

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-505049

(P2016-505049A)

(43) 公表日 平成28年2月18日(2016.2.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C O 7 D 231/06 (2006.01)</b>	C O 7 D 231/06 D	4 C O 6 3
<b>A 6 1 K 31/415 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/415	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 6
<b>A 6 1 K 31/517 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/517	
<b>A 6 1 K 31/519 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/519	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-553910 (P2015-553910)  
 (86) (22) 出願日 平成26年1月22日 (2014.1.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月8日 (2015.9.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/012466  
 (87) 国際公開番号 W02014/116651  
 (87) 国際公開日 平成26年7月31日 (2014.7.31)  
 (31) 優先権主張番号 61/755,878  
 (32) 優先日 平成25年1月23日 (2013.1.23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

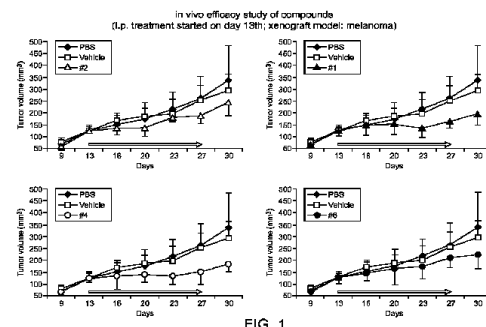
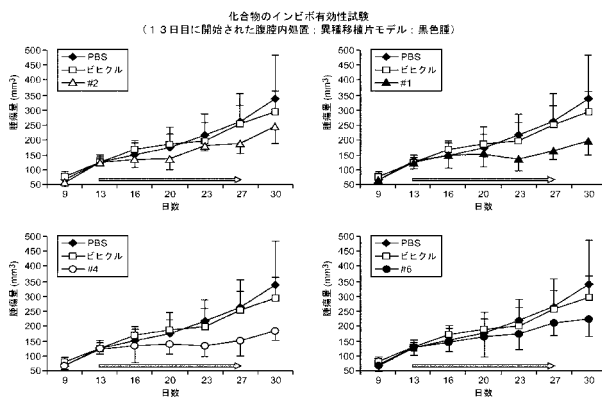
(71) 出願人 506115514  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 607 オークランド フランクリン ス  
 トリート 1111 トウエルフス フロ  
 ア  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小分子によるヒト癌における G L I タンパク質のターゲティング方法

## (57) 【要約】

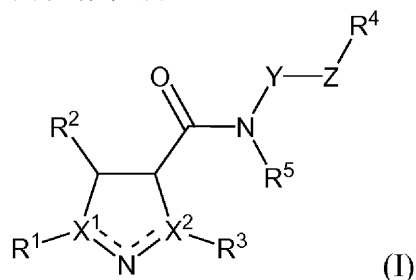
本開示は、G L I ポリペプチドを発現する癌の診断及び治療のための組成物、薬学的調製物、及び方法を提供する。開示される組成物及び薬学的調製物は、1つ以上のピラゾリル含有化合物またはその類似体もしくは誘導体を含み得る。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 (I) の化合物の単離された鏡像異性体、ならびにその塩、水和物、溶媒和物、立体異性体、及びプロドラッグ：



10

式中、

$X^1$  及び  $X^2$  の各々は独立して、N または C であり、環 N が、C である  $X^1$  及び  $X^2$  のいずれかと二重結合を形成するように、 $X^1$  及び  $X^2$  の一方は N でありかつ  $X^1$  及び  $X^2$  の一方は C であり、

$R^1$  は、アリールまたは置換アリールであり、

$R^2$  は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、及びアルキルから選択され、

$R^3$  は、アリールまたは置換アリールであり、

20

Y は、直接結合または  $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、

Z は、 $C_1 \sim C_4$  アルキルまたはアリールであり、

$R^4$  は、-OH であり、

$R^5$  は、水素、または  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。

## 【請求項 2】

より緩徐に溶出する鏡像異性体である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

より速く溶出する鏡像異性体である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 4】

$X^1$  が N であり、 $X^2$  が C である、請求項 1 に記載の化合物。

30

## 【請求項 5】

$R^1$  が、アリールである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

$R^2$  が、アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

$R^3$  が、置換アリールである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 8】

$R^5$  が、水素である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 9】

Y が  $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、Z が  $C_1 \sim C_4$  アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

40

## 【請求項 10】

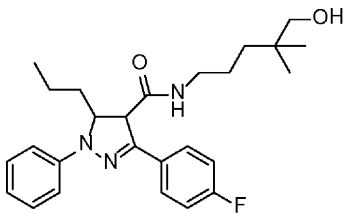
Y 及び Z が  $-(CH_2)_3-C(CH_3)_2-CH_2-$  を形成するように、Y が  $C_1 \sim C_4$  アルキルでありかつ Z が  $C_1 \sim C_4$  アルキルである、請求項 9 に記載の化合物。

## 【請求項 11】

$R^1$  がアリールであり、 $R^2$  がアルキルであり、 $R^3$  が置換アリールである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 12】

構造：



(化合物 4)

を有する、3 - ( 4 - フルオロ - フェニル ) - 1 - フェニル - 5 - プロピル - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピラゾール - 4 - カルボン酸 ( 5 - ヒドロキシ - 4 , 4 - ジメチル - フェニル ) - アミドである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 1 3】

より緩徐に溶出する鏡像異性体である、請求項 1 2 に記載の化合物。

## 【請求項 1 4】

より速く溶出する鏡像異性体である、請求項 1 2 に記載の化合物。

## 【請求項 1 5】

( i ) 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の化合物と、

( i i ) 薬学的に許容される担体と

を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 1 6】

( i ) 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の化合物と、

( i i ) 化学療法薬と

を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 1 7】

( i ) 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の化合物と、

( i i ) エルロチニブ、ペメトレキセド、LY294002、SB431542、及びシスプラチンから選択される治療薬と  
を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 1 8】

癌性状態を有する対象を治療するための方法であって、

治療有効量の請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の薬学的組成物を前記対象に投与することを含み、

前記癌性状態が、GLIタンパク質を発現することを特徴とし、前記投与することが、前記対象の治療をもたらす、前記方法。

## 【請求項 1 9】

薬物療法において使用するための、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 2 0】

癌の治療において使用するための、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 2 1】

癌治療のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の薬学的組成物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

米国特許法第 1 1 9 ( e ) 項に従って、本願は、2013 年 1 月 23 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 7 5 5 , 8 7 8 号の出願日に対する優先権を主張し、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【背景技術】

## 【0002】

10

20

30

40

50

## 序文

ヘッジホッグ (Shh または Hh)、WNT、FGF、及び BMP シグナル伝達経路は、胚形成、組織再生、及び発癌中に一緒に繋がる。Hh シグナル伝達経路の異常な活性化は、様々なヒト腫瘍における病理的帰結につながる。ヘッジホッグは、PATCHED 1 (ptch1) 及び SMOOTHENED (smo) を含む膜貫通タンパク質複合体に結合し、かつ GLI 亜鉛フィンガー転写因子の転写につながるタンパク質キナーゼ A の阻害を含む、細胞質シグナル伝達事象のカスケードを引き起こすことにより、Hh シグナル伝達を開始する分泌糖タンパク質である。その後、亜鉛フィンガー転写因子の GLI ファミリーは、コンテキスト依存及び細胞型特異的様式で、細胞外 Hh 刺激を定義された転写プログラムに翻訳する (Ruiz I Altaba et al., 2002, Nat. Rev. Cancer 2: 361 - 72 (非特許文献1))。

10

## 【0003】

GLI タンパク質を含むいくつかのタンパク質は、Hh シグナル伝達の媒介に関与する (Kato h and Kato h, 2005, Cancer Biol. Ther. 4: 1050 - 4 (非特許文献2))。脊椎動物は、少なくとも3つのはっきりと異なる GLI タンパク質、すなわち GLI (GLI 1 と称される)、GLI 2、及び GLI 3 を有する。これらのタンパク質は、亜鉛フィンガー転写因子の GLI ファミリーであり、ショウジョウバエキュピタスインターラブタス (Ci) 及びカエノラブディティス・エレガンス (Caenorhabditis elegans) 性決定遺伝子 tra-1 と高度に保存された C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> 亜鉛フィンガードメイン (5つの亜鉛フィンガー DNA 結合モチーフを有する) を共有する (Hui et al., 1994, Dev. Biol. 162: 402 - 13 (非特許文献3))。

20

## 【0004】

ショウジョウバエ及びマウス発生における Hh シグナル伝達についてはあまり知られていないが、ヒト癌における Hh シグナル伝達及び GLI 活性に応答して活性化される分子機構及び腫瘍形成プログラムの理解は、依然として非常に限られている。Hh 関連癌の共通の特性は、1つ以上の GLI タンパク質の発現レベルの上昇である。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

30

【非特許文献1】Ruiz I Altaba et al., 2002, Nat. Rev. Cancer 2: 361 - 72

【非特許文献2】Kato h and Kato h, 2005, Cancer Biol. Ther. 4: 1050 - 4

【非特許文献3】Hui et al., 1994, Dev. Biol. 162: 402 - 13

## 【発明の概要】

## 【0006】

## 概要

40

本開示は、一般的に、腫瘍形成、腫瘍成長、及び腫瘍生存を阻害する組成物及び方法に関する。本組成物は、ヘッジホッグ及び GLI シグナル伝達経路を阻害する小分子化合物を含む。本組成物は、GLI タンパク質が過剰発現される癌の治療に用途を見出す。

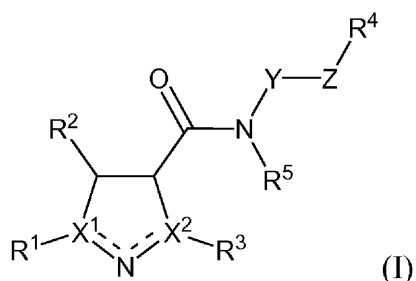
## 【0007】

本実施形態は、GLI タンパク質が過剰発現されるいくつかの癌の検出及び治療に有用な化合物、薬学的組成物、キット、及び方法を提供する。そのような癌は、肺癌、NSCLC、乳癌、結腸癌、中皮腫、黒色腫、肉腫、前立腺癌、卵巣癌、腎臓癌、食道癌、胃癌、肝細胞癌、上咽頭癌、膵臓癌、神経膠腫等を含む。

## 【0008】

本開示の態様は、式 (I) の化合物、ならびにその塩、水和物、溶媒和物、立体異性体、及びプロドラッグを含む：

50



式中、

$X^1$  及び  $X^2$  の各々は独立して、N または C であり、環 N が、C である  $X^1$  及び  $X^2$  のいずれかと二重結合を形成するように、 $X^1$  及び  $X^2$  の一方は N でありかつ  $X^1$  及び  $X^2$  の一方は C であり、

$R^1$  は、アリールまたは置換アリールであり、

$R^2$  は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、及びアルキルから選択され、

$R^3$  は、アリールまたは置換アリールであり、

Y は、直接結合または  $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、

Z は、 $C_1 \sim C_4$  アルキルまたはアリールであり、

$R^4$  は、-OH であり、

$R^5$  は、水素、または  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。

【0009】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $X^1$  は N であり、 $X^2$  は C である。

【0010】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $X^1$  は C であり、 $X^2$  は N である。

【0011】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $R^1$  は、アリールである。

【0012】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $R^2$  は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、及びアルキルから選択される。

【0013】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $R^2$  は、ヘテロアリール及びアルキルから選択される。

【0014】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $R^3$  は、アリールである。

【0015】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $R^3$  は、置換アリールである。

【0016】

本化合物のいくつかの実施形態では、 $R^5$  は、水素である。

【0017】

本化合物のいくつかの実施形態では、Y は  $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、Z は  $C_1 \sim C_4$  アルキルである。

【0018】

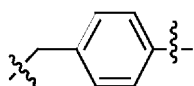
本化合物のいくつかの実施形態では、Y 及び Z が  $-(CH_2)_3-C(CH_3)_2-CH_2-$  を形成するように、Y は  $C_1 \sim C_4$  アルキルでありかつ Z は  $C_1 \sim C_4$  アルキルである。

【0019】

本化合物のいくつかの実施形態では、Y は  $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、Z はアリールである。

【0020】

本化合物のいくつかの実施形態では、Y 及び Z が、



を形成するように、YはC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキルでありかつZはアリールである。

【0021】

本化合物のいくつかの実施形態では、R<sup>1</sup>はアリールであり、R<sup>2</sup>はヘテロアリールであり、R<sup>3</sup>はアリールである。

【0022】

本化合物のいくつかの実施形態では、R<sup>1</sup>はアリールであり、R<sup>2</sup>はアルキルであり、R<sup>3</sup>は置換アリールである。

10

【0023】

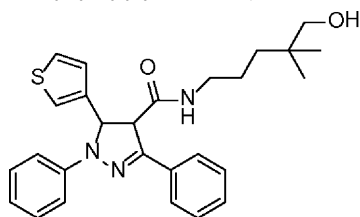
本化合物のいくつかの実施形態では、R<sup>1</sup>はアリールであり、R<sup>2</sup>はアリールであり、R<sup>3</sup>はアリールである。

【0024】

本化合物のいくつかの実施形態では、R<sup>1</sup>はアリールであり、R<sup>2</sup>は置換アリールであり、R<sup>3</sup>は置換アリールである。

【0025】

本化合物のいくつかの実施形態では、本化合物は、構造：



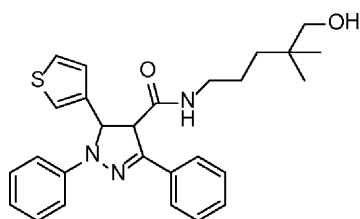
(化合物1)

20

を有する、1、3 - ジフェニル - 5 - チオフェン - 3 - イル - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピラゾール - 4 - カルボン酸 ( 5 - ヒドロキシ - 4 , 4 - ジメチル - ペンチル ) - アミドである。

【0026】

本化合物のいくつかの実施形態では、本化合物は、構造：



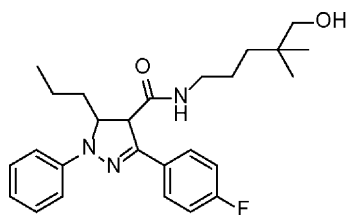
(化合物1)

30

を有する、1、3 - ジフェニル - 5 - チオフェン - 3 - イル - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピラゾール - 4 - カルボン酸 ( 5 - ヒドロキシ - 4 , 4 - ジメチル - ペンチル ) - アミドである。

【0027】

本化合物のいくつかの実施形態では、本化合物は、構造：



(化合物4)

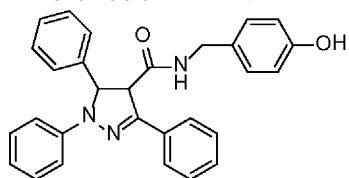
40

を有する、3 - ( 4 - フルオロ - フェニル ) - 1 - フェニル - 5 - プロピル - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピラゾール - 4 - カルボン酸 ( 5 - ヒドロキシ - 4 , 4 - ジメチル - ペンチル ) - アミドである。

【0028】

50

本化合物のいくつかの実施形態では、本化合物は、構造：



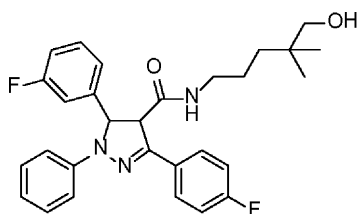
(化合物2)

を有する、1,3,5-トリフェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸4-ヒドロキシ-ベンジルアミドである。

【0029】

本化合物のいくつかの実施形態では、本化合物は、構造：

10



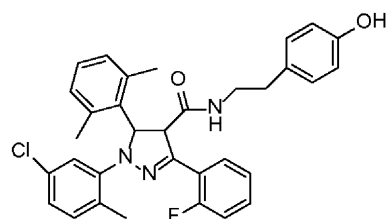
(化合物6)

を有する、3-(4-フルオロ-フェニル)-5-(3-フルオロ-フェニル)-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸(5-ヒドロキシ-4,4-ジメチル-ペンチル)-アミドである。

【0030】

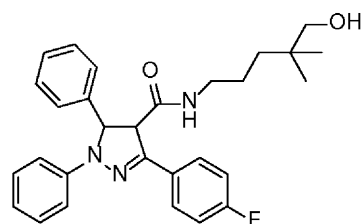
20

本化合物のいくつかの実施形態では、本化合物は、



(1-(5-クロロ-2-メチル-フェニル)-5-(2,6-ジメチル-フェニル)-3-(2-フルオロ-フェニル)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸[2-(4-ヒドロキシ-フェニル)-エチル]-アミド、化合物3)、及び

30



(3-(4-フルオロ-フェニル)-1,5-ジフェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸(5-ヒドロキシ-4,4-ジメチル-ペンチル)-アミド、化合物5)から選択される。

【0031】

40

本開示の態様は、上述の式(I)の化合物及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を含む。

【0032】

本開示の態様は、上述の式(I)の化合物及び化学療法薬を含む薬学的組成物を含む。

【0033】

本開示の態様は、上述の式(I)の化合物、ならびにエルロチニブ、ペメトレキセド、LY294002、SB431542、及びシスプラチンから選択される治療薬を含む薬学的組成物を含む。

【0034】

本実施形態は、式(I)の化合物を使用するための方法も提供する。ある特定の実施形

50

態では、癌性状態に罹患する対象を治療するための方法が提供される。本方法は、治療有効量の式 (I) の化合物、または式 (I) の化合物を含む薬学的組成物を対象に投与するステップを含み、癌性状態は、GLIポリペプチドの発現を特徴とし、投与のステップは、対象の治療をもたらす。

#### 【0035】

さらに、本実施形態は、薬物療法において使用するための式 (I) の化合物、または式 (I) の化合物を含む薬学的組成物を提供する。さらに、本実施形態は、癌の治療において使用するための式 (I) の化合物、または式 (I) の化合物を含む薬学的組成物を提供する。さらに、本実施形態は、癌治療のための医薬の製造における、式 (I) の化合物、または式 (I) の化合物を含む薬学的組成物の使用を提供する。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0036】

【図1】本開示の実施形態による、マウス異種移植片モデル (黒色腫 Me1Juso) を使用した、化合物 1、2、4、及び 6 のインビボ有効性試験を示す。腫瘍重量は、化合物を投与して処置した後に大幅に減少した。結果は、平均 ± 標準偏差 (エラーバー) である。矢印は、注入期間を示す。

【図2】本開示の実施形態による、マウス異種移植片モデル (中皮腫 MS-1) を使用した、化合物 1 及び 4 のインビボ有効性試験を示す。腫瘍重量は、化合物を投与して処置した後に大幅に減少した。結果は、平均 ± 標準偏差 (エラーバー) である。矢印は、注入期間を示す。

20

【図3】本開示の実施形態による、マウス異種移植片モデル (肺癌 A549) を使用した化合物 1 及び 4 のインビボ有効性試験を示す。腫瘍重量は、化合物を投与して処置した後に大幅に減少した。結果は、平均 ± 標準偏差 (エラーバー) である。矢印は、注入期間を示す。

【図4】本開示の実施形態による、化合物 1、2、4、及び 6 による hGli1、hGli2、hGli3、hHHIP、hWnt2、hAxin2、hEGFR、及び hCyclin D1 活性の調節を示す。

【図5】本開示の実施形態による、インビボ処置後のマウスの白血球集団に対する、化合物 1、2、4、及び 6 の効果を示す。インビボ試験の完了時、全処置群の各動物由来の白血球 (WBC: 白血球細胞、NE: 好中球、LY: リンパ球、MO: 単球、EO: 好酸球、BA: 好塩基球) を回収し、血液細胞計数器により白血球集団を数えた。結果は、平均 ± 標準偏差 (エラーバー) である。

30

【図6】本開示の実施形態による、インビボ試験の薬物投与期間中のマウスの体重に対する化合物 1、2、4、及び 6 の効果を示す。

【図7】本開示の実施形態による、毒性試験におけるマウスの体重に対する、異なる用量の化合物 4 及び 6 の効果を示す。本化合物を、6 日間連続、25、50、及び 100 mg/kg 体重の 3 つの異なる用量で、腹部に腹腔内注入した。各投薬量群は、3 匹のマウスを含んだ。マウスの体重を、はかりを使用して測定した。結果は、平均 ± 標準偏差 (エラーバー) である。

【図8】本開示の実施形態による、細胞毒性アッセイ、ならびにマウス由来の肝細胞、脾臓細胞、腎細胞、及び心臓細胞を使用した化合物 2 のスクリーニングを示す。

40

【図9】本開示の実施形態による、細胞毒性アッセイ、ならびにマウス由来の肝細胞、脾臓細胞、腎細胞、及び心臓細胞を使用した化合物 1 のスクリーニングを示す。

【図10】本開示の実施形態による、細胞毒性アッセイ、ならびにマウス由来の肝細胞、脾臓細胞、腎細胞、及び心臓細胞を使用した化合物 4 のスクリーニングを示す。

【図11】本開示の実施形態による、細胞毒性アッセイ、ならびにマウス由来の肝細胞、脾臓細胞、腎細胞、及び心臓細胞を使用した化合物 6 のスクリーニングを示す。

【図12】本開示の実施形態による、肺癌細胞におけるエルロチニブ (Tarceva) 及び化合物 4 の相乗効果を示す。

【図13】本開示の実施形態による、中皮腫細胞におけるエルロチニブ (Tarceva

50



）及び化合物 4 の相乗効果を示す。

【図 1 4】本開示の実施形態による、肺癌細胞における P I 3 K 阻害剤 L Y 2 9 4 0 0 2 及び化合物 6 の相乗効果を示す。

【図 1 5】本開示の実施形態による、中皮腫細胞における P I 3 K 阻害剤 L Y 2 9 4 0 0 2 及び化合物 6 の相乗効果を示す。

【図 1 6】本開示の実施形態による、肺癌細胞における T G F 阻害剤 S B 4 3 1 5 4 2 及び化合物 6 の相乗効果を示す。

【図 1 7】本開示の実施形態による、中皮腫細胞におけるペメトレキセド ( A l i m t a ) 及び化合物 6 の相乗効果を示す。

【図 1 8】本開示の実施形態による、様々な癌細胞系についての G l i 阻害剤化合物 4、及びその 2 つの精製された鏡像異性体 ( P 1 及び P 2 ) の各々の細胞毒性 I C <sub>50</sub> 値 (  $\mu$  M ) を示す。

【図 1 9】本開示の実施形態による、非小細胞肺癌 ( N S C L C ) 細胞における G l i 阻害剤化合物 4 の有効性及び G l i 発現の相関関係のグラフを示す。

【図 2 0】本開示の実施形態による、癌細胞における G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の有効性及び G l i 発現の相関関係のグラフを示す。

【図 2 1】本開示の実施形態による、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビトロで N C S L C 細胞系 A 5 4 9 において G l i / T A F 依存転写活性を阻害することを示す、ルシフェラーゼ活性 ( % ) のグラフを示す。

【図 2 2】本開示の実施形態による、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビトロで N S C L C 細胞において G l i 下流標的を阻害することを示す、G l i 下流標的の発現レベルのグラフを示す。

【図 2 3】本開示の実施形態による、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビトロで中皮腫細胞において G l i 下流標的を阻害することを示す、遺伝子発現のグラフを示す。

【図 2 4】本開示の実施形態による、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビボの腫瘍内の中皮腫細胞において G l i 下流標的を阻害することを示す、免疫組織化学像 ( マウス異種移植片モデル：中皮腫 M S - 1 ) を示す。

【図 2 5】本開示の実施形態による、インビトロでの中皮腫細胞の成長の抑制における G D C 0 4 4 9 ( S m o 阻害剤 ) 及び G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の相乗効果を示すグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 7 】

詳細な説明

本開示の態様は、G L I タンパク質が過剰発現されるいくつかの癌の検出及び治療に有用な化合物、薬学的組成物、キット、及び方法を含む。本組成物は、ヘッジホッグ及び G L I シグナル伝達経路を阻害する小分子化合物を含む。

【 0 0 3 8 】

本発明及び本発明の特定の例示的な実施形態を説明する前に、本発明は、言うまでもなく、変化し得るので、記載される特定の実施形態に限定されないことを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、単に特定の実施形態を説明する目的であり、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定するよう意図されないことも理解されたい。

【 0 0 3 9 】

値の範囲が提供される場合、文脈が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の 1 0 分の 1 までの、その範囲の上限値から下限値の間の各介在値、ならびにその表示範囲の任意の他の表示値または介在値が、本実施形態内に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、表示範囲内の任意の具体的に除外された値に従って本実施形態内にも包含される。表示範囲がそれらの上限値及び下限値のうちの 1 つまたは両方を含む場合、それらの包含される値の

10

20

30

40

50

いずれかまたは両方を除外する範囲も本実施形態に包含される。

【0040】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。本明細書に記載のものと同様もしくは同等の任意の方法及び材料が本発明の実施または試験において使用され得るが、例示的な方法及び材料が、これから記載される。

【0041】

本明細書に引用される全ての刊行物及び特許は、各個々の刊行物または特許が参照により組み込まれるように具体的かつ個々に示されるかのように参照により本明細書に組み込まれ、刊行物が関連して引用される方法及び/または材料を開示及び説明するために参照により本明細書に組み込まれる。任意の刊行物の引用は、出願日前にそれを開示するためであり、本発明が先行発明によりそのような刊行物に先行する資格がないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の出版日とは異なる場合があり、別々に確認する必要がある。得る。

10

【0042】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される、単数形「a」、「and」、及び「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数対象を含むことに留意すべきである。よって、例えば、「化合物(compound)」についての言及は、複数のそのような化合物及び当業者に既知のその等価物などを含む。

20

【0043】

用語

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味を有する。以下の参考文献は、本明細書で使用される多くの用語の一般定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed., 1994)、The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)、The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)、及びHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用される、以下の用語は、特記しない限り、それらに属する意味を有する。

30

【0044】

本明細書で使用される、「アルキル」という用語は、直鎖または分枝鎖炭化水素ラジカルを指し、指定される炭素原子の数を有する二価及び多価のラジカルを含み得る(すなわち、 $C_1 \sim C_{10}$ は1~10個の炭素を意味する)。飽和炭化水素ラジカルの例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、例えば、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなどの相同体及び異性体などの基が挙げられる。

40

【0045】

本明細書で使用される、「アルケニル」という用語は、1つ以上の二重結合を有する不飽和アルキル基のものを指す。アルケニル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、ならびにより高次の相同体及び異性体が挙げられる。

【0046】

本明細書で使用される、「アルキニル」という用語は、1つ以上の三重結合を有する不飽和アルキル基のものを指す。アルキニル基の例としては、エチニル(アセチレニル)、1-プロピニル、1-及び2-ブチニル、ならびにより高次の相同体及び異性体が挙げられる。

