

(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2017-528452

(P2017-528452A)

(43) 公表日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 265 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-511233 (P2017-511233)	(71) 出願人	508188868
(86) (22) 出願日	平成27年8月25日 (2015.8.25)		ユニバーシティ・オブ・キャンベラ
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月22日 (2017.3.22)		University of Canbe
(86) 国際出願番号	PCT/AU2015/050489		rra
(87) 国際公開番号	W02016/029262		オーストラリア2617オーストラリアン
(87) 国際公開日	平成28年3月3日 (2016.3.3)		・キャピタル・テリトリー、ブルース、ユ
(31) 優先権主張番号	2014903345		ニバーシティ・ドライブ
(32) 優先日	平成26年8月25日 (2014.8.25)	(74) 代理人	100100158
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100150500
			弁理士 森本 靖
		(74) 代理人	100176474
			弁理士 秋山 信彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん幹細胞を調節するための組成物およびその使用

(57) 【要約】

がん幹細胞を調節するための組成物および方法を開示する。さらに詳しくが、本発明が、がん幹細胞などのLSDおよび/またはPKC- θ 過剰発現細胞の増殖を阻害するため、化学薬剤またはがん細胞への放射線照射の生物学的効果を増強するため、非転移性および転移性がんなどのがんを治療するため、および/またはがん再発を予防するためのリジンデメチラーゼ (LSD) 阻害剤およびプロテインキナーゼCシータ阻害剤 (PKC- θ) の使用を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる組成物。

【請求項 2】

LSD阻害剤が、LSD1阻害剤である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

LSD阻害剤が、LSD2阻害剤である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

LSD1阻害剤が、選択的LSD1阻害剤である、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 5】

LSD2阻害剤が、選択的LSD2阻害剤である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

LSD阻害剤が、Pan-LSD阻害剤である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

LSD阻害剤が、非選択的LSD阻害剤である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

PKC- θ 阻害剤が、選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項 1～7 のいずれか 1 つに記載の組成物。

20

【請求項 9】

PKC- θ 阻害剤が、非選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項 1～7 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 10】

医薬的に許容しうる担体をさらに含む、請求項 1～7 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 11】

LSD過剰発現細胞、PKC- θ 過剰発現細胞、ならびにLSD-およびPKC- θ 過剰発現細胞から選ばれるEMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも 1 つを変更するためのLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の使用。

【請求項 12】

30

がんを治療または予防するためのLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の使用。

【請求項 13】

がんが、非転移性がんである、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

がんが、転移性がんである、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 15】

がんの再発を阻止または防止するためのLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の使用。

【請求項 16】

がんが、非転移性がんである、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

40

がんが、転移性がんである、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 18】

LSD阻害剤が、LSD1阻害剤である、請求項 11～17 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 19】

LSD阻害剤が、LSD2阻害剤である、請求項 11～17 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 20】

LSD1阻害剤が、選択的LSD1阻害剤である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 21】

LSD2阻害剤が、選択的LSD2阻害剤である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 22】

50

LSD阻害剤が、Pan-LSD阻害剤である、請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 2 3】

LSD阻害剤が、非選択的LSD阻害剤である、請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 2 4】

PKC- θ 阻害剤が、選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項 1 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 2 5】

PKC- θ 阻害剤が、非選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項 1 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 2 6】

LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤が、これらの用途のための医薬として調製または製造される、請求項 1 1 ~ 2 5 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 2 7】

LSD過剰発現細胞、PKC- θ 過剰発現細胞およびLSD-およびPKC- θ 過剰発現細胞から選ばれるEMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも 1 つを変更する方法であって、

細胞を、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の形成、増殖、維持、生存率、生存能力、EMTまたはMETを調節するのに十分な量で、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤に接触させることを含むか、それらのことからなるか、または、本質的にそれらのことからなる方法。

【請求項 2 8】

EMT調節遺伝子過剰発現細胞が、CSCおよび非CSC腫瘍細胞から選ばれる、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

CSCおよび／または非CSC腫瘍細胞が、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫CSCおよび非CSC腫瘍細胞から選ばれる、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

CSCおよび／または非CSC腫瘍細胞が、乳腺CSCまたは非CSC腫瘍細胞(たとえば、乳管上皮CSCまたは非CSC腫瘍細胞などの乳腺上皮CSCまたは非CSC腫瘍細胞)である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

EMT調節遺伝子過剰発現細胞におけるPKC- θ の過剰発現が、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の核中のPKC- θ の存在または増加した量を含む、請求項 2 7 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 2】

EMT調節遺伝子過剰発現細胞をLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と接触させる前に、EMT調節遺伝子過剰発現細胞中のEMT調節遺伝子(たとえば、LSD(たとえば、LSD1および／またはLSD2)および／またはPKC- θ)の過剰発現を検出すること(たとえば、正常な細胞(たとえば、正常な乳腺細胞)中のEMT調節遺伝子の発現と比較して)をさらに含む、請求項 2 7 ~ 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

CSC中のEMT調節遺伝子の過剰発現を検出することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

非CSC腫瘍細胞中のEMT調節遺伝子の過剰発現を検出することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

CSCおよび非CSC腫瘍細胞中のEMT調節遺伝子の過剰発現を検出することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

10

20

30

40

50

EMT調節遺伝子過剰発現細胞をLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と接触させる前に、PKC- θ 過剰発現細胞の核中のPKC- θ の存在または増加した量を検出すること(たとえば、正常な細胞(たとえば、正常な乳腺細胞)の核中のPKC- θ の量と比較して)をさらに含む、請求項27～30に記載の方法。

【請求項37】

CSCの核中のPKC- θ の存在または増加した量を検出することを含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

非CSC腫瘍細胞の核中のPKC- θ の存在または増加した量を検出することを含む、請求項36に記載の方法。

10

【請求項39】

CSCおよび非CSC腫瘍細胞の核中のPKC- θ の存在または増加した量を検出することを含む、請求項36に記載の方法。

【請求項40】

EMT調節遺伝子過剰発現細胞をLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と接触させる前に、EMT調節遺伝子過剰発現細胞中のCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することをさらに含む、請求項27～30に記載の方法。

【請求項41】

CSC中のCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することを含む、請求項40に記載の方法。

20

【請求項42】

非CSC腫瘍細胞中のCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

CSCおよび非CSC腫瘍細胞中のCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項44】

EMT調節遺伝子過剰発現細胞をLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と接触させる前に、EMT調節遺伝子過剰発現細胞中のクロマチンへのPKC- θ の結合を検出することをさらに含む、請求項27～30に記載の方法。

30

【請求項45】

CSC中のクロマチンへのPKC- θ の結合を検出することを含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

非CSC腫瘍細胞中のクロマチンへのPKC- θ の結合を検出することを含む、請求項44に記載の方法。

【請求項47】

CSCおよび非CSC腫瘍細胞中のクロマチンへのPKC- θ の結合を検出することを含む、請求項44に記載の方法。

【請求項48】

EMT調節遺伝子過剰発現細胞が、1種以上のCSCマーカーを発現することを含む、請求項27～47に記載の方法。

40

【請求項49】

CSCマーカーが、ABCB5、ALDH1、ABCG2、 α_6 インテグリン、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリン、 β -カテニン活性、CD15、CD13、CD20、CD24、CD26、CD29、CD44、CD90、CD133、CD166、CD271、c-Met、ヘッジホッグ-Gli、ネスチン、CXCR4、LGR5、Trop2およびノーダル-アクチビンから選ばれる、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

CSCが、ALDH1、CD24、CD44、CD90、CD133、ヘッジホッグ-Gli、 α_6 インテグリンから選ばれる1つまたはそれ以上の(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の)CSC

50

マーカーを発現する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

CSCが、CD24およびCD44(たとえば、CD44^{high}、CD24^{low})を発現する、請求項 49 または請求項 48 に記載の方法。

【請求項 52】

CSCが、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫CSCから選ばれる、請求項 27～51 に記載の方法。

【請求項 53】

CSCが、乳がんCSCである、請求項 27～51 に記載の方法。

【請求項 54】

CSCが、多能性幹細胞マーカーOct4またはSox2の発現を障害しているか、また廃止しているか、または多能性幹細胞上のこれらのマーカーのレベルまたは機能的活性の約1/5、1/10、1/20、1/50、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} または約 10^{-15} 未満のレベルまたは機能的活性でこれらマーカーの一方または両方を発現する、請求項 27～53 に記載の方法。

【請求項 55】

患者においてがん再発を減少させることを含むがん(たとえば、原発性がんまたは転移性がん)を治療または予防する方法であって、前記がんが少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞を含み、

LSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を有効量で患者に同時に投与して、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更することを含むか、それらのことからなるか、または本質的にそれらのことからなる、方法。

【請求項 56】

LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤が、有効量で患者に同時に投与されて、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力および/または(vi)EMTを阻害するか、または、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞の(vii)METを刺激もしくは誘導する、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

LSD阻害剤が、選択的LSD阻害剤(たとえば、選択的LSD1阻害剤または選択的LSD2阻害剤)である、請求項 55 または請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

LSD阻害剤が、Pan-LSD阻害剤である、請求項 55 または請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

LSD阻害剤が、非選択的LSD阻害剤である、請求項 55 または請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】

PKC- θ 阻害剤が、選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項 55～59 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 61】

PKC- θ 阻害剤が、非選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項 55～59 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 62】

少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞が、CSCおよび非CSC腫瘍細胞から選ばれる、請求項 55～59 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 63】

がんが、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫がんから選ばれる、請求項 55～62 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 64】

がんが、乳がんである、請求項 55～62 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 65】

10

20

30

40

50

CSCが、ホルモン耐性である非CSC腫瘍細胞を生じさせる、請求項55～64のいずれか1つに記載の方法。

【請求項66】

非CSC腫瘍細胞が、エストロゲン受容体(ER)およびプロゲステロン受容体(PR)から選ばれる1種以上(たとえば、1または2種)のホルモン受容体の発現を低下させているか、または廃止している、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を患者に同時に投与する前に、患者から得られた腫瘍サンプル中のEMT調節遺伝子(たとえば、LSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)および/またはPKC- θ)の過剰発現を検出すること(たとえば、正常または非腫瘍サンプルにおけるEMT調節遺伝子の発現と比較して)をさらに含み、ここで、腫瘍サンプルが、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCおよび/または非CSC腫瘍細胞)を含む、請求項55～66のいずれか1つに記載の方法。 10

【請求項68】

LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を患者に同時に投与する前に、患者から得られた腫瘍サンプル中の1種以上の上記の広範なCSCマーカーを検出することをさらに含み、ここで、腫瘍サンプルが、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞を含む、請求項55～67のいずれか1つに記載の方法。

【請求項69】

LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤が、相乗効果量で投与される、請求項55～68のいずれか1つに記載の方法。 20

【請求項70】

患者におけるがんの再発を減少させることを含む、がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)を治療または予防するための方法であって、ここで、がんは、CSCおよび非CSC腫瘍細胞を含み、(1)LSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)阻害剤；および(2)CSCおよび/または非CSC腫瘍細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率または(v)生存能力の少なくとも1つを阻害するのに有効な量、および/またはCSCの(vi)EMTを阻害するのに有効な量、および/またはCSCの(vii)METを刺激もしくは誘導するのに有効な量のPKC- θ 阻害剤；および(3)非CSC腫瘍細胞の増殖、生存率または生存能力を阻害し、それによりがんを治療または予防するためのがん療法または薬剤；を患者に同時に投与することを含むか、それらのことからなるか、または本質的にそれらのことからなる、方法。 30

【請求項71】

LSD阻害剤が、選択的LSD阻害剤(たとえば、選択的LSD1阻害剤または選択的LSD2阻害剤)である、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

LSD阻害剤が、Pan-LSD阻害剤である、請求項70に記載の方法。

【請求項73】

LSD阻害剤が、非選択的LSD阻害剤である、請求項70に記載の方法。

【請求項74】

PKC- θ 阻害剤が、選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項70～73のいずれか1つに記載の方法。 40

【請求項75】

PKC- θ 阻害剤が、非選択的PKC- θ 阻害剤である、請求項70～73のいずれか1つに記載の方法。

【請求項76】

がん療法または薬剤が、放射線療法、外科手術、化学療法、ホルモン切除療法、アポトーシス促進療法および免疫療法から選ばれる、請求項70～75のいずれか1つに記載の方法。

【請求項77】

がん療法または薬剤が、急速に分裂する細胞を標的とするか、または細胞周期または細 50

胞分裂を妨害する、請求項 70～76 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 78】

患者が、同時投与の前に、CSCおよび非CSC腫瘍細胞を含むがん有するかまたは発症する危険性があることを同定することをさらに含む、請求項 70～77 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 79】

がんが、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫がんから選ばれる、請求項 70～78 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 80】

がんが、乳がんである、請求項 70～78 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 81】

CSCが、ホルモン耐性である非CSC腫瘍細胞を生じさせる、請求項 70～80 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 82】

非CSC腫瘍細胞が、エストロゲン受容体(ER)およびプロゲステロン受容体(PR)から選ばれる1種以上(たとえば、1または2種)のホルモン受容体の発現を低下させているか、または廃止している、請求項 81に記載の方法。

【請求項 83】

同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプル中のEMT調節遺伝子(たとえば、LSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)および/またはPKC-θ)の過剰発現を検出すること(たとえば、正常または非腫瘍サンプルにおけるEMT調節遺伝子の発現と比較して)をさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞を含む、請求項 70～82 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 84】

同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプルの中のCSCおよび/または非CSC腫瘍細胞の核におけるPKC-θの存在または増量を検出すること(たとえば、正常な乳腺細胞)の核における量と比較して)をさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞を含む、請求項 70～83 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 85】

同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプルのCSCおよび/または非CSC腫瘍細胞中のCD44またはuPARのプロモーターへのPKC-θの結合を検出することをさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞または両方を含む、請求項 70～84 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【請求項 86】

同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプルのCSCおよび非CSC腫瘍細胞中のクロマチンへのPKC-θの結合を検出することをさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞または両方を含む、請求項 70～85 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 87】

同時投与の前に、CSCが、1種以上のCSCマーカーを発現することを検出することをさらに含む、請求項 70～86 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【請求項 88】

LSD阻害剤およびPKC-θ阻害剤が、相乗効果量で投与される、請求項 70～87 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 89】

LSD阻害剤、PKC-θ阻害剤およびがん薬剤が、相乗効果量で投与される、請求項 70～87 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 90】

LSD阻害剤およびPKC-θ阻害剤と、必要に応じてがん療法/薬剤、がん療法または薬剤の投与によって発症するか、または発症する危険性が高い感染に対して有効である少なくとも1つの抗感染剤、とを同時に、順次、または別々に投与することをさらに含み、ここで

50

、抗感染剤は、抗菌剤、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、駆虫剤、抗原虫剤および殺線虫剤から選ばれる、請求項70～89のいずれか1つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国特許法119条(e)の下に、2014年8月25日出願の「がん幹細胞を調節するための組成物およびその使用」と題するオーストラリア仮出願第2014903345号に対する優先権を主張する。上記出願の開示の全体が参照することにより本出願に含める。

【0002】

本発明は、一般に、がん幹細胞を調節するための組成物および方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、がん幹細胞などのLSDおよび/またはPKC- θ 過剰発現細胞の増殖を阻害するため、化学薬剤またはがん細胞への放射線照射の生物学的効果を増強するため、非転移性および転移性がんなどのがんを治療するため、および/またはがん再発を予防するためのリジンデメチラーゼ(LSD)阻害剤およびプロテインキナーゼCシータ阻害剤(PKC- θ)の使用を開示する。

【背景技術】

【0003】

上皮細胞から間葉系細胞への転移(EMT)は、がんの進行および転移における重要なステップである。しかしながら、がん細胞(CSC)または「前駆体」転移細胞と呼ばれる腫瘍細胞の小さな亜集団のみが、転移性腫瘍の開始および再発のために重要な役割を果たす可能性がある。CSCは、腫瘍を開始させ、より分化した非幹細胞子孫の複製を生成および支持することによって悪性進行を促進する(たとえば、Kleffelら、2013. Adv Exp Med Biol. 734:145-79; Chenら、2013. Acta Pharmacologica Sinica 34:732-740; Paezら、2012. Clin Cancer Res. 18(3):645-53を参照)。CSCは、根本的に、腫瘍形成、がん転移、腫瘍再発、薬剤耐性、および化学療法および放射線療法の失敗の原因であることが実証されている。残念なことに、CSCが腫瘍形成および成長を引き起こす機序、および腫瘍原性におけるCSC特異的分化の可塑性の潜在的役割は、現在のところ分かっていない。

【0004】

興味深いことに、CSCは、正常な幹細胞と多くの同様の形質を共有している。たとえば、CSCは、自己複製能力、すなわち、限定された数の分裂とは対照的に、さらなる腫瘍原性がん幹細胞を、典型的には他の分裂腫瘍細胞よりも遅い速度で発生させる能力を有する。CSCは、多くの腫瘍が宿主臓器に固有の複数の細胞型を含むだけでなく、異質性が腫瘍転移において一般的に保持される、という組織学的証拠となる、複数の細胞型に分化する能力を有する(すなわち、それらは多分化能性である)。

【0005】

CSCは、たとえば、以下の表1に列挙されるような特定の細胞表面マーカーを発現する：

10

20

30

【表 1】

異なる固形腫瘍型についてのCSCマーカー								
乳腺	結腸	神経膠腫	肝臓	肺	黒色腫	卵巣	膵臓	前立腺
	ABCB5							
ALDH1	ALDH1						ABCG2	
CD24	β -カテニン活性	CD15	CD13	ALDH1	ABCB5		ALDH1	ALDH1
CD44	CD24	CD90	CD24	ABCG2	ALDH1	CD24	CD24	CD44
CD90	CD26	CD133	CD44	CD90	CD20	CD44	CD44	CD133
CD133	CD29	α_6 インテグリン	CD90	CD117	CD133	CD117	CD133	$\alpha_2\beta_1$ インテグリン
ヘッジホッグ-Gli活性	CD44	ネスチン	CD133	CD133	CD271	CD133	c-Met	α_6 インテグリン
α_6 インテグリン	CD133						CXCR4	Trop2
	CD166						ネスチン	
	LGR5						ノーダル-アクチビン	

10

20

【0006】

30

正常な体細胞は化学薬剤に耐性があり、薬物を排出する様々なポンプ(MDRタンパク質など)および効率的なDNA修復機構を有する。さらに、化学薬剤が迅速に複製する細胞を標的とする一方、正常幹細胞の突然変異した対応物であるCSCもまた、薬物療法および放射線治療に耐えることができる同様の機構を有し得る。換言すれば、従来の化学療法および放射線療法は、腫瘍を再生することができない腫瘍の大部分を形成する分化したかまたは分化している細胞を死滅させる。一方、分化したかまたは分化している細胞を生じさせたCSCの集団は、そのまま残り、この疾患の再発を引き起こす可能性がある。従来の抗がん治療のさらなる危険は、たとえば、化学療法の治療が化学療法耐性CSCのみを残し、その後の再発腫瘍も化学療法に対して耐性である可能性があることである。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、疾患再発および遠隔転移の予防および/または治療のための、細胞傷害性薬物耐性の腫瘍開始性CSCを標的とする、新規なアプローチの同定に対する緊急に必要である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概略

本発明は、LSD(たとえば、LSD1およびLSD2)およびプロテインキナーゼCシータ(PKC- θ)がCSCおよび非CSC腫瘍細胞において過剰発現され、EMTおよびCSCおよび非CSC腫瘍細胞の

50

形成および維持を制御するために重要であるという決定に部分的に基づく。本発明者らはまた、CSCおよび非CSC腫瘍細胞のEMT、形成、生存率、生存能力および維持を阻害することができ、また、これらの酵素の両方の活性を同時に阻害することによって間葉細胞から上皮細胞への転移(MET)を誘導することができることを見出した。したがって、以下に説明するように、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤が、EMTの阻害、METの刺激または誘導、およびがんの再発の低減などの、CSCおよび非CSC腫瘍細胞の増殖、生存率および生存能力を低減または阻害するための組成物および方法において有用であることが提案される

【0009】

したがって、1つの態様において、本発明は、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる組成物を提供する。LSD阻害剤は、LSD1阻害剤およびLSD2阻害剤、またはそれらの組み合わせから適切に選ばれる。特定の実施態様において、LSD阻害剤はLSD1阻害剤である。適切なLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の非限定的な例としては、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質または他の有機(炭素含有)または無機分子が挙げられる。特定の実施態様において、阻害剤は、小分子阻害剤および核酸分子(たとえば、LSD遺伝子(たとえば、LSD1またはLSD2)またはPKC- θ 遺伝子の転写または翻訳を阻害するもの、またはRNA干渉を媒介するもの)から選ばれる。

【0010】

いくつかの実施態様において、LSD阻害剤は、阻害剤の不在下での、LSD遺伝子の発現、あるいは対応するLSD発現産物のレベルまたは機能的活性の約9/10、4/5、7/10、3/5、1/2、2/5、3/10、1/5、1/10、1/20、1/50、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} または約 10^{-15} 未満まで、LSD遺伝子(たとえば、LSD1またはLSD2)の発現を減少させるか、あるいはLSDの発現産物のレベルまたは機能的活性を減少させる(たとえば、LSDポリペプチド(たとえば、LSD1またはLSD2)のレベルを低下させるか、またはLSD媒介脱メチル化を減少させる)。いくつかの実施態様において、LSD阻害剤は、選択的LSD阻害剤(たとえば、選択的LSD1阻害剤または選択的LSD2阻害剤)である。他の実施態様では、LSD阻害剤は、Pan-LSD阻害剤である。さらに他の実施態様において、LSD阻害剤は、非選択的LSD阻害剤である。

【0011】

いくつかの実施態様において、PKC- θ の阻害剤は、阻害剤の不在下での、PKC- θ 遺伝子の発現、あるいは対応するPKC- θ 発現産物のレベルまたは機能的活性の約9/10、4/5、7/10、3/5、1/2、2/5、3/10、1/5、1/10、1/20、1/50、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} または約 10^{-15} 未満まで、PKC- θ 遺伝子の発現を減少させるか、あるいはPKC- θ の発現産物のレベルまたは機能的活性を減少させる(たとえば、PKC- θ ポリペプチドのレベルを低下させ、PKC- θ 媒介リン酸化を減少させ、PKC- θ のCD44またはuPARのプロモーターへの結合を阻害し、PKC- θ (たとえば、活性PKC- θ)のクロマチンへの結合を減少させ；グアニン交換因子、GIV/GirdinのPKC- θ 媒介性阻害を低下させ、調節性T細胞機能のPKC- θ 媒介性阻害を低下させ、またはPKC- θ 媒介性EMTを低下させる)。いくつかの実施態様において、PKC- θ 阻害剤は、選択的PKC- θ 阻害剤である。他の実施態様において、PKC- θ 阻害剤は、非選択的PKC- θ 阻害剤である。

【0012】

いくつかの実施態様において、組成物は、医薬的に許容しうる担体をさらに含む。

【0013】

本発明の組成物は、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)および/またはPKC- θ (本明細書では「EMT調節遺伝子」とも呼ばれる)を過剰発現する細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更するのに有用である。したがって、関連する態様において、本発明は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更するためのLSD阻害剤およびPKC阻害剤の使用を提供する。いくつか

の実施態様において、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤は、それらの適用のための薬剤として調製または製造される。

【0014】

別の関連する態様において、本発明は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更する方法を提供する。これらの方法は、一般に、細胞を、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の形成、増殖、維持、生存率、生存能力、EMTまたはMETを調節するのに十分な量で、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と接触させることを含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる。適切には、EMT調節遺伝子過剰発現細胞は、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫CSCおよび非CSC腫瘍を含むCSCおよび非CSC腫瘍細胞から選ばれる。いくつかの実施態様において、CSCは、乳腺CSC(たとえば、乳管上皮CSCなどの乳腺上皮CSC)である。いくつかの実施態様において、非CSC腫瘍細胞は、乳腺非CSC腫瘍細胞(たとえば、乳管上皮非CSC腫瘍細胞などの乳腺上皮非CSC腫瘍細胞)である。いくつかの実施態様において、EMT調節遺伝子過剰発現細胞におけるPKC- θ の過剰発現は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の核におけるPKC- θ の存在または増加量を含む。

【0015】

いくつかの実施態様において、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更する方法は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞をLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と接触させる前に、EMT調節遺伝子過剰発現細胞中のEMT調節遺伝子の過剰発現(たとえば、LSD(LSD1および/またはLSD2)および/またはPKC- θ を検出すること(正常細胞(たとえば、正常な乳腺細胞)におけるEMT調節遺伝子の発現と比較して))をさらに含む。このタイプの非限定的な例において、本発明方法は、CSC中のEMT調節遺伝子の過剰発現を検出することを含む。他の非限定的な例において、本発明方法は、非CSC腫瘍細胞におけるEMT調節遺伝子の過剰発現を検出することを含む。さらに他の非限定的な例において、本発明方法は、CSCおよび非CSC腫瘍細胞におけるEMT調節遺伝子の過剰発現を検出することを含む。

【0016】

いくつかの実施態様において、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更する方法は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞をLSDインヒビターおよびPKC- θ インヒビターと接触させる前に、PKC- θ 過剰発現細胞の核におけるPKC- θ の存在または増加量を検出する(たとえば、正常細胞(たとえば、正常な乳腺細胞)の核におけるPKC- θ の量と比較して)ことをさらに含む。このタイプの例において、本発明方法は、CSCの核におけるPKC- θ の存在または増加量を検出することを含む。他の例示的な例において、本発明方法は、非CSC腫瘍細胞の核におけるPKC- θ の存在または増加した量を検出することを含む。さらに他の例示的な例において、本発明方法は、CSCおよび非CSC腫瘍細胞の核におけるPKC- θ の存在または増加量を検出することを含む。

【0017】

いくつかの実施態様において、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更する方法は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞をLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と接触させる前に、EMT調節遺伝子過剰発現細胞中のCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することをさらに含む。このタイプの代表的な例において、本発明方法は、CSCにおけるPKC- θ のCD44またはuPARのプロモーターへの結合の検出を含む。このタイプの代表的な例において、本発明方法は、CSCにおけるPKC- θ のCD44またはuPARのプロモーターへの結合を検出することを含む。他の代表的な例において、本発明方法は、非CSC腫瘍細胞におけるCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することを含む。さらに他の代表的な例において、本発明方法は、CSCおよび非CSC腫瘍細胞におけるCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することを含む。

【0018】

いくつかの実施態様において、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更する方法は、PKC- θ インヒビターをEMT調節遺伝子過剰発現細胞に接触させる前に、EMT調節遺伝子過剰発現細胞中のPKC- θ のクロマチンへの結合を検出することをさらに含む。このタイプの非限定的な例において、本発明方法は、CSCにおけるPKC- θ のクロマチンへの結合を検出することを含む。他の非限定的な例において、本発明方法は、非CSC腫瘍細胞中のクロマチンに対するPKC- θ の結合を検出することを含む。さらに他の非限定的な例において、本発明方法は、CSCおよび非CSC腫瘍細胞中のPKC- θ のクロマチンへの結合を検出することを含む。

10

【0019】

適切には、MT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更する方法は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞が、1種以上のCSCマーカーを発現することを検出することをさらに含む。

【0020】

EMT調節遺伝子過剰発現細胞がCSCであるいくつかの実施態様において、CSCは、ABCB5、ALDH1、ABCG2、 α_6 インテグリン、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリン、 β -カテニン活性、CD15、CD13、CD20、CD24、CD26、CD29、CD44、CD90、CD133、CD166、CD271、c-Met、ヘッジホッグ-Gli、ネスチン、CXCR4、LGR5、Trop2およびノーダル-アクチビンから選ばれる1種以上(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上)のCSCマーカーを発現する。いくつかの実施態様において、CSCは、ALDH1、CD24、CD44、CD90、CD133、ヘッジホッグ-Gli、 α_6 インテグリンから選ばれる1種以上(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上)のCSCマーカーを発現する。このタイプの例において、CSCは、CD24およびCD44(たとえば、CD44^{high}、CD24^{low})を発現する。いくつかの実施態様において、CSCは、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫CSCから選ばれる。特定の実施態様において、CSCは、乳がんCSCである。適切には、CSCは、多能性幹細胞マーカーOct4またはSox2の発現を障害しているか、または廃止しているか、または多能性幹細胞上のこれらのマーカーのレベルまたは機能的活性の約1/5、1/10、1/20、1/50、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} または約 10^{-15} 未満のレベルまたは機能的活性でこれらマーカーの一方または両方を発現する。

20

30

【0021】

もう1つの態様において、本発明は、患者においてがん再発を減少させることを含むがん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)を治療または予防する方法であって、前記がんが少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞を含む、方法。これらの方法は、一般に、LSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を有効量で患者に同時に投与して、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力、(vi)EMTまたは(vii)METの少なくとも1つを変更することを含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる。適切には、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤は、有効量で患者に同時に投与して、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力または(vi)EMTを阻害するか、また少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞の(vii)METを刺激もしくは誘導する。いくつかの実施態様において、LSD阻害剤は、選択的LSD阻害剤(たとえば、選択的LSD1阻害剤または選択的LSD2阻害剤)である。他の実施態様において、LSD阻害剤は、Pan-LSD阻害剤である。さらに他の実施態様において、LSD阻害剤は、非選択的LSD阻害剤である。いくつかの実施態様において、PKC- θ 阻害剤は、選択的PKC- θ 阻害剤である。他の実施態様において、PKC- θ 阻害剤は、非選択的PKC- θ 阻害剤である。適切には、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞は、CSCおよび非CSC腫瘍細胞から選ばれる。

40

【0022】

いくつかの実施態様において、がんは、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓

50

がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫がんから選ばれる。適切には、がんは、乳がんである。いくつかの実施態様において、CSCは、ホルモン耐性である非CSC腫瘍細胞を生じさせる。このタイプの例において、非CSC腫瘍細胞は、エストロゲン受容体(ER)およびプロゲステロン受容体(PR)から選ばれる1種以上(たとえば、1または2種)のホルモン受容体の発現を低下させているか、または廃止している。

【0023】

いくつかの実施態様において、がんを治療または予防するための方法は、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を患者に同時に投与する前に、患者から得られた腫瘍サンプル中のEMT調節遺伝子(たとえば、LSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)および/またはPKC- θ)の過剰発現を検出すること(たとえば、正常または非腫瘍サンプルにおけるEMT調節遺伝子の発現と比較して)をさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCおよび/または非CSC腫瘍細胞)を含む。

10

【0024】

いくつかの実施態様において、がんを治療または予防するための本発明方法は、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を患者に同時に投与する前に、患者から得られた腫瘍サンプル中の1種以上の上記の広範なCSCマーカーを検出することをさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、少なくとも1種のEMT調節遺伝子過剰発現細胞を含む。

【0025】

適切には、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤は、相乗効果量で投与される。

【0026】

本発明のさらに別の態様は、患者におけるがんの再発を減少させることを含む、がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)を治療または予防するための方法であって、ここで、がんは、CSCおよび非CSC腫瘍細胞を含む。これらの方法は、一般に、(1)LSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)阻害剤；および(2)CSCおよび/または非CSC腫瘍細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率または(v)生存能力の少なくとも1つを阻害するのに有効な量、および/またはCSCの(vi)EMTを阻害するのに有効な量、および/またはCSCの(vii)METを刺激もしくは誘導するのに有効な量のPKC- θ 阻害剤；および(3)非CSC腫瘍細胞の増殖、生存率または生存能力を阻害し、それによりがんを治療または予防するためのがん療法または薬剤；を患者に同時に投与することを含むか、それらのことからなるか、または本質的にそれらのことからなる。いくつかの実施態様において、LSD阻害剤は、選択的LSD阻害剤(たとえば、選択的LSD1阻害剤または選択的LSD2阻害剤)である。他の実施態様において、LSD阻害剤は、Pan-LSD阻害剤である。さらに他の実施態様において、LSD阻害剤は、非選択的LSD阻害剤である。いくつかの実施態様において、PKC- θ 阻害剤は、選択的PKC- θ 阻害剤である。他の実施態様において、PKC- θ 阻害剤は、非選択的PKC- θ 阻害剤である。いくつかの実施態様において、がん療法または薬剤は、放射線療法、外科手術、化学療法、ホルモン切除療法、アポトーシス促進療法および免疫療法から選ばれる。このタイプの例において、がん療法または薬剤は、急速に分裂する細胞を標的とするか、または細胞周期または細胞分裂を妨害する。

20

30

【0027】

適切には、該方法は、患者が、同時投与の前に、CSCおよび非CSC腫瘍細胞を含むがん有するかまたは発症する危険性があることを同定することをさらに含む。いくつかの実施態様において、がんは、乳がん、前立腺がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、結腸がん、黒色腫、肝臓がんまたは神経膠腫がんから選ばれる。適切には、がんは、乳がんである。いくつかの実施態様において、CSCは、ホルモン耐性である非CSC腫瘍細胞を生じさせる。このタイプの例において、非CSC腫瘍細胞は、エストロゲン受容体(ER)およびプロゲステロン受容体(PR)から選ばれる1種以上(たとえば、1または2種)のホルモン受容体の発現を低下させているか、または廃止している。

40

【0028】

いくつかの実施態様において、がんの治療または予防のための方法は、同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプル中のEMT調節遺伝子(たとえば、LSD(たとえば、LSD1およ

50

び/またはLSD2)および/またはPKC- θ)の過剰発現を検出すること(たとえば、正常または非腫瘍サンプルにおけるEMT調節遺伝子の発現と比較して)をさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞を含む。

【0029】

いくつかの実施態様において、がんの治療または予防のための方法は、同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプルの中のCSCおよび/または非CSC腫瘍細胞の核におけるPKC- θ の存在または増量を検出すること(たとえば、正常な乳腺細胞)の核における量と比較して)をさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞を含む。

【0030】

いくつかの実施態様において、がんの治療または予防のための方法は、同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプルのCSCおよび/または非CSC腫瘍細胞におけるCD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合を検出することをさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞または両方を含む。

10

【0031】

いくつかの実施態様において、がんの治療または予防のための方法は、同時投与の前に、患者から得られた腫瘍サンプルのCSCおよび/または非CSC腫瘍細胞におけるクロマチンに対するPKC- θ の結合を検出することをさらに含み、ここで、腫瘍サンプルは、CSCまたは非CSC腫瘍細胞または両方を含む。

【0032】

いくつかの実施態様において、がんの治療または予防のための方法は、同時投与の前に、CSCが、上記に広範に記載した1種以上のCSCマーカーを発現すること検出することをさらに含む。

20

【0033】

適切には、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤は、相乗効果量で投与される。

【0034】

適切には、LSD阻害剤、PKC- θ 阻害剤およびがん薬剤は、相乗効果量で投与される。

【0035】

典型的には、LSD阻害剤、PKC- θ 阻害剤およびがん療法または薬剤の少なくとも1つ(たとえば、1、2またはすべて)は、たとえば、週に少なくとも2回、週に少なくとも3回、週に少なくとも4回、週に少なくとも5回、週に少なくとも6回、毎週、隔週、3週ごと、4週毎、毎月、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、6ヶ月に1回などのルーチン計画で投与される。

30

【0036】

いくつかの実施態様において、がん治療は、病原体への感染のより高いリスクに患者を曝露する可能性が高い。したがって、これらの実施態様において、本発明方法は、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤と、必要に応じてがん薬剤、がん療法または薬剤の投与によって発症するか、または発症する危険性が高い感染に対して有効である少なくとも1つの抗感染剤、とを同時に、順次、または別々に投与することをさらに含み、ここで、抗感染剤は、抗菌剤、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、駆虫剤、抗原虫剤および殺線虫剤から選ばれる。

40

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】(A)ヒト乳腺CSCのキー表面マーカー；(B)ヒト乳腺CSCにおけるCSC-誘導性遺伝子；(C)細胞培養における乳腺球；のインビトロ測定を示すグラフおよび写真である。

【図2】3つのヒトCSCモデルにおけるCD44領域を横切るH3K4me1およびLSD1 ChIPアッセイの結果を示すグラフである。(EC、MCF-7上皮細胞系；BC、MDA-MB231基礎細胞株)。

【図3】ヒト正常(A)および乳がん組織(B)におけるLSD1の核染色、およびヒト正常(C)および乳がん組織(D)における表面マーカーCD44を示す写真である。

【図4】siRNAによるLSD1ノックダウンが、MDA-MB-231基礎転移モデルの乳腺ヒトCD44^{high}CD24^{low} CSCの発症を阻害することを示すグラフである：転写産物分析(A)、FACS分析(B)

50

、MCF-7 IMモデル：FACS分析(C)、転写産物分析(D)、およびChIP(E)およびFAIRE分析(F)。

【図5】siRNAによるLSD2ノックダウンが、FACS分析(AおよびB)および腫瘍様塊アッセイ(C)を用いる乳腺CD44^{high}CD24^{low} CSCの発症を阻害することを示すグラフである。

【図6】NCD38がMCF-IMモデルのCSCの形成を阻害することを示すグラフおよび写真である。
(A) LSD1特異的阻害剤NCD38はMCF-IMモデルのCD44^{high} CD24^{low}-CSC様亜集団を阻害する。MCF-7細胞をPMA刺激(0.65ng/μl、60時間)(ST)前にビヒクル単独またはNCD38(5μM、17時間)とともにプレインキュベーションした。次いで、細胞をHoechst 33528、APC-抗CD44およびPE-抗CD24にて氷上で20分間染色し、FACS分析に付した。FACSプロットのサークルは、CD44^{high}/CD24^{low} CSC様亜集団の適切なゲーティングを示し、CSC様亜集団%を各ゲートの上に示す。(B) 上記図6Aのデータのグラフ表示。データは、3つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。(C) 5μM NCD38はMCF-IMモデルの腫瘍様塊形成を減少させる。腫瘍様塊アッセイを超低接着表面6ウェルプレートを用い4 x 10⁴ MCF-7細胞/ウェルで行った。MCF-7細胞をPMA刺激(0.65ng/ml、6日間)(ST)または非刺激放置(NS)の前にビヒクル単独またはNCD38(5μM、17時間)でプレインキュベーションした。腫瘍様塊の位相差顕微鏡像を6日間アッセイ後に撮影し、60μmより大きい腫瘍様塊のみをカウントした。(D) 上記図6Cのグラフ表示。データは3つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。

【図7】特異的LSD1阻害剤NCD38がヒト転移乳がん細胞の維持を阻害し、該細胞を上皮型に変換することを示すグラフおよび写真である。(A) NCD38は基礎/転移モデルのCD44^{high} CD24^{low}-CSC様亜集団を阻害する。MDA-MB 231細胞をビヒクル単独またはNCD38(5μM)とともにインキュベーションした。次に、細胞をHoechst 33528、APC-抗CD44、およびPE-抗CD24にて氷上で20分間染色し、FACS分析に付した。CSC様亜集団パーセントを棒グラフで示す。データは3つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。(B) 上記図7Aのグラフ表示。データは3つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。(C) LSD1阻害剤NCD38は基礎/転移モデルのEMTを阻害する。LSD1特異的阻害剤(-コントロール)で前処理していないかまたはNCD38(5μM)(+NCD38)で処理したMDA-MB 231細胞の位相差顕微鏡像を撮影した。

【図8】化学薬剤ドセタキセルと組み合わせたLSD1阻害剤パルギリニンが、インビボマウス異種移植モデルの腫瘍のサイズを減少させることを示す写真である。5x10⁶ MDA-MB-231細胞を各マウスの乳腺脂肪体に注射した。腫瘍体積50mm³で記載した用量で処置を開始した。(A) 4週間処置後の各処置群の代表的マウス。(B) 処置第4週で切除した腫瘍の毎週の腫瘍サイズ。

【図9】パルギリニンとドセタキセルの組み合わせが処置開始7週後のインビボマウス異種移植モデルの腫瘍の体積と重量が減少させることを示すグラフである。5x10⁶ MDA-MB-231細胞を各マウスの乳腺脂肪体に注射した。腫瘍体積50mm³で記載した用量で処置を開始した。腫瘍体積を処置7週間まで毎週測定した。(A) 7週間処置後の各処置群の腫瘍重量(グラム)。腫瘍重量はマウス3匹の平均±標準誤差(SE)である。(B) 毎週の腫瘍体積(mm³)。化学療法処置日をグラフ上に黒矢印で示す。腫瘍体積は5匹またはそれ以上のマウスの平均±標準誤差(SE)である。

【図10】パルギリニンとドセタキセルの組み合わせがインビボマウス腫瘍のがん幹細胞を減少させることを示すグラフ。5x10⁶ MDA-MB-231細胞を各マウスの乳腺脂肪体中に注射した。腫瘍体積50mm³で記載した用量で処置を開始した。マウスを7週間処置して屠殺した。単細胞浮遊液を調製し、次いで細胞をHoechst 33528、APC-抗CD44、およびPE-抗CD24にて氷上で20分間染色し、FACS分析を行った。(A) 各処置群のCSC亜集団%。(B) リアルタイムPCRによる各群の切除腫瘍のCD44 mRNA発現。データは各群マウス5匹の平均±標準誤差(SE)である。

【図11-1】図11Aは、MCF-IMモデルにおけるPKC誘導物質、ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)によるMCF-7細胞の刺激が、最大EMTをもたらすことを示すグラフである。MCF-7細胞を、刺激しないままにするか、または(NS)TNF-α(20 ng/mL)、EGF(50 ng/mL)、IL-6(50 ng/mL)、TGF-β(2.5 ng/mL)またはPMA(20ng/mL)で60時間刺激した。オリンパス17X1顕微鏡を用いて、各刺激について3つ以上の位相差画像を撮影した。各画像に

において少なくとも200個の細胞をカウントし、EMTを受けている細胞の平均パーセンテージ(%)を計算し、続いてグラフをプロットした。結果を、2回の独立した実験からの平均±標準誤差として示す。図11Bは、MCT-IMモデルにおけるEMTマーカー、ラミニン-5の形態的EMT変化および細胞内染色パターンの差異を示す写真である。MCF-7細胞を非刺激(NS)またはPMA(ST)(0.65ng/mL、60時間)で刺激し、その後、位相差顕微鏡法により写真を撮るか、または抗ラミニン-5抗体(緑色)もしくはDAPI染色(核染色)(青色)でそれぞれ染色した。ライカ顕微鏡を用いて倍率60倍でMCF-7の共焦点顕微鏡像を撮影した。図11Cは、MCF-IMモデルにおけるより大きな創傷治癒を示す写真である。MCF-7細胞を、(i)PMA(0.65ng/mL)で18時間刺激するか、または(ii)未処置、非刺激(NS)のままにした。続いて、0時間(赤線)および18時間(緑色線)の時点で10倍の倍率を用いてオリンパス17X1によって創傷治癒アッセイの位相差画像を撮影した。処置の創傷治癒能力を示すために、2つの画像の重ね合わせ(1つの画像に赤と緑のラインを一緒に表示する)を行なった。

【図11-2】図11Dは、MCF-IMおよび基礎/転移モデルにおけるより高いPKCキナーゼ活性を示すグラフである。MCF-7細胞を、非刺激(NS)またはPMA(0.65ng/mL)で刺激(ST)のいずれかに付した。PKC ELISAベースのキナーゼアッセイを、NSおよびST処理MCF-7細胞およびMDA-MD 231細胞の両方からの全細胞溶解物(WCL)、細胞質抽出物(CE)または核抽出物(NE)のいずれかでを行った。450nmで吸光度を測定した。データは、ネガティブコントロールと比較した相対キナーゼ活性としてプロットされる。データは、3つの独立した実験の平均±SEを表し、統計的有意性は、GraphPad Prism 5.03を用いた両側のペアテストによって決定した。図11Eは、MCF-IMモデルにおけるCD44^{high}/CD24^{low}-がん幹様細胞(CSC)亜集団の選別のためのFACSゲーティング戦略を示すグラフである。MCF-7細胞を、未処置、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA(0.65ng/mL)で60時間刺激(ST)した。続いて、FACS選別の前に、細胞を、Hoechst、APC-抗CD44およびPE-抗CD24カクテルで染色した。CD44^{high}/CD24^{low}染色によってがん幹様細胞(CSC)集団を定義した。CSC様およびNCSC亜集団のゲートをPMA刺激集団で最初に作製し、これらのゲートを非刺激集団にコピーして、非刺激細胞においてCSC様集団が0.1%未満であることを確認した。ゲーティング戦略を強調するために、10の独立した実験の代表的なFACSプロットを示す。図11Fは、MCF-IMモデルが、CD44^{high}/CD24^{low}またはCSC様亜集団の高いパーセンテージをもたらすことを示すグラフである。MCF-7細胞を、未処理、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA(0.65ng/mL)で60時間刺激(ST)した。図11Eに記載のゲーティング戦略を用いてFACS分析を行い、続いて、10の独立した実験からの平均%CSC様亜集団をプロットした(エラーバーは標準誤差である)。

図11Gは、MCF-IMモデルが、腫瘍様塊の生成を導くことを示す写真およびグラフである。超低付着6ウェルプレートにて、腫瘍様塊アッセイを、4 x 10⁴個のMCF-7細胞/ウェルで行った。細胞を、(A)非刺激(NS)、または(B)PMA(0.65ng/mL)または(C)TNF- α (10ng/mL)で刺激した。6日間のアッセイ開始後、腫瘍様塊アッセイのための位相差顕微鏡法を用いて画像を撮影し、グラフをプロットした。実験を二重に行い、各ウェルの腫瘍様塊を平均してカウントした。データは、2つの独立した実験の平均±SEを表す。

【図11-3】図11Hは、誘導されたCSC様亜集団が、MCF-IMモデルにおいて異なる転写プロファイルを有することを示すグラフである。転写産物分析を、非刺激(NS)またはPMA刺激(0.65ng/mL、60時間)のMCF-7細胞のいずれかにおいて行い、FACSは、CD44、ラミニン-5、uPAR、フィブロネクチンおよびインテグリン β 遺伝子について、亜集団-がん幹様細胞(CSC様)および非がん幹様細胞(NCSC)を選別した。前記3つの集団より単離された全RNAから合成されたcDNAに対して、TaqMan(登録商標)リアルタイムPCRを実施した。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を任意のコピー数に変換し、シクロフィリンA参照レベルに対して正規化した。mRNAレベルは任意のコピー数で表し、非刺激細胞と比較した倍数変化をエラーバーの上に示す。データは、3つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。

図11Iは、誘導されたCSC様およびNCSC亜集団が、MCF-IMモデルにおけるmiR200ファミリーメンバーの発現の減少をもたらすことを示すグラフである。未処置、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA刺激(60時間、0.65ng/mL)のいずれかのMCF-7細胞からのTaqMan(登録商標)MicroRNAリアルタイム分析により、miR 200bおよびmiR 200cのMicroRNA cDNAレベルを

10

20

30

40

50

測定した。FACSは、がん幹様細胞(CSC様)および非がん幹様細胞(NCSC)の亜集団を分類した。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を任意のコピー数に変換し、RNU6B参照レベルに対して正規化した。MicroRNAレベルを任意のコピーで表し、データは、3つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。

【図12-1】図12Aは、広範囲のPKC阻害剤、ビスインドリルマレイミド-Iが、MCF-IMモデルにおいてEMTを阻害することを示す写真である。非刺激(NS)およびPMAで刺激された(0.65ng/μL、60時間)(ST)MCF-7細胞の位相差顕微鏡画像は、PKC特異的阻害剤による前処理なし(ST(-)BIS)か、またはPMA刺激前にビスインドリルマレイミド(1μM)で1時間前処理して(ST(+))BIS撮影された。図12Bは、非常に高濃度のビスインドリルマレイミド-Iだけではなく、Go 6976が、MCF-IMモデルにおいてCD44^{high} CD24^{low}-CSC様亜集団を阻害することを示すグラフである。MCF-7細胞を、PMA刺激(0.65ng/μL、60時間)(ST)の前に、ビヒクル単独またはビスインドリルマレイミド-I(100nmおよび1μM)またはGo6976(1μM)と共にプレインキュベートした。次に、細胞を、Hoechst 33528、APC-抗CD44およびPE-抗CD24にて、氷上で20分間染色し、FACS分析に付した。FACSプロット上の円は、CD44^{high}/CD24^{low}CSC様亜集団の適切なゲーティングを示し、CSC様亜集団%は、それぞれゲートの上方に示される。図12Cは、図2Bに提示されたデータの別のグラフ表示である。データは、2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。図12Dは、1μM ビスインドリルマレイミド-Iが、MCF-IMモデルにおいて腫瘍様塊の形成を減少させることを示す写真である。超低付着6ウェルプレートにて、腫瘍様塊アッセイを、4 x 10⁴個のMCF-7細胞/ウェルで行った。MCF-7細胞を、PMA刺激する(6日間、0.65ng/mL)(ST)か、または非刺激のままにする(NS)前に、ビヒクル単独またはビスインドリルマレイミド-I(1μM、1時間)とともにプレインキュベートした。6日間のアッセイ後に、腫瘍様塊の位相差顕微鏡画像を撮り、60μmを超える腫瘍様塊のみをカウントした。

【図12-2】図12Eは、図2Bに示されるデータの別のグラフ表示である。データは、2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。図12Fは、100nMのビスインドリルマレイミド-I処理が、MCF-IMモデルにおける重要な誘導性EMT/CSC遺伝子の転写を阻害することができないことを示すグラフである。MCF-7細胞を、未処理、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA刺激する(0.65ng/μL、60時間)(ST)前に、ビスインドリルマレイミド-I(100nM)で1時間前処理した。EMT/CSC遺伝子-ラミニン-5、uPARおよびCD44に対するTaqMan(登録商標)リアルタイムPCR分析を、全RNAから合成したcDNAにおいて行った。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を、任意のコピー数に変換し、シクロフィリンA参照レベルに対して正規化した。mRNAレベルを、非刺激細胞と比較した倍数変化で表す。データは、2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。図12Gは、1μMのビスインドリルマレイミド-I処理が、MCF-IMモデルにおける重要な誘導性EMT/CSC遺伝子の転写を阻害することができないことを示すグラフである。MCF-7細胞を、未処理、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA刺激する(0.65ng/μL、60時間)(ST)前に、ビスインドリルマレイミド-I(1μM)で1時間前処理した。EMT/CSC遺伝子-ラミニン-5、uPARおよびCD44に対するTaqMan(登録商標)リアルタイムPCR分析を、全RNAから合成したcDNAにおいて行った。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を、任意のコピー数に変換し、シクロフィリンA参照レベルに対して正規化した。mRNAレベルを、非刺激細胞と比較した倍数変化で表す。データは、2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。図12Hは、1μMのGo6976処理が、MCF-IMモデルにおける重要な誘導性EMT/CSC遺伝子の転写を阻害することができないことを示すグラフである。MCF-7細胞を、未処理、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA刺激する(0.65ng/μL、60時間)(ST)前に、Go6976(1μM)で1時間前処理した。EMT/CSC遺伝子-ラミニン-5、uPARおよびCD44に対するTaqMan(登録商標)リアルタイムPCR分析を、全RNAから合成したcDNAにおいて行った。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を、任意のコピー数に変換し、シクロフィリンA参照レベルに対して正規化した。mRNAレベルを、非刺激細胞と比較した倍数変化で表す。データは、2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。

図12Iは、広範囲のPKC阻害剤であるビスインドリルマレイミド-Iが、基礎/転移モデルにおいてEMTを阻害することを示す写真である。MDA-MB 231細胞の位相差顕微鏡画像を、PKC

特異的阻害剤の前処置なし(-BIS)またはビスインドリルマレイミド(4 μ M)で処理して(+BIS)で撮影した。

【図12-3】図12Jは、ビスインドリルマレイミド-Iが、基礎/転移モデルにおいてCD44^{high} CD24^{low}-CSC様亜集団を阻害することを示すグラフである。MDA-MB 231細胞を、ビヒクル単独またはビスインドリルマレイミド-I(4 μ M)とともにインキュベートした。次に、Hoechst 33528、APC-抗CD44およびPE-抗CD24にて氷上で20分間細胞を染色し、FACS分析に付した。CSC様亜集団パーセントを棒グラフで示す。データは2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。図12Kは、ビスインドリルマレイミド-I処理が、基礎/転移モデルにおける重要な誘導性EMT/CSC遺伝子の転写を阻害することを示すグラフである。MDA-MB 231細胞を、ビヒクル単独またはビスインドリルマレイミド-I(4 μ M)とともにインキュ

10

【図13-1】図13Aは、非常に低い濃度のPKC- θ ペプチド阻害剤が、MCF-IMモデルにおいてEMTを消失させることを示す写真である。非刺激(NS)およびPMA(0.65 ng/ μ L、60時間)刺激(ST)したMCF-7細胞の位相差顕微鏡画像を、PMA刺激前の阻害剤による前処理なし、またはPKC- θ 特異的ペプチド(30 μ M)で24時間前処理のいずれかで撮影した。図13Bは、PKC- θ ペプチド阻害剤が、MCF-IMモデルにおけるCD44^{high} CD24^{low}-CSC様亜集団を阻害することを示すグラフである。MCF-7細胞を、PMA(0.65 ng/ μ L、60時間)刺激(ST)前に、ビヒクル単独またはPKC- θ 特異的ペプチド(30 μ M)とともにプレインキュベートした。次に、Hoechst 33528、APC-抗CD44およびPE-抗CD24にて氷上で20分間細胞を染色し、FACS分析に付した。CD44^{high}/CD24^{low}-CSC様亜集団の適切なゲーティングを行い、棒グラフをプロットした。データは2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。図13Cは、PKC- θ ペプチド阻害剤が、MCF-IMモデルにおける重要な誘導性EMT/CSC遺伝子の転写を減少させることを示すグラフである。MCF-7細胞を、PMA(0.65 ng/ μ L、60時間)刺激(ST)前に、ビヒクル単独またはPKC- θ 特異的ペプチド(30 μ M)とともにプレインキュベートした。EMT/CSC遺伝子-CD44に対するTaqMan(登録商標)リアルタイムPCR分析を、全RNAから合成したcDNAにおいて行った。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を、任意のコピー数に変換し、シクロフィリンA参照レベルに対して正規化した。mRNAレベルを、非刺激細胞と比較した倍数変化で表す。データは、2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表す。図13Dは、MCF-IMモデルにおいて、PPKC- θ ノックダウンは、PMA誘導CSC様亜集団の消失をもたらすが、PKC- β ノックダウンは、MA誘導CSC様亜集団を増強することを示すグラフである。MCF-7細胞を、mock siRNA(mock)、PKC- θ siRNAまたはPKC- β siRNAで48時間トランスフェクトさせ、次いで、未処理、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA刺激(0.65 ng/mL、60時間)に付した。次いで、Hoechst、APC-抗CD44およびPE-抗CD24抗体染色カクテルで細胞を染色することによってFACS分析を行った。CSC様亜集団の適切なゲーティングを行い、CSC様亜集団%を棒グラフで示す。データは2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。

20

30

40

【図13-2】図13Eは、PKC- θ ノックダウンが、MCF-IMモデルにおける腫瘍様塊形成を減少させることを示すグラフである。超低付着6ウェルプレートにて、腫瘍様塊アッセイを、4 x 10⁴個のMCF-7細胞/ウェルで行った。MCF-7細胞を、mock siRNA(mock)またはPKC- θ siRNAのいずれかで48時間トランスフェクトさせ、次いで、未処理、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA刺激(0.65 ng/mL、60時間)に付した。アッセイの6日後、腫瘍様塊の位相差顕微鏡画像を撮影し、60 μ mより大きい腫瘍様塊のみをカウントし、棒グラフをプロットした。データは、2つの独立した実験の平均±SEを表す。図13Fは、PPKC- θ ノックダウンは、MCF-IMモデルにおいて重要な誘導性EMT/CSC遺伝子の転写の阻害をもたらすが、PKC- β ノックダウンは、MCF-IMモデルにおいてこの阻害を有さないことを示すグラフである。MCF-7細胞を、mock siRNA(mock)、PKC- θ siRNAまたはPKC- β siRNAのいずれ

50

かで48時間トランスフェクトさせ、次いで、未処理、非刺激(NS)のままにするか、またはPMA刺激(0.65 ng/mL、60時間)に付した。EMT/CSC遺伝子-uPARおよびCD44に対するTaqMan(登録商標)リアルタイムPCR分析を、全RNAから合成したcDNAにおいて行った。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を、任意のコピー数に変換し、シクロフィリンA参照レベルに対して正規化した。mRNAレベルを、非刺激細胞と比較した倍数変化で表す。データは、2つの独立した実験の平均±SEを表す。図13Gは、PKC- θ NLS(核局在シグナル)突然変異の過剰発現が、核内でPKC- θ の侵入を減少させることを示すグラフである。MCF-IMモデルにおいて、PKC- θ WT(野生型)またはPKC- θ NLSの過剰発現を72時間行った後、共焦点顕微鏡法に付した。図13Hは、MCF-IMモデルにおいて、PKC- θ NLS(核局在シグナル)突然変異の過剰発現が、CSC%を減少させることを示す写真である。MCF-IMモデルにおいて、細胞を刺激する(0.65 ng/mL、60時間)前に、Mockベクター、PKC- θ WT(野生型)またはPKC- θ NLSの過剰発現を、72時間行なった。続いて、Hoechst、APC-抗CD44およびPE-抗CD24抗体染色カクテルで細胞を染色することによってFACS分析を行った。CSC様亜集団の適切なゲーティングを行い、mockを越えるCSC様亜集団の増加%を計算し、棒グラフで示す。データは2つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を示す。図13Iは、MCF-IMモデルにおいて、PKC- θ NLS(核局在シグナル)突然変異の過剰発現が、重要な誘導性EMT/CSC遺伝子の転写の阻害をもたらすことを示すグラフである。MCF-IMモデルにおいて、細胞を刺激する(0.65 ng/mL、60時間)前に、Mockベクター、PKC- θ WT(野生型)またはPKC- θ NLSの過剰発現を、72時間行なった。EMT/CSC遺伝子-uPARおよびCD44に対するTaqMan(登録商標)リアルタイムPCR分析を、全RNAから合成したcDNAにおいて行った。各時点で生成された閾値サイクル(Ct)値を、任意のコピー数に変換し、シクロフィリンA参照レベルに対して正規化した。mRNAレベルを、非刺激細胞と比較した倍数変化で表す。データは、2つの独立した実験の平均±SEを表す。

10

20

【図14】図14Aは、PKC- θ が、がん細胞のCD44遺伝子のプロモーター領域のクロマチンと会合していることを示すグラフである。MCF-IM、HMLE-IMおよび基礎転移性モデルにおいて、抗体 抗PKC- θ 抗体を用い、免疫沈降したDNAでChIPアッセイを行なった。これらの免疫沈降したDNAについて、CD44プロモータープライマーを用いてリアルタイムPCR分析を行った。このデータを、免疫沈降したDNAのnil抗体コントロールに対するChIP豊富化比として図式的に示し、全入力DNAに対して正規化した。結果は、3つの独立した実験のうちの1つからのChIP豊富化比を表す。図14BおよびCは、MCF-IMモデルにおいて、PKC- θ 、PKC- θ (蛍光)の活性型が、CSC誘導性遺伝子のプロモーター領域にてクロマチンで高度に豊富化されていることを示すグラフである。MCF-7細胞は、非刺激(NS)であるか、またはPMA(ST)(0.65ng/ μ L、60時間)で刺激された。続いて、抗体 抗PKC- θ (蛍光)を用い、免疫沈降したDNAでChIPアッセイを行なった。これらの免疫沈降したDNAについて、(B)uPARおよび(C)CD44プロモータープライマーを用いてリアルタイムPCR分析を行った。データを、免疫沈降したDNAのnil抗体コントロールに対するChIP豊富化比として図式的に示し、全入力DNAに対して正規化した。結果は、3つの独立した実験のうちの1つからのChIP豊富化比を表す。図14Dは、MCF-IMモデルにおいて、PKC- θ が、CSC誘導性遺伝子uPAR上のPol IIと物理的に相互作用することを示すグラフである。連続的ChIPを、非刺激(NS)またはPMA刺激(ST)(0.65ng/mL、60時間)MCF-7細胞のいずれかにおいて行った。最初の一次クロマチン免疫沈降を行い、次いで、一次免疫沈降から回収したクロマチンに対して二次クロマチン免疫沈降を行った。使用した抗体は、一次ChIPでは抗Pol II抗体、二次ChIPでは抗PKC- θ 抗体であった。免疫沈降したDNAについて、uPARプロモーター指向性プライマーを用いてリアルタイムPCR分析を行った。データを、免疫沈降したDNAのnil抗体コントロールに対するChIP豊富化比として図式的に示し、全入力DNAに対して正規化した。「nil抗体」は、抗体(一次または二次のいずれも)が架橋DNAに付加されていないサンプルを意味する。結果は、3つの独立した実験のうちの1つからのChIP豊富化比を表す。図14Eは、MCF-IMモデルにおいて、PKC- θ の薬理的阻害またはノックダウンが、uPARプロモーターを横切るそのクロマチン会合を減少させることを示すグラフである。MCF-7細胞を、ビヒクル単独またはビスインドリルマレイミド-I(1 μ M)とともに1時間ブレインキュベートし、続いて

30

40

50

、PMAで刺激した(0.65ng/μl、60時間)(ST)。別の実験では、mock siRNA(mock)またはPKC-θ siRNAのいずれかで細胞をトランスフェクトさせ、次いで、トランスフェクションの48時間後に、PMA刺激(ST)(0.65ng/mL、60時間)に付した。その後、免疫沈降したDNAについて、抗PKC-θ抗体を用いてChIPアッセイを行った。これらの免疫沈降したDNAについて、uPARプロモータープライマーを用いてリアルタイムPCR分析を行った。データを、免疫沈降したDNAのnil抗体コントロールに対するChIP豊富化比として図式的に示し、全入力DNAに対して正規化した。結果は、3つの独立した実験のうちの1つからのChIP豊富化比を表す。

【図15】図15は、ヒト正常および浸潤性乳がん組織における活性PKC-θの核染色を示す写真である。抗PKC-θ(蛍光)抗体を用いて、正常およびヒトの乳がん組織の核染色を行い、顕微鏡写真を撮影した。

【図16】図16は、MCF-IMモデルにおいて、LSD1およびPKC-θ阻害剤による腫瘍様塊の同時治療が、いずれかの阻害剤単独よりも低用量の両方の阻害剤で、CSC形成を減少させることを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

(発明の詳細な説明)

1. 定義

特記しない限り、本明細書に記載のすべての技術および化学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または等価なあらゆる方法および材料を本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法と材料を記載する。本発明のために以下の用語を以下に定義する。

【0039】

本明細書に記載の冠詞「a」および「an」は、該冠詞の文法的目的語の1または1以上(すなわち、少なくとも1を表す。例として、「an要素」は1要素または1以上の要素を表す。

【0040】

用語「同時投与」または「同時に投与する」、または「同時投与する」などは、2またはそれ以上の活性物質を含む単一組成物の投与、または各活性物質を別の組成物としておよび/または別経路で同時期または同時に、または有効性の結果がすべてのそのような活性物質を単一組成物として投与する時に得られるのと等価である短い充分な期間内に連続して送達する投与を表す。「同時に(simultaneously)」は、活性物質を実質的に同時に、望ましくは同じ製剤と一緒に投与することを意味する。「同時期に(contemporaneously)」は、活性物質を密接な時間内に投与すること、たとえばある薬剤を別のものの前または後約1分間以内～約1日以内に投与することを意味する。あらゆる同時期が有用である。しかしながら、同時に投与しないときは該物質を約1分以内～約8時間以内、適切には約1～約4時間以内に投与する場合が多いだろう。同時期に投与するときは、該物質を対象の同部位に適切に投与する。用語「同部位」は、正確な位置を含むが、約0.5～約15cm、好ましくは約0.5～約5cm内でありうる。本明細書に記載の用語「分離して」は、該物質を一定間隔、たとえば約1日～数週間または数ヶ月間の間隔で投与することを意味する。活性物質はいずれの順番でも投与することができる。本明細書に記載の用語「連続的に」は、順に、たとえば分、時間、日、または週の間隔(単数または複数)で投与することを意味する。適切ならば、活性物質を定期的な反復周期で投与することができる。

【0041】

用語「薬剤(物質)」または「調節剤(物質)」は、目的とする薬理学的および/または生理学的効果を誘導する化合物を含む。該用語は、限定されるものではないが、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、活性代謝物、類似体などを含む本明細書に具体的に記載の該化合物の医薬的に許容しうる薬理学的活性成分も含む。上記用語を用いる場合は、これは活性物質自体、および医薬的に許容しうる薬理学的に活性な塩、エステル、アミド、プロドラッグ、代謝物、類似体などを含むと理解すべきである。用語「薬剤」は、狭く解釈すべきではなく、小分子、タンパク質性分子、たとえばペプチド、ポリペプチド、およびタ

ンパク質、およびそれらを含む組成物、および遺伝分子、たとえばRNA、DNAおよびその模倣物および化学的類似体、および細胞物質に及ぶ。用語「薬剤」は、本明細書に記載のポリペプチドを産生および分泌することができる細胞、および該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む。したがって、用語「薬剤」は、種々の細胞で発現および分泌するためのベクター、たとえばウイルスまたは非ウイルスベクター、発現ベクター、およびプラスミドを含む核酸構築物に及ぶ。

【0042】

あらゆる物質および/または現象のレベルに関して本明細書に記載の用語「変化させる」および文法的等価物は、該物質および/または現象の量が、量を客観的および/または主観的に決定するか否かに関わらず増加および/または減少することを表す。

10

【0043】

「抗原結合分子」は、標的抗原に対する結合親和性を有する分子を意味する。この用語は、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、および抗原結合活性を示す非免疫グロブリン由来タンパク質フレームワークに及ぶ。

【0044】

「抗原性または免疫原性活性」は、投与すると動物、適切には哺乳動物に抗原性または免疫原性反応をもたらす本発明のポリペプチド、断片、変異体、または誘導体の能力を表す(該反応はポリペプチドまたはその断片と特異的に結合する要素の産生を含む)。

【0045】

本明細書で用いている用語「アルキル」は、炭素数1~10の直鎖、分岐鎖、または環状飽和炭化水素基を表す。必要に応じて、アルキル基は、直鎖または分岐鎖配列の炭素数1、2、3、4、5、または6のアルキル基を含む C_{1-6} アルキルなどの特定数の炭素原子を有しうる。適切なアルキル基の例は、限定されるものではないが、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、4-メチルブチル、n-ヘキシル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、5-メチルペンチル、2-エチルブチル、3-エチルブチル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、およびシクロヘプチルを含む。

20

【0046】

本明細書で用いている用語「アルケニル」は、炭素原子間に1またはそれ以上の二重結合を有する炭素数2~10の直鎖、分岐鎖、または環式炭化水素基を表す。必要に応じて、アルケニル基は特定数の炭素原子を有しうる。たとえば、「 C_2-C_6 アルケニル」などの場合 C_2-C_6 は、直鎖または分岐鎖配置に2、3、4、5、または6炭素原子を有する基を含む。適切なアルケニル基の例は、限定されるものではないが、エテニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、ブタジエニル、ペンテニル、ペンタジエニル、ヘキセニル、ヘキサジエニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニルおよびシクロヘキサジエニルを含む。

30

【0047】

「アラルキル」は、上記アリール基、たとえば、 $-CH_2$ フェニル、 $-(CH_2)_2$ フェニル、 $-(CH_2)_3$ フェニル、 $-H_2CH(CH_3)CH_2$ フェニルなどで置換された上記アルキルおよびそれらの誘導体を意味する。

40

【0048】

本明細書で用いている「芳香族」または「アリール」は、少なくとも1つの環が芳香族である各環が7原子以下のあらゆる安定な単環式または二環式炭素環を意味することを意図する。そのようなアリール要素の例は、限定されるものではないが、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、ビフェニル、フェナントリル、アントリル、またはアセナフチルを含む。

【0049】

ある例では、置換基は、ゼロを含む一定範囲の炭素を含むと定義することができる(たとえば (C_0-C_6) アルキレン-アリール)。アリールがフェニルであるとみなすと、この定義

50

はそのフェニル、およびたとえば CH_2Ph 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$ を含むだろう。

【0050】

また、本明細書に記載の化合物は不斉中心を有することがあるので2以上の立体異性体が存在しうると認識できる。したがって、本発明は、たとえば約90%ee以上(たとえば約95%または97%ee)または99%ee以上の1またはそれ以上の不斉中心の実質的に純粋な異性体の化合物(そのラセミ混合物を含む)も表す。そのような異性体は天然であるか、または不斉合成(たとえばキラル中間体を用いる)またはキラル分割により製造することができる。

【0051】

抗原結合分子に言及する場合、本明細書で用いている用語「特異的に結合する」、「特異的に免疫相互作用する」などは、タンパク質の異種ポピュレーションおよび他の生物製剤の存在下で抗原の存在を確定する結合反応を表す。したがって、示したイムノアッセイ条件下で、特定抗原と結合する分子は、特定抗原と結合し、試料中に存在する有意な量の他のタンパク質または抗原と結合しない。そのような条件下の抗原との特異的結合は、特定抗原に対する特異性で選択した抗原結合分子を必要とするかもしれない。たとえば試料中に存在する該抗原と結合するが他のタンパク質と結合しない抗原結合分子は選択したタンパク質抗原を増加させることができる。種々のイムノアッセイ形式を用いて特定タンパク質と特異的に免疫相互作用する抗原結合分子を選択することができる。たとえば、固相ELISAイムノアッセイを日常的に用い、タンパク質と特異的に免疫相互作用するモノクローナル抗体を選択する。特異的免疫反応性を確定するのに用いることができるイムノアッセイ形式と条件の説明については、Harlow and Lane(1988)Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publications、New York参照のこと。

【0052】

用語「がん幹細胞」またはCSCは、広く増殖し、新しい腫瘍を形成し、がんの発達を維持する能力を含む腫瘍発生能と腫瘍維持能を有する細胞、すなわち、腫瘍を形成し増殖させる無限の増殖潜在能力を有する細胞を表す。CSCは、バルク腫瘍細胞と生物学的に異なり、幹細胞に関連する特性、特に自己再生および増殖し、特定がん試料中に見られるすべての細胞種を生じる能力を有する。用語「がん幹細胞」またはCSCは、幹細胞(SCS)の遺伝子変化とCSCになる細胞の遺伝子変化の両方を含む。特定の態様において、CSCは、適切に $\text{CD}24^+\text{CD}44^+$ である乳腺CSCであり、その実例は $\text{CD}44^{\text{high}} \text{CD}24^{\text{low}}$ を含む。

【0053】

「コーディング配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに関与するあらゆる核酸配列を意味する。それに反して、用語「非コーディング配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに関与しないあらゆる核酸配列を表す。

【0054】

本明細書を通して、特記しない限り、用語「含む(comprise、comprises、およびcomprising)」は、記載した工程または要素または工程群または要素群を含むことを示すが、いかなる他の工程または要素または工程群または要素群も排除しないと理解される。したがって、用語「含む(comprisingなど)」の使用は、記載した要素が必要または必須であるが、他の要素が任意であり存在していてもいなくてもよいことを示す。「からなる」は、用語「からなる」に続くものを含み、それに限定されることを意味する。したがって、用語「からなる」は、記載した要素を必要または必須とし、他の要素は存在しないことを示す。「本質的にからなる」は、該用語後に記載したあらゆる要素を含み、記載した要素の開示で特定した活性または作用に干渉または関与しない他の要素に限定される。したがって、用語「本質的にからなる」は、記載した要素を必要または必須とするが、他の要素は、記載した要素の活性または作用に影響を及ぼすか否かに応じて任意であり、存在することもしないこともあることを示す。

【0055】

「に対応する(corresponds toまたはcorresponding to)」は、基準核酸配列と実質的に

配列同一性を示す核酸配列（たとえば、基準核酸配列のすべてまたは部分と少なくとも約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、97、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、または最大100%の配列同一性）、または基準アミノ酸配列と十つ的な配列類似性または同一性を示すアミノ酸配列（たとえば、基準アミノ酸配列のすべてまたは部分と少なくとも50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、97、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、または最大100%の配列類似性または同一性）を意味する。

【0056】

10

用語「誘導体化する(derivatize、derivatizingなど)」は、化学反応、たとえば化合物と官能基付加試薬などを反応させることにより1またはそれ以上の反応基を化合物に付加することにより別の物質から化合物を製造または得ることを表す。

【0057】

「誘導体」は、修飾、たとえば他の化学部分と結合または複合体化によるかまたは当該分野で理解されている翻訳後修飾技術により基礎配列から誘導されたポリペプチドを意味する。用語「誘導体」は、その範囲内に、機能的等価分子をもたらす付加または欠失を含む親配列に対して行った変更も含む。

【0058】

本明細書に記載のがん幹細胞の用語「分化」は、がん幹細胞の多能性腫瘍前駆細胞への変化、および多能性腫瘍前駆細胞の単能性腫瘍前駆細胞および/または最終分化腫瘍細胞への変化を表す。

20

【0059】

病状を治療または予防する文脈において「有効量」は、該病状の、症状の発生を予防し、そのような症状を抑制し、および/または存在する症状を治療するのに有効な単用量または一連ものの部分の薬剤または組成物の量をそのような治療または予防を必要とする個体に投与することを意味する。有効量は、治療する個体の健康および身体状態、治療する個体の分類群、組成物の製剤、医学的状況の評価、および他の関連因子に応じて変化する。該量は、日常的試験により決定することができる比較的広い範囲になると予期される。

【0060】

30

本明細書で用いている用語「上皮間葉転換」(EMT)は、胚発生の正常プロセスである上皮表現型から間葉表現型への変換を表す。EMTは、イオンおよび液体輸送体として機能する損傷上皮細胞が間葉細胞を再構成するマトリックスになるプロセスでもある。がんにおいて、この形質転換は、典型的には細胞形態の変化、間葉タンパク質の発現、および侵襲性の増加をもたらす。in vitroでEMTを定義する基準は、上皮細胞の極性の損失、個々の細胞への分離、次いで細胞運動性獲得後の分散を含む(Vincent-Salomonら、Breast Cancer Res. 2003; 5(2): 101-106参照)。EMT中の発現、分散、および/または機能を変化し、因果関係がある分子のクラスは、増殖因子(たとえば、形質転換増殖因子(TGF)- β 、wnts)、転写因子(たとえば、Snail、SMAD、LEF、および核 β -カテニン)、細胞対細胞付着軸の分子(カドヘリン、カテニン)、細胞骨格モジュレーター(Rhoファミリー)、および細胞外プロテアーゼ(マトリックスメタロプロテアーゼ、プラスミノノーゲンアクチベーター)を含む(Thompsonら、Cancer Research 65、5991-5995、Jul. 15、2005参照)。

40

【0061】

本明細書で用いている用語「上皮」は、血管および他の小腔のライニングを含む体の内部および外部表面の皮膜を表す。上皮は、細胞対細胞結合により側方に相互に広範に付着している構成細胞による比較的薄いシートまたは層を形成する上皮細胞の集合体からなる。該層は極性があり、頂端側と基底側がある。上皮細胞の密な組織化に関わらず、上皮はかなり適応性があり、上皮層の細胞は、扁平から円柱状に変化しまたは一端でピンチインし他の末端で引き延ばされるなどの形状が変化する。しかしながら、これは個々にではなく細胞群に生じる傾向がある(Thompsonら、2005、上記、参照)。

50

【0062】

用語「発現」は、遺伝子産物の生合成を表す。たとえば、コーディング配列の場合、発現はコーディング配列のmRNAへの転写とmRNAの1またはそれ以上のポリペプチドへの翻訳を含む。反対に、非コーディング配列の発現は、非コーディング配列の転写産物への転写のみを含む。

【0063】

「発現ベクター」は、該ベクター内に含まれるポリヌクレオチドの転写と適切にはポリヌクレオチドによってコードされるペプチドまたはポリペプチドの合成を指示することができるあらゆる遺伝子要素を意味する。そのような発現ベクターは当業者に知られている。

10

【0064】

本明細書で用いている用語「機能」は、生物学的、酵素的、または治療的機能を表す。

【0065】

本明細書で用いている用語「遺伝子」は、細胞のゲノムのあらゆるすべての分離したコーディング領域と関連非コーディングおよび調節領域を表す。該用語は、特定ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム、イントロン、および発現の調節に関与する隣接5'および3'非コーディングヌクレオチド配列を意味することを意図する。この点で、該遺伝子は、さらに、特定遺伝子と天然に関連するプロモーター、エンハンサー、終止および/またはポリアデニル化シグナルなどの調節シグナルまたはヘテロローガスな調節シグナルを含みうる。DNA配列は、cDNAまたはゲノムDNA、またはその断片でありうる。該遺伝子は、染色体外維持または宿主への統合のために適切なベクター中に導入することができる。

20

【0066】

化学物質種に用いる用語「基」は、分子の部分を形成する一連の原子を表す。ある場合には、基は互いに結合して分子の部分を形成する2またはそれ以上の原子を含みうる。基は、一価または多価(たとえば二価)で、分子の1またはそれ以上のさらなる基と結合することができる。たとえば、一価の基は、分子の別の基と結合することができるようにその水素原子の1つが除去された分子と考えることができる。基は正または負に荷電しうる。たとえば、正に荷電した基は、1またはそれ以上のプロトン(すなわち、 H^+)が付加した中性基と考えることができ、負に荷電した基は、1またはそれ以上のプロトンが除去された中性基と考えることができる。基の非限定的例は、限定されるものではないが以下の基を含む：アルキル基、アルキレン基、アルケニル基、アルケニレン基、アルキニル基、アルキニレン基、アリール基、アリーレン基、イミニル基、イミニレン基、ヒドリド基、ハロ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、カルボキシ基、チオ基、アルキルチオ基、ジスルフィド基、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、シリル基、およびシロキシ基。単独または複合語または基の定義に用いているアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロサイクリルなどの基は、所望により1またはそれ以上の置換基で置換することができる。本明細書で用いている「所望により置換された」は、以下から選ばれる1またはそれ以上の基でさらに置換されているかまたは置換されていない基を表す：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ハロ、ハロアルキル、ハロアルケニル、ハロアルキニル、ハロアリール、ヒドロキシ、アルコキシ、アルケニルオキシ、アリールオキシ、ベンジルオキシ、ハロアルコキシ、ハロアルケニルオキシ、ハロアリールオキシ、ニトロ、ニトロアルキル、ニトロアルケニル、ニトロアルキニル、ニトロアリール、ニトロヘテロサイクリル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、ジアアリールアミノ、フェニルアミノ、ジフェニルアミノ、ベンジルアミノ、ジベンジルアミノ、ヒドラジノ、アシル、アシルアミノ、ジアシルアミノ、アシルオキシ、ヘテロサイクリル、ヘテロシクロキシ、ヘテロシクラミノ、ハロヘテロサイクリル、カルボキシエステル、カルボキシ、カルボキシアミド、メルカプト、アルキルチオ、ベンジルチオ、アシルチオ、およびリン含有基。本明細書で用いている用語「所望により置換された」は、 CH_2 基をカルボニル($C=O$)基

30

40

50

で置換することを示すこともある。所望の置換基の非限定的例は以下のものを含む：アルキル、好ましくは C_{1-8} アルキル(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえばメチル、エチル、プロピル、ブチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、またはシクロヘキシル)、ヒドロキシ C_{1-8} アルキル(たとえば、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシプロピル)、アルコキシアリル(たとえば、メトキシメチル、メトキシエチル、メトキシプロピル、エトキシメチル、エトキシエチル、エトキシプロピルなど) C_{1-8} アルコキシ、(たとえば、 C_{1-6} アルコキシ、たとえば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、シクロプロポキシ、シクロブトキシ)、ハロ(フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード)、モノフルオロメチル、モノクロロメチル、モノプロモメチル、ジフルオロメチル、ジクロロメチル、ジプロモメチル、トリフルオロメチル、トリクロロメチル、トリプロモメチル、ヒドロキシ、フェニル(それ自身が本明細書に記載の所望の置換基、たとえば、ヒドロキシ、ハロ、メチル、エチル、プロピル、ブチル、メトキシ、エトキシ、アセトキシ、アミノでさらに置換することができる)、ベンジル(ここで、 CH_2 および/またはフェニル基は本明細書に記載のごとくさらに置換することができる)、フェノキシ(ここで、 CH_2 および/またはフェニル基本明細書に記載のごとくさらに置換することができる)、ベンジロキシ(ここで、 CH_2 および/またはフェニル基は本明細書に記載のごとくさらに置換することができる)、アミノ、 C_{1-8} アルキルアミノ(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえば、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ)、ジ C_{1-8} アルキルアミノ(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえばジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ)、アシルアミノ(たとえば、 $NHC(O)CH_3$)、フェニルアミノ(ここで、フェニルそれ自体を本明細書に記載のごとくさらに置換することができる)、ニトロ、ホルミル、 $-C(O)-C_{1-8}$ アルキル(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえばアセチル)、 $O-C(O)-$ アルキル(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえばアセチルオキシ)、ベンゾイル(ここで、 CH_2 および/またはフェニル基それ自身をさらに置換することができる)、 CH_2 を $C=O$ 、 CO_2H 、 CO_2 C_{1-8} アルキルで置換(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえば、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル)、 CO_2 フェニル(ここで、フェニルそれ自身をさらに置換することができる)、 $CONH_2$ 、 $CONH$ フェニル(ここで、フェニルそれ自身を本明細書に記載のごとくさらに置換することができる)、 $CONH$ ベンジル(ここで、 CH_2 および/またはフェニル基を本明細書に記載のごとくさらに置換することができる)、 $CONH$ C_{1-8} アルキル(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえば、メチルアミド、エチルアミド、プロピルアミド、ブチルアミド)、 $CONH$ C_{1-8} アルキルアミン(たとえば、 C_{1-6} アルキル、たとえば、アミノメチルアミド、アミノエチルアミド、アミノプロピルアミド、アミノブチルアミド)、 $-C(O)$ ヘテロサイクリル(たとえば、 $-C(O)-1$ -ピペリジン、 $-C(O)-1$ -ピペラジン、 $-C(O)-4$ -モルホリン)、 $-C(O)$ ヘテロアリール(たとえば、 $-C(O)-1$ -ピリジン、 $-C(O)-1$ -ピリダジン、 $-C(O)-1$ -ピリミジン、 $-C(O)-1$ -ピラジン)、 $CONH$ ジ C_{1-8} アルキル(たとえば、 C_{1-6} アルキル)。

【0067】

「ヘテロアラルキル」基は、ヘテロアリール基で置換された上記アルキル、たとえば、 $-CH_2$ ピリジニル、 $-(CH_2)_2$ ピリミジニル、 $-(CH_2)_3$ イミダゾリルなど、およびその誘導体を意味する。

【0068】

本明細書で用いている用語「ヘテロアリール」または「ヘテロ芳香族」は、少なくとも1の環が芳香族であり、O、N、およびSからなる群から選ばれる1~4ヘテロ原子を含む各環が7原子以下の安定な単環式または二環式環を表す。この定義の範囲内のヘテロアリール基は、限定されるものではないがいかのものを含む：アクリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、キノキサリニル、ピラゾリル、インドリル、ベンゾトリアゾリル、フラニル、チエニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、キノリニル、イソキノリニル、オキサゾリル、イソキサゾリル、インドリル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、テトラヒドロキノリン。また、下記複素環の定義において、「ヘテロアリール」は、あらゆる窒素含有ヘテロアリールのN-オキシド誘導体を含むと理解される。

【0069】

10

20

30

40

50

「ヘテロサイクリル」および「ヘテロアリール」のさらなる例は、限定されるものではないが以下のものを含む：ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾフラザニル、ベンゾピラゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチオフェニル、ベンゾキサゾリル、カルバゾリル、カルボリニル、シンノリニル、フラニル、イミダゾイル、インドリニル、インドリル、インドラジニル、インダゾリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ナフトピリジニル、オキサジアゾリル、オキサゾリル、オキサゾリン、イソキサゾリン、オキセタニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドピリジニル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、テトラヒドロピラニル、テトラゾリル、テトラゾロピリジル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、アゼチジニル、アジリジニル、1,4-ジオキサニル、ヘキサヒドロアゼピニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピロリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ジヒドロベンゾイミダゾリル、ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾチオフェニル、ジヒドロベンゾキサゾリル、ジヒドロフラニル、ジヒドロイミダゾリル、ジヒドロインドリル、ジヒドロイソオキサゾリル、ジヒドロイソチアゾリル、ジヒドロオキサジアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、ジヒドロピラジニル、ジヒドロピラゾリル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロピリミジニル、ジヒドロピロリル、ジヒドロキノリニル、ジヒドロテトラゾリル、ジヒドロチアジアゾリル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロチエニル、ジヒドロトリアゾリル、ジヒドロアゼチジニル、メチレンジオキシベンゾイル、テトラヒドロフラニル、およびテトラヒドロチエニル、およびそのN-オキシド。ヘテロサイクリル置換基の結合は炭素原子またはヘテロ原子を介して生じることができる。

10

20

【0070】

本明細書で用いている「ヘテロアリーレン」は、好ましくは約3～約15員の、環系中の原子の1またはそれ以上の、より好ましくは1～3がヘテロ原子、すなわち、炭素以外の要素、たとえば、窒素、酸素および硫黄原子である二価の単環式または多環式環系である。ヘテロアリーレン基は、所望により、1またはそれ以上の、好ましくは1～3のアリール基置換基で置換されうる。典型的なヘテロアリーレン基は、たとえば1,4-イミダゾリレンを含む。

【0071】

本明細書で用いている用語「複素環」、「ヘテロ脂肪族」、または「ヘテロサイクリル」は、O、NおよびSからなる群から選ばれる1～4ヘテロ原子を含む5～10員の非芳香族複素環を意味することを意図し、二環式基を含む。

30

【0072】

「ヘテロサイクリルアルキル」基は、複素環基、たとえば、 $-\text{CH}_2$ ピロリジン-1-イル、 $-(\text{CH}_2)_2$ ピペリジン-1-イルなどで置換された上記のアルキル、およびその誘導体を意味する。

【0073】

本明細書で用いている用語「high(高い)」は、正常より大きい、標準(たとえば予め決定した尺度またはサブグループ尺度)より大きい、または別のサブグループ尺度より比較的大きい尺度を表す。たとえば、 $\text{CD44}^{\text{high}}$ は、正常CD44尺度より大きいCD44の尺度を表す。したがって、「 $\text{CD44}^{\text{high}}$ 」は、常に、対象の身体に関連部分または対象の身体由来の関連試料中の少なくとも検出可能なCD44に対応する。正常尺度は、当業者が利用可能なあらゆる方法にしたがって決定することができる。用語「high(高い)」は、予め決定した尺度、たとえば予め決定したカットオフに等しいかまたはそれより大きい尺度も表しうる。対象が特定マーカーについて「high」でない場合は、該マーカーについて「low(低い)」である。一般的に、対象が「high」であるか「low」であるかを決定するのに用いるカットオフは、区分が臨床的関連性を持つように選択すべきである。

40

【0074】

「同族体」は、本明細書において共通の先祖DNA配列由来の十分な別の遺伝子または産物と関連する遺伝子またはその産物を表すのに用いる。

50

【0075】

用語「ホルモンレセプター陰性(HR-)腫瘍」は、標準的方法(たとえば、患者の生物試料の核の免疫組織染色)により決定したある閾値以上の腫瘍の増殖、生存率、または生存能力を促すホルモンに対するレセプターを発現しない腫瘍を意味する。該閾値は、Allredスコアまたは遺伝子発現を用いて測定することができる。たとえば、Harveyら(1999. J Clin Oncol 17:1474-1481)およびBadveら(2008. J Clin Oncol 26(15):2473-2481)参照。ある態様において、該腫瘍はエストロゲンレセプター(ER-)および/またはプロゲステロンレセプター(PR-)を発現しない。

【0076】

用語「ホルモンレセプター陽性(HR+)腫瘍」は、標準的方法(たとえば、患者の生物試料の核の免疫組織染色)により決定したある閾値以上の腫瘍の増殖、生存率、または生存能力を促すホルモンに対するレセプターを発現する腫瘍を意味する。該閾値は、Allredスコアまたは遺伝子発現を用いて測定することができる。たとえば、Harveyら(1999. J Clin Oncol 17:1474-1481)およびBadveら(2008. J Clin Oncol 26(15):2473-2481)参照。標準的方法(たとえば、患者の生物試料の核の免疫組織染色)により決定したエストロゲンレセプター(ER)またはプロゲステロンレセプター(PR)を発現する腫瘍。

【0077】

本明細書で用いている用語「ホルモン耐性がん」は、非ホルモン耐性がんと比較してホルモン療法またはエンドクリン療法に対する反応が低下したまたは排除されたがんを表す。生物学および臨床的観点から、種々の耐性パターンを区別することができる:A)エンドクリンレセプター発現に関わらずエンドクリンレセプター(たとえば、エストロゲンレセプター)標的化に本質的に非感受性の腫瘍(汎エンドクリン療法耐性またはde novo耐性); B)ホルモン依存性であるが、1またはそれ以上の特定のエンドクリン療法に耐性(薬剤選択的耐性;たとえば、タモキシフェンに反応し、アロマターゼ阻害剤に反応しない)の腫瘍;およびC)最初にエンドクリン療法に反応するが、次いで進行する(耐性獲得)腫瘍。すべてのタイプの耐性が本明細書に含まれる。ある態様において、ホルモン耐性がんは、ホルモンまたはエンドクリン療法の実施前にホルモン耐性である(すなわち、de novoホルモン耐性である)がんである。他の態様において、ホルモン耐性がんは、最初はホルモン耐性でないが、ホルモンまたはエンドクリン療法の少なくとも1の処置後にホルモン耐性になるがんである。

【0078】

本明細書で用いている用語「ホルモン療法」または「エンドクリン療法」は、ホルモンの遮断または除去に関する処置と定義される。該処置は、ホルモンまたはプロホルモンを合成する腺を除去し、ホルモン合成を遮断または阻害し、またはホルモンとそのレセプターの結合を抑制または阻害し、またはホルモンレセプターを下方調節または分解することを含む。

【0079】

本明細書において、「ハイブリダイゼーション」は、DNA-DNAハイブリッドまたはDNA-RNAハイブリッドを生じる相補的ヌクレオチド配列の対合を表すのに用いる。相補的塩基配列は、塩基対合則に関連する配列である。DNAでは、AはTと対合し、CはGと対合する。RNAでは、UはAと対合し、CはGと対合する。この点で、本明細書で用いている用語「マッチ」および「ミスマッチ」は、相補的核酸鎖中の対合ヌクレオチドのハイブリダイゼーション可能性を表す。マッチしたヌクレオチドは効率的にハイブリダイズする(たとえば上記伝統的A-TおよびG-C塩基対)。ミスマッチは効率的にハイブリダイズしない他のヌクレオチドの組み合わせである。本発明において、好ましい対合メカニズムは、オリゴマー化合物の鎖の相補的ヌクレオチドまたはヌクレオチド塩基(核酸塩基)間の水素結合(ワトソンクリック、フーグスティーン、または逆フーグスティーン水素結合でありうる)を含む。たとえば、アデニンとチミンは、水素結合の形成を介して対合する相補的核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは、当業者に知られた種々の環境下で起きうる。

【0080】

用語「～と特異的にハイブリダイズする」などは、配列が複合混合物(たとえば、全細胞)DNAまたはRNAで存在する場合にストリンジェント条件下で分子が特定ヌクレオチド配列のみと結合、2本鎖形成、またはハイブリダイズすることを表す。

【0081】

本明細書で用いている用語「ヒドロカルビル」は、飽和、不飽和、芳香族、直鎖または分岐鎖、または環式基(多環基を含む)を含む炭素と水素を含むあらゆるラジカルを含む。ヒドロカルビルは、限定されるものではないが、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₃-C₁₀シクロアルキル、アリール、たとえば、フェニルおよびナフチル、Ar(C₁-C₈)アルキル、たとえば、ベンジル(いずれも所望により置換されうる)を含む。

【0082】

本明細書において「免疫反応性(の)」への言及は、分子間の相互作用、反応、または他の形の結合、特に該分子の1が免疫系の成分である場合は模倣物への言及を含む。

【0083】

本明細書で用いている用語「阻害剤」は、LSD ポリペプチド(たとえばLSD1(リジン特異的ヒストンデメチラーゼ1Aとしても知られる)；リジン(K)特異的デメチラーゼ1(KDM1)；リジン(K)特異的デメチラーゼ1A(KDM1A)；BRAF35-HDAC複合体タンパク質BHC110；FAD結合タンパク質BRAF35-HDAC複合体、110 kDaサブユニット；アミノキシダーゼ(フラビン含有)ドメイン2(AOF2)；リジン特異的ヒストンデメチラーゼ1；RP1-184J9.1およびLSD2(リジン特異的ヒストンデメチラーゼ1B(KDM1B)としても知られる)；アミノキシダーゼフラビン含有1(AOF1)；アミノキシダーゼ(フラビン含有)ドメイン1；フラビン含有アミノキシダーゼドメイン含有タンパク質1；リジン特異的ヒストンデメチラーゼ2の機能または生物活性；またはLSD遺伝子の発現(たとえば、LSD1(KDM1Aとして知られる)；AOF2；BHC110；KDM1およびLSD2(KDM1Bとして知られる)；AOF1；bA204B7.3；C6orf193；dJ298J15.2)を減少または阻害する薬剤を意味する。

【0084】

本明細書で用いている用語「low(低い)」は、正常より低い、標準(たとえば予め決定した尺度またはサブグループ尺度)より低いか、または別のサブグループ尺度より比較的低い尺度を表す。たとえば、CD24^{low}は、正常CD24尺度より低いCD24の尺度を表す。正常尺度は、当業者が利用可能なあらゆる方法にしたがって決定することができる。用語「low」は、予め決定した尺度、たとえば予め決定したカットオフと等しいかまたはそれより低い尺度も表しうる。

