

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7132123号

(P7132123)

(45)発行日 令和4年9月6日(2022.9.6)

(24)登録日 令和4年8月29日(2022.8.29)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/519 (2006.01)

A 6 1 K 31/519

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/02

請求項の数 7 (全26頁)

(21)出願番号	特願2018-542236(P2018-542236)	(73)特許権者	504389991
(86)(22)出願日	平成29年2月10日(2017.2.10)		ノバルティス アーゲー
(65)公表番号	特表2019-508413(P2019-508413 A)		スイス国 パーゼル リヒトシュトラッセ 3 5
(43)公表日	平成31年3月28日(2019.3.28)	(74)代理人	100092783
(86)国際出願番号	PCT/IB2017/050743		弁理士 小林 浩
(87)国際公開番号	WO2017/118965	(74)代理人	100095360
(87)国際公開日	平成29年7月13日(2017.7.13)		弁理士 片山 英二
審査請求日	令和2年1月20日(2020.1.20)	(74)代理人	100120134
(31)優先権主張番号	16155123.9		弁理士 大森 規雄
(32)優先日	平成28年2月10日(2016.2.10)	(74)代理人	100135943
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 三橋 規樹
(31)優先権主張番号	16186188.5	(74)代理人	100104282
(32)優先日	平成28年8月29日(2016.8.29)		弁理士 鈴木 康仁
	最終頁に続く	(72)発明者	ビエス, ブルーノ
			最終頁に続く

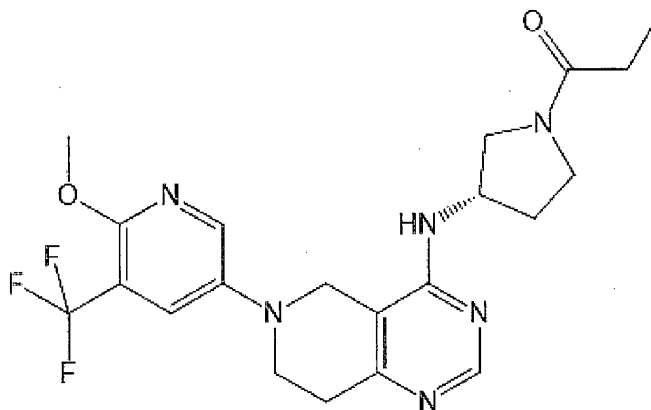
(54)【発明の名称】 原発性シェーグレン症候群の治療のための P I 3 K の活性阻害剤または機能阻害剤の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オン

【化 1】



または薬学的に許容されるその塩を含む、原発性シェーグレン症候群の治療に使用するための医薬組成物。

【請求項 2】

薬学的に許容される塩が 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

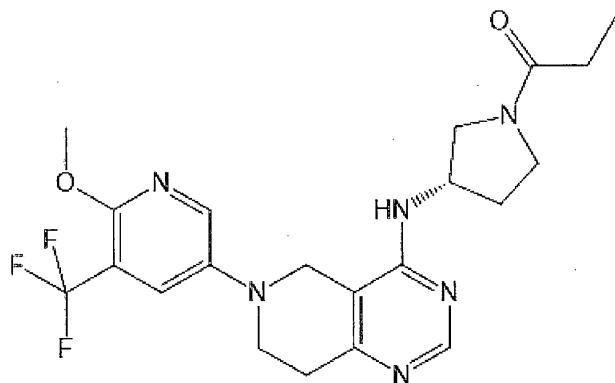
1 種または複数の薬学的に許容される担体を含む、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オン

10

【化 2】



20

または薬学的に許容されるその塩と 1 種または複数の治療活性剤とを含む、原発性シェーグレン症候群の治療に使用するための組合せ物。

【請求項 5】

約 40 ~ 200 kg のヒト対象に対する単位投与量が、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩として 10 ~ 100 mg である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 6】

約 50 ~ 70 kg のヒト対象に対する単位投与量が、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩として 70 mg である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

投与が 1 日 2 回である、請求項 1、2、3、5 または 6 に記載の医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、原発性シェーグレン症候群の治療のための、PI3K デルタアイソフォームに対する阻害作用を有するホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼファミリーの活性阻害剤または機能阻害剤（以下 PI3K 阻害剤）ならびに / または薬学的に許容されるその塩および / もしくはその溶媒和物の使用に関する。より詳細には、本発明は、原発性シェーグレン症候群の治療のための、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3

50

- d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩の使用に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

シェーグレン症候群は、「原発性」または「続発性」のいずれかに分類される。原発性シェーグレン症候群 (p S S) は、他に基礎疾患としてリウマチ性障害を伴わずに発症するが、続発性シェーグレン症候群は、全身性エリテマトーデス (S L E)、関節リウマチ (R A)、または強皮症など、他に基礎疾患としてリウマチ性疾患を伴う。原発性シェーグレン症候群は、体の免疫系が、例えば、唾液腺および涙腺など、体液を分泌する腺を攻撃する慢性自己免疫疾患である。唾液腺および涙腺に対する免疫介在性の攻撃は、口内乾燥およびドライアイの発症に繋がる。p S S の他の症状または状態として、皮膚乾燥、時に完全に消耗した状態に達する疲労および倦怠感、筋肉痛、関節痛、関節の硬直および腫脹、血管炎、集中困難が挙げられる。現時点で、原発性シェーグレン症候群に対する既知の治療法はないが、治療は、その症状の管理に役立ち得る。非ステロイド性抗炎症薬は、筋骨格症状を治療するために使用されることがあるが、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤、および疾患修飾性抗リウマチ薬 (D M A R D) が処方されることもあり、その大半は有害な副作用を有する。このため、原発性シェーグレン症候群の治療におけるさらなる治療的進歩が必要とされている (Holdgate N. F1000Research 2016, 5(F1000 Faculty Rev):1412)。

10

【発明の概要】

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 3 】

P I 3 K デルタ阻害剤である 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩は、原発性シェーグレン症候群の治療に好適であることが見出されている。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 4 】

【図 1】健常者に単回経口投与した後の化合物 A の P K / P D 関係を示すグラフである。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 5 】

1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩は、原発性シェーグレン症候群の治療に好適であることが見出された。

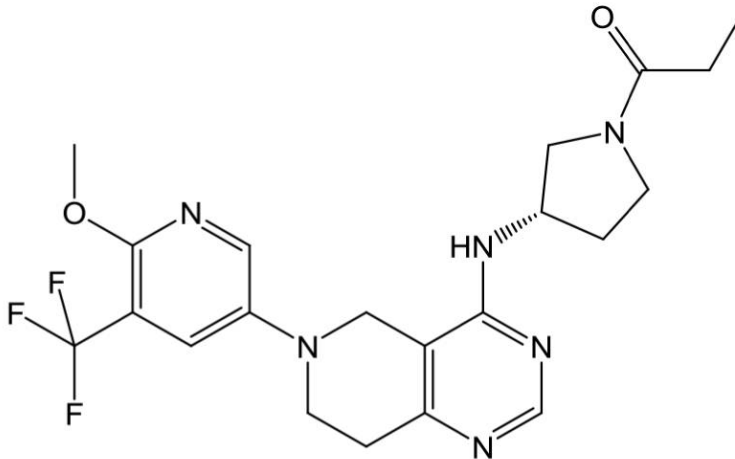
【 0 0 0 6 】

1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オン

40

【 0 0 0 7 】

【化 1】



(化合物 A)

および薬学的に許容されるその塩の例は、国際公開第 2 0 1 2 / 0 0 4 2 9 9 号パンフレットの実施例 6 7 に記載されている。

【 0 0 0 8 】

リン酸化 Akt (pAkt) は、PI3K デルタ活性化の下流エフェクターである。1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩は、PI3K デルタアイソフォームに対する選択性を持つ PI3K 阻害剤である (国際公開第 2 0 1 2 / 0 0 4 2 9 9 号パンフレット) 。本発明者らは、pSS 患者では Akt 経路が活性化されていると仮説を立て、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩は、pSS の治療において有用であることが見出された。