50

【0047】

本明細書で使用される、「アリール」という用語は、5～12環員を有する多価不飽和芳香族炭化水素置換基を指し、これは一緒に縮合されるか、または共有結合される単環もしくは多環（最大3つの環）であり得る。アリール基の非限定的な例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ピフェニル、及びベンジルが挙げられる。他のアリール基も本実施形態において有用である。

【0048】

本明細書で使用される、「シクロアルキル」という用語は、3～15個の炭素、及び縮合または共有結合され得る1～3つの環を有する飽和環式炭化水素を指す。本実施形態に有用なシクロアルキル基は、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルを含むが、これらに限定されない。本実施形態に有用なビシクロアルキル基は、[3.3.0]ビシクロオクタニル、[2.2.2]ビシクロオクタニル、[4.3.0]ビシクロノナン、[4.4.0]ビシクロデカン（デカリン）、スピロ[3.4]オクタニル、スピロ[2.5]オクタニルなどを含むが、これらに限定されない。

10

【0049】

本明細書で使用される、「シクロアルケニル」という用語は、3～15個の炭素、及び縮合または共有結合され得る1～3つの環を有する不飽和環式炭化水素を指す。本実施形態に有用なシクロアルケニル基は、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、及びシクロオクテニルを含むがこれらに限定されない。ビシクロアルケニル基も本実施形態において有用である。

20

【0050】

本明細書で使用される、「ハロゲン」という用語は、フッ素（F）、塩素（Cl）、臭素（Br）、及びヨウ素（I）を含む元素を指す。

【0051】

本明細書で使用される、「ヘテロアリール」という用語は、一緒に縮合されるか、または共有結合される単環もしくは多環（最大3つの環）であり得、N、O、またはSなどの環に少なくとも1個のヘテロ原子を有する、5～12環員を有する多価不飽和芳香族炭化水素置換基を指す。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を通して分子の残りの部分に付加され得る。ヘテロアリール基の非限定的な例としては、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソキサゾリル、4-イソキサゾリル、5-イソキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリール、3-フリール、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、プリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、及び6-キノリルが挙げられる。本実施形態に有用なさらなるヘテロアリール基は、ピリジルN-オキシド、テトラゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、インダゾリル、またはラジカル置換された、特に、モノ-またはジ-置換された任意のものを含む。

30

【0052】

本明細書で使用される、「ヘテロシクリル」という用語は、3～15環員、及び縮合または共有結合され得る1～3つの環を有し、かつN、O、またはSなどの環に少なくとも1個のヘテロ原子を有する飽和環式炭化水素を指す。加えて、ヘテロ原子は、そのヘテロ環が分子の残りの部分に付加される位置を占有することができる。ヘテロシクリル基の例としては、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが挙げられる。

40

【0053】

本明細書で使用される、「立体異性体」という用語は、非対称炭素原子（光学中心）または二重結合を保有する本実施形態の化合物を指す。ラセミ体、ジアステレオマー、鏡像

50

異性体、幾何異性体（すなわち、シス／トランス異性体）及び個々の立体異性体は全て、本実施形態の範囲内に包含されることが意図される。

【0054】

「標識」または「検出可能な部分」は、分光、光化学、生化学、免疫化学、化学または他の物理手段により検出可能な組成物である。例えば、有用な標識は、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、ELISAにおいて一般的に使用される）、ビオチン、ジゴキシゲニン、もしくはハプテン、及び放射標識を小分子化合物内に組み込むことにより検出可能にさせることができるタンパク質または他の実体を含む。標識は、任意の位置で化合物内に組み込むことができる。

【0055】

「薬学的に許容される」という用語は、生理学的に耐性であり、典型的には、ヒト対象などの対象に投与された場合にアレルギーまたは類似する望ましくない反応をもたらさない組成物を指す。例えば、「薬学的に許容される」という用語は、ヒトなどの動物に使用するために、連邦政府もしくは州政府の規制機関により承認された、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識される薬局方に列記されることも意味し得る。

【0056】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書において、アミノ酸残基のポリマーを指すために同義に使用される。本用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー、修飾された残基を含むもの、及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用する。

【0057】

本明細書で使用される、「プロドラッグ」という用語は、生理条件下で容易に化学変化を受けて本実施形態の化合物を提供する化合物を指す。加えて、プロドラッグは、エキスビオ環境において化学または生化学方法により本実施形態の化合物に変換され得る。例えば、プロドラッグは、好適な酵素または化学試薬と共に経皮パッチリザーバに配置される場合、本実施形態の化合物にゆっくり変換され得る。

【0058】

本明細書で使用される、「塩」という用語は、本明細書に記載される化合物に見出される置換基により、比較的非毒性の酸または塩基と共に調製される化合物の塩を指す。本実施形態の化合物が比較酸性の官能基を含む場合、塩基添加塩は、そのような化合物の中性形態を、純粋なまたは好適な不活性溶媒中のいずれかで、十分な量の所望の塩基と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容される塩基添加塩の例としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノ、もしくはマグネシウムの塩または類似する塩が挙げられる。本実施形態の化合物が比較塩基性の官能基を含む場合、酸添加塩は、そのような化合物の中性形態を、純粋なまたは好適な不活性溶媒中のいずれかで、十分な量の所望の酸と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容される酸添加塩の例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一水素炭酸（monohydrogencarbonic）、リン酸、一水素リン酸（monohydrogenphosphoric）、二水素リン酸（dihydrogenphosphoric）、硫酸、一水素硫酸（monohydrogensulfuric）、ヨウ化水素酸（hydroiodic）、または亜リン酸などの無機酸に由来するもの、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などの比較的非毒性有機酸に由来する塩が挙げられる。アルギニン酸などのアミノ酸の塩、及びグルクロン酸またはガラクトン酸などの有機酸の塩も含まれる（例えば、Berge, S. M., et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19を参照）。本実施形態のある特定の化合物は、化合物を塩基または酸の添加塩のいずれかに変換させることができる塩基及び酸両方の官能基を含む

10

20

30

40

50

。

## 【0059】

化合物の中性形態は、塩を塩基または酸と接触させ、従来の様式で親化合物を単離することにより再生することができる。化合物の親形態は、極性溶媒における可溶性など、ある特定の物理的性質において様々な塩形態と異なるが、それ以外は、塩は、本実施形態の目的において、化合物の親形態と同等である。

## 【0060】

本明細書で使用される、「溶媒和物」という用語は、溶媒に複合される本実施形態の化合物を指す。本実施形態の化合物と溶媒和物を形成することができる溶媒は、アルコール（メタノール、エタノール等）、エーテル、アセトン、酢酸エチル、ハロゲン化溶媒（塩化メチレン、クロロホルム等）、ヘキサン、及びペンタンなどの一般的な有機溶媒を含む。さらなる溶媒は水を含む。水が複合溶媒である場合、複合体は、水和物と呼ばれる。

## 【0061】

「置換 (Substituted)」は、1つ以上の水素原子が各々、独立して、同じまたは異なる置換基（複数可）で置換された基を指す。典型的な置換基は、 $-X$ 、 $-R^{14}$ 、 $-O-$ 、 $=O$ 、 $-OR^{14}$ 、 $-SR^{14}$ 、 $-S-$ 、 $=S$ 、 $-NR^{14}R^{15}$ 、 $=NR^{14}$ 、 $-CX_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-S(O)_2R^{14}$ 、 $-OS(O)_2O^-$ 、 $-OS(O)_2R^{14}$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^{14})(O^-)$ 、 $-OP(O)(OR^{14})(OR^{15})$ 、 $-C(O)R^{14}$ 、 $-C(S)R^{14}$ 、 $-C(O)OR^{14}$ 、 $-C(O)NR^{14}R^{15}$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(S)OR^{14}$ 、 $-NR^{16}C(O)NR^{14}R^{15}$ 、 $-NR^{16}C(S)NR^{14}R^{15}$ 、 $-NR^{17}C(NR^{16})NR^{14}R^{15}$ 、及び $-C(NR^{16})NR^{14}R^{15}$ を含むが、これらに限定されず、式中、各 $X$ は独立して、ハロゲンであり、「 $R^{14}$ 」、「 $R^{15}$ 」、「 $R^{16}$ 」、及び「 $R^{17}$ 」は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、置換ヘテロアリールアルキル、 $-NR^{18}R^{19}$ 、 $-C(O)R^{18}$ 、もしくは $S(O)_2R^{18}$ であるか、または任意に、 $R^{18}$ 及び $R^{19}$ は、それらが両方付加される原子と一緒にシクロヘテロアルキルもしくは置換シクロヘテロアルキル環を形成し、「 $R^{18}$ 」、「 $R^{19}$ 」、及び「 $R^{22}$ 」は各々独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロヘテロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリール、及び置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキルからなる群から選択される。

## 【0062】

上に定義される全ての置換基において、自体に対してさらなる置換基で置換基を定義することにより到達したポリマー（例えば、置換アリール基等でさらに置換される、自身が置換アリール基で置換される置換アリール基を置換基として有する置換アリール）は、本明細書に含まれることが意図されないことを理解する。そのような場合において、そのような置換の最大数は、3つである。例えば、置換アリール基の連続置換は、置換アリール-（置換アリール）-置換アリールに限定される。

## 【0063】

本明細書で使用される、「生体試料」は、核酸またはポリペプチドを含む生体組織または流体の試料である。そのような試料は、典型的には、ヒト由来であるが、非ヒト霊長類または齧歯類、例えば、マウス及びラットから単離された組織を含む。生体試料は、生検及び剖検試料などの組織の切片、組織学的目的用に採取された凍結切片、血液、血漿、血清、痰、便、涙、粘液、毛髪、皮膚等も含み得る。生体試料は、外植片ならびに患者組織に由来する初代及び/または形質転換細胞培養物も含み得る。「生体試料」は、動物由来の細胞もしくは細胞集団または若干量の組織もしくは流体も指す。ほとんどの場合、生体

試料は、動物から摘出されたが、用語「生体試料」は、インビボ、すなわち、動物から摘出されることなく分析される細胞または組織を指す場合もある。典型的には、「生体試料」は、動物由来の細胞を含むが、本用語は、癌関連ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドレベルを測定するために使用され得る、血液、唾液、または尿の非細胞画分などの非細胞生体材料を指す場合もある。組織生検、血液試料、頬の切屑、唾液試料、または乳頭分泌を含むが、これらに限定されない多くの種類の生体試料が本実施形態において使用され得る。本明細書で使用される、「組織生検」は、診断分析のために、ヒトなどの動物から摘出された若干量の組織を指す。癌を有する患者において、組織は、腫瘍から摘出され、腫瘍内の細胞の分析を可能にし得る。「組織生検」は、針生検、細径針生検、直視下生検等のいずれの種類の生検を指し得る。

10

#### 【0064】

「生体試料を提供する」は、本実施形態において記載される方法に使用するための生体試料を得ることを意味する。多くの場合、これは、患者から細胞の試料を摘出することにより行われるが、前に単離された細胞（例えば、別の個人によって、別の時間に、及び/または別の目的のために単離される）を使用することにより、またはインビボでの本実施形態の方法を行うことによっても達成され得る。治療歴または予後歴を有する記録組織が特に有用である。

#### 【0065】

組織培養における「癌細胞」、「形質転換」細胞、または「形質転換」は、必ずしも新しい遺伝子材料の取り込みを伴わない自発性または誘発された表現型変化を指す。形質転換は、形質転換ウイルスによる感染、及び新しいゲノムDNAの組み込み、または外因性DNAの取り込みから生じ得るが、自発的、または発癌物質への曝露後にも生じ得、それによって、内因性遺伝子を突然変異させる。形質転換は、細胞の不死化、異常な成長制御、非形態変化、及び/または悪性度などの表現型変化と関連する（例えば、Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)）。

20

#### 【0066】

「細胞成長における変化」という表現は、病巣の形成、足場非依存性、半固体もしくは軟寒天成長、接触阻害及び成長の密度制限における変化、成長因子もしくは血清必要量の損失、細胞形態における変化、不死化の増加もしくは損失、腫瘍特異的マーカーの増加もしくは損失、好適な動物宿主内に注入された場合に腫瘍を形成もしくは抑制する能力、及び/または細胞の不死化など、インビトロまたはインビボでの細胞成長及び増殖特性における任意の変化を指す。例えば、Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique pp. 231 - 241 (3rd ed. 1994)を参照。

30

#### 【0067】

「量を関連付ける」は、1つの試料において決定された、ある量の物質、分子、またはマーカー（GliまたはGLIなど）を、別の試料において決定された、その量の同じ物質、分子、またはマーカーと比較することを意味する。別の試料において決定された同じ物質、分子、またはマーカーの量は、所与の癌に特定のであり得る。

40

#### 【0068】

「量を決定する」という用語の同義語は、本実施形態の範囲内で企図され、GliもしくはGLIなどの分子の存在、不在、量、または濃度を検出、測定、試験、または決定することを含むが、これらに限定されない。

#### 【0069】

「決定する」という用語の同義語は、本実施形態の範囲内で企図され、GLIポリペプチド、標識、本実施形態の化合物などの分子の存在、不在、量、または濃度を検出、測定、アッセイ、試験、または決定することを含むが、これらに限定されない。本用語は、定性及び定量決定の両方を指す。

#### 【0070】

50

S h hシグナル伝達、G L Iシグナル伝達、またはW n t 2シグナル伝達の文脈において、「下方調節」または「阻害」という用語は、S h hシグナル伝達、G L Iシグナル伝達、またはW n t 2シグナル伝達の既知のアッセイにより測定される、S h hシグナル伝達、G L Iシグナル伝達、またはW n t 2シグナル伝達を部分的または完全に阻害することを指す。阻害剤は、例えば、本実施形態の化合物である。

【0071】

治療に関する本実施形態の化合物の「有効量」、「有効用量」、「十分な量」、またはこれらの文法的な等価物は、寛解させる、またはある程度症状を減少させる、または状態の進行を停止もしくは反転するのに十分な量である。特定の薬学的組成物の投与による特定の状態、例えば、癌の症状の寛解は、薬学的組成物の投与に関連し得る任意の緩和、永久的もしくは一時的に関わらず、持続、または移行を指す。「有効量」は、インビボ及びインビトロで投与され得る。

10

【0072】

「G L I」という用語は、G L Iタンパク質のファミリーを指す。G L Iタンパク質は、G L I (G L I 1とも称される)、G L I 2、及びG L I 3を含む。G L Iタンパク質の例としては、G L I 1、G L I 2、及びG L I 3が挙げられる。

【0073】

「G L I」ポリペプチドは、天然に存在するまたは組換え形態の両方を含む。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるG L Iポリペプチド及びG L Iサブドメインポリペプチドは、ヒトG L I配列に対応する配列を含み得る。よって、例示的なG L Iが本明細書において提供され、当該技術分野において既知である。例えば、いくつかの脊椎動物のG L I 1、G L I 2、及びG L I 3タンパク質、例えば、ヒトG L I 1 (GenBank受託番号NM\_\_005269, P08151)、マウスG L I 1 (GenBank受託番号NM\_\_010296, AB025922, AAC09169, P47806)、ゼブラフィッシュG L I 1 (GenBank受託番号NM\_\_178296)、ヒトG L I 2 (GenBank受託番号NM\_\_030381, NM\_\_030380, NM-030379, DQ086814)、マウスG L I 2 (GenBank受託番号XM\_\_922107)、ヒトG L I 3 (GenBank受託番号NM\_\_000168, AJ250408, M57609, P10071, AAY87165)、チンパンジーG L I 3 (GenBank受託番号NM\_\_001034190, AY665272, Q5IS56)、マウスG L I 3 (GenBank受託番号X95255, NM\_\_008130, NP\_\_032156, Q61602)、ラットG L I 3 (GenBank受託番号XM\_\_225411)、ゼブラフィッシュG L I 3 (GenBank受託番号NM\_\_205728, AY377429)が特徴付けされている。

20

30

【0074】

G L Iタンパク質は、完全長G L Iタンパク質であるか、またはG L Iタンパク質のサブドメインなどの、部分G L Iタンパク質であり得る。例えば、「G L I 3」ポリペプチドは、(i) GenBank受託番号NM\_\_000168, AJ250408, M57609, P10071、及びAAY87165)から選択されるヒトG L I 3に対して、少なくとも約100、150、200、250、300、500以上のアミノ酸の領域にわたって、約60%を超えるアミノ酸配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくは91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、(ii) アミノ酸配列FDAIIなどのアミノ酸配列モチーフFXX (F = フェニルアラニン、X = 任意の残基、 = 任意の疎水性残基)を含む、(iii) 転写活性ドメインを含む、(iv) G L I DNA結合部位に結合する、及び/または(v) TAFに結合するヒトG L I 3のポリペプチド及び多型バリエーション、対立遺伝子、変異体を指す。

40

【0075】

「G L Iタンパク質活性」という用語は、G L Iシグナル伝達を指し、例えば、G L Iによる下流遺伝子の転写活性化、G L Iタンパク質のG L I DNA結合部位への結合、

50

及びG L Iタンパク質の、他のタンパク質、例えば、T A F、またはC B P ( C r e b タンパク質結合タンパク質 ) などの活性化補助因子への結合を含む。

【 0 0 7 6 】

「G l i」という用語は、G L Iタンパク質をコードする遺伝子を指す。よって、G l i 1、G l i 2、及びG l i 3は、それぞれ、G L I 1、G L I 2、及びG L I 3タンパク質をコードする遺伝子である。

【 0 0 7 7 】

「G l i 核酸」または「g l i ポリヌクレオチド」は、G L I、G L I 2、またはG L I 3タンパク質をコードする脊椎動物の遺伝子を指す。「G l i 核酸」は、天然に存在するまたは組換え形態の両方を含む。G l i ポリヌクレオチドまたはG L I ポリペプチドコード配列は、典型的には、ヒト由来であるが、非ヒト霊長類、齧歯類（例えば、ラット、マウス、もしくはハムスター）、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、または他の哺乳類由来であり得るが、これらに限定されない他の哺乳類由来であり得る。本実施形態の実施に有用なG l i 核酸、例えば、ヒトG l i 1 ( G e n B a n k 受託番号N M \_ 0 0 5 2 6 9 )、マウスG l i 1 ( G e n B a n k 受託番号N M \_ 0 1 0 2 9 6、A B 0 2 5 9 2 2 )、ゼブラフィッシュG l i 1 ( G e n B a n k 受託番号N M \_ 1 7 8 2 9 6 )、ヒトG l i 2 ( G e n B a n k 受託番号N M \_ 0 3 0 3 8 1、N M \_ 0 3 0 3 8 0、N M - 0 3 0 3 7 9、D Q 0 8 6 8 1 4 )、マウスG l i 2 ( G e n B a n k 受託番号X M \_ 9 2 2 1 0 7 )、ヒトG l i 3 ( G e n B a n k 受託番号N M \_ 0 0 0 1 6 8、A J 2 5 0 4 0 8、M 5 7 6 0 9 )、チンパンジーG l i 3 ( G e n B a n k 受託番号N M \_ 0 0 1 0 3 4 1 9 0、A Y 6 6 5 2 7 2 )、マウスG l i 3 ( G e n B a n k 受託番号X 9 5 2 5 5、N M \_ 0 0 8 1 3 0 )、ラットG l i 3 ( G e n B a n k 受託番号X M \_ 2 2 5 4 1 1 )、ゼブラフィッシュG l i 3 ( G e n B a n k 受託番号N M \_ 2 0 5 7 2 8、A Y 3 7 7 4 2 9 ) がクローン化され、特徴付けされている。G l i ポリヌクレオチドは、完全長G l i ポリヌクレオチドである、すなわち、完全なG L Iタンパク質をコードしているか、またはG L Iタンパク質のサブドメインをコードする部分G l i ポリヌクレオチドであり得る。

10

20

【 0 0 7 8 】

「G L I 経路」、「G L I シグナル伝達」、または「G L I シグナル伝達経路」という用語は、同義に使用され、G L Iタンパク質の発現及び/または活性をもたらすその受容体（複数可）に結合するヘッジホッグタンパク質により開始されるシグナル伝達経路を指す。

30

【 0 0 7 9 】

「ヘッジホッグ」という用語は、「H h」という用語と同義に使用され、H h 受容体に結合し、それによって、G L Iタンパク質の発現及び/または活性化をもたらすH h シグナル伝達経路を開始するサイトカインである。哺乳類において、ソニックヘッジホッグ ( S h h )、インディアンヘッジホッグ ( I h h )、及びデザートヘッジホッグ ( D h h ) の3つのH h ファミリー遺伝子がある。いくつかの脊椎動物ヘッジホッグタンパク質、例えば、ヒトS H H、マウスS H H、ラットS H H、ヒトI H H、及びマウスD H Hが、当該技術分野において知られている。

40

【 0 0 8 0 】

生体試料における「G l i m R N A のレベル」または「W n t 2 m R N A のレベル」という用語は、それぞれ、細胞または生体試料に存在する、G l i またはW n t 遺伝子から転写されるm R N A の量を指す。m R N A は、一般的に、機能性G L I またはW N T タンパク質をコードするが、コードされたタンパク質の機能を変更または排除する突然変異が存在し得る。「G l i m R N A のレベル」または「W n t 2 m R N A のレベル」は、定量化される必要はないが、対照試料からのレベルもしくは対照試料の予測されるレベルと比較して、または比較することなく、例えば、ヒトにより、主観的な視覚的検出により、単純に検出され得る。

【 0 0 8 1 】

生体試料における「G L I ポリペプチドのレベル」または「W n t 2 ポリペプチドのレ

50



ベル」は、それぞれ、細胞または生体試料に存在する、G l iまたはW n t 2 m R N Aから翻訳されるポリペプチドの量を指す。ポリペプチドは、G L IまたはW N T 2タンパク質活性を有しても、有さなくてもよい。「G L Iポリペプチドのレベル」または「W N T 2ポリペプチド」は、定量化される必要はないが、対照試料からのレベルもしくは対照試料の予測されるレベルと比較して、または比較することなく、例えば、ヒトにより、主観的な視覚的検出により、単純に検出され得る。

#### 【 0 0 8 2 】

本明細書で使用される、G L Iなどのポリペプチドのレベルまたは活性の「調節因子」は、そのポリペプチドの活性化剤及び/または阻害剤を含み、ポリペプチドの発現レベルもしくはポリペプチドの活性を活性化または阻害する化合物を指す。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3である。活性化剤は、例えば、本実施形態のポリペプチドの発現を誘発もしくは活性化するか、または本実施形態のポリペプチドに結合する、それを刺激する、増加させる、開放する、活性化する、促進する、もしくは活性化を強化する、感作する、またはその活性を上方調節する化合物である。活性化剤は、天然に存在する、及び合成の化合物、小化学分子などを含む。活性化剤のアッセイは、例えば、G L Iポリペプチドを発現する細胞に候補化合物を適用し、その後、機能効果を決定することを含む。潜在的な活性化剤で処理されるG L Iポリペプチドを含む試料またはアッセイは、効果の程度を検査するために、活性化剤を含まない対照試料と比較される。対照試料（候補化合物で処理されない）は、100%の相対的活性値が割り当てられる。ポリペプチドの活性化は、対照に対するポリペプチド活性値が、110%、任意に130%、150%、任意に200%、300%、400%、500%、または1000~3000%以上である場合、達成される。阻害剤は、例えば、本実施形態のポリペプチドの発現を抑制もしくは不活性化するか、または本実施形態のポリペプチドに結合する、それを減少させる、閉鎖する、不活性化する、妨害する、もしくは活性化を減少させる、脱感作する、またはその活性を下方調節する化合物である。阻害剤は、G L Iタンパク質の発現に干渉するs i R N A及びアンチセンスR N Aなどの核酸、ならびに天然に存在する、及び合成の化合物、小化学分子などを含む。阻害剤のアッセイは、本明細書に記載される。潜在的な阻害剤で処理されるG L Iポリペプチドを含む試料またはアッセイは、効果の程度を検査するために、阻害剤を含まない対照試料と比較される。対照試料（候補化合物で処理されない）は、100%の相対的活性値が割り当てられる。ポリペプチドの阻害は、対照に対するポリペプチド活性値が、10%、任意に20%、任意に30%、任意に40%、任意に50%、60%、70%、80%、または90~100%減少される場合、達成される。

#### 【 0 0 8 3 】

「プロモーター」は、核酸の転写を指向する多くの核酸制御配列として定義される。本明細書で使用されるとき、プロモーターは、ポリメラーゼI I型プロモーターの場合においては、T A T A要素などの、転写の開始部位の近くに必要核酸配列を含む。プロモーターはまた、任意に、転写の開始部位から数千の塩基対と同程度の距離に位置し得る、遠位エンハンサーまたはリプレッサー要素を含む。

#### 【 0 0 8 4 】

「構成的」プロモーターは、ほとんどの環境及び発達条件下で活性であるプロモーターである。「誘導」プロモーターは、ほとんどの環境及び発達調節下で活性であるプロモーターである。「作動可能に連結される」という用語は、核酸発現制御配列（プロモーター、転写因子結合部位のアレイなど）と第2の核酸配列との間の機能連結を指し、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を指向する。

#### 【 0 0 8 5 】

「組換え」という用語は、例えば、細胞、または、核酸、タンパク質、もしくはベクターに関して使用される場合、その細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入、または未変性核酸もしくはタンパク質の変更により修飾されているか、または細胞が、そのように修飾された細胞に由来することを示す。よって、組

10

20

30

40

50

換え細胞は、細胞の未変性（非組換え）形態内には見られない遺伝子を発現するか、またはさもなければ異常に発現される、低発現される、または全く発現されない未変性遺伝子を発現する。本明細書において、「組換え核酸」という用語とは、一般には、天然には通常見られない形態で、例えば、ポリメラーゼ及びエンドヌクレアーゼを使用して核酸を操作することにより、本来インビトロで形成された核酸を意味する。この様式において、異なる配列の作動可能な連結が達成される。よって、直鎖形態の単離された核酸、または通常連結されないDNA分子を結合することによりインビトロで形成された発現ベクターは両方とも、組換え体と考えられる。組換え核酸が作製され、宿主細胞または生物内に再導入されると、非組換えにより、すなわち、インビトロ操作ではなく、宿主細胞のインビトロ細胞機構を使用して複製するが、そのような核酸は、一旦組換えにより生成されると、後に非組換えにより複製されるが、尚も組換え体と考えられることを理解する。同様に、「組換えタンパク質」は、組換え技法、すなわち、上記のように組換え核酸の発現を通して作製されたタンパク質である。