【0085】

用語「低級アルキル」は、炭素数1~6の直鎖および分岐鎖アルキル基、たとえば、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、2-メチルペンチルなどを表す。ある態様において、低級アルキル基はメチルまたはエチルである。

【0086】

用語「低級アルコキシ」は、炭素数1~6の直鎖および分岐鎖アルコキシ、たとえば、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソ-プロポキシ、n-ブトキシ、tert-ブトキシ、sec-ブトキシ、n-ペントキシ、n-ヘキソキシ、2-メチル-ペントキシなどを表す。通常、低級アルコキシ基はメトキシまたはエトキシである。

【0087】

本明細書で用いている用語「間葉」は、結合組織、骨、軟骨、および循環およびリンパ系が発生するゼラチン状基質中に組み込まれたゆるく充填された未分化の細胞からなる胚子中胚葉の部分を表す。間葉は、比較的びまん性の組織ネットワークを形成する細胞の集合体である。間葉は、完全な細胞層ではなく、該細胞は典型的にはその表面上に隣と接合して結合する点のみを有する。この接着は、カドヘリン結合にも関与しうる(Thompsonら、2005、上記参照)。

【0088】

本明細書で用いている用語「上皮細胞間葉転換」(MET)は、運動性、多極性、または紡

10

20

30

40

50

錘形間葉細胞の上皮という極性細胞の平面アレイへの転換に関与する可逆的生物学的プロセスである。METは、EMTの逆プロセスである。METは、正常発生、がん転移、および誘導多能性幹細胞再プログラミングで起きる。

【0089】

「調節する(modulating)」は、標的分子のレベルまたは機能的活性を直接または間接的に増加または減少させることを意味する。たとえば、ある薬剤は、標的分子以外の分子と相互作用することによりレベル/活性を間接的に調節しうる。この点で、標的ポリペプチドをコードする遺伝子の間接的調節は、その範囲内に第1核酸分子の発現の調節を含み、第1核酸分子の発現産物は標的ポリペプチドをコードする核酸分子の発現を調節する。

【0090】

本明細書で用いている用語「オリゴヌクレオチド」は、ホスホジエステル結合(またはその関連構造変異体または合成類似体)を介して結合した多様なヌクレオチド残基(デオキシリボヌクレオチド、またはリボヌクレオチド、またはその関連構造変異体または合成類似体)からなるポリマーを表す。したがって、用語「オリゴヌクレオチド」は典型的にはヌクレオチド残基とその間の結合が天然であるヌクレオチドポリマーを表すが、該用語はその範囲内に限定されるものではないが、ペプチド核酸(PNAs)、ホスホルアミデート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、2'-O-メチルリボ核酸などを含む種々の類似体も含むと理解される。該分子の正確なサイズは、特定の応用に応じて異なり得る。オリゴヌクレオチドは、典型的には長さがかなり短く、一般的には約10~30ヌクレオチド残基であるが、該用語はあらゆる長さの分子を表すことができる。しかし、用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、典型的には長いオリゴヌクレオチドに用いる。

【0091】

本明細書で用いている用語「操作可能に連結した」または「操作可能に結合した」は、限定されるものではないがプロモーターを含む調節要素の調節管理下に構造遺伝子を置き、次いで該遺伝子の転写および所望により翻訳を調節することを意味する。ヘテロローガスなプロモーター/構造遺伝子の組み合わせの構築では、一般的には、遺伝子配列またはプロモーターは遺伝子の転写開始部位から離れて位置することが好ましく、それが天然環境で調節する遺伝子配列またはプロモーターと該遺伝子(すなわち、遺伝子配列またはプロモーターが由来する遺伝子)間の距離とほぼ同じである。当該分野で知られているように、この距離のいくらかの変化を、機能を損失せずに含むことができる。同様に、その調節下に置かれるヘテロローガスな遺伝子に関する調節配列要素の好ましい配置は、その天然環境における該要素(すなわちそれが由来する遺伝子)の配置で定義される。

【0092】

用語「過剰発現する」、「過剰発現」または「過剰発現した」は、通常、がん細胞で正常細胞と比べて検出可能なより高レベルに転写または翻訳される遺伝子(たとえば、LSD遺伝子)を互換性に表す。したがって、過剰発現は、タンパク質とRNAの過剰発現(転写、転写後プロセッシング、翻訳、翻訳後プロセッシング、安定性変化、およびタンパク質分解変化の増加による)、およびタンパク質トラフィックパターンの変化(核局在性の増加)および機能的活性の増加(たとえば、基質の酵素加水分解の増加)による局所的過剰発現を表す。また、過剰発現は、正常細胞または比較細胞(たとえば、乳腺細胞)に比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上でありうる。

【0093】

本明細書で互換性に用いる用語「患者」、「対象」、「宿主」、または「個体」は、療法または予防が必要なあらゆる対象、特に脊椎動物対象、さらに特に哺乳動物対象を表す。本発明の範囲内に属する適切な脊椎動物は、限定されるものではないが、脊索動物亜門のあらゆるメンバー(霊長目の動物(たとえば、ヒト、サル、および類人猿)を含む)を含み、サル種、たとえばMacaca属(たとえば、カニクイザル、たとえばMacaca fascicularis、および/またはアカゲザル(Macaca mulatta))、およびヒヒ(Papio ursinus)、およびマーモセット(Callithrix属の種)、リスザル(Saimiri属の種)、およびシシザル(Saguinus属の種)、および類人猿種、たとえばチンパンジー(Pan troglodytes)、齧歯動物(たとえば、

マウス、ラット、モルモット)、ウサギ目の動物(たとえば、ウサギ、野ウサギ)、ウシ亜科の動物(たとえばウシ)、ヒツジ種(ovines)(たとえば、ヒツジ)、ヤギ種(たとえば、ヤギ)、ブタ種(porcines)(たとえば、ブタ)、ウマ科動物(たとえば、ウマ)、イヌ科動物(たとえば、イヌ)、ネコ科動物(たとえば、ネコ)、鳥類(たとえば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガン、愛玩鳥(たとえばカナリア、セキセイインコなど))、海洋哺乳動物(たとえば、イルカ、クジラ)、爬虫類(ヘビ、カエル、トカゲなど)、および魚を含む。特定の態様において、該対象は、霊長類、たとえばヒトである。しかしながら、前記用語は症状が存在することを意味しないと理解される。

【0094】

「医薬的に許容しうる担体」は、生物学的または非生物学的にも望ましくないものでない物質からなる医薬的ベークルを意味し、すなわち、該物質は、選択した活性薬剤と共にいかなるもしくは実質的な副作用も生じることなく対象に投与することができる。担体は、賦形剤および他の添加剤、たとえば、希釈剤、界面活性剤、着色料、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、保存料、トランスフェクション剤などを含みうる。

【0095】

同様に、本明細書に記載の化合物の「薬理的に許容しうる」塩、エステル、アミド、プロドラッグ、または誘導体は、生物学的または非生物学的にも望ましくないものでない塩、エステル、アミド、プロドラッグ、または誘導体である。

【0096】

用語「ポリヌクレオチド」、「遺伝子物質」、「遺伝子形」、「核酸」および「ヌクレオチド配列」は、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合形成、および混合ポリマー、センスおよびアンチセンス鎖を含み、当業者が容易に認識するように化学的または生化学的に修飾されることがあるか、または非天然または誘導体化ヌクレオチド塩基を含むことがある。

【0097】

「フェニルアルキル」は、フェニルで置換されている上記アルキル、たとえば、 $-\text{CH}_2$ フェニル、 $-(\text{CH}_2)_2$ フェニル、 $-(\text{CH}_2)_3$ フェニル、 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ フェニルなど、およびそれらの誘導体を意味する。フェニルアルキルはアラルキル基の一部である。

【0098】

用語「ポリヌクレオチド変異体」および「変異体」は、基準ポリヌクレオチド配列と実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチド、または当該分野で知られたストリンジェント条件下で基準配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドを表す(たとえば、Sambrookら、Molecular Cloning. A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、1989参照)。これらの用語は、1またはそれ以上のヌクレオチドが付加または欠失、または異なるヌクレオチドで置換しているポリヌクレオチドも含む。この点で、突然変異、付加、欠失、および置換を含むある種の変化を基準ポリヌクレオチドにもたらすことにより、変化したポリヌクレオチドが基準ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持することができることは十分理解される。用語「ポリヌクレオチド変異体」および「変異体」は天然の対立遺伝子変異体も含む。

【0099】

本明細書で互換性に用いる用語「ポリペプチド」、「タンパク質性分子」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーおよびその変異体および合成類似体を表す。したがって、これらの用語は、1またはそれ以上のアミノ酸残基が合成非天然アミノ酸であるアミノ酸ポリマー、たとえば、対応する天然アミノ酸の化学類似体、および天然アミノ酸ポリマーに適用する。これらの用語は、修飾、たとえば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを排除しない。可溶性形の対象タンパク質性分子が特に有用である。該定義内には、たとえばアミノ酸の1またはそれ以上の類似体(たとえば非天然アミノ酸)を含むポリペプチドまたは置換結合を有するポリペプチドが含まれる。

【0100】

用語「ポリペプチド変異体」は、1またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸で置換しているポリペプチドを表す。いくつかのアミノ酸を、後記のポリペプチドの活性の性質

10

20

30

40

50

を変化させずに広く同様の特性を有する他のものに置換することができる(保存的置換)ことは当該分野でよく理解されている。これらの用語は、1またはそれ以上のアミノ酸が付加または欠失し、または別のアミノ酸で置換しているポリペプチドも含む。

【0101】

用語「プロドラッグ」は、その最も広い意味で用い、インビボで本発明の化合物に変換されるその誘導体も含む。そのような誘導体は、たとえば、遊離ヒドロキシ基がエステル誘導体に変換された化合物を含み、当業者に容易に思い浮かぶだろう。

【0102】

本明細書で用いている用語「予防する(prevent、prevented、またはpreventing)」は、疾患または病状の発症に対する対象の抵抗性が増加する、すなわち、対象が疾患または病状を発症する可能性が減少する予防的処置、および疾患または病状後の処置がそれを完全に除去または減少させ、またはそれが悪化するのを予防するために開始されることを表す。これらの用語は、その範囲内に該疾患または病状にかかりやすいが、そうであるとまだ診断されていない対象に該疾患または病状が生じるのを予防することも含む。

【0103】

本明細書で用いている「ラセミ体(racemate)」はエナンチオマーの混合物を表す。

【0104】

用語「減少する」、「阻害する」、「縮小する」、「抑制する」、「低下する」および文法的等価物は、第2試料に対して第1試料の物質および/または現象のレベルについて用いる場合、第1試料中の物質および/または現象の量が、あらゆる当該分野で認められた統計分析法を用いて統計的に有意なあらゆる量だけ第2試料中より低いことを意味する。ある態様において、該低下は、たとえば患者が疾患の症状、たとえば痛み、疲労などの主観的知見に言及する場合に主観的に決定することができる。別の態様において、該低下は、患者由来の試料中のCSCおよび/または非CSC腫瘍細胞の数が患者由来の以前の試料より低い場合に客観的に決定することができる。別の態様において、第1試料中の物質および/または現象の量は、第2試料中の同じ物質および/または現象の量より少なくとも10%低い。別の態様において、第1試料中の物質および/または現象の量は、第2試料中の同じ物質および/または現象の量より少なくとも25%低い。さらに別の態様において、第1試料中の物質および/または現象の量は、第2試料中の同じ物質および/または現象の量より少なくとも50%低い。さらなる態様において、第1試料中の物質および/または現象の量は、第2試料中の同じ物質および/または現象の量より少なくとも75%低い。さらに別の態様において、第1試料中の物質および/または現象の量は、第2試料中の同じ物質および/または現象の量より少なくとも90%低い。あるいはまた、差は「n倍」の差として表すことができる。

【0105】

用語「塩」、「誘導体」および「プロドラッグ」は、あらゆる医薬的に許容しうる塩、エステル、水和物、またはレシピエントに投与すると本発明の化合物またはその活性代謝物または残基を(直接または間接的に)もたらすことができるあらゆる他の化合物を含む。適切な医薬的に許容しうる塩は、医薬的に許容しうる無機酸(たとえば、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、炭酸、ホウ酸、スルファミン酸、および臭化水素酸)の塩、または医薬的に許容しうる有機酸(たとえば、酢酸、プロピオン酸、酪酸、酒石酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フマル酸、クエン酸、乳酸、粘液酸、グルコン酸、安息香酸、コハク酸、シュウ酸、フェニル酢酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、サリチル酸、スルファニル酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、エデト酸、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、パントテン酸、タンニン酸、アスコルビン酸、および吉草酸)の塩を含む。塩基性塩は、限定されるものではないが、医薬的に許容しうるカチオン、たとえばナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、およびアルキルアンモニウムを用いて形成されるものを含む。塩基性窒素含有基は、ハロゲン化低級アルキル、たとえば、塩化、臭化、およびヨウ化メチル、エチル、プロピル、およびブチル；硫酸ジアルキル、たとえば硫酸ジメチルおよびジエチ

ルなどで4級化することもできる。しかしながら、医薬的に許容されない塩も医薬的に許容しうる塩の製造に有用でありうるので本明細書の範囲内であることは理解されるだろう。塩およびプロドラッグおよび誘導体の製造は、当該分野で知られた方法により行うことができる。たとえば、金属塩は本発明の化合物と金属水酸化物を反応させることにより製造することができる。酸塩は適切な酸と本発明の化合物を反応させることにより製造することができる。

【0106】

用語「選択的」は、別のLSD、または別の酵素、たとえばモノアミンオキシダーゼ(MAO)(たとえば、MAO AまたはMAO B)に対する実質的な阻害または拮抗を示さずにLSD2に対する阻害または拮抗を示す化合物を表す。したがって、LSD1に選択的な化合物は、別のLSD(すなわち、LSD1以外のLSD、たとえば、LSD2)、または別の酵素(たとえば、MAO)の阻害または拮抗について約2倍、5倍、10倍、20倍、50倍大きい、または約100倍大きいLSD1選択性を示す。ある態様において、選択的化合物は、別のLSDまたは別の酵素(たとえば、MAO)より特定のLSDに対して少なくとも50倍大きい阻害または拮抗を示す。さらに他の態様において、選択的化合物は、別のLSDまたは別の酵素(たとえば、MAO)より特定のLSDに対して少なくとも100倍大きい阻害または拮抗を示す。さらに他の態様において、選択的化合物は、別のLSDまたは別の酵素(たとえば、MAO)より特定のLSDに対して少なくとも500倍大きい阻害または拮抗を示す。さらに他の態様において、選択的化合物は、別のLSDまたは別の酵素(たとえば、MAO)より特定のLSDに対して少なくとも1000倍大きい阻害または拮抗を示す。あるいは、用語「選択的」は、PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 、またはPKC- ν などの別のPKC酵素の機能を実質的に阻害または拮抗することなく、PKC- θ を阻害するか、またはPKC- θ に対する拮抗作用を示す化合物を意味する。対照的に、用語「非選択的」は、PKC- θ を阻害するか、またはPKC- θ に対する拮抗作用を示し、かつ、PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 、またはPKC- ν などの少なくとも1つの他のPKC酵素の機能を実質的に阻害するか、または拮抗する化合物を意味する。一般に、PKC- θ に選択的である化合物は、もう1つのPKC(すなわち、PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 、またはPKC- ν などのPKC- θ 以外のPKC)の阻害または拮抗作用に関し、約2倍、5倍、10倍、20倍、50倍または約100倍を超えるPKC- θ 選択性を示す。いくつかの実施態様において、選択的化合物は、もう1つのPKC(すなわち、PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 、またはPKC- ν などのPKC- θ 以外のPKC)に対してよりも少なくとも50倍大きいPKC- θ に対する阻害または拮抗作用を示す。さらに他の実施態様において、選択的化合物は、もう1つのPKC(すなわち、PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 、またはPKC- ν などのPKC- θ 以外のPKC)に対してよりも少なくとも100倍大きいPKC- θ に対する阻害または拮抗作用を示す。さらに他の実施態様において、選択的化合物は、もう1つのPKC(すなわち、PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 、またはPKC- ν などのPKC- θ 以外のPKC)に対してよりも少なくとも500倍大きいPKC- θ に対する阻害または拮抗作用を示す。さらに他の実施態様において、選択的化合物は、もう1つのPKC(すなわち、PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 、またはPKC- ν などのPKC- θ 以外のPKC)に対してよりも少なくとも1000倍大きいPKC- θ に対する阻害または拮抗作用を示す。

【0107】

本明細書で用いている用語「配列同一性」は、配列が比較のウィンドウでヌクレオチド毎ベースまたはアミノ酸毎のベースで同じである程度を表す。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較のウィンドウで2つの最適にアラインメントした配列を比較し、同じ核酸塩基(たとえば、A、T、C、G、I)または同じアミノ酸残基(たとえば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、およびMet)が両配列に生じる位置の数を決定してマッチした位置の数を得、マッチした位置の数を比較のウィンドウ中の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で割

り、および結果に100をかけて配列同一性のパーセンテージをうることにより計算する。本発明の目的では、「配列同一性」は適切な方法により計算した「マッチパーセンテージ」を意味すると理解される。たとえば、配列同一性分析は、DNASISコンピュータプログラム(windows用バージョン2.5(Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USAから入手可能)を用い、ソフトウェア添付の基準マニュアルで用いている標準デフォルトを用いて行うことができる。

【0108】

「類似性」は、表2に記載の保存的置換と同じかまたはそれを構成するアミノ酸のパーセンテージ数を表す。

【表2】

10

表 2

最初の残基	典型的な置換基
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile,
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

20

30

40

【0109】

類似性は、配列比較プログラム、たとえばGAP(Deverauxら 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395)を用いて決定することができる。このように、本明細書に記載のものと同様または実質的に異なる長さの配列はアラインメントにギャップを挿入することにより

50

比較されるかもしれない。そのようなギャップはたとえばGAPで用いた比較アルゴリズムにより決定される。

【0110】

2またはそれ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列の関係を説明するのに用いる用語は、「基準配列」、「比較ウインドウ」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」、および「実質同一」を含む。「基準配列」は、ヌクレオチドおよびアミノ酸残基の長さが少なくとも12、しばしば15～18およびしばしば少なくとも25モノマー単位(含む)である。2つのポリヌクレオチドは、それぞれ(1)2ポリヌクレオチド間が同様の配列(すなわち、完全ポリヌクレオチド配列の部分のみ)および(2)2ポリヌクレオチド配列間に不一致がある配列を含みうるので、2(またはそれ以上の)ポリヌクレオチド間の比較は典型的には配列類似性の局在領域を同定および比較するために「比較ウインドウ」の2ポリヌクレオチドの配列を比較することにより行う。「比較ウインドウ」は、2配列を最適にアラインメントした後に配列を隣接位置の同数の基準配列と比較する少なくとも6隣接位置、通常約50～約100、より通常約100～約150の概念的断片を表す。比較ウインドウは、2配列の最適なアラインメントのために基準配列(付加または欠失を含まない)と比べて約20%またはそれ以下の付加または欠失(すなわちギャップ)を含みうる。比較ウインドウをアラインメントするための配列の最適なアラインメントは、アルゴリズムのコンピューターでの実施(GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison、WI、USA))、または検査および最もよいアラインメント(すなわち、比較ウインドウで最も高い相同性パーセンテージをもたらす)により行うことができる。たとえば、Altschulら、1997、Nucleic Acids Res. 25:3389に記載のプログラムのBLASTファミリーを参照することもできる。配列分析の詳細な考察は、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons Inc、1994-1998、Chapter 15のUnit 19.3にみることができる。

【0111】

本明細書で用いている「小分子」は、分子量が3キロダルトン(kDa)未満、典型的には1.5キロダルトン未満、適切には約1キロダルトン未満の組成物を表す。小分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭化水素、脂質、または他の有機(炭素含有)、または無機分子であり得る。当業者は、本明細書に基づいて、化学および/または生物学的混合物の広範なライブラリーを認識することができるので、しばしば、真菌、細菌、または藻類抽出物を、本発明のあらゆるアッセイを用いてスクリーニングし生物活性を調節する化合物を同定することができる。「小有機分子」は、分子量が3キロダルトン未満、1.5キロダルトン未満、または約1kDa未満の有機化合物(または無機化合物(たとえば金属)と錯体を形成した有機化合物)である。

【0112】

本明細書で用いている「ストリンジェンシー」は、ハイブリダイゼーション中の温度とイオン強度条件、およびある有機溶媒の存在の有無を表す。ストリンジェンシーが高いと、より高い配列間の相補性度が観察される。本明細書に記載の「ストリンジェント条件」は、相補的塩基の割合が高い、好ましくは正確な相補性を有するポリヌクレオチドのみがハイブリダイズする温度およびイオン条件を表す。必要なストリンジェンシーは、ヌクレオチド配列依存性であり、ハイブリダイゼーション中に存在する種々の成分に依存し、ヌクレオチド類似体を用いると大きく変化する。一般的には、ストリンジェント条件は、規定のイオン強度およびpHで特定の配列の熱融点(T_m)より約10℃～20℃低いように選ばれる。 T_m は、標的配列の50%が相補的プローブとハイブリダイズする温度(規定のイオン強度およびpH以下)である。ポリヌクレオチドは標的配列と少なくとも低ストリンジェント条件下、好ましくは少なくとも中ストリンジェント条件下、より好ましくは高ストリンジェント条件下でハイブリダイズすると理解される。本明細書において低ストリンジェント条件への言及は、少なくとも約1%v/v～少なくとも約15%v/vホルムアミド、42℃のハイブリダイゼーションで少なくとも約1M～少なくとも約2M塩、および42℃の洗浄で少なくとも約1M～少なくとも約2M塩を含み、包含する。低ストリンジェント条件は、65℃のハイブリ

ダイゼーションで1%ウシ血清アルブミン(BSA)、1 mM EDTA、0.5M NaHPO₄(pH 7.2)、7% SDS、および室温での洗浄で(i)2xSSC、0.1%SDS；または(ii)0.5%BSA、1 mM EDTA、40 mM NaHPO₄(pH 7.2)、5%SDSも含みうる。中ストリンジェント条件は、少なくとも約16%v/v～少なくとも約30%v/vホルムアミド、42℃のハイブリダイゼーションで少なくとも約0.5M～少なくとも約0.9M塩、および42℃の洗浄で少なくとも約0.5M～少なくとも約0.9M塩を含み、包含する。中ストリンジェント条件は、65℃のハイブリダイゼーションで1%ウシ血清アルブミン(BSA)、1mM EDTA、0.5M NaHPO₄(pH 7.2)、7%SDS、および42℃の洗浄で(i)2 x SSC、0.1%SDS；または(ii)0.5%BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO₄(pH 7.2)、5%SDSも含みうる。高ストリンジェント条件は、少なくとも約31%v/v to 少なくとも約50%v/vホルムアミド、および42℃のハイブリダイゼーションで少なくとも約0.01M～少なくとも約0.15M塩、および42℃の洗浄で少なくとも約0.01M～少なくとも約0.15M塩を含み、包含する。高ストリンジェント条件は、65℃のハイブリダイゼーションで1%BSA、1mM EDTA、0.5M NaHPO₄(pH 7.2)、7%SDS、および65℃以上の温度の洗浄で(i)0.2 x SSC、0.1%SDS；または(ii)0.5%BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO₄(pH 7.2)、1%SDSも含みうる。高ストリンジェント条件のある態様は、約45℃で6 X SSC中でハイブリダイズし、次いで65℃で0.2 X SSC、0.1%SDSで1またはそれ以上洗浄することを含む。きわめて高ストリンジェント条件のある態様は、65℃で0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDSにてハイブリダイズし、次いで65℃で0.2 X SSC、1%SDSにて1またはそれ以上洗浄することを含む。他のストリンジェント条件は当該分野でよく知られている。当業者は、種々の要因を操作してハイブリダイゼーションの特異性を最適化することができる。最終洗浄のストリンジェンシーの最適化は、高度のハイブリダイゼーションを保証するのに役立ちうる。詳細な例は、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(上記)、2.10.1～2.10.16頁、およびMOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL(Sambrook、et al.編)(Cold Spring Harbor Press 1989)、1.101～1.104項参照。

【0113】

「本質的に相補的な」は、オリゴヌクレオチドまたはその部分配列が標的配列とハイブリダイズするよう十分相補的であることを意味する。したがって、オリゴヌクレオチドまたは部分配列のヌクレオチド配列が標的配列の正確な相補配列を反映する必要はない。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは標的配列とのミスマッチを含まない。

【0114】

本明細書で用いている用語「相乗的」は、第二の薬剤または療法と組み合わせて投与したときの第一の薬剤の治療効果が、第二の薬剤または療法を単独で投与したときの予測される付加的治療効果より大きいことを意味する。したがって、用語「相乗的」は、PKC-θ阻害剤と組み合わせて投与したときのLSD阻害剤(たとえば、LSD1またはLSD2阻害剤)の治療効果が、LSD阻害剤およびPKC-θ阻害剤を単独で投与したときの予測される付加的治療効果より大きい実施態様を包含する。用語「相乗的」は、また、がん療法または薬剤と組み合わせて投与したときのLSD阻害剤(たとえば、LSD1またはLSD2阻害剤)およびPKC-θ阻害剤の治療効果が、LSD阻害剤、PKC-θ阻害剤および該がん療法または薬剤を単独で投与したときの予測される付加的治療効果より大きい実施態様を包含する。LSD阻害剤およびPKC-θ阻害剤に適用する用語「相乗的有効量」は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力または(vi)EMTを阻害するか、またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞の(vii)METを刺激もしくは誘導するのに有効な、LSD阻害剤の用量対PKC-θ阻害剤の用量の用量反応プロット対EMT調節遺伝子過剰発現細胞の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率、(v)生存能力または(vi)EMTの阻害において、用量LSD阻害剤軸または用量PKC-θ阻害剤軸を横切らない効果をもたらす組成物(一般的には医薬組成物)中の各成分の量を意味する。LSD阻害剤およびPKC-θ阻害剤に適用する用語「相乗的有効量」は、また、CSCおよび非CSC腫瘍細胞の形成、増殖、生存率、生存能力、または維持を阻害しがんを治療または予防するのに有効な、LSD阻害剤の用量対PKC-θ阻害剤の用量の用量反応プロット対CSCおよび非CSC腫瘍細胞の形成、増殖、生存率、生存能力、または維持の阻害において、用量LSD阻害剤軸または用量PKC-θ阻害剤軸を横切らない効果

をもたらす組成物(一般的には医薬組成物)中の各成分の量を意味する。さらに、LSD阻害剤、PKC- θ 阻害剤およびがん薬剤に適用する用語「相乗的有効量」は、CSCおよび非CSC腫瘍細胞の形成、増殖、生存率、生存能力、または維持を阻害しがんを治療または予防するのに有効な、LSD阻害剤の用量対PKC- θ 阻害の用量剤対がん薬剤の用量の用量反応プロット対CSCおよび非CSC腫瘍細胞の形成、増殖、生存率、生存能力、または維持の阻害において、用量LSD阻害剤軸または用量がん薬剤軸を横切らない効果をもたらす組成物(一般的には医薬組成物)中の各成分の量を意味する。当該分野で相乗性を決定するのに用いる用量反応曲線は、たとえばSandeら(1080-1105頁、A. Goodmanら編、the Pharmacological Basis of Therapeutics、MacMillan Publishing Co., Inc., New York(1980)参照)に記載されている。最適な相乗的量は、用量レベル、スケジュール、および反応などの因子を変え、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤および任意にがん法剤の種々の組み合わせに対する用量反応曲線からアイソボログラムを作製するコンピューター作製モデルを用いて95%信頼限界を用いて決定することができる。用量反応曲線のCSCおよび非CSC腫瘍細胞の形成、増殖、生存率、生存能力、または維持の最も高い阻害が最適用量レベルと関連する。

【0115】

本明細書で用いている用語「治療(処置)」、「治療(処置)する」などは、目的とする薬理学的および/または生理学的効果を得ることを示す。該効果は、疾患またはbyお嬢(たとえば血液悪性腫瘍)、および/または該疾患または病状に起因する副作用の部分的または完全治癒について治療的でありうる。これらの用語は、哺乳動物、特にヒトの病状または疾患のあらゆる治療にも及び、(a)該疾患または病状を阻害し、すなわちその発生を止め、または(b)該疾患または病状を緩和し、すなわち、該疾患または病状の退行をもたらすことを含む。

【0116】

本明細書で用いている用語「腫瘍」は、悪性または良性に関わらずあらゆる新生物細胞成長および増殖、およびすべての前がん性およびがん性細胞および組織を表す。用語「がん」および「がん性」は、典型的には無秩序な細胞増殖を一部特徴とする哺乳動物の生理的状态を示し、または説明する。本明細書で用いている用語「がん」は、初期または末期がんを含む非転移および転移がんを表す。用語「前がん性」は、典型的にはがんに先立つかまたはがんに発展する病状または増殖を表す。「非転移」は、良性であるか、または原発部位に止まり、リンパまたは血管系または原発部位以外の組織に侵入しないがんを意味する。一般的には、非転移がんは、0、I、またはII期のがん、時にIII期のがんであるあらゆるがんである。「初期がん」は、侵襲性または転移性でないがんを意味し、または0、I、またはII期のがんに分類される。用語「末期がん」は、一般的にはIII期またはIV期のがんを表すが、II期のがんやII期のがんのサブステージも表すことができる。当業者は、II期のがんの初期がんまたは末期がんとしての分類は、がんの特定のタイプに依存する。がんの実例は、限定されるものではないが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、頸部がん、膀胱がん、結腸直腸がん、肺がん、肝細胞がん、胃がん、肝臓がん、膀胱がん、尿路のがん、甲状腺がん、腎臓がん、がん、メラノーマ、脳のがん、非小細胞肺がん、頭および首の扁平上皮がん、子宮内膜がん、多発性骨髄腫、直腸がん、および食道がんを含む。典型的な態様において、該がんは乳がんである。

【0117】

本明細書で用いている用語「腫瘍試料」は、がん患者から得た腫瘍を含む試料を意味する。該用語は、臨床試料、たとえば外科的切除により得た組織や、バイオブシー(たとえばコアバイオブシーまたは微細針バイオブシー)により得た組織を包含する。該用語は、原発腫瘍以外の部位から得られる腫瘍細胞、たとえば循環腫瘍細胞を含む試料、および保存腫瘍試料、たとえばホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍試料、または凍結腫瘍試料も包含する。該用語は、患者の腫瘍細胞の子孫、たとえば、原発腫瘍細胞または循環腫瘍細胞由来の細胞培養試料である細胞を含む。該用語は、腫瘍細胞インビボ由来のタンパク質または核酸材料を含むことがある試料、たとえば、骨髄、血液、血漿、血清などを包含する。該用語は、腫瘍細胞を豊富化しまたはその獲得後に操作された試料、および患者の腫

瘍材料から得られるポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを含む試料も包含する。

【0118】

「ベクター」は、たとえばポリヌクレオチドを挿入またはクローニングすることができるプラスミド、バクテリオファージ、酵母、またはウイルス由来のポリヌクレオチド分子、好ましくはDNA分子を意味する。ベクターは、好ましくは1またはそれ以上のユニークな制限部位を含み、標的細胞または組織、またはその前駆細胞または組織を含む特定の宿主細胞中で自律複製することができるか、またはクローニングした配列が再生可能なように特定宿主のゲノムに統合することができる。したがって、ベクターは、自律複製するベクター、すなわち、その複製が染色体複製と独立している染色体外エンティティとして存在するベクター、たとえば、直鎖または閉環状プラスミド、染色体外要素、ミニ染色体、または人工染色体でありうる。ベクターは、自己複製を保証するあらゆる手段を含むことができる。あるいはまた、ベクターは、宿主細胞に導入するとゲノムに統合され、それが統合された染色体と一緒に複製されるものでありうる。ベクター系は、宿主細胞のゲノムに導入される全DNAと一緒に含む単一ベクターまたはプラスミド、2またはそれ以上のベクターまたはプラスミド、またはトランスポゾンを含むことができる。ベクターの選択は、たとえばべく対が導入される宿主細胞とベクターの適合性に依存する。本件において、ベクターは好ましくは動物、好ましくは哺乳動物細胞に操作可能に機能的なウイルス、ウイルス由来ベクターである。そのようなベクターは、ボックスウイルス、アデノウイルス、または酵母由来でありうる。ベクターは、適切な形質転換体の選択に用いることができる抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーも含みうる。そのような耐性遺伝子の例は当業者に知られており、抗生物質カナマイシンおよびG418(Geneticin(登録商標))に対する耐性をもたらすnptII遺伝子および抗生物質ヒグロマイシンBに対する耐性をもたらすhph遺伝子を含む。

【0119】

本明細書で用いている強調またはイタリック体の遺伝子名は、いかなる強調またはイタリック体でない遺伝子名により示すそのタンパク質産物に対して遺伝子を示す。たとえば、「LSD1」は、LSD1遺伝子を表し、「LSD1」はタンパク質産物または「LSD1」遺伝子の転写および翻訳および/または代わりのスプライシングから生じる産物を表す。

【0120】

本明細書に記載の各態様は、特記しない限り各およびすべての態様に準用する。

【0121】

2. がん幹細胞の形成、増殖、または生存能力を減少または抑制するための組成物および方法

本発明は、ホルモン耐性乳がんを含む乳がんはCSCが豊富化され、LSD(たとえば、LSD1およびLSD2)およびPKC- θ が該CSCおよび非CSC腫瘍細胞に過剰発現することが判明したことに一部基づく。これらの知見に基づき、本発明者らは、乳腺CSCおよび乳腺非CSC腫瘍細胞をLSD(たとえば、LSD1およびLSD2)阻害剤およびPKC- θ 阻害剤で別々に処置し、それらのそれぞれが、単独で、乳腺CSCおよび乳腺非CSC腫瘍細胞の形成、増殖、または生存能力を特に阻害し、乳腺CSCのEMTを阻害し、および/または乳腺CSCにおけるMETを刺激/誘導することを見い出した。驚いたことに、本発明者らは、乳腺CSCおよび乳腺非CSC腫瘍細胞を、LSD(たとえば、LSD1およびLSD2)阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の両方で処置すると、乳腺CSCおよび乳腺非CSC腫瘍細胞の形成、増殖、または生存能力の阻害、乳腺CSCのEMTの阻害、および/または乳腺CSCにおけるMETの刺激/誘導に関して、相乗効果などの有意により大きい効果がもたらされることを見い出した。いかなる理論や実施方法に縛られることも望まないが、LSD1およびLSD2を含むLSD、およびPKC- θ は、その調節領域にわたって活性クロマチンドメインの調節を解除することによりCSC特異的遺伝子の転写に重要な役割を果たし、この調節解除は乳腺CSCの生成と一般的にはCSCの生成を促進することを提唱する。

【0122】

上記知見に基づいて、本発明者らは、LSD(たとえば、LSD1およびLSD2)およびPKC- θ の阻害がCSCおよび/または非CSC腫瘍細胞の増殖、維持、生存率、または生存能力の減少、および/またはCSCのEMT減少、および/またはCSCのMET増加をもたらすことにより、それらから分化する非CSC腫瘍細胞をわずかにし、非CSC腫瘍細胞のがん療法または薬剤によるより有効な治療をもたらすことを提唱する。

【0123】

したがって、本発明の方法および組成物は、CSCおよび/または非CSC腫瘍細胞の増殖、維持、生存率、または生存能力を減少または抑制し、および/またはCSCのEMTを減少または抑制し、および/またはCSCのMETを促進または誘導してがん(たとえば、転移がん)を治療または予防するためのLSD阻害剤(たとえば、LSD1またはLSD2阻害剤)およびPKC- θ の活用をもたらす。特定の態様において、LSD阻害剤(たとえば、LSD1またはLSD2阻害剤)およびPKC- θ は、それらの細胞の非CSC腫瘍細胞子孫の増殖、生存、または生存を減少させるがん療法または薬剤と組み合わせて用いる。したがって、本発明の方法および組成物は、下記の転移がんを含むがんの治療または予防に特に有用である。

【0124】

2.1 LSD阻害剤

LSD阻害剤は、LSDの蓄積、機能、または安定性を減少させ、またはLSD遺伝子の発現を減少させるあらゆる活性薬剤を含み、包含し、そのような阻害剤は、限定されるものではないが、小分子および高分子、たとえば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭化水素、多糖、リポ多糖、脂質、または他の有機(炭素含有)、または無機分子を含む。

【0125】

ある態様において、LSD阻害剤は、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)転写産物の転写または翻訳を阻害するように機能するアンタゴニスト核酸分子である。このタイプの代表的な転写産物は、下記配列のいずれかに対応するヌクレオチド配列を含む：(1)たとえば、GenBank登録No. NM_015013.3、NP_001009999.1、およびNM_001009999.2に記載のヒトLSD1ヌクレオチド配列；たとえば、GenBank登録No. NM_153042.3に記載のヒトLSD2ヌクレオチド配列；(2)(1)に記載の配列のいずれかと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列；(3)(1)に記載の配列と少なくとも低、中、または高ストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；(4)下記アミノ酸配列のいずれかをコードするヌクレオチド配列：たとえば、GenPept登録No. NP_055828.2、NP_001009999.1、および060341.2に記載のヒトLSD1アミノ酸配列；たとえば、GenPept登録No. NP_694587.3に記載のヒトLSD2アミノ酸配列；(5)(4)に記載の配列のいずれかと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列類似性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；および(4)に記載の配列のいずれかと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列。

【0126】

実例となるアンタゴニスト核酸分子は、アンチセンス分子、アプタマー、リボザイムおよび三重鎖形成分子、RNAiおよび外部ガイド配列を含む。核酸分子は、標的分子が持つ特異活性のエフェクター、阻害剤、モジュレーター、および刺激薬として作用することができるか、または機能的核酸分子はあらゆる他の分子から独立したde novo活性を有することができる。

【0127】

アンタゴニスト核酸分子は、あらゆる高分子、たとえば、DNA、RNA、ポリペプチド、または炭化水素鎖と相互作用することができる。したがって、アンタゴニスト核酸分子は、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)_mRNAまたはLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)のゲノムDNA

と相互作用するか、またはLSD ポリペプチド(たとえば、LSD1またはLSD2)と相互作用することができる。他のアンタゴニスト核酸分子は、標的分子とアンタゴニスト核酸分子の配列相同性に基づいて他の核酸と相互作用するよう設計されている。他の状況において、アンタゴニスト核酸分子と標的分子の特異的認識は、アンタゴニスト核酸分子と標的分子の配列相同性に基づかず、特異的認識が生じるのを可能にする三次構造の形成に基づく。

【0128】

ある態様では、アンチセンスRNAまたはDNA分子を、標的mRNAと結合し、タンパク質の翻訳を防ぐことによりLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)の翻訳を直接ブロックするために用いる。アンチセンス分子は、標準または非標準塩基対合により標的核酸分子と交互作用するよう設計する。アンチセンス分子と標的分子の相互作用は、たとえば、RNAseH介在RNA-DNAハイブリッド分解により標的分子の破壊を促進するよう設計することができる。あるいはまた、アンチセンス分子は、通常、標的分子に生じるプロセッシング機能、たとえば、転写または複製を妨げるよう設計することができる。アンチセンス分子は、標的分子の配列に基づいて設計することができる。標的分子の最も接近可能な領域をみいだすことによりアンチセンス効率を最適化するための多くの方法が存在する。非限定的方法は、DMSおよびDEPCを用いるin vitro選択実験およびDNA修飾試験を含む。特定の態様において、アンチセンス分子は、 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 、または 10^{-12} と等しいかまたはそれ以下の解離定数(Kd)で標的分子と結合する。特定の態様において、翻訳開始部位、たとえば10~+10領域由来のアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドを用いる。

【0129】

アプタマーは、標的分子と適切に特異的に交互作用する分子である。アプタマーは、一般的には、明確な二次および三次構造、たとえばステムループまたはG-カルテットにホルルドする長さ15~50塩基の小核酸である。アプタマーは、小分子、たとえば、ATPおよびテオフィリン、および大分子、たとえば、逆転写酵素およびトロニンと結合することができる。アプタマーは、標的分子の 10^{-12} M未満のKdで非常に密接に結合することができる。適切には、アプタマーは、 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 、または 10^{-12} 未満のKdで標的分子と結合する。アプタマーは、非常に特異性が高い標的分子と結合することができる。たとえば、標的分子と該分子の単一位置のみが異なる別の分子との結合親和性に10,000倍以上の差があるアプタマーが単離された。アプタマーがバックグラウンド結合分子のKdより少なくとも 10^{-} 、 100^{-} 、 1000^{-} 、 $10,000^{-}$ 、または $100,000$ 倍低いことが望ましい。目的とする標的に対するアプタマーの適切な製造方法に、「Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment」(SELEX(登録商標))がある。SELEX(登録商標)法は米国特許No. 5,475,096および米国特許No. 5,270,163に記載されている(WO 91/19813も参照のこと)。簡単には、核酸混合物は、結合に好都合な条件下で標的分子と接触する。結合しない核酸を結合した核酸と区分し、核酸-標的複合体を分離する。次に、分離した核酸を増幅して結合、区分、分離、および増幅の反復サイクルにかけて核酸のリガンド豊富化混合物を得、標的分子と高い特異性の高親和性核酸リガンドをうることが望ましい。

【0130】

他の態様において、抗LSD(たとえば、抗LSD1またはLSD2)リボザイムは、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)RNAの特異的開裂を触媒するのに用いる。リボザイム作用のメカニズムは、リボザイム分子の相補的標的RNAに対する配列特異的ハイブリダイゼーション、次いで、ヌクレオチド鎖切断の開裂を含む。天然系で見られるリボザイム、たとえば、ハンマーヘッドリボザイム、ヘアピンリボザイム、およびテトラヒメナリボザイムに基づくヌクレアーゼまたは核酸ポリマーゼ型反応を触媒する種々の異なるタイプのリボザイムがある。天然系にはみられないが、de novoで特異的反応を触媒するように操作された多くのリボザイムもある。典型的なリボザイムはRNAまたはDNA基質を開裂する。ある態様において、RNA基質を開裂するリボザイムを用いる。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム開裂部位を、下記配列、GUA、GUU、およびGUCを含む標的分子のリボザイム開裂部位をスキャンニングすることにより最初に同定する。同定したら、該開裂部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15~20リボヌクレオチドの短いRNA配列の予測される構造的特徴、たとえば該オ

リボヌクレオチド配列を不適切にしうる二次構造を評価することができる。候補標的の適切さは、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対するその利便性を試験することにより評価することもできる。

【0131】

三重鎖を形成する機能的核酸分子は2本鎖または1本鎖核酸と相互作用することができる分子である。三重分子が標的領域と相互作用すると、ワトソンクリックおよびフーグステイン塩基対合の両方に依存性の複合体を形成するDNAの3つの鎖がある三重鎖と呼ばれる構造が形成される。高親和性および特異性で標的領域と結合することができるので三重分子が好ましい。一般的には、三重鎖形成分子は 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 、または 10^{-12} 未満のKdで標的分子と結合することが望ましい。

10

【0132】

外部ガイド配列(EGS)は、複合体を形成する標的核酸分子と結合する分子であり、この複合体は標的分子を開裂するRNase Pにより認識される。EGSは、最適なRNA分子を特異的に標的とするよう設計することができる。RNase Pは細胞内のトランスファーRNA(tRNA)のプロセッシングを助ける。細菌RNase Pは、標的RNA:EGS複合体を天然tRNA基質によく似たものにするEGSを用いることにより事実上あらゆるRNA配列を開裂するよう補充することができる。同様に、RNAの真核性EGS/RNase P指向性開裂を利用して真核細胞内の目的とする標的を開裂することができる。

【0133】

他の態様において、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)遺伝子またはLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)転写産物のRNA干渉(RNAi)を仲介するRNA分子を用いて遺伝子発現を減少または抑制することができる。RNAiは、標的遺伝子の転写産物とホモローガスな1本鎖または通常2本鎖RNA(dsRNA)を導入することにより標的遺伝子産物と干渉または破壊することを表す。2本鎖RNA干渉(dsRNAi)または小干渉RNA(siRNA)を含むRNAi法は、哺乳動物細胞および線虫*C. elegans*(Fireら、1998. *Nature* 391、806-811)を含む多くの生物で広く実証されている。哺乳動物細胞では、RNAiは、小干渉RNA(siRNA)の21~23ヌクレオチド(nt)₂本鎖(Chiuら、2002 *Mol. Cell.* 10:549-561; Elbashirら、2001. *Nature* 411:494-498)、またはミクロRNA(miRNA)、機能的小ヘアピンRNA(shRNA)、またはDNA鋳型とRNAポリマーゼIIIプロモーターを用いてインビボで発現する他のdsRNAにより(Zengら、2002. *Mol. Cell* 9:1327-1333; Paddisonら、2002. *Genes Dev.* 16:948-958; Leeら、2002. *Nature Biotechnol.* 20:500-505; Paulら、2002. *Nature Biotechnol.* 20:505-508; Tuschl、T.、2002. *Nature Biotechnol.* 20:440-448; Yuら、2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9):6047-6052; McManusら、2002. *RNA* 8:842-850; Suiら、2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(6):5515-5520)引き金が引かれる。

20

30

【0134】

特定の態様において、dsRNA自体、特にLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)遺伝子の少なくとも部分に対応するdsRNA産生構築物を用いてその発現を減少または抑制する。遺伝子発現のRNAi介在阻害は、当該分野で報告されたあらゆる技術を用いて、たとえば、ステムループまたはヘアピンRNA構造をコードする核酸構築物を標的細胞のゲノム中にトランスフェクションするか、または収束プロモーターからまたはヘッドツーヘッドまたはテイルツーテイルで単一プロモーターの後からLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)遺伝子に対する相同性を有するトランスフェクトした酢酸構築物を発現させることにより達成することができる。それ自身折り畳んでdsRNAを産生する能力を有する単一RNAを生成するかぎり、または2つの分離したRNA転写産物を生成し、次いでアニールして標的遺伝子との相同性を有するdsRNAを形成するかぎり、あらゆる同様な構築物を用いることができる

40

【0135】

絶対的相同性はRNAiには必要でなく、下の閾値は約200塩基対のdsRNAと約85%相同性と記載されている(PlasterkおよびKetjing、2000、*Current Opinion in Genetics and Dev.* 10:562-67)。したがって、dsRNAの長さに応じて、RNAiをコードする核酸は標的遺伝子転写産物に対する相同性のレベルが異なり、すなわち、100~200塩基対のdsRNAは標的遺伝

50

子と少なくとも約85%の相同性を有し、より長いすなわち、300～100塩基対のdsRNAは標的遺伝子と少なくとも約75%の相同性を有する。独立して発現したRNAとアニールするように設計された単一RNA転写産物を発現するRNAをコードする構築物、または収束プロモーターから分離した転写産物を発現する単一構築物は、適切には長さが少なくとも約100ヌクレオチドである。内部ホールディングによりdsRNAを形成するように設計された単一RNAを発現するRNAをコードする構築物は通常、長さが少なくとも約200ヌクレオチドである。

【0136】

dsRNA形成構築物を発現するために用いたプロモーターは、得られるdsRNAが破壊を目標とした細胞系統中の遺伝子産物に特異的であれば、あらゆるタイプのプロモーターでありうる。あるいはまた、該プロモーターは系統特異的であり得、特定の発生系統の細胞にのみ発現する。これは、相同性のいくらかの重複が非標的細胞系統に発現する遺伝子で観察される場合には有利かもしれない。該プロモーターは、外部調節因子または細胞内環境因子によっても誘導可能であるかもしれない。

【0137】

ある態様において、たとえば、Tuschlら U.S.2002/0086356中に記載の対応する特異的mRNAの開裂を指示する約21～約23ヌクレオチドのRNA分子はRNAiを仲介するのに利用することができる。そのような21～23-ntRNA分子は3'ヒドロキシル基を含み、1本鎖または2本鎖(2本の21～23-ntRNA)でありうる(ここで、dsRNA分子は平滑末端であるか、オーバーハング末端(たとえば、5'、3')を含みうる。

【0138】

ある態様において、アンタゴニスト核酸分子はsiRNAである。siRNAは、あらゆる適切な方法で製造することができる。たとえば、3'オーバーハング末端を有する塩基対合の場合は標的mRNAを配列特異的に分解することができるsiRNAを開示する国際公報W002/44321(本明細書の一部を構成する)を参照することができる。配列特異的遺伝子サイレンシングは、酵素ダイサーにより生成されるsiRNAに良く似た合成短2本鎖RNAを用いて哺乳動物細胞で達成することができる。siRNAは、化学的にまたはin vitroで合成することができるか、細胞内部でsiRNAにプロセスされる短2本鎖ヘアピン様RNA(shRNA)の結果でありうる。合成siRNAは、一般的にはアルゴリズムおよび従来のDNA/RNA合成装置を用いて設計する。供給者は、Ambion(Austin, Tex.)、ChemGenes(Ashland, Mass.)、Dharmacon(Lafayette, Colo.)、Glen Research(Sterling, Va.)、MWB Biotech(Esbersberg, Germany)、Proligo(Boulder, Colo.)、およびQiagen(Vent, The Netherlands)を含む。siRNAはAmbion's SILENCER(登録商標)siRNA構築キットなどのキットを用いてin vitroで合成することもできる。

【0139】

ベクターからのsiRNAの製造は、より一般的には、短ヘアピンRNA(shRNA)の転写により行う。たとえば、Imgenex's GENESUPPRESSOR(登録商標)構築キットおよびInvitrogen's BLOCK-IT(登録商標)誘導性RNAiプラスミドおよびレンチウイルスベクターなどのshRNAを含むベクターを製造するためのキットが利用可能である。さらに、siRNAを形成し、対象に送達する方法も当該分野でよく知られている。たとえば、US 2005/0282188; US 2005/0239731; US 2005/0234232; US 2005/0176018; US 2005/0059817; US 2005/0020525; US 2004/0192626; US 2003/0073640; US 2002/0150936; US 2002/0142980; およびUS2002/0120129を参照のこと(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。

【0140】

実例となるRNAi分子(たとえばLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)siRNAおよびshRNA)は、文献(たとえば、Yang, et al., 2010. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 21499-21504、およびHeら、2012. Transcription 3: 3: 1-16)、またはSanta Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA)に記載され、OriGene Technologies, Inc.(Rockville, MD, USA)から市販されている。

【0141】

本発明は、さらにペプチドまたはポリペプチドベースの阻害剤化合物を予期する。たと

えば、BHC80(PHDフィンガータンパク質21Aとしても知られる)は、LSD1との複合体の部分を形成し、LSD1デメチラーゼ活性を阻害しうる。したがって、本発明は、さらに、LSD1酵素活性を阻害するためのBHC80またはその生物学的に活性な断片の使用を予期する。BHC80ポリペプチドのアミノ酸配列、およびBHC80ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は公的に利用可能である。その際、たとえば、Homo sapiens BHC80アミノ酸配列はGenBank登録No. NP057705；およびGenBank登録No. NP057705に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列はGenBank NM016621；2)Mus musculus BHC80アミノ酸配列はGenBank登録No. NP620094；およびGenBank登録No. NP620094に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列はGenBank NM138755；3)Gallus gallus BHC80アミノ酸配列はGenBank登録No. NP00118576.1；およびGenBank登録No. NP00118576.1に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列はGenBank NM001199647；および4)Bos taurus BHC80アミノ酸配列はGenBank登録No. DAA21793を参照することができる。

【0142】

実例となるBHC80ポリペプチドは以下からなる群から選ばれる：(1)上記GenBank BHC80ポリペプチドエントリーのいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；(2)上記GenBank BHC80ポリペプチドエントリーのいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；(3)上記GenBank BHC80ポリヌクレオチドエントリーのいずれかに記載のヌクレオチド配列と少なくとも低、中、または高ストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列でコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；(4)上記GenBank BHC80ポリヌクレオチドエントリーのいずれかに記載のヌクレオチド配列と少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列でコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；および(5)LSD1酵素活性を阻害する(1)～(4)のいずれかのポリペプチドの断片。

【0143】

BHC80ポリペプチドは、ポリペプチドそれ自体を送達するか、またはBHC80ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むBHC80核酸を細胞に導入することにより細胞中に導入することができる。ある態様において、BHC80核酸は以下から選ばれるヌクレオチド配列を含む：(1)上記GenBank BHC80ポリヌクレオチドエントリーのいずれかに記載のBHC80ヌクレオチド配列；(2)(1)に記載の配列のいずれかと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列；(3)(1)に記載の配列と少なくとも低、中、または高ストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；(4)上記GenBank BHC80ポリペプチドエントリーのいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；(5)(4)に記載の配列のいずれかと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列類似性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；および(4)に記載の配列のいずれかと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列。

【0144】

BHC80核酸は組換え発現ベクターの形でありうる。BHC80ヌクレオチド配列は、発現ベクター中の転写調節エレメント、たとえばプロモーターと操作可能に結合することができる。適切なベクターは、たとえば組換えレトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノウイルス；レトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、核酸発現ベクター、およびプラスミド発現ベクターを含む。ある場合には、該発現ベクターは、細胞のゲノ

ム内に統合される。他の場合には、発現ベクターは細胞中で、エピソーム状態で存続する。

【0145】

適切な発現ベクターは、限定されるものではないが以下のものを含む：ウイルスベクター(たとえば、ウイルスベクター based on ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；アデノウイルス(たとえば、Liら、Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 2543 2549, 1994; Borrásら、Gene Ther 6: 515 524, 1999; Li and Davidson、PNAS 92: 7700 7704, 1995; Sakamotoら、Hum Gene Ther 5: 1088 1097, 1999; WO 94/12649、WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984およびWO 95/00655参照)；アデノ関連ウイルス(たとえば、Aliら、Hum Gene Ther 9: 8186, 1998、Flanneryら、PNAS 94: 6916 6921, 1997; Bennettら、Invest Ophthalmol Vis Sci 38: 2857 2863, 1997; Jomaryら、Gene Ther 4: 683 690, 1997、Rollingら、Hum Gene Ther 10: 641 648, 1999; Aliら、Hum Mol Genet. 5: 591 594、1996; Srivastava in WO 93/09239、Samulskiら、J. Vir.(1989)63: 3822-3828; Mendelsonら、Virology(1988)166: 154-165; およびFlotteら、PNAS(1993)90: 10613-10617参照)；SV40；ヘルペスシンプレックスウイルス；ヒト免疫不全ウイルス(たとえば、Miyoshiら、PNAS 94: 10319 23, 1997; Takahashiら、J Virology 73: 7812 7816, 1999参照)；レトロウイルスベクター(たとえば、ネズミ白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、およびラウス肉腫ウイルス、ハーベイウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳腺腫瘍ウイルスなどのレトロウイルス由来ベクター)など。

【0146】

本発明は、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)の酵素活性を減少させる小分子薬剤も预期する。

【0147】

本発明に用いるのに適したLSD1の酵素活性を減少させる小分子薬剤は、LSD1酵素活性も阻害するモノアミンオキシダーゼ(MAO)阻害剤；LSD1酵素活性を阻害するポリアミン化合物；LSD1酵素活性を阻害するフェニルシクロプロピルアミン誘導体などを含む。

【0148】

MAO阻害剤の非限定的例は、MAO-A-選択的阻害剤、MAO-B-選択的阻害剤、およびMAO 非選択的阻害剤を含む。阻害剤の実例は、5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)(5-HT)およびノルエピネフリン(NE)を選択的に脱アミノ化するMAO-Aアイソフォーム、および/またはフェニルエチルアミン(PEA)およびベンジルアミンを選択的に脱アミノ化するMAO-Bアイソフォームの報告された阻害剤(MAO-AおよびMAO-Bは共にドーパミン(DA)を代謝する)を含む。種々の態様において、MAO阻害剤は、不可逆的または可逆的(たとえばMAO-Aの可逆的阻害剤(RIMA))であり得、MAO-Aおよび/またはMAO-B(たとえば、非選択的二重阻害剤またはアイソフォーム-選択的阻害剤)に対する異なる有効性を持ちうる。

【0149】

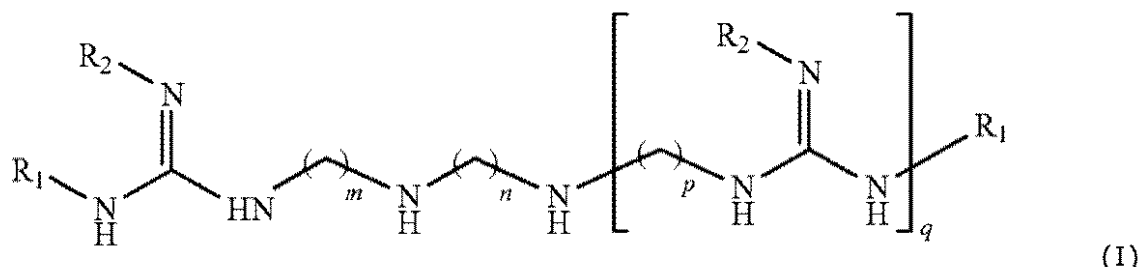
ある態様において、MAO阻害剤は以下から選ばれる：クロルギリン；L-デブレニル；イソカルボキサジド(Marplan(登録商標))；アヤフアスカ；ニアラミド；イプロニアジド；イプロクロジド；モクロベミド(Aurorix(登録商標))；4-クロロ-N-(2-モルホリン-4-イルエチル)ベンズアミド)；フェネルジン(Nardil(登録商標))；(±)-2-フェニルエチルヒドラジン)；トランシルプロミン(Parnate(登録商標))；(±)-trans-2-フェニルシクロプロパン-1-アミン(フェネルジンの同属)；トロキサトン；レボデブレニル(Selegiline(登録商標))；ハルマラ；RIMA(たとえば、Da Pradaら(1989. J Pharmacol Exp Ther 248: 400-414)記載のモクロベミド；プロファロミン；およびCuretら(1998. J Affect Disord 51: 287-30)記載のベフロキサトン；Ann. Neurol., 40(1): 99-107(1996)記載のラザベミド(Ro 19 6327)、およびAubinら(2004. J. Pharmacol. Exp. Ther. 310: 1171-1182)記載のSL25.1 131；塩酸セレギリン(1-デブレニル、ELDEPRYL、ZELAPAR)；ジメチルセレギレン；サフィナミド；ラザギリン(AZILECT)；ピフェメラン；デソキシペガニン；ハルミン(テレパチンまたはバナステリンとしても知られる)；リネゾリド(ZYVOX、ZYVOXID)；パルギリン(EUDA

TIN、SUPIRDYL)；ジエノリドカバピロンデスメトキシヤングニン；5-(4-アリールメトキシフェニル)-2-(2-シアノエチル)テトラゾールなど。

【0150】

小分子LSD1阻害剤は、WosterらのU.S.公開公報No. 2007/0208082(この内容は本明細書の一部を構成する)に記載のポリアミン化合物から選ぶこともできる。LSD1の実例となるポリアミン阻害剤は、式(I)：

【化1】



10

(I)

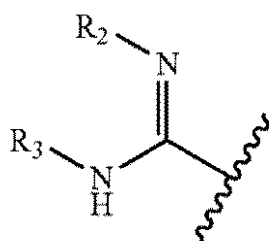
の化合物、

またはその塩、溶媒和物、または水和物を含む

〔式中、nは1～12の整数である；mおよびpは独立して1～5の整数である；qは0または1である；各R₁は独立してC₁-C₈アルキル、C₄-C₁₅シクロアルキル、C₃-C₁₅分岐鎖アルキル、C₆-C₂₀アリール、C₆-C₂₀ヘテロアリール、C₇-C₂₄アラルキル、C₇-C₂₄ヘテロアラルキル、および

20

【化2】



30

からなる群から選ばれる；

ここで、R₃はC₁-C₈アルキル、C₄-C₁₅シクロアルキル、C₃-C₁₅分岐鎖アルキル、C₆-C₂₀アリール、C₆-C₂₀ヘテロアリール、C₇-C₂₄アラルキル、およびC₇-C₂₄ヘテロアラルキルからなる群から選ばれる；

各R₂は独立して水素またはC₁-C₈アルキルから選ばれる〕。

【0151】

適切なポリアミン化合物は、式(I)の化合物である(ここで、R₁の1または両方がC₆-C₂₀アリール、たとえば単環アリール(限定されるものではないがフェニルを含む))。ある態様において、該化合物は、R₁がフェニルである式(I)の化合物である。ある態様において、qが1であり、mおよびpが3であり、nが4である。別の態様において、qが1であり、mおよびpが3であり、nが7である。

40

【0152】

適切なポリアミン化合物は、R₁の少なくとも1または両方がC₈-C₁₂またはC₁-C₈アルキル(たとえば、直鎖アルキル)である式(I)の化合物である。R₁の1または両方がC₁-C₈直鎖アルキル、たとえば、メチルまたはエチルでありうる。ある態様において、各R₁はメチルである。1または両R₁がC₄-C₁₅シクロアルキル基、たとえば直鎖アルキル基を含むシクロアルキル基(ここで、シクロアルキル基はそのアルキルまたはシクロアルキル部分を介して該分子と結合している)を含むかまたはである。たとえば、1または両R₁はシクロプロピル

50

メチルまたはシクロヘキシルメチルでありうる。ある態様において、1の R_1 がシクロプロピルメチルまたはシクロヘキシルメチルであり、他の R_1 が直鎖アルキル基、たとえば、直鎖 C_1 - C_8 非置換アルキル基(限定されるものではないがエチル基を含む)である。ある態様において、 R_1 は C_3 - C_{15} 分岐鎖アルキル基、たとえばイソプロピルである。 R_1 が C_1 - C_8 置換アルキルであるときは、置換アルキルは、第1級、第2級、第3級、または第4級アミンを含むあらゆる置換基で置換されうる。したがって、ある態様において、 R_1 は、 R_1 がたとえば、アルキル- NH_2 、またはアルキル-アミン-アルキル部分、たとえば、 $-(CH_2)_yNH(CH_2)_zCH_3$ (ここで、 y および z は独立して1~8の整数である)であるようにアミンで置換された C_1 - C_8 アルキル基である。ある態様において、 R_1 は $-(CH_2)_3NH_2$ である。

【0153】

ある態様において、該化合物は1または両 R_1 が C_7 - C_{24} 置換または非置換アラルキルである式(I)の化合物である(ある態様において、そのアルキル部分(たとえば、ベンジル)を介して該分子と結合したアラルキルである)。ある態様において、両 R_1 はアラルキル部分(ここで、該部分のアルキル部分は、2アリール基で置換されており、該部分はそのアルキル基を介して該分子と結合している)である。たとえば、ある態様において、1または両 R_1 が C_7 - C_{24} アラルキル(ここで、アルキル部分は2フェニル基で置換されている)であり、たとえば、 R_1 は2,2-ジフェニルエチルまたは2,2-ジベンジルエチルである。ある態様において、式(I)の両 R_1 は2,2-ジフェニルエチルであり、 n は1、2、または5である。ある態様において、式(I)の各 R_1 は2,2-ジフェニルエチルであり、 n は1、2、または5であり、 m および p はそれぞれ1である。

【0154】

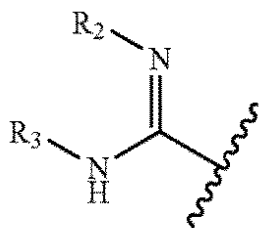
ある態様において、少なくとも1の R_1 が水素である。1の R_1 が水素である場合は、他の R_1 はアリール基、たとえばベンジルを含む R_1 の上記のあらゆる部分でありうる。上記式(I)のいずれかの化合物が、少なくとも1または両 R_2 が水素または C_1 - C_8 置換または非置換アルキルである化合物を含む。ある態様において、各 R_2 は非置換アルキル、たとえばメチルである。別の態様において、各 R_2 は水素である。上記式(I)のいずれかの化合物は q が1であり、 m および p が同じである化合物でありうる。したがって、式(I)のポリアミノグアニジンは、ポリアミノグアニジンコア(たとえば R_1 を除く)に関して対称でありうる。あるいはまた、式(I)の化合物は、たとえば q が0である場合に非対称でありうる。ある態様において、 m および p は1である。ある態様において、 q は0である。ある態様において、 n は1~5の整数である。

【0155】

ある態様において、該化合物は、ポリアミノビグアニドまたはN-アルキル化ポリアミノビグアニドである。N-アルキル化ポリアミノビグアニドは、少なくとも1のビグアニドの少なくとも1のイミン窒素がアルキル化されているポリアミノビグアニドを意図する。ある態様において、該化合物は、式(I)のポリアミノビグアニド、またはその塩、溶媒和物、または水和物(ここで、 q は1であり、少なくとも1または両 R_1 が構造：

【0156】

【化3】



である

(ここで、各 R_3 は独立して C_1 - C_8 アルキル、 C_6 - C_{20} アリール、 C_6 - C_{20} ヘテロアリール、 C_7 - C_{24} アラルキル、および C_7 - C_{24} ヘテロアラルキルからなる群から選ばれ；各 R_2 は独立して水

素または C_1 - C_8 アルキルである。)。

【0157】

ある態様では、ポリアミノビグアニド化合物中、少なくとも1または各 R_3 は C_1 - C_8 アルキルである。たとえば、 R_3 が C_1 - C_8 アルキルである場合は、該アルキルは第1級、第2級、第3級、または第4級アミンを含むあらゆる置換基で置換されうる。したがって、ある態様において、 R_3 は、 R_3 が、たとえば、アルキル- NH_2 、またはアルキル-アミン-アルキル部分、たとえば、 $-(CH_2)_yNH(CH_2)_zCH_3$ (ここで、 y および z は独立して1~8の整数である)であるようにアミンで置換された C_1 - C_8 アルキル基である。ある態様において、 R_3 は $-(CH_2)_3NH_2$ である。また、 R_3 は C_4 - C_{15} シクロアルキルまたは C_3 - C_{15} 分岐鎖アルキルでありうる。ある態様において、少なくとも1または各 R_3 は C_6 - C_{20} アリールである。ある態様において、 q は1
10であり、 m および p は3であり、 n は4である。別の態様において、 q は1であり、 m および p は3であり、 n は7である。

【0158】

ある態様において、該化合物は、少なくとも1の R_3 が C_7 - C_{24} アラルキルである(ある態様において、そのアルキル部分を介して該分子と結合したアラルキルである)式(I)のポリアミノビグアニドである。ある態様において、各 R_3 はアラルキル部分である(ここで、該部分のアルキル部分は1または2アリール基で置換されており、該部分はそのアルキル部分を介して該分子と結合している)。たとえば、ある態様において、少なくとも1または各 R_3 は、たとえば R_3 が2,2-ジフェニルエチルまたは2,2-ジベンジルエチルであるようにアルキル部分が2フェニルまたはベンジル基であるアラルキルである。ある態様において、各 R_3 は2
20,2-ジフェニルエチルであり、 n は1、2、または5である。ある態様において、各 R_3 は2,2-ジフェニルエチルであり、 n は1、2、または5であり、 m および p はそれぞれ1である。

【0159】

上記式(I)のいずれかのポリアミノビグアニドは、少なくとも1または両 R_2 が水素または C_1 - C_8 アルキルである化合物を含む。ある態様において、各 R_2 が非置換アルキル、たとえばメチルである。別の態様において、各 R_2 が水素である。

【0160】

上記式(I)のいずれかのポリアミノビグアニド化合物は、 q が1であり、 m および p が同じである化合物を含む。したがって、式(I)のポリアミノビグアニドは、ポリアミノビグアニドコアに関して対称でありうる。あるいはまた、式(I)の化合物は非対称でありうる。
30ある態様において、 m および p は1である。ある態様において、 q は0である。ある態様において、 n は1~5の整数である。ある態様において、 q 、 m 、および p はそれぞれ1であり、 n は1、2、または5である。

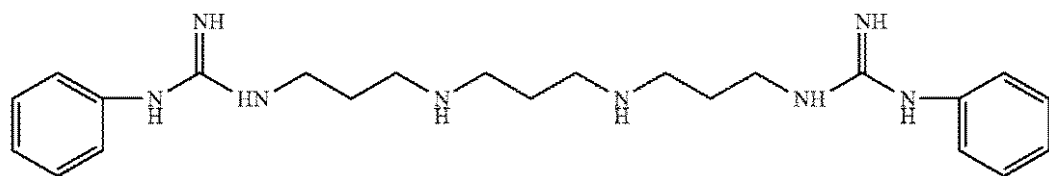
【0161】

式(I)について記載の各 R_1 、 R_2 、 R_3 、 m 、 n 、 p および q は、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 m 、 n 、 p および q の各およびすべての組み合わせを具体的に個々に記載しているのと同じそのすべての組み合わせを意図し、含むことをこの開示により理解し、明確に知らせる。

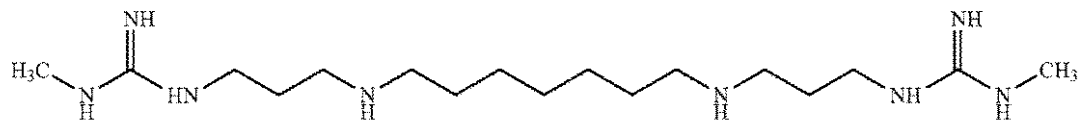
【0162】

式(I)の代表的化合物は、たとえば

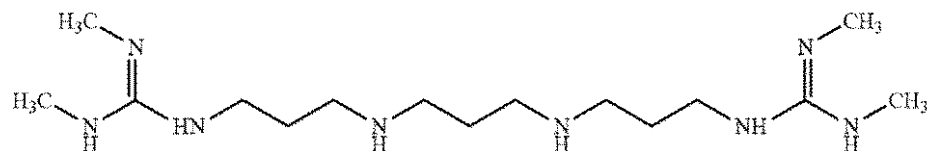
【化 4】



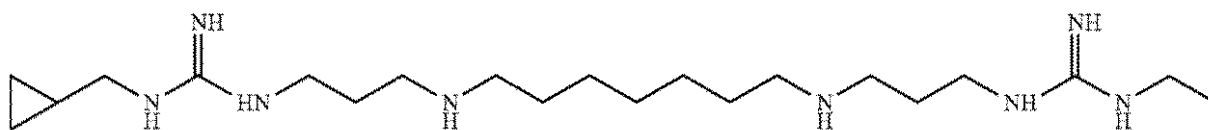
B188-2



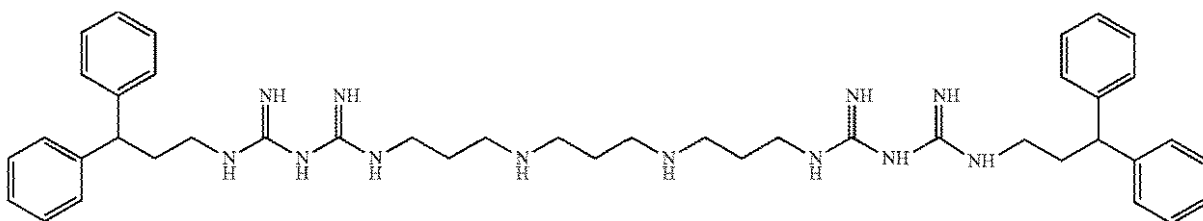
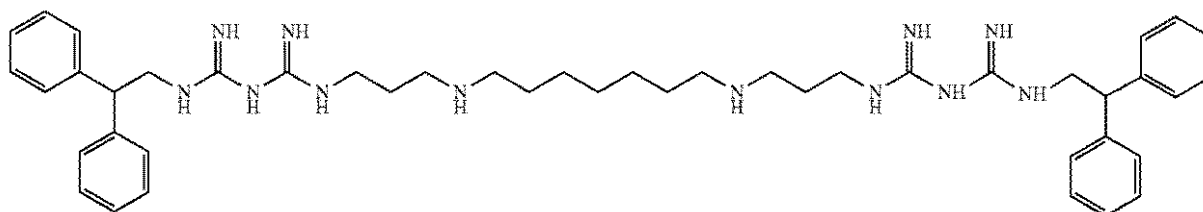
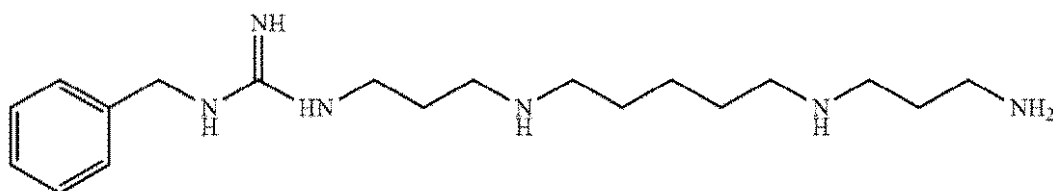
B181



B182



B291

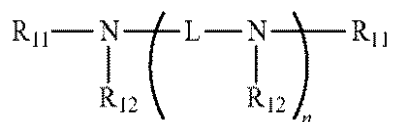


を含む。

【 0 1 6 3 】

ある態様において、ポリアミン化合物は、式(II)：

【化 5】



10

20

30

40

50

(II)

で示される構造で示され、
 またはその塩、溶媒和物、または水和物である。
 (ここで、nは1、2、または3である；

【0164】

各Lは、独立して長さ約2~14炭素、たとえば、長さ約2、3、4、5、6、8、10、12、または14炭素原子のリンカーであって、リンカー骨格原子が飽和または不飽和であり得、通常1、2、3、または4以下の不飽和原子がテザー骨格に存在し、各骨格原子が置換または非置換(たとえばC₁-C₈アルキルで)であり得、リンカー骨格が環式基(たとえば、該間の3原子が該骨格に含まれるシクロヘキサ-1,3-ジイル基)を含むことがあり；

10

各R₁₂は、独立して水素およびC₁-C₈アルキルから選ばれ；および

各R₁₁は、独立して以下から選ばれる：水素、C₂-C₈アルケニル、C₁-C₈アルキル、またはC₃-C₈分岐鎖アルキル(たとえば、メチル、エチル、tert-ブチル、イソプロピル、ペンチル、シクロブチル、シクロプロピルメチル、3-メチルブチル、2-エチルブチル、5-NH₂-ペンタ-1-イル、プロピル-1-イルメチル(フェニル)ホスフィネート、ジメチルビスシクロ[3.1.1]ヘプチル)エチル、2-(デカヒドロナフチル)エチルなど)、C₆-C₂₀アリールまたはヘテロアリール、C₁-C₂₄アラルキルまたはヘテロアラルキル(2-フェニルベンジル、4-フェニルベンジル、2-ベンジルベンジル、3-ベンジルベンジル、3,3-ジフェニルプロピル、3-(ベンゾイミダゾリル)-プロピル、4-イソプロピルベンジル、4-フルオロベンジル、4-tert-ブチルベンジル、3-イミダゾリル-プロピル、2-フェニルエチルなど)、-C(=O)-C₁-C₈アルキル、-C(=O)-C₁-C₈アルケニル、-C(=O)-C₁-C₈アルキニル、アミノ置換シクロアルキル(たとえば、第1級、第2級、第3級、または第4級アミンで置換されたシクロアルキル基、たとえば、5-NH₂-シクロヘプチル、3-NH₂-シクロペンチルなど)、およびC₂-C₈アルカノイル(たとえば、メチルおよびアルキルアジド基で置換されたアルカノイル)。

20

【0165】

ある態様において、各Lは、独立して以下から選ばれる：-CHR₁₃-(CH₂)_m-、-CHR₁₃-(CH₂)_n-CHR₁₃-、-(CH₂)_mCHR₁₃-、-CH₂-A-CH₂-および-(CH₂)_p-

[式中、

mは1~5の整数である；

Aは、(CH₂)_m、エタン-1,1-ジイル、またはシクロヘキサ-1,3-ジイルである；

pは2~14の整数、たとえば、1、2、3、4、または5である；

nは1~12の整数である；および

R₁₃はC₁-C₈アルキルである。

30

【0166】

式(II)に関して置換アラルキルまたはヘテロアラルキルは、アリールまたはヘテロアリール基で置換されたアルカノイル部分、すなわち、-C(=O)-アリール、-C(=O)-アラルキル、-C(=O)-ヘテロアリール、および-C(=O)-ヘテロアラルキルを意図し、含む。ある態様において、アラルキルまたはヘテロアラルキル部分のアルキル部分は、そのアルキル部分を介して該分子と結合している。たとえば、少なくとも1または両R₁₁は、アラルキル部分、たとえば、2-フェニルベンジル、4-フェニルベンジル、3,3-ジフェニルプロピル、2-(2-フェニルエチル)ベンジル、2-メチル-3-フェニルベンジル、2-ナブチルエチル、4-(ピレニル)ブチル、2-(3-メチルナブチル)エチル、2-(1,2-ジヒドロアセナフタ-4-イル)エチルなどでありうる。別の態様において、少なくとも1または両R₁₁は、ヘテロアラルキル部分、たとえば、3-(ベンゾイミダゾリル)プロパノイル、1-(ベンゾイミダゾリル)メタノイル、2-(ベンゾイミダゾリル)エタノイル、2-(ベンゾイミダゾリル)エチルなどでありうる。

40

【0167】

ある態様において、式(II)の化合物は、以下からなる群から選ばれる少なくとも1の部分を含む：t-ブチル、イソプロピル、2-エチルブチル、1-メチルプロピル、1-メチルブチル、3-ブテニル、イソペンタ-2-エニル、2-メチルプロパン-3-オールイル、エチルチイル

50

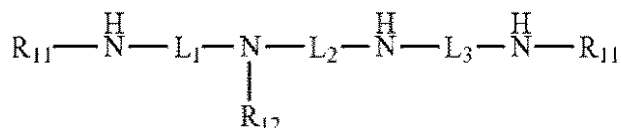
、フェニルチイル、プロピノイル、1-メチル-1H-ピロール-2-イル；トリフルオロメチル、シクロプロパンカルバルデヒド、ハロ置換フェニル、ニトロ置換フェニル、アルキル置換フェニル、2,4,6-トリメチルベンジル、ハロ-5置換フェニル、たとえばパラ-(F₃S)-フェニル、アジド、および2-メチルブチル。

【0168】

ある態様において、式(II)中の各R₁₁は、独立して水素、n-ブチル、エチル、シクロヘキシルメチル、シクロペンチルメチル、シクロプロピルメチル、シクロヘブチルメチル、シクロヘキシルエタ-2-イル、およびベンジルから選ばれる。

【0169】

ある態様において、ポリアミン化合物は、nが3である式(II)の構造を有し、式(III)：
【化6】



(III)

で示される構造を有する化合物である

〔式中、L₁、L₂、およびL₃は独立して-CHR₁₃-(CH₂)_m-、-CHR₁₃-(CH₂)_n-CHR₁₃-、-(CH₂)_m-CHR₁₃-、-CH₂-A-CH₂-および-(CH₂)_p-から選ばれる；

m、A、p、n、およびR₁₃は前記と同意義である〕。

【0170】

ある態様において、ポリアミン化合物は、L₁が-CHR₁₃-(CH₂)_m-でありL₂が-CHR₁₃-(CH₂)_n-CHR₁₃-であり、L₃が-(CH₂)_m-CHR₁₃-であり、R₁₁、R₁₂、R₁₃、mおよびnが善意と同意義である、式(III)の構造を有する。

【0171】

ある態様において、ポリアミン化合物は、L₁、L₂およびL₃が独立して-CH₂-A-CH₂-であり、R₁₂が水素であり、R₁₁およびAが前記と同意義である、式(III)の構造を有する。特定の態様において、AおよびR₁₁の少なくとも1がアルケニル部分を含む。

【0172】

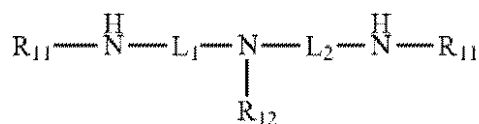
ある態様において、ポリアミン化合物は、L₁、L₂およびL₃が独立して-(CH₂)_p-（ここで、pは前記と同意義である）であり、R₁₂が水素である式(III)の構造を有する。特定の態様において、L₁およびL₃についてpは3～7の整数であり、L₂についてpは3～14の整数である。

【0173】

ある態様において、ポリアミン化合物は、L₁およびL₃が独立して-(CH₂)_p-であり；L₂が-CH₂-A-CH₂-であり；R₁₂が水素であり；R₁₁、pおよびAが前記と同意義である式(III)の構造を有する。特定の態様において、L₁およびL₃についてpは2～6の整数であり、L₂についてAは(CH₂)_x（ここで、xは1～5の整数である）またはシクロヘキサ-1,3-ジイルである。

【0174】

ある態様において、ポリアミン化合物はnが2である式(II)の構造を有し、式(IV)：
【化7】



(IV)

の構造を有する

[式中、 L_1 および L_2 は、独立して $-\text{CHR}_{13}-(\text{CH}_2)_m-\text{CHR}_{13}-(\text{CH}_2)_n-\text{CHR}_{13}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n$ 、 $\text{CHR}_{13}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{A}-\text{CH}_2-$ 、および $-(\text{CH}_2)_p-$ から選ばれ、 m 、 A 、 p 、 n 、および R_{13} は前記と同意義である]。

【0175】

ある態様において、ポリアミン化合物は、 L_1 が $-(\text{CH}_2)_p-$ であり、 L_2 が $-(\text{CH}_2)_m-\text{CHR}_{13}-$ であり、 R_{13} 、 m 、および p が前記と同意義である式(IV)の構造を有する。特定の態様において、 L_1 について p は3～10の整数であり、 L_2 について n は2～9の整数である。

【0176】

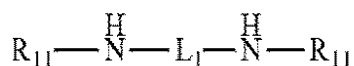
ある態様において、ポリアミン化合物は、 L_1 および L_2 が $-(\text{CH}_2)_p-$ であり； p が前記と同意義である式(IV)の構造を有する。特定の態様において、 p は3～7の整数である。

10

【0177】

ある態様において、ポリアミン化合物は、 n が1である式(II)の構造を有し、式(V)：

【化8】



(V)

の構造を有する

[式中、 L_1 は $-(\text{CH}_2)_p-$ であり、 p は前記と同意義である]。特定の態様において、 p は2～6の整数である。

20

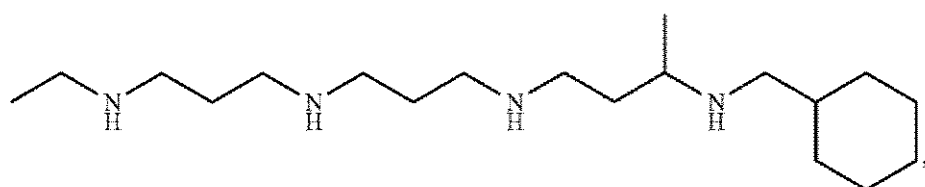
【0178】

特定の態様において、式(V)中の1の R_{11} は、アミノ置換シクロアルキル(たとえば、第1級、第2級、第3級、または第4級アミンで置換されたシクロアルキル基)、または C_2-C_8 アルカノイル(アルカノイルが1またはそれ以上の置換基、たとえば、メチルまたはアルキルアジド基で置換されうる)；および他の R_{11} が C_1-C_8 アルキルまたは C_7-C_{24} アラルキルである。

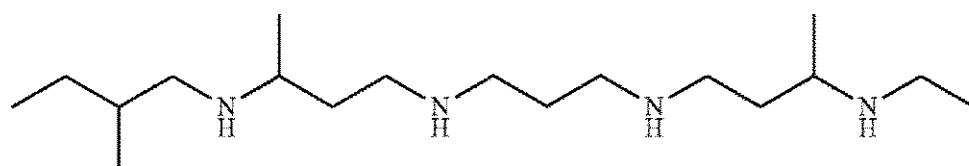
【0179】

式(II)の代表的化合物は、たとえば

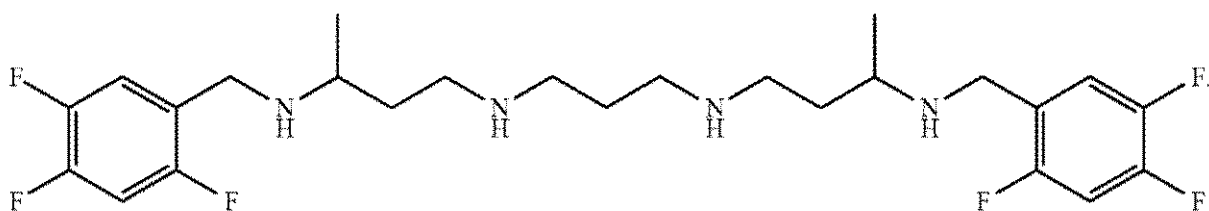
【化 9】



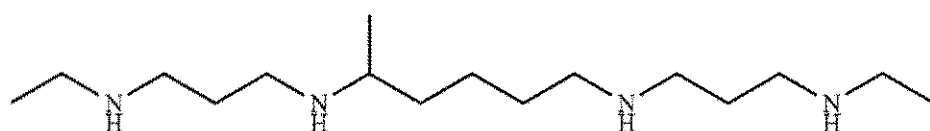
GEXH-32-50A



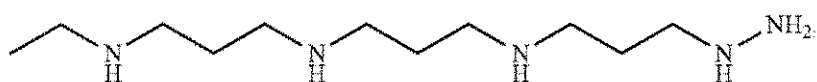
44-DHEJ-4C



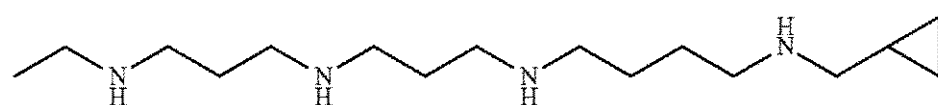
44-DHEJ-5C



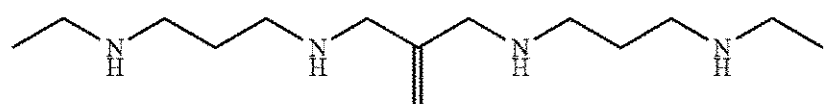
55-DHEJ-24C



YZ33046



YZ33049



ZQW-44

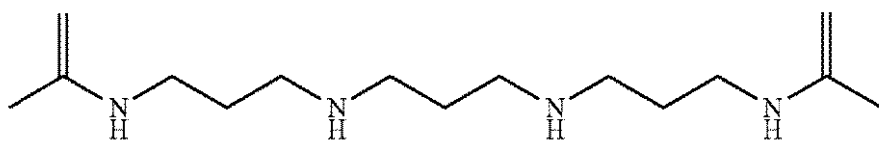
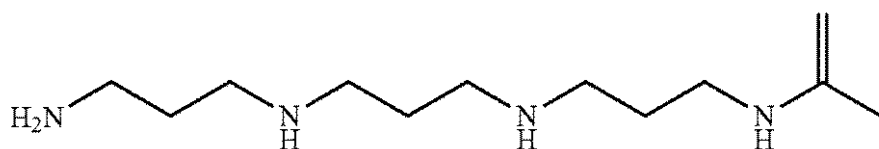
10

20

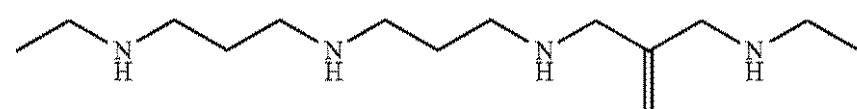
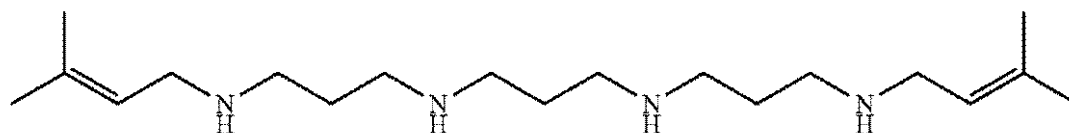
30

40

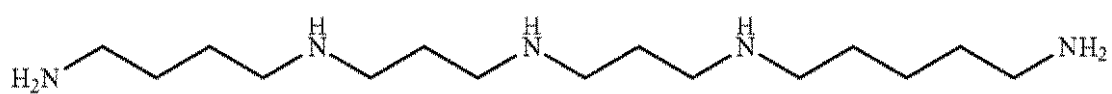
【化 1 0】



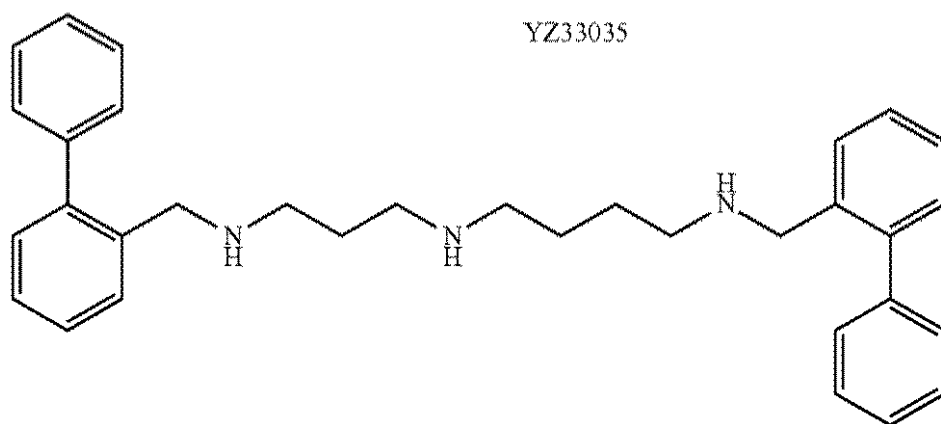
10



20

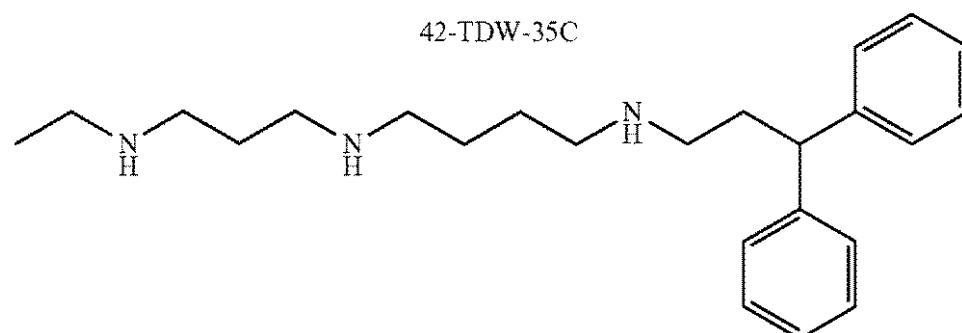


YZ33035



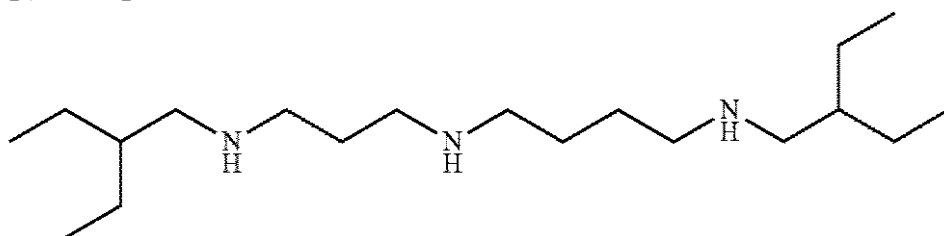
30

42-TDW-35C



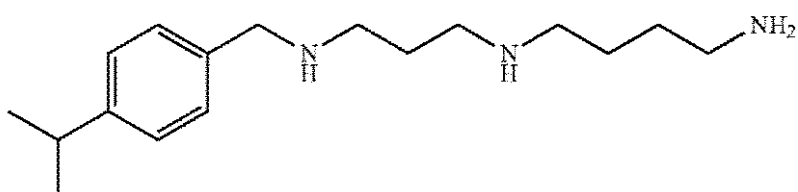
40

【化 1 1】



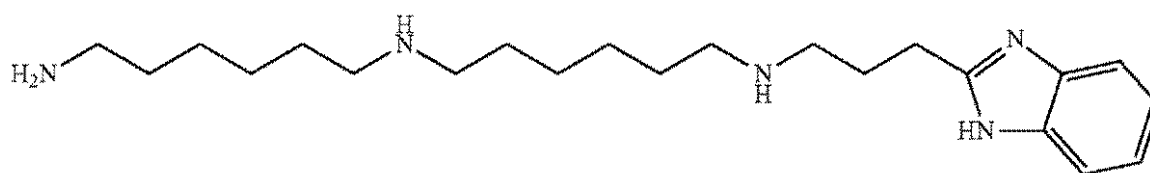
46-TDW-12

10

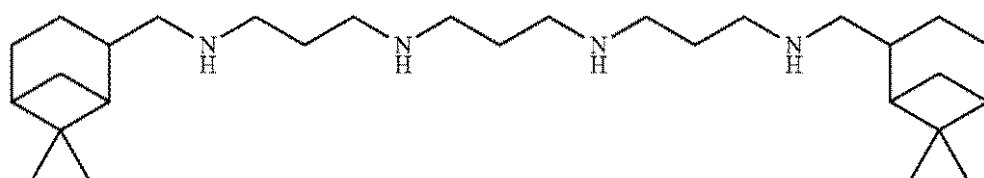


46-TDW-17C

20

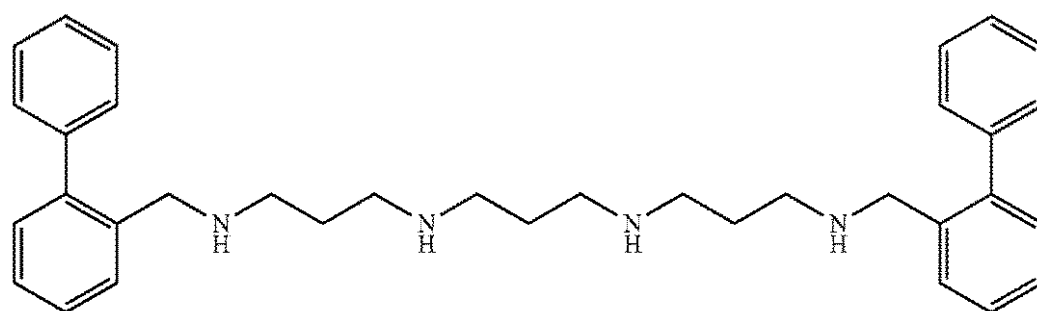


50-DHEJ-3C



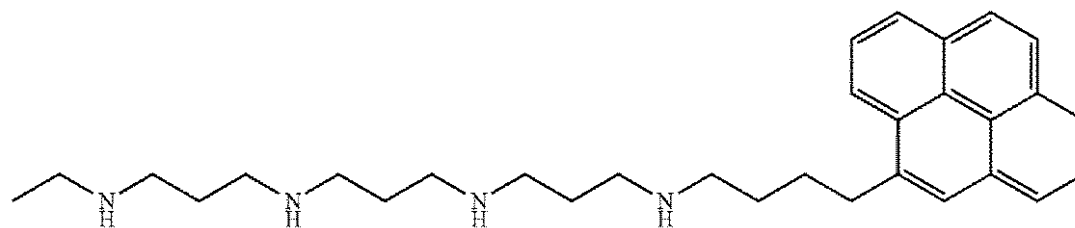
ZQW-35

30



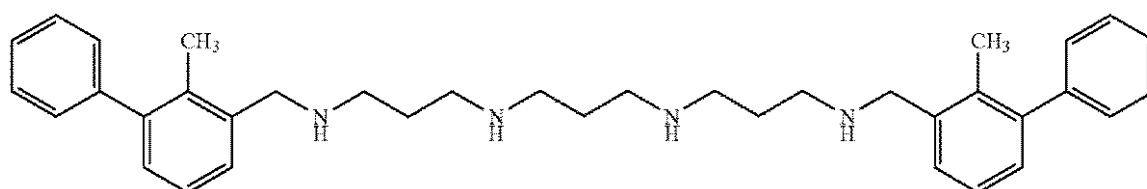
39-TDW-3

40

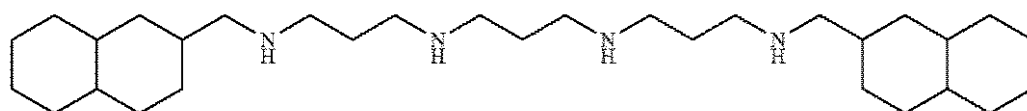


40-TDW-23

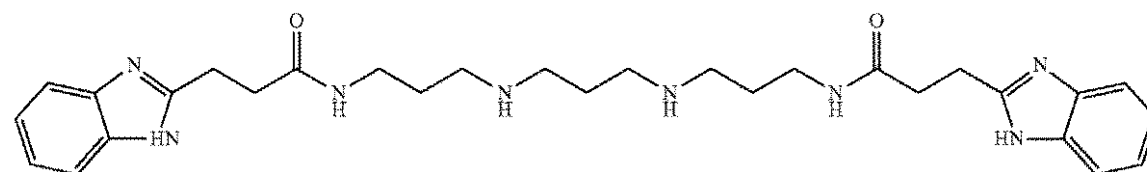
【化 1 2】



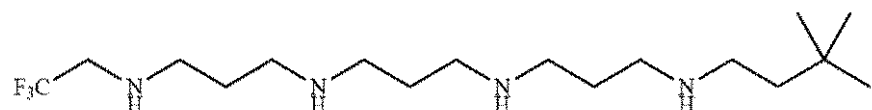
40-TDW-48



YZ-3312C

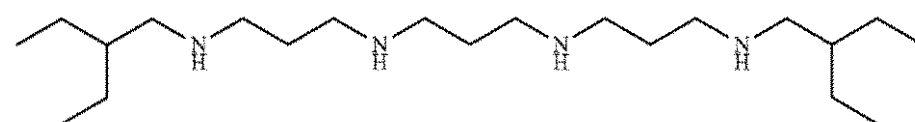


44-DHEJ-38

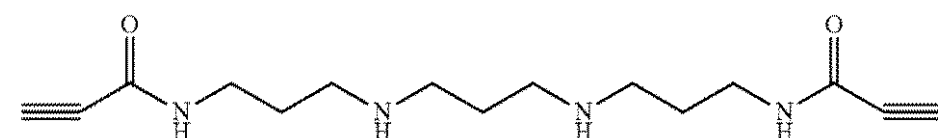


10

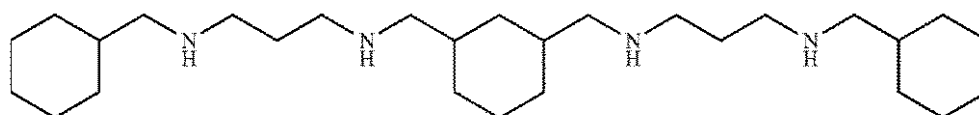
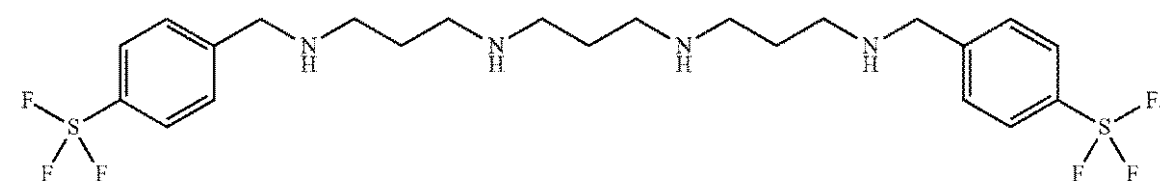
20



