-6}烷基时，它们任选与各自键合的氮原子一起形成3～8元的含氮饱和杂环，

L表示单键或任选取代的C_{1-6}亚烷基，

V表示单键、任选取代的C_{3-10}亚环烷基或任选取代的3～10元的二价饱和杂环基，

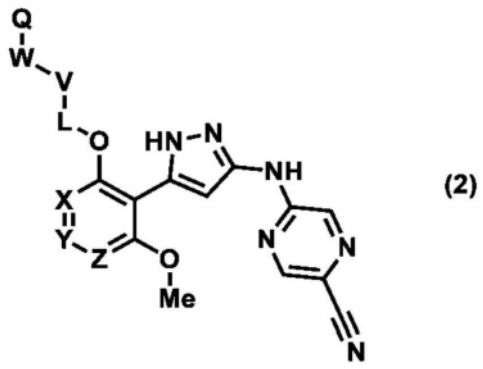
W表示单键或任选取代的C_{1-6}亚烷基，

Q表示氢原子或NHR^{14}，

R^{14}表示氢原子、任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{3-10}环烷基、或任选取代的3～10元的饱和杂环基。

45.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂，其中，式(1)由下述式(2)所示：

[化2]



(2)

式中，

X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子，其中，X、Y和Z不同时为CR^8，

R^8为多个时,各自独立地表示

氢原子、

氟原子、

氯原子、

溴原子、

C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或

5～6元的杂芳基(该杂芳基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代),

L表示

单键、或

C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

V表示

单键、

C_{3-10}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或

3～10元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

W表示

单键、或

C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

Q表示氢原子、或NHR^{14},

R^{14}表示

氢原子、

C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、

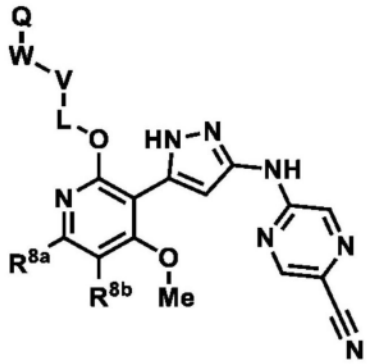
C_{3-10}环烷基(该环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或

3～10元的饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

R^{16}和R^{17}各自独立地表示氢原子、或C_{1-6}烷基,R^{16}或R^{17}为多个时,R^{16}或R^{17}分别任选相同或不同,其中,与同一氮原子键合的R^{16}和R^{17}均为C_{1-6}烷基时,它们任选与各自键合的氮原子一起形成3～8元的含氮饱和杂环。

46.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂,其中,式(1)由下述式(3)所示:

[化3]



(3)

式中,

R^{8a}和R^{8b}各自独立地表示氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基,

L表示单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-6}亚烷基,

V表示单键、

C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或

3~7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

W表示单键、或

被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

Q为氢原子或NH_2。

47.根据权利要求46所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{8a}和R^{8b}各自独立地为氢原子、氟原子或氯原子。

48.根据权利要求46所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{8a}和R^{8b}各自独立地为氢原子、或氯原子。

49.根据权利要求46~48中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,L为C_{1-3}亚烷基。

50.根据权利要求46~49中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为单键。

51.根据权利要求46~50中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为C_{3-7}亚环烷基。

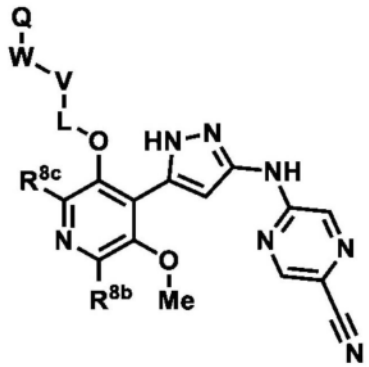
52.根据权利要求46~51中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,W为单键。

53.根据权利要求46~51中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,W为C_{1-3}亚烷基。

54.根据权利要求46~53中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Q为NH_2。

55.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂,其中,式(1)由下述式(4)所示:

[化4]



(4)

式中,

R^{8b}和R^{8c}各自独立地表示氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基，

L表示

单键、或

C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代)，

V表示

单键、

C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或

3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1～3个羟基和氟原子任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)，

W表示

单键、或

被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基，

Q为氢原子、NH_2、或NHMe。

56.根据权利要求55所述的治疗剂和/或预防剂，其中，R^{8b}和R^{8c}为氢原子。

57.根据权利要求55或56中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，L为

单键、或

被1个羟基或氟原子任选取代的C_{1-6}亚烷基。

58.根据权利要求55～57中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，V为

单键、

C_{3-7}亚环烷基、或

3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)。

59.根据权利要求55～58中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，W为单键、或C_{1-3}亚烷基。

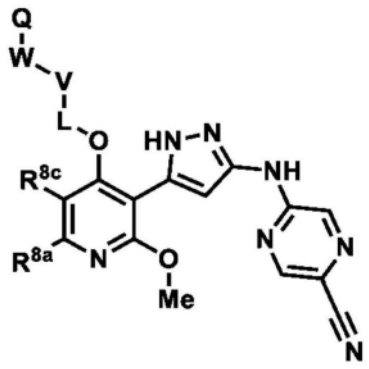
60.根据权利要求55～59中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为氢原子。

61.根据权利要求55～59中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为NH_2。

62.根据权利要求55～59中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为NHMe。

63.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂，其中，式(1)由下述式(5)所示：

[化5]



(5)

式中，

R^{8a}和R^{8c}各自独立地表示氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基，

L表示单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-6}亚烷基，

V表示

单键、

C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或

3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1个羟基任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)，

W表示

单键、或

被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基，

Q为氢原子、或NH_2。

64.根据权利要求63所述的治疗剂和/或预防剂，其中，R^{8a}和R^{8c}为氢原子。

65.根据权利要求63或64中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，L为被1个羟基任选取代的C_{1-6}亚烷基。

66.根据权利要求63～65中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，V为单键、C_{3-7}亚环烷基或3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自羟基、和被1个羟基任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)。

67.根据权利要求63～66中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，W为单键、或C_{1-3}亚烷基。

68.根据权利要求63～67中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为氢原子。

69.根据权利要求63～67中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为NH_2。

70.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂，其含有选自以下的化合物的化合物或其制药学可接受的盐：

5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-6-氯-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-2-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(3-氟氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{2-甲氧基-4-[(3-甲基氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]吡啶-3-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{4-[(3-羟基氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]-2-甲氧基吡啶-3-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(4-{[3-(羟基甲基)氮杂环丁烷-3-基]甲氧基}-2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(3R)-3-氨基丁氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(3S)-3-氨基丁氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(3-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-甲氧基-5-[(吗啉-2-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-甲氧基-5-[(吗啉-2-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(2S)-3-氨基-2-羟基丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

N-{5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}-5-氯吡嗪-2-胺、

N-{5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}-5-(三氟甲基)吡嗪-2-胺、

5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-6-甲氧基嘧啶-5-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-({5-[3-(氮杂环丁烷-3-基)甲氧基-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(3-{[(1R,3S)-3-氨基环己基]氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

(S)-5-[(5-{3-[(3-氟吡咯烷-3-基)甲氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

(S)-5-[(5-{3-甲氧基-[5-(吡咯烷-3-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

(R)-5-[(5-{3-[(3-氟吡咯烷-3-基)甲氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(4-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-6-甲氧基嘧啶--基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-(氟甲氧基)吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-甲氧基-5-[(3-甲基氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(3-{[3-(二氟甲基)氮杂环丁烷-3-基]甲氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(2S)-3-氨基-2-甲基丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(2R)-3-氨基-2-甲基丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(2S)-3-氨基-2-氟丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(2R)-3-氨基-2-氟丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-甲氧基-5-[3-(甲基氨基)丙氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-

2-甲腈、

5-{[5-(3-{[(1R,3R)-3-氨基环戊基]氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(1R)-1-(氮杂环丁烷-3-基)乙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-[(5-{3-[(1R)-1-(3-羟基氮杂环丁烷-3-基)乙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(3-甲氧基-5-{[(1R,3R)-3-(甲基氨基)环戊基]氧基}吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(3-{[(1R,2S,4S,5S)-4-氨基双环[3.1.0]己烷-2-基]氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(2-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-4-甲氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

5-{[5-(4-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈。

71.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有选自以下的化合物的化合物或其制药学可接受的盐:

5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-2-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

72.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有选自以下的化合物的化合物或其制药学可接受的盐:

5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-2-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

73.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有以下的化合物或其制药学可接受的盐:

5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

74.根据权利要求44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有以下的化合物或其制药学可接受的盐:

5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症的治疗药

技术领域

[0001] 本公开中,作为对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症的治疗药,涉及CHK1抑制剂、包封有CHK1抑制剂的脂质体、或它们与免疫检查点抑制剂的并用。

背景技术

[0002] CHK1是在细胞周期中的DNA损伤的检查点信号转导路径中位于ATR下游的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。在哺乳类细胞中,CHK1响应于电离放射线等引起的DNA损伤、或由癌细胞等中的过度细胞增殖、基因组不稳定性引起的DNA复制应激而被ATR依赖性地磷酸化(非专利文献1～5)。CHK1通过激活CHK1的该磷酸化而将CDC25A磷酸化,CDC25A引起的周期蛋白E/CDK2的脱磷酸化受到抑制,从S期开始的进展停止。此外,CHK1将CDC25C磷酸化,抑制CDC25C引起的周期蛋白B/CDK1的脱磷酸化,使从G2M期开始的进展停止。在任何情况下,CDK活性的控制都会诱发细胞周期的停止,阻止DNA损伤存在下的细胞分裂,由此促进DNA损伤的修复。CHK1抑制在癌细胞中抑制细胞周期中的DNA损伤的检查点功能,由此在DNA损伤存在下引起DNA修复不全、无法控制的DNA合成等,其结果是诱发DNA片段化、复制灾难、以及细胞死亡(专利文献1～2)。

[0003] 自上市以来,免疫检查点抑制剂继手术、放射线疗法、化学疗法之后,确立了作为癌症治疗中的第4疗法的地位。这些免疫检查点抑制剂目前已被批准用于以黑色素瘤为代表的广泛的癌症类型中。作为其效果的特征,报道了带来长期生存效果(Durable Clinical Response),但该效果仅在部分患者中被发现,例如头颈扁平上皮癌症中的纳武单抗的总有效率13.3%等,寻求有效率的改善(非专利文献7)。

[0004] 报道了CHK1的各种抑制剂(专利文献1～3)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] [专利文献1]国际公开第2010/077758号

[0008] [专利文献2]国际公开第2012/064548号

[0009] [专利文献3]国际公开第2017/132928号

[0010] 非专利文献

[0011] [非专利文献1]Dai Y and Grant S,Clin Cancer Res,16(2):376-383(2010)

[0012] [非专利文献2]Benada J and Macurek L,Biomolecules,5:1912-1937(2015)

[0013] [非专利文献3]King C,Mol Cancer Ther,14(9):2004-2013(2015)

[0014] [非专利文献4]Dent P,Expert Opinion on Investigational drugs,28(12):1095-1100(2019)

[0015] [非专利文献5]Evangelisti G.等,Expert Opinion on Investigational Drugs,29(8):779-792(2020)

[0016] [非专利文献6]David H.等.J Clin Oncol,34:1764-1771(2016)

[0017] [非专利文献7]Raffaele A.等.Expert Opinion on Biological Therapy,19:3,

169-171(2019)

发明内容

[0018] 用于解决问题的手段

[0019] 本公开提供用于治疗对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症、或预防已缓解的癌症的复发的药剂。

[0020] 本发明人等进行深入研究,结果发现:通过CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体,使药物持续暴露于癌症组织,由此发现杀细胞效果、抗原提呈亢进,M2巨噬细胞减少且肿瘤内转变为吸引CD8阳性T细胞的环境(炎症性的微小环境),针对对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症,本制剂示出优异的抗肿瘤效果。还发现:通过对前述抑制剂或脂质体并用免疫检查点抑制剂,由此示出更优异的抗肿瘤效果。还发现:并用前述抑制剂或脂质体和免疫检查点抑制剂时,具有记忆功能的CD8阳性T细胞增加,二次移植时肿瘤被排斥或肿瘤生长被抑制,由此示出对已缓解的癌症的复发的预防效果,从而完成本公开。

[0021] 即,本公开如以下所示。

[0022] [项1]

[0023] 对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的治疗剂和/或预防剂,其含有CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体作为有效成分。

[0024] [项2]

[0025] 根据项1所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0026] [项3]

[0027] 根据项2所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂被同时施用。

[0028] [项4]

[0029] 根据项2或3中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,在施用前述CHK1抑制剂后,施用前述免疫检查点抑制剂。

[0030] [项5]

[0031] 根据项2～4中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再施用前述抗PD-1抗体。

[0032] [项6]

[0033] 根据项2～4中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再在3天后施用前述抗PD-1抗体。

[0034] [项7]

[0035] 根据项2～6中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0036] [项8]

[0037] 根据项2～6中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0038] [项9]

[0039] 根据项2～6中任一项所述的记载的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0040] [项10]

[0041] 根据项1～9中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD3阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0042] [项11]

[0043] 根据项1～10中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0044] [项12]

[0045] 根据项1～11中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数为0.135以下。

[0046] [项13]

[0047] 根据项1～12中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的巨噬细胞的M1-M2比为21以下。

[0048] [项14]

[0049] 根据项1～13中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD206阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0050] [项15]

[0051] 根据项1～14中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的IAd阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比减少。

[0052] [项16]

[0053] 根据项1～15中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的淋巴结内的CD62L阴性CD44阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的淋巴结相比减少。

[0054] [项17]

[0055] 根据项1～16中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的PD-L1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0056] [项18]

[0057] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的VEGFa表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0058] [项19]

[0059] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的颗粒酶B表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0060] [项20]

[0061] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的干扰素γ表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0062] [项21]

[0063] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的H2ab1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0064] [项22]

[0065] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD80表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0066] [项23]

[0067] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的Mrc1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0068] [项24]

[0069] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的精氨酸酶1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0070] [项25]

[0071] 根据项1～17中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的DNA复制应激与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0072] [项26]

[0073] 用于预防已缓解的癌症复发的治疗剂和/或预防剂,其含有CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体作为有效成分。

[0074] [项27]

[0075] 根据项26所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0076] [项28]

[0077] 根据项26或27中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0078] [项29]

[0079] 根据项26或27中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0080] [项30]

[0081] 根据项26或27中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0082] [项31]

[0083] 根据项26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为选自扁平上皮癌、黑色素瘤、急性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、恶性淋巴瘤、浆细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、脑肿瘤、头颈癌、头颈扁平上皮癌、食道癌、甲状腺癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤・胸腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、胆囊・胆管癌、肝癌、肝细胞癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、MSI-高(high)型大肠癌、肛门癌、胃肠道间质瘤、绒毛膜上皮癌、子宫体癌、宫颈癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、PARP抑制剂耐药性卵巢癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肾癌、肾细胞癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、肾母细胞肿瘤、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、尤文肉瘤、软骨肉瘤、软组织肉瘤、或皮肤癌中的至少一种癌症。

[0084] [项32]

[0085] 根据项26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为选自黑色素瘤、扁平上皮癌、非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌、头颈扁平上皮癌、尿路上皮癌、非肌层浸

润性膀胱癌、肾癌、肝细胞癌、MSI-高型大肠癌、食道癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、或子宫体癌中的至少一种癌症。

[0086] [项33]

[0087] 根据项26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症为选自头颈癌、扁平上皮癌、非小细胞肺癌、肛门癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、或子宫体癌中的至少一种癌症。

[0088] [项34]

[0089] 根据项26～30中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为具有高肿瘤突变负荷(Tumor Mutation Burden-High;TMB-High)的实体瘤。

[0090] [项35]

[0091] 根据项1～34中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含磷脂。

[0092] [项36]

[0093] 根据项35所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述磷脂为选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、和氢化大豆卵磷脂中的一种或它们中的二种以上的组合物。

[0094] [项37]

[0095] 根据项1～36中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含甾醇类。

[0096] [项38]

[0097] 根据项1～37中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述甾醇类为胆固醇。

[0098] [项39]

[0099] 根据项1～38中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含聚合物修饰脂质。

[0100] [项40]

[0101] 根据项39所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述聚合物修饰脂质的聚合物部分为聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、甲氧基聚乙二醇、甲氧基聚丙二醇、甲氧基聚乙烯醇、甲氧基聚乙烯基吡咯烷酮、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、乙氧基聚乙烯醇、乙氧基聚乙烯基吡咯烷酮、丙氧基聚乙二醇、丙氧基聚丙二醇、丙氧基聚乙烯醇、或丙氧基聚乙烯基吡咯烷酮。

[0102] [项41]

[0103] 根据项39或40所述的治疗剂和/或预防剂,其中,聚合物修饰脂质的脂质部分为磷脂酰乙醇胺或二酰基甘油。

[0104] [项42]

[0105] 根据项1～41中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,

[0106] 前述包封有CHK1抑制剂的脂质体包含

[0107] (1)40～70摩尔%的磷脂、

[0108] (2)30～50摩尔%的胆固醇、和

[0109] (3)1～10摩尔%的聚合物修饰脂质。

[0110] [项43]

[0111] 根据项1～42中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含选自无机酸、无机酸盐、有机酸、有机酸盐、糖类、缓冲剂、抗氧化剂、和聚合物类中的添加物。

[0112] [项1A]

[0113] CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体的用途,其用于制备对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的治疗剂和/或预防剂。

[0114] [项2A]

[0115] 根据项1A所述的用途,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0116] [项3A]

[0117] 根据项2A所述的用途,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂被同时施用。

[0118] [项4A]

[0119] 根据项2A或3A中任一项所述的用途,其特征在于,在施用前述CHK1抑制剂后,施用前述免疫检查点抑制剂。

[0120] [项5A]

[0121] 根据项2A～4A中任一项所述的用途,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再施用前述抗PD-1抗体。

[0122] [项6A]

[0123] 根据项2A～4A中任一项所述的用途,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再在3天后施用前述抗PD-1抗体。

[0124] [项7A]

[0125] 根据项2A～6A中任一项所述的用途,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0126] [项8A]

[0127] 根据项2A～6A中任一项所述的用途,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0128] [项9A]

[0129] 根据项2A～6A中任一项所述的记载的用途,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0130] [项10A]

[0131] 根据项1A～9A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD3阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0132] [项11A]

[0133] 根据项1A～10A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0134] [项12A]

[0135] 根据项1A～11A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数为0.135以下。

[0136] [项13A]

[0137] 根据项1A～12A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的巨噬细胞的M1-M2比为21以下。

[0138] [项14A]

[0139] 根据项1A～13A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD206阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0140] [项15A]

[0141] 根据项1A～14A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的IAd阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比减少。

[0142] [项16A]

[0143] 根据项1A～15A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的淋巴结内的CD62L阴性CD44阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的淋巴结相比减少。

[0144] [项17A]

[0145] 根据项1A～16A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的PD-L1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0146] [项18A]

[0147] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的VEGFa表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0148] [项19A]

[0149] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的颗粒酶B表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0150] [项20A]

[0151] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的干扰素γ表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0152] [项21A]

[0153] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的H2ab1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0154] [项22A]

[0155] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD80表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0156] [项23A]

[0157] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的Mrc1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0158] [项24A]

[0159] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的精氨酸酶1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0160] [项25A]

[0161] 根据项1A～17A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的DNA复制应激与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0162] [项26A]

[0163] CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体的用途,其用于制备用于预防已缓解的癌症复发的治疗剂和/或预防剂。

[0164] [项27A]

[0165] 根据项26A所述的用途,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0166] [项28A]

[0167] 根据项26A或27A中任一项所述的用途,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0168] [项29A]

[0169] 根据项26A或27A中任一项所述的用途,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0170] [项30A]

[0171] 根据项26A或27A中任一项所述的用途,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0172] [项31A]

[0173] 根据项26A～30A中任一项所述的用途,其中,前述癌症为选自扁平上皮癌、黑色素瘤、急性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、恶性淋巴瘤、浆细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、脑肿瘤、头颈癌、头颈扁平上皮癌、食道癌、甲状腺癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤·胸腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、胆囊·胆管癌、肝癌、肝细胞癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、MSI-高型大肠癌、肛门癌、胃肠道间质瘤、绒毛膜上皮癌、子宫体癌、宫颈癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、PARP抑制剂耐药性卵巢癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肾癌、肾细胞癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、肾母细胞肿瘤、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、尤文肉瘤、软骨肉瘤、软组织肉瘤、或皮肤癌中的至少一种癌症。

[0174] [项32A]

[0175] 根据项26A～30A中任一项所述的用途,其中,前述癌症为黑色素瘤、非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌、头颈扁平上皮癌、尿路上皮癌、非肌层浸润性膀胱癌、肾癌、肝细胞癌、MSI-高型大肠癌、食道癌、结肠/直肠癌、乳腺癌、子宫体癌。

[0176] [项33A]

[0177] 根据项26A～30A中任一项所述的用途,其特征在于,前述癌症为选自头颈癌、扁平上皮癌、非小细胞肺癌、肛门癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、或子宫体癌中的至少一种癌症。

[0178] [项34A]

[0179] 根据项26A～30A中任一项所述的用途,其中,前述癌症为具有高肿瘤突变负荷(Tumor Mutation Burden-High;TMB-High)的实体瘤。

[0180] [项35A]

[0181] 根据项1A～34A中任一项所述的用途,其中,前述脂质体进一步包含磷脂。

[0182] [项36A]

[0183] 根据项35A所述的用途,其中,前述磷脂为选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵

磷脂、和氢化大豆卵磷脂中的一种或它们中的二种以上的组合物。

[0184] [项37A]

[0185] 根据项1A～36A中任一项所述的用途,其中,前述脂质体进一步包含甾醇类。

[0186] [项38A]

[0187] 根据项1A～37A中任一项所述的用途,其中,前述甾醇类为胆固醇。

[0188] [项39A]

[0189] 根据项1A～38A中任一项所述的用途,其中,前述脂质体进一步包含聚合物修饰脂质。

[0190] [项40A]

[0191] 根据项39A所述的用途,其特征在于,前述聚合物修饰脂质的聚合物部分为聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、甲氧基聚乙二醇、甲氧基聚丙二醇、甲氧基聚乙烯醇、甲氧基聚乙烯基吡咯烷酮、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、乙氧基聚乙烯醇、乙氧基聚乙烯基吡咯烷酮、丙氧基聚乙二醇、丙氧基聚丙二醇、丙氧基聚乙烯醇、或丙氧基聚乙烯基吡咯烷酮。

[0192] [项41A]

[0193] 根据项39A或40A所述的用途,其中,聚合物修饰脂质的脂质部分为磷脂酰乙醇胺或二酰基甘油。

[0194] [项42A]

[0195] 根据项1A～41A中任一项所述的用途,其中,

[0196] 前述包封有CHK1抑制剂的脂质体包含

[0197] (1)40～70摩尔%的磷脂、

[0198] (2)30～50摩尔%的胆固醇、和

[0199] (3)1～10摩尔%的聚合物修饰脂质。

[0200] [项43A]

[0201] 根据项1A～42A中任一项所述的用途,其中,前述脂质体进一步包含选自无机酸、无机酸盐、有机酸、有机酸盐、糖类、缓冲剂、抗氧化剂、和聚合物类中的添加物。

[0202] [项1B]

[0203] 治疗剂和/或预防剂,其用于在对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的治疗和/或预防中使用,其含有CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体作为有效成分。

[0204] [项2B]

[0205] 根据项1B所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0206] [项3B]

[0207] 根据项2B所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂被同时施用。

[0208] [项4B]

[0209] 根据项2B或3B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,在施用前述CHK1抑制剂后,施用前述免疫检查点抑制剂。

[0210] [项5B]

[0211] 根据项2B～4B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再施用前述抗PD-1抗体。

[0212] [项6B]

[0213] 根据项2B～4B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再在3天后施用前述抗PD-1抗体。

[0214] [项7B]

[0215] 根据项2B～6B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0216] [项8B]

[0217] 根据项2B～6B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0218] [项9B]

[0219] 根据项2B～6B中任一项所述的记载的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0220] [项10B]

[0221] 根据项1B～9B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD3阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0222] [项11B]

[0223] 根据项1B～10B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0224] [项12B]

[0225] 根据项1B～11B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数为0.135以下。

[0226] [项13B]

[0227] 根据项1B～12B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的巨噬细胞的M1-M2比为21以下。

[0228] [项14B]

[0229] 根据项1B～13B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD206阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0230] [项15B]

[0231] 根据项1B～14B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的IAd阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比减少。

[0232] [项16B]

[0233] 根据项1B～15B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的淋巴结内的CD62L阴性CD44阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的淋巴结相比减少。

[0234] [项17B]

[0235] 根据项1B～16B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的PD-L1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0236] [项18B]

[0237] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的VEGFa表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0238] [项19B]

[0239] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的颗粒酶B表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0240] [项20B]

[0241] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的干扰素γ表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0242] [项21B]

[0243] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的H2ab1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0244] [项22B]

[0245] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD80表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0246] [项23B]

[0247] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的Mrc1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0248] [项24B]

[0249] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的精氨酸酶1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0250] [项25B]

[0251] 根据项1B～17B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的DNA复制应激与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0252] [项26B]

[0253] 用于在预防已缓解的癌症复发中使用的治疗剂和/或预防剂,其含有CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体作为有效成分。

[0254] [项27B]

[0255] 根据项26B所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0256] [项28B]

[0257] 根据项26B或27B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0258] [项29B]

[0259] 根据项26B或27B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0260] [项30B]

[0261] 根据项26B或27B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0262] [项31B]

[0263] 根据项26B～30B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为选自扁平上皮癌、黑色素瘤、急性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、恶性淋巴瘤、浆细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、脑肿瘤、头颈癌、头颈扁平上皮癌、食道癌、甲状腺癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤·胸腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、胆囊·胆管癌、肝癌、肝细胞癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、MSI-高型大肠癌、肛门癌、胃肠道间质瘤、绒毛膜上皮癌、子宫体癌、宫颈癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、PARP抑制剂耐药性卵巢癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肾癌、肾细胞癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、肾母细胞肿瘤、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、尤文肉瘤、软骨肉瘤、软组织肉瘤、或皮肤癌中的至少一种癌症。

[0264] [项32B]

[0265] 根据项26B～30B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为黑色素瘤、非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌、头颈扁平上皮癌、尿路上皮癌、非肌层浸润性膀胱癌、肾癌、肝细胞癌、MSI-高型大肠癌、食道癌、结肠/直肠癌、乳腺癌、子宫体癌。

[0266] [项33B]

[0267] 根据项26B～30B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述癌症为选自头颈癌、扁平上皮癌、非小细胞肺癌、肛门癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、或子宫体癌中的至少一种癌症。

[0268] [项34B]

[0269] 根据项26B～30B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述癌症为具有高肿瘤突变负荷(Tumor Mutation Burden-High;TMB-High)的实体瘤。

[0270] [项35B]

[0271] 根据项1B～34B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含磷脂。

[0272] [项36B]

[0273] 根据项35B所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述磷脂为选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、和氢化大豆卵磷脂中的一种或它们中的二种以上的组合物。

[0274] [项37B]

[0275] 根据项1B～36B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含甾醇类。

[0276] [项38B]

[0277] 根据项1B～37B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述甾醇类为胆固醇。

[0278] [项39B]

[0279] 根据项1B～38B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含聚合物修饰脂质。

[0280] [项40B]

[0281] 根据项39B所述的治疗剂和/或预防剂,其特征在于,前述聚合物修饰脂质的聚合物部分为聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、甲氧基聚乙二醇、甲氧基聚丙

二醇、甲氧基聚乙烯醇、甲氧基聚乙烯基吡咯烷酮、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、乙氧基聚乙烯醇、乙氧基聚乙烯基吡咯烷酮、丙氧基聚乙二醇、丙氧基聚丙二醇、丙氧基聚乙烯醇、或丙氧基聚乙烯基吡咯烷酮。

[0282] [项41B]

[0283] 根据项39B或40B所述的治疗剂和/或预防剂,其中,聚合物修饰脂质的脂质部分为磷脂酰乙醇胺或二酰基甘油。

[0284] [项42B]

[0285] 根据项1B～41B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,

[0286] 前述包封有CHK1抑制剂的脂质体包含

[0287] (1)40～70摩尔%的磷脂、

[0288] (2)30～50摩尔%的胆固醇、和

[0289] (3)1～10摩尔%的聚合物修饰脂质。

[0290] [项43B]

[0291] 根据项1B～42B中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述脂质体进一步包含选自无机酸、无机酸盐、有机酸、有机酸盐、糖类、缓冲剂、抗氧化剂、和聚合物类中的添加物。

[0292] [项1C]

[0293] 用于治疗和/或预防对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的方法,其包括将CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体向该患者施用。

[0294] [项2C]

[0295] 根据项1C所述的方法,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0296] [项3C]

[0297] 根据项2C所述的方法,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂被同时施用。

[0298] [项4C]

[0299] 根据项2C或3C中任一项所述的方法,其特征在于,在施用前述CHK1抑制剂后,施用前述免疫检查点抑制剂。

[0300] [项5C]

[0301] 根据项2C～4C中任一项所述的方法,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再施用前述抗PD-1抗体。

[0302] [项6C]

[0303] 根据项2C～4C中任一项所述的方法,其特征在于,前述CHK1抑制剂和前述免疫检查点抑制剂在被同时施用后,再在3天后施用前述抗PD-1抗体。

[0304] [项7C]

[0305] 根据项2C～6C中任一项所述的方法,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0306] [项8C]

[0307] 根据项2C～6C中任一项所述的方法,其中,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0308] [项9C]

[0309] 根据项2C～6C中任一项所述的记载的方法,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0310] [项10C]

[0311] 根据项1C～9C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD3阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0312] [项11C]

[0313] 根据项1C～10C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0314] [项12C]

[0315] 根据项1C～11C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数为0.135以下。

[0316] [项13C]

[0317] 根据项1C～12C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的巨噬细胞的M1-M2比为21以下。

[0318] [项14C]

[0319] 根据项1C～13C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD206阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0320] [项15C]

[0321] 根据项1C～14C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的IAd阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比减少。

[0322] [项16C]

[0323] 根据项1C～15C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的淋巴结内的CD62L阴性CD44阳性细胞数与抗PD-1抗体应答性的患者中的淋巴结相比减少。

[0324] [项17C]

[0325] 根据项1C～16C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的PD-L1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0326] [项18C]

[0327] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的VEGFa表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0328] [项19C]

[0329] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的颗粒酶B表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0330] [项20C]

[0331] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的干扰素γ表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0332] [项21C]

[0333] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的H2ab1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0334] [项22C]

[0335] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的CD80表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0336] [项23C]

[0337] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的Mrc1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0338] [项24C]

[0339] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的精氨酸酶1表达与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比增加。

[0340] [项25C]

[0341] 根据项1C～17C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症患者的肿瘤组织内的DNA复制应激与抗PD-1抗体应答性的患者中的肿瘤组织相比降低。

[0342] [项26C]

[0343] 用于预防已缓解的癌症复发的方法,其包括将CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体对患者施用。

[0344] [项27C]

[0345] 根据项26C所述的方法,其特征在于,并用前述CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂。

[0346] [项28C]

[0347] 根据项26C或27C中任一项所述的方法,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0348] [项29C]

[0349] 根据项26C或27C中任一项所述的方法,其特征在于,前述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。

[0350] [项30C]

[0351] 根据项26C或27C中任一项所述的方法,其特征在于,前述抗PD-1抗体为博利珠单抗、纳武单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗。

[0352] [项31C]

[0353] 根据项26C～30C中任一项所述的方法,其中,前述癌症为选自扁平上皮癌、黑色素瘤、急性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、恶性淋巴瘤、浆细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、脑肿瘤、头颈癌、头颈扁平上皮癌、食道癌、甲状腺癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤·胸腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胃癌、胆囊·胆管癌、肝癌、肝细胞癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、MSI-高型大肠癌、肛门癌、胃肠道间质瘤、绒毛膜上皮癌、子宫体癌、宫颈癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、PARP抑制剂耐药性卵巢癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肾癌、肾细胞癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、肾母细胞肿瘤、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、尤文肉瘤、软骨肉瘤、软组织肉瘤、或皮肤癌中的至少一种癌症。

[0354] [项32C]

[0355] 根据项26C～30C中任一项所述的方法,其中,前述癌症为黑色素瘤、非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌、头颈扁平上皮癌、尿路上皮癌、非肌层浸润性膀胱癌、肾癌、肝细胞癌、MSI-高型大肠癌、食道癌、结肠/直肠癌、乳腺癌、子宫体癌。

[0356] [项33C]

[0357] 根据项26C～30C中任一项所述的方法,其特征在于,前述癌症为选自头颈癌、扁平上皮癌、非小细胞肺癌、肛门癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、卵巢癌、铂制剂耐药性卵巢癌、或子宫体癌中的至少一种癌症。

[0358] [项34C]

[0359] 根据项26C～30C中任一项所述的方法,其中,前述癌症为具有高肿瘤突变负荷(Tumor Mutation Burden-High;TMB-High)的实体瘤。

[0360] [项35C]

[0361] 根据项1C～34C中任一项所述的方法,其中,前述脂质体进一步包含磷脂。

[0362] [项36C]

[0363] 根据项35C所述的方法,其中,前述磷脂为选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂、和氢化大豆卵磷脂中的一种或它们中的二种以上的组合物。

[0364] [项37C]

[0365] 根据项1C～36C中任一项所述的方法,其中,前述脂质体进一步包含甾醇类。

[0366] [项38C]

[0367] 根据项1C～37C中任一项所述的方法,其中,前述甾醇类为胆固醇。

[0368] [项39C]

[0369] 根据项1C～38C中任一项所述的方法,其中,前述脂质体进一步包含聚合物修饰脂质。

[0370] [项40C]

[0371] 根据项39C所述的方法,其特征在于,前述聚合物修饰脂质的聚合物部分为聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、甲氧基聚乙二醇、甲氧基聚丙二醇、甲氧基聚乙烯醇、甲氧基聚乙烯基吡咯烷酮、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、乙氧基聚乙烯醇、乙氧基聚乙烯基吡咯烷酮、丙氧基聚乙二醇、丙氧基聚丙二醇、丙氧基聚乙烯醇、或丙氧基聚乙烯基吡咯烷酮。

[0372] [项41C]

[0373] 根据项39C或40C所述的方法,其中,聚合物修饰脂质的脂质部分为磷脂酰乙醇胺或二酰基甘油。

[0374] [项42C]

[0375] 根据项1C～41C中任一项所述的方法,其中,

[0376] 前述包封有CHK1抑制剂的脂质体包含

[0377] (1)40～70摩尔%的磷脂、

[0378] (2)30～50摩尔%的胆固醇、和

[0379] (3)1～10摩尔%的聚合物修饰脂质。

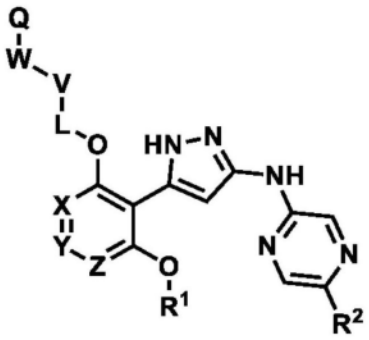
[0380] [项43C]

[0381] 根据项1C～42C中任一项所述的方法,其中,前述脂质体进一步包含选自无机酸、无机酸盐、有机酸、有机酸盐、糖类、缓冲剂、抗氧化剂、和聚合物类中的添加物。

[0382] [项44]

[0383] 根据项1～43中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,前述CHK1抑制剂由式(1)所示:

[0384] [化6]

[0385] 

(1)

[0386] [式中,

[0387] R^1表示氢原子、任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{3-10}环烷基、任选取代的3～10元的饱和杂环基、任选取代的C_{6-10}芳基、或任选取代的5～12元的杂芳基,

[0388] R^2表示氢原子、卤素原子、氰基、硝基、羧基、磺酸、磷酸、-OR^3、-SR^3、-COR^4、-CO_2R^4、-$CONR^5R^6$、-SO_2R^4、-$SO_2NR^5R^6$、-$OCOR^4$、-OCO_2R^4、-$OCONR^5R^6$、-NR^5R^6、-NR^7COR^4、-$NR^7CO_2R^4$、-$NR^7CONR^5R^6$、-$NR^7SO_2R^4$、-$NR^7SO_2NR^5R^6$、任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{2-6}烯基、任选取代的C_{2-6}炔基、任选取代的C_{3-10}环烷基、任选取代的3～10元的饱和杂环基、任选取代的C_{6-10}芳基、或任选取代的5～12元的杂芳基,

[0389] R^3表示氢原子或C_{1-6}烷基,

[0390] R^4表示C_{1-6}烷基,

[0391] R^5、R^6和R^7各自独立地表示氢原子、或C_{1-6}烷基,其中,与同一氮原子键合的R^5和R^6均为C_{1-6}烷基时,它们任选与各自键合的氮原子一起形成3～8元的含氮饱和杂环,

[0392] X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子,其中,X、Y和Z不同时为CR^8,

[0393] R^8为多个时,各自独立地表示氢原子、卤素原子、氰基、硝基、羧基、磺酸、磷酸、-OR^9、-SR^9、-COR^{10}、-CO_2R^{10}、-$CONR^{11}R^{12}$、-SO_2R^{10}、-$SO_2NR^{11}R^{12}$、-$OCOR^{10}$、-OCO_2R^{10}、-$OCONR^{11}R^{12}$、-$NR^{11}R^{12}$、-$NR^{13}COR^{10}$、-$NR^{13}CO_2R^{10}$、-$NR^{13}CONR^{11}R^{12}$、-$NR^{13}SO_2R^{10}$、-$NR^{13}SO_2NR^{11}R^{12}$、任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{2-6}烯基、任选取代的C_{2-6}炔基、任选取代的C_{3-10}环烷基、任选取代的3～10元的饱和杂环基、任选取代的C_{6-10}芳基、或任选取代的5～12元的杂芳基,

[0394] R^9表示氢原子或C_{1-6}烷基,

[0395] R^{10}表示C_{1-6}烷基,

[0396] R^{11}、R^{12}和R^{13}各自独立地表示氢原子或C_{1-6}烷基,其中,与同一氮原子键合的R^{11}和R^{12}均为C_{1-6}烷基时,它们任选与各自键合的氮原子一起形成3～8元的含氮饱和杂环,

[0397] L表示单键或任选取代的C_{1-6}亚烷基,

[0398] V表示单键、任选取代的C_{3-10}亚环烷基或任选取代的3～10元的二价饱和杂环基,

[0399] W表示单键或任选取代的C_{1-6}亚烷基,

[0400] Q表示氢原子或NHR^{14},

[0401] R^{14}表示氢原子、任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{3-10}环烷基、或任选取代的3～10元的饱和杂环基]。

[0402] [项45]

[0403] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^1、R^2、R^8、R^{14}、L、V、和W中的任选取代的C_{1-6}烷基、任选取代的C_{2-6}烯基、任选取代的C_{2-6}炔基、任选取代的C_{3-10}环烷基、任选取代的3～10元的饱和杂环基、任选取代的C_{6-10}芳基、任选取代的5～12元的杂芳基、任选取代的C_{1-6}亚烷基、任选取代的C_{3-10}亚环烷基、或任选取代的3～10元的二价饱和杂环基各自独立地任选被选自

[0404] (1)卤素原子、

[0405] (2)羟基、

[0406] (3)C_{6-10}芳基、

[0407] (4)5～12元的杂芳基、

[0408] (5)C_{1-6}烷基、

[0409] (6)C_{2-6}烯基、

[0410] (7)C_{2-6}炔基、

[0411] (8)C_{1-6}烷氧基、

[0412] (9)C_{1-6}烷基硫基、

[0413] (10)C_{3-10}环烷基、

[0414] (11)3～10元的饱和杂环基、

[0415] (12)羧基、

[0416] (13)-COR^{15}、

[0417] (14)-CO_2R^{15}、

[0418] (15)-$CONR^{16}R^{17}$、

[0419] (16)-$NR^{16}R^{17}$、

[0420] (17)-$NR^{18}COR^{15}$、

[0421] (18)-$NR^{18}CO_2R^{15}$、

[0422] (19)-$NR^{18}SO_2R^{15}$、

[0423] (20)-$NR^{18}CONR^{16}R^{17}$、

[0424] (21)-$NR^{18}SO_2NR^{16}R^{17}$、

[0425] (22)-SO_2R^{15}、

[0426] (23)-$SO_2NR^{16}R^{17}$、

[0427] (24)-$OCOR^{15}$、

[0428] (25)-OCO_2R^{15}、

[0429] (26)-$OCONR^{16}R^{17}$、

[0430] (27)磺酸、

[0431] (28)磷酸、

[0432] (29)氰基、和

[0433] (30)硝基

[0434] 中的相同或不同的1～5个取代基取代,

[0435] 其中,前述(3)C_{6-10}芳基、(4)5～12元的杂芳基、(5)C_{1-6}烷基、(6)C_{2-6}烯基、(7)C_{2-6}炔基、(8)C_{1-6}烷氧基、(9)C_{1-6}烷基硫基、(9)C_{3-10}环烷基和(10)3～10元的饱和杂环基所示的基团任选被选自

[0436] (a)卤素原子、

[0437] (b)羟基、

[0438] (c)C_{6-10}芳基、

[0439] (d)5～12元的杂芳基、

[0440] (e)C_{1-6}烷基、

[0441] (f)C_{2-6}烯基、

[0442] (g)C_{2-6}炔基、

[0443] (h)C_{1-6}烷氧基、

[0444] (i)C_{3-10}环烷基、

[0445] (j)3～10元的饱和杂环基、

[0446] (k)羧基、

[0447] (l)-COR^{15}、

[0448] (m)-CO_2R^{15}、

[0449] (n)-$CONR^{16}R^{17}$、

[0450] (o)-$NR^{16}R^{17}$、

[0451] (p)-$NR^{18}COR^{15}$、

[0452] (q)-$NR^{18}SO_2R^{15}$、

[0453] (r)-SO_2R^{15}、

[0454] (s)-$SO_2NR^{16}R^{17}$、

[0455] (t)磺酸、

[0456] (u)磷酸、

[0457] (v)氰基、和

[0458] (w)硝基

[0459] 中的相同或不同的1～5个取代基取代，

[0460] R^{15}为多个时，各自独立地为C_{1-6}烷基，

[0461] R^{16}和R^{17}各自独立地为氢原子或C_{1-6}烷基，R^{16}或R^{17}为多个时，R^{16}或R^{17}分别任选相同或不同，其中，与同一氮原子键合的R^{16}和R^{17}均为C_{1-6}烷基时，它们任选与各自键合的氮原子一起形成3～8元的含氮饱和杂环，

[0462] R^{18}为氢原子或C_{1-6}烷基。

[0463] [项46]

[0464] 根据项44～45中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，R^1为氢原子、或被1～3个氟原子任选取代的C_{1-6}烷基。

[0465] [项47]

[0466] 根据项44～46中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，R^1为甲基。

[0467] [项48]

[0468] 根据项44～47中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，R^2为氢原子、卤素原子、氰基、-OR^3、C_{1-6}烷基、C_{3-10}环烷基、或3～10元的饱和杂环基。

[0469] [项49]

[0470] 根据项44～46中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，R^2为氰基。

[0471] [项50]

[0472] 根据项44～49中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^8为多个时,各自独立地为氢原子、卤素原子、氰基、-OR^9、-CO_2R^{10}、-$CONR^{11}R^{12}$、-$NR^{11}R^{12}$、-$NR^{13}COR^{10}$、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、氯原子、溴原子、羟基、苯基、5～6元的杂芳基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-7}环烷基、3～7元的饱和杂环基、-$CONR^{16}R^{17}$、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、C_{3-10}环烷基(该环烷基被选自氟原子、氯原子、溴原子、羟基、苯基、5～6元的杂芳基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-7}环烷基、3～7元的饱和杂环基、-$CONR^{16}R^{17}$、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、3～10元的饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氯原子、溴原子、羟基、苯基、5～6元的杂芳基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-7}环烷基、3～7元的饱和杂环基、-$CONR^{16}R^{17}$、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、苯基(该苯基被选自氟原子、氯原子、溴原子、羟基、苯基、5～6元的杂芳基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-7}环烷基、3～7元的饱和杂环基、-$CONR^{16}R^{17}$、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或5～6元的杂芳基(该杂芳基被选自氟原子、氯原子、溴原子、羟基、苯基、5～6元的杂芳基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-7}环烷基、3～7元的饱和杂环基、-$CONR^{16}R^{17}$、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)。

[0473] [项51]

[0474] 根据项44～50中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,L为

[0475] 单键、或

[0476] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)。

[0477] [项52]

[0478] 根据项44～51中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为

[0479] 单键、

[0480] C_{3-10}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或

[0481] 3～10元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)。

[0482] [项53]

[0483] 根据项44～52中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,W为单键、或

[0484] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)。

[0485] [项54]

[0486] 根据项44～53中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{14}为氢原子、

[0487] C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、

[0488] C_{3-10}环烷基(该环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或

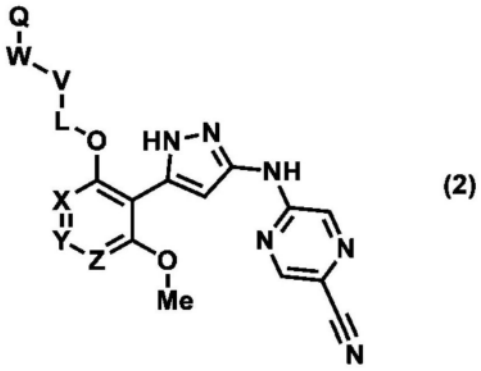
[0489] 3～10元的饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-

$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)。

[0490] [项55]

[0491] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其中,式(1)由下述式(2)所示:

[0492] [化7]

[0493] 

(2)

[0494] [式中,

[0495] X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子,其中,X、Y和Z不同时为CR^8,

[0496] R^8为多个时,各自独立地表示

[0497] 氢原子、

[0498] 氟原子、

[0499] 氯原子、

[0500] 溴原子、

[0501] C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、$-NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或

[0502] 5～6元的杂芳基(该杂芳基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、$-NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代),

[0503] L表示

[0504] 单键、或

[0505] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、$-NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0506] V表示

[0507] 单键、

[0508] C_{3-10}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、$-NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或

[0509] 3～10元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、$-NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0510] W表示

[0511] 单键、或

[0512] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、$-NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0513] Q表示氢原子、或NHR^{14},

[0514] R^{14}表示

[0515] 氢原子、

[0516] C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、

[0517] C_{3-10}环烷基(该环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或

[0518] 3～10元的饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0519] R^{16}和R^{17}各自独立地表示氢原子、或C_{1-6}烷基,R^{16}或R^{17}为多个时,R^{16}或R^{17}分别任选相同或不同,其中,与同一氮原子键合的R^{16}和R^{17}均为C_{1-6}烷基时,它们任选与各自键合的氮原子一起形成3～8元的含氮饱和杂环]。

[0520] [项56]

[0521] 根据项44～55中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,X、Y和Z中的1个或2个表示氮原子。

[0522] [项57]

[0523] 根据项44～56中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,X为氮原子,

[0524] Y和Z为CR^8。

[0525] [项58]

[0526] 根据项44～56中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Y为氮原子,

[0527] X和Z为CR^8。

[0528] [项59]

[0529] 根据项44～56中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Z为氮原子,

[0530] X和Y为CR^8。

[0531] [项60]

[0532] 根据项44～59中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^8为多个时,各自独立地表示氢原子、

[0533] 氟原子、

[0534] 氯原子、

[0535] 溴原子、或

[0536] C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、和C_{1-3}烷氧基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0537] [项61]

[0538] 根据项44～60中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,L为单键、或

[0539] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0540] [项62]

[0541] 根据项44～61中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为

[0542] 单键、

[0543] C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基任选取代的C_{1-3}烷

基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或

[0544] 3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0545] [项63]

[0546] 根据项44～62中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,W为单键、或

[0547] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0548] [项64]

[0549] 根据项44～63中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{14}为氢原子、或

[0550] C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0551] [项65]

[0552] 根据项44～64中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Q为

[0553] 氢原子、

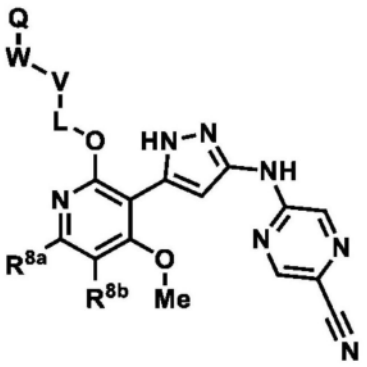
[0554] NH_2、或

[0555] NHMe。

[0556] [项66]

[0557] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其中,式(1)由下述式(3)所示:

[0558] [化8]

[0559] 

(3)

[0560] [式中,

[0561] R^{8a}和R^{8b}各自独立地表示氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基,

[0562] L表示单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-6}亚烷基,

[0563] V表示

[0564] 单键、

[0565] C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或

[0566] 3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0567] W表示

[0568] 单键、或

[0569] 被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0570] Q为氢原子或NH_2]。

[0571] [项67]

[0572] 根据项66所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{8a}和R^{8b}各自独立地为氢原子、氟原子或氯原子。

[0573] [项68]

[0574] 根据项66所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{8a}和R^{8b}各自独立地为氢原子、或氯原子。

[0575] [项69]

[0576] 根据项66～68中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,L为C_{1-3}亚烷基。

[0577] [项70]

[0578] 根据项66～69中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为单键。

[0579] [项71]

[0580] 根据项66～70中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为C_{3-7}亚环烷基。

[0581] [项72]

[0582] 根据项66～71中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,W为单键。

[0583] [项73]

[0584] 根据项66～71中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,W为C_{1-3}亚烷基。

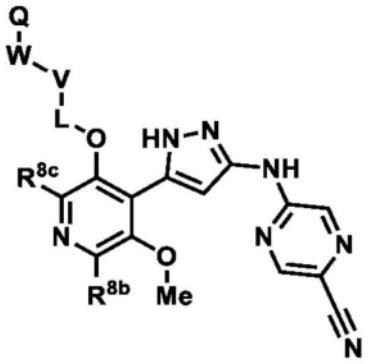
[0585] [项74]

[0586] 根据项66～73中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Q为NH_2。

[0587] [项75]

[0588] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其中,式(1)由下述式(4)所示:

[0589] [化9]

[0590] 

(4)

[0591] [式中,

[0592] R^{8b}和R^{8c}各自独立地表示氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基,

[0593] L表示

[0594] 单键、或

[0595] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代),

[0596] V表示

[0597] 单键、

[0598] C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或

[0599] 3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1～3个羟基和氟原子任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0600] W表示

[0601] 单键、或

[0602] 被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基，

[0603] Q为氢原子、NH_2、或NHMe]。

[0604] [项76]

[0605] 根据项75所述的治疗剂和/或预防剂，其中，R^{8b}和R^{8c}为氢原子。

[0606] [项77]

[0607] 根据项75或76中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，L为单键、或

[0608] 被1个羟基或氟原子任选取代的C_{1-6}亚烷基。

[0609] [项78]

[0610] 根据项75～77中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，V为

[0611] 单键、

[0612] C_{3-7}亚环烷基、或

[0613] 3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)。

[0614] [项79]

[0615] 根据项75～78中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，W为

[0616] 单键、或

[0617] C_{1-3}亚烷基。

[0618] [项80]

[0619] 根据项75～79中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为氢原子。

[0620] [项81]

[0621] 根据项75～79中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为NH_2。

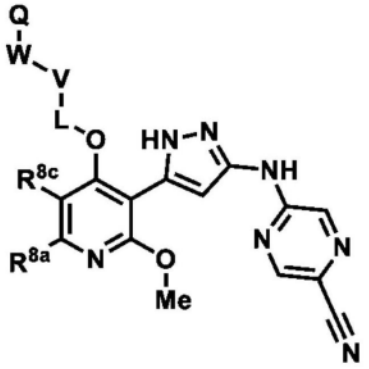
[0622] [项82]

[0623] 根据项75～79中任一项所述的治疗剂和/或预防剂，其中，Q为NHMe。

[0624] [项83]

[0625] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂，其中，式(1)由下述式(5)所示：

[0626] [化10]

[0627] 

(5)

[0628] [式中，

[0629] R^{8a}和R^{8c}各自独立地表示氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基，

[0630] L表示单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-6}亚烷基，

[0631] V表示

[0632] 单键、

[0633] C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或

[0634] 3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1个羟基任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0635] W表示

[0636] 单键、或

[0637] 被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0638] Q为氢原子、或NH_2]。

[0639] [项84]