#### 【0086】

本明細書において、「化学療法薬耐性」とは、化学療法薬による治療に応答しない、すなわち、そのような治療によって死滅しない、または成長阻害されない腫瘍を意味する。

#### 【0087】

「対象」または「患者」という用語は、癌などの状態、障害、または疾患の治療を必要とするヒトなどの哺乳類を指す。

#### 【0088】

「TAF」という用語は、TBP関連因子を指す。ある特定の実施形態では、TAFは、TAF<sub>II</sub>、すなわち、RNAポリメラーゼII型により転写された真核生物遺伝子の転写活性化の媒介に参与するTAFタンパク質である。TAFタンパク質は、他の転写活性化剤またはリプレッサーと相互作用する（Goodrich and Tjian, Curr Opin Cell Biol 6(3):403-9(1994)、Albright and Tjian, Gene 242(1-2):1-13(2000)）。TAFは、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、または酵母由来であり得る。GLIと相互作用するTAFタンパク質の例としては、TAF<sub>II</sub>31タンパク質である。Klemmらは、ヒトTFIIDサブユニットをクローン化し、これを、hTAF<sub>II</sub>32と名付けた（Klemm et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA, 92(13):5788-92）。32kDタンパク質は、HeLa細胞核抽出物から単離され、部分的に配列決定された。特定されたcDNAは、264残基の推定アミノ酸配列を有し、ショウジョウバエTAF<sub>II</sub>40に関連する。Klemmらは、TAF<sub>II</sub>32がGTF2B及びウイルス転写トランス活性化剤VP16と相互作用することを示した（Klemm et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA, 92(13):5788-92）。著者は、組換えにより発現されたTAF<sub>II</sub>32が部分組換えTFIID複合体において機能的であり、組換え複合体がGAL4-VP16融合タンパク質により活性化を媒介したことを示した。TAF<sub>II</sub>32及びTAF<sub>II</sub>31は、同じタンパク質の2つの名前であり、これは、現在、TAF9とも称される。Luらは、TAF9をクローン化し、これをTAF<sub>II</sub>31と呼んだ。TAF9は、264アミノ酸タンパク質をコードする。免疫沈降及び結合分析は、TAF9が、p53活性の主な細胞の負の調節因子であるMDM2によって結合されたものと同一の部位でp53のN末端ドメインと相互作用することを示した。（Lu et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA, 92(11):5154-8）。ヒトTAF<sub>II</sub>31ヌクレオチド及びタンパク質配列は、例えば、GenBank受託番号U25112、U21858、及びNM\_016283に見出すことができる。

#### 【0089】

本明細書で使用される、「治療する」、「治療（treating）」、及び「治療（treatment）」という用語は、（1）癌などの疾患を予防する、すなわち、疾患にかかりやすいが、疾患のいずれの症状をまだ経験していない対象において、疾患の臨床

10

20

30

40

50

症状を発達させない、(2)疾患を阻害する、すなわち、疾患もしくはその臨床症状の発達を停止または減少させる、または(3)疾患を軽減する、すなわち、疾患もしくはその臨床症状の後退をもたらすことを含む。治療は、状態、障害、もしくは疾患の症状または病態が寛解されるか、さもなければ有利に変更される任意の様式を意味する。ある特定の実施形態では、そのような治療を必要とする対象は、ヒトなどの哺乳類である。

#### 【0090】

「腫瘍細胞」は、腫瘍における前癌性、癌性、及び正常な細胞を指す。

#### 【0091】

「Wnt」という用語は、哺乳類遺伝子のファミリー、及びショウジョウバエセグメント極性遺伝子無羽に関連するコードされたタンパク質を指す。ヒトにおいて、遺伝子のWntファミリーは、典型的には、疎水性シグナル配列を有する38～43kDaシステイン豊富糖タンパク質、及び保存アスパラギン連結オリゴ糖コンセンサス配列をコードする(Shimizu et al., Cell Growth Differ 8(12):1349-58(1997)) Wntファミリーは、少なくとも19の哺乳類メンバーを含む。Wntタンパク質の例としては、Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、WNT10A、Wnt10B、Wnt11、Wnt12、Wnt13、Wnt14、Wnt15、及びWnt16が挙げられる。ある特定の実施形態では、Wntタンパク質は、ヒトWnt2タンパク質などのWnt2である。

10

20

#### 【0092】

実施形態の説明において、化合物の構造が論じられる。次いで、化合物を含む薬学的製剤が論じられ、それらの使用方法、及びキットの説明が続く。

#### 【0093】

小分子化合物

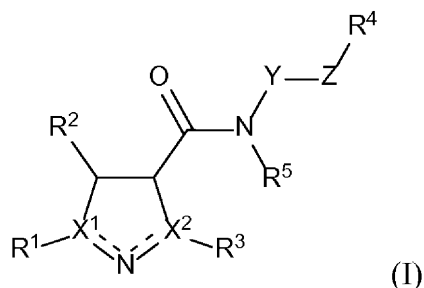
本開示の組成物は、以下に示される式I～IIIの化合物を含む。本開示の薬学的組成物及び方法は、式I～IIIの化合物も含む。

#### 【0094】

式I

本開示は、式(I)の化合物、ならびにその塩、水和物、溶媒和物、立体異性体、及びプロドラッグを提供する：

30



式中、

X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>の各々は独立して、NまたはCであり、環Nが、CであるX<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>のいずれかと二重結合を形成するように、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>の一方はNでありかつX<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>の一方はCであり、

40

R<sup>1</sup>は、アリールまたは置換アリールであり、

R<sup>2</sup>は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、及びアルキルから選択され、

R<sup>3</sup>は、アリールまたは置換アリールであり、

Yは、直接結合またはC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキルであり、

Zは、C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキルまたはアリールであり、

R<sup>4</sup>は、-OHであり、

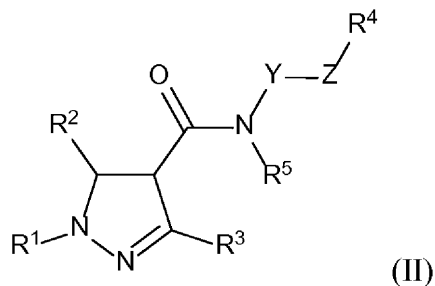
R<sup>5</sup>は、水素、またはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルである。

50

## 【 0 0 9 5 】

## 式 I I

本開示は、式 ( I I ) の化合物、ならびにその塩、水和物、溶媒和物、立体異性体、及びプロドラッグを提供する：



10

式中、

R<sup>1</sup> は、アリールまたは置換アリールであり、

R<sup>2</sup> は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、及びアルキルから選択され、

R<sup>3</sup> は、アリールまたは置換アリールであり、

Y は、直接結合または C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキルであり、

Z は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキルまたはアリールであり、

R<sup>4</sup> は、-OH であり、

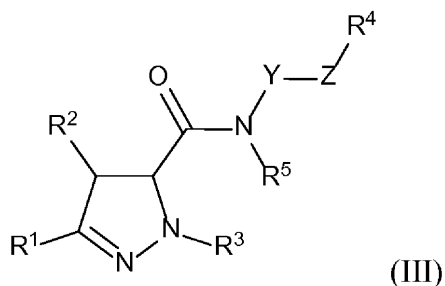
R<sup>5</sup> は、水素、または C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。

20

## 【 0 0 9 6 】

## 式 I I I

本開示は、式 ( I I I ) の化合物、ならびにその塩、水和物、溶媒和物、立体異性体、及びプロドラッグを提供する：



30

式中、

R<sup>1</sup> は、アリールまたは置換アリールであり、

R<sup>2</sup> は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、及びアルキルから選択され、

R<sup>3</sup> は、アリールまたは置換アリールであり、

Y は、直接結合または C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキルであり、

Z は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキルまたはアリールであり、

R<sup>4</sup> は、-OH であり、

R<sup>5</sup> は、水素、または C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。

40

## 【 0 0 9 7 】

式 ( I ) において、X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> の各々は独立して、N または C であり、環 N が、C である X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> のいずれかと二重結合を形成するように、X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> の一方は N でありかつ X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> の一方は C である。ある特定の実施形態では、X<sup>1</sup> は N であり、X<sup>2</sup> は C である。ある特定の実施形態では、X<sup>1</sup> は C であり、X<sup>2</sup> は N である。

## 【 0 0 9 8 】

式 ( I ) ~ ( I I I ) において、R<sup>1</sup> は、アリールまたは置換アリールである。ある特定の実施形態では、R<sup>1</sup> は、アリールである。ある特定の実施形態では、R<sup>1</sup> は、置換ア

50

リールである。ある特定の実施形態では、 $R^1$  は、置換アリールであり、置換基は、アルキルまたはハロゲンである。

【0099】

式(I)～(III)において、 $R^2$  は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、及びアルキルから選択される。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、アリールまたは置換アリールである。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、アリールである。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、置換アリールである。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、ヘテロアリールまたは置換ヘテロアリールである。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、ヘテロアリールである。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、置換ヘテロアリールである。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、アルキルである。

10

【0100】

ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、及びアルキルから選択される。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、ヘテロアリール及びアルキルから選択される。ある特定の実施形態では、 $R^2$  は、置換アリールであり、置換基は、アルキルまたはハロゲンである。

【0101】

式(I)～(III)において、 $R^3$  は、アリールまたは置換アリールである。ある特定の実施形態では、 $R^3$  は、アリールである。ある特定の実施形態では、 $R^3$  は、置換アリールである。ある特定の実施形態では、 $R^3$  は、置換アリールであり、置換基は、アルキルまたはハロゲンである。

20

【0102】

式(I)～(III)において、 $R^5$  は、水素であるか、または $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R^5$  は、水素である。ある特定の実施形態では、 $R^5$  は、 $C_1 \sim C_6$  アルキルである。

【0103】

式(I)～(III)において、Yは、直接結合、または $C_1 \sim C_4$  アルキルである。ある特定の実施形態では、Yは、直接結合である。ある特定の実施形態では、Yは、 $C_1 \sim C_4$  アルキルである。

【0104】

式(I)～(III)において、Zは、 $C_1 \sim C_4$  アルキルまたはアリールである。ある特定の実施形態では、Zは、 $C_1 \sim C_4$  アルキルである。ある特定の実施形態では、Zは、アリールである。

30

【0105】

ある特定の実施形態では、Yは、直接結合であり、Zは、 $C_1 \sim C_4$  アルキルである。ある特定の実施形態では、Yは、直接結合であり、Zは、アリールである。ある特定の実施形態では、Yは、 $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、Zは、 $C_1 \sim C_4$  アルキルである。ある特定の実施形態では、Yは、 $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、Zは、アリールである。

【0106】

ある特定の実施形態では、Yは直接結合であり、Zは $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、 $R^5$  は水素である。ある特定の実施形態では、Yは直接結合であり、Zはアリールであり、 $R^5$  は水素である。ある特定の実施形態では、Yは $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、Zは $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、 $R^5$  は水素である。ある特定の実施形態では、Yは $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、Zはアリールであり、 $R^5$  は水素である。

40

【0107】

ある特定の実施形態では、 $R^1$  はアリールであり、 $R^2$  はヘテロアリールであり、 $R^3$  はアリールである。

【0108】

ある特定の実施形態では、 $R^1$  はアリールであり、 $R^2$  はアルキルであり、 $R^3$  は置換アリールである。

【0109】

50

ある特定の実施形態では、 $R^1$  はアリールであり、 $R^2$  はアリールであり、 $R^3$  はアリールである。

【0110】

ある特定の実施形態では、 $R^1$  はアリールであり、 $R^2$  は置換アリールであり、 $R^3$  は置換アリールである。

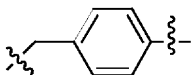
【0111】

ある特定の実施形態では、 $Y$  及び  $Z$  が  $-(CH_2)_3-C(CH_3)_2-CH_2-$  を形成するように、 $Y$  は  $C_1 \sim C_4$  アルキルでありかつ  $Z$  は  $C_1 \sim C_4$  アルキルである。

【0112】

ある特定の実施形態では、 $Y$  及び  $Z$  が、

10



を形成するように、 $Y$  は  $C_1 \sim C_4$  アルキルでありかつ  $Z$  はアリールである。

【0113】

本化合物のある特定の実施形態は、以下の表に図示される。

20

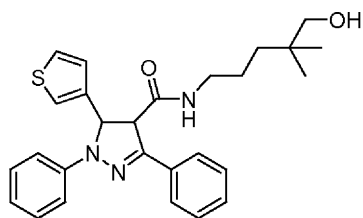
30

40

化合物	$X^1$	$X^2$	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^5$	$-Y-Z-R^4$
1	N	C				H	
2	C	N				H	
3	N	C				H	
4	N	C				H	
5	N	C				H	
6	N	C				H	

【0114】

本化合物、及びその塩、または溶媒和物、または立体異性体の実施形態は、以下に示される、1,3-ジフェニル-5-チオフェン-3-イル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸(5-ヒドロキシ-4,4-ジメチル-ペンチル)-アミド(化合物1)を含む。

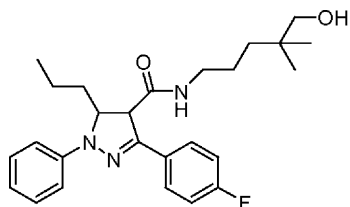


(化合物1)

## 【 0 1 1 5 】

本化合物、及びその塩、または溶媒和物、または立体異性体の実施形態は、以下に示される、3-(4-フルオロ-フェニル)-1-フェニル-5-プロピル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸(5-ヒドロキシ-4,4-ジメチル-ペンチル)-アミド(化合物4)を含む。

10

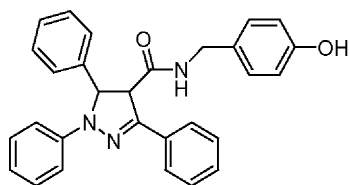


(化合物4)

## 【 0 1 1 6 】

本化合物、及びその塩、または溶媒和物、または立体異性体の実施形態は、以下に示される、1,3,5-トリフェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸4-ヒドロキシ-ベンジルアミド(化合物2)を含む。

20

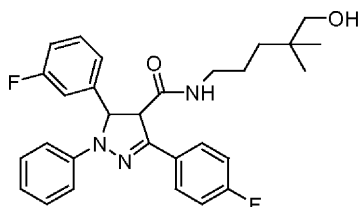


(化合物2)

## 【 0 1 1 7 】

本化合物、及びその塩、または溶媒和物、または立体異性体の実施形態は、以下に示される、3-(4-フルオロ-フェニル)-5-(3-フルオロ-フェニル)-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸(5-ヒドロキシ-4,4-ジメチル-ペンチル)-アミド(化合物6)を含む。

30

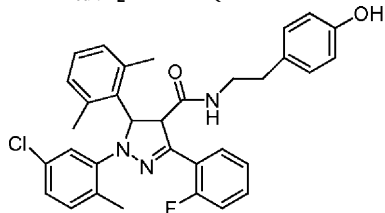


(化合物6)

## 【 0 1 1 8 】

本化合物、及びその塩、または溶媒和物、または立体異性体の実施形態は、以下に示される、1-(5-クロロ-2-メチル-フェニル)-5-(2,6-ジメチル-フェニル)-3-(2-フルオロ-フェニル)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボン酸[2-(4-ヒドロキシ-フェニル)-エチル]-アミド(化合物3)を含む。

40



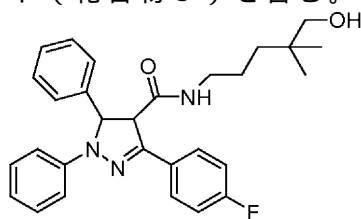
(化合物3)

## 【 0 1 1 9 】

本化合物、及びその塩、または溶媒和物、または立体異性体の実施形態は、以下に示さ

50

れる、3 - ( 4 - フルオロ - フェニル ) - 1 , 5 - ジフェニル - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピラゾール - 4 - カルボン酸 ( 5 - ヒドロキシ - 4 , 4 - ジメチル - ペンチル ) - アミド ( 化合物 5 ) を含む。



(化合物5)

## 【 0 1 2 0 】

10

## 小分子化合物の調製

本開示の化合物を合成するために有用な一般的に知られる化学合成スキーム及び条件を提供する多くの一般参照が利用可能である (例えば、Smith and March, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Fifth Edition, Wiley-Interscience, 2001、またはVogel, A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis, Fourth Edition, New York: Longman, 1978を参照)。

## 【 0 1 2 1 】

20

本明細書に記載される化合物は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、分取薄層クロマトグラフィー、フラッシュカラムクロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー手段を含む、当該技術分野に既知の手段のいずれかによって精製され得る。正相及び逆相ならびにイオン樹脂を含む、任意の好適な固定相が使用され得る。例えば、Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Edition, ed. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979、及びThin Layer Chromatography, ed. E. Stahl, Springer-Verlag, New York, 1969を参照。

## 【 0 1 2 2 】

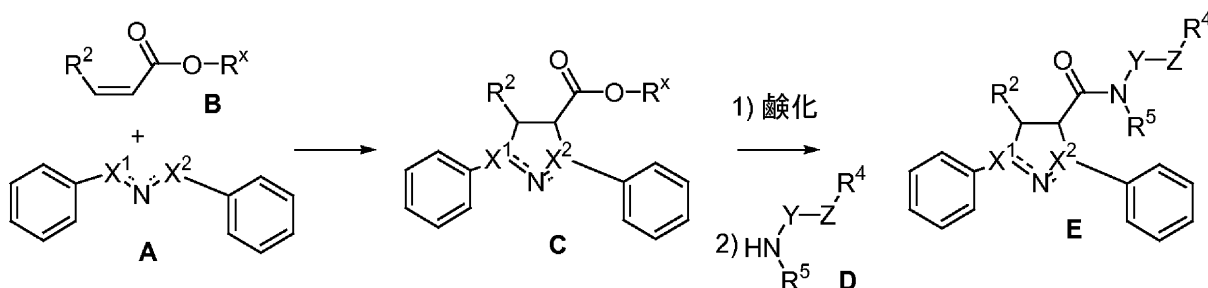
30

本開示の化合物を調製するためのプロセスのいずれか中、考慮される分子のいずれか上の感応性または反応性の基を保護することが必要かつ/または望ましい場合がある。これは、T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Fourth edition, Wiley, New York 2006などの一般的な研究に記載される従来の保護基の手段により達成され得る。保護基は、当該技術分野に既知の方法を使用して、適宜後続段階で除去することができる。

## 【 0 1 2 3 】

本実施形態の化合物は、下の合成スキームに従い調製され得る。図示の目的の合成スキーム 1 において、 $R^1$  及び  $R^3$  はフェニルであり、 $R^x$  は脱離基であり、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $Y$ 、 $Z$ 、及び  $R^4$  は前に定義された通りである。

40

合成スキーム 1

50



## 【0124】

ピラゾール誘導体は、ヒドラゾンと不飽和化合物との間の反応により形成され得る。合成スキーム1において、化合物Aは、化合物Bと縮合され、化合物Cを形成する。反応は、そのまま(nearly)、または好適な溶媒と共に行うことができる。反応は、冷却しながら、室温で、または加熱しながらを含む、様々な温度で行うことができる。ある特定の実施形態では化合物Aは、好適な溶媒中で化合物Bと共に還流される。好適な溶媒は、例えば、メタノール、メチレン、塩化物、DMF、またはTHFである。当業者は、特定の反応物により、好適な反応条件を決定することができる。

## 【0125】

合成スキーム1をさらに参照すると、化合物Cは、鹸化される。ある特定の実施形態では、化合物Cは、エステルを含み、R<sup>x</sup>は、アルキル基である。化合物Cを鹸化するための条件は、塩基を伴う好適な溶媒中での反応を含む。鹸化に好適な溶媒は、水、アルコール(メタノール及びエタノールなど)、THF、及びそれらの混合物を含むが、これらに限定されない。好適な塩基は、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムを含むが、これらに限定されない。

10

## 【0126】

次いで、鹸化された化合物Cは、ペプチドカップリング反応において、アミンDと反応して、化合物Eを形成する。ペプチドカップリング反応は、典型的には、従来のペプチドカップリング試薬を採用し、従来のカップリング反応条件下で行われる。使用に好適なカップリング試薬は、例として、エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピルカルボジイミド(EDCまたはEDCI)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)などのカルボジイミド、及びN,N'-カルボニルジイミダゾール、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン(EDQ)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)などの他の周知のカップリング試薬を含む。任意に、そのようなN-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAT)、N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)などの周知のカップリングプロモーターがこの反応に採用され得る。典型的には、このカップリング反応は、塩化メチレン、THF、またはDMFなどの不活性希釈液中で、約1~約72時間、約0~約60の範囲の温度で行われる。

20

30

## 【0127】

図示される例では、本実施形態の化合物は、実施例に示されるように、桂皮酸エチルまたは不飽和エステルのベンズアルデヒドフェニルヒドラゾンとの縮合、続いて、エチルエステルの鹸化、及びアミンとの反応により所望のアミド最終生成物を得ることにより調製することができる。あるいは、本実施形態の化合物は、最初に、桂皮酸または不飽和エステルをアミンと反応させて、アミドを調製し、次に、ベンズアルデヒドフェニルヒドラゾンと縮合させることにより調製することができる。当業者は、本実施形態の化合物を調製するために、さらなる方法が存在することを認識する。

40

## 【0128】

ある特定の実施形態では、式(I)の化合物は、標識を含む。これは、インビボ投与後の、化合物の分布を検出し、試験するのに有用である。例えば、トリチウム(<sup>3</sup>H)が、従来の薬物動態/動的調査において、標的として使用され得る。標識を含む化合物は、例えば、分光、光化学、生化学、免疫化学、化学、または他の物理手段により検出され得る。

## 【0129】

本実施形態の化合物は、そのような化合物を構成する原子のうちの1つ以上に不自然な割合の原子同位体も含み得る。例えば、本化合物は、例えば、トリチウム(<sup>3</sup>H)または炭素-14(<sup>14</sup>C)などの放射活性同位体で放射標識され得る。本実施形態の化合物の

50

全ての同位体の変形は、放射活性であるか否かに関わらず、本実施形態の範囲内に包含されることが意図される。

#### 【0130】

##### 鏡像異性体特異的活性

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される化合物は、2つ以上の立体異性体を含み得る。本明細書で使用される、「立体異性体」という用語は、非対称炭素原子（光学中心）または二重結合を保有する本実施形態の化合物を指す。例えば、本明細書に記載される化合物は、2つの鏡像異性体を含み得る。本明細書で使用される、「鏡像異性体」は、互いの重ねることができない鏡像である2つの立体異性体のうちの1つである。いくつかの場合では、化合物の鏡像異性体のラセミ混合物は、個々の鏡像異性体に分離され得る。例えば、鏡像異性体は、これらに限定されないが、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（例えば、キラルHPLC）、結晶化などの分離技術を使用して分離され得る。他の実施形態では、個々の鏡像異性体は、例えば、キラル出発材料及び非対称合成法を使用することにより、個別に合成され得る。

10

#### 【0131】

ある特定の実施形態では、個々の鏡像異性体は、上述のように、キラル分離技術（例えば、キラルHPLC）を使用して分離することができる。いくつかの場合では、キラル分離技術は、実質的に純粋な個々の鏡像異性体を提供するように構成される。例えば、個々の鏡像異性体は、95%以上、または96%以上、または97%以上、または98%以上、または99%以上、または99.5%以上、または99.9%以上、またはさらには100%の純度など、90%以上の純度を有し得る。ある特定の場合では、個々の鏡像異性体は、98%、または99%、または99.9%の純度を有する。いくつかの場合では、分離された鏡像異性体は、95%以上、または96%以上、または97%以上、または98%以上、または99%以上、または99.5%以上、または99.9%以上など、90%以上の鏡像異性体過剰を有する。

20

#### 【0132】

キラル分離技術（例えば、キラルHPLC）が個々の鏡像異性体を分離するために使用される実施形態では、異なる鏡像異性体は、使用される分離条件下で大幅に異なる滞留時間を有し得る（例えば、下の実施例16を参照）。例えば、第1の鏡像異性体は、第2の鏡像異性体よりも大幅に短い滞留時間を有し得る。これらの場合では、第1の鏡像異性体は、「より速く溶出する」鏡像異性体のように記載され、第2の鏡像異性体は、「より緩徐に溶出する」鏡像異性体のように記載され得る。いくつかの場合では、第1及び第2の鏡像異性体は、0.3分以上、または0.4分以上、または0.5分以上、または0.6分以上、または0.7分以上、または0.8分以上、または0.9分以上、または1分以上、または1.1分以上、または1.2分以上、または1.3分以上、または1.4分以上、または1.5分以上、または1.6分以上、または1.7分以上、または1.8分以上、または1.9分以上、または2分以上、または2.5分以上、または3分以上、または3.5分以上、または4分以上、または4.5分以上、または5分以上など、0.2分以上を含む、0.1分以上の溶出時間の差を有し得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2の鏡像異性体は、0.5分～1.5分、または0.7分～1.2分など、0.5分～2分の範囲の溶出時間の差を有する。例えば、第1及び第2の鏡像異性体は、1分の溶出時間の差を有し得る。

30

40

#### 【0133】

ある特定の実施形態では、1つの鏡像異性体は、他の鏡像異性体の活性よりも大きい活性を有し得る。例えば、第1の鏡像異性体は、第2の鏡像異性体の活性よりも大きい活性を有し得る。あるいは、第2の鏡像異性体は、第1の鏡像異性体の活性よりも大きい活性を有し得る。いくつかの場合では、上述のように、鏡像異性体は、キラル分離技術（例えば、HPLC）におけるそれらの滞留時間に基づき、互いに区別され得る。これらの場合では、第1の鏡像異性体（例えば、より速く溶出する鏡像異性体）は、第2の鏡像異性体（例えば、より緩徐に溶出する鏡像異性体）とは大幅に異なる活性を有し得る。例えば、

50

より速く溶出する鏡像異性体は、より緩徐に溶出する鏡像異性体よりも大きい活性を有し得る。他の実施形態では、より緩徐に溶出する鏡像異性体は、より速く溶出する鏡像異性体よりも大きい活性を有し得る。

【0134】

いくつかの場合では、化合物の活性は、その最大半量の阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) により測定され得る。 $IC_{50}$  は、生物学的プロセス (またはプロセスの構成要素、例えば、酵素、細胞、細胞受容体、微生物等) の阻害における化合物の有効性の尺度である。この定量的測定は、生物学的プロセスを半分阻害するためにどのくらいの化合物が必要とされるかを示す。ある特定の実施形態では、上述のように、化合物の鏡像異性体は、大幅に異なる活性を有し得る。例えば、第2の鏡像異性体 (例えば、より緩徐に溶出する鏡像異性体) は、第1の鏡像異性体 (例えば、より速く溶出する鏡像異性体) より低い  $IC_{50}$  を有し得る、すなわち、第2の鏡像異性体は、第1の鏡像異性体より活性である。いくつかの場合では、第2の鏡像異性体の  $IC_{50}$  は、65%以下、もしくは60%以下、もしくは55%以下、もしくは50%以下、もしくは45%以下、もしくは40%以下、もしくは35%以下、もしくは30%以下、もしくは25%以下、もしくは20%以下、もしくは15%以下、もしくは10%以下、もしくは5%以下、もしくは3%以下を含む70%以下など、第1の鏡像異性体の75%以下の  $IC_{50}$  であるか、または第2の鏡像異性体の  $IC_{50}$  は、第1の鏡像異性体の1%以下の  $IC_{50}$  である。