1) 慢性的な B 細胞活動亢進は、pSS における一貫したかつ顕著な免疫調節異常である (Hansen A et al, Arthritis Research & Therapy 2007; 9; 218) 。1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩は、in vitro および in vivo において、例えば、pAkt、CD69、CD86、APC 機能、サイトカイン産生、および抗体産生など、種々の B 細胞機能を直接阻害する。

2) pSS 患者は、接着分子、サイトカイン、およびケモカインの特有なプロファイルを示すことが見出されており、これには、pSS の病態形成に關与する B 細胞誘引性ケモカインである CXCL13 (BCA - 1、BLC) の顕著な過剰発現が含まれるが、CXCL10 (IP - 10) および CCL4 (MIP - 1 beta) の顕著な過剰発現も含まれる (Hansen A et al, Arthritis Research & Therapy 2007; 9; 218, Lee, Y. J. et al, Rheumatology 2010; 49(9);1747-1752, Kramer JM et al, J Leukoc Biol. 2013; 94(5);1079-1089, Nishikawa A et al Arthritis Research & Therapy 2016;18;106) 。1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩は、CpG または抗 IgM によって刺激された健常者から得られた PBMC の上清中の CXCL13 (BCA - 1、BLC) を阻害するが、CXCL10 (IP - 10) お

10

20

30

40

50

よび C C L 4 (M I P - 1 b e t a) も阻害する。

3) p S S の特徴的な特性として、胚中心 (G C) 様構造を持つ異所性リンパ組織の形成が挙げられる。健常者において、G C は、T 細胞依存性免疫応答の際の二次リンパ器官である一次 B 細胞濾胞から形成される (Hansen A et al, Arthritis Research & Therapy 2007; 9; 218)。

組織学的に、G C 形成の阻害は、F A C S 分析によって測定される辺縁帯 B 細胞 (M Z B 細胞) および濾胞ヘルパー T 細胞 (T F H) の全般的な減少を伴う。これらの細胞は、p S S の病態生理学に関与すると考えられる。1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩は、G C 様構造、M Z B 細胞、および T F H を減少させる。

10

【 0 0 0 9 】

一実施形態において、本発明は、原発性シェーグレン症候群の治療に使用するための 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を提供する。

【 0 0 1 0 】

別の実施形態において、本発明は、原発性シェーグレン症候群の治療法であって、このような治療を必要としている対象、例えば、ヒト対象に 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を治療有効量で投与することを含む、治療法を提供する。

20

【 0 0 1 1 】

別の実施形態において、本発明は、原発性シェーグレン症候群の治療のための薬剤の製造のための、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩の使用を提供する。

30

【 0 0 1 2 】

別の実施形態において、本発明は、原発性シェーグレン症候群の治療のための、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩の使用を提供する。

【 0 0 1 3 】

好ましいのは、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンがリン酸塩の形態である、上記の実施形態のいずれかである。

40

【 0 0 1 4 】

好ましい実施形態において、本発明は、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩に関する。

【 0 0 1 5 】

本明細書で用いる場合、「対象」という用語は、動物を指す。通常、該動物は哺乳動物である。また、対象は、例えば、霊長類 (例えば、ヒト、男性または女性)、ウシ、ヒツ

50

ジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、魚類、鳥類などを指す。特定の実施形態において、該対象は霊長類である。好ましい実施形態において、該対象はヒトである。

【 0 0 1 6 】

本明細書で用いる場合、「阻害する (inhibit)」、「阻害 (inhibition)」、または「阻害すること (inhibiting)」という用語は、所定の状態、症状、もしくは障害、または疾患の退行もしくは抑制、または生物学的活性もしくは生物学的過程のベースライン活性における顕著な低下を指す。

【 0 0 1 7 】

本明細書で用いる場合、どの疾患または障害に対しても「治療する (treat)」、「治療すること (treating)」、または「治療 (treatment)」という用語は、一実施形態において、該疾患または障害を改善すること（すなわち、該疾患の発症またはその臨床症状の少なくとも1つの進行の遅延、または停止、または退行）を指す。別の実施形態において、「治療する (treat)」、「治療すること (treating)」、または「治療 (treatment)」という用語は、該患者によって識別できないであろうものを含む、少なくとも1つの身体的パラメータの軽減または改善を指す。さらに別の実施形態において、「治療する (treat)」、「治療すること (treating)」、または「治療 (treatment)」は、該疾患または障害を、身体的に（例えば、識別できる症状の安定化）、生理的に（例えば、身体的パラメータの安定化）、またはその両方で調整することを指す。さらに別の実施形態において、「治療する (treat)」、「治療すること (treating)」、または「治療 (treatment)」は、該疾患または障害の発症、または発現、または進行の予防または遅延を指す。

【 0 0 1 8 】

本明細書で用いる場合、このような対象が、生物学的に、医学的に、または生活の質において、このような治療から利益を得る場合、対象は、治療を「必要としている」とする。

【 0 0 1 9 】

本明細書で用いる場合、対象化合物を「投与 (administration)」または「投与すること (administering)」という用語は、本発明の化合物およびそのプロドラッグを、治療を必要としている対象に提供することを意味する。1種または複数の追加の治療薬との「組合せ」投与は、任意の順序および任意の投与経路での、同時（併用）および継続的投与を含む。

【 0 0 2 0 】

組合せ相手の他の治療薬として、例えば、国際公開第 2 0 1 2 / 0 6 5 9 5 0 号パンフレットに開示されているような C D 4 0 に結合する抗体；A M G 5 5 7 などの誘導性 T 細胞共刺激分子；国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 7 0 8 2 号パンフレットに開示されているような B 細胞活性化因子受容体 (B A F F - R) を標的とする抗体；低用量 I L - 2、リツキシマブなどの抗 C D 2 0 抗体；ベリムマブなどの B 細胞活性化因子 (B A F F) を阻害する抗体；トシリズマブなどのインターロイキン - 6 受容体 (I L - 6 R) に対する抗体；アバタセプト；もしくはベラタセプト；さらにシクロスポリン点眼薬；メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、ハイドロキシクロロキン、および金塩などの疾患修飾性抗リウマチ薬 (D M A R D)；インフリキシマブおよびエタネルセプトなどの腫瘍壊死因子 (T N F) - α 阻害剤；イブプロフェンなどの非ステロイド系抗炎症薬；プレドニゾンなどの全身性副腎皮質ステロイド剤；またはアザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル、およびシクロホスファミドなどの他の免疫抑制剤が挙げられる。

【 0 0 2 1 】

組合せ相手の他の薬剤として、例えば、分泌促進剤；セビメリンおよびピロカルピンなどのムスカリン受容体作動薬；ガバペンチンもしくはプレガバリン；人工涙液；人工唾液；または膣エストロゲンクリームが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルア

10

20

30

40

50

ミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。好適な薬学的に許容される担体は、国際公開第2012/004299号パンフレットに記載されている。好ましい投与経路は経口である。

【0023】

一実施形態において、本発明は、治療有効量の1 - {(S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - ピリド[4, 3 - d]ピリミジン - 4 - イルアミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩および1種または複数の治療活性剤を含む組合せ物、特に医薬組合せ物を提供する。

10

【0024】

一実施形態において、本発明は、治療有効量の1 - {(S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - ピリド[4, 3 - d]ピリミジン - 4 - イルアミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンのリン酸塩および1種または複数の治療活性剤を含む組合せ物、特に医薬組合せ物を提供する。

【0025】

別の実施形態において、本発明は、pSSの治療の際、同時に、個別に、または連続して使用する組合せ製剤として、1 - {(S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - ピリド[4, 3 - d]ピリミジン - 4 - イルアミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容される塩および少なくとも1種の他の治療薬を含む製品を提供する。