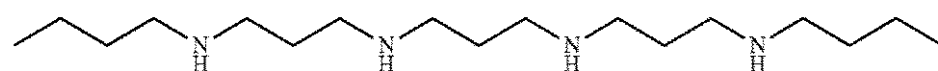
30



40

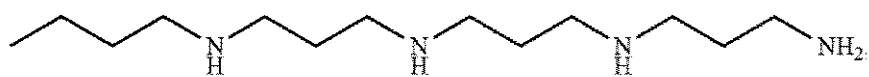


UNS-31-7A

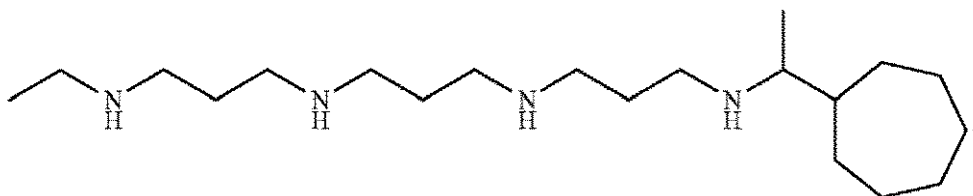
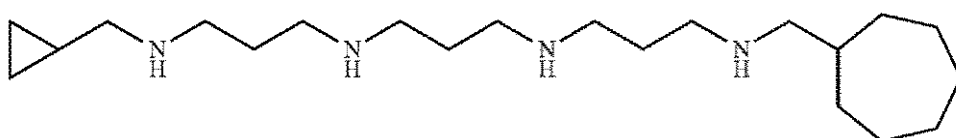


ZQW-14c

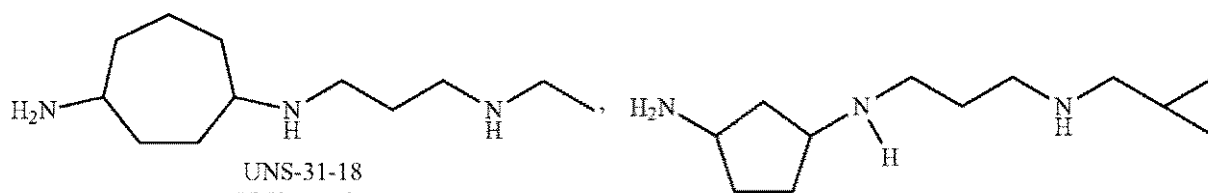
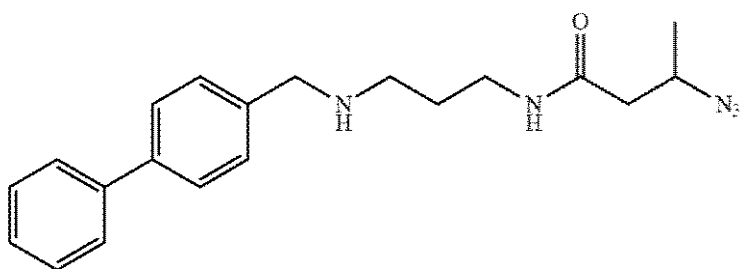
【化 1 3】



ZQW-16c

 α -メチルCHENspm

CPCHENspm

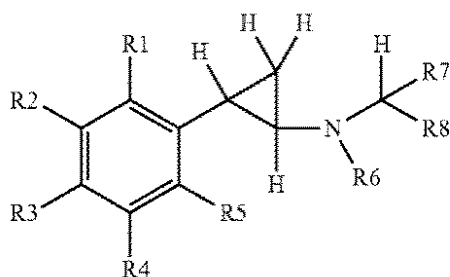
UNS-31-18
UNS-31-19c

を含む。

【0180】

阻害剤であるフェニルシクロプロピルアミン誘導体は、下記式(VI)：

【化 1 4】



(VI)

〔式中、

10

20

30

40

50

R1～R5はそれぞれ独立してH、ハロ、アルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、-L-アリアル、-L-ヘテロサイクリル、-L-カルボサイクリル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルキニル、アミノ、アルキルアミノ、アリアル、アリアルアルキル、アリアルアルケニル、アリアルアルキニル、アリアルアルコキシ、アリアルオキシ、アリアルチオ、ヘテロアリアルチオ、シアノ、シアナト、ハロアリアル、ヒドロキシル、ヘテロアリアルオキシ、ヘテロアリアルアルコキシ、イソシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、チオカルボニル、チオシアナト、トリハロメタンスルホンアミド、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、およびC-アミドから選ばれる；

10

R6はHまたはアルキルである；

R7はH、アルキル、またはシクロアルキルである；

R8は、-L-ヘテロサイクリルの環または環系が、ハロ、アルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、-L-アリアル、-L-ヘテロサイクリル、-L-カルボサイクリル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルキニル、アミノ、アルキルアミノ、アリアル、アリアルアルキル、アリアルアルケニル、アリアルアルキニル、アリアルアルコキシ、アリアルオキシ、アリアルチオ、ヘテロアリアルチオ、シアノ、シアナト、ハロアリアル、ヒドロキシル、ヘテロアリアルオキシ、ヘテロアリアルアルコキシ、イソシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、チオカルボニル、チオシアナト、トリハロメタンスルホンアミド、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、およびC-アミドから選ばれる0～3の置換基を有する-L-ヘテロサイクリルであるか；または

20

R8は、-L-アリアルルの環または環系がハロ、アルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、-L-アリアル、-L-ヘテロサイクリル、-L-カルボサイクリル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルキニル、アミノ、アルキルアミノ、アリアル、アリアルアルキル、アリアルアルケニル、アリアルアルキニル、アリアルアルコキシ、アリアルオキシ、アリアルチオ、ヘテロアリアルチオ、シアノ、シアナト、ハロアリアル、ヒドロキシル、ヘテロアリアルオキシ、ヘテロアリアルアルコキシ、イソシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、チオカルボニル、チオシアナト、トリハロメタンスルホンアミド、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、およびC-アミドから選ばれる1～3の置換基を有する；-L-アリアルルである；

30

各Lは、独立して $-(CH_2)_n-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nNH(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nO(CH_2)_n-$ 、および $-(CH_2)_nS(CH_2)_n-$ から選ばれる(ここで、各nは独立して0、1、2、および3から選ばれる)]で示される化合物、またはその医薬的に許容しうる塩を含む。

【0181】

ある場合には、Lは共有結合である。ある場合は、R6およびR7はヒドロである。ある場合は、R1～R5の1が-L-アリアル、-L-ヘテロサイクリル、および-L-カルボサイクリルから選ばれる。

【0182】

式VIの化合物のある態様において、R8環または環系上の置換基(単数または複数)は、ヒドロキシル、ハロ、アルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、 $-N(C_{1-3}\text{アルキル})_2$ 、 $-NH(C_{1-3}\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)NH(C_{1-3}\text{アルキル})$ 、 $-C(=O)N(C_{1-3}\text{アルキル})_2$ 、 $-S(=O)_2(C_{1-3}\text{アルキル})$ 、 $-S(=O)_2NH_2$ 、 $-S(O)_2NH_2$ 、 $-S(O)_2N(C_{1-3}\text{アルキル})_2$ 、 $-S(=O)_2NH(C_{1-3}\text{アルキル})$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、および $-NO_2$ から選ばれる。

40

【0183】

ある態様において、本発明の化合物は、式(VI)の化合物であって、

各R1～R5が、所望により置換され、独立して-H、ハロ、アルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、-L-アリアル、-L-ヘテロアリアル、-L-ヘ

50

テロサイクリル、-L-カルボサイクリル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルキニル、アミノ、アリール、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、アリールアルコキシ、アリールオキシ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、シアノ、シアナト、ハロアリール、ヒドロキシル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールアルコキシ、イソシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、チオカルボニル、チオシアナト、トリハロメタンスルホンアミド、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、およびC-アミドから選ばれ；

R6が-Hおよびアルキルから選ばれ；

R7が-H、アルキル、およびシクロアルキルから選ばれ；

R8が-C(=O)NRxRyおよび-C(=O)Rzから選ばれ；

Rxが存在するときは、-H、アルキル、アルキニル、アルケニル、-L-カルボサイクリル、-L-アリール、および-L-ヘテロサイクリル(そのすべてが所望により置換されている(-Hを除く))から選ばれ；

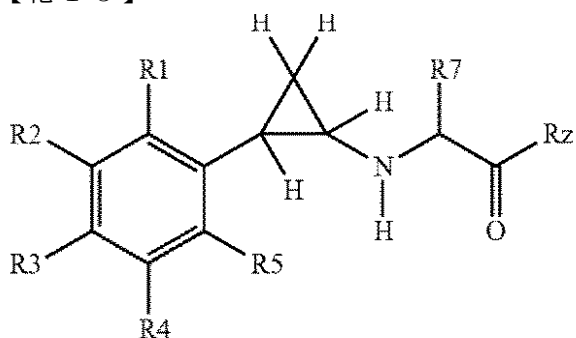
Ryが存在するときは、-H、アルキル、アルキニル、アルケニル、-L-カルボサイクリル、-L-アリール、および-L-ヘテロサイクリル(そのすべてが所望により置換されている(-Hを除く))から選ばれ、RxおよびRyは環状に結合しうる；

Rzが存在するときは、-H、アルコキシ、-L-カルボサイクリル、-L-ヘテロサイクリル、-L-アリールから選ばれ、アリール、ヘテロサイクリル、またはカルボサイクリルは所望により置換され；各Lは式Iの主骨格とカルボサイクリル、ヘテロサイクリル、またはアリール基を結合するリンカーであり、リンカー-Lの炭化水素部分は飽和、部分飽和、または不飽和であり、独立して-(CH₂)_n-(CH₂)_n-、-(CH₂)_nC(=O)(CH₂)_n-、-(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-、-(CH₂)_nNHC(=O)O(CH₂)_n-、-(CH₂)_nNHC(=O)NH(CH₂)_n-、-(CH₂)_nNHC(=S)S(CH₂)_n-、-(CH₂)_nOC(=O)S(CH₂)_n-、-(CH₂)_nNH(CH₂)_n-、-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-、-(CH₂)_nS(CH₂)_n-、および-(CH₂)_nNHC(=S)NH(CH₂)_n-の式を有する飽和親基から選ばれる(ここで、各nは独立して0、1、2、3、4、5、6、7、および8から選ばれる)化合物である。この態様では、所望により置換されたは、独立してアシルアミノ、アシルオキシ、アルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アルキル、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルキニル、アミノ、アリール、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、アリールアルコキシ、アリールオキシ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、カルボサイクリル、シアノ、シアナト、ハロ、ハロアルキル、ハロアリール、ヒドロキシル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロサイクリル、ヘテロアリールアルコキシ、イソシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、チオカルボニル、チオシアナト、トリハロメタンスルホンアミド、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、およびC-アミドから選ばれる0または1~4の所望の置換基を表す。この態様のより具体的な局面では、所望の置換基は、ハロ、アルキル、アリール、およびアリールアルキルから選ばれる1または2の所望の置換基である。

【0184】

ある態様において、式(VI)中のR8は、該化合物が下記構造を有するような-CORzである；

【化15】



10

20

30

40

50

(VI)

〔式中、R1～R7は前記と同意義であり、Rzは、独立してアシルアミノ、アシルオキシ、アルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アルキル、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルキニル、アミノ、アリール、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、アリールアルコキシ、アリールオキシ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、カルボサイクリル、シアノ、シアナト、ハロ、ハロアルキル、ハロアリール、ヒドロキシル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロサイクリル、ヘテロアリールアルコキシ、イソシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、チオカルボニル、チオシアナト、トリハロメタンスルホンアミド、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、およびC-アミドから選ばれる1～4の所望の置換基で所望により置換された-L-ヘテロサイクリルであり、該-L-は、独立して $-(CH_2)_n-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nNH(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nO-(CH_2)_n-$ 、および $-(CH_2)_nS(CH_2)_n-$ （ここで、各nは独立して0、1、2、および3から選ばれる）から選ばれる〕

10

【0185】

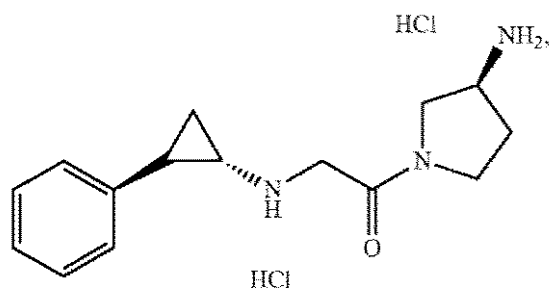
この態様の特定の局面において、各Lは、独立して $-(CH_2)_n-(CH_2)_n-$ および $-(CH_2)_nO-(CH_2)_n-$ （ここで各nは、独立して0、1、2、および3から選ばれる）から選ばれる。この態様のより特定の局面において、各Lは、結合、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2OCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2CH_2-$ 、および $-CH_2OCH_2CH_2-$ から選ばれる。さらにより特定の局面において、各Lは、結合、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 OCH_2- 、および $-CH_2CH_2CH_2-$ から選ばれる。さらにより特定の局面において、Lは結合および $-CH_2-$ から選ばれる。

20

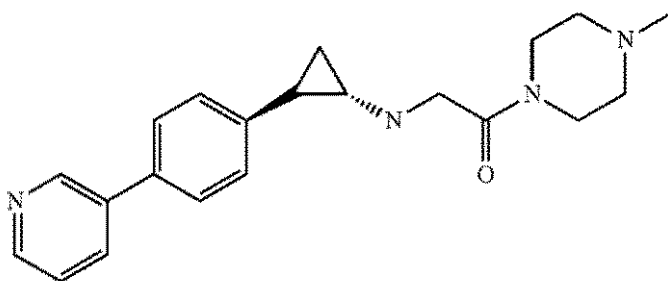
【0186】

式VIの典型的な化合物は、

【化16】

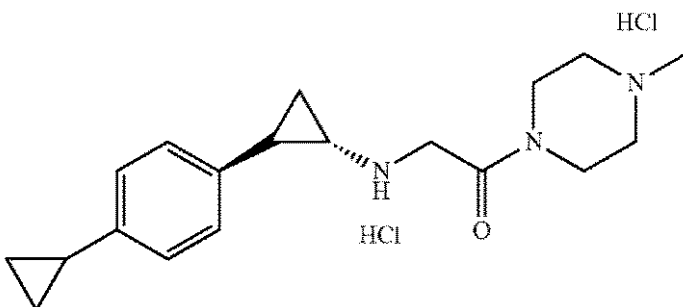


30



、および

40



50

を含む。

【0187】

式VIの典型的な化合物は以下から選ばれる：N-シクロプロピル-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；N-シクロプロピル-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}プロパンアミド；2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}-N-プロパ-2-イニルアセトアミド；N-イソプロピル-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；N-(tert-ブチル)-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；N-(2-モルホリン-4-イル-2-オキソエチル)-N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミン；2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}プロパンアミド；メチル 2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}プロパノエート；N-シクロプロピル-2-{メチル[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；2-{メチル[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；N-メチル-trans-2-(フェニルシクロプロピルアミノ)プロパンアミド；1-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)エタノン；1-(4-エチルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)エタノン；1-(4-ベンジルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)-エタノン；2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)-1-(4-フェニルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-N-シクロプロピルアセトアミド；2-((trans)-2-(4-(3-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(3-クロロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(3-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；1-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-(4-フェネトキシフェニル)シクロプロピルアミノ)エタノン；2-((trans)-2-(4-(4-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(4-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；(trans)-N-(4-フルオロベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(4-フルオロベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミニウム(アミニウム)；4-(((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)メチル)ベンゾニトリル；(trans)-N-(4-シアノベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミニウム；(trans)-2-フェニル-N-(4-(トリフルオロメチル)ベンジル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(4-(トリフルオロメチル)ベンジル)シクロプロパンアミニウム；(trans)-2-フェニル-N-(ピリジン-2-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(ピリジン-3-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(ピリジン-4-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-N-((6-メチルピリジン-2-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(チアゾール-2-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(チオフェン-2-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-N-((3-プロモチオフェン-2-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((4-プロモチオフェン-2-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(3,4-ジクロロベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(3-フルオロベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミニウム；(trans)-N-(2-フルオロベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(キノリン-4-イルメチル)シクロプロパンアライン；(trans)-N-(3-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-((6-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-イル)メチル)シクロプロパンアミン；(trans)-N-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((4-メチルピリジン-2-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((6-メトキシピリジン-2-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；2-(((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)メチル)ピリジン-3-オール；(trans)-N-((6-プロモピリジン-2-イル)メチル)-2-フェ

10

20

30

40

50

ニルシクロプロパンアミン；4-(((trans)-2-(4(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)メチル)ベンゾニトリル；(trans)-N-(4-(ベンジルオキシ)ベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-ベンジル-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)-N-(4-メトキシベンジル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)-N-(4-フルオロベンジル)シクロプロパンアミン-；(trans)-2-フェニル-N-(キノリン-2-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-((5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル)メチル)シクロプロパンアミン；(trans)-N-((3-フルオロピリジン-2-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(キノリン-3-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-N-((6-メトキシピリジン-3-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((5-メトキシピリジン-3-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン-；(trans)-N-((2-メトキシピリジン-3-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((3H-インドール-3-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；3-(((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)メチル)ベンゾニトリル；(trans)-N-(2-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；3-(((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)メチル)ピリジン-2-アミン；(trans)-N-((2-クロロピリジン-3-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(3,4-ジメトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((2,3-ジヒドロベンゾフラン-5-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イルメチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2,6-ジフルオロ-4-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-2-フェニル-N-(4-(トリフルオロメトキシ)ベンジル)シクロプロパンアミン；(trans)-N-(5-フルオロ-2-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2-フルオロ-4-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((4-メトキシナフタレン-1-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2-フルオロ-6-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((2-メトキシナフタレン-1-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((4,7-ジメトキシナフタレン-1-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン-；(trans)-N-(4-メトキシ-3-メチルベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(3-クロロ-4-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(3-フルオロ-4-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(4-メトキシ-2-メチルベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((3,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[b][1,4]ジオキセピン-6-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((3,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[b][1,4]ジオキセピン-7-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-((2,2-ジメチルクロマン-6-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(4-メトキシ-2,3-ジメチルベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(4-メトキシ-2,5-ジメチルベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2-フルオロ-4,5-ジメトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(3-クロロ-4,5-ジメトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2-クロロ-3,4-ジメトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2,4-ジメトキシ-6-メチルベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2,5-ジメトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2,3-ジメトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(2-クロロ-3-メトキシベンジル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(1H-インドール-5-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)-N-(ピリジン-2-イルメチル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)-N-(2-メトキシベンジル)シクロプロパンアミン；(trans)-N-(1-(4-メトキシフェニル)エチル)-2-フェニルシクロプロパンアライン；(trans)-N-(1-(3,4-ジメトキシフェニル)エチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(1-(2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-イル)エチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン

10

20

30

40

50

；(trans)-N-(1-(5-フルオロ-2-メトキシフェニル)エチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(trans)-N-(1-(3,4-ジメトキシフェニル)プロパン-2-イル)-2-フェニルシクロプロパン-アミン；(trans)-N-((3-メチル-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)メチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；

およびその医薬的に許容しうる塩。

【0188】

別の小分子LSD阻害剤化合物は、たとえば、WO2010/043721(PCT/EP2009/063685)、WO2010/084160(PCT/EP2010/050697)、PCT/EP2010/055131；PCT/EP2010/055103；およびEP出願番号EP10171345(これらすべての内容は本願の開示と矛盾しない範囲で本明細書の一部を構成する)に記載の選択的LSD1およびLSD1/MAOB 二重阻害剤から選ばれうる。このタイプの代表的化合物は、フェニルシクロプロピルアミン誘導体または同族体を含み、その実例は以下のものを含む：アミン基上に1または2の置換基を有するフェニルシクロプロピルアミン；アミン基上に0、1、または2の置換基およびフェニル基上に1、2、3、4、または5の置換基を有するフェニルシクロプロピルアミン；フェニル基上に1、2、3、4、または5の置換基を有するフェニルシクロプロピルアミン；アミン基上に0、1、または2の置換基を有するフェニルシクロプロピルアミン(ここで、PCPAのフェニル基は、アミン基上に0、1、または2の置換基を有するアリール-またはヘテロアリール-シクロプロピルアミンが得られるようアリールまたはヘテロサイクリルから選ばれる別の環系で置換(交換)される)；フェニルシクロプロピルアミン(ここで、PCPAのフェニル基はアリール-またはヘテロサイクリル-シクロプロピルアミンが得られるようアリールまたはヘテロサイクリルから選ばれる別の環系で置換(交換)され、該アリールまたはヘテロサイクリル部分上の該アリール-またはヘテロサイクリル-シクロプロピルアミンはアミン基上に0、1、または2の置換基およびフェニル基上に1、2、3、4、または5の置換基を有する)I；フェニル基上に1、2、3、4、または5の置換基を有するフェニルシクロプロピルアミン；または上記フェニルシクロプロピルアミン類似体または誘導体のいずれか(ここで、シクロプロピルは、1、2、3、または4のさらなる置換基を有する)。適切には、ヘテロサイクリル基はヘテロアリールにおいてこの段落で上記されている。

【0189】

フェニルシクロプロピルアミン誘導体または類似体の非限定的態様は、「シクロプロピルアミンアミド」誘導体および「シクロプロピルアミン」誘導体を含む。「シクロプロピルアミンアセトアミド」誘導体の特定の例は、限定されるものではないが以下のものを含む：N-シクロプロピル-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；N-シクロプロピル-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}プロパンアミド；2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}-N-プロパ-2-イニルアセトアミド；N-イソプロピル-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；N-(tert-ブチル)-2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド；N-(2-モルホリン-4-イル-2-オキシエチル)-N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミン；2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}プロパンアミド；メチル 2-{[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}プロパノエート；1-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)エタノン；1-(4-エチルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)エタノン；1-(4-ベンジルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)エタノン；2-((trans)-2-フェニルシクロプロピルアミノ)-1-(4-フェニルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(1,1'-ビフェニル-4-イル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-yl)エタノン；2-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-N-シクロプロピルアセトアミド；2-((trans)-2-(4-(3-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(4-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン；2-((trans)-2-(4-(3

-クロロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン; 1-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2-((trans)-2-(4-フェネトキシフェニル)シクロプロピルアミノ)エタノン; 2-((trans)-2-(ピフェニル-4-イル)シクロプロピルアミノ)-1-(4-メチルピペラジン-1-イル)エタノン; N-シクロプロピル-2-{{(trans)-2-フェニルシクロプロピル}アミノ}アセトアミド; N-メチル-trans-2-(フェニルシクロプロピルアミノ)プロパンアミド; 2-{{メチル[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}アセトアミド; N-[2-(4-メチルピペラジン-1-イル)エチル]-N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミン; N-シクロプロピル-N'-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]エタン-1,2-ジアミン; N,N-ジメチル-N'-(2-{{(trans)-2-フェニルシクロプロピル}アミノ}エチル)エタン-1,2-ジアミン; (3R)-1-(2-{{(trans)-2-フェニルシクロプロピル}アミノ}エチル)ピロリジン-3-アミン; (3S)-N,N-ジメチル-1-(2-{{(trans)-2-フェニルシクロプロピル}アミノ}エチル)ピロリジン-3-アミン; (3R)-N,N-ジメチル-1-(2-{{(trans)-2-フェニルシクロプロピル}アミノ}エチル)ピロリジン-3-アミン; N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(2-ピペラジン-1-イルエチル)アミン; N,N-ジエチル-N'-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]エタン-1,2-ジアミン; N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(2-ペリジン-1-イルエチル)アミン; (trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)-N-(2-(4-メチルピペラジン-1-イル)エチル)シクロプロパンアミン; (trans)-N-(2-(4-メチルピペラジン-1-イル)エチル)-2-(3'-(トリフルオロメチル)ピフェニル-4-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(3'-クロロピフェニル-4-イル)-N-(2-(4-メチルピペラジン-1-イル)エチル)シクロプロパンアミン; (R)-1-(2-((trans)-2-(3'-(トリフルオロメチル)ピフェニル-4-イル)シクロプロピルアミノ)エチル)ピロリジン-3-アミン; and N1-シクロプロピル-N2-((trans)-2-(3'-(トリフルオロメチル)ピフェニル-4-イル-)シクロプロピル)エタン-1,2-ジアミン。

10

20

30

40

50

【0190】

「シクロプロピルアミン」誘導体の特定の例は、限定されるものではないが以下のものを含む: N-4-フルオロベンジル-N-{{(trans)-2-[4-(ベンジルオキシ)フェニル]シクロプロピル}アミン、N-4-メトキシベンジル-N-{{(trans)-2-[4-(ベンジルオキシ)フェニル]シクロプロピル}アミン、N-ベンジル-N-{{(trans)-2-[4-(ベンジルオキシ)フェニル]シクロプロピル}アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ-メチル)ピリジン-3-オール、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(3-メチルピリジン-2-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(4-クロロピリジン-3-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(4-トリフルオロメチルピリジン-3-イル-メチル)アミン、N-(3-メトキシベンジル)-N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(キノリン-4-イルメチル)アミン、N-(2-フルオロベンジル)-N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミン、N-(3-フルオロベンジル)-N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(3,4-ジクロロ-1-フェニルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(5-プロモ-チオフェン-2-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(3-プロモ-チオフェン-2-イルメチル)-アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(チオフェン-2-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(1,3-チアゾール-2-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(3-メチル-ピリジン-2-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(ピリジン-4-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(ピリジン-3-イルメチル)アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(ピリジン-2-イルメチル)アミン、[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-[4-(トリフルオロメチル)ベンジル]アミン、({[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミノ}メチル)ベンゾニトリル、N-(4-フルオロベンジル)-N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]アミン、N-[(trans)-2-フェニルシクロプロピル]-N-(3-プロモ-ピリジン-2-イルメチル)アミン、N-4-シアノベンジル-N-{{(trans)-2-[4-(ベンジルオキシ)フェニル]シクロプロピル}アミン、N-4-[(ベンジルオキシ)-ベンジル]-N-[(trans)-2-(4-フェニル)シクロプロピル]アミン; 2-((trans)-2-(4-

(4-シアノベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(3-シアノベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(4-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(3-フルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(3-クロロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(4-クロロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(3-ブロモベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-(3,5-ジフルオロベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(4-フェネトキシフェニル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、2-((trans)-2-(3'-(トリフルオロメチル)ビフェニル-4-イル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド、および2-((trans)-2-(3'-クロロビフェニル-4-イル)シクロプロピルアミノ)アセトアミド。

10

【0191】

LSD1阻害剤の他の例には、たとえば、フェネルジン、またはパルギリン(プロパルギルアミン)、またはその誘導体または類似体がある。フェネルジンおよびパルギリン(プロパルギルアミン)の誘導体および類似体は、限定されるものではないが、親化合物のフェニル基がヘテロアリールで交換、または所望により環式基で置換されているか、または親化合物のフェニル基が所望により環式基で置換されている化合物を含む。ある局面において、フェネルジンまたはパルギリン誘導体、またはその類似体は、本明細書に記載の選択的LSD1または二重LSD1/MAOB阻害活性を有する。ある態様において、フェネルジン誘導体または類似体は、フェニル基上に1、2、3、4、または5の置換基を有する。ある局面において、フェネルジン誘導体または類似体は、アリールまたはヘテロサイクリル基で置換(と交換)されたフェニル基を有し、該アリールまたはヘテロサイクリル基は0、1、2、3、4、または5の置換基を有する。ある局面において、パルギリン誘導体または類似体は、フェニル基上に1、2、3、4、または5の置換基を有する。ある局面において、パルギリン誘導体または類似体は、アリールまたはヘテロサイクリル基で置換(と交換)されたフェニル基を有し、該アリールまたはヘテロサイクリル基は0、1、2、3、4、または5の置換基を有する。そのような化合物の製造方法は当業者に知られている。

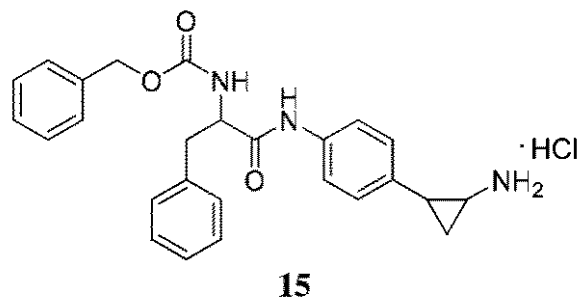
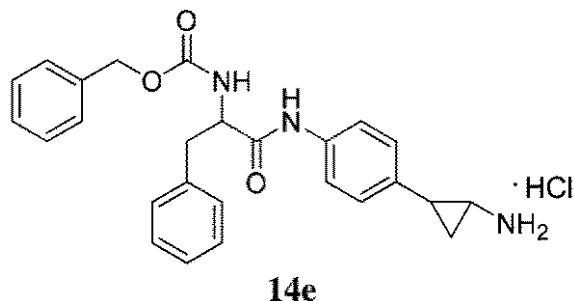
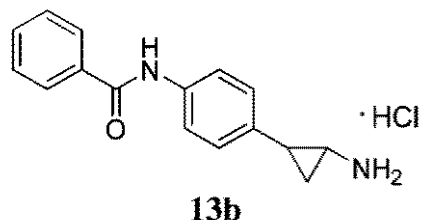
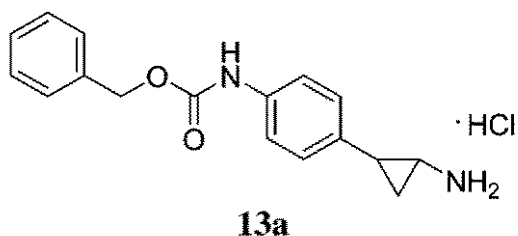
20

【0192】

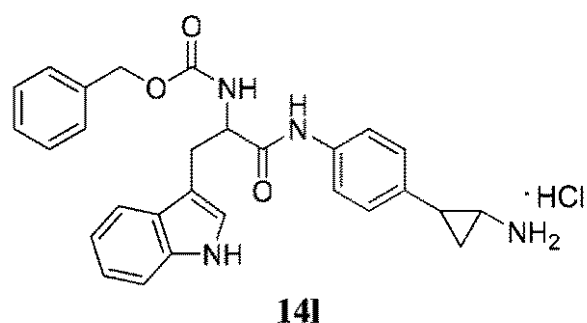
本発明は、たとえば、Bindaら(2010. J. Am. Chem. Soc. 132: 6827-6833(この内容は本明細書の一部を構成する))に記載のLSD(たとえば、LSD1および/またはLSD2)酵素機能の阻害剤であるトラニルシプロミン誘導体も予期する。そのような化合物の非限定的例は、

30

【化 17】



および



を含む。

【0193】

あるいはまた、LSD1阻害剤化合物は、Benelkebirら(2011. Bioorg. Med. Chem. doi:10.1016/j.bmc.2011.02.017(この内容は本明細書の一部を構成する))に記載のトランシルプロミン類似体から選ぶことができる。o-、m-およびp-プロモ類似体を含むこのタイプの代表的な類似体は、(1R,2S)-2-(4-プロモフェニル)シクロプロパンアミンヒドロクロリド(化合物4c)、(1R,2S)-2-(3-プロモフェニル)シクロプロパンアミンヒドロクロリド(化合物4d)、(1R,2S)-2-(2-プロモフェニル)シクロプロパンアミンヒドロクロリド(化合物4e)、(1R,2S)-2-(ピフェニル-4-イル)シクロプロパンアミンヒドロクロリド(化合物4f)を含む。

【0194】

クロロビニル、エンド-シクロプロピルアミン、およびヒドラジン官能基を含む、Culhaneら(2010. J. Am. Chem. Soc. 132:3164-3176(この内容は本明細書の一部を構成する))に記載のペプチド骨格化合物にも言及しうる。Culhane et alが開示する非限定的化合物は、プロパルギル-Lys-4、N-メチルプロパルギル-Lys-4 H3-21、cis-3-クロロアリル-Lys-4 H3-21、trans-3-クロロアリル-Lys-4 H3-21、エクソ-シクロプロピル-Lys-4 H3-21、エンドシクロプロピル-Lys-4 H3-21、エンドジメチルシクロプロピル-Lys-4、ヒドラジノ-Lys-4 H3-21、およびヒドラジノ-Lys-4 H3-21を含む。

【0195】

LSD1を阻害するのに有用な別のシクロプロピルアミン化合物は、Fyfeら U.S. 公開公報No. 2013/0197013(この内容は本明細書の一部を構成する))に記載のものを含む。LSD1阻害選択性であると記載されているLSD1の実例となるシクロプロピルアミン阻害剤は、下記式(VII)で示される化合物を含む：

10

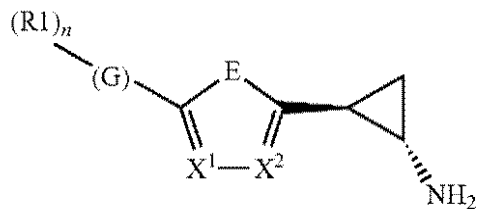
20

30

40

50

【化 18】



(VII)

10

[式中、

E は、 $-\text{N}(\text{R}3)-$ 、 $-\text{O}-$ 、または $-\text{S}-$ であるか、または $-\text{X}^3=\text{X}^4-$ である；

X^1 および X^2 は独立して $\text{C}(\text{R}_2)$ または N である；

X^3 および X^4 は存在する時は、独立して $\text{C}(\text{R}_2)$ または N である；

(G) はサイクリル基(式VIIに示す。サイクリル基 (G) は n 置換基 $(\text{R}1)$ を有する)；

各 $(\text{R}1)$ は、独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、 $-\text{L}_1$ -サイクリル、 $-\text{L}_1$ -アミノ、 $-\text{L}_1$ -ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選ばれる；

各 $(\text{R}2)$ は、独立して $-\text{H}$ 、アルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、 $-\text{L}_1$ -サイクリル、 $-\text{L}_1$ -アミノ、 $-\text{L}_1$ -ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選られ、ここで各 $(\text{R}2)$ 基は、1、2、または3の独立して選ばれる所望の置換基を有するか、または2の $(\text{R}2)$ 基が一緒になって1、2、または3の独立して選ばれる所望の置換基を有するヘテロサイクリルまたはアリアル基を形成し、該所望の置換基は、独立してアルキル、アルカノイル、ヘテロアルキル、ヘテロサイクリル、ハロアルキル、シクロアルキル、カルボサイクリル、アリアルアルコキシ、ヘテロサイクリルアルコキシ、アリアル、アリアルオキシ、ヘテロサイクリルオキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、オキソ、アシルオキシ、カルボニル、カルボキシル、カルボキサミド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、アミノアルキル、アミドアルキル、アミド、ニトロ、チオール、アルキルチオ、アリアルチオ、スルホンアミド、スルフィニル、スルホニル、ウレア、またはカルバメートから選ばれる；

20

30

$\text{R}3$ は $-\text{H}$ または (C_1-C_6) アルキル基である；

各 L_1 は、独立してアルキレン、またはヘテロアルキレンである；および

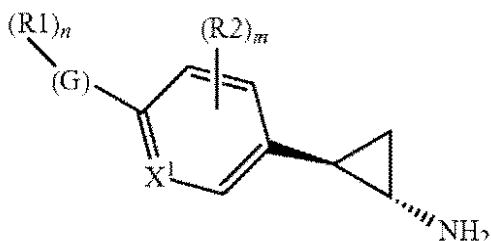
n は、0、1、2、3、4、または5である]

、またはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、または混合物、またはその医薬的に許容しうる塩または溶媒和物。

【0196】

ある態様において、式(VII)の化合物は、下記式(VIII)で示される：

【化 19】



(VIII)

50

[式中、

X^1 はCHまたはNであり；(G)はサイクリル基である；

各(R_1)は、独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選ばれる；

各(R_2)は、独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選られ、各(R^2)基は、1、2、または3の所望の置換基を有し、該所望の置換基は、独立してアルキル、アルカノイル、ヘテロアルキル、ヘテロサイクリル、ハロアルキル、シクロアルキル、カルボサイクリル、アリールアルコキシ、ヘテロサイクリルアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロサイクリルオキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、オキソ、アシルオキシ、カルボニル、カルボキシル、カルボキサミド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、アミノアルキル、アミドアルキル、アミド、ニトロ、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、スルホンアミド、スルフィニル、スルホニル、ウレア、またはカルバメートから選ばれる；

各L1は独立してアルキレンまたはヘテロアルキレンである；

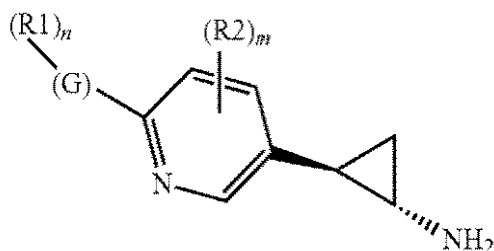
mは、0、1、2、または3であり；nは0、1、2、3、4、または5である(ただし、 X^1 が-CH-であり、(G)がアリールである場合は、nおよびmは、 $n+m$ が0より大きいように独立して選ばれる)；

、またはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、または混合物、またはその医薬的に許容しうる塩または溶媒和物。

【0197】

他の態様において、式(VII)の化合物は、下記式(IX)で示される：

【化20】



(IX)

[式中、

(G)はサイクリル基である；

各(R_1)は独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選ばれる；

各(R_2)は独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選られ、各(R_2)基は0、1、2、または3の所望の置換基を有し、該所望の置換基は、独立してアルキル、アルカノイル、ヘテロアルキル、ヘテロサイクリル、ハロアルキル、シクロアルキル、カルボサイクリル、アリールアルコキシ、ヘテロサイクリルアルコキシ、アリール、アリールオキシ、

ヘテロサイクリルオキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、オキソ、アシルオキシ、カルボニル、カルボキシル、カルボキサミド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、アミノアルキル、アミドアルキル、アミド、ニトロ、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、スルホンアミド、スルフィニル、スルホニル、ウレア、またはカルバメートから選ばれる；

各L1は独立してアルキレンまたはヘテロアルキレンであり；mは0、1、2、または3である；および

nは0、1、2、3、4、または5である]

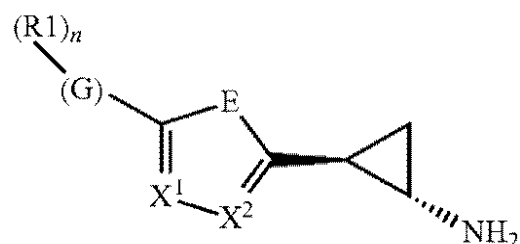
、またはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、または混合物、またはその医薬的に許容しうる塩または溶媒和物。

10

【0198】

さらに他の態様において、式(VII)の化合物は、下記式(X)で示される：

【化21】



20

(X)

[式中、

Eは-N(R3)-、-O-、または-S-であるか、または-X³=X⁴-である；

X¹、X²、X³およびX⁴は、独立してC(R2)またはNである(ただし、Eが-X³=X⁴-である場合はX¹、X²、X³およびX⁴の少なくとも1がNである)；

(G)はサイクリル基であり；各(R1)は、独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選ばれる；

30

各(R2)は、独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選ばれ、各(R2)基は1、2、または3の所望の置換基を有し、該所望の置換基は、独立してアルキル、アルカノイル、ヘテロアルキル、ヘテロサイクリル、ハロアルキル、シクロアルキル、カルボサイクリル、アリールアルコキシ、ヘテロサイクリルアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロサイクリルオキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、オキソ、アシルオキシ、カルボニル、カルボキシル、カルボキサミド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、アミノアルキル、アミドアルキル、アミド、ニトロ、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、スルホンアミド、スルフィニル、スルホニル、ウレア、またはカルバメートから選ばれる；

40

【0199】

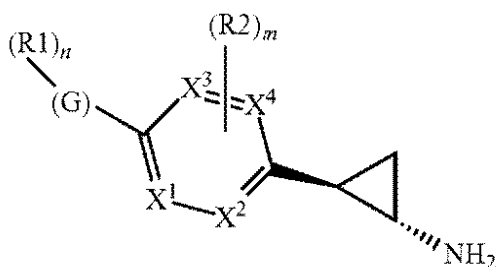
R3は-Hまたは(C₁-C₆)アルキル基であり；各L1はアルキレンまたはヘテロアルキレンであり；nは0、1、2、3、4、または5である]

、またはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、または混合物、またはその医薬的に許容しうる塩または溶媒和物。

【0200】

50

さらに他の態様において、式(VII)の化合物は、下記式(XI)で示される：
【化 2 2】



(XI)

[式中、

X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は、独立してCHまたはNである(ただし、 X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 の少なくとも1のはNである；

(G)はサイクリル基であり；各(R1)は、独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選ばれる；

各(R2)は独立してアルキル、アルケニル、アルキニル、サイクリル、-L1-サイクリル、-L1-アミノ、-L1-ヒドロキシル、アミノ、アミド、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ヒドロキシル、アルコキシ、ウレア、カルバメート、アシル、またはカルボキシルから選ばれ、各(R2)基は1、2、または3の所望の置換基を有し、該所望の置換基は、独立してアルキル、アルカノイル、ヘテロアルキル、ヘテロサイクリル、ハロアルキル、シクロアルキル、カルボサイクリル、アリールアルコキシ、ヘテロサイクリルアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロサイクリルオキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、オキソ、アシルオキシ、カルボニル、カルボキシル、カルボキサミド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、アミノアルキル、アミドアルキル、アミド、ニトロ、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、スルホンアミド、スルフィニル、スルホニル、ウレア、またはカルバメート；各L1はアルキレン、またはヘテロアルキレンから選ばれる；

m は0、1、2、または3であり； n は0、1、2、3、4、または5である]

、またはそのエナンチオマー、ジアステレオマー、または混合物、またはその医薬的に許容しうる塩または溶媒和物。

【0 2 0 1】

式VIIで示される代表的化合物は、適切には以下から選ばれる：(trans)-2-(3'-(トリフルオロメチル)ビフェニル-4-イル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(テルフェニル-4-イル)シクロプロパンアミン；4'-(trans)-2-アミノシクロプロピル)ビフェニル-4-オール；4'-(trans)-2-アミノシクロプロピル)ビフェニル-3-オール；(trans)-2-(6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；(Trans)-2-(6-(3,5-ジクロロフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(6-(4-クロロフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(6-(3-クロロフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(6-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(6-(4-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；(trans)-2-(6-(3-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；4-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)ベンゾニトリル；3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)ベンゾニトリル；(Trans)-2-(6-p-トリルピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；(Trans)-2-(6-m-トリルピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン；4-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピ

リジン-2-イル)フェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェノール; 4-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)ベンズアミド; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)ベンズアミド; 2-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェノール; (Trans)-2-(6-(3-メトキシ-4-メチルフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; 5-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-2-フルオロフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-フルオロフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-4-フルオロフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-2-フルオロフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-2, 4-ジフルオロフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-2, 4, 6-トリフルオロフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-クロロフェノール; (Trans)-2-(6-(2-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (Trans)-2-(6-(5-クロロチオフェン-2-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (Trans)-2-(6-(5-メチルチオフェン-2-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (Trans)-2-(6-(1H-インドール-6-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (Trans)-2-(6-(ベンゾ[b]チオフェン-5-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-3-メチルピリジン-2-イル)フェノール; (trans)-2-(6-(3-クロロフェニル)-5-メチルピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(5-メチル-6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(4-フルオロ-3-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン、(trans)-2-(6-(3-フルオロ-5-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(2-フルオロ-5-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン、(trans)-2-(6-(2-フルオロ-3-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(3-クロロ-5-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(2-クロロ-5-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(3-メトキシ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-メトキシベンゾニトリル; 5-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-2-メチルフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-4-クロロフェノール; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-(トリフルオロメチル)フェノール; (trans)-2-(6-(2-フルオロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)アセトアミド; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)メタンスルホンアミド; (trans)-2-(6-(ベンゾ[b]チオフェン-2-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(6-(ベンゾ[b]チオフェン-3-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; 5-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)チオフェン-2-カルボニトリル; (trans)-2-(6-(4-メチルチオフェン-3-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(2-クロロ-6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; (trans)-2-(2-(4-クロロフェニル)-6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; 4-(3-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-2-yl)フェノール; 4-(3-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)-ピリジン-2-イル)ベンズアミド; (trans)-2-(2-メチル-6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-ヒドロキシベンゾニトリル; (trans)-2-(6-(3,4-ジフルオロ-5-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン; 5-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジ

10

20

30

40

50

ン-2-イル)-2,3-ジフルオロフェノール ; (trans)-2-(6-(3-クロロ-4-フルオロ-5-メトキシフェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン ; 5-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-3-クロロ-2-フルオロフェノール ; (trans)-2-(6-(1H-インダゾール-6-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン ; (trans)-2-(6-(9H-カルバゾール-2-イル)ピリジン-3-イル)シクロプロパンアミン ; 6-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)インドリン-2-オン ; 6-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)ベンゾフラン-2(3H)-オン ; 4-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)ピリジン-2(1H)-オン ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)ベンゼンスルホンアミド ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)プロパン-2-スルホンアミド ; 4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-4-フルオロビフェニル-3-オール ; 4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-5-クロロビフェニル-3-オール ; 4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-5-クロロ-4-フルオロビフェニル-3-オール ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ビフェニル-3-イル)ベンゼンスルホンアミド ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ビフェニル-3-イル)プロパン-2-スルホンアミド ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ビフェニル-3-イル)メタンスルホンアミド ; N-(2-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)メタンスルホンアミド ; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-4-メトキシベンゾニトリル ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ビフェニル-2-イル)メタンスルホンアミド ; 4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-6-メトキシビフェニル-3-カルボニトリル ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-6-メトキシビフェニル-3-イル)メタンスルホンアミド ; 4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-6-ヒドロキシビフェニル-3-カルボニトリル ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-6-ヒドロキシビフェニル-3-イル)メタンスルホンアミド ; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-4-ヒドロキシベンゾニトリル ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-4-ヒドロキシフェニル)メタン-スルホンアミド ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-(トリフルオロメチル)フェニル)エタンスルホンアミド ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-(トリフルオロメチル)フェニル)メタンスルホンアミド ; 3-(6-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-3-イル)フェノール ; (Trans)-2-(5-(3-メトキシフェニル)ピリジン-2-イル)シクロプロパンアミン ; 4-(6-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-3-イル)フェノール ; 2-(6-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-3-イル)フェノール ; 2-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チオフエン-2-イル)フェノール ; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チオフエン-2-イル)フェノール ; 4-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チオフエン-2-イル)フェノール ; 2-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-2-イル)フェノール ; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-2-イル)フェノール ; 4-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-2-イル)フェノール ; 2-(2-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-5-イル)フェノール ; 3-(2-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-5-イル)フェノール ; 2-(2-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-5-イル)フェノール ; 3-(2-((trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-5-イル)フェノール ; 3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリミジン-2-イル)フェノール ; 4-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリミジン-2-イル)フェノール ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-4-メトキシフェニル)メタン-スルホンアミド ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-5-クロロ-[1,1'-ビフェニル]-3-イル)メタンスルホンアミド ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-クロロフェニル)メタンスルホンアミド ; N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-4-フルオロ-[1,1'-ビフェニル]-3-イル)メタンスルホンアミド ; N-(5-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-2-フルオロフェニル)メタンスルホンアミド ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)エタンスルホンアミド ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)-4-シアノベンゼンスルホンアミド ; N-(3-(5-((trans)-2-アミノシ

10

20

30

40

50

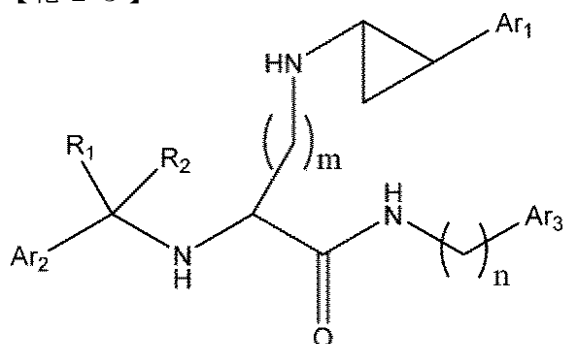
クロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)-3-シアノベンゼンスルホンアミド；N-(3-(5-(trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェニル)-2-シアノベンゼンスルホンアミド；N-(3-(5-((trans)-2-アミノシクロプロピル)ピリジン-2-イル)-5-(トリフルオロメチル)フェニル)-4-シアノベンゼンスルホンアミド；N-(4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-[1,1'-ビフェニル]-3-イル)-1,1,1-トリフルオロメタンスルホンアミド；4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-6-ヒドロキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボニトリル；4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-[1,1'-ビフェニル]-2-オール、4'-((trans)-2-アミノシクロプロピル)-3'-メトキシ-[1,1'-ビフェニル]-3-オール；N-(3-(5-(trans)-2-アミノシクロプロピル)チアゾール-2-イル)フェニル)-2-シアノベンゼンスルホンアミド；またはその医薬的に許容しうる塩または溶媒和物。

10

【0202】

他の態様において、LSD1阻害化合物は、たとえば、Ogasawaraら(2013、Angew. Chem. Int. Ed. 52:8620-8624(この内容は本明細書の一部を構成する)に記載のフェニルシクロプロピルアミン誘導体から選ばれる。このタイプの代表的化合物は、式(XII)：

【化23】



20

(XII)

[式中、Ar₁は5～7員のアリールまたはヘテロアリール環である；

Ar₂およびAr₃は、それぞれ独立して所望により1～3の置換基で置換された5～7員のアリールまたはヘテロアリール環から選ばれる；

R₁およびR₂は、独立して水素およびヒドロキシルから選ばれるか、またはR₁およびR₂が一緒になって=O、=S、または=NR₃を形成する；

30

R₃は、水素、-C₁₋₆アルキル、または-OHから選ばれる；

mは、1～5の整数である；および

nは、1～3の整数である]

、またはその医薬的に許容しうる塩で示される。

【0203】

式(VII)の特定の態様において、下記の1またはそれ以上を適用する：

Ar₁は、6員のアリールまたはヘテロアリール環、特にフェニル、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、1,3,5-トリアジン、1,2,4-トラジンおよび1,2,3-トリアジン、特にフェニルである；

40

Ar₂は、6員のアリールまたはヘテロアリール環、特にフェニル、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、1,3,5-トリアジン、1,2,4-トラジンおよび1,2,3-トリアジン、特にフェニルであり；特に6員のアリールまたはヘテロアリール環が、特に3または4位が1の所望の置換基で所望により置換されている；

Ar₃は、6員のアリールまたはヘテロアリール環、特にフェニル、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、1,3,5-トリアジン、1,2,4-トラジンおよび1,2,3-トリアジン、特にフェニルであり；特に6員のアリールまたはヘテロアリール環が、特に3または4位が1の所望の置換基で所望により置換されている。

【0204】

Ar₁およびAr₂の特に所望の置換基は、-C₁₋₆アルキル、-C₂₋₆アルケニル、CH₂F、-CHF₂

50

、 $-\text{CF}_3$ 、ハロ、アリール、ヘテロアリール、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ アルキル NH_2 、 $-\text{C}(\text{O})$ -ヘテロサイクリル、特にメチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 CH_3 、 Cl 、 F 、フェニル、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-4}\text{NH}_2$ 、および $-\text{C}(\text{O})$ -ヘテロサイクリルを含む；

R_1 および R_2 が一緒になって $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 、または $=\text{NR}_3$ 、特に $=\text{O}$ 、または $=\text{S}$ 、特に $=\text{O}$ を形成する；

R_3 は、 H 、 $-\text{C}_{1-3}$ アルキル、または $-\text{OH}$ 、特に H 、 $-\text{CH}_3$ 、または $-\text{OH}$ である。

m は、2～5、特に3～5、特に4である、

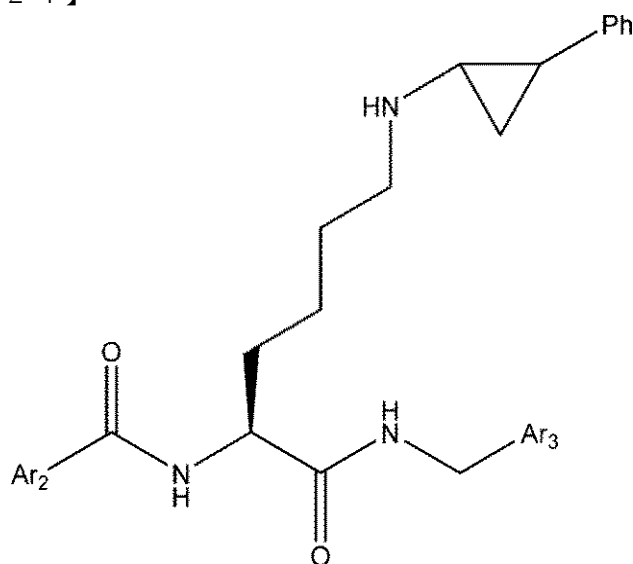
n は、1または2、特に1である。

【0205】

10

ある態様において、式(XII)の化合物は、式(XIIa)：

【化24】



20

(XIIa)

[式中、 Ar_2 および Ar_3 は式(XII)について定義した通りである]の化合物である。

30

【0206】

式(XII)で示される非限定的化合物は以下のものを含む：

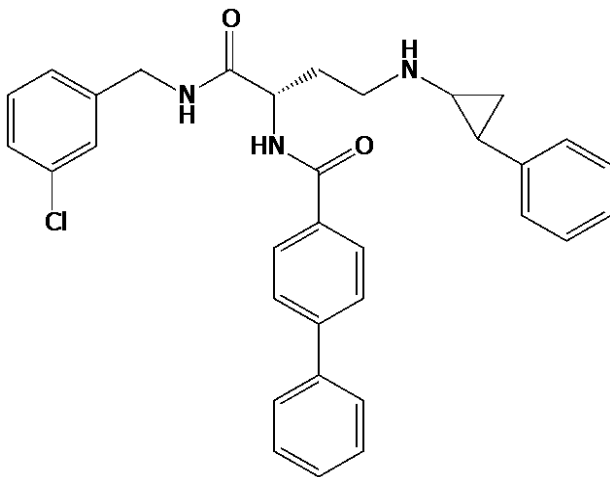
【表 3】

化合物	Ar ₂	Ar ₃
1b	フェニル	フェニル
1c	4-メチルフェニル	フェニル
1d	4- <i>t</i> -ブチルフェニル	フェニル
1e	4-クロロフェニル	フェニル
1f	4-フルオロフェニル	フェニル
1g	4-フェニル-フェニル	フェニル
1h	4-トリフルオロメチルフェニル	フェニル
1i	3-(2-アミノエチルカルバモイル)フェニル	フェニル
1j	3-(ピペラジン-1-カルボニル)フェニル	フェニル
1k	4-フェニル-フェニル	4-メチルフェニル
1l	4-フェニル-フェニル	4-フルオロフェニル
1m	4-フェニル-フェニル	4-フェニル-フェニル
1n	4-フェニル-フェニル	4- <i>t</i> -ブチルフェニル
1o	4-フェニル-フェニル	3-メチルフェニル
1p	4-フェニル-フェニル	3-フルオロフェニル
1q	4-フェニル-フェニル	3-フェニル-フェニル

【0207】

式(XII)で示される例示的化合物(本明細書においてNCD-38と称する)は、以下の構造式によって表される：

【化25】



【0208】

式(VII)の化合物の合成および阻害活性は、Ogasawaraら (2013、上記)によって記載されている。

【0209】

他のLSD1阻害剤として、たとえば、Uedaら (2009. J. Am. Chem. Soc. 131(48) : 17536-17537) ; Mimasu i(2010. Biochemistry June 22. [Epub ahead of print] PMID : 20568732 [PubMed-as supplied by publisher])に開示のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0210】

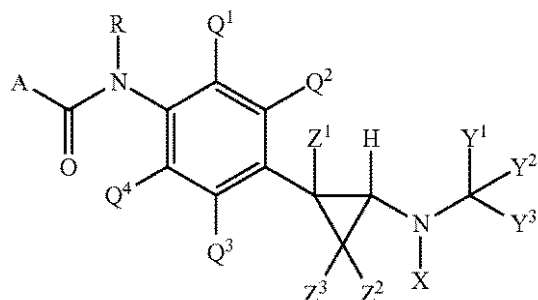
他のフェニルシクロプロピルアミン誘導体および類縁体は、たとえば、Kaiserら (1962、J. Med. Chem. 5 : 1243-1265) ; Zirkleら (1962. J. Med. Chem. 1265-1284 ; U.S. Pat. Nos. 3,365,458 ; 3,471,522 ; 3,532,749)およびBolesovら (1974. Zhurnal Organicheskoi Khimii 10 : 8 1661-1669)およびRussian Patent No. 230169(19681030)に見い出さ

れる。

【0211】

他の実施態様において、LSD1阻害剤化合物は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用される、Tomitaら 米国特許出願公開公報No. 2014/0228405に記載のシクロプロパンアミン化合物から選ばれる。このタイプの代表的化合物は、式(XIII)：

【化26】



(XIII)

[式中、

Aは、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基である；

Rは、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基である；または

AとRとは、互いに結合して、置換基を有してもよい環を形成してもよい；

Q¹、Q²、Q³およびQ⁴は、それぞれ独立して、水素原子または置換基である；Q¹とQ²、およびQ³とQ⁴は、互いに結合して、任意に置換基を有してもよい環を形成してもよい；

Xは、水素原子、置換基を有してもよい非環式炭化水素基または置換基を有してもよい飽和環式基である；

Y¹、Y²およびY³は、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基を表す；

XとY¹、およびY¹とY²は、互いに結合して、任意に置換基を有してもよい環を形成してもよい；および

Z¹、Z²およびZ³は、それぞれ独立して、水素原子または置換基である]

またはその塩である。

【0212】

式(XIII)で示される化合物の特定の実施態様において、化合物は、Aが、1～3個のハロゲン原子で置換された1～3個のC₁₋₆アルキル基を有してもよいフェニル基、ビフェニル基またはピラゾリル基であり；Rが水素原子であり；またはAおよびRが、互いに結合して1もしくは2個のオキソ基を有するジヒドロイソインドール環を形成してもよく；Q¹が、水素原子またはC₁₋₆アルキル基であり；Q²、Q³およびQ⁴が、それぞれ水素原子であり；Xが、水素原子であり；Y¹、Y²およびY³が、それぞれ独立して、水素原子またはC₃₋₈シクロアルキル基であり；Y¹およびY¹が、互いに結合し、隣接する炭素原子と一緒にあって、1～3個のC₁₋₆アルキル基を有してもよいピペリジン環を形成してもよく；およびZ¹、Z²およびZ³が、それぞれ水素原子である化合物、またはその塩である。

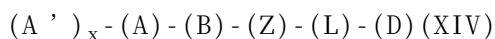
【0213】

式(XIII)で示される典型的化合物は、以下から選ばれるのが適切である：(1)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}-2-メチルフェニル)ベンズアミド、(2)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)-3-(トリフルオロメトキシ)ベンズアミド、(3)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)ベンズアミド、(4)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)-シクロヘキサカルボキサミド、(5)N-(4-{trans-2-[(1,1-ジオキシドテトラヒドロ-2H-チオピラン-4-イル)アミノ]シクロプロピル}-フェニル)

-3-(トリフルオロメチル)ベンズアミド、(6)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)-1,3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド、(7)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)-1,5-ジメチル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド、(8)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)-1-メチル-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド、(9)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)-1-メチル-5-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド、および(10)N-(4-{trans-2-[(シクロプロピルメチル)アミノ]シクロプロピル}フェニル)-1-メチル-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド、またはその塩。

【0214】

さらに他の実施態様において、LSD1阻害剤化合物は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるMunozら 米国特許出願公開公報No. 2014/0213657に記載の化合物から選ばれる。このタイプの代表的化合物は、式(XIV)：



[式中、

(A)は、ヘテロアリールまたはアリールである；

各(A')は、存在するならば、独立して、アリール、アリールアルコキシ、アリールアルキル、ヘテロシクリル、アリールオキシ、ハロ、アルコキシ、ハロアルキル、シクロアルキル、ハロアルコキシ、およびシアノから選ばれる(ここで、各(A')は、ハロゲン、ハロアルキル、ハロアルコキシ、アリール、アリールアルコキシ、アルキル、アルコキシ、アミド、 $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、ヘテロアリール、シアノ、スルホニルおよびスルフィニルから独立して選ばれる0、1、2または3個の置換基で置換される)；

Xは、0、1、2または3である；

(B)は、シクロプロピル環であり、ここで、(A)および(Z)は、(B)の異なる炭素原子に共有的に結合する；

(Z)は、 $-\text{NH}-$ である；

(L)は、単結合、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ および $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ から選ばれる；

および
(D)は、脂肪族炭素環式基またはベンゾシクロアルキルであり、ここで、脂肪族炭素環式基またはベンゾシクロアルキル基は、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})$ 、アルキル、ハロ、アミド、シアノ、アルコキシ、ハロアルキルおよびハロアルコキシから独立して選ばれる0、1、2または3個の置換基を有する]

またはそのエナンチオマー、ジアステレオマーもしくはその混合物、またはその医薬的に許容しうる塩もしくは溶媒和物で示される。

【0215】

式(XIV)で示される化合物の非限定的例として、以下のものが挙げられる：N-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)-6-メトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；N-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)-5,6-ジメトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；N-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)-4,5-ジメトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；N-((trans)-2-フェニルシクロプロピル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；6-メトキシ-N-((trans)-2-フェニルシクロプロピル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；6-クロロ-N-((trans)-2-フェニルシクロプロピル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；N-((trans)-2-フェニルシクロプロピル)-6-(トリフルオロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；7-メトキシ-N-((trans)-2-フェニルシクロプロピル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-1-アミン；N-((trans)-2-(3'-クロロビフェニル-4-イル)シクロプロピル)-6-メトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；N-((trans)-2-(4'-クロロビフェニル-4-イル)シクロプロピル)-6-メトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；6-メトキシ-N-((trans)-2-(3'-メトキシビフェニル-4-イル)シクロプロピル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；N-trans-(2-シクロヘキシルエチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(Trans)-N

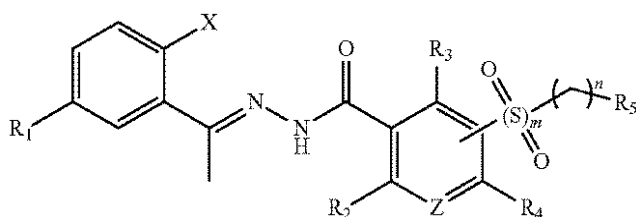
- (3-シクロヘキシルプロピル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(Trans)-N-(2-シクロヘプチルエチル)-2-フェニルシクロプロパンアミン；(Trans)-2-(4-(3-ブromoベンジルオキシ)フェニル)-N-(2-シクロヘキシルエチル)シクロプロパンアミン；N-((trans)-2-(4-(3-ブromoベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)-6-メトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-アミン；(Trans)-2-(3'-クロロビフェニル-4-イル)-N-(2-シクロヘキシルエチル)シクロプロパンアミン；(Trans)-2-(4'-クロロビフェニル-4-イル)-N-(2-シクロヘキシルエチル)シクロプロパンアミン；(Trans)-N-(2-シクロヘキシルエチル)-2-(3'-メトキシビフェニル-4-イル)シクロプロパンアミン；N-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)-7-メトキシ-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-1-アミン；および1-((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)シクロプロパンカルボキサミド；またはその医薬的に許容しうる塩もしくは溶媒和物。

10

【0216】

さらに他の実施態様において、LSD1阻害剤化合物は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用される、Vankayalapatiらの米国特許出願公開公報No. 2014/0163017に記載の置換(E)-N'-(1-フェニルエチリデン)ベンゾヒドラジド類縁体から選ばれる。このタイプの代表的化合物は、式(XV)：

【化27】

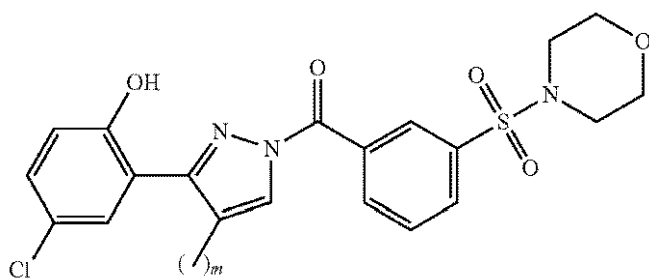


20

(XV)

または式(XVI)：

【化28】



30

(XVI)

[式中、

mは、0または1である；

nは、は、0～3の整数である；

Xは、OH、NO₂およびFから選ばれる；

Zは、NおよびCHから選ばれる；

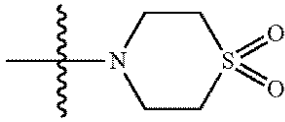
R₁は、ハロ、C₁-C₃ハロアルキルおよびC₁-C₃ポリハロアルキルから選ばれる；

R₂、R₃およびR₄はそれぞれ独立して、水素、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、アミノ、C₂-C₆アルカルコキシ、C₁-C₆アルコキシ、C₁-C₆アルキル、C₁-C₆ポリハロアルキルおよびC₁-C₆ハロアルキルから選ばれる；

R₅は、NR₆R₇、C₁-C₆アルキル、C₃-C₆シクロアルキル、

40

【化 2 9】



およびCyから選ばれ、かつ、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、C₂-C₆アルカルコキシ、C₁-C₆アルキルアルコール、C₁-C₆アルコキシ、C₁-C₆アルキル、C₁-C₆ポリハロアルキル、C₁-C₆ハロアルキル、C₃-C₆シクロアルキルおよびCyから独立して選ばれる0~3個の基で置換される；ここで、Cyは、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、アゼパニル、オキサゾリジニル、イミダゾリジニル、ピラゾリジニル、ピペラジニル、オキサジナニル、モルホリニル、ヘキサヒドロピリミジニルおよびヘキサヒドロピリダジニルから選ばれるヘテロシクロアルキルである；および、ここで、R₆およびR₇はそれぞれ独立して、水素、C₁-C₆アルキル、C₃-C₆シクロアルキルおよびC₃-C₆ヘテロシクロアルキルから選ばれる]

10

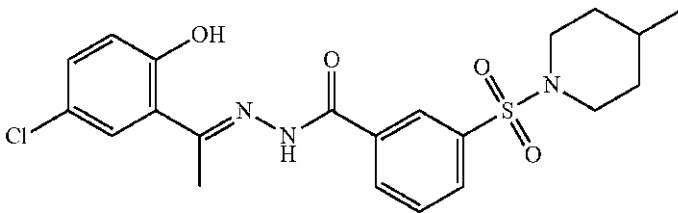
またはその医薬的に許容しうる塩で示される。

【0 2 1 7】

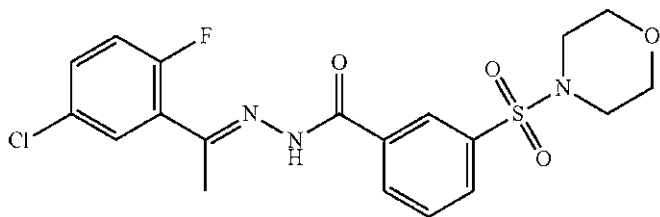
式 (XV) および (XVI) で示される例示的化合物として、以下のものが挙げられる：

【化 3 0】

20

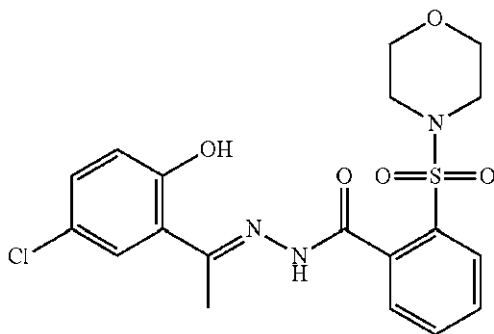


、



30

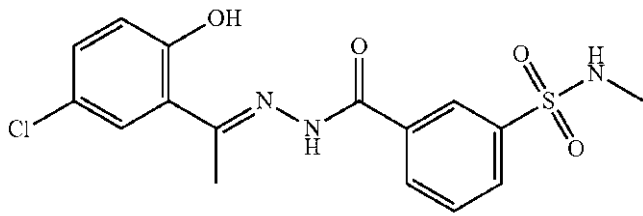
、



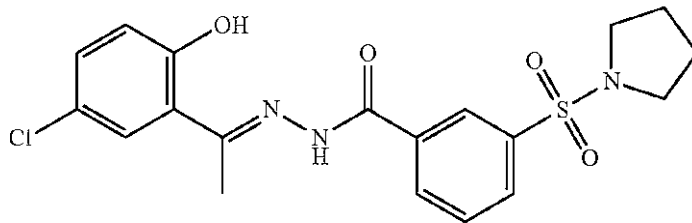
40

、

【化 3 1】

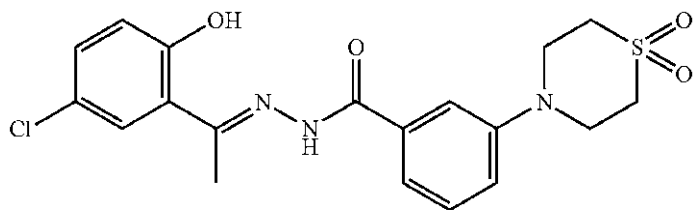


、



10

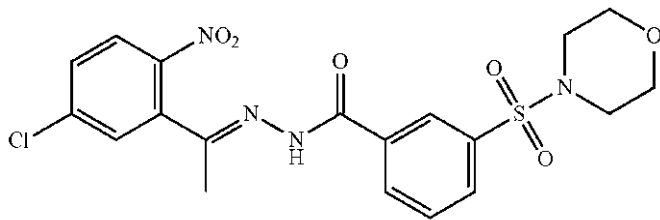
、



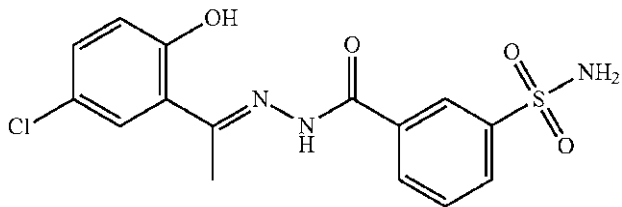
20

、

【化 3 2】

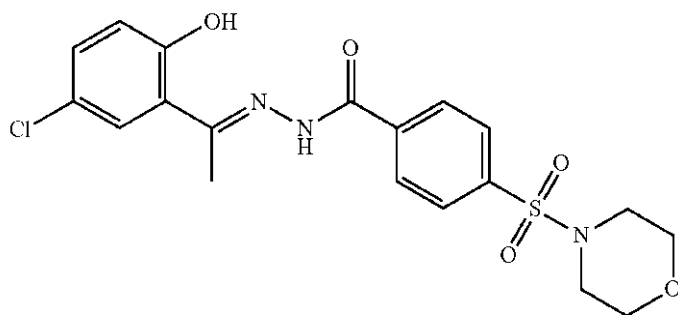


、



10

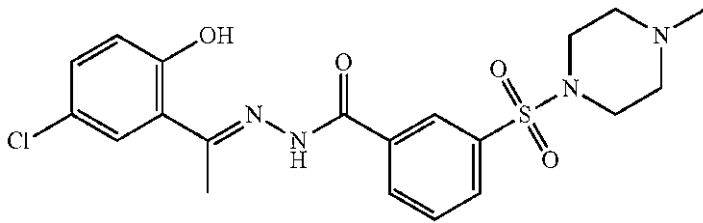
、



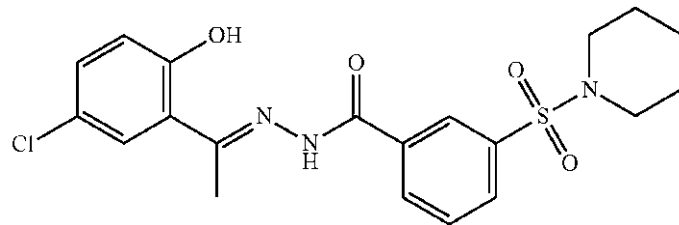
20

、

【化 3 3】

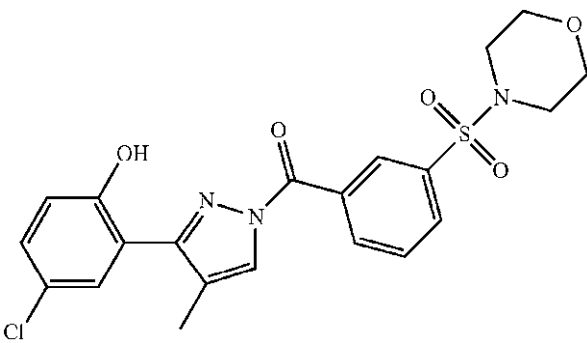


、



10

、

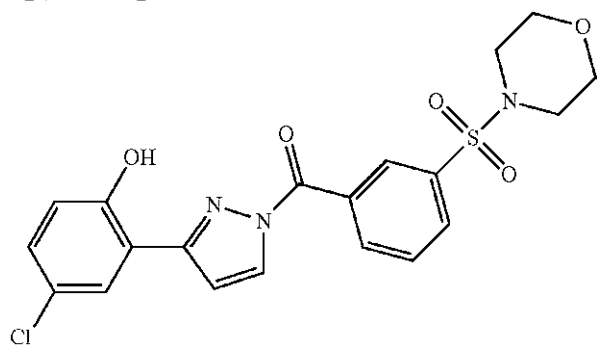


20

、

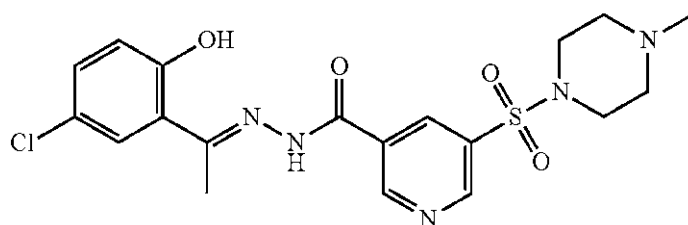
30

【化 3 4】



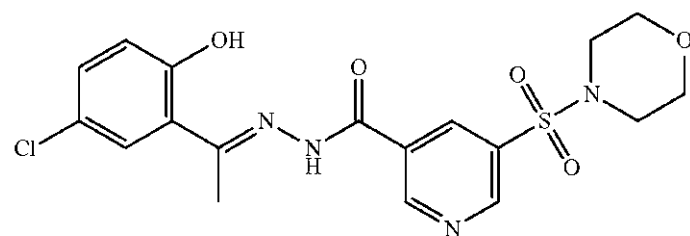
10

、



および

20



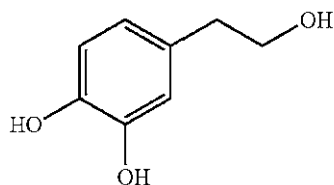
。

【 0 2 1 8 】

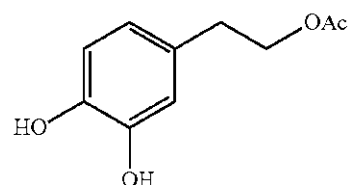
30

他の実施態様において、LSD1阻害剤化合物は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるMcCordらの米国特許出願公開公報No. 2014/0155339に記載のヒドロキシチロソール、ヒドロキシチロソール誘導および／または置換化合物、および／またはヒドロキシチロソール代謝物から選ばれる。このタイプの代表的化合物として：

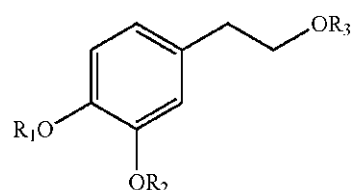
【化 3 5】



、



、および



、

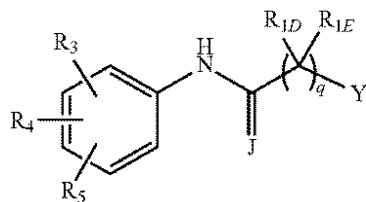
〔式中、

R_1 、 R_2 および R_3 は独立して、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ルケニル、置換もしくは非置換アルキニル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アシル、ORa、SRa、SORa、 SO_2Ra 、 OSO_2Ra 、 OSO_3Ra 、 NO_2 、NHRa、 $N(Ra)_2$ 、 $=N-Ra$ 、 $N(Ra)CORa$ 、 $N(CORa)_2$ 、 $N(Ra)SO_2R'$ 、 $N(Ra)C(=NRa)N(Ra)Ra$ 、CN、ハロゲン、CORa、COORa、OCORa、OCOORa、OCONHRa、 $OCON(Ra)_2$ 、CONHRa、 $CON(Ra)_2$ 、 $CON(Ra)ORa$ 、 $CON(Ra)SO_2Ra$ 、 $PO(ORa)_2$ 、 $PO(ORa)Ra$ 、 $PO(ORa)(N(Ra)Ra)$ およびLSD1タンパク質に対する阻害効果を有するアミノ酸エステルから選ばれる；および、さらにここで、Ra基はそれぞれ独立して、水素、LSD1タンパク質に対する阻害効果を有する置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは非置換アルキニル、置換もしくは非置換アリール、および置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アシルなどから選ばれる；および、さらにここで、置換もしくは非置換アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリルおよび／またはアシル基はそれぞれ、 C_{1-28} (その中のすべての範囲を含む)である〕が挙げられる。

【0 2 1 9】

さらに他の実施態様において、LSD1阻害剤化合物は、その全体が参照することによって本明細書に援用されるCaseroらの米国特許出願公開公報No. 2014/0011857に記載の小分子化合物から選ばれる。このタイプの代表的化合物は、式(XVII)：

【化 3 6】



10

20

30

40

50

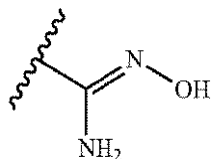
(XVII)

〔式中、

Yは、

(i)

【化 3 7】



10

(ii)-C(O)OH；または

(iii)-NH₂；Jは、0、Sまたは不在であり、ここで、Jが不在の場合、Jが結合する炭素は、-CH₂-である；R₃は、アルキル、アリール、炭素環式、複素環式、アラルキル、アルコキシ、アリールオキシ、ハロアルキルまたはハロであり、これらのそれぞれは、ニトロ、ヒドロキシ、チオ、C(O)NR_AR_BまたはC(O)OR_Aで任意に置換される；R₅は、H、アルキル、アリール、炭素環式、複素環式、アラルキル、アルコキシ、アリールオキシ、ハロアルキルまたはハロであり、これらのそれぞれは、ニトロ、ヒドロキシ、チオ、C(O)NR_AR_BまたはC(O)OR_Aで任意に置換される；ここで、R₃は、オルト置換される；R_{1D}またはR_{1E}はそれぞれ独立して、H、アルキル、アリール、炭素環式、複素環式、アルコキシまたはハロであり、これらのそれぞれは、任意に置換される；R_AおよびR_Bは出現ごとにそれぞれ独立して、以下から選ばれる：それぞれ0、SまたはNから選ばれる0、1、2または3個のヘテロ原子を含む、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニルまたは任意に置換されたアルキニル；任意に置換されたアリール；任意に置換されたヘテロアリール；任意に置換された複素環式；任意に置換された炭素環式；または水素；およびqは、1、2、3、4、5、6または7である〕

20

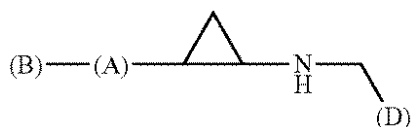
で示される。

【0 2 2 0】

他の実施態様において、LSD1阻害剤は、その全体が参照することによって本明細書に援用されるMunozらの米国特許出願公開公報No. 2013/0231342に記載のアリールシクロプロピルアミン化合物から選ばれる。このタイプの代表的化合物は、式(XVIII)：

30

【化 3 8】



(XVIII)

〔式中、

(A)は、n個の置換基(R3)を有するシクリル基である；

(B)は、シクリル基または-(L1)-シクリル基であり、ここで、該シクリル基または該-(L1)-シクリル基に含まれるシクリル部分は、n個の置換基(R2)を有する；

(L1)は、-O-、-NH-、-N(アルキル)-、アルキレンまたはヘテロアルキレンである；

(D)は、ヘテロアリール基または-(L2)-ヘテロアリール基であり、ここで、該ヘテロアリール基または該-(L2)-ヘテロアリール基に含まれるヘテロアリール部分は、1個の置換基(R1)を有し、さらに、該ヘテロアリール基は、環炭素原子を介して分子の残りの部分に共有結合するか、または該-(L2)-ヘテロアリール基に含まれるヘテロアリール部分は、環炭素原子を介して(L2)部分に共有結合する；

(L2)は、-O-、-NH-、-N(アルキル)-、アルキレンまたはヘテロアルキレンである；

40

50

(R1)は、水素結合基である；

各(R2)は独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクリル、アミノ、アミド、C-アミド、アルキルアミノ、ヒドロキシル、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、アルコキシ、アシル、カルボキシル、カルバメート、またはウレアから選ばれる；

各(R3)は独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクリル、アミノ、アミド、C-アミド、アルキルアミノ、ヒドロキシル、ニトロ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、アルコキシ、アシル、カルボキシル、カルバメート、またはウレアから選ばれる；およびnは独立して、0、1、2、3または4である]

10

で示される。

【0221】

式(XVIII)で示される化合物の非限定的例は、以下のものから選ばれる：5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)メチル)ピリミジン-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)メチル)チアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロピルアミノ)メチル)ピリミジン-2-アミン；5-(((trans)-2-(6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロピルアミノ)メチル)チアゾール-2-アミン；3-(5-(((trans)-2-((2-アミノピリミジン-5-イル)メチルアミノ)シクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェノール；3-(5-(((trans)-2-((2-アミノチアゾール-5-イル)メチルアミノ)シクロプロピル)ピリジン-2-イル)フェノール；4'-(((trans)-2-((2-アミノピリミジン-5-イル)メチルアミノ)シクロプロピル)ピフェニル-3-オール；4'-(((trans)-2-((2-アミノチアゾール-5-イル)メチルアミノ)シクロプロピル)ピフェニル-3-オール；5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)メチル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-アミン；5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピルアミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-((4-フルオロベンジル)オキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-((3,5-ジフルオロベンジル)オキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-((4-クロロベンジル)オキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-((3-クロロベンジル)オキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-((2-フルオロベンジル)オキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-N-メチル-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；N-(5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)アセトアミド；4'-(((trans)-2-((5-アミノ-1,3,4-オキサジアゾール-2-イル)メチル)アミノ)シクロプロピル)-[1,1'-ビフェニル]-3-オール；5-(((trans)-2-(6-(3-(トリフルオロメチル)フェニル)ピリジン-3-イル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-アミン；5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)チアゾール-5-アミン；4-(((trans)-2-(3'-((トリフルオロメチル)-[1,1'-ビフェニル]-4-イル)シクロプロピル)アミノ)メチル)チアゾール-2-アミン；2-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)オキサゾール-5-アミン；3-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)イソキサゾール-5-アミン；5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-アミン；3-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-アミン；5-(((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロ

20

30

40

50

ロピル)アミノ)メチル)-1,2,4-チアジアゾール-3-アミン; 5-((((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)ピリジン-2-アミン; 6-((((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)ピリダジン-3-アミン; 5-((((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)ピラジン-2-アミン; 2-((((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)ピリミジン-5-アミン; 6-((((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,2,4-トリアジン-3-アミン; 3-((((trans)-2-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)シクロプロピル)アミノ)メチル)-1,2,4-トリアジン-6-アミン; またはその医薬的に許容しうる塩もしくは溶媒和物。

【0222】

本発明は、既知のLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)阻害剤のみならずあらゆる適切なスクリーニングアッセイで同定されたLSD阻害剤も包含する。したがって、本発明は、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)を阻害し、LSD-過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(i)形成; (ii)増殖; (iii)生残; (iv)生存; (v)維持; (vi)EMT; または(vii)METの少なくとも1つを変化させ、またはがん(たとえば、転移性がん)を治療または予防するのに有用な修飾物質のスクリーニング方法に及ぶ。ある態様において、該スクリーニング方法は、(1)調製物と被験物質を接触させ、ここで、該調製物は、(i)LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)の少なくとも生物活性断片またはその変異体または誘導体に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチド; または(ii)LSD遺伝子(たとえば、LSD1またはLSD2)またはその部分の転写産物を生成することができるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、または(iii)レポーター遺伝子と操作可能に結合しているLSD遺伝子(たとえば、LSD1またはLSD2)の発現を調節する遺伝子配列(たとえば、転写要素)の少なくとも部分を含むポリヌクレオチドを含む; および(2)被験物質の非存在下の基準レベルまたは機能的活性に対する該ポリペプチド、該ポリヌクレオチド、または該レポーター遺伝子の発現産物のレベルまたは機能的活性の変化を検出することを含む。被験物質非存在下の正常または基準レベルおよび/または機能的活性に対する該ポリペプチド、転写産物、または転写産物部分、または該レポーター遺伝子の発現産物のレベルおよび/または機能的活性の検出された減少は、該物質がLSD-過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(i)形成; (ii)増殖; (iii)生残; (iv)生存; (v)維持; (vi)EMT; または(vii)METの少なくとも1つを変化させ、またはがんを治療または予防するのに有用であることを示す。適切には、これは、被験物質が、LSD-過剰発現細胞の(i)形成; (ii)増殖; (iii)生残; (iv)生存; (v)維持; (vi)EMT; または(vii)METの少なくとも1つを変化させるかまたは該がんを治療または予防するか否かを分析または決定することにより確認する。

【0223】

本発明の範囲内にあるモジュレーターは、拮抗的抗原結合分子、および阻害剤ペプチ断片、アンチセンス分子、リボザイム、RNAi分子、および共抑制分子を含むLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)のレベルまたは機能的活性の阻害剤、およびLSD(たとえば、LSD1またはLSD2)の多糖およびリボ多糖阻害剤を含む。

【0224】

候補物質は、多くの化学物質のクラスを包含するが、典型的には有機分子、好ましくは分子量が50ダルトン以上約2,500ダルトン以下の小有機化合物である。候補物質は、タンパク質との構造的相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含み、典型的には少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基、望ましくは官能化学基の少なくとも2を含む。候補物質は、上記官能基の1またはそれ以上で置換された環式炭素または複素環式構造、または芳香族またはポリ芳香族構造を含むことが多い。候補物質は、限定されるものではないが、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体、またはそれらの混合物を含む生体分子にもみいだされる。

【0225】

LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)の小(非ペプチド)モジュレーターは特に好都合である。その際、小分子は、経口投与後により急速に吸収され、潜在的抗原決定基が少なく、ま

10

20

30

40

50

たはより大きなタンパク質ベースの医薬より細胞膜を横切る可能性が高いので望ましい。また、小有機分子は、適切な細胞内に入る能力を有し、遺伝子の発現に影響を及ぼし(たとえば、遺伝子発現に関与する調節領域または転写因子と相互作用することにより); または補助分子の結合を阻害または促進することにより遺伝子の活性に影響を及ぼしうる。

【0226】

あるいはまた、細菌、真菌、植物、および動物抽出物の形の天然化合物のライブラリーが利用可能であるかまたは容易に作成される。さらに、天然または合成的に作成したライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および生化学的手段により容易に修飾し、これを用いて組み合わせられライブラリーを作成することができる。既知の薬剤を、指向性または無作為化学修飾(たとえば、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化など)して構造類似体を製造することができる。

【0227】

スクリーニングは、既知の薬理活性化合物およびその化学類似体も対象にすることができる。

【0228】

本発明の修飾物質のスクリーニングはあらゆる適切な方法で達成することができる。たとえば、該方法は、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)をコードする遺伝子に対応するポリヌクレオチドを発現する細胞を、該修飾活性を有すると疑われる物質と接触させ、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)のレベルまたは機能的活性の修飾、または該ポリヌクレオチドによりコードされる転写産物のレベルの修飾、または該ポリペプチドの下流細胞標的または転写産物(以後、標的分子という)の活性または発現の修飾についてスクリーニングすることを含む。そのような修飾の検出は、限定されるものではないが、抗原結合分子コンジュゲートまたは蛍光物質(たとえばフルオレセインまたはローダミン)の抗原コンジュゲートを用いるELISA、細胞ベースのELISA、阻害ELISA、ウエスタンブロット、免疫沈降、スロット、またはドットブロットアッセイ、免疫染色、RIA、シンチレーション近接アッセイ、蛍光イムノアッセイ、Ouchterlony二重拡散分析、アビジン-ビオチンまたはストレプトアビジン-ビオチン検出系を用いるイムノアッセイ、および逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を含む核酸検出アッセイを含む技術を用いて達成することができる。