[0640] 根据项83所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{8a}和R^{8c}为氢原子。

[0641] [项85]

[0642] 根据项83或84中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,L为被1个羟基任选取代的C_{1-6}亚烷基。

[0643] [项86]

[0644] 根据项83～85中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为

[0645] 单键、

[0646] C_{3-7}亚环烷基或

[0647] 3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自羟基、和被1个羟基任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)。

[0648] [项87]

[0649] 根据项83～86中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,W为单键、或

[0650] C_{1-3}亚烷基。

[0651] [项88]

[0652] 根据项83～87中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Q为氢原子。

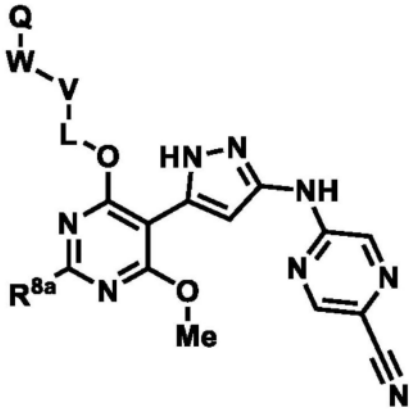
[0653] [项89]

[0654] 根据项83～87中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Q为NH_2。

[0655] [项90]

[0656] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其中,式(1)由下述式(6)所示:

[0657] [化11]

[0658] 

(6)

[0659] [式中,

[0660] R^{8a}表示氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基,

[0661] L表示

[0662] 单键、或

[0663] C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代),

[0664] V表示

[0665] 单键、

[0666] C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或

[0667] 3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基和被1～3个氟原子任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0668] W表示

[0669] 单键、或

[0670] 被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0671] Q为氢原子、NH_2、或NHMe]。

[0672] [项91]

[0673] 根据项90所述的治疗剂和/或预防剂,其中,R^{8a}为氢原子。

[0674] [项92]

[0675] 根据项90或项91中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,L为C_{1-4}亚烷基。

[0676] [项93]

[0677] 根据项90～92中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,V为

[0678] 单键、或

[0679] C_{3-7}亚环烷基。

[0680] [项94]

[0681] 根据项90～93中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,,其中,W为单键、或

[0682] C_{1-3}亚烷基。

[0683] [项95]

[0684] 根据项90～94中任一项所述的治疗剂和/或预防剂,其中,Q为NH_2。

[0685] [项96]

[0686] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有选自以下的化合物中的化合物或其制药学可接受的盐:

[0687] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0688] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-6-氯-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0689] 5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0690] 5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-2-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0691] 5-[(5-{3-[(3-氟氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-

基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0692] 5-[(5-{2-甲氧基-4-[(3-甲基氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]吡啶-3-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0693] 5-[(5-{4-[(3-羟基氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]-2-甲氧基吡啶-3-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0694] 5-{[5-(4-{[3-(羟基甲基)氮杂环丁烷-3-基]甲氧基}-2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0695] 5-[(5-{3-[(3R)-3-氨基丁氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0696] 5-[(5-{3-[(3S)-3-氨基丁氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0697] 5-{[5-(3-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0698] 5-[(5-{3-甲氧基-5-[(吗啉-2-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0699] 5-[(5-{3-甲氧基-5-[(吗啉-2-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0700] 5-[(5-{3-[(2S)-3-氨基-2-羟基丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0701] N-{5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}-5-氯吡嗪-2-胺、

[0702] N-{5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}-5-(三氟甲基)吡嗪-2-胺、

[0703] 5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-6-甲氧基嘧啶-5-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0704] 5-({5-[3-(氮杂环丁烷-3-基)甲氧基-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0705] 5-{[5-(3-{[(1R,3S)-3-氨基环己基]氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0706] (S)-5-[(5-{3-[(3-氟吡咯烷-3-基)甲氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0707] (S)-5-[(5-{3-甲氧基-[5-(吡咯烷-3-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0708] (R)-5-[(5-{3-[(3-氟吡咯烷-3-基)甲氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0709] 5-{[5-(4-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-6-甲氧基嘧啶--基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0710] 5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-(氟甲氧基)吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0711] 5-[(5-{3-甲氧基-5-[(3-甲基氮杂环丁烷-3-基)甲氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0712] 5-{[5-(3-{[3-(二氟甲基)氮杂环丁烷-3-基]甲氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0713] 5-[(5-{3-[(2S)-3-氨基-2-甲基丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0714] 5-[(5-{3-[(2R)-3-氨基-2-甲基丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0715] 5-[(5-{3-[(2S)-3-氨基-2-氟丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0716] 5-[(5-{3-[(2R)-3-氨基-2-氟丙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0717] 5-[(5-{3-甲氧基-5-[3-(甲基氨基)丙氧基]吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0718] 5-{[5-(3-{[(1R,3R)-3-氨基环戊基]氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0719] 5-[(5-{3-[(1R)-1-(氮杂环丁烷-3-基)乙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0720] 5-[(5-{3-[(1R)-1-(3-羟基氮杂环丁烷-3-基)乙氧基]-5-甲氧基吡啶-4-基}-1H-吡唑-3-基)氨基]吡嗪-2-甲腈、

[0721] 5-{[5-(3-甲氧基-5-{[(1R,3R)-3-(甲基氨基)环戊基]氧基}吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0722] 5-{[5-(3-{[(1R,2S,4S,5S)-4-氨基双环[3.1.0]己烷-2-基]氧基}-5-甲氧基吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0723] 5-{[5-(2-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-4-甲氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈、

[0724] 5-{[5-(4-{[1-(氨基甲基)环丙基]甲氧基}-2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-3-基]氨基}吡嗪-2-甲腈。

[0725] [项97]

[0726] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有选自以下的化合物中的化合物或其制药学可接受的盐:

[0727] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0728] 5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈、

[0729] 5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-2-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

[0730] [项98]

[0731] 项44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有以下的化合物或其制药学可接受的盐:

[0732] 5-({5-[4-(3-氨基丙氧基)-2-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

[0733] [项99]

[0734] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有以下的化合物或其制药学可接受的盐:

[0735] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

[0736] [项100]

[0737] 根据项44所述的治疗剂和/或预防剂,其含有以下的化合物或其制药学可接受的盐:

[0738] 5-({5-[3-(3-氨基丙氧基)-5-甲氧基吡啶-4-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈。

[0739] 发明效果

[0740] 根据本公开,可提供含有CHK1抑制剂、或包封有CHK1抑制剂的脂质体作为有效成分的对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的治疗剂和/或预防剂。进而,对前述抑制剂或脂质体并用免疫检查点抑制剂时,与单剂相比示出优异的抗肿瘤效果。此外,前述抑制剂、前述脂质体、或它们与免疫检查点抑制剂的并用也示出已缓解的癌症的复发预防效果。

[0741] 根据本公开,可提供包含5-杂芳基-1H-吡唑-3-胺衍生物或其制药学可接受的盐的CHK1抑制剂。本公开的化合物兼具优异的CHK1抑制活性和高安全性。通过包封于脂质体、并从脂质体中缓慢释放,由此可持续作用于癌症,示出强效的抗肿瘤效果。本公开的化合物作为CHK1参与的疾病的治疗药有用,具体而言,能适用于胰腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、尤文肉瘤、软骨肉瘤、或软组织肉瘤等患者。

[0742] 本公开中,与5-苯基-1H-吡唑-3-胺衍生物即普瑞色替(Prexasertib)相比,普瑞色替虽然在对卵巢癌症患者的2期试验中示出药理作用,但并未实现根据非临床试验推测的持续暴露72小时的药效最大化,与此相对,本公开的化合物或其盐能进一步对其进行改善。并且,在单次施用时,与因高最高血中浓度而发生副作用的普瑞色替相比,本公开的化合物或盐没有这样的副作用。三天的连续施用时,与长时间的药物暴露而导致发生副作用相比,本公开的化合物或盐未发现这样的副作用(非专利文献3、非专利文献6)。另外,本申请发明人等新发现普瑞色替具有肝毒性的风险,本申请发明的化合物可降低该肝毒性的风险。综上,本公开的化合物兼具优异的CHK1抑制活性和高安全性。

[0743] 特别是,式(3)所示的具有在特定的位置具有氮原子的吡啶环的化合物具备在兼具高抗肿瘤活性和安全性的同时,具有优异的药代动力学的特征。

[0744] 特别是,式(3)所包含的实施例1的化合物与普瑞色替相比,具有下述特征,示出高CHK1抑制活性,具有强效的细胞增殖抑制效果,同时兼具高安全性。进而,实施例1的化合物在示出良好的药代动力学的同时,具有可有效被封入脂质体的特征。实施例1的化合物的脂质体制剂具有优异的抗肿瘤效果的同时,具有高安全性,通过与已知的抗癌剂并用,可进一步发挥更特异的抗肿瘤效果。

附图说明

[0745] [图1]示出实施例39的化合物的I型的粉末X线衍射图。横轴表示衍射角2θ(°),纵轴表示计数(以下,图2～图6也相同)。

[0746] [图2]示出实施例40的化合物的II型的粉末X线衍射图。

[0747] [图3]示出实施例41的化合物的III型的粉末X线衍射图。

[0748] [图4]示出实施例42的化合物的IV型的粉末X线衍射图。

[0749] [图5]示出实施例43的化合物的V型的粉末X线衍射图。

[0750] [图6]示出实施例44的化合物的VI型的粉末X线衍射图。

[0751] [图7]图7是针对试验例11的试验A、普瑞色替的溶液制剂或脂质体制剂的使用ES-2荷癌小鼠示出肿瘤PD应答作用的图。PD应答是通过蛋白印迹检测γH2AX和微管蛋白的表达量,将各条带强度通过ImageJ软件进行定量,将γH2AX的表达量根据微管蛋白的表达量算出相对值,由此进行评价。纵轴表示γH2AX的相对值。

[0752] [图8]图8是针对试验例11的试验B、普瑞色替的溶液制剂或实施例1的脂质体制剂的使用ES-2荷癌小鼠示出肿瘤PD应答作用的图。PD应答是通过蛋白印迹检测γH2AX和微管蛋白的表达量,将各条带强度通过ImageJ软件进行定量,将γH2AX的表达量根据微管蛋白的表达量算出相对值,由此进行评价。纵轴表示γH2AX的相对值。

[0753] [图9]图9是针对试验例11的试验C、实施例1的脂质体制剂的使用ES-2荷癌小鼠示出肿瘤PD应答作用的图。PD应答是通过蛋白印迹检测γH2AX和微管蛋白的表达量,将各条带强度通过ImageJ软件进行定量,将γH2AX的表达量根据微管蛋白的表达量算出相对值,由此进行评价。纵轴表示γH2AX的相对值。

[0754] [图10]图10是示出抗PD-1抗体和实施例1的脂质体制剂的施用方案例的图。实施例1的脂质体制剂是在与抗PD-1抗体同时施用后,然后以1周/次(A1)、2周/次(A2)、3周/次(A3)、4周/次(A4)或5周/次(A5)施用。抗PD-1抗体在与实施例1同时施用后,根据各个方案以2周/次(B1)、3周/次(B2)、4周/次(B3)或6周/次(B4)施用。即,实施例1和抗PD-1抗体可根据选择它们的任意组合的施用方案进行施用。优选举出A1和B1、A1和B2、A1和B3、A1和B4、A1和B5、A2和B1、A2和B2、A2和B3、A2和B4、A2和B5、A3和B1、A3和B2、A3和B3、A3和B4、A3和B5、A4和B1、A4和B2、A4和B3、A4和B4、A4和B5、A5和B1、A5和B2、A5和B3、A5和B4、A5和B5的施用方案的组合。

[0755] [图11]图11是示出试验例28的试验、实施例1的脂质体制剂的CD8阳性T细胞的各克隆量的细胞数和TCR库的克隆型的图。

[0756] [图12]图12是示出试验例28的试验、实施例1的脂质体制剂的CD8评分的图。

[0757] [图13]图13是示出试验例28的试验、实施例1的脂质体制剂的M1-M2比的图。

[0758] [图14]图14是示出基于试验例34的试验、实施例1处理得到的ssDNA的表达量的图。

具体实施方式

[0759] 以下,进一步详细说明本公开。应当理解,在整个本说明书中,除非另有说明,否则单数形式的表现也包括其复数形式的概念。所以,应当理解,除非另有说明,否则单数形式的冠词(例如,英语情况中的“a(一个)”、“an(一种)”、“the(该)”等)也包括其复数形式的概

念。此外,应当理解,除非另有说明,否则本说明书中使用的术语以该领域中通常使用的含义使用。因此,除非另有定义,否则本说明书中使用的所有专业术语和科学技术术语具有与本公开所属领域的本领域技术人员通常所理解的相同的含义。发生矛盾时,以本说明书(包括定义)为准。

[0760] 以下对本说明书中的术语进行说明。

[0761] 本说明书中,用“任选取代”定义的基团中的取代基的数目只要可以取代则没有特别限制。此外,除非另外特别说明,否则对各基团的说明也适用于该基团为其它基团的一部分或取代基的情况。

[0762] “卤素原子”可举出例如氟原子、氯原子、溴原子、或碘原子等。优选为氟原子或氯原子。

[0763] “C_{1-6}烷基”是指碳原子数为1~6的烷基,“C_6烷基”是指碳原子数为6的烷基。其它数字的情况也相同。

[0764] “C_{1-6}烷基”是指碳原子数为1~6的直链状或支链状的饱和烃基。作为C_{1-6}烷基,优选列举“C_{1-4}烷基”,更优选列举“C_{1-3}烷基”。作为“C_{1-3}烷基”的具体例,例如可举出甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基等。作为“C_{1-4}烷基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-3}烷基”的具体例所举出的那些之外,而且可举出丁基、1,1-二甲基乙基、1-甲基丙基、2-甲基丙基等。作为“C_{1-6}烷基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-4}烷基”的具体例所举出的那些之外,而且可举出戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、4-甲基戊基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、己基等。

[0765] “C_{2-6}烯基”是指具有2~6个碳原子、含有1~3个双键的直链状或支链状的不饱和烃基。作为“C_{2-6}烯基”,优选列举“C_{2-4}烯基”。作为“C_{2-4}烯基”的具体例,例如可以举出乙烯基、丙烯基、甲基丙烯基、丁烯基等。作为“C_{2-6}烯基”的具体例,例如除了作为前述“C_{2-4}烯基”的具体例所列举的那些之外,而且可以列举戊烯基、己烯基等。

[0766] “C_{2-6}炔基”是指具有2~6个碳原子、含有1个三键的直链状或支链状的不饱和烃基。作为“C_{2-6}炔基”,优选列举“C_{2-4}炔基”。作为“C_{2-4}炔基”的具体例,例如可以举出丙炔基、甲基丙炔基、丁炔基等。作为“C_{2-6}炔基”的具体例,例如除了作为前述“C_{2-4}炔基”的具体例所列举的那些之外,而且可以列举甲基丁炔基、戊炔基、己炔基等。

[0767] “C_{1-6}烷氧基”是指“C_{1-6}烷基氧基”,“C_{1-6}烷基”部分与前述“C_{1-6}烷基”同义。作为“C_{1-6}烷氧基”,优选举出“C_{1-4}烷氧基”,更优选举出“C_{1-3}烷氧基”。作为“C_{1-3}烷氧基”的具体例,例如可以举出甲氧基、乙氧基、丙氧基、1-甲基乙氧基等。作为“C_{1-4}烷氧基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-3}烷氧基”的具体例所列举的那些之外,而且可以举出丁氧基、1,1-二甲基乙氧基、1-甲基丙氧基、2-甲基丙氧基等。作为“C_{1-6}烷氧基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-4}烷氧基”的具体例所举出的那些之外,而且可举出戊氧基、1,1-二甲基丙氧基、1,2-二甲基丙氧基、1-甲基丁氧基、2-甲基丁氧基、4-甲基戊氧基、3-甲基戊氧基、2-甲基戊氧基、1-甲基戊氧基、己氧基等。

[0768] “C_{1-6}烷基硫基”的“C_{1-6}烷基”部分与前述“C_{1-6}烷基”含义相同。作为“C_{1-6}烷基硫基”,优选可举出“C_{1-4}烷基硫基”,更优选可举出“C_{1-3}烷基硫基”。作为“C_{1-3}烷基硫基”的具体例,可举出例如甲基硫基、乙基硫基、丙基硫基、1-甲基乙基硫基等。作为“C_{1-4}烷基硫基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-3}烷基硫基”的具体例所举出的那些之外,还可举出丁基硫

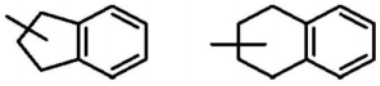
基、1,1-二甲基乙基硫基、1-甲基丙基硫基、2-甲基丙基硫基等。作为“C_{1-6}烷基硫基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-4}烷基硫基”的具体例所举出的那些之外,还可举出戊基硫基、1,1-二甲基丙基硫基、1,2-二甲基丙基硫基、1-甲基丁基硫基、2-甲基丁基硫基、4-甲基戊基硫基、3-甲基戊基硫基、2-甲基戊基硫基、1-甲基戊基硫基、己基硫基等。

[0769] “C_{1-6}亚烷基”是指具有碳原子数1～6个的直链状或支链状的2价饱和烃基。作为“C_{1-6}亚烷基”,优选可举出“C_{1-4}亚烷基”,更优选可举出“C_{1-3}亚烷基”。作为“C_{1-3}亚烷基”的具体例,可举出例如亚甲基、亚乙基、亚丙基等。作为“C_{1-4}亚烷基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-3}亚烷基”的具体例所举出的那些之外,还可举出亚丁基、1,1-二甲基亚乙基、1,2-二甲基亚乙基、1-甲基三亚甲基、2-甲基三亚甲基等。作为“C_{1-6}亚烷基”的具体例,例如除了作为前述“C_{1-4}亚烷基”的具体例所举出的那些之外,还可举出亚戊基、1,1-二甲基三亚甲基、1,2-二甲基三亚甲基、1-甲基亚丁基、2-甲基亚丁基、1-甲基亚戊基、2-甲基亚戊基、3-甲基亚戊基、亚己基等。

[0770] “C_{3-10}环烷基”是指碳原子数3～10的环状的饱和烃基,还包括具有一部分不饱和键的那些以及桥联结构的那些。作为“C_{3-10}环烷基”,优选可举出“C_{3-7}环烷基”。作为“C_{3-7}环烷基”的具体例,可举出例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基等。作为“C_{3-10}环烷基”的具体例,例如除了作为前述“C_{3-7}环烷基”的具体例所举出的那些之外,还可举出环辛基、环壬基、环癸基、金刚烷基等。

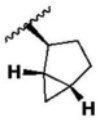
[0771] 此外,“C_{3-10}环烷基”还包含前述C_{3-10}环烷基与芳香族烃环稠合而成的二环式的基团。该稠合而成的化合物的具体例可举出例如下述所示的结构等。

[0772] [化12]

[0773] 

[0774] 上述桥联结构的具体例可举出例如下述所示的结构等。

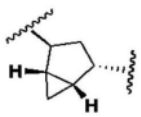
[0775] [化13]

[0776] 

[0777] “C_{3-10}亚环烷基”是指碳原子数3～10的环状的2价饱和烃基,还包括具有一部分不饱和键的那些以及桥联结构的那些。作为“C_{3-10}亚环烷基”,优选可举出“C_{3-7}亚环烷基”。作为“C_{3-7}亚环烷基”的具体例,可举出例如亚环丙基、亚环丁基、亚环戊基、亚环己基、亚环庚基等。作为“C_{3-10}环烷基”的具体例,例如除了作为前述“C_{3-7}环烷基”的具体例所举出的那些之外,还可举出亚环辛基、亚环壬基、亚环癸基、亚金刚烷基等。

[0778] 上述桥联结构的具体例可举出例如下述所示的结构等。

[0779] [化14]

[0780] 

[0781] “3～10元的饱和碳环”是指碳原子数3～10的环状的饱和烃。作为“3～10元的饱和碳环”,优选可举出“4～6元的饱和碳环”。作为“4～6元的饱和碳环”的具体例,可举出例如

环丁烷环、环戊烷环、环己烷环等。作为“3～10元的饱和碳环”的具体例，例如除了作为前述“4～6元的饱和碳环”的具体例所举出的那些之外，还可举出环丙烷环、环庚烷环、环辛烷、环壬烷、环癸烷等。

[0782] “3～10元的饱和杂环基”是指由独立地选自氮原子、氧原子和硫原子中的1～2个原子与2～9个碳原子构成的1价饱和杂环基，还包括具有一部分不饱和键的那些以及桥联结构的那些。构成环的原子可包含如-C(O)-、-S(O)-、-SO_2-这样被氧化了的原子。作为“3～10元的饱和杂环基”，优选可举出“4～7元的单环式的饱和杂环基”。作为“4～7元的单环式的饱和杂环基”的具体例，可举出例如氧杂环丁烷基、氮杂环丁烷基、四氢呋喃基、吡咯烷基、咪唑烷基、哌啶基、吗啉基、硫代吗啉基、二氧代硫代吗啉基、六亚甲基亚氨基、噁唑烷基、噻唑烷基、氧代咪唑烷基、二氧代咪唑烷基、氧代噁唑烷基、二氧代噁唑烷基、二氧代噻唑烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基等。作为“3～10元的饱和杂环基”，例如除了作为前述“4～7元的单环式的饱和杂环基”的具体例所举出的那些之外，而且可举出环氧乙烷基、吖丙啶基等。

[0783] 此外，“3～10元的饱和杂环基”中还包含前述3～10元的饱和杂环基与6元的芳香族烃环或6元的芳香族杂环形成稠环而得的二环式的“3～10元的饱和杂环基”。作为形成了稠环的6元的芳香族烃环，可举出苯环等。作为形成了稠环的6元的芳香族杂环，可举出吡啶、嘧啶、哒嗪等。作为形成了稠环的二环式的“3～10元的饱和杂环基”的具体例，可举出二氢吲哚基、二氢异吲哚基、二氢嘌呤基、二氢噻唑并嘧啶基、二氢苯并二噁烷基、异吲哚基、吲唑基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、四氢萘啶基等。

[0784] “3～8元的含氮饱和杂环”是指由1个氮原子与2～7个碳原子构成的饱和杂环。作为“3～8元的含氮饱和杂环”，优选可举出“4～6元的含氮饱和杂环”。作为“4～6元的含氮饱和杂环”的具体例，可举出例如氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环等。作为“3～8元的含氮饱和杂环”的具体例，例如除了作为前述“4～6元的含氮饱和杂环”的具体例所举出的那些之外，而且可举出氮丙啶环、氮杂环庚烷环、氮杂环辛烷环等。

[0785] “3～10元的二价饱和杂环基”是指由独立地选自氮原子、氧原子和硫原子中的1～2个原子与2～9个碳原子构成的2价饱和杂环基，还包含具有一部分不饱和键的那些和桥联结构的那些。构成环的原子可包含如-C(O)-、-S(O)-、-SO_2-这样被氧化了的原子。作为“3～10元的饱和杂环基”，优选可举出“4～7元的单环式饱和杂环基”。作为“4～7元的单环式饱和杂环基”的具体例，可举出例如亚氧杂环丁烷基、亚氮杂环丁烷基、亚四氢呋喃基、亚吡咯烷基、亚咪唑烷基、亚哌啶基、亚吗啉基、亚硫代吗啉基、亚二氧代硫代吗啉基、亚六亚甲基亚胺基、亚噁唑烷基、亚噻唑烷基、亚氧代咪唑烷基、亚二氧代咪唑烷基、亚噁唑烷基、亚二氧代噁唑烷基、亚二氧代噻唑烷基、亚四氢呋喃基、亚四氢吡喃基等。作为“3～10元的饱和杂环基”，例如除了作为前述“4～7元的单环式饱和杂环基”的具体例所举出的那些之外，而且可举出亚氧杂环丙烷基、亚氮杂环丙烷基等。

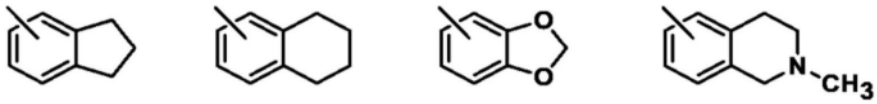
[0786] 此外，“3～10元的饱和杂环基”中还包含前述3～10元的饱和杂环基与6元的芳香族烃环或6元的芳香族杂环形成稠环而得的二环式的“3～10元的饱和杂环基”。作为形成了稠环的6元的芳香族烃环，可举出苯环等。作为形成了稠环的6元的芳香族杂环，可举出吡啶、嘧啶、哒嗪等。作为形成了稠环的二环式的“3～10元的饱和杂环基”的具体例，可举出亚二氢吲哚基、亚二氢异吲哚基、亚二氢嘌呤基、亚二氢噻唑并嘧啶基、亚二氢苯并二噁烷基、

亚异吲哚基、亚吲唑基、亚四氢喹啉基、亚四氢异喹啉基、亚四氢萘啶基等。

[0787] “C_{6-10}芳基”是指碳原子数为6～10的芳香族烃环基。作为“C_{6-10}芳基”的具体例，可举出例如苯基、1-萘基、2-萘基等。优选可举出苯基。

[0788] 此外，“C_{6-10}芳基”中还包含前述C_{6-10}芳基与C_{4-6}环烷基或5～6元的饱和杂环形成稠环而得的二环式的“C_{6-10}芳基”。作为形成了稠环的二环式的“C_{6-10}芳基”的具体例，可举出例如下述所示的基团等。

[0789] [化15]

[0790] 

[0791] “芳香族烃环”是指上述“C_{6-10}芳基”的环部分。

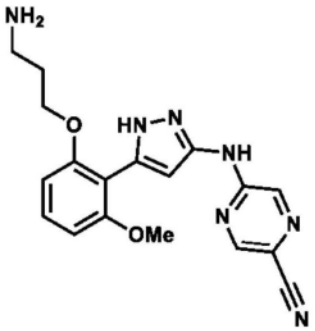
[0792] “5～12元的杂芳基”是指包含独立地选自氮原子、氧原子和硫原子中的1～4个原子的单环式的5～7元的芳香族杂环的环状基、或二环式的8～12元的芳香族杂环的环状基。优选为“5～7元的单环式的杂芳基”。更优选为吡啶基、嘧啶基、喹啉基或异喹啉基。进一步优选为吡啶基。作为“5～7元的单环式的杂芳基”的具体例，可举出例如吡啶基、哒嗪基、异噻唑基、吡咯基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、咪唑基、嘧啶基、噻二唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、噁二唑基、三唑基、四唑基等。作为“5～12元的杂芳基”的具体例，除了作为前述“5～7元的单环式的杂芳基”的具体例所举出的那些基团之外，还可举出吲哚基、吲唑基、苯并吡喃基、喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并异噁唑基、苯并异噻唑基、苯并三唑基、苯并咪唑基等。

[0793] “芳香族杂环”是指上述“5～12元的杂芳基”的环部分。

[0794] “癌症”和“肿瘤”在本公开中含义相同，均是指恶性肿瘤，并且包含癌症、肉瘤和血液恶性肿瘤。作为“癌症”或“肿瘤”的具体例，可举出例如急性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、恶性淋巴瘤、浆细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、脑肿瘤、头颈癌、食道癌、甲状腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤·胸腺癌、乳腺癌、胃癌、胆囊·胆管癌、肝癌、肝细胞癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胃肠道间质瘤、绒毛膜上皮癌、子宫体癌、宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肾癌、肾细胞癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、肾母细胞肿瘤、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、尤文肉瘤、软骨肉瘤、软组织肉瘤、或皮肤癌等。

[0795] 普瑞色替是指具有下述的结构的化合物。

[0796] [化16]

[0797] 

[0798] 式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)所示的本公开的化合物中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、

R^{8a}、R^{8b},R^{8c}、R^{9}、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16},R^{17}、R^{18}、X、Y、Z、L、V、W、Q和Y的优选方式如以下所述,但本公开的技术范围不限定于下述列举的化合物的范围。

[0799] 作为R^{1}的优选方式,可举出被1～3个氟原子任选取代的C_{1-6}烷基。

[0800] 作为R^{1}的更优选方式,可举出被1～3个氟原子任选取代的甲基、或乙基。

[0801] 作为R^{1}的进一步优选方式,可举出被1～3个氟原子任选取代的甲基。

[0802] 作为R^{1}的进一步更优选方式,可举出甲基。

[0803] 作为R^{2}的优选方式,可举出氢原子、卤素原子、氰基、-OR^{3}、被1～3个卤素原子任选取代的C_{1-6}烷基、C_{3-10}环烷基、或3～10元的饱和杂环基。

[0804] 作为R^{2}的更优选方式,可举出氢原子、卤素原子、氰基或被1～3个卤素原子任选取代的C_{1-6}烷基。

[0805] 作为R^{2}的进一步优选方式,可举出卤素原子、氰基或被1～3个卤素原子任选取代的C_{1-6}烷基。

[0806] 作为R^{2}的进一步更优选方式,可举出氰基。

[0807] 作为R^{3}的优选方式,可举出氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0808] 作为R^{3}的更优选方式,可举出C_{1-6}烷基。

[0809] 作为R^{3}的进一步优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0810] 作为R^{3}的进一步更优选方式,可举出甲基。

[0811] 作为R^{4}的优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0812] 作为R^{4}的更优选方式,可举出甲基。

[0813] 作为R^{5}、R^{6}和R^{7}的优选方式,可举出氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0814] 作为R^{5}、R^{6}和R^{7}的更优选方式,可举出C_{1-6}烷基。

[0815] 作为R^{5}、R^{6}和R^{7}的进一步优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0816] 作为R^{5}、R^{6}和R^{7}的进一步更优选方式,可举出甲基。

[0817] 作为R^{8}的优选方式,可举出氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或5～6元的杂芳基(该杂芳基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0818] 作为R^{8}的更优选方式,可举出氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0819] 作为R^{8}的进一步优选方式,可举出氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基。

[0820] 作为R^{8}的进一步更优选方式,可举出氢原子、或氯原子。

[0821] 作为R^{8a}、R^{8b}和R^{8c}的优选方式,可举出氢原子、氟原子、氯原子、溴原子。

[0822] 作为R^{8a}、R^{8b}和R^{8c}的更优选方式,可举出氢原子、氯原子。

[0823] 作为R^{8a}、R^{8b}和R^{8c}的进一步优选方式,可举出氢原子。

[0824] 作为R^{9}的优选方式,可举出氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0825] 作为R^{9}的更优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0826] 作为R^{9}的进一步优选方式,可举出甲基。

[0827] 作为R^{10}的优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0828] 作为R^{10}的进一步优选方式,可举出甲基。

[0829] 作为R^{11}、R^{12}和R^{13}的优选方式,可举出氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0830] 作为R^{11}、R^{12}和R^{13}的更优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0831] 作为R^{11}、R^{12}和R^{13}的进一步优选方式,可举出甲基。

[0832] 作为R^{14}的优选方式,可举出氢原子、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1~3个取代基任选取代)、C_{3-10}环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1~3个取代基任选取代)、或3~10元的饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1~3个取代基任选取代)。

[0833] 作为R^{14}的更优选方式,可举出氢原子、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1~3个取代基任选取代)。

[0834] 作为R^{14}的进一步优选方式,可举出氢原子、或C_{1-3}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代)。

[0835] 作为R^{14}的进一步更优选方式,可举出氢原子、或甲基。

[0836] 作为R^{15}的优选方式,可举出C_{1-6}烷基。

[0837] 作为R^{15}的更优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0838] 作为R^{15}的进一步优选方式,可举出甲基。

[0839] 作为R^{16}和R^{17}的优选方式,可举出氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0840] 作为R^{16}和R^{17}的更优选方式,可举出C_{1-6}烷基。

[0841] 作为R^{16}和R^{17}的进一步优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0842] 作为R^{16}和R^{17}的进一步更优选方式,可举出甲基。

[0843] 作为R^{18}的优选方式,可举出氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0844] 作为R^{18}的更优选方式,可举出C_{1-6}烷基。

[0845] 作为R^{18}的进一步优选方式,可举出C_{1-3}烷基。

[0846] 作为R^{18}的进一步更优选方式,可举出甲基。

[0847] 作为X、Y和Z的优选方式,可举出CR^8、或氮原子。本公开中,提及本公开的化合物或制药学可接受的盐时,X、Y和Z不同时为CR^8。

[0848] 作为X、Y和Z的另外的优选方式,可举出X、Y和Z中的1个或2个表示氮原子。

[0849] 作为X、Y和Z的另外的优选方式,可举出X为CR^8、Y和Z为氮原子。

[0850] 作为X、Y和Z的进一步的另外的优选方式,可举出Y为CR^8、X和Z为氮原子。

[0851] 作为X、Y和Z的进一步的不同的优选方式,可举出Z为CR^8、X和Y为氮原子。

[0852] 作为L的优选方式,可举出单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1~3个取代基任选取代)。

[0853] 作为L的更优选方式,可举出单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代)。

[0854] 作为L的进一步优选方式,可举出单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子和羟基中的1个取代基任选取代)。

[0855] 作为L的进一步更优选方式,可举出单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-6}亚烷基。

[0856] 作为V的优选方式,可举出单键、C_{3-10}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、

C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或3～10元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)。

[0857] 作为V的更优选方式,可举出单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基任选取代的C_{1-3}烷基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0858] 作为V的进一步优选方式,可举出单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基和被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基和被1～2个羟基任选取代的C_{1-3}烷基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)。

[0859] 作为V的进一步更优选方式,可举出单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或3～7元的二价饱和杂环基(该3～7元的饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)。

[0860] 作为W的优选方式,可举出单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)。

[0861] 作为W的更优选方式,可举出单键、或C_{1-3}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代)。

[0862] 作为W的进一步优选方式,可举出单键、或C_{1-3}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子和羟基中的1个取代基任选取代)。

[0863] 作为W的进一步更优选方式,可举出单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基。

[0864] 作为Q的优选方式,可举出氢原子、或NHR^{14}。

[0865] 作为Q的更优选方式,可举出氢原子、NH_2、或NHMe。

[0866] 作为Q的进一步优选方式,可举出氢原子、或NH_2。

[0867] 作为Q的进一步更优选方式,可举出氢原子。

[0868] 作为Q的另外的进一步更优选方式,可举出NH_2。

[0869] 作为式(1)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(A)。

[0870] (A)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0871] R^1为被1～3个氟原子任选取代的甲基、或乙基,

[0872] R^2为氢原子、卤素原子、氰基、-OR^3、被1～3个卤素原子任选取代的C_{1-6}烷基、C_{3-10}环烷基、或3～10元的饱和杂环基,

[0873] R^3为氢原子、或C_{1-6}烷基,

[0874] X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子,其中,X、Y和Z不同时为CR^8,

[0875] R^8为氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或5～6元的杂芳基(该杂芳基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代),

[0876] L为单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0877] V为单键、C_{3-10}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或3～10元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0878] W为单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0879] Q为氢原子、或NHR^{14},

[0880] R^{14}为氢原子、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、C_{3-10}环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或3～10元的饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0881] R^{16}和R^{17}为氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0882] 作为式(1)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(B)。

[0883] (B)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0884] R^1为被1～3个氟原子任选取代的甲基,

[0885] R^2为卤素原子、氰基、或被1～3个卤素原子任选取代的C_{1-6}烷基,

[0886] X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子,其中,X、Y和Z不同时为CR^8,

[0887] R^8为氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基,

[0888] L为单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0889] V为单键、C_{3-10}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或3～10元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0890] W为单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0891] Q为氢原子、或NHR^{14},

[0892] R^{14}为氢原子、C_{1-6}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、C_{3-10}环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或3～10元的饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代),

[0893] R^{16}和R^{17}为氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0894] 作为式(1)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(C)。

[0895] (C)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0896] R^1为甲基、氟甲基,

[0897] R^2为氯原子、氰基、三氟甲基,

[0898] X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子,其中,X、Y和Z不同时为CR^8,

[0899] R^8为氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基，

[0900] L为单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)，

[0901] V为单键、C_{3-10}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)、或3～10元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)，

[0902] W为单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、C_{1-3}烷氧基、-$NR^{16}R^{17}$、和氰基中的相同或不同的1～3个取代基任选取代)，

[0903] Q为氢原子、或NHR^{14}，

[0904] R^{14}为氢原子、或C_{1-3}烷基(该烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代)，

[0905] R^{16}和R^{17}为氢原子、或C_{1-6}烷基。

[0906] 作为式(1)所示的化合物的1个方式，可举出以下的(D)。

[0907] (D)化合物或其制药学可接受的盐，其中，

[0908] R^1为甲基，

[0909] R^2为氰基，

[0910] X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子，其中，X、Y和Z不同时为CR^8，

[0911] R^8为氢原子、氟原子、氯原子、溴原子、或C_{1-3}烷基，

[0912] L为单键、或C_{1-6}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代)，

[0913] V为单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基任选取代的C_{1-3}烷基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)、或3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、羟基、被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基、和氰基中的相同或不同的1～2个取代基任选取代)，

[0914] W为单键、或C_{1-3}亚烷基(该亚烷基被选自氟原子、羟基、和氰基中的1个取代基任选取代)，

[0915] Q为氢原子、NH_2、或NHMe。

[0916] 作为式(1)或(2)所示的化合物的1个方式，可举出以下的(E)。

[0917] (E)化合物或其制药学可接受的盐，其中，

[0918] X、Y和Z各自独立地表示CR^8或氮原子，其中，X、Y和Z不同时为CR^8，

[0919] R^8为氢原子、或氯原子，

[0920] L为单键、或被1个羟基或氟原子任选取代的C_{1-6}亚烷基，

[0921] V为单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1～2个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)，

[0922] W为单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基，

[0923] Q为氢原子、NH_2、或NHMe。

[0924] 作为式(3)所示的化合物的1个方式，可举出以下的(F)。

[0925] (F)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0926] R^{8a}和R^{8b}各自独立地为氢原子、或氯原子,

[0927] L为单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0928] V为单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0929] W为单键或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0930] Q为氢原子或NH_2。

[0931] 作为式(3)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(G)。

[0932] (G)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0933] R^{8a}和R^{8b}各自独立地为氢原子、或氯原子,

[0934] L为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0935] V为单键,

[0936] W为单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0937] Q为NH_2。

[0938] 作为式(3)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(H)。

[0939] (H)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0940] R^{8a}和R^{8b}各自独立地为氢原子,

[0941] L为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0942] V为C_{3-7}亚环烷基,

[0943] W为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0944] Q为NH_2。

[0945] 作为式(4)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(I)。

[0946] (I)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0947] R^{8b}和R^{8c}为氢原子,

[0948] L为单键、或被1个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0949] V为单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1～3个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0950] W为单键或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0951] Q为氢原子、NH_2、或NHMe。

[0952] 作为式(4)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(J)。

[0953] (J)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0954] R^{8b}和R^{8c}各自独立地为氢原子,

[0955] L为被1个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0956] V为3～7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1～3个羟基和氟原子任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0957] W为单键,

[0958] Q为氢原子。

[0959] 作为式(4)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(K)。

[0960] (K)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0961] R^{8b}和R^{8c}各自独立地为氢原子,

[0962] L为被1个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0963] V为C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0964] W为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0965] Q为NH_2。

[0966] 作为式(4)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(L)。

[0967] (L)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0968] R^{8b}和R^{8c}各自独立地为氢原子,

[0969] L为单键,

[0970] V为C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0971] W为单键,

[0972] Q为NH_2、或NHMe。

[0973] 作为式(4)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(M)。

[0974] (M)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0975] R^{8b}和R^{8c}各自独立地为氢原子,

[0976] L为被1个羟基或氟原子任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0977] V为单键,

[0978] W为单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0979] Q为NH_2、或NHMe。

[0980] 作为式(5)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(N)。

[0981] (N)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0982] R^{8a}和R^{8c}各自独立地为氢原子,

[0983] L为单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0984] V为单键、C_{3-7}亚环烷基(该亚环烷基被选自羟基、和C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代)、或3~7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自氟原子、氰基、羟基、和被1~2个羟基任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0985] W为单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0986] Q为氢原子、或NH_2。

[0987] 作为式(5)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(O)。

[0988] (O)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0989] R^{8a}和R^{8c}各自独立地为氢原子,

[0990] L为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0991] V为3~7元的二价饱和杂环基(该饱和杂环基被选自羟基、和被1个羟基任选取代的C_{1-3}烷基中的1个取代基任选取代),

[0992] W为单键,

[0993] Q为氢原子。

[0994] 作为式(5)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(P)。

[0995] (P)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[0996] R^{8a}和R^{8c}各自独立地为氢原子,

[0997] L为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[0998] V为单键,

[0999] W为单键、或被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[1000] Q为NH_2。

[1001] 作为式(5)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(Q)。

[1002] (Q)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[1003] R^{8a}各自独立地为氢原子,

[1004] L为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[1005] V为C_{3-7}亚环烷基,

[1006] W为被1个羟基任选取代的C_{1-3}亚烷基,

[1007] Q为NH_2。

[1008] 作为式(6)所示的化合物的1个方式,可举出以下的(R)。

[1009] (R)化合物或其制药学可接受的盐,其中,

[1010] R^{8a}为氢原子,

[1011] L为C_{1-3}亚烷基,

[1012] V为单键、或C_{3-7}亚环烷基,

[1013] W为单键、或C_{1-3}亚烷基,

[1014] Q为NH_2。

[1015] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈盐酸盐,其为具有以2θ表示且至少在7.2°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(I型)。

[1016] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈盐酸盐,其为具有以2θ表示且至少在8.8°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(I型)。

[1017] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈盐酸盐,其为具有以2θ表示且至少在7.2°±0.2°、和8.8°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(I型)。

[1018] 作为本发明的进一步的方式,可举出I型的晶型的5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈盐酸盐,其具有以2θ表示且在7.2°±0.2°、8.8°±0.2°、9.8°±0.2°、10.2°±0.2°、10.7°±0.2°、16.7°±0.2°、18.5°±0.2°、26.2°±0.2°、和27.0°±0.2°和26.4°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图。通过具有选自这10个峰中的4个或5个,该晶体可被确定。

[1019] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈磷酸盐,其为具有以2θ表示且至少在6.8°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(II型)。

[1020] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈磷酸盐,其为具有以2θ表示且至少在13.0°±0.2°

具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(II型)。

[1021] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈磷酸盐,其为具有以2θ表示且至少在6.8°±0.2°、和13.0°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(II型)。

[1022] 作为本发明的进一步的方式,可举出II型的晶型的5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈磷酸盐,其具有以2θ表示且在6.8°±0.2°、7.5°±0.2°、11.7°±0.2°、11.9°±0.2°、13.0°±0.2°、16.4°±0.2°、19.3°±0.2°、20.4°±0.2°、22.7°±0.2°、和24.3°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图。通过具有选自这10个峰中的4个或5个,该晶体可被确定。

[1023] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈甲苯磺酸盐,其为具有以2θ表示且至少在6.0°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(III型)。

[1024] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈的甲苯磺酸盐,其为具有以2θ表示且至少在17.0°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(III型)。

[1025] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈甲苯磺酸盐,其为具有以2θ表示且至少在6.0°±0.2°、和17.0°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(III型)。

[1026] 作为本发明的进一步的方式,可举出III型的晶型的5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈甲苯磺酸盐,其具有以2θ表示且在6.0°±0.2°、9.0°±0.2°、12.1°±0.2°、14.4°±0.2°、16.2°±0.2°、17.0°±0.2°、22.8°±0.2°、和26.3°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图。通过具有选自这10个峰中的4个或5个,该晶体可被确定。

[1027] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在9.3°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(IV型)。

[1028] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在10.2°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(IV型)。

[1029] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在9.3°±0.2°、和10.2°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(IV型)。

[1030] 作为本发明的进一步的方式,可举出IV型的晶型的5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其具有以2θ表示且在9.3°±0.2°、10.2°±0.2°、10.7°±0.2°、13.6°±0.2°、16.7°±0.2°、17.1°±0.2°、17.8°±0.2°、18.6°±0.2°、26.1°±0.2°和26.4°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图。通过具有选自这10个峰中的4个或5个,该晶体可被确定。

[1031] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在7.9°±0.2°具有特

征峰的粉末X线衍射图的晶型(V型)。

[1032] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在8.7°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(V型)。

[1033] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在7.9°±0.2°、和8.7°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(V型)。

[1034] 作为本发明的进一步的方式,可举出V型的晶型的5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其具有以2θ表示且在7.9°±0.2°、8.7°±0.2°、12.2°±0.2°、13.1°±0.2°、15.9°±0.2°、17.6°±0.2°、19.9°±0.2°、21.9°±0.2°、22.8°±0.2°、和26.6°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图。通过具有选自这10个峰中的4个或5个,该晶体可被确定。

[1035] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在5.3°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(VI型)。

[1036] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在5.7°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(VI型)。

[1037] 作为本发明的进一步的方式,可举出5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其为具有以2θ表示且至少在5.3°±0.2°、和5.7°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图的晶型(VI型)。

[1038] 作为本发明的进一步的方式,可举出VI型的晶型的5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈,其具有以2θ表示且在5.3°±0.2°、5.7°±0.2°、7.0°±0.2°、7.3°±0.2°、7.8°±0.2°、8.4°±0.2°、9.3°±0.2°、10.5°±0.2°、11.5°±0.2°、和14.1°±0.2°具有特征峰的粉末X线衍射图。通过具有选自这10个峰中的4个或5个,该晶体可被确定。

[1039] 施用本公开的化合物时,其使用量根据症状、年龄、施用方法等而不同,例如在为静脉内注射的情况下,对于成人,以每天的下限为0.01mg(优选0.1mg)、上限为1000mg(优选100mg)分为1次或数次,根据症状而施用,由此可期待效果。作为其施用日程,例如可以举出单次施用、1天1次连续施用3天、或者1天2次连续施用1周等。进而,也可以间隔约1天～约60天而重复上述记载的各施用方法。

[1040] 本公开的化合物可以通过非口服施用或口服施用而施用,优选通过非口服的方法,更优选通过静脉内注射而施用。另外,本公开的化合物优选作为药物上可接受的载体,例如脂质体而制剂化并施用。

[1041] 包封本公开的化合物的脂质体包含至少一种以上的磷脂。作为磷脂,例如可以举出磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂等。

[1042] 对磷脂中的脂肪酸残基没有特别限定,例如可以举出碳原子数为14～18的饱和或不饱和的脂肪酸残基,具体而言,可以举出源自肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等脂肪酸的酰基。另外,也可以使用蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂等源自天然物的磷脂,以及在其

不饱和脂肪酸残基中添加了氢的氢化蛋黄卵磷脂、氢化大豆卵磷脂(也称为氢化大豆磷脂、或氢化大豆磷脂酰胆碱)等。

[1043] 磷脂相对于脂质体膜成分整体的配合量(摩尔分率)没有特别限定,优选列举30～80%,更优选列举40～70%。

[1044] 包封本公开的化合物的脂质体可以包含甾醇类。作为甾醇类,可列举出胆固醇、β-谷甾醇、豆甾醇、樟脑甾醇、油胺甾醇、麦角甾醇和岩藻甾醇等。作为甾醇类,优选列举胆固醇。甾醇类相对于脂质体膜成分整体的配合量(摩尔分率)没有特别限定,优选列举0～60%,更优选列举10～50%,进一步优选列举30～50%。

[1045] 包封本公开的化合物的脂质体为了提高在体内的滞留性,可包含聚合物修饰脂质。聚合物修饰脂质相对于脂质体膜成分整体的配合量(摩尔分率)没有特别限定,优选列举0～20%,更优选列举1～10%。作为聚合物修饰脂质的聚合物部分,优选列举亲水性聚合物,更优选列举其中未与脂质结合的聚合物的末端被烷氧基化的亲水性聚合物。作为聚合物修饰脂质的聚合物部分,具体没有特别限定,例如可举出聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、甲氧基聚乙二醇、甲氧基聚丙二醇、甲氧基聚乙烯醇、甲氧基聚乙烯吡咯烷酮、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、乙氧基聚乙烯醇、乙氧基聚乙烯吡咯烷酮、丙氧基聚乙二醇、丙氧基聚丙二醇、丙氧基聚乙烯醇、和丙氧基聚乙烯吡咯烷酮。作为聚合物修饰脂质的聚合物部分,优选列举聚乙二醇、甲氧基聚乙二醇、甲氧基聚丙二醇、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、丙氧基聚乙二醇、和丙氧基聚丙二醇。作为聚合物修饰脂质的聚合物部分,更优选列举聚乙二醇、甲氧基聚乙二醇、乙氧基聚乙二醇、乙氧基聚丙二醇、和丙氧基聚乙二醇。作为聚合物修饰脂质的聚合物部分,进一步更优选列举聚乙二醇、和甲氧基聚乙二醇。作为聚合物修饰脂质的聚合物部分,最优选列举甲氧基聚乙二醇。聚合物修饰脂质的聚合物部分的分子量没有特别限定,例如可举出100～10000道尔顿,优选列举1000～7000道尔顿,更优选列举1500～5000道尔顿,最优选列举1500～3000道尔顿。

[1046] 作为聚合物修饰脂质的脂质部分,具体没有特别限定,例如可以举出磷脂酰乙醇胺和二酰基甘油。作为聚合物修饰脂质的脂质部分,优选列举具有碳原子数14～18的饱和或不饱和的脂肪酸残基的磷脂酰乙醇胺、和具有碳原子数14～18的饱和或不饱和的脂肪酸残基的二酰基甘油,更优选列举具有碳原子数14～18的饱和脂肪酸残基的磷脂酰乙醇胺、和具有碳原子数14～18的饱和脂肪酸残基的二酰基甘油,进一步优选列举具有棕榈酰基或硬脂酰基的磷脂酰乙醇胺、和具有棕榈酰基或硬脂酰基的二酰基甘油。作为聚合物修饰脂质的脂质部分,最优选列举二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺。

[1047] 包封本公开的化合物的脂质体可以包含药学上可接受的添加物。作为添加物,可举出例如无机酸、无机酸盐、有机酸、有机酸盐、糖类、缓冲剂、抗氧化剂和聚合物类。

[1048] 作为无机酸,可举出例如磷酸、盐酸和硫酸。

[1049] 作为无机酸盐,可举出例如磷酸氢钠、氯化钠、硫酸铵和硫酸镁。

[1050] 作为有机酸,可举出例如柠檬酸、乙酸、琥珀酸和酒石酸。

[1051] 作为有机酸盐,可举出例如柠檬酸钠、乙酸钠、琥珀酸二钠和酒石酸钠。

[1052] 作为糖类,可举出例如葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇和海藻糖。

[1053] 作为缓冲剂,可举出例如L-精氨酸、L-组氨酸、氨丁三醇(三羟基甲基氨基甲烷、Tris)和它们的盐。

[1054] 作为抗氧化剂,可举出例如亚硫酸钠、L-半胱氨酸、巯基乙酸钠、硫代硫酸钠、抗坏血酸和生育酚。

[1055] 作为聚合物类,可以举出例如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、和羧甲基纤维素钠。

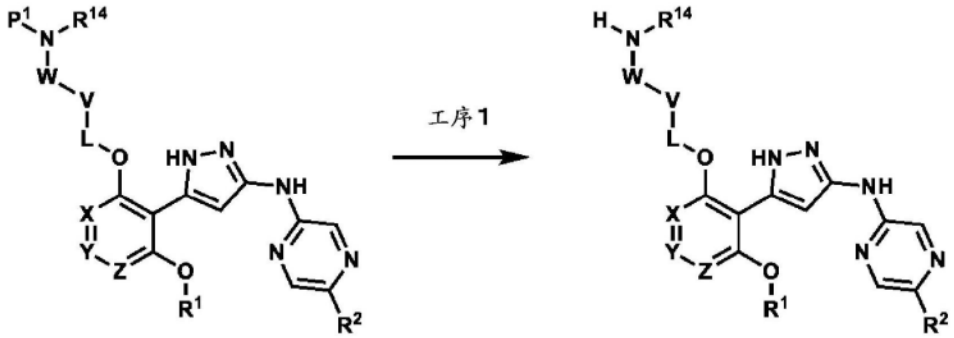
[1056] 以下,举例来说明式(1)所示的本公开的化合物的制造方法,但本公开的化合物的制造方法不限于此。下述制造方法中使用的化合物只要不妨碍反应,也可以形成盐。

[1057] 本公开的化合物可以以公知化合物为起始原料,适当组合例如以下的制造方法A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、和R的方法、或依照这些的方法或本领域技术人员公知的合成方法来制造。除式(a2)以外的本公开的化合物也可以将依照这些的方法或本领域技术人员公知的合成方法适当组合来制造。

[1058] 制造方法A

[1059] 式(a2)所示的本公开的化合物例如可以通过以下的方法制造。

[1060] [化17]