10

【0135】

他の実施形態では、第1の鏡像異性体 (例えば、より速く溶出する鏡像異性体) は、第2の鏡像異性体 (例えば、より緩徐に溶出する鏡像異性体) より低い  $IC_{50}$  を有する、すなわち、第1の鏡像異性体は、第2の鏡像異性体より活性である。ある特定の場合では、第1の鏡像異性体の  $IC_{50}$  は、65%以下、もしくは60%以下、もしくは55%以下、もしくは50%以下、もしくは45%以下、もしくは40%以下、もしくは35%以下、もしくは30%以下、もしくは25%以下、もしくは20%以下、もしくは15%以下、もしくは10%以下、もしくは5%以下、もしくは3%以下を含む70%以下など、第2の鏡像異性体の75%以下の  $IC_{50}$  であるか、または第1の鏡像異性体の  $IC_{50}$  は、第2の鏡像異性体の1%以下の  $IC_{50}$  である。

20

【0136】

細胞に基づくアッセイにおける小分子化合物の試験

30

本実施形態の化合物は、インビトロ及びインビボでの活性についてスクリーニングされ得る。インビトロアッセイに関して、本開示は、本明細書に記載される、細胞に基づく細胞毒性アッセイを提供する。インビボアッセイに関して、本開示は、本明細書に記載される、マウス異種移植片アッセイを提供する。

【0137】

薬学的組成物

本開示は、式 (I) の少なくとも1つの化合物と、任意に、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物または医薬を提供する。薬学的組成物または医薬は、例えば、癌などの状態の治療のために、患者に投与され得る。

【0138】

製剤及び投与

40

本実施形態の化合物は、薬学的組成物、または腸内もしくは非経口のいずれかの適用に好適な賦形剤または担体と組み合わせて、もしくは混合して、その治療有効量を含む医薬を製造するのに有用である。

【0139】

本実施形態において使用するための薬学的組成物または医薬は、1つ以上の生理学的に許容される担体または賦形剤を使用して、標準的な技法により製剤化され得る。好適な薬学的担体は、本明細書、及び E. W. Martin による "Remington's Pharmaceutical Sciences" に記載されている。本実施形態の化合物及びそれらの生理学的に許容される塩及び溶媒和物は、吸入を介して、局所的、経鼻的、

50

経口的、非経口的、または直腸的を含む、任意の好適な経路による投与用に製剤化され得る。よって、薬学的組成物の投与は、シリンジもしくは他のデバイスにより、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、鼻腔内、脳内、気管内、動脈内、腹腔内、膀胱内、胸膜内、冠内、または腫瘍内注入により行われ得る。吸入またはエアロゾル投与と同様に、経皮投与も想定される。錠剤及びカプセルは、経口、直腸、または膣投与され得る。

#### 【0140】

経口投与に関して、薬学的組成物または医薬は、薬学的に許容される賦形剤と共に、従来の手段によって調製される、例えば、錠剤またはカプセルの形態を取ることができる。ある特定の実施形態では、錠剤及びゼラチンカプセルは、(a)希釈剤もしくは充填剤、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロース(例えば、エチルセルロース、微結晶セルロース)、グリシン、ペクチン、ポリアクリレート、及び/またはリン酸水素カルシウム、硫酸カルシウム、(b)滑沢剤、例えば、シリカ、タルカム、ステアリン酸、そのマグネシウム塩、もしくはカルシウム塩、ステアリン酸金属塩、コロイド状二酸化ケイ素、水素化植物油、コーンスターチ、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、及び/またはポリエチレングリコール、錠剤に関しては、また(c)結合剤、例えば、アルミニウムケイ酸マグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、及び/もしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース、所望により、(d)崩壊剤、例えば、デンプン(例えば、ジャガイモデンプンまたはナトリウムデンプン)、グリコール酸、寒天、アルギニン酸、もしくはそのナトリウム塩、または発泡混合物、(e)湿潤剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、及び/または(f)吸収剤、着色剤、風味剤、及び甘味剤と一緒に、活性成分、すなわち、本実施形態の化合物を含む。

10

20

#### 【0141】

錠剤は、当該技術分野において既知の方法により、フィルムコーティングまたは腸溶コーティングのいずれかを施され得る。経口投与用の液体調製物は、例えば、溶液、シロップ、または懸濁液の形態を取るか、または使用前に水または他の好適なビヒクルと構成するための乾燥製品として提示され得る。そのような液体調製物は、従来の手段によって、薬学的に許容される添加剤、例えば、懸濁剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用油脂)、乳化剤(例えば、レシチンもしくはアカシア)、非水性ビヒクル(例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール)、または分別植物油、及び防腐剤、例えば、メチル、もしくはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸、またはソルビン酸と共に調製され得る。調製物は、適切に、緩衝塩、風味剤、着色剤、及び/または甘味剤も含み得る。所望する場合、経口投与用の調製物は、活性化化合物を徐放するために、適切に製剤化され得る。

30

40

#### 【0142】

吸入による投与に関して、化合物は、好適な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の好適なガスを使用して、加圧バックまたはネブライザからのエアロゾルスプレー提示の形態で便宜的に送達され得る。加圧エアロゾルの場合には、投薬単位は、計量された量を送達するためにバルブを提供することによって決定することができる。吸入器具または通気器において使用するために、化合物及び好適な粉末基剤、例えば、ラクトースまたはデンプンの粉末ミックスを含む、例えば、ゼラチンのカプセル及びカートリッジが製剤化され得る。

#### 【0143】

本実施形態の化合物は、注入により、例えば、ボラス注入または連続輸注により、非経口投与用に製剤化され得る。注入用製剤は、防腐剤が添加された、例えば、アンプルまたは多回用量容器の単位投薬形態で、提示され得る。ある特定の実施形態では、注入可能組成物は、水性の等張溶液または懸濁液であり、坐剤は、脂肪エマルジョンまたは懸濁液から調製される。組成物は、滅菌され、かつ/または防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、溶液促進剤、浸透圧を調節するための塩、及び/もしくは緩衝剤などのアジュバントを含

50

み得る。あるいは、活性成分は、好適なビヒクル、例えば、使用前に滅菌の発熱物質を含まない水と構成するための粉末形態であり得る。加えて、それらは、他の治療的に有益な物質も含み得る。組成物は、それぞれ、従来の混合法、造粒法、またはコーティング法により調製され、約 0.1 ~ 75 %、または約 1 ~ 50 % の活性成分を含む。

【0144】

経皮への適用に好適な製剤は、担体と共に、有効量の本実施形態の化合物を含む。ある特定の実施形態では、担体は、宿主の皮膚を通過するのを補助するための吸収性の薬理的に許容される溶媒を含む。例えば、経皮デバイスは、裏地部材を含むバンドエイド、任意に担体と共に化合物を含むリザーバ、任意に、長期間にわたって制御され、所定の速度で宿主の皮膚に化合物を送達するための速度制御バリア、及び任意に、皮膚にデバイスを固定するための接着性オーバーレイの形態である。マトリックス経皮製剤も使用することができる。

10

【0145】

ある特定の実施形態では、局所適用、例えば、皮膚及び眼に好適な製剤は、当該技術分野において周知である水溶液、軟膏、クリーム、またはゲルである。そのようなものは、可溶化剤、安定化、等張増強剤、緩衝剤、及び防腐剤を含み得る。

【0146】

本化合物は、直腸組成物、例えば、従来の坐剤基剤、例えば、ココアバターもしくは他のグリセリドを含む、例えば、坐剤または滞留浣腸に製剤化され得る。

20

【0147】

さらに、本化合物は、デポ調製物として製剤化され得る。そのような長時間作用製剤は、移植（例えば、皮下または筋肉内）によって、または筋肉内注入によって投与され得る。よって、例えば、本化合物は、好適なポリマーもしくは疎水性材料（例えば、許容可能な油中のエマルジョンとして）もしくはイオン交換樹脂と共に、または難溶性誘導体、例えば、難溶性塩として製剤化され得る。

【0148】

本組成物は、所望により、活性成分を含む 1 つ以上の単位投与形態を含み得るバックまたはディスペンサーデバイス中に存在し得る。このバックは、例えば、金属またはプラスチック箔、例えば、プリスターバックを含み得る。このバックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書を添付することができる。

30

【0149】

組み合わせ製剤

ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、有効量の本明細書に定義される実施形態の化合物、及び化学療法薬などの別の治療薬を含む。

【0150】

化学療法薬の例としては、ダウノルビシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、エソルビシン、プレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシンアラビノシド、ビス-クロロエチルニトロソ尿素 (nitrosurea)、プスルファン、マイトマイシン C、アクチノマイシン D、ミスラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシプロゲステロン、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソ尿素 (nitrosurea)、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン (CA)、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシペルオキシシクロホスホラミド、5-フルオロウラシル (5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン (5-FUdR)、メトトレキサート (MTX)、コルヒチン、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、トリメトトレキサート、テニポシド、シスプラチンジエチルスチルベストロール (DES)、ピスモデギブ (GDC-0449)、エルロチニブ (Tarceva (登録商標))、ペメトレキセド (Alimta (登録商標))、PI3K 阻害剤 LY

40

50

294002、TGF 阻害剤SB431542、及びシスプラチンが挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N. J. を参照。

#### 【0151】

ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びビスモデギブ（GDC-0449）、エルロチニブ（Tarceva（登録商標））、ペメトレキセド（Alimta（登録商標））、LY294002、SB431542、及びシスプラチンから選択される別の治療薬を含む。ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びビスモデギブ（GDC-0449）を含む。ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びエルロチニブ（Tarceva（登録商標））を含む。ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びペメトレキセド（Alimta（登録商標））を含む。ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びLY294002を含む。ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びSB431542を含む。ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びシスプラチンを含む。

10

#### 【0152】

ある特定の実施形態は、化合物1～6のうちの1つ以上と、例えば、以下の表に示される別の治療薬の組み合わせを提供する。

20

化合物1～6と別の治療薬の組み合わせの例					
化合物1 と ビスモデギブ (GDC-0449)	化合物1 とエルロチニブ (Tarceva (登録商標))	化合物1 とペメトレキセド (Alimta (登録商標))	化合物1 と LY294002	化合物1 と SB431542	化合物1 と シスプラチン
化合物2 と ビスモデギブ (GDC-0449)	化合物2 とエルロチニブ (Tarceva (登録商標))	化合物2 とペメトレキセド (Alimta (登録商標))	化合物2 と LY294002	化合物2 と SB431542	化合物2 と シスプラチン
化合物3 と ビスモデギブ (GDC-0449)	化合物3 とエルロチニブ (Tarceva (登録商標))	化合物3 とペメトレキセド (Alimta (登録商標))	化合物3 と LY294002	化合物3 と SB431542	化合物3 と シスプラチン
化合物4 と ビスモデギブ (GDC-0449)	化合物4 とエルロチニブ (Tarceva (登録商標))	化合物4 とペメトレキセド (Alimta (登録商標))	化合物4 と LY294002	化合物4 と SB431542	化合物4 と シスプラチン
化合物5 と ビスモデギブ (GDC-0449)	化合物5 とエルロチニブ (Tarceva (登録商標))	化合物5 とペメトレキセド (Alimta (登録商標))	化合物5 と LY294002	化合物5 と SB431542	化合物5 と シスプラチン
化合物6 と ビスモデギブ (GDC-0449)	化合物6 とエルロチニブ (Tarceva (登録商標))	化合物6 とペメトレキセド (Alimta (登録商標))	化合物6 と LY294002	化合物6 と SB431542	化合物6 と シスプラチン

30

40

#### 【0153】

本実施形態の化合物と共に使用する場合、そのような化学療法薬は、個々に（例えば、5-FU及び本実施形態の化合物）、順次（例えば、一定の期間の間、5-FU及び本実施形態の化合物、その後、例えば、MTX及び本実施形態の化合物）、または1つ以上の他のそのような治療薬との組み合わせ（例えば、5-FU、MTX、及び本実施形態の化

50

合物、または5-FU、放射療法、及び本実施形態の化合物)で使用され得る。投与は、同じもしくは異なる投与経路によって、または同じ薬学的製剤と一緒に存在してよい。

【0154】

ある特定の実施形態では、治療有効量の本実施形態の化合物は、外科手術、及び任意に別の化学療法薬の投与と組み合わせて投与される。

【0155】

治療有効量及び投薬

ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、癌を予防、治療、または制御するために治療有効量で患者に投与される。薬学的組成物または医薬は、患者において有効な治療応答を引き起こすのに十分な量で患者に投与される。有効な治療応答は、疾患の症状または合併症を少なくとも部分的に停止または遅らせる応答である。これを達成するのに適切な量は、「治療有効量」と定義される。

10

【0156】

投与される化合物の投薬量は、温血動物(哺乳類)の種、体重、年齢、個々の状態、治療される領域の表面積、及び投与形態による。用量の大きさは、特定の対象における特定の化合物の投与に付随する任意の有害作用の存在、性質、及び程度によっても決定される。約50~70kgの哺乳類への経口投与の単位投薬量は、約5~500mgの活性成分を含み得る。典型的には、本実施形態の化合物の投薬量は、所望の効果を達成するのに十分である投薬量である。

20

【0157】

最適な投薬スケジュールは、対象の身体における化合物蓄積の測定から計算することができる。一般に、投薬量は、体重の1kg当たり1ng~1,000mgであり、毎日、毎週、毎月、または毎年1回以上与えられ得る。当業者は、最適な投薬量、投薬方法、及び反復速度を決定することができる。

【0158】

ある特定の実施形態では、本実施形態の化合物を含む薬学的組成物または医薬は、複数日間、対象の体重の1kg当たり(1mg/kg)約1mgの化合物~約1g/kgの範囲の日用量で投与される。ある特定の実施形態では、日用量は、約5mg/kg~約500mg/kgの範囲の用量である。ある特定の実施形態では、日用量は、約10mg/kg~約250mg/kgである。ある特定の実施形態では、日用量は、約25mg/kg~約150mg/kgである。日用量は、1日1回投与されるか、またはサブ用量に分割し、複数用量で、例えば1日2回、3回、または4回投与され得る。

30

【0159】

所望の治療効果を達成するために、化合物は、複数日間、治療有効日用量で投与され得る。よって、対象における癌を治療するための化合物の治療的に有効な投与は、3日~2週間以上の範囲の期間の間継続する周期的な(例えば、毎日)投与を必要とする。典型的には、化合物は、少なくとも3日連続、多くの場合、少なくとも5日連続、非常にしばしば、少なくとも10日、時には、20、30、40日以上連続投与される。連続日用量は、治療有効量を達成するための一経路であるが、治療的に有益な効果は、投与が対象における化合物の治療有効濃度を維持するのに十分に頻繁に反復される限り、化合物が毎日投与されない場合でも達成され得る。例えば、2日に1回、3日に1回、または高用量範囲が採用され、対象が耐えられる場合は1週間に1回、化合物を投与することができる。

40

【0160】

そのような化合物の最適な投与量、毒性、及び治療有効性は、個々の化合物の相対的効力により変動し得、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順により、例えば、LD<sub>50</sub>(集団の50%に致死の用量)及びED<sub>50</sub>(集団の50%に治療的に有効な用量)を決定することにより、決定され得る。毒性と治療効果と間の用量比は、治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>の比率として表すことができる。ある特定の実施形態では、本開示は、大きな治療指数を示す化合物を提供する。毒性副作用を示す化合物が使用され得るが、正常な細胞に対する潜在的な損傷を最小限にし、それによって、副作用を減少

50

させるために、そのような化合物が患部組織部位を標的とする送達系を設計するための注意がとられるべきである。

【0161】

例えば、細胞培養アッセイ及び動物試験から得たデータが、ヒトにおいて使用するための投薬量範囲を製剤化するために使用され得る。ある特定の実施形態では、そのような化合物の投薬量は、ほとんど、または全く毒性のないED<sub>50</sub>を含む循環濃度の範囲内である。投薬量は、採用される投薬形態及び投与経路により、この範囲内で変動し得る。本実施形態の方法に使用される任意の化合物に関して、治療有効量は、最初は、細胞培養アッセイから推定され得る。細胞培養において決定される、IC<sub>50</sub>（症状の最大半量の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルにおける用量が製剤化され得る。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定され得る。一般に、小分子化合物の用量当量は、典型的な対象に関して、約1 ng/kg ~ 100 mg/kgである。

10

【0162】

治療成功後、治療される状態、例えば、癌の再発を阻止するために、対象に維持療法を受けさせることが望ましい場合がある。

【0163】

小分子化合物を使用した癌の治療

本実施形態は、例えば、GLIポリペプチドを発現する癌などの状態を治療するために、式（I）の化合物を使用するための方法を提供する。GLIポリペプチドを発現するあらゆる細胞または腫瘍細胞が、本実施形態の方法を実施するために使用され得る。

20

【0164】

ある特定の実施形態では、癌性状態に罹患する対象を治療するための方法が提供される。この方法は、治療有効量の本実施形態の化合物を対象に投与するステップを含み、癌性状態は、GLIポリペプチドの発現を特徴とし、投与のステップは、対象の治療をもたらす。

【0165】

さらに、本実施形態は、薬物療法において使用するための式（I）の化合物を提供する。さらに、本実施形態は、癌の治療に使用するための式（I）の化合物を提供する。さらに、本実施形態は、癌の医薬治療の製造における、式（I）の化合物の使用を提供する。

30

【0166】

ある特定の癌は、GLIポリペプチドを発現する。よって、対象における大半の癌性状態または癌は、本実施形態の化合物を使用して治療することができる。ある特定の実施形態では、癌性状態または癌は、結腸癌、黒色腫、中皮腫、肺癌、腎細胞癌、乳癌、前立腺癌、肉腫、卵巣癌、食道癌、胃癌、肝細胞癌、上咽頭癌、膵臓癌、及び神経膠腫から選択される。

【0167】

ある特定の実施形態では、化合物は、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドを発現する結腸癌に罹患する対象を治療するために使用される。

40

【0168】

ある特定の実施形態では、化合物は、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドを発現する乳癌に罹患する対象を治療するために使用される。

【0169】

ある特定の実施形態では、化合物は、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドを発現する上咽頭癌に罹患する対象を治療するために使用される。

【0170】

50



ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する肺癌に罹患する対象を治療するために使用される。肺癌は、気管支原性肺癌〔扁平細胞、未分化小細胞、未分化大細胞、腺癌〕、肺泡〔細気管支〕癌、気管支腺腫、肉腫、リンパ腫、軟骨性過誤腫、中皮腫、S C L C、及びN S C L Cを含むが、これらに限定されない。

【0171】

ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する肉腫に罹患する対象を治療するために使用される。肉腫は、血管肉腫、線維肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、粘液腫、横紋筋腫、線維腫、脂肪腫、及び奇形腫などの癌を含むが、これらに限定されない。

10

【0172】

ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する消化器癌に罹患する対象を治療するために使用される。消化器癌は、食道〔扁平上皮癌、腺癌、平滑筋肉腫、リンパ腫〕、胃〔癌、リンパ腫、平滑筋肉腫〕、膵臓〔管腺癌、インスリノーマ、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、カルチノイド腫瘍、VIP産生腫瘍〕、小腸〔腺癌、リンパ腫、カルチノイド腫瘍、カボジ肉腫、平滑筋腫、血管腫、脂肪腫、神経線維腫、線維腫〕、及び大腸〔腺癌、管状腺腫、絨毛腺腫、過誤腫、平滑筋腫〕の癌を含むが、これらに限定されない。

【0173】

ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する泌尿生殖器の癌に罹患する対象を治療するために使用される。泌尿生殖器の癌は、腎臓〔腺癌、ウィルムス腫瘍（腎芽腫）〕、リンパ腫、白血病、腎細胞癌〕、膀胱及び尿道〔扁平上皮癌、移行上皮癌、腺癌〕、前立腺〔腺癌、肉腫〕、ならびに精巣〔精上皮腫、奇形腫、胚性癌腫、奇形癌腫、絨毛癌、肉腫、ライディッヒ細胞腫、線維腫、線維腺腫、類腺腫瘍、脂肪腫〕の癌を含むが、これらに限定されない。

20

【0174】

ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する肝臓癌に罹患する対象を治療するために使用される。肝臓癌は、肝細胞癌、胆管細胞癌、肝芽腫、血管肉腫、肝細胞腺腫、及び血管腫を含むが、これらに限定されない。

30

【0175】

ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する皮膚癌に罹患する対象を治療するために使用される。皮膚癌は、悪性黒色腫、基底細胞癌、扁平上皮癌、カボジ肉腫、母斑、異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド、及び乾癬を含むが、これらに限定されない。

【0176】

ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する婦人科癌に罹患する対象を治療するために使用される。婦人科癌は、子宮〔子宮内膜癌〕、子宮頸部〔子宮頸癌、前浸潤性子宮頸部異形成〕、卵巣〔卵巣癌（漿液性嚢胞腺癌、粘液性嚢胞腺癌、類内膜癌、明細胞腺癌、未分類癌）〕、顆粒膜-卵胞膜細胞腫瘍、セルトリ-ライディッヒ細胞腫、未分化胚細胞腫、悪性奇形腫、及び他の生殖細胞腫瘍〕、外陰部〔扁平上皮癌、上皮内癌、腺癌、線維肉腫、黒色腫〕、膣〔明細胞癌、扁平上皮癌、ブドウ状肉腫（胎児性横紋筋肉腫）〕、ならびにファロピウス管〔癌〕の癌を含むが、これらに限定されない。

40

【0177】

ある特定の実施形態では、化合物は、G L I 1、G L I 2、またはG L I 3ポリペプチドなどのG L Iポリペプチドを発現する骨癌に罹患する対象を治療するために使用される。骨癌は、骨肉腫〔骨肉腫〕、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫〔細網細胞肉腫〕、多発性骨髄腫、悪性巨細胞腫瘍、脊索腫、骨軟骨腫

50

〔骨軟骨性外骨腫〕、良性軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、類骨腫、及び巨細胞腫瘍を含むが、これらに限定されない。

【0178】

ある特定の実施形態では、化合物は、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドを発現する神経系の癌に罹患する対象を治療するために使用される。神経系の癌は、頭蓋〔骨腫、血管腫、肉芽腫、黄色腫、骨パジェット病〕、髄膜〔髄膜腫、髄膜肉腫、神経膠腫〕、脳〔星状細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、上衣腫、胚細胞腫（松果体腫）、多形神経膠芽腫、乏突起神経膠腫、シュワン腫、網膜芽細胞腫、先天性腫瘍〕、及び脊髄〔神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、肉腫〕の癌を含むが、これらに限定されない。

10

【0179】

ある特定の実施形態では、化合物は、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドを発現する血液癌に罹患する対象を治療するために使用される。血液癌は、血液〔骨髄性白血病（急性及び慢性）、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、骨髄増殖性疾患、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群〕、ホジキン病、及び非ホジキンリンパ腫（悪性リンパ腫）の癌を含むが、これらに限定されない。

【0180】

ある特定の実施形態では、化合物は、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドを発現する副腎の癌に罹患する対象を治療するために使用される。副腎の癌は、神経芽細胞腫を含むが、これに限定されない。

20

【0181】

本開示は、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドが発現される癌の治療または予防のための方法を提供する。ある特定の実施形態では、この方法は、薬学的組成物を患者に投与するステップを含む。そのような薬学的組成物は、例えば、式（I）の化合物を含む。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物1である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物4である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物2である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物6である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物3である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物5である。

【0182】

本実施形態の薬学的組成物は、単独で、または1つ以上の追加の治療化合物または治療法と併用して投与される。そのような治療化合物または治療法の例としては、タキソール、シクロホスファミド、タモキシフェン、フルオロウラシル、及びドキシソルピシンを含むが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、薬学的組成物または医薬は、本実施形態の化合物、及びエルロチニブ（Tarceva（登録商標））、ペメトレキセド（Alimta（登録商標））、LY294002、SB431542、及びシスプラチンから選択される別の治療薬を含む。加えて、他の化学療法薬が本明細書に記載される。

30

【0183】

癌を治療するための方法は、任意に、以下のステップのうちの1つ以上を含み得る：個人から組織もしくは流体の生体試料を得る、例えば、生体試料を、GLI1、GLI2、またはGLI3に指向される抗体と接触させることにより、GLI1、GLI2、またはGLI3ポリペプチドなどのGLIポリペプチドの発現に関して生体試料をスクリーニングする、または例えば、Gli1、Gli2、もしくはGli3 mRNAを検出することにより、Gli1、Gli2、もしくはGli3ポリヌクレオチドの発現に関して生体試料をスクリーニングする。

40

【0184】

多くの癌は、初めに、本明細書に記載される化学療法薬を使用して治療される。しかしながら、非常に多くの場合、癌は、そのような化学療法薬に対して耐性を発達させ、その結果、もはや有効ではない。よって、一実施形態では、癌は、多剤耐性癌、またはさもなければ治療に抵抗性である癌である。したがって、ある特定の実施形態では、本実施形態

50

の化合物は、腫瘍細胞における化学療法薬に対する耐性を克服するために使用される。この方法は、少なくとも1つの化学療法薬に対して耐性である腫瘍細胞に、本実施形態の化合物を投与するステップを含み、投与は、後に腫瘍細胞死をもたらす。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物1である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物4である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物2である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物6である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物3である。ある特定の実施形態では、本化合物は、化合物5である。

【0185】

ある特定の実施形態では、癌の治療に使用するための本実施形態の化合物が提供される。ある特定の実施形態では、本開示は、GLIポリペプチドが発現される状態、例えば、癌の治療上及び/もしくは予防処置のための薬学的組成物または医薬の製造における、本実施形態の化合物の使用を提供する。

10

【0186】

ある特定の実施形態では、本開示は、GLIポリペプチドを発現する癌の治療のために、別の化学療法抗癌剤と併用して使用するための薬学的組成物または医薬の製造における化合物の使用を提供する。本開示により提供される薬学的組成物または医薬は、本明細書に記載される。

【0187】

キット

上に提案される診断、研究、及び治療用途における使用に関して、キットも本開示によって提供される。診断及び研究用途では、そのようなキットは、以下のうちのいずれか、または全てを含み得る：アッセイ試薬、緩衝剤、本実施形態の化合物、GLIポリペプチド、GLI核酸、抗GLI抗体、ハイブリダイゼーションプローブ、及び/またはプライマー、GLI発現構築物等。治療用生成物は、滅菌生理食塩水、または別の薬学的に許容されるエマルジョン及び懸濁基剤を含み得る。

20

【0188】

加えて、キットは、本実施形態の方法の実施に関する指示（すなわち、プロトコル）を含む説明材料を含み得る。説明書は、様々な形態で対象キットに与えられてよく、それらのうちの1つ以上がキットに与えられてよい。説明材料は、典型的には、筆記物または印刷物を含むが、そのようなものに限定されない。そのような説明書を保存し、それらをエンドユーザに通信することができる任意の媒体が想定される。そのような媒体は、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ、フラッシュメモリ）、光学媒体（例えば、CD-ROM、DVD、ブルーレイ）などを含むが、これらに限定されない。そのような媒体は、そのような説明材料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含み得る。