【0229】

LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)が調節されるかまたは発現するポリヌクレオチドは試験対象の細胞中で天然に生じるかまたは試験目的で宿主細胞中に導入されると理解される。さらに、天然または導入ポリヌクレオチドは構成的に発現することにより、該配列のコードされた産物の発現を下方調節する(下方調節は核酸または発現産物レベルでありうる)物質のスクリーニングに有用なモデルを提供しうる。さらに、ポリヌクレオチドを細胞内に導入する範囲内において、該ポリヌクレオチドは、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)をコードする全コーディング配列を含むか、またはコーディング配列(たとえば、LSDの活性部位)の部分、またはLSDをコードする対応する遺伝子の発現を調節する部分(たとえば、LSD1プロモーター、またはLSD2プロモーター)を含む。たとえば、該ポリヌクレオチドと天然に結合するプロモーターを試験対象である細胞内に導入することができる。この場合、該プロモーターのみを用いると、たとえば、該プロモーターと適切なレポーターポリヌクレオチド(限定されるものではないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、およびカテコールアミンアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を含む)を操作可能に結合することにより、該プロモーター活性の修飾を検出することができる。発現の修飾は、該レポーターポリヌクレオチドに関する活性を測定することにより決定することができる。

【0230】

これらの方法は、合成、組み合わせ、化学および天然ライブラリーを含む推定した修飾物質、たとえば、タンパク質性、または非タンパク質性物質のハイスループットスクリーニングを実施するためのメカニズムを提供する。これらの方法は、標的分子をコードするポリヌクレオチドと結合するか、または上流分子の発現を修飾し、次いで、標的分子を

コードするポリヌクレオチドの発現を修飾する物質の検出も促進するだろう。したがって、これらの方法は、本発明の標的分子の発現または活性を直接または間接的に修飾する物質を検出するメカニズムを提供する。

【0231】

別の態様において、被験物質を、例としてEpiQuik ヒストンデメチラーゼLSD1阻害剤スクリーニングアッセイキット(Epigentek Group, Brooklyn, NY)、またはLSD1阻害剤スクリーニングアッセイキット(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI)を含む市販のアッセイを用いてスクリーニングする。

【0232】

化合物は、さらに最も強力なインビボ効果を有するそれらの化合物を同定するために動物モデルで試験することができる。これらの分子は、たとえば該化合物を連続修飾、分子モデリング、および合理的薬物設計に用いる他のルーチン手段に供することにより医薬をさらに開発するための「リード化合物」として役立ちうる。

【0233】

2.2 PKC- θ 阻害剤

PKC- θ 阻害剤は、PKC- θ の蓄積、機能または安定性を減少させ；またはPKC- θ 遺伝子の発現を減少させる任意の活性薬剤を含み、包含し、そのような阻害剤として、小分子および高分子、たとえば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭化水素、多糖、リボ多糖、脂質または他の有機(炭素含有)もしくは無機分子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0234】

いくつかの実施態様において、PKC- θ 阻害剤は、PKC- θ 転写産物の転写または翻訳を阻害するように機能するアンタゴニスト核酸分子である。このタイプの代表的な転写産物は、下記配列のいずれかに対応するヌクレオチド配列を含む：(1)たとえば、GenBank登録No. XM_005252496、XM_005252497、XM_005252498およびXM_005252499に記載のヒトPKC- θ ヌクレオチド配列；(2)(1)に記載の配列のいずれか1つと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列；(3)(1)に記載の配列と少なくとも低、中または高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；(4)下記アミノ酸配列のいずれか1つをコードするヌクレオチド配列：たとえば、Gen Pept登録No. XP_005252553、XP_005252554、XP_005252555およびXP_005252556に記載のヒトPKC- θ アミノ酸配列；(5)(4)に記載の配列のいずれか1つと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列類似性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；および(4)に記載の配列のいずれか1つと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列。実例となるアンタゴニスト核酸分子は、アンチセンス分子、アプタマー、リボザイムおよび三重鎖形成分子、dsRNA、siRNAおよびshRNAなどのRNAiならびに外部ガイド配列を含む。

【0235】

実例となるRNAi分子(たとえば、PKC- θ siRNAおよびshRNA)は、当技術分野で記載されている(たとえば、Maら、2013. BMC Biochem. 14:20；およびKimら、2013. Immune Netw. 13(2):55-62)か、またはSanta Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)、OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)、Sigma-Aldrich Pty Ltd(Castle Hill, NSW, Australia)から購入可能である。

【0236】

本発明はさらに、ペプチドまたはポリペプチドベースの阻害剤化合物を意図する。たとえば、さまざまなPKC- θ アイソザイム-および可変領域-特異的ペプチドが知られており、実例として以下のものが挙げられる：

(a)たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用される米国特許No. 5,7

10

20

30

40

50

83,405に開示される、それぞれ、GLSNFDCG [配列番号：1](PKC- θ 残基 8-15)またはYVESENGQMYI [配列番号：2](PKC- θ 残基 36-46)のアミノ酸配列を有する θ V1由来ペプチドである θ V1-1および θ V1-2；

(b)たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるUS 2004/0009922に開示される、VKSPFDCS [配列番号：3](PKC- θ 残基 655-662またはDRALINS [配列番号：4]、あるいは修飾ペプチドVrSPFDCS [配列番号：5]のアミノ酸配列を有する θ V5由来ペプチド；および

(c)たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるUS 2010/0311644に開示される、KGDNDVLI [配列番号：6]、KGENVDLI [配列番号：7]、KGKEVDLI [配列番号：8]、KGKNVDLI [配列番号：9]、RGKNVELA [配列番号：10]、RGENVELA [配列番号：11]、KGKQVNLI [配列番号：12]、KGKQVNLI [配列番号：13]、KGDQVNLI [配列番号：14]、またはKGKQVNLI [配列番号：15]のアミノ酸配列を有する Ψ θ RACK由来ペプチド。

【0237】

たとえば、上記のPKC- θ 阻害剤ペプチドは、融合タンパク質の一部として改変することができる。融合タンパク質は、ペプチド阻害剤の細胞取り込みを増加させるように機能する輸送タンパク質またはペプチドを含むことができ、治療効果などのもう1つの望ましい生物学的効果を有するか、またはこれらの機能の両方を有することができる。融合タンパク質は、当業者に公知の方法によって製造されうる。阻害剤ペプチドは、当技術分野で公知のさまざまな方法で、もう1つのペプチドに結合されるか、あるいは共役されてもよい。たとえば、阻害剤ペプチドは、融合タンパク質の両方のペプチドがそれらの活性を保持している架橋を介して、本明細書に記載の担体ペプチドまたは他のペプチドに結合され得る。さらなる例として、ペプチドは、1つのペプチドのC末端から他のペプチドのN末端へのアミド結合によって、互いに連結されていてもよいし、あるいは共役されていてもよい。阻害剤ペプチドと他の融合タンパク質のメンバーとの間の結合は、ペプチド結合で切断不能であってもよく、あるいは、たとえば、当技術分野で公知のエステルまたは他の切断可能な結合で切断可能であってもよい。

【0238】

いくつかの実施態様において、輸送タンパク質またはペプチドは、たとえば、アミノ酸配列 CRQIKIWFQNRMRMKWKK [配列番号：16]を含むDrosophila Antennapediaホメオドメイン由来配列であってもよく、N末端のCys-Cys結合を介する架橋によって阻害剤に結合されてもよい(たとえば、Theodoreら、1995. J. Neurosci 15: 7158-7167; Johnsonら、1996. Circ Res 79: 1086において議論されているように)。あるいは、阻害剤は、Vivesら、1997. J. Biol. Chem. 272: 16010-16017、米国特許No. 5,804,604に記載され、GenBank登録No. AAT48070の1型ヒト免疫不全ウイルス由来の転写活性化調節タンパク質(Tat)由来の輸送ポリペプチド(配列番号：17; YGRKKRRQRRRで示されるTatのアミノ酸s 47-57由来など)；またはMitchellら、2000. J. Peptide Res. 56: 318-325およびRolhbardら、2000. Nature Med. 6: 1253-1257に記載のポリアルギニンによって修飾されてもよい。阻害剤は、阻害剤の細胞取り込みを増加させるために、当業者に公知の他の方法によって修飾することができる。

【0239】

PKC- θ 阻害ペプチドは、PKC- θ 阻害ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を細胞に導入することによって、細胞に導入することもできる。PKC- θ 核酸は組換え発現ベクターの形でありうる。PKC- θ 阻害ペプチドコーティング配列は、発現ベクター中の転写調節エレメント、たとえばプロモーターと操作可能に結合することができる。適切なベクターは、たとえば組換えレトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノウイルス；レトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、核酸発現ベクター、およびプラスミド発現ベクターを含む。ある場合には、該発現ベクターは、細胞のゲノム内に統合される。他の場合には、発現ベクターは細胞中、エピソーム状態で存続する。

【0240】

適切な発現ベクターは、限定されるものではないが以下のものを含む：ウイルスベクタ

ー(たとえば、ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；アデノウイルス(たとえば、Liら、Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543-2549, 1994; Borrásら、Gene Ther 6:515-524, 1999; Li and Davidson、PNAS 92:7700-7704, 1995; Sakamotoら、Hum Gene Ther 5:1088-1097, 1999; WO 94/12649、WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984およびWO 95/00655参照); アデノ関連ウイルス(たとえば、Aliら、Hum Gene Ther 9:8186, 1998, Flanneryら、PNAS 94:6916-6921, 1997; Bennettら、Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857-2863, 1997; Jomaryら、Gene Ther 4:683-690, 1997、Rollingら、Hum Gene Ther 10:641-648, 1999; Aliら、Hum Mol Genet. 5:591-594, 1996; Srivastava in WO 93/09239、Samulskiら、J. Vir.(1989)63:3822-3828; Mendelsonら、Virology(1988)166:154-165; およびFlotteら、PNAS(1993)90:10613-10617参照); SV40; ヘルペスシンプレックスウイルス; ヒト免疫不全ウイルス(たとえば、Miyoshiら、PNAS 94:10319-23, 1997; Takahashiら、J Virol 73:7812-7816, 1999参照)に基づくウイルスベクター; レトロウイルスベクター(たとえば、ネズミ白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、およびラウス肉腫ウイルス、ハーベイウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳腺腫瘍ウイルスなどのレトロウイルス由来ベクター)など。

10

【0241】

本発明はまた、PKC- θ の機能的活性を減少させる(たとえば、PKC- θ -媒介性リン酸化の減少、CD44またはuPARのプロモーターへのPKC- θ の結合の阻害、クロマチンへのPKC- θ (たとえば、活性PKC- θ)の結合の減少; グアニン交換因子GIV/GirdinのPKC- θ -媒介性阻害の減少、調節T細胞機能のPKC- θ -媒介性阻害の減少、PKC- θ -媒介性EMTの減少など)小分子薬剤を企図する。

20

【0242】

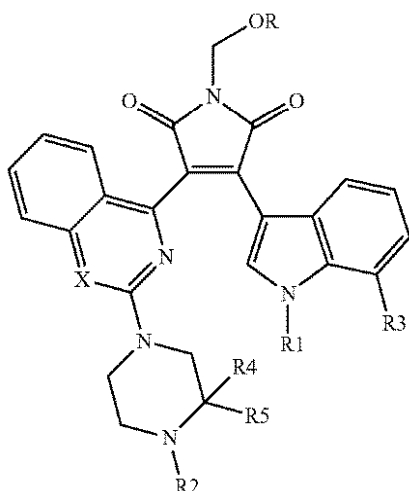
本発明に用いるのに適したPKC- θ の機能的活性を減少させる小分子薬剤は、PKC- θ の機能的活性を阻害するピリジン誘導体; PKC- θ の機能的活性を阻害するプリン化合物、PKC- θ の機能的活性を阻害するピリミジン誘導体; PKC- θ の機能的活性を阻害するアニリン化合物、PKC- θ の機能的活性を阻害するインドール誘導体などを包含する。

【0243】

いくつかの実施態様において、小分子PKC- θ 阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるCookeらの米国特許出願公開公報No. 2013/0157980に記載の置換インドール誘導体から選ばれる。このタイプの実例となる誘導体として式(XIX):

30

【化39】



40

(XIX)

で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩、もしくは水和物が挙げられる。

【0244】

50

式(XIX)で示される化合物のいくつかの実施態様において、

Xは、CHまたはNであり；

Rは、Hまたは PO_3H_2 であり；

R1は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり；R2は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり；R3は、H、 C_{1-4} アルキル、CN、HalまたはOHであり；およびR4およびR5は互いに独立して、Hまたは C_{1-4} アルキルである；またはR4およびR5は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって、3～6員のシクロアルキル基を形成する。

【0245】

式(XIX)で示される化合物の他の実施態様において、

Xは、CHであり；

Rは、 PO_3H_2 であり；

R1は、Hであり；

R2は、Hまたは C_{1-4} アルキルである；R3は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり；およびR4およびR5は互いに独立して、Hである；またはR4およびR5は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって、3～6員のシクロアルキル基を形成する。

【0246】

式(XIX)で示される化合物のさらに他の実施態様において、

Xは、CHであり；

Rは、Hであり；

R1は、Hであり；

R2は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり；R3は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり；R4およびR5は互いに独立して、Hである；またはR4およびR5は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって、3～6員のシクロアルキル基を形成する。

【0247】

式(XIX)で示される化合物のさらに他の実施態様において、

Xは、Nであり；

Rは、 PO_3H_2 であり；

R1は、Hであり；

R2は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり；

R3は、Hであり；および

R4およびR5は互いに独立して、Hである；またはR4およびR5は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって、3～6員のシクロアルキル基を形成する。

【0248】

式(XIX)で示される化合物のさらに他の実施態様において、

Xは、Nであり；

Rは、 PO_3H_2 であり；

R1は、Hであり；

R2は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり；

R3は、Hであり；および

R4およびR5は互いに独立して、Hまたは C_{1-4} アルキルである。

【0249】

いくつかの実施態様において、PKC- θ の機能的活性を阻害する置換インドール誘導体として、式(XX)：

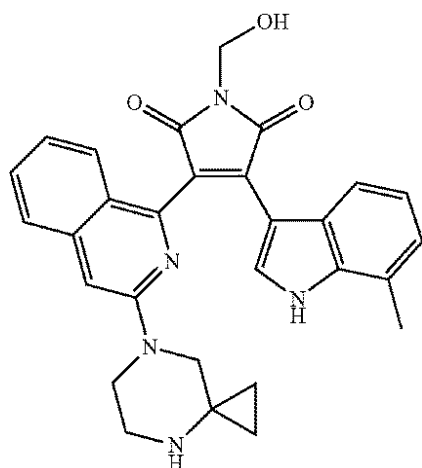
10

20

30

40

【化 4 0】



10

(XX)

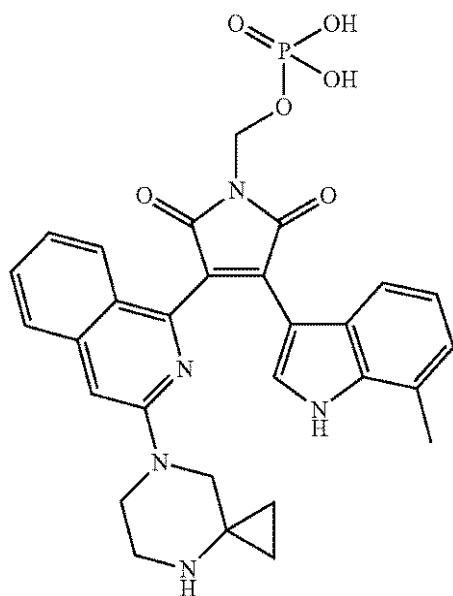
で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩が挙げられる。

【 0 2 5 0】

他の実施態様において、PKC- θ の機能的活性を阻害する置換インドール誘導体として、式(XXI)：

20

【化 4 1】



30

(XXI)

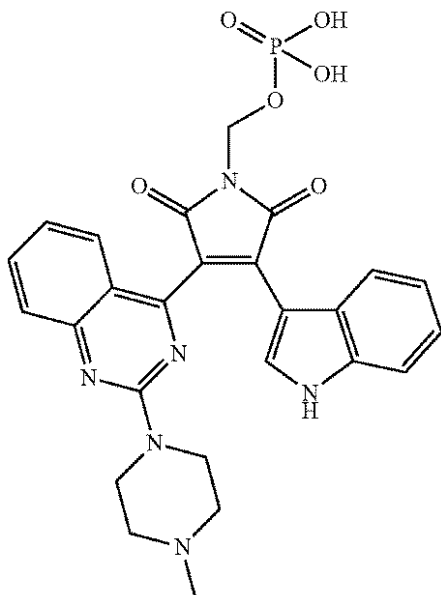
で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩、もしくは水和物が挙げられる。

40

【 0 2 5 1】

さらに他の実施態様において、PKC- θ の機能的活性を阻害する置換インドール誘導体として、式(XXII)：

【化 4 2】



10

(XXII)

で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩が挙げられる。

20

【0252】

式(I)で示される化合物の代表例として、以下の化合物が挙げられる：

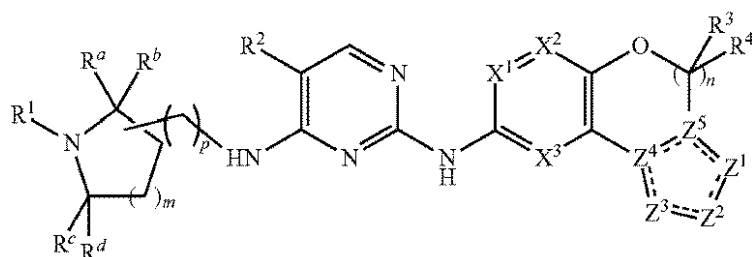
リン酸 モノ-[3-[3-(4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イル)-イソキノリン-1-イル]-4-(7-メチル-1H-インドール-3-イル)-2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-ピロール-1-イルメチル]エステル・一水和物；3-[3-(4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イル)-イソキノリン-1-イル]-1-ヒドロキシメチル-4-(-7-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンまたはその医薬的に許容しうる塩；およびリン酸 モノ-{3-(1H-インドール-3-イル)-4-[2-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-キナゾリン-4-イル]-2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-ピロール-1-イルメチル}エステルまたはその医薬的に許容しうる塩。

【0253】

30

他の実施態様において、小分子PKC- θ 阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるZhaoらの米国特許出願公開公報No. 2013/0143875に記載のピリミジンジアミン誘導体から選ばれる。このタイプの代表的な誘導体として式(XXIII)：

【化 4 3】



40

(XXIII)

[式中、

R^1 は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、 $-C(O)OR^{1a}$ 、 $-S(O)R^{1b}$ 、および $-S(O)_2R^{1c}$ から選ばれる；ここで、 R^{1a} 、 R^{1b} 、および R^{1c} のそれぞれは独立して、水素、アルキルまたはフェニル-アルキルである；

R^a 、 R^b 、 R^c および R^d は独立して、水素およびアルキルから選ばれる；

m は、1～5の整数である；

p は、0～6の整数である；

50

R^2 は、アシルオキシ、ヒドロキシ、チオール、アシル、アルキル、アルコキシ、置換アルキル、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アシルアミノ、アジド、カルボキシル、カルボキシルアルキル、シアノ、ハロゲン、ニトロ、アミノアシルオキシ、オキシアシルアミノ、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ 置換アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アリール、 $-SO_2-$ ヘテロアリール、およびトリハロメチルから選ばれる；

X^1 、 X^2 、および X^3 は、 CR^5 であるか、または X^1 、 X^2 、および X^3 のうちの1つは、Nであり、残りは、 CR^5 である；

R^5 は、水素、ハロゲン、アルキルおよび置換アルキルから選ばれる；

R^3 および R^4 は出現ごとに独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアミノアシル、アジド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、オキソ、チオケト、カルボキシル、カルボキシルアルキル、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ 置換アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アリールおよび $-SO_2-$ ヘテロアリールから選ばれる；または R^3 および R^4 は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって、炭素環式または複素環式4～8員環を形成する；

n は、1～3の整数である；

Z^1 、 Z^2 、および Z^3 は、 CR^6R^{6a} 、N、O、およびSから選ばれる；

Z^4 および Z^5 は、N、C、および CR^6 から選ばれる；

R^6 は、水素、ハロゲン、アルキルおよび置換アルキルから選ばれる；

R^{6a} は、水素、ハロゲン、アルキルおよび置換アルキルから選ばれるか、または価数要件を満たすために不在である；および

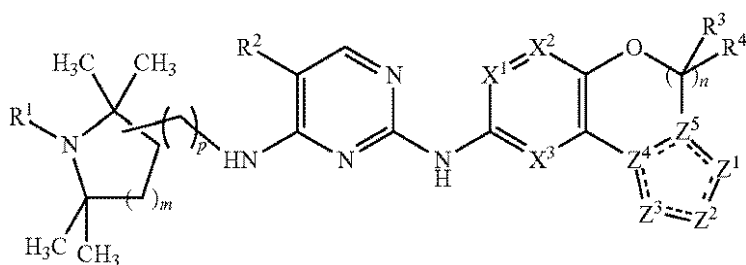
破線は、単結合または二重結合を表す]

で示される化合物またはその塩もしくは溶媒和物または立体異性体が挙げられる。

【0254】

式(XXIII)で示される化合物のいくつかの実施態様において、 R^a 、 R^b 、 R^c および R^d は、低級アルキル基を表す。このような化合物の実例となる例として、 R^a 、 R^b 、 R^c および R^d がメチル基であり、式(XXIV)：

【化44】



(XXIV)

で示される化合物が挙げられる。

【0255】

式(XXIII)で示される化合物の他の実施態様において、 X^1 、 X^2 、および X^3 はそれぞれ、C Hである。これらの化合物は、以下の式(XXV)：

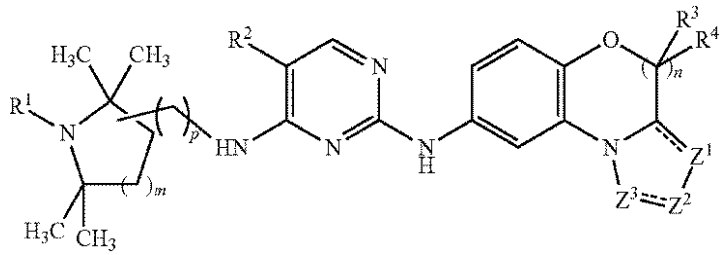
10

20

30

40

【化 4 5】



(XXV)

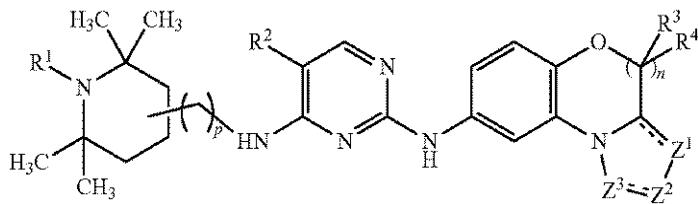
10

を有する。

【0 2 5 6】

式(XXIII)で示される化合物の他の実施態様において、 X^1 、 X^2 、および X^3 はそれぞれ、C
Hであり、 m は、2である。これらの化合物は、以下の式(XXVI)：

【化 4 6】



(XXVI)

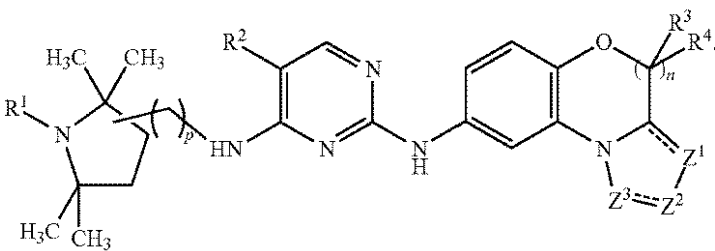
20

を有する。

【0 2 5 7】

式(XXIII)で示される化合物のさらに他の実施態様において、 X^1 、 X^2 、および X^3 はそれ
ぞれ、CHであり、 m は、1である。これらの化合物は、以下の式(XXVII)：

【化 4 7】



(XXVII)

30

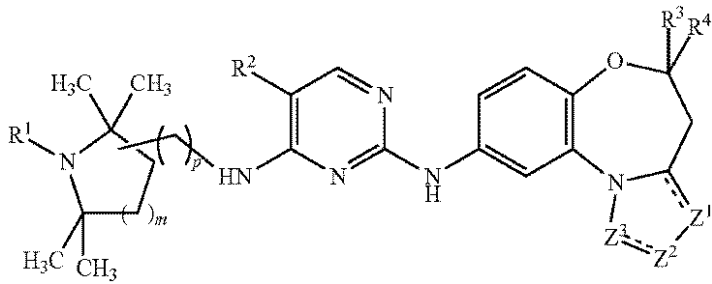
を有する。

【0 2 5 8】

式(XXIII)で示される化合物のさらに他の実施態様において、 X^1 、 X^2 、および X^3 はそれ
ぞれ、CHであり、 n は、2であり、および R^3 および R^4 の1つのセットは、水素である。これ
らの化合物は、以下の式(XXVIII)：

40

【化 4 8】



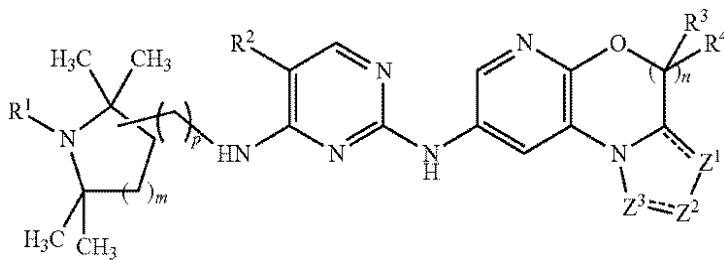
(XXVIII)

を有する。

【 0 2 5 9】

式(XXIII)で示される化合物のさらに他の実施態様において、X²は、Nであり、X¹およびX³はそれぞれ、CHである。これらの化合物は、以下の式(XXIX)：

【化 4 9】



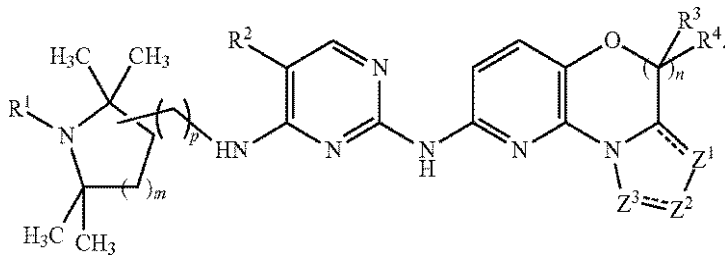
(XXIX)

を有する。

【 0 2 6 0】

式(XXIII)で示される化合物のさらに他の実施態様において、X³は、Nであり、X¹およびX²はそれぞれ、CHである。これらの化合物は、以下の式(XXX)：

【化 5 0】



(XXX)

を有する。

【 0 2 6 1】

式(XXIII)で示される化合物の他の実施態様において、Z⁴は、Cであり、Z⁵は、Nである。このような化合物は、以下の式(XXXI)：

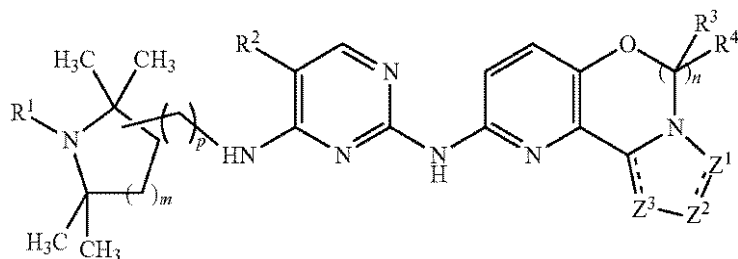
10

20

30

40

【化 5 1】



(XXXI)

10

を有する。

【0 2 6 2】

式(XXIII)の例示的化合物として、以下のものが挙げられる：N2-(4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(1,2,2,6,6-ペンタメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4H-ベンゾ[b]ピロロ[1,2-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(2,2,6,6-テトラ-メチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4H-ベンゾ[b]ピロロ[1,2-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(1,2,2,6,6-ペンタメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4,4-ジフルオロ-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4,4-ジフルオロ-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(1,2,2,6,6-ペンタメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4,4-ジメチル-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(1,2,2,6,6-ペンタメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4,4-ジメチル-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(5,5-ジメチル-5H-ベンゾ[e]テトラゾロ[1,5-c][1,3]オキサジン-9-イル)-5-フルオロ-N4-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(5,5-ジメチル-5H-ベンゾ[e]テトラゾロ[1,5-c][1,3]オキサジン-9-イル)-5-フルオロ-N4-(1,2,2,6,6-ペンタメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(8,9-ジヒドロスピロ[ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-4,1'-シクロブタン]-8-イル)-5-フルオロ-N4-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(8,9-ジヒドロスピロ[ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-4,1'-シクロブタン]-8-イル)-5-フルオロ-N4-(1,2,2,6,6-ペンタメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；5-フルオロ-N2-(4-メチル-8,9-ジヒドロ-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-N4-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；5-フルオロ-N2-(4-メチル-8,9-ジヒドロ-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-N4-(1,2,2,6,6-ペンタメチルピペリジン-4-イル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-((1,2-, 2,5,5-ペンタメチルピロリジン-3-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-((2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-3-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4,4-ジメチル-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-((1,2,2,5,5-ペンタメチルピロリジン-3-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン；N2-(4,4-ジメチル-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(((3S)-2,2,5-トリメチルピロリジン-3-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン；およびN2-(4,4-ジメチル-4H-ベンゾ[b]テトラゾロ[1,5-d][1,4]オキサジン-8-イル)-5-フルオロ-N4-(((3R)-2,2,5-トリメチル

20

30

40

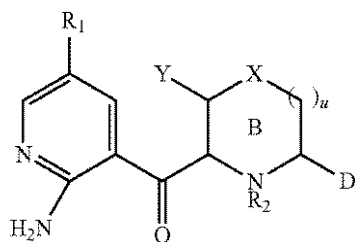
50

ピロリジン-3-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン、またはその塩もしくは溶媒和物または立体異性体。

【0263】

別の小分子PKC- θ 阻害剤化合物は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるMaltaisらの米国特許出願公開公報No. 2013/0137703に記載のアミノピリジン化合物から選ばれる。このタイプの非限定的化合物は、式(XXXII)：

【化52】



(XXXII)

[式中、

R_1 は、-H、C1-C3脂肪族、F、またはClである。環Bは、5または6員の単環式芳香族複素環である。Xは、-CH-、-S-、または-NR₂-である。R₂は、不在であるか、または-Hである。Yは、-Y1または-Q1である。Y1は、1つ以上のFで任意かつ独立して置換されたC1-10脂肪族基である。

Q1は、フェニルまたは窒素、酸素およびイオウから選ばれる0~3個のヘテロ原子を有する5~6員の単環式ヘテロアリール環である；およびQ1は、1つ以上のJ_aで任意かつ独立して置換される。

Dは、環Cまたは-Q-R₃である。

環Cは、1-2個の窒素原子を有する6~8員の非芳香族単環式環、または窒素および酸素から選ばれる1~3個のヘテロ原子を有する8~12員の非芳香族架橋二環式環系である；および環Cは、1つ以上のJ_bで任意かつ独立して置換される。

Qは、-NH-、または-O-である。

R₃は、-OH、または-NH₂で置換されたC1-10アルキルである；ここで、R₃中の3~6個のメチレン単位は、任意に、C3~C6員のシクロアルキル環を形成してもよい；およびR₃はさらに独立して、1つ以上のJ_eで任意かつ独立して置換される。

各J_aは独立して、FまたはC1-C6アルキルである。

J_bは、3個までのメチレン基が、任意に置換された-O-であるC1-C10アルキルである；および、ここで、C1-C10アルキルは、1つ以上のJ_cで任意かつ独立して置換される；またはJ_bは、C3-C6シクロアルキル、またはC5-C6ヘテロアリールである；またはJ_bは、J_dで任意かつ独立して置換されるフェニルである；または同じ炭素原子上の2つのJ_bは、=OまたはスピロC3-C6シクロアルキルを形成する。

各J_cは独立して、F、-OH、またはC3-C6シクロアルキルである。

各J_dは独立して、FまたはClである。

各J_eは独立して、フェニル、窒素、酸素、およびイオウから選ばれる1~3個のヘテロ原子を有する5~6員の単環式芳香族または非芳香族環であるか、または同じ炭素原子上の2つのJ_eは、スピロC3-C6シクロアルキルを形成する。

uは、0または1である。]

で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩である。

【0264】

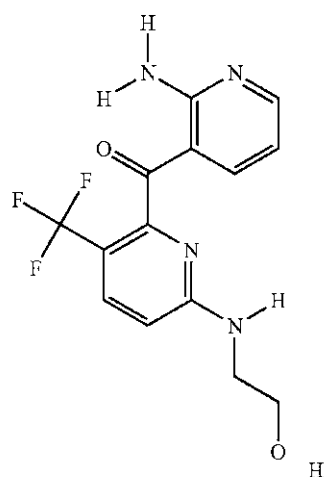
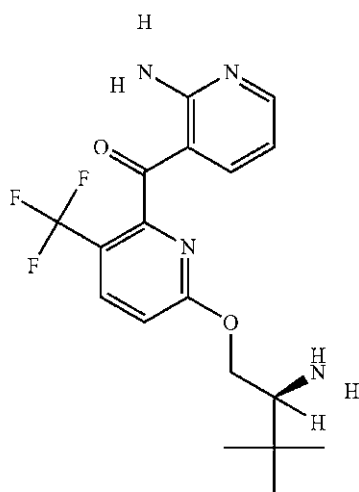
いくつかの実施態様において、環Bは、ピリジルである；環Cは、ピペリジニル(piperidinyl)、ピペリジニル(piperizinyl)、ジアゼパニル、トリアゼパニル、アゾカニル、ジアゾカニル、トリアゾカニル、インドリル、インダゾリル、またはジアザビシクロオクチルから選ばれる；および環Cは、1つ以上のJ_bで任意かつ独立して置換され、可変基の残り

は、上述のとおりである。

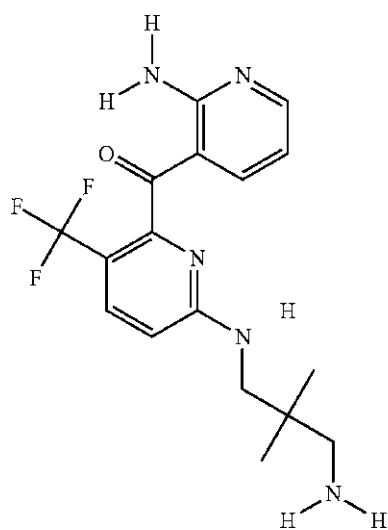
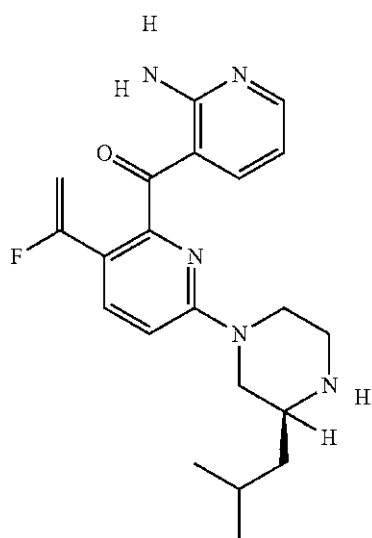
【0265】

式(XXXII)で示される化合物の代表的化合物として、以下のものが挙げられる：

【化53】



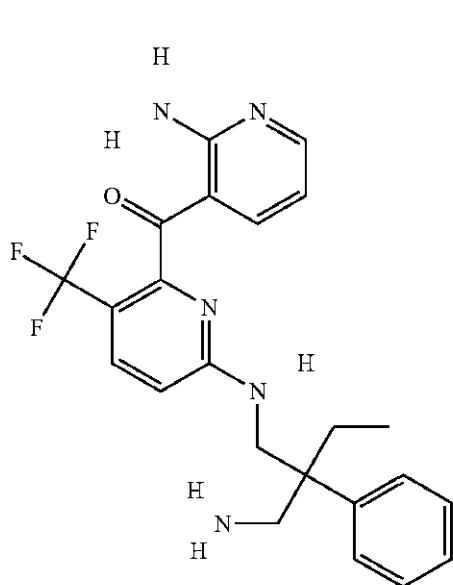
10



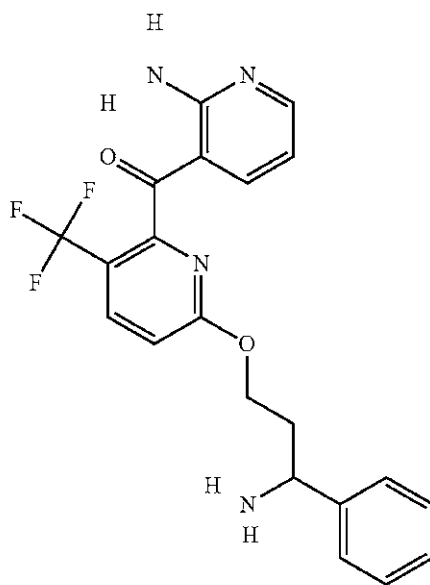
20

30

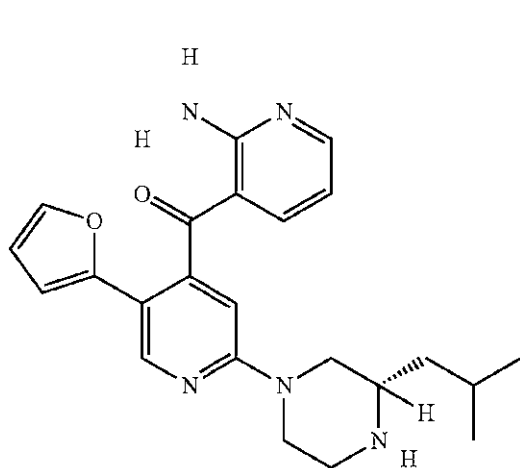
【化 5 4】



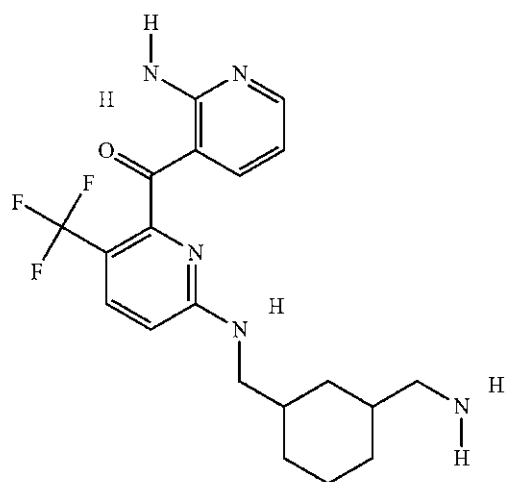
10



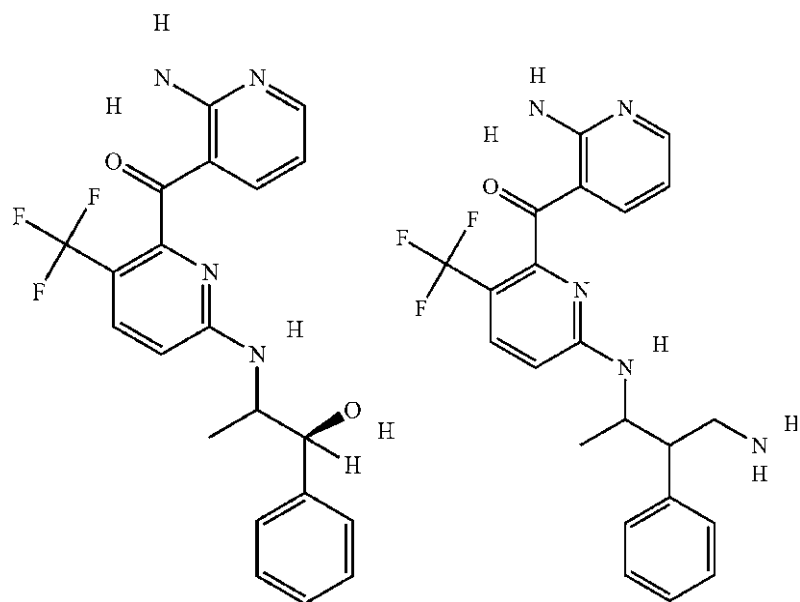
20



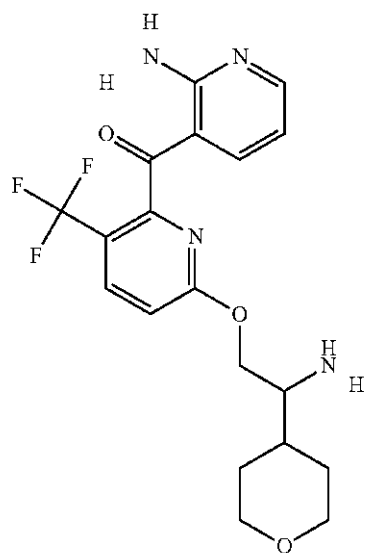
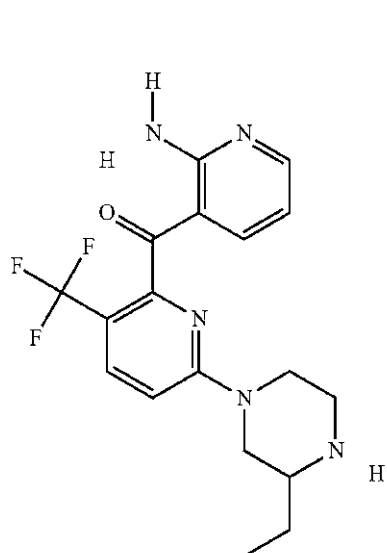
30



【化 5 5】

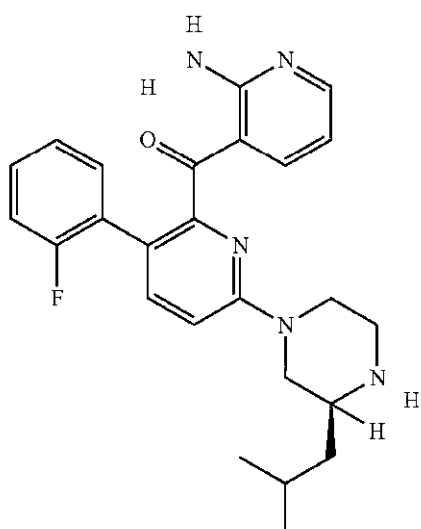
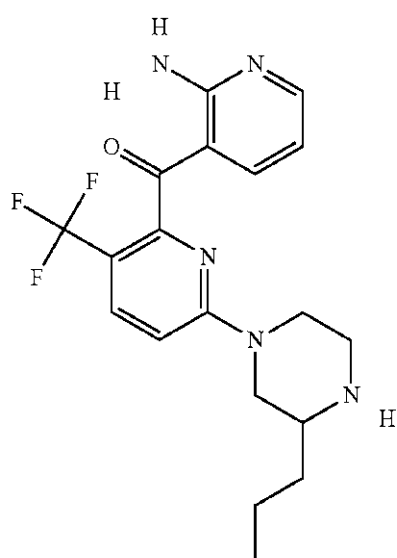


【化 5 6】



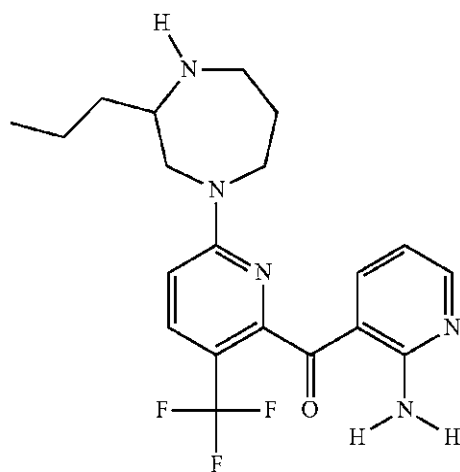
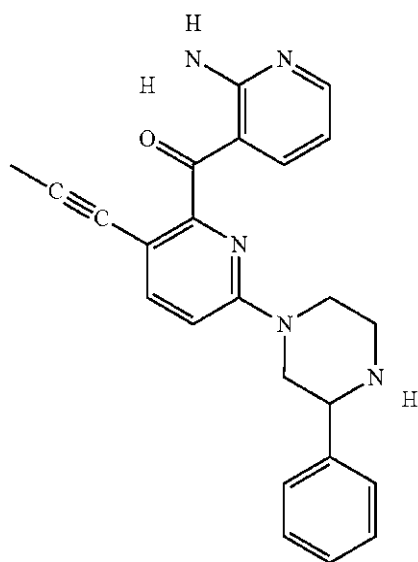
10

20

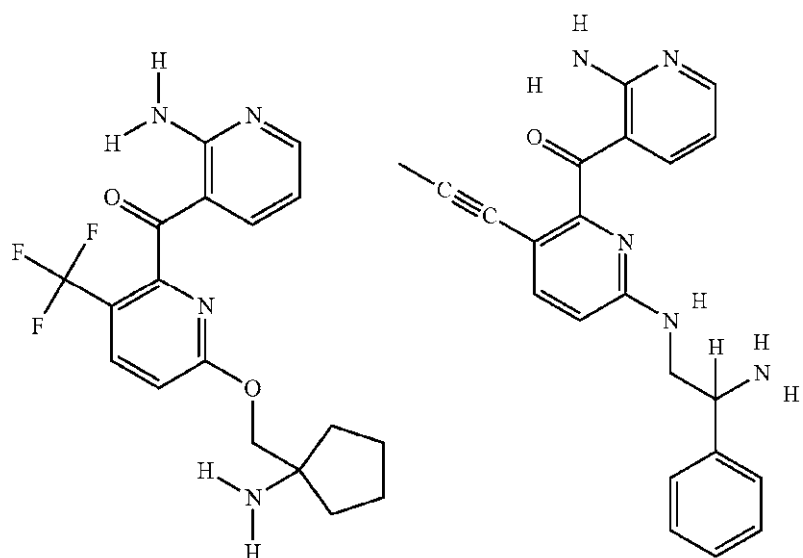


30

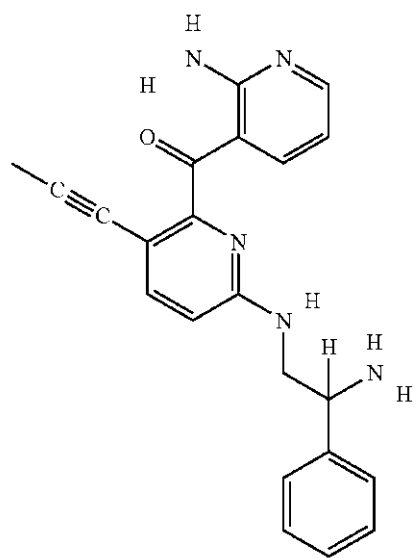
【化 5 7】



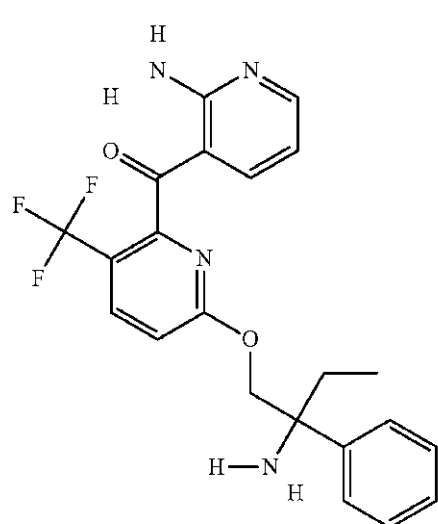
【化 5 8】



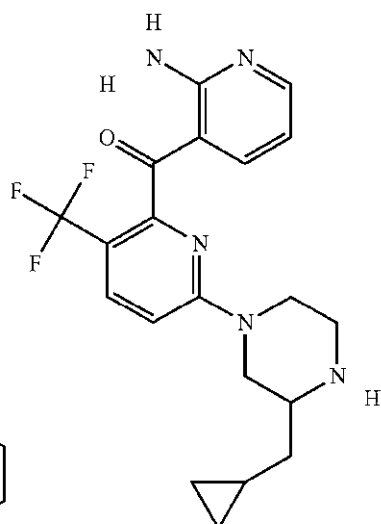
10



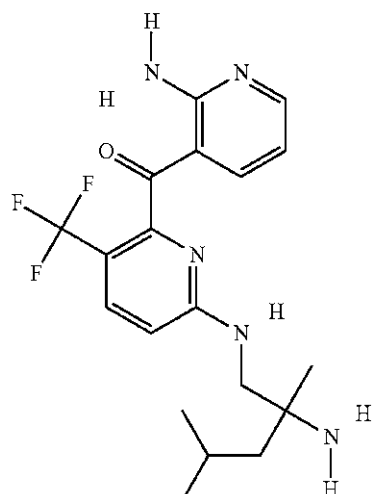
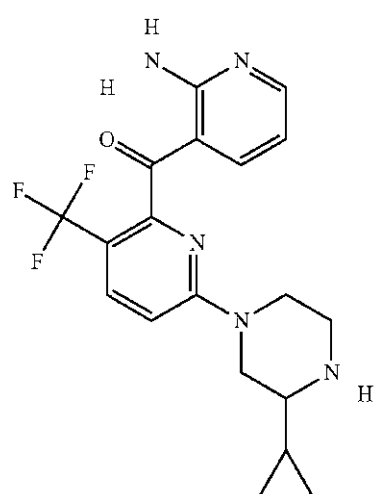
20



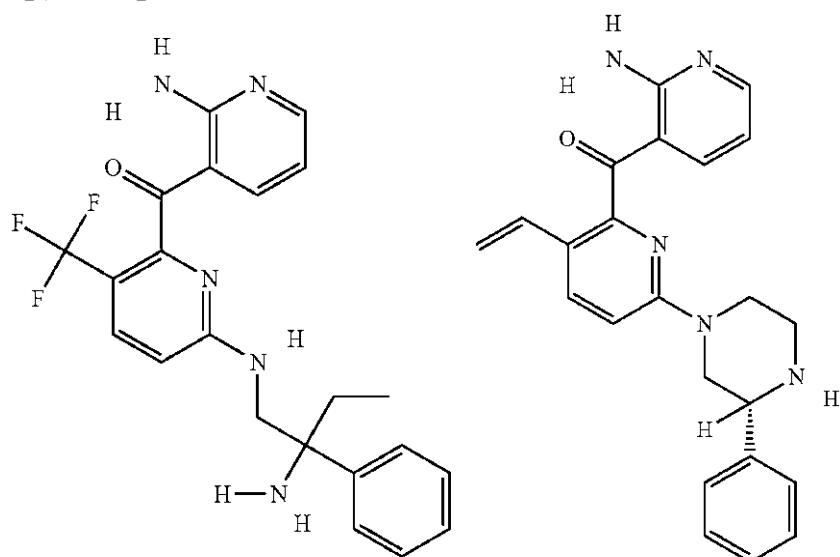
30



40



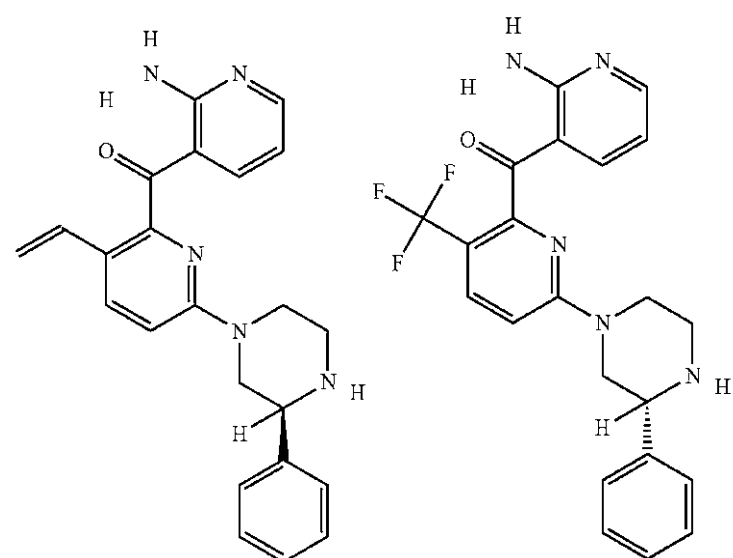
【化 5 9】



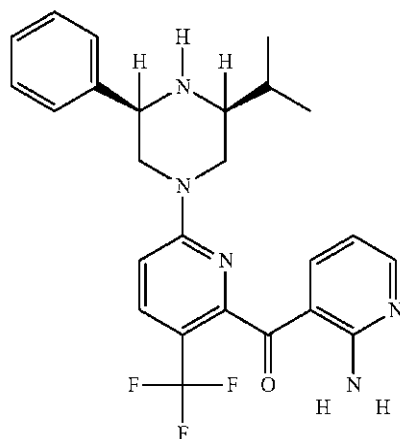
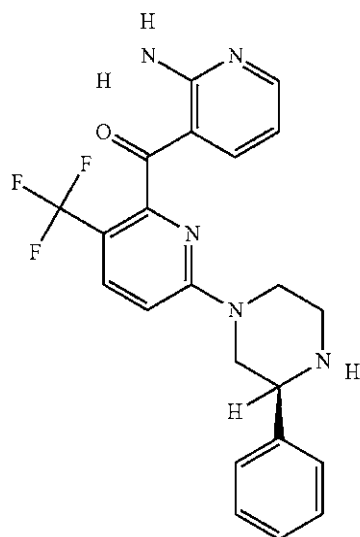
10

20

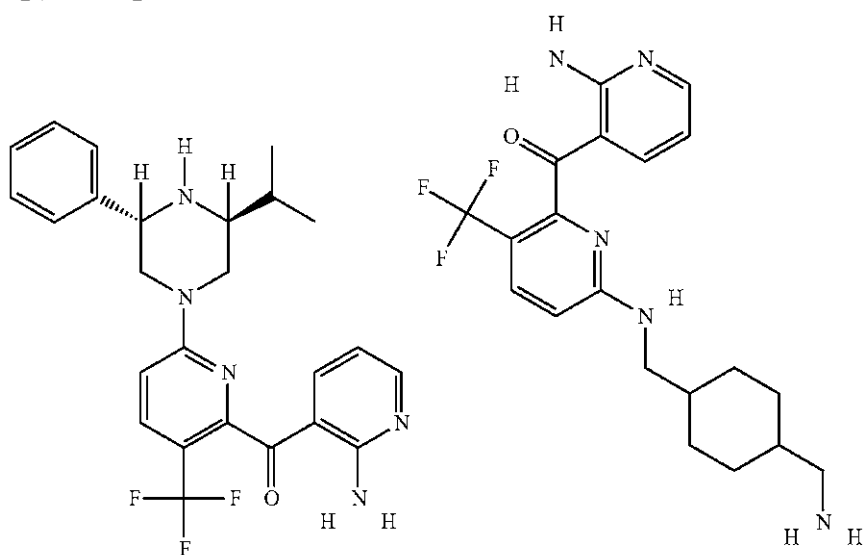
30



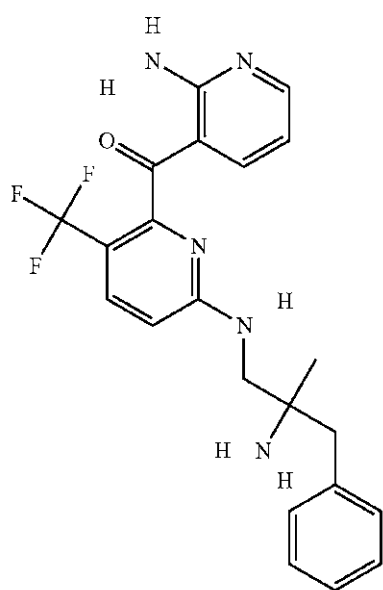
【化 6 0】



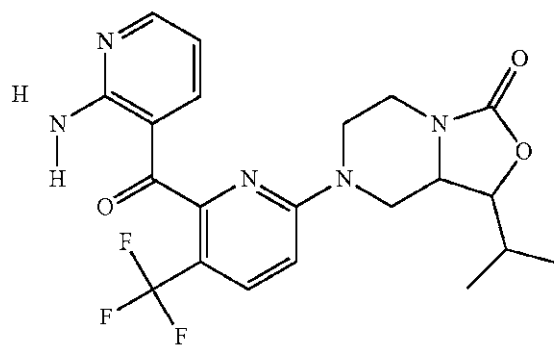
【化 6 1】



10

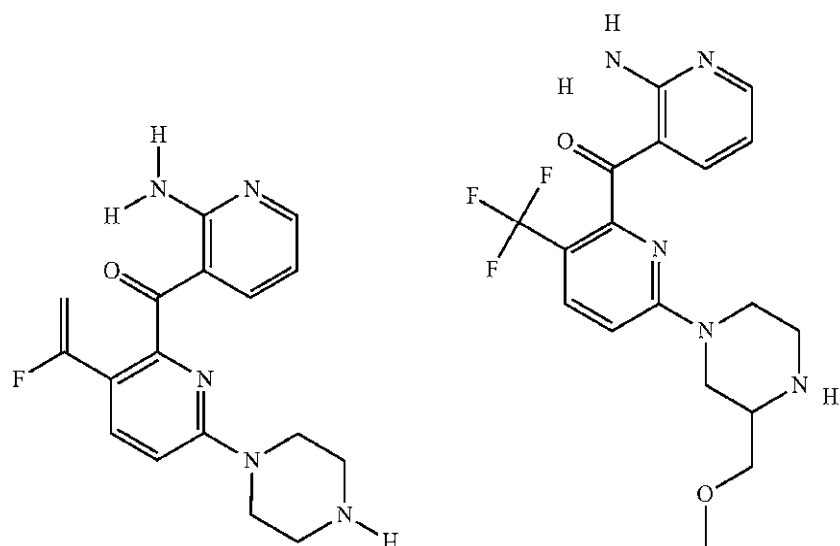


20

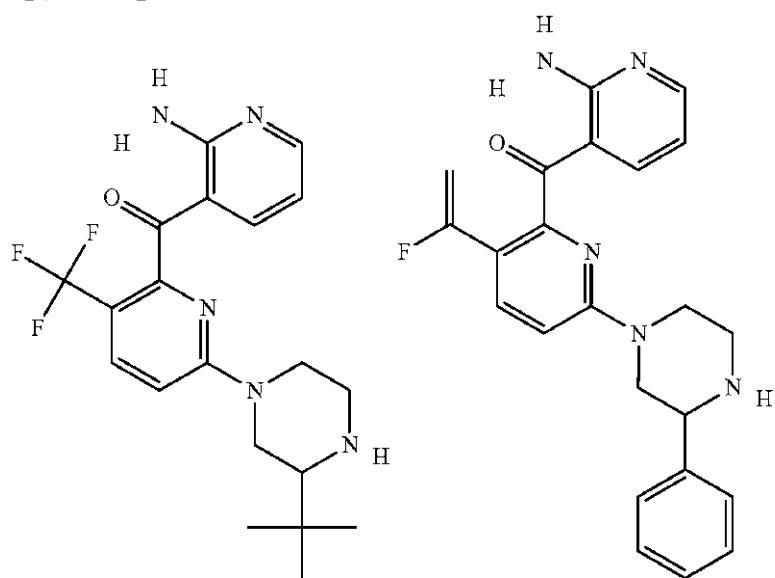


30

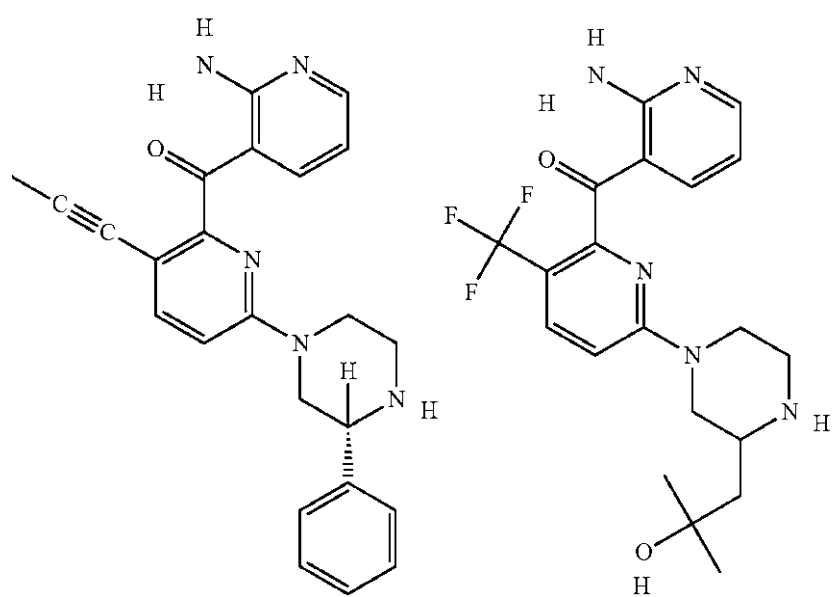
【化 6 2】



【化 6 3】



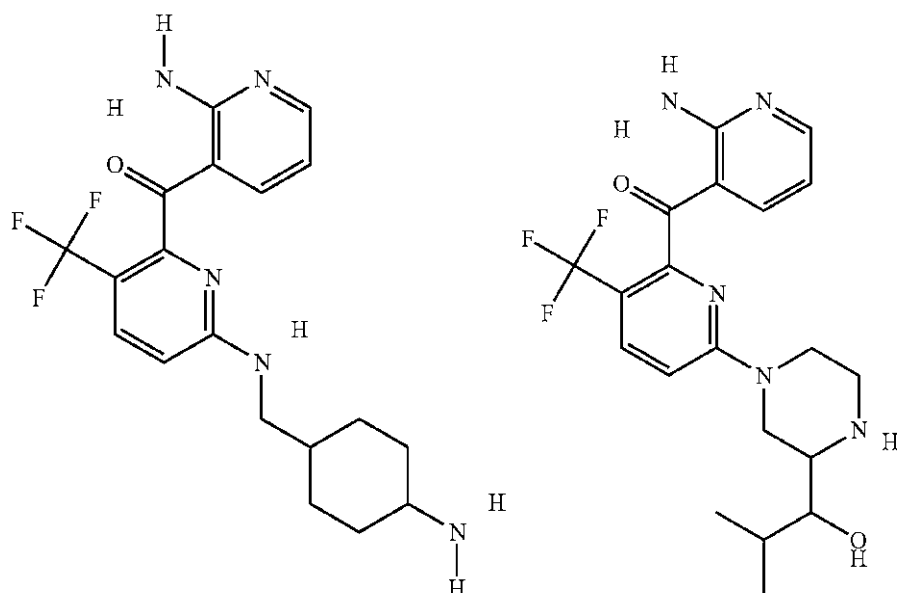
10



20

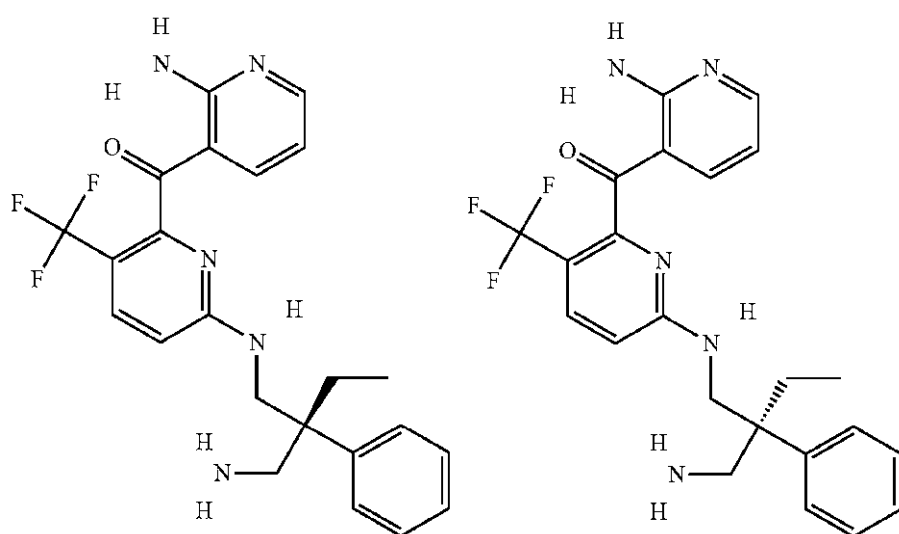
30

【化 6 4】



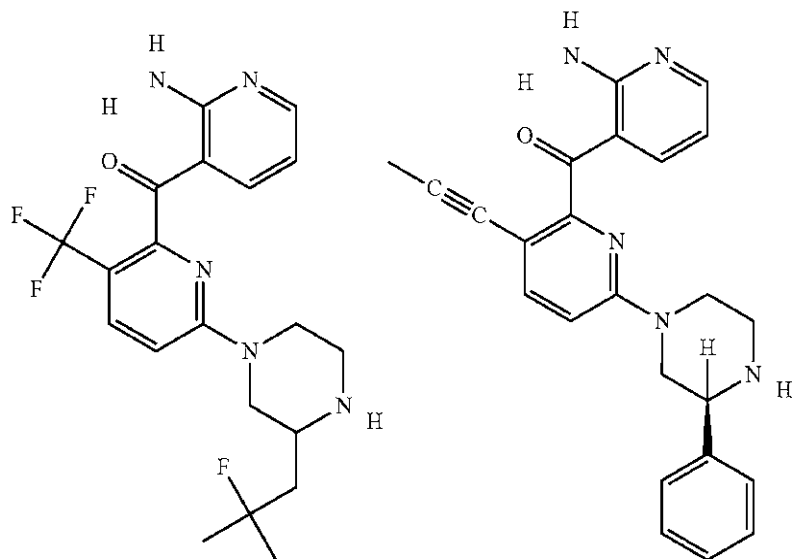
10

20

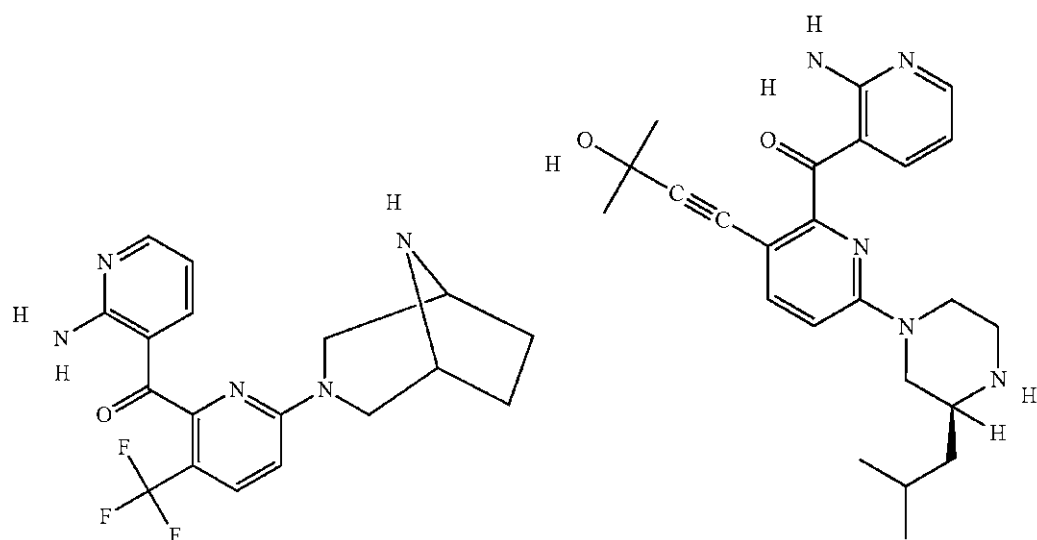


30

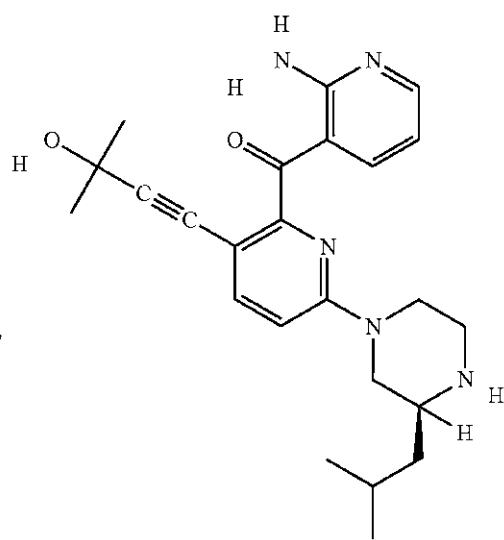
【化 6 5】



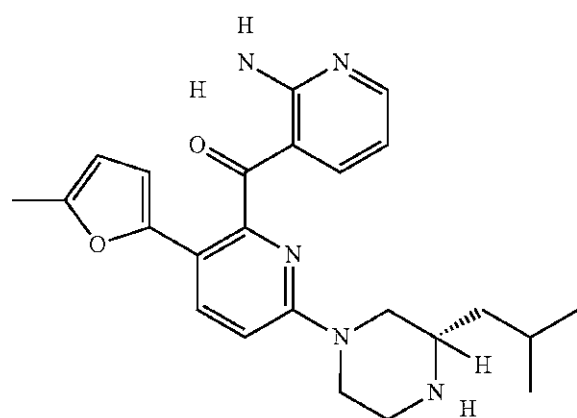
【化 6 6】



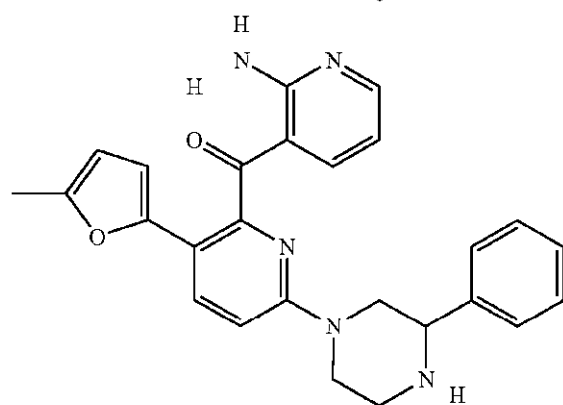
10



20

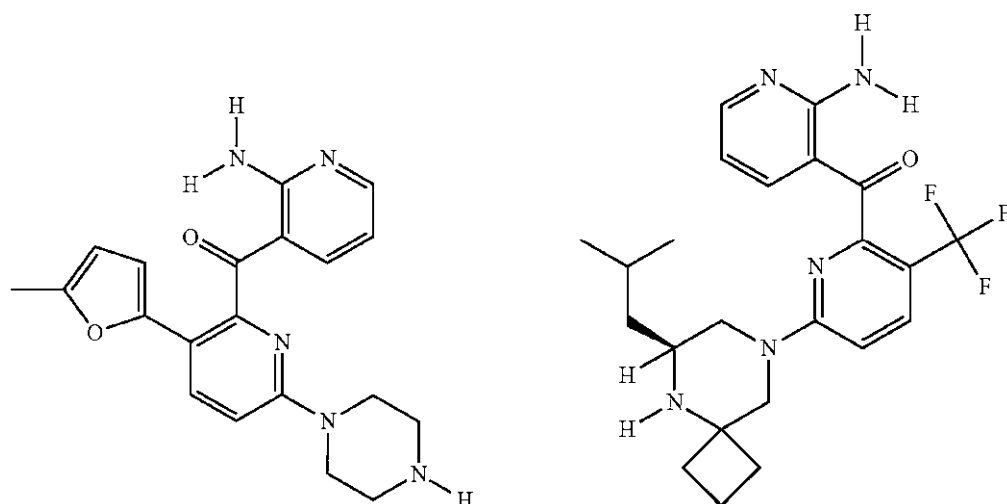


30



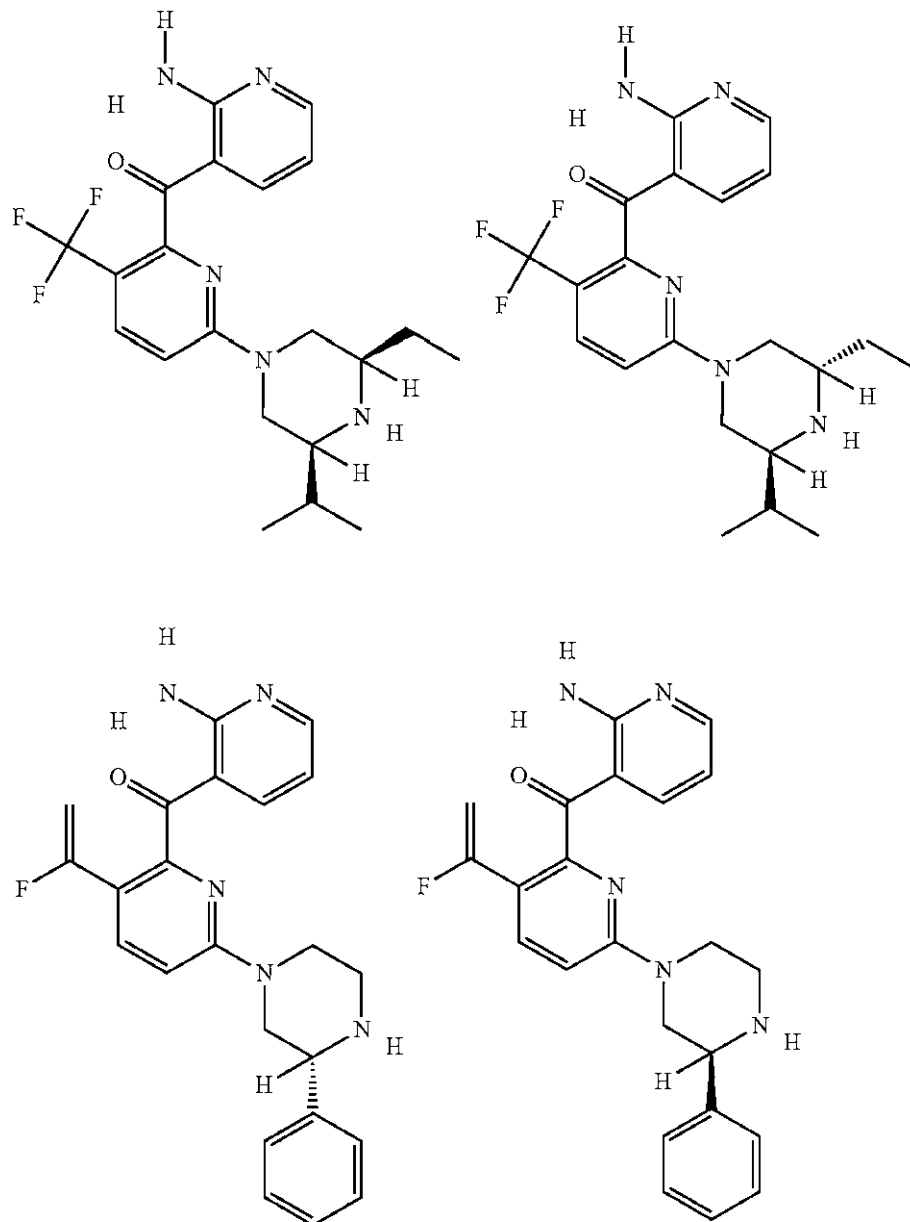
40

【化 6 7】



10

【化 6 8】



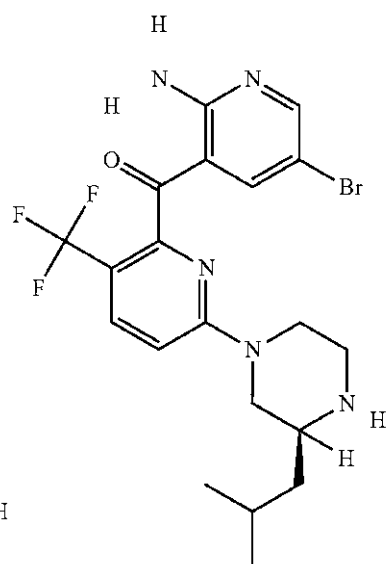
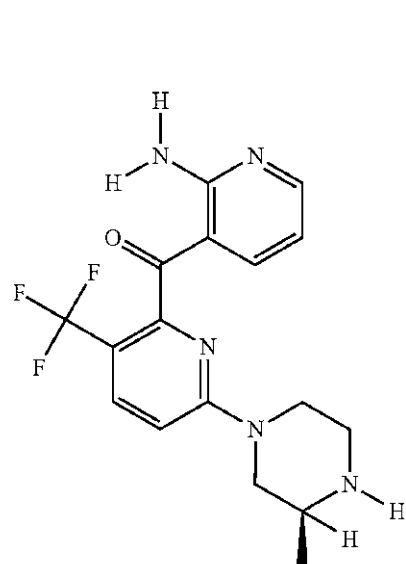
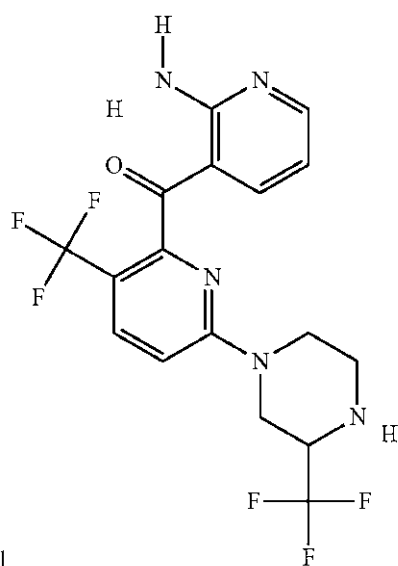
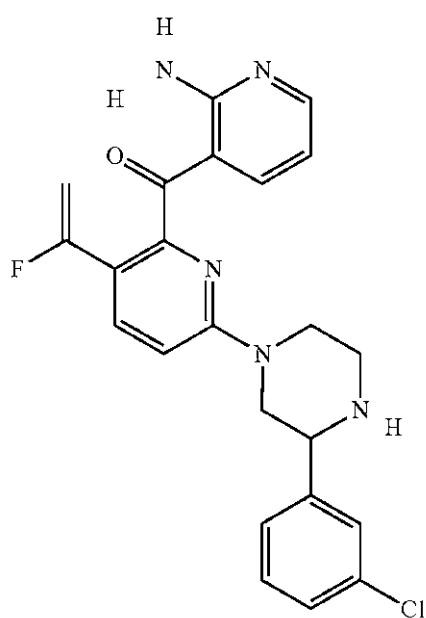
20

30

40

50

【化 6 9】

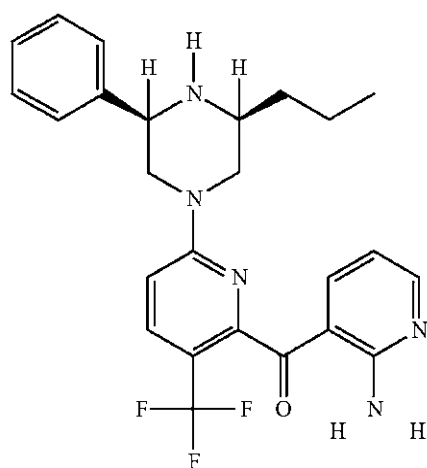
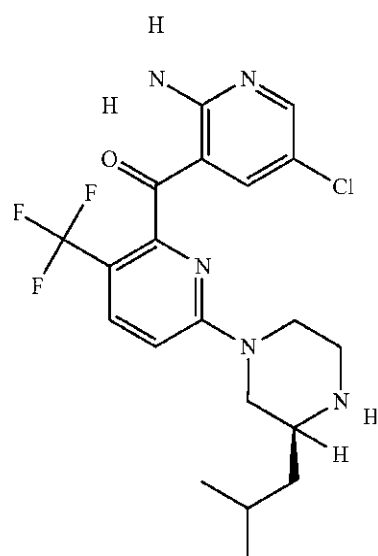


10

20

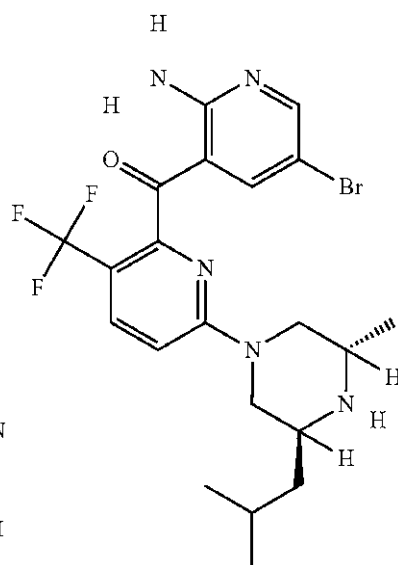
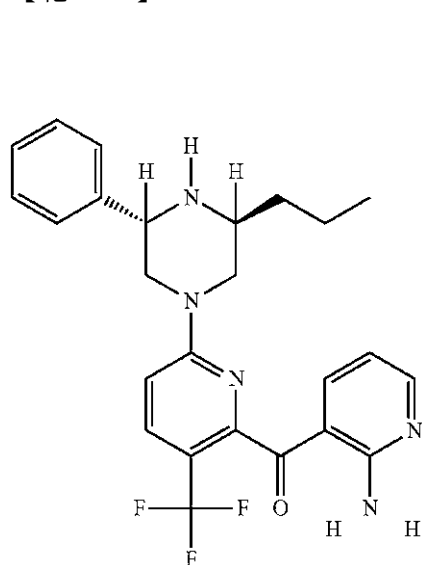
30

【化 7 0】



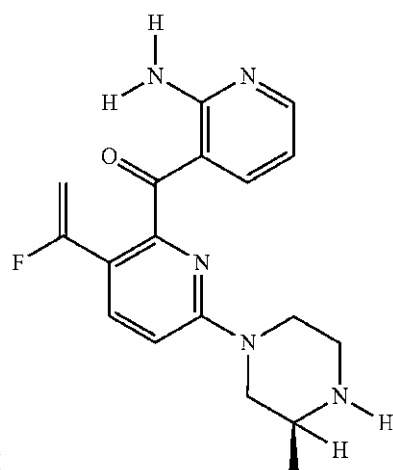
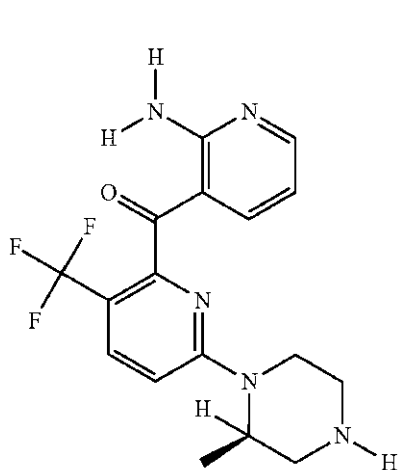
10

【化 7 1】



20

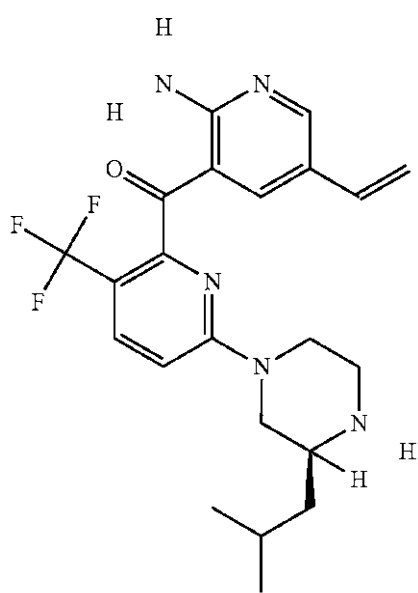
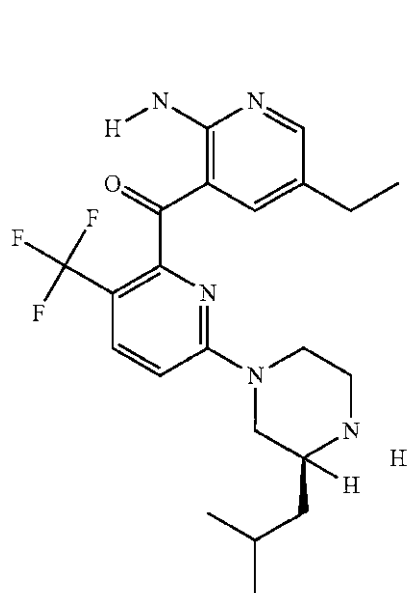
30



40

50

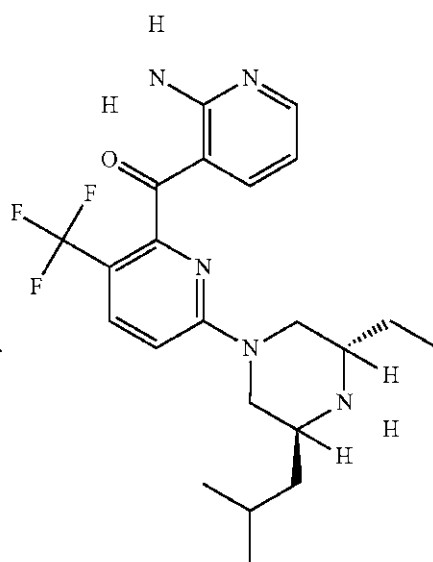
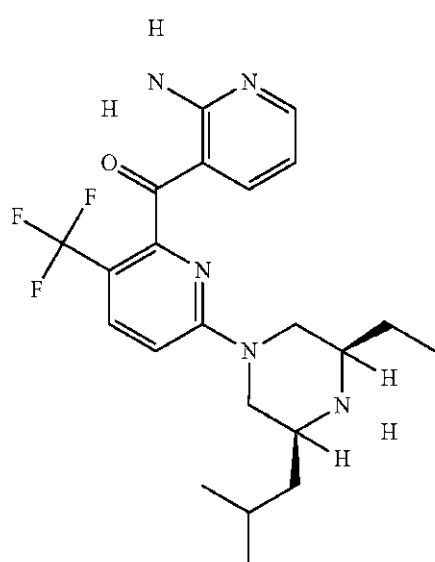
【化 7 2】



10

20

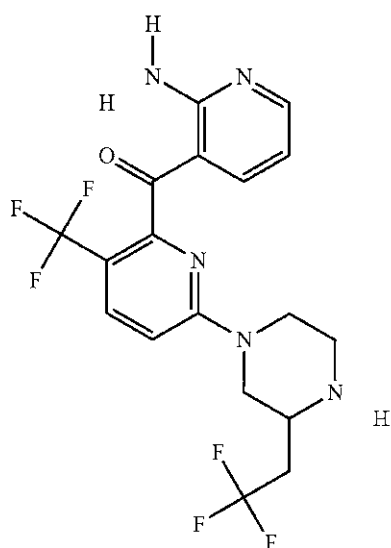
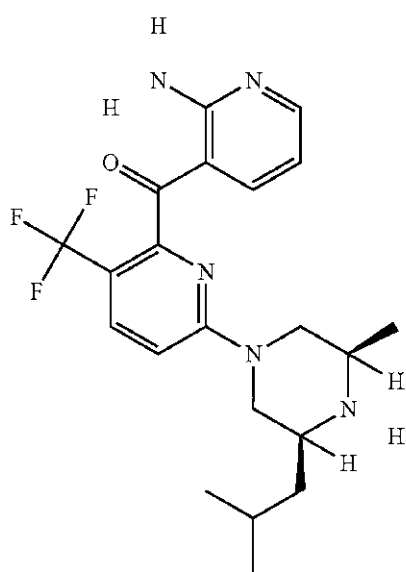
【化 7 3】



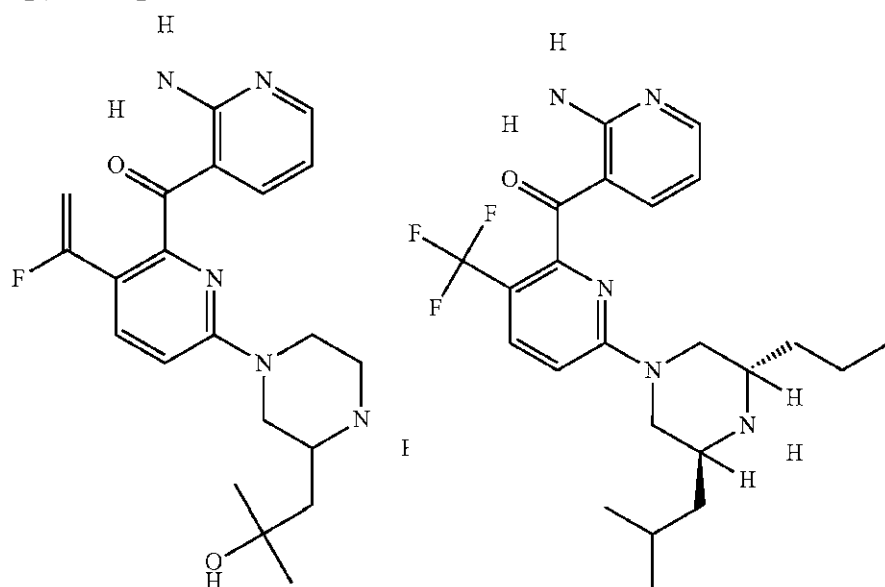
10

20

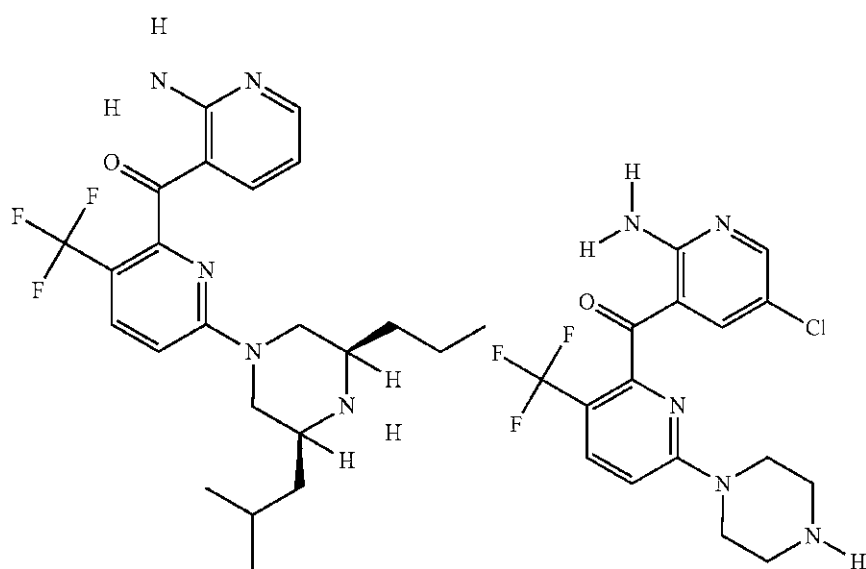
30



【化 7 4】



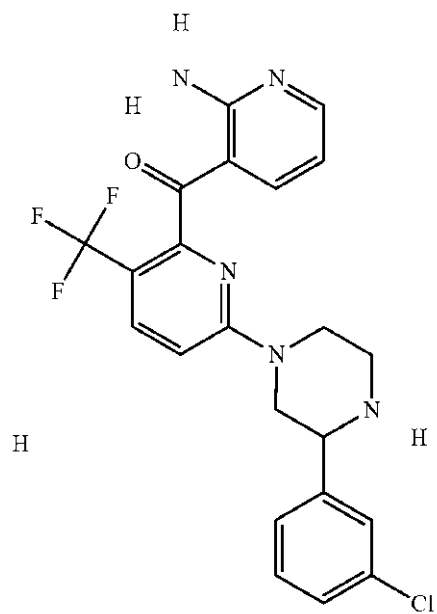
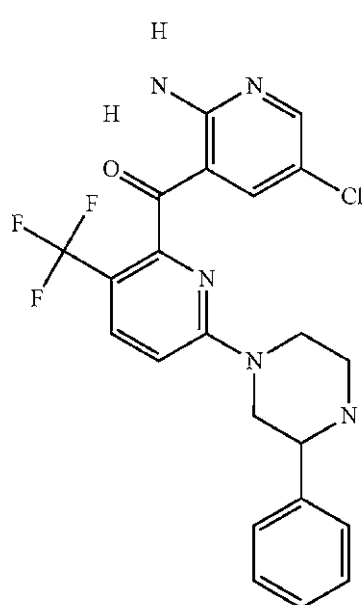
10



20

30

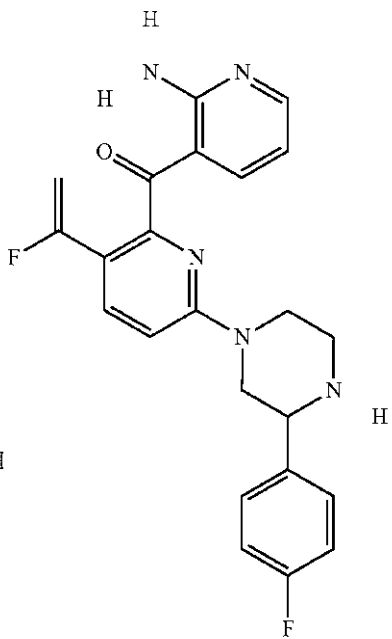
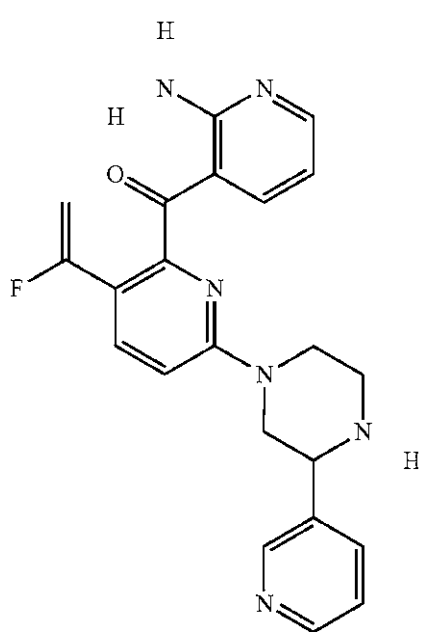
【化 7 5】