[1061] 

(a1) (a2)

[1062] [式中,R^1、R^2、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项目1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基。作为P^1,可举出例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行,1999年)中记载的氨基的保护基等。]。

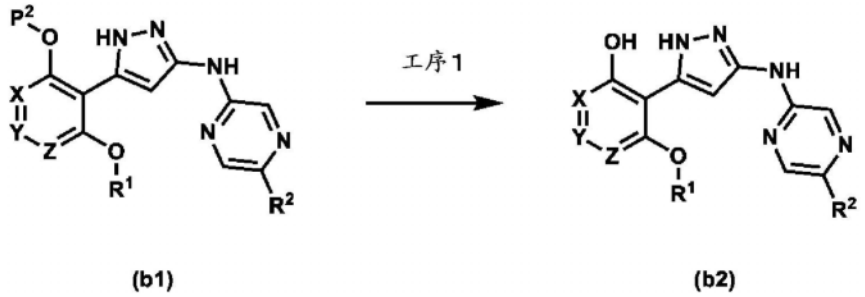
[1063] [工序1]

[1064] 化合物(a2)可以通过将利用下述的制造方法得到的化合物(a1)的保护基P^1除去而制造。本工序可以依据例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行,1999年)中记载的方法等来进行。

[1065] 制造方法B

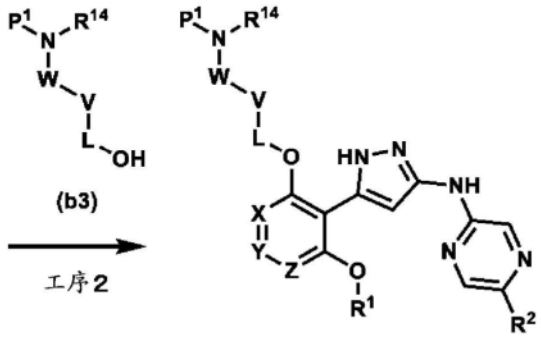
[1066] 式(a1)所示的本公开的化合物例如可以通过下面的方法制造。

[1067] [化18]



(b1) (b2)

[1068]



(a1)

[1069] [式中,R^1、R^2、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项目1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基,P^2是指苯酚的保护基。作为P^1,可以举出例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行,1999年)中记载的氨基的保护基等,作为P^2,可以举出例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行,1999年)中记载的苯酚的保护基等。]。

[1070] 化合物(b3)可作为市售品获得。

[1071] [工序1]

[1072] 化合物(b2)可以通过将利用下述的制造方法得到的化合物(b1)的保护基P^2除去来制造。本工序可以依据例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行,1999年)中记载的方法等进行。

[1073] [工序2]

[1074] 化合物(a1)可以在适当的溶剂中、在光延试剂的存在下,通过化合物(b2)与化合物(b3)的光延反应来制造。

[1075] 作为光延试剂,可举出例如偶氮二羧酸二乙酯(DEAD)、偶氮二羧酸异丙酯(DIAD)、N,N,N',N'-四异丙基偶氮二甲酰胺(TIPA)、1,1'-(偶氮二羰基)二哌啶(ADDP)、N,N,N',N'-四甲基偶氮二甲酰胺(TMAD)和三苯基膦、三丁基膦等,也可使用氰基亚甲基三甲基磷烷(CMMP)、氰基亚甲基三丁基磷烷(CMBP)。

[1076] 作为溶剂中,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂,就没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲基亚砜等非质子系溶剂;或者它们的混合溶剂等。作为溶剂,优选举出甲苯、苯、THF、1,4-二噁烷和它们

的混合溶剂等。

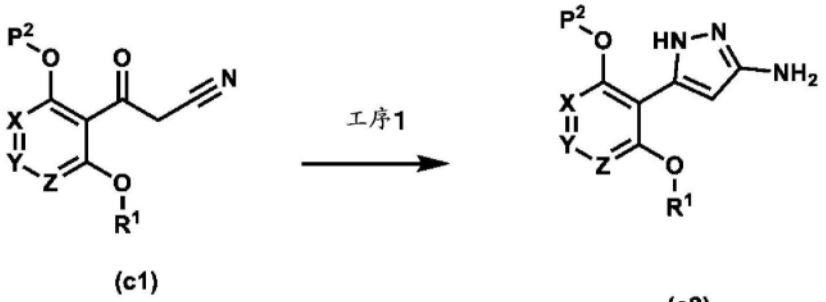
[1077] 反应时间通常为5分钟～72小时,优选为12小时～24小时。

[1078] 反应温度通常为0℃～100℃,优选为0℃～50℃。

[1079] 制造方法C

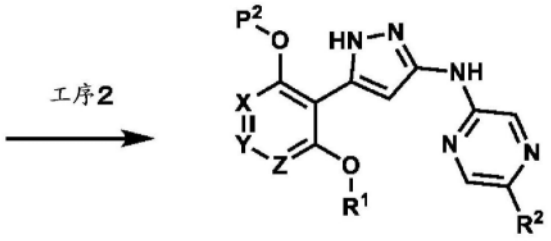
[1080] 式(b1)所示的本公开的化合物例如可以通过下面的方法制造。

[1081] [化19]



(c1) (c2)

[1082]



(b1)

[1083] [式中,R^1、R^2、X、Y和Z与项目1的记载含义相同,P^2是指苯酚的保护基。作为P^2,可举出例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行,1999年)中记载的苯酚的保护基等。]。

[1084] [工序1]

[1085] 化合物(c2)可以通过使化合物(c1)在适当的酸存在下或不存在下、在适当的溶剂中与肼一水合物反应来制造。

[1086] 作为酸,可举出乙酸、丙酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、乙磺酸、盐酸、硫酸、樟脑磺酸等。作为酸,优选列举乙酸、对甲苯磺酸等。

[1087] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲基亚砜等非质子系溶剂;甲醇、乙醇、异丙醇、丁醇等醇系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出1,4-二噁烷、甲苯、乙醇等。

[1088] 反应时间通常为5分钟～72小时,优选为12小时～24小时。

[1089] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为50℃～100℃。

[1090] [工序2]

[1091] 化合物(b1)可以通过使化合物(c2)在适当的碱存在下、在适当的溶剂中与5-氯吡

嗪衍生物反应来制造。化合物(b1)也可以通过将化合物(c2)在适当的钯催化剂、配体和碱存在下、在适当的溶剂中与5-氯吡嗪衍生物反应来制造。

[1092] 作为碱,例如可举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1,5-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯(DBN)、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)、吡啶、二甲基氨基吡啶、甲基吡啶、N-甲基吗啉(NMM)、N-乙基吗啉等有机碱类、或碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、氢氧化钠、氢氧化钾等无机碱类。作为碱,优选举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、N-乙基吗啉、碳酸钾、碳酸铯等。

[1093] 作为钯催化剂,例如可举出氯化钯、乙酸钯等盐、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)氯仿加成物等0价钯络合物等。

[1094] 作为配体,例如可举出4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基呫吨(Xantophos)、2,2’-双(二苯基膦基)-1,1’-联萘(BINAP)、2-二环己基膦基-2’,6’-二甲氧基联苯(SPhos)、2-二环己基膦基-2’,4’,6’-三异丙基联苯(XPhos)等膦配体等。作为配体,优选为4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基呫吨(Xantophos)。

[1095] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出四氢呋喃、1,4-二噁烷、甲苯、二甲亚砜等。

[1096] 反应时间通常为5分钟～48小时,优选为1小时～6小时。

[1097] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为50℃～100℃。

[1098] 制造法D

[1099] 式(c1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1100] [化20]

[1101] 

(d1) (c1)

[1102] [式中,R^1、X、Y和Z与项1的记载含义相同,P^2是指苯酚的保护基。作为P^2,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的苯酚的保护基等。]

[1103] [工序1]

[1104] 化合物(c1)可通过使化合物(d1)在适当的碱存在下、在适当的溶剂中与乙腈反应而制造。

[1105] 作为碱,可使用无机碱。作为无机碱,可举出氢化钠等氢化物、氟化钾等卤化碱金属、氢氧化钠、氢氧化钾等碱金属氢氧化物、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、碳酸氢钠等碳酸碱盐、乙醇钠、叔丁醇钠、叔丁醇钾等碱金属醇盐、正丁基锂、甲基锂、异丙基溴化镁等碱金属。作为碱,优选举出乙醇钠、叔丁醇钠、叔丁醇钾、正丁基锂等。

[1106] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;甲醇、乙醇、异丙基醇、丁醇等醇系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出四氢呋喃、甲苯等。

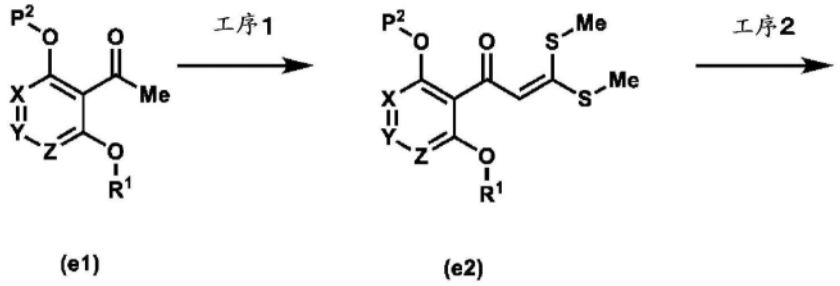
[1107] 反应时间通常为5分钟～72小时,优选为12小时～24小时。

[1108] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为50℃～100℃。

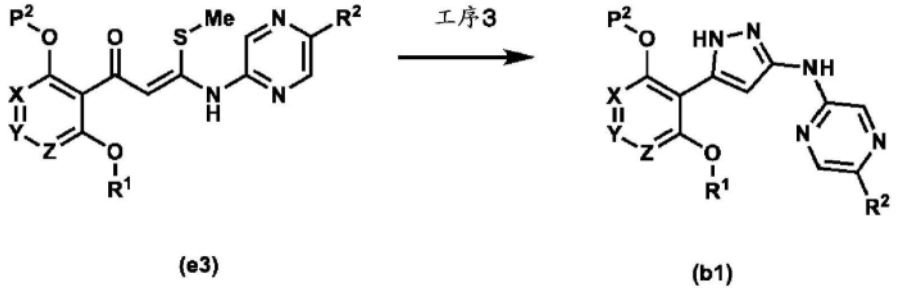
[1109] 制造法E

[1110] 式(b1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1111] [化21]



[1112]



[1113] [式中,R^1、R^2、X、Y和Z与项1的记载含义相同,P^2是指苯酚的保护基。作为P^2,例如可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的苯酚的保护基等。]

[1114] [工序1]

[1115] 化合物(e2)可通过使化合物(e1)在适当的碱存在下、在适当的溶剂中与二硫化碳和碘甲烷反应而制造。

[1116] 作为碱,可使用无机碱。作为无机碱,可举出氢化钠等氢化物、氟化钾等卤化碱金属、氢氧化钠、氢氧化钾等碱金属氢氧化物、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、碳酸氢钠等碳酸碱盐、乙醇钠、叔丁醇钠、叔丁醇钾等碱金属醇盐、正丁基锂、甲基锂、异丙基溴化镁等碱金属。作为碱,优选举出氢化钠、叔丁醇钾等。

[1117] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质

子系溶剂;甲醇、乙醇、异丙基醇、丁醇等醇系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出四氢呋喃、甲苯、N,N-二甲基甲酰胺等。

[1118] 反应时间通常为5分钟～72小时,优选为30分钟～2小时。

[1119] 反应温度通常为-78℃～200℃,优选为0℃～25℃。

[1120] [工序2]

[1121] 化合物(e3)可通过使化合物(e2)在适当的碱存在下、在适当的溶剂中与5-氨基吡嗪衍生物反应而制造。

[1122] 作为碱,例如可举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1,5-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯(DBN)、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)、吡啶、二甲基氨基吡啶、甲基吡啶、N-甲基吗啉(NMM)、N-乙基吗啉等有机碱类、或碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠、氢氧化钾等无机碱类。作为碱,优选举出三乙基胺、二异丙基乙基胺等。

[1123] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出四氢呋喃、甲苯、二甲亚砜等。

[1124] 反应时间通常为5分钟～48小时,优选为2小时～8小时。

[1125] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为50℃～100℃。

[1126] [工序3]

[1127] 化合物(b1)可通过使化合物(e3)在适当的酸存在下或非存在下、在适当的溶剂中与肼一水合物反应而制造。

[1128] 作为酸,可举出乙酸、丙酸、对甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、盐酸、硫酸、樟脑磺酸等。作为酸,优选举出乙酸。

[1129] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;甲醇、乙醇、异丙基醇、丁醇等醇系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出1,4-二噁烷、乙醇等。

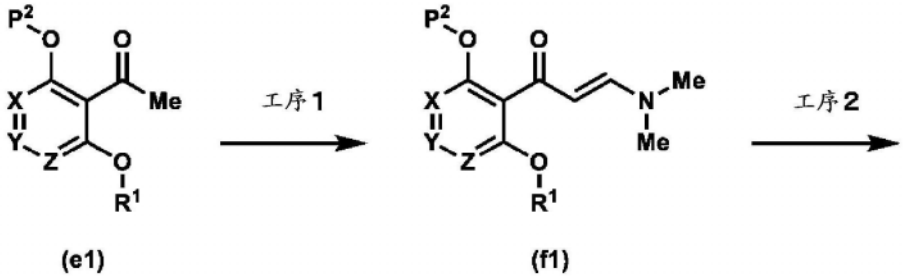
[1130] 反应时间通常为5分钟～72小时,优选为12小时～24小时。

[1131] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为50℃～100℃。

[1132] 制造法F

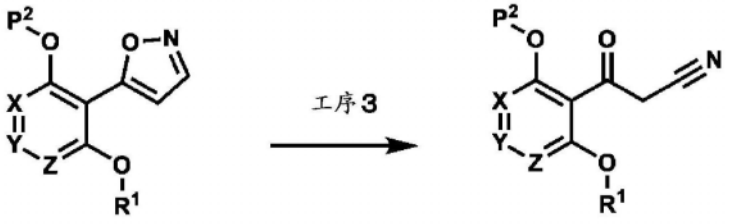
[1133] 式(c1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1134] [化22]



(e1) (f1)

[1135]



(f2) (c1)

[1136] [式中,R^1、X、Y和Z与项1的记载含义相同,P^2是指苯酚的保护基。作为P^2,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的苯酚的保护基等。]

[1137] [工序1]

[1138] 化合物(f1)可通过使化合物(e1)在适当的溶剂中与二甲基甲酰胺二甲基缩醛反应而制造。

[1139] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出N,N-二甲基甲酰胺等。

[1140] 反应时间通常为5分钟～48小时,优选为24小时～48小时。

[1141] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为60℃～120℃。

[1142] [工序2]

[1143] 化合物(f2)可通过使化合物(f1)在适当的溶剂中与羟基胺盐酸盐反应而制造。

[1144] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;甲醇、乙醇、异丙基醇、丁醇等醇系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出乙醇、异丙基醇等。

[1145] 反应时间通常为5分钟～48小时,优选为6小时～12小时。

[1146] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为40℃～80℃。

[1147] [工序3]

[1148] 化合物(c1)可通过使化合物(f2)在适当的溶剂中与碱反应而制造。

[1149] 作为碱,例如可举出碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠、氢氧化钾等

无机碱类。作为碱,优选举出氢氧化钠、氢氧化钾等。

[1150] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、苯甲醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;水、甲醇、乙醇、异丙基醇、丁醇等质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出水、乙醇的混合溶剂等。

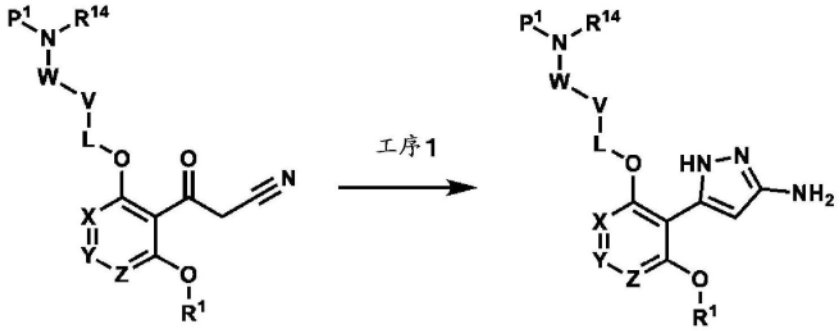
[1151] 反应时间通常为5分钟～48小时,优选为1小时～6小时。

[1152] 反应温度通常为0℃～200℃,优选为20℃～50℃。

[1153] 制造法G

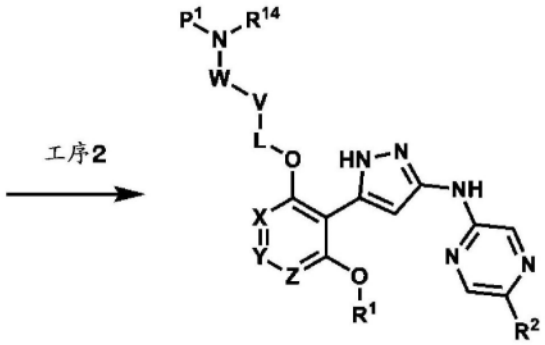
[1154] 式(a1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1155] [化23]



(g1) (g2)

[1156]



(a1)

[1157] [式中,R^1、R^2、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。]

[1158] [工序1]

[1159] 化合物(g2)可通过制造法C的工序1所述的方法或基于其的方法而由通过下述的制造法得到的化合物(g1)制造。

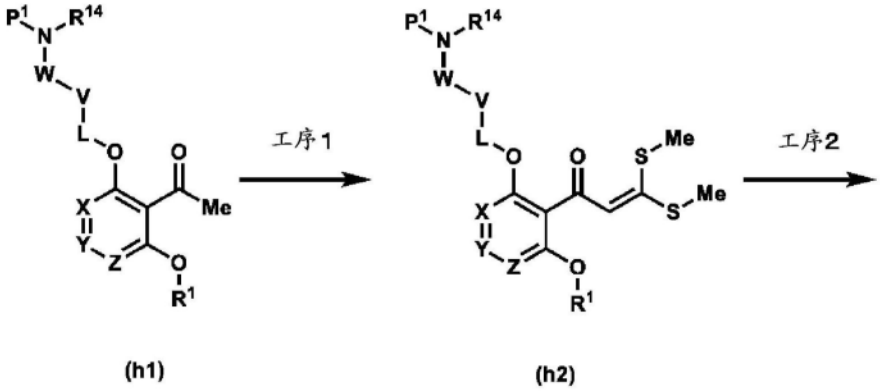
[1160] [工序2]

[1161] 化合物(a1)可通过制造法C的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(g2)制造。

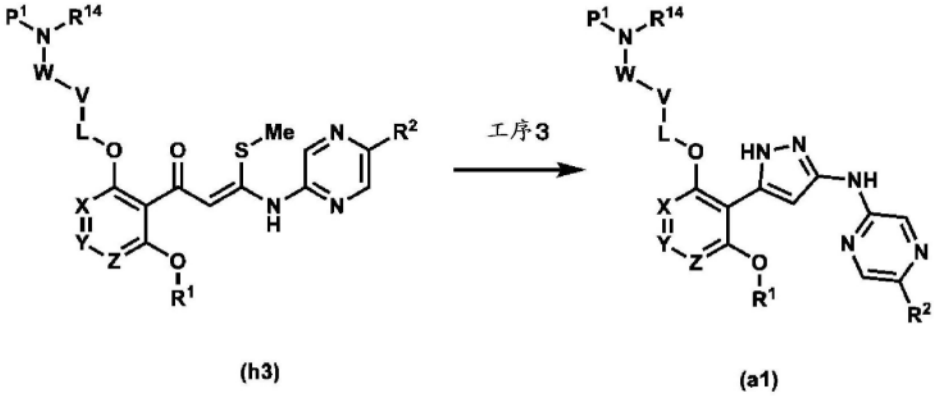
[1162] 制造法H

[1163] 式(a1)所示的化合物例如可通过下面的方法制造。

[1164] [化24]



[1165]



[1166] [式中,R^1、R^2、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。]

[1167] [工序1]

[1168] 化合物(h2)可通过制造法E的工序1所述的方法或基于其的方法而由通过下述的制造法得到的化合物(h1)制造。

[1169] [工序2]

[1170] 化合物(h3)可通过制造法E的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(h2)制造。

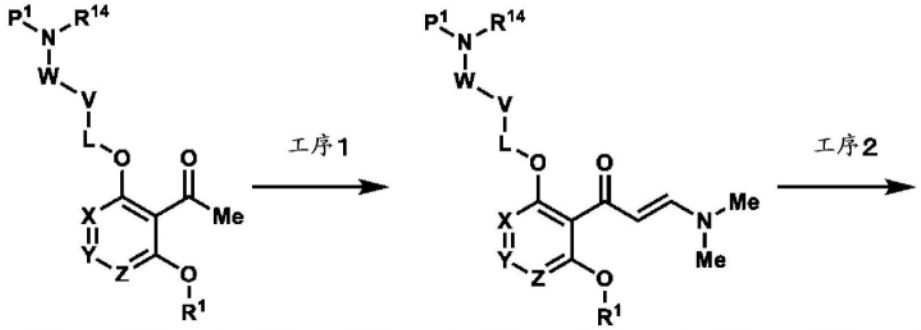
[1171] [工序3]

[1172] 化合物(a1)可通过制造法E的工序3所述的方法或基于其的方法而由化合物(h3)制造。

[1173] 制造法I

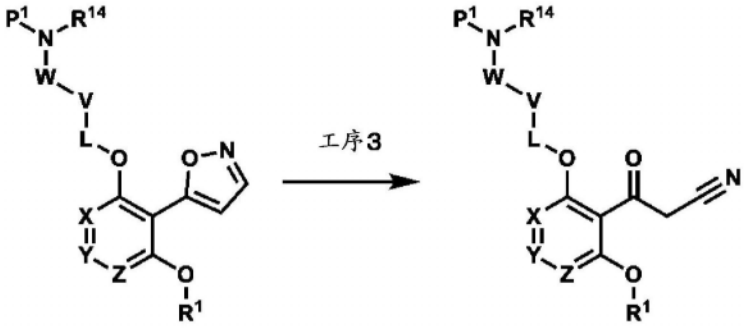
[1174] 式(g1)所示的化合物例如可通过下面的方法制造。

[1175] [化25]



(h1) (i1)

[1176]



(i2) (g1)

[1177] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。]

[1178] [工序1]

[1179] 化合物(i1)可通过制造法F的工序1所述的方法或基于其的方法而由通过下述的制造法得到的化合物(h1)制造。

[1180] [工序2]

[1181] 化合物(i2)可通过制造法F的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(i1)制造。

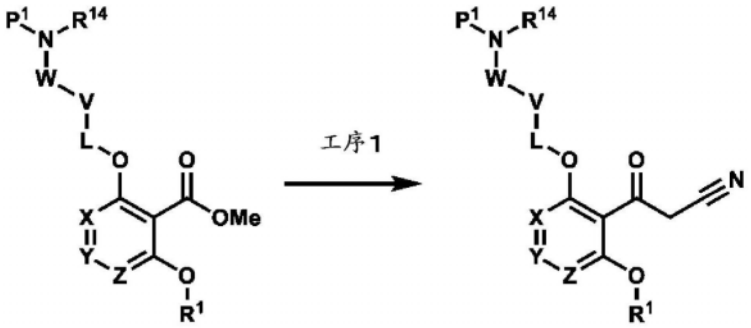
[1182] [工序3]

[1183] 化合物(g1)可通过制造法F的工序3所述的方法或基于其的方法而由化合物(i2)制造。

[1184] 制造法J

[1185] 式(g1)所示的化合物也可通过例如下面的方法制造。

[1186] [化26]

[1187] 

(j1) (g1)

[1188] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。]

[1189] [工序1]

[1190] 化合物(g1)可通过制造法D的工序1所述的方法或基于其的方法、由通过下述的制造法得到的化合物(j1)制造。

[1191] 制造法K

[1192] 式(d1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1193] [化27]

[1194] 

(k1) (d1)

[1195] [式中,R^1、X、Y和Z与项1的记载含义相同,P^2是指苯酚的保护基。作为P^2,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的苯酚的保护基等。]

[1196] 化合物(k1)能以市售品的形式获得。

[1197] [工序1]

[1198] 化合物(d1)可通过例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)中记载的方法而由化合物(k1)制造。

[1199] 制造法L

[1200] 式(e1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1201] [化28]

[1202] 

(l1) (e1)

[1203] [式中,R^1、X、Y和Z与项1的记载含义相同,P^2是指苯酚的保护基。作为P^2,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的苯酚的保护基等。]

[1204] 化合物(l1)能以市售品的形式获得。

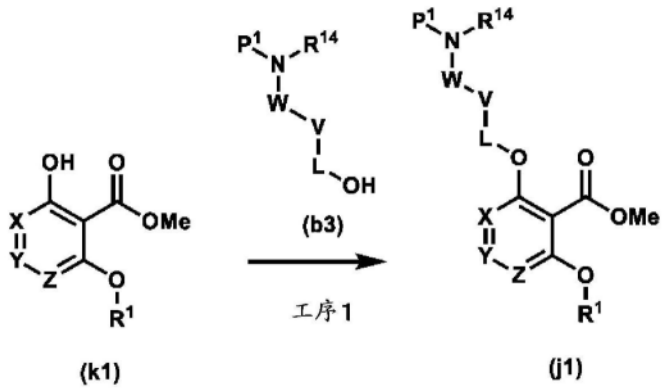
[1205] [工序1]

[1206] 化合物(e1)可通过制造法K的工序1所述的方法或基于其的方法由化合物(l1)制造。

[1207] 制造法M

[1208] 式(j1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1209] [化29]

[1210] 

(k1) (j1)

[1211] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。]

[1212] 化合物(k1)和化合物(b3)能以市售品的形式获得。

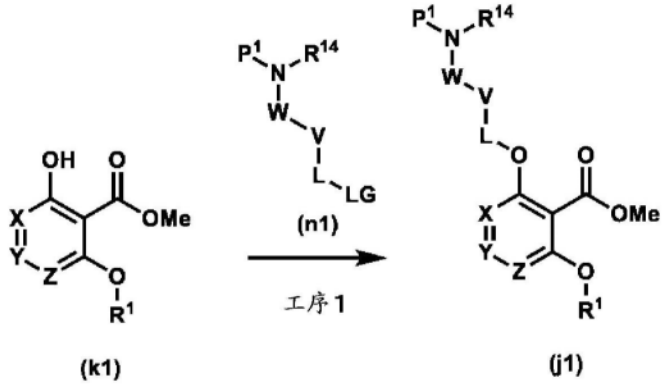
[1213] [工序1]

[1214] 化合物(j1)可通过制造法B的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(k1)和化合物(b3)制造。

[1215] 制造法N

[1216] 式(j1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1217] [化30]

[1218] 

[1219] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基,LG是指离去基团。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。作为LG,例如,可举出卤素、甲烷磺酰基氧基、对甲苯磺酸氧基、三氟甲烷磺酸氧基等。]

[1220] 化合物(k1)和化合物(n1)能以市售品的形式获得。

[1221] [工序1]

[1222] 化合物(j1)可通过使化合物(k1)和化合物(n1)在适当的碱的存在下或非存在下、在适当的溶剂中反应而制造。

[1223] 作为碱,例如可举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1.5-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯(DBN)、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)、吡啶、4-二甲基氨基吡啶、甲基吡啶、N-甲基吗啉(NMM)等有机碱类、或碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠、氢氧化钾等无机碱类。作为碱,优选举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、碳酸钾、氢氧化钠等。

[1224] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出甲醇、乙醇、2-丙醇(异丙基醇)、叔丁醇等醇系溶剂;二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、苯甲醚、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出2-丙醇、四氢呋喃、甲苯、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺等。

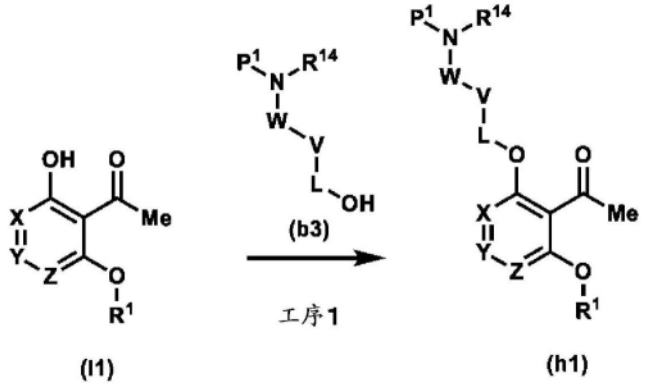
[1225] 反应温度通常为-80℃～加热回流下,优选为25℃～90℃。

[1226] 反应时间通常为30分钟～48小时,优选为6～12小时。

[1227] 制造法0

[1228] 式(h1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1229] [化31]

[1230] 

[1231] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。]

[1232] 化合物(l1)和化合物(b3)能以市售品的形式获得。

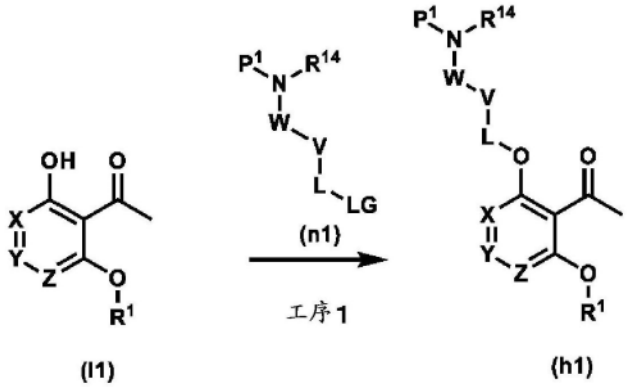
[1233] [工序1]

[1234] 化合物(h1)可通过制造法B的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(l1)和化合物(b3)制造。

[1235] 制造法P

[1236] 式(h1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1237] [化32]

[1238] 

[1239] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基,LG是指离去基团。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。作为LG,例如,可举出卤素、甲烷磺酰基氧基、对甲苯磺酸氧基、三氟甲烷磺酸氧基等。]

[1240] 化合物(l1)和化合物(n1)能以市售品的形式获得。

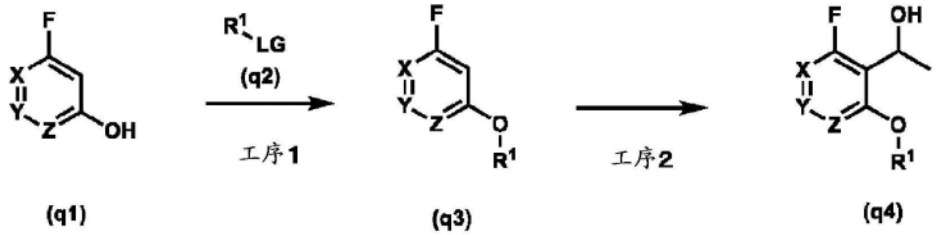
[1241] [工序1]

[1242] 化合物(h1)可通过制造法B的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(l1)和化合物(n1)制造。

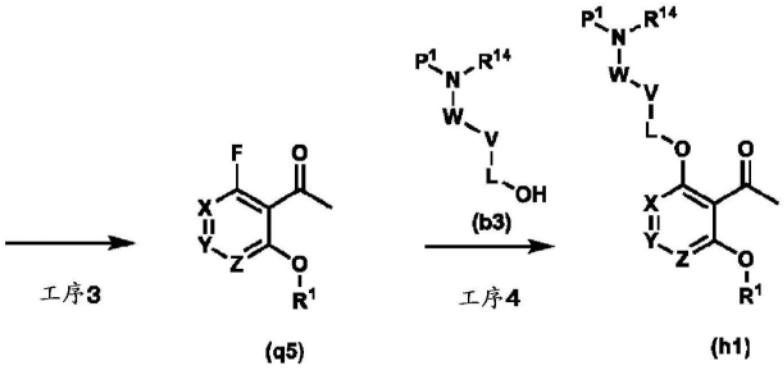
[1243] 制造法Q

[1244] 式(h1)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1245] [化33]



[1246]



[1247] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基,LG是指离去基团。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。作为LG,例如,可举出卤素、甲烷磺酰基氧基、对甲苯磺酸氧基、三氟甲烷磺酸氧基等。]

[1248] 化合物(q1)、化合物(q2)和化合物(b3)能以市售品的形式获得。

[1249] [工序1]

[1250] 化合物(q3)可通过制造法N的工序1所述的方法或基于其的方法而由化合物(q1)和化合物(q2)制造。

[1251] [工序2]

[1252] 化合物(q4)可通过使化合物(q3)和乙醛在适当的碱的存在下、在适当的溶剂中反应而制造。

[1253] 作为碱,例如可举出正丁基锂、仲丁基锂、叔丁基锂、二异丙基氨基锂、六甲基哌啶锂、六甲基二硅胺基锂、六甲基二硅胺基钠、六甲基二硅胺基钾、异丙基镁氯-氯化锂络合物等。

[1254] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、苯甲醚、二甲苯等芳香族烃系溶剂;二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷等卤素系溶剂;乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出四氢呋喃。

[1255] 反应温度通常为-80℃～加热回流下,优选为-80℃～25℃。

[1256] 反应时间通常为30分钟～48小时,优选为6～12小时。

[1257] [工序3]

[1258] 化合物(q5)可通过使化合物(q4)和适当的氧化剂在适当的碱的存在下或非存在下、在适当的溶剂中反应而制造。

[1259] 作为氧化剂,例如,可举出二氧化锰、Dess-Martin试剂、二甲亚砜-草酰氯、二甲亚砜-三氟乙酸酐、三氧化硫-吡啶络合物、2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基-次氯酸钠等。

[1260] 作为碱,例如可举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1.5-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯(DBN)、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)、吡啶、4-二甲基氨基吡啶、甲基吡啶、N-甲基吗啉(NMM)等有机碱类、或碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠、氢氧化钾等无机碱类。

[1261] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷等卤素系溶剂;二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、苯甲醚、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺等。

[1262] 反应温度通常为-80℃～加热回流下,优选为-80℃～25℃。

[1263] 反应时间通常为30分钟～48小时,优选为6～12小时。

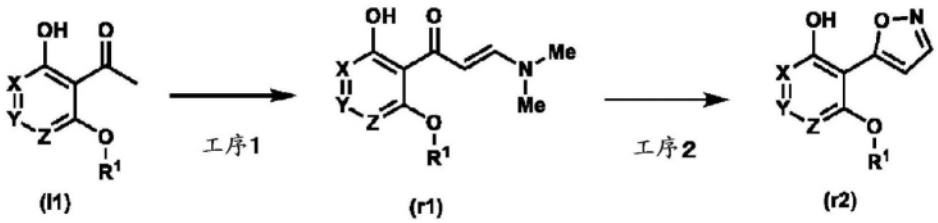
[1264] [工序4]

[1265] 化合物(h1)可通过制造法B的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(q5)和化合物(b3)制造。

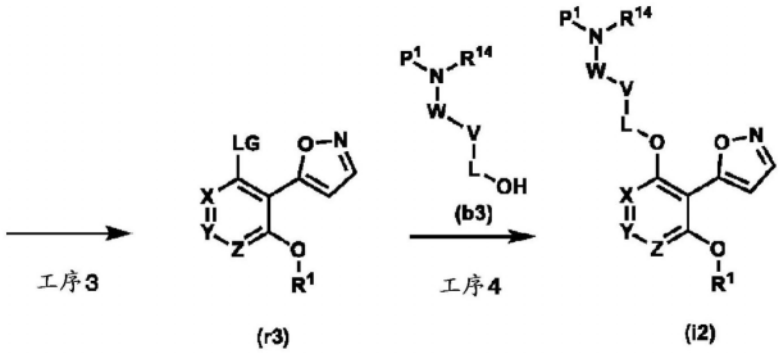
[1266] 制造法R

[1267] 式(i2)所示的本公开的化合物例如可利用下面的方法制造。

[1268] [化34]



[1269]



[1270] [式中,R^1、R^{14}、X、Y、Z、L、V和W与项1的记载含义相同,P^1是指氨基的保护基,LG是指离去基团。作为P^1,例如,可举出Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)所述的氨基的保护基等。

[1271] 作为LG,例如,可举出卤素、甲烷磺酰基氧基、对甲苯磺酸氧基、三氟甲烷磺酸氧基等。]

[1272] 化合物(l1)和化合物(b3)能以市售品的形式获得。

[1273] [工序1]

[1274] 化合物(r1)可通过制造法F的工序1所述的方法或基于其的方法而由化合物(11)制造。

[1275] [工序2]

[1276] 化合物(r2)可通过制造法F的工序2所述的方法或基于其的方法而由化合物(r1)制造。

[1277] [工序3]

[1278] 化合物(r3)可通过使化合物(r2)和适当的卤化剂或磺酰基化剂在适当的碱的存在下或非存在下、在适当的溶剂中或无溶剂下反应而制造。

[1279] 作为卤化剂或磺酰基化剂,例如,可举出亚硫酰氯、磷酰氯、草酰氯、三溴化磷、甲烷磺酰氯、N-苯基双(三氟甲烷磺酰亚胺)、三氟甲磺酸酐等。

[1280] 作为碱,例如可举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1.5-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯(DBN)、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)、吡啶、4-二甲基氨基吡啶、甲基吡啶、N-甲基吗啉(NMM)等有机碱类、或碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠、氢氧化钾等无机碱类。

[1281] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷等卤素系溶剂;二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、苯甲醚、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,优选举出二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺等。

[1282] 反应温度通常为-80℃～加热回流下,优选为0℃～加热回流下。

[1283] 反应时间通常为30分钟～48小时,优选为30分钟～12小时。

[1284] [工序4]

[1285] 化合物(i2)可通过在适当的碱的存在下使化合物(r3)和化合物(b3)在适当的溶剂中与适当的钯源和配体进行催化反应而制造。

[1286] 作为碱,例如可举出三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、吡啶、4-二甲基氨基吡啶、甲基吡啶、N-甲基吗啉(NMM)等有机碱类、或碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、氢氧化钠、氢氧化钾等无机碱类。作为碱,优选举出二异丙基乙基胺、碳酸铯等。

[1287] 作为钯源,可举出氯化钯、乙酸钯等盐、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)氯仿加成物等0价钯络合物。

[1288] 作为配体,可举出4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基呫吨(Xantophos)、2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘(BINAP)、2-二环己基膦基-2',6'-二甲氧基联苯(SPhos)、2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯(XPhos)等膦配体。作为配体,优选举出4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基呫吨(Xantophos)。

[1289] 作为溶剂,只要是在本工序的反应条件下不反应的溶剂即可,没有特别限定,例如可以举出二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷等卤素系溶剂;二乙醚、二异丙基醚、四氢呋喃、甲基环戊基醚、1,4-二噁烷等醚系溶剂;苯、甲苯、氯苯、苯甲醚、二甲苯等芳香族烃系溶剂;乙酸乙酯、乙酸甲酯等酯系溶剂;乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、二甲亚砜等非质子系溶剂;或它们的混合物。作为溶剂,

优选举出四氢呋喃、1,4-二噁烷、甲苯、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺等。

[1290] 反应温度通常为0℃～加热回流下,优选为50℃～加热回流下。

[1291] 反应时间通常为5分钟～72小时,优选为2～12小时。

[1292] 上述说明的制造方法中,没有记载起始原料或中间体的制造方法的那些可以作为市售品获得,或者可以由市售化合物通过本领域技术人员公知的方法或依照它们的方法来合成。

[1293] 上述说明的制造方法的各反应中,除了具体明示保护基的使用的情况之外,可以根据需要使用保护基。例如,在反应点以外的任意官能团于说明的反应条件下会发生变化、或者在没有保护基的状态下不适合实施说明的方法的情况下,可以根据需要保护反应点以外的部位,在反应结束后或在进行一系列反应后进行脱保护,由此可以得到目标化合物。

[1294] 作为保护基,可使用例如Protective Groups in Organic Synthesis(Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts著、John Wiley&Sons,Inc.发行、1999年)等中记载的保护基等。作为氨基的保护基的具体例,可举出例如苄氧基羰基、叔丁氧羰基、乙酰基、苄基等。此外,作为羟基的保护基的具体例,可举出例如三甲基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基等三烷基甲硅烷基、乙酰基、苄基等。

[1295] 保护基的导入和脱离可以通过有机合成化学中常用的方法(参照例如前述Protective Groups in Organic Synthesis)或依照它们的方法来进行。

[1296] 本说明书中,保护基、缩合剂等有时也以本技术领域中惯用的IUPAC-IUB(生物化学命名委员会)的缩写来表示。应予说明,本说明书中使用的化合物名不一定遵循IUPAC命名法。

[1297] 上述说明的制造方法中的中间体或目标化合物,通过适宜改变其官能团(例如,根据需要进行官能团的保护、脱保护,以氨基、羟基、羰基、卤素等为开端进行各种变换),也可以衍生为本公开中包含的其它化合物。官能团的变换可以通过通常进行的一般方法(参照例如Comprehensive Organic Transformations,R.C.Larock,John Wiley&Sons Inc.(1999)等)来进行。

[1298] 上述说明的制造方法中的中间体和目标化合物可以通过有机合成化学中常用的纯化方法(例如,中和、过滤、提取、洗涤、干燥、浓缩、重结晶、各种色谱等)来分离纯化。此外,对于中间体来说,也可以在不特别进行纯化的情况下用于后面的反应。

[1299] 作为“制药学上可接受的盐”,可举出酸加成盐和碱加成盐。例如,作为酸加成盐,可举出盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、磷酸盐等无机酸盐,或柠檬酸盐、草酸盐、邻苯二甲酸盐、富马酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、乙酸盐、甲酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、三氟乙酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐等有机酸盐。此外,作为碱加成盐,可举出钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、钡盐、铝盐等无机碱盐,或三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇[三(羟基甲基)甲胺]、叔丁胺、环己胺、二环己胺、N,N-二苄基乙胺等有机碱盐。进一步,“制药学上可接受的盐”还可举出与精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、天冬氨酸、或谷氨酸等碱性氨基酸或酸性氨基酸的氨基酸盐。

[1300] 起始原料和中间体的合适的盐以及作为药品原料可接受的盐是常用的无毒性盐。作为这些盐,例如,除了有机酸盐(例如乙酸盐、三氟乙酸盐、马来酸盐、富马酸盐、柠檬酸

盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、甲酸盐、甲苯磺酸盐等)和无机酸盐(例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等)之类的酸加成盐、与氨基酸(例如精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等)的盐、碱金属盐(例如钠盐、钾盐等)、碱土金属盐(例如钙盐、镁盐等)等金属盐、铵盐、有机碱盐(例如三甲胺盐、三乙胺盐、吡啶盐、甲基吡啶盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基亚乙基二胺盐等)等之外,本领域技术人员可以适宜选择。

[1301] 本公开中,将式(1)~(5)所示的化合物的任意1个或2个以上的^{1}H变换为$^{2}H(D)$而得的氘变换体也包含在式(1)~(5)所示的化合物中。

[1302] 本公开包括式(1)~(5)所示的化合物或其制药学上可接受的盐。此外,本公开的化合物有时也以水合物和/或与各种溶剂的溶剂化物(乙醇化物等)的形式存在,因此这些水合物和/或溶剂化物也包含在本公开的化合物中。

[1303] 进一步,本公开的化合物还包含基于光学活性中心的光学异构体、基于由分子内旋转的束缚产生的轴性或面性手性的阻转异构体、其它立体异构体、互变异构体、几何异构体等可能存在的所有异构体、和所有形式的晶型、进而它们的混合物。

[1304] 特别是光学异构体、阻转异构体,可以以外消旋体的形式得到,或者在使用光学活性的起始原料、中间体时,可以以光学活性体的形式得到。此外,根据需要,在前述制造方法的合适的阶段,可以通过使用光学活性柱的方法、分级结晶法等公知的分离方法,将对应的原料、中间体或最终品的外消旋体物理地或化学地拆分为它们的光学对映体。作为它们的拆分方法,可举出例如使外消旋体与光学活性拆分剂反应,合成2种非对映异构体,利用物理性质的差异,通过分级结晶等方法拆分的非对映异构体法等。

[1305] 想要获得本公开的化合物的制药学上可接受的盐时,在式(1)~(5)所示的化合物以制药学上可接受的盐的形式得到的情况下,只要直接纯化即可,此外,在以游离的形式得到的情况下,只要溶解或悬浮于适当的有机溶剂中,加入酸或碱,通过通常的方法形成盐即可。

[1306] 包封本公开的化合物的脂质体例如可以通过下述的方法来制造。

[1307] [工序1]

[1308] 将磷脂、胆固醇等膜构成成分溶解于氯仿等有机溶剂中,在烧瓶内蒸馏除去有机溶剂,由此在烧瓶内壁形成脂质混合物的薄膜。作为上述的替代,也可以溶解于叔丁基醇等中,然后进行冷冻干燥,由此以冷冻干燥物的形式得到脂质混合物。此外,将磷脂、胆固醇等膜构成成分溶解于有机溶剂中后,使用瞬间真空干燥装置CRUX(Hosokawa Micron株式会社制),也可以得到粉末化的脂质混合物,可以以Presome(注册商标)的名称由日本精化株式会社获得。

[1309] [工序2]

[1310] 在工序1中得到的脂质混合物中加入硫酸铵水溶液等内水相溶液并进行分散,由此得到粗脂质体分散液。

[1311] [工序3]

[1312] 使用挤出机,使工序2中得到的粗脂质体分散液通过过滤器,由此制为期望的粒径。或者,使用高压均化器将工序2中得到的粗脂质体分散液在高压下由喷嘴排出,由此制成期望的粒径。脂质体的粒径没有特别限定,例如为10nm~200nm、优选为30nm~150nm、更优选为40nm~140nm、进一步优选为50~120nm、最优选为60~100nm。脂质体的粒径是通过

动态光散射法测定的平均值,例如可以使用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)进行测定。

[1313] [工序4]

[1314] 将工序3中得到的脂质体液通过凝胶过滤、透析、切向流过滤或超速离心等置换外水相。

[1315] [工序5]

[1316] 将工序4中得到的置换了外水相的脂质体液与要包封的化合物一起进行孵育,由此将化合物包封于脂质体中。

[1317] [工序6]

[1318] 将所得包封有化合物的脂质体进行凝胶过滤、透析、切向流过滤或超速离心等,由此除去未包封的化合物。应予说明,工序5中得到了期望的包封率的情况下,可以省略工序6。

[1319] 本公开的化合物为了增强其效果,可以与其他药物并用来使用。具体地,本公开的化合物可以与激素治疗剂、化疗剂、免疫治疗剂或抑制细胞生长因子及其受体作用的药剂等药物并用来使用。以下,将能够与本公开的化合物并用的药物简记为并用药物。

[1320] 本公开的化合物即使以单剂形式使用也显示出优异的抗癌作用,通过进一步与前述并用药物的一种或数种并用(多剂并用),可以更进一步增强其效果或改善患者的QOL。

[1321] 作为“激素治疗剂”,可举出例如磷雌酚、已烯雌酚、氯苯达松、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸环丙孕酮、达那唑、地诺孕素、asoprinil、烯丙雌醇、孕烯酮、诺美孕酮、通尿灵(tadenan)、美帕曲星、雷洛昔芬、奥美昔芬、左美洛昔芬、抗雌激素(例如,柠檬酸他莫昔芬、柠檬酸托瑞米芬等)、丸剂、美替司他、睾内酯、氨鲁米特、LH-RH衍生物(LH-RH激动剂(例如,醋酸戈舍瑞林、布舍瑞林、亮丙瑞林等)、LH-RH拮抗剂)、屈洛昔芬、依匹醇、炔雌醇磺酸酯、芳香化酶抑制剂(例如,盐酸法罗唑、阿那曲唑、来曲唑、依西美坦、伏氯唑、福美司坦等)、抗雄激素(例如,氟他胺、恩杂鲁胺、阿帕鲁胺、比卡鲁胺、尼鲁米特等)、肾上腺皮质激素系药剂(例如,地塞米松、泼尼松龙、倍他米松、去炎松等)、雄激素合成抑制药(例如阿比特龙等)、维甲酸、和延缓维甲酸代谢的药剂(例如利阿唑等)等。

[1322] 作为“化疗剂”,可使用例如烷基化剂、代谢拮抗剂、抗癌性抗生素、植物来源抗癌剂、分子靶向治疗剂、免疫调节剂、其它化疗剂等。代表性的例子如以下所记载。

[1323] 作为“烷基化剂”,可举出例如氮芥、氮芥N-氧化物盐酸盐、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、卡波醌、甲苯磺酸英丙舒凡、白消安、盐酸尼莫司汀、米托糖醇、美法仑、达卡巴嗪、雷莫司汀、雌莫司汀磷酸钠、曲替胺、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲霉素、哌泊溴烷、依托格糖、卡铂、顺铂、米铂、奈达铂、奥沙利铂、六甲蜜胺、氨莫司汀、二溴螺氯铵、福莫司汀、泼尼莫司汀、嘌嗪替派、苯达莫司汀(ribomustin)、替莫唑胺、曲奥舒凡、曲磷胺、净司他丁替马拉美、阿多来新、半胱胺亚硝脲、比折来新、曲贝替定和它们的DDS制剂等。

[1324] 作为“代谢拮抗剂”,可举出例如巯基嘌呤、6-巯基嘌呤核苷、硫代肌苷、甲氨蝶呤、培美曲塞、依诺他滨、阿糖胞苷、阿糖胞苷烷磷酯、盐酸安西他滨、5-FU系药剂(例如,氟尿嘧啶、替加氟、UFT、去氧氟尿苷、卡莫氟、加洛他滨、乙嘧替氟、卡培他滨等)、氨基蝶呤、奈拉滨、甲叶酸钙、硫鸟嘌呤(tabloid)、布多辛、亚叶酸钙、左亚叶酸钙、克拉屈滨、乙嘧替氟、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、喷司他丁、吡曲克辛、碘苷、米托胍腙、噻唑呋林、氨莫司汀、苯达

莫司汀、和它们的DDS制剂等。

[1325] 作为“抗癌性抗生素”,可举出例如放线菌素D、放线菌素C、丝裂霉素C、色霉素A3、盐酸博来霉素、硫酸博来霉素、硫酸培洛霉素、盐酸柔红霉素、盐酸多柔比星、盐酸阿柔比星、盐酸吡柔比星、盐酸表柔比星、新制癌菌素、光辉霉素、肉瘤霉素、嗜癌素、米托坦、盐酸佐柔比星、盐酸米托蒽醌、盐酸伊达比星、艾立布林、和它们的DDS制剂等。

[1326] 作为“植物来源抗癌剂”,可举出例如依托泊苷、磷酸依托泊苷、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、硫酸长春地辛、替尼泊甙、紫杉醇、多西他赛、DJ-927、长春瑞滨、伊立替康、拓扑替康、和它们的DDS制剂等。

[1327] 作为“分子靶向治疗剂”,可举出例如伊马替尼、吉非替尼、厄洛替尼、索拉非尼、达沙替尼、舒尼替尼、尼洛替尼、拉帕替尼、帕唑帕尼、鲁索替尼、克里唑替尼、维莫非尼、凡德他尼、普纳替尼、卡博替尼、托法替尼、瑞格菲尼、博苏替尼、阿昔替尼、达拉非尼、曲美替尼、尼达尼布、艾德拉尼、色瑞替尼、乐伐替尼、帕博西尼、阿来替尼、阿法替尼、奥希替尼、瑞博西尼、阿贝西利、布加替尼、来那替尼、库潘尼西、卡比替尼、依鲁替尼、阿卡替尼、康奈非尼、比美替尼、巴瑞替尼、福他替尼、劳拉替尼、厄达替尼、恩曲替尼、达克替尼、西罗莫司、依维莫司、坦罗莫司、奥拉帕尼、瑞卡帕尼、尼拉帕尼、维奈妥拉、阿扎胞苷、地西他滨、伏立诺他、帕比司他、罗米地辛、硼替佐米、卡非佐米、拉罗替尼和伊沙佐米等。

[1328] 作为“免疫调节剂”,可举出例如来那度胺和泊马度胺等。

[1329] 作为“其它化疗剂”,可举出例如索布佐生等。

[1330] 作为“免疫治疗剂(BRM)”,可举出例如毕西巴尼、云芝多糖、西索菲兰、香菇多糖、乌苯美司、干扰素、白细胞介素、巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素、淋巴毒素、BCG疫苗、短小棒杆菌、左旋咪唑、多糖K、丙考达唑、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、Toll样受体激动剂(例如,TLR7激动剂、TLR8激动剂、TLR9激动剂等)。