30

【0189】

キットの意図されるユーザ及びユーザの特定の必要性に応じて、多種多様のキット及び構成成分が本実施形態により調製され得る。

【0190】

ある特定の実施形態では、本キットは、薬学的キットであり、(i)本実施形態の小分子化合物、及び(ii)薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を含む。薬学的キットは、任意に、薬学的組成物がGLIポリペプチドまたはGLI核酸を発現する癌を治療するために使用され得るか、または使用するべきであると記述される説明書を含む。

40

【0191】

追加のキットの実施形態は、当業者が本明細書に記載される方法の変形のうちのいずれかを実施することを可能にするであろう任意の機能成分を含む。

【0192】

対象の組成物、薬学的調製物、及び方法の実施形態の追加の態様は、2012年7月20日に出願されたPCT/US12/47689に見出され、これは、2011年7月21日に出願された米国仮特許出願第61/510,176号に対して優先権を主張し、そ

50

これらの各々の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0193】

以下の実施例は、当業者に本発明の実施形態をどのように作製及び使用するかの完全なる開示及び説明を提供するように提示され、本発明者が自身の発明とみなすものの範囲を限定するようには意図されておらず、以下の実験が全てまたは唯一の実施される実験であると表すようにも意図されていない。使用される数値（例えば、量、温度等）に対する正確さを確保する努力がなされているが、いくつかの実験による誤差及び偏差が考慮されるべきである。別途示されない限り、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は、摂氏温度であり、圧力は、大気圧であるか、またはそれに近い。

【実施例】

【0194】

実施例1：一般的な方法

A．細胞系

大半のヒト細胞系は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection）（A.T.C.C.；Manassas, Virginia）から得た。これらの細胞系は、非小細胞肺癌（NSCLC）細胞A549、H1703、H460、H358、H322、H838、H1299、H1650、H1975、H522、H441、H1666、H2170、H820、HCC2935、HCC4006、及びA427、中皮腫細胞211H、H513、H2052、H28、及びH2452、結腸癌細胞SW480、HCT116、HT29、Lovo、DLD-1、COLO-205、COLO-201、及びCaCO2、乳癌細胞MCF7、HuL100、HCC1569、SKBR-3、及びBT474、膵臓癌細胞Panc-1、Panc02.13、HPAF-II、SW1990、Ypac、8902-1、及び8988-1、黒色腫細胞LOX、A375、A2058、Calu、Calv6、HA-A、AS2504、Mel202、MaMel144、SK-Mel-2、SK-Mel-5、SK-Mel-28、SK-Mel-3、SK-Mel-24、SK-Mel-30、及びMelJuso、多発性骨髄腫細胞PRMI-8226、H929、MM1.R、及びU266、前立腺癌細胞系LnCAP及びDU145、正常な肺線維芽細胞MRC5を含む。他のヒト中皮腫癌細胞系H290及びMS-1は、国立保健研究所（National Institute of Health）（NIH, Frederick, Maryland）から得、RENは、親切にもペンシルバニア大学（University of Pennsylvania）（Philadelphia, Pennsylvania）のDr. Steven Albelda研究室により提供された。ヒト膵臓癌細胞系BxPC3、Panc4.21、及びCFPAC-1は、親切にもサンフランシスコのカリフォルニア大学（University of California, San Francisco）（San Francisco, California）のDr. Matthias Hebrok研究室により提供された。ヒト胃癌細胞系MNK28及びAGSは、親切にもサンフランシスコのカリフォルニア大学（University of California, San Francisco）（San Francisco, California）のDr. Xin Chenにより提供され、食道癌細胞系OE19、TE-7、OE31、及びOE21は、親切にもサンフランシスコのカリフォルニア大学（University of California, San Francisco）（San Francisco, California）のDr. Michael Kornにより提供された。

【0195】

B．組織試料

腫瘍の治療的一次切除を受ける患者からの新鮮な癌組織及び周囲正常組織を外科手術時に回収し（IRB承認H8714-15319-040）、直ちに液体窒素中で急速凍結した。これらの組織試料は、後に使用するまで、-170の液体窒素冷凍庫で保持された。一次組織培養物を以下のように調製した：切除を受ける患者から同意を得て、新鮮な

10

20

30

40

50

癌組織を得、細かく切り（直径 1 ~ 2 mm）、その後、製造者のプロトコルに従い、室温で 2 時間、コラゲナーゼ A（Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana）で消化した。消化からの単一細胞を沈降させ、10 % のウシ胎仔血清、ペニシリン（100 IU/ml）、及びストレプトマイシン（100 µg/ml）を補足した RPMI 1640 を使用して、細胞ペレットを 2 回洗浄した。次いで、細胞を同じ培地中に再懸濁し、さらなる処理ができる状態になるまで、5 % の CO<sub>2</sub> の湿ったインキュベータ中、37 °C で、6 ウェルプレートで培養した。

#### 【0196】

##### C. 細胞生存数アッセイ（細胞に基づく細胞毒性アッセイ）

典型的には、本実施形態の化合物を、30 mM の濃度の DMSO に溶解した。次いで、0、10、30、50 から 100 µM の範囲の異なる濃度の細胞培養条件下で、化合物を試験した。処理後の細胞生存数を決定するために、6 ウェルプレート中で細胞を化合物と共に約 3 日間インキュベートした。細胞培養培地を除去した後、1 ml の 0.5 % のクリスタルバイオレット溶液（20 % のエタノール及び 20 % のメタノール中で調製された）を添加し、細胞を 5 分間染色した。次いで、水道水でクリスタルバイオレット溶液をきれいにすすいだ。細胞生存数は、クリスタル染色されたプレートの密度に基づき推定された。

#### 【0197】

増殖または細胞毒性アッセイにおいて生細胞の数を決定するための別のアッセイは、比色法の MTS アッセイである。MTS アッセイ試薬は、市販されている（Promega Corp., Madison, Wisconsin）。試薬は、テトラゾリウム化合物 [3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 5 - (3 - カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 - スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム, 分子内塩; MTS] 及び電子カップリング試薬（フェナジンエトスルフェート; PES）を含む。PES は、強化された化学安定性を有し、これは、それが MTS と混合され、安定した溶液を形成することを可能にする。MTS テトラゾリウム化合物（Owen 試薬）は、細胞によって、組織培養培地において可溶性である着色ホルマザン生成物へと生物還元（bioreduced）される。この変換は、代謝的に活性な細胞におけるデヒドロゲナーゼ酵素により生成される NADPH または NADH によって達成され得る。490 nm の吸光度によって測定されるホルマザン生成物の量は、培養物中の生存細胞の数に正比例する。MTS ホルマザン生成物は、組織培養培地において可溶性であるため、このアッセイは、MTT などのテトラゾリウム化合物を使用する手順よりも少ないステップを必要とする。MTT 還元のホルマザン生成物は、570 nm で読み取る吸光度を記録する前に結晶を溶解するために、手順においてさらなるステップを必要とする結晶沈殿物である。

#### 【0198】

##### D. 定量的 RT - PCR

全 RNA は、Qiagen RNeasy Mini Kit（Valencia, California）を使用して単離された。ハイブリダイゼーションプローブ及びプライマー（表 1）は、Applied Biosystems（ABI, Foster City, California）から購入した。cDNA 合成及び Taqman（登録商標）PCR は、製造者のプロトコルに従い実施された。遺伝子発現は、ABI 7300 リアルタイム PCR システムにおいて、3 つ組でアッセイされた。試料を、それらのハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対して規準化し、その後、2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法を使用して計算した。

#### 【0199】

（表 1）定量的 RT - PCR のハイブリダイゼーションプローブ及びプライマー

遺伝子	ハイブリダイゼーションプローブ 及びプライマー  (Applied Biosystemsの製品番号、 列記される遺伝子のTaqman (登録商標) PCRアッセイ 混合物に関して)
Gli1	Hs01110776_g1
Gli2	Hs01119974_m1
Gli3	Hs00609233_m1
Axin2	Hs00610344_m1
EGFR	Hs01076078_m1
Wnt-2	Hs00608224_m1
HHIP	Hs01011015_m1
Cyclin D1	Hs99999004_m1

10

## 【0200】

## E．インビボ抗腫瘍形成能試験

20

ヒト癌細胞を保有するマウス異種移植片モデルにおいて、投与化合物がインビボで試験された。簡潔には、雌の胸腺欠損ヌードマウス株NCRNU-M(5~10週齢、体重20~25グラム; Taconic, Germantown, New York)を、無菌状態で維持した。3つのヒト癌細胞系NSCLC A549、黒色腫Me1Juso、及び中皮腫MS-1が使用された。5~10匹のマウスが各群において使用され、 $3 \times 10^6$ 癌細胞を100  $\mu$ lの量で、背部領域に皮下注入された。接種後、眼に見える腫瘍結節になるように、ヒト癌細胞を、10~13日間、マウスにおいて成長させた。次いで、50 mg/kg体重(1日当り1 mg/マウス)の用量で、本実施形態の化合物を動物に注入した。ビヒクルのみは、対照として使用された。化合物及び対照は、マウスの腹部への腹腔内注入のために、40  $\mu$ lの量に調節された。注入は、14日間、ほぼ同じ時間に毎日実施された。化合物処置完了後、腫瘍をさらに1~2週間成長させた。腫瘍の大きさは、3~4日ごとに測定され、腫瘍量は、幅(x)及び長さ(y)( $x^2 y / 2$ 、ここで $x < y$ )を使用して計算された。この期間全体を通して、処置の一般的な毒性も、マウスの体重を測定することにより監視された。データは、平均値(±標準偏差)として表された。

30

## 【0201】

## F．マウスにおける化合物の薬物動態(PK)試験

マウス(群当り3匹)に、10 mg/kg体重の用量の化合物の各々を用いて、静脈内注入または経口投与のいずれかを行った。次いで、注入または経口投与(PO)20分、1時間、3時間、10時間、及び24時間後に各マウスの尾静脈から血漿を回収した。各血漿試料の化合物濃度は、マウスの血流内への化合物の吸収を確認するために、質量分析により決定された。

40

## 【0202】

## G．毒性評価のための組織学的検査

インビボ試験が完了した後、様々な臓器をマウスから切除した。これらの臓器は、肝臓、肺、心臓、腎臓、腸、卵巣、脳、脾臓、皮膚、及び筋肉を含んだ。検体を4%の緩衝ホルムアルデヒドに固定し、パラフィンに包埋し、薄片にし、ヘマトキシリン及びエオシン(HE)染色により組織学的分析を行った。ビヒクル対照と比較して、全ての臓器由来の毒性のエビデンスに関して、HE染色したスライドがマウス病理学者によって検査された。加えて、全処置群の各動物由来の白血球(WBC:白血球細胞、NE:好中球、LY:

50

リンパ球、M O : 単球、E O : 好酸球、B A : 好塩基球) を回収し、血液細胞計数器により白血球集団を計数した。

#### 【0203】

#### H . 統計分析

データは、平均値 ( ± 標準偏差 ) を表す。エクセルにおける独立 T 検定を、異なる処置及び細胞系を比較するために使用した。

#### 【0204】

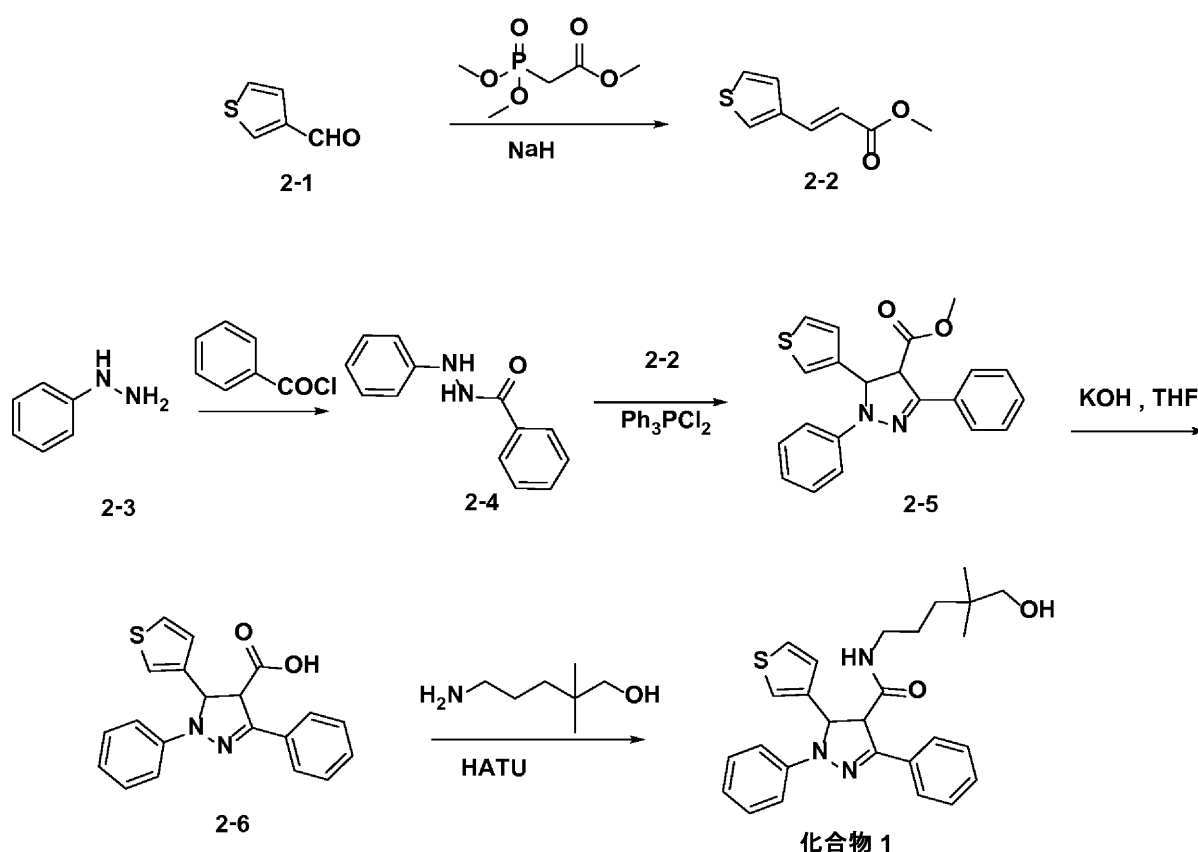
#### I . 小分子化合物の調製

別途記載されない限り、試薬及び溶媒は、市販の供給元から受け取ったまま使用された。プロトンに関して、400 MHz の Bruker AVANCE 分光計でプロトン及び炭素核磁気共鳴スペクトルを得た。スペクトルは、ppm ( ) で示され、カップリング定数 J は、ヘルツで報告される。溶媒ピークは、プロトンスペクトルの参照ピークとして使用された。LC - MS スペクトルは、Agilent 1100 HPLC LC - MS イオン捕捉エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析で得た。

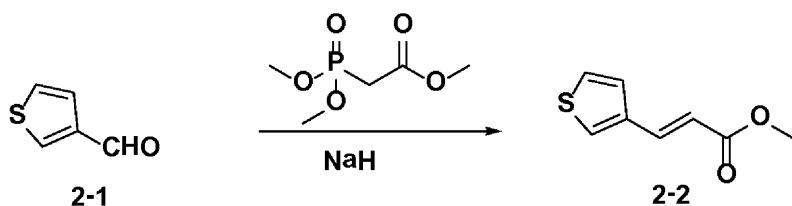
#### 【0205】

#### 実施例 2 : 化合物 1 の合成

#### 合成スキーム 2



#### A . 化合物 2 - 2 の調製



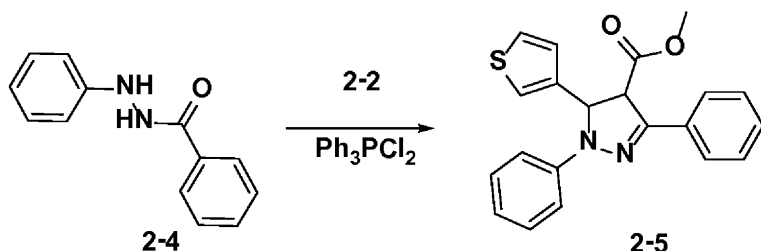
500 mL の脱水 THF 中 60 % の NaH (37 g、0.93 mol) の混合物に、メチル 2 - (ジメトキシホスホリル) アセレート (102 g、0.56 mol) を添加した。次いで、100 mL の脱水 THF 中の化合物 2 - 1 (41 g、0.37 mol) の溶液を、この混合物に添加した。反応混合物を室温で 12 時間撹拌した。反応混合物に飽和 N

10

20

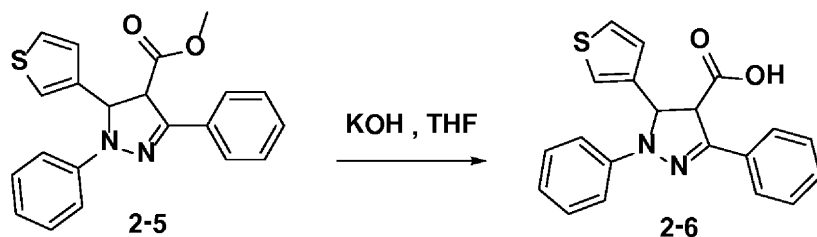
30

### C. 化合物 2 - 5 の調製



40

D. 化合物 2 - 6 の調製



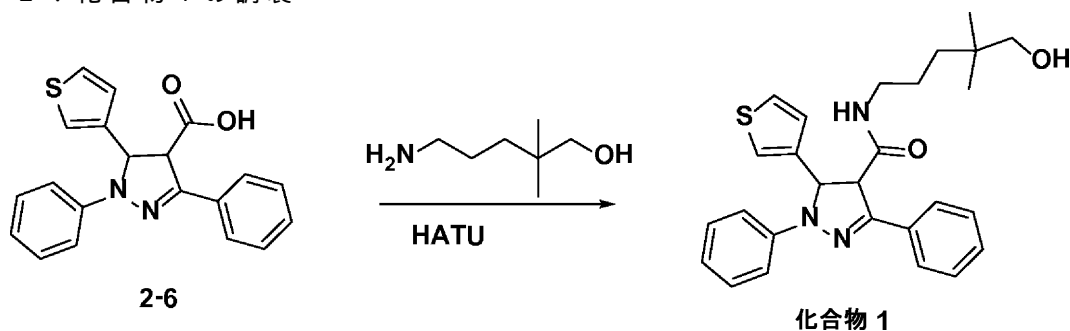
50



( 9 . 0 g、収率 9 2 % ) を得た。  $m/z$  : 3 4 9 [ M + H ] <sup>+</sup>。

【 0 2 0 9 】

E . 化合物 1 の調製



10

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の化合物 2 - 6 ( 9 . 0 g、2 6 m m o l )、5 - アミノ - 2 , 2 - ジメチルペンタン - 1 - オール ( 5 . 1 g、3 9 m m o l )、Et<sub>3</sub>N ( 5 . 2 g、5 2 m m o l )、及び O - ( 7 - アザ - 1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - N , N , N , N - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート ( H A T U、1 4 . 8 g、3 9 m m o l ) の混合物を、室温で 1 2 時間攪拌した。反応混合物を水 ( 3 × 2 0 m L )、ブライン ( 2 × 2 0 m L ) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で乾燥させた。残留物をカラムクロマトグラフィー ( 石油エーテル中の酢酸エチル 2 5 % v / v ) で精製し、白色の固体として化合物 1 ( 6 . 0 g、収率 : 5 0 % ) を得た。

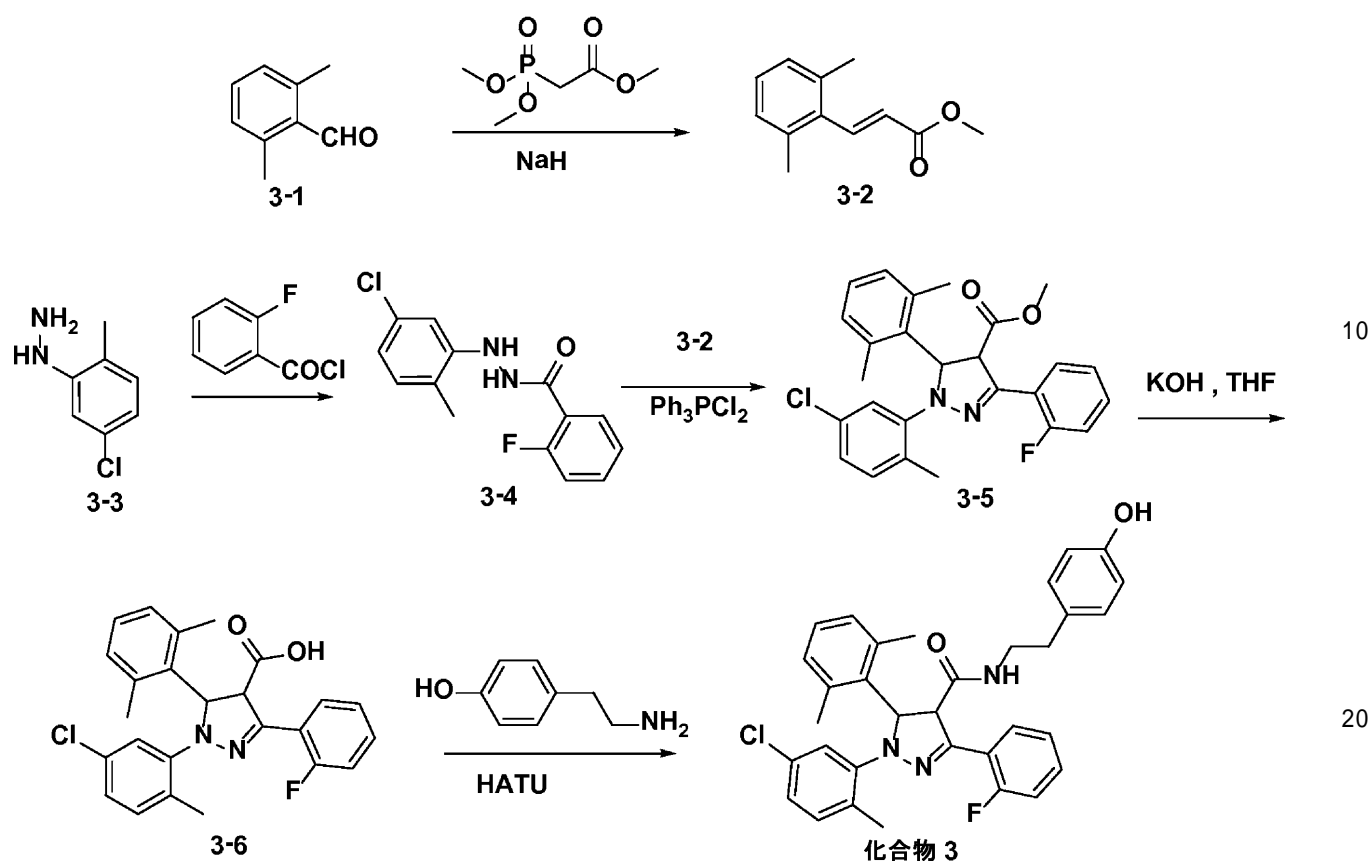
20

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>) δ 7.71 (m, 2H), 7.35~7.30(m, 5H), 7.23 (q, *J*=3.2, 1H), 7.14 (d, *J*=8.0, 2H), 7.09 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.8 *J*<sub>2</sub>=0.8, 1H), 6.94 (m, 2H), 6.38 (t, *J*=5.6, 1H), 4.96 (d, *J*=4.8, 1H), 4.49 (d, *J*=4.4, 1H), 3.33 (m, 1H), 3.10 (s, 2H), 3.15 (m, 1H), 1.42~1.35 (m, 2H), 1.11~1.06 (m, 2H), 0.74 (d, *J*=2.4, 6H).  $m/z$ : 462 [M+H]<sup>+</sup>

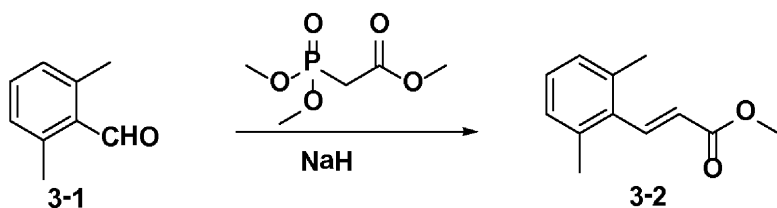
【 0 2 1 0 】

実施例 3 : 化合物 3 の合成

## 合成スキーム 3



A. 化合物 3 - 2 の調製



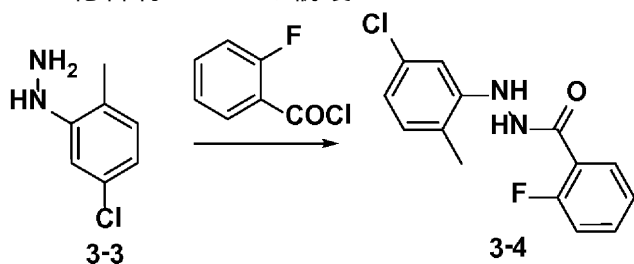
30

500 mL の脱水 THF 中 60 % の NaH (37 g、0.93 mol) の溶液に、メチル 2 - (ジメトキシホスホリル) アセテート (102 g、0.56 mol) を添加した。次いで、100 mL の脱水 THF 中の化合物 3 - 1 (50 g、0.37 mol) の溶液を、この溶液に添加した。反応混合物を室温で 12 時間撹拌した。反応混合物に飽和 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液を添加した。得られた混合物を濃縮し、酢酸エチル (3 × 50 mL) で抽出した。有機相を水 (3 × 25 mL)、ブライン (3 × 25 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させ、粗生成物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィー (石油エーテル中の酢酸エチル 10 % v/v) で精製し、黄色の液体として化合物 3 - 2 (30 g、収率：43 %) を得た。m/z : 191 [M + H]<sup>+</sup>

40

【0211】

B. 化合物 3 - 4 の調製



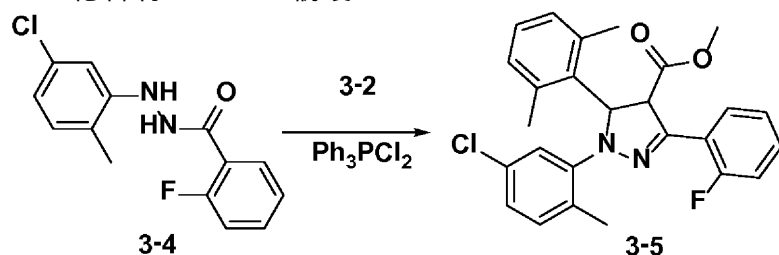
400 mL の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の化合物 3 - 3 (100 g、0.64 mol) 及びピリジン (101 g、1.28 mol) の混合物に、室温の 100 mL の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の 4 -