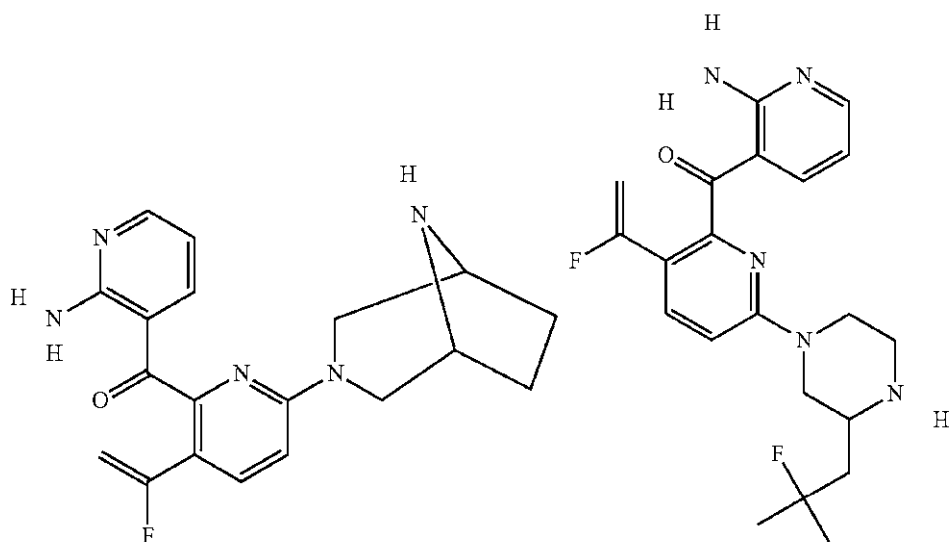
10

20

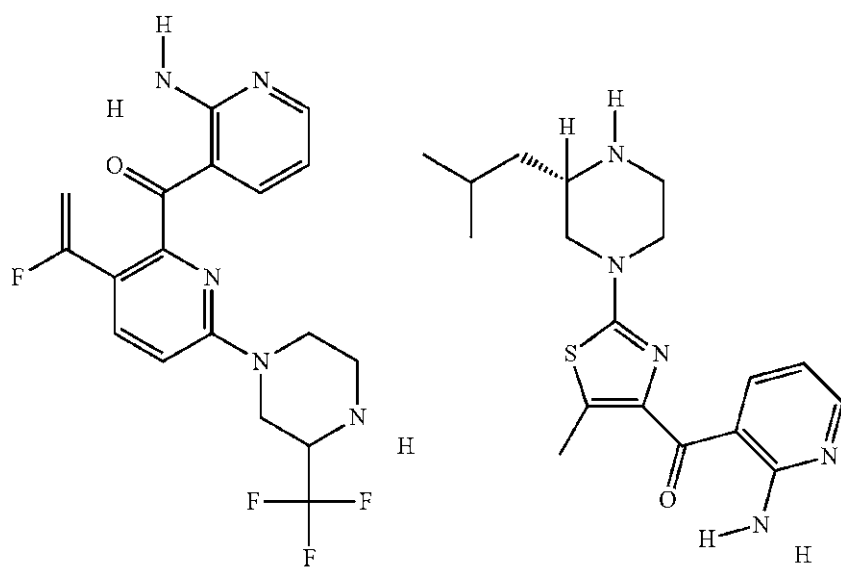
30



10

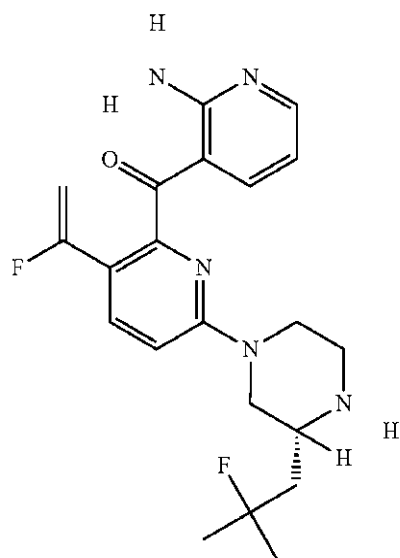
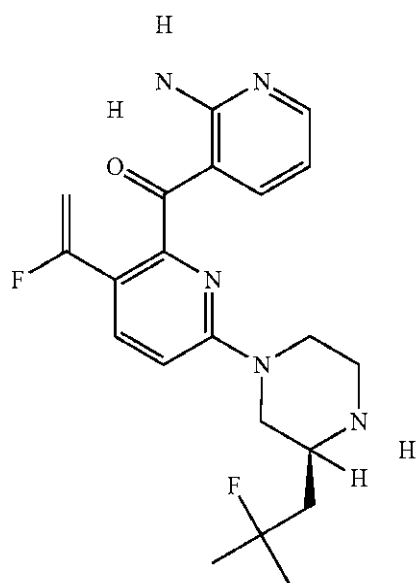


20

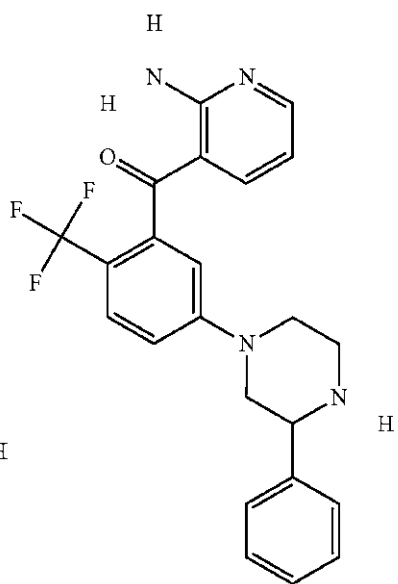
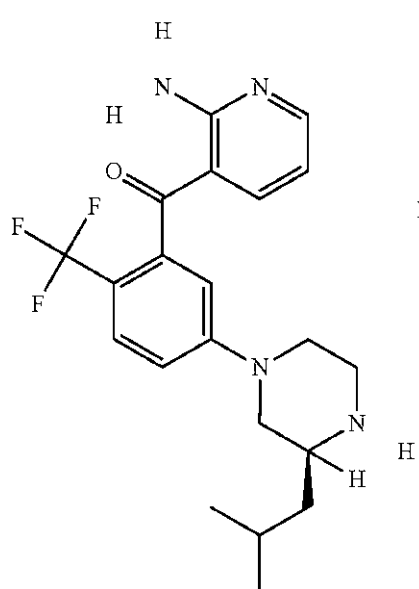


30

【化 7 7】



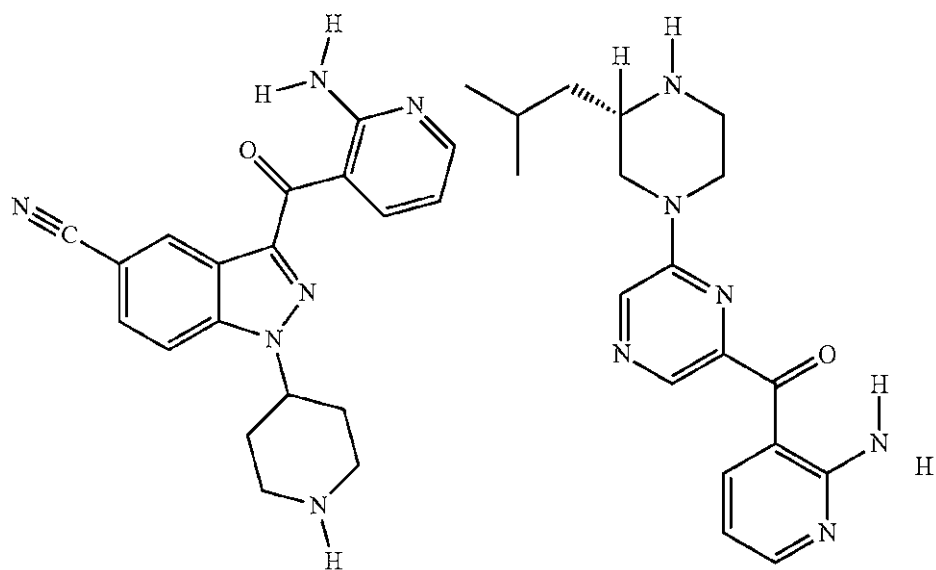
【化 7 8】



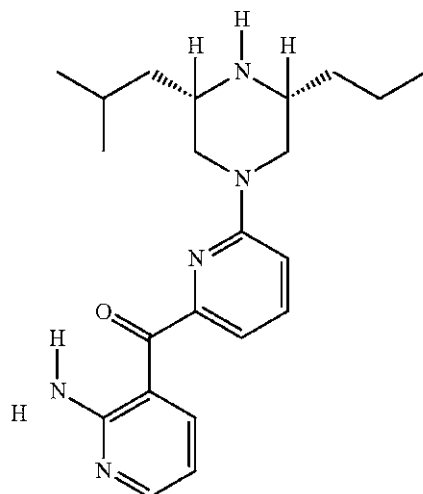
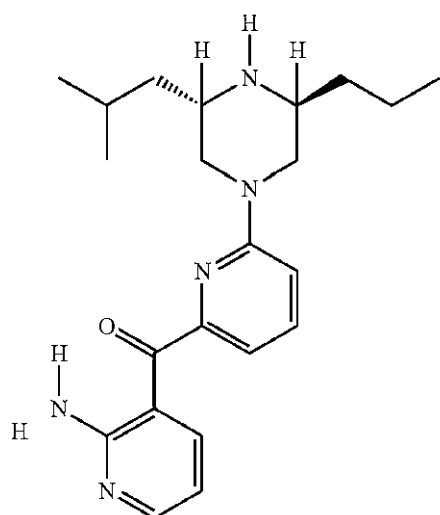
10

20

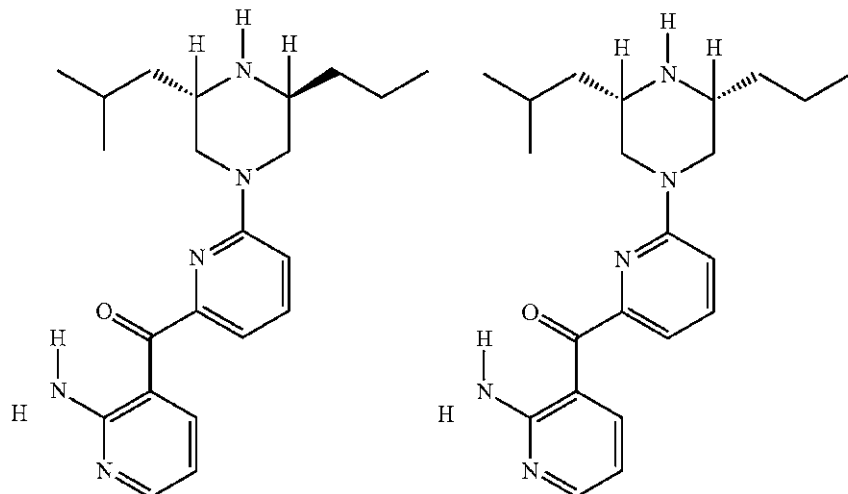
30



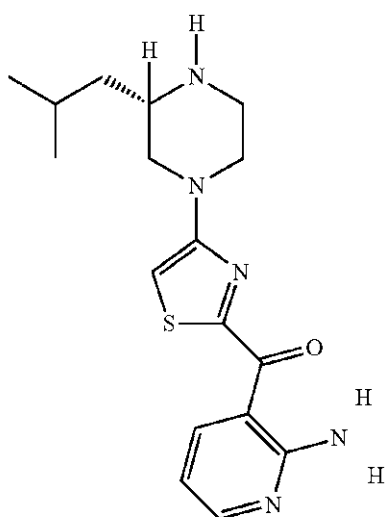
【化 7 9】



【化 8 0】



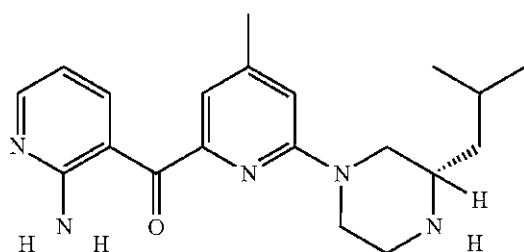
10



20

30

および



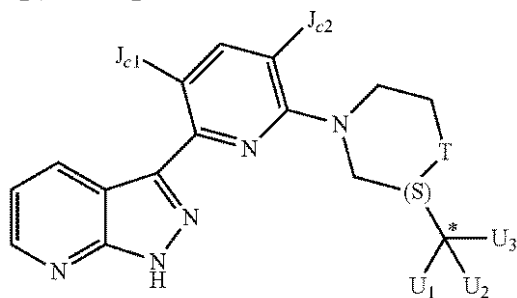
40

。

【 0 2 6 6 】

本発明はまた、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用される、Jimenezら 米国特許出願公開公報No. 2013/0053395に記載のピラゾロピリジン化合物を企図する。このタイプの実例となる誘導体は、式(XXXIII)：

【化 8 1】



(XXXIII)

〔式中、

Tは、-NH-または不在である。

各 J_{c1} および J_{c2} は独立して、-CN、-F、-Cl、-OR、-CH₂OR、または-CF₃である。

各 U_1 、 U_2 、および U_3 は独立して、-H、Z、または J_b であり、ここで、 U_1 、 U_2 、および U_3 のうちの1つのみが、-Hである；または U_1 、 U_2 、および U_3 のうちの2つが一緒になって、1つ以上の J_e で任意かつ独立して置換される、0～1個のヘテロ原子を有するC1-C6シクロアルキル環を形成する。

Zは、Y2-Q2である。

Y2は、不在であるか、または1つ以上の J_d で任意かつ独立して置換されるC₁₋₆アルキルである。

Q2は、不在であるか、または1つ以上の J_e で任意かつ独立して置換される、0～1個のヘテロ原子を有するC₃-C₈シクロアルキルであり、ここで、Y2およびQ2の両方が不在であることはない。

各 J_b は独立して、-F、-OR、-CN、-CF₃、-N(R)₂、-C(O)N(R)₂、1つ以上の J_a で任意かつ独立して置換されるC1-6アルキルである。

各 J_a は独立して、-F、-OR、-N(R)₂、または-C(O)N(R)₂である。各 J_d は独立して、-OR、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)₂またはFである。各 J_e は独立して、C₁-C₆アルキル、-OR、-N(R)₂、-CF₃、またはFである。各Rは、-HまたはC₁-C₆アルキルである。]

で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩である。

【0267】

いくつかの実施態様において、*で示される炭素にはアキラル中心がある。

【0268】

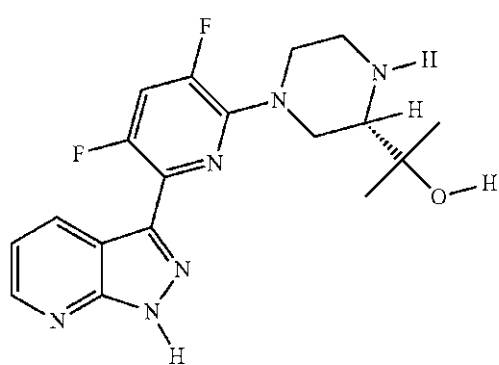
式(XXXIII)で示される化合物の非限定的例として、以下のものが挙げられる：

10

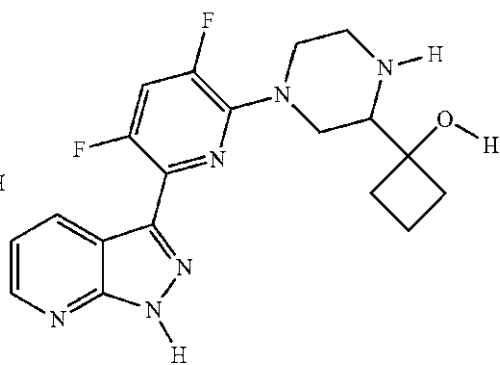
20

30

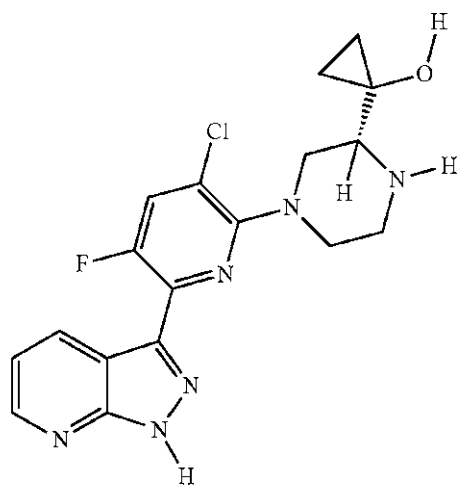
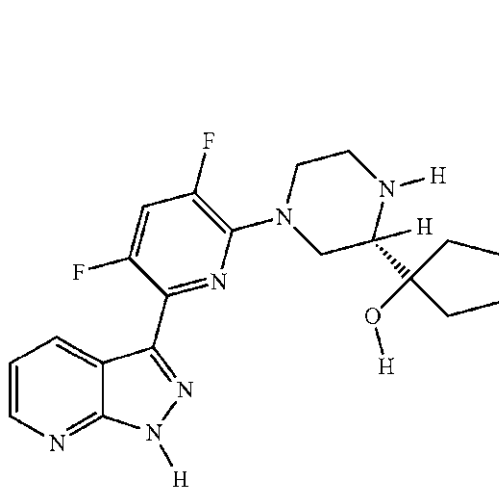
【化 8 2】



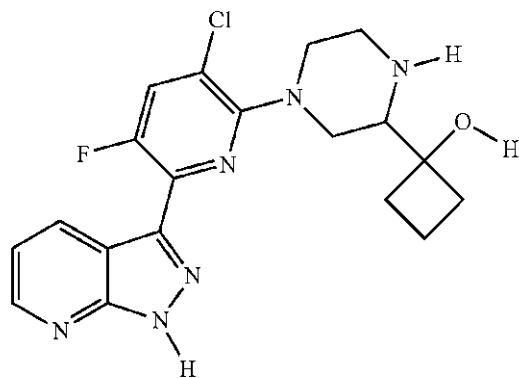
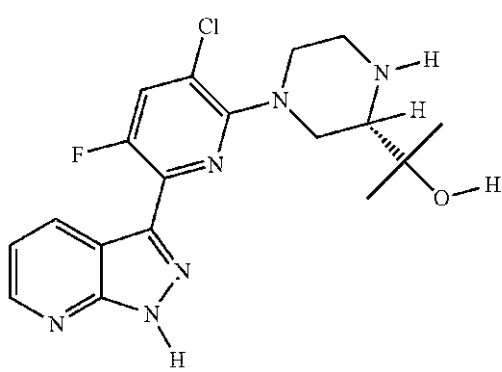
10



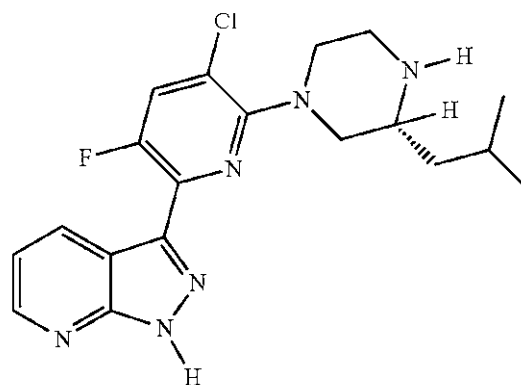
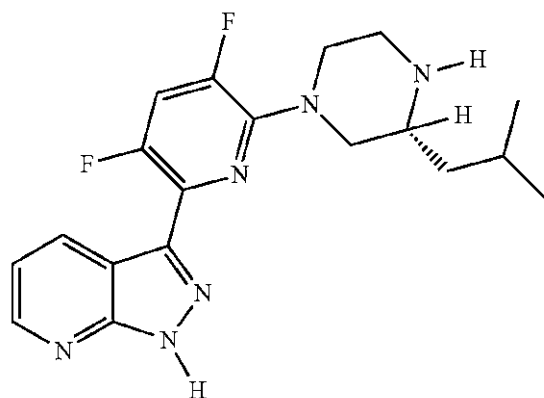
20



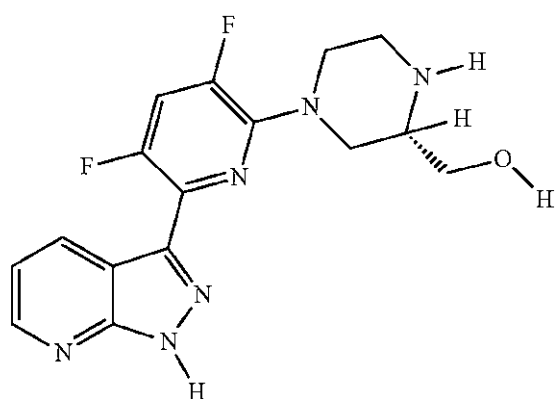
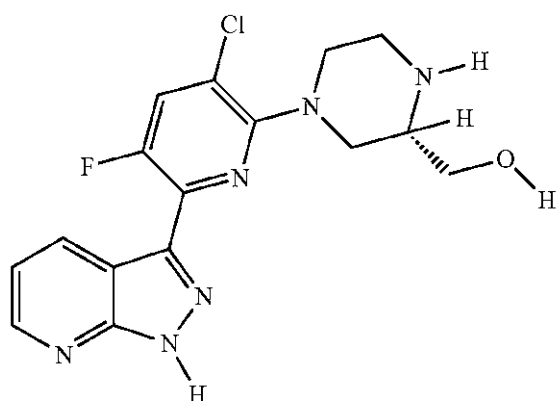
30



【化 8 3】

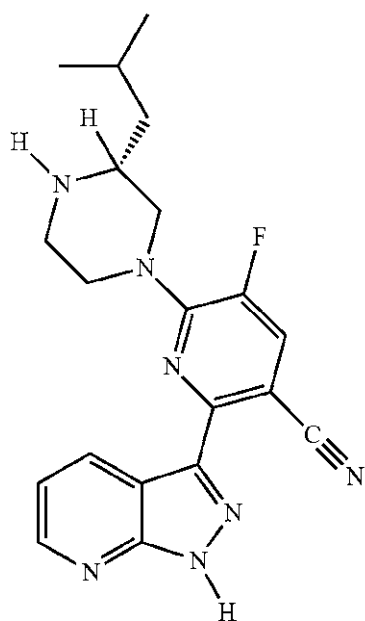


10



20

および



30

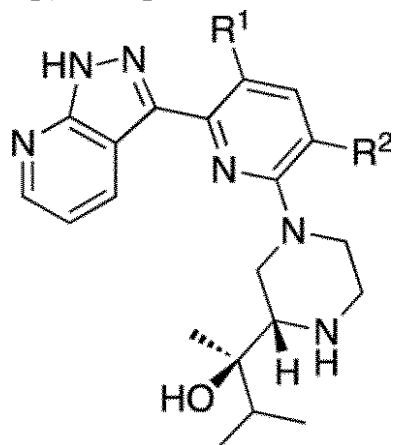
。

【0269】

別のピラゾロピリジンPKC- θ 阻害剤化合物は、その全体が参照することによって本明細書に援用されるJimenezら(2013、J. Med. Chem. 56 1799-180)に開示される。例示的化合物は、式(XXXIIIa)：

40

【化 8 4】



(XXXIIIa)

[式中、

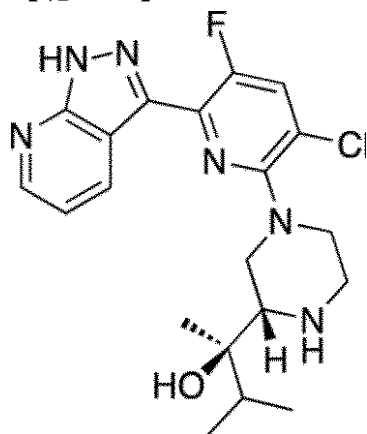
 R^1 は独立して、F、Clまたは CF_3 である；および R^2 は独立して、H、F、Cl、OH、CNまたは CH_2OH である]

で示される。

【0270】

特定の実施態様において、ピラゾロピリジン化合物は、式(XXXIIIb)：

【化 8 5】



(XXXIIIb)

で示される。

【0271】

この化合物は、Jimenezら (2013、J. Med. Chem. 56 1799-180)において化合物27と命名された(本明細書においてもC27と称する)。

【0272】

さらに他の実施態様において、小分子PKC- θ 阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるBrenchleyらの米国特許出願公開公報No. 2012/018453 4に記載の三環式ピラゾロピリジン化合物から選ばれる。このタイプの非限定的化合物は、式(XXXIV)：

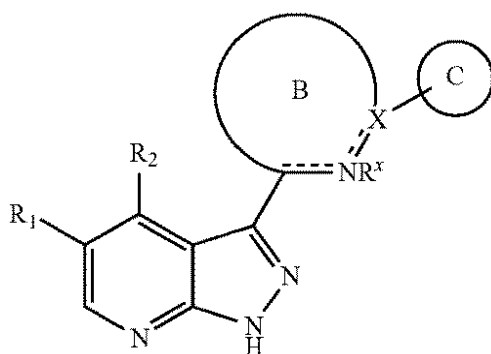
10

20

30

40

【化 8 6】



(XXXIV)

[式中、

R_1 は、-H、ハロゲン、-OR'、-N(R')₂、-C(O)OR'、-C(O)N(R')₂、-NR'C(O)R'、NR'C(O)OR'、-CN、-NO₂、1つ以上の J_a で任意かつ独立して置換されるC₁-C₁₀脂肪族基であるか、または1つ以上の J_b で任意かつ独立して置換されるC3-C8脂環式基である。

R_2 は、-H、ハロゲン、-CN、-NO₂、-OR'、-N(R')₂、-C(O)OR'、-C(O)N(R')₂、-NR'C(O)R'、-NR'C(O)OR'、1つ以上の J_a で任意かつ独立して置換されるC₁-C₁₀脂肪族基であるか、または1つ以上の J_b で任意かつ独立して置換されるC₃-C₈脂環式基である。

Xは、-C-または-N-である。

R^x は、不在であるか、または-Hである。

環Bは、芳香族または非芳香族環に任意に融合した5員の単環式芳香族複素環であり；および環Bは、1つのYで任意に置換され、および独立してさらに、1つ以上の J_c で任意かつ独立して置換される。

Yは、-Y1-Q1である。

Y1は、不在であるか、またはC₁₋₁₀脂肪族であり、ここで、Y1の3個までのメチレン単位は、G'で任意かつ独立して置換され、ここで、G'は、-O-、-C(O)-、-N(R')-、または-S(O)_p-であり；およびY1は、1つ以上の J_d で任意かつ独立して置換される。

Q1は、不在であるか、または窒素、酸素、およびイオウから独立して選ばれる0~3個のヘテロ原子を有するC₃₋₈員の飽和、部分飽和、または完全不飽和単環式環基であり；およびQ1は、1つ以上の J_b で任意かつ独立して置換される；ここで、Y1およびQ1の両方が不在であることはない。

環Cは、窒素、酸素、およびイオウから独立して選ばれる0~3個のヘテロ原子を有する3~8員の飽和、部分飽和、または完全不飽和単環式環であるか、または窒素、酸素、およびイオウから独立して選ばれる0~5個のヘテロ原子を有する8-12員の飽和、部分飽和、または完全不飽和二環式環系であり；および環Cは、1つのZで任意に置換され、および独立してさらに、1つ以上の J_b で任意かつ独立して置換される。

Zは、-Y2-Q2である。

Y2は、不在であるか、またはC₁₋₁₀脂肪族であり、ここで、Y2の3個までのメチレン単位は、G'で任意かつ独立して置換され、ここで、G'は、-O-、-C(O)-、-N(R')-、または-S(O)_p-であり；およびY2は、1つ以上の J_d で任意かつ独立して置換される。

Q2は、不在であるか、または窒素、酸素、およびイオウから独立して選ばれる0~3個のヘテロ原子を有するC₃₋₈員の飽和、部分飽和、または完全不飽和単環式環基であるか、または窒素、酸素、およびイオウから独立して選ばれる0~5個のヘテロ原子を有する8-12員の飽和、部分飽和、または完全不飽和二環式環系であり；およびQ2は、1つ以上の J_e で任意かつ独立して置換される；ここで、Y2およびQ2の両方が不在であることはない。

各R'は独立して、-H、または1つ以上の J_a で任意かつ独立して置換されるC₁-C₆アルキルである。

各 J_a は独立して、ハロゲン、-OR、-N(R)₂、-C(O)OR、-C(O)N(R)₂、-NRC(O)R、-NRC(O)O

10

20

30

40

50

R、-CN、-NO₂、またはオキソである。

各J_bは独立して、ハロゲン、-OR、-N(R)₂、-C(O)OR、-C(O)N(R)₂、-NRC(O)R、-NRC(O)OR、-CN、-NO₂、オキソ、またはJ_aで任意かつ独立して置換されるC₁-C₆アルキルである。

各J_cは独立して、ハロゲン、-OR'、-N(R')₂、-C(O)OR'、-C(O)N(R')₂、-NR'C(O)R'、-NR'C(O)OR'、-CN、-NO₂、または1つ以上のJ_aで任意かつ独立して置換されるC₁-C₁₀脂肪族基であるか、または1つ以上のJ_bで任意かつ独立して置換されるC₃-C₈脂環式基である。

各J_dは独立して、ハロゲン、-CN、または-NO₂である。各J_eは独立して、ハロゲン、-CN、-NO₂、オキソ、C1-10脂肪族であり、ここで、3個までのメチレン単位は、G'で任意かつ独立して置換され、ここで、G'は、-O-、-C(O)-、-N(R')-、または-S(O)_p-であり；および脂肪族基は、1つ以上のJ_dで任意かつ独立して置換されるか、またはJ_eは、1つ以上のJ_bで任意かつ独立して置換されるC₃-C₈脂環式基である。

各Rは独立して、-HまたはC₁-C₆アルキルである。

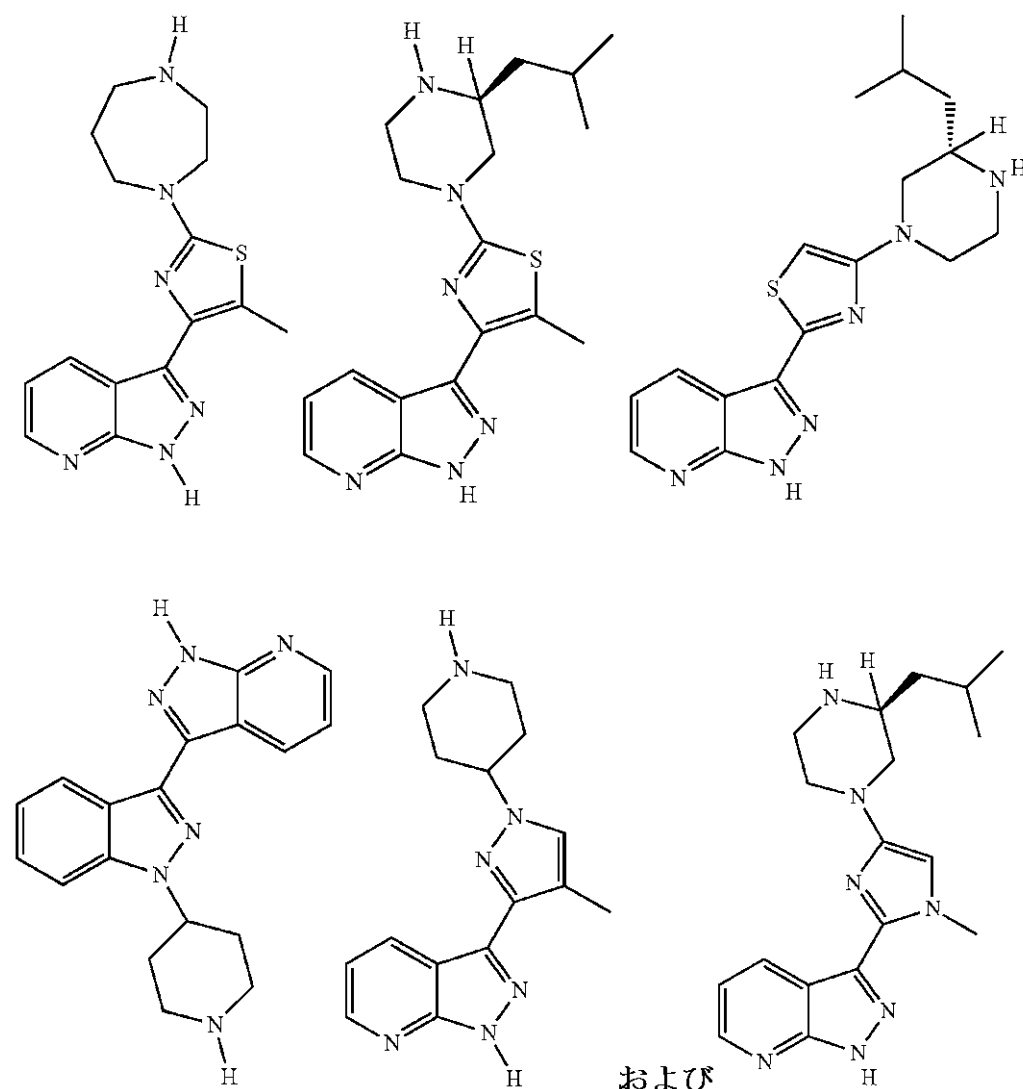
各pは独立して、0、1、または2である。]

で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩である。

【0273】

式(XXXIV)で示される化合物の代表的化合物として、以下のものが挙げられる：

【化87】



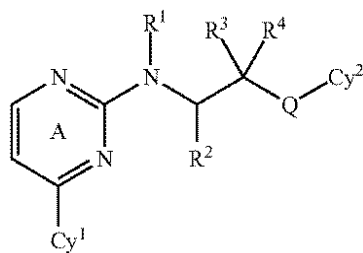
および

。

【0274】

さらに他の実施態様において、小分子PKC- θ 阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるFlemingらの米国特許出願公開公報No. 2011/0071134に記載の2-(アミノ置換)-4-アリールピリミジン化合物を包含する。このタイプの代表的化合物は、式(XXXV)：

【化 8 8】



(XXXV)

[式中、

R^1 および R^2 はそれぞれ独立して、H、 C_{1-3} アルキルまたは C_3 -5シクロアルキルである；

R^3 は、HまたはFである；

R^4 は、H、F、 $-OR^a$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ または $-N(R^a)_2$ である；または R^3 および R^4 はそれらが結合する炭素原子と一緒に、カルボニル基を形成する；ここで、 R^a はそれぞれ独立して、H、 C_{1-3} アルキルまたは C_3 -5シクロアルキルである；

環Aは、1もしくは2個の独立した R^5 で任意に置換され、ここで、各 R^5 は独立して、ハロ、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CN$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^c$ 、 $-N(R^b)_2$ 、 $-NR^bC(O)R^b$ 、 $-NR^bC(O)N(R^b)_2$ 、 $-NR^bCO_2R^c$ 、 $-CO_2R^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)N(R^b)_2$ 、 $-OC(O)N(R^b)_2$ 、 $-S(O)_2R^c$ 、 $-SO_2N(R^b)_2$ 、 $-S(O)R^c$ 、 $-NR^bSO_2N(R^b)_2$ 、 $-NR^bSO_2R^c$ 、またはハロ、 $-CN$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^c$ 、 $N(R^b)_2$ 、 $NR^bC(O)R^b$ 、 $-NR^bC(O)N(R^b)_2$ 、 $-NR^bCO_2R^c$ 、 $-CO_2R^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)N(R^b)_2$ 、 $-OC(O)N(R^b)_2$ 、 $-S(O)_2R^c$ 、 $-SO_2N(R^b)_2$ 、 $-S(O)R^c$ 、 $-NR^bSO_2N(R^b)_2$ 、または $-NR^bSO_2R^c$ で任意に置換された C_{1-4} 脂肪族基から選ばれ、ここで、 R^b はそれぞれ独立して、Hまたは C_{1-4} 脂肪族基である；または同じ窒素原子上の2つの R^b が窒素原子と一緒に、窒素原子に加えてN、OまたはSから選ばれる0~2個の環ヘテロ原子を有する5~8員の芳香族または非芳香族環を形成する；および R^c はそれぞれ独立して、 C_{1-4} 脂肪族基である；

Cy^1 は、以下から選ばれる：a) 環のメタもしくはパラ位において1つの出現のWで置換された6員のアリールまたはヘテロアリール環；またはb) 1つの出現のWで置換された5員のヘテロアリール環；

ここで、 Cy^1 は、 R^6 の1~3個の独立した出現によって任意にさらに置換され、ここで、 R^6 はそれぞれ独立して、 $-$ ハロ、 C_{1-8} 脂肪族、 $-CN$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^d$ 、 $-N(R^E)_2$ 、 $-NR^EC(O)R^b$ 、 $-NR^EC(O)N(R^E)_2$ 、 $-NR^ECO_2R^d$ 、 $-CO_2R^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)N(R^E)_2$ 、 $-OC(O)N(R^E)_2$ 、 $-S(O)_2R^d$ 、 $-SO_2N(R^E)_2$ 、 $-S(O)R^d$ 、 $-NR^ESO_2N(R^E)_2$ 、 $-NR^ESO_2R^d$ 、 $-C(=NH)-N(R^E)_2$ 、またはハロ、 $-CN$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^d$ 、 $-N(R^E)_2$ 、 $-NR^EC(O)R^b$ 、 $-NR^EC(O)N(R^E)_2$ 、 $-NR^ECO_2R^d$ 、 $-CO_2R^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)N(R^E)_2$ 、 $-OC(O)N(R^E)_2$ 、 $-S(O)_2R^d$ 、 $-SO_2N(R^E)_2$ 、 $-S(O)R^d$ 、 $-NR^ESO_2N(R^E)_2$ 、 $-NR^ESO_2R^d$ 、または $-C(=NH)-N(R^E)_2$ で任意に置換された C_{1-8} 脂肪族基から選ばれ、ここで、 R^d はそれぞれ、 C_{1-6} 脂肪族および R^E はそれぞれ独立して、H、 C_{1-6} 脂肪族、 $-C(=O)R^b$ 、 $-C(O)OR^b$ または $-SO_2R^b$ である；または同じ窒素原子上の2つの R^b が窒素原子と一緒に、窒素原子に加えてN、OまたはSから選ばれる0~2個の環ヘテロ原子を有する5~8員の芳香族または非芳香族環を形成する；

Wは、 $-R^8$ 、 $V-R^8$ 、 L_1-R^7 、 $V-L_1-R^7$ 、 L_1-V-R^8 、または $L_1-V-L_2-R^7$ である；ここで： L_1 および L_2 はそれぞれ独立して、任意に置換された C_{1-6} アルキレン鎖である；Vは、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-NR^E-NR^EC(O)-$ 、 $-NR^ECO_2-$ 、 $-NR^ESO_2-$ 、 $-C(O)N(R^b)-$ 、 $-SO_2N(R^b)-$ 、 $-NR^EC(O)N(R^b)-$ または $-OC(O)-$ である； R^7 は、H、ハロ、 $-OH$ 、 $-N(R^F)_2$ 、 $-CN$ 、 $-OR^G$ 、 $-C(O)R^G$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R^G$ 、 $-SR^G$ 、 $-S(O)R^G$ 、 $-S(O)_2R^G$ 、 $-N(R^E)C(O)R^G$ 、 $-N$

10

20

30

40

50

(R^E)CO₂R^G、-N(R^E)SO₂R^G、-C(O)N(R^F)₂、-SO₂N(R^F)₂、-N(R^E)C(O)N(R^F)₂、-OC(O)R^F、またはC₁₋₁₀脂肪族、C₆₋₁₀アリール、3~14員のヘテロシクリルまたは5-14員のヘテロアリールから選ばれる任意に置換された基であり、ここで、R^Fはそれぞれ独立して、H、C₁₋₆脂肪族、C₆₋₁₀アリール、3~14員のヘテロシクリル、5-14員のヘテロアリール、-C(=O)R^b、-C(O)OR^bまたは-SO₂R^bである；または同じ窒素原子上の2つのR^Fが窒素原子と一緒にあって、窒素原子に加えてN、OまたはSから選ばれる0~2個の環ヘテロ原子を有する5~8員の芳香族または非芳香族環を形成する；およびR^Gはそれぞれ、C₁₋₆脂肪族、C₆₋₁₀アリール、3~14員のヘテロシクリル、または5-14員のヘテロアリールである；R⁸は、C₁₋₁₀脂肪族、C₆₋₁₀アリール、3~14員のヘテロシクリルまたは5-14員のヘテロアリールから選ばれる任意に置換され基である；

10

Qは、結合、CH₂またはC(=O)である；

Cy²は、C₆₋₁₀アリール、5~10員のヘテロアリール、または5~10員のヘテロシクリル環であり、ここで、各環は、R⁹の1~3個の独立した出現によって任意にさらに置換される；

ここで、R⁹はそれぞれ独立して、から選ばれるC₁₋₄脂肪族、-N(R^b)₂、ハロ、NO₂、-CN、-OR^b、-C(O)R^a、-CO₂R^a、-SR^C、-S(O)R^C、-S(O)₂R^C、-OS(O)₂R^C、-N(R^b)C(O)R^a、-N(R^b)CO₂R^a、-N(R^b)SO₂R^a、-C(O)N(R^b)₂、-SO₂N(R^b)₂、-N(R^b)C(O)N(R^b)₂、-OC(O)R^a、または-N(R^b)₂、ハロ、NO₂、-CN、-OR^b、-C(O)R^a、-CO₂R^a、-SR^C、-S(O)R^C、-OS(O)₂R^C、-S(O)₂R^C、-N(R^b)C(O)R^a、-N(R^b)CO₂R^a、-N(R^b)SO₂R^a、-C(O)N(R^b)₂、-SO₂N(R^b)₂、-N(R^b)C(O)N(R^b)₂、または-OC(O)R^aで任意に置換されたC₁₋₄脂肪族基である；および

R¹⁰は、フェニル、またはa 5-6員のヘテロシクリルもしくはヘテロアリール環から選ばれる]

20

で示される化合物またはその医薬的に許容しうる塩である。

【0275】

特定の実施態様において、式(XVII)の化合物は、以下の制限の1つもしくはそれ以上、またはすべての対象になる：

1)Cy¹が、メタ位にてWで置換されたフェニルである場合、

a)Wが、-OMeであり、R¹、R²、R³、およびR⁴がそれぞれ、水素であり、およびQが、結合である場合、環Aは、R⁵でさらに置換され、R⁵は、-CF₃または-C(O)N(R^b)₂以外の基である；および

b)Wが、-OMeであり、R¹、R²、R³、およびR⁴がそれぞれ、水素であり、およびQが、-CH₂-である場合、Cy²は、1H-ベンズイミダゾール-1-イル以外である；

30

2)Cy¹が、パラ位にてWで置換されたフェニルであり、R¹、R²、R³、およびR⁴がそれぞれ、水素である場合：

a)Qが、結合である場合、Wは、i)-CONH₂；ii)-CONHR⁸、ここで、R⁸は、フェニル、-アルキルフェニル、アルキル、または-アルキルヘテロシクロから選ばれる任意に置換された基；iii)-CF₃；iv)-SO₂Me；v)-NH₂；vi)-tBu；vii)Cy²が、モルホリンである場合、-CO₂H；viii)Cy²が、インドールである場合、-O(フェニル)；およびix)-OMe；以外である；

b)Qが、-CH₂-である場合、Wは、i)Cy²が、任意に置換されたイミダゾールまたはベンズイミダゾールである場合、-CONH₂；ii)-CONHR⁸、ここで、R⁸は、フェニル、-アルキルフェニル、または-アルキルヘテロシクロから選ばれる任意に置換された基；iii)-CF₃；iv)-SO₂Me；v)-OH、ここで、Cy²は、5~10員のヘテロシクリル環；vi)Cy²が、5~10員のヘテロシクリル環である場合、tBu；およびvii)-OMe；以外である；および

40

3)Cy¹が、5員のヘテロアリール環である場合：

a)Cy¹が、イソキサゾールであり、R¹、R²、R³、およびR⁴がそれぞれ、水素であり、Qが、結合であり、およびWが、p-フルオロ-フェニルである場合、Cy²は、ピリジルまたはN-ピロリジニル以外の基である；

b)Cy¹が、トリアゾリルであり、R¹、R²、R³、およびR⁴がそれぞれ、水素であり、Qが、結合であり、およびWが、-(CH₂)₂N(シクロペンチル)C(O)CH₂(ナフチル)である場合、Cy²は、N-ピペリジニル以外の基である；

c)Cy¹が、イミダゾリルであり、R¹、R²、R³およびR⁴がそれぞれ、水素であり、Qが、結

50

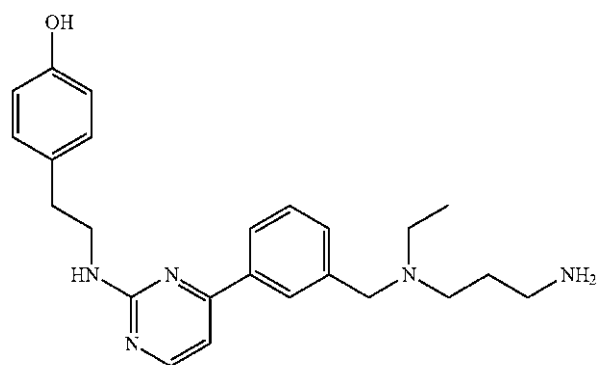
合であり、およびWが、メタ-CF₃-フェニルである場合、R⁶は、C(O)OCH₂CH₃以外の基である；および

d)Cy¹が、イミダゾール-5-イルであり、Wが、パラ-フルオロ-フェニルである場合、R⁶は、シクロヘキシル以外の基である。

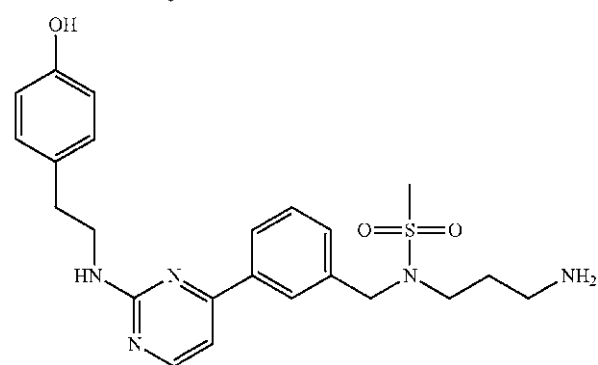
【0276】

このタイプの非限定的化合物は、以下の構造式によって表される：

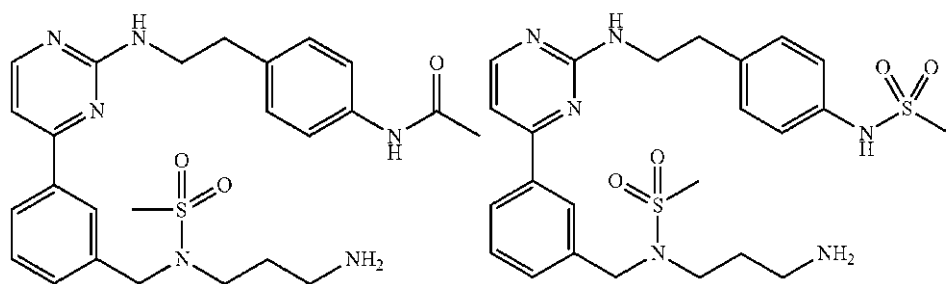
【化89】



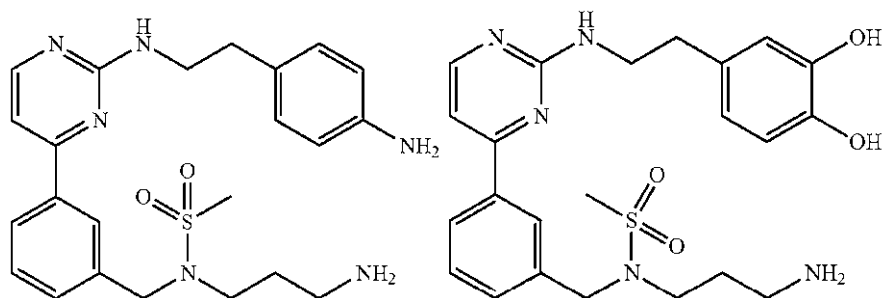
10



20

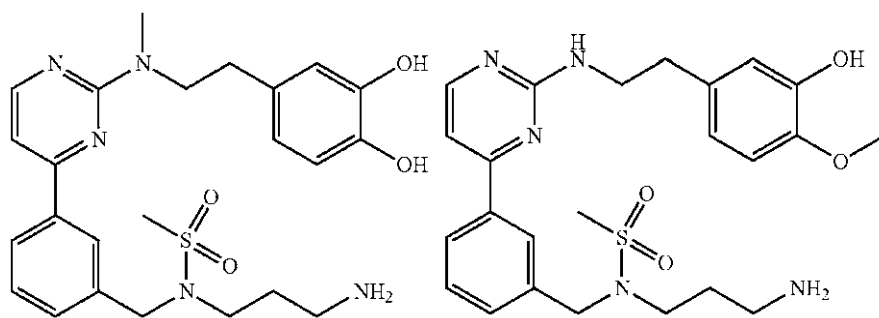


30

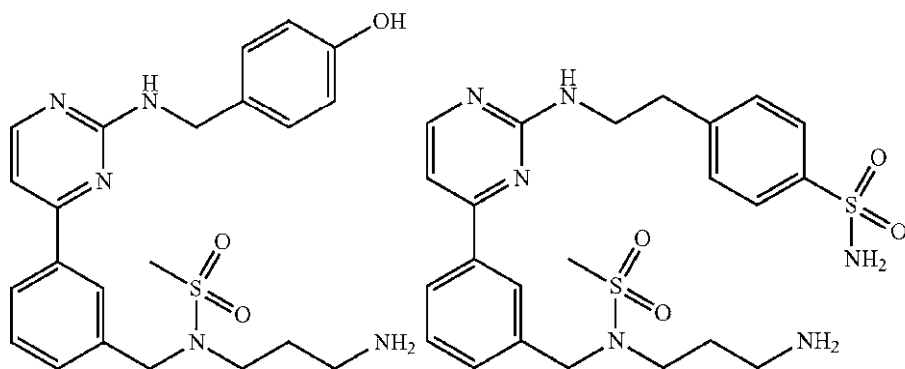


40

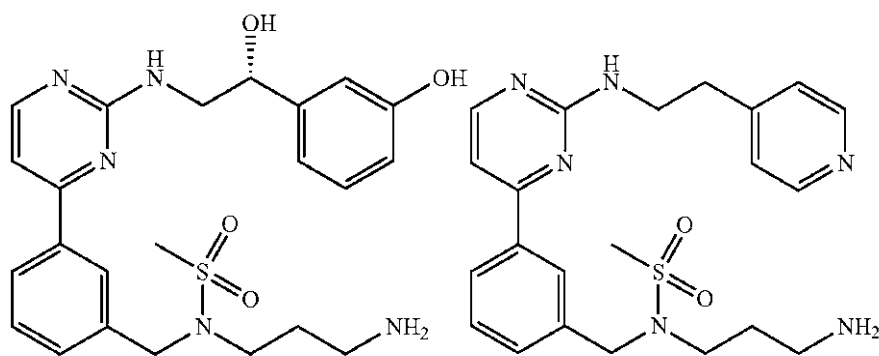
【化 9 0】



10

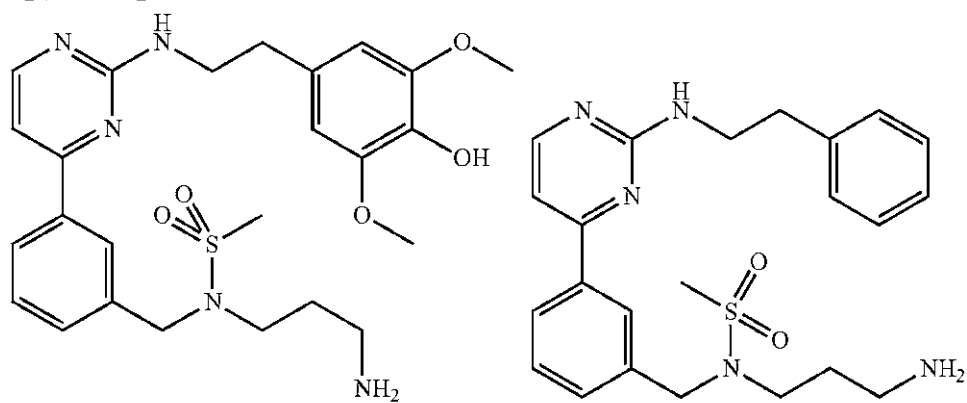


20

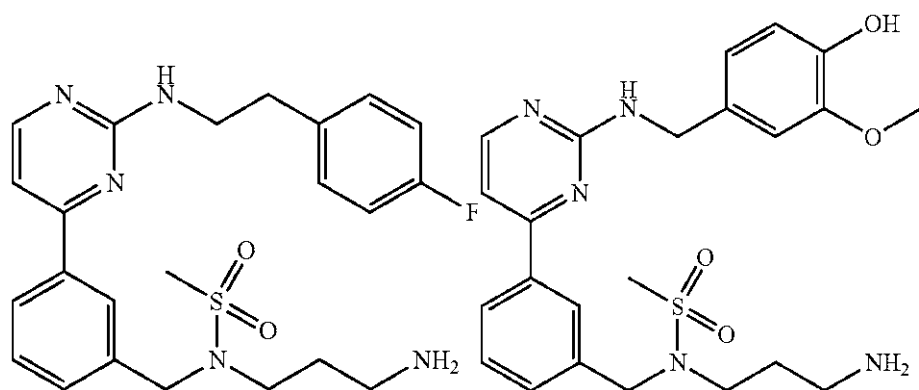


30

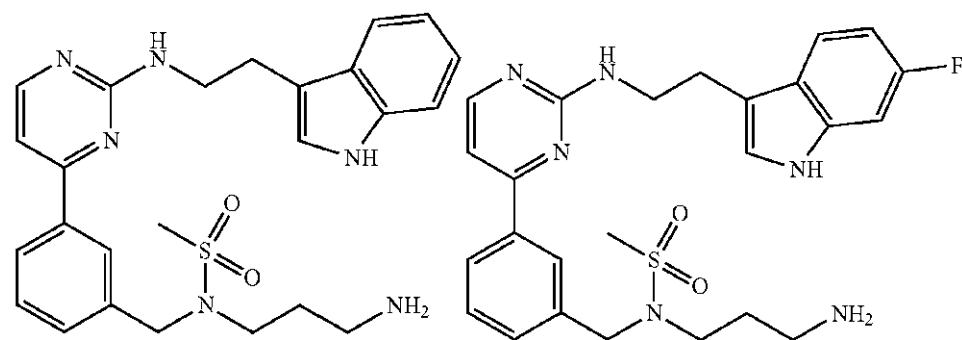
【化 9 1】



10

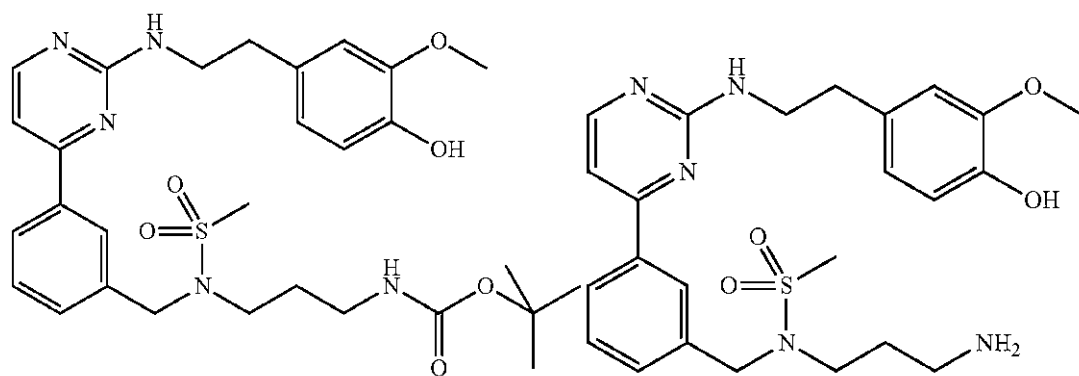


20

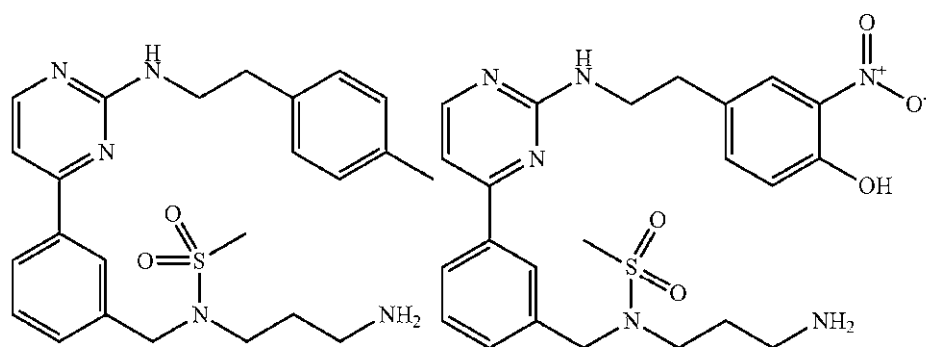


30

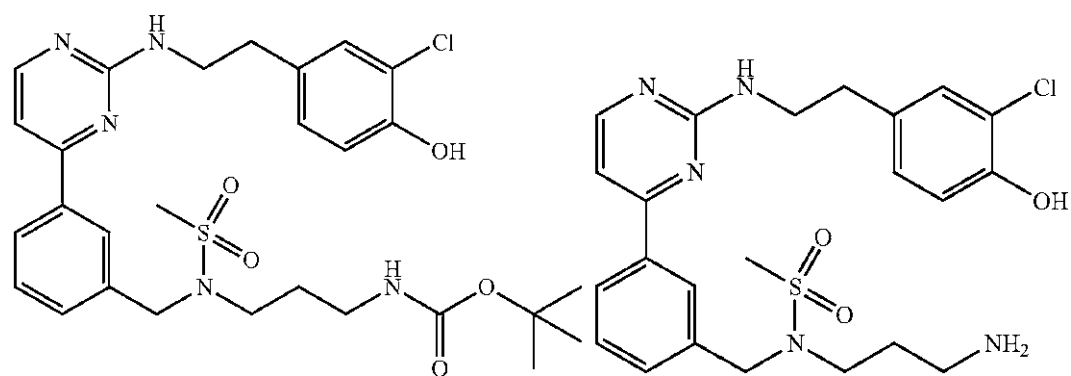
【化 9 2】



10

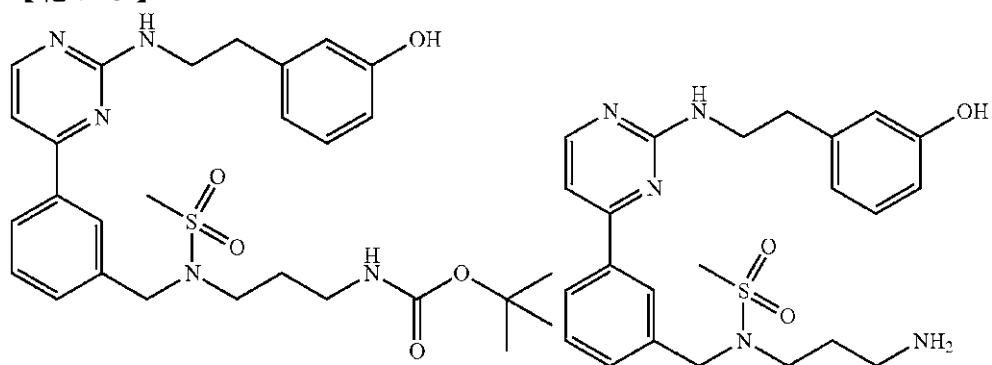


20

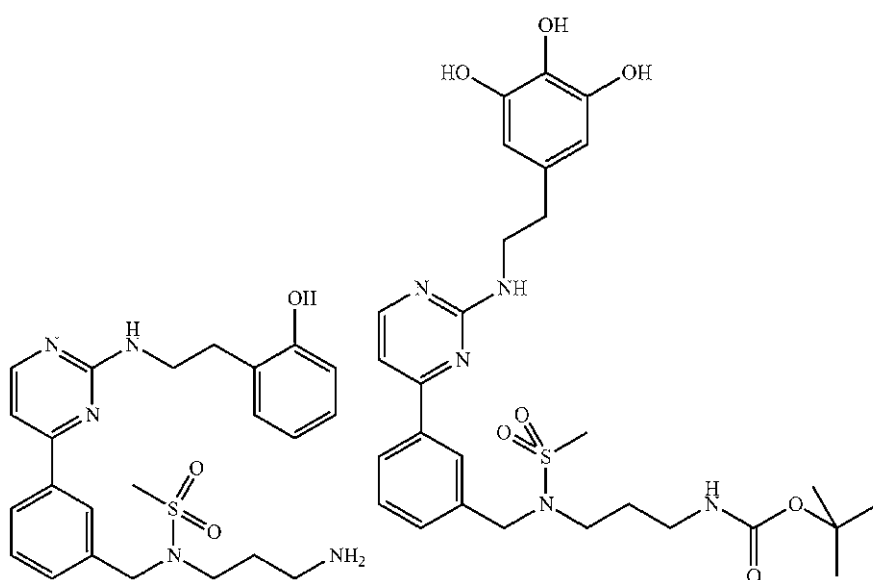


30

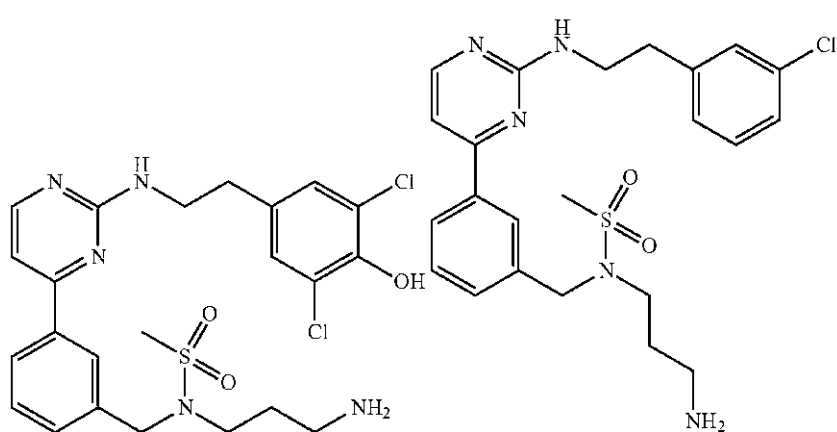
【化 9 3】



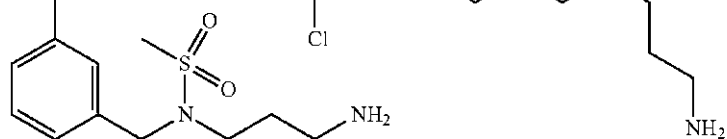
10



20

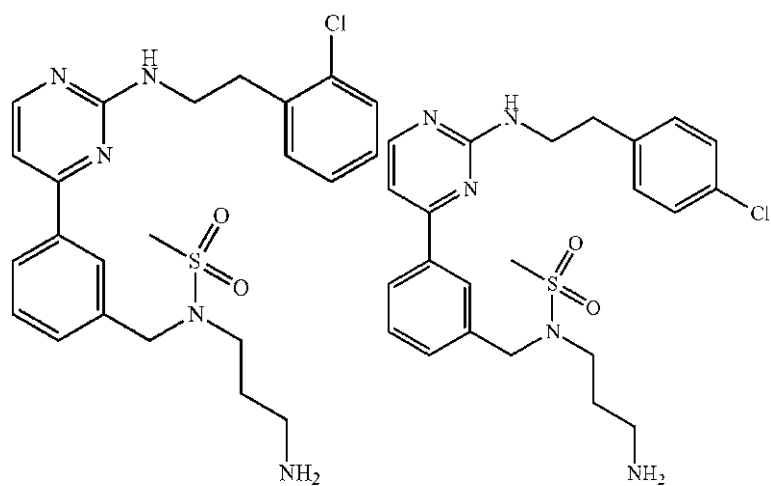


30

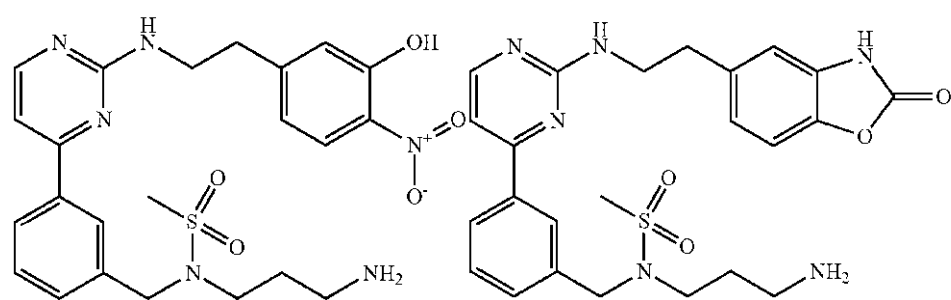


40

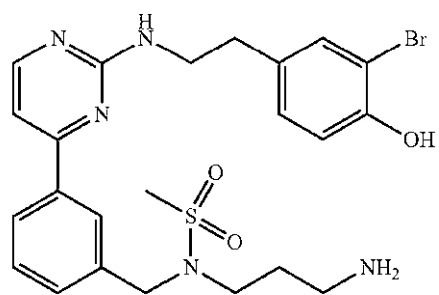
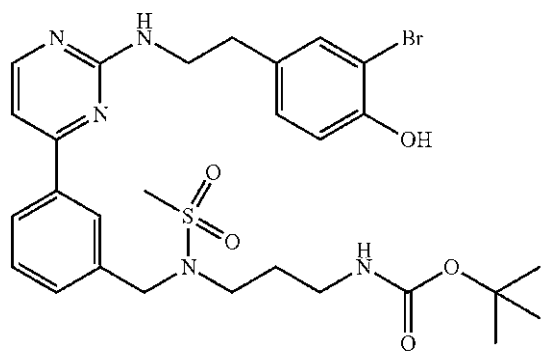
【化 9 4】



10

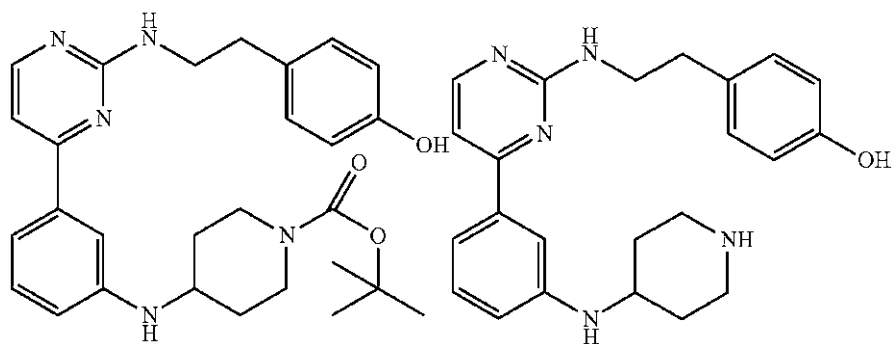


20

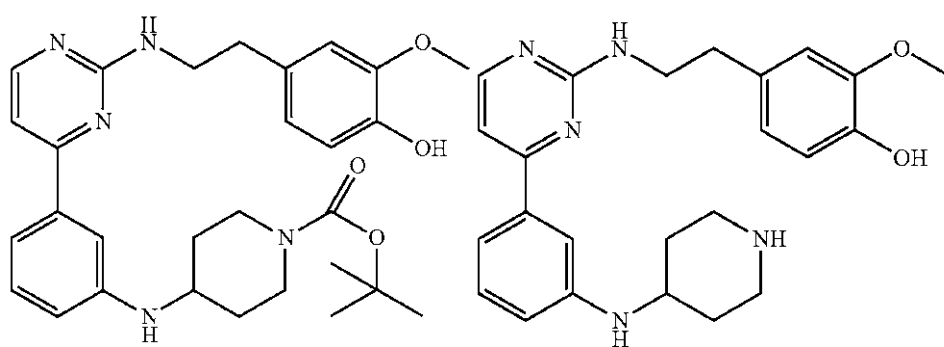


30

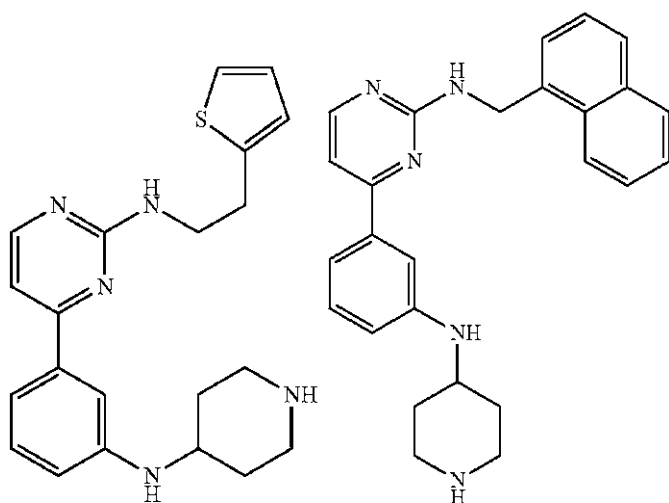
【化 9 5】



10

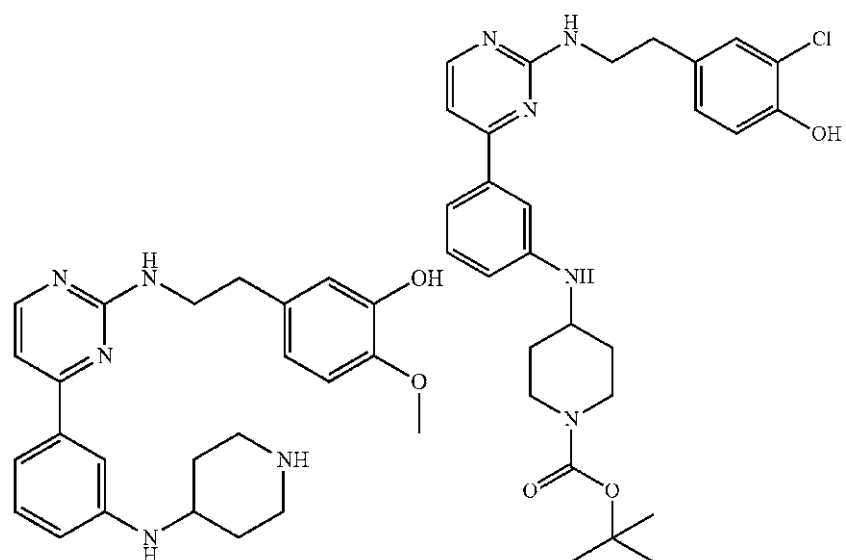


20

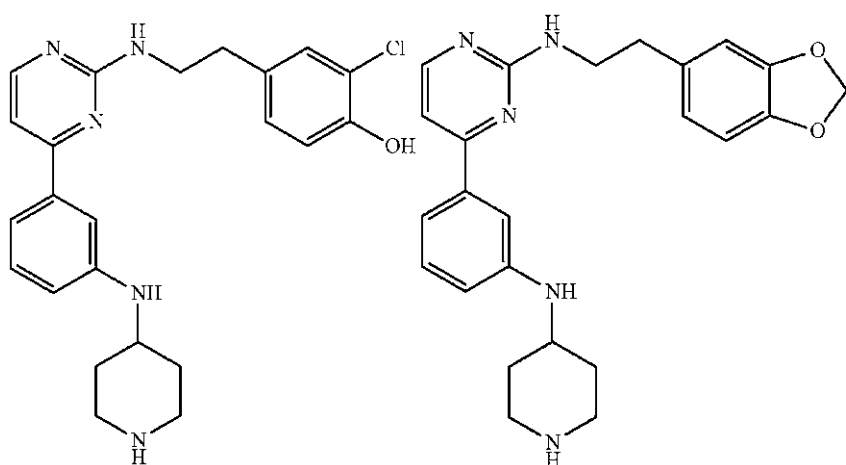


30

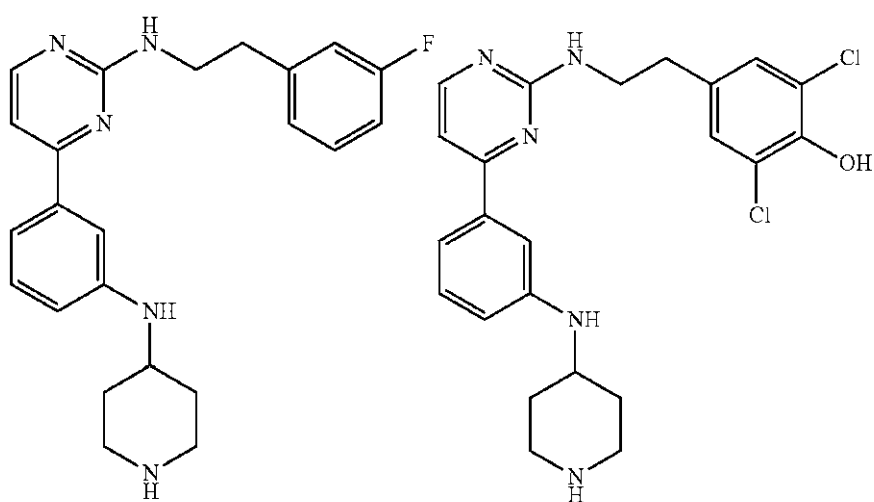
【化 9 6】



10



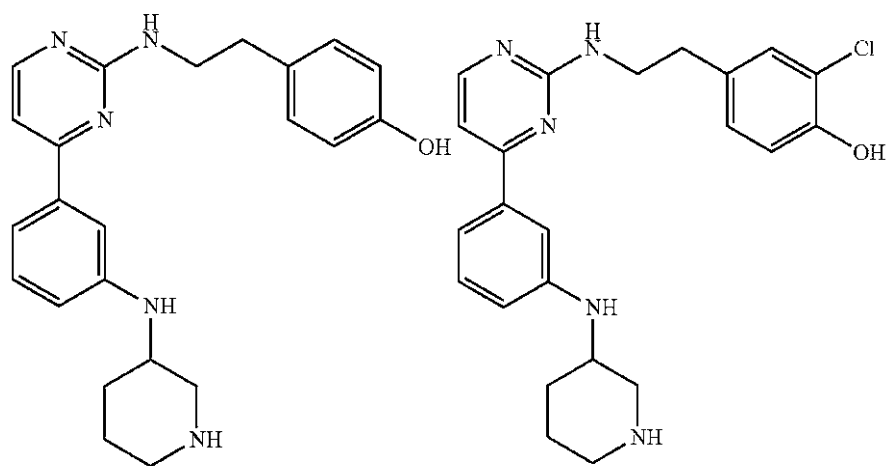
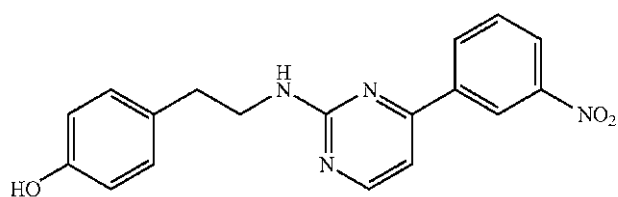
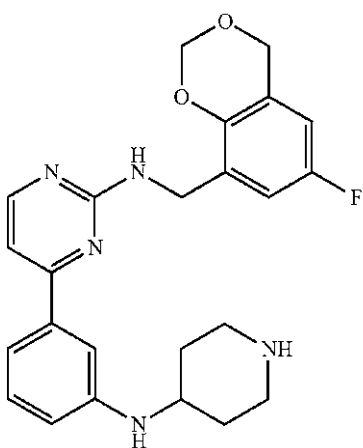
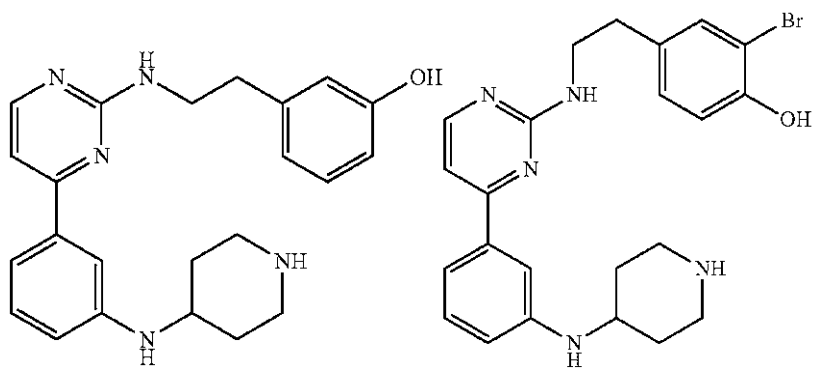
20



30

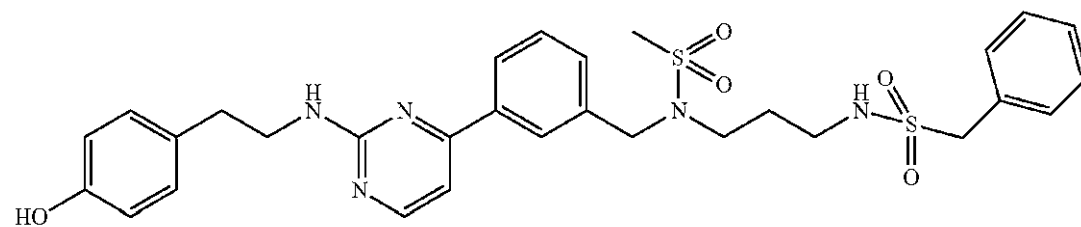
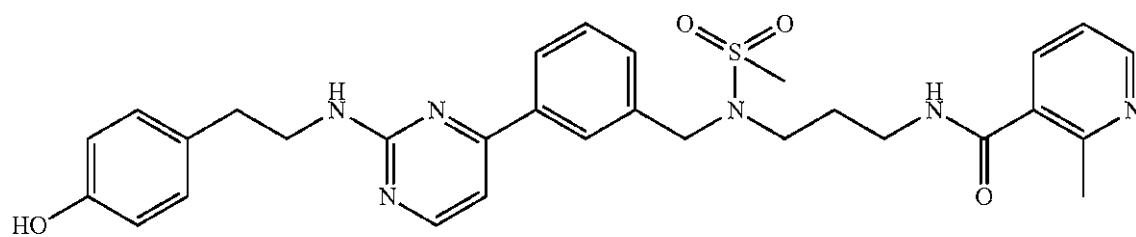
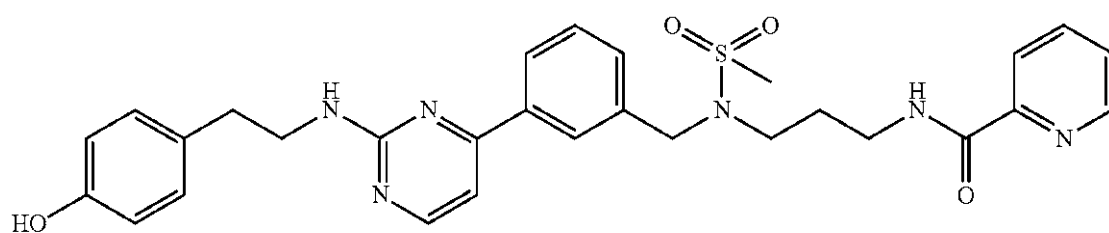
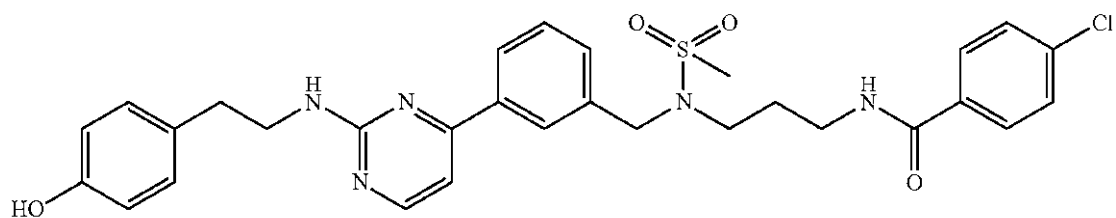
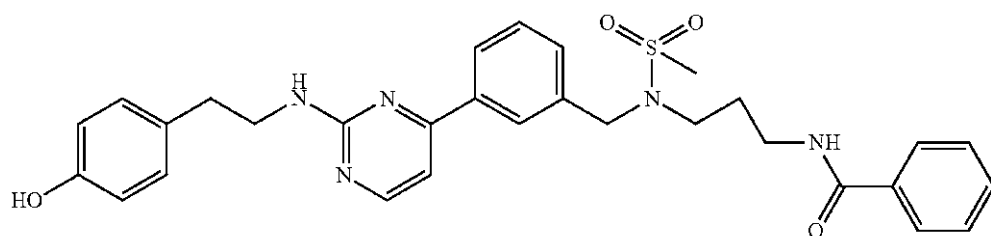
40