[1331] 作为抑制细胞生长因子及其受体的作用的药剂中的细胞生长因子,只要是促进细胞增殖的物质,则可以是任意物质,通常是分子量为20,000以下的肽,可举出通过与受体结合而在低浓度下发挥作用的因子。具体可举出:EGF(表皮生长因子)或与其具有实质上相同活性的物质(例如,TGFalpha等)、胰岛素或与其具有实质上相同活性的物质(例如,胰岛素、IGF(胰岛素样生长因子)-1、IGF-2等)、FGF(成纤维细胞生长因子)或与其具有实质上相同分析的物质(例如,酸性FGF、碱性FGF、KGK(角质细胞生长因子)、FGF-10等)、以及其它细胞生长因子(例如,CSF(集落刺激因子)、EPO(红细胞生成素)、IL-2(白细胞介素-2)、NGF(神经生长因子)、PDGF(血小板衍生生长因子)、TGF-β(转化生长因子β)、HGF(肝细胞生长因子)、VEGF(血管内皮生长因子)、调蛋白、血管生成素等)。

[1332] 本公开的化合物和并用药物的施用时期没有限定,可以将它们向施用对象同时施用,也可以隔开时间差施用。此外,可以制成本公开的化合物与并用药物的合剂。并用药物的施用量可以以临床上使用的用量为基准来适宜选择。此外,本公开的化合物与并用药物的配混比可以根据施用对象、施用路径、对象疾病、症状、组合等而适宜选择。例如施用对象为人的情况下,相对于本公开的化合物1重量份,只要使用并用药物0.01～100重量份即可。此外,为了抑制其副作用,可以与止吐剂、睡眠诱导剂、抗惊厥药等药剂(并用药物)组合使用。

[1333] “对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性”是指在实体瘤中即使施用免疫检查点抑制

剂也不会抑制肿瘤的增大的状态。对抗PD-1抗体示出抗性是指即使施用上述抗PD-1抗体也不会抑制肿瘤的增大的状态。对抗PD-L1抗体示出抗性是指即使施用上述的抗PD-L1抗体也不会抑制肿瘤的增大的状态。在血液癌中是指即使施用免疫检查点抑制剂也不会抑制血液中的癌细胞数的增加的状态。对抗PD-1抗体示出抗性是指即使施用上述的抗PD-1抗体也不会抑制血液中的癌细胞数的增加的状态。抗PD-L1抗体示出抗性是指即使施用上述的抗PD-L1抗体也不会抑制血液中的癌细胞的数的增加的状态。

[1334] 抗PD-1抗体是指识别PD-1分子的蛋白质,是具有Y字型的4根链结构(轻链·重链的2种多肽链各2根),通过Fab部位选择性识别1个分子的分子。抗PD-1抗体可通过在制备使产生抗体的B细胞和骨髓瘤发生细胞融合而得到的杂交瘤后,对培养上清中分泌的抗体进行纯化而制造。

[1335] 巨噬细胞的M1-M2比是指由M1巨噬细胞的标志物(例如,CD86、STAT1、IL-1beta、iNOS、CXCL9、CXCL10等)定义的细胞群与由M2巨噬细胞的标志物(例如,Mrc1、Arg1、CD163等)定义的细胞群的比率。该值越高则肿瘤内的环境越变为炎症性的环境,意味着抗PD-1/PD-L1抗体越容易发挥效果。

[1336] 具有高肿瘤突变负荷(Tumor Mutation Burden-High;TMB-High)的实体癌是指FoundationOne CDx癌症基因组图谱(Cancer Genomic Profile)中测得的TMB评分示出10mut/Mb以上的癌症。

[1337] 抗PD-1抗体应答性的患者是指通过施用抗PD-1抗体而抑制肿瘤增大的状态。抑制肿瘤增大的状态是指RECIST基准中病情稳定(SD)、部分缓解(PR)、完全缓解(CR)的任意状态。特别是抑制肿瘤增大的效果持续6个月(24周)以上的状态称为持久临床获益(Durable Clinical Benefit,DCB)。

[1338] CHK1抑制剂和免疫检查点抑制剂被同时施用后,可在3天后、1周后、2周后、3周后、4周后、5周后或6周后施用抗PD-1抗体。

[1339] 作为对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的巨噬细胞的M1-M2比,优选为21以下、20以下、19以下、18以下、17以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下、9.9以下、9.8以下、9.7以下、9.6以下、9.5以下、9.4以下、9.3以下、9.2以下、9.1以下、9.0以下、8.9以下、8.8以下、8.7以下、8.6以下、8.5以下、8.4以下、8.3以下、8.2以下、8.1以下、8.0以下、7.9以下、7.8以下、7.7以下、7.6以下、7.5以下、7.4以下、7.3以下、7.2以下、7.1以下、7.0以下、6.9以下、6.8以下、6.7以下、6.6以下、6.5以下、6.4以下、6.3以下、6.2以下、6.1以下、6.0以下、5.9以下、5.8以下、5.7以下、5.6以下、5.5以下、5.4以下、5.3以下、5.2以下、5.1以下、5.0以下、4.9以下、4.8以下、4.7以下、4.6以下、4.5以下、4.4以下、4.3以下、4.2以下、4.1以下、4.0以下、3.9以下、3.8以下、3.7以下、3.6以下、3.5以下、3.4以下、3.3以下、3.2以下、3.1以下、3.0以下、2.9以下、2.8以下、2.7以下、2.6以下、2.5以下、2.4以下、2.3以下、2.2以下、2.1以下、2.0以下、1.9以下、1.8以下、1.7以下、1.6以下、1.5以下、1.4以下、1.3以下、1.2以下、1.1以下、1.0以下、0.9以下、0.8以下、0.7以下、0.6以下、0.5以下、0.4以下、0.3以下、0.2以下、0.1以下。

[1340] 作为对免疫检查点抑制剂示出治疗抗性的癌症患者的肿瘤组织内的CD8阳性细胞数,优选为0.135以下、0.130以下、0.125以下、0.120以下、0.115以下、0.110以下、0.095以下、0.090以下、0.085以下、0.080以下、0.075以下、0.070以下、0.065以下、0.060以下、

0.055以下、0.050以下、0.045以下、0.040以下、0.035以下、0.030以下、0.025以下、0.020以下、0.015以下、0.010以下。

[1341] 在本说明书中,“或”在能够采用文章中列举的事项的“至少1个以上”时使用。“或者”也同样。在本说明书中,当以“2个值的范围内”的形式记载时,该范围也包括2个值自身。

[1342] 本说明书中引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献均以与各自具体记载的相同程度通过参考将其全部内容援用于本说明书中。

[1343] 以上,为了容易理解而示出优选的实施方式对本公开进行了说明。以下,基于实施例对本公开进行说明,但上述说明和以下的实施例仅以例示的目的提供,并非以限定本公开的目的提供。因此,本发明的范围并不限于本说明书中具体记载的实施方式或实施例,而仅由权利要求书限定。

[1344] 实施例

[1345] 以下通过参考例、实施例和试验例进而具体地说明本公开,但本发明不限于此。

[1346] 在本说明书中,有时使用以下缩写。

[1347] Ts:对甲苯磺酰基

[1348] THF:四氢呋喃

[1349] TFA:三氟乙酸

[1350] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[1351] DMSO:二甲基亚砜

[1352] MeCN:乙腈

[1353] Me:甲基

[1354] Boc:叔丁氧基羰基

[1355] Dess-Martin试剂:Dess-Martin过碘烷(1,1,1-三乙酰氧基-1,1-二氢-1,2-苯碘酰-3-(1H)-酮)

[1356] 化合物鉴定中使用的NMR(Nuclear Magnetic Resonance)数据是通过日本电子株式会社的JNM-ECS400型核磁共振装置(400MHz)取得的。

[1357] 作为NMR中使用的符号,s是指单峰、d是指双峰、dd是指二重双峰、t是指三重峰、td是指三重双峰、q是指四重峰、m是指多重峰、br是指宽峰、brs是指宽单峰、brm是指宽多重峰、以及J是指键合常数。

[1358] 化合物鉴定中使用的LC/MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)分析条件如下所述。观察到的质谱[MS(m/z)]中,对应于单一同位素质量(仅包含主同位素的精密质量)的值用$[M+H]^+$、$[M-H]^-$或$[M+2H]^{2+}$等表示,保留时间用Rt(分钟)表示。

[1359] 测定条件A

[1360] 检测仪器:ACQUITY(注册商标)SQ detector(Waters公司)

[1361] HPLC:ACQUITY UPLC(注册商标)系统

[1362] 柱:Waters ACQUITYUPLC(注册商标)BEHC18(1.7μm,2.1mm×30mm)

[1363] 溶剂:A液:0.06%甲酸/H_2O,B液:0.06%甲酸/MeCN

[1364] 梯度条件:0.0-1.3min线性梯度B 2%-96%

[1365] 流速:0.8mL/min

[1366] UV:220nm和254nm

[1367] 柱温:40℃

[1368] 测定条件B

[1369] 检测机器:APCI 6120Quadrupole LC/MS(Agilent Technologies公司)

[1370] HPLC:Agilent Technologies 1260Infinity(注册商标)系统

[1371] 柱:Agilent Technologies(注册商标)ZORBAX SB-C18(1.8μm,2.1mm×50mm)

[1372] 溶剂:A液:0.1%甲酸/H_2O,B液:MeCN

[1373] 梯度条件:0.0-5.0min线性梯度B 5%-90%

[1374] 流速:0.6mL/min

[1375] UV:210nm,254nm,and 280nm

[1376] 柱温:40℃

[1377] 测定条件C

[1378] 检测机器:Shimadzu LCMS-2020

[1379] 柱:L-柱-2ODS(4.6mm×35mm)

[1380] 梯度条件:MeCN/H_2O/HCO_2H=10/90/0.1→100/0/0.1(0-2min)、100/0/0.1(2-4min)

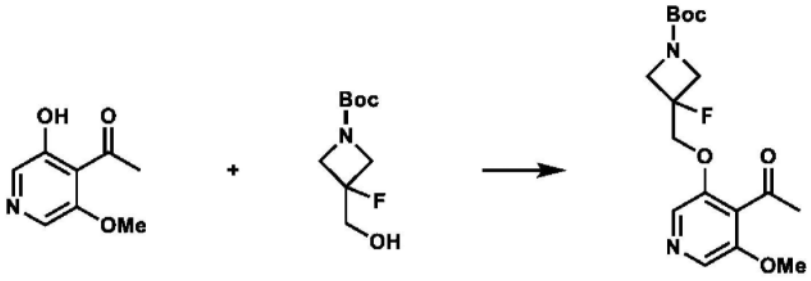
[1381] 流速:2mL/min

[1382] 柱温:40℃

[1383] 参考例1:

[1384] 3-{[(4-乙酰基-5-甲氧基吡啶-3-基)氧基]甲基}-3-氟氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁基酯

[1385] [化35]

[1386] 

参考例1

[1387] 3-{[(4-乙酰基-5-甲氧基吡啶-3-基)氧基]甲基}-3-氟氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁基酯(参考例1)的制造

[1388] 在室温下向1-(3-羟基-5-甲氧基-4-吡啶基)乙酮(1.00g)的THF(50.0mL)溶液中加入3-氟-3-(羟基甲基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁基酯(1.85g)、三苯基膦(3.15g),冷却至0℃。加入偶氮二甲酸二异丙基酯(2.5mL),在0℃下搅拌12小时。向反应液中加入饱和食盐水,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到参考例1(720mg)。

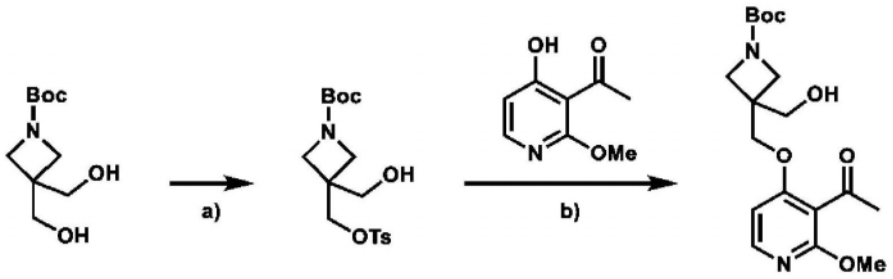
[1389] LC-MS;$[M+H]^+$355.2/Rt(分钟)0.886(测定条件A)

[1390] 参考例2:

[1391] 3-{[(3-乙酰基-2-甲氧基吡啶-4-基)氧基]甲基}-3-(羟基甲基)氮杂环丁烷-1-

甲酸叔丁基酯

[1392] [化36]

[1393] 

参考例2

[1394] a)3-(羟基甲基)-3-{[(4-甲基苯-1-磺酰基)氧基]甲基}氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁基酯的制造

[1395] 在0℃下向3,3-双(羟基甲基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁基酯(1.50g)的二氯甲烷(20.0mL)溶液中加入吡啶(5.60mL)、三甲基胺盐酸盐(0.13g)、对甲苯磺酰氯(1.45g),在室温下搅拌12小时。将饱和食盐水加入反应液中,急冷后,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去,由此得到标题化合物(2.30g)。所得残渣不进行纯化直接用于后面的反应。

[1396] LC-MS;$[M+H]^+$372.1/Rt(分钟)0.928(测定条件A)

[1397] b)3-{[(3-乙酰基-2-甲氧基吡啶-4-基)氧基]甲基}-3-(羟基甲基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁基酯(参考例2)的制造

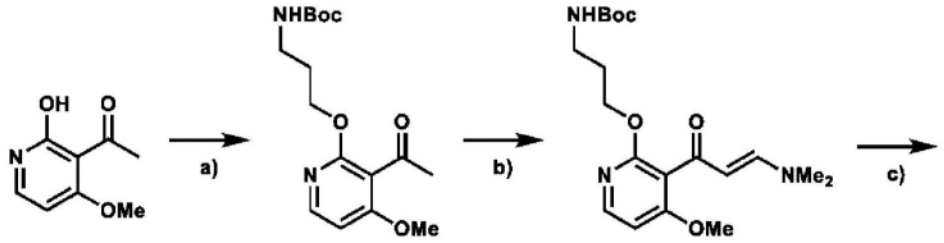
[1398] 向3-(羟基甲基)-3-{[(4-甲基苯-1-磺酰基)氧基]甲基}氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁基酯(2.30g)的DMF(10.0mL)溶液中加入1-(4-羟基-2-甲氧基-3-吡啶基)乙酮(1.00g)、碳酸铯(7.80g),在室温下搅拌12小时。向反应液中加入饱和食盐水,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到参考例2(1.01g)。

[1399] LC-MS;$[M+H]^+$367.3/Rt(分钟)0.796(测定条件A)

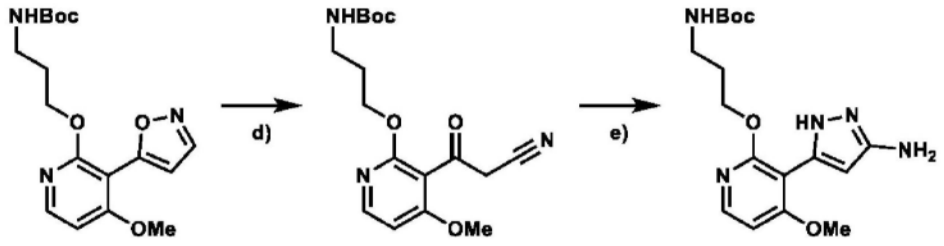
[1400] 参考例3:

[1401] (3-{[3-(3-氨基-1H-吡唑-5-基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯

[1402] [化37]



[1403]



参考例3

[1404] a){3-[(3-乙酰基-4-甲氧基吡啶-2-基)氧基]丙基}氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1405] 在0℃下向1-(2-羟基-4-甲氧基吡啶-3-基)乙酮(2.00g)的DMF(40.0mL)溶液中加入碳酸铯(7.80g)、3-(Boc-氨基)丙基溴(4.27g),在室温下搅拌12小时。向反应液中加入饱和食盐水,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(2.25g)。

[1406] LC-MS;$[M+H]^+$325.2/Rt(分钟)0.959(测定条件A)

[1407] 1H-NMR($CDCl_3$)δ:8.06(1H,d,J=6.0Hz),6.55(1H,d,J=6.0

[1408] Hz),4.97(1H,brs),4.40(2H,t,J=6.4Hz),3.86(3H,s),3.27-3.24(2H,m),2.49(3H,s),1.96-1.90(2H,m),1.44(9H,s).

[1409] b)[3-({3-[(2E)-3-(二甲基氨基)丙-2-烯基]-4-甲氧基吡啶-2-基}氧基)丙基]氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1410] 向{3-[(3-乙酰基-4-甲氧基吡啶-2-基)氧基]丙基}叔丁基氨基甲酸酯(2.25g)的DMF(10.0mL)溶液中加入N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(10.0mL),在115℃下搅拌24小时。放冷后,将反应液的溶剂减压馏去,由此以粗产物的形式得到标题化合物(4.30g)。

[1411] LC-MS;$[M+H]^+$380.3/Rt(分钟)0.722(测定条件A)

[1412] c)(3-{[4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1413] 向[3-({3-[(2E)-3-(二甲基氨基)丙-2-烯基]-4-甲氧基吡啶-2-基}氧基)丙基]氨基甲酸叔丁基酯(4.30g)的乙醇(30.0mL)溶液中加入羟基胺盐酸盐(5.49g),在65℃下搅拌2小时。放冷后,将反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液,急冷。将所得水溶液用乙酸乙酯提取2次。将所得有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(1.63g)。

[1414] LC-MS;$[M+H]^+$350.2/Rt(分钟)0.722(测定条件A)

[1415] 1H-NMR($CDCl_3$)δ:8.32(1H,d,J=1.6Hz),8.12(1H,d,J=6.0Hz),6.64(1H,d,J=6.0Hz),6.59(1H,d,J=1.6Hz),4.87(1H,brs),4.45(2H,t,J=6.4Hz),3.92(3H,s),3.28-3.24(2H,m),1.99-1.93(2H,m),1.44(9H,s).

[1416] d)(3-{[3-(氰基乙酰基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1417] 向(3-{[4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯(1.63g)的乙醇(20.0mL)和水(5.00mL)的混合溶液中加入氢氧化钾(0.29g),在室温下搅拌5小时。将反应液减压浓缩,将残渣加入饱和食盐水,急冷。将所得水溶液用乙酸乙酯提取2次。将所得有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(1.50g)。

[1418] LC-MS;$[M+H]^+$350.2/Rt(分钟)0.872(测定条件A)

[1419] 1H-NMR($CDCl_3$)δ:8.14(1H,d,J=6.0Hz),6.59(1H,d,J=6.0Hz),4.94(1H,brs),4.44(2H,t,J=6.0Hz),3.92(3H,s),3.29-3.23(2H,m),1.99-1.93(2H,m),1.43(9H,s).

[1420] e)(3-{[3-(3-氨基-1H-吡唑-5-基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯(参考例3)的制造

[1421] 在0℃下向(3-{[3-(氰基乙酰基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯(1.99g)的乙醇(20.0mL)溶液中加入乙酸(3.28mL)、肼一水合物(2.78mL),90℃下搅拌24小时。放冷后,将反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液,急冷。将所得水溶液用氯仿提取2次。将所得有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(氯仿/甲醇)纯化,由此得到参考例3(1.60g)。

[1422] LC-MS;$[M+H]^+$364.0/Rt(分钟)0.684(测定条件A)

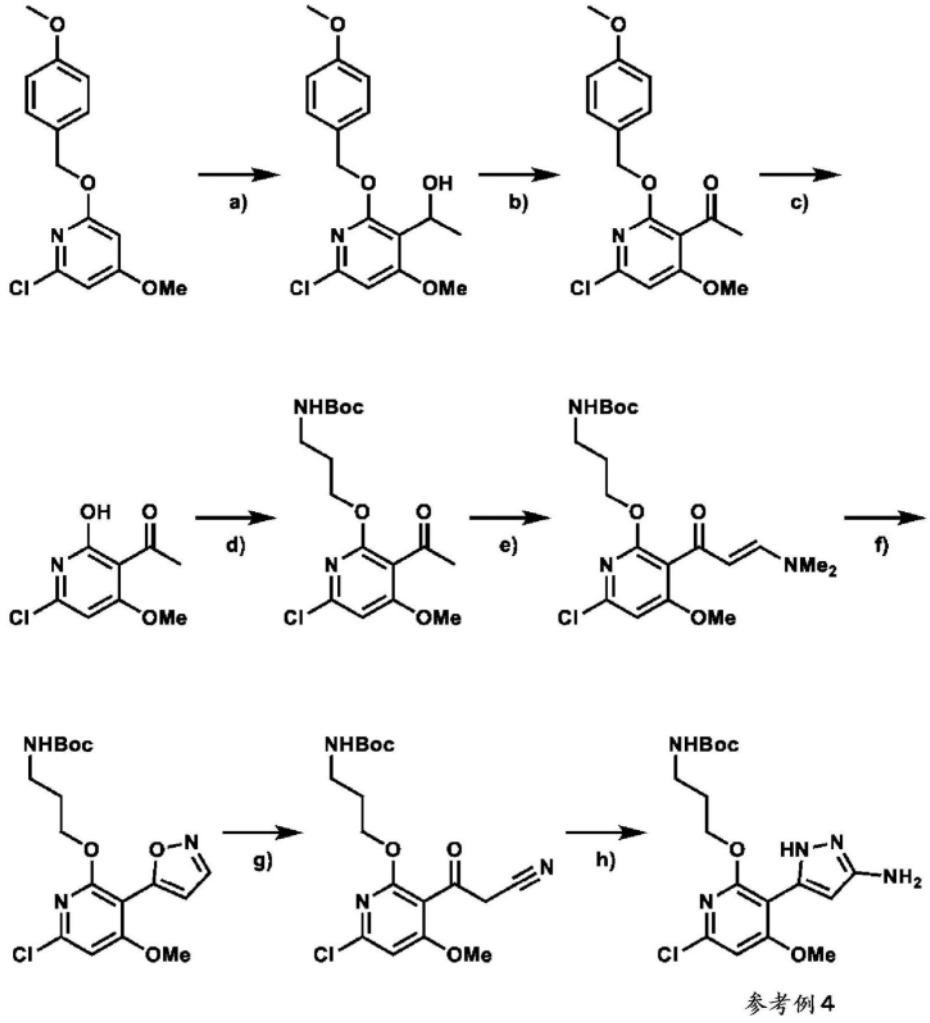
[1423] 1H-NMR(DMSO-D6)δ:11.61-10.91(1H,brs),8.01(1H,d,J=12.0Hz),6.93-6.89(1H,m),6.84(1H,d,J=6.0Hz),5.93(1H,brs),4.50(1H,brs),4.32(2H,t,J=6.4Hz),3.89(3H,s),3.09-3.04(2H,m),1.86-1.79(2H,m),1.37(9H,s).

[1424] 参考例4:

[1425] (3-{[3-(3-氨基-1H-吡唑-5-基)-6-氯-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯

[1426] [化38]

[1427]



参考例4

[1428] a)1-{6-氯-4-甲氧基-2-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]吡啶-3-基}乙烷-1-醇的制造

[1429] 将2-氯-4-甲氧基-6-[(4-甲氧基苯甲基)氧基]吡啶(10.0g)的THF(100mL)溶液冷却至-78℃。加入2.8mol/L的正丁基锂(15.3mL),在-78℃下搅拌3小时。加入乙酰胺(6.30mL),在-78℃下搅拌6小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液,急冷,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(4.25g)。

[1430] LC-MS;$[M+H]^+$324.2/Rt(分钟)1.118(测定条件A)

[1431] 1H-NMR($CDCl_3$)δ:7.36(2H,d,J=8.8Hz),6.89(2H,d,J=8.8

[1432] Hz),6.55(1H,s),5.32(2H,s),5.16-5.11(1H,m),3.85(3H,s),

[1433] 3.80(3H,s),3.30(1H,s),1.41(3H,d,J=6.8Hz).

[1434] 13C-NMR($CDCl_3$)δ:165.2,159.6,147.6,130.1,128.6,114.1,112.6,101.8,68.7,62.9,56.3,55.4,23.1.

[1435] b)1-{6-氯-4-甲氧基-2-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]吡啶-3-基}乙烷-1-酮的制造

[1436] 向1-{6-氯-4-甲氧基-2-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]吡啶-3-基}乙烷-1-醇(3.15g)的二氯甲烷(100mL)溶液中加入Dess-Martin试剂(6.19g),在室温下搅拌12小时。将反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液,急冷。将所得水溶液用乙酸乙酯提取2次。将所得有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱

(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(2.50g)。

[1437] LC-MS;[M+H]+322.2/Rt(分钟)1.081(测定条件A)

[1438] c)1-(6-氯-2-羟基-4-甲氧基吡啶-3-基)乙烷-1-酮的制造

[1439] 向1-{6-氯-4-甲氧基-2-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]吡啶-3-基}乙烷-1-酮(2.50g)的二氯甲烷(30.0mL)溶液中加入TFA(6.00mL),在室温下搅拌2小时。将溶剂减压馏去,将残渣用胺硅胶柱色谱(氯仿/甲醇)纯化,得到标题化合物(2.00g)。

[1440] LC-MS;[M+H]+202.1/Rt(分钟)0.773(测定条件A)

[1441] d){3-[(3-乙酰基-6-氯-4-甲氧基吡啶-2-基)氧基]丙基}氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1442] 在0℃下向1-(6-氯-2-羟基-4-甲氧基吡啶-3-基)乙烷-1-酮(3.00g)的DMF(50.0mL)溶液中加入碳酸铯(9.70g)、3-(Boc-氨基)丙基溴(5.63g),在室温下搅拌12小时。向反应液中加入饱和食盐水,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(1.01g)。

[1443] LC-MS;[M+H]+359.3/Rt(分钟)1.123(测定条件A)

[1444] e)[3-({6-氯-3-[(2E)-3-(二甲基氨基)丙-2-烯基]-4-甲氧基吡啶-2-基}氧基)丙基]氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1445] 向{3-[(3-乙酰基-6-氯-4-甲氧基吡啶-2-基)氧基]丙基}氨基甲酸叔丁基酯(840mg)的DMF(10.0mL)溶液中加入N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(3.00mL),在115℃下搅拌24小时。放冷后,将反应液的溶剂减压馏去,由此以粗产物的形式得到标题化合物(0.97g)。

[1446] LC-MS;[M+H]+414.4/Rt(分钟)0.944(测定条件A)

[1447] f)(3-{[6-氯-4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1448] 向[3-({6-氯-3-[(2E)-3-(二甲基氨基)丙-2-烯基]-4-甲氧基吡啶-2-基}氧基)丙基]氨基甲酸叔丁基酯(0.97g)的乙醇(30.0mL)溶液中加入羟基胺盐酸盐(1.70g),在65℃下搅拌2小时。放冷后,将反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液,急冷。将所得水溶液用乙酸乙酯提取2次。将所得有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(677mg)。

[1449] LC-MS;[M+H]+384.3/Rt(分钟)1.132(测定条件A)

[1450] g)(3-{[6-氯-3-(氰基乙酰基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1451] 向(3-{[6-氯-4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯(677mg)的乙醇(20.0mL)和水(5.00mL)的混合溶液中加入氢氧化钾(100mg),在室温下搅拌2小时。将反应液减压浓缩,将残渣加入饱和食盐水,急冷。将所得水溶液用乙酸乙酯提取2次。将所得有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(470mg)。

[1452] LC-MS;[M+H]+384.3/Rt(分钟)1.064(测定条件A)

[1453] h)(3-{[3-(3-氨基-1H-吡唑-5-基)-6-氯-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基

甲酸叔丁基酯(参考例4)的制造

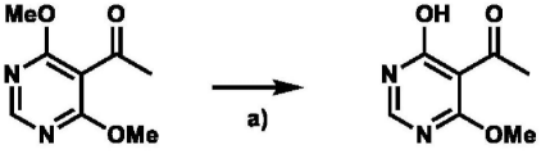
[1454] 在0℃下向(3-{[6-氯-3-(氰基乙酰基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯(470mg)的乙醇(20.0mL)溶液中加入乙酸(0.71mL)、肼一水合物(0.77mL),在90℃下搅拌24小时。放冷后,将反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液,急冷。将所得水溶液用氯仿提取2次。将所得有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(氯仿/甲醇)纯化,由此得到参考例4(350mg)。

[1455] LC-MS;$[M+H]^+$398.3/Rt(分钟)0.911(测定条件A)

[1456] 参考例5:

[1457] 1-(4-羟基-6-甲氧基嘧啶-5-基)乙烷-1-酮

[1458] [化39]

[1459] 

参考例5

[1460] a)1-(4-羟基-6-甲氧基嘧啶-5-基)乙烷-1-酮的制造

[1461] 在-60℃下向1-(4,6-二甲氧基嘧啶-5-基)乙烷-1-酮(2.00g)的二氯甲烷(30.0mL)溶液中加入三溴化硼的二氯甲烷溶液(1.0mol/L,54.9mL),在-50℃以下搅拌3小时。向反应液中加入饱和食盐水,急冷后,用氯仿提取。将有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(甲醇/氯仿)纯化,由此得到标题化合物(220mg)。

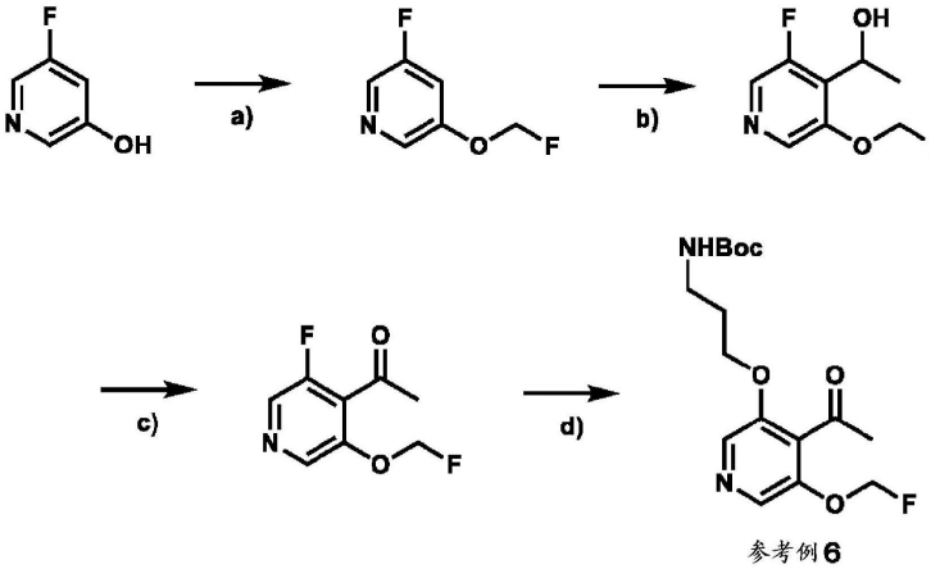
[1462] LC-MS;$[M+H]^+$169.1/Rt(分钟)0.367(测定条件A)

[1463] 1H-NMR($CDCl_3$)δ:14.31(1H,brs),8.36(1H,s),4.10(3H,s),2.65(3H,s).

[1464] 参考例6:

[1465] (3-{[4-乙酰基-5-(氟甲氧基)吡啶-3-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯

[1466] [化40]

[1467] 

参考例6

[1468] a)3-氟-5-(氟甲氧基)吡啶的制造

[1469] 在室温下向5-氟吡啶-3-醇(1.00g)的DMF(30.0mL)溶液中加入碳酸铯(4.32g)、氟甲基4-甲基苯磺酸酯(2.17g),在80℃下加热搅拌8小时。向反应液加入水,用二乙醚提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(538mg)。

[1470] LC-MS;$[M+H]^+$146.0/Rt(分钟)0.574(测定条件A)

[1471] b)1-[3-氟-5-(氟甲氧基)吡啶-4-基]乙烷-1-醇的制造

[1472] 将N,N-二异丙基乙基胺(0.687mL)的THF(15mL)溶液冷却至-78℃,加入正丁基锂(1.58moL/L、3.05mL),在0℃下搅拌15分钟。将反应液再次冷却至-78℃,加入3-氟-5-(氟甲氧基)吡啶(538mg),搅拌1小时后,加入乙醛(0.419mL)。将反应液慢慢升温至室温,整夜搅拌后,向反应液加入水,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(475mg)。

[1473] LC-MS;$[M+H]^+$190.1/Rt(分钟)0.494(测定条件A)

[1474] 1H-NMR(CDCl3)δ:8.30(1H,d,J=1.8Hz),8.26(1H,s),5.85(1H,dd,J=6.7,3.1Hz),5.71(1H,dd,J=7.2,3.2Hz),5.31-5.22(1H,m),2.60(1H,dd,J=9.8,1.8Hz),1.59(3H,d,J=6.7Hz).

[1475] c)1-[3-氟-5-(氟甲氧基)吡啶-4-基]乙烷-1-酮的制造

[1476] 将1-[3-氟-5-(氟甲氧基)吡啶-4-基]乙烷-1-醇(475mg)的二氯甲烷(10.0mL)溶液进行冰冷却,加入Dess-Martin试剂(1.60g),在室温下进行整夜搅拌。向反应液中加入硫代硫酸钠水溶液和饱和碳酸氢钠水溶液,用氯仿提取。将所得有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(407mg)。

[1477] LC-MS;$[M+H]^+$188.0/Rt(分钟)0.618(测定条件A)

[1478] d)(3-{[4-乙酰基-5-(氟甲氧基)吡啶-3-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1479] 向1-[3-氟-5-(氟甲氧基)吡啶-4-基]乙烷-1-酮(407mg)和碳酸铯(1.42g)的DMF(10.0mL)溶液中加入(3-羟基丙基)氨基甲酸叔丁基酯(762mg),在80℃下加热搅拌8小时。向反应液加入水,用二乙醚提取。将有机层用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(67mg)。

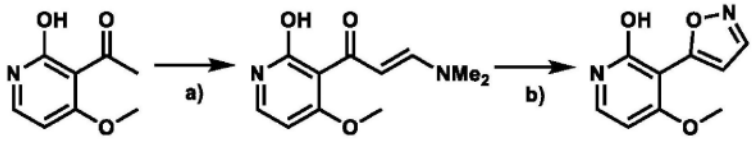
[1480] LC-MS;$[M+H]^+$343.2/Rt(分钟)0.832(测定条件A)

[1481] 1H-NMR(CDCl3)δ:8.22(1H,d,J=1.8Hz),8.16(1H,s),5.68(2H,d,J=53.6Hz),4.70(1H,brs),4.15(2H,t,J=6.1Hz),3.32-3.21(2H,m),2.50(3H,s),2.00-1.93(2H,m),1.41(9H,s).

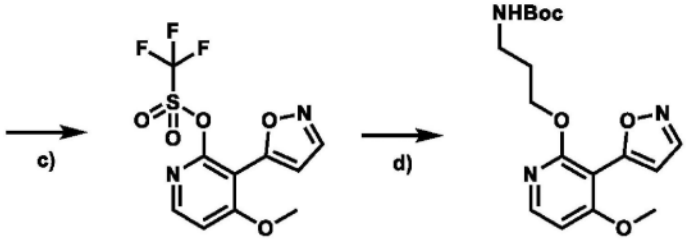
[1482] 参考例7:

[1483] (3-{[4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯

[1484] [化41]



[1485]



参考例7

[1486] a)(2E)-3-(二甲基氨基)-1-(2-羟基-4-甲氧基吡啶-3-基)丙-2-烯-1-酮的制造

[1487] 向1-(2-羟基-4-甲氧基吡啶-3-基)乙酮(2.50g)和甲苯(6.23ml)的混合物中加入叔丁氧基双(二甲基氨基)甲烷(5.21g),在55℃下加热搅拌6小时。放冷后,滴加甲苯(18.6ml),过滤并收集生成的晶体,用甲苯洗涤。将晶体真空干燥而得到标题化合物(2.87g)。将滤液减压浓缩,将从乙醇/甲苯混合溶剂中析出的晶体用乙醇/甲苯混合溶剂洗涤,真空干燥而得到标题化合物的第2晶体(0.20g)。

[1488] LC-MS;$[M+H]^+$223.1/Rt(分钟)1.564

[1489] 1H-NMR(DMSO-D6)δ:11.25(1H,br s),7.39(1H,d,J=6.7Hz),7.11(1H,br s),6.21(1H,d,J=7.9Hz),5.00(1H,d,J=11.0Hz),3.73(3H,s),3.00(3H,br s),2.75(3H,br s).

[1490] b)4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-醇的制造

[1491] 向(2E)-3-(二甲基氨基)-1-(2-羟基-4-甲氧基吡啶-3-基)丙-2-烯-1-酮(2.50g)和乙醇(37.5ml)的混合物中加入羟基胺盐酸盐(1.56g),在室温下搅拌16小时。向反应混合物中加入水(37.5ml),减压浓缩直至达到28.5g后,再加入水(9.0ml),在0℃下搅拌。过滤并收集生成的晶体,用冷水洗涤,真空干燥,由此得到标题化合物(1.53g)。

[1492] LC-MS;$[M+H]^+$193.1/Rt(分钟)0.928

[1493] 1H-NMR(DMSO-D6)δ:11.83(1H,br s),8.51(1H,d,J=1.8Hz),7.61(1H,d,J=7.3Hz),6.83(1H,d,J=1.8Hz),6.38(1H,d,J=7.3Hz),3.93(3H,s).

[1494] c)4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基三氟甲烷磺酸酯的制造

[1495] 向4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-醇(1.23g)和吡啶(6.1ml)的混合物中在0℃下滴加三氟甲磺酸酐(2.16g)。将反应混合物升温,在室温下搅拌16小时。将反应混合物冷却至0℃,滴加水(16ml),在0℃下搅拌1.5小时。过滤并收集生成的晶体,用水/吡啶混合溶剂洗涤,接着用水洗涤,真空干燥,由此得到标题化合物(1.91g)。

[1496] LC-MS;$[M+H]^+$325.0/Rt(分钟)4.781

[1497] 1H-NMR(CDCl3)δ:8.37(1H,d,J=1.8Hz),8.32(1H,d,J=6.1Hz),7.01(1H,d,J=6.1Hz),6,67(1H,d,J=1.8Hz),4.00(3H,s).

[1498] d)(3-{[4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯的制造

[1499] 向4-甲氧基-3-(1,2-噁唑-5-基)吡啶-2-基三氟甲烷磺酸酯(50mg)和叔丁基(3-

羟基丙基)氨基甲酸酯(54mg)、4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基呫吨(18mg)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)氯仿加成物(16mg)、甲苯(1.5ml)的混合物中加入二异丙基乙基胺(72mg),在100℃下加热搅拌4小时。将反应混合物放冷后,将不溶物用硅藻土过滤除去,用乙酸乙酯洗涤。将滤液浓缩,将残渣用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(30mg)。

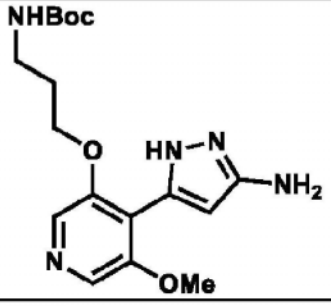
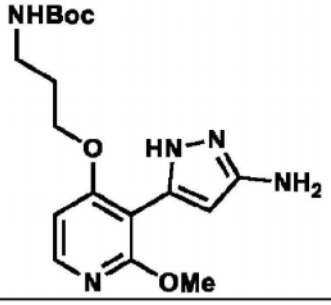
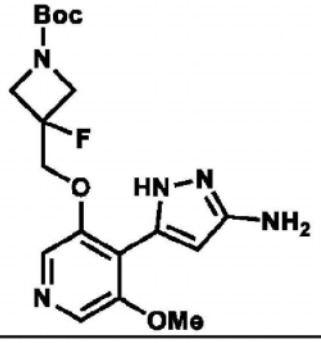
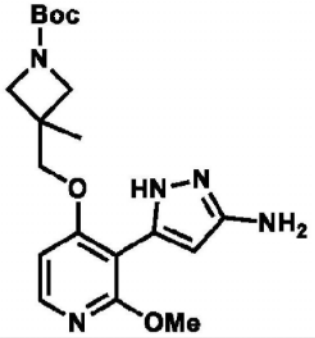
[1500] LC-MS;$[M+H]^+$350.2/Rt(分钟)4.647

[1501] 参考例8～41:

[1502] 使用对应的原料化合物,利用与参考例1～7所述的方法相同的方法,得到下表所示的参考例8～41的化合物

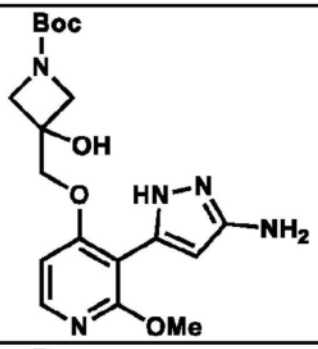
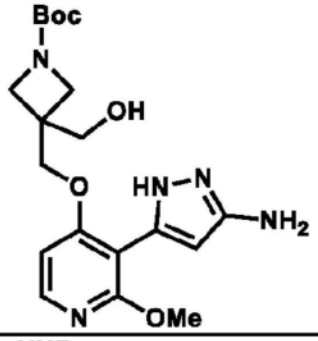
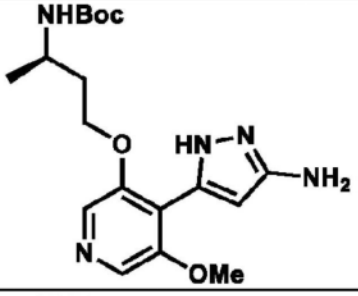
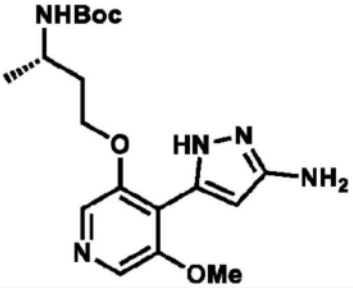
[1503] [表1-1]

[1504]

参考例	结构式	LC－MS；[M+H]$^+$ 保留时间（分钟）	测定条件
8		364.3／0.724	A
9		364.3／0.722	A
10		394.3／0.660	A
11		390.6／0.714	A

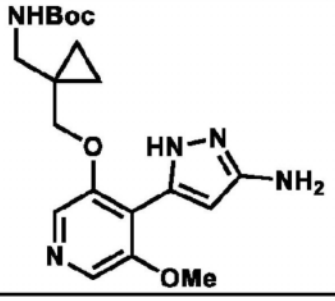
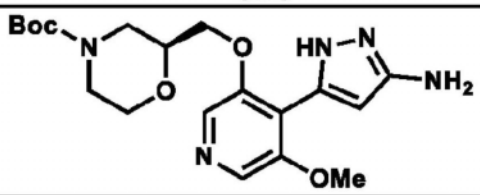
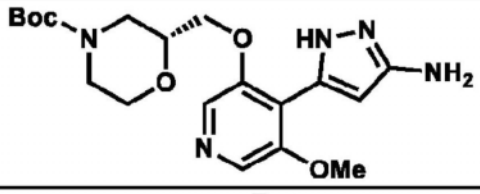
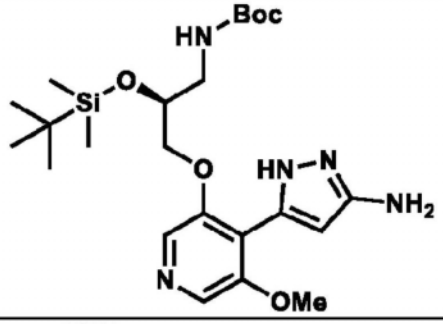
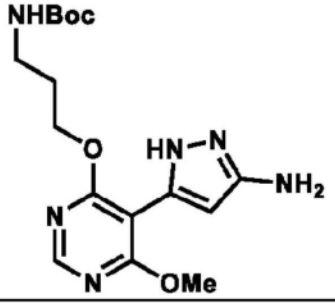
[1505] [表1-2]

[1506]

12		392.4／0.632	A
13		406.4／0.658	A
14		378.3／0.610	A
15		378.3／0.616	A

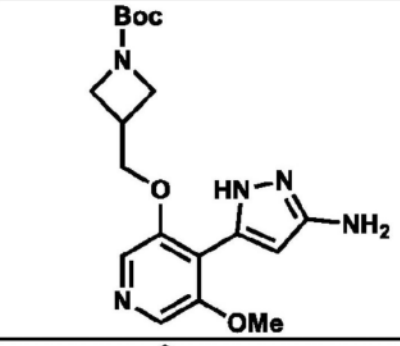
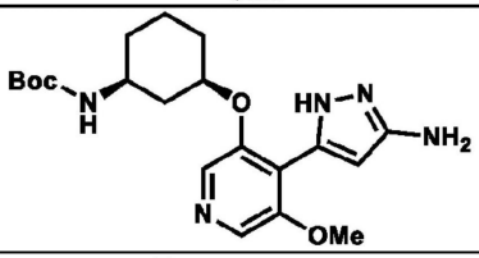
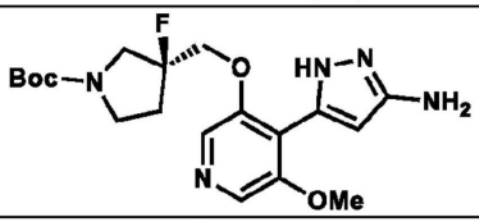
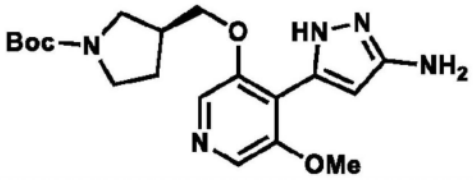
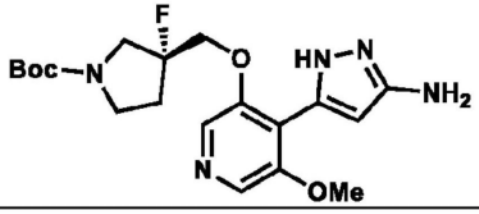
[1507] [表1-3]

[1508]

16		390.3／0.633	A
17		406.3／0.624	A
18		406.4／0.638	A
19		494.5／0.981	A
20		365.3／0.678	A

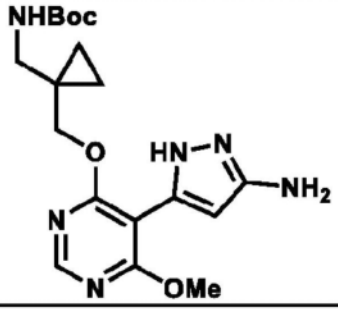
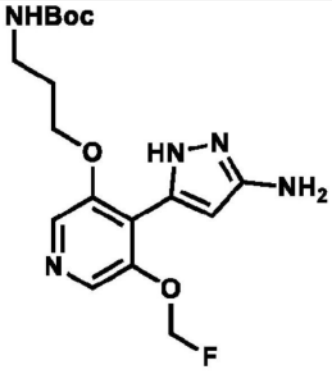
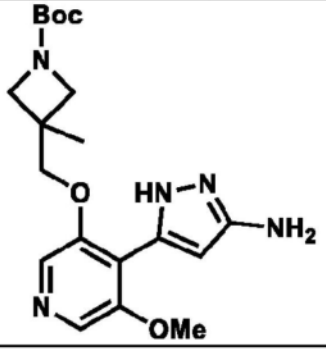
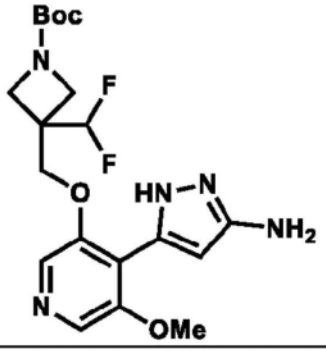
[1509] [表1-4]

[1510]

21		376.3／0.611	A
22		404.4／0.688	A
23		408.3／0.687	A
24		390.3／0.674	A
25		408.3／0.698	A

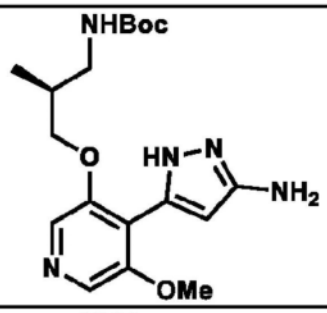
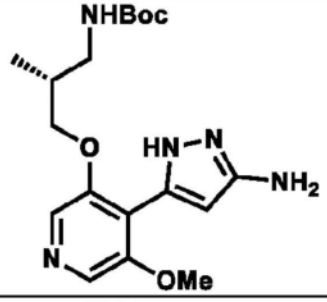
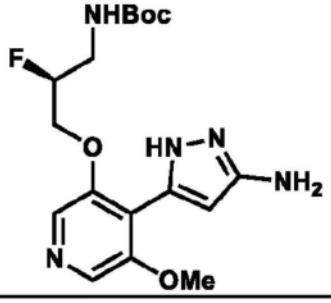
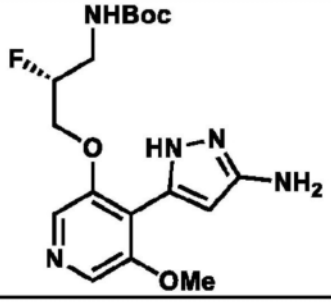
[1511] [表1-5]

[1512]

26		391.3／0.77 7	A
27		382.3／0.66 0	A
28		390.3／0.66 0	A
29		426.3／0.72 1	A

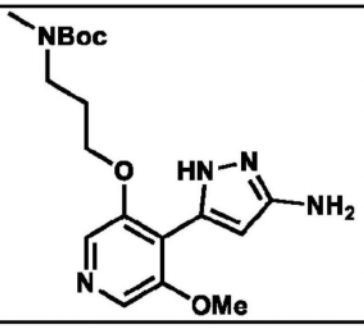
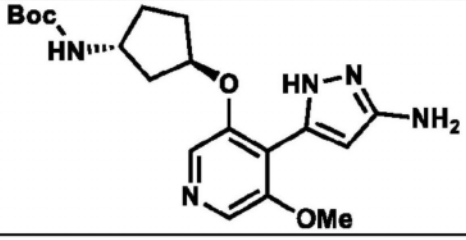
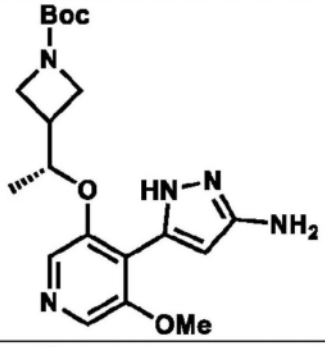
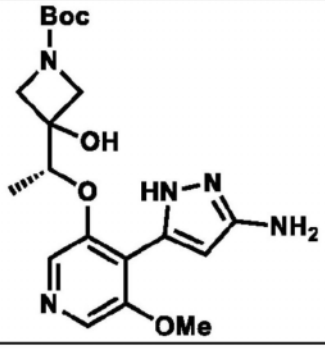
[1513] [表1-6]

[1514]

30		378／1．174	C
31		378／1．175	C
32		382／1．155	C
33		382／1．154	C

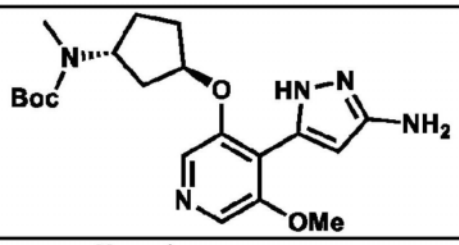
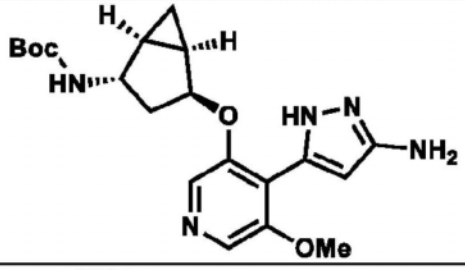
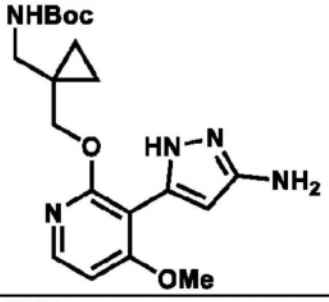
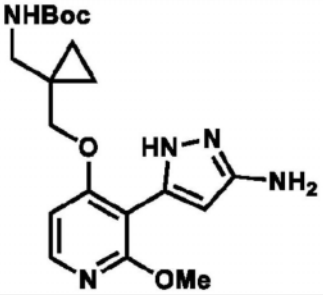
[1515] [表1-7]

[1516]

34		378／1.194	C
35		390／1.177	C
36		390／1.222	C
37		406／1.142	C

[1517] [表1-8]

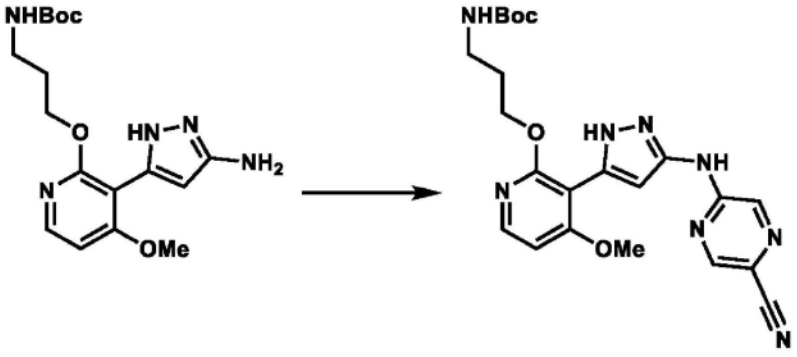
[1518]

38		404／1.290	C
39		402／1.228	C
40		390／1.344	C
41		390／1.315	C

[1519] 参考例42：

[1520] {3-[(3-{3-[(5-氰基吡嗪-2-基)氨基]-1H-吡唑-5-基}-4-甲氧基吡啶-2-基)氧基]丙基}氨基甲酸叔丁基酯

[1521] [化42]

[1522] 

参考例3 参考例42

[1523] 在室温下向(3-{[3-(3-氨基-1H-吡唑-5-基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯(600mg)的DMSO(10.0mL)溶液中加入4-乙基吗啉(1.00mL)、5-氯吡嗪-2-甲腈(461mg),在80℃下搅拌12小时。向反应液中加入饱和食盐水,用乙酸乙酯提取。将有机层

用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(已烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物(1.01g)。

[1524] LC-MS;$[M+H]^+$467.3/Rt(分钟)0.885(测定条件A)

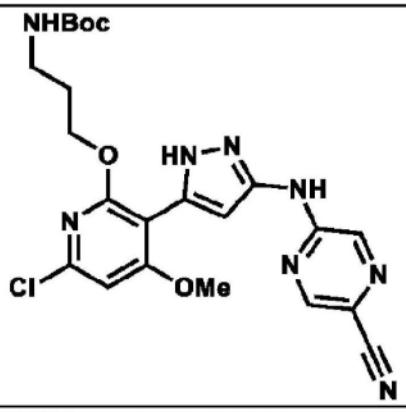
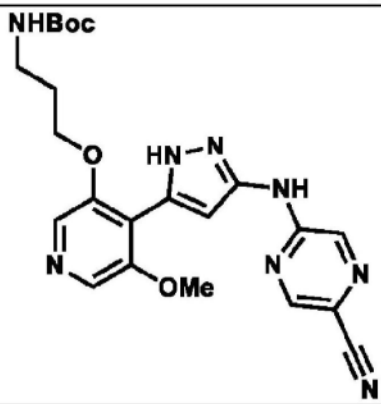
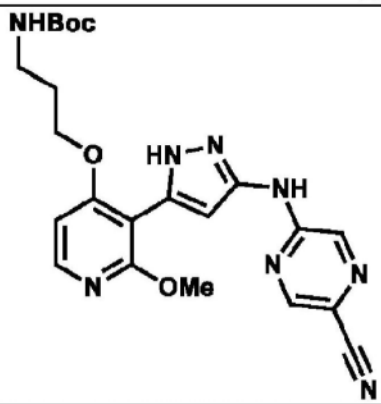
[1525] 1H-NMR(DMSO-D6)δ:12.4(1H,s),10.7(1H,s),8.61(1H,s),8.50(1H,brs),8.07(1H,d,J=5.2Hz),7.06(1H,brs),6.90(1H,d,J=6.0Hz),4.34(2H,t,J=6.4Hz),3.93(3H,s),3.14-3.08(2H,m),1.87-1.84(2H,m),1.35(9H,s).