20

【0026】

別の実施形態において、本発明は、pSSの治療の際、同時に、個別に、または連続して使用する組合せ製剤として、1 - {(S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - ピリド[4, 3 - d]ピリミジン - 4 - イルアミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンのリン酸塩および少なくとも1種の他の治療薬を含む製品を提供する。

【0027】

pSSの治療用の組合せ製剤として提供される製品は、1 - {(S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - ピリド[4, 3 - d]ピリミジン - 4 - イルアミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩および前記他の治療薬と同じ医薬組成物中に一緒に含む、または式(I)の化合物および前記他の治療薬を個別の剤形、例えば、キットの形態で含む組成物を含む。

30

【0028】

pSSの治療用の組合せ製剤として提供される製品は、1 - {(S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - ピリド[4, 3 - d]ピリミジン - 4 - イルアミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンのリン酸塩および前記他の治療薬と同じ医薬組成物中に一緒に含む、または式(I)の化合物および前記他の治療薬を個別の剤形、例えば、キットの形態で含む組成物を含む。

40

【0029】

したがって、本発明は、pSSの治療に使用するための1 - {(S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - ピリド[4, 3 - d]ピリミジン - 4 - イルアミノ} - ピロリジン - 1 - イル} - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩であって、別の治療薬と共に投与されるように調製される、薬剤を提供する。

【0030】

さらに、本発明は、pSSの治療のための別の治療薬の使用であって、該薬剤が、1 -

50

{ (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩と共に投与される、使用を提供する。

【 0 0 3 1 】

さらに、本発明は、p S S の治療法に使用するための 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩であって、別の治療薬と共に投与されるように調製される 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を提供する。

10

【 0 0 3 2 】

さらに、本発明は、p S S の治療法に使用するための別の治療薬であって、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩と共に投与されるように調製される、治療薬を提供する。

20

【 0 0 3 3 】

さらに、本発明は、p S S の治療法に使用するための 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩であって、別の治療薬と共に投与される 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を提供する。

【 0 0 3 4 】

さらに、本発明は、p S S の治療法に使用するための別の治療薬であって、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩と共に投与される、治療薬を提供する。

30

【 0 0 3 5 】

さらに、本発明は、p S S の治療のための、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩の使用であって、前記患者に、あらかじめ（例えば、24 時間以内）別の治療薬が投与されている、使用を提供する。

40

【 0 0 3 6 】

さらに、本発明は、p S S の治療のための別の治療薬の使用であって、前記患者に、あらかじめ（例えば、24 時間以内）1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩が投与されている、使用を提供する。

【 0 0 3 7 】

本発明は、p S S の治療に使用するための 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン -

50

1 - オンのリン酸塩であって、別の治療薬と共に投与されるように調製されるものを提供する。

【0038】

さらに、本発明は、pSSの治療のための別の治療薬の使用であって、該薬剤が、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩と共に投与される、使用を提供する。

【0039】

さらに、本発明は、pSSの治療法に使用するための1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩であって、別の治療薬と共に投与されるように調製される1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩を提供する。

10

【0040】

さらに、本発明は、pSSの治療法に使用するための別の治療薬であって、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩と共に投与されるように調製される、治療薬を提供する。

20

【0041】

さらに、本発明は、pSSの治療法に使用するための1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩であって、別の治療薬と共に投与される1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩を提供する。

30

【0042】

さらに、本発明は、pSSの治療法に使用するための別の治療薬であって、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩と共に投与される、治療薬を提供する。

【0043】

さらに、本発明は、pSSの治療のための、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩の使用であって、前記患者に、あらかじめ（例えば、24時間以内）別の治療薬が投与されている、使用を提供する。

40

【0044】

さらに、本発明は、pSSの治療のための別の治療薬の使用であって、前記患者に、あらかじめ（例えば、24時間以内）1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩が投与されている、使用を提供する。

【0045】

一実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメ

50

チル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 5 0 ~ 7 0 k g のヒト対象に対して約 1 0 ~ 1 0 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。
【 0 0 4 6 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 4 0 ~ 2 0 0 k g のヒト対象に対して約 1 0 ~ 1 0 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。

10

【 0 0 4 7 】

一実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 5 0 ~ 7 0 k g のヒト対象に対して約 1 0 ~ 1 0 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。

【 0 0 4 8 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 4 0 ~ 2 0 0 k g のヒト対象に対して約 1 0 ~ 1 0 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。

20

【 0 0 4 9 】

化合物、前記医薬組成物、またはその組合せ物の治療有効投与量は、体重、年齢、および個々の状態、または治療対象の障害または疾患の重症度によって異なる。通常の技術を有する医師または臨床医であれば、該障害または疾患の進行を予防、抑制、または阻止するために必要な各活性成分の有効量を速やかに決定し得る。

【 0 0 5 0 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 5 0 ~ 7 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。

30

【 0 0 5 1 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 4 0 ~ 2 0 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。

40

【 0 0 5 2 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 5 0 ~ 7 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。

【 0 0 5 3 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸

50

塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 4 0 ~ 2 0 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分を単位投与量とし得る。

【 0 0 5 4 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 5 0 ~ 7 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分で 1 日 2 回投与される。

【 0 0 5 5 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 4 0 ~ 2 0 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分で 1 日 2 回投与される。

10

【 0 0 5 6 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 5 0 ~ 7 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分で 1 日 2 回投与される。

20

【 0 0 5 7 】

別の実施形態において、1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩を含む、p S S の治療のための医薬組成物または組合せ物は、約 4 0 ~ 2 0 0 k g のヒト対象に対して約 7 0 m g の有効成分で 1 日 2 回投与される。

実験の詳細

【 0 0 5 8 】

出発物質の製造について特に記載のない限り、前記化合物は公知のものであるか、当技術分野において公知の方法または下記のとおりの方法に準じて調製されてもよい。

30

【 0 0 5 9 】

下記実施例は、限定することなく、本発明を例示するものである。

【 0 0 6 0 】

40

50

【表 1 - 1】

略記:

略記	説明	
Akt	PKB 参照	
APC	抗原提示細胞	
BCR	B 細胞受容体	
BD	Becton Dickinson	
b.i.d.	1 日 2 回(「bis in die」)	
BMMC	骨髄由来マスト細胞	10
BSA	ウシ血清アルブミン	
CsA	シクロスポリン A	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
EC ₅₀	50%の効果を示す濃度	
FACS	蛍光活性化細胞選別装置	
fMLP	N-ホルミルメチオニル-ロイシル-フェニルアラニン	
HEL	ニワトリ卵白リゾチーム	
IC ₅₀	50%の阻害を示す濃度	
IFNα	インターフェロンアルファ	
Ig	免疫グロブリン	20
IL	インターロイキン	
InsR	インスリン受容体	
LLOQ	定量下限値	
LPS	リポ多糖	
m-IL-3	マウス IL-3	
MLR	混合リンパ球反応	
mTOR	哺乳類ラパマイシン標的	
n.d.	未測定	
PBMC	末梢血単核球細胞	
pDC	形質細胞様樹状細胞	30
PDK1	3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ 1	
PH	プレクストリン相同ドメイン	
PI	ホスファチジルイノシトール	
PI3K	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ	
PKB	プロテインキナーゼ B(Akt としても周知)	
rIL-4	ラットインターロイキン-4	
RT	室温	
SCF	幹細胞因子	
SD	標準偏差	
SEM	平均値の標準誤差	40

【 0 0 6 1 】

【表 1 - 2】

略記	説明
Ser473	473 番目のセリン
Th	ヘルパーT 細胞
TLR	Toll 様受容体

【 0 0 6 2 】

希釈した全血中のヒト B 細胞活性化

方法．細胞表面 B 細胞受容体刺激時の B 細胞活性化に対する作用を評価するため、90 % ヒト全血中の B リンパ球を、化合物の量を漸増させながら、抗 I g M 抗体のみ (a I g M) を加え、または I L - 4 (a I g M / I L - 4) と組み合わせて加えて培養することによって刺激した。全血内の刺激は、生理的状态を密接に反映し、血漿タンパクと結合する可能性が考慮される。標的 P I 3 K に近位の経路を介した早期の活性化は、A k t リン酸化の阻害として確認された。