50

フルオロベンゾイルクロリド (101 g、0.64 mol) の溶液を添加した。反応混合物を12時間撹拌した。反応混合物を水 (4 × 50 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留物を酢酸エチルで再結晶化し、白色の固体として化合物 3-4 (70 g、収率 39%) を得た。m/z : 279 [M + H]<sup>+</sup>

【0212】

C. 化合物 3-5 の調製



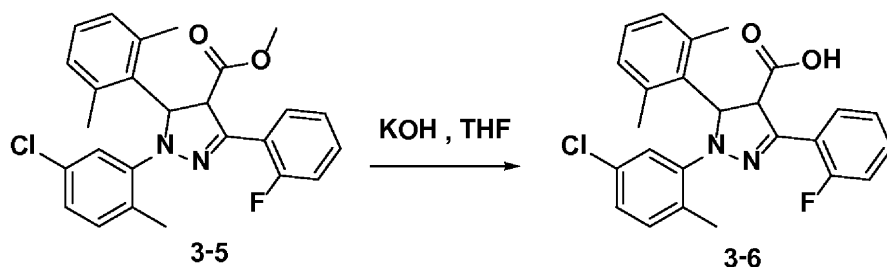
10

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 mL) 中の化合物 3-4 (20 g、72 mmol) 及び化合物 3-2 (15 g、79 mmol) ならびに Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (48 g、144 mmol) の溶液に、室温の Et<sub>3</sub>N (36 g、360 mmol) を添加した。この反応混合物を室温で12時間撹拌した。反応混合物を水 (3 × 30 mL)、ブライン (3 × 30 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留物をカラムクロマトグラフィー (石油エーテル中の酢酸エチル 1% v/v) で精製し、黄色の固体として化合物 3-5 (10 g、収率: 31%) を得た。m/z : 451 [M + H]<sup>+</sup>

20

【0213】

D. 化合物 3-6 の調製

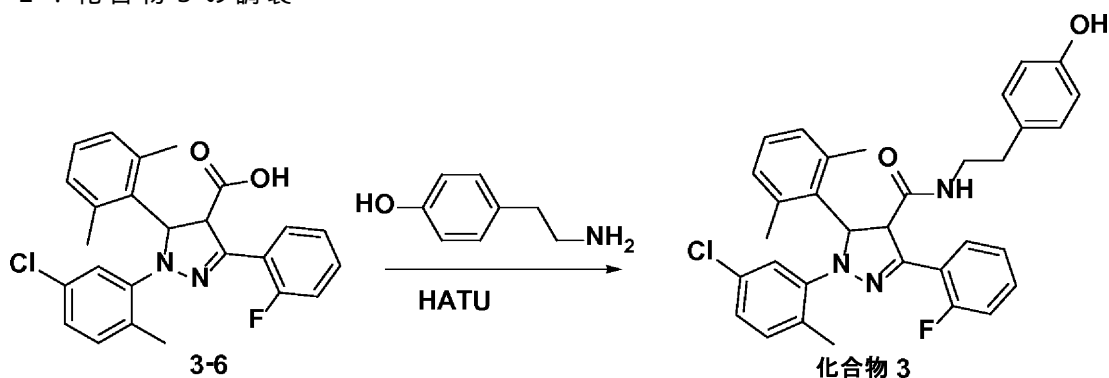


30

THF (150 mL) 中の化合物 3-5 (10.0 g、22 mmol) の溶液に、水 (60 mL) 中の KOH (3.7 g、67 mmol) を添加した。反応混合物を室温で12時間撹拌した。反応混合物を、1N HCl で6のpH値に調節し、濃縮し、酢酸エチル (4 × 30 mL) で抽出した。有機相を水 (2 × 20 mL)、ブライン (2 × 20 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させ、黄色の固体として粗化合物 3-6 (8.0 g、収率 83%) を得た。m/z : 437 [M + H]<sup>+</sup>

【0214】

E. 化合物 3 の調製



40

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の化合物 3-6 (8.0 g、18 mmol)、4-(2-アミノエチル)フェノール (3.7 g、27 mmol)、Et<sub>3</sub>N (3.6 g、36 mmol)、O-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N-テトラメチ

50

ルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (10.3 g、27 mmol) の混合物を、室温で12時間撹拌した。反応混合物を水 (3 × 20 mL)、ブライン (2 × 20 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留物をカラムクロマトグラフィー (石油エーテル中の酢酸エチル 25% v/v) で精製し、白色の固体として化合物 3 (5.0 g、収率: 50%) を得た。

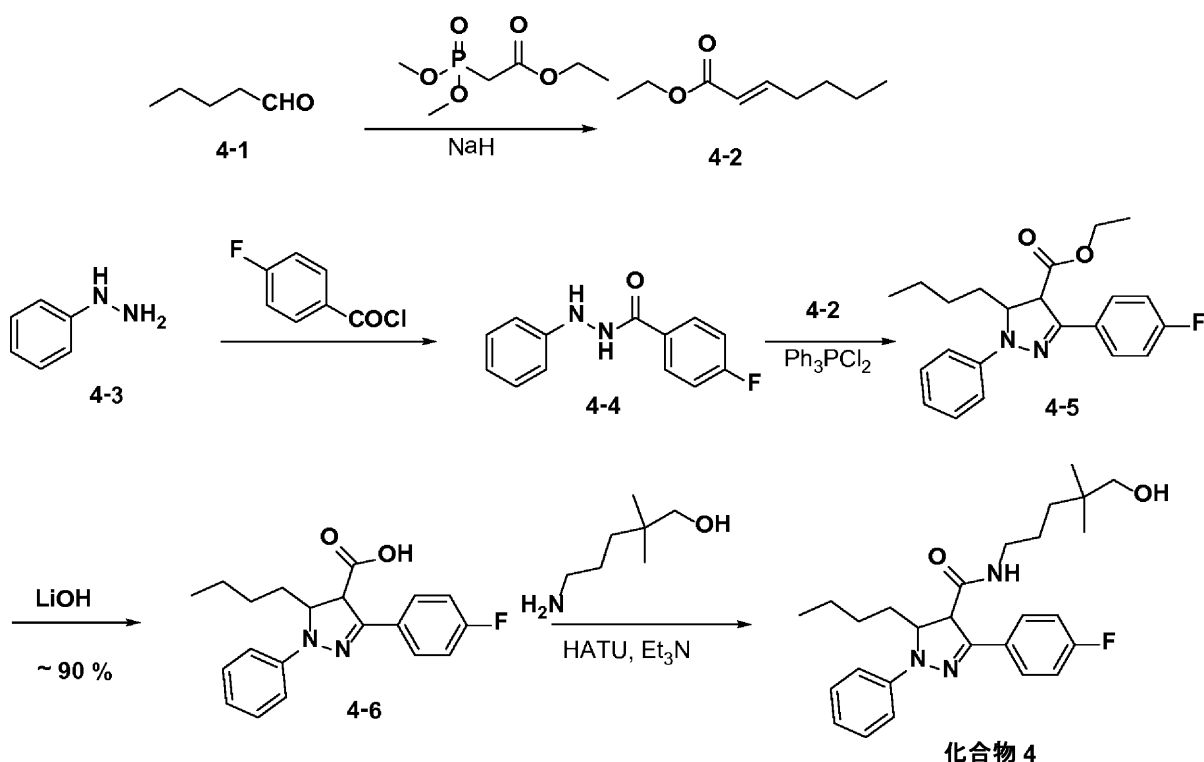
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>) δ 7.56 (td, *J*<sub>1</sub>=7.6, *J*<sub>2</sub>=2.0, 1H), 7.26~7.20(m, 1H), 7.14 (d, *J*=7.6, 1H), 7.07~6.90 (m, 6H), 6.83(d, *J*=6.8, 1H), 6.79(d, *J*=8.8, 2H), 6.12(t, *J*=5.6, 1H), 5.34(dd, *J*<sub>1</sub>=10.4, *J*<sub>2</sub>=1.6, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.77 (d, *J*=10.4, 1H), 3.55(m, 1H), 3.43 (m, 1H), 2.70~2.54 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.10 (s, 3H). *m/z*: 556 [M+H]<sup>+</sup>

10

# 【 0 2 1 5 】

実施例 4 : 化合物 4 の合成

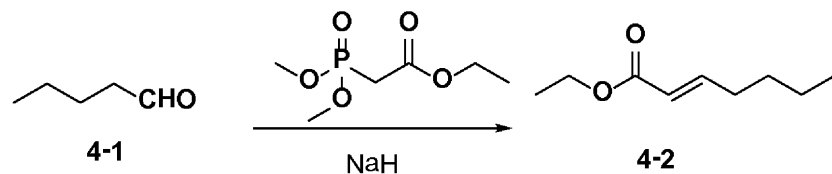
## 合成スキーム 4



20

30

## A . 化合物 4 - 2 の調製



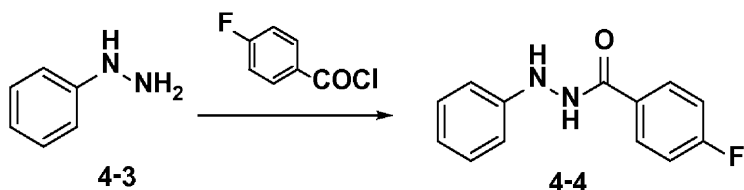
40

500 mL の脱水 THF 中 60% の NaH (34.8 g、870 mmol) の溶液に、エチル 2 - (ジメトキシホスホリル) アセテート (102 g、522 mmol) を添加した。次いで、100 mL の脱水 THF 中の化合物 4 - 1 (30 g、348 mmol) の溶液を、この混合物に添加した。反応混合物を室温で12時間撹拌した。反応混合物に NH<sub>4</sub>Cl 飽和水溶液を添加した。得られた混合物を濃縮し、酢酸エチル (3 × 50 mL) で抽出した。有機相を水 (3 × 25 mL)、ブライン (3 × 25 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させ、粗生成物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィー (石油エーテル中の酢酸エチル 10% v/v) で精製し、黄色の液体として化合物 4 - 2 (20 g、収率 37%) を得た。 *m/z* : 157 [M+H]<sup>+</sup>

# 【 0 2 1 6 】

50

## B. 化合物 4 - 4 の調製

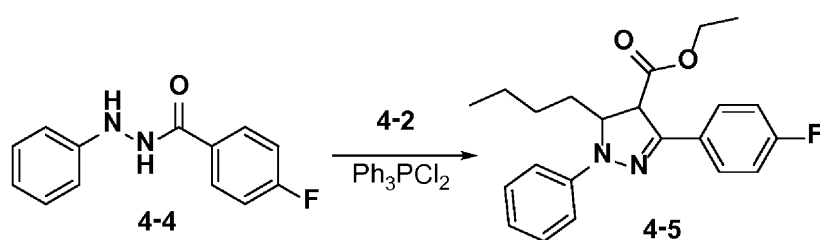


室温の 100 mL の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の化合物 4 - 3 (100 g、0.9 mol) 及び 400 mL の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中のピリジン (146 g、1.9 mol) の混合物に、4 - フルオロベンゾイルクロリド (147 g、0.9 mol) の溶液を添加した。反応混合物を 12 時間撹拌した。反応混合物を水 (4 × 50 mL) で洗浄し、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留物を酢酸エチルで再結晶化し、白色の固体として化合物 4 - 4 (200 g、収率 94%) を得た。m/z : 231 [M + H]<sup>+</sup>

10

【0217】

## C. 化合物 4 - 5 の調製



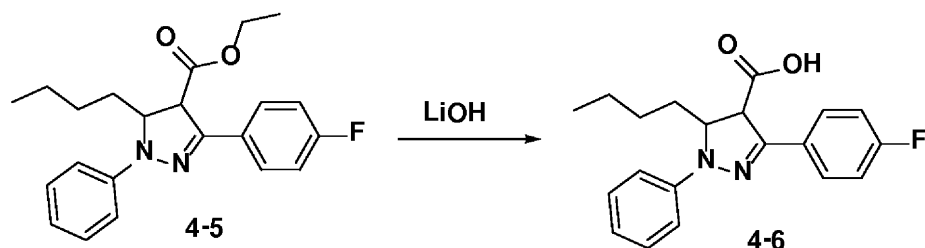
20

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (250 mL) 中の化合物 4 - 4 (20 g、87 mmol) 及び化合物 4 - 2 (15 g、96 mmol) ならびに  $\text{Et}_3\text{N}$  (44 g、435 mmol) の溶液に、室温の  $\text{Ph}_3\text{PCl}_2$  (58 g、174 mmol) を添加した。反応混合物を室温で 12 時間撹拌した。反応混合物を水 (3 × 30 mL)、ブライン (3 × 30 mL) で洗浄し、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留物をカラムクロマトグラフィー (石油エーテル中の酢酸エチル 1% v/v) で精製し、黄色の固体として化合物 4 - 5 (9 g、収率 28%) を得た。m/z : 369 [M + H]<sup>+</sup>

【0218】

## D. 化合物 4 - 6 の調製

30

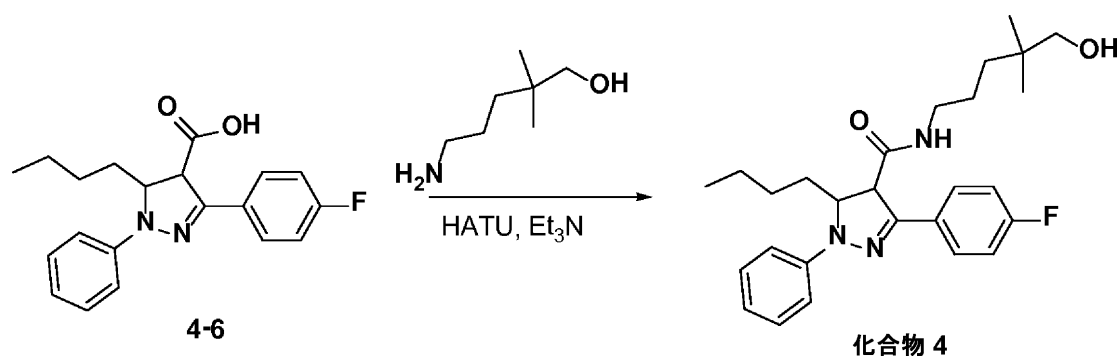


THF (150 mL) 中の化合物 4 - 5 (9.0 g、24 mmol) の溶液に、水 (60 mL) 中の  $\text{LiOH}$  (4.1 g、72 mmol) を添加した。反応混合物を室温で 12 時間撹拌した。反応混合物を、1 N  $\text{HCl}$  で pH 値を 6 に調節し、濃縮し、酢酸エチル (4 × 30 mL) で抽出した。有機相を水 (2 × 20 mL)、ブライン (2 × 20 mL) で洗浄し、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、真空中で濃縮させ、黄色の固体として粗化合物 4 - 6 (8.0 g、収率 98%) を得た。m/z : 341 [M + H]<sup>+</sup>

40

【0219】

## E. 化合物 4 の調製



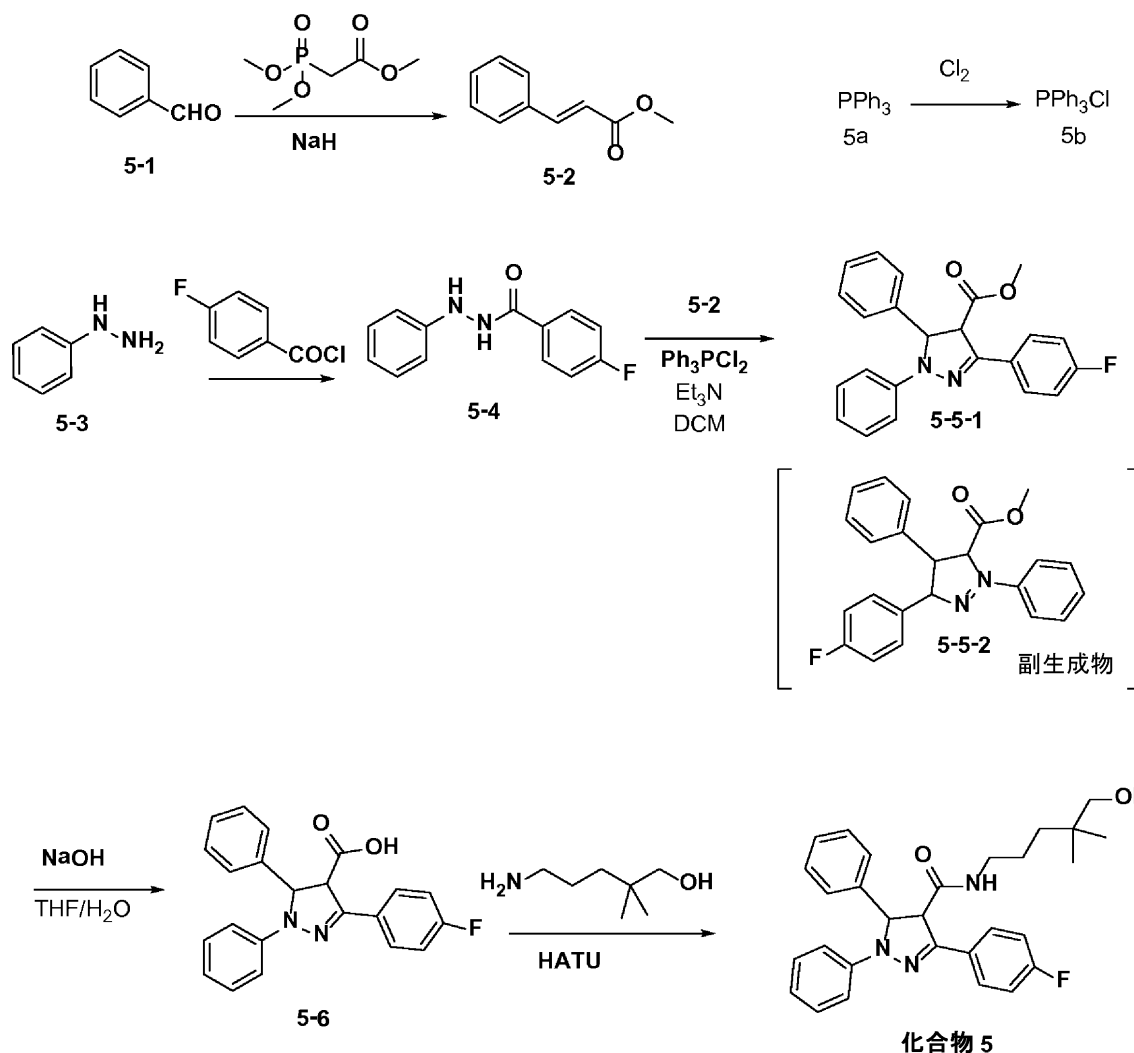
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の化合物 4 - 6 ( 8 . 0 g、24 mmol )、5 - アミノ - 2 , 2 - ジ  
 メチルペンタン - 1 - オール ( 5 . 3 g、41 mmol )、Et<sub>3</sub>N ( 5 . 4 g、54 m  
 mol )、O - ( 7 - アザ - 1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - N , N , N , N  
 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート ( 15 . 4 g、40 . 5 mmol ) の混合物を、室温で 12 時間撹拌した。反応混合物を水 ( 3 × 20 mL )、ブライン  
 ( 2 × 20 mL ) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留物をカラムクロマトグラフィー ( 石油エーテル中の酢酸エチル 25 % v / v ) で精製し、白  
 色の固体として化合物 4 ( 6 . 0 g、収率 : 55 % ) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub> / D<sub>2</sub>O-d<sub>2</sub>) δ 7.73 (td, *J*<sub>1</sub>=5.6, *J*<sub>2</sub>=2.4, 2H), 7.32(t, *J*=7.6,  
 2H), 7.11 (t, *J*=7.8, 4H), 6.93 (t, *J*=7.2, 1H), 6.35(m, 1H), 4.34 (d, *J*=4.4, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.30  
 (m, 1H), 3.17 (s, 2H), 3.08 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.39~1.25 (m, 6H), 1.06 (m,  
 2H), 0.84 (t, *J*=6.8, 3H), 1.05 (s, 6H). m/z: 454 [M+H]<sup>+</sup>

【 0 2 2 0 】

実施例 5 : 化合物 5 の合成

## 合成スキーム 5



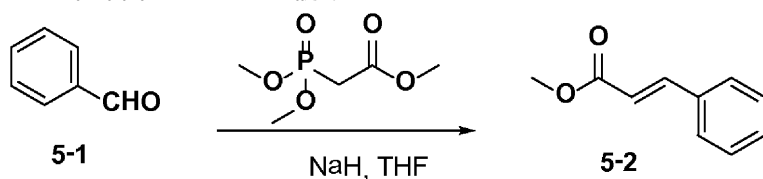
10

20

30

40

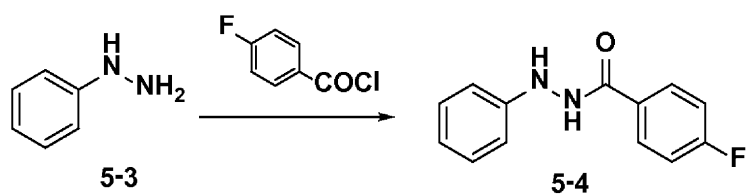
## A. 化合物 5 - 2 の調製



THF (500 ml) 中の NaH (60%) (19.83 g、0.496 mol、1.5 等量) の懸濁液に、氷浴下、メチル 2 - (ジメトキシホスホリル) アセテート (66 g、0.363 mol、1.1 等量) を滴下して添加した。添加が完了した後、混合物を 30 分間攪拌した。次いで、THF (100 ml) 中の化合物 5 - 1 (40 g、0.33 mol、1.0 等量) を添加した。反応混合物を周囲温度に温め、一晚攪拌した。水 (100 ml) を 0 ~ 10 で滴下して添加した。反応混合物を層に分離し、水層を酢酸エチル (2 × 100 mL) で抽出した。混合有機層をブライン (2 × 100 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。混合有機相を真空中で濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物を酢酸エチルで再結晶化し、白色の固体として化合物 5 - 2 (45 g、収率 73%) を得た。MS (ESI) m/z 163.1 (M + H)<sup>+</sup>。

【0221】

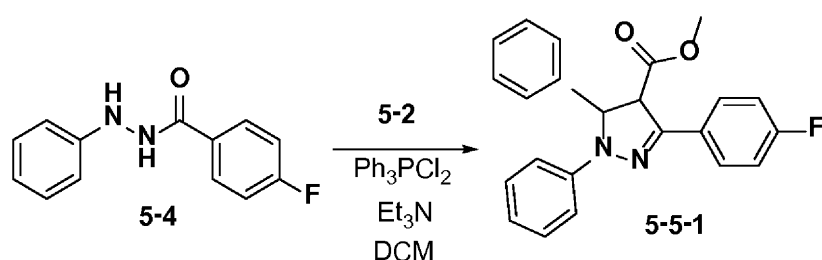
## B. 化合物 5 - 4 の調製



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) 中の化合物 5 - 3 (100 g、0.926 mol、1.0 等量) 及び CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 ml) 中のピリジン (110 g、1.39 mol、1.5 等量) を、4 - フルオロベンゾイルクロリド (146.3 g、0.926 mol、1.0 等量) に添加した。反応混合物を 12 時間撹拌した。反応混合物を水 (4 × 100 mL) で洗浄し、真空中で濃縮させた。残留物を酢酸エチルで再結晶化し、白色の固体として化合物 5 - 4 (150 g、収率 70 %) を得た。MS (ESI) m/z 231 (M + H)<sup>+</sup>。

【0222】

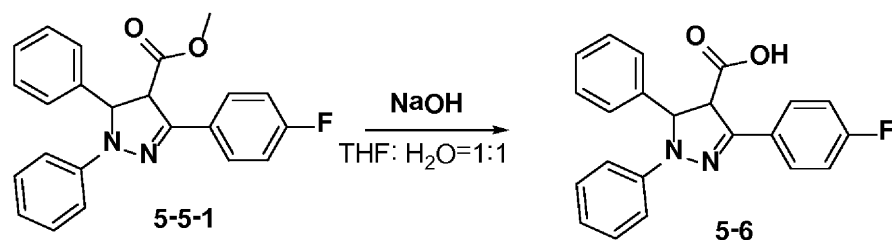
C. 化合物 5 - 5 - 1 の調製



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の化合物 5 - 4 (20.82 g、0.091 mol、1.0 等量) 及び化合物 5 - 2 (16.2 g、0.10 mol、1.1 等量) ならびに Et<sub>3</sub>N (46.0 g、0.455 mol、5.0 等量) の溶液に、室温の Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (60.4 g、0.182 mol、2.0 等量) を添加した。反応混合物を室温で 12 時間撹拌した。反応混合物を水 (3 × 50 mL)、ブライン (2 × 50 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留物をカラムクロマトグラフィー (MeOH : DCM = 1 : 100) で精製し、白色の固体として化合物 5 - 5 - 1 (9 g、収率 26 %) を得た。MS (ESI) m/z 375 (M + H)<sup>+</sup>。

【0223】

D. 化合物 5 - 6 の調製



化合物 5 - 5 - 1 (9 g、0.024 mmol、1.0 等量) ならびに THF (50 mL) 及び H<sub>2</sub>O (50 mL) 中の NaOH (1.93 g、0.048 mmol、2.0 等量) の混合物を、室温で 4 時間撹拌した。反応混合物を真空中で濃縮し、pH を 1 ~ 2 に調節した。反応混合物を濾過して、白色の固体を分離した。固体を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> に溶解した。溶液をブライン (2 × 100 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶液を真空中で濃縮し、白色の固体として化合物 5 - 6 (7.65 g、収率 88 %) を得た。MS (ESI) m/z 361 (M + H)<sup>+</sup>。

【0224】

E. 化合物 5 の調製

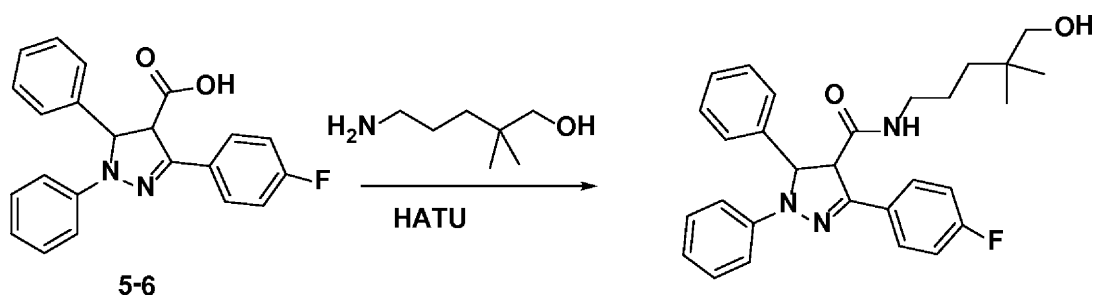
10

20

30

40



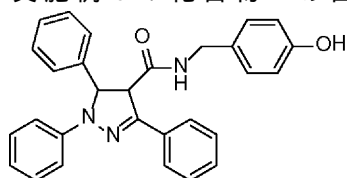


CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の化合物5-6(9g、0.025mol、1.0等量)、o-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)(14.25g、0.038mol、1.5等量)、Et<sub>3</sub>N(5.06g、0.050mol、2.0等量)の溶液に、2時間室温で撹拌した。反応混合物に、水(100ml)を添加し、有機相を分離した。有機層をブライン(2×50ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶液を真空中で濃縮し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、白色の固体として化合物5(5.6g、収率47%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.63-7.67 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.20 (m, 3H), 7.15 (m, 2H), 6.95-6.99 (m, 3H), 6.40 (m, 1H), 4.78 (d, *J*=4.4, 1H), 4.47 (d, *J*=5.2, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.20 (s, 2H), 3.19 (m, 1H), 1.44 (m, 2H), 1.12 (m, 2H), 0.76 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 474.2 (M+H)<sup>+</sup>