[1526] 参考例43~78:

[1527] 使用对应的原料化合物,通过与参考例42所述的方法同样的方法,得到下表所示的参考例43~78的化合物。

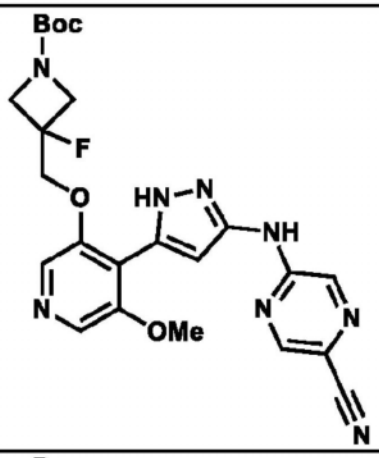
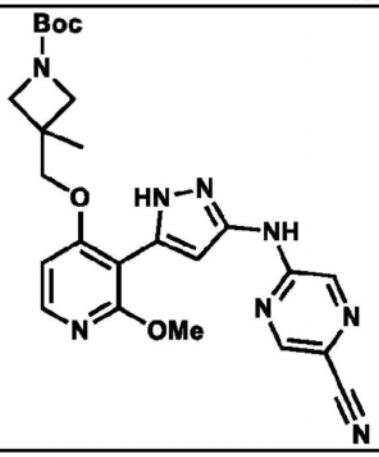
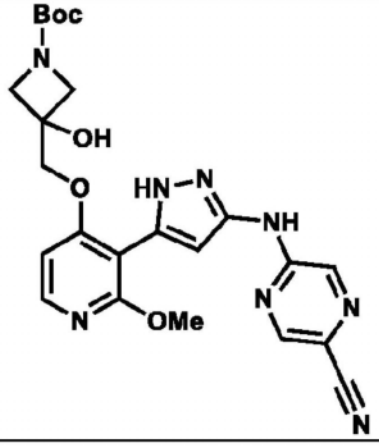
[1528] [表2-1]

[1529]

参考例	结构式	LC-MS;[M+H]+ 保留时间(分钟)	测定条件
43		501.4/1.123	A
44		467.3/0.898	A
45		467.3/0.885	A

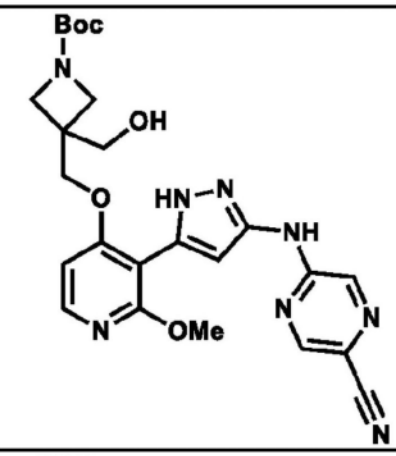
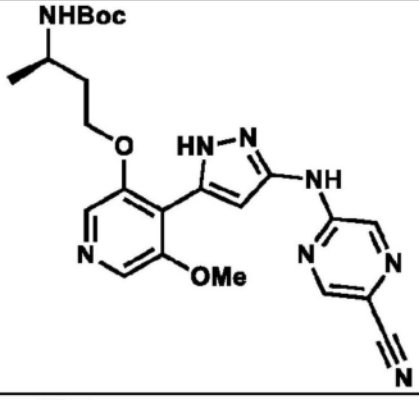
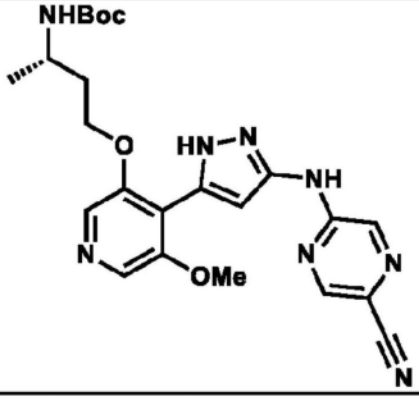
[1530] [表2-2]

[1531]

46		497.3／0.853	A
47		493.4／0.972	A
48		495.4／0.849	A

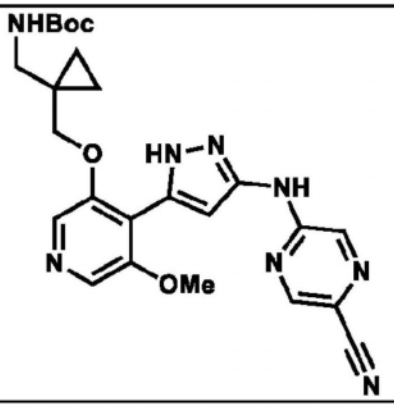
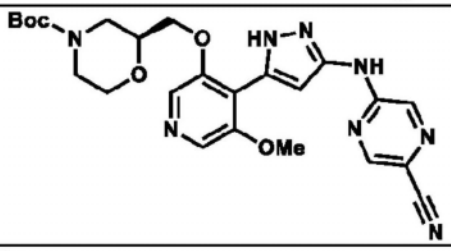
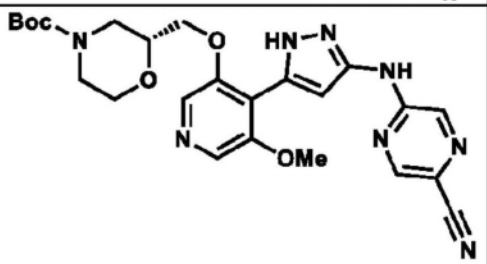
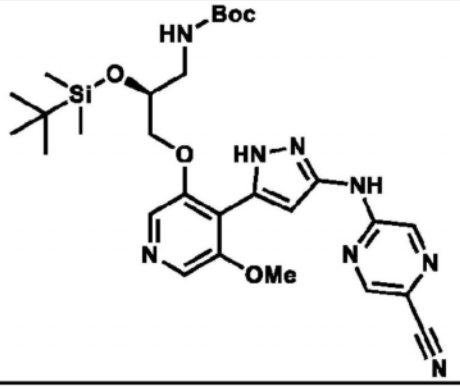
[1532] [表2-3]

[1533]

49		509.4／0.846	A
50		481.4／0.826	A
51		481.4／0.827	A

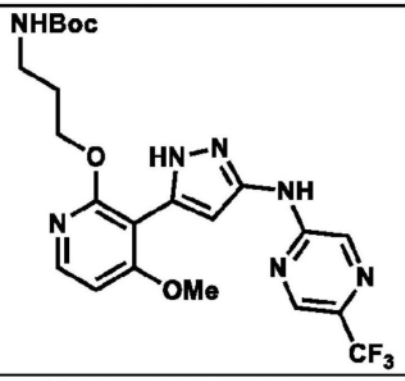
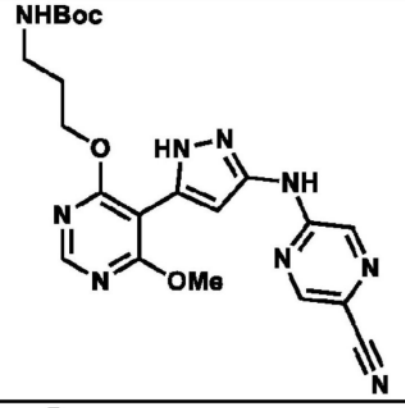
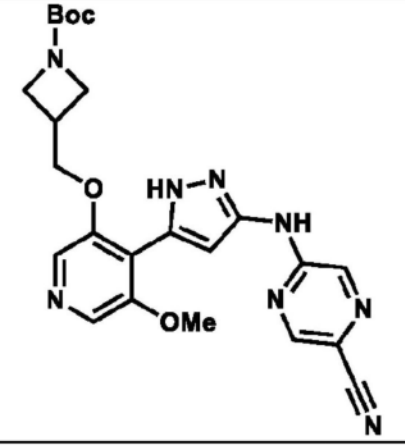
[1534] [表2-4]

[1535]

52		494.4／0.828	A
53		509.4／0.839	A
54		509.4／0.835	A
55		597.5／1.154	A

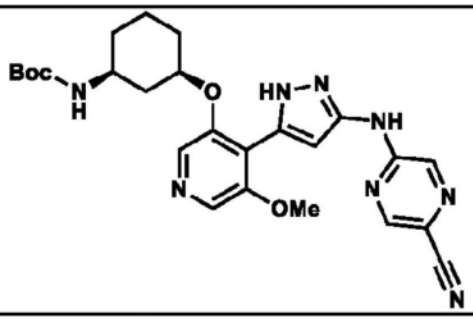
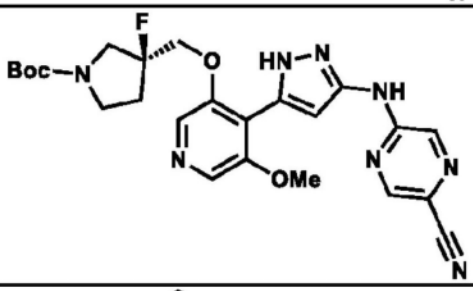
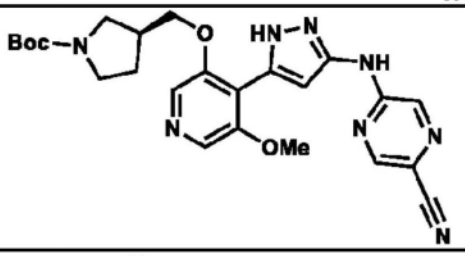
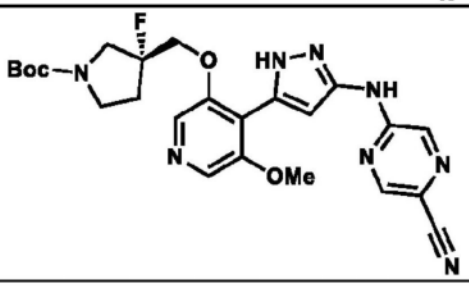
[1536] [表2-5]

[1537]

56		510.4／1.017	A
57		468.4／0.927	A
58		479.4／0.819	A

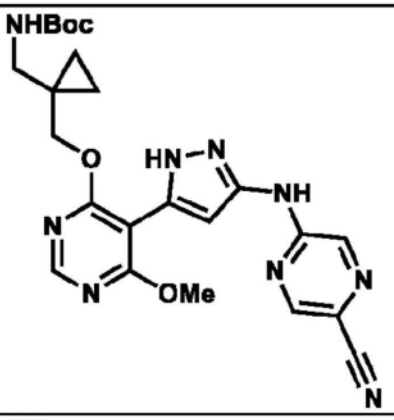
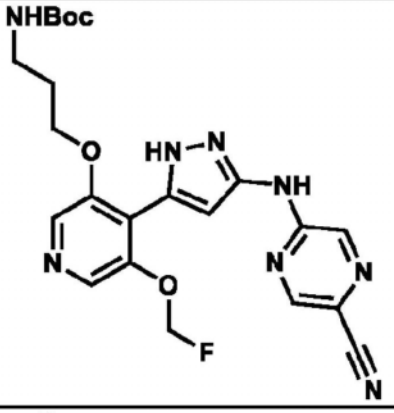
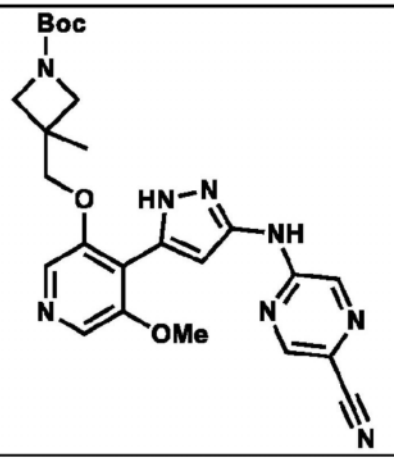
[1538] [表2-6]

[1539]

59		507.4／0.872	A
60		511.4／0.851	A
61		193.1／0.869	A
62		511.4／0.859	A

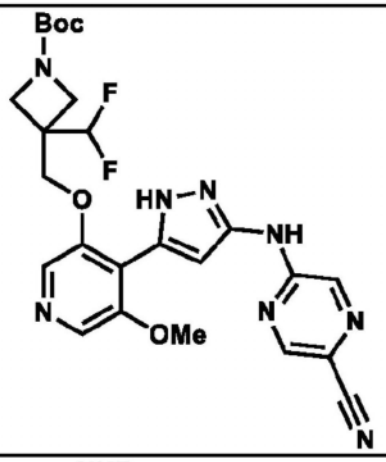
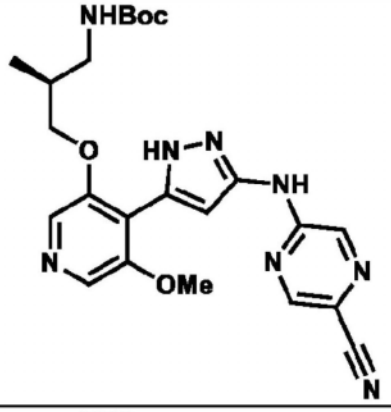
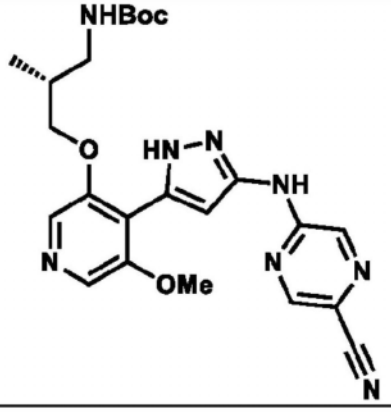
[1540] [表2-7]

[1541]

63		494.4／0.984	A
64		485.4／0.846	A
65		493.4／0.863	A

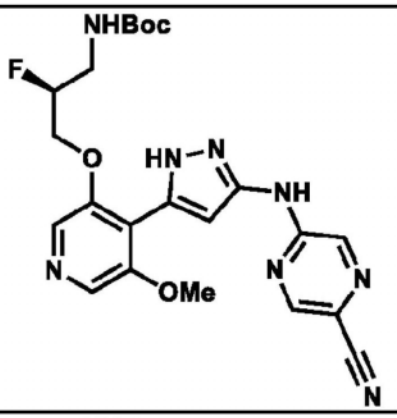
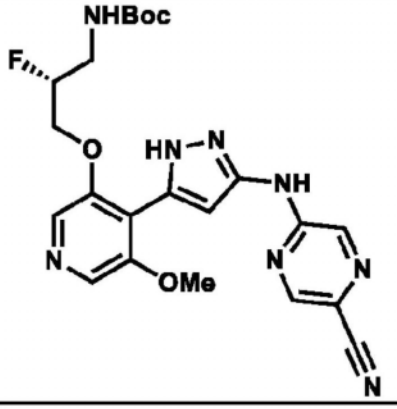
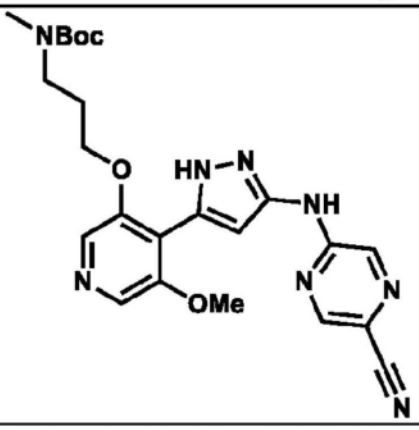
[1542] [表2-8]

[1543]

66		529.4／0.889	A
67		481.5／0.865	A
68		481.5／0.857	A

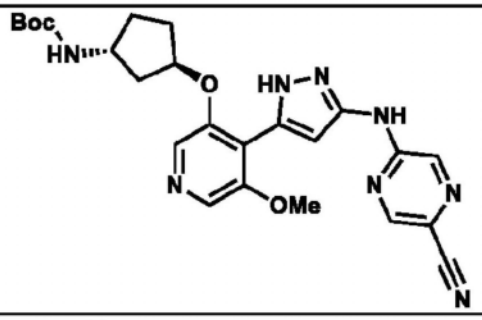
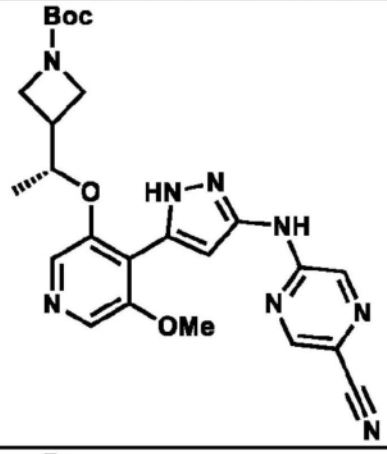
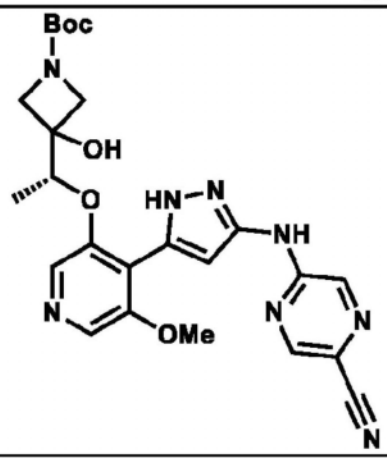
[1544] [表2-9]

[1545]

69		485.4／0.836	A
70		485.4／0.814	A
71		481.4／0.848	A

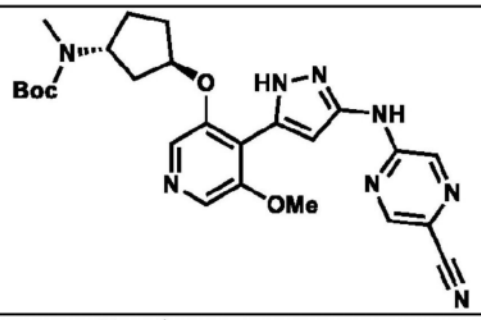
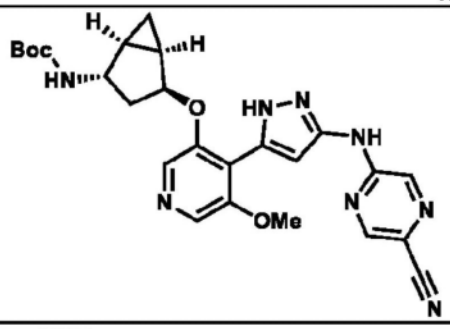
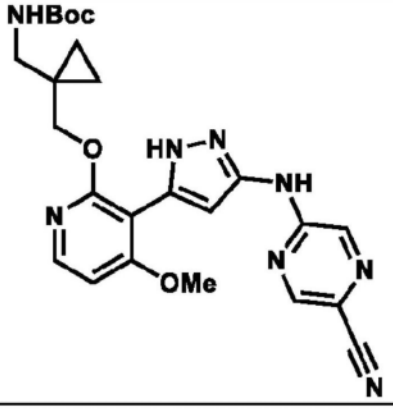
[1546] [表2-10]

[1547]

72		493.4／0.850	A
73		493.4/0.851	A
74		509.4／0.803	A

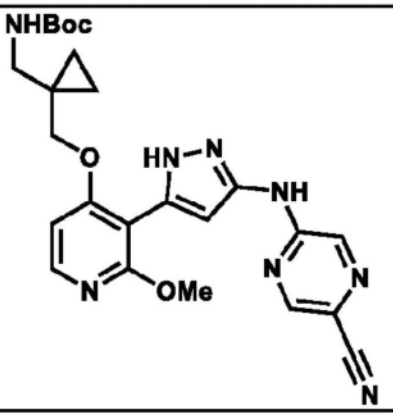
[1548] [表2-11]

[1549]

75		507.5／0.928	A
76		505.5／0.892	A
77		493.4／0.955	A

[1550] [表2-12]

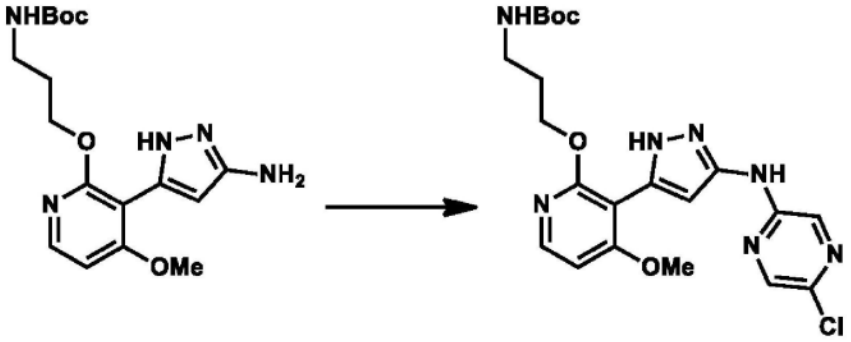
[1551]

78		493.5／0.943	A

[1552] 参考例79：

[1553] {3-[(3-{3-[(5-氯吡嗪-2-基)氨基]-1H-吡唑-5-基}-4-甲氧基吡啶-2-基)氧基]丙基}氨基甲酸叔丁基酯

[1554] [化43]

[1555] 

参考例3 参考例79

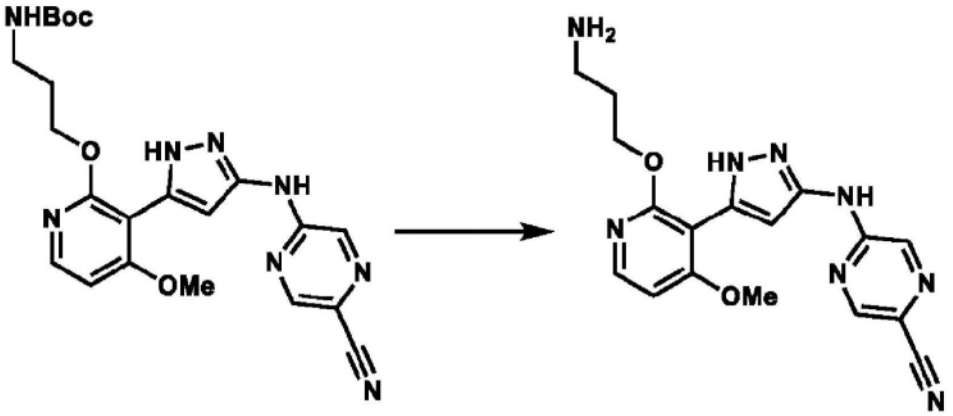
[1556] 在室温下向(3-{[3-(3-氨基-1H-吡唑-5-基)-4-甲氧基吡啶-2-基]氧基}丙基)氨基甲酸叔丁基酯(60mg)的1,4-二噁烷(825μL)溶液中加入2,5-二氯吡嗪(32.9μL)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(15.1mg)、4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基呫吨(19.1mg)、碳酸铯(108mg),在微波照射下,在150℃下搅拌2小时。向反应液加入水,用乙酸乙酯提取。将有机层用饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥后,将其过滤除去,将溶剂减压馏去。将残渣用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯)纯化,由此得到标题化合物。

[1557] LC-MS;$[M+H]^+$476.3/Rt(分钟)0.969(测定条件A)

[1558] 实施例1:

[1559] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈

[1560] [化44]

[1561] 

参考例42 实施例1

[1562] 在室温下向参考例42中得到的{3-[(3-{3-[(5-氰基吡嗪-2-基)氨基]-1H-吡唑-5-基}-4-甲氧基吡啶-2-基)氧基]丙基}氨基甲酸叔丁基酯(200mg)的二氯甲烷(20.0mL)溶液中加入TFA(2.00mL),在室温下搅拌1小时。将溶剂减压馏去,将残渣用胺硅胶柱色谱(乙酸乙酯/甲醇)纯化,得到实施例1(112mg)。

[1563] LC-MS;$[M+H]^+$367.2/Rt(分钟)0.671(测定条件A)

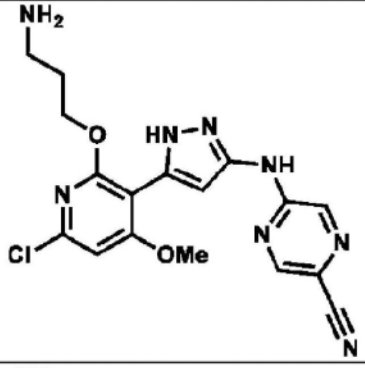
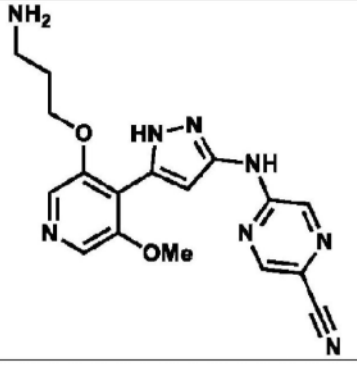
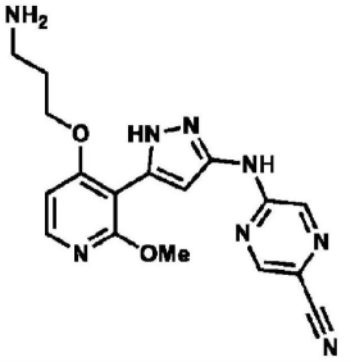
[1564] 1H-NMR(DMSO-D6)δ:8.65(1H,s),8.50(1H,brs),8.06(1H,d,J=6.4Hz),7.04(1H,brs),6.89(1H,d,J=6.4Hz),4.41(2H,t,J=6.0Hz),3.92(3H,s),2.75(1H,t,J=6.8Hz),1.85-1.76(2H,m).

[1565] 实施例2~38:

[1566] 使用对应的原料化合物,利用与实施例1相同的方法,得到下表所示的实施例2～38的化合物。

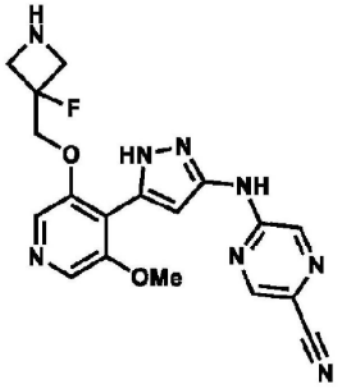
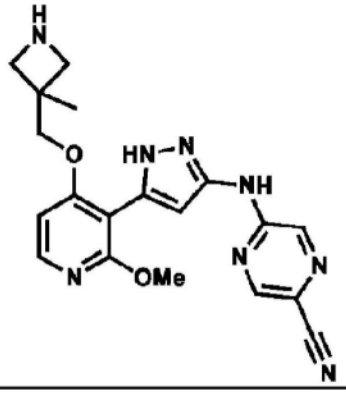
[1567] [表3-1]

[1568]

实施例	结构式	LC－MS；[M+H]$^+$ 保留时间（分钟） ^{1}H－NMR
2		401.3／0.636 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ: 8.65 (1H, s), 8.48 (1H, brs), 7.05-6.99 (2H, m), 4.38 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.96 (3H, s), 2.75 (1H, t, J = 6.0 Hz), 1.85-1.78 (2H, m).
3		367.3／0.673 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ: 8.67 (1H, s), 8.48 (1H, brs), 8.19 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.22 (1H, brs), 4.28 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.98 (3H, s), 2.79 (2H, t, J = 6.0 Hz), 1.89-1.85 (2H, m).
4		367.3／0.610 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ: 8.66 (1H, s), 8.49 (1H, brs), 8.05 (1H, d, J = 6.0 Hz), 7.07 (1H, brs), 6.91 (1H, d, J = 5.6 Hz), 4.23 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.93 (3H, s), 3.33 (2H, brs), 2.77 (2H, t, J = 6.0 Hz), 1.88-1.82 (2H, m).

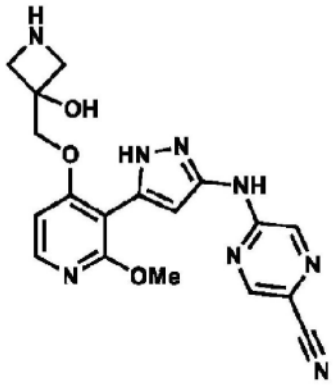
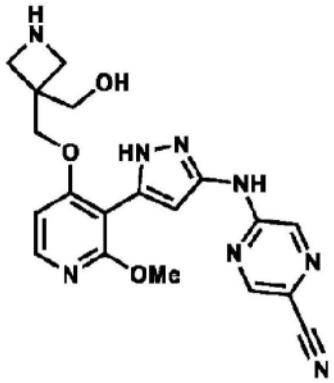
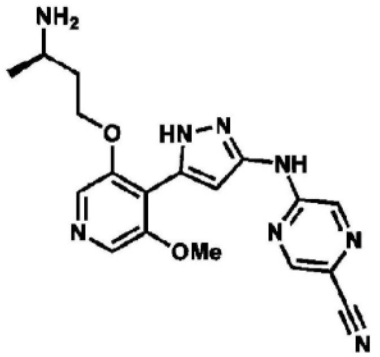
[1569] [表3-2]

[1570]

5		397.3／0.528 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：13.05 (1H, brs), 10.80 (1H, brs), 8.60 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.47 (1H, brs), 8.27 (1H, d, J = 11.6 Hz), 7.21 (1H, brs), 4.55 (2H, d, J = 18.8 Hz), 4.01 (3H, s), 3.76 (1H, dd, J = 9.6, 20.8 Hz), 3.56 (2H, t, J = 10.4, 12.8 Hz).
6		393.3／0.568 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：8.62 (1H, s), 8.52 (1H, brs), 8.07 (1H, d, J = 6.4 Hz), 7.12 (1H, brs), 6.97 (1H, d, J = 5.6 Hz), 4.17 (2H, s), 3.98 (3H, s), 3.52 (2H, d, J = 8.0 Hz), 3.35 (2H, d, J = 8.0 Hz), 1.23 (3H, s).

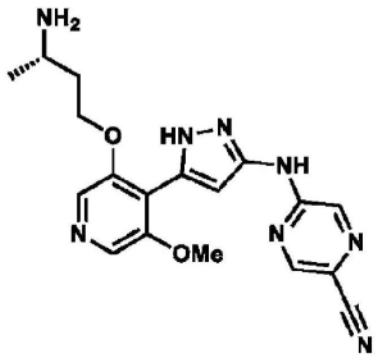
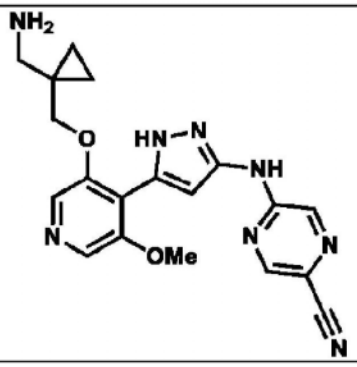
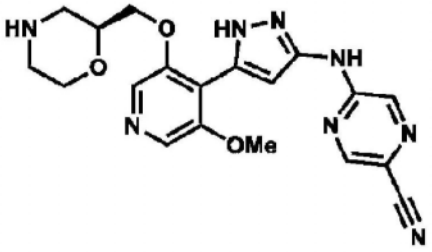
[1571] [表3-3]

[1572]

7		395.3／0.544 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：14.19 (1H, brs), 10.71 (1H, brs), 8.71 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.60 (1H, brs), 8.14 (1H, d, J = 6.0 Hz), 7.26 (1H, s), 7.07 (1H, d, J = 6.0 Hz), 6.03 (1H, brs), 4.26 (2H, s), 4.05 (3H, s), 3.76 (2H, d, J = 8.8 Hz), 3.48 (2H, d, J = 8.4 Hz), 3.38 (1H, brs).
8		409.3／0.545 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：13.89 (1H, brs), 8.63 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.51 (1H, brs), 8.07 (1H, d, J = 6.0 Hz), 7.13 (1H, brs), 6.98 (1H, d, J = 6.0 Hz), 4.93 (1H, brs), 4.28 (2H, s), 3.98 (3H, s), 3.61-3.56 (4H, m), 3.31-3.16 (2H, m).
9		381.3／0.497 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：8.65 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.49 (1H, brs), 8.20 (2H, d, J = 9.6 Hz), 7.19 (1H, brs), 4.34-4.22 (2H, m), 3.98 (3H, s), 3.06-3.01 (1H, m), 1.84-1.71 (2H, m), 1.03 (3H, d, J = 6.8 Hz).

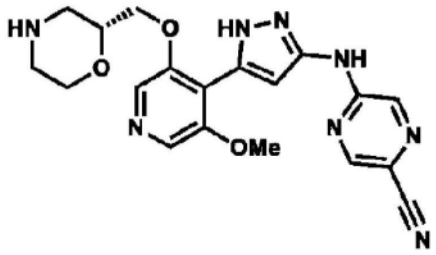
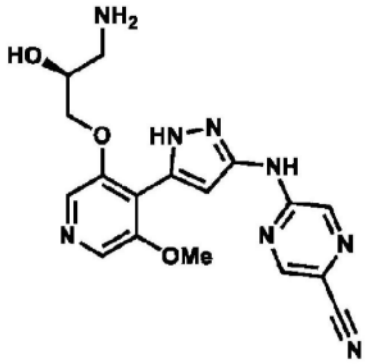
[1573] [表3-4]

[1574]

10		381.3／0.546 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：8.55 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.39 (1H, brs), 8.10 (2H, d, J = 10.0 Hz), 7.09 (1H, brs), 4.24-4.13 (2H, m), 3.88 (3H, s), 2.96-2.92 (1H, m), 1.88-1.61 (2H, m), 0.94 (3H, d, J = 6.0 Hz)
11		393.3／0.594 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：8.63 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.49 (1H, brs), 8.17 (2H, d, J = 11.6 Hz), 7.31 (1H, s), 4.13 (2H, s), 3.99 (3H, s), 2.72 (2H, s), 0.57-0.50 (4H, m)
12		409.3／0.561 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：12.58 (1H, s), 10.82 (1H, s), 8.71 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.47 (1H, brs), 8.20 (2H, d, J = 3.6 Hz), 7.24 (1H, brs), 4.18 (2H, d, J = 4.8 Hz), 3.99 (3H, s), 3.78 3.75 (2H, m), 3.52 3.46 (1H, m), 2.96-2.93 (1H, m), 2.70-2.56 (4H, m).

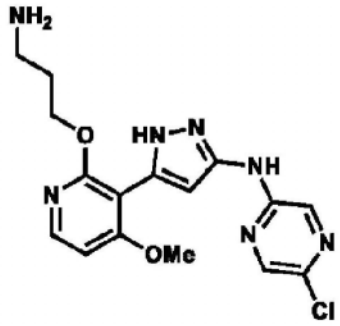
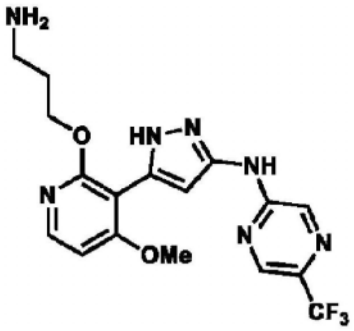
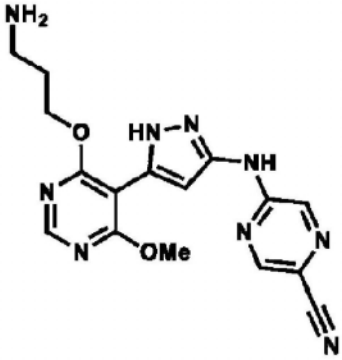
[1575] [表3-5]

[1576]

13		409.3／0.497 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：12.58 (1H, s), 10.82 (1H, s), 8.71 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.46 (1H, brs), 8.20 (2 H, d, J = 3.7 Hz), 7.23 (1H, brs), 4.18 (2H, d, J = 4.9 Hz), 3.99 (3H, s), 3.83-3.76 (2H, m), 3.50 (1H, td, J = 10.8, 2.8 Hz), 2.95 (1H, dd, J = 12.2, 1.8 Hz), 2.70-2.55 (3H, m).
14		383.2／0.452 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：8.74 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.56 (1H, brs), 8.29 (1H, s), 8.27 (1H, s), 7.30 (1H, brs), 4.30 (1H, dd, Jgem = 9.5, J = 4.6 Hz), 4.22 (1H, dd, Jgem = 9.5, J = 5.8 Hz), 4.05 (3H, s), 3.92-3.87 (1H, m), 2.82 (1H, dd, Jgem = 12.8, J = 5.5 Hz), 2.76 (1H, dd, Jgem = 12.8, J = 6.1 Hz).

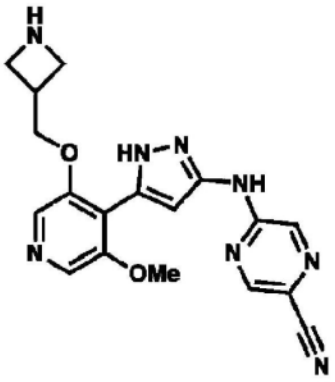
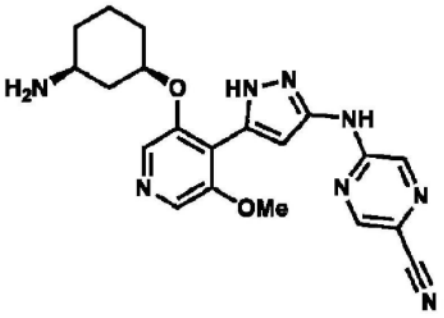
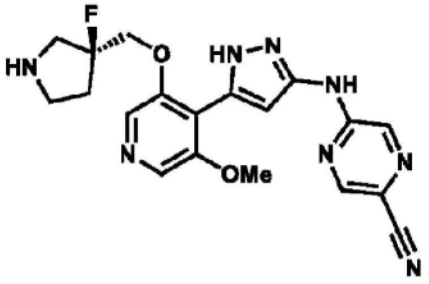
[1577] [表3-6]

[1578]

15		376／0．578 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：9.99 (1H, s), 8.51 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.31 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.12 (1H, d, J = 6.1 Hz), 6.95 (1H, d, J = 6.1 Hz), 6.91 (1H, s), 4.47 (2H, t, J = 6.1 Hz), 3.99 (3H, s), 2.81 (2H, t, J = 6.7 Hz), 1.92-1.85 (2H, m).
16		410／0．637 (测定条件A) 1H-NMR (CD3OD) δ：8.58 (1H, s), 8.55 (1H, s), 8.13 (1H, d, J = 5.5 Hz), 7.05 (1H, s), 6.94 (1H, d, J = 6.1 Hz), 4.57 (2H, t, J = 6.1 Hz), 4.07 (3H, s), 2.91 (2H, t, J = 6.7 Hz), 2.05 (2H, td, J = 9.6, 5.5 Hz).
17		368．2／0．558 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6, 65° C) δ：8.61 (1H, s), 8.53 (1H, s), 8.44 (1H, s), 7.06 (1H, s), 4.55 (2H, t, J = 6.1 Hz), 4.05 (3H, s), 2.78 (2H, t, J = 6.4 Hz), 1.90-1.84 (2H, m).

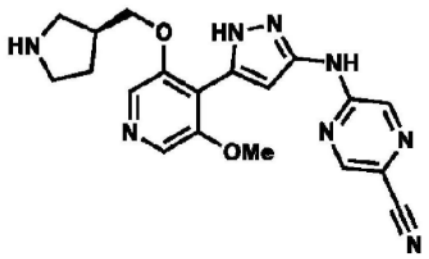
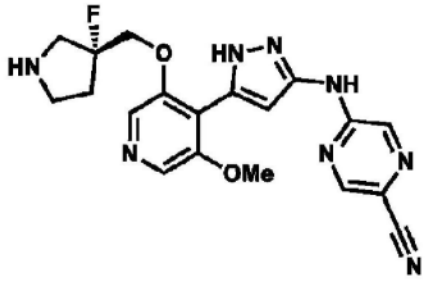
[1579] [表3-7]

[1580]

18		379.2／0.525 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：14.25 (1H, brs), 8.64 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.50 (1H, brs), 8.24 (1H, s), 8.22 (1H, s), 7.29 (1H, brs), 4.39 (2H, d, J = 3.7 Hz), 4.02 (3H, s), 3.85 (2H, t, J = 7.9 Hz), 3.29 (2H, dd, J = 7.6, 4.0 Hz), 2.98-2.92 (1H, m).
19		407.3／0.597 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：8.65 (1H, s), 8.51 (1H, brs), 8.23 (1H, s), 8.15 (1H, s), 7.22 (1H, brs), 4.59 (1H, m), 3.97 (3H, s), 2.76 (1H, m), 2.16 (1H, d, J = 11.6 Hz), 1.99 (1H, d, J = 10.4 Hz), 1.79-1.67 (2H, m), 1.41-1.23 (3H, m), 1.11-1.03 (1H, m).
20		411.3／0.562 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：12.61 (1H, brs), 10.85 (1H, brs), 8.58 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.46 (1H, brs), 8.23 (1H, s), 8.22 (1H, s), 7.27 (1H, brs), 4.54-4.38 (2H, m), 4.00 (3H, s), 3.24-3.15 (1H, m), 3.03-2.93 (2H, m), 2.85-2.79 (1H, m), 2.12-1.87 (2H, m).

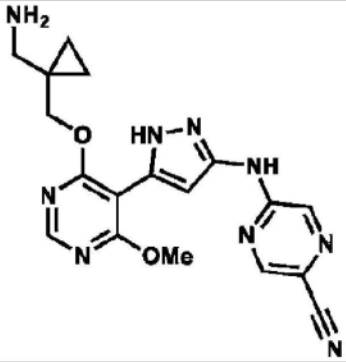
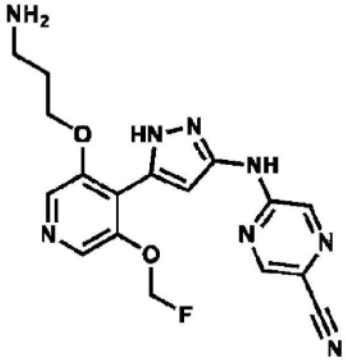
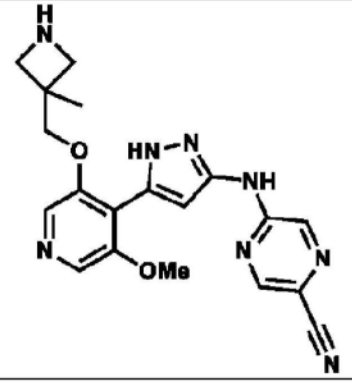
[1581] [表3-8]

[1582]

21		393.3／0.603 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：13.17 (1H, brs), 8.63 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.47 (1H, brs), 8.19 (1H, s), 8.18 (1H, s), 7.26 (1H, brs), 4.20 (1H, dd, J = 9.2, 5.5 Hz), 4.09 (1H, dd, J = 8.9, 6.4 Hz), 3.99 (3H, s), 2.98 (1H, dd, J = 10.4, 7.3 Hz), 2.87 (1H, m), 2.76-2.70 (2H, m), 2.53 (1H, m), 1.92 (1H, m), 1.48 (1H, m).
22		411.3／0.559 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：12.61 (1H, brs), 10.85 (1H, brs), 8.57 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.45 (1H, brs), 8.23 (1H, s), 8.22 (1H, s), 7.27 (1H, brs), 4.54-4.38 (2H, m), 4.00 (3H, s), 3.24-3.15 (1H, m), 3.03-2.93 (2H, m), 2.85-2.79 (1H, m), 2.12-1.87 (2H, m).

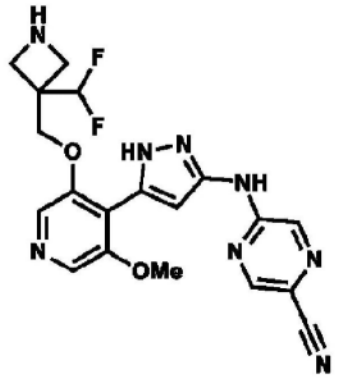
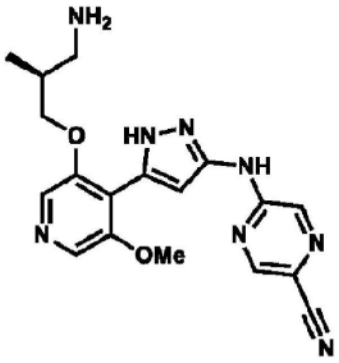
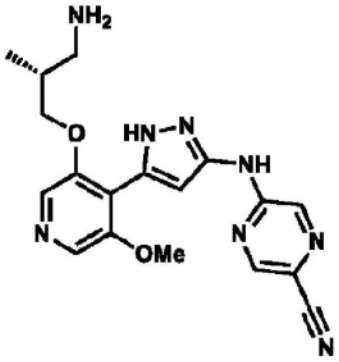
[1583] [表3-9]

[1584]

23		394．3／0．594 (测定条件A) ^{1}H-NMR (DMSO-D6) δ：8.64 (1H, s), 8.48 (1H, brs), 8.43 (1H, s), 7.24 (1H, brs), 4.40 (2H, s), 4.05 (3H, s), 2.72 (2H, s), 0.56 (4H, m)
24		385／0．570 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.68 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.48 (1H, s), 8.33 (1H, s), 8.27 (1H, s), 7.18 (1H, br s), 5.99 (2H, d, J = 53.2 Hz), 4.30 (2H, t, J = 5.8 Hz), 2.83 (2H, t, J = 6.4 Hz), 1.94-1.88 (2H, m).
25		393／0．573 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.59 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.47 (1H, br s), 8.21 (1H, s), 8.19 (1H, s), 7.27 (1H, br s), 4.18 (2H, s), 3.99 (3H, s), 3.51 (2H, d, J = 7.9 Hz), 3.35 (2H, d, J = 7.9 Hz), 1.20 (3H, s).

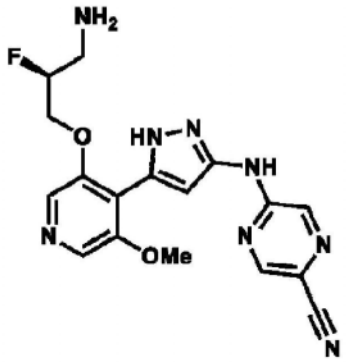
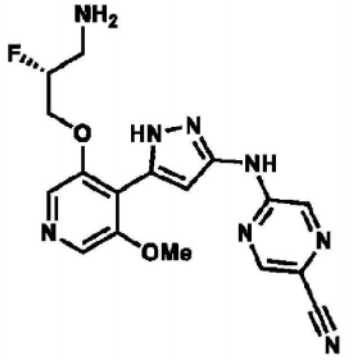
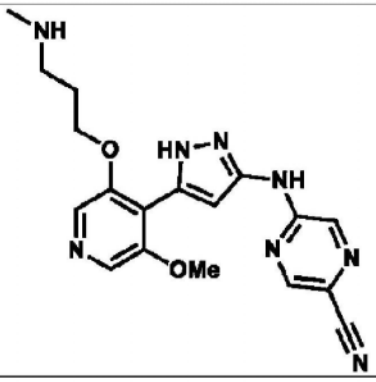
[1585] [表3-10]

[1586]

26		429／0．567 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：10.78 (1H, br s), 8.61 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.49 (1H, br s), 8.30 (1H, s), 8.26 (1H, s), 7.21 (1H, s), 6.27 (1H, t, J = 56.4 Hz), 4.48 (2H, s), 4.02 (3H, s), 3.80 (2H, d, J = 8.5 Hz), 3.35 (2H, d, J = 8.5 Hz).
27		381／0．622 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.63 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.46 (1H, br s), 8.21 (1H, s), 8.19 (1H, s), 7.26 (1H, br s), 4.19-4.07 (2H, m), 3.98 (3H, s), 2.67 (2H, d, J = 6.1 Hz), 2.02-1.90 (1H, m), 1.01 (3H, d, J = 6.1 Hz).
28		381／0．573 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.63 (1H, s), 8.46 (1H, br s), 8.20 (1H, s), 8.19 (1H, s), 7.26 (1H, br s), 4.18-4.07 (2H, m), 3.98 (3H, s), 2.66 (2H, d, J = 6.1 Hz), 2.01-1.91 (1H, m), 1.01 (3H, d, J = 7.3 Hz).

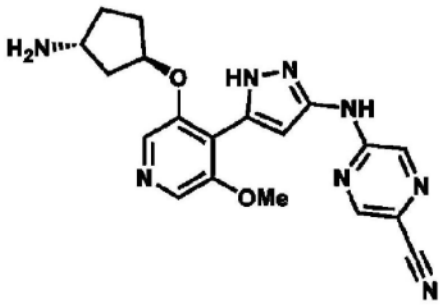
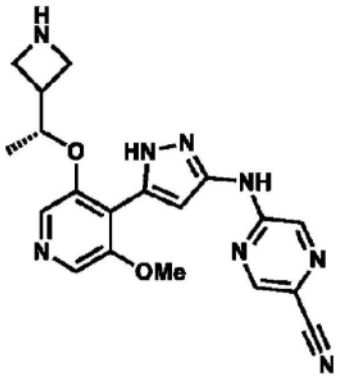
[1587] [表3-11]

[1588]

29		385／0．543 (测定条件A) 1H NMR (DMSO D6) δ：10.81 (1H, br s), 8.65 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.48 (1H, br s), 8.22 (2H, s), 7.22 (1H, br s), 4.92-4.72 (1H, m), 4.54-4.33 (2H, m), 3.99 (3H, s), 2.95 (1H, d, J = 6.1 Hz), 2.90 (1H, dd, J = 5.8, 1.5 Hz).
30		385／0．548 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.65 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.48 (1H, br s), 8.22 (2H, s), 7.22 (1H, br s), 4.93-4.71 (1H, m), 4.53 4.33 (2H, m), 3.99 (3H, s), 2.95 (1H, d, J = 6.1 Hz), 2.90 (1H, dd, J = 5.8, 1.5 Hz).
31		381／0．527 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.66 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.50 (1H, br s), 8.19 (2H, s), 7.24 (1H, br s), 4.28 (2H, t, J = 5.8 Hz), 3.99 (3H, s), 2.69 (2H, t, J = 6.1 Hz), 2.31 (3H, s), 1.98-1.89 (2H, m).