【 0 0 6 3 】

刺激時の B 細胞表面活性化マーカーに対する化合物 A の i n v i t r o 作用を評価するため、ヘパリン化全血 180 . 5 μ L を、あらかじめ希釈された化合物 A 9 . 5 μ L と共に 96 ウェル丸底マイクロタイタープレート (N u n c) にスパイクし、濃度範囲が 50 ~ 0 . 008 μ M の 2 倍希釈系列を得た。対照ウェルを D M S O で前処理し、最終濃度が 0 . 5 % の D M S O を得た。培養液を 2 組ずつ用意し、プレートシェーカー (30 秒、速度 900) で撹拌して十分に混合させ、上下にピペティングし、再度プレートシェーカーで撹拌した。培養液を 37 、5 % C O ₂ 下で 1 時間培養した。次に、記載されている刺激溶液 10 μ L を加え、上記のとおり混合し、培養液を 37 、5 % C O ₂ 下でさらに 24 時間培養した。

10

【 0 0 6 4 】

フローサイトメトリー分析

培養後、該培養液に、25 mM E D T A 溶液、p H 7 . 4 を 15 μ L / ウェルで加え、細胞凝集塊を崩した。試料を、プレートシェーカー (速度 900) で 15 分間撹拌して十分に混合した。細胞に蛍光標識抗体の混合液 25 μ L を加えて染色し、プレートシェーカー (30 秒間、速度 900) で混合させ、暗所、室温にて 30 分間培養した。F A C S 分析において、試料を、抗 h u C D 3 - A P C - C y 7 (B e c t o n D i c k i n s o n [B D] # 5 5 7 8 3 2) で染色することによって T 細胞をゲーティングし、また抗 h u C D 19 - A P C (B D # 5 5 5 4 1 5) で染色することによって B 細胞をゲーティングした。さらに、試料を、結果の項に記載されている下記の抗体の組合せで染色した：抗 h u C D 69 - P E - C y 7 (B D # 5 5 7 7 4 5) および抗 h u C D 86 - P E - C y 5 (B D # 5 5 5 6 5 9) 。

20

30

【 0 0 6 5 】

染色後、試料を、2 mL / ウェルの 1 $\times$ B D L y s i n g S o l u t i o n (B D # 3 4 9 2 0 2) を含有する 96 ディープウェル V 底マイクロタイタープレート (C o r n i n g # 3 9 6 0 9 6) に移した。プレートを上下にピペティングすることによって混合し、暗所、室温にて 10 分間培養した。プレートを 450 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、その上清を除去後、C e l l W A S H (B D # 3 4 9 5 2 4) 2 mL を各ウェルに加えた。プレートを 450 $\times$ g で 5 分間再度遠心分離し、その上清を除去し、細胞ペレットを C e l l W A S H 0 . 5 mL 中に再懸濁した。

【 0 0 6 6 】

データは、B D F A C S D i v a ソフトウェア (バージョン 4 . 1 . 2) を用いた B D L S R I I フローサイトメーターによって得られた。サイズおよび粒度に従った F S C / S S C ドットプロットにおいてリンパ球をゲーティングし、さらに C D 19、C D 3、および活性化マーカーの発現を解析した。データは、C D 19 + または C D 3 + 集団中の活性化マーカーに対して陽性染色された細胞の百分率として、ドットプロットから算出された。

40

【 0 0 6 7 】

統計的評価

信号雑音比 (S / N) は、活性化された血液試料からのマーカー陽性 B 細胞または T 細胞の百分率を、活性化されていない試料からのマーカー陽性 B 細胞または T 細胞の百分率で除することによって算出された。

50

【 0 0 6 8 】

薬剤に曝露させた後のB細胞またはT細胞活性化の阻害率は、下記の式によって算出された：

【 0 0 6 9 】

【数1】

$$\% \text{阻害} = 100 \times \frac{\text{薬剤不使用時の刺激-薬剤使用時の刺激}}{\text{薬剤不使用時の刺激-非刺激}}$$

10

非線形回帰曲線適合のため、ORIGIN7ソフトウェア(OriginLab Corporation, Northampton, MA)を使用した。50%阻害を生じる薬剤濃度(IC50)は、ヒルの式を阻害データに当てはめることによって得られた。

【 0 0 7 0 】

刺激の際の細胞内経路活性化マーカーであるpAktに対する化合物Aのin vitro作用を評価するため、ヘパリン化血液180μLを、あらかじめ希釈された化合物A10μLと共に5mL丸底チューブ(BD, cat#352063)に加え、濃度範囲が16666nM~0.8nMの希釈液を得た。対照試料をDMSOで前処理し、最終濃度が0.17%のDMSO溶液を得た。試料を2組ずつ用意し、ボルテックス(5秒間3回、速度1800)で撹拌して十分に混合させた。試料を水浴中37℃で1.5時間培養した(閉蓋)。次に、体積10μLの刺激溶液を加え、混合し(5秒間3回、速度1800)、水浴中37℃で20分間培養した。

20

【 0 0 7 1 】

細胞溶解、固定、および透過処理

培養後、2mLのあらかじめ加温した(水浴中37℃)BD Phosflow Lys e / F i x b u f f e r (BD, cat#558049)を各チューブに加え、ボルテックス(vortexer)で3秒間振盪し、水浴中37℃で20分間培養した。試料を、400gで5分間遠心分離した。遠心分離後、2mLのBD Phosflow Perm/wash buffer I (BD, cat#557885)を各チューブに加え、暗所、室温(RT)にて10分間培養した。400gで5分間遠心分離した後、ペレットを2mLのBD Phosflow Perm/wash buffer Iで洗浄し、再度400gで5分間遠心分離した。上清を除去し、試料を下記のとおり染色した。

30

【 0 0 7 2 】

フローサイトメトリー分析

pAktの分析のため、処理後のヒト血液試料を、抗huCD20(Alexa488標識抗huCD20, BD cat#558056)で染色することによって、サイトメトリー分析においてB細胞をゲーティングした。さらに、試料を、Alexa647コンジュゲート抗ヒトリン酸化Akt(Ser473; BD, cat#560343)で染色した。

【 0 0 7 3 】

染色工程は、BD Phosflow perm/wash buffer I中、暗所、RTにて30分間行われた。培養後、試料を、2mLのBD Phosflow perm/wash buffer Iで洗浄し、400gで5分間遠心分離し、ペレットを300μLのBD Stain Buffer (BD, cat#554656)に再懸濁した。データが、DIVA(バージョン6.1.2)ソフトウェアを用いたLSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences)によって取得されるまで、試料を氷冷した。サイズおよび粒度に従ったFSC/SSCドットプロットにおいてリンパ球をゲーティングし、さらにCD20の発現およびAktのリン酸化を解析した。データは、CD20+集団中のAkt-リン酸化に対して陽性染色された細胞の百分率として、ドットプロットまたはヒストグラムから算出された。上述のとおり、表面活性化マーカーに対する統

40

50

計的評価を行った。

【 0 0 7 4 】

【 表 2 】

結果.(表1)。

表1 全血中のヒトB細胞機能の阻害

基質	90%ヒト血液		
刺激	algM/IL-4		algM
読み出し	CD69	CD86	pAkt ^e
(A) IC ₅₀ [μM]	0.193 ^d	0.202 ^d	0.144

^d提示データは、少なくとも4回の独立した試験の平均値±SDである；

^e提示データは、少なくとも2回の独立した試験の平均値±SDである

10

20

【 0 0 7 5 】

B C R 刺激後のマウス B 細胞の増殖。

方法 . (Julius et al 1984) に記載されるとおり、化合物の量を漸増させながら、マウス B 細胞を抗 I g M 抗体によって B C R を介して刺激し、放射性 ³ H - チミジンの取込みによって増殖の評価を行った。