#### 【0225】

実施例6：化合物2の合成



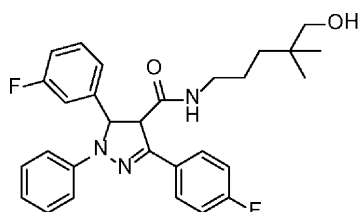
(化合物2)

実施例2-5と類似する合成手順を使用して、化合物2を合成した。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.31 (s, 1H), 8.92 (t, *J*=5.6, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.37 (m, 5H), 7.30 (m, 3H), 7.16 (m, 2H), 7.00 (m, 4H), 6.74 (m, 1H), 6.73 (m, 2H), 5.47 (d, *J*=6.4, 1H), 4.31 (d, *J*=6.4, 1H), 4.20 (m, 2H). MS (ESI) *m/z* 448.2 (M+H)<sup>+</sup>

#### 【0226】

実施例7：化合物6の合成



(化合物6)

実施例2-5と類似する合成手順を使用して、化合物6を合成した。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62-7.64 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.26 (m, 1H), 7.12-7.15 (m, 2H), 6.97-7.01 (m, 5H), 6.40 (m, 1H), 4.78 (d, *J*=5.2, 1H), 4.46 (d, *J*=5.2, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.20 (s, 2H), 3.19 (m, 1H), 1.38 (m, 2H), 1.13 (m, 2H), 0.76 (d, *J*=3.2, 1H). MS (ESI) *m/z* 492.2 (M+H)<sup>+</sup>

#### 【0227】

実施例 8：本実施形態の化合物はインビボでの腫瘍成長を抑制する（マウス異種移植片モデル：黒色腫 M e l J u s o）

マウス異種移植片モデル（黒色腫 M e l J u s o）を使用して、化合物 1、2、4、及び 6 のインビボ有効性試験を実施した。マウスに  $3 \times 10^6$  細胞を  $100 \mu\text{l}$  の量で、背部領域に皮下注入した。接種 13 日後、マウスは、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$  体重の用量で 14 日間、毎日、投与化合物で治療を受け始めた（ $n = 10$ ）。ビヒクルのみは、対照として使用された（ $n = 10$ ）。投与化合物及びビヒクルは、マウスの腹部への腹腔内注入のために、 $40 \mu\text{l}$  の量に調節された。腫瘍の大きさ及び腫瘍量は、上述のように計算された。図 1 に見られるように、腫瘍成長は、投与化合物での処置後、劇的に抑制された。

【0228】

実施例 9：本実施例の化合物はインビボでの腫瘍成長を抑制する（マウス異種移植片モデル：中皮腫 M S - 1）

マウス異種移植片モデル（中皮腫 M S - 1）を使用して、化合物 1 及び 4 のインビボ有効性試験を実施した。1 群当り 5 匹の雌の胸腺欠損ヌードマウスに  $3 \times 10^6$  細胞を  $100 \mu\text{l}$  の量で、背部領域に皮下注入した。接種 10 日後、毎日  $50 \text{ mg} / \text{kg}$  体重で、14 日間の化合物の腹腔内注入を開始した（ $n = 5$ ）。ビヒクルのみは、対照として使用された（ $n = 5$ ）。処置完了後、腫瘍をさらに 2 週間成長させた。実験が完了するまで、腫瘍の大きさを週 2 回測定した。対照群と比較して、投与化合物で処置された後に腫瘍重量が減少した（図 2）。

【0229】

実施例 10：本実施形態の化合物はインビボでの腫瘍成長を抑制する（マウス異種移植片モデル：肺癌 A 5 4 9）

マウス異種移植片モデル（N S C L C A 5 4 9）において、化合物 1 及び 4 のインビボ有効性試験を検査した。マウスに  $3 \times 10^6$  細胞を  $100 \mu\text{l}$  の量で、背部領域に皮下注入した。接種 10 日後、マウスは、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$  体重の用量で 14 日間、毎日（ $n = 5$ ）、その後、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$  体重で別の一連の処置を  $1 \times 7$  日間、毎日、化合物 1 または 4 を用いる処置を受け始めた。ビヒクルのみは、対照として使用された（ $n = 5$ ）。投与された化合物及び D M S O は、マウスの腹部への腹腔内注入のために、 $50 \mu\text{l}$  の量に調節された。最初の腫瘍接種から 43 日後、腫瘍を各群のマウスから切断し、はかりを使用して、それらの重量を測定した。対照群と比較して、投与化合物で処置された後に腫瘍重量が減少した（図 3）。この低用量インビボ結果は、本明細書に提示されるインビトロデータと一致する。

【0230】

実施例 11：インビボの腫瘍における本実施形態の化合物のヘッジホッグ経路に対する効果

化合物 1、2、4、及び 6 がインビボでヘッジホッグシグナル伝達経路の障害を通して腫瘍成長を抑制するかを検査するために、H h 経路（例えば、G l i 1、G l i 2、G l i 3、H H I P、及び C y c l i n D 1）の主要成分及び直接標的遺伝子の発現が、異種移植片腫瘍から単離された全 R N A を使用して、定量的リアルタイム R T - P C R により分析された。G A P D H は、対照として機能する。この R T - P C R 分析は、適切な大きさの腫瘍を有する各群の 2 匹の無作為に選択されたマウス由来の「プールされた」腫瘍を使用して実施された。H h シグナル伝達が黒色腫の腫瘍（M e l J u s o）において、化合物 1、2、4、及び 6 により障害されたことが分かった（図 4）。結果は図 4 に示され、C は対照であり、V はビヒクルである。

【0231】

実施例 12：インビボの腫瘍における本実施形態の化合物の標準 W n t 経路に対する効果

化合物 1、2、4、及び 6 がインビボで W n t シグナル伝達経路の障害を通して腫瘍成長を抑制するかを検査するために、W n t 経路（例えば、W n t 2、A x i n 2、E G F R、及び C y c l i n D 1）の主要成分及び直接標的遺伝子の発現が、異種移植片腫瘍から単離された全 R N A を使用して、定量的リアルタイム R T - P C R により分析された

10

20

30

40

50

。GAPDHは、対照として機能する。このRT-PCR分析は、適切な大きさの腫瘍を有する各群の2匹の無作為に選択されたマウス由来の「プールされた」腫瘍を使用して実施された。標準Wnt活性化の主要な指標の発現が、対照と比較して、化合物1、2、及び4で処置された黒色腫の腫瘍において大幅に下方調節されたことが分かった(図4)。結果は図4に示され、Cは対照であり、Vはビヒクルである。

#### 【0232】

実施例13：インビボ処置後のマウスにおける本実施形態の化合物の毒性分析

化合物1、2、4、及び6の予備インビボ毒性試験として、処置後のマウスにおける白血球集団の変化及び体重の損失があるかを検査した。本明細書に記載されるインビボ試験の完了時、全処置群の各動物由来の白血球(WBC：白血球細胞、NE：好中球、LY：リンパ球、MO：単球、EO：好酸球、BA：好塩基球)を回収し、血液細胞計数器により白血球集団を計数した。薬物投与経過中、対照群(n=10)及び処置群(n=10)の体重を測定した。白血球集団または体重損失の目立った変化は、投与化合物で処置した後には観察されなかった(図5及び6)。さらなる毒性試験では、異なる用量の化合物4及び6の、マウスの体重に対する効果が検査された。化合物を、マウス(投薬群当り3匹のマウス)に、6日間連続、25、50、及び100mg/kg体重の3つの異なる用量で、腹部に腹腔内注入した。一貫して、体重の目立った損失は、投与化合物で処置した後には観察されなかった(図7)。

10

#### 【0233】

実施例14：マウスにおける本実施形態の化合物の様々な細胞に対する効果

インビボで化合物1、2、4、及び6の毒性を分析するために、各群(3匹)は、6日間、毎日、各化合物の2用量を腹腔内注入され、その後、肝臓、脾臓、腎臓、及び心臓などの主なマウスの臓器が、マウスから切除された。検体を4%の緩衝ホルムアルデヒドに固定し、パラフィンに包埋し、薄片にし、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色により組織学的分析を行う。化合物処置されたマウス由来の臓器において目立った毒性は観察されなかった。結果が図8~11に示される。

20

#### 【0234】

実施例15：癌細胞の治療における本実施形態の化合物及び化学療法薬の相乗効果

化合物といくつかの化学療法薬：エルロチニブ(Tarceva(登録商標))、PI3K阻害剤LY294002、TGF阻害剤SB431542、及びペメトレキセド(Alimta(登録商標))の併用処理が、ヒトNSCLC及びMM細胞系において実施された(図12~17)。全ての実験では、NSCLC及びMM細胞系が、異なる用量の各化合物または組み合わせで72時間処理され、MTSアッセイは、細胞増殖を決定するために実施された。CalcuSynソフトウェア(Biosoft, Cambridge, UK)により計算された併用指数(CI)は、2つの化合物の併用効果の効果を説明するために適用され、CI<1は相乗効果を示し、CI=1は相加効果を示し、CI>1は拮抗効果を示す。スチューデントのt検定が統計分析に適用された。併用処置はNSCLC及びMM細胞の増殖を相乗的に抑制し得ることが分かった。

30

#### 【0235】

実施例16：化合物4の鏡像異性体P1及びP2のキラルHPLCカラム分離

実験は、化合物4の2つの鏡像異性体(P1及びP2)を分離するために実施された。Chiralpak AD-Hカラム(Chiral Technologies, Exton, PA)が使用された。カラムの大きさは、25cm×4.6mm内径であり、CSP粒径は5ミクロンであった。15%(v/v)の二酸化炭素に混入されたHPLCグレードのメタノールが共溶媒として使用された。カラムの温度は39.7であった。CO<sub>2</sub>の流速は2.55ml/分であり、共溶媒の流速は0.45ml/分であり、総流速は3ml/分となる。前圧及び背圧は、それぞれ、186及び150バールであり、36バールの圧力降下をもたらす。フォトダイオードアレイ開始及び停止波長は、それぞれ、214及び359nmであった。

40

#### 【0236】

50

記載される条件下で、化合物 4 の鏡像異性体 P 1 は、3.27 分の滞留時間を有することが分かり、一方、化合物 4 の鏡像異性体 P 2 は、4.14 分の滞留時間を有した。各鏡像異性体の曲線下パーセンテージ面積は、それぞれ、49.1% (鏡像異性体 P 1) 及び 47.7% (鏡像異性体 P 2) であった。鏡像異性体 P 1 及び鏡像異性体 P 2 の後続の反復クロマトグラフィーは (鏡像異性体 P 1 に関しては、温度が 39.1、圧力降下が 45 バールであり、鏡像異性体 P 2 に関しては、温度が 41.1、圧力降下が 33 バールであったことを除き、上述に示されるのと同じ HPLC 条件を用いて)、別々に、それぞれ、99.9% (鏡像異性体 P 1) 及び 98.8% (鏡像異性体 P 2) の純度を示し、滞留時間は、鏡像異性体 P 1 に関しては 3.53 分であり、鏡像異性体 P 2 に関しては 4.47 分であった。

10

#### 【0237】

実施例 17: キラル化合物 4 は複数の癌細胞系において鏡像異性体特異的活性を示す

実験は、様々な癌細胞系 (肺癌、黒色腫、中皮腫、結腸直腸癌、膵臓癌、及び前立腺癌を含む) における鏡像異性体特異的活性を決定するために実施された。癌細胞系は、0.5% の FBS を含む培地中で、ビヒクルまたは用量範囲 0.1  $\mu$ M ~ 20  $\mu$ M の化合物 4 のいずれか、及び 2 つの精製された化合物 4 の鏡像異性体 (P 1 及び P 2) で 4 日間処理され、細胞毒性 IC<sub>50</sub> 値が決定された。データは、鏡像異性体 P 2 が鏡像異性体 P 1 よりも癌細胞成長の抑制において活性であったことを示した。結果は、P 2 鏡像異性体の IC<sub>50</sub> 値が化合物 4 の約 50% であったため (すなわち、P 1 及び P 2 鏡像異性体の等量混合)、化合物 4 及び鏡像異性体 P 2 の活性が特異的であることも示した。図 18 は、様々な癌細胞系についての G1i 阻害剤化合物 4 及びその 2 つの精製された鏡像異性体 (P 1 及び P 2) の各々の細胞毒性 IC<sub>50</sub> 値 ( $\mu$ M) を示す。

20

#### 【0238】

実施例 18: 肺癌細胞系における G1i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の有効性と G1i 発現の相関関係

実験は、肺癌細胞系における化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 (図 18 に記載される IC<sub>50</sub> 値) の有効性と G1i 1 及び G1i 2 の発現レベルとの間の相関関係を検査するために実施された。化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の IC<sub>50</sub> 値 ( $\mu$ M) は、これらの細胞系における G1i 1 及び G1i 2 の mRNA 発現レベル (リアルタイム RT-PCR により測定された) と逆に相関し、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がヒト肺癌細胞系において G1i 機能の阻害に特異的であったことを支持する。図 19 は、非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞における G1i 阻害剤化合物 4 の有効性と G1i 発現の相関関係のグラフを示す。

30

#### 【0239】

実施例 19: 他の癌細胞における G1i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の有効性と G1i 発現の相関関係

実験は、いくつかの他の種類の癌細胞系 (中皮腫、黒色腫、及び結腸直腸癌を含む) における化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 (図 18 に記載される IC<sub>50</sub> 値) の有効性と G1i 1 及び G1i 2 の発現レベルとの間の相関関係を検査するために実施された。化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の IC<sub>50</sub> 値 ( $\mu$ M) は、これらの細胞系における G1i 1 及び G1i 2 の mRNA 発現レベル (リアルタイム RT-PCR により測定された) と逆に相関し、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 が癌細胞系において G1i 機能の阻害に特異的であったことを支持する。図 20 は、中皮腫、黒色腫、及び結腸直腸癌の癌細胞を含むこれらの他の種類の癌細胞系における G1i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の有効性と G1i 発現の相関関係のグラフを示す。

40

#### 【0240】

実施例 20: NSCLC 細胞系 A549 における小 G1i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 による G1i / TAF9 依存転写活性の阻害

G1i 機能の阻害における化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 の特異性を検査し、それが G1i と TAF9 との間の相互作用を遮断するかを実証するために、NSCLC A549 細胞における化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 処置後のルシフェラーゼ活性を検査するための G1i

50

依存転写の代替え測定として、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に連結された G l i 結合部位の 8 つの反復物 ( 8 × G l i B S ) を使用して、実験が実施された。結果は、G l i 1 または G l i 2 単独の過剰発現が 8 × G l i B S - ルシフェラーゼ活性を大幅に増加させ、T A F 9 の G l i 1 または G l i 2 のいずれかとの同時発現が 8 × G l i B S - ルシフェラーゼ活性を G l i 単独によるものよりも大幅に高いレベルにさらに増加させたことを示し、G l i 1 及び G l i 2 が G l i 結合部位に特異的に結合し、転写において機能的に活性であり、T A F 9 が活性化補助因子として G l i タンパク質と相互作用し得ることを確認したことを示した。5 μ M で 16 ~ 20 時間処置した後、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 は、A 5 4 9 細胞において、G l i 単独及び G l i / T A F 9 誘発 8 × G l i B S - ルシフェラーゼ活性の両方を大幅に下方調節することが分かった。この結果は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 が G l i タンパク質と T A F 9 との間の相互作用の阻害に特異的であり得ることを示す。図 2 1 は、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビトロで N C S L C 細胞系 A 5 4 9 において G l i / T A F 依存転写活性を阻害することを示す、ルシフェラーゼ活性 ( % ) のグラフを示す。

10

#### 【 0 2 4 1 】

実施例 2 1 : G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 はインビトロで N S C L C 細胞における G l i 下流標的を阻害する

実験は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 が G l i 機能の阻害を通して肺癌細胞の成長を抑制したかを分析するために、リアルタイム R T - P C R を使用して実施された。全 R N A は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 で処置された肺癌細胞 ( A 5 4 9 及び H 1 2 9 9 ) から単離された。結果は、G l i 1、G l i 2、H H I P、及び P t c h 1 などの G l i 下流標的の発現レベルがこれらの肺癌細胞系において化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 により全て大幅に下流調節されたことを示した。これらの結果は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 化合物が G l i 機能の阻害を通して肺癌細胞の成長を特異的に抑制し得ることを示唆する。図 2 2 は、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビトロで N S C L C 細胞において G l i 下流標的を阻害することを示す、G l i 下流標的の発現レベルのグラフを示す。

20

#### 【 0 2 4 2 】

実施例 2 2 : G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 はインビトロで中皮腫細胞における G l i 下流標的を阻害する

実験は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 が G l i 機能の阻害を通して中皮腫細胞の成長を抑制したかを分析するために、リアルタイム R T - P C R を使用して実施された。全 R N A は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 ( 5 μ M ) で処理された中皮腫細胞 M S - 1 から単離された。結果は、G l i 1、G l i 2、H H I P、及び P t c h 1 などの G l i 下流標的の発現レベルがこれらの M S - 1 細胞において化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 により全て大幅に下流調節されたことを示した。これらの結果は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 化合物が G l i 機能の阻害を通して中皮腫細胞の成長を特異的に抑制し得ることを示唆する。図 2 3 は、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビトロで中皮腫細胞において G l i 下流標的を阻害することを示す、遺伝子発現のグラフを示す。

30

#### 【 0 2 4 3 】

実施例 2 3 : G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 はインビボで腫瘍内の中皮腫細胞において G l i 下流標的を阻害する ( マウス異種移植片モデル : 中皮腫 M S - 1 )

実験は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビボでの G l i 機能の阻害を通して中皮腫の腫瘍成長を抑制したかを分析するために、免疫組織化学検査 ( I H C ) を使用して実施された。結果は、G l i 1 及び G l i 2 のタンパク質発現レベルがこれらの M S - 1 腫瘍において化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 により両方とも大幅に下方調節され、これらのインビボ腫瘍における増殖マーカー K i - 6 7 の下方調節と一致したことを示した。これらの結果は、化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 化合物がインビボでの G l i 機能の阻害を通して中皮腫の腫瘍成長を特異的に抑制し得ることを示唆する。図 2 4 は、G l i 阻害剤化合物 4 - 鏡像異性体 P 2 がインビボで腫瘍内の中皮腫細胞において G l i 下流標的を阻害することを示す、免疫組織化学像を示す ( マウス異種移植片モデル : 中皮腫 M S - 1 ) 。

40

50

## 【0244】

実施例24：インビトロでの中皮腫細胞の成長の抑制におけるGDC0449（Smο阻害剤）及びG1i阻害剤化合物4 - 鏡像異性体P2の相乗効果

実験は、GDC0449（Smο阻害剤）及びG1i阻害剤化合物4 - 鏡像異性体P2の併用治療を試験するために実施された。中皮腫細胞系H28を、G1i阻害剤化合物4 - 鏡像異性体P2及びSmο阻害剤GDC0449を併用することにより処理した。結果は、併用治療が相乗的または相加的にこれらの中皮腫細胞の増殖を抑制したことを示した。CalcuSynソフトウェア（バイオソフト）は、相乗的、相加的、及び拮抗的薬物相互作用を特定するために、半数有効式を使用するChou - Talalay法に基づく併用指数（CI）を用いて癌細胞系における各併用治療に関して計算するために使用された。CI値は、2つの化合物の併用効果の効果を説明し、 $CI < 1$ は相乗効果を示し、 $CI = 1$ は相加効果を示し、 $CI > 1$ は拮抗効果を示す。相乗効果は、中程度の相乗効果（ $CI = 0.7 \sim 0.9$ ）、相乗効果（ $CI = 0.3 \sim 0.7$ ）、及び強い相乗効果（ $CI = 0.1 \sim 0.3$ ）としてさらに定義される。図25は、インビトロでの中皮腫細胞の成長の抑制におけるGDC0449（Smο阻害剤）及びG1i阻害剤化合物4 - 鏡像異性体P2の相乗効果を示すグラフを示す。

10

## 【0245】

上述の実施形態は、明確さ及び理解のために図示及び実施例によりある程度詳細に記載されてきたが、本開示の教示を考慮して、ある特定の変形、変更、修正、及び等価物の置換が本発明の趣旨及び範囲から必ずしも逸脱することなく行われ得ることは、当業者には容易に明らかであろう。結果として、本明細書に記載される実施形態は、様々な修正、変更などを受け、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲を参照することによってのみ決定される。当業者は、本質的に類似する結果をもたらすように変更、変形、または修正され得る様々な重要でないパラメータを容易に認識する。

20

## 【0246】

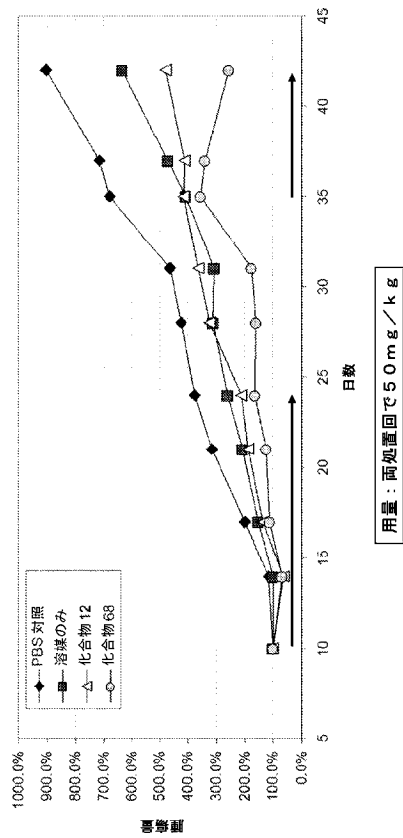
本発明の要素の各々は、本明細書において、複数の実施形態を含むように記載されるが、別途示されない限り、本発明の所与の要素の実施形態の各々は、本発明の他の要素の実施形態の各々と共に使用することができ、各々のそのような使用が本発明の別個の実施形態を形成することが意図されることを理解するべきである。

## 【0247】

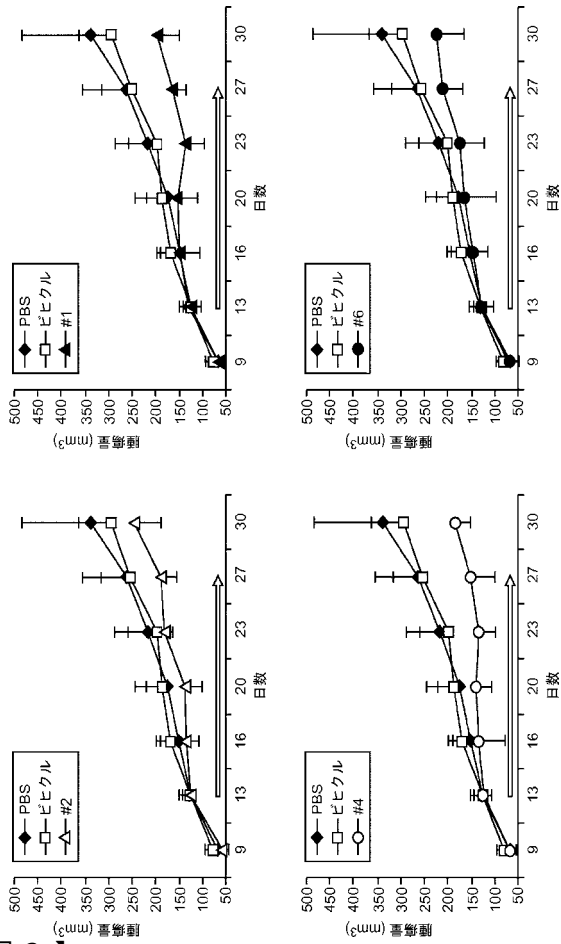
上の開示から理解することができるように、本発明は、多種多様の用途を有する。本発明は、単に図示であり、決して本発明の定義及び範囲を制限することが意図されない上記の実施例によりさらに図示される。

30

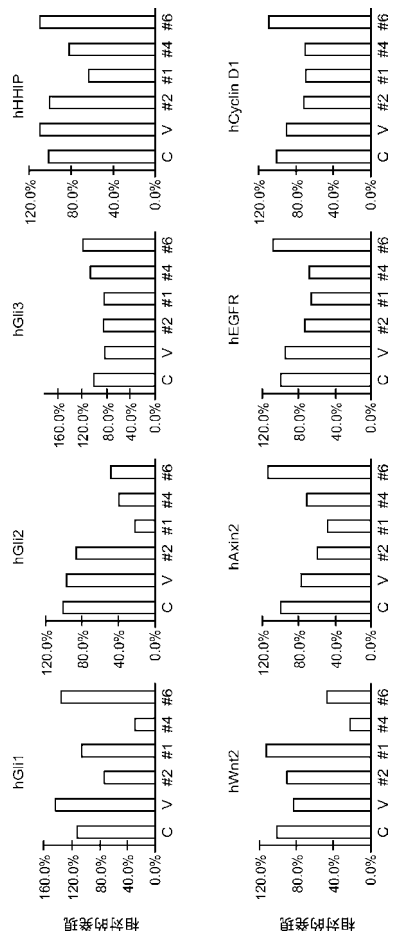
化合物のインビボ有効性試験  
(10日目に1回目の、  
35日目に2回目の腹腔内処置を開始；  
異種移植片モデル：肺癌A549)



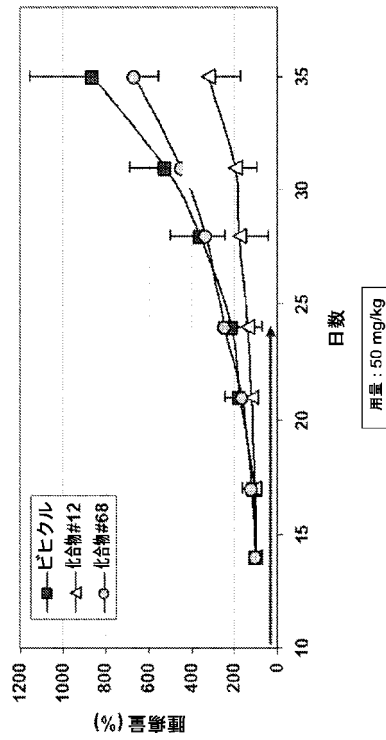
化合物のインビボ有効性試験  
(13日目に腹腔内処置を開始；異種移植片モデル：黒色腫)