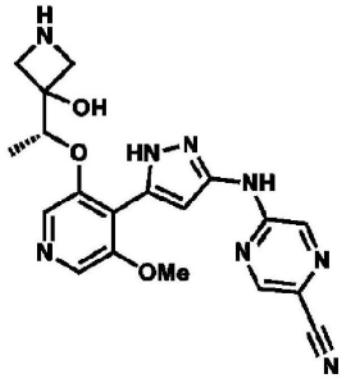
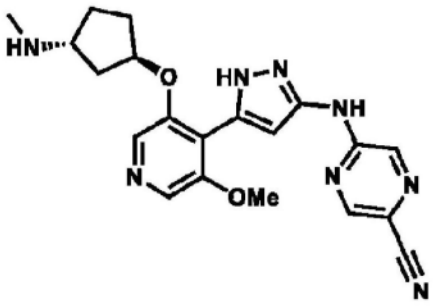
[1589] [表3-12]

[1590]

32		393／0．576 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：12.52 (1H, br s), 8.66 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.47 (1H, br s), 8.15 (1H, s), 8.13 (1H, s), 7.24 (1H, br s), 5.15-5.07 (1H, m), 3.98 (3H, s), 3.56-3.47 (1H, m), 2.30-2.18 (1H, m), 2.08-1.90 (2H, m), 1.78-1.64 (2H, m), 1.38-1.26 (1H, m).
33		393／0．608 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.65 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.51 (1H, br s), 8.25 (1H, s), 8.18 (1H, s), 7.18 (1H, br s), 5.02-4.92 (1H, m), 3.99 (3H, s), 3.83-3.77 (2H, m), 3.39-3.35 (1H, m), 3.20-3.14 (1H, m), 2.82-2.72 (1H, m), 1.23 (3H, d, J = 6.1 Hz).

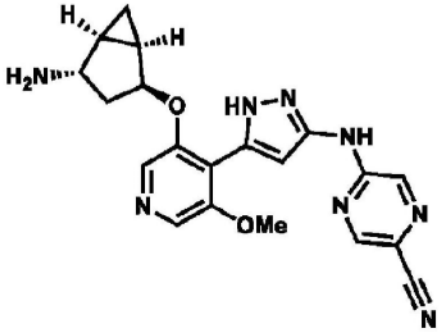
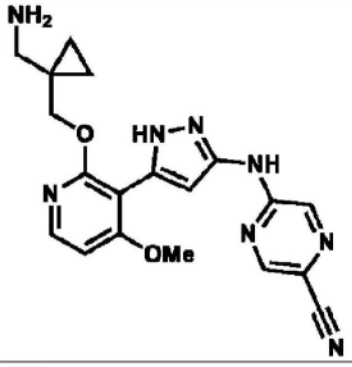
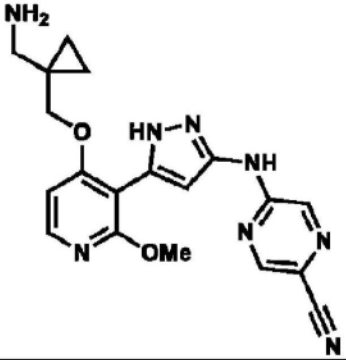
[1591] [表3-13]

[1592]

34		409／0．626 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：10.65 (1H, br s), 8.65 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.52 (1H, br s), 8.26 (1H, s), 8.19 (1H, s), 7.20 (1H, br s), 5.98 (1H, br s), 4.80 (1H, d, J = 6.1 Hz), 4.77 (1H, d, J = 6.1 Hz), 4.00 (3H, s), 3.69 (1H, d, J = 7.9 Hz), 3.65 (1H, d, J = 7.9 Hz), 3.52 (1H, d, J = 8.5 Hz), 3.35 (1H, d, J = 8.5 Hz), 1.26 (3H, d, J = 6.1 Hz).
35		407／0．642 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：12.52 (1H, br s), 8.63 (1H, s), 8.48 (1H, br s), 8.15 (1H, s), 8.14 (1H, s), 7.23 (1H, br s), 5.12-5.05 (1H, m), 3.97 (3H, s), 3.19-3.11 (1H, m), 2.20 (3H, s), 2.19-2.09 (1H, m), 2.08-1.99 (1H, m), 1.99-1.89 (1H, m), 1.82 1.71 (2H, m), 1.47-1.36 (1H, m).

[1593] [表3-14]

[1594]

36		405／0．584 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：12.50 (1H, br s), 8.61 (1H, s), 8.50 (1H, br s), 8.28 (1H, s), 8.16 (1H, s), 7.26 (1H, br s), 5.52-5.43 (1H, m), 3.98 (3H, s), 3.35-3.34 (1H, m), 3.33-3.32 (1H, m), 1.87 (1H, dd, J = 13.4, 7.9 Hz), 1.82-1.74 (1H, m), 1.61-1.51 (1H, m), 1.41-1.31 (1H, m), 0.62-0.56 (1H, m), 0.52-0.45 (1H, m).
37		393／0．654 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.64 (1H, s), 8.50 (1H, br s), 8.04 (1H, d, J = 5.5 Hz), 7.14 (1H, br s), 6.90 (1H, d, J = 6.1 Hz), 4.27 (2H, s), 3.94 (3H, s), 2.80 (2H, s), 0.63 0.51 (4H, m).
38		393／0．682 (测定条件A) 1H-NMR (DMSO-D6) δ：8.62 (1H, d, J = 1.2 Hz), 8.49 (1H, br s), 8.03 (1H, d, J = 5.5 Hz), 7.18 (1H, br s), 6.87 (1H, d, J = 6.1 Hz), 4.09 (2H, s), 3.95 (3H, s), 2.70 (2H, s), 0.58-0.47 (4H, m).

[1595] 实施例39～44的粉末X线衍射测定在以下所示的条件下测定。将所得衍射图(XRD光谱)示于图1～图6。实施例39～41为实施例1的化合物的各种盐的晶体,实施例42～44为实施例1的化合物的多晶型物。

[1596] 在确定晶型时,根据图1～图6的衍射图所示的各晶体的特征衍射峰判断即可。

[1597] 由图1～图6的衍射图确定的主要衍射峰和特征衍射峰分别在下面列举。应予说明,以下的实施例中记载的衍射角2θ(°)中的衍射峰值利用测定机器或利用测定条件等,有时会产生少许的测定误差。具体而言,测定误差可以为±0.2、优选为±0.1的范围内。

[1598] 粉末X线衍射测定法:

[1599] 检测机器:Spectris Power X射线衍射系统Empyrian

[1600] X射线管:CuKα(波长:1.54埃)

[1601] 管电压:45kV

[1602] 管电流:40mA

[1603] 测定范围:4～40度(2θ)

[1604] 步幅:0.013度

[1605] 累计时间:100秒/步

[1606] 实施例39:

[1607] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈盐酸盐

[1608] 向实施例1的化合物(30.0mg)中加入甲醇(0.6mL),再加入5～10％(W/V)盐酸-甲醇溶液(60μL),在设定温度60℃下搅拌2小时。放冷后,静置一整夜,滤取析出的固体,干燥,由此以晶体(I型)的形式得到标题化合物。

[1609] [I型]粉末X线衍射图示于图1。

[1610] 主要衍射峰:2θ(°)＝7.2、8.8、9.8、10.2、10.7、16.7、18.5、26.2、27.0

[1611] 特征衍射峰:2θ(°)＝7.2、8.8、9.8、10.2、10.7

[1612] 实施例40:

[1613] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈磷酸盐

[1614] 向实施例1的化合物(30.0mg)中加入13.4mg/mL磷酸-甲醇溶液(1200μL),在设定温度60℃下搅拌4小时。放冷后,静置一整夜,滤取析出的固体,干燥,由此以晶体(II型)的形式得到标题化合物。

[1615] [II型]粉末X线衍射图示于图2。

[1616] 主要衍射峰:2θ(°)＝6.8、7.5、11.7、11.9、13.0、16.4、19.3、20.4、22.7、24.3

[1617] 特征衍射峰:2θ(°)＝6.8、7.5、11.7、11.9、13.0

[1618] 实施例41:

[1619] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈甲苯磺酸盐

[1620] 向实施例1的化合物(30.0mg)中加入甲醇(0.6mL),再加入26.0mg/mL甲苯磺酸-甲醇溶液(0.6mL),在设定温度60℃下搅拌2小时。放冷后,静置一整夜,滤取析出的固体,干燥,由此以晶体(III型)的形式得到标题化合物。

[1621] [III型]粉末X线衍射图示于图3。

[1622] 主要衍射峰:2θ(°)＝6.0、9.0、12.1、14.4、16.2、17.0、22.8、26.3特征衍射峰:2θ(°)＝6.0、9.0、12.1、14.4、16.2、17.0

[1623] 实施例42:

[1624] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈

[1625] [IV型]粉末X线衍射图示于图4。

[1626] 通过实施例1,以晶体(IV型)的形式得到标题化合物。

[1627] 主要衍射峰:2θ(°)＝9.3、10.2、10.7、13.6、16.7、17.1、17.8、18.6、26.1、26.4

[1628] 特征衍射峰:2θ(°)＝9.3、10.2、10.7、16.7、26.1、26.4

[1629] 实施例43:

[1630] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-

甲腈

[1631] [V型]粉末X线衍射图示于图5。

[1632] 加入实施例1的化合物(5mg)的四氢呋喃/水(10/1、0.5mL)溶液,在设定温度105℃下加热1小时。放冷后,密封静置4天后,开封静置3天,馏去溶剂。得到析出的固体,为晶体(V型)的标题化合物。

[1633] 主要衍射峰:2θ(°)=7.9、8.7、12.2、13.1、15.9、17.6、19.9、21.9、22.8、26.6

[1634] 特征衍射峰:2θ(°)=7.9、8.7、12.2、13.1、15.9、26.6

[1635] 实施例44:

[1636] 5-({5-[2-(3-氨基丙氧基)-4-甲氧基吡啶-3-基]-1H-吡唑-3-基}氨基)吡嗪-2-甲腈

[1637] [VI型]粉末X线衍射图示于图6。

[1638] 加入实施例1的化合物(5mg)的丙酮/水(10/1、0.5mL)溶液,在设定温度105℃下加热1小时。放冷后,密封静置4天后,开封静置3天,馏去溶剂。以晶体(VI型)的形式得到析出的固体即标题化合物。

[1639] 主要衍射峰:2θ(°)=5.3、5.7、7.0、7.3、7.8、8.4、9.3、10.5、11.5、14.1

[1640] 特征衍射峰:2θ(°)=5.3、5.7、7.0、7.3、8.4、9.3

[1641] 试验例

[1642] 试验例1:CHK1抑制活性试验

[1643] 从Molecular Device公司获得IMAP TR-FRET Screening Express Kit(R8160)。将CHK1激酶(02-117,CarnaBio公司)、FAM标记CHK1tide(R7185,MolecularDevice公司)、ATP分别以使终浓度成为4μg/mL、2μM、20μM的方式用分析缓冲液稀释。将FAM-PKAtide(R7255、Molecular Device公司)、FAM-Phospho-PKAtide(R7304、MolecularDevice公司)稀释后混合,制成0至100%的磷酸化水平的校准标准品(calibration standard)系列。在384孔板中添加5μL用0.4%DMSO溶液溶解的化合物,制成各添加5μL CHK1、CHK1tide、ATP的化合物研究组和各添加20μL标准品的标准品组,在30℃下进行3小时的激酶反应。然后,添加60μL的结合试剂(80%缓冲液A、20%缓冲液B、1:600结合试剂、1:400Tb-Donor),在室温下进行2小时的结合反应。使用SpectraMaxParadigm(MolecularDevice公司),获得在340nm激发时的520nm、490nm的荧光强度。使用标准品计算出CHK1tide的磷酸化水平,将DMSO处理组设为磷酸化水平100%,使用下面所示的计算式求出激酶活性,计算出相当于激酶活性显示50%的评价化合物的浓度的IC_{50}值。

[1644] 激酶抑制(%)=100-A/B×100

[1645] A:评价化合物存在下的信号

[1646] B:阴性对照(DMSO处理组)的信号

[1647] 对于实施例中得到的化合物和从MedChemExpress公司购买的普瑞色替(在以下的试验例中购买处也相同),进行试验例1中所示的试验。对于关于各受试物质的试验结果的IC_{50}值(nM),如下表所示。

[1648] [表4-1]

[1649]

实施例	IC_{50} (nM)	0.1nM,CHK1抑制%
普瑞色替	0.54	11
1	<0.1	55
2	0.22	31
3	0.22	28
4	0.23	25
5	0.33	15
6	0.27	15
7	0.21	29
8	<0.1	51
9	0.24	24
10	0.30	20
11	0.18	35
12	0.34	21
13	0.74	6
14	0.22	30
15	0.26	29
16	3.04	<5
17	0.30	24
18	0.51	<5
19	0.26	20
20	0.34	6
21	0.29	15
22	0.24	22
23	0.79	<5
24	0.30	23
25	0.74	<5
26	0.14	42
27	3.46	<5
28	0.50	<5
29	0.60	<5
30	0.26	28
31	0.75	<5
32	0.76	<5

[1650] [表4-2]

[1651]

33	0.69	<5
34	1.82	<5
35	0.62	<5
36	0.73	<5
37	0.32	18
38	0.70	<5

[1652] 如上表所示,实施例1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、17、18、19、20、21、22、24、26、28、30和37的化合物示出比普瑞色替强的CHK1活性的抑制效果。其中,实施例1和8的化合物具有特别强效抑制CHK1活性的特异效果。

[1653] 试验例2:细胞增殖抑制实验

[1654] 从美国培养细胞系统保存机构(ATCC)获得ES-2细胞。在37℃、5%CO2存在下,用含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的McCoy's 5a培养基培养本细胞。

[1655] 在384孔板中每孔接种500个细胞,添加评价化合物,以使DMSO的终浓度成为0.1%,培养2天。培养结束后,使用CellTiter-Glo(注册商标)3D试剂(Promega、G968B)计算出细胞存活率。根据存活率曲线,算出相当于细胞增殖的抑制率显示50%的评价化合物的浓度的IC_{50}值。应予说明,ES-2细胞已知示出顺铂耐性。

[1656] 对于实施例中得到的化合物和普瑞色替,进行试验例2中所示的试验。对于各受试物质的抑制50%细胞增殖的浓度(IC_{50}值;nM),如下表所示。应予说明,以下的表中根据I、II、III、IV、V的评级列举本公开的代表化合物的细胞增殖抑制试验的结果(1000nM＜I、1000nM＞II＞300nM、300nM＞III＞100nM、100nM＞IV＞30nM、30nM＞V)。

[1657] [表5]

[1658]

实施例	IC_{50} (nM)	实施例	IC_{50} (nM)
普瑞色替	V	20	V
1	V	21	V
2	IV	22	V
3	V	23	V
4	V	24	II
5	V	25	V
6	V	26	V
7	IV	27	V
8	IV	28	V
9	IV	29	V
10	IV	30	V
11	V	31	V
12	III	32	V
13	II	33	V
14	II	34	I
15	V	35	V
16	II	36	V
17	V	37	V
18	IV	38	V
19	V		

[1659] 如上表所示,实施例1、3、4、5、6、11、15、17、19、20、21、22、23、25、26、27、28、29、30、31、32、33、35、36、37和38的化合物显示出与普瑞色替同等的良好的细胞增殖抑制效果。

[1660] 试验例3:hERG电流抑制试验

[1661] 向培养的hERG(人Ether-a-go-go相关基因)基因稳定表达的CHO细胞株细胞中添加受试物质,使其为0.27～100μM。使用Qube 384(SophionBioscience公司)测定电位刺激下的hERG电流,计算出各受试物质抑制50％hERG电流的浓度(IC_{50}值;μM)。

[1662] 对于实施例中得到的化合物和普瑞色替,进行试验例3中所示的试验。另外,在各实施例的化合物中,将用试验例3中得到的hERG的IC_{50}除以试验例1中得到的抑制CHK1的IC_{50}而得到的值作为hERG/CHK1算出。结果如下表所示。

[1663] [表6-1]

[1664]

实施例	hERG抑制 IC_{50}(μM)	hERG /CHK1
普瑞色替	3．3	6111
1	11．5	＞115000
2	10．7	48636
3	87．4	397273
4	13．6	59130
5	2．7	8182
6	0．4	1481
7	72．8	346667
8	＞100	＞10000000
9	18．7	77917
10	21．6	72000
11	5．1	28333
12	3．1	9118
13	＜2．7	＜3649
14	＞100	＞454545
15	＜2．7	＜10385
16	＜2．7	＜888
17	12．6	42000
18	18．9	37059
19	11．3	43462
20	3．8	11176
21	10．3	35517
22	3．0	12500
23	＜2．7	＜6923
24	34．5	115000
25	4．7	6351
26	＜2．7	19286
27	13．9	4017
28	16．7	33400
29	11．2	18667
30	10．4	40000
31	6．9	9200

[1665] [表6-2]

[1666]

32	56.4	74211
33	14.5	21014
34	>100	>54945
35	8.7	14032
36	22.0	30137
37	<2.7	<8438
38	<2.7	<4500

[1667] 如上表所示,实施例1、3、4、7～10、14、24、32和34的化合物显示CHK1抑制的IC_{50}与hERG的IC_{50}具有50000倍以上的背离幅度。其中,实施例1、3、7、8、14和24的化合物显示CHK1抑制的IC_{50}与hERG的IC_{50}具有100000倍以上的背离幅度。

[1668] 这6种化合物与普瑞色替相比显示18倍以上的背离幅度,具备具有高安全性的特异的效果。

[1669] 试验例4:CYP3A4 MBI和酶失活清除率评价

[1670] 细胞色素P450(以下CYP)是参与药物代谢的最重要的酶群,许多药代动力学相互作用都是基于对这些CYP活性的抑制。CYP存在多种分子种类,尤其是CYP3A4在CYP的氧化反应中参与药物代谢的比例最大,并且占肝脏中存在的CYP的大部分。

[1671] CYP抑制方式主要有“可逆的抑制”和“不可逆的抑制(mechanism-basedinhibition:MBI)”的两种类型,特别是,已知基于MBI的CYP抑制不仅能引起药物相互作用,还会引起严重的副作用(肝毒性等)(Curr Opin Drug Discov Devel.2010January,13(1),66-77,Therapeutics and Clinical Risk Management,2005,1(1),3-13)。

[1672] 使用本实施例化合物和普瑞色替,评价CYP3A4的MBI和酶失活清除率。

[1673] 使用人肝微粒体为酶源,使用咪达唑仑或睾酮为底物,评价试验化合物对CYP3A4的抑制效果及抑制方式。37℃代谢反应30分钟后,通过LC-MS/MS测定试验化合物添加组(4种浓度)的底物来源的代谢产物和非添加组的底物来源的代谢产物,由该比率计算出抑制率。此外,由浓度图计算出IC_{50}值。已知试验化合物认定具有MBI作用时,通过在NADPH(辅因子)存在下预温育后添加底物来开始反应,从而IC50降低(Xenobiotica,2009,39(2),99-112),因此,当预温育带来的IC_{50}值的变化为2倍以上时,判定具有MBI作用。

[1674] 认定具有MBI作用时,通过非线形最小二乘法计算出k_{inact}(最大酶失活速度常数)和K_I(导致最大酶失活速度的50％速度的抑制药的浓度)。此外,根据Drug Metabolism and Disposition,2011,39(7),1247-1254所述的方法,计算出酶失活清除率($CL_{int}=k_{inact}/K_I$(ml/min/mmol)×CYP含量(pmol/mg蛋白))。

[1675] 将作为各实施例化合物和普瑞色替对CYP3A4的MBI作用的指标的由预温育带来的IC_{50}值的变化倍率和酶失活清除率示于下表。

[1676] [表7-1]

[1677]

实施例	IC_{50}值的变化倍率	酶失活清除率（μL／min／mg蛋白）
普瑞色替	2．6	0．019
1	未检测到	-
2	未检测到	-
3	3．1	0．036
4	未检测到	-
5	2．9	0．717
6	未检测到	-
7	未检测到	-
8	未检测到	-
9	4．5	0．150
10	3．3	0．091
11	3．5	1．040
12	2．7	0．287
13	3．6	0．484
14	未检测到	-
17	10．9	0．766
18	3．9	0．352
19	8．4	1．157
20	3．7	1．112
21	2．5	0．074
22	2．1	0．349
23	2．4	0．433
25	2．6	0．722
26	2．2	＞100
27	3．6	0．679
28	3．5	0．188
29	未检测到	0．054
30	未检测到	-

[1678] [表7-2]

[1679]

31	未检测到	
32	3.4	3.831
33	2.3	0.8887
34	未检测到	0.002
35	2.9	0.192
36	3.9	0.4430
37	未检测到	-
38	未检测到	-

[1680] 本申请发明人等新发现:普瑞色替抑制基于MBI的CYP3A4,因此存在会引起肝毒性等严重的副作用的风险。

[1681] 如上表所示明显可知,尽管普瑞色替示出基于MBI的CYP3A4的抑制,但实施例1、2、4、6～8、14、29～31、34、37和38的化合物未示出基于MBI的CYP3A4的抑制。本结果表明:实施例1、2、4、6～8、14、29～31、34、37和38的化合物具备具有高安全性的特异效果:不仅可以降低药物相互作用,还可降低引起肝毒性等严重的副作用的风险。其中,式(3)所示的化合物示出特别高的安全性,具有特异的效果。

[1682] 试验例5.人骨髓细胞菌落形成试验(血液毒性评价试验)

[1683] 人骨髓CD34阳性造血干细胞获自ロンザ株式会社。本冷冻细胞利用MethocultExpress培养基和含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的RPMI1640培养基以9:1混合得到的培养基解冻,以每1孔5000个细胞接种在6孔板中,在37℃、5%CO_2存在下培养一晚。以DMSO的终浓度为0.1%、100nM的方式添加评价化合物,培养48小时。回收细胞,用PBS洗涤。在12孔板中接种1/6量的细胞,在37℃、5%CO_2存在下培养约2周。培养结束后,使用溴化噻唑蓝四唑(MTT)计算菌落形成数。

[1684] 针对实施例中得到的代表化合物和普瑞色替,进行试验例5所示的试验。将结果示于下表。

[1685] [表8]

[1686]

	化合物浓度(nM)	菌落数(/孔)	
		mean	S. D.
DMSO	—	34	17
普瑞色替	100	19	9
实施例1	100	34	24

[1687] 如上表所明示,尽管100nM的普瑞色替示出对人骨髓细胞菌落形成的抑制效果,但100nM的实施例1未示出对人骨髓细胞菌落形成的抑制效果。根据该结果,实施例1的化合物具备对血液毒性具有高安全性的特异效果。

[1688] 试验例6.脂质体包封试验

[1689] 对于代表性的实施例化合物和普瑞色替,实施了脂质体的包封试验。

[1690] 将6.48g氢化大豆磷脂酰胆碱(COATSOME NC-21E,日油株式会社制)、2.32g胆固醇(Sigma公司制)和2.06g二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇2000(SUNBRIGHT DSPE-020CN,日油株式会社制)溶解于560mL加热至65℃的叔丁醇中。将该溶液用干冰/丙酮浴冷冻后,通过在减压下蒸馏除去而将叔丁醇去除,得到脂质混合物。

[1691] 向上述脂质混合物中添加250mM硫酸铵溶液200mL,加温至65℃,用均化器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散,得到粗脂质体分散液。进一步,将粗脂质体分散液用高压均化器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)约80nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes20KMWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相替换为10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液

(pH6.5),由此得到空脂质体液。通过0.22μm膜过滤器进行过滤,加入10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5),调整总脂质浓度为75mM(75μmol/mL)或50mM(50μmol/mL)。应予说明,制备量适宜增减。

[1692] 称取受试化合物2~3mg,加入总脂质浓度50mM的空脂质体液1mL,加入1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠水溶液而调整为pH5.5~7,在65℃的水浴中加温10~30分钟,然后冰冷却。有不溶物时,在15,000×g下离心5分钟除去。

[1693] 脂质体包封率如以下这样算出。

[1694] 将脂质体液100μL通过超滤过滤器(AmiconUltra、100K、0.5mL、Merck公司制)在4℃、15,000×g下离心10分钟。超滤后的滤液中的化合物浓度通过HPLC测定,设为未包封化合物浓度。

[1695] 将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混合液(0.1/25/75)稀释,在5℃下静置10分钟以上。在15,000×g下离心5分钟除去不溶物,通过HPLC测定上清的化合物浓度,设为脂质体液中的化合物浓度。

[1696] 通过下式算出包封率和包封效率。

[1697] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1698] 包封效率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/化合物导入时浓度

[1699] HPLC的测定条件如下述所示。

[1700] HPLC条件

[1701] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1702] 柱温:40℃

[1703] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1704] B:乙腈

[1705] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[1706] 流速:0.8mL/min

[1707] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1708] 注入量:3μL或5μL

[1709] [表9]

[1710]

化合物	化合物导入时浓度(mg/mL)	脂质体液中的化合物浓度(mg/mL)	包封率(%)	包封效率(%)
普瑞色替	2	2.16	99.8	107.7
实施例1	3	2.70	97.1	87.4
实施例3	2	1.86	99.3	92.3
实施例4	2	1.73	99.9	86.6
实施例5	3	2.97	100.0	99.1
实施例6	3	3.01	99.9	100.3

[1711] 可确认普瑞色替、实施例1、3、4、5、和6可实现80％以上的高包封效率。应予说明，实施例4的脂质体封入操作中，加入1mol/L盐酸调整pH时，观察到液体粘度显著上升。该粘度上升在大批量进行脂质体制造时可能成为问题。另一方面，实施例1、3、5、和6中，在脂质体封入操作中未发现粘度的上升。因此，式(3)和(4)所示的化合物示出特别良好的脂质体封入操作性。

[1712] 试验例6A.实施例1的脂质体包封试验

[1713] 针对实施例1的化合物，实施了脂质体的包封试验。

[1714] 称取Presome ACD-1(包含氢化大豆磷脂酰胆碱、胆固醇和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇2000的质量比分别为3:1:1的预调制混合物、日本精化株式会社制)11.08g，添加250mM硫酸铵溶液200mL，加热至65℃，利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而，将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散，得到平均粒径(Z-平均)80nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制)，将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/10％蔗糖溶液(pH6.5)，用0.22μm滤膜过滤，由此得到总脂质浓度75mM(75μmol/mL)的空脂质体液。

[1715] 称取实施例1的化合物，加入10mM L-组氨酸缓冲液/10％蔗糖溶液(pH6.5)约0.4mL、0.1mol/L盐酸约0.1mL、和上述空脂质体液1mL，加入1mol/L盐酸，将pH调整为6～6.5，在65℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却。然后，用0.22μm滤膜过滤。

[1716] 脂质体包封率如下进行计算。

[1717] 未包封化合物浓度:针对在脂质体液100μL中加入4％磷酸水溶液100μL得到的液体，用HPLC测定化合物浓度。HPLC的测定条件如下所述。

[1718] HPLC条件

[1719] 柱:MonoSelect nPEC(GL Sciences Inc.)

[1720] 柱温:30℃

[1721] 流动相:A:含有0.1％三氟乙酸的水

[1722] B:乙腈

[1723] A/B(min):

[1724] 95/5(0)→95/5(1)→70/30(6)→70/30(7)→95/5(7.01)→95/5(10)

[1725] 流速:1mL/min

[1726] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1727] 注入量:2μL

[1728] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释，在5℃下静置10分钟以上。在15,000×g下离心5分钟除去不溶物，将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。HPLC的测定条件如下所述。

[1729] HPLC条件

[1730] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1731] 柱温:40℃

[1732] 流动相:A:含有0.1％三氟乙酸的水

[1733] B:乙腈

[1734] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[1735] 流速:0.8mL/min

[1736] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1737] 注入量:5μL

[1738] 通过下式算出包封率和包封效率。

[1739] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1740] 包封效率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/化合物导入时浓度

[1741] [表10]

[1742]

化合物	化合物导入时浓度(mg/mL)	脂质体液中的化合物浓度(mg/mL)	包封率(%)	包封效率(%)
实施例1	2	1.94	94.1	91.3
	3	2.84	96.6	91.6
	4	3.78	97.5	92.2

[1743] 可确认实施例1可实现90%以上的高脂质体包封效率。

[1744] 试验例6B.实施例1的脂质体包封试验

[1745] 针对实施例1的化合物,实施了脂质体的包封试验。

[1746] 称取Presome ACD-1(包含氢化大豆磷脂酰胆碱、胆固醇和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇2000的质量比分别为3:1:1的预调制混合物、日本精化株式会社制)11.08g,添加250mM硫酸铵溶液200mL,加热至65℃,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。

[1747] 称取实施例1的化合物120mg,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)18.3mL、1mol/L盐酸0.3mL、和上述空脂质体液41.7mL,用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为2.00mg/mL、包封率98.0%、平均粒径(Z-平均)为84nm。

[1748] 脂质体包封率如下进行计算。

[1749] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1750] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,在5℃下静置10分钟以上。在15,000×g下离心5分钟除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1751] HPLC的测定条件如下所述。

[1752] HPLC条件

[1753] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1754] 柱温:40℃

[1755] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1756] B:乙腈

[1757] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[1758] 流速:0.8mL/min

[1759] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1760] 注入量:5μL

[1761] 利用下式计算包封率。

[1762] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1763] 将包封有实施例1的化合物的脂质体在5℃下保存,确认化合物浓度、包封率、和平均粒径的变化。如表11所明示,包封有实施例1的脂质体未发现化合物浓度、包封率和平均粒径大幅变化,保存稳定性优异。

[1764] [表11]

[1765]

化合物	保存时间	化合物浓度(mg/mL)	包封率(%)	平均粒径(Z-平均)
实施例1	初始值	2.00	98.0	84
	1W	2.07	98.5	—
	2W	2.00	98.7	—
	4W	1.90	98.9	—
	2M	2.10	99.3	—
	3M	1.94	99.0	—
	6M	2.06	99.5	89

[1766] 试验例7.药代动力学试验

[1767] 对于普瑞色替的溶液制剂、实施例1、3、6和普瑞色替的脂质体制剂,进行小鼠静脉内施用,进行血液中的受试物质的浓度测定。

[1768] 溶液制剂使用溶解在10mM甘氨酸/5%甘露醇溶液(pH2)或含有20%磺丁基醚-β-环糊精的10mM甘氨酸/5%甘露醇溶液(pH2)中后,用0.22μm滤膜过滤而得的物质。

[1769] 脂质体制剂使用下述这样的物质:利用与试验例6同样的方法制备包封有受试化合物的脂质体,使用凝胶过滤柱PD-10(GE Healthcare公司制)将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5)后,用0.22μm膜滤器过滤,加入10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5),调整浓度而得到脂质体制剂。

[1770] <施用试验>

[1771] 对于7周龄、雌性的BALB/c小鼠静脉内瞬时施用溶液制剂或脂质体制剂,在无麻醉下从颈静脉经时采集血液直至施用后72小时。在刚采血后的血液中加入4倍量的甲醇,将所得物质进行离心分离,用LC-MS/MS定量所得的上清中的受试化合物浓度。

[1772] LC-MS/MS的测定条件如下所述。

[1773] HPLC:Prominence系统(岛津制作所)

[1774] MS/MS:4000QTRAP(SCIEX)

[1775] 柱:Cadenza CD-C18,3μm,50×2mm(Imtakt株式会社)柱温:40℃

[1776] 流动相:A:含有0.1%甲酸的水

[1777] B:含有0.1%甲酸的乙腈

[1778] A/B(min):90/10(0)→10/90(2.5)→10/90(3.5)→90/10(3.6)→90/10(5.0)

[1779] 流速:0.4mL/min

[1780] 检测:ESI(正模式)

[1781] 注入量:0.1～5μL

[1782] 试验结果示于下表。表中,“mean”是指平均,“S.D.”是指标准偏差。关于从施用后0小时至施用后72小时为止的血浆中受试化合物浓度,示于表12、13、14、15和16。

[1783] [表12]

[1784]

普瑞色替的溶液制剂 1.0mg/kg (i.v.)	血浆中化合物浓度 (ng/mL)				
	1	2	3	mean	S.D.
0.08hr	245	277	160	227	61
0.25hr	138	112	140	130	16
0.5hr	93.6	139	90	108	27
1.0hr	51.2	44.3	64.9	53.5	11
6.0hr	N.D.	9.95	5.46	5.14	5.0
24.0hr	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
48.0hr	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
72.0hr	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.

[1785] [表13]

[1786]

普瑞色替的脂质体制剂 1.0mg/kg (i.v.)	血浆中化合物浓度 (ng/mL)				
	1	2	3	mean	S.D.
0.08hr	28200	24800	27400	26800	1778
0.25hr	23200	26600	25200	25000	1709
0.5hr	26200	26100	23800	25367	1358
1.0hr	20200	24600	21000	21933	2344
6.0hr	12600	13000	11200	12267	945
24.0hr	1610	2290	3630	2510	1028
48.0hr	211	320	232	254	58
72.0hr	7.98	11.3	21.8	13.7	7.2

[1787] [表14]

[1788]

实施例1的脂质体制剂1.0mg/kg (i.v.)	血浆中化合物浓度（ng/mL）				
	1	2	3	mean	S.D.
0.08hr	30400	31100	30800	30767	351
0.25hr	30500	29600	33300	31133	1930
0.5hr	28700	27600	27800	28033	586
1.0hr	24800	25500	24600	24967	473
6.0hr	18300	19000	16900	18067	1069
24.0hr	7200	5940	6810	6650	645
48.0hr	2000	2000	1580	1860	242.5
72.0hr	159	22.6	194	125.2	90.6

[1789] [表15]

[1790]

实施例3的脂质体制剂1.0mg/kg (i.v.)	血浆中化合物浓度（ng/mL）				
	1	2	3	mean	S.D.
0.08hr	31000	29100	37000	32367	4124
0.25hr	33700	34200	30900	32933	1779
0.5hr	25400	24600	30600	26867	3258
1.0hr	28600	24700	26900	26733	1955
6.0hr	15600	14800	17300	15900	1277
24.0hr	9780	8730	8710	9073	612
48.0hr	3520	2960	4940	3807	1021
72.0hr	1340	1442	1020	1267	219

[1791] [表16]

[1792]

实施例6的脂质体制剂1.0mg/kg (i.v.)	血浆中化合物浓度（ng/mL）				
	1	2	3	mean	S.D.
0.08hr	24700	23500	28800	25667	2779
0.25hr	25800	28100	25400	26433	1457
0.5hr	20700	21400	24700	22267	2136
1.0hr	23300	20100	21900	21767	1604
6.0hr	11100	10100	12700	11300	1311
24.0hr	1050	1050	926	1009	71.6
48.0hr	50.1	31.4	24.8	35.4	13.1
72.0hr	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.

[1793] 关于实施例1、3、6和普瑞色替的脂质体制剂的AUC，利用梯形法算出自施用后0小

时起至血浆中受试化合物浓度可定量的时刻(t)的AUC,示于表17。

[1794] [表17]

[1795]

实施例	AUC_{0-t} (ng·hr/mL)
普瑞色替	236309
1	447473
3	583953
6	186225

[1796] 根据以上结果,当静脉内施用经脂质体制剂化的实施例1和实施例3的包封脂质体时,各自确认了高血中滞留性。本结果显示实现了对于普瑞色替非临床试验中报道的药效最大化至关重要的72小时的持续暴露。因此,实施例1和实施例3具有优异的药代动力学分布,作为抗癌剂极其有用。表示作为式(3)所示的化合物的特征的、吡啶环上的氮原子存在于特定的位置是重要的。

[1797] 试验例8.使用细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的药效评价试验

[1798] 使用普瑞色替、包封有普瑞色替的脂质体制剂和包封有实施例1的脂质体制剂,评价抗肿瘤作用。

[1799] 普瑞色替的溶液制剂使用将普瑞色替溶解在含有20%磺丁基醚-β-环糊精的10mM甘氨酸/5%甘露醇溶液(pH2)中后,用0.22μm滤膜过滤而得的物质。

[1800] 脂质体制剂利用与试验例6相同的方法制备。称取受试化合物,加入总脂质浓度50mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,加入1mol/L盐酸将pH调整为6~7。或向受试化合物中加入10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5)和盐酸,使化合物溶解或分散,加入总脂质浓度75mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,将pH调整为6~7。将该液体在65℃的水浴中加热10~30分钟后进行冰冷却。在5℃的冰箱静置一晚以上后,用0.22μm滤膜过滤。利用试验例6所述的方法算出的脂质体包封率为99%以上。

[1801] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj,雌性,日本Charles River),将ES-2细胞(ATCC)向腹侧部周边进行皮内移植,以使其成为1×10^6个细胞/小鼠。在移植5~14天后确认ES-2细胞的植入后,将溶液制剂以30mg/kg或脂质体制剂以3mg/kg、7.5mg/kg、20mg/kg的剂量1周进行1次静脉施用、或1天2次连续进行3天皮下施用(1周合计施用6次)。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[1802] 肿瘤体积[mm^3]=0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[1803] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。此外,记载了由溶液制剂或脂质体制剂施用所带来的施用结束时的完全肿瘤消退(CR)个体率。对照施用组使用通过与试验例6相同的方法制备的空脂质体液。

[1804] T/C(%)=(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施

用开始时的肿瘤体积)×100

[1805] 表18示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的T/C(%)和CR个体率。

[1806] [表18]

[1807]

试验	施用路径	施用量(mg/kg)	施用期间(天)	日程(次/周)	T/C(%)	CR(%)
普瑞色替的溶液制剂	静脉	30(最大耐受剂量)	14	1	73	0
普瑞色替的溶液制剂	皮下	10(最大耐受剂量)	14	6	−5	0
普瑞色替的脂质体制剂	静脉	3	10	1	64	0
普瑞色替的脂质体制剂	静脉	7.5	10	1	4	0
普瑞色替的脂质体制剂	静脉	20	14	1	−17	33
实施例1的脂质体制剂	静脉	3	10	1	61	0
实施例1的脂质体制剂	静脉	7.5	10	1	6	0
实施例1的脂质体制剂	静脉	20	14	1	18	33

[1808] 在使用了荷癌小鼠的药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在任意的施用量下均明显示出与脂质体制剂化的普瑞色替同样优异的抗肿瘤效果。这些脂质体制剂在使用20mg/kg的施用量的评价试验中,实现了溶液制剂化的普瑞色替不能实现的肿瘤消退。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[1809] 试验例9.使用细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的中性粒细胞数的测定

[1810] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj,雌性,日本Charles River),将ES-2细胞(ATCC)向腹侧部周边进行皮内移植,以使其成为1×10^6个细

胞/小鼠。在移植5～14天后确认ES-2细胞的植入后,包封有普瑞色替的脂质体制剂和包封有实施例1的脂质体制剂以各用量进行单次静脉施用。自施用起72小时后采集血液,进行中性粒细胞数的测定。在本试验的比较中,使用了通过与试验例6同样的方法制备的空脂质体液。

[1811] 将施用了空脂质体液的对照施用组与分别施用了脂质体制剂化的实施例1和脂质体制剂化的普瑞色替的施用组进行比较,利用下式算出中性粒细胞的残存率,针对各自的制剂评价安全性。

[1812] 中性粒细胞的残存率(%)＝(施用组在施用72小时后的中性粒细胞数)/(对照施用组在施用72小时后的中性粒细胞数)×100

[1813] 表19示出对于细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的中性粒细胞的残存率。

[1814] [表19]

[1815]

试验	施用量 (mg／kg)	中性粒细胞的残存率 (%)
空脂质体	—	—
普瑞色替的 脂质体制剂	3	15
普瑞色替的 脂质体制剂	7．5	4
实施例1的 脂质体制剂	3	61
实施例1的 脂质体制剂	7．5	20
实施例1的 脂质体制剂	20	11

[1816] 脂质体制剂化的实施例1在与脂质体制剂化的普瑞色替相同的施用量下示出同等抗肿瘤效果。脂质体制剂化的普瑞色替在作为最小有效量的3mg/kg中,中性粒细胞的残存率为15%,可同时观测到抗肿瘤效果和血液毒性。另一方面,脂质体制剂化的实施例1在作为最小有效量的3mg/kg时,中性粒细胞的残存率为61%,血液毒性的副作用降低。此外,脂质体制剂化的实施例1如试验例8所示,观测到肿瘤消退的20mg/kg的施用量中,也示出比施用脂质体制剂化的普瑞色替7.5mg/kg时更高的中性粒细胞的残存率。综上可知,实施例1是兼具比普瑞色替高的安全性和有效性的优异化合物,具有特别的效果。此外,实施例1的脂质体制剂同样地是兼具高安全性和有效性的优异化合物,具有特别的效果。

[1817] 试验例10.人骨髓细胞髓系分化诱导试验(血液毒性评价试验)

[1818] 人骨髓CD34阳性造血干细胞获自ロンザ株式会社。本冷冻细胞利用1%胎牛血清含有IMDM培养基解冻,利用Complete hemaTox(注册商标)髓系培养基悬浮,在96孔板中每孔接种1000个细胞。以DMSO的终浓度成为0.1%、3nM的方式添加评价化合物,在37℃、5%

CO_2存在下培养7天。培养结束后,回收每孔半分量的细胞悬浮液,使用CellTiter-Glo(注册商标)3D Reagent(Promega、G968B)测定发光值,用下式计算出细胞生存比率。

[1819] 细胞生存比率(%)=(评价化合物的7天后的发光测定值)/(对照组的7天后的发光测定值)×100

[1820] 针对实施例中得到的代表化合物和普瑞色替,进行试验例10所示的试验。结果示于下表。

[1821] [表20]

[1822]

	化合物浓度(nM)	生存细胞比率(%)	
		mean	S. D.
DMSO	—	100	2
普瑞色替	3	26	3
实施例1	3	82	1

[1823] 如上表所示,尽管3nM的普瑞色替对由人骨髓细胞分化诱导的髓系细胞示出抑制效果,但3nM的实施例1明显未对由人骨髓细胞分化诱导的髓系细胞示出抑制效果。根据该结果,与普瑞色替相比,实施例1是对血液毒性具有高安全性的化合物,具有特别且特异的效果。

[1824] 试验例11.使用细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的肿瘤PD试验

[1825] 使用普瑞色替、包封有普瑞色替的脂质体制剂和包封有实施例1的脂质体制剂,评价肿瘤中的药效学的(Pharmaco Dynamics:PD)应答作用。

[1826] 普瑞色替的溶液制剂使用将普瑞色替溶解在含有20%磺丁基醚-β-环糊精的10mM甘氨酸/5%甘露醇溶液(pH2)中后,用0.22μm滤膜过滤而得的物质。

[1827] 脂质体制剂利用与试验例6相同的方法制备。称取受试化合物,加入总脂质浓度50mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,加入1mol/L盐酸将pH调整为6~7。或向受试化合物中加入10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5)和盐酸,使化合物溶解或分散,加入总脂质浓度75mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,将pH调整为6~7。将该液体在65℃的水浴中加热10~30分钟后进行冰冷却。在5℃的冰箱静置一晚以上后,用0.22μm滤膜过滤。利用试验例6所述的方法算出的脂质体包封率为99%以上。

[1828] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植卵巢癌ES-2细胞(ATCC),以使成为1×10^6细胞/小鼠。在移植5~14天后确认ES-2细胞的植入后,各试验按以下的条件进行施用:

[1829] 试验A:以溶液制剂30mg/kg或脂质体制剂7.5mg/kg、3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg的用量进行单次静脉施用。试验B:以溶液制剂30mg/kg或脂质体制剂7.5mg/kg、3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg的用量进行单次静脉施用。试验C:以脂质体制剂20mg/kg、7.5mg/kg、3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg的用量进行单次静脉施用。在施用后在1天后、3天后或者6天后回收肿瘤,评价基于化合物施用的肿瘤的PD应答。

[1830] 肿瘤中的PD应答作用通过蛋白印迹进行评价。利用ImageJ软件算出通过抗抗γH2AX抗体(05-636、Merck公司)和抗微管蛋白抗体(3873、Cell Signaling Technology公

司)检测到的各条带强度。

[1831] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,通过下式算出各条带强度的相对值,评价肿瘤中的PD应答作用。对照施用组使用通过与试验例6相同的方法制备的空脂质体液。

[1832] γH2AX的强度=｛(本公开的化合物施用组的肿瘤的γH2AX的条带强度)/(本公开的化合物施用组的肿瘤的微管蛋白的条带强度)｝/｛(对照施用组的肿瘤的γH2AX的条带强度/对照施用组的肿瘤的微管蛋白的条带强度)｝×100

[1833] 图7-9示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的γH2AX的强度。

[1834] 根据以上结果,如试验例11试验A所示,施用脂质体制剂化的普瑞色替时,在施用3天后,可确认7.5mg/kg的施用量下的强PD应答作用,实现了溶液制剂化的普瑞色替不能实现的PD应答作用。如试验例11试验B所示,施用脂质体制剂化的实施例1时,在施用1天后,可确认7.5mg/kg的施用量下的强PD应答作用,实现了溶液制剂化的普瑞色替不能实现的PD应答作用。如试验例11试验C所示,施用脂质体制剂化的实施例1时,在施用3天后和施用6天后,可确认7.5mg/kg和20mg/kg的施用量下的强PD应答作用。这些脂质体制剂如试验例7所示,示出实现了在普瑞色替的非临床试验中报告的对药效的最大化至关重要的72小时的持续暴露。因此,实施例1具有优异的药代动力学和药效学分布,作为抗癌剂极其有用。

[1835] 试验例12.使用细胞移植了ES-2的腹膜接种荷癌小鼠的药效评价试验

[1836] 使用普瑞色替、包封有普瑞色替的脂质体制剂和包封有实施例1的脂质体制剂,评价抗肿瘤作用。

[1837] 普瑞色替的溶液制剂使用将普瑞色替溶解在含有20%磺丁基醚-β-环糊精的10mM甘氨酸/5%甘露醇溶液(pH2)中后,用0.22μm滤膜过滤而得的物质。

[1838] 包封有普瑞色替的脂质体制剂如下进行制备。

[1839] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)80nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度75mM的空脂质体液。加入普瑞色替60mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)10mL、上述空脂质体液20mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。脂质体液中的普瑞色替浓度为1.97mg/mL、包封率98%。

[1840] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[1841] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1842] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1843] HPLC的测定条件如下所述。

[1844] HPLC条件

[1845] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1846] 柱温:40℃

[1847] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1848] B:乙腈

[1849] A/B(min):

[1850] 90/10(0)→70/30(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→90/10(4.01)→90/10(5)

[1851] 流速:0.8mL/min

[1852] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1853] 注入量:5μL

[1854] 利用下式计算包封率。

[1855] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1856] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[1857] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。加入实施例1的化合物80mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)12.2mL、上述空脂质体液27.8mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为1.99mg/mL、包封率97%。

[1858] 脂质体包封率如下进行计算。

[1859] 未包封化合物浓度:针对向脂质体液100μL中加入4%磷酸水溶液100μL而得的液体,用HPLC测定化合物浓度。HPLC的测定条件如下所述。

[1860] HPLC条件

[1861] 柱:MonoSelect nPEC(GL Sciences Inc.)

[1862] 柱温:30℃

[1863] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1864] B:乙腈

[1865] A/B(min):

[1866] 95/5(0)→95/5(1)→70/30(6)→70/30(7)→95/5(7.01)→95/5(10)

[1867] 流速:1mL/min

[1868] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1869] 注入量:2μL

[1870] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。HPLC的测定条件如下所述。

[1871] HPLC条件

[1872] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1873] 柱温:40℃

[1874] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1875] B:乙腈

[1876] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[1877] 流速:0.8mL/min

[1878] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1879] 注入量:5μL

[1880] 利用下式计算包封率。

[1881] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1882] 对于5周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River),向腹腔内移植使卵巢癌ES-2细胞(ATCC)上表达了荧光素酶的细胞株,以使其成为1×10^6细胞/小鼠。在移植5~14天后通过IVIS Imaging系统(PerkinElmer公司)确认ES-2细胞的植入后,将溶液制剂以30mg/kg或将脂质体制剂以4.5mg/kg、20mg/kg的用量进行1周1次静脉施用。自施用开始起经时地测定基于荧光素酶的发光,评价基于化合物施用的肿瘤的缩小作用。根据由基于荧光素酶的发光推测的肿瘤的大小、全身症状和体重推移,观察小鼠,对没有严重的发现且示出健康状态的小鼠测定生存期间。

[1883] 算出仅施用溶剂的对照施用组和本公开的化合物施用组的生存期间中央值,评价抗肿瘤效果。对照施用组施用空脂质体液。

[1884] 表21示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了ES-2的腹膜接种荷癌小鼠的生存期间中央值。

[1885] [表21]

[1886]

试验	施用量(mg/kg)	施用期间(天)	日程(次/周)	生存期间中央值(天)
空脂质体	—	35	1	18.5
普瑞色替的溶液制剂	30(最大耐受剂量)	35	1	27
普瑞色替的脂质体制剂	20	35	1	33.5
实施例1的脂质体制剂	4.5	35	1	24
实施例1的脂质体制剂	20	35	1	32

[1887] 在使用了腹膜接种荷癌小鼠的药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在20mg/kg的施用量下明显示出与脂质体制剂化的普瑞色替同样优异的抗肿瘤效果。这些脂质体制剂在使用20mg/kg的施用量的评价试验中,实现了溶液制剂化的普瑞色替不能实现的生存期间的延长。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[1888] 试验例13.使用细胞移植了ES-2的卵巢原位荷癌小鼠的药效评价试验

[1889] 使用普瑞色替、包封有普瑞色替的脂质体制剂和包封有实施例1的脂质体制剂,评价抗肿瘤作用。

[1890] 普瑞色替的溶液制剂使用将普瑞色替溶解在含有20%磺丁基醚-β-环糊精的10mM甘氨酸/5%甘露醇溶液(pH2)中后,用0.22μm滤膜过滤而得的物质。

[1891] 包封有普瑞色替的脂质体制剂如下进行制备。

[1892] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)80nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度75mM的空脂质体液。加入普瑞色替60mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)10mL、上述空脂质体液20mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。脂质体液中的普瑞色替浓度为1.97mg/mL、包封率98%。

[1893] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[1894] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1895] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1896] HPLC的测定条件如下所述。

[1897] HPLC条件

[1898] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1899] 柱温:40℃

[1900] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1901] B:乙腈

[1902] A/B(min):

[1903] 90/10(0)→70/30(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→90/10(4.01)→90/10(5)

[1904] 流速:0.8mL/min

[1905] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1906] 注入量:5μL

[1907] 利用下式计算包封率。

[1908] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1909] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[1910] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。加入实施例1的化合物80mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)12.2mL、上述空脂质体液27.8mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为1.99mg/mL、包封率97%。

[1911] 脂质体包封率如下进行计算。

[1912] 未包封化合物浓度:针对向脂质体液100μL中加入4%磷酸水溶液100μL而得的液体,用HPLC测定化合物浓度。HPLC的测定条件如下所述。

[1913] HPLC条件

[1914] 柱:MonoSelect nPEC(GL Sciences Inc.)