結果 . (表 2) 。

【 0 0 7 6 】

i n v i t r o における L P S に誘導されたマウス B 細胞からの抗体産生。

方法 . 若干の改良を加えた M o o n (Moon et al 1989) を応用した手順に従い、L P S に誘導された B 細胞機能について検討した：化合物の量を漸増させながら、B a l b / c n u / n u マウスの脾臓 B 細胞を、m I L - 4、m I L - 5、および L P S と共に培養した。最終濃度は、0 . 5 × 1 0 ⁵ 脾細胞 / ウェル、5 0 0 U / m L m I L - 4、5 0 0 U / m L m I L - 5、および 5 0 μ g / m L L P S であった。6 日間の培養後、抗体産生に関して、上清を E L I S A によって分析した。

結果 . (表 2) 。

【 0 0 7 7 】

マウス B C R 遺伝子組換え B 細胞の抗原提示およびサイトカイン産生。

方法 . M D 4 H E L B c R T g マウスからの C D 1 9 ⁺ 脾臓 B 細胞の精製
M D 4 H E L B c R 遺伝子組換え B 1 0 . B R (M D 4 B 1 0 . B R) マウスは、J o s e M o r e n o 教授 (R e s e a r c h U n i t o n A u t o i m m u n e D i s e a s e s , C e n t r o M e d i c o N a c i o n a l S i g l o X X I , M e x i c o) からの寄贈であった。

過量のイソフルラン曝露によって殺処分した後、M D 4 B 1 0 . B R マウスおよび非遺伝子組換えの同腹対照である B 1 0 . B R マウスから脾臓を単離した。単離した脾臓を、R P M I 1 6 4 0 (I n v i t r o g e n , # 3 1 8 7 0) に懸濁し、G e n t l e M A C S D i s s o c i a t o r (M i l t e n y i B i o t e c) によって解離させ、C e l l S t r a i n e r (B D F a l c o n , 7 0 μ m メッシュ、# 3 5 2 3 5 0) を用いて濾過した。赤血球を除去するため、単一脾臓細胞懸濁液を、さらに溶解緩衝液 (

30

40

50

Sigma、#R7757)で処理し、PBSで2回洗浄し、10%FBS、100U/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、および50μM 2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加したRPMI-1640からなる完全培養液に再懸濁した。さらに、提供された製造業者の指示に従って磁気細胞分離装置、AutoMACS(Miltenyi Biotec)を使用し、非B細胞を除去することによって脾臓B細胞の精製を行った。要約すると、0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)および2mMEDTAを添加したPBSであるMACS緩衝液40μLに懸濁した 1×10^7 個の脾臓細胞を、CD43(Ly48、ラットIgG2a)、CD4(L3T4、ラットIgG2b)、およびTer-119(ラットIgG2b)に対するモノクローナル抗体からなるビオチン-抗体カクテル10μLと共に氷冷下で15分間培養した。ビオチン-抗体カクテルで処理した後、脾臓細胞を、さらに抗ビオチン抗体30μLと共に氷冷下で15分間培養し、MACS緩衝液1mLに再懸濁してAutoMACSを介したB細胞の精製に用いた。AutoMACSを使用した精製において、「Deplete」プログラムを選択し、outlet port neg1からネガティブフラクションをB細胞に富んだ画分として採取した。この純度は、FACS分析で分離された画分中のCD19⁺細胞の割合によって決定され、95%を上回った。

10

【0078】

細胞染色およびFACS分析

精製したB細胞を、氷冷したFACS緩衝液(0.1%アジドおよび0.1%BSAを添加したPBS)50μLに再懸濁した。FACS緩衝液中の細胞懸濁液を、Fc block(ラット抗マウスCD16/CD32抗体、BD Pharmingen、#553142)1μLで、氷冷下にて10分間処理した。Fc blockで処理した後、B細胞集団を識別するため、細胞を抗CD19 PerCpを用い、氷冷下にて30分間染色し、さらに抗HEL48-61ペプチド/MHCクラスII I-Ak(Aw3.18.14)抗体、続いて抗マウスIgG1 PE抗体を用いて抗原提示活性と同じく細胞活性化を測定した。染色した細胞試料を、氷冷したFACS緩衝液5mLで2回洗浄し、FACS Calibur(BD Bioscience)を使用して分析した。Aw3.18.14抗体(Dadaglio G et al. 1997)を、ハイブリドーマ培養液(ATCC、#CRL2826)からAmicon遠心式30kdフィルター(Milliore、#LSK2ABA20)を用いて精製した。他のすべての抗体は、BD Bioscienceから購入した。

20

30

【0079】

FACSデータを分析し、平均蛍光強度(MFI)は、FlowJoソフトウェア(Tree Star Inc)によって算出された。IC₅₀値は、GraphPad PRISMバージョン6.0ソフトウェア(GraphPad Software Inc)によって算出された。

【0080】

MHC IIによる抗原提示の測定

100万個の脾臓細胞またはMD4 B10.BRマウスから精製したB細胞を、完全培養液500μLに懸濁し、24ウェルプレートに播種した。該細胞を化合物Aで30分間前処理し、さらに特定の濃度のHELタンパク質と共に37、5%CO₂下で一晩培養した。一晩培養後、該細胞を回収し、上述のとおり、FACS分析に用いてCD19⁺細胞上のHELペプチド/MHC II複合体の発現レベルを測定した。DMSO濃度は、0.1%を超えないように維持した。

40

【0081】

炎症性サイトカイン放出の測定

項2.1に記載されたとおり、MD4 B10.BRから精製した百万個のB細胞を、完全培養液200μLに懸濁し、可溶性CD40リガンドと共にHELタンパク質100μMによって、37、5%CO₂下で48時間刺激した。刺激する30分前に、化合物Aを該培養液に加えた。HELタンパク質による刺激後、培養液上清を回収し、提供され

50

た製造業者 (R & D s y s t e m s) の指示に従った E L I S A による、 I L - 6 およ
び T N F α の測定に用いた。該データは、 3 つの試料から得た濃度の平均 (p g / m L)
として示され、 I C ₅₀ 値は、上述のとおり算出された。 D M S O 濃度は、 0 . 1 % を超
えないように維持した。

結果 . (表 2) 。

【 0 0 8 2 】

【表 3 】

表2 マウスB細胞機能の阻害

基質	マウス脾臓		マウス BCR tg B 細胞		
刺激	抗 IgM	LPS/ IL-4	ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)		
読み出し	増殖	IgM	APC 機能	IL-6	TNF α
(A)					
IC ₅₀ [μ M]	0.008 ^a	0.234 ^a	0.395 ^b	0.022 ^a	0.028 ^a

10

^a 提示データは、少なくとも 2 回の独立した試験の平均値である;^b 提示データは、少なく
とも 4 回の独立した試験の平均値である

20

【 0 0 8 3 】

ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) のケモカイン産生

方法 .