インビボでの黒色腫における  
Hh及びWnt経路に対する化合物の効果

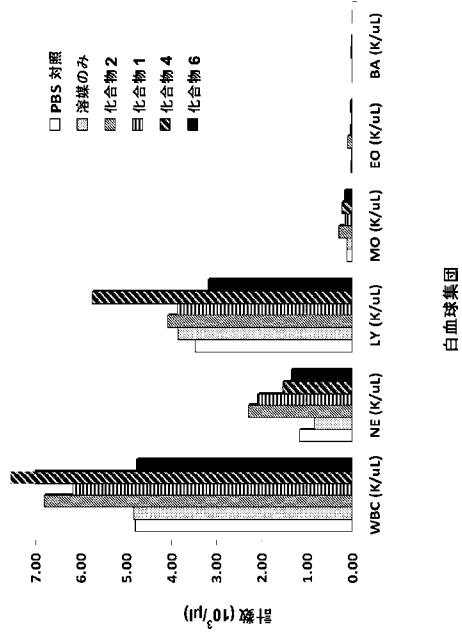


化合物のインビボ有効性試験  
(10日目に腹腔内処置を開始；  
異種移植片モデル：中皮腫MS-1)



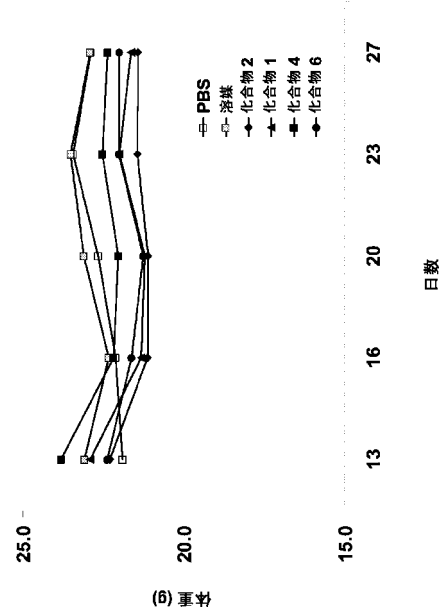
【図 5】

マウスにおける化合物の毒性分析



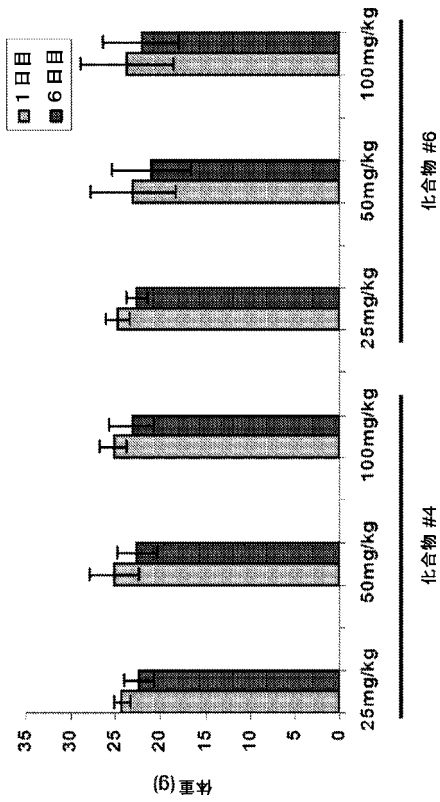
【図 6】

マウスにおける化合物の毒性分析



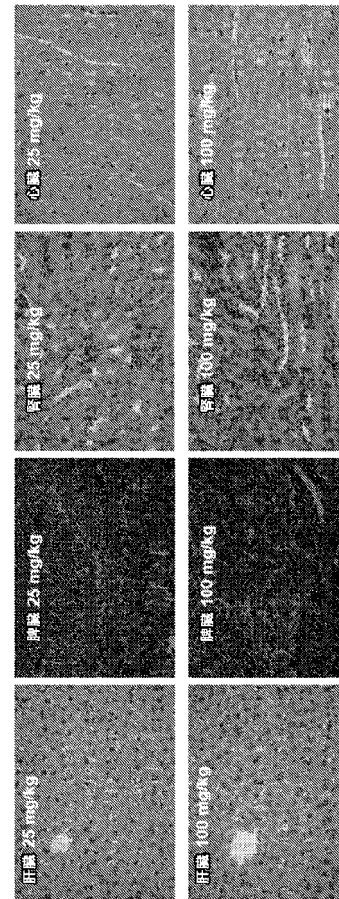
【図 7】

マウスにおける化合物の毒性分析



【図 8】

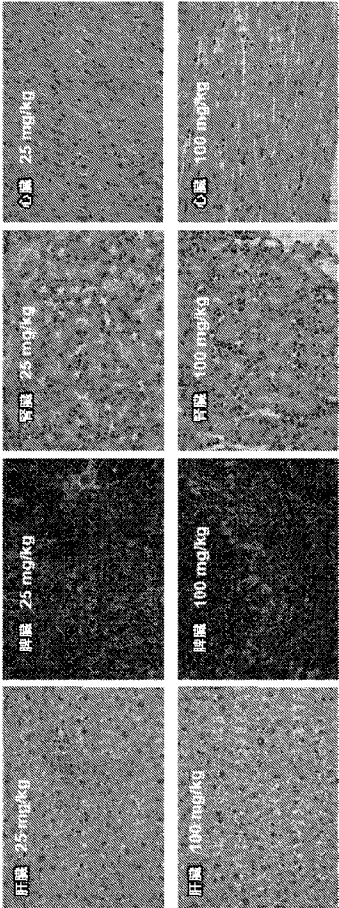
マウスにおける化合物#2の毒性分析





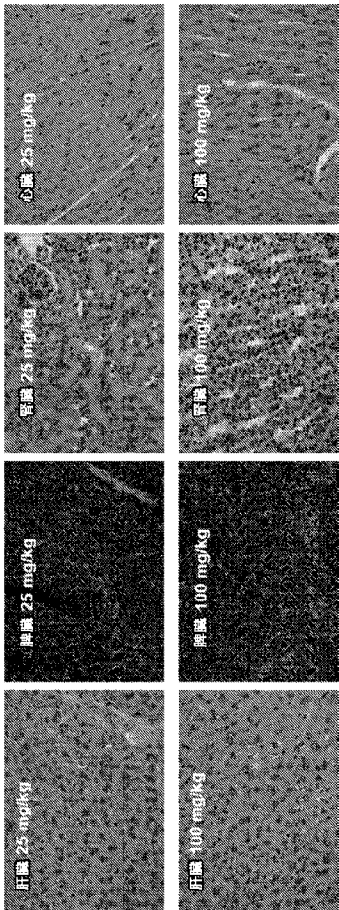
マウスにおける化合物# 1 の毒性分析

【 図 9 】



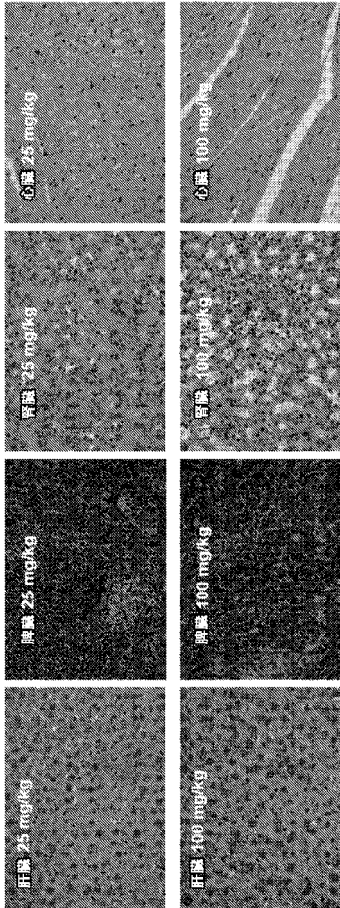
マウスにおける化合物# 6 の毒性分析

【 図 1 1 】



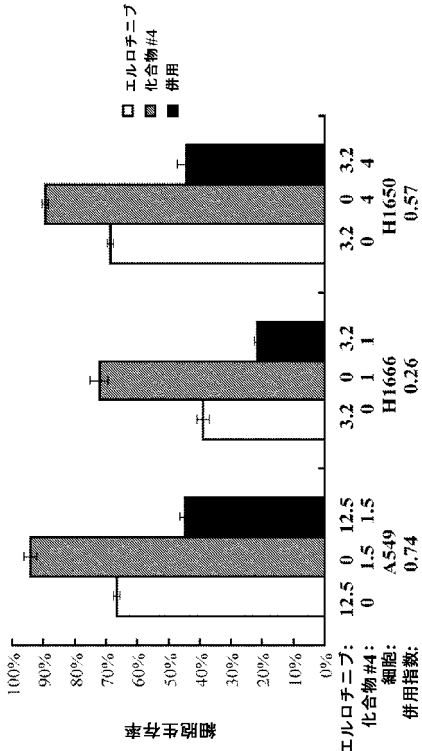
マウスにおける化合物# 4 の毒性分析

【 図 1 0 】



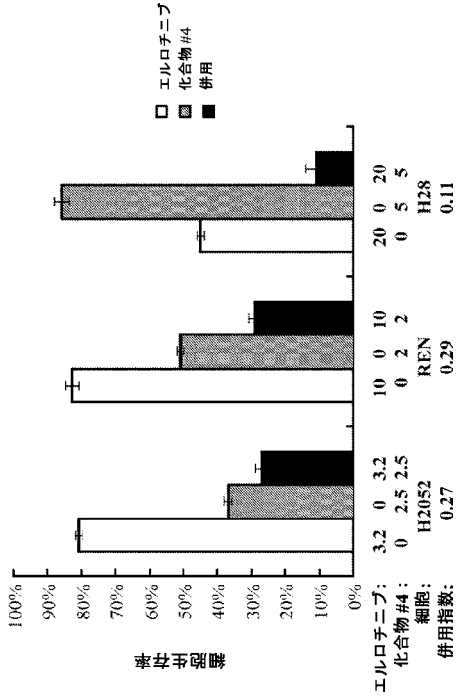
エルロチニブ (T a r c e v a) 及び化合物# 4 の相乗効果

【 図 1 2 】



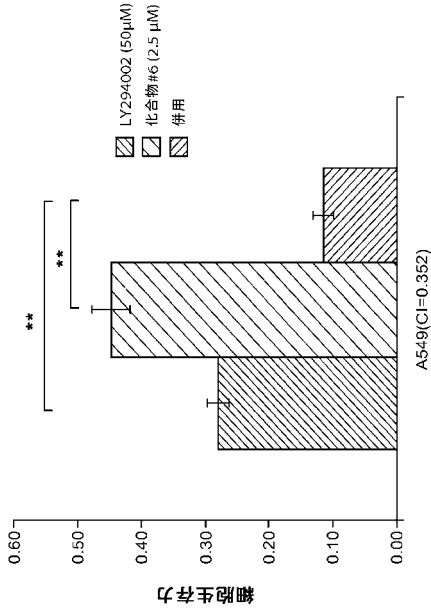
【図 1 3】

エルロチニブ (T a r c e v a) 及び化合物 # 4 の相乗効果



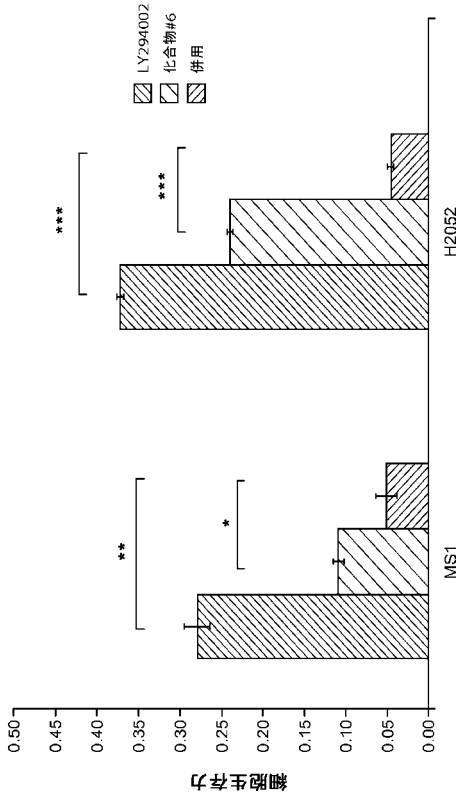
【図 1 4】

肺癌細胞における  
併用処置 (LY294002 : PI3K阻害剤及び化合物 # 6)



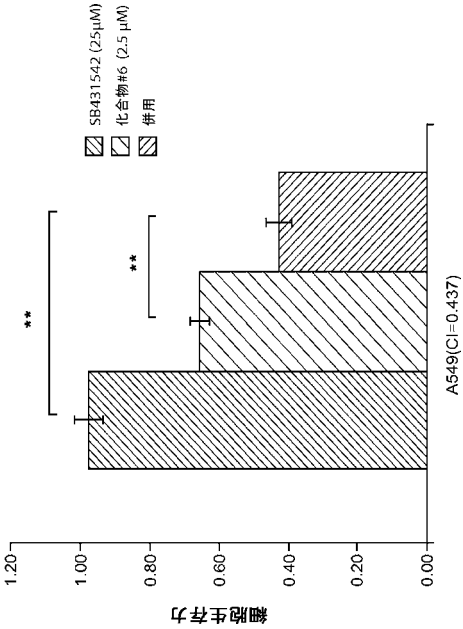
【図 1 5】

中皮腫細胞における  
併用処置 (LY294002 : PI3K阻害剤及び化合物 # 6)

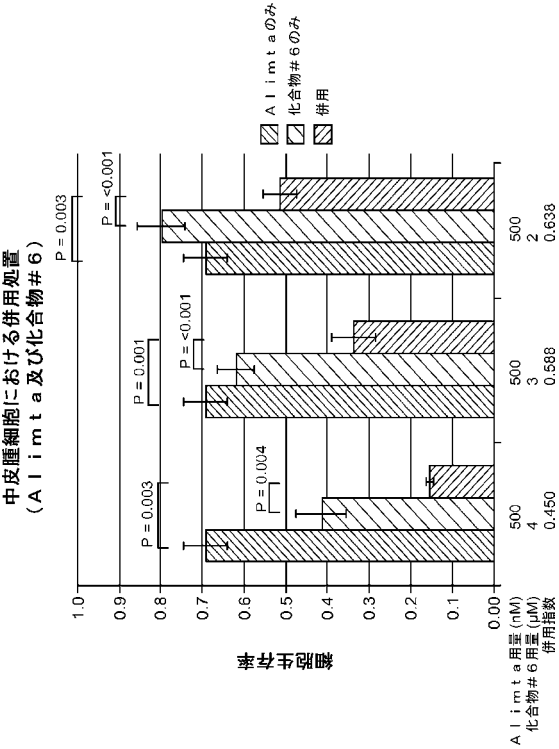


【図 1 6】

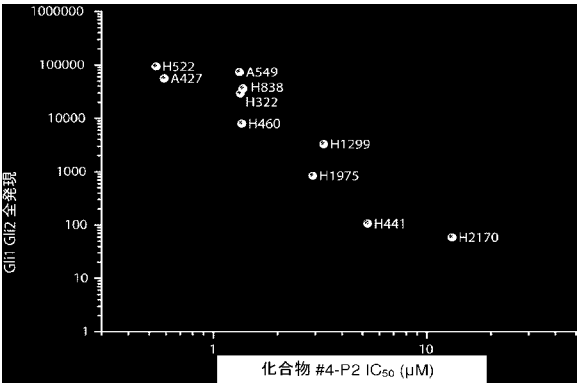
肺癌細胞における  
併用処置 (SB431542 : TGFβ阻害剤および化合物 # 6)



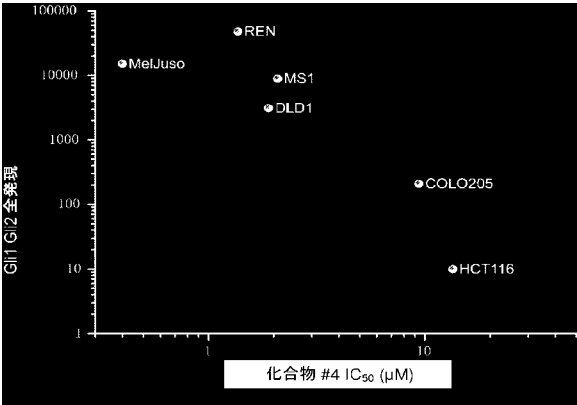
【 図 1 7 】



【 図 1 9 】



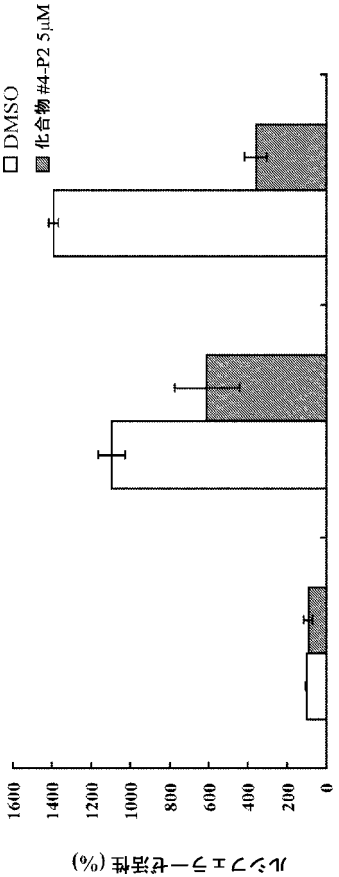
【 図 2 0 】



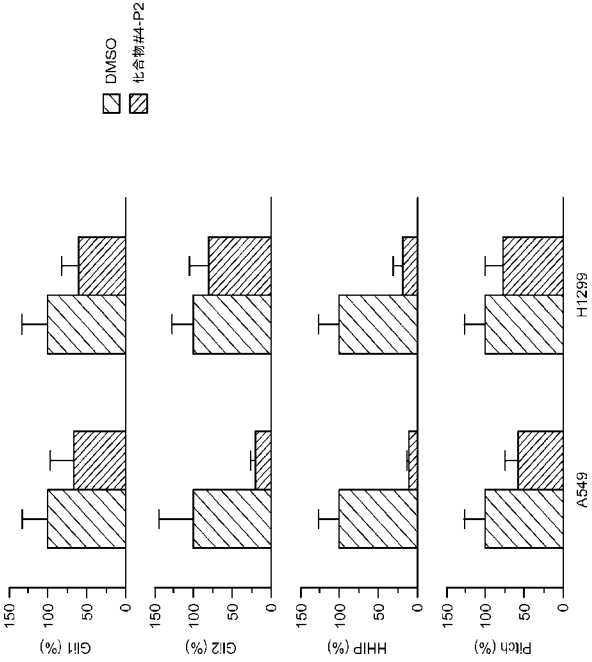
【 図 1 8 】

癌	細胞系	#4	P1	P2	癌	細胞系	#4	P1	P2	
黒色腫	Clau6	2.27	8.67	1.58	中皮腫	H2052	1.59	12.81	0.87	
	SK-Mel30	4.27	8.19	2.93		REN	1.37	5.33	0.75	
	LOX	1.52	11.03	0.81		H2452	4.09	8.21	2.50	
	MelJuso	0.96	8.12	0.49		211H	4.78	13.31	2.59	
	Mel144	1.15	6.27	0.69		H290	1.11	4.93	0.65	
	Mel202	3.54	6.08	1.94		MSI	2.09	8.11	0.88	
肺	H322	2.55	9	1.34	結腸	COLO-201	6.79	8.25	5.20	
	H460	2.2	6.55	1.36		Caco-2	1.55	6.72	1.20	
	A549	2.87	8.14	1.33		DLD-1	1.9	0.80	0.80	
	H1703	5.79	9.01	3.96		HCT116	13.50	6.50	6.50	
	H1299	5.03	10.78	3.3	脾臓					
	H1975	4.93	13.99	2.93		CFPAC1	1.22	9.41	0.69	
	H441	6.6	10.67	5.29		ASPC-1			2.80	
	H522	0.95	7.59	0.54		Panc 02.13			6.10	
	H2170	16.27	17.97	13.17		PANC-1			6.80	
	H838	2.89	12.04	1.38		前立腺	DUI45	3.17	6.02	2.54
	A427	1.1	7.08	0.59						

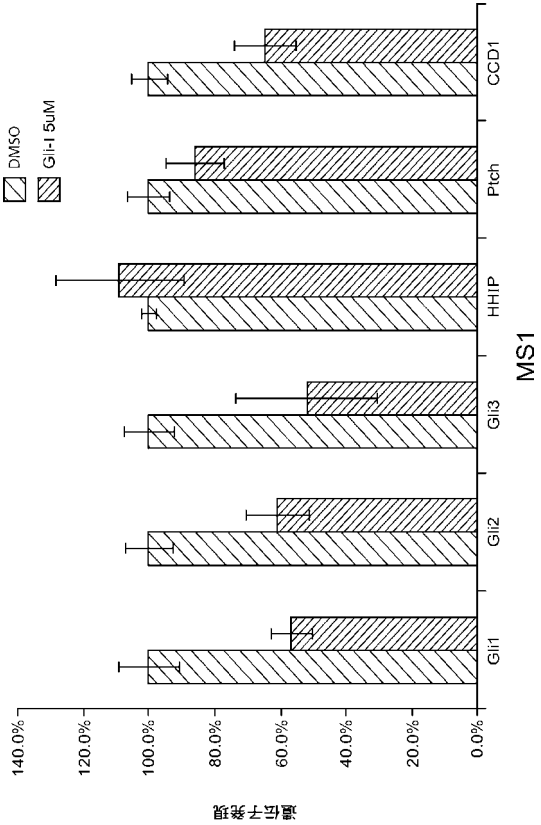
【 図 2 1 】



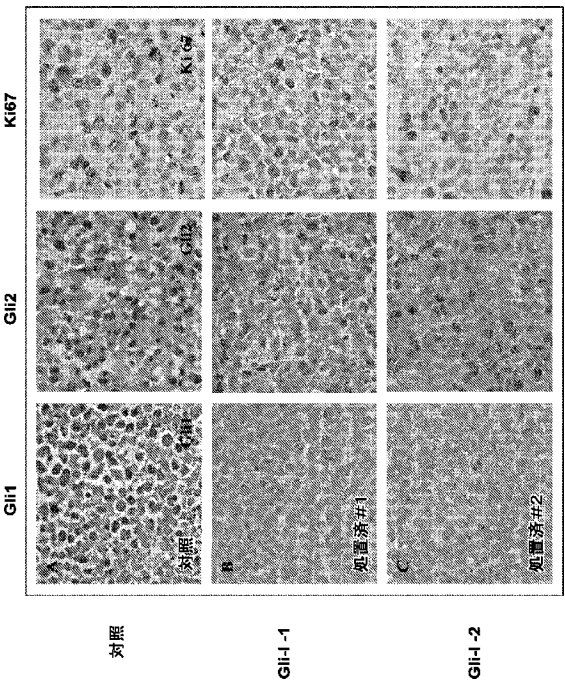
【図 2 2】



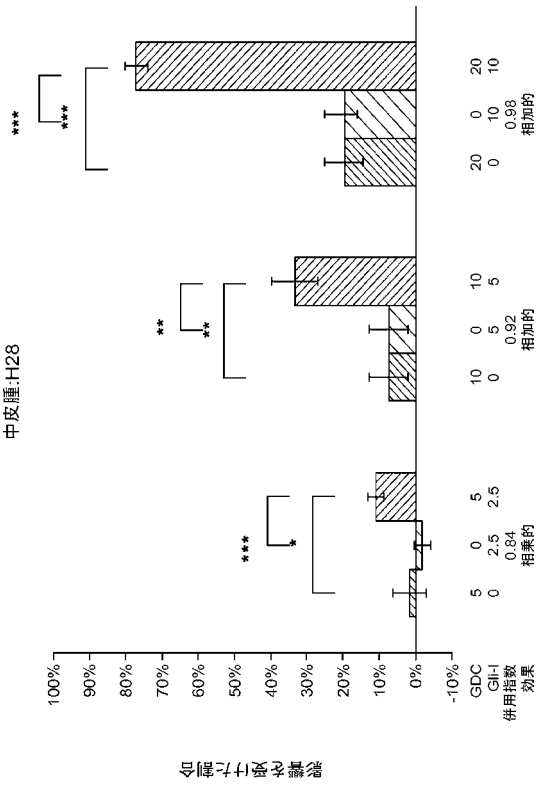
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/12466

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 31/415 (2014.01) USPC - 514/406; 514/403; 548/379.4; 548/379.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 514/406 IPC: A61K 31/415 (2014.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/403; 548/379.4; 548/379.7 (see search words below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase: Full-text = AU BE BR CA CH CN DE DK EP ES FI FR GB IN JP KR SE TH TW US WO Google: Scholar/Patents: gli proteins pyrazole phenyl enantiomer diaryl dimethyl pentyl hydroxy amide triaryl hpic chiral enantiomer isolation eluting pyrazole fluorophenyl hydroxy-4,4-dimethyl-pentyl		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 7,714,014 B2 (He et al.) 11 May 2010 (11.05.2010) Col 5, In 51-53; Col 11, In 42-49; Col 23, In 31-40; Col 23, In 48-50; Col 23, In 63-64; Col 24, compound FN2-5; Col 26, In 64-67; Col 28, In 66-67; Col 29, In 17; Col 37, In 1-5	1-17
Y	PIRKLE et al. A Widely Useful Chiral Stationary Phase for the High-Performance Liquid Chromatography Separation of Enantiomers, J. Am. Chem. Soc., 1981, Vol. 103, pp 3964-3966. pg 3265, Col 1, para 1 to Col 2 para 1; pg 3266, Figure 1	1-17
X,P	WO 2013/013190 A1 (HE et al.) 24 January 2013 (24.01.2013) Entire Document	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 April 2014 (03.04.2014)		Date of mailing of the international search report <b>02 MAY 2014</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/12466

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☒ Claims Nos.: 18-21  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 33/24 (2006.01)</b>	A 6 1 K 33/24	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>C 0 7 D 409/04 (2006.01)</b>	C 0 7 D 409/04	
<b>A 6 1 K 31/4155 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/4155	

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

(74) 代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ホー ピョウ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フォスター シティー ロス レーン 2 0 0

(72) 発明者 マン マイケル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ パルナッソス アベニュー 5 0 0

(72) 発明者 ジャブロンズ デビッド エム.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ ナインティーンズ ストリート 1 2 4  
3

F ターム(参考) 4C063 AA01 BB01 CC92 DD42 EE01  
4C084 AA19 NA05 ZB262  
4C086 AA01 AA02 AA03 BC36 BC46 CB05 GA04 GA07 HA12 HA28  
MA02 MA04 MA05 NA14 ZB26