10



40

【化 9 8】



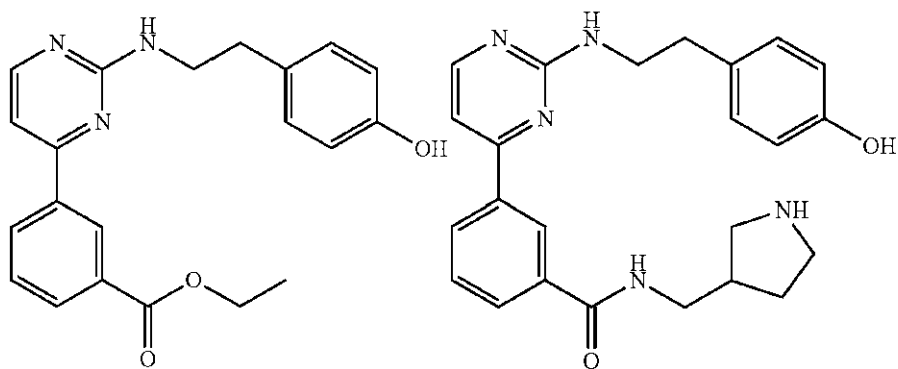
10

20

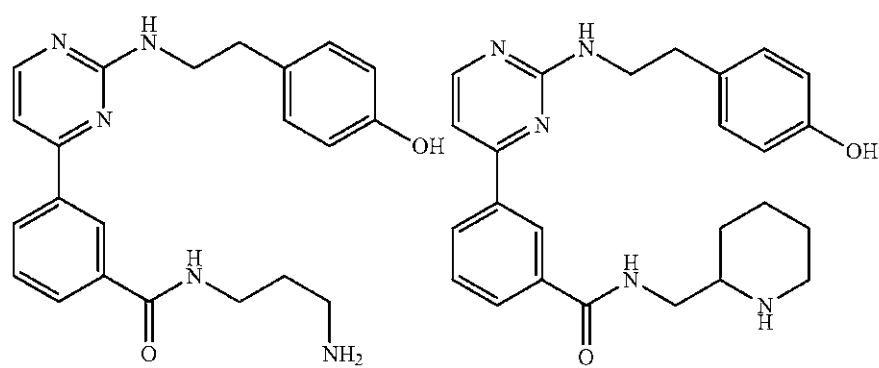
30

40

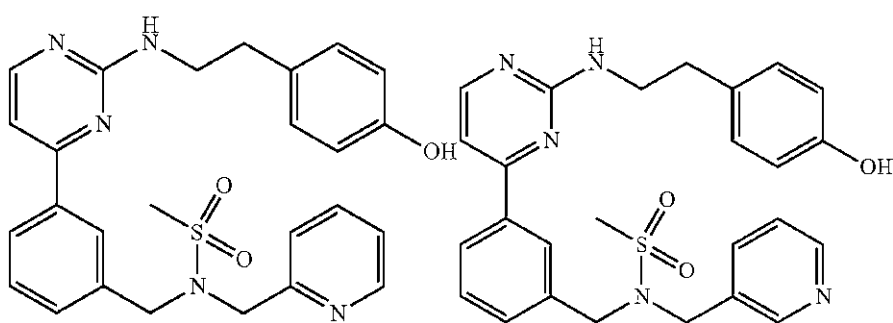
【化 9 9】



10

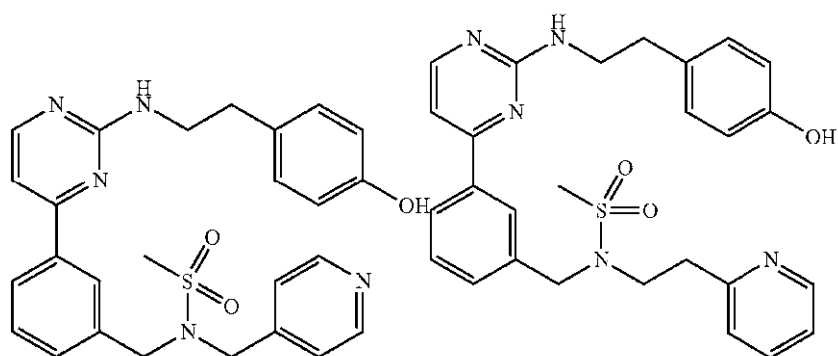


20

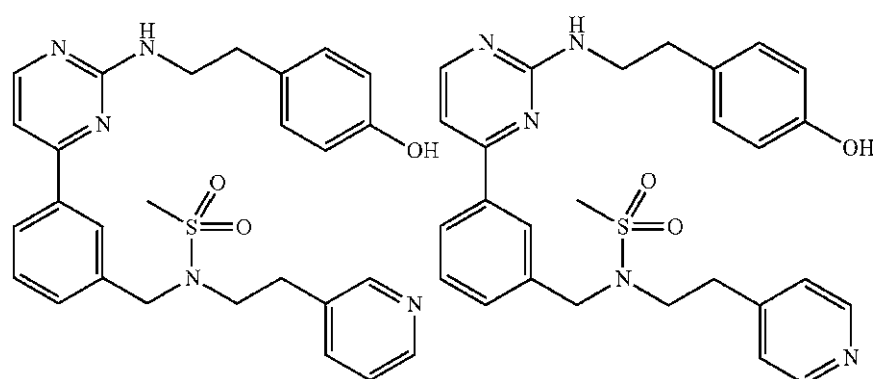


30

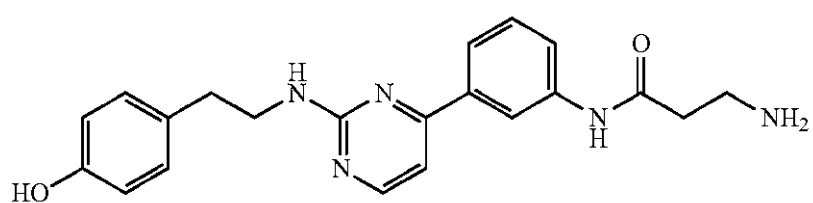
【化 1 0 0】



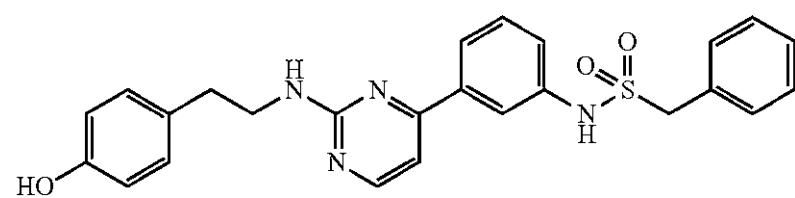
10



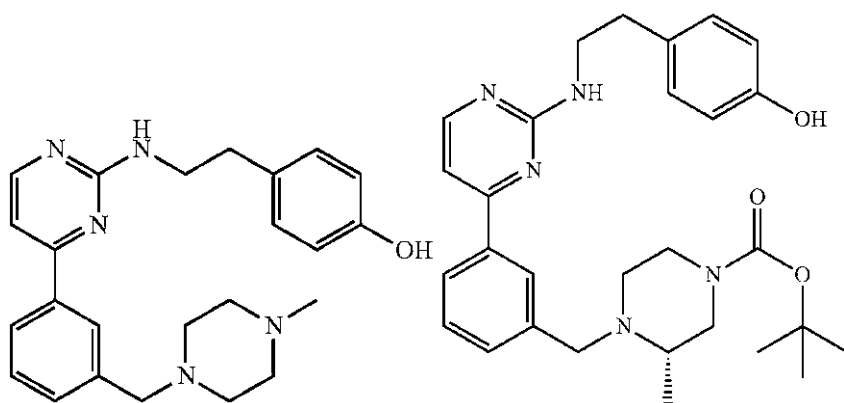
20



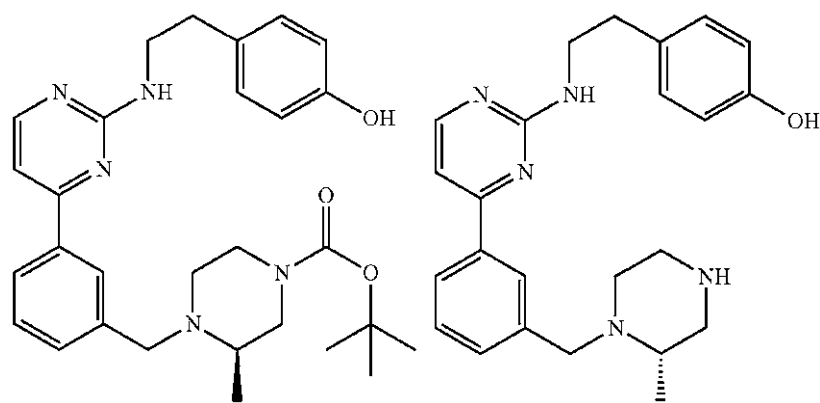
30



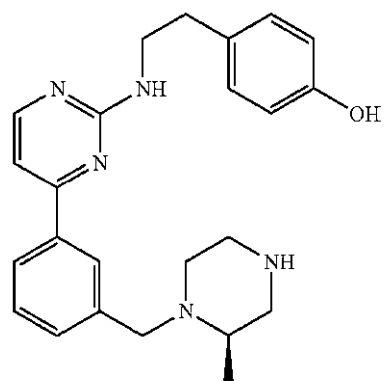
【化 1 0 1】



10

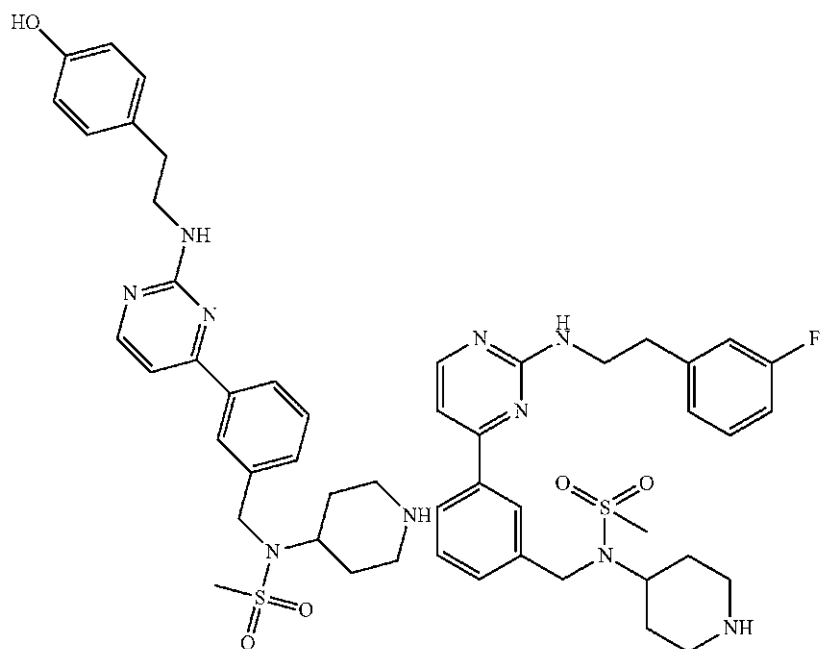


20



30

【化 1 0 2】



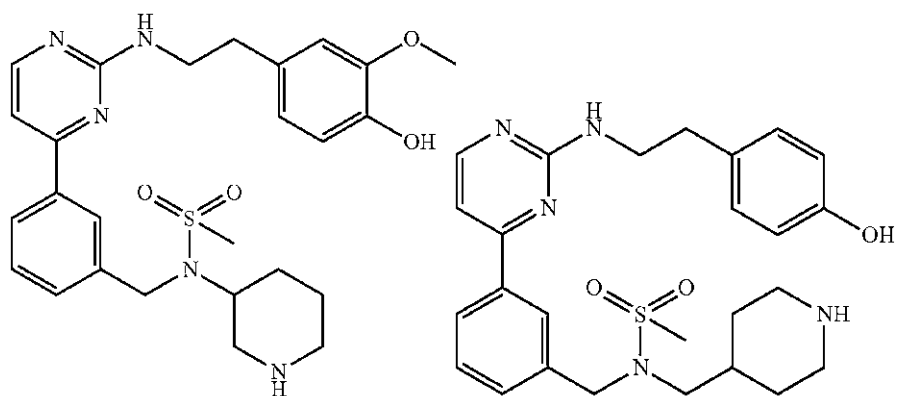
10

20

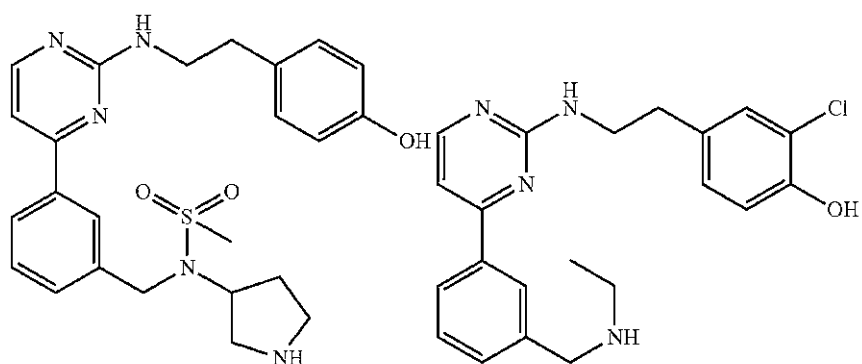
30

40

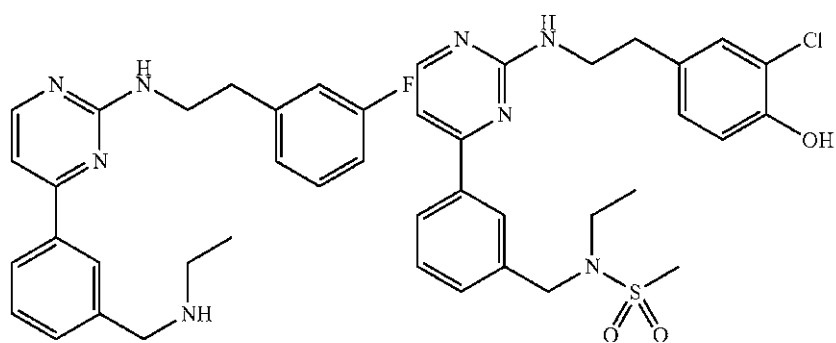
【化 1 0 3】



10

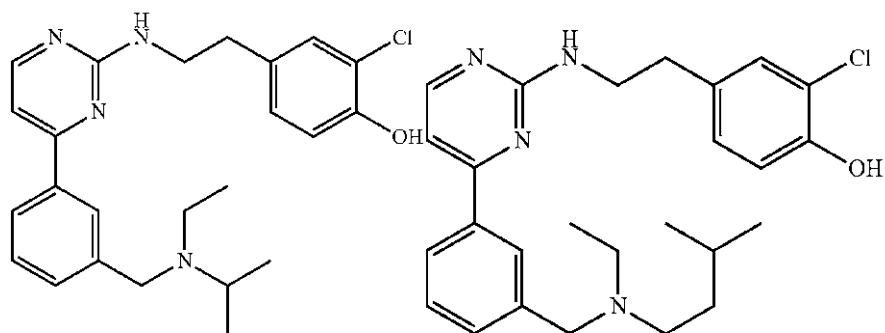


20

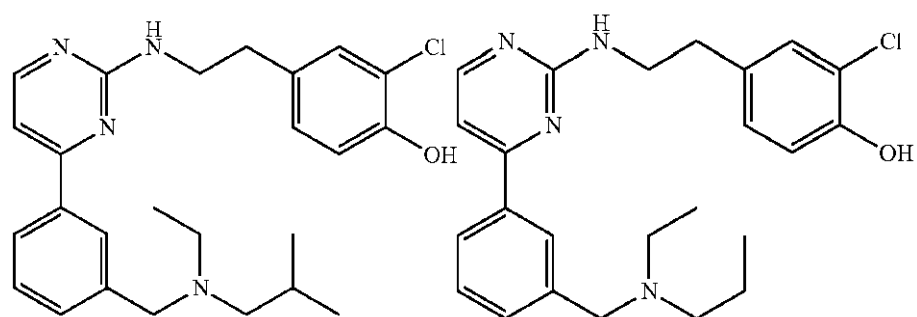


30

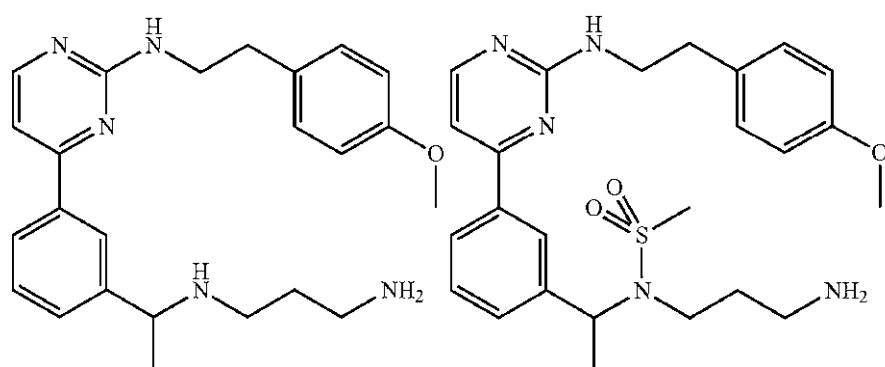
【化 1 0 4】



10

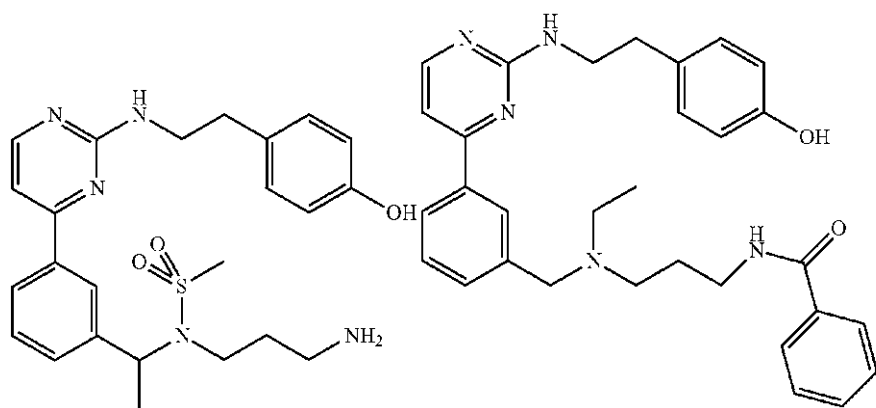


20

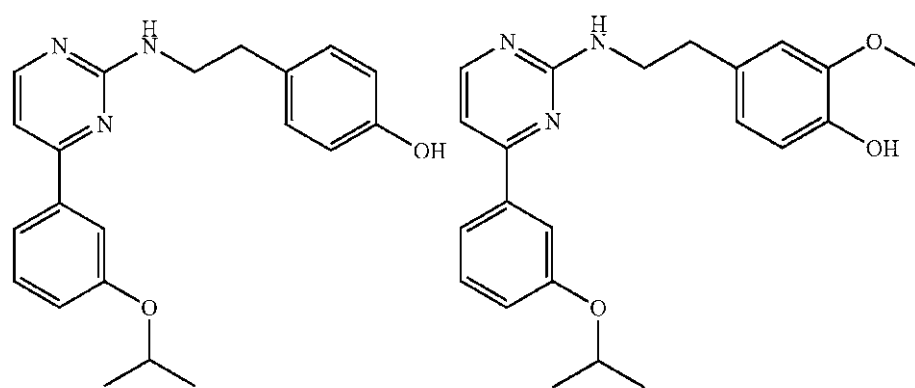


30

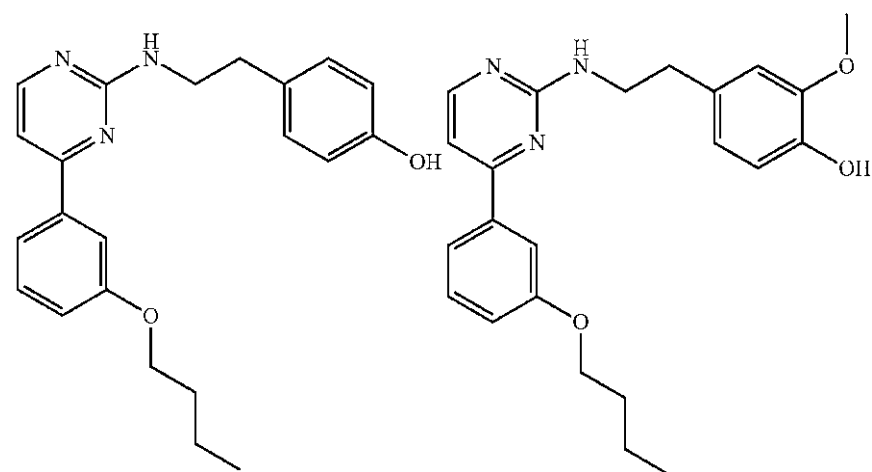
【化 1 0 5】



10



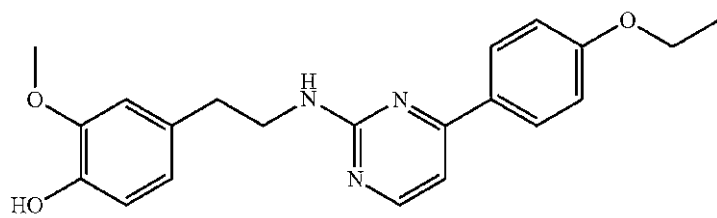
20



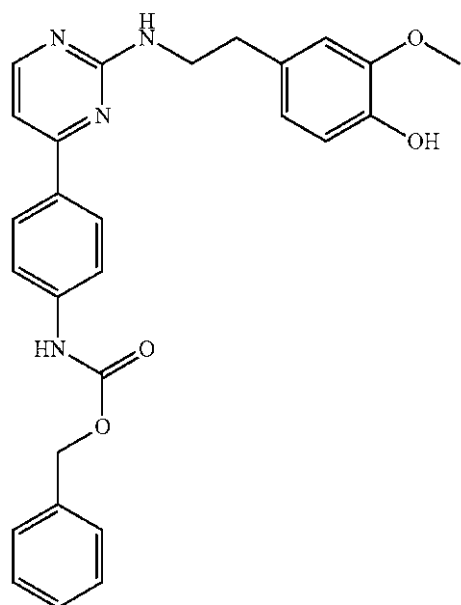
30

40

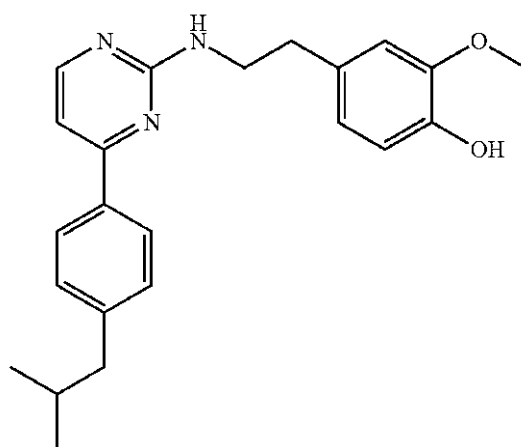
【化 1 0 6】



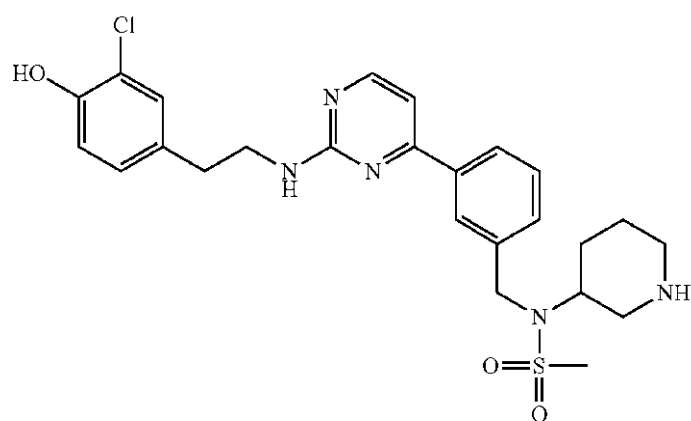
10



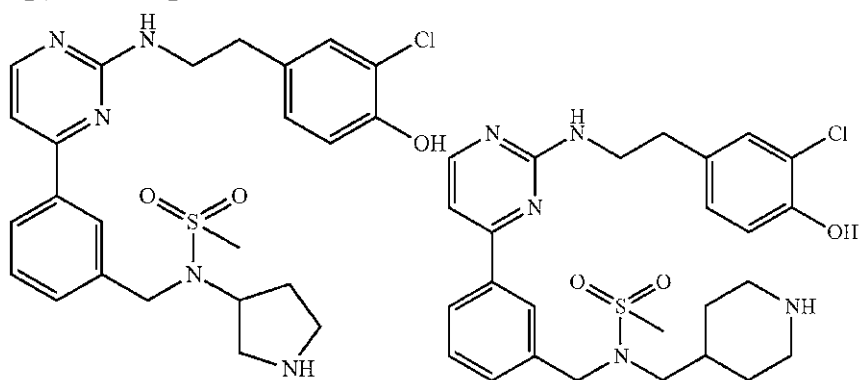
20



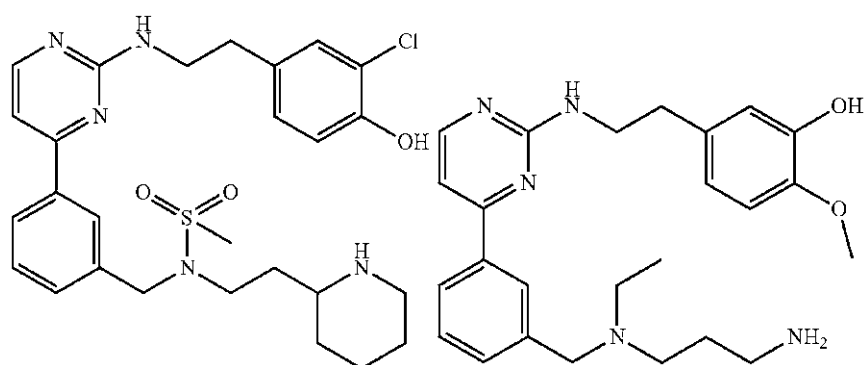
30



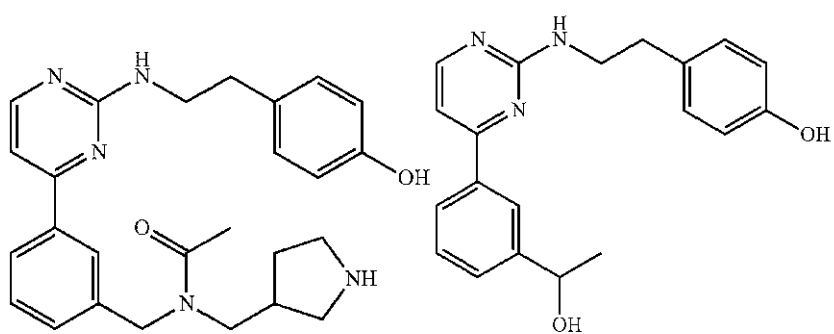
【化 1 0 7】



10

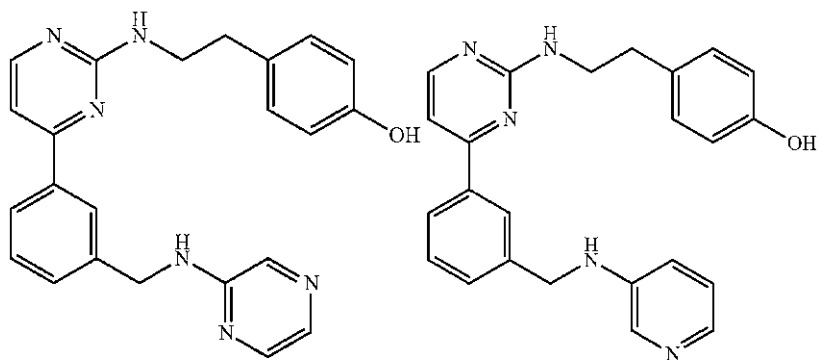


20

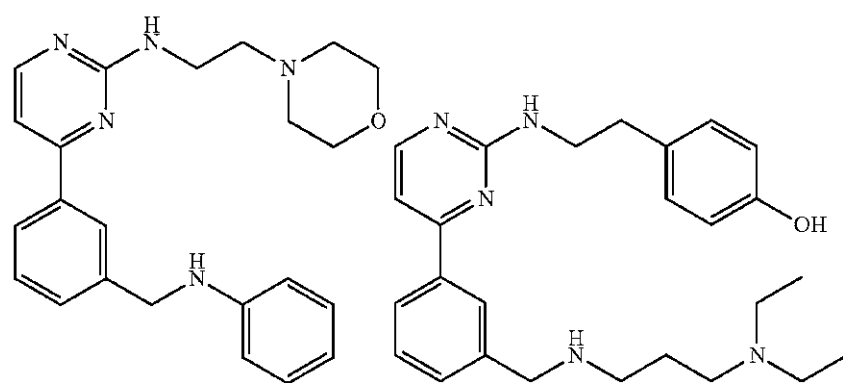


30

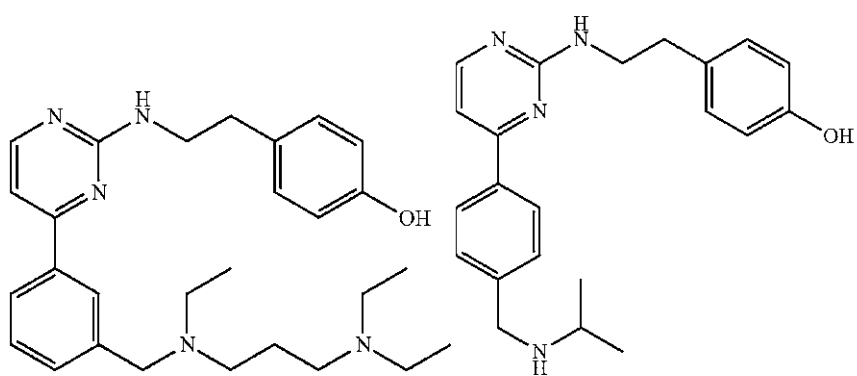
【化 1 0 8】



10

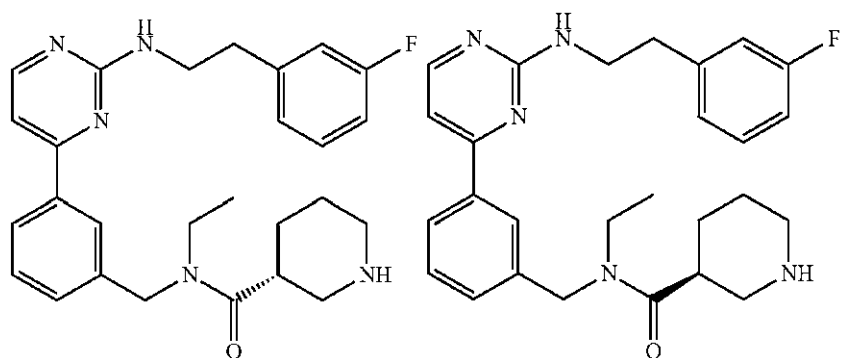


20

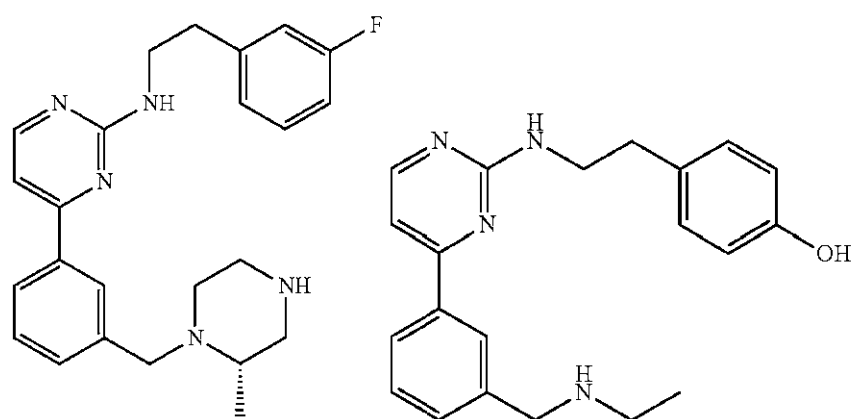


30

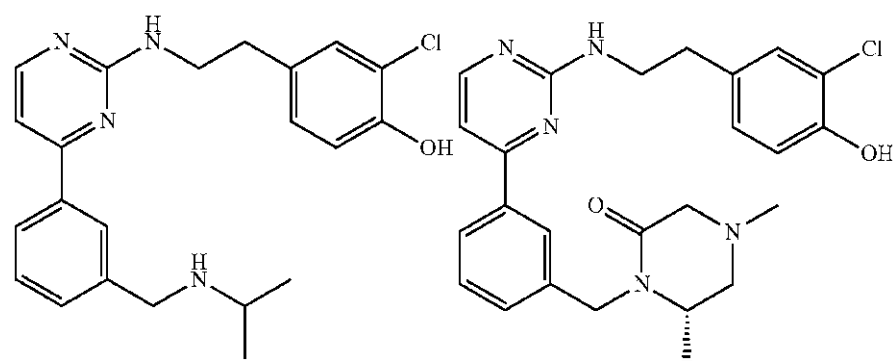
【化 1 0 9】



10

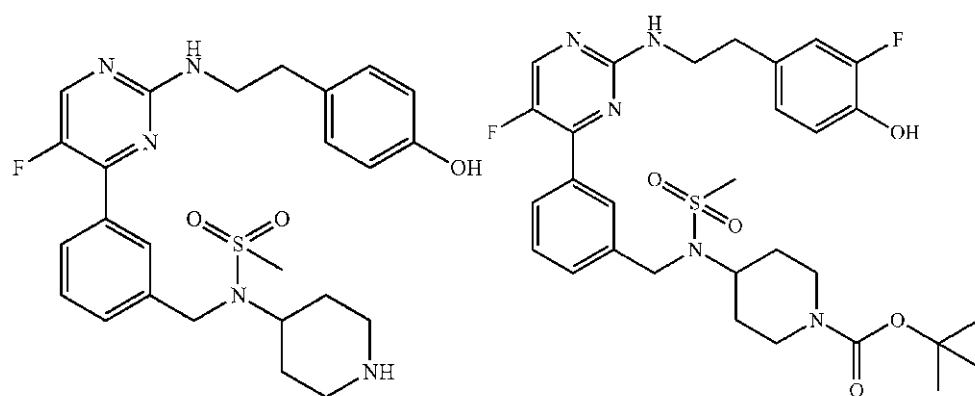


20

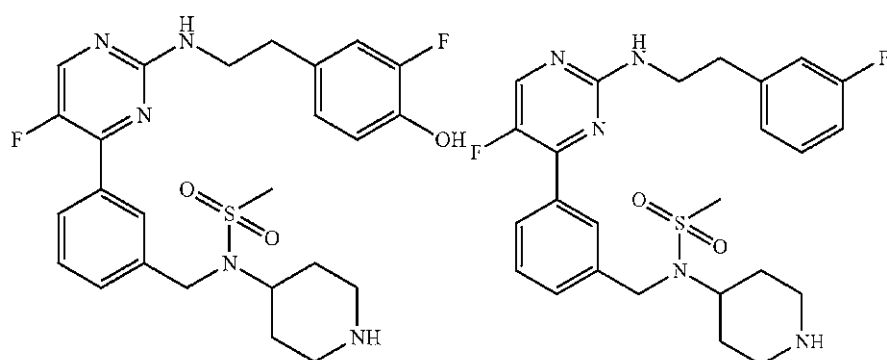


30

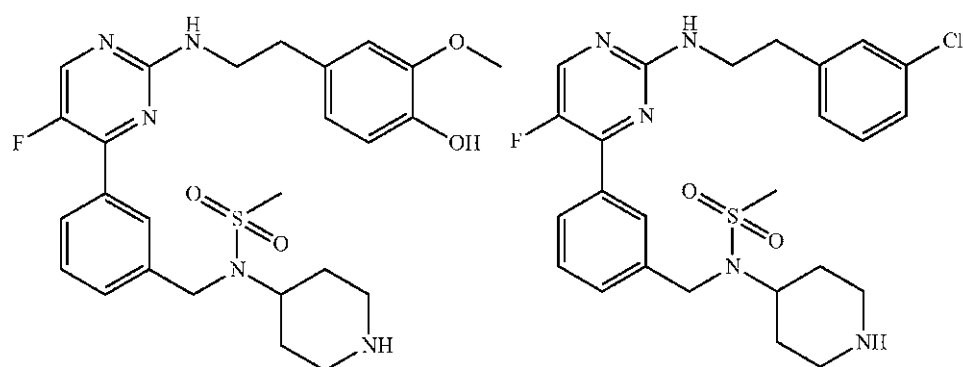
【化 1 1 0】



10

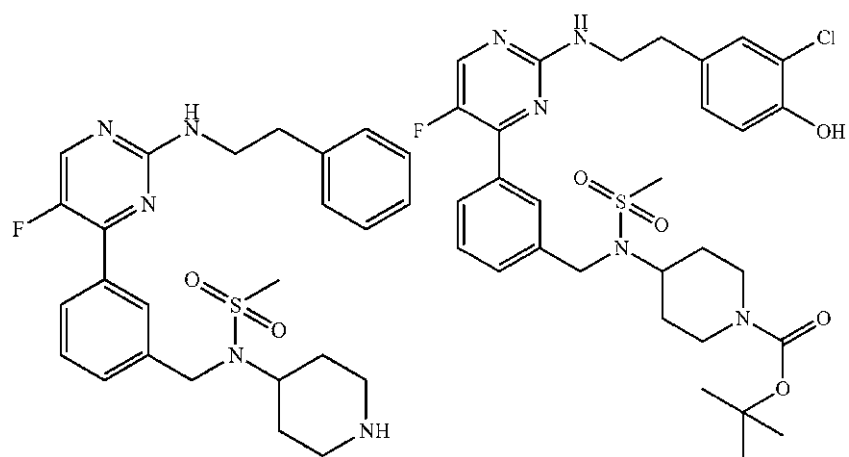


20

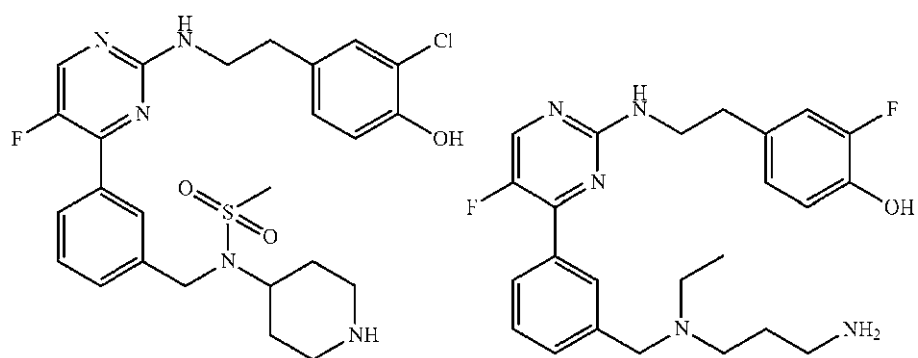


30

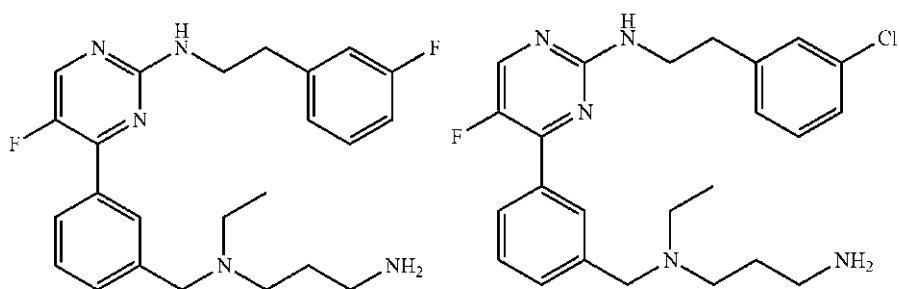
【化 1 1 1】



10

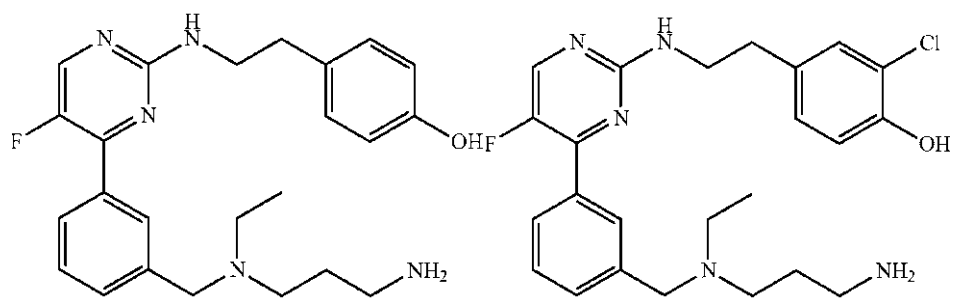


20

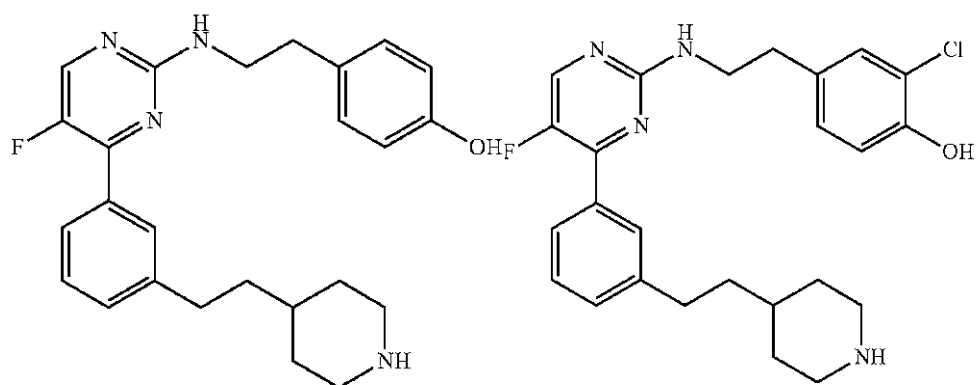


30

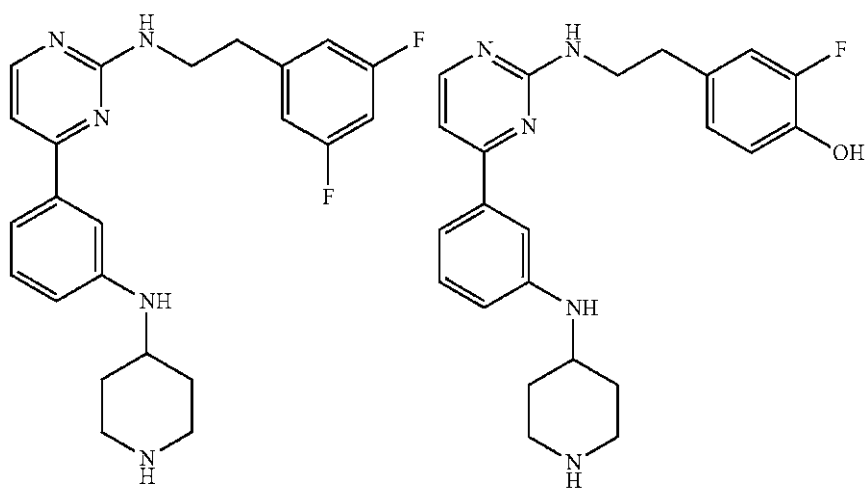
【化 1 1 2】



10

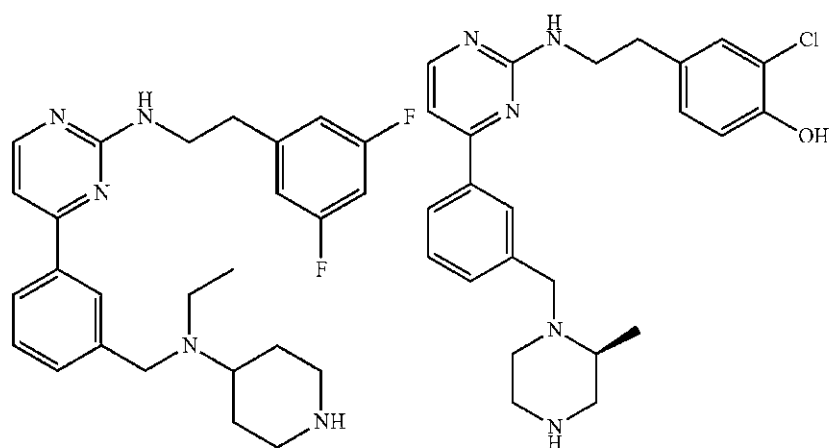


20

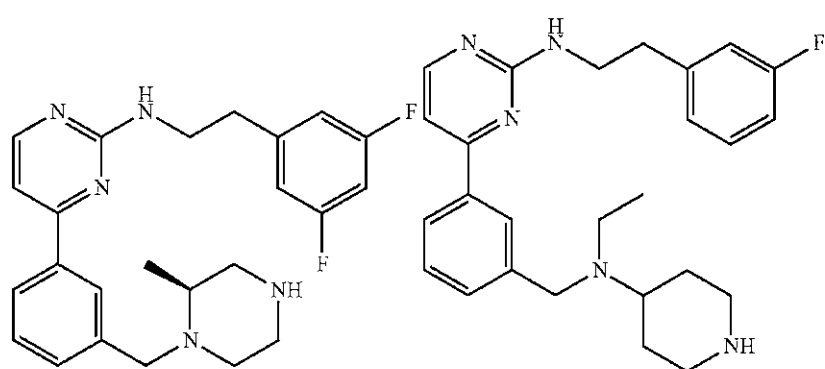


30

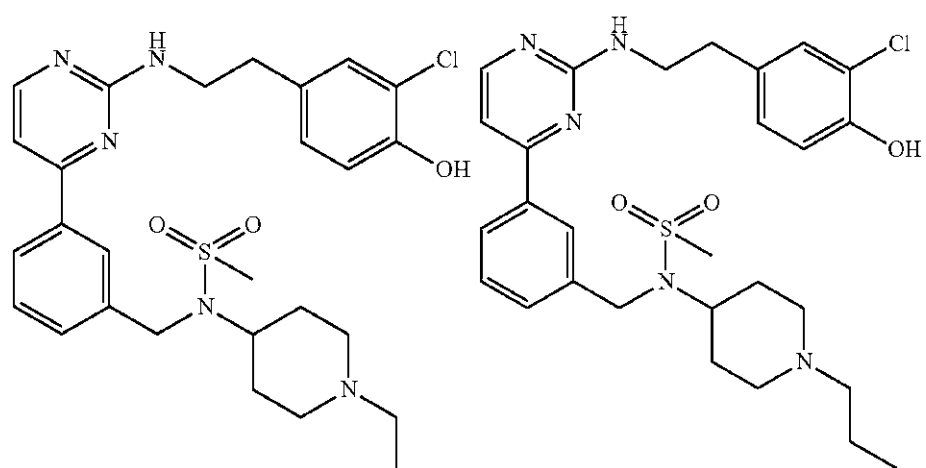
【化 1 1 3】



10



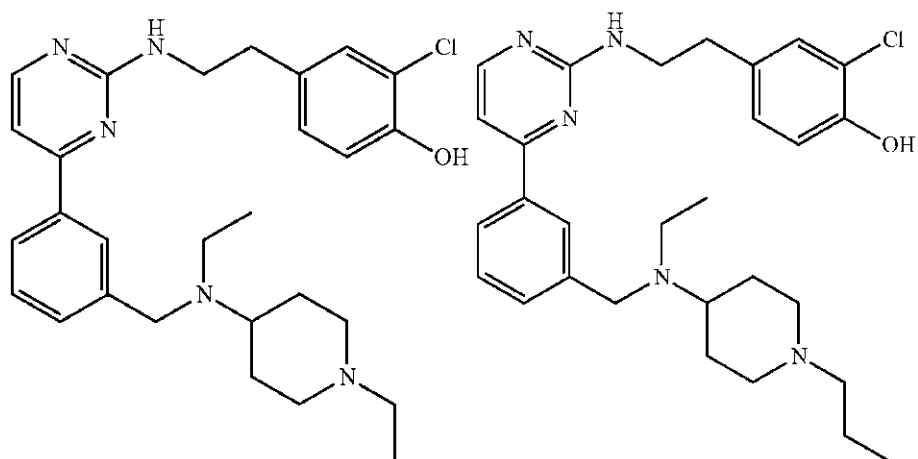
20



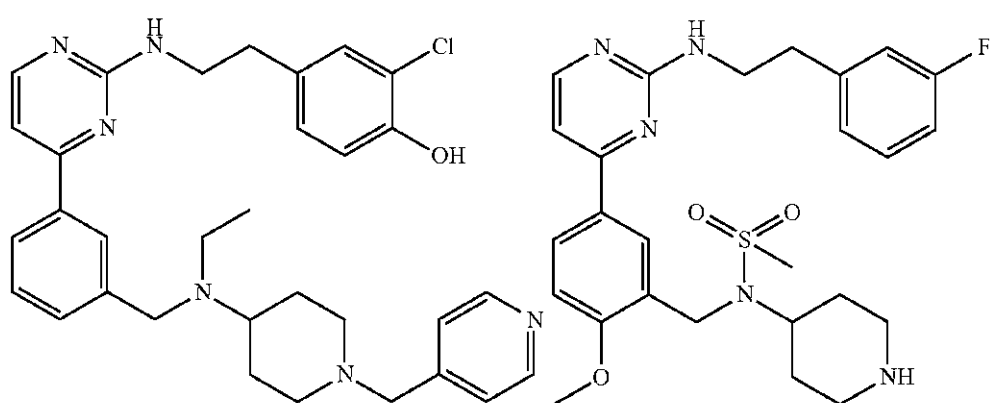
30

40

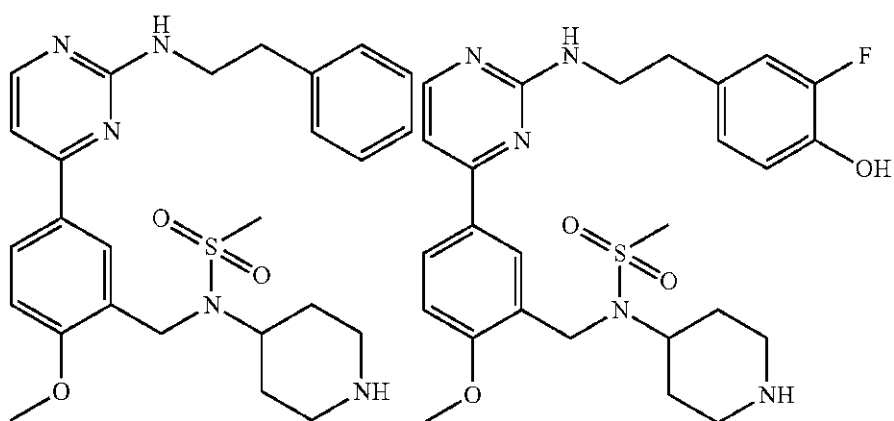
【化 1 1 4】



10



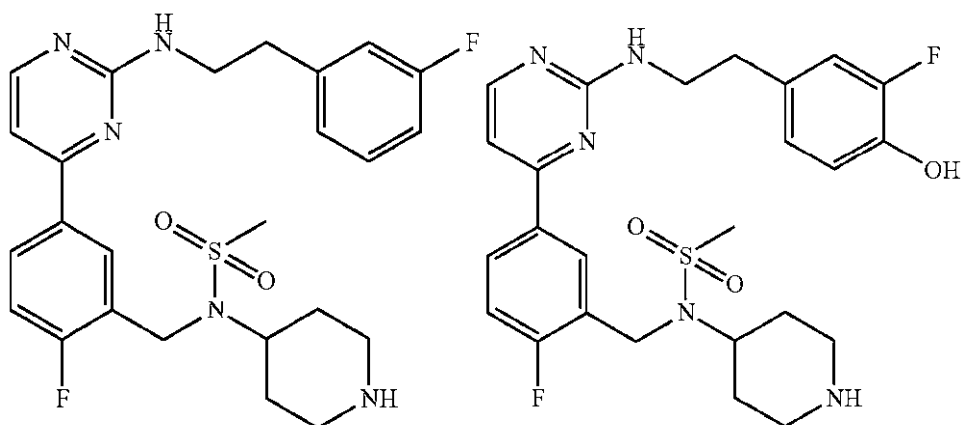
20



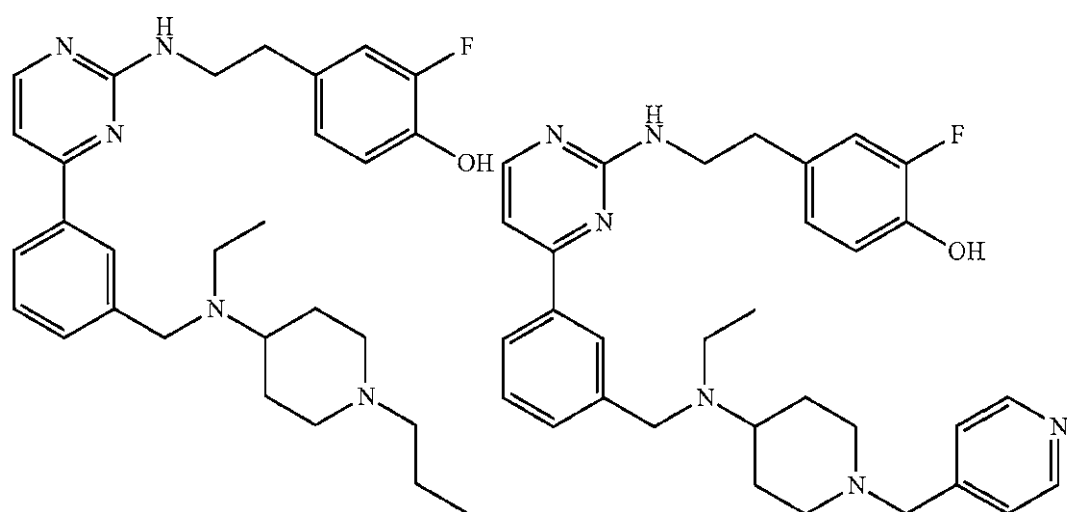
30

40

【化 1 1 5】

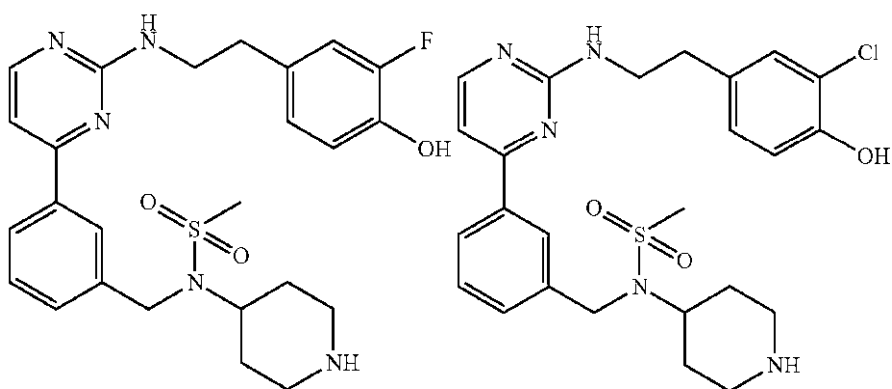


10



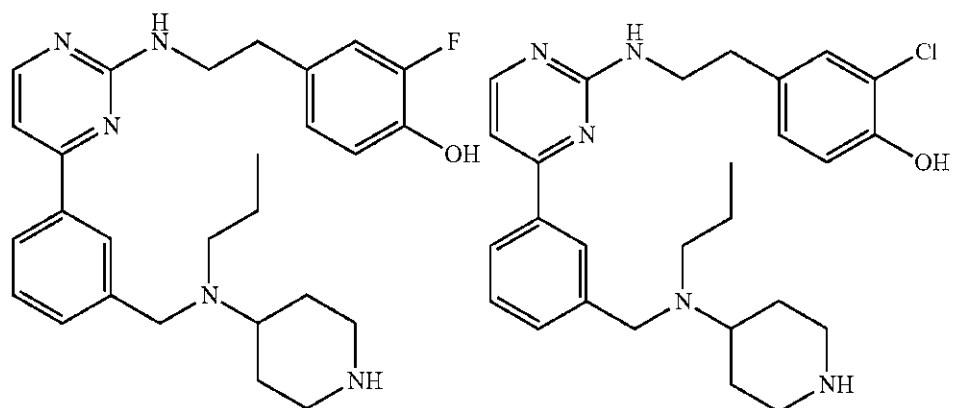
20

30

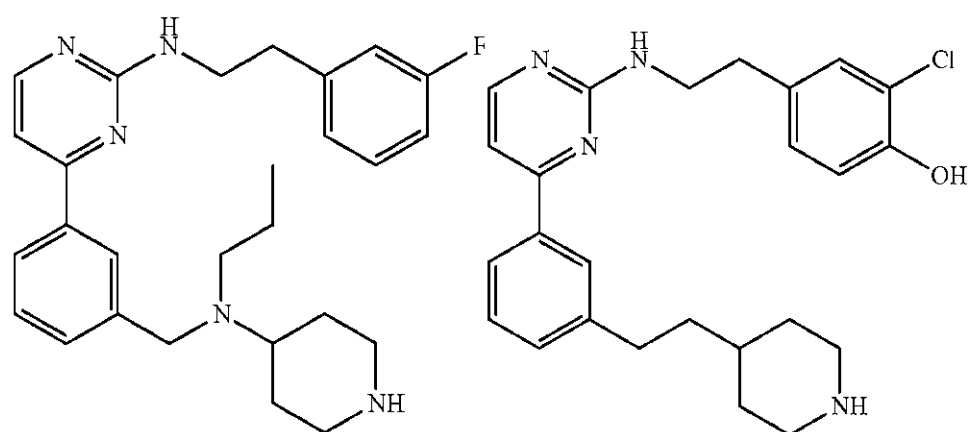


40

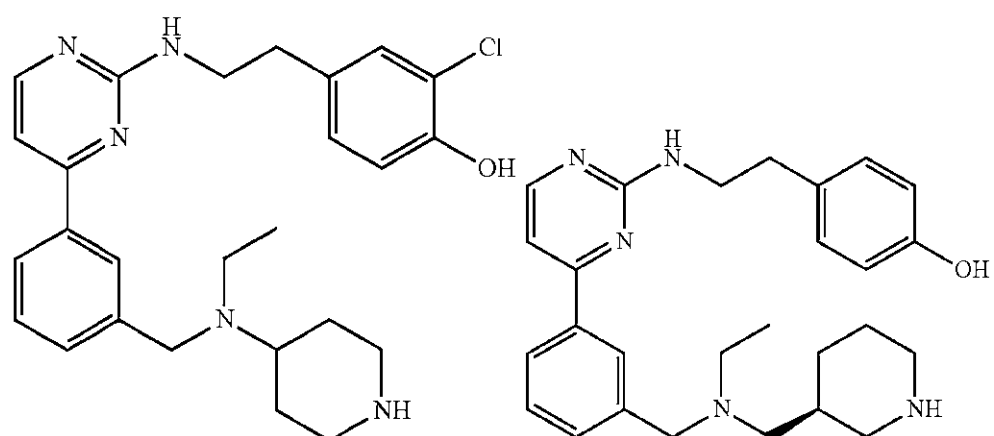
【化 1 1 6】



10



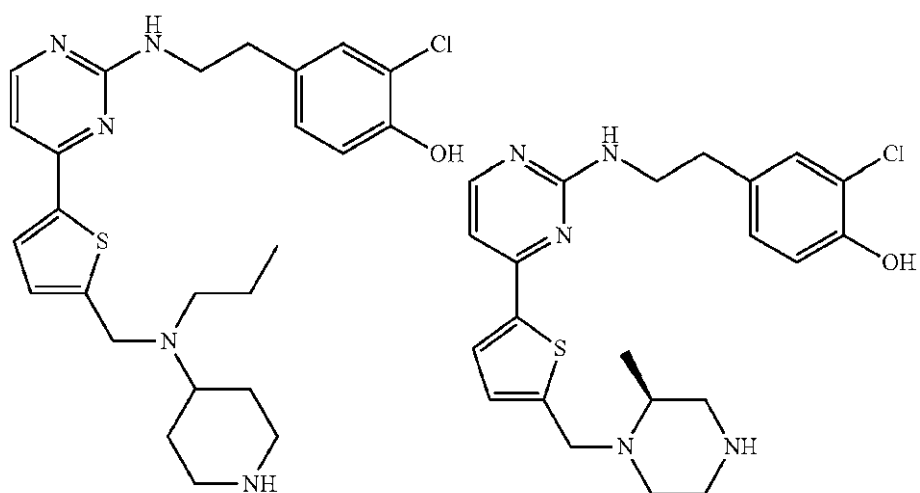
20



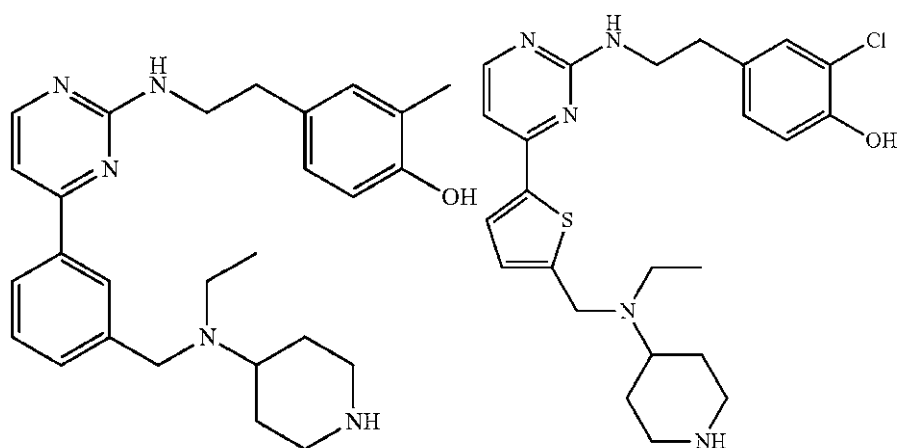
30

40

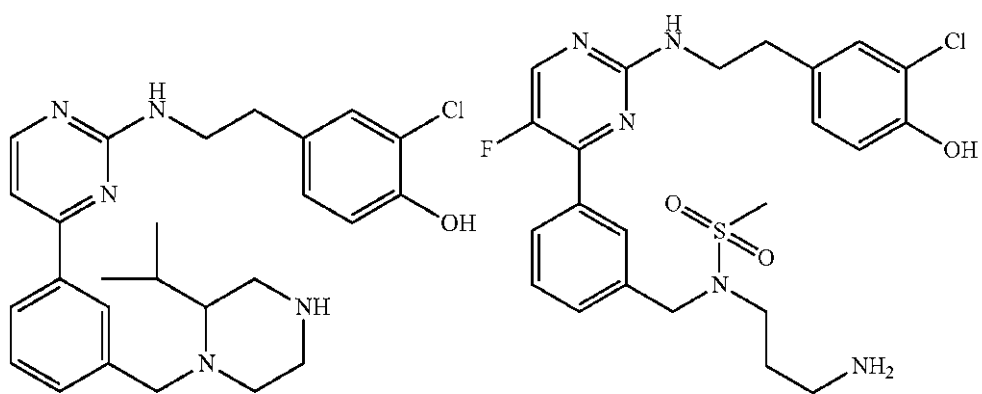
【化 1 1 7】



10



20

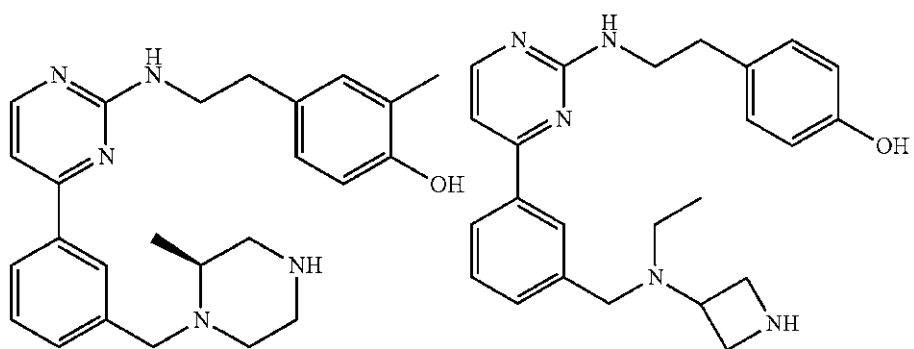


30

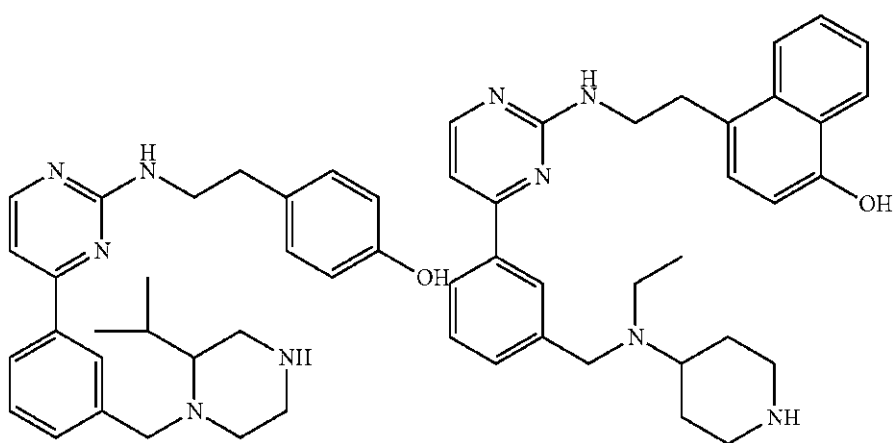


40

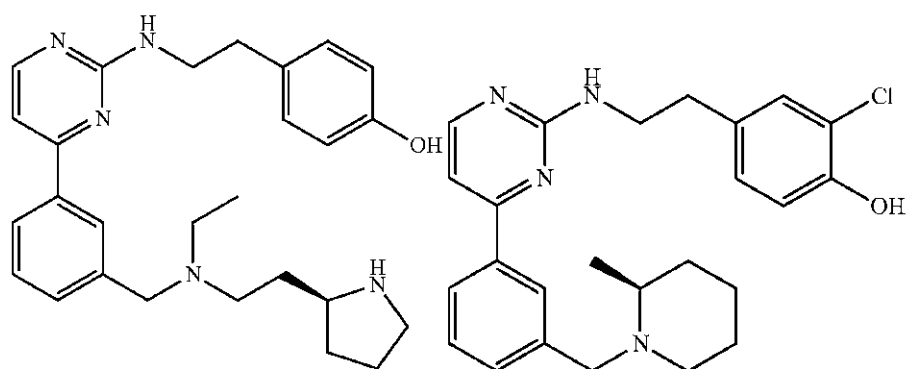
10



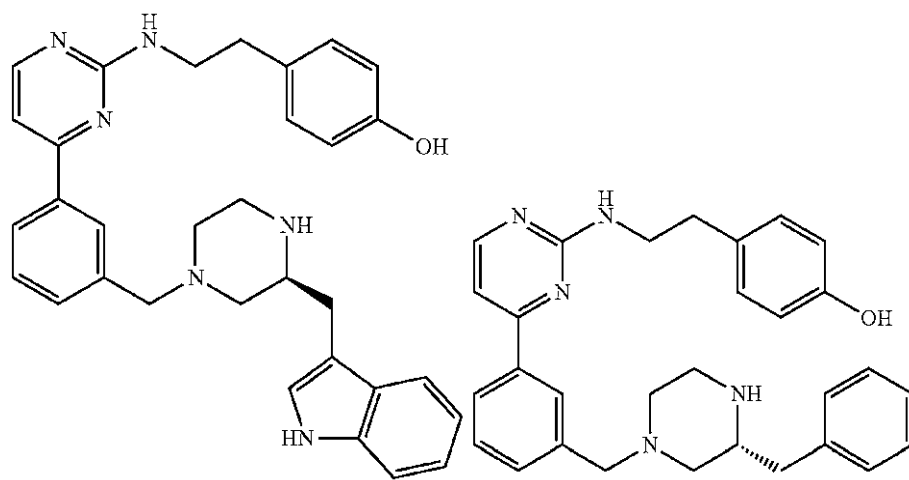
20



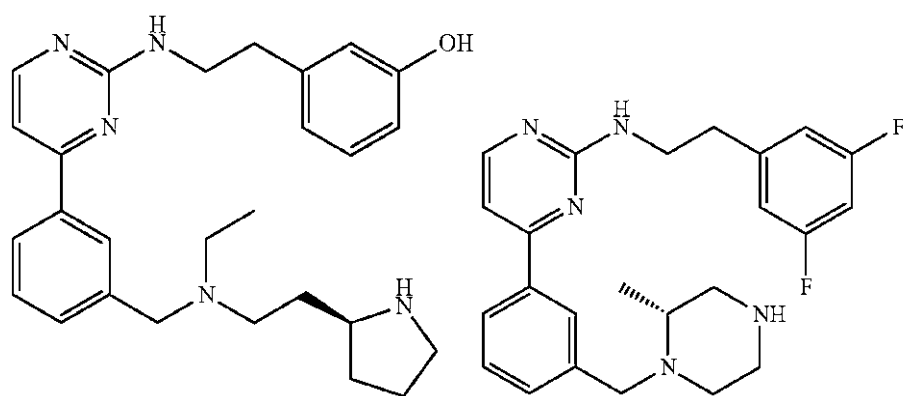
30



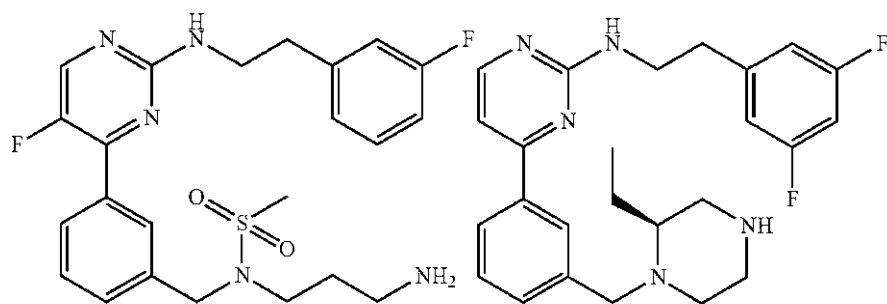
【化 1 1 9】



10

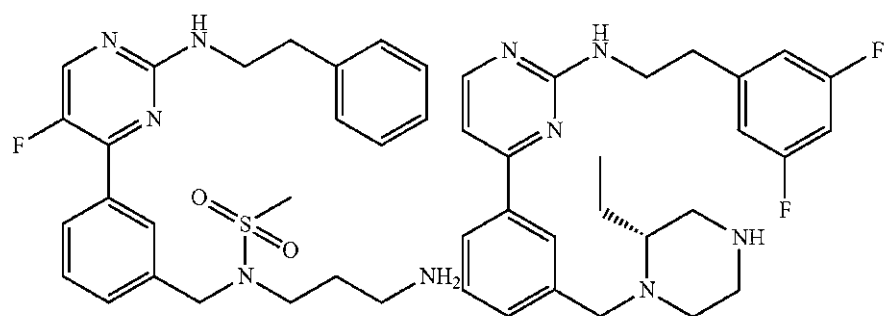


20

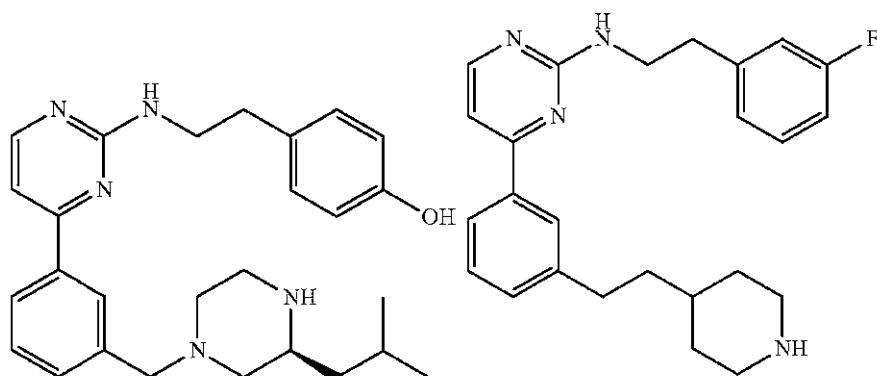


30

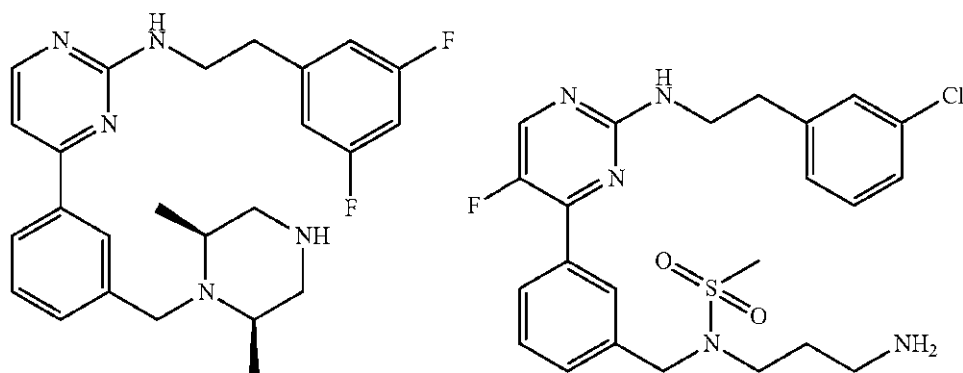
【化 1 2 0】



10

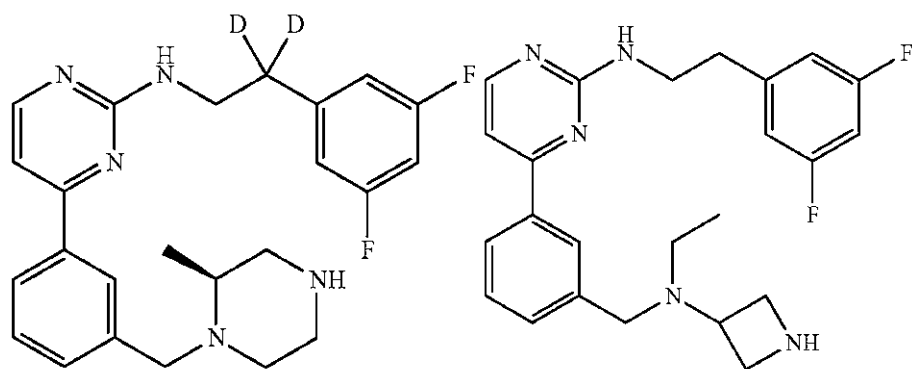


20

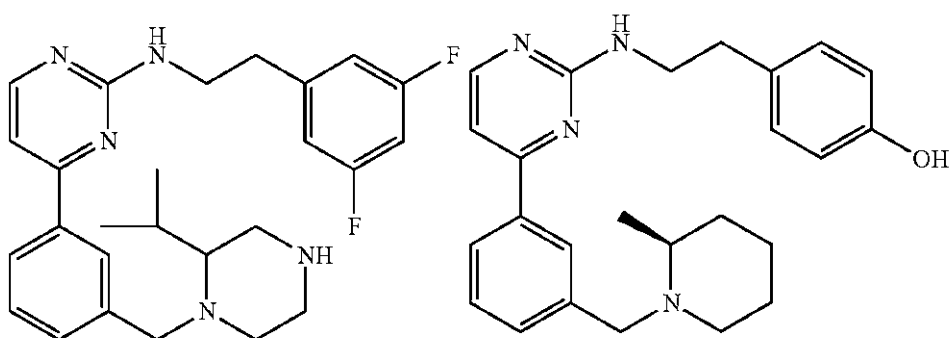


30

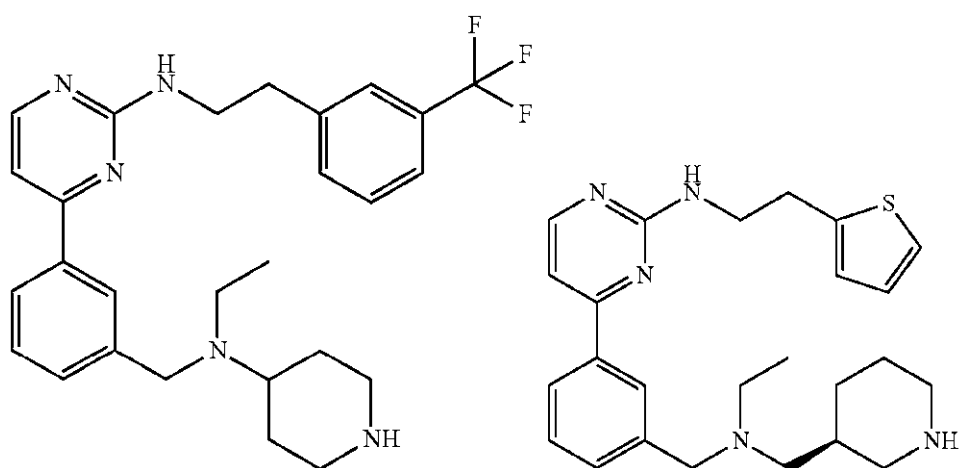
【化 1 2 1】



10

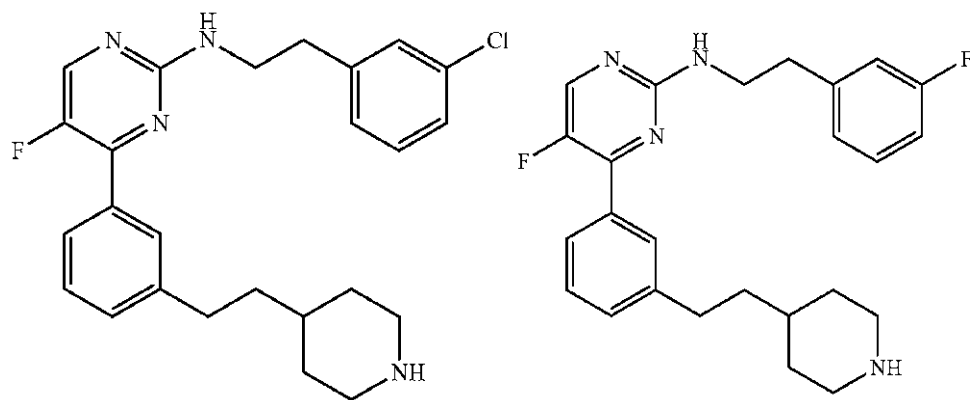


20

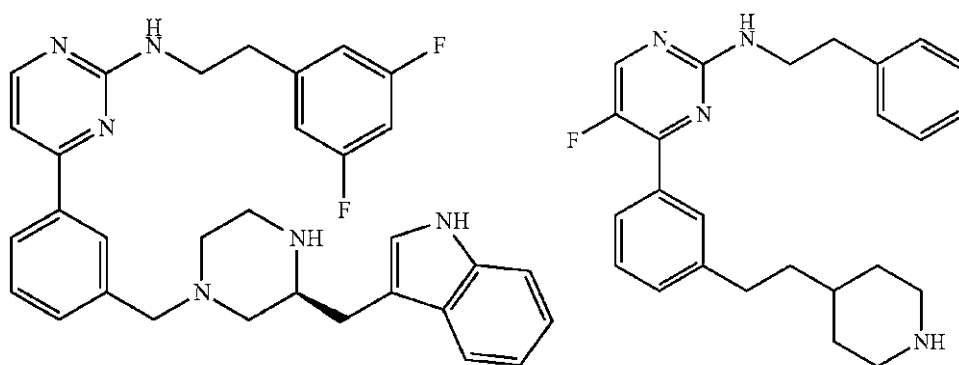


30

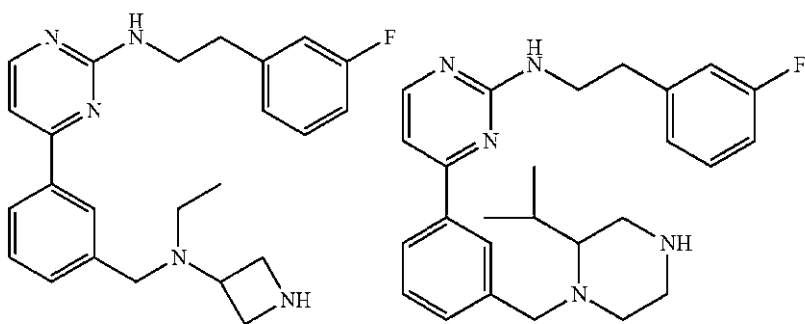
【化 1 2 2】



10

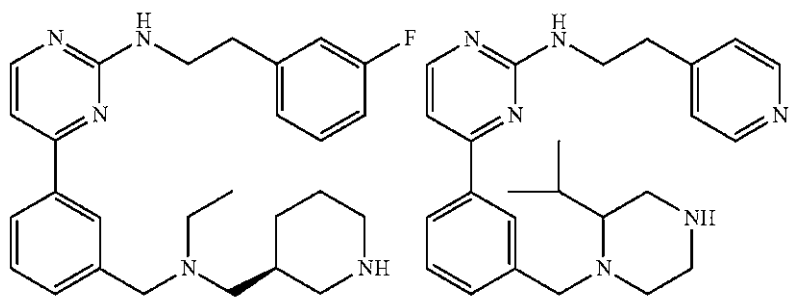


20

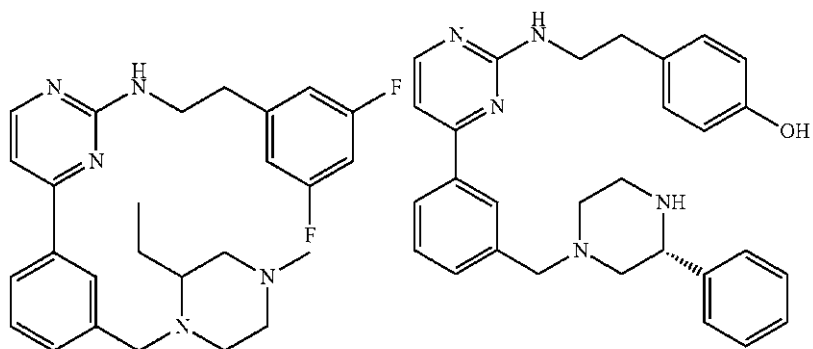


30

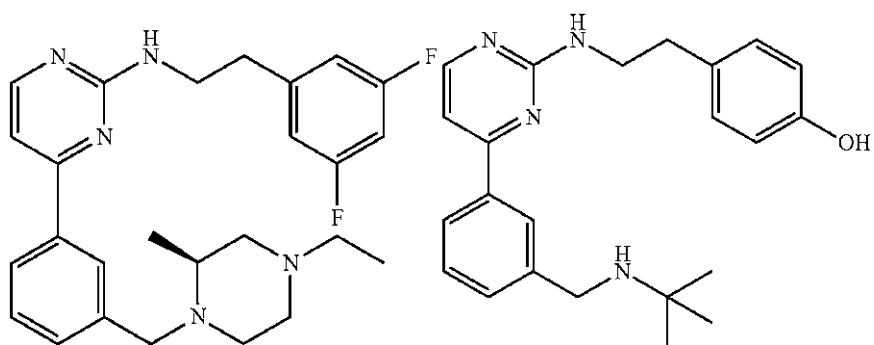
【化 1 2 3】



10

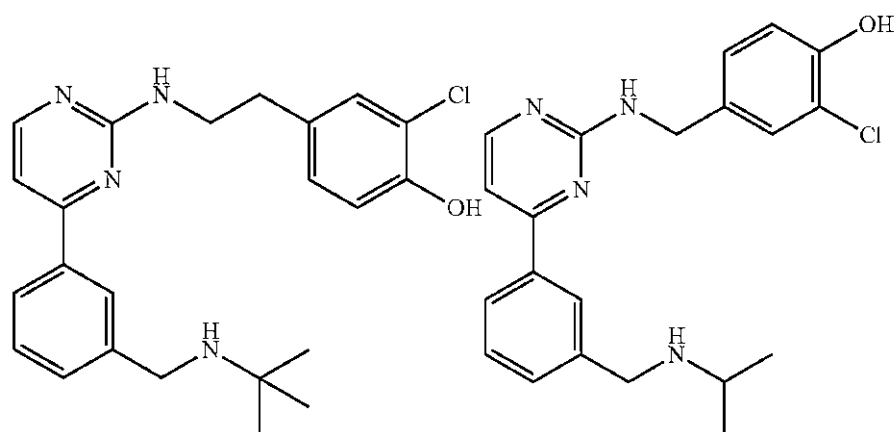


20

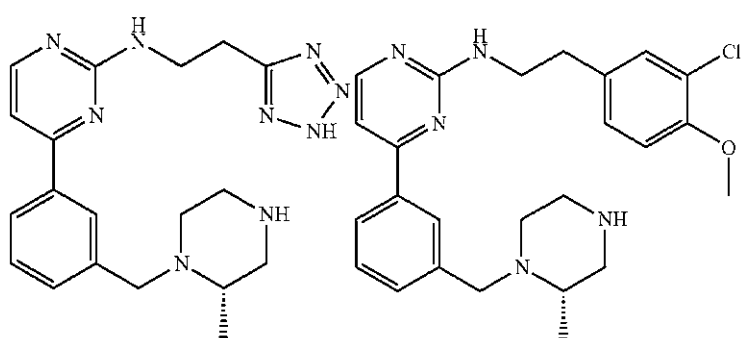


30

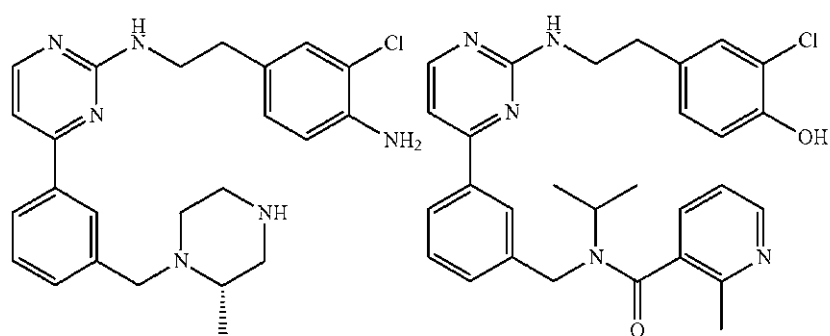
【化 1 2 4】



10

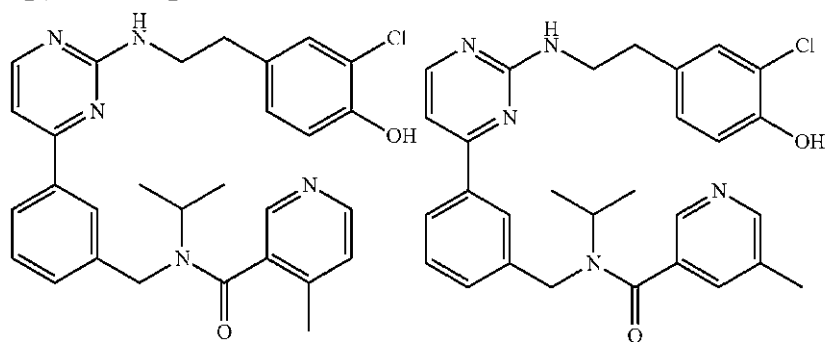


20

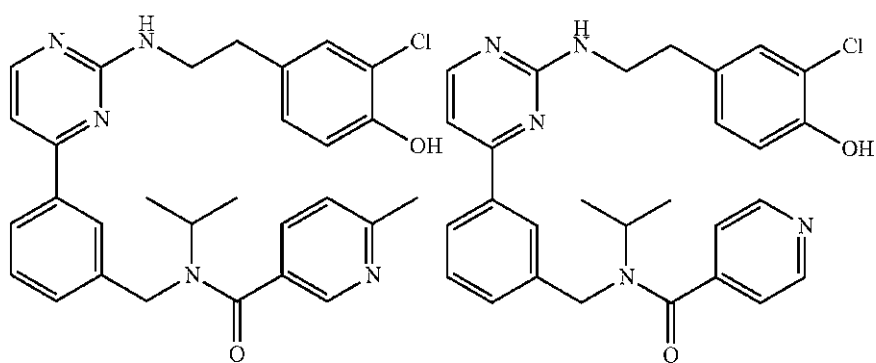


30

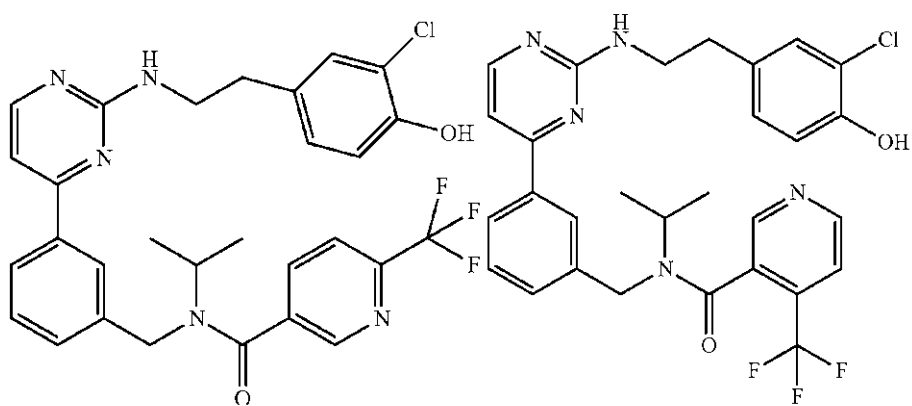
【化 1 2 5】



10

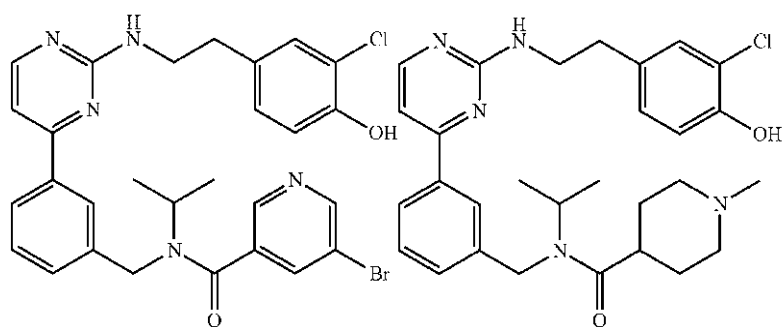


20

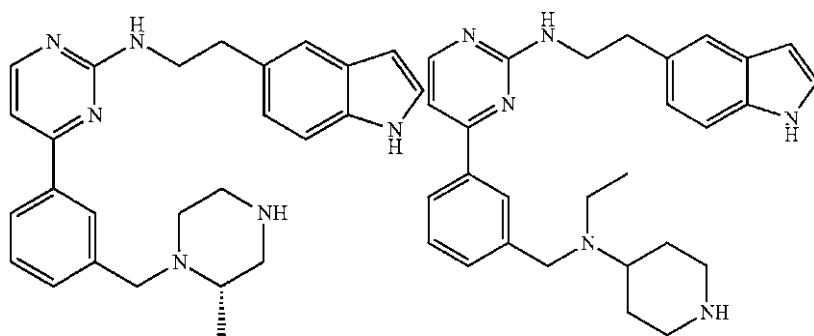


30

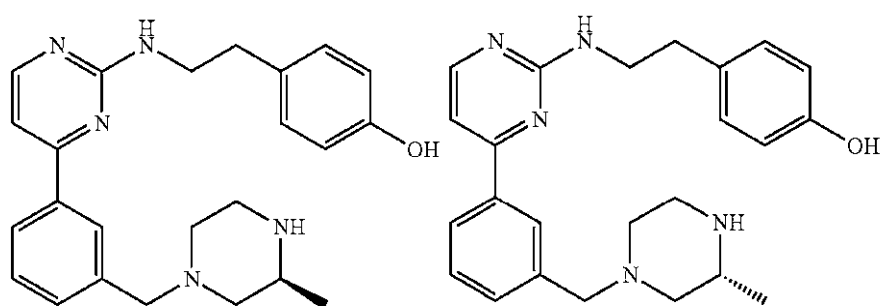
【化 1 2 6】



10

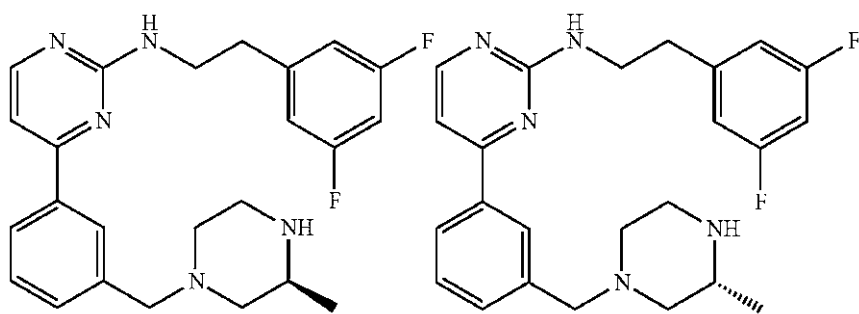


20

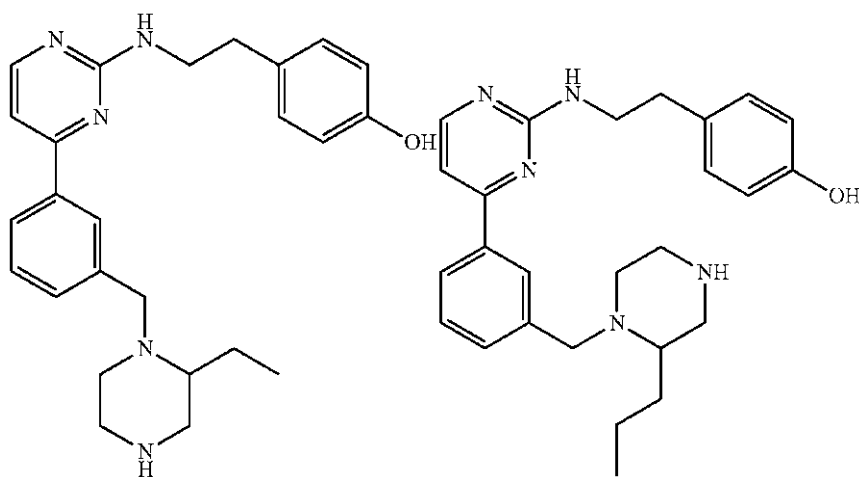


30

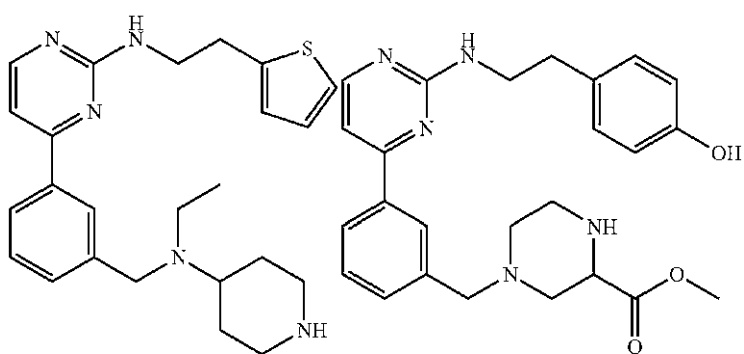
【化 1 2 7】



10

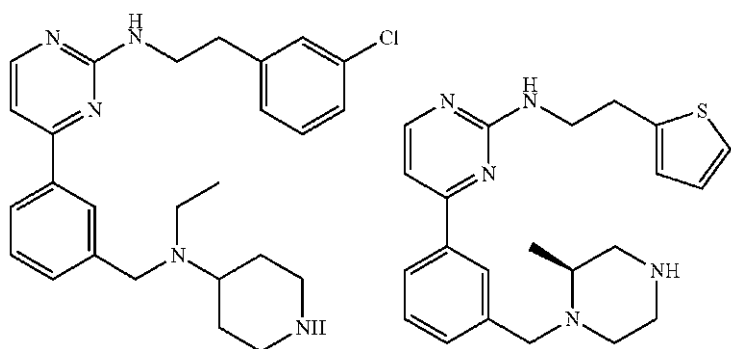


20

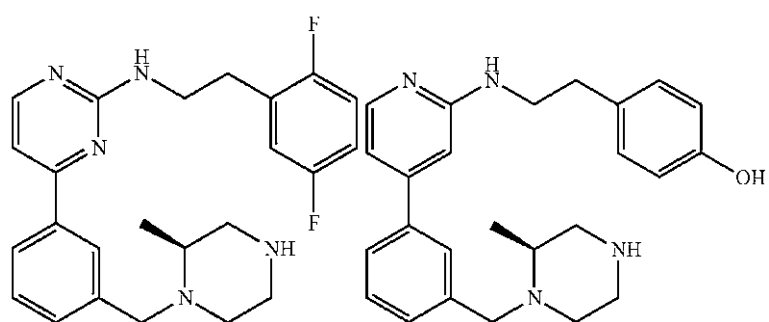


30

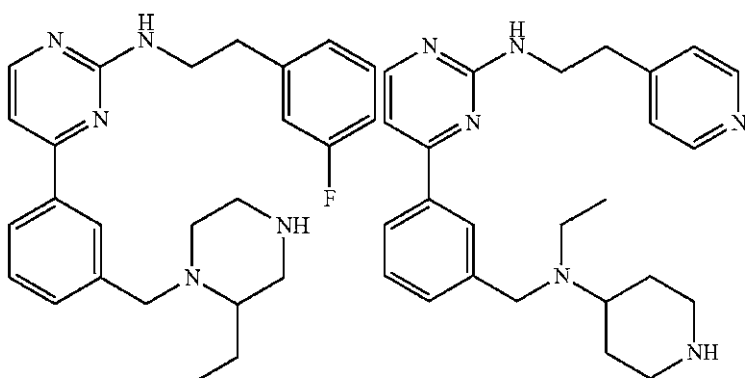
【化 1 2 8】



10

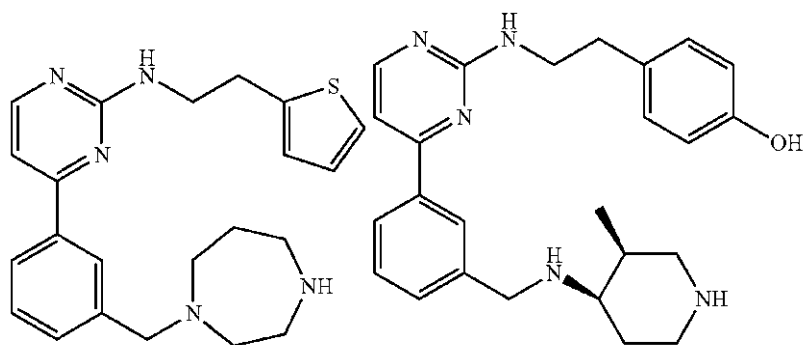


20

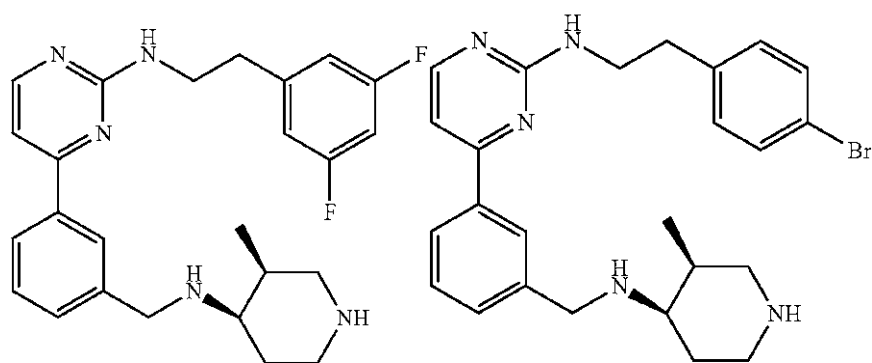


30

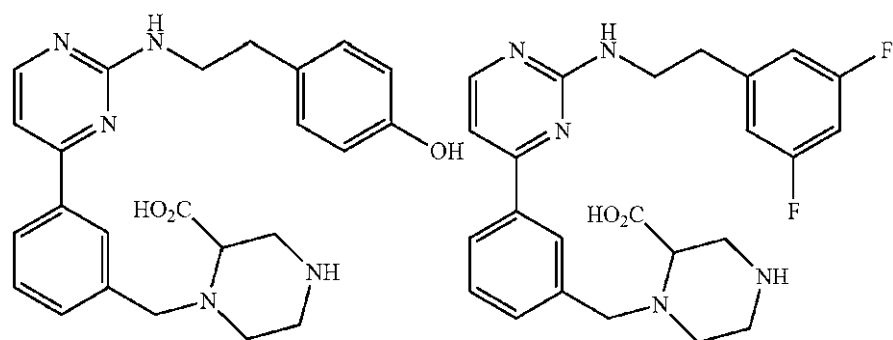
【化 1 2 9】



10

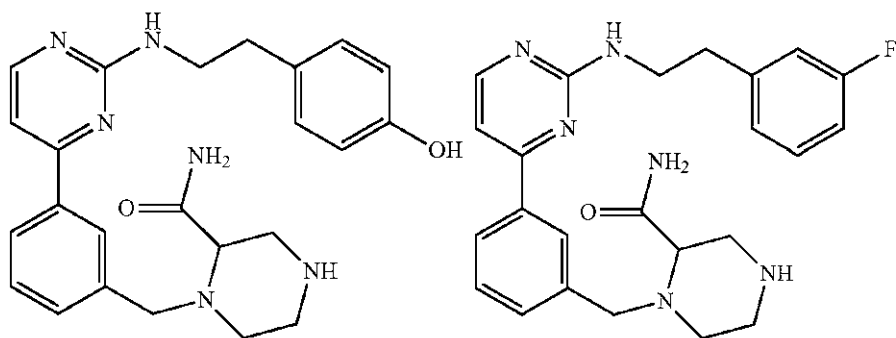


20

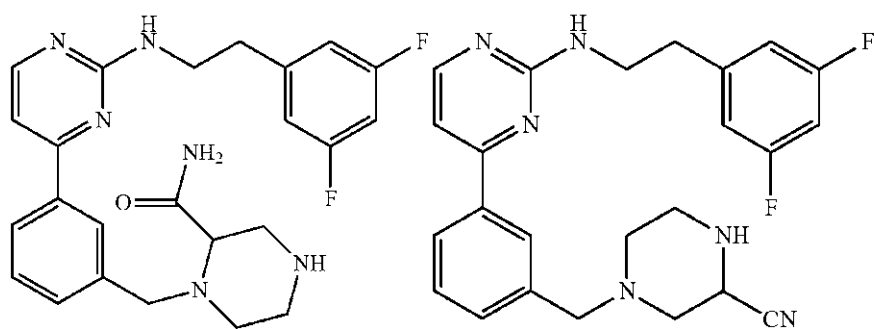


30

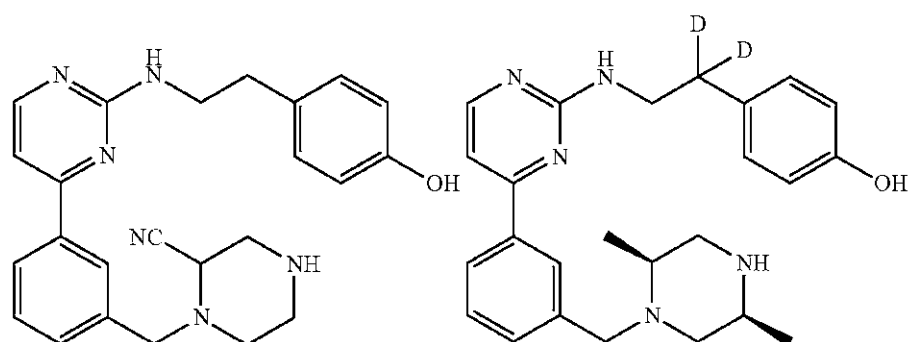
【化 1 3 0】



10

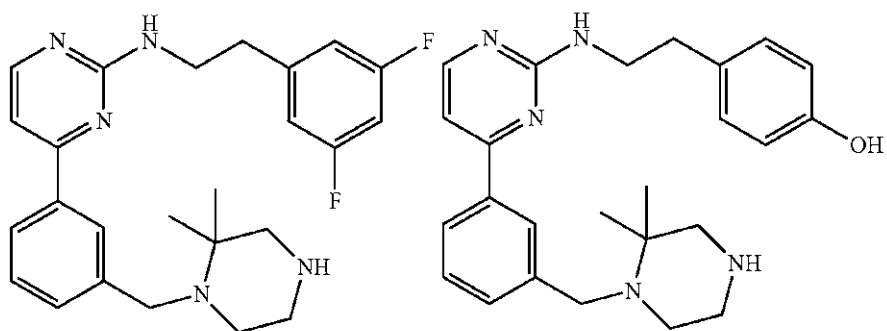


20

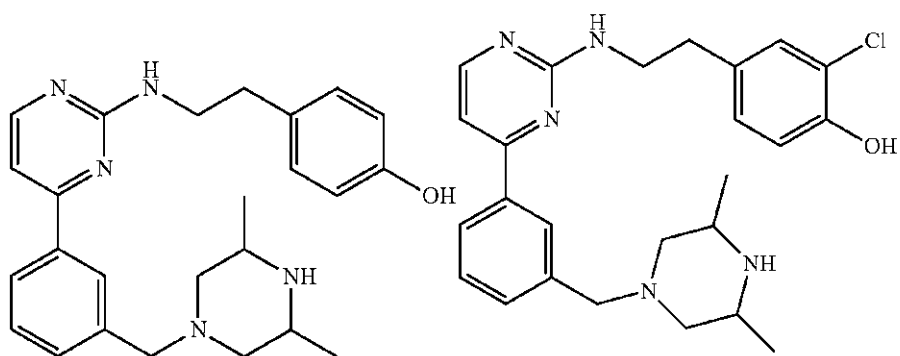


30

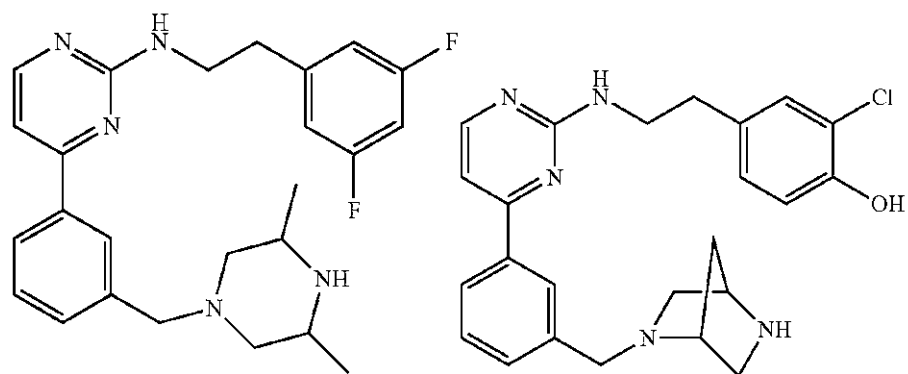
【化 1 3 1】



10

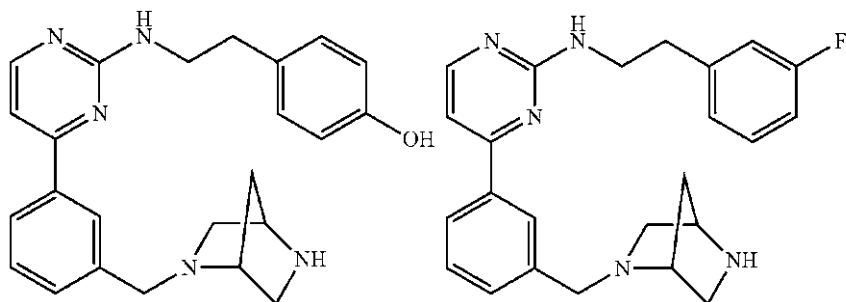


20

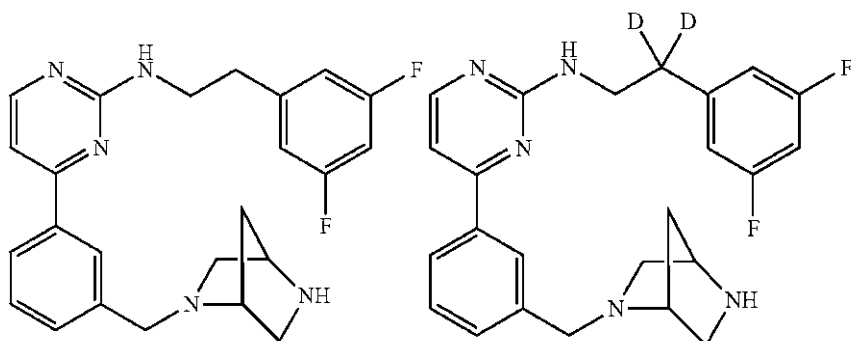


30

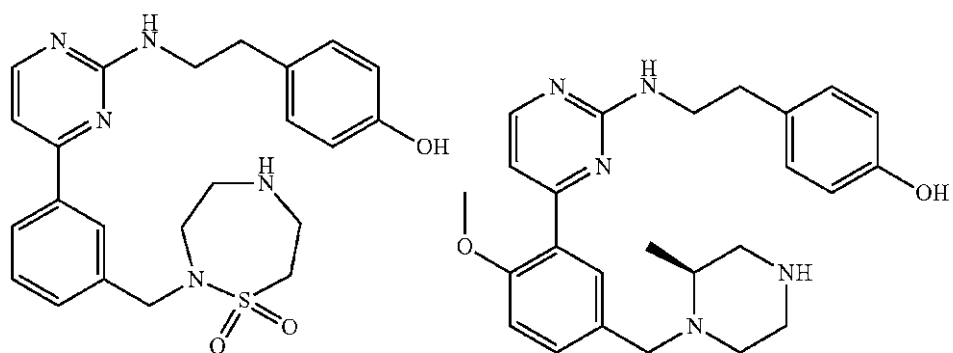
【化 1 3 2】



10

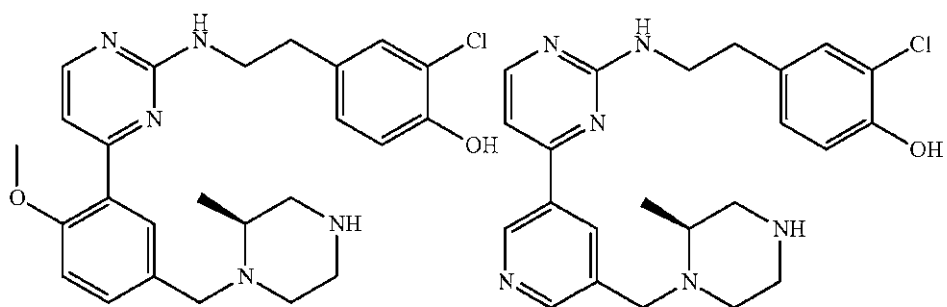


20

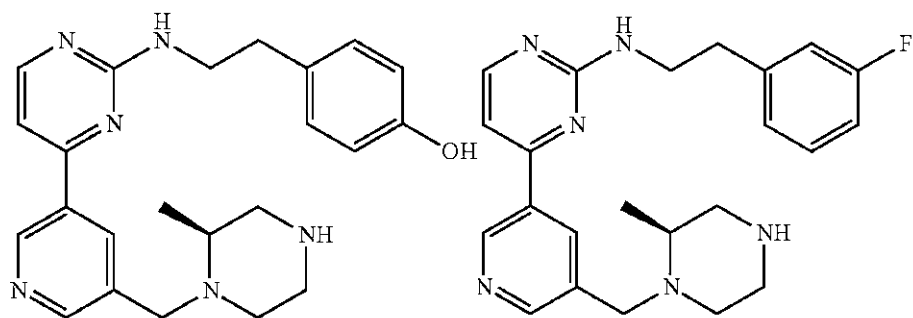


30

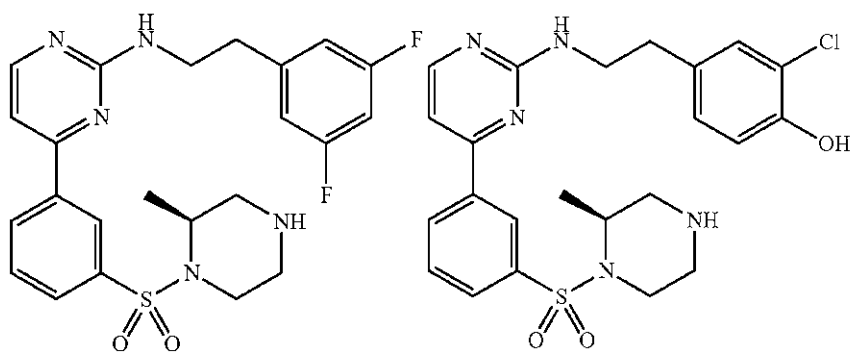
【化 1 3 3】



10

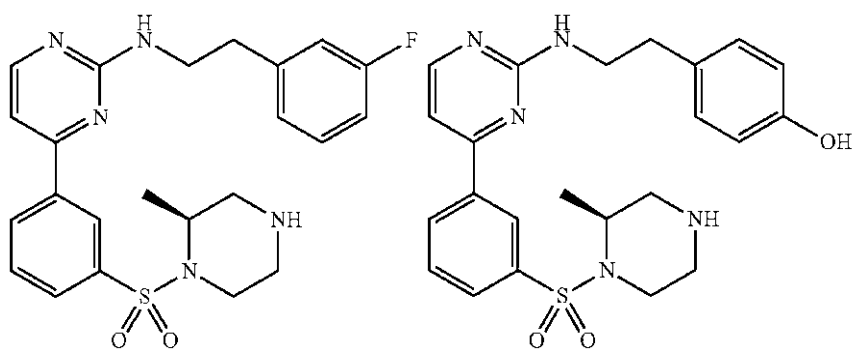


20

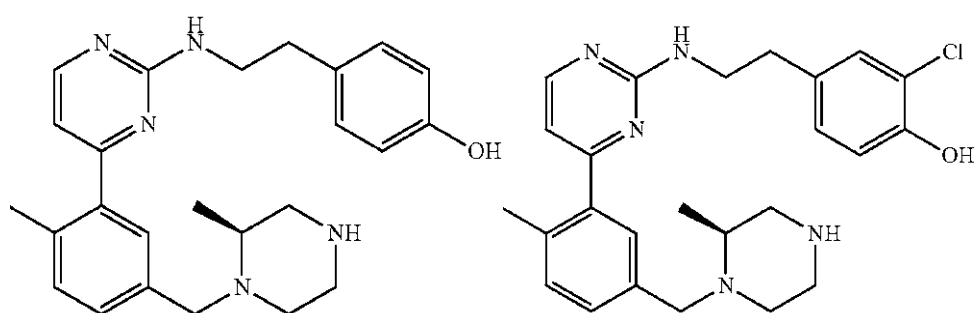


30

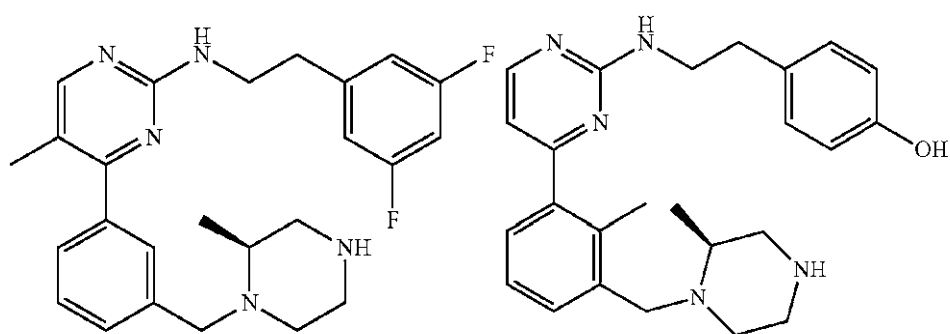
【化 1 3 4】



10

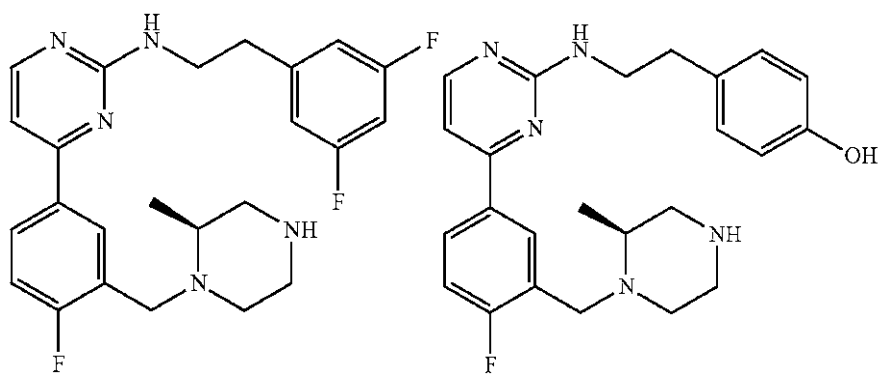


20

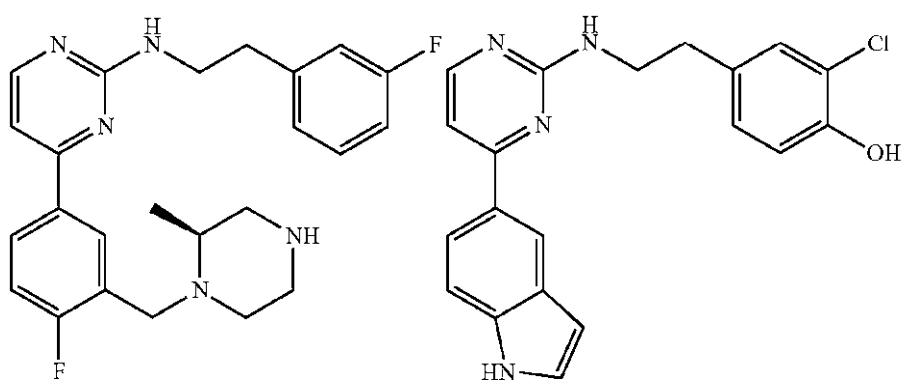


30

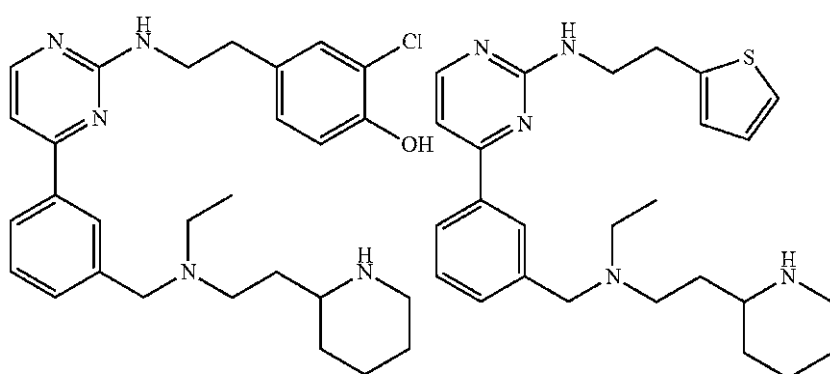
【化 1 3 5】



10

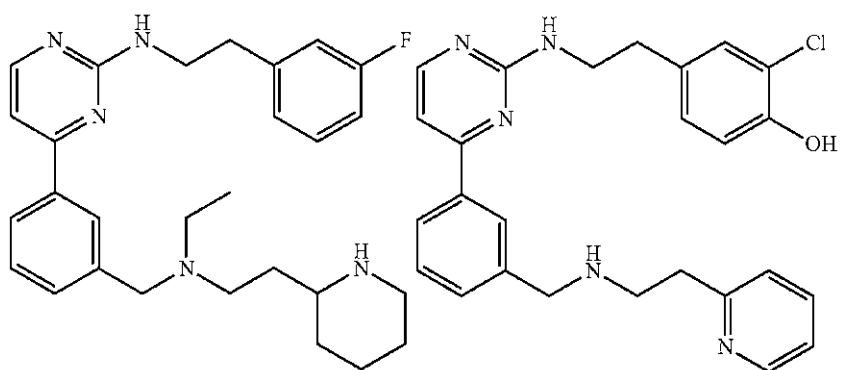


20

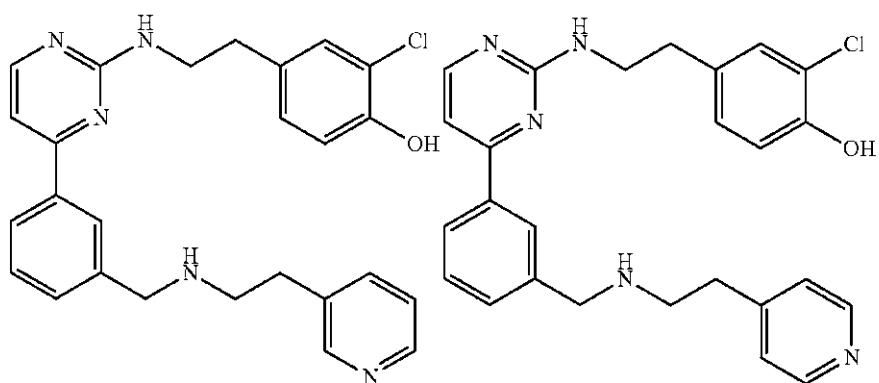


30