[1915] 柱温:30℃

[1916] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1917] B:乙腈

[1918] A/B(min):

[1919] 95/5(0)→95/5(1)→70/30(6)→70/30(7)→95/5(7.01)→95/5(10)

[1920] 流速:1mL/min

[1921] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1922] 注入量:2μL

[1923] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。HPLC的测定条件如下所述。

[1924] HPLC条件

[1925] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1926] 柱温:40℃

[1927] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1928] B:乙腈

[1929] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[1930] 流速:0.8mL/min

[1931] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1932] 注入量:5μL

[1933] 利用下式计算包封率。

[1934] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1935] 对于5周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles

River),在右侧卵巢内移植了使卵巢癌ES-2细胞(ATCC)上表达了荧光素酶的细胞株,以使成为1×10^6细胞/小鼠。在移植5～14天后通过IVIS Imaging系统(PerkinElmer公司)确认ES-2细胞的植入后,将溶液制剂以30mg/kg或将脂质体制剂以4.5mg/kg、20mg/kg的用量进行1周1次静脉施用。自施用开始起经时地测定基于荧光素酶的发光,评价基于化合物施用的肿瘤的缩小作用。根据由基于荧光素酶的发光推测的肿瘤的大小、全身症状和体重推移观察小鼠,对没有严重的发现且示出健康状态的小鼠测定生存期间。

[1936] 算出仅施用溶剂的对照施用组和本公开的化合物施用组的生存期间中央值,评价抗肿瘤效果。对照施用组施用空脂质体液。

[1937] 表22示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了ES-2的卵巢原位荷癌小鼠的生存期间中央值。

[1938] [表22]

[1939]

试验	施用量(mg/kg)	施用期间(天)	日程(次/周)	生存期间中央值(天)
空脂质体	—	56	1	31.5
普瑞色替的溶液制剂	30(最大耐受剂量)	56	1	36
普瑞色替的脂质体制剂	20	56	1	48.5
实施例1的脂质体制剂	4.5	56	1	39.5
实施例1的脂质体制剂	20	56	1	46

[1940] 在使用卵巢原位荷癌小鼠的药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在20mg/kg的施用量下明显示出与脂质体制剂化的普瑞色替同样优异的抗肿瘤效果。这些脂质体制剂在使用20mg/kg的施用量的评价试验中,实现了溶液制剂化的普瑞色替不能实现的生存期间的延长。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[1941] 试验例14.使用细胞移植了各种癌细胞的荷癌小鼠的药效评价试验使用包封有实施例1的脂质体制剂,评价抗肿瘤作用。

[1942] 包封有实施例1的脂质体制剂使用了试验例12中使用的物质或由以下的方法制备的物质。

[1943] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)138.4g,添加250mM硫酸铵溶液2437g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度58.2mg/mL的空脂质体液。称取实施例1的化合物3.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)562g和上述空脂质体液980g,将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon2 Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为10mML-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为1.98mg/mL、包封率97%。

[1944] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[1945] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1946] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1947] HPLC的测定条件如下所述。

[1948] HPLC条件

[1949] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1950] 柱温:40℃

[1951] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1952] B:乙腈

[1953] A/B(min):

[1954] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[1955] 流速:0.8mL/min

[1956] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1957] 注入量:5μL

[1958] 利用下式计算包封率。

[1959] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[1960] 或

[1961] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。加入实施例1的化合物60mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)9.16mL、上述空脂质体

液20.8mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为2.08mg/mL、包封率98%。

[1962] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[1963] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1964] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1965] HPLC的测定条件如下所述。

[1966] HPLC条件

[1967] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1968] 柱温:40℃

[1969] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1970] B:乙腈

[1971] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[1972] 流速:0.8mL/min

[1973] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[1974] 注入量:5μL

[1975] 利用下式计算包封率。

[1976] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度。

[1977] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River)或NODSCID小鼠(NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植卵巢癌SKOV-3细胞(ATCC)或肉瘤SJCRH30细胞(ATCC)或肉瘤HT-1080细胞(ATCC)或胰腺癌AsPC-1细胞(ATCC)或胰腺癌BxPC-3细胞(ATCC)或肺癌Calu-6细胞(ATCC)或卵巢癌OV5304细胞(CrownBioscience公司),以使成为5×10^{5}细胞/小鼠或1×10^{6}细胞/小鼠或3×10^{6}细胞/小鼠或5×10^{6}细胞/小鼠或8mm^3~27mm^{3}肿瘤块/小鼠。在移植5~27天后,确认各种癌细胞的植入后,将脂质体制剂以4.5mg/kg或10mg/kg或20mg/kg的用量1周1次进行静脉施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。应予说明,已知BxPC-3细胞示出吉西他滨耐性,OV5304示出PARP抑制剂耐性。

[1978] 肿瘤体积[mm^3]=0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[1979] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。对照施用组施用空脂质体液。

[1980] T/C(%)=(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[1981] 表23示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了各种癌细胞的荷癌小鼠的T/C(%)。

[1982] [表23]

[1983]

癌细胞株	癌症种类	试验	施用量（mg／kg）	施用期间（天）	日程（次/周）	T／C（%）
SKOV－3	卵巢癌	实施例1的脂质体制剂	20	21	1	10
SJCRH30	肉瘤	实施例1的脂质体制剂	10	14	1	3
HT－1080	肉瘤	实施例1的脂质体制剂	20	14	1	5
AsPC－1	胰腺癌	实施例1的脂质体制剂	4．5	21	1	73
AsPC－1	胰腺癌	实施例1的脂质体制剂	20	21	1	27
BxPC－3	胰腺癌	实施例1的脂质体制剂	4．5	21	1	15
BxPC3	胰腺癌	实施例1的脂质体制剂	20	21	1	21
Calu－6	肺癌	实施例1的脂质体制剂	10	14	1	2
OV5304	卵巢癌	实施例1的脂质体制剂	20	25	1	83

[1984] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1明显示出对各种癌细胞株的优异的抗肿瘤效果。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[1985] 试验例14A.使用细胞移植了各种癌细胞的荷癌小鼠的药效评价试验

[1986] 使用包封有实施例1的脂质体制剂,评价抗肿瘤作用。

[1987] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[1988] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[1989] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下

升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[1990] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[1991] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1992] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[1993] HPLC的测定条件如下所述。

[1994] HPLC条件

[1995] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[1996] 柱温:40℃

[1997] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[1998] B:乙腈

[1999] A/B(min):

[2000] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2001] 流速:0.8mL/min

[2002] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2003] 注入量:5μL

[2004] 利用下式计算包封率。

[2005] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2006] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植A2780细胞(ECACC)或HCC1806细胞(ATCC)或An3CA细胞(ATCC)或Detroit562细胞(ATCC)或FaDu细胞(ATCC)或NCI-H460细胞(ATCC),以使成为$1x10^6$细胞/小鼠或$2x10^6$细胞/小鼠或$1.2x10^6$细胞/小鼠或$1x10^6$细胞/小鼠或$3x10^6$细胞/小鼠或$3x10^6$细胞/小鼠。在移植5~27天后,确认各种癌细胞的植入后,将脂质体制剂以20mg/kg的用量1周1次进行静脉施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。应予说明,已知BxPC-3细胞示出吉西他滨耐性,OV5304示出PARP抑制剂耐性。

[2007] 肿瘤体积[mm^3]=0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2008] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。对照施用组施用空脂质体液。

[2009] T/C(%)=(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2010] 表23A示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了各种癌细胞的荷癌小鼠的T/C(%)。

[2011] [表23A]

癌细胞株	癌症种类	试验	施用量(mg/kg)	施用期间(天)	日程(次/周)	T／C(%)
A2780	卵巢癌	实施例1的脂质体制剂	20	14	1	55
HCC1806	乳腺癌	实施例1的脂质体制剂	20	21	1	−8
An3CA	子宫体癌	实施例1的脂质体制剂	20	14	1	15
Detroit562	头颈癌	实施例1的脂质体制剂	20	14	1	−1
FaDu	头颈癌	实施例1的脂质体制剂	20	14	1	33
NCI−H460	头颈癌	实施例1的脂质体制剂	20	14	1	19

[2012]

[2013] 试验例15.使用细胞移植了PA-1的荷癌小鼠的并用药效评价试验使用包封有实施例1的脂质体制剂和顺铂,评价抗肿瘤作用。

[2014] 使用了顺铂(Randa注射液50mg/100mL、日本化药公司)。

[2015] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2016] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)138.4g,添加250mM硫酸铵溶液2437g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度58.2mg/mL的空脂质体液。称取实施例1的化合物3.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)562g和上述空脂质体液980g,将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon2 Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为10mML-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为1.98mg/mL、包封率97%。

[2017] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2018] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2019] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀

释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2020] HPLC的测定条件如下所述。

[2021] HPLC条件

[2022] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2023] 柱温:40℃

[2024] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2025] B:乙腈

[2026] A/B(min):

[2027] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2028] 流速:0.8mL/min

[2029] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2030] 注入量:5μL

[2031] 利用下式计算包封率。

[2032] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2033] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植卵巢癌PA-1细胞(ATCC),以使成为5×10^6细胞/小鼠。在移植5~14天后确认PA-1细胞的植入后,将脂质体制剂以20mg/kg或将顺铂以2.5mg/kg或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2034] 肿瘤体积[mm^3]=0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2035] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。此外,记载了由脂质体制剂或顺铂或并用施用带来的施用结束时的完全肿瘤消退(CR)个体率。对照施用组施用空脂质体液。

[2036] T/C(%)=(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2037] 表24示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了PA-1的荷癌小鼠的T/C(%)和CR个体率。

[2038] [表24]

[2039]

试验	施用路径	施用量（mg／kg）	施用期间（天）	日程（次/周）	T／C（%）	CR（%）
实施例1的脂质体制剂	静脉	２０	２１	1	－５	0
顺铂	腹腔	２．５	２１	2	５２	0
实施例1的脂质体制剂和顺铂	静脉和腹腔	２０和２．５	２１	1 和 2	－１１	５０

[2040] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在与顺铂的并用中明显示出优异的抗肿瘤效果。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[2041] 试验例16.使用细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的并用药效评价试验使用包封有实施例1的脂质体制剂和吉西他滨,评价抗肿瘤作用。

[2042] 吉西他滨(Gemzar注射用200mg、日本イーライリリー公司)使用了溶于生理食盐水(大冢生食注、大冢制药工厂公司)而得到的物质。

[2043] 脂质体制剂利用与试验例6相同的方法制备。称取受试化合物,加入总脂质浓度50mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,加入1mol/L盐酸将pH调整为6～7。或向受试化合物中加入10mM L-组氨酸缓冲液/10％蔗糖溶液(pH6.5)和盐酸,使化合物溶解或分散,加入总脂质浓度75mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,将pH调整为6～7。将该液体在65℃的水浴中加热10～30分钟后进行冰冷却。在5℃的冰箱静置一晚以上后,用0.22μm滤膜过滤。利用试验例6所述的方法算出的脂质体包封率为99％以上。

[2044] 对于4～7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植卵巢癌ES-2细胞(ATCC),以使成为1×10^6细胞/小鼠。在移植5～14天后确认ES-2细胞的植入后,将脂质体制剂以4.5mg/kg或将吉西他滨以30mg/kg或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2045] 肿瘤体积[mm^3]＝0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2046] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。此外,记载了由脂质体制剂或吉西他滨或并用施用带来的施用结束时的完全肿瘤消退(CR)个体率。对照施用组使用通过与试验例6相同的方法制备的空脂质体液。

[2047] T/C(％)＝(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2048] 表25示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的T/

C(%)和CR个体率。

[2049] [表25]

[2050]

试验	施用路径	施用量(mg/kg)	施用期间(天)	日程(次/周)	T/C(%)	CR(%)
实施例1的脂质体制剂	静脉	4.5	14	1	58	0
吉西他滨	腹腔	30	14	2	9	0
实施例1的脂质体制剂和吉西他滨	静脉和腹腔	4.5和30	14	1和2	-15	100

[2051] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在与吉西他滨的并用中明显示出优异的抗肿瘤效果。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[2052] 试验例17.使用细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的中性粒细胞数的测定

[2053] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和吉西他滨,进行中性粒细胞数的测定。

[2054] 吉西他滨(Gemzar注射用200mg、日本イーライリリー公司)使用了溶于生理食盐水(大冢生食注、大冢制药工厂公司)而得到的物质。

[2055] 脂质体制剂利用与试验例6相同的方法制备。称取受试化合物,加入总脂质浓度50mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,加入1mol/L盐酸将pH调整为6~7。或向受试化合物中加入10mM L-组氨酸缓冲液/10%蔗糖溶液(pH6.5)和盐酸,使化合物溶解或分散,加入总脂质浓度75mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,将pH调整为6~7。将该液体在65℃的水浴中加热10~30分钟后进行冰冷却。在5℃的冰箱静置一晚以上后,用0.22μm滤膜过滤。利用试验例6所述的方法算出的脂质体包封率为99%以上。

[2056] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植卵巢癌ES-2细胞(ATCC),以使成为1×10^6细胞/小鼠。在移植5~14天后确认ES-2细胞的植入后,将脂质体制剂以4.5mg/kg或将吉西他滨以30mg/kg或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。自最终施用起96小时后采集血液,进行中性粒细胞数的测定。本试验的比较中使用了通过与试验例6同样的方法制备的空脂质体液。

[2057] 将施用了空脂质体液的对照施用组与使用了脂质体制剂化的实施例1、吉西他滨和它们的并用的施用组进行比较,通过下式算出中性粒细胞的残存率,评价各自的制剂的安全性。

[2058] 中性粒细胞的残存率(%)=(施用组的施用96小时后的中性粒细胞数)/(对照施用组的施用96小时后的中性粒细胞数)×100

[2059] 表26示出对于细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的中性粒细胞的残存率。

[2060] [表26]

[2061]

试验	施用量（mg／kg）	施用期间（天）	日程（次/周）	中性粒细胞的残存率（%）
空脂质体	—	14	1	—
实施例1的脂质体制剂	4．5	14	1	87
吉西他滨	30	14	2	39
实施例1的脂质体制剂和吉西他滨	4．5 和 30	14	1 和 2	38

[2062] 脂质体制剂化的实施例1在4.5mg/kg下中性粒细胞的残存率为87％,如试验例17所示,示出抗肿瘤效果,同时不示出血液毒性的副作用。此外,脂质体制剂化的实施例1如试验例17所示,在与观测到肿瘤消退的吉西他滨的并用施用中,不使由吉西他滨带来的血液毒性的副作用恶化,示出高中性粒细胞的残存率。根据以上,脂质体制剂化的实施例1是兼具高安全性和有效性的优异化合物,具有特别的效果。

[2063] 试验例18.使用细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的并用施用顺序相关的药效评价试验

[2064] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和吉西他滨,评价抗肿瘤作用。

[2065] 吉西他滨(Gemzar注射用200mg、日本イーライリリー公司)使用了溶于生理食盐水(大冢生食注、大冢制药工厂公司)而得到的物质。

[2066] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2067] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4％蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。加入实施例1的化合物60mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4％蔗糖溶液(pH6.5)9.16mL、上述空脂质体液20.8mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为2.08mg/mL、包封率98％。

[2068] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2069] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4％磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2070] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2071] HPLC的测定条件如下所述。

[2072] HPLC条件

[2073] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2074] 柱温:40℃

[2075] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2076] B:乙腈

[2077] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2078] 流速:0.8mL/min

[2079] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2080] 注入量:5μL

[2081] 利用下式计算包封率。

[2082] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2083] 对于4~7周龄的BALB/c-nu/nu小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植卵巢癌ES-2细胞(ATCC),以使成为1×10^6细胞/小鼠。在移植5~14天后确认ES-2细胞的植入后,将脂质体制剂以4.5mg/kg的用量和吉西他滨以30mg/kg的用量进行单次静脉施用和单次腹腔施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用,使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2084] 肿瘤体积[mm^3]=0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2085] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。此外,记载了由脂质体制剂或吉西他滨或并用施用带来的施用结束时的完全肿瘤消退(CR)个体率。对照施用组施用空脂质体液。

[2086] T/C(%)=(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2087] 表27示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了ES-2的荷癌小鼠的T/C(%)和CR个体率。

[2088] [表27]

[2089]

试验	T／C (%)
实施例1的脂质体制剂（第1天）和吉西他滨（第1天）	22
实施例1的脂质体制剂（第2天）和吉西他滨（第1天）	7
实施例1的脂质体制剂（第5天）和吉西他滨（第1天）	66
实施例1的脂质体制剂（第1天）和吉西他滨（第2天）	21
实施例1的脂质体制剂（第1天）和吉西他滨（第5天）	34

[2090] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在与吉西他滨的并用中明显示出优异的抗肿瘤效果。如试验例18所示,脂质体制剂化的实施例1和吉西

他滨的并用带来的抗肿瘤效果显示:在吉西他滨施用的第二天进行实施例1的脂质体制剂施用的施用顺序效果最强,接着是,同时施用或在实施例1的脂质体制剂施用的第二天进行吉西他滨施用的施用顺序效果强。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[2091] 试验例19.使用细胞移植了MC38的荷癌小鼠的并用药效评价试验

[2092] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,评价抗肿瘤作用。

[2093] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2094] 脂质体制剂利用与试验例6相同的方法制备。称取受试化合物,加入总脂质浓度50mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,加入1mol/L盐酸将pH调整为6～7。或向受试化合物中加入10mM L-组氨酸缓冲液/10％蔗糖溶液(pH6.5)和盐酸,使化合物溶解或分散,加入总脂质浓度75mM的空脂质体液,以使化合物浓度达到2mg/mL,将pH调整为6～7。将该液体在65℃的水浴中加热10～30分钟后进行冰冷却。在5℃的冰箱静置一晚以上后,用0.22μm滤膜过滤。利用试验例6所述的方法算出的脂质体包封率为99％以上。

[2095] 对于4～7周龄的c57BL/6J小鼠(C57BL/6J、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠大肠癌MC38细胞(Kerafast公司),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5～14天后确认MC38细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2096] 肿瘤体积[mm^3]＝0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2097] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。此外,记载了由脂质体制剂或抗PD-1抗体或并用施用带来的施用结束时的完全肿瘤消退(CR)个体率。对照施用组使用通过与试验例6相同的方法制备的空脂质体液。

[2098] T/C(％)＝(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2099] 表28示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了MC38的荷癌小鼠的T/C(％)和CR个体率。

[2100] [表28]

[2101]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	T／C（%）	CR（%）
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg／kg	14	1	43	0
抗PD-1抗体	腹腔	200μg／头	14	2	23	0
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体	静脉和腹腔	10mg／kg和200μg／头	14	1和2	5	60

[2102] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在脂质体制剂化的实施例1和与抗PD-1抗体的并用中明显示出优异的抗肿瘤效果。如试验例19所示,细胞移植了MC38的荷癌小鼠是抗PD-1抗体示出抗肿瘤效果的模型。根据本试验结果,实施例1是对抗PD-1抗体示出抗肿瘤效果的模型示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[2103] 试验例20.使用细胞移植了EMT6的荷癌小鼠的并用药效评价试验

[2104] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,评价抗肿瘤作用。

[2105] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2106] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2107] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。加入实施例1的化合物60mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)9.16mL、上述空脂质体液20.8mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为2.08mg/mL、包封率98%。

[2108] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2109] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2110] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2111] HPLC的测定条件如下所述。

[2112] HPLC条件

[2113] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2114] 柱温:40℃

[2115] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2116] B:乙腈

[2117] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2118] 流速:0.8mL/min

[2119] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2120] 注入量:5μL

[2121] 利用下式计算包封率。

[2122] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2123] 对于4~7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠乳腺癌EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5~14天后,确认EMT6细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2124] 肿瘤体积[mm^3]=0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2125] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。此外,记载了由脂质体制剂或抗PD-1抗体或并用施用带来的施用结束时的完全肿瘤消退(CR)个体率。对照施用组施用空脂质体液。

[2126] T/C(%)=(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2127] 表29示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了EMT6的荷癌小鼠的T/C(%)和CR个体率。

[2128] [表29]

[2129]

试验	施用路径	施用量	施用期间(天)	日程(次/周)	T/C(%)	CR(%)
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg/kg	14	1	36	20
抗PD-1抗体	腹腔	200μg/头	14	2	102	20
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体	静脉和腹腔	10mg/kg和200μg/头	14	1和2	-6	100

[2130] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在脂质体制

剂化的实施例1和与抗PD-1抗体的并用中明显示出优异的抗肿瘤效果。如试验例20所示,细胞移植了EMT6的荷癌小鼠是抗PD-1抗体未示出抗肿瘤效果的模型。根据本试验结果,实施例1是对于抗PD-1抗体未示出抗肿瘤效果的模型在脂质体制剂化的实施例1和与抗PD-1抗体的并用中示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[2131] 试验例21.使用细胞移植了EMT6的荷癌小鼠的并用施用顺序相关的药效评价试验

[2132] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,评价抗肿瘤作用。

[2133] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2134] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2135] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2136] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[2137] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2138] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2139] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2140] HPLC的测定条件如下所述。

[2141] HPLC条件

[2142] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2143] 柱温:40℃

[2144] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2145] B:乙腈

[2146] A/B(min):

[2147] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2148] 流速:0.8mL/min

[2149] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2150] 注入量:5μL

[2151] 利用下式计算包封率。

[2152] 包封率(%)＝(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2153] 对于5周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠乳腺癌EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5天后,确认EMT6细胞的植入后,将脂质体制剂以6mg/kg和将抗PD-1抗体以200μg/头的用量进行进行1周1次静脉施用和1周1次腹腔施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2154] 肿瘤体积[mm^3]＝0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2155] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。此外,记载了由脂质体制剂和抗PD-1抗体带来的施用结束时的完全肿瘤消退(CR)个体率。对照施用组施用空脂质体液。

[2156] T/C(%)＝(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2157] 表30示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了EMT6的荷癌小鼠的T/C(%)和CR个体率。

[2158] [表30]

[2159]

试验	T／C (%)	CR (%)
实施例1的脂质体制剂 (第1、8和15 天) 和抗PD-1抗体 (第1、8和15 天)	19	40
实施例1的脂质体制剂 (第1、8和15 天) 和抗PD-1抗体 (第4、11和18 天)	33	0
实施例1的脂质体制剂 (第4、11和18 天) 和抗PD-1抗体 (第1、8和15 天)	46	0

[2160] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,脂质体制剂化的实施例1在与抗PD-1抗体的并用中明显示出优异的抗肿瘤效果。如试验例21所示,脂质体制剂化的实施例1和抗PD-1抗体的并用带来的抗肿瘤效果同时施用最强,接着是,在实施例1的脂质体制剂施用后进行抗PD-1抗体施用的并用顺序强。根据本试验结果,实施例1是示出优异的抗肿瘤效果的有希望的化合物,具有特别的效果。

[2161] 试验例22.激酶选择性试验

[2162] 通过热点全面板激酶分析(Reaction Biology公司),评价普瑞色替、实施例1和实施例3对370的野生型激酶的选择性。

[2163] 缓冲液:20mM HEPES,pH7.5,10mM $MgCl_2$,2mM $MnCl_2$(根据需要),1mM EGTA,0.02% Brij35,0.02mg/mL BSA,0.1mM Na_3VO_4,2mM DTT,1%DMSO

[2164] ATP浓度:10μM

[2165] 反应时间:2小时

[2166] 2小时的ATP转换率:5~20%

[2167] 化合物浓度:100nM

[2168] 表31~表33中,针对普瑞色替、实施例1和实施例3,针对370的野生型激酶中在100nM下残存活性小于25%的激酶,示出激酶的名称和100nM下的残存活性(%)。

[2169] [表31]

[2170]

激酶	普瑞色替(100nM)添加后的残存活性(%)
RSK2	0.98
RSK3	1.69
CHK1	1.97
RSK1	2.23
CAMK2A	2.52
SIK2	2.62
RSK4	4.78
CAMK2D	6.07
LOK/STK10	6.15
CHK2	6.41
RET	7.12
TNIK	7.76
MARK4	10.22
MEK5	10.72
MELK	11.40
SIK1	11.93
MARK3	12.64
TRKC	12.67
MARK1	14.10
MARK2/PAR-1BA	14.26
BRSK2	14.44
ARK5/NUAK1	17.86
CDK8/CYCLIN C	18.06
CDK19/CYCLIN C	19.87
GLK/MAP4K3	20.81
BRSK1	21.69
LRRK2	23.54

[2171] [表32]

[2172]

激酶	实施例1(100nM)添加后的残存活性(%)
CHK1	2.87
RSK3	3.91
RSK2	4.32
RSK1	8.51
RSK4	9.05
CAMK2A	13.90
SIK2	14.12
MELK	17.18
TRKC	17.43
TNIK	17.81
RET	19.04
MARK4	24.10

[2173] [表33]

[2174]

激酶	实施例3(100nM)添加后的残存活性(%)
RSK2	2.22
CHK1	2.24
RSK3	3.13
RSK1	4.74
SIK2	4.85
RSK4	6.11
CAMK2A	7.18
MELK	11.28
MARK4	11.52
MARK2/PAR-1BA	13.37
MARK1	13.99
MARK3	14.18
TNIK	15.11
CAMK2D	15.60
BRSK2	17.03
TRKC	19.27
CHK2	19.41
RET	20.57
LOK/STK10	22.15
ARK5/NUAK1	22.68
CDK8/CYCLIN C	23.71
BRSK1	24.80

[2175] 如上表所示,实施例1和3的化合物示出比普瑞色替高的CHK1选择性。其中,实施例1具有特异选择性地抑制CHK1活性的特别的效果,避免基于非选择性的激酶抑制的毒性的表达,同时示出基于CHK1抑制的优异的抗肿瘤效果。

[2176] 试验例23.CHK1/CHK2选择性试验

[2177] 将受试物质溶于二甲基亚砜(DMSO),再用DMSO稀制备试验浓度的100倍浓度的溶液。将该溶液再用检测缓冲液进行25倍稀释而作为受试物质溶液。阳性对照物质也与其同

样地制备阳性对照物质溶液。将4倍浓度受试物质溶液利用检测缓冲液(20mM HEPES,0.01％Triton X-100,1mM DTT,pH7.5)制备。将4倍浓度底物/ATP/金属溶液利用试剂盒缓冲液(20mM HEPES,0.01％Triton X-100,5mM DTT,pH7.5)制备。将2倍浓度激酶溶液利用检测缓冲液制备。将5μL的4倍浓度受试物质溶液、5μL的4倍浓度底物/ATP/金属溶液和10μL的2倍浓度激酶溶液在聚丙烯制384孔板的孔内混合,在室温下反应1小时。添加70μL的终止缓冲液(QuickScout Screening Assist MSA;Carna Biosciences)使反应停止。将反应溶液中的底物肽和磷酸化肽利用LabChip™系统(Perkin Elmer)进行分离、定量。利用由底物肽峰高(S)和磷酸化肽峰高(P)计算的产物比(P/(P+S))评价激酶反应。将含有所有反应组分的对照孔的平均信号设为0％抑制,将背景孔(未添加酶)的平均信号设为100％抑制,根据各受试物质试验孔的平均信号计算抑制率。使用非线性最小二乘法将受试物质浓度和抑制率的图近似为四参数逻辑曲线来求出IC_{50}值。

[2178] 表34示出普瑞色替和实施例1的对CHK1和CHK2的IC_{50}值。

[2179] [表34]

[2180]

激酶	普瑞色替	实施例1
CHK1	$<3.0\times10^{-10}$M	$<3.0\times10^{-10}$M
CHK2	1.03×10^{-8}M	5.66×10^{-8}M

[2181] 如上表所示,实施例1的化合物与普瑞色替相比示出高的CHK1选择性。因此,实施例1在避免基于CHK2抑制的毒性的表达的同时,示出基于CHK1抑制的优异的抗肿瘤效果。

[2182] 试验例24.使用细胞移植了EMT6的荷癌小鼠的肿瘤内免疫细胞评价试验

[2183] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,针对在肿瘤内浸润的免疫细胞的分类进行评价。

[2184] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2185] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2186] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)138.4g,添加250mM硫酸铵溶液2437g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4％蔗糖溶液(pH6.5),使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度58.2mg/mL的空脂质体液。称取实施例1的化合物3.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4％蔗糖溶液(pH6.5)562g和上述空脂质体液980g,将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon2 Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为10mML-组氨酸缓冲液/9.4％蔗糖溶液(pH6.5),用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为1.98mg/mL、包封率97％。

[2187] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2188] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4％磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2189] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2190] HPLC的测定条件如下所述。

[2191] HPLC条件

[2192] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2193] 柱温:40℃

[2194] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2195] B:乙腈

[2196] A/B(min):

[2197] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2198] 流速:0.8mL/min

[2199] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2200] 注入量:5μL

[2201] 利用下式计算包封率。

[2202] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2203] 对于4~7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠乳腺癌EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5~14天后确认EMT6细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。自施用开始起10天后从各组4例个体回收肿瘤,测定重量后,进行合并,以使各组成为1个样品(N=4)。将EMT6细胞的肿瘤块用剪刀细细切断,使用小鼠肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec公司),按照规程使用温和的MACS组织解离器(Miltenyi Biotec公司),将肿瘤块制备为细胞悬浮液。

[2204] 将制备得到的细胞通过70μm细胞过滤器后,用添加有10%FBS的RPMI1640洗涤。然后,用红细胞溶解液(Lonza公司)处理1分钟,除去红细胞,再用添加10%FCS的RPMI1640洗涤,利用添加5%BSA的MACS冲洗液(Miltnyi Biotec公司、以下为MACS缓冲液)进行悬浮。将细胞悬浮液利用LUNAFL(Logos Biosystems公司)进行计数,将$1x10^6$细胞通过以下的方法和抗体进行染色。

[2205] 向细胞悬浮液中添加小鼠BD Fc BlockTM(BD Biosciences公司)进行封闭后,在冰上用BV510标记抗小鼠CD8a(Biolegend公司)、BV711标记抗小鼠CD3(Biolegend)、FITC标记抗小鼠f4/80(Biolegend公司)、PE标记抗小鼠IAd(BD Biosciences公司)、PerCP标记抗小鼠CD45(Biolegend公司)、PE-Cy7标记抗小鼠CD11b(赛默飞公司)、APC标记抗小鼠CD206(Biolegend公司)、APC-Cy7标记抗小鼠CD4(BD Biosciences公司)进行20分钟染色。利用MACS缓冲液洗涤1次后,添加在PBS中稀释得到的Hoechst33342(赛默飞公司),在冰上反应5分钟使死细胞染色。用MACS缓冲液进行2次染色后,用1%PFA/PBS固定,使用流式细胞仪对细胞进行分析。

[2206] 将CD45+CD3+T细胞(CD3阳性T细胞)、CD45+CD3+CD8+T细胞(CD8阳性T细胞)、CD45+CD11b+f4/80+IAd低CD206高细胞(M2巨噬细胞)、CD45+CD11b+f4/80+IAd高CD206低细胞(M1

巨噬细胞)的活细胞中的比例乘以利用LUNA FL(Logos Biosystems公司)计数的活细胞数,算出细胞数后,除以肿瘤重量,算出单位重量的各分类的细胞数。

[2207] 表35中记载了空脂质体、实施例1的脂质体制剂、抗PD-1抗体、并用组中的CD3阳性T细胞数、CD8阳性T细胞数,表36记载了M1巨噬细胞数、M2巨噬细胞数。

[2208] [表35]

[2209]

试验	施用路径	施用量	施用期间(天)	日程(次/周)	CD3阳性T细胞数(细胞/g)	CD8阳性T细胞数(细胞/g)
空脂质体	静脉	—	10	1	93239	6480
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg/kg	10	1	361191	733321
抗PD-1抗体	腹腔	200μg/头	10	2	106370	5818
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg/kg和200μg/头	10	1和2	244316	28829

[2210] [表36]

[2211]

试验	施用路径	施用量	施用期间(天)	日程(次/周)	M2巨噬细胞数(细胞/g)	M1巨噬细胞数(细胞/g)	M1—M2比
空脂质体	静脉	—	10	1	825485	363318	0.440
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg/kg	10	1	390266	1315145	3.370
抗PD-1抗体	腹腔	200μg/头	10	2	187972	544623	2.897
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg/kg和200μg/头	10	1和2	18364	119228	6.493

[2212] 通过实施例1的脂质体制剂的施用,肿瘤内的CD3阳性T细胞、CD8阳性T细胞各自与空脂质体施用组相比增加3倍、7倍以上,因此表示实施例1的脂质体制剂增强T细胞向肿瘤内的流入。通过实施例1的脂质体制剂的施用,与空脂质体施用组相比,M2巨噬细胞减少,M1巨噬细胞增加,在实施例1的脂质体制剂施用中M1-M2比增加为7.7倍,在抗PD-1抗体并用中增加14.8倍。以上表示:实施例1的脂质体制剂使肿瘤内微小环境由免疫抑制环境变为炎症环境。

[2213] 试验例25.使用细胞移植了EMT6的荷癌小鼠的淋巴结内CD8阳性T细胞分类评价试验

[2214] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,针对淋巴结中的CD8阳性T细胞的分类进行评价。

[2215] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2216] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2217] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2218] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[2219] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2220] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2221] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2222] HPLC的测定条件如下所述。

[2223] HPLC条件

[2224] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2225] 柱温:40℃

[2226] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2227] B:乙腈

[2228] A/B(min):

[2229] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2230] 流速:0.8mL/min

[2231] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2232] 注入量:5μL

[2233] 利用下式计算包封率。

[2234] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2235] 对于4～7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠乳腺癌EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5～14天后确认EMT6细胞的植入后,实施例1的将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。在自施用开始起10天后将所属淋巴结回收至HBSS缓冲液。将回收的淋巴结利用载玻片研磨,通过添加了10％FCS的RPMI1640进行悬浮。将细胞悬浮液离心沉降,用血细胞裂解液(Lonza公司)处理1分钟,除去红细胞,再用添加10％FCS的RPMI1640洗涤,利用添加5％BS的MACS冲洗溶液(Miltnyi Biotec公司、以下MACS缓冲液)进行悬浮。将细胞悬浮液利用LUNAFL(Logos Biosystems公司)计数,将$5x10^5$细胞通过以下的方法和抗体进行染色。

[2236] 向细胞悬浮液中添加稀释于PBS的小鼠BD Fc BlockTM(BD Biosciences公司)和活/死可固定染料,近IR(Thermofisher Siecntific公司),在冰上10分钟进行封闭后,离心沉降后利用MACS缓冲液100μL悬浮,使用BV510标记抗小鼠CD8a(Biolegend公司)、FITC标记抗小鼠CD44(Biolegend公司)、PE标记抗小鼠CD62L(BD Biosciences公司)、APC标记抗小鼠CD3(Biolegend公司)抗体在冰上进行20分钟染色。用MACS缓冲液进行2次洗涤后,用1％PFA/PBS固定,使用流式细胞仪对细胞进行分析。

[2237] 将CD45+CD3+CD8+CD62L+CD44+T细胞(中央记忆CD8阳性T细胞)、CD45+CD3+CD8+CD62L-CD44+T细胞(初始CD8阳性T细胞)、CD45+CD3+CD8+CD62L+CD44-T细胞(效应记忆CD8阳性T细胞)、CD45+CD3+CD8+CD62L-CD44-T细胞(效应CD8阳性T细胞)的活细胞中的比例乘以利用LUNA FL计数得到的活细胞数,算出细胞数,记载于表37。

[2238] [表37]

[2239]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	CD62L阴性CD44阳性细胞数（细胞/g）	CD62L阴性CD44阴性细胞数（细胞/g）
空脂质体	静脉	—	10	1	1889939	2643709
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg／kg	10	1	5115776	6535902
抗PD-1抗体	腹腔	200μg／头	10	2	5214578	8089262
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg／kg和200μg／头	10	1和2	7328752	1259490

[2240] 通过实施例1的脂质体制剂的施用,淋巴结中的CD62L阴性CD44阳性细胞数、CD62L阴性CD44阴性细胞数与空脂质体群相比增加3倍左右。进而,通过实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用,与空脂质体施用组相比,增加4～5倍。根据以上所示,通过实施例1的脂质体制剂的施用,以CD8阳性T细胞为中心的免疫反应被诱导,通过与抗PD-1抗体并用,该反应进一步变强。

[2241] 试验例26.免疫检查点抑制剂抵抗关连基因的改善效果研究

[2242] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,评价免疫检查点抑制剂抵抗关连基因的变化。

[2243] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2244] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2245] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。加入实施例1的化合物60mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)9.16mL、上述空脂质体液20.8mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为2.08mg/mL、包封率98%。

[2246] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2247] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL

混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2248] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2249] HPLC的测定条件如下所述。

[2250] HPLC条件

[2251] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2252] 柱温:40℃

[2253] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2254] B:乙腈

[2255] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2256] 流速:0.8mL/min

[2257] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2258] 注入量:5μL

[2259] 利用下式计算包封率。

[2260] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2261] 对于4~7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠乳腺癌EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5~14天后确认EMT6细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。自施用开始起10天后回收肿瘤,用干冰冷冻后,使用Maxwell RSC简易RNA细胞试剂盒(Promega公司),按照规程提取RNA。通过Qbit(赛默飞公司)测定RNA浓度,根据理研ジェネシス公司nCounter服务的规程,提供RNA。理研ジェネシス公司的解析是使用nCounter小鼠PanCancerIO 360面板(NanoString Technologies公司),使用nCounterFLEX分析系统进行解析。对于预定的标准化结果,将VEGF和PD-L1的表达差以施用抗PD-1抗体的个体组数据设为100%,算出抗PD-1抗体和实施例1的脂质体制剂的并用组中的表达,记载于表38。

[2262] [表38]

[2263]

试验	施用路径	施用量	施用期间(天)	日程(次/周)	PD-L1表达(%)	VEGFa表达(%)
抗PD-1抗体	腹腔	200μg/头	10	2	100	100
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg/kg和200μg/头	10	1和2	392	66

[2264] 通过实施例1的脂质体制剂的施用,与空脂质体施用组相比,PD-L1的表达亢进3.92倍,VEGFa的表达减少0.66倍。PD-L1的表达亢进也在临床上用作预测抗PD-1抗体的治

疗效果的生物标志物。认为通过实施例1的脂质体制剂的施用,PD-L1的表达亢进,由此变为抗PD-1容易示出药效的环境。VEGFa的表达亢进已知抑制CD8阳性T细胞向肿瘤内的流入。暗示通过实施例1的脂质体制剂的施用,VEGFa的表达降低,有助于使CD8阳性T细胞向肿瘤内的流入亢进。

[2265] 试验例27.长期免疫记忆的诱导效果研究

[2266] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,对长期免疫记忆的诱导进行评价。

[2267] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2268] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2269] 将Presome ACD-1(日本精化株式会社制)11.08g和250mM硫酸铵溶液200mL混合,利用均质器(ULTRA-TURRAX、IKA公司制)分散而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(Nano-MizerNM2、吉田机械兴业制)在100MPa的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)81nm的脂质体。使用透析盒(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes 20K MWCO、Thermo Scientific公司制),将脂质体外水相置换为10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5),用0.22μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度53.1mg/mL的空脂质体液。加入实施例1的化合物60mg、10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)9.16mL、上述空脂质体液20.8mL,将pH调整为6.5。将该液体在50℃的水浴中加热30分钟后进行冰冷却,用0.22μm滤膜过滤。实施例1的脂质体液中的化合物浓度为2.08mg/mL、包封率98%。

[2270] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2271] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2272] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2273] HPLC的测定条件如下所述。

[2274] HPLC条件

[2275] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2276] 柱温:40℃

[2277] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2278] B:乙腈

[2279] A/B(min):95/5(0)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2280] 流速:0.8mL/min

[2281] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2282] 注入量:5μL

[2283] 利用下式计算包封率。

[2284] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2285] 或

[2286] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,

利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[2287] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2288] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2289] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2290] HPLC的测定条件如下所述。

[2291] HPLC条件

[2292] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2293] 柱温:40℃

[2294] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2295] B:乙腈

[2296] A/B(min):

[2297] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2298] 流速:0.8mL/min

[2299] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2300] 注入量:5μL

[2301] 利用下式计算包封率。

[2302] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2303] 对于4~7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠乳腺癌EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5~14天后确认EMT6细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。将实施例1的脂质体制剂进行3次施用后,在实施例1的脂质体制剂单剂施用组和实施例1的脂质体制剂与抗PD-1抗体的并用组中发现完全缓解。再进行3个月观察,对其间维持完全缓解的个体和同周龄的非移植小鼠,再次在腹侧部周边皮内移植EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠,观察肿瘤的生长(二次移植)。自二次移植时起经时地测定肿瘤体积,评价肿瘤体积的缩小作用。将各组中的完全缓解率和二次移植后14天的肿瘤体积记载在表39中。使用

利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2304] 肿瘤体积[mm^3]＝0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2305] [表39]

[2306]

试验	施用路径	施用量	施用期间(天)	日程(次/周)	完全缓解率(%)	二次移植14天后的平均肿瘤体积(mm^3)
空脂质体	静脉	—	10	1	0	—
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg/kg	10	1	5.5	0
抗PD-1抗体	腹腔	200μg/头	10	2	0	—
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg/kg和200μg/头	10	1和2	50	36
非移植	—	—	—	—	—	336

[2307] 实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体并用组与实施例1的脂质体制剂单剂施用组相比,以高概率完全缓解。此外,对于完全缓解的个体,与非移植小鼠相比,未发现二次移植了癌细胞时的肿瘤的生长,或肿瘤的生长被抑制,因此表示完全缓解小鼠获得了长期免疫记忆。

[2308] 试验例28.使用细胞移植了EMT6的荷癌小鼠的肿瘤内CD8阳性细胞的TCR库研究、CD8评分、M1-M2巨噬细胞比率的研究

[2309] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,研究肿瘤内的CD8阳性T细胞的库变化和M1-M2巨噬细胞比率。

[2310] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2311] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2312] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2313] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸制备为pH6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[2314] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2315] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2316] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2317] HPLC的测定条件如下所述。

[2318] HPLC条件

[2319] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2320] 柱温:40℃

[2321] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2322] B:乙腈

[2323] A/B(min):

[2324] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2325] 流速:0.8mL/min

[2326] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2327] 注入量:5μL

[2328] 利用下式计算包封率。

[2329] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2330] 对于4~7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠乳腺癌EMT6细胞(ATCC),以使成为5×10^5细胞/小鼠。在移植5~14天后确认EMT6细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。自施用开始起10天后回收肿瘤,测定重量后,进行合并,以使各组成为1个样品(N=4)。将EMT6细胞的肿瘤块用剪刀细细切断,使用小鼠肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec公司),按照规程使用温和的MACS组织解离器,将肿瘤块制备为细胞悬浮液。

[2331] 将制备得到的细胞通过70μm细胞过滤器后,用添加有10%FBS的RPMI1640洗涤。然后,用红细胞溶解液(Lonza公司)处理1分钟,除去红细胞,进一步用添加10%FCS的RPMI1640洗涤,利用添加5%BSA的MACS冲洗液(Miltnyi Biotec公司、以下为MACS缓冲液)进行悬浮。将细胞悬浮液利用LUNAFL(Logos Biosystems公司)计数,对所有细胞按照规程添加CD45 MicroBeads,小鼠(Miltenyi Biotec公司),利用自动MACS Pro分离器(Miltenyi Biotec公司)分离CD45阳性细胞。将分离了的细胞进一步利用PerCP标记抗小鼠CD45抗体在冰上进行20分钟染色。利用MACS缓冲液洗涤1次后,添加稀释在PBS中的Hoechst33342(赛默飞公司),在冰上反应5分钟使死细胞染色。用MACS缓冲液进行2次染色。将染色的细胞用细

胞分选仪分离出CD45阳性活细胞。对已分离的细胞进行计数后,根据ChromiumNext GEN单细胞5‘试剂盒v2(10x GENOMICS公司)的规程,制作序列库,通过タカラバイオ公司进行序列解析。

[2332] 根据所得序列数据,使用CellRanger软件(10x GENOMICS公司)算出单细胞的基因表达和TCR克隆型,此外,根据所得基因表达数据进行细胞的聚类。对于所得的各簇,根据标志基因的表达划分细胞种类。根据Cd8a、Cd8b1表达、以及Cd4、Ncr1不表达,从由此确定的淋巴细胞簇中进行CD8阳性T细胞的划分。同样地,从巨噬细胞簇中,根据Stat1和Cd86的表达、根据M1巨噬细胞的Arg1和Mrc1的表达,进行M2巨噬细胞的划分。CD8阳性T细胞的个数相对于所得CD45阳性细胞的个数全体作为CD8阳性T细胞比例(图12)。同样地求出M1巨噬细胞和M2巨噬细胞的比例,计算出其比值作为M1-M2巨噬细胞比(图13)。T细胞克隆性使用由CellRanger输出的TCR克隆型信息进行解析。作为克隆性的指标,使用一定大小以上的克隆(具体为检测到2个细胞以上的克隆)在全部克隆中的比例、和由各克隆的细胞比例求出的基尼系数。为了校正各施用组检测到的CD8阳性T细胞数的差,在各施用组随机取样数量相等的细胞(35个细胞)后进行指标的算出。该取样进行100次,算出指标的平均。计算各施用组的指标,在投药组间进行比较(图11)。

[2333] 如图11所示,实施例1的脂质体制剂施用组中与空脂质体施用组相比,T细胞克隆性明显增加。实施例1的脂质体制剂和实施例1的脂质体制剂与抗PD-1抗体的并用组中,与空脂质体施用组相比,CD8阳性T细胞比例、M1-M2巨噬细胞比分别为5倍以上。在临床中将这些值在抗PD-1抗体敏感性的患者层和非敏感性患者层中比较时,CD8阳性T细胞比例敏感性患者层是非敏感性患者层的0.1-0.15倍,M1-M2巨噬细胞比是2-3倍左右,因此,根据文献(Pender等.Clin CancerRes2021;27:202-12),实施例1的脂质体制剂施用组、并用组中的变化是显著的。

[2334] 试验例29.使用细胞移植了Renca的荷癌小鼠的并用药效评价试验

[2335] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,评价抗肿瘤作用。

[2336] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2337] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2338] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2339] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径

(Z-平均)为74nm。

[2340] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2341] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4％磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2342] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2343] HPLC的测定条件如下所述。

[2344] HPLC条件

[2345] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2346] 柱温:40℃

[2347] 流动相:A:含有0.1％三氟乙酸的水

[2348] B:乙腈

[2349] A/B(min):

[2350] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2351] 流速:0.8mL/min

[2352] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2353] 注入量:5μL

[2354] 利用下式计算包封率。

[2355] 包封率(％)＝(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2356] 对于4～7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、杰克逊实验室・日本),将小鼠肾癌Renca细胞向腹侧部周边进行皮内移植,以使其成为5×10^4个细胞/小鼠。在移植23天后,确认Renca细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2357] 肿瘤体积[mm^3]＝0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2358] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。对照施用组施用空脂质体液。

[2359] T/C(％)＝(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2360] 表40示出受试化合物的各施用量、施用期间的对细胞移植了Renca的荷癌小鼠的T/C(％)。

[2361] [表40]

[2362]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	T／C（%）
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg／kg	15	1	80
抗PD-1抗体	腹腔	200μg／头	15	2	139
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体	静脉和腹腔	10mg／kg和200μg／头	15	1和2	59

[2363] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,“脂质体制剂化的实施例1”在“单剂”、或“与抗PD-1抗体的并用”中示出优异的抗肿瘤效果。如试验例29所示,细胞移植了Renca的荷癌小鼠是抗PD-1抗体未示出抗肿瘤效果的模型。根据本试验结果,实施例1的脂质体制剂通过“单剂”或“与抗PD-1抗体的并用”,对抗PD-1抗体未示出抗肿瘤效果的模型示出优异的抗肿瘤效果,具有特别的效果。

[2364] 试验例30.使用细胞移植了LLC的荷癌小鼠的并用药效评价试验

[2365] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,评价抗肿瘤作用。

[2366] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2367] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2368] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2369] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[2370] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2371] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2372] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀

释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2373] HPLC的测定条件如下所述。

[2374] HPLC条件

[2375] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2376] 柱温:40℃

[2377] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2378] B:乙腈

[2379] A/B(min):

[2380] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2381] 流速:0.8mL/min

[2382] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2383] 注入量:5μL

[2384] 利用下式计算包封率。

[2385] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2386] 对于4~7周龄的B6小鼠(C57BL/6J、雌性、杰克逊实验室·日本),将小鼠肺癌LLC细胞(RIKEN BRC)向腹侧部周边进行皮内移植,以使其成为1×10^6个细胞/小鼠。在移植7天后,确认LLC细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。从开始施用起经时测定肿瘤体积,评价由于施用化合物产生的肿瘤体积的缩小作用。使用利用电子游标卡尺(Mitutoyo)测量的肿瘤的短径、长径,通过下式计算出肿瘤体积。

[2387] 肿瘤体积[mm^3]=0.5×(短径[mm])^2×长径[mm]

[2388] 将仅施用了溶剂的对照施用组与本公开的化合物施用组进行比较,用以下的式子算出T/C,评价抗肿瘤效果。对照施用组施用空脂质体液。

[2389] T/C(%)=(本公开的化合物施用组的施用结束时的肿瘤体积-本公开的化合物施用组的施用开始时的肿瘤体积)/(对照施用组的施用结束时的肿瘤体积-对照施用组的施用开始时的肿瘤体积)×100

[2390] 表41示出受试化合物的各施用量在施用期间的对细胞移植了LLC的荷癌小鼠的T/C(%)。

[2391] [表41]

[2392]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	T／C（%）
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg／kg	17	1	33
抗PD-1抗体	腹腔	200μg／头	17	2	43
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体	静脉和腹腔	10mg／kg和200μg／头	17	1和2	8

[2393] 在使用了荷癌小鼠的并用药效评价试验中,“脂质体制剂化的实施例1”在“单剂”、或“与抗PD-1抗体的并用施用”中明显示出优异的抗肿瘤效果。如试验例30所示,细胞移植了LLC的荷癌小鼠是抗PD-1抗体难以示出抗肿瘤效果的模型。根据本试验结果,实施例1通过其脂质体制剂的“单剂”、或“与抗PD-1抗体的并用”对抗PD-1抗体难以示出抗肿瘤效果的模型示出优异的抗肿瘤效果,具有特别的效果。

[2394] 试验例31.使用细胞移植了Renca的荷癌小鼠的肿瘤内免疫细胞评价试验

[2395] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,针对在肿瘤内浸润的免疫细胞的分类进行评价。

[2396] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2397] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2398] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2399] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[2400] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2401] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4%磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2402] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2403] HPLC的测定条件如下所述。

[2404] HPLC条件

[2405] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2406] 柱温:40℃

[2407] 流动相:A:含有0.1%三氟乙酸的水

[2408] B:乙腈

[2409] A/B(min):

[2410] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2411] 流速:0.8mL/min

[2412] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2413] 注入量:5μL

[2414] 利用下式计算包封率。

[2415] 包封率(%)=(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2416] 对于4~7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠肾癌Renca细胞,以使成为5×10^4细胞/小鼠。在移植23天后,确认Renca细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。自施用开始起15天后从各组4例个体回收肿瘤。将Renca细胞的肿瘤块用剪刀细细切断,使用小鼠肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec公司),按照规程使用温和的MACS组织解离器(Miltenyi Biotec公司),将肿瘤块制备为细胞悬浮液。

[2417] 将制备得到的细胞通过70μm细胞过滤器后,用添加有10%FBS的RPMI1640洗涤。然后,用红细胞溶解液(Lonza公司)处理1分钟,除去红细胞,再用添加10%FCS的RPMI1640洗涤,利用添加5%BSA的MACS冲洗液(Miltnyi Biotec公司、以下为MACS缓冲液)进行悬浮。

[2418] 向细胞悬浮液中添加稀释于PBS的活/死可固定染料,近IR(Thermofisher Siecntific公司),在冰上反应5分钟使死细胞染色。利用MACS缓冲液洗涤1次后,添加小鼠BD Fc BlockTM(BD Biosciences公司)进行封闭后,在冰上用V450标记小鼠CD45(BD Biosciences公司)、BV510标记抗小鼠CD8a(Biolegend公司)、PE-Cy7标记抗小鼠CD3(赛默飞公司)、APC标记抗小鼠CD4(BD Biosciences公司)进行20分钟染色。用MACS缓冲液进行2次染色后,用1%PFA/PBS固定,使用流式细胞仪对细胞进行分析。

[2419] 对于CD45+淋巴细胞分类CD8+T细胞(CD8阳性T细胞)的活细胞中的比例,计算出各组6个个体的数据的平均。

[2420] 表42记载了空脂质体、实施例1的脂质体制剂、抗PD-1抗体、并用组中的CD8阳性T细胞率。

[2421] [表42]

[2422]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	CD8阳性T细胞率（%）
空脂质体	静脉	—	15	1	0.025
实施例1的脂质体制剂	腹腔	10mg／kg	15	1	0.094
抗PD-1抗体	腹腔	200μg／头	15	2	0.034
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg／kg和200μg／头	15	1和2	0.427

[2423] 通过实施例1的脂质体制剂的施用,肿瘤内的CD8阳性T细胞与空脂质体施用组相比增加3.5倍以上,因此表示实施例1的脂质体制剂增强T细胞的向肿瘤内的流入。以上表示,在小鼠肾癌Renca模型中实施例1的脂质体制剂使肿瘤内微小环境由免疫抑制环境变为炎症环境。

[2424] 试验例32.使用细胞移植了LLC的荷癌小鼠的肿瘤内免疫细胞评价试验

[2425] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,针对在肿瘤内浸润的免疫细胞的分类进行评价。