P B M C の単離

胚中心の形成に関わるケモカイン産生における化合物 A の作用を評価するため、 P B M
C を、 L e u c o s e p チューブ (G r e i n e r B i o - o n e # 2 2 7 2 8 9) 中
のパフィーコート (I n t e r - R e g i o n a l e B l u t s p e n d e o f t h e
S w i s s R e d C r o s s から入手) から、 F i c o l l - P a q u e p l u s
(G E h e a l t h c a r e # 1 7 - 1 4 4 0 - 0 3) を用い、標準的なフィコール
勾配遠心分離によって単離した。細胞を、 P B S で 2 回洗浄し、その後 1 0 % F B S、ゲ
ンタマイシン (5 0 μ g / m L)、インスリン - トランスフェリン - セレン、および β -
メルカプトエタノール (5 0 μ M) を添加した R P M I 1 6 4 0 培養液に $2 . 2 \times 1 0 ^ 6$
/ m L で再懸濁した。

30

【 0 0 8 4 】

P B M C の刺激

P B M C を、 4 8 ウェルプレート (C o s t a r # 3 5 4 8) に分注し、あらかじめ
希釈された化合物 A と共に培養し、最終濃度 0 . 3、1、または 3 μ M の希釈液を得た。
対照試料を D M S O で前処置し、最終濃度 0 . 0 3 % の D M S O 溶液を得た。試料を十分
に混合し、加湿インキュベーターで 3 7 $^{\circ}$ にて 1 時間培養した。その後、 T L R 9 アゴニ
ストである O D N M 3 6 2 (I n v i v o g e n、 # t l r 1 - m 3 6 2) を最終濃度
3 0 μ g / m L で、または抗 I g M - デキストラン (F i n a b i o s o l u t i o n
0 0 0 4) を最終濃度 2 μ g / m L で添加し、細胞を刺激した。対照試料は刺激せず
においた。試料を十分に混合し、加湿インキュベーターで 3 7 $^{\circ}$ にて 2 4 時間培養した。

40

【 0 0 8 5 】

サイトカイン / ケモカイン検出

刺激後、培養液上清を回収し、 B i o - P l e x 多重免疫測定法 (C X C L 1 3 ; B i
o R a d # 1 7 1 B K 1 2 M R 2) もしくは M S D V - P l e x 測定法 (I P - 1 0
; M e s o S c a l e D i a g n o s t i c s) によって、または製造業者の指示に従

50

って、ケモカインを定量化した。

結果。(表3および4)。

【0086】

【表4】

表3 TLR9 リガンド誘導性の CXCL13 産生の阻害

刺激	非添加	ODN	ODN	ODN	ODN
化合物 A (nM)	非添加	非添加	3000	1000	300
ドナー1	1 ^a	61	41	42	51
ドナー2	1	19	4	6	8
ドナー3	0	14	5	7	8
ドナー4	1	9	3	3	3
ドナー5	1	63	29	42	39
ドナー6	4	202	86	84	113
平均	1	61	28	31	37
SD	1	73	33	32	42
%阻害			55	51	40

^a pg/mL で表示した測定された培養液上清中の CXCL13 の量

【0087】

【表5】

表4 抗 IgM-デキストランリガンド誘導性の IP-10 産生の阻害

刺激	非添加	抗 IgM- デキストラン	抗 IgM- デキストラン	抗 IgM- デキストラン	抗 IgM- デキストラン
化合物 A (nM)	非添加	非添加	3000	1000	300
ドナー1	117	3026	715	1624	2764
ドナー2	48	106	93	71	79
ドナー3	15	77	27	29	32
ドナー4	17	35	34	42	37
ドナー5	88	1460	899	1010	1233
ドナー6	442	58	59	52	52
平均	121	794	305	471	699
SD	162	1227	394	683	1117
%阻害			62	41	12

^a pg/mL で表示した測定された培養液上清中の IP-10 の量

【0088】

C X C L 1 3 誘導性の B 細胞遊走

方法 .

バフィーコートからの B 細胞単離

上記のとおり、P B M C をバフィーコートから単離した。細胞を、P B S で 2 回洗浄し、その後 2 % F B S および 1 m M E D T A を含む P B S に $5 \times 10^7 / \text{mL}$ で再懸濁した。さらに、製造業者の指示に従い、E a s y S e p (商 標) H u m a n B C e l l E n r i c h m e n t K i t (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s # 1 9 0 5 4) を用いた非 B 細胞の除去によって B 細胞の精製を行った。要約すると、分離緩衝液 8 m L 中の 4×10^8 P B M C を、1 4 m L 丸底チューブ中で濃縮カクテル 4 0 0 u L と共に、室温にて 1 0 分間培養した。P B M C を、さらに磁性粒子 6 0 0 u L と共に、室内

10

20

30

40

50

で5分間培養した。B細胞単離のため、該チューブを磁石内に5分間静置し、濃縮したB細胞を新たな14mLチューブに回収した。その後、細胞を洗浄し、10%FBS、ゲンタマイシン(50ug/mL)、インスリン-トランスフェリン-セレン、およびβ-メルカプトエタノール(50uM)を添加したRPMI1640培養液に 5×10^6 /mLで再懸濁した。

【0089】

96ウェルtranswellプレートにおける遊走アッセイ

単離したB細胞を5mL丸底チューブ(Costar #352054)に分注し、あらかじめ希釈された化合物Aと共に培養して最終濃度10、1、0.1または0.01μMの希釈液を得た。対照試料をDMSOで前処理し、最終濃度が0.1%のDMSO溶液を得た。試料を十分に混合し、水浴中37℃で30分間培養した。希釈液中の最終濃度が100nMのCXCL13(R&D Systems #801-CX)約235μLを、96ウェルtranswellのレシーバープレート(Costar #3387)のウェルに添加した。対照ウェルには、培養液235μLを充填した。5μmパーミアブルサポートのインサートをレシーバープレートに取り付け、あらかじめ培養したB細胞80μLを充填した。transwellプレートを、加湿インキュベーターで37℃にて3時間培養した。パーミアブルサポートのインサートを取り外し、レシーバープレート中の細胞数をフローサイトメトリーによって測定した。

結果。(表5)。

【0090】

【表6】

表5 CXCL13誘導性のB細胞遊走の阻害

刺激	非添加	CXCL13	CXCL13	CXCL13	CXCL13	CXCL13
化合物A (nM)	非添加	非添加	10000	1000	100	10
細胞数 ^a	737	6981	2043	3743	4556	6165
SD	42	478	353	594	317	953
%阻害	100	0	79	52	39	13
StD	1	8	6	10	5	15

^a4つウェルの平均値

【0091】

試験化合物のラットへの単回経口投与によるex vivoにおけるAkt-リン酸化の時間依存的な阻害

方法.

動物

すべての試験は、体重220~280gの成体雄Lewisラット(LEW/Han/Hsd、Charles River、Germany and LEW/Orl@Rj、Janvier、France)を用いて実施された。

【0092】

管理状態

動物は、従来の衛生環境で飼育し、通常食を与え、水を自由に摂取させた。試験前および試験中、餌および水の摂取は無制限とした。

【0093】

試薬

高分子量ヘパリンナトリウム(B. Braun、Melsungen、Germany; 5000IU/mL)を抗凝固剤として使用した。ヤギ抗ラットIgM抗体は、Serotec、Dusseldorf Germanyから入手した(cat#302001)。BD Phosflow Lyse/Fix buffer Iは、BD bio

sciencesから入手した(cat#558049)。組換えラットIL-4(BD、cat#555107)は、一定量に分割し、-80で保存した。

【0094】

薬剤およびin vivoにおける薬剤適用

投与のための懸濁液を新たに調製し、暗所、室温にて保存した。化合物A 14.8 mgを、0.5% Tween 80と共に、0.5% CMC 5.92 mLに懸濁した。次に、乳白色で均一な懸濁液を前記動物に適用した。試験物質は、体積4 mL/kg体重、つまり10 mg/kgの経口用量で経口投与された。

【0095】

採血

動物には、FluVacエアフローシステム(airflow system)を用いてイソフルランで麻酔をかけた。全血は、投与前ならびに投与後1、2、4、6、8、10、12および24時間の時点で、舌下から採取した。薬力学分析のため、ラット血液100 μLを、時点毎にヘパリンナトリウム(B. Braun、Melsungen、Germany; 5000 IU/mL) 30 IUの入ったEppendorfチューブに採取した。薬物動態分析のため、ラット血液150 μLを、時点毎にEDTAでコーティングしたEppendorf(Milian cat#TOM-14)チューブに採取した。

【0096】

薬物動態分析

薬物動態分析のため、各全血試料150 μLを、分析前に-80で保存した。内部標準(濃度=400 ng/mL) 20 μLを各全血試料の80 μLアリコートに添加後、アセトニトリル400 μLを加えて沈殿させ、細胞およびタンパク質を遠心分離によって除去した。次に、該有機上層を蒸発乾固した。該残渣は、0.2%のギ酸を含有する50%アセトニトリル中に溶解させ、これを0.2%ギ酸で希釈し、遠心分離した後、分析前に10で保存した。校正のため、8つのブランク全血試料に、1~5000 ng/mLの量の化合物を添加した。精度および回収率管理試料は、100 ng/mLとした。