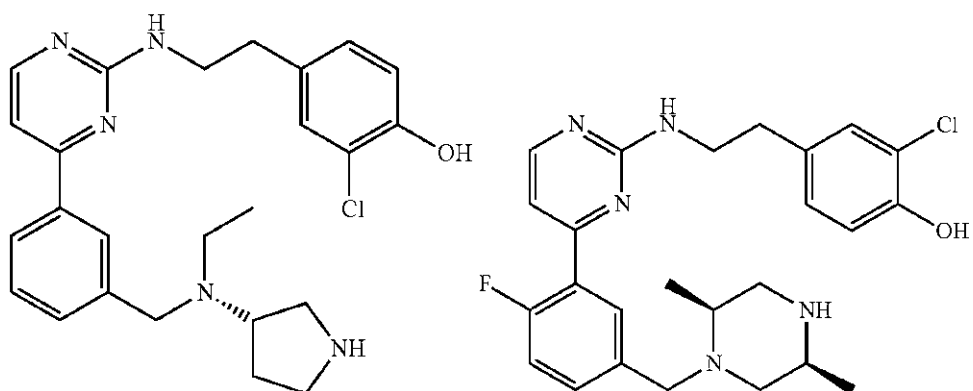
【化 1 3 6】



10

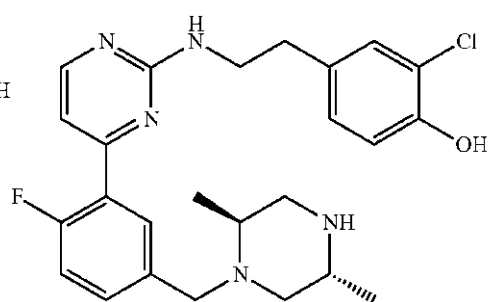
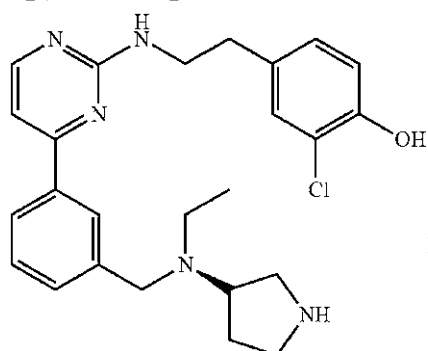


20

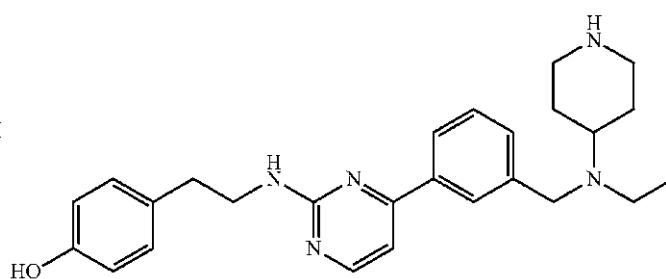
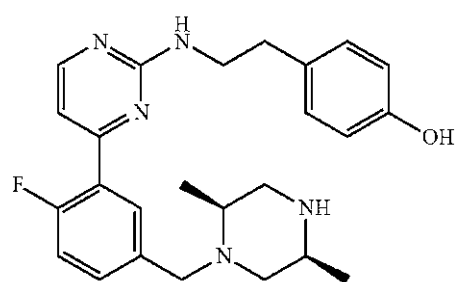


30

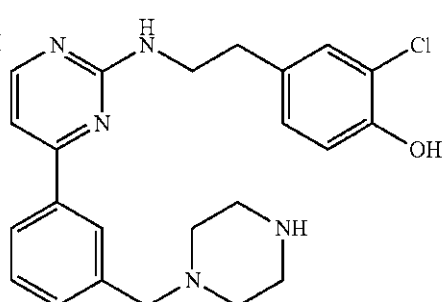
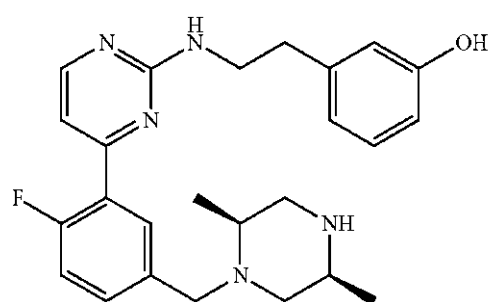
【化 1 3 7】



10

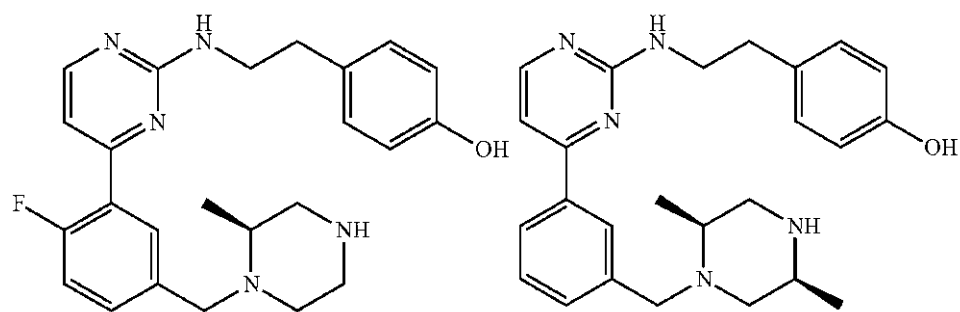


20

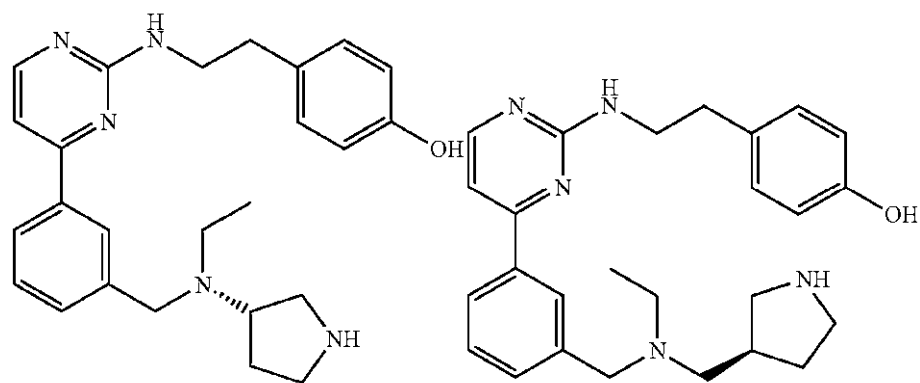


30

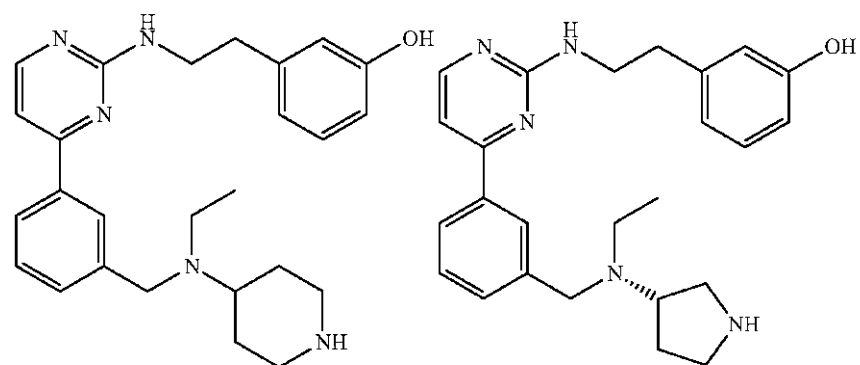
【化 1 3 8】



10

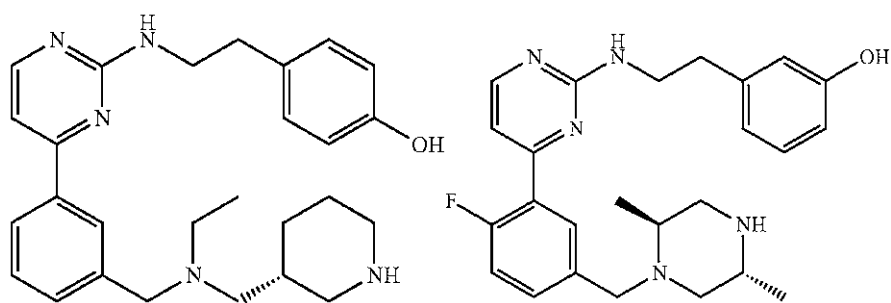


20

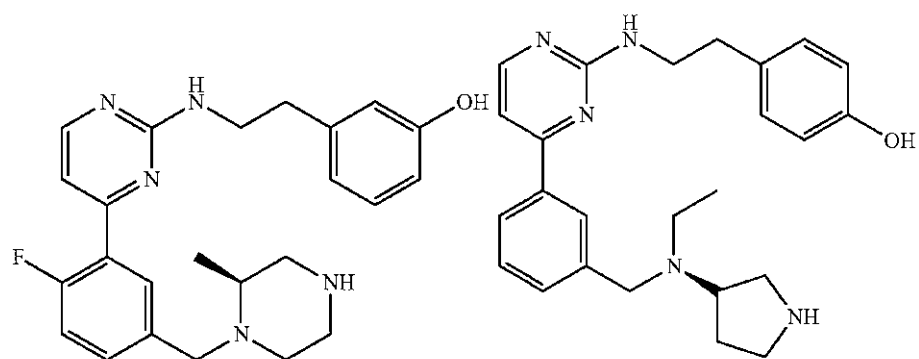


30

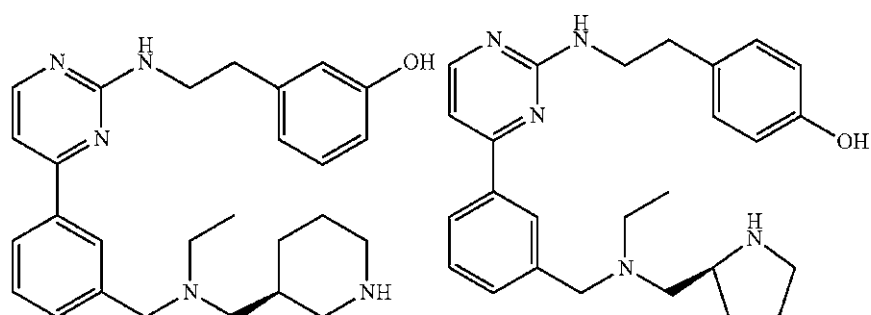
【化 1 3 9】



10

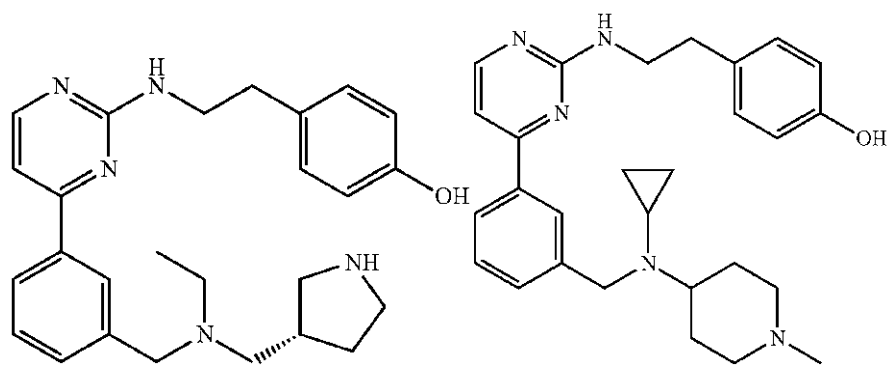


20

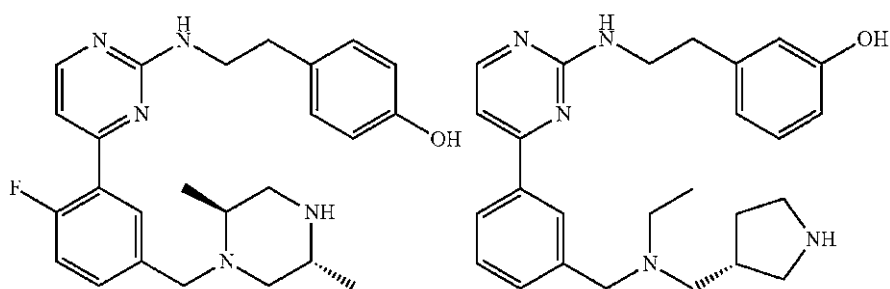


30

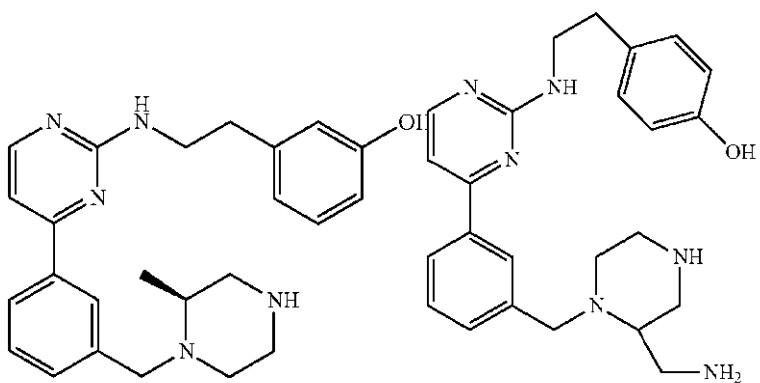
【化 1 4 0】



10

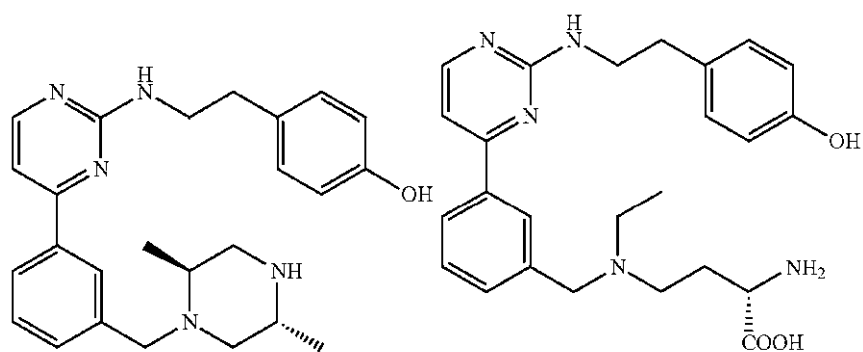


20

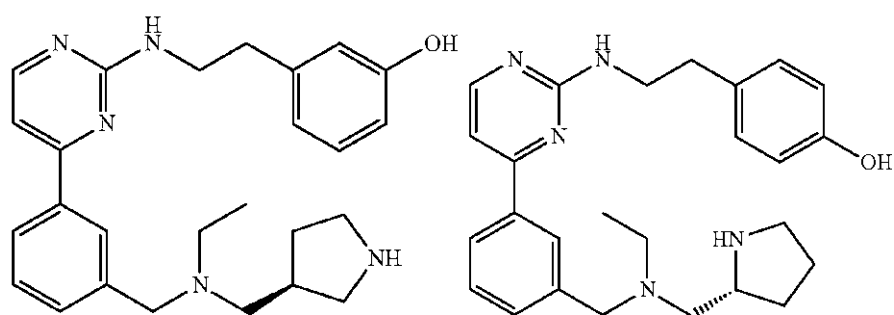


30

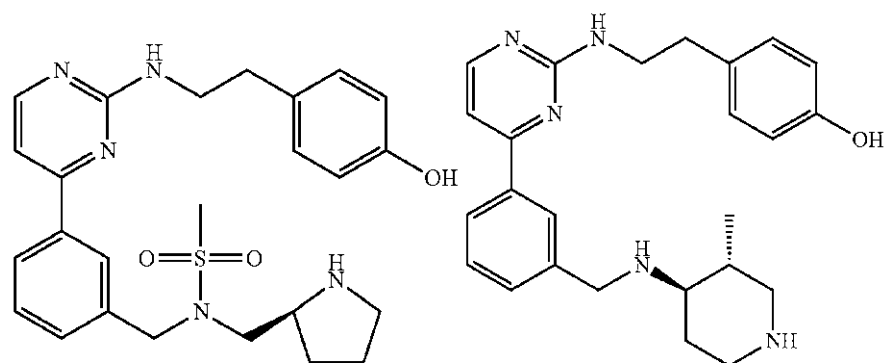
【化 1 4 1】



10

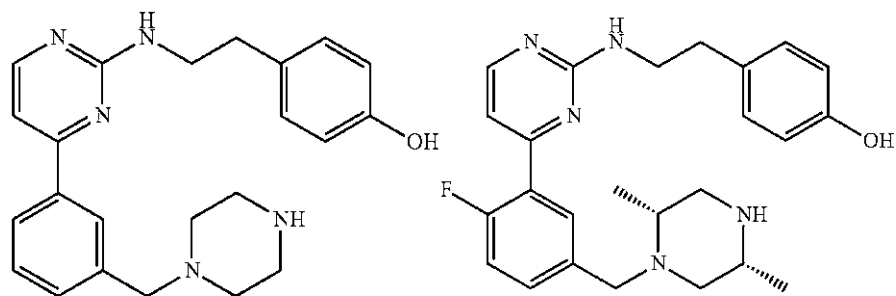


20

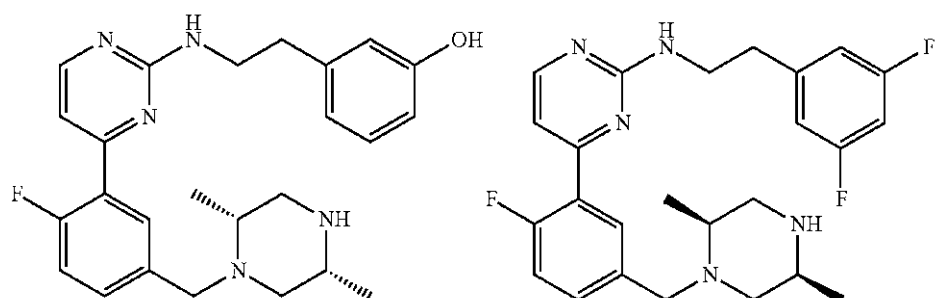


30

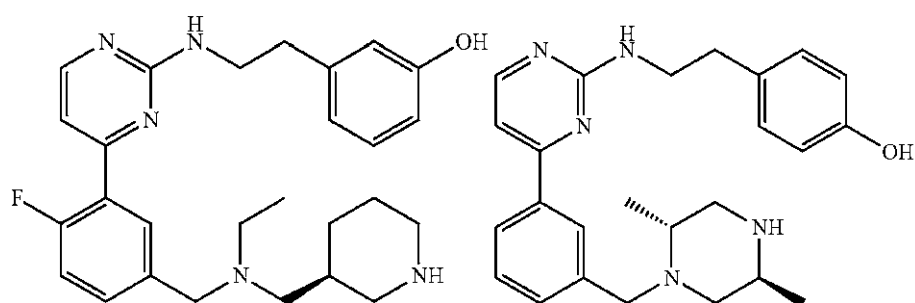
【化 1 4 2】



10

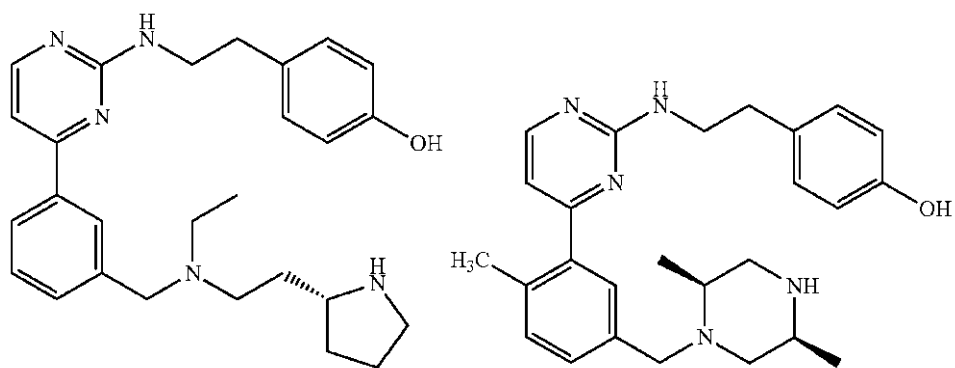


20

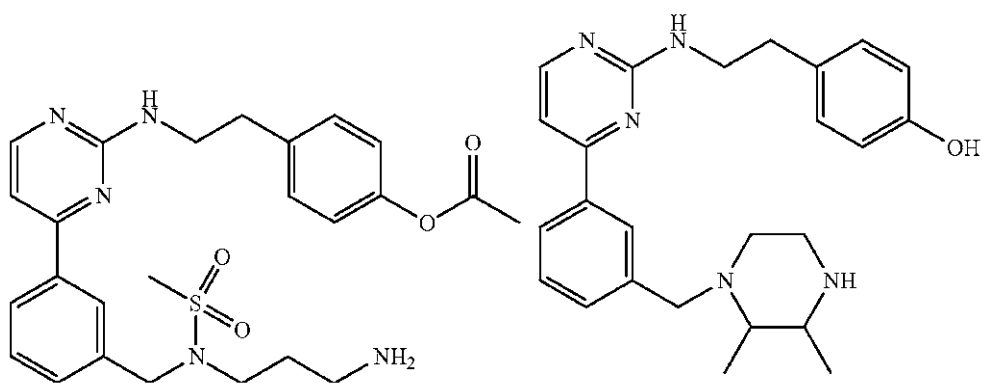


30

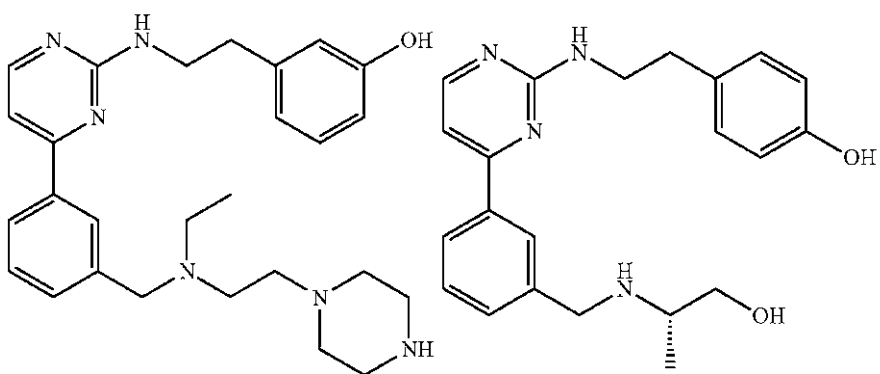
【化 1 4 3】



10

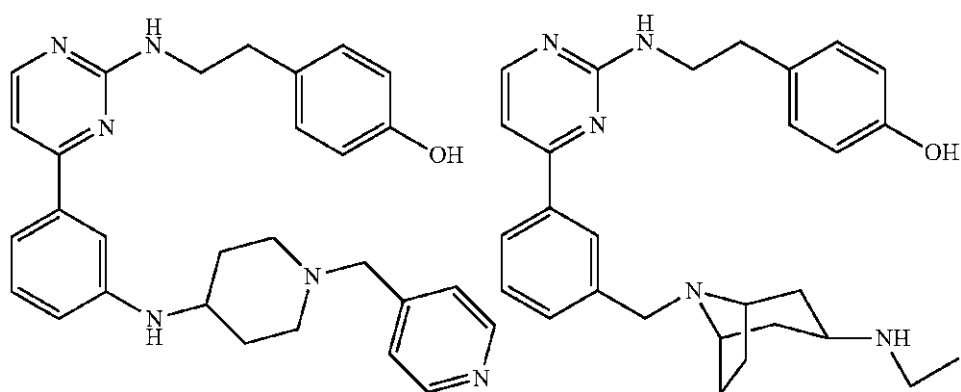
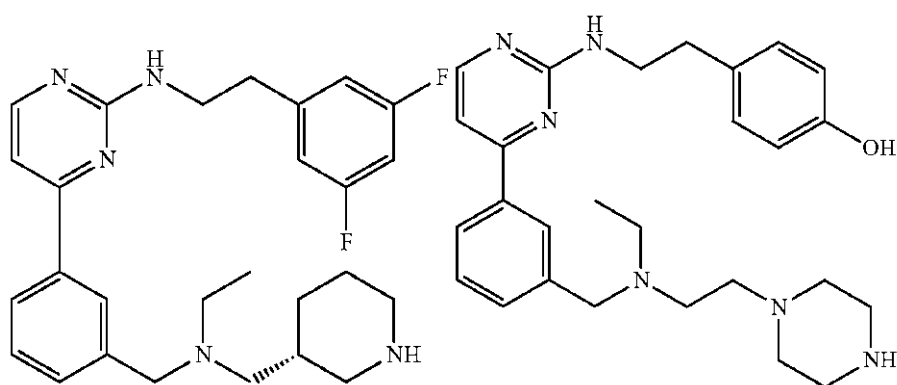
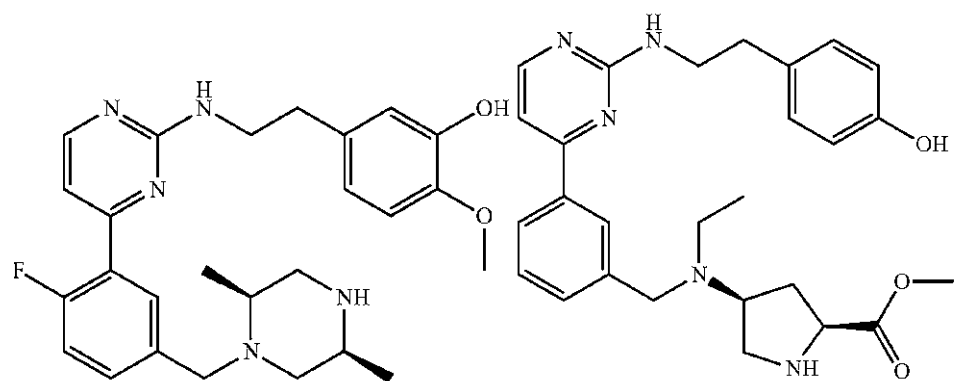


20

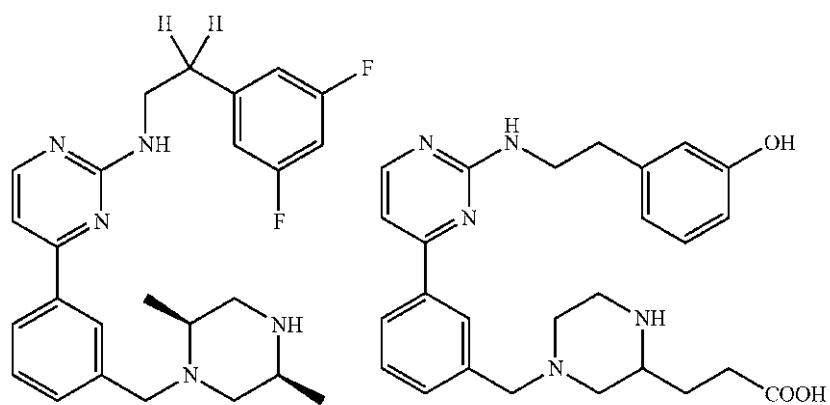


30

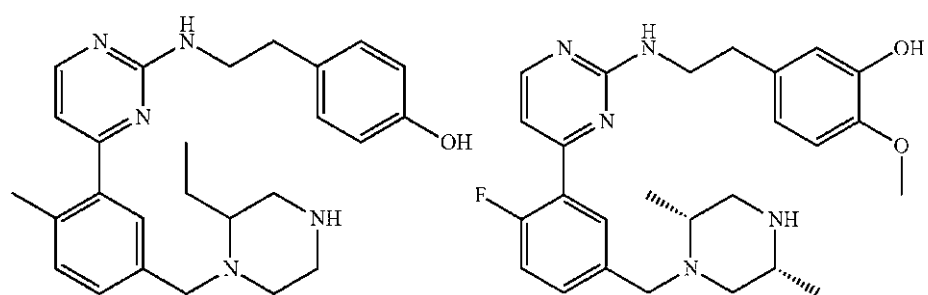
【化 1 4 4】



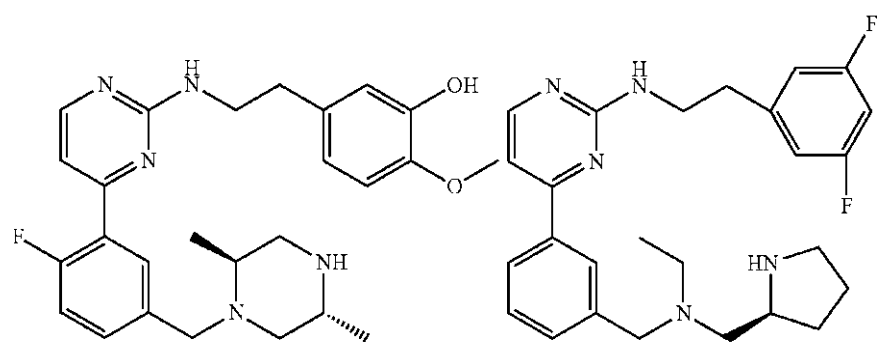
【化 1 4 5】



10

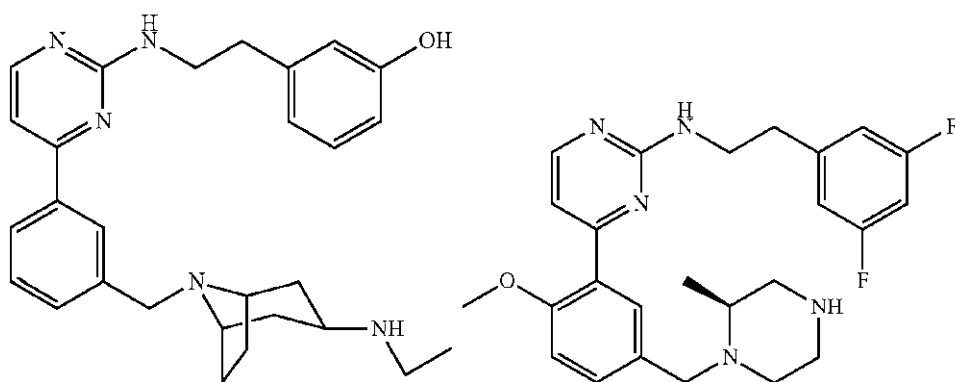


20

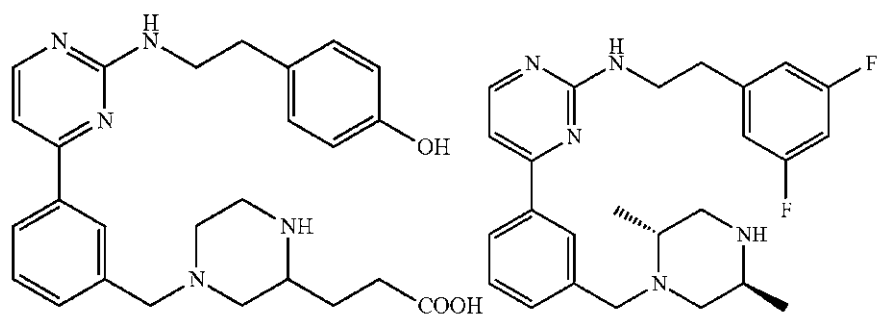


30

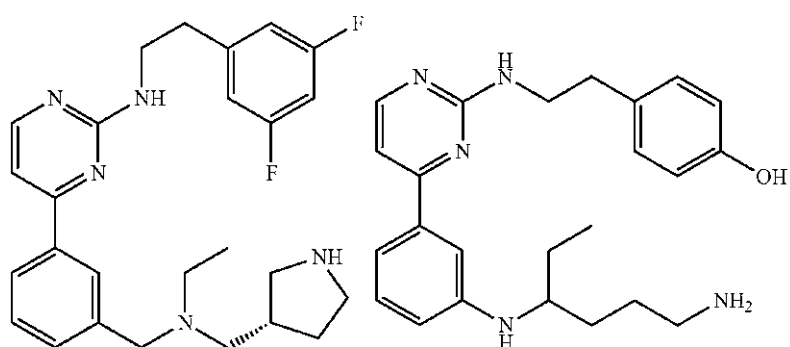
【化 1 4 6】



10

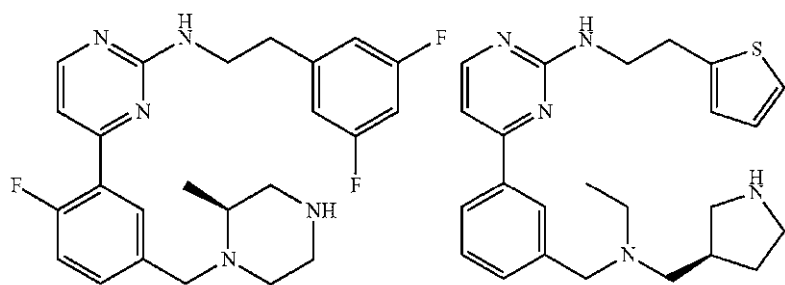


20

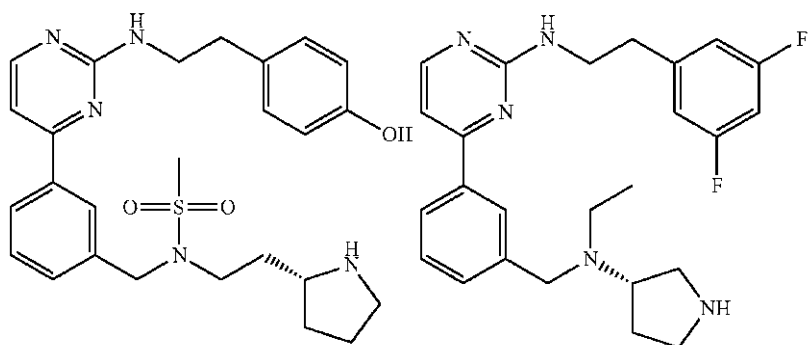


30

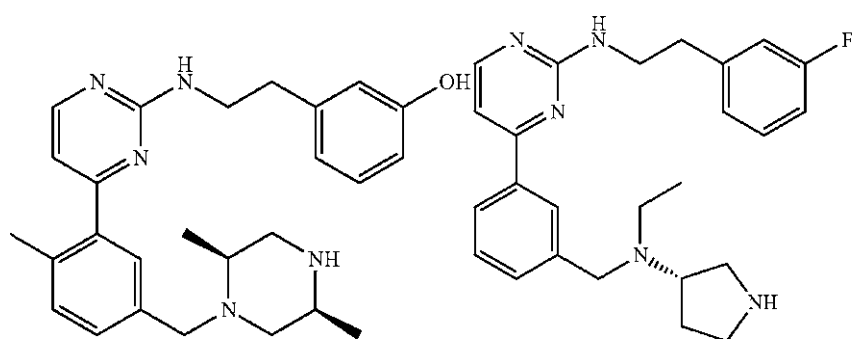
【化 1 4 7】



10

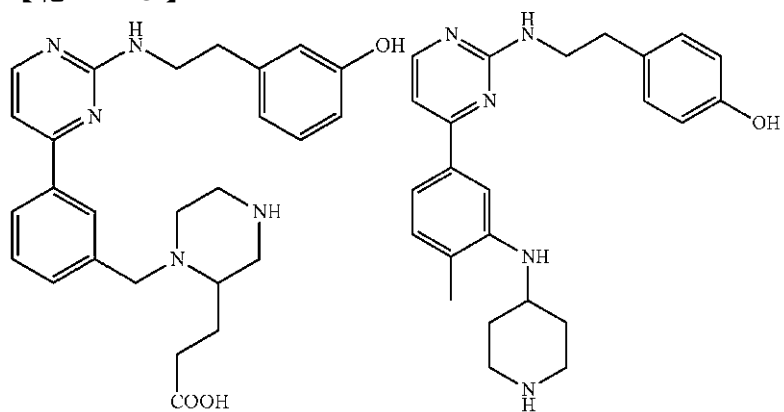


20

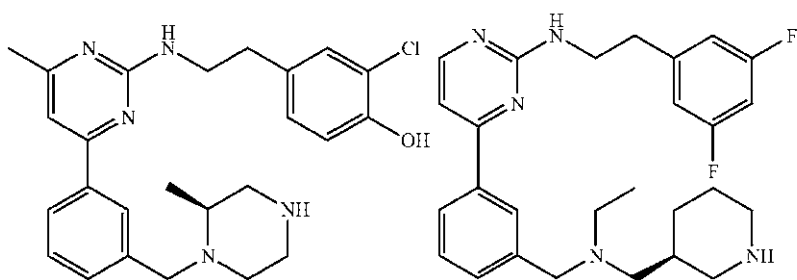


30

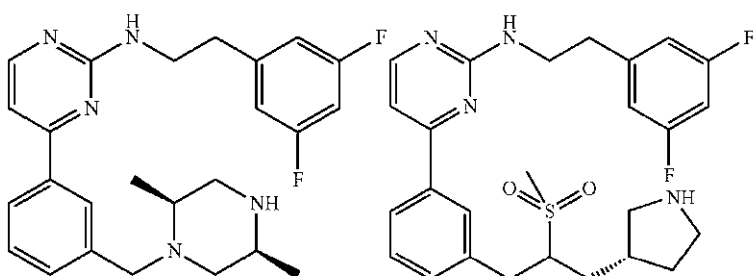
【化 1 4 8】



10

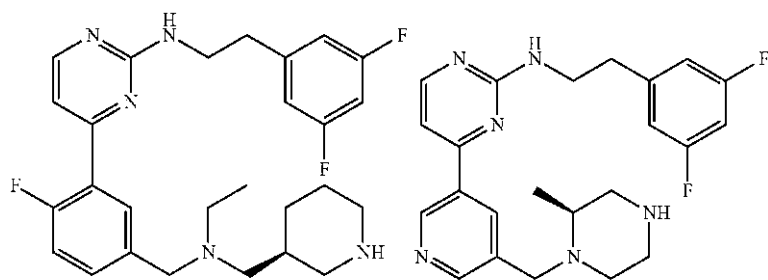


20

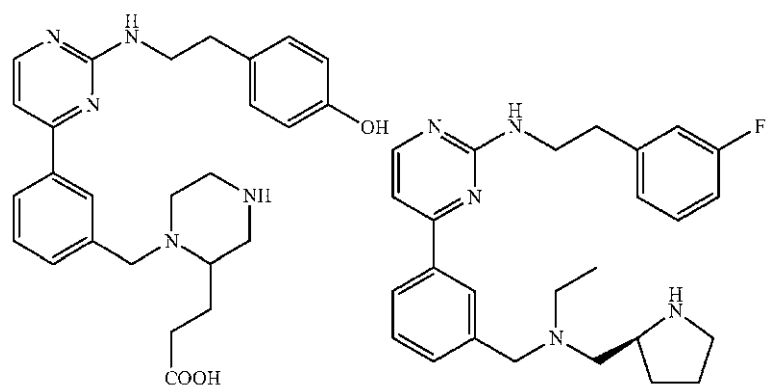


30

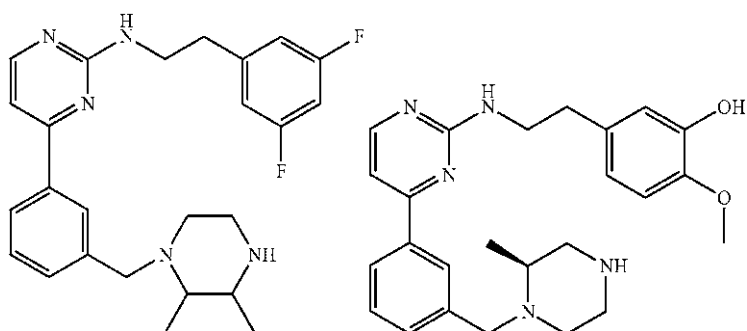
【化 1 4 9】



10

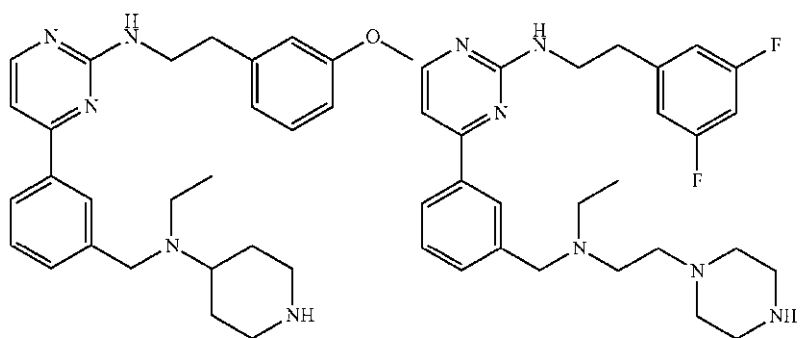


20

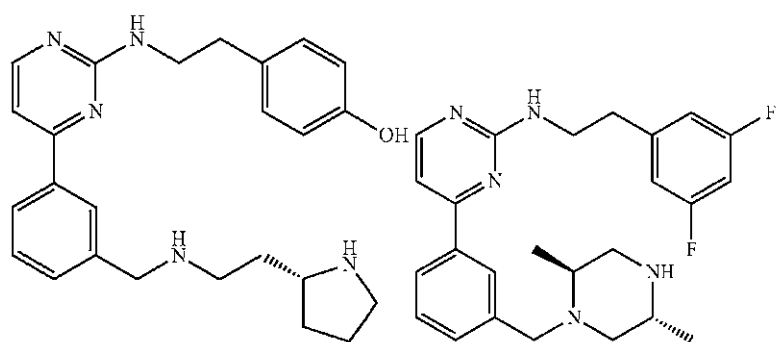


30

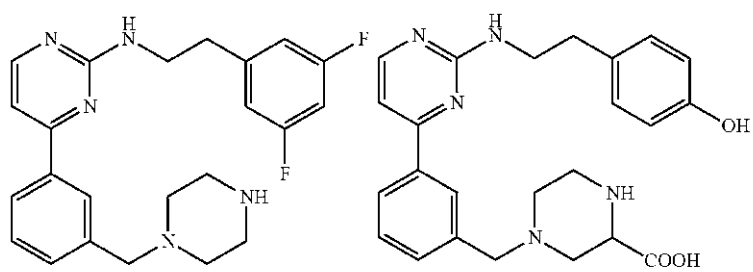
【化 1 5 0】



10

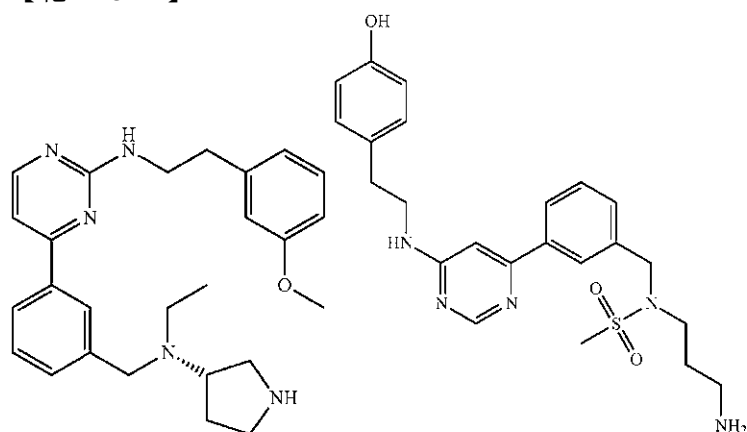


20

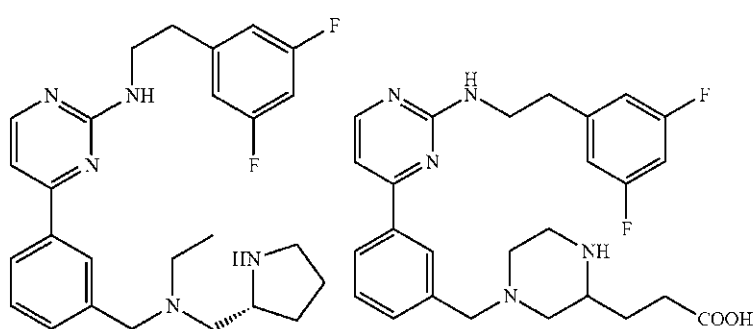


30

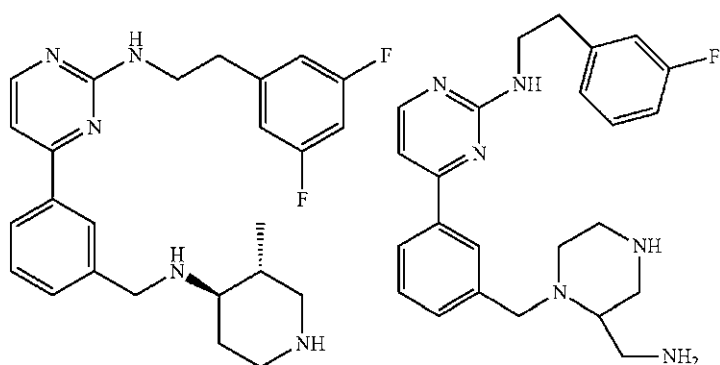
【化 1 5 1】



10

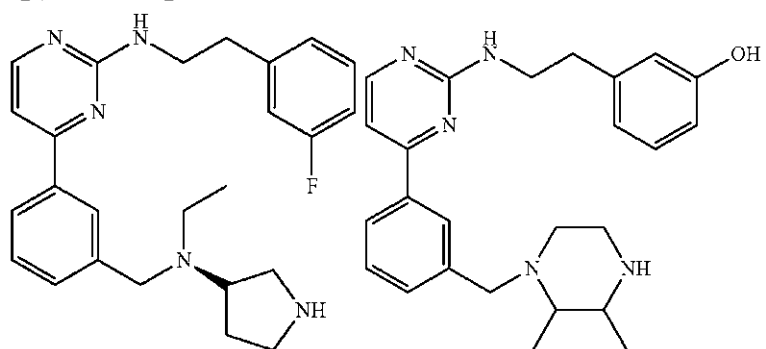


20

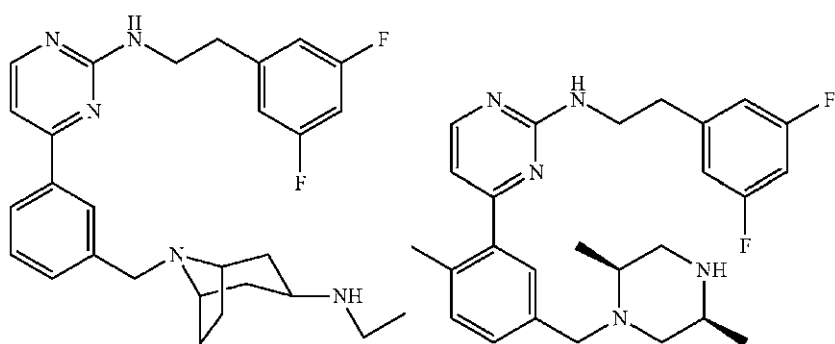


30

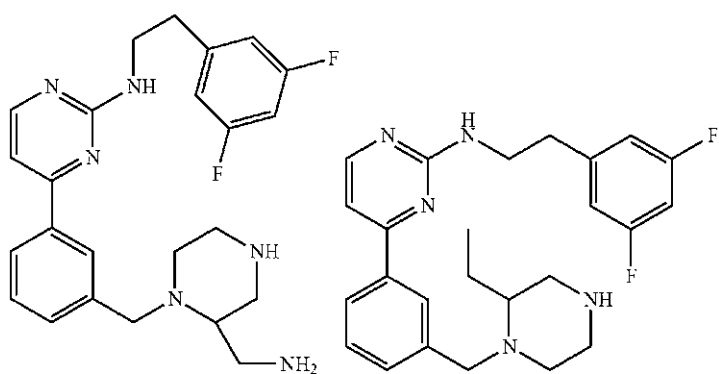
【化 1 5 2】



10

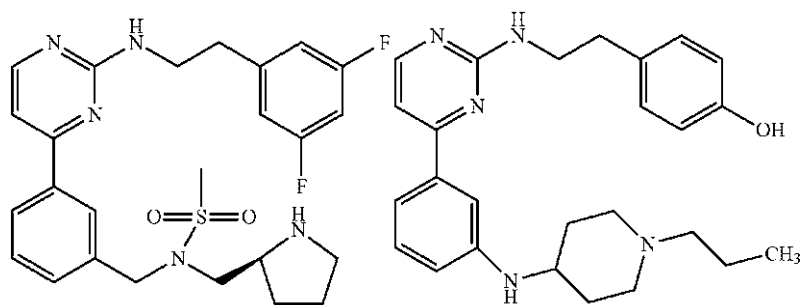


20

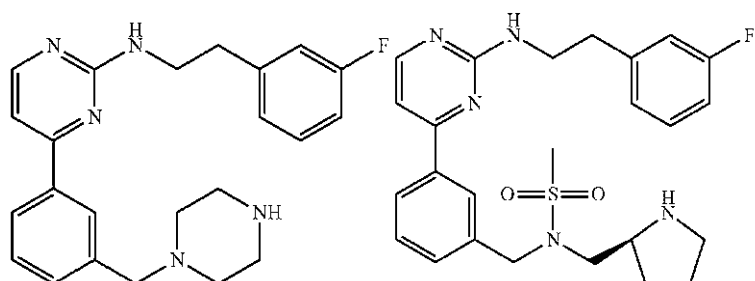


30

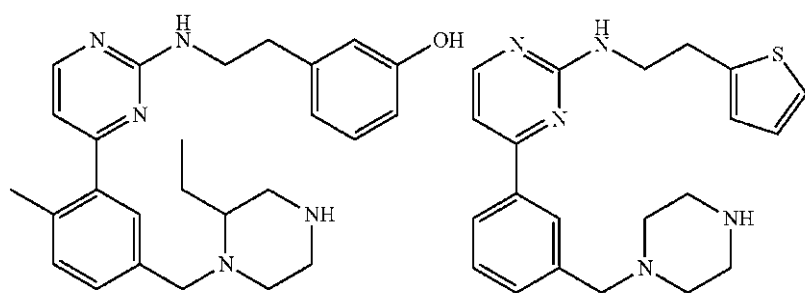
【化 1 5 3】



10

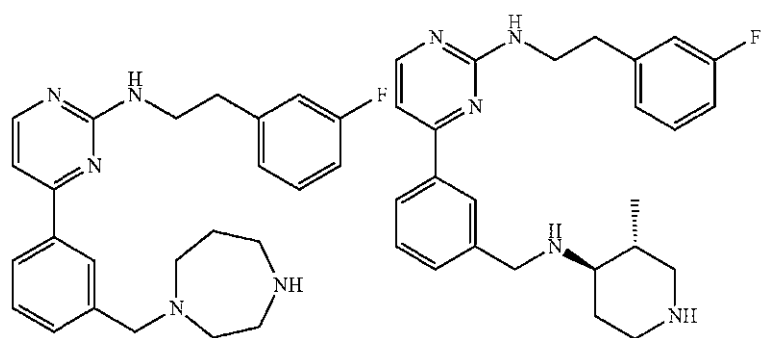


20

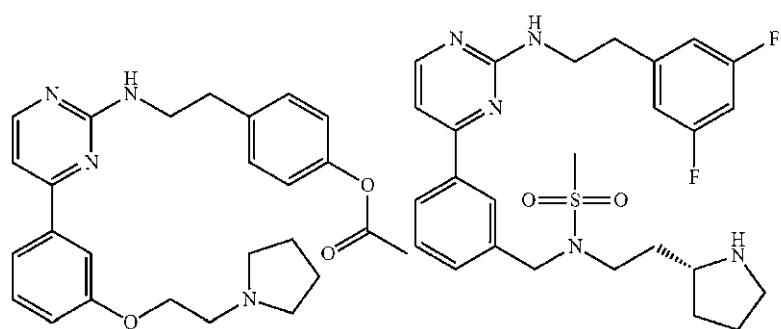


30

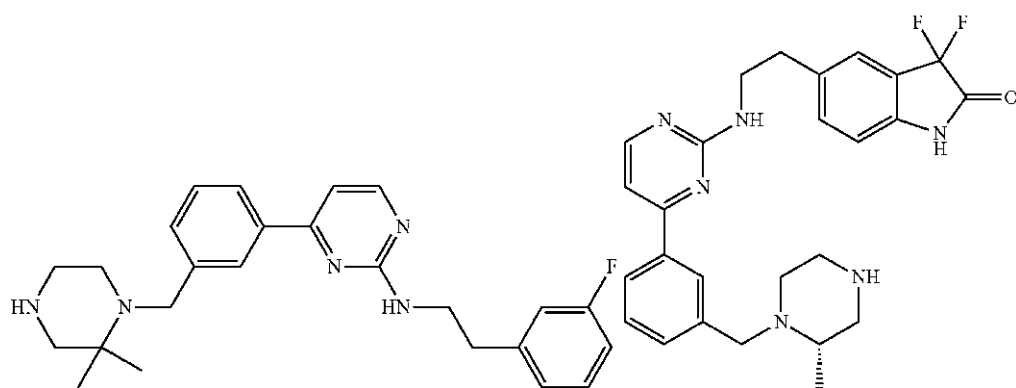
【化 1 5 4】



10

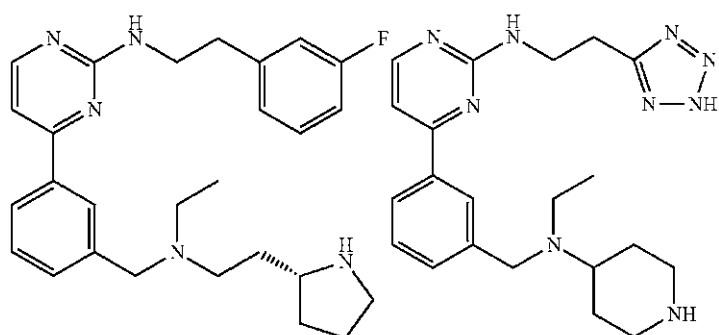


20

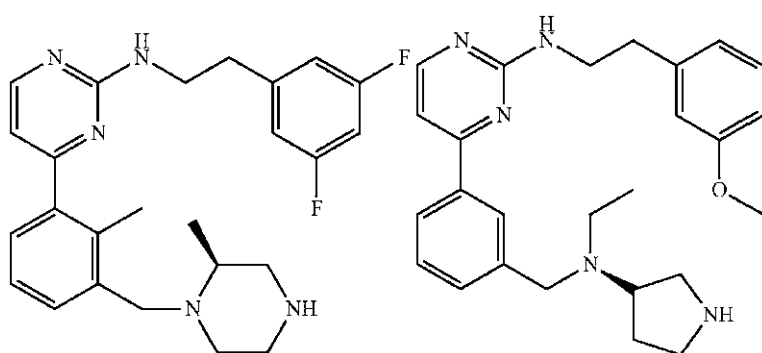


30

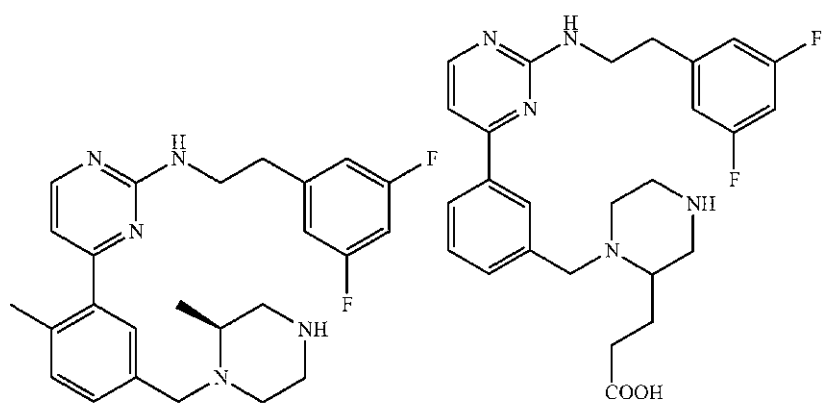
【化 1 5 5】



10

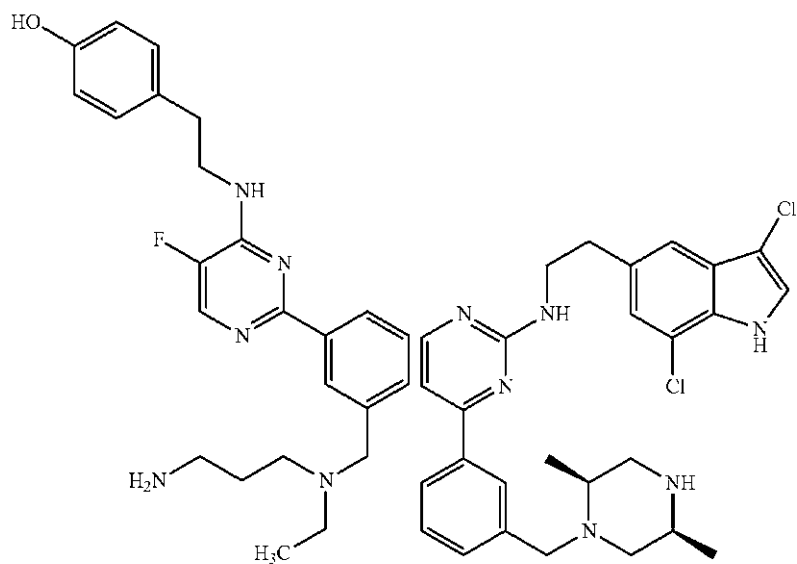


20

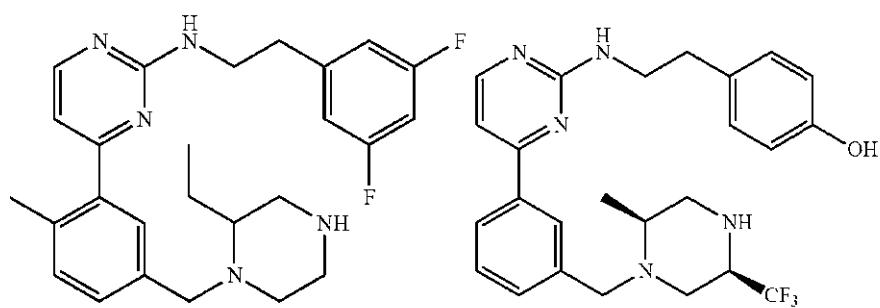


30

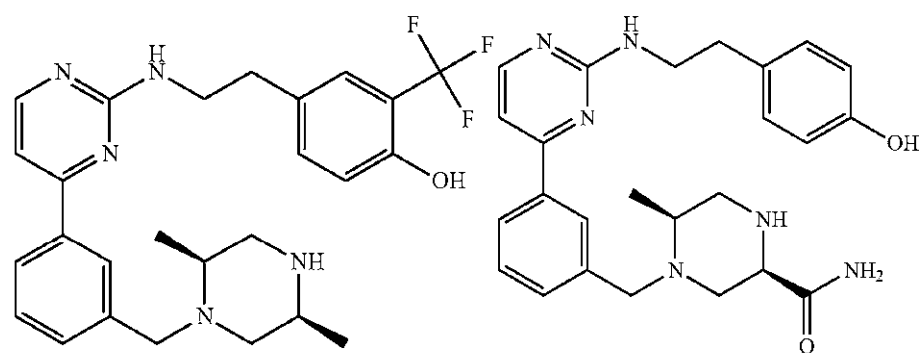
【化 1 5 6】



10



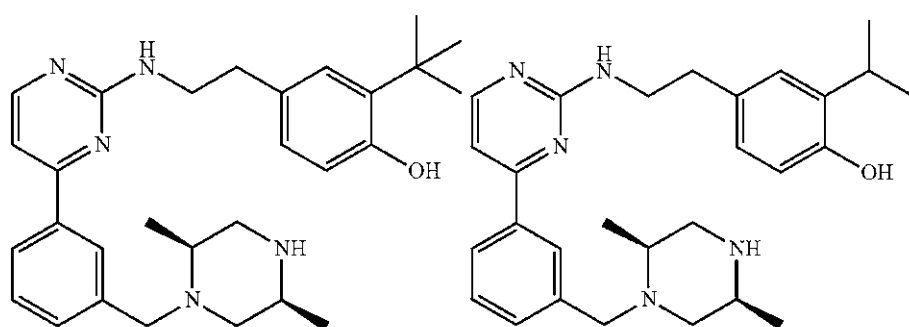
20



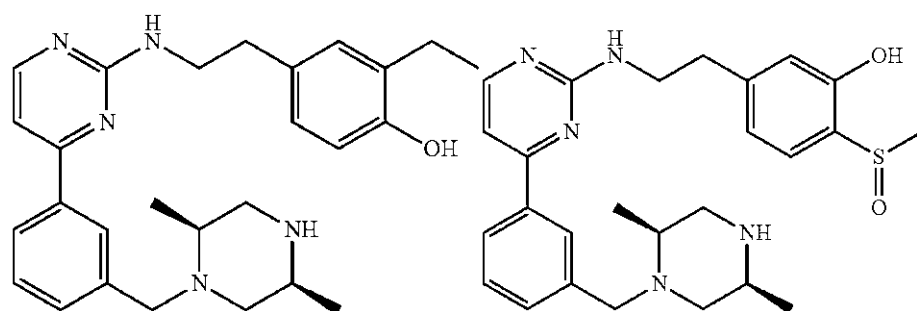
30

[illegible]

10

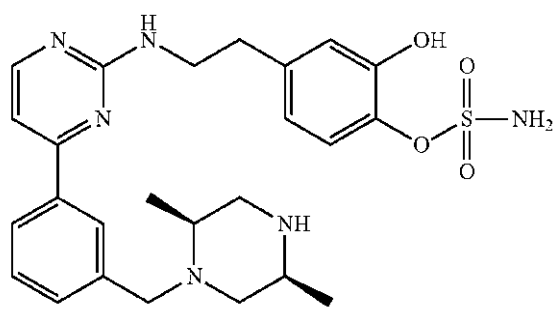
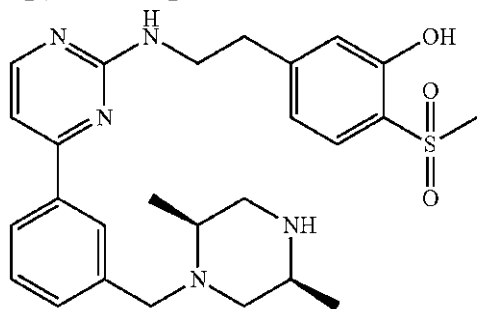


20

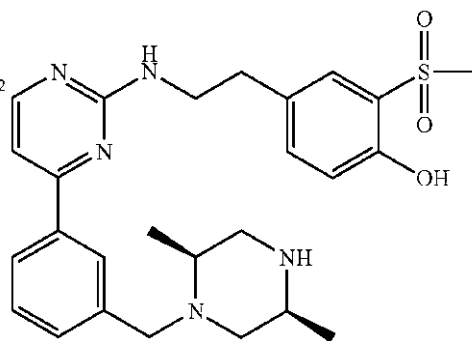
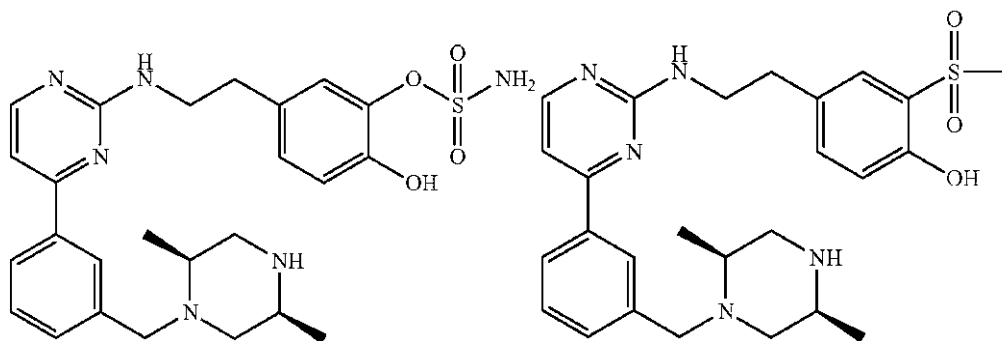


30

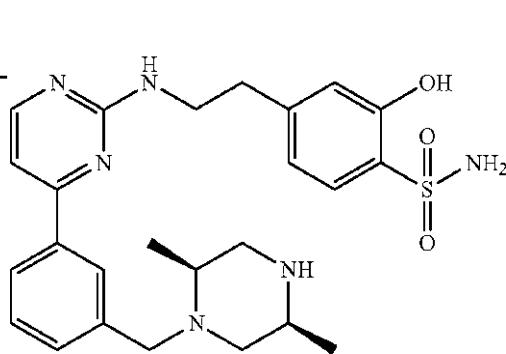
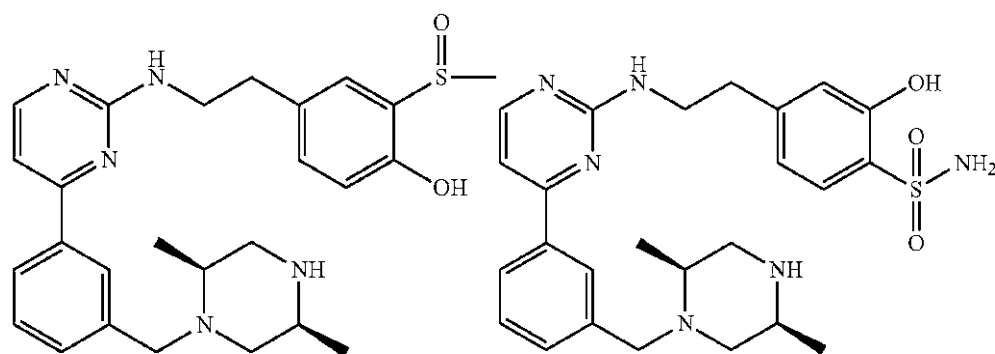
【化 1 5 8】



10

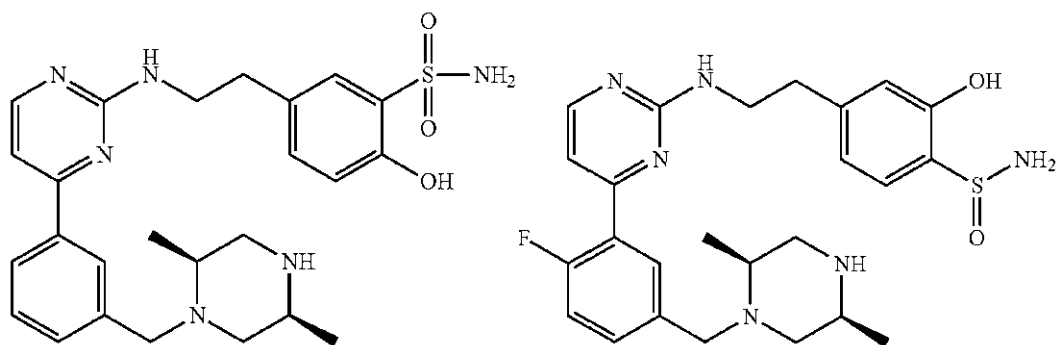


20

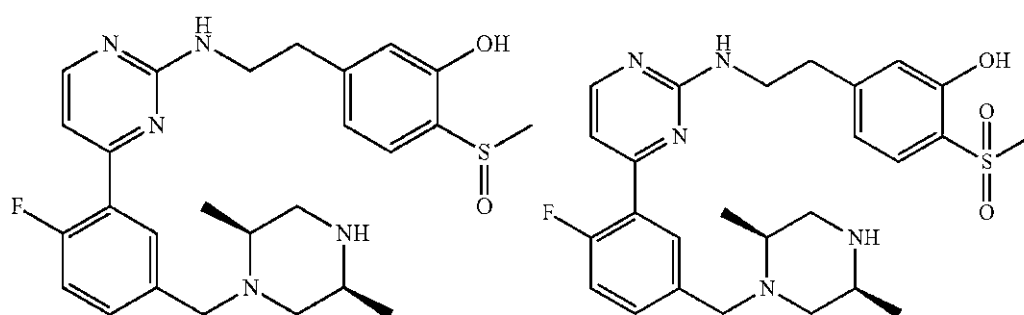


30

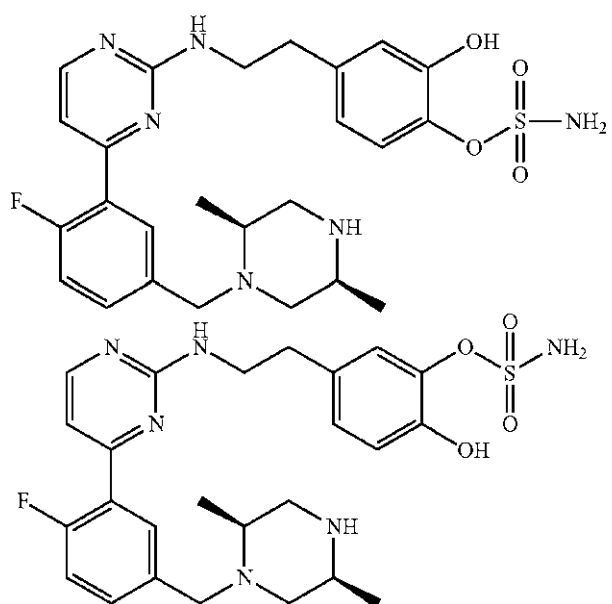
10



20

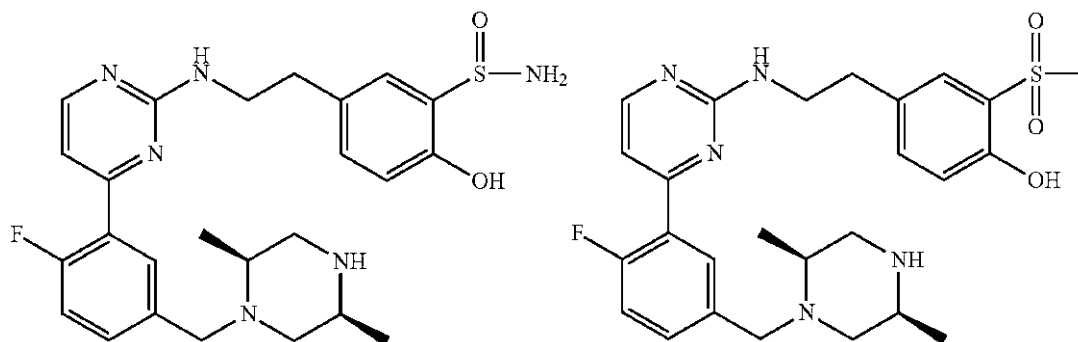


30

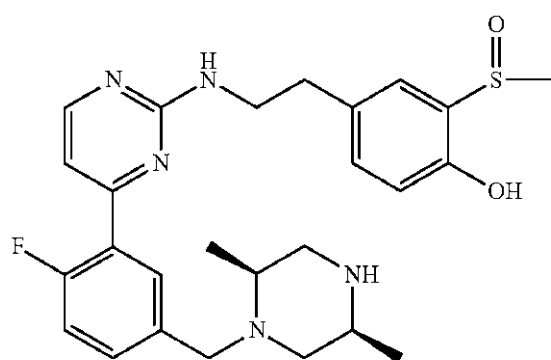


40

【化 1 6 0】

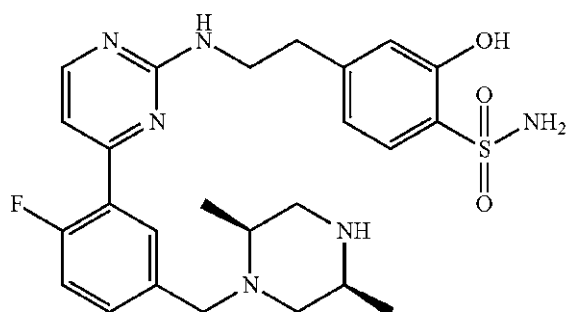


10



20

および

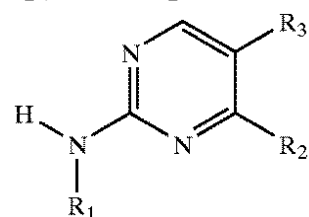


30

【 0 2 7 7】

さらに他の実施態様において、小分子PKC- θ 阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるCardozoらの米国特許出願公開公報No. 2005/0124640に記載のピリミジン誘導体を包含する。このタイプの代表的化合物は、式(XXXVI)：

【化 1 6 1】



40

(XXXVI)

〔式中、

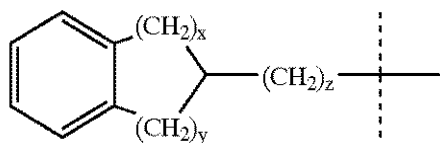
R_1 は、 C_{1-8} アルキル、 C_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-7} シクロアルキル- C_{1-8} アルキル、ナフチル、キノリニル、アリール- C_{1-8} アルキル、またはヘテロアリール- C_{1-8} アルキルであり、ここで、 C_{1-8} アルキル基のそれぞれにおいて、メチレン基は、-NHC(O)-または-C(O)NH-で任意に置換されてもよく、および、ここで、 C_{1-8} アルキル基のそれぞれは、オキシ基ま

50

たは1つ以上のC₁₋₃アルキル基で任意に置換され、ここで、C₁₋₈アルキル基の同じ炭素原子上の2つのアルキル置換基は、任意に組み合わせられて、C₂₋₅アルキレン架橋を形成してもよく、および、ここで、アリール基は、C₃₋₆アルキレン架橋基によって隣接する炭素原子において任意に置換され、ここで、メチレン基は、酸素、-S-、-S(O)-、-SO₂-または-N(R₆)-で任意に置換される；または

R_1 は、以下の構造式：

【化 1 6 2】

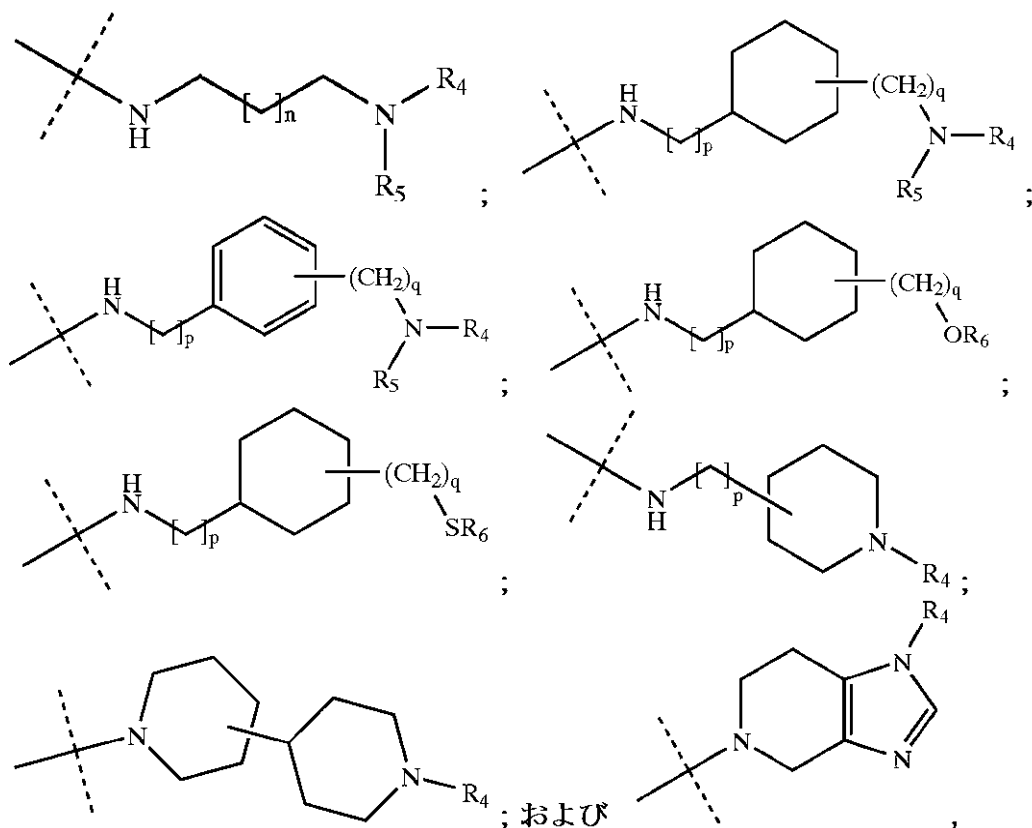


(ここで、xおよびyは独立して、0、1、2、3または4である；ただし、x+yは、2～4であり、zは、0、1または2であり、および、環中の1もしくは2個のCH₂基は、-O-、-S-、-S(O)-、-SO₂-または-N(R₆)で任意に置換されてもよい)を有する；

ここで、各R₁基は、1つ以上の以下の基：C₁₋₆アルキル、C₃₋₆シクロアルキル、ハロゲン、ニトロ、ヒドロキシ、C₁₋₆アルキルオキシ、C₁₋₆アルキルチオ、アリール、アリールC₁₋₆アルキル、アリールオキシ、アリールチオ、アミノスルホニル、または1もしくは2個のC₁₋₆アルキル基で任意に置換されたアミノで任意に置換され、ここで、各アリール基は、1つ以上のC₁₋₆アルキル、ハロゲン、ニトロ、ヒドロキシまたは1もしくは2個のC₁₋₆アルキル基で任意に置換されたアミノで任意に置換され、および、ここで、C₁₋₆アルキル基のそれぞれにおいて、メチレン基は、-NHC(O)-または-C(O)NH-で任意に置換されてもよく、および、ここで、C₁₋₆アルキル基のそれぞれは、1つ以上のハロゲンで任意に置換される；

R_2 は、以下の基：

【化 1 6 3】



; および

1

(式中、

nは、3～8の整数である；

pは、1～3の整数である；

qは、0～3の整数である；

R₄およびR₅はそれぞれ独立して、水素、C₁₋₆アルキル、アリールC₁₋₆アルキル、またはアミジノから選ばれ、ここで、各アリール基は、1つ以上のC₁₋₆アルキル、ハロゲン、ニトロ、ヒドロキシまたは1もしくは2個のC₁₋₆アルキル基で任意に置換されたアミノで任意に置換され、および、ここで、C₁₋₆アルキル基のそれぞれは、1つ以上のハロゲンで任意に置換され、および、ここで、アミジノは、1～3個のC₁₋₆アルキルで任意に置換される；

R₆は、水素またはC₁₋₆アルキルである)

から選ばれ；

ここで、各R₂基は、1つ以上のC₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ、CN、-OH、-NH₂またはハロゲンで任意に置換される；

R₃は、ハロゲン、シアノ、ニトロ、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルオキシカルボニルまたはアミノカルボニルであり、ここで、C₁₋₆アルキル基のそれぞれは、1つ以上のハロゲンで任意に置換される]