[2426] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2427] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2428] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2429] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径(Z-平均)为74nm。

[2430] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2431] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4％磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2432] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2433] HPLC的测定条件如下所述。

[2434] HPLC条件

[2435] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2436] 柱温:40℃

[2437] 流动相:A:含有0.1％三氟乙酸的水

[2438] B:乙腈

[2439] A/B(min):

[2440] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2441] 流速:0.8mL/min

[2442] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2443] 注入量:5μL

[2444] 利用下式计算包封率。

[2445] 包封率(％)＝(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2446] 对于4～7周龄的B6小鼠(C57BL/6J、雌性、杰克逊实验室·日本),将小鼠肺癌LLC细胞(RIKEN BRC)向腹侧部周边进行皮内移植,以使其成为1×10^6个细胞/小鼠。在移植7天后,确认LLC细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。自施用开始起17天后从各组4例个体回收肿瘤。将LLC细胞的肿瘤块用剪刀细细切断,使用小鼠肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec公司),按照规程使用温和的MACS组织解离器(Miltenyi Biotec公司),将肿瘤块制备为细胞悬浮液。

[2447] 将制备得到的细胞通过70μm细胞过滤器后,用添加有10％FBS的RPMI1640洗涤。然后,用红细胞溶解液(Lonza公司)处理1分钟,除去红细胞,再用添加10％FCS的RPMI1640洗涤,利用添加5％BSA的MACS冲洗液(Miltnyi Biotec公司、以下为MACS缓冲液)进行悬浮。

[2448] 向细胞悬浮液中添加稀释于PBS的活/死可固定染料,近IR(Thermofisher Siecntific公司),在冰上反应5分钟使死细胞染色。利用MACS缓冲液洗涤1次后,添加小鼠BD Fc BlockTM(BD Biosciences公司)进行封闭后,在冰上用V450标记小鼠CD45(BD Biosciences公司)、BV510标记抗小鼠CD8a(Biolegend公司)、PE-Cy7标记抗小鼠CD3(赛默飞公司)、PerCP标记抗小鼠CD4(BD Biosciences公司)进行20分钟染色。用MACS缓冲液进行2次染色后,用1％PFA/PBS固定,使用流式细胞仪对细胞进行分析。

[2449] 对于CD45+淋巴细胞分类CD8+T细胞(CD8阳性T细胞)的活细胞中的比例,计算出各组6个个体的数据的平均。

[2450] 表43记载了空脂质体、实施例1的脂质体制剂、抗PD-1抗体、并用组中的CD8阳性T细胞率。

[2451] [表43]

[2452]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	CD8阳性T细胞率（%）
空脂质体	静脉	—	17	1	0.92
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg/kg	17	1	1.20
抗PD-1抗体	腹腔	200μg/头	17	2	1.36
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg/kg和200μg/头	17	1和2	2,14

[2453] 通过“实施例1的脂质体制剂”的施用,肿瘤内的CD8阳性T细胞与空脂质体施用组相比增加1.3倍以上,因此表示实施例1的脂质体制剂增强T细胞向肿瘤内的流入。同时,本模型中也发现与“抗PD-1抗体施用组”中相同程度的肿瘤内的CD8阳性T细胞,“该脂质体制剂与抗PD-1抗体的并用组”中发现与它们相对应的增加。这与试验例30中所示的药效数据一致。以上表示:在小鼠肾癌LLC模型中实施例1的脂质体制剂也使肿瘤内微小环境由免疫抑制环境变为炎症环境。

[2454] 试验例33.使用细胞移植了Renca的荷癌小鼠的肿瘤内免疫环境评价试验

[2455] 使用包封有实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体,对在肿瘤内浸润的免疫细胞相关的基因表达进行评价。

[2456] 抗PD-1抗体(114116、Biolegend公司)使用利用PBS(Invitrogen公司)稀释而得的物质。

[2457] 包封有实施例1的脂质体制剂如下进行制备。

[2458] 称取Presome ACD-1(日本精化株式会社制)498.2g,添加250mM硫酸铵溶液8772g,利用均质器(CLEARMIX、M TECHNIQUE公司制)分散,通过真空脱气进行消泡而得到粗脂质体分散液。进而,将粗脂质体分散液利用高压均质器(MicrofluidizerM-110EH-30、Microfluidics公司制)在14500Psi的压力下分散,得到平均粒径(Z-平均)73nm的脂质体。使用装有5个Pellicon盒(Pellicon 2Mini 300kD 0.1m2、メルク公司制)的切向流过滤系统,将脂质体外水相置换为注射用水后,添加组氨酸和蔗糖以使其成为10mM L-组氨酸/9.4%蔗糖溶液,使用1mol/L盐酸将pH调整为6.5后,使用0.2μm滤膜过滤,由此得到总脂质浓度50.2mg/mL的空脂质体液。

[2459] 称取实施例1的化合物10.0g,加入10mM L-组氨酸缓冲液/9.4%蔗糖溶液(pH6.5)1354g、1mol/L盐酸27g、和上述空脂质体液3786g,用1mol/L盐酸将pH调整为6.5。在45℃下升温60分钟后冷却,将pH调整为6.5,用0.2μm滤膜过滤。将该液体以50mL分装入玻璃瓶中,加盖,密封。脂质体液中的实施例1的化合物浓度为2.01mg/mL、包封率为97.5%、平均粒径

(Z-平均)为74nm。

[2460] 脂质体液中的化合物浓度和包封率如下进行计算。

[2461] 未包封化合物浓度:将脂质体液100μL、4％磷酸水溶液100μL和生理食盐水300μL混合,以100,000×g离心60分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2462] 脂质体液中的化合物浓度:将脂质体液用三氟乙酸/水/甲醇混液(0.1/25/75)稀释,以4℃、15,000×g离心10分钟而除去不溶物,将上清的化合物浓度用HPLC进行测定。

[2463] HPLC的测定条件如下所述。

[2464] HPLC条件

[2465] 柱:Acquity UPLC BEH C18,1.7μm,50x2.1mm

[2466] 柱温:40℃

[2467] 流动相:A:含有0.1％三氟乙酸的水

[2468] B:乙腈

[2469] A/B(min):

[2470] 95/5(0)→60/40(3)→0/100(3.5)→0/100(4)→95/5(4.01)→95/5(5)

[2471] 流速:0.8mL/min

[2472] 检测:紫外可见检测器测定波长254nm

[2473] 注入量:5μL

[2474] 利用下式计算包封率。

[2475] 包封率(％)＝(脂质体液中的化合物浓度-未包封化合物浓度)×100/脂质体液中的化合物浓度

[2476] 对于4～7周龄的BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrlCrlj、雌性、日本Charles River),在腹侧部周边皮内移植小鼠肾癌Renca细胞,以使成为5×10^4细胞/小鼠。在移植23天后,确认Renca细胞的植入后,将脂质体制剂以10mg/kg或抗PD-1抗体以200μg/头或以它们的并用的用量进行1周1次静脉施用、或1周2次腹腔施用、或它们的并用施用。自施用开始起15天后从各组4例个体回收肿瘤。将Renca细胞的肿瘤块用剪刀细细切断,使用小鼠肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec公司),按照规程使用温和的MACS组织解离器(Miltenyi Biotec公司),将肿瘤块制备为细胞悬浮液。

[2477] 将制备得到的细胞通过70μm细胞过滤器后,用添加有10％FBS的RPMI1640洗涤。然后,用红细胞溶解液(Lonza公司)处理1分钟,除去红细胞,再用添加10％FCS的RPMI1640洗涤,利用添加5％BSA的MACS冲洗液(Miltnyi Biotec公司、以下为MACS缓冲液)进行悬浮。

[2478] 将细胞悬浮液离心沉降,用干冰冷冻后,使用Maxwell RSC简易RNA细胞试剂盒(Promega公司),按照规程提取RNA。将提取RNA利用xxx进行逆转录,使用Taqman探针对CD8阳性T细胞关连标志物(颗粒酶B、干扰素γ)、M1巨噬细胞关连基因(H2ab1、CD80)、M2巨噬细胞关连基因(Mrc1、精氨酸酶1)、管家基因GAPDH的表达水平进行定量,将各基因的表达量用GAPDH的值进行标准化。

[2479] 在表44～46中,对于CD8阳性T细胞关连标志物(颗粒酶B、干扰素γ)、M1巨噬细胞关连基因(H2ab1、CD80)、M2巨噬细胞关连基因(Mrc1、Arg1)的变化,算出各组5或6个个体的数据的平均,通过以载体的值为1时的比率数据示出。

[2480] [表44]

[2481]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	颗粒酶B	干扰素γ
空脂质体	静脉	—	15	1	1	1
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg／kg	15	1	2．6	12．9
抗PD-1抗体	腹腔	200μg／头	15	2	0．7	1．2
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg／kg和200μg／头	15	1和2	3．4	17．8

[2482] [表45]

[2483]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	CD80	H2ab1
空脂质体	静脉	—	15	1	1	1
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg／kg	15	1	1．9	1．6
抗PD-1抗体	腹腔	200μg／头	15	2	0．8	1．1
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg／kg和200μg／头	15	1和2	1．7	1．6

[2484] [表46]

[2485]

试验	施用路径	施用量	施用期间（天）	日程（次/周）	Mrc1	Arg1
空脂质体	静脉	—	15	1	1	1
实施例1的脂质体制剂	静脉	10mg/kg	15	1	0.6	0.7
抗PD-1抗体	腹腔	200μg/头	15	2	0.8	0.5
实施例1的脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用	静脉和腹腔	10mg/kg和200μg/头	15	1和2	0.5	0.7

[2486] 通过实施例1的脂质体制剂的施用,与空脂质体施用组相比,在“实施例1的脂质体制剂组”、或“该脂质体制剂和抗PD-1抗体的并用组”中,肿瘤内的CD8阳性T细胞关连基因(颗粒酶B、干扰素γ)分别增加为2倍、10倍以上,M1巨噬细胞关连基因(H2ab1、CD80)分别增加1.5倍、1.5倍以上,M2巨噬细胞关连基因(Mrc1、精氨酸酶1)分别减少0.6倍、0.7倍以下。根据以上表示,在小鼠肾癌Renca模型中实施例1的脂质体制剂使肿瘤内微小环境由M2巨噬细胞主导的免疫抑制环境变为M1巨噬细胞主导的炎症环境。根据该变化,暗示Renca模型中实施例1的脂质体制剂单剂、和该脂质体制与抗PD-1抗体的并用带来显著的药效。

[2487] 试验例34.细胞中的细胞质内ssDNA评价试验

[2488] 使用实施例1,针对肿瘤内的复制应激进行评价。

[2489] 接种小鼠乳腺癌细胞EMT6、小鼠肾癌细胞Renca,在24小时后用实施例1和DMSO处理并培养24小时。然后,回收细胞,使用NE-PER核和胞质提取试剂(赛默飞公司),提取细胞质成分。进行蛋白质定量,测定浓度后,使用Qbit ssDNA分析试剂盒(赛默飞公司),对ssDNA进行定量。

[2490] 各细胞中的定量结果示于图14。

[2491] 如图14所示,通过实施例1的处理,细胞质内的ssDNA在EMT6中亢进1.3倍,在Renca中亢进1.5倍。细胞质内的ssDNA增加是DNA复制应激的标志之一,因此表示在这些细胞中实施例1诱导复制应激。

[2492] 如试验例34中所示,实施例1的处理会带来ssDNA在细胞质中的蓄积。ssDNA的蓄积是通过DNA复制应激、修复异常导致的DNA损伤而引起的。蓄积的细胞质ssDNA激活STING路径,释放I型干扰素、细胞因子,如试验例32所示激活树状细胞为代表的肿瘤内的免疫细胞。上述的作用认为是实施例1在抗PD-1抗体抗性肿瘤中通过与抗PD-1抗体的并用而示出显著药效的机制之一。

[2493] 根据试验例1～13的结果,本申请发明的化合物示出高的CHK1抑制活性(试验例1),示出高的癌细胞增殖抑制效果(试验例2)。此外,本申请发明化合物具有心毒性的风险

低的特征(试验例3),同时具有可高效包封于脂质体的特征(试验例6、6A、6B)。

[2494] 本发明人等新发现普瑞色替具有肝毒性的担忧的问题,特别是发现式(3)所示的化合物(在特定的位置具有氮原子的吡啶衍生物)克服了该问题,具有高的安全性(试验例4)。另外,特别是式(3)所示的化合物具有优异的药代动力学(试验例7)。

[2495] 作为式(3)所包含的代表化合物的实施例1的化合物与普瑞色替相比,具有5倍以上高的CHK1抑制活性(试验例1),具有示出强效的细胞增殖抑制效果的特别的效果(试验例2)。此外,实施例1的化合物与普瑞色替相比,心毒性极低(试验例3)。发现:未示出作为普瑞色替的新问题的肝毒性的担忧(试验例4),与普瑞色替相比,具有血液毒性的风险大幅减轻的特异效果(试验例5、和试验例10)。此外,实施例1的化合物示出良好的药代动力学(试验例7),可高效封入脂质体中,示出良好的脂质体封入操作性(试验例6、6A、6B)。

[2496] 此外,脂质体制剂化的实施例1的化合物具有在体外和体内中示出优异的抗肿瘤效果的特别的效果,同时具备具有高安全性的特异效果(试验例8、试验例9、试验例11～试验例14)。通过将已知的抗癌剂和实施例1的化合物并用,具有兼具极优异的抗肿瘤效果和高安全性的特征(试验例15～试验例21)。此外,实施例1的化合物与普瑞色替相比,具有选择性抑制CHK1的特别的效果,在避免非选择性激酶抑制而产生的毒性的同时,示出基于CHK1抑制的优异的抗肿瘤效果(试验例22～试验例23)。

[2497] 综上所述,实施例1的化合物与普瑞色替相比,在具备高有效性的特别效果的同时,兼具示出高安全性的特异的效果,具有不能预测到的效果。此外,实施例1的脂质体制剂是兼具优异的血中滞留性、抗肿瘤效果、高安全性的优异药剂,具有意想不到的效果。

[2498] 本公开涉及CHK1抑制剂,涉及降低副作用的同时治疗效果高的抗肿瘤剂。本发明人等进行深入研究的结果发现:式(1)所示的化合物对CHK1具有强抑制作用,发现优异抗肿瘤作用。其中,式(3)所示的具有在特定的位置具有氮原子的吡啶环的一系列化合物确认示出特别且特异的效果,从而完成本申请发明。

[2499] 具体而言,本发明人等创制了实施例1～38的化合物,且一系列化合物示出极高的CHK1抑制活性(试验例1),示出高癌细胞毒性(试验例2)。由于hERG抑制弱,因此具有兼具高安全性的特异效果(试验例3)。此外,本申请发明人等发现普瑞色替具有肝毒性的担忧的问题,发现本申请发明化合物具有克服该课题的特异效果(试验例4)。其中,实施例1等所代表的“具有在特定的取代位置存在氮原子的吡啶环的式(3)所示的化合物”具有极其特别且特异的效果。

[2500] 式(3)代表的实施例1等化合物与普瑞色替不同,不抑制人骨髓细胞菌落形成且对血液毒性示出高安全性(试验例5),示出脂质体包封效率极高、良好的脂质体封入操作性(试验例6、6A、6B),通过脂质体制剂化而示出高血中滞留性(试验例7)。该脂质体制剂不仅对荷癌模型具有普瑞色替不能实现的肿瘤消退效果(试验例8),还具有极高的安全性(试验例9、10)。实施例1本身具有优异药代动力学的和药效学的分布(试验例11),其脂质体制剂示出普瑞色替不能实现的生存期间的延长效果(试验例12、13),对各种癌症示出广泛的有效性(试验例14)。将脂质体制剂化的实施例1和各种抗癌剂(顺铂、吉西他滨或PD-1抗体)并用后示出特别的效果(试验例15-21)。此外,实施例1的化合物与普瑞色替相比,具有选择性抑制CHK1活性的特别效果,因此可避免非选择性激酶抑制产生的毒性,示出基于CHK1抑制的优异的抗肿瘤效果(试验例22～23)。实施例1的化合物示出使肿瘤内微小环境由免疫抑

制环境变为炎症环境的效果(试验例24)。

[2501] 通过实施例1的脂质体制剂的施用,示出以CD8阳性T细胞为中心的免疫反应被诱导,通过与抗PD-1抗体并用,其反应进一步变强(试验例25)。通过实施例1的施用,示出VEGFa的表达降低(试验例26)。实施例1和抗PD-1抗体的并用组与实施例1单剂施用组相比,示出以高概率变得完全缓解,完全缓解的小鼠获得长期的免疫记忆(试验例27)。试验例1施用组与空脂质体施用组相比,明显T细胞克隆性显著增加,CD8阳性T细胞比例、M1-M2巨噬细胞比在试验例1和试验例1与抗PD-1抗体的并用组中与空脂质体施用组相比分别变为5倍以上(试验例28)。

[2502] 脂质体制剂化的实施例1对于抗PD-1抗体未示出或难以示出抗肿瘤效果的模型即“细胞移植了Renca、或LLC的荷癌小鼠”,通过单剂、或与抗PD-1抗体的并用施用示出格外显著的抗肿瘤效果(试验例29和30)。此外,对于细胞移植了Renca、或LLC的荷癌小鼠,脂质体制剂化的实施例1在单剂、或与抗PD-1抗体的并用中增加肿瘤内的CD8阳性T细胞率,使肿瘤内微小环境由免疫抑制环境变为炎症环境(试验例31和32)。此外,对于细胞移植了Renca的荷癌小鼠,脂质体制剂化的实施例1在单剂、或与抗PD-1抗体的并用中使CD8阳性T细胞关连基因(颗粒酶B、干扰素γ)和M1巨噬细胞关连基因(H2ab1、CD80)增加,使M2巨噬细胞关连基因(Mrc1、精氨酸酶1)减少,因此具有使肿瘤内微小环境由M2巨噬细胞主导的免疫抑制环境变为M1巨噬细胞主导的炎症环境的格外显著的效果(试验例33)。此外,将小鼠乳腺癌细胞EMT6和小鼠肾癌细胞Renca用实施例1处理后,细胞质内的ssDNA增加,因此实施例1具有诱导上述细胞中DNA复制应激的格外显著的效果(试验例34)。

[2503] 如以上所述,尽管使用本公开的优选实施方式来说明了本公开,但是可理解本公开应当仅通过权利要求书来解释其范围。本申请对于作为日本特愿2022-87166(2022年5月27日申请)主张优先权,其内容在本说明书中作为参考被引用。可理解对于本说明书中引用的专利、专利申请和文献,其内容本身应该与具体在本说明书中记载同样地作为对于本说明书的参考而引用其内容。

[2504] 产业上的可利用性

[2505] 本公开的化合物强效地抑制检查点激酶1(CHK1)。它们的脂质体制剂通过其缓释效果而实现持续的药物暴露,由此显示出基于CHK1的抑制作用的强效的抗肿瘤效果。因此,本公开的化合物和其制药学上可接受的盐、含有它们的药物组合物、以及含有它们的脂质体制剂作为CHK1参与的病状的治疗剂或预防剂是有用的。

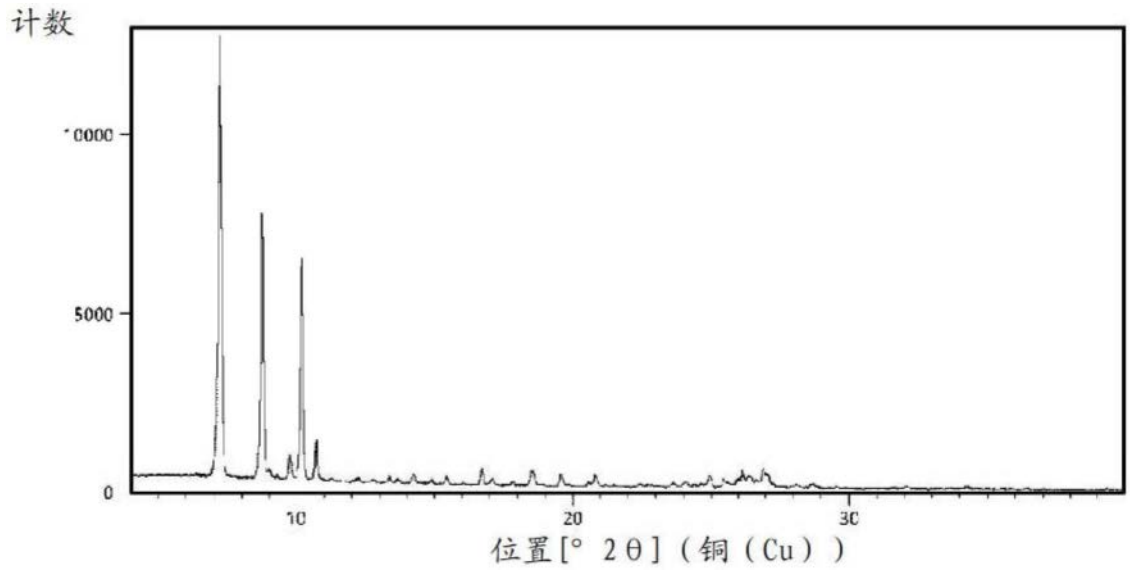

计数
10000
5000
0
10
20
30
位置[° 2θ]（铜（Cu））

图1

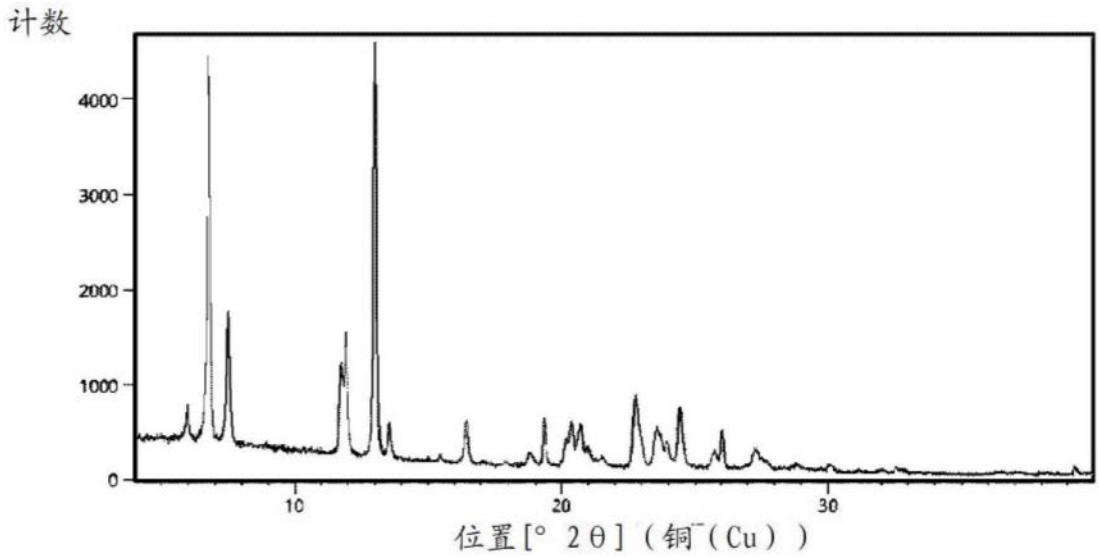

计数
4000
3000
2000
1000
0
10
20
30
位置[° 2θ]（铜（Cu））

图2

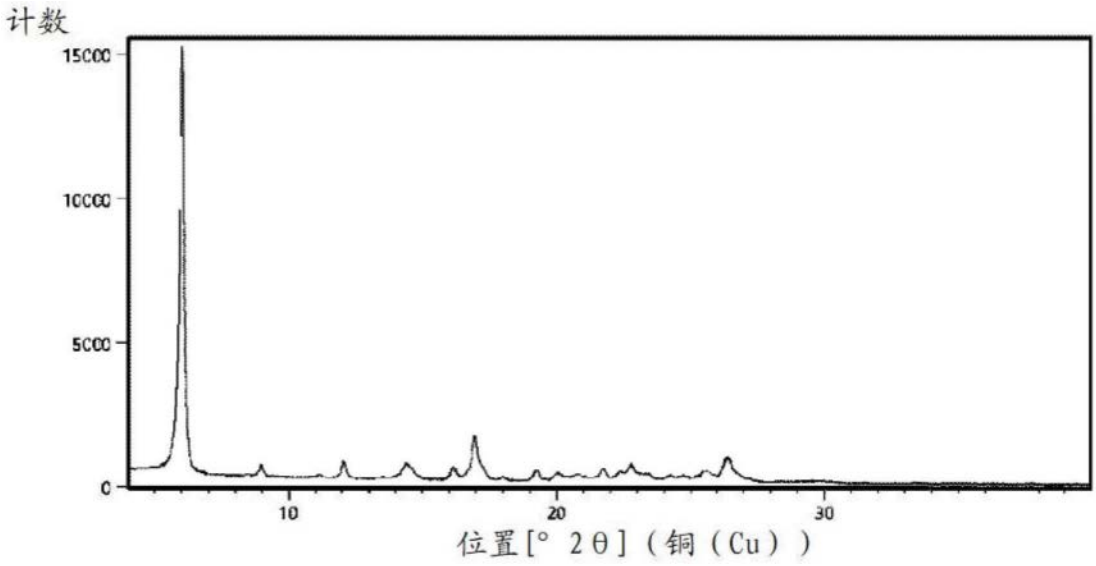

计数
15000
10000
5000
0
10
20
30
位置[° 2θ]（铜（Cu））

图3

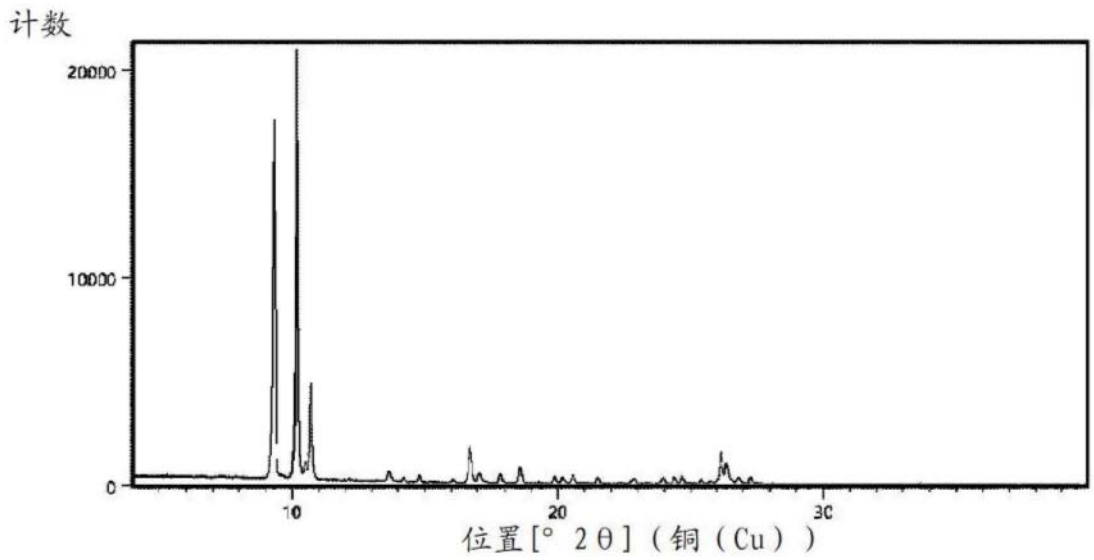

计数
20000
10000
0
10
20
30
位置[° 2θ]（铜（Cu））

图4

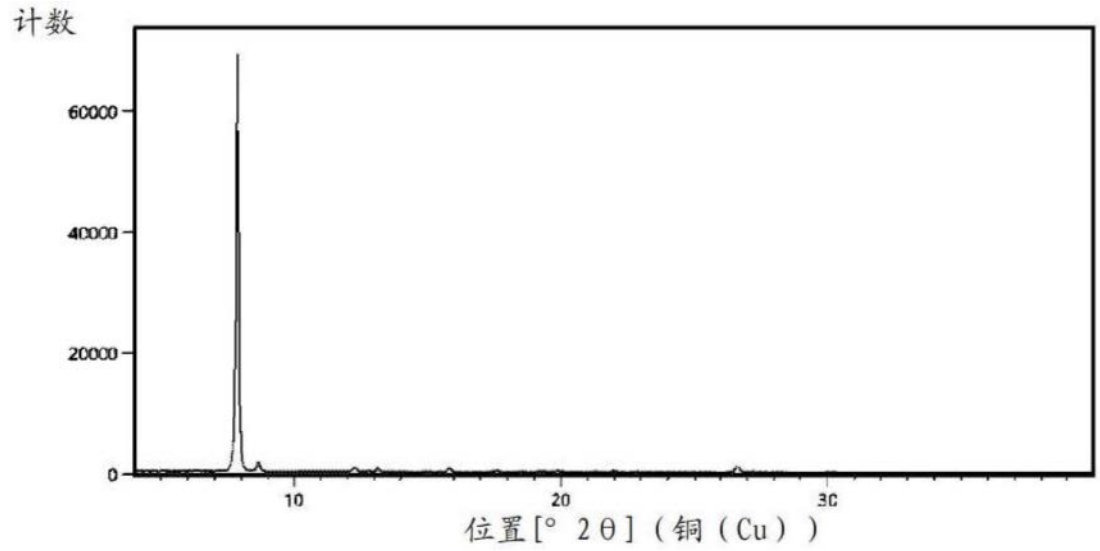

计数
60000
40000
20000
0
10
20
30
位置[° 2θ]（铜（Cu））

图5

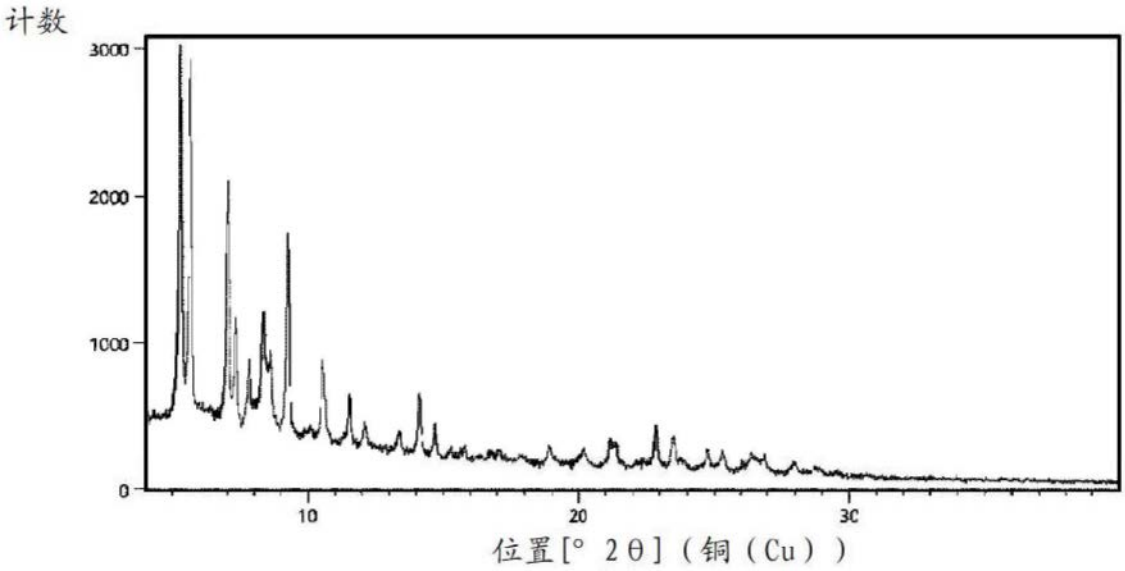
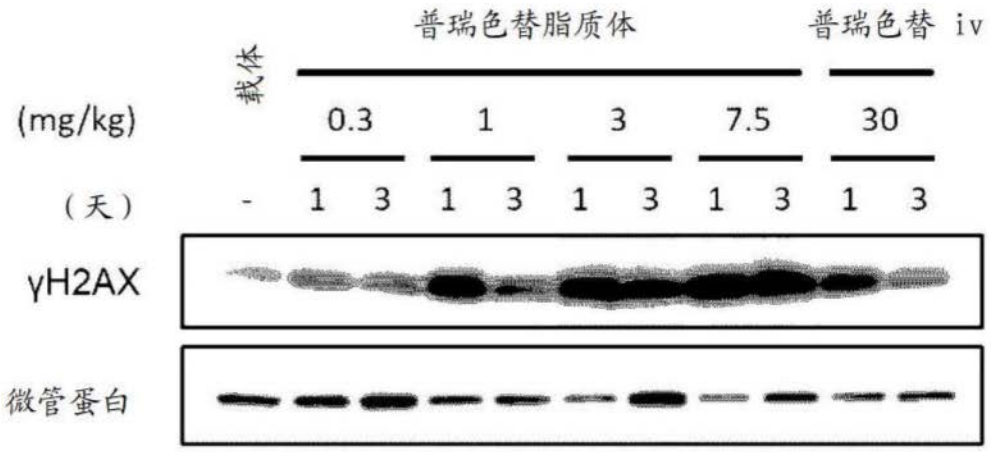

计数
3000
2000
1000
0
10
20
30
位置[° 2θ]（铜（Cu））

图6


普瑞色替脂质体
普瑞色替 iv
载体
(mg/kg)
0.3
1
3
7.5
30
(天)
-
1
3
1
3
1
3
1
3
1
3
γH2AX
微管蛋白

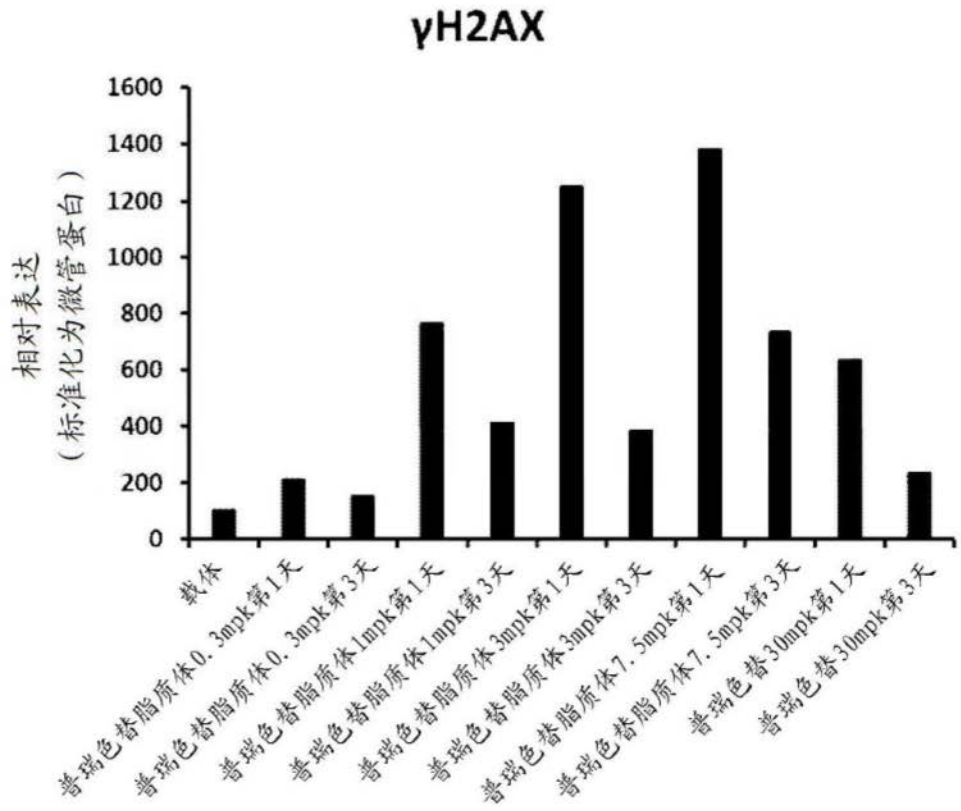
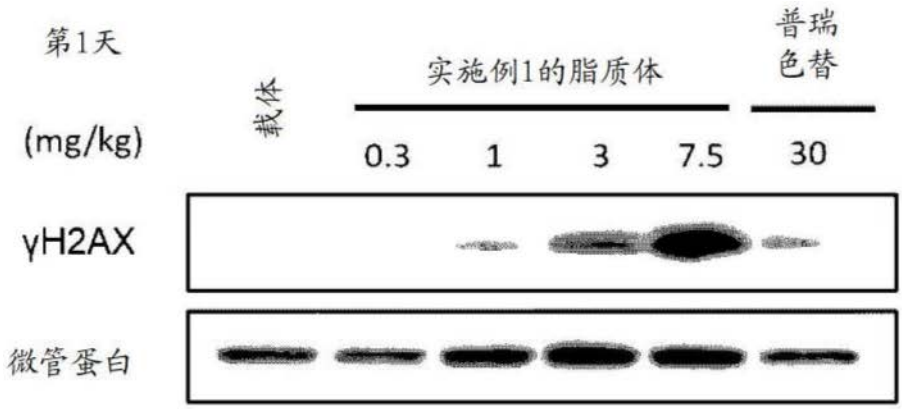

γH2AX
相对表达
(标准化为微管蛋白)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
载体
普瑞色替脂质体0.3mpk第1天
普瑞色替脂质体0.3mpk第3天
普瑞色替脂质体1mpk第1天
普瑞色替脂质体1mpk第3天
普瑞色替脂质体3mpk第1天
普瑞色替脂质体3mpk第3天
普瑞色替脂质体7.5mpk第1天
普瑞色替脂质体7.5mpk第3天
普瑞色替30mpk第1天
普瑞色替30mpk第3天

图7


第1天
(mg/kg)
载体
实施例1的脂质体
普瑞
色替
0.3
1
3
7.5
30
γH2AX
微管蛋白

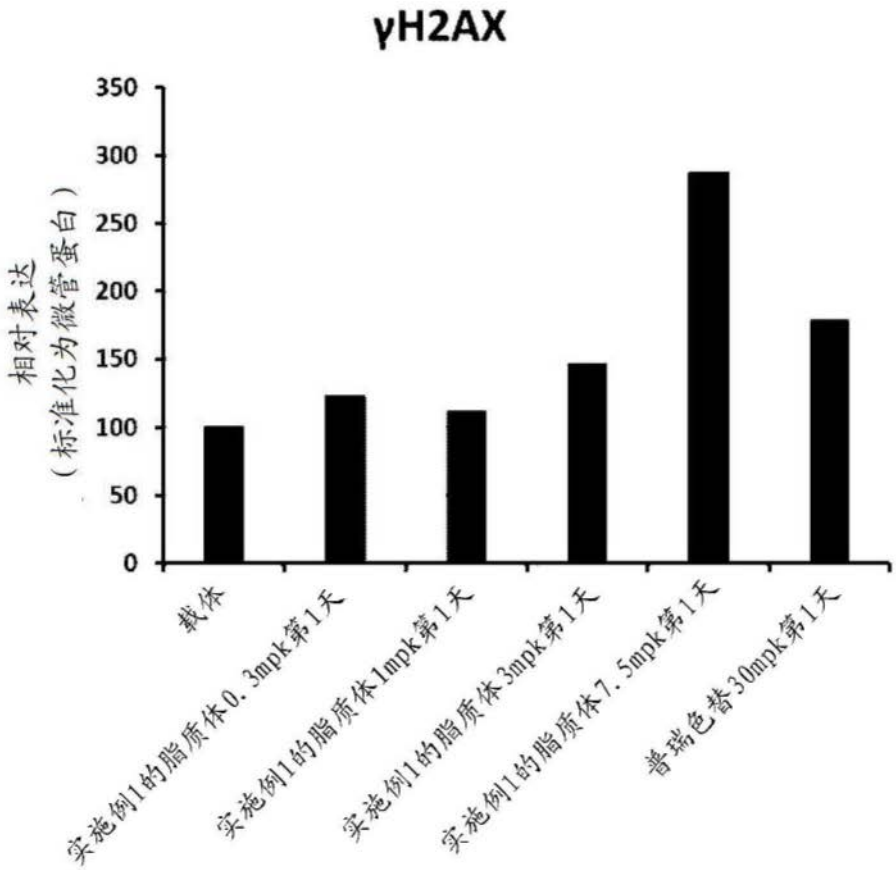

γH2AX
相对表达
（标准化为微管蛋白）
350
300
250
200
150
100
50
0
载体
实施例1的脂质体0.3mpk第1天
实施例1的脂质体1mpk第1天
实施例1的脂质体3mpk第1天
实施例1的脂质体7.5mpk第1天
普瑞色替30mpk第1天

图8


实施例1的脂质体
（天）
载体
第3天
第6天
(mg/kg)
0.3
1
3
7.5
20
20
γH2AX
微管蛋白

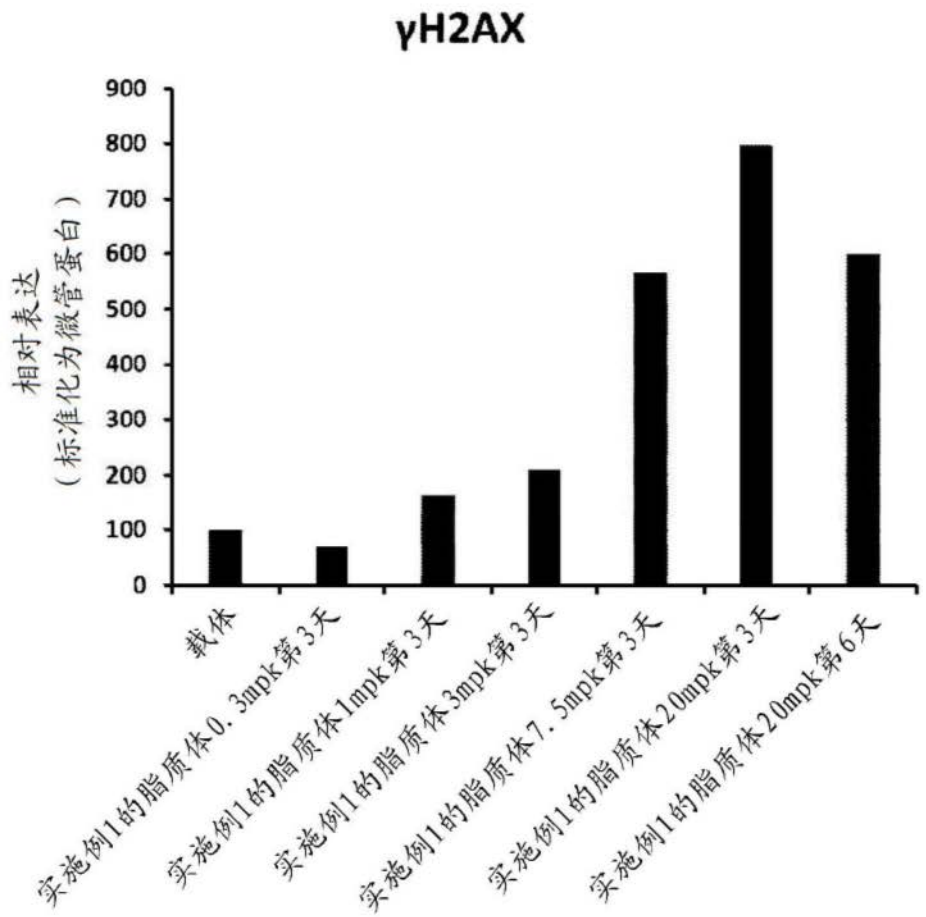

γH2AX
相对表达
（标准化为微管蛋白）
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
载体
实施例1的脂质体0.3mpk第3天
实施例1的脂质体1mpk第3天
实施例1的脂质体3mpk第3天
实施例1的脂质体7.5mpk第3天
实施例1的脂质体20mpk第3天
实施例1的脂质体20mpk第6天

图9

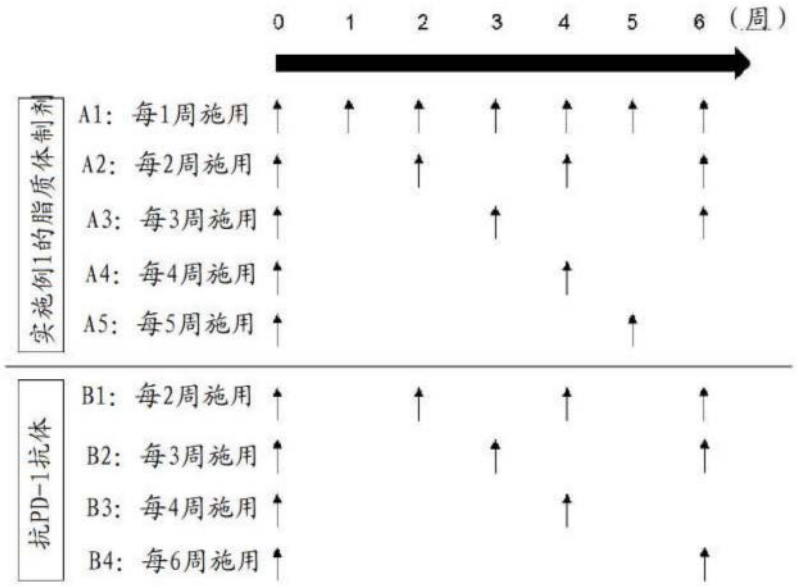

0
1
2
3
4
5
6
（周）
实施例1的脂质体制剂
A1：每1周施用
A2：每2周施用
A3：每3周施用
A4：每4周施用
A5：每5周施用
抗PD-1抗体
B1：每2周施用
B2：每3周施用
B3：每4周施用
B4：每6周施用

图10

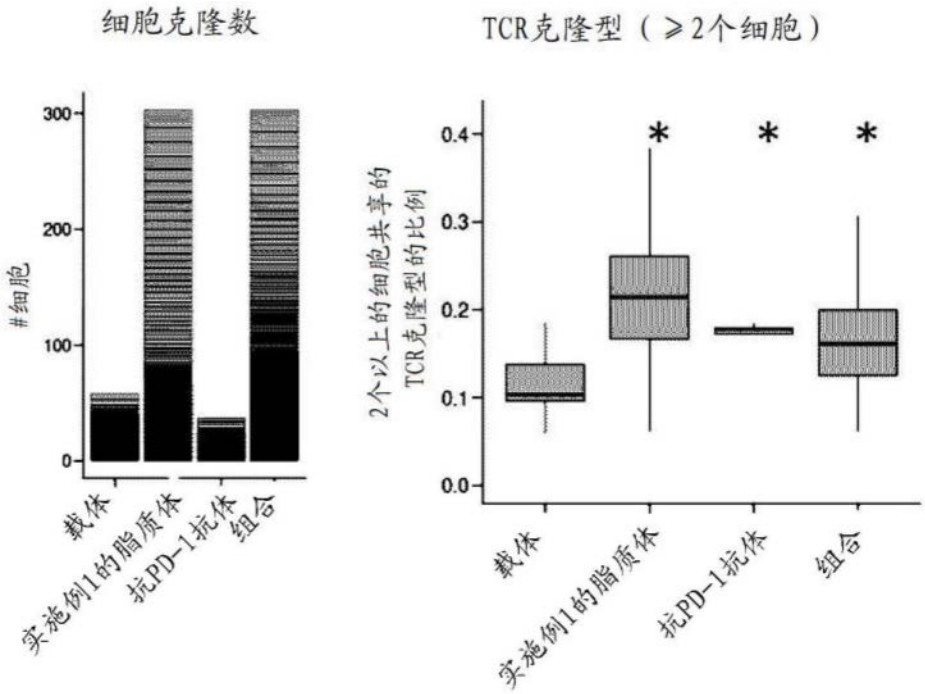

细胞克隆数
#细胞
300
200
100
0
载体
实施例1的脂质体
抗PD-1抗体
组合
TCR克隆型（≥2个细胞）
2个以上的细胞共享的TCR克隆型的比例
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
*
载体
实施例1的脂质体
抗PD-1抗体
组合

图11

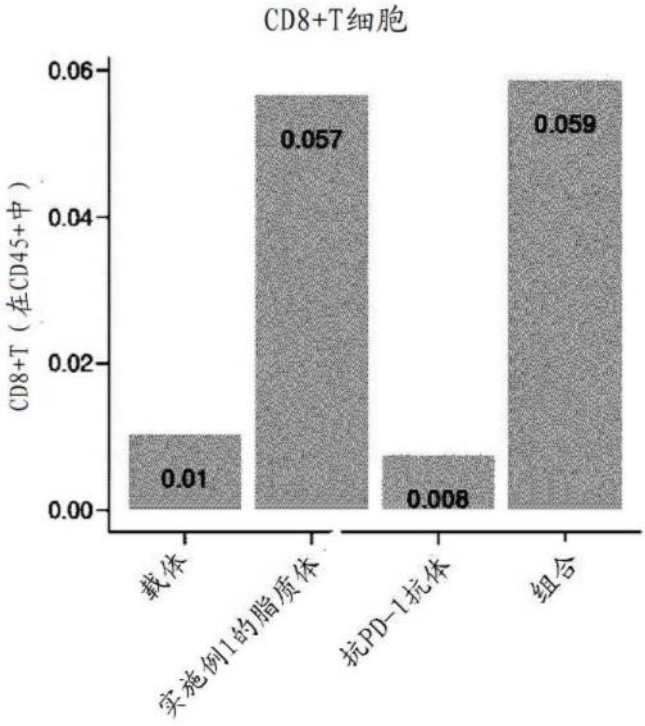

CD8+T细胞
CD8+T（在CD45+中）
0.06
0.04
0.02
0.00
0.01
0.057
0.008
0.059
载体
实施例1的脂质体
抗PD-1抗体
组合

图12

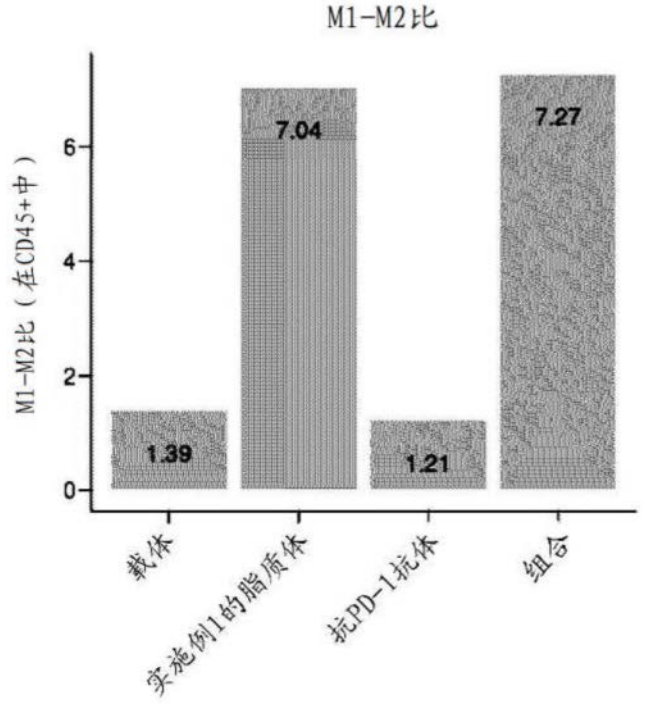

M1-M2比
M1-M2比（在CD45+中）
6
4
2
0
1.39
7.04
1.21
7.27
载体
实施例1的脂质体
抗PD-1抗体
组合

图13

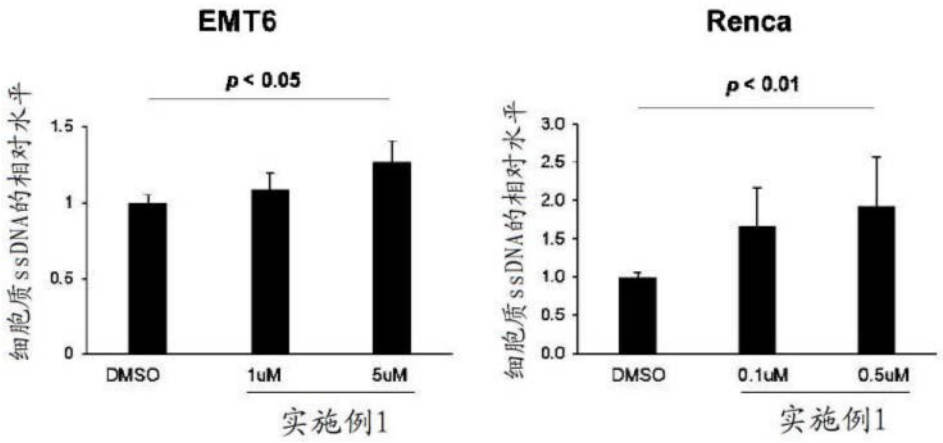

EMT6
p < 0.05
细胞质ssDNA的相对水平
1.5
1
0.5
0
DMSO
1uM
5uM
实施例1
Renca
p < 0.01
细胞质ssDNA的相对水平
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
0.1uM
0.5uM
实施例1

图14