【0097】

分析のため、各試料抽出物の10 μLアリコートをLC-MS-MSシステムに注入した。化合物は、0.2%のギ酸を含有する5 mMギ酸アンモニウムから5%のメタノールを含有するアセトニトリルまでの直線勾配を用いたReprosil-pur C18逆相カラムで5分以内に分離させた。検出には、451.2 m/z→247.0 m/zの質量遷移を伴う、MRMによる質量分析が用いられた。APエレクトロスプレー源における該カラム溶出液のイオン化後、化合物Aおよび内部標準は、それらの[MH]⁺プロダクトイオンとして検出された。

【0098】

化合物A濃度は、MS/MSシグナルの相対強度から得られた抽出されたピーク面積比に基づき、XCalibur(登録商標)およびExcel(登録商標)によって算出された。該LOQは1 ng/mLに決定し、1 ng/mLから1000 ng/mLの間の校正精度は5%よりも高かった。前記QC試料(n=5、100 ng/mL)の精度は4.7% RSDよりも高く、前記回収率は102.6%であった。

【0099】

in vitroにおける全血刺激

薬剤を投与した動物から採取した血液のex vivo分析のため、採血直後、5 mL丸底チューブ(BD、cat#352063)中でヘパリン化血液90 mLをRPMI培養液(Gibco、cat#31870) 100 mLと混合し、抗ラットIgMの最終濃度が50 mg/mLおよびrIL-4の最終濃度が10 ng/mLの抗ラットIgM/rIL-4 10 μLで活性化した。対照試料は刺激せずにおいた。試料を十分に混合し、水浴中37で10分間培養した。

【0100】

細胞溶解、固定、および透過処理

10

20

30

40

50

培養後、あらかじめ加温した（水浴中37℃）BD Phosflow Lyse/Fix buffer 2mLを各チューブに加えた。試料を十分に混合し、水浴中37℃で20分間培養した。次に、試料を400gで5分間遠心分離した。遠心分離後、BD Phosflow Perm/wash buffer 2mLを各チューブに加えた。試料を十分に混合し、暗所、室温（RT）にて10分間培養した。その後、試料をドライアイス上で急速凍結し、次に、FACS染色まで-80℃で保存した。

【0101】

フローサイトメトリー分析

解凍のため、試料すべてを水浴中25℃で10分間培養した。400gで5分間遠心分離後、ペレットをBD Phosflow Perm/wash buffer 2mLで洗淨し、さらに400gで5分間遠心分離した。上清を除去した。pAktの分析のため、試料をPE標識抗ラットIgM（BD、cat#553888）で染色することによって、FACS分析においてB細胞をゲーティングした。さらに、試料をAlexa647コンジュゲート抗リン酸化Akt（Ser473；BD、cat#560343）で染色した。染色工程は、全量100μLのBD Phosflow perm/wash buffer中、暗所、RTにて30分間行われた。培養後、試料を2mLのBD Phosflow perm/wash bufferで洗淨し、400gで5分間遠心分離し、ペレットを300μLのBD Stain Buffer（BD、cat#554656）中に再懸濁した。データが、DIVAソフトウェア（バージョン6.1.2）を用いたLSRIIFローサイトメーター（BD Biosciences）によって取得されるまで、試料を氷冷した。サイズおよび粒度に従ったFSC/SSCドットプロットにおいてリンパ球をゲーティングし、さらにIgMの発現およびAktのリン酸化を解析した。データは、IgM+集団中のAkt-リン酸化に対して陽性染色された細胞の百分率として、ドットプロットまたはヒストグラムから算出された。

【0102】

統計的評価

ex vivoにおける薬剤の作用は、フローサイトメトリーによって測定されたAkt-リン酸化の阻害として現れた。Akt-リン酸化の阻害百分率は、下記の式によって算出された：

【0103】

【数2】

$$\% \text{阻害} = 100 \times \frac{\text{薬剤不使用時の刺激} - \text{薬剤使用時の刺激}}{\text{薬剤不使用時の刺激} - \text{非刺激}}$$

結果．（表6）。

【0104】

10

20

30

40

50

【表 7】

表6 ラットにおけるAkt-リン酸化の時間依存的な阻害

時点[時間]	IgM+B 細胞における pAkt の%阻害					
	ラット 1	ラット 2	ラット 3	ラット 4	平均値	SD.
0	-2.0	15.7	6.9	-20.6	0.0	15.5
1	100.0	98.2	95.6	99.1	98.2	1.9
2	100.9	97.3	101.8	98.2	99.6	2.1
4	93.8	100.0	105.3	81.4	95.1	10.3
6	76.1	99.1	94.7	83.1	88.2	10.6
8	83.1	83.1	85.8	65.4	79.4	9.4
10	69.0	74.3	76.9	62.7	70.7	6.3
12	74.3	71.6	73.4	69.0	72.1	2.3
24	30.8	40.6	37.0	12.2	30.2	12.6

10

【0105】

4匹のLewisラットの群に、化合物A 10mg/kgを単回経口投与した。方法の項に記載されたとおり、表示された時点において、50%ラット全血を抗ラットIgM/rIL-4で刺激し、Akt-リン酸化を判定した。データは、個々の値およびSDと共に4匹の動物の平均値を示す。

20

【0106】

ヒトの血漿における化合物Aの薬物動態分析

方法．全血試料は、直接静脈穿刺または前腕静脈に挿入した留置カニューレのいずれかによって得られた。血液試料を、エチレンジアミン・四酢酸三カリウム(K₃EDTA)を含むチューブに採取し、60分以内に3～5で遠心分離して血漿を分離した。得られた血漿を凍結し、薬剤濃度を測定するまで-20で保存した。

【0107】

血漿中の化合物A濃度を検証済みエレクトロスプレーイオン化液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(HPLC-MS/MS)を用いてポジティブイオンモードで数値化した。簡潔に述べると、血漿試料40μLを96ウェルプレート上のImpactタンパク質沈殿プレートに移した。75%アセトニトリル水溶液で調製して4ng/mLに希釈した内部標準[13CD3]化合物A150μLを、96ウェルプレートに添加してボルテックスで混合した。対照ブランク試料として、体積150μLの内部標準を含まない75%アセトニトリル水溶液を代わりに添加した。プレートをフィルムで密封して10分間振盪し、遠心分離した(10分間、2250g、4)。体積4μLの試料抽出物をLC/MS/MSシステム(API4000、Applied Biosystems)に注入した。

30

【0108】

化合物Aのクロマトグラフィー分離を、Ascenis 2.7μm C18、50×2.1mm(Sigma-Aldrich)を用い、40、流速1.00mL/分で実施した。Aを含む移動相：0.1%ギ酸水溶液およびB：0.1%ギ酸アセトニトリル溶液。移動相B10%の初期条件を最初の0.3分間維持し、該移動相Bの組成を次の0.3分間に50%まで直線的に増加させ、10分間に95%まで急増させ、その後10%まで戻した。化合物Aの保持時間およびその内部標準は約1.4分であった。化合物Aおよび[13CD3]化合物Aの選択された質量遷移は、それぞれ451.2→247.1、174.1および455.3→251.2、174.2、124.2であった。

40

【0109】

校正標準のピーク面積比(化合物A対[13CD3]化合物A)を用い、重み付けした

50

(1 / 濃度の二乗) 二次の最小二乗回帰アルゴリズムを適用することによって、検量線を作成した。

【0110】

臨床試料中の化合物A濃度は、前記検量線に対するそのピーク面積比から逆算された (Analys t software)。該方法は、LLOQを3 ng / mLとして3 ng / mL ~ 1000 ng / mLの範囲で問題なく検証された。7つの校正標準によって該ダイナミックレンジをカバーした。該方法は、直線性 (検量線からの校正標準の偏差 15 % (LLOQでは 20 %))、日間および日内の精度および正確さ (公称値の平均バイアス 15 % (LLOQでは 20 %)) ; 正確さ 15 % (LLOQでは 20 %))、さらにキャリーオーバー反応に関する所定の受入基準を満たした。