で示される化合物またはその互変異性体、医薬的に許容しうる塩、溶媒和物もしくはアミノ保護誘導体である。

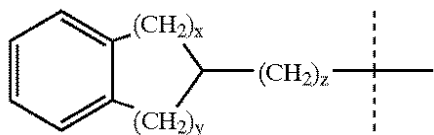
【0278】

式(XVIII)で示されるピリミジン誘導体化合物またはその互変異性体、医薬的に許容しうる塩、溶媒和物もしくはアミノ保護誘導体のいくつかの例において、

R₁は、アリール-C₁₋₄アルキルまたはヘテロアリール-C₁₋₄アルキルであり、ここで、C₁₋₄アルキル基のそれぞれにおいて、メチレン基は、-NHC(O)-または-C(O)NH-で任意に置換されてもよく、および、ここで、C₁₋₄アルキル基のそれぞれは、オキシ基または1つ以上のC₁₋₃アルキル基で任意に置換され、ここで、C₁₋₄アルキル基の同じ炭素原子上の2つのアルキル置換基は、任意に組み合わせられて、C₂₋₅アルキレン架橋を形成してもよく、および、ここで、アリール基は、C₃₋₆アルキレン架橋基によって隣接する炭素原子において任意に置換され、ここで、メチレン基は、酸素、イオウまたは-N(R₆)-で任意に置換される；または

R₁は、以下の構造式：

【化164】



(ここで、xおよびyは独立して、0、1、2、3または4である；ただし、x+yは、2～3であり、およびzは、0または1である)

を有する；

ここで、「ヘテロアリール」は、ピリジル、フリル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、またはインドリルとして定義される；

ここで、各R₁基は、1つ以上の以下の基：C₁₋₆アルキル、Cl、Br、F、ニトロ、ヒドロキシ、CF₃、-OCF₃、-OCF₂H、-SCF₃、C₁₋₄アルキルオキシ、C₁₋₄アルキルチオ、フェニル、ベンジル、フェニルオキシ、フェニルチオ、アミノスルホニル、または1もしくは2個のC₁₋₃アルキル基で任意に置換されたアミノで任意に置換される；

R₂は、以下の基：

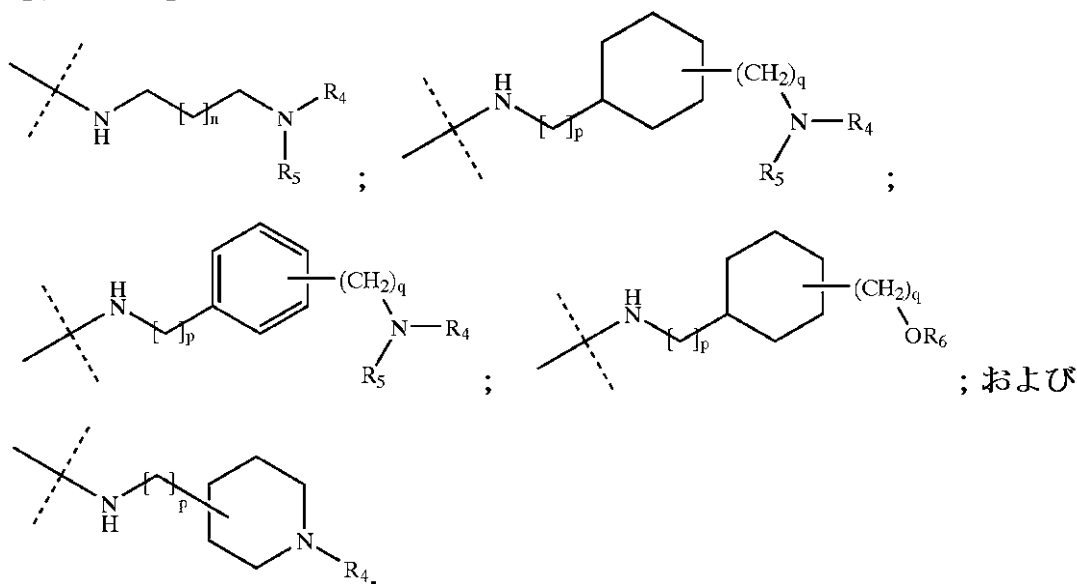
10

20

30

40

【化 1 6 5】



10

(式中、

nは、5～7の整数である；

pは、1～2の整数である；

qは、1～2の整数である；

R₄およびR₅はそれぞれ独立して、水素、C₁₋₆アルキル、アリールC₁₋₆アルキル、またはアミノから選ばれる；R₆は、水素である)

から選ばれる；

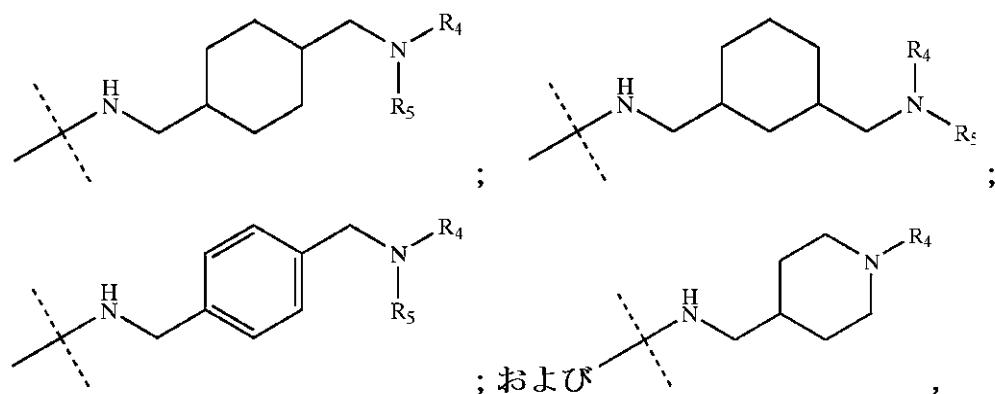
R₃は、Br、Cl、F、シアノまたはニトロである。

【0 2 7 9】

式(XVIII)で示されるピリミジン誘導体化合物またはその互変異性体、医薬的に許容しうる塩、溶媒和物もしくはアミノ保護誘導体の他の例において、

R₁は、フェニル-C₁₋₄アルキルまたはナフチルC₁₋₂アルキルである；ここで、各R₁基は、1つ以上の以下の基：メチル、Cl、Br、F、ニトロ、ヒドロキシ、C_{F3}、-OCF₃、-SCF₃、C₁₋₄アルキルオキシまたはC₁₋₄アルキルチオで任意に置換される；R₂は、以下の基：

【化 1 6 6】



40

(式中、R₄およびR₅はそれぞれ独立して、水素、C₁₋₃アルキル、またはアミノから選ばれる)

から選ばれる；

50

R₃は、Br、Cl、シアノまたはニトロである。

【0280】

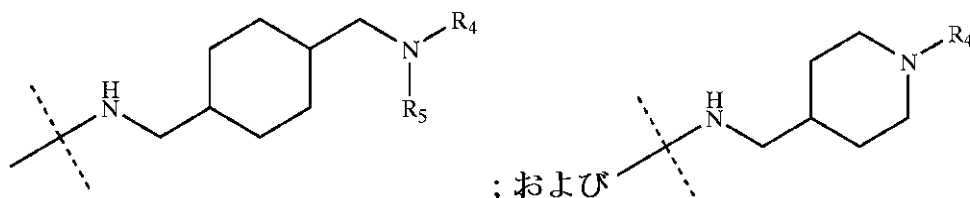
式(XVIII)で示されるピリミジン誘導体化合物またはその互変異性体、医薬的に許容する塩、溶媒和物もしくはアミノ保護誘導体のさらに他の例において、

R₁は、フェニルCH₂-である；

ここで、フェニル基は、1つ以上の以下の基：メチル、Cl、Br、F、ニトロ、ヒドロキシ、CF₃、-OCF₃、-SCF₃、C₁₋₄アルキルオキシまたはC₁₋₄アルキルチオで任意に置換される；

R₂は、以下の基：

【化167】



10

から選ばれる；

R₃は、ニトロである；

R₄およびR₅はそれぞれ独立して、水素、メチル、またはアミノから選ばれる。

20

【0281】

式(XXXVI)で示される化合物の非限定的例は、以下のものから選ばれる：エチル 4-({[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-2-[(2-クロロベンジル)アミノ]ピリミジン-5-カルボキシレート；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]-メチル}-5-ニトロ-N²-[(2R)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-2-イル]ピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-[(2S)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-2-イル]ピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]-メチル}-5-ニトロ-N²-[(1R)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-1-イル]ピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]-メチル}-5-ニトロ-N²-[(1S)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-1-イル]ピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(4-クロロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(2-メチルフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(3-メチルフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(4-メチルフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(2-フルオロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(4-フルオロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N²-(2-アミノベンジル)-N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(3,5-ジメトキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；3-[(2-[(2-クロロベンジル)アミノ]-5-ニトロピリミジン-4-イル}アミノ)メチル]フェニル}メタンアミン；2-({[4-({[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ}メチル)フェノール；N²-(5-アミノ-2-クロロベンジル)-N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；4-({[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-2-[(2-クロロベンジル)アミノ]ピリミジン-5-カルボキサミド；N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-クロロベンジル)-5-フルオロピリミジン-2,4-ジアミン；3-({[4-(

30

40

50

{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ
 }メチル)-N-[2-(2-メチルフェニル)エチル]ベンズアミド ; (1S,2R)-2-([4-([4-(アミノ
 メチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ}メチル)シ
 クロヘキサノール ; (1R,2R)-2-([4-([4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ
)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ}メチル)シクロヘキサノール ; メチル 4-([4-(ア
 ミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-2-[(2-クロロベンジル)アミノ]ピリミジン-
 5-カルボキシレート ; 4-{[4-([4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニ
 トロピリミジン-2-イル]アミノ}-N-[2-(2-メチルフェニル)エチル]ブタンアミド ; 5-{[4-
 ([4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミ
 ノ}-N-[2-(2-メチルフェニル)エチル]ペンタンアミド ; 6-{[4-([4-(アミノメチル)シク
 ロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ}-N-[2-(2-メチルフェニ
 ル)エチル]ヘキサナミド ; (1R,3R)-3-([4-([4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチ
 ル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ}メチル)-4,4-ジメチルシクロヘキサノ
 ール ; N⁴-([4-cis-[(ジメチル-アミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-N²-(1-ナフチルメ
 チル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N²-[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロ-N⁴-(
 ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; 5-ニトロ-N⁴-(ピペリジン-4-イル
 メチル)-N²-{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン ; N²-(1-
 ナフチルメチル)-5-ニトロ-N⁴-(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-
 -([4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-N²-[2-(メチルチオ)ベンジル]-
 5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-(4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}
 メチル)-5-ニトロ-N²-{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミ
 ン ; N⁴-(4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-N²-(1-ナフチルメチル)-
 5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{4-[(ジメチルアミノ)メチル]ベンジル}-N²-[2-(
 メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{4-[(ジメチルアミノ)メ
 チル]ベンジル}-5-ニトロ-N²-{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-
 ジアミン ; N⁴-{4-[(ジメチルアミノ)メチル]ベンジル}-N²-(1-ナフチルメチル)-5-ニトロ
 ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-[(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル]-N²-[2-(メチルチ
 オ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2-,4-ジアミン ; N⁴-[(1-メチルピペリジン-4-イル)メ
 チル]-5-ニトロ-N²-{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン
 ; N⁴-[(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル]-N²-(1-ナフチルメチル)-5-ニトロピリミジ
 ン-2,4-ジアミン ; N²-(2-クロロベンジル)-N⁴-[(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル]-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N²-(2-メトキシベンジル)-N⁴-[(1-メチルピペリジン-4-
 -イル)メチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシ
 ル]メチル}-N²-(2-メトキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミ
 ノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-[2-(トリフルオロメチル)ベンジル]ピリ
 ミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(-2,4-ジクロ
 ロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシ
 ル]メチル}-N²-(3-メトキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミ
 ノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[4-フルオロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(3
 -メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘ
 キシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(ピリジン-2-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[
 4-(アミノメチル)-シクロヘキシル]メチル}-N²-(3-クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン
 -2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(4-クロロベンジル)
 -5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N-
 (4-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロ
 ヘキシル]メチル}-N²-(2,4-ジメトキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-
 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ベ
 ンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メ
 チル}-N²-(2,5-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノ

10

20

30

40

50

メチル)シクロヘキシル]メチル }-5-ニトロ- N^2 -[2-(トリフルオロメトキシ)ベンジル]ピ
 リミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-クロロ-
 6-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘ
 キシル]メチル}- N^2 -(2,3-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4
 -(アミノメチル)シクロヘキシル]-メチル}- N^2 -(2-フリルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,
 4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -(チエン-2-イ
 ルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2
 -(2-クロロベンジル)-5-メチルピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -(6-アミノヘキシル)- N^2 -(2
 -クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N -[4-(アミノメチル)ベンジル]- N
 ^{2} -(2-クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -(7-アミノヘプチル)- N^2 -(
 2-クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[3-(アミノメチル)シクロヘ
 キシル]メチル}- N^2 -(2-クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(ア
 ミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(1-メチル-1-フェニルエチル)-5-ニトロピリミ
 ジン-2,4-ジアミン ; 4-(4,4'-ビピペリジン-1-イル)- N -(2-クロロベンジル)-5-ニトロピ
 リミジン-2-アミン ; N^2 -(2-クロロベンジル)- N^4 -(4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘ
 キシル]メチル)-5-ニトロピリ ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,5
 -ジフルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)-シ
 クロヘキシル]メチル}- N^2 -[4-(ジフルオロメトキシ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-
 ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-エトキシベンジル)-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニ
 トロ- N^2 -[(1S)-1-フェニルエチル]ピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シ
 クロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{
 [4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミジ
 ン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(3-クロロ-2-フル
 オロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシ
 ル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -(4-ペンチルベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミ
 ノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(4-ブトキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-
 ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,3-ジメトキシベンジル
)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)-シクロヘキシル]メチル}-
 N^2 -(2,5-ジメトキシベンジル)-5-ニトロ-ピリミジン-2,4-ジアミン ; N^2 -(2-クロロベンジ
 ル)- N^4 -[7-(ジメチルアミノ)ヘプチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4
 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(1,1'-ビフェニル-2-イルメチル)-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(
 4-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロ
 ヘキシル]メチル}- N^2 -(2,4-ジフルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N
 ^{4} -{[4-(アミノメチル)-シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(3-フルオロ-4-メチルベンジル)-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2
 ,3-ジフルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シ
 クロヘキシル]メチル}-5-ブromo- N^2 -(2-クロロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{
 [4-(アミノメチル)シクロヘキシル]-メチル}- N^2 -(2,6-ジメトキシベンジル)-5-ニトロピ
 リミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,6-ジフ
 ルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキ
 シル]メチル}- N^2 -[2-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2
 ,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(4-クロロ-2-フルオロ
 ベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]
 メチル}-5-ニトロ- N^2 -(1-フェニルシクロプロピル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(
 アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[1-(2-クロロフェニル)-1-メチルエチル]-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(
 2,3-ジヒドロ-1-ベンゾフラン-5-イルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N^4 -{[
 4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[(1,5-ジメチル-1H-ピロール-2-イル)メチ

ル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}
 - N^2 -(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シ
 クロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,3-ジメチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,4-ジメチルベンジル)-5-ニトロピ
 リミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,5-ジメ
 チルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; 2 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキ
 シル]メチル}- N^2 -[2-フルオロ-5-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2
 ,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(メチルチオ)ベン
 ジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチ
 ル}-5-ニトロ- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]-ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(3-フルオロベンジル)-5-ニトロピリ
 ミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(6-クロロ-2-
 フルオロ-3-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル
)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-クロロ-6-フルオロ-3-メチルベンジル)-5-ニトロピリミ
 ジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -2-ナフチル-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(1
 -ナフチルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘ
 キシル]メチル}- N^2 -[2-フルオロ-4-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニトロピリミジ
 ン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(4-クロロ-2-メチ
 ルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル
]メチル}- N^2 -(5-クロロ-2-)メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4
 -(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(3-クロロ-2-メチルベンジル)-5-ニトロピ
 リミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]-メチル}- N^2 -[5-フルオ
 ロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミ
 ノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(-5-クロロ-2-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミ
 ジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル-)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,3-ジフルオ
 ロ-4-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シク
 ロヘキシル]メチル}- N^2 -(-5-フルオロ-2-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジア
 ミン; N^4 -{[4-(アミノメチル-)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -1-ナフチル-5-ニトロピリミ
 ジン-2,4-ジアミン; {4-trans-[(2-[(2-クロロベンジル)アミノ]-5-ニトロピリミジン-4
 -イル}アミノ)メチル]シクロヘキシル}メタノール; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル
]メチル}-5-プロモ- N^2 -(2,5-ジクロロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(ア
 ミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロモ- N^2 -(2,4-ジクロロベンジル)ピリミジン-2
 ,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロモ- N^2 -(2-プロモベ
 ンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(
 シクロヘキシルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シク
 ロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-ナフチルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4
 -(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロモ- N^2 -[2-(トリフルオロメトキシ)ベン
 ジル]ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロ
 モ- N^2 -[2-(トリフルオロメチル)ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメ
 チル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(ジフルオロメトキシ)ベンジル]-5-ニトロピリミジ
 ン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル-]メチル}- N^2 -[3-(ジフルオロ
 メトキシ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロ
 ヘキシル]メチル}- N^2 -(-2-クロロ-4-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミ
 ン; N^4 -{[4-(アミノメチル)-シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-クロロ-3,6-ジフルオロベン
 ジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチ
 ル}-5-ニトロ- N^2 -(2,3,5-トリフルオロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(ア
 ミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -(2,3,4,5-テトラフルオロベンジル)ピ
 リミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -[
 (1R)-1-フェニルエチル]ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシ

10

20

30

40

50

ル]メチル}-N²-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-2-イル-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[(1S)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[(1R)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(4-クロロ-1-ナフチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(4-メトキシ-2-ナフチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-キノン-6-イルピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-trans-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,5-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-trans-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,3-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(2-クロロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(3-クロロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-クロロ-6-フェノキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロモ-N²-2-ナフチルピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロモ-N²-(1-ナフチルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(ピリジン-3-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; 4-({[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-2-[(2-クロロベンジル)アミノ]ピリミジン-5-カルボニトリル ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[4-(ジメチルアミノ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-trans-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-(7-アミノヘプチル)-N²-(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-(7-アミノヘプチル)-N²-(2,5-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N-({4-[(2-[(2-クロロベンジル)アミノ]-5-ニトロピリミジン-4-イル}アミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-グアニジン ; N²-(3-アミノベンジル)-M-{-[4(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(2-ニトロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(2-プロモフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-プロモベンジル)-5-クロロピリミジン-2,4-ジアミン ; (4-{[(2-{[2-(1H-インドール-3-イル)エチル]アミノ}-5-ニトロピリミジン-4-イル)アミノ]メチル}シクロヘキシル)メタンアミニウムクロリド ; N-({3-[(2-[(2-クロロベンジル)-アミノ]-5-ニトロピリミジン-4-イル}アミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)グアニジン ; 3-({[4-({[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ}メチル)フェノール ; (4-{[(2-{[2-(1H-イミダゾール-4-イル)エチル]アミノ}-5-ニトロピリミジン-4-イル)アミノ]メチル}シクロヘキシル)-メタンアミニウムクロリド ; N²-(2-クロロベンジル)-M-({4-cis-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-クロロ-N²-(2-クロロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N²-(2-クロロベンジル)-5-ニトロ-N⁴-(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(2-フェニルエチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(3-フェニルプロピル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(4-フェニルブチル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(2-フェニルプロピル)ピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(4-メトキシフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(3-メトキシフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(2-メトキシフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン ; 4-

10

20

30

40

50

[(2-[2-(2-クロロベンジル)アミノ]-5-ニトロピリミジン-4-イル}アミノ)メチル]ピペリジン-1-カルボキシミドアミド; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(3,5-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -(5-アミノペンチル)- N^2 -(2-クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; 2-(ベンジルアミノ)-4-(1,4,6,7-テトラヒドロ-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-5-イル)-5-トリフルオロメチル-ピリミジン; 2-(4-クロロベンジルアミノ)-4-(1,4,6,7-テトラヒドロ-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-5-イル)-5-ニトロ-ピリミジン; 2-(2-クロロベンジルアミノ)-4-(1,4,6,7-テトラヒドロ-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-5-イル)-5-ニトロ-ピリミジン; 2-(ベンジルアミノ)-4-(1,4,6,7-テトラヒドロ-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-5-イル)-5-ニトロ-ピリミジン; または N^4 -{[trans-4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -[2-(トリフルオロメトキシ)ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン。

【0282】

いくつかの実施態様において、式(XXXVI)で示されるピリミジン誘導体化合物は、以下のものから選ばれる：

N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -[(2R)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-2-イル]ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(4-クロロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(3-メチルフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(4-メチルフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(3-フルオロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(4-フルオロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; (1R,3R)-3-({[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル}アミノ}メチル)-4,4-ジメチルシクロヘキサノール; N^4 -(4-cis-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)- N^2 -(1-ナフチルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^2 -[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロ- N^4 -(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン; 5-ニトロ- N^4 -(ピペリジン-4-イルメチル)- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン; N^2 -(1-ナフチルメチル)-5-ニトロ- N^4 -(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -(4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)- N^2 -[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -(4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-5-ニトロ- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -(4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)- N^2 -(1-ナフチル-メチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{4-[(ジメチルアミノ)メチル]ベンジル}- N^2 -[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{4-[(ジメチルアミノ)メチル]ベンジル}-5-ニトロ- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -[(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル]- N^2 -[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -[(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル]-5-ニトロ- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-メトキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -[2-(トリフルオロメチル)ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,4-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[4-フルオロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(3-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(3-クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(4-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N^4 -{[4-(

10

20

30

40

50

アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,5-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン
 -2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-[2-(トリ
 フルオロメトキシ)ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘ
 キシル]メチル}-N²-(2-クロロ-6-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-
 {[4-(アミノメチル-)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,3-ジクロロベンジル)-5-ニトロピ
 リミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[3-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-クロロ
 ベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N²-(2-クロロベンジル)-N⁴-(4-[(ジメチ
 ルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(
 アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,5-ジフルオロベンジル)-5-ニトロピリミジ
 ン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-エトキシベン
 ジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチ
 ル}-N²-(2-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)
 シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(3-クロロ-2-フルオロベンジル)-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(1
 ,1'-ビフェニル-2-イルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメ
 チル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,4-ジフルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-
 ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,3-ジフルオロベンジ
 ル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}
 -N²-(2,6-ジフルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチ
 ル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-ニト
 ロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(4-ク
 ロロ-2-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)
 シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-
 {[4-(アミノメチル-)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,3-ジメチルベンジル)-5-ニトロピ
 リミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(メチル
 チオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキ
 シル]メチル}-5-ニトロ-N²-{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-
 ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(3-フルオロベンジル)-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(6
 -クロロ-2-フルオロ-3-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(ア
 ミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-クロロ-6-フルオロ-3-メチルベンジル)-5-ニ
 トロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-2-ナ
 フチル-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチ
 ル}-N²-(1-ナフチルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)
 シクロヘキシル]メチル}-N²-(4-クロロ-2-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジ
 アミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(5-クロロ-2-メチルベンジ
 ル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}
 -N²-(3-クロロ-2-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノ
 メチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[5-フルオロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]-5-
 ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(5
 -クロロ-2-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチ
 ル-)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,3-ジフルオロ-4-メチルベンジル)-5-ニトロピリミジ
 ン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(5-フルオロ-2-メ
 チルベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシ
 ル]メチル}-5-プロモ-N²-(2,5-ジクロロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(
 アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロモ-N²-(2-プロモベンジル)ピリミジン-2,4
 -ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(シクロヘキシルメチル)
 -5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-
 プロモ-N²-[2-(トリフルオロメチル)ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミ

10

20

30

40

50

ノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(ジフルオロメトキシ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-クロロ-4-フルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル-)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-クロロ-3,6-ジフルオロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(2,3,5-トリフルオロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-2,-3-ジヒドロ-1H-インデン-2-イル-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(4-クロロ-1-ナフチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(4-メトキシ-2-ナフチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-キノリン-6-イルピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-trans-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2,3-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(2-クロロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(3-クロロフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-プロモ-N²-2-ナフチルピリミジン-2,4-ジアミン; 4-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-2-[(2-クロロベンジル)アミノ]ピリミジン-5-カルボニトリル; N⁴-{[4-trans-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-(7-アミノヘプチル)-N²-(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-(7-アミノヘプチル)-N²-(2,5-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N-({4-[(2-[(2-クロロベンジル)アミノ]-5-ニトロピリミジン-4-イル}アミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)グアニジン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(2-ニトロベンジル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-[2-(2-プロモフェニル)エチル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-N²-(2-プロモベンジル)-5-クロロピリミジン-2,4-ジアミン; N-({3-[(2-[(2-クロロベンジル)アミノ]-5-ニトロピリミジン-4-イル}アミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)グアニジン 3-({[4-({4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}アミノ)-5-ニトロピリミジン-2-イル]アミノ}メチル)フェノール; N²-(2-クロロベンジル)-N⁴-({4-cis-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N²-(2-クロロベンジル)-5-ニトロ-N⁴-(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(2-フェニルエチル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-(4-フェニルブチル)ピリミジン-2,4-ジアミン; またはN⁴-{[trans-4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ-N²-[2-(トリフルオロメトキシ)-ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン。

【0283】

さらに他の実施態様において、式(XXXVI)で示されるピリミジン誘導体化合物は、以下のものから選ばれる：

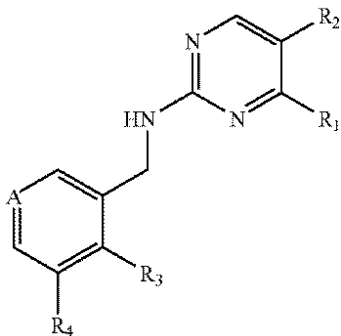
N⁴-({4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-N²-(1-ナフチルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N²-[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロ-N⁴-(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン; 5-ニトロ-N⁴-(ピペリジン-4-イルメチル)-N²-{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン; N²-(1-ナフチルメチル)-5-ニトロ-N⁴-(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-({4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-N²-[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-({4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-5-ニトロ-N²-{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-({4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル}メチル)-N²-(1-ナフチル-メチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{4-[(ジメチルアミノ)メチル]ベンジル}-N²-[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン; N⁴-{4-[(ジメチルアミノ)メチル]ベ

ンジル}-5-ニトロ- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -[(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル]- N^2 -[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロ
 ピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -[(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル]-5-ニトロ- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}ピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-メトキシベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -[2-(トリフルオロメトキシ)ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]-メチル}- N^2 -(2,3-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[3-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-クロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^2 -(2-クロロベンジル)- N^4 -{[4-[(ジメチルアミノ)メチル]シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -[2-(メチルチオ)ベンジル]-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -{2-[(トリフルオロメチル)チオ]ベンジル}-ピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(1-ナフチルメチル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2,3-ジクロロベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^4 -{[4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}- N^2 -(2-プロモベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン;
 N^2 -(2-クロロベンジル)-5-ニトロ- N^4 -(ピペリジン-4-イルメチル)ピリミジン-2,4-ジアミン;
 または N^4 -{[trans-4-(アミノメチル)シクロヘキシル]メチル}-5-ニトロ- N^2 -[2-(トリフルオロメトキシ)-ベンジル]ピリミジン-2,4-ジアミン。

【0284】

別のPKC- θ 阻害剤ピリミジン誘導体は、その全体が参照することによって本明細書に援用されるBarbosaらの米国特許出願公開公報No. 2010/0318929に記載のピリミジン誘導体を包含する。これらの化合物は、式(XXXVII)：

【化168】



(XXXVII)

[式中、

R_1 は、以下の基：

10



30

40

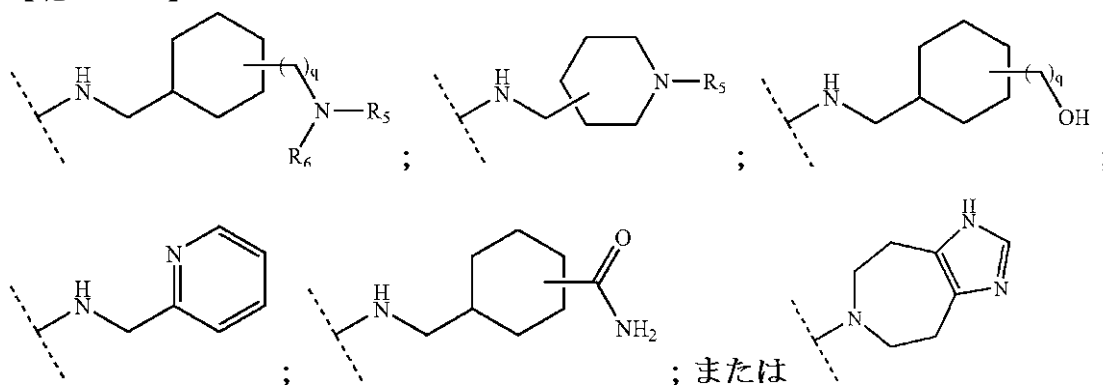
50

R_{15} 、ここで、 R_{14} および R_{15} はそれぞれ独立して、次の基から選ばれる：(i)アミノで置換される C_{1-6} アルキルカルボニル、または(ii)ここで、 R_{14} および R_{15} は、それらの間の窒素とともに5~7員の環を形成するメチレン架橋を構成し、ここで、メチレン基の1つは C_{1-6} アルキルで置換される、および各 C_{1-6} アルキルは、ヒドロキシルまたは $NR_{10}R_{11}$ で任意に置換され、ここで、 R_{10} および R_{11} は、前記と同意義である、(D)- $CONR_{16}R_{17}$ 、ここで、 R_{16} および R_{17} はそれぞれ独立して、以下から選ばれる：(i)ヒドロキシルまたは $NR_{18}R_{19}$ で置換される C_{1-6} アルキル、ここで、 R_{18} および R_{19} はそれぞれ独立して、水素または C_{1-6} アルキルから選ばれるか、またはここで、 R_{18} および R_{19} は、それらの間の窒素とともに4~6員の環を形成するメチレン架橋を構成し、ここで、メチレン基の1つは酸素で任意に置換される；(E)アミノ、 C_{1-3} アルキルアミノ、またはジ(C_{1-3} アルキル)アミノで任意に置換される C_6 アルキニル基；およびAは独立して、炭素または窒素から選ばれる]で示される化合物またはその互変異性体、医薬的に許容しうる塩、溶媒和物もしくはアミノ保護誘導体である。

【0285】

このタイプの実例となる例において、 R_1 は、以下の基：

【化170】



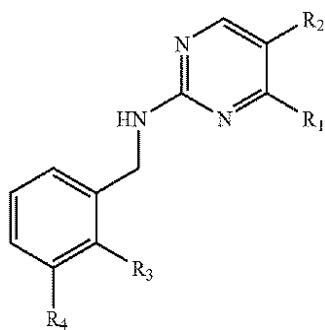
から選ばれる；

ここで： q は、0または1である； R_5 、 R_6 はそれぞれ独立して、以下から選ばれる：(A)水素、または(B)ここで、 R_5 および R_6 は一緒になって、それらの間の窒素とともに5~6員の環を形成するメチレン架橋を構成し、および環は、1つ以上の次の基で任意かつ独立して置換される：(iv) C_{1-6} アルキル、(v) COR_7 、ここで、 R_7 は、 C_{1-6} アルキルオキシである、(C) C_{1-6} アルキルカルボニル、(D) C_{1-6} アルキルスルホニル； R_2 は、次の基から選ばれる：(A)シアノ、または(B)ニトロ； R_3 は、次の基から選ばれる：(A) C_{1-3} アルキル、(B)フッ素で任意に置換される C_{1-3} アルキルオキシ、(C)ハロゲン； R_4 は、次の基から選ばれる：(A)1つ以上の次の基で置換されるアリール：(i)ヒドロキシルまたは $NR_{20}R_{21}$ で置換される C_{1-3} アルキル、ここで、 R_{20} および R_{21} はそれぞれ独立して、次の基から選ばれる：(f)水素、(g)ヒドロキシルまたは $CONH_2$ で任意に置換される C_{1-3} アルキル、または(h)ここで、 R_{20} および R_{21} は一緒になって、それらの間の窒素とともに5~6員の環を形成するメチレン架橋を構成し、(ii) $CONH_2$ 、(iii) SO_2NH_2 、(B) C_{1-3} アルキルで任意に置換される3-ピリジル、ここで、各アルキル基は、アミノで任意に置換される、(C)- $NR_{22}R_{23}$ 、ここで、 R_{22} および R_{23} は一緒になって、それらの間の窒素とともに5~6員の環を形成するメチレン架橋を構成し、ここで、メチレン基の1つは C_{1-3} アルキルで置換される、および各 C_{1-3} アルキルは、OHまたは $NR_{20}R_{21}$ で任意に置換され、ここで、 R_{20} および R_{21} は、前記と同意義である、(D)- $CONR_{24}R_{25}$ 、ここで、 R_{24} および R_{25} はそれぞれ独立して、以下から選ばれる：(i) C_{1-3} アルキルアミノで置換される C_{1-3} アルキル；およびAは独立して、炭素または窒素から選ばれる；またはその互変異性体、医薬的に許容しうる塩、溶媒和物もしくはアミノ保護誘導体である。

【0286】

他の実例となる例において、式(XXXVII)の化合物は、式(XXXVIIa)：

【化 1 7 1】



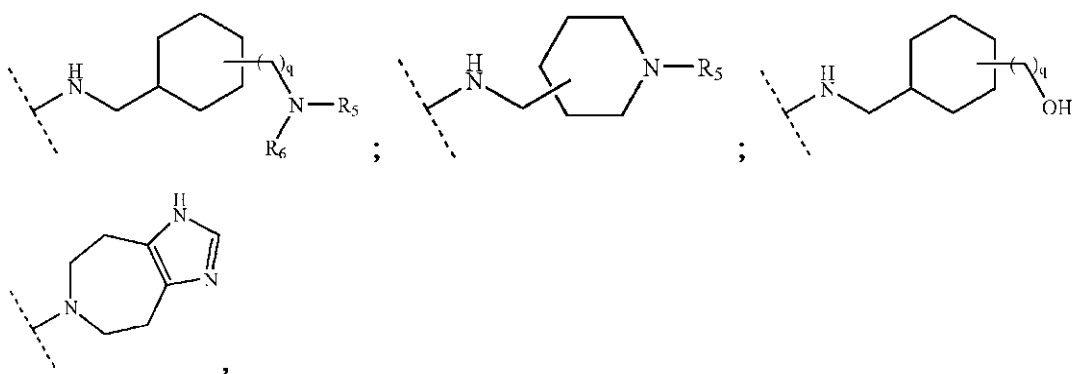
10

(XXXVIIa)

[式中、

R₁は、次の基から選ばれる：

【化 1 7 2】

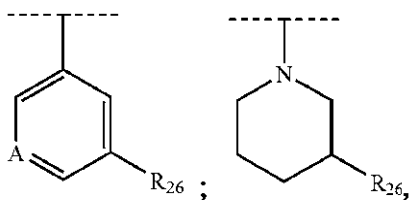


20

ここで：qは、0または1である；R₅、R₆はそれぞれ独立して、以下から選ばれる：(A)水素、(B)C₁₋₆アルキルカルボニル、(C)C₁₋₆アルキルスルホニル；R₂は、次の基から選ばれる：(A)シアノ、または(B)ニトロ；R₃は、次の基から選ばれる：(A)CH₃、(B)OCF₃、(C)Cl；R₄は、次の基から選ばれる：

30

【化 1 7 3】



40

ここで：R₂₆は、次の基から選ばれる：(A)ヒドロキシルまたはNR₂₇R₂₈で置換されるC₁₋₃アルキル、ここで、R₂₇およびR₂₈はそれぞれ独立して、次の基から選ばれる：(i)水素、(ii)ヒドロキシルまたはCONH₂で任意に置換されるC₁₋₃アルキル、(B)CONH₂、(C)SO₂NH₂；およびAは、炭素または窒素である]

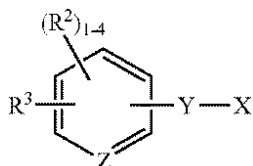
によって表される化合物またはその互変異性体、医薬的に許容しうる塩、溶媒和物もしくはアミノ保護誘導体である。

【0 2 8 7】

小分子PKC-θ阻害剤として企図されるものは、その全体が参照することによって本明細書に援用されるAjiokaらの米国特許出願公開公報No. 2010/0120869に記載のアニリン化合物である。このタイプの代表的化合物は、式(XXXVIII)：

50

【化 1 7 4】



(XXXVIII)

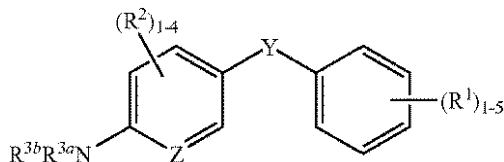
によって表される。

式 (XX) の X は、それぞれ 1-5 R^1 で置換されたアリールまたはヘテロアリールである。式 (X) の Y は、 $-O-$ 、 $-S(O)_n-$ 、 $-N(R^4)-$ および $-C(R^4)_2-$ であり、ここで、下付の n は、0-2 である。式 (XX) の Z は、 $-N=$ または $-CH=$ である。式 (XX) の各 R^1 は独立して、 H 、ハロゲン、 C_{1-8} アルキル、 C_{1-6} ヘテロアルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} ハロアルコキシ、 $-OR^{1a}$ 、 $-C(O)R^{1a}$ 、 $-C(O)OR^{1a}$ 、 $-C(O)NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-SR^{1a}$ 、 $-N(R^{1a})C(O)R^{1b}$ 、 $-N(R^{1a})C(O)OR^{1b}$ 、 $-N(R^{1a})C(O)NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-OP(O)(OR^{1a})_2$ 、 $-S(O)_2OR^{1a}$ 、 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-S(O)_2-C_{1-6}$ ハロアルキル、 $-CN$ 、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールである。式 (XX) の R^{1a} および R^{1b} のそれぞれは独立して、 H または C_{1-6} アルキルである。式 (XX) の各 R^2 は独立して、 H 、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 $-NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-NR^{1a}C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-NR^{1a}C(O)-C_{1-6}$ ハロアルキル、 $-NR^{1a}-(CH_2)-NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-NR^{1a}-C(O)-NR^{1a}R^{1b}$ 、または $-NR^{1a}-C(O)OR^{1a}$ であり、あるいは、隣接する R^1 基と隣接する R^2 基は、結合してシクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールを形成することができる。式 (XX) の R^3 は、 $-NR^{3a}R^{3b}$ または $-NCO$ である。式 (XX) の R^{3a} および R^{3b} のそれぞれは独立して、 H 、 C_{1-6} アルキル、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-C(O)-C_{1-6}$ ハロアルキル、 $-(CH_2)-NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-C(O)-NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-C(O)OR^{1a}$ 、 $-C(S)CN$ 、アミノ酸残基、ペプチドまたはオリゴペプチドである。式 (XX) の各 R^4 は独立して、 H または C_{1-6} アルキルであるか、または 1 つ以上の R^4 基が同じ原子に結合する場合、 R^4 基は、任意に結合して C_{5-8} シクロアルキルを形成する。式 (XX) の化合物には、その塩、水和物およびプロドラッグも包含される。

【0 2 8 8】

いくつかの実施態様において、式 (XXXVIII) のアニリン化合物は、式 (XXXVIIIa)：

【化 1 7 5】



(XXXVIIIa)

によって表される。

【0 2 8 9】

式 (XXXVIIIa) の各 R^1 は独立して、 H 、ハロゲン、 C_{1-8} アルキル、 C_{1-6} ヘテロアルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} ハロアルコキシ、 $-OR^{1a}$ 、 $-CN$ 、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり、および式 (XXXVIIIa) の R^{3a} および R^{3b} のそれぞれは独立して、 H 、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、アミノ酸残基、ペプチドまたはオリゴペプチドである。

【0 2 9 0】

さらに他の実施態様において、式 (XXXVIIIa) の各 R^1 は独立して、 H 、ハロゲン、 C_{1-8} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{1-6} ハロアルコキシ、 $-C(O)OR^{1a}$ 、シクロアルキル、またはヘテロアリールである。さらに、式 (XXXVIIIa) の各 R^2 は独立して、 H 、ハロゲン、または $-NR^{1a}C(O)-C_{1-6}$ アルキルである。さらに他の実施態様において、式 (XXXVIIIa) の各 R^1 は独

10

20

30

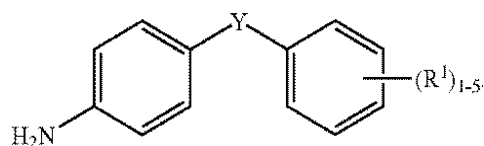
40

50

立して、H、メチル、n-プロピル、イソプロピル、t-ブチル、t-ペンチル、Cl、Br、CF₃、OCF₃、シクロペンチル、ピロリル、またはCO₂Hであり、および各R²は独立して、HまたはClである。他の実施態様において、式(XX)のR^{3a}は、アミノ酸残基であり、R^{3b}は、Hである。適切には、アミノ酸残基は、アルギニン残基である。

【0291】

さらに他の実施態様において、式(XXXVIII)のアニリン化合物は、式(XXXVIIIb)：
【化176】



10

を有する。

【0292】

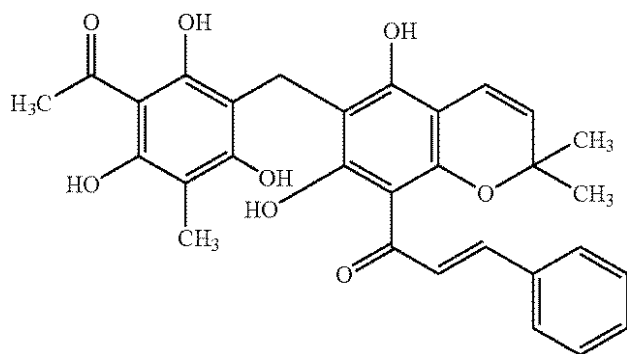
いくつかの他の実施態様において、式(XXXVIIIb)のYは、Sである。さらに他の実施態様において、式(XXXVIIIb)のYは、Oである。いくつかの実施態様において、式(XXXVIIIb)の各R¹は独立して、H、メチル、n-プロピル、イソプロピル、t-ブチル、t-ペンチル、Cl、Br、CF₃、OCF₃、シクロペンチル、ピロリル、またはCO₂Hである。さらに他の実施態様において、式(XXXVIIIb)の各R¹は独立して、C₁₋₈アルキルまたはシクロアルキルである。さらに他の実施態様において、式(XXXVIIIb)の各R¹は独立して、4-t-ブチル、4-シクロペンチルまたは4-t-ペンチルである。

20

【0293】

他の実施態様において、小分子PKC-θ阻害剤は、式(XXXIX)：

【化177】



30

(XXXIX)

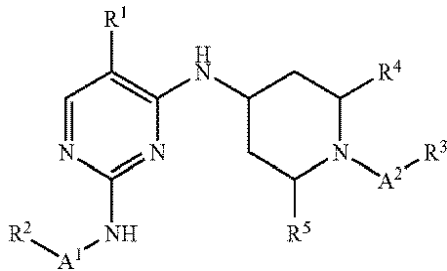
を有するロットレリン(マロトキシシンまたは1-[6-[(3-アセチル-2,4,6-トリヒドロキシ-5-メチルフェニル)メチル]-5,7-ジヒドロキシ-2,2-ジメチル-2H-1-ベンゾピラン-8-イル]-3-フェニル-2-プロペン-1-オンとしても知られる、Calbiochem、San Diego、Calif.から入手可能)、またはその誘導体もしくは類縁体から選ばれる。

【0294】

40

さらに他の実施態様において、小分子PKC-θ阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるBaudlerの米国特許出願公開公報No. 2005/0222186 A1に記載の置換ジアミノピリミジンを包含する。これらの化合物は、式(XXXX)：

【化 1 7 8】



(XXXX)

〔式中、 R^1 、 R^2 および R^3 は独立して、置換もしくは非置換フェニル、ナフチル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、1,2,3-トリアゾリル、インドリル、ベンズイミダゾリル、フラニル(フリル)、ベンゾフラニル(ベンゾフリル)、チオフェニル(チエニル)、ベンゾチオフェニル(ベンゾチエニル)、チアゾリル、イソキサゾリル、ピリジル、ピリミジニル、キノリニルおよびイソキノリニルから選ばれる； R^4 は、水素またはメチルである； R^5 は、水素またはメチルである； A^1 は、 C_{1-3} アルキレンまたはエチレンオキシ(-CH₂-CH₂-O-)である；および A^2 は、 C_{1-3} アルキレンまたはエチレンオキシ(-CH₂-CH₂-O-)である〕
によって表される化合物およびその水和物、溶媒和物もしくはエステルである。

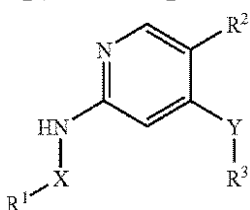
【0 2 9 5】

このような化合物の非限定的例として、以下のものが挙げられる：[1-ベンジル(4-ピペリジル)]{2-[(2-ピリジルメチル)アミノ]-5-(3-チエニル)ピリミジン-4-イル}アミン；{5-(4-メトキシフェニル)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(-4-ピペリジル)]アミン；{5-フェニル-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(4-ピペリジル)]アミン；{5-(4-クロロフェニル)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(4-ピペリジル)]アミン；{5-(4-(N,N-ジメチルアミノ)フェニル)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(4-ピペリジル)]アミン；{5-(フェニル-4-カルボキサミド)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(4-ピペリジル)]アミン；{5-(4-カルボキシフェニル)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(-4-ピペリジル)]アミン；{5-(2-チエニル)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(4-ピペリジル)]アミン；{5-(2-フラニル)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(4-ピペリジル)]アミン；{5-(3-フラニル)-2-[(4-ピリジルメチル)アミノ]ピリミジン-4-イル}[1-ベンジル(4-ピペリジル)]アミン；N(4)-(1-ベンジル-ピペリジン-4-イル)-5-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N(2)-ピリジン-2-イルメチル-ピリミジン-2,4-ジアミン；N-(3-[4-(1-ベンジル-ピペリジン-4-イルアミノ)-2-[(ピリジン-2-イルメチル)-アミノ]-ピリミジン-5-イル}フェニル)-アセトアミド；3-[4-(1-ベンジル-ピペリジン-4-イルアミノ)-2-[(ピリジン-2-イルメチル)-アミノ]-ピリミジン-5-イル]-フェノール；および4-{4-(1-ベンジル-ピペリジン-4-イルアミノ)-2-[(ピリジン-2-イルメチル)-アミノ]-ピリミジン-5-イル}N,N-ジ-メチル-ベンズアミド。

【0 2 9 6】

さらに他の実施態様において、小分子PKC- θ 阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるBrunetteの米国特許出願公開公報No. 2006/0217417に記載の置換ピリジン化合物を包含する。これらの化合物は、式(XXXXI)：

【化 1 7 9】



10

20

30

40

50

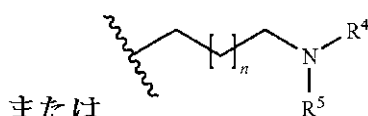
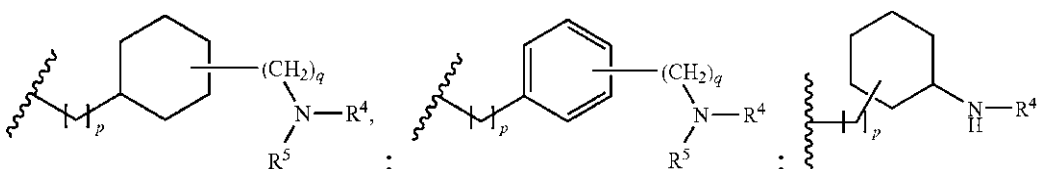
(XXXXI)

〔式中、

Xは、結合または C_{1-6} 置換もしくは非置換アルキルであり、ここで、1または2個のメチレン単位は、酸素またはイオウ原子で置換されうる；Yは、 $-NH-$ 、 $-O-$ または $-S-$ である； R^1 は、 C_{3-6} 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アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールである；

R^2 は、トリフルオロメチル、シアノ、 $-CONH_2$ 、ハロゲン、およびニトロから選ばれる；および R^3 は、

【化180】



または

である；

ここで、pは、1～3の整数である(両端を含む)；qは、0～3の整数である(両端を含む)；nは、0～5の整数である(両端を含む)； R^4 および R^5 はそれぞれ独立して、水素、 C_{1-6} 置換もしくは非置換アルキルから選ばれるか、またはここで、 R^4 および R^5 は、それらの間の窒素とともに5～6員の置換もしくは非置換環を形成するメチレン架橋を構成し、ここで、メチレン基の1つは酸素、イオウまたはNR基で任意に置換され、ここで、Rは、水素または C_{1-6} 置換もしくは非置換アルキルである]

によって表される化合物；その互変異性体；医薬的に許容しうる塩、溶媒和物またはアミノ保護誘導体である。

【0297】

式(XXXXI)で示される化合物の非限定的例として、以下のものが挙げられる：5-ニトロ-N4-ピペリジン-4-イルメチル-N2-(2-トリフルオロメトキシ-ベンジル)-ピリジン-2-,4-ジアミン；N2-(2,3-ジクロロ-ベンジル)-5-ニトロ-N4-ピペリジン-4-イルメチル-ピリジン-2,4-ジアミン；N2-[2-(3-クロロ-フェニル)-エチル]-5-ニトロ-N4-ピペリジン-4-イルメチル-ピリジン-2,4-ジアミン；5-ニトロ-N2-フェネチル-N4-ピペリジン-4-イルメチル-ピリジン-2,4-ジアミン；N4-(4-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-5-ニトロ-N2-(2-トリフルオロメトキシ-ベンジル)-ピリジン-2,4-ジアミン；N4-(4-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-N2-(2,3-ジクロロ-ベンジル)-5-ニトロピリミジン-2,4-ジアミン；N4-(4-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-5-ニトロ-N2-フェネチル-ピリジン-2,4-ジアミン；N4-(4-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-N2-[2-(3-クロロ-フェニル)-エチル]-5-ニトロ-1-ピリジン-2,4-ジアミン；N4-(4-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-5-ニトロ-N2-(2-クロロ-ベンジル)-ピリジン-2,4-ジアミン；N4-(4-trans-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-5-ニトロ-N2-(2-トリフルオロメトキシ-ベンジル)-ピリジン-2,4-ジアミン；N4-(4-trans-アミノ-シクロヘキシルメチル)-5-ニトロ-N2-(2-トリフルオロメトキシ-ベンジル)-ピリジン-2,4-ジアミン；4-[(4-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-アミノ]-6-(2-クロロ-ベンジルアミノ)-ニコチンアミド；および4-[(4-アミノメチル-シクロヘキシルメチル)-アミノ]-6-(2-クロロ-ベンジルアミノ)-ニコチンニトリル。

【0298】

さらに他の実施態様において、小分子PKC- θ 阻害剤は、たとえば、その全体が参照することによって本明細書に援用されるAubersonの米国特許出願公開公報No. 2007/0142401に記載のインドリル-ピロールジオン誘導体を包含する。これらの化合物は、式(XXXXII)：

10

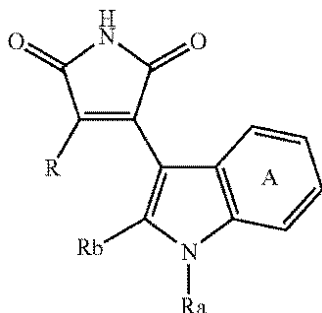
20

30

40

50

【化 1 8 1】



(XXXXII)

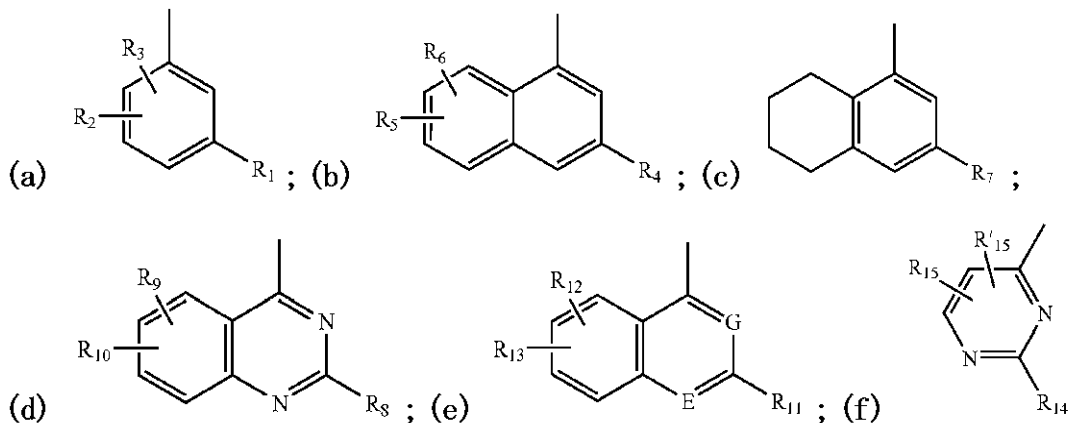
〔式中、

R_a は、H； C_{1-4} アルキル；またはOH、 NH_2 、 NHC_{1-4} アルキルまたはN(ジ- C_{1-4} アルキル) $_2$ で置換された C_{1-4} アルキルである；

R_b は、H；または C_{1-4} アルキルである；

Rは、式(a)、(b)、(c)、(d)、(e)または(f)：

【化 1 8 2】



で示される基であり、

ここで、 R_1 、 R_4 、 R_7 、 R_8 、 R_{11} および R_{14} のそれぞれは、OH；SH；複素環式残基； $NR_{16}R_{17}$ 、ここで、 R_{16} および R_{17} のそれぞれは独立して、Hまたは C_{1-4} アルキルであるか、または R_{16} および R_{17} は、それらが結合する窒素原子と一緒に、複素環式残基を形成する；または式 $\alpha -X-R_c-Y(\alpha)$ で示される基であり、ここで、Xは、直接結合、O、Sまたは NR_{18} であり、ここで、 R_{18} は、Hまたは C_{1-4} アルキルであり、 R_c は、 C_{1-4} アルキレンまたは C_{1-4} アルキレンであり、ここで、1つの CH_2 は、 CR_xR_y で置換され、ここで、 R_x および R_y の一方は、Hであり、他方は、 CH_3 であり、 R_x および R_y のそれぞれは、 CH_3 であるか、または R_x および R_y は、一緒になって、 $-CH_2-CH_2-$ を形成し、およびYは、末端炭素原子に結合し、OH、a複素環式残基および $-NR_{19}R_{20}$ から選ばれ、ここで、 R_{19} および R_{20} のそれぞれは独立して、H、 C_{3-6} シクロアルキル、 C_{3-6} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、アリール- C_{1-4} アルキルまたは末端炭素原子上にてOHで任意に置換された C_{1-4} アルキルであるか、または R_{10} および R_{20} は、それらが結合する窒素原子と一緒に、複素環式残基を形成する；

R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{15} および R'_{15} のそれぞれは独立して、H、ハロゲン、 C_{1-4} アルキル、 CF_3 、OH、SH、 NH_2 、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルチオ、 NHC_{1-4} アルキル、N(ジ- C_{1-4} アルキル) $_2$ またはCNである；

Eが、 $-N=$ であり、Gが、 $-CH=$ であるか、またはEが、 $-CH=$ であり、Gが、 $-N=$ であるのいずれかである；および

環Aは、任意に置換される]

10

20

30

40

50

またはその塩である。

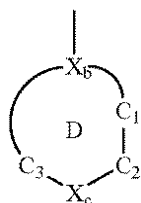
【0299】

実例となる例において、 R_1 、 R_4 、 R_7 、 R_8 、 R_{11} 、 R_{14} または Y としての、または、それぞれ $NR_{16}R_{17}$ または $NR_{19}R_{20}$ によって形成された複素環式残基は、1または2個のヘテロ原子を含み、1つ以上の環炭素原子上および／または存在する場合に1つの環窒素原子上で任意に置換された、3～8員の飽和、不飽和または芳香族複素環式環である。

【0300】

特定の実施態様において、 R_1 、 R_4 、 R_7 、 R_8 、 R_{11} 、 R_{14} または Y としての、または、それぞれ $NR_{16}R_{17}$ または $NR_{19}R_{20}$ によって形成された、複素環式残基は、式(γ)：

【化183】



(γ)

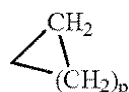
[式中、

環Dは、5、6または7員の飽和、不飽和または芳香族環である；

X_b は、 $-N-$ 、 $-C-$ または $-CH-$ である；

X_c は、 $-N=$ 、 $-NR_f-$ 、 $-CR_f'$ または $-CHR_f'$ であり、ここで、 R_f は、窒素原子のための置換基であり、 C_{1-6} アルキル；アシル； C_{3-6} シクロアルキル； C_{3-6} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル；フェニル；フェニル- C_{1-4} アルキル；複素環式残基；および式 $\beta -R_{21}-Y'$ (β)の残基から選ばれ、ここで、 R_{21} は、 C_{1-4} アルキレンまたは0によって中断された C_{2-4} アルキレンであり、および Y' は、 OH 、 NH_2 、 $NH(C_{1-4}$ アルキル)または $N(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ であり；および R_f' は、環炭素原子のための置換基であり、 C_{1-4} アルキル； C_{1-4} -アルキルによってさらに任意に置換された C_3 -シクロアルキル；

【化184】



(ここで、 p は、1、2または3である)；

CF_3 ；ハロゲン； OH ； NH_2 ； $-CH_2-NH_2$ ； $-CH_2-OH$ ；ピペリジン-1-イル；およびピロリジニルから選ばれる；

C_1 および C_2 の間の結合は、飽和または不飽和のいずれかである；

C_1 および C_2 のそれぞれは独立して、上述の環炭素原子のための置換基から選ばれる1または2個の置換基で任意に置換された炭素原子である；および

C_3 および X_b の間ならびに C_1 および X_b の間の線はそれぞれ、5、6または7員の環Dを得るのに必要な炭素原子の数を表す]

で示される残基である。

【0301】

式(XXIV)の化合物の他の非限定的例において、

R_a は、 H ； CH_3 ； CH_2-CH_3 ；またはイソプロピルであり、

R_b は、 H ；ハロゲン； C_{1-6} -アルコキシ；または C_{1-6} アルキルであり、および

I. R は、式(a)：

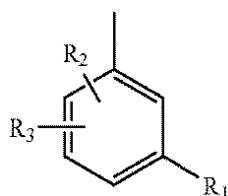
10

20

30

40

【化 1 8 5】



(a)

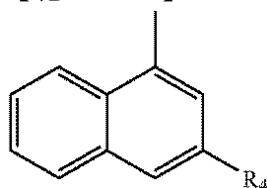
(ここで、 R_1 は、3または4位にて CH_3 で置換されたピペラジン-1-イル；または4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イルであり； R_2 は、 Cl ； Br ； CF_3 ；または CH_3 であり；および R_3 は、 H ； CH_3 ；または CF_3 であり； R_a が H または CH_3 であり、 R_b が H であり、 R_1 が4-メチル-1-ピペラジニルである場合、 R_3 は、 H 以外である)

10

の基；または

II. R は、式(b)：

【化 1 8 6】



20

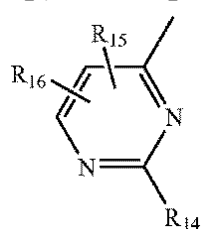
(b)

(ここで、 R_4 は、3および／または4位にて CH_3 で置換されたピペラジン-1-イル；または4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イルであり； R_4 が4-メチル-1-ピペラジニルである場合、 R_a は、 H または CH_3 以外である)

の基；または

III. R は、式(c)：

【化 1 8 7】



30

(c)

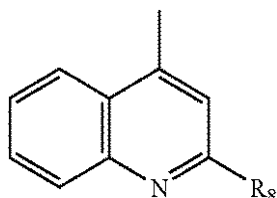
(ここで、 R_{14} は、3および／または4位にて CH_3 で、または3位にてエチル、フェニル- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ- C_{1-4} アルキルまたはハロゲン- C_{1-4} アルキルで任意に置換されたピペラジン-1-イル；または4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イルであり； R_{15} は、ハロゲン； CF_3 ；または CH_3 であり； R_{15} は、 R_a が H または CH_3 であり、 R_b が H であり、 R_{14} が4-メチル-1-ピペラジニルである場合、 CH_3 以外である；および R_{16} は、 H ； CH_3 ；または CF_3 であり； R_{16} は、 R_{15} が Cl であり、 R_a が H または CH_3 であり、 R_b が H であり、 R_{14} が4-メチル-1-ピペラジニルである場合、 H 以外である)

40

の残基；または

IV. R は、式(d)：

【化 1 8 8】



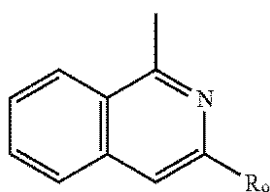
(d)

(ここで、 R_8 は、ピペラジン-1-イル、3-メチル-ピペラジン-1-イルまたは4-ベンジル-ピペラジン-1-イルである)

の基；または

V. R は、式(e)：

【化 1 8 9】



(e)

(ここで、 R_9 は、4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イル；または3位にてメチルまたはエチルで、および4位にてメチルで任意に置換されたピペラジン-1-イルである)

の基；のいずれかである。

【0 3 0 2】

式(XXIV)で示される化合物のいくつかの例において、

R が式(a)である場合、

R_1 は、-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)、1-ピペラジニル、3-メチル-ピペラジン-1-イルまたは-(4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イル)であり、

R_2 は、2-Clまたは2-CH₃であり、

R_3 は、3-CH₃、3-CF₃またはHであり、

R_a は、HまたはCH₃であり、

R が式(b)である場合、

R_4 は、-(4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イル)、3-メチル-ピペラジン-1-イルまたは4-メチル-3-メチル-ピペラジン-1-イルであり、

R_a は、HまたはCH₃であり、

R が式(c)である場合、

R_{14} は、-4-メチル-ピペラジン-1-イル、3-メチル-ピペラジン-1-イル、-4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イル、1-ピペラジニル、4-メチル-3-メチル-ピペラジン-イル、3-メトキシエチル-ピペラジン-1-イル、3-エチル-ピペラジン-1-イル、3-ベンジル-ピペラジン-1-イルまたは3-CH₂F-ピペラジン-1-イルであり、

R_{15} は、Cl、Br、CF₃、Fであり、

R_{16} は、CH₃、H、CH₂-CH₃であり、

R_a は、HまたはCH₃であり、

R_b は、H、CH₂-CH₂-CH₃、F、CH(CH₃)₂、Cl、OCH₃、CH₃またはCH₂-CH₃であり、

R が式(d)である場合、

R_8 は、3-メチル-ピペラジン-1-イル、4-ベンジル-1-ピペラジニルまたは1-ピペラジニルであり、

R_a は、CH₃またはHであり、

R が式(e)である場合、

10

20

30

40

50

R₉は、-4,7-ジアザ-スピロ[2.5]オクト-7-イル、3-エチル-ピペラジン-1-イル、3-メチル-ピペラジン-1-イル、4-メチル-3-メチル-ピペラジン-1-イルまたは3-エチル-ピペラジン-1-イルであり、

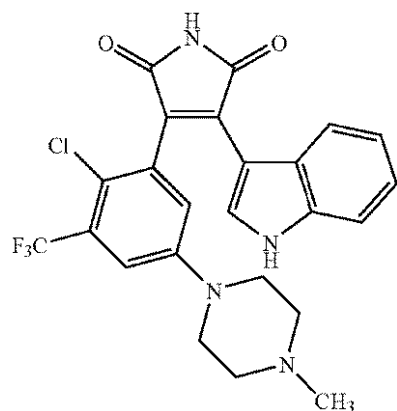
R_aは、H、CH₂-CH₃またはCH(CH₃)₂であり、

R_bは、CH₃、F、CH(CH₃)₂、OCH₃、CH₂-CH₃またはClである。

【0303】

式(XXXXII)で示される化合物の特定の実施態様として、式：

【化190】

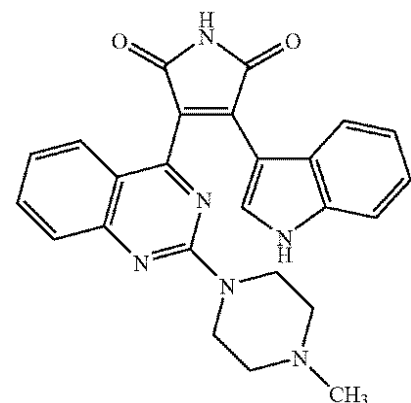


10

20

で示される、3-[2-クロロ-5-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-3-トリフルオロメチル-フェニル]-4-(1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン；および式：

【化191】



30

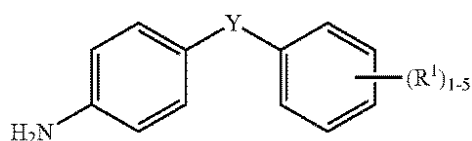
で示される、3-(1H-インドール-3-イル)-4-[2-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-キナゾリン-4-イル]-ピロール-2,5-ジオンが挙げられる。

【0304】

他の実施態様において、PKC-θ阻害剤は、その全体が参照することによって本明細書に援用されるAjiokaの米国特許出願公開公報No. 2013/0225687に開示の選択的PKC-θ小分子化合物から選ばれる。これらの化合物は、式(XXXXIII)：

40

【化192】



(XXXXIII)

[式中、Yは、-O-、および-S-から選ばれる；

各R¹は独立して、n-プロピル、イソプロピル、t-ブチル、t-ペンチル、CF₃、OCF₃、シ

50

クロペンチル、ピロリル、およびCO₂Hから選ばれる]

で示される化合物およびその塩、水和物およびプロドラッグであり、PKC-θを選択的に阻害する。

【0305】

本発明は、既知のPKC-θ阻害剤のみならず、たとえば、上述のLSD阻害剤に関して開示された任意の適切なスクリーニングアッセイによって同定されたPKC-θ阻害剤も包含する。したがって、本発明は、PKC-θを阻害し、次に、PKC-θ-過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(i)形成；(ii)増殖；(iii)維持；(iv)EMT；または(v)METの少なくとも1つを変更するか、またはがん(たとえば、転移性がん)を治療もしくは予防するのに有用な調節剤をスクリーニングする方法にも拡張される。いくつかの実施態様において、該スクリーニング法は、(1)調製品を試験薬と接触させること、ここで、調製品は、(i)PKC-θの少なくとも生物学的に活性なフラグメントまたはその変異体もしくは誘導体に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチド；または(ii)PKC-θ遺伝子の転写産物またはその一部がそれから生産可能であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；または(iii)レポーター遺伝子に作動可能にされるPKC-θ遺伝子の発現を調節する遺伝的配列の少なくとも一部(たとえば、転写エレメント)を含むポリヌクレオチドを含む；および(2)試験薬の不在下での参照レベルまたは機能的活性と比較した、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはレポーター遺伝子の発現産物のレベルまたは機能的活性における変化を検出すること；を含む。試験薬の不在下での正常または参照レベルおよび／または機能的活性と比較した、該ポリペプチド、転写産物もしくは転写産物の一部またはレポーター遺伝子の発現産物のレベルおよび／または機能的活性の検出された低下は、該試験薬が、PKC-θ-過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(i)形成；(ii)増殖；(iii)維持；(iv)EMT；または(v)METの少なくとも1つを変更するか、またはがん(たとえば、転移性がん)を治療もしくは予防するのに有用であることを示す。適切には、これは、試験薬がPKC-θ-過剰発現細胞の(i)形成；(ii)増殖；(iii)維持；(iv)EMT；または(v)METの少なくとも1つを変更するか、またはがんを治療もしくは予防するかどうかを分析または決定することによって確認される。

【0306】

3. 治療および予防用途

本発明によれば、LSD(たとえば、LSD1またはLSD2)機能を阻害する薬剤ならびにPKC-θ機能を阻害する薬剤が、PKC-θ-過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(i)形成；(ii)増殖；(iii)維持；(iv)EMT；または(v)METの少なくとも1つを変更するか、またはがん(たとえば、転移性がん)を治療もしくは予防するための活性剤として有用であることが提案される。したがって、LSD阻害剤は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率または(v)生存能力の少なくとも1つを阻害するために、および／またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)の(vi)EMTを阻害するために、および／またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)の(vii)METを刺激もしくは誘導するために、さらに詳しくは、非転移性または転移性がんなどのがんの症状を治療もしくは予防および／または緩和するために、およびがんの再発を防止するために、PKC-θ阻害剤との併用(併用療法)で(たとえば、同じ組成物中で、または別々の組成物中で)、および任意に医薬的に許容しうる担体とともに、個人に投与されうる。

【0307】

この方法は、LSD阻害剤を、PKC-θ阻害剤と別々に、同時にまたは連続的に投与することを含む。いくつかの実施態様において、これは、両方のタイプの薬剤を包含する単一組成物もしくは薬理学的製剤を投与することによって、または一方の組成物が、LSD阻害剤を含み、他方が、PKC-θ阻害剤を含む別々の組成物もしくは製剤を同時に投与することによって、達成されうる。他の実施態様において、LSD阻害剤による治療は、数分から数日の間隔で、PKC-θ阻害剤による治療に先行するか、または後続することができる。LSD阻害剤がPKC-θ阻害剤とは別で投与される実施態様においては、LSD阻害剤が、上述のようにEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)においてPKC-θ阻害

剤との有利な組み合わせ効果を発揮することができる状態、特に、がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)の進行を逆行もしくは阻止する患者の能力を維持もしくは増強することができる状態であるように、各送達のために失効しないようにする。このような場合、互いに約1~12時間以内、より適切には互いに約2~6時間以内に両方を投与することが企図される。しかしながら、場合によっては、治療期間を大きく延長するのが望ましく、その場合、数時間(2、3、4、5、6または7時間)~数日(1、2、3、4、5、6、7または8日)が各投与の間に経過する。

【0308】

LSD阻害剤またはPKC- θ 阻害剤のいずれかの複数回の投与が望ましいことが考えられる。LSD阻害剤を「A」とし、PKC- θ 阻害剤を「B」として、以下に例示されるような、さまざまな組合せを用いることができる：

10

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B
A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A
A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B。

【0309】

他の組合せが、企図される。さらに、両方の薬剤は、同量の薬剤単独で投与するのと比較して、EMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)の(i)形成、(ii)増殖、(iii)維持、(iv)生存率または(v)生存能力の少なくとも1つを阻害するため、および/またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)の(vi)EMTを阻害するため、および/またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)の(vii)METを刺激もしくは誘導するため、さらに詳しくは、非転移性または転移性がんなどのがんの症状を治療もしくは予防および/または緩和するため、およびがんの再発を防止するために有効な組合せ量で、患者に送達される。

20

【0310】

医薬的に活性である限りあらゆるLSD阻害剤またはPKC- θ 阻害剤を本発明の組成物と方法に用いることができる。「医薬的に活性な」LSDまたはPKC- θ 阻害剤は、EMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSCまたは非CSC腫瘍細胞)の(i)形成；(ii)増殖；(iii)生存率；(iv)生存能力；または(v)維持；またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(vi)EMTの減少、障害、抑止、または予防、および/またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(vii)METの増強、および/または、それを必要とする個体に投与したときの、症状の発生の予防、そのような症状の抑制、または存在する転移性がん関連症状の治療といったような悪性腫瘍、特に転移性がんの治療および/または予防をもたらす形態である。

30

【0311】

本発明の方法に用いるための投与方法、投与したLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の量、ならびにLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤製剤は、当該分野のルーチンおよび当業者の技術内である。悪性腫瘍、特に転移性がんを治療したか否かは、適切なコントロールに比べて疾患の経過を示す1またはそれ以上の診断パラメータを測定することにより決定する。動物実験の場合において、「適切なコントロール」は、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤で治療されていないか、またはLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤を含まない医薬組成物で治療した動物である。ヒト対象の場合は、「適切なコントロール」は、治療前の個体、またはプラセボで処置したヒト(たとえば、年齢が適合するかまたは同様のコントロール)でありうる。本発明によれば、転移性がんの治療は、限定されるものではないが、(1)患者のLSD-過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(i)形成；(ii)増殖；(iii)生存率；(iv)生存能力；または(v)維持；またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(vi)EMTの進行を弱め、抑制し、減じ、予防し、または阻止し、および/またはEMT調節遺伝子過剰発現細胞(たとえば、CSC)の(vii)METを増強し；(2)対象のがん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)を治療し；(3)がん体質であるがまだがんと診断されていない(すなわち、処置が、がんの予防的処置を構成する)対象のがん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)を予防し；または(iii)がん(たとえば、転移性がん)の退縮をもたらすことを含み、包含する

40

50

。

【0312】

本発明の組成物と方法は、がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)と診断されているか、がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)があると疑われるか、がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)に罹りやすいことがわかっており、がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)が発生する可能性があると考えられるか、または以前に治療したがん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)の再発を生じる可能性があると考えられる個体を治療するのに適している。がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)はホルモンレセプター陽性またはホルモンレセプター陰性でありうる。ある状態において、該がん(たとえば、非転移性がんまたは転移性がん)はホルモンレセプター陰性であり、ホルモンまたはエンドクリン療法に抵抗性である。がんが乳がんである状態において、乳がん(たとえば、非乳腺CMC腫瘍細胞)はホルモンレセプター陰性(たとえば、エストロゲンレセプター(ER)陰性および/またはプロゲステロンレセプター(PR)陰性)である。

10

【0313】

ある状態において、意図する投与方法に応じて、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤含有組成物は、一般的には約0.000001%~90%、約0.0001%~50%、または約0.01%~約25%(重量%)の該阻害剤を含み、残りは適切な医薬的担体または希釈剤などである。LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の用量は、種々の因子、たとえば投与方法、罹患対象の種、年齢、性別、体重、および一般健康状態に依存しうるし、標準的プロトコルを用いて当業者が容易に決定することができる。用量は、LSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤のその標的分子に対する結合親和性、そのバイオアベイラビリティ、およびそのin vivoおよび薬物動態特性も考慮するだろう。その際、該薬剤の正確な投与量は、施術者の判断にも依存しうる。転移性がんの治療または予防において投与する薬剤の有効量の決定において、医師または獣医師は、該疾患または病状の進行を経時的に評価することができる。とにかく、当業者は、過度な実験を行うことなくLSD阻害剤およびPKC- θ 阻害剤の適切な用量を容易に決定することができる。患者に投与する活性物質の用量は、患者に経時的な有益な反応、たとえば、CMC(たとえば、乳腺CMC)および/または非CMC腫瘍細胞の形成、増殖、生残、生存、または維持の障害、抑止、または予防、非CMC腫瘍細胞のEMTの阻害、CMC(たとえば、乳腺CMC)のMETの促進、および/または転移性がんの治療および/または予防をもたらすのに十分であるべきである。該用量を血液悪性腫瘍の症状を軽減するために適切な間隔で投与することができる。そのような間隔は、当業者に知られたルーチン手段を用いて確認することができ、用いる活性物質およびその製剤の種類に応じて変化しうる。たとえば、該間隔は、毎日、隔日、毎週、隔週、毎月、隔月、年4回、年2回、または年1回でありうる。

20

30

【0314】

投与量と投与間隔は、LSD/PKC- θ -阻害効果を維持するのに十分な活性物質の血漿レベルをもたらすように個々に調整することができる。全身投与のための通常患者への用量は、1~2000mg/日、通常1~250mg/日、典型的には10~150mg/日、0.02~25mg/kg/日、通常0.02~3mg/kg/日、典型的には0.2~1.5mg/kg/日の範囲である。患者の体表面積では、0.5~1200mg/m²/日、通常0.5~150mg/m²/日、典型的には5~100mg/m²/日の範囲である。

40

【0315】

本発明の実施において、LSD(たとえば、LSD1およびLSD2)およびPKC- θ の、LSDおよびPKC- θ 阻害剤による阻害は、CSCの形成、増殖、生残、生存、または維持の減少をもたらす、同様に、CSCから分化する非CSC腫瘍細胞がわずかになり、非CSC腫瘍細胞の補助がん療法または薬剤によるより有効な治療をもたらすだろう。したがって、本発明は、さらに、LSDおよびPKC- θ 阻害剤を非CMC腫瘍細胞増殖、生残、または生存を阻害する少なくとも1のがん療法と同時に投与することを予期する。LSD阻害剤は、該がん療法後に治療的に用いるか、または該療法を施す前または該療法と一緒に用いることができる。したがって、本発明は、LSD阻害剤、PKC- θ 阻害剤およびがん療法(その非限定的例は、放射線療法、外科手術、化学療法、ホルモン除去療法、アポトーシス促進療法および免疫療法を含む)

50

の同時投与を用いる組み合わせ療法を予期する。

【0316】

3.1 放射線療法

放射線療法は、DNA損傷、たとえば、 γ 放射線治療、X線、UV放射線治療、マイクロ波、電子放出、ラジオアイソトープなどを誘導する放射線照射および波を含む。療法は、上記の形の放射線照射で局所腫瘍部位を照射することにより達成できる。おそらくこれらの因子のすべては、DNA前駆体、DNAの複製と修復、および染色体の組み立てと維持における広範囲の損傷DNAをもたらす。

【0317】

X線の線量範囲は、50～200レントゲンを長期間(3～4週間)毎日から2000～6000レントゲンの単一線量の範囲である。ラジオアイソトープの線量範囲は大きく変化し、アイソトープの半減期、放射した放射線の強さと種類、および新生物細胞による取り込みに依存する。

10

【0318】

放射線療法の非限定的例は、高精度放射線外部照射(50～100グレイを4～8週間にわたりフラクションとして照射)、単発または分割高線量率小線源射療法、永続的組織内小線源射療法、全身性ラジオアイソトープ(たとえば、ストロンチウム89)を含む。ある態様において、放射線療法は、放射線増感剤と組み合わせて投与することができる。放射線増感剤の実例は、限定されるものではないが、エファプロキシラル、エタニダゾール、フルオゾール、ミソニダゾール、ニモラゾール、テモポルフィン、およびチラパザミンを含む。

20

【0319】

3.2 化学療法

化学薬剤は、下記カテゴリーのいずれかまたはそれ以上から選ぶことができる：

(i)内科的腫瘍学に用いる抗増殖/抗新生物薬およびそれらの組み合わせ、たとえばアルキル化剤(たとえば、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロランブシル、ブスルファン、およびニトロソウレア)；代謝拮抗物質(たとえば、抗葉酸薬、たとえばフルオロピリジン、たとえば5-フルオロウラシルおよびテガフル、ラルチトレキセド、メトトレキセート、シトシンアラビノシド、およびヒドロキシウレア；抗腫瘍抗生物質(たとえば、アントラサイクリン、たとえばアドリアマイシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダウノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシンC、ダクチノマイシン、およびミソラマイシン))；抗有糸分裂薬(たとえば、ビンカアルカロイド、たとえばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、およびビノレルビン、およびタキソイド、たとえばパクリタキセルおよびドセタキセル；およびトポイソメラーゼ阻害剤(たとえば、エピポドフィロトキシン、たとえばエトポシドおよびテニポシド、アムサクリン、トポテカン、およびカンプトテシン)；

30

【0320】

(ii)細胞増殖抑制剤、たとえば抗エストロゲン(たとえば、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、およびヨードキシフェン)、エストロゲンレセプター下方調節剤(たとえば、フルベストラント)、抗アンドロゲン(たとえば、ビカルタミド、フルタミド、ニルタミド、およびシプロテロンアセテート)、UHアンタゴニストまたはLHRHアゴニスト(たとえば、ゴセレリン、ロイプロレリン、およびブセレリン)、プロゲステロゲン(たとえば、メゲストロールアセテート)、アロマターゼ阻害剤(たとえば、アナストロゾール、レトロゾール、ボラゾール、およびエキセメスタン)、および5 α -レダクターゼ阻害剤、たとえばフィナステリド；

40

【0321】

(iii)がん細胞浸潤を阻害する薬剤(たとえば、メタロプロテアーゼ阻害剤、たとえばマリマスタット、およびウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子レセプター機能阻害剤)；

【0322】

(iv)増殖因子機能の阻害剤、たとえば、そのような阻害剤は以下を含む：増殖因子抗体、増殖因子レセプター抗体(たとえば、抗erbb2抗体トラスツズマブ[Herceptin(登録商標)]お

50

よび抗erbb1抗体セツキシマブ[C225])、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、MEK阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、およびセリン/トレオニンキナーゼ阻害剤、たとえば上皮増殖因子ファミリーの他の阻害剤(たとえば、他のEGFRファミリーチロシンキナーゼ阻害剤、たとえばN-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン-4-アミン(ゲフィチニブ、AZD1839)、N-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミン(エルロチニブ、OSI-774)、および6-アクリルアミド-N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン-4-アミン(CI 1033))、たとえば、血小板由来増殖因子ファミリーの阻害剤、たとえば肝細胞増殖因子ファミリーの阻害剤；

【0323】

(v) 抗血管新生剤、たとえば血管内皮増殖因子の効果を阻害するもの(たとえば、抗血管内皮細胞増殖因子抗体ベバシズマブ[Avastin(登録商標)]、たとえば、国際特許出願WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856およびWO 98/13354に記載の化合物)および他のメカニズムにより作用する化合物(たとえば、リノミド、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 機能の阻害剤、およびアンギオスタチン)；

【0324】

(vi) 血管損傷剤、たとえばコンプレスタチンA4および国際特許出願WO 99/02166、W000/40529、WO 00/41669、W001/92224、W002/04434、およびW002/08213に記載の化合物；

【0325】

(vii) アンチセンス療法、たとえば、上記標的を標的とするもの、たとえばISIS 2503、抗ras アンチセンス；および

【0326】

(viii) 以下を含む遺伝子療法アプローチ：たとえば、異常遺伝子(たとえば異常p53)置換アプローチ、または異常GDEPT(遺伝子標的酵素プロドラッグ療法)アプローチ、たとえば、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ、または細菌ニトロレダクターゼ酵素を用いるもの、および化学療法または放射線療法に対する患者の耐容性を増加させるためのアプローチ、たとえば多薬剤耐性遺伝子療法。

【0327】

3.3 免疫療法

免疫療法アプローチは、たとえば、患者腫瘍細胞の免疫原性を増加させるex-vivoおよびin-vivoアプローチ、たとえば、サイトカイン、たとえば、インターロイキン2、インターロイキン4、または顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子によるトランスフェクション、T細胞アネルギーを減少させるアプローチ、トランスフェクションした免疫細胞、たとえばサイトカインでトランスフェクションした樹状細胞を用いるアプローチ、サイトカインでトランスフェクション腫瘍細胞株を用いるアプローチ、および抗イデオタイプ抗体を用いるアプローチを含む。これらのアプローチは、一般的には、がん細胞を標的とし破壊する免疫エフェクター細胞および分子の使用に依存する。免疫エフェクターは、たとえば悪性細胞表面のあるマーカーに特異的な抗体でありうる。該抗体は単独で療法のエフェクターとして役立つか、細胞の殺滅を実際に促進する他の細胞を補充することができる。また、該抗体は、薬剤または毒素(化学薬剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など)と結合し、単に標的物質として役立つ。あるいはまた、該エフェクターは、悪性細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を保持するリンパ球でありうる。種々のエフェクター細胞は細胞毒性T細胞およびNK細胞を含む。

【0328】

3.4 他の療法

他のがん療法の例は、光線療法、冷凍療法、毒素療法、またはアポトーシス促進療法を含む。当業者は、このリストはがんおよび他の過形成病変に利用可能な治療法の種類を網羅していないことがわかるだろう。

【0329】

化学療法および放射線療法が急速に分裂する細胞を標的とし、および/または細胞周期

10

20

30

40

50

または細胞分裂を崩壊させることはよく知られている。これらの治療は、その進行を遅くし、または治癒的治療により疾患の症状を逆転させるためにがんの種々の形の治療の部分として提供される。しかしながら、これらのがん治療は、免疫不全状態を生じ、それに続いて病原感染症をもたらすことがあり、したがって、本発明は、がん療法から生じる免疫不全状態から生じる感染症に有効であるかまたはそのリスクの増加があるLSD阻害剤、がん療法、および高感染剤を用いる組み合わせ療法にも及ぶ。抗感染剤は、適切には、限定されるものではないが、微生物、たとえば、ウイルス、細菌、酵母、真菌、原虫などを殺すかまたはその増殖を阻害する化合物を含む抗微生物薬から選ばれ、抗生物質、殺アメーバ薬、抗真菌剤、抗原虫薬、抗マラリア薬、抗結核薬、および抗ウイルス薬を含む。抗感染薬は、その範囲内に駆虫薬および抗線虫薬も含む。実例となる抗生物質は以下を含む：

キノロン(たとえば、アミフロキサシン、シノキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、フレロキサシン、フルメクイン、ロメフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、オキシリニック酸、ペフロキサシン、ロソキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン、スパルフロキサシン、クリナフロキサシン、ガチフロキサシン、モキシフロキサシン；デミフロキサシン；およびガレノキサシン)、テトラサイクリン、グリシルサイクリン、およびオキサゾリジノン(たとえば、クロルテトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、リメサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、チゲサイクリン；リネゾリド、エペロゾリド)、グリコペプチド、アミノグリコシド(たとえば、アミカシン、アルベカシン、ブチロシン、ジベカシン、ホルチマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、メオマイシン、ネチルマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン)、 β -ラクタム(たとえば、イミペネム、メロペネム、ピアペネム、セファクロール、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セファゾリン、セフィキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフォニシド、セフォペラゾン、セフォラニド、セフォタキシム、セフォチアム、セフピミゾール、セフピラミド、セフボドキシム、セフスロジン、セフタジジム、セフテラム、セフテゾール、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトリアゾン、セフロキシム、セフゾナム、セファアセトリル、セファレキシン、セファログリシン、セファロリジン、セファロチン、セファピリン、セファラジン、セフィネタゾール、セフォキシチン、セフォテタン、アズトレオナム、カルモナム、フロモキシム、モキサラクタム、アミジノシリン、アモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、カルベニシリン、ベンジルペニシリン、カルフェシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、メチシリン、メズロシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリンG、ピペラシリン、スルベニシリン、テモシリン、チカルシリン、セフジトレン、SC004、KY-020、セフジニル、セフチブテン、FK-312、S-1090、CP-0467、BK-218、FK-037、DQ-2556、FK-518、セフォゾプラン、ME1228、KP-736、CP-6232、Ro 09-1227、OPC-20000、LY206763)、リファマイシン、マクロライド(たとえば、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、オレアンドロマイシン、ロキタマイシン、ロサラマイシン、ロキシスロマイシン、トロレアンドロマイシン)、ケトリド(たとえば、テリスロマイシン、セスロマイシン)、クメルマイシン、リンコサミド(たとえば、クリンダマイシン、リンコマイシン)、およびクロラムフェニコール。

10

20

30

40

【0330】

実例となる抗ウイルス薬は、硫酸アバカビル、シクロビルナトリウム、塩酸アマンタジン、アンブレナビル、シドフォビル、デラビルジンメシラート、ジダノシン、エファビレンツ、ファンシクロビル、フォミビルセンナトリウム、フォスカルネットナトリウム、ガンシクロビル、硫酸インジナビル、ラミブジン、ラミブジン/ジドブゼン、ネルフィナビルメシラート、ネビラピン、リン酸オセルタミビル、リバビリン、塩酸リマンダジン、リトナビル、サキナビル、サキナビルメシラート、スタブジン、塩酸バラシクロビル、ザルシタピン、ザナミビル、およびジドブゼンを含む。

【0331】

50

殺アメーバ薬または抗原虫薬の非限定的例は、アトバクオン、塩酸クロロキン、リン酸クロロキン、メトロニダゾール、塩酸メトロニドゾール、およびペンタミジンイセチオネートを含む。駆虫薬は、メベンダゾール、ピランテルパモエート、アルベンダゾール、イベルメクチン、およびチアベンダゾールから選ばれる少なくとも1でありうる。実例となる抗真菌剤は、アンホテリシンB、アンホテリシンB硫酸コレステルイル複合体、アンホテリシンB脂質複合体、アンホテリシンBリボソーマル、フルコナゾール、フルシトシン、グリセオフルビンマイクロサイズ、グリセオフルビンウルトラマイクロサイズ、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ナイスタチン、および塩酸テルビナフィンから選ぶことができる。抗マラリア薬の非限定的例は、塩酸クロロキン、リン酸クロロキン、ドシサイクリン、硫酸ヒドロキシクロロキン、メフロキンヒドロクロリド、リン酸プリマキン、ピリメタミン、およびピリメタミンとスルファドキシシンから選ぶことができる。抗結核薬は、限定されるものではないが、クロファジミン、シクロセリン、ダブゾン、塩酸エタンブトール、イソニアジド、プラジナミド、リファブチン、リファンピン、リファペンチン、および硫酸ストレプトマイシンを含む。

【0332】

上記のように、本発明は、LSDおよびPKC- θ 阻害剤とさらなる薬剤の同時投与を含む。LSDおよびPKC- θ 阻害剤を他の薬剤とともに投与することを含む態様において、該組み合わせにおける活性物質の用量は、それら自体の有効量を含むことができ、さらなる薬剤はさらに患者に対する治療または予防的利益を増強しうる。あるいはまた、LSDおよびPKC- θ 阻害剤および該さらなる薬剤は、全体として転移性がんを予防または治療するための有効量を含みうる。有効量は、たとえば投与のタイミングと回数、投与方法、製剤などを含む特定の治療管理の文脈において定義することができる。ある態様において、LSDおよびPKC- θ 阻害剤および所望によりがん療法は、ルーチンスケジュールで投与する。あるいはまた、該がん療法は、症状が発生したときに投与することができる。本明細書で用いている「ルーチンスケジュール」は、予め決定した指定期間を表す。ルーチンスケジュールは、該スケジュールが予め決定されている限り長さが同じまたは異なる期間を含みうる。たとえば、ルーチンスケジュールは、毎日、隔日、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、一週間毎、一月毎に、または2カ月毎、3カ月毎、4カ月毎、5カ月毎、6カ月毎、7カ月毎、8カ月毎、9カ月毎、10カ月毎、11カ月毎、12カ月毎などにあらゆる日数または週数のセットでLSDおよびPKC- θ 阻害剤を投与することを含みうる。あるいはまた、予め決定したルーチンスケジュールは、LSDおよびPKC- θ 阻害剤とがん療法を、第1週は毎日、次いで数カ月間は毎月、その後3カ月毎に同時投与することを含む。適切なスケジュールがある日に投与することを含むことを予め決定している限り、あらゆる特定の組み合わせがルーチンスケジュールでカバーされる。

【0333】

さらに、本発明は、CMC細胞の増殖、生残、または生存を減少させるかまたは抑制し、悪性腫瘍、特に転移性がんを予防または治療するための、LSD阻害剤、PKC- θ 阻害剤および所望により悪性腫瘍の治療に有用ながん薬剤を含む医薬組成物を提供する。本発明の製剤は、医薬的に許容しうる濃度の塩、緩衝剤、保存料、適合担体、アジュバント、および所望により他の医薬成分をルーチンの含みうる医薬的に許容しうる溶液で投与される。治療する特定の病状に応じて、該製剤を全身または局所投与することができる。製剤および投与の技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co., Easton, Pa., 最新版にみることができる。適切な経路は、たとえば、経口、直腸、経粘膜、または腸投与；非経口送達(筋肉内、皮下、髄内注射、およびくも膜下、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻内、または眼内注射を含む)を含む。注射では、本発明の活性物質または薬剤は、適切には生理学的に適合性の緩衝液、たとえば、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理学的食塩水緩衝液中の水性溶液に製剤化することができる。経粘膜投与では、浸透すべき障壁に適した浸透剤を製剤に用いる。そのような浸透剤は一般的に当該分野で知られている。

【0334】

10

20

30

40

50

該薬剤は、当該分野でよく知られた医薬的に許容しうる担体を用いて経口投与に適した用量に容易に製剤化することができる。そのような担体は、本発明の化合物を、治療する患者が経口摂取するための剤形、たとえば、錠剤、丸薬、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などに製剤化することを可能にする。これらの担体は、糖、デンプン、セルロースおよびその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギン酸、リン酸緩衝溶液、乳化剤、等張生理食塩水、および発熱物質不含水から選ぶことができる。

【0335】

非経口投与用の医薬製剤は、水溶性の活性化合物の水性溶液を含む。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油状注射懸濁液として製造することができる。適切な脂溶性溶媒またはピークルは、脂肪酸油、たとえば、ゴマ油、または合成脂肪酸エステル、たとえば、オレイン酸エチル、またはトリグリセリド、またはリボソームを含む。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘性を増加させる物質、たとえば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランを含む。所望により該懸濁液は、適切な安定化剤、または該化合物の可溶性を増大して高濃縮溶液の製造を可能にする薬剤も含みうる。

【0336】

経口使用のための医薬製剤は、活性化合物と固体賦形剤を混合し、所望により得られた混合物を粉にし、次いで所望により適切な助剤を添加した後に顆粒の混合物を加工して錠剤または糖衣錠コアを得ることにより得ることができる。適切な賦形剤には、特に充填剤、たとえば糖(ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む)；セルロース調製物、たとえば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、ガムトラガカント、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、またはポリビニルピロリドン(PVP)などがある。必要に応じて、崩壊剤、たとえば、架橋ポリビニルピロリドン、カンテン、またはアルギン酸、またはその塩、たとえば、アルギン酸ナトリウムを加えることができる。そのような組成物は、あらゆる薬学的方法により製造することができるが、すべての方法は、1またはそれ以上の上記薬剤と1またはそれ以上の必要な成分を構成する該担体を結合する工程を含む。一般的には、本発明の医薬組成物は、それ自体知られた方法で、たとえば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣錠化、研和、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥プロセスにより製造しうる。

【0337】

糖衣錠