10

結果。(図1)。

【0111】

刺激した / 非刺激の臨床全血試料におけるB細胞中のpAktの測定

方法。

採血および細胞刺激

Aktリン酸化として測定されるヒトB細胞活性化に対する化合物Aのin vivo作用の評価のため、臨床試料を、Na-ヘパリンmonovetteシステムを用いて全血から調製した。

【0112】

次に、全血を、抗IgM / IL-4 (7.5 μg / mLの抗IgM [Southern Biotech] および7.5 ng / mLのIL-4 [R&D]) またはPBS (非刺激試料) のいずれかと共に培養した。培養は、プレートフォーマット中の血液95 μL (2組ずつ) を用い、採血後1時間以内に実施された。培養液を、穏やかに上下にピペティングすることによって十分に混合し、37 °Cで培養した (インキュベーター内、5% CO₂)。30分後、全血は、BD PhosFlow - Lyse / Fix buffer (1600 μL) を用い、暗所、37 °C (水浴) で20分間溶解および固定された。溶解および固定された血液試料を、速やかに凍結し、次の工程まで-80 °Cで保存した。

20

【0113】

B細胞活性化マーカーの染色

臨床試料は、採血後1週間以内に処理された。解凍が完了した後 (37 °Cの水浴)、試料を、室温にて、502 g (1580 rpm) で5分間遠心分離した。次に、ペレット化した細胞を、氷冷したBD PhosFlow Perm II buffer 500 μLで洗浄し、十分に混合して30 ~ 35分間氷冷した。培養後、FACS緩衝液1200 μLを加え、細胞を、室温にて650 g (1800 rpm) で10分間遠心分離した。上清を除去し、上述のとおり、該試料を再度洗浄した。染色工程は、直接染色 (Per - CP - Cy5.5 - 標識抗ヒトCD20 [BD cat # 558021] およびAlexa Fluor (登録商標) 488コンジュゲート抗ヒト総Akt [Cell Signaling cat # 29175] を使用) およびpAkt (Ser473) (Cell Signaling cat # 4058L) に対する間接染色の両方から構成された。第一に、細胞を一次抗体 (総体積50 μL) と共に、暗所、室温にて30 ~ 35分間培養し、続いて、FACS緩衝液 (1200 μL) で洗浄し、RTにて650 g (1800 rpm) で10分間遠心分離した。さらに、ペレット化した細胞を二次Ab (総体積50 μL) と共に、暗所、RTにて15 ~ 17分間培養し、続いて、FACS緩衝液 (1200 μL) で洗浄し、RTにて650 g (1800 rpm) で10分間遠心分離した。洗浄工程の繰り返し後 (FACS緩衝液1200 μL、RTにて650 gで10分間遠心分離)、細胞を1% PFA (PBS中) 300 μLに再懸濁し、5 mLポリスチレンチューブに移した。

30

40

【0114】

データ取得および分析

同日、試料を分析した。データ取得は、DIVAソフトウェアを用いたFACS Cant o IIによって高流速で行った。ゲーティングは以下のとおり行った: 第一に、F

50

SC - A 対 FSC - H のドットプロットを用いてダブレットを除去した。次に、白血球にゲートを作成するため、FSC - A 対 SSC - A のドットプロット上に単一細胞を表示した。CD 20 対 SSC - A のドットプロットを作成し、白血球を表示した。CD 20 - 陽性 B 細胞に基づき、pAkt に対するヒストグラムプロットを作成した。非刺激試料を用いて、陽性および陰性 pAkt 集団に対するインターバルゲートを設定した。データは、ベースライン値と比較した pAkt の % 阻害として算出された。

結果：(図 1)。

【0115】

化合物 A は、PI3K / Akt 経路に対する用量 - 、濃度 - 、および時間 - 依存的な阻害を示す。化合物 A 80 mg の単回投与後、12 時間にわたり 80 % を超える経路阻害が達成される。化合物 A に関する用量反応相関のモデリングによって、経路阻害を 24 時間にわたり維持することは、1 日 2 回の投与計画によって保証され得ることが示唆される。また、本発明は以下を提供する。

10

[1]

原発性シェーグレン症候群の治療に使用するための 1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンまたは薬学的に許容されるその塩。

[2]

1 - { (S) - 3 - [6 - (6 - メトキシ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ] - ピロリジン - 1 - イル } - プロパン - 1 - オンのリン酸塩である、[1] に記載の使用のための化合物。

20

[3]

治療有効量の、[1] または [2] に記載の使用のための化合物と 1 種または複数の薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

[4]

治療有効量の、[1] または [2] に記載の使用のための化合物と 1 種または複数の治療活性剤とを含む組合せ物。

[5]

約 40 ~ 200 kg のヒト対象に対する単位投与量が、有効成分 10 ~ 100 mg である、[1] または [2] に記載の使用のための化合物。

30

[6]

約 50 ~ 70 kg のヒト対象に対する単位投与量が、有効成分 70 mg である、[1] または [2] に記載の使用のための化合物。

[7]

投与が 1 日 2 回である、[5] または [6] に記載の使用のための化合物。

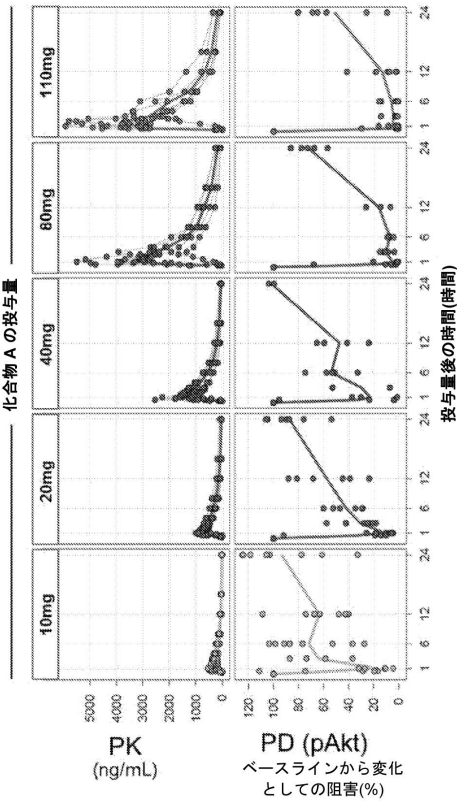
40

50

【図面】

【図 1】

図1



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

スイス国 バーゼル 4 0 0 2 , ポストファッハ , ノバルティス インスティテューツ フォー バイ
オメド・リサーチ , ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者 バークハート , クリストフ

スイス国 バーゼル 4 0 0 2 , ポストファッハ , ノバルティス インスティテューツ フォー バイ
オメド・リサーチ , ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者 クリスト , アンドレア

スイス国 バーゼル 4 0 0 2 , ポストファッハ , ノバルティス インスティテューツ フォー バイ
オメド・リサーチ , ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者 デバック , ステファン

スイス国 バーゼル 4 0 0 2 , ポストファッハ , ノバルティス インスティテューツ フォー バイ
オメド・リサーチ , ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者 カリス , クリストフ

スイス国 バーゼル 4 0 0 2 , ポストファッハ , ノバルティス インスティテューツ フォー バイ
オメド・リサーチ , ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者 リンドグレーン , サム

スイス国 バーゼル 4 0 0 2 , ポストファッハ , ノバルティス インスティテューツ フォー バイ
オメド・リサーチ , ノバルティス ファーマ アーゲー

審査官 金子 亜希

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 3 5 4 1 1 (J P , A)

P N A S , 2006年 , 103(45) , 16882-16887

Clin Exp Rheumatol , 2007年 , 25(6) , 831-837

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 5 1 9

A 6 1 P 3 7 / 0 2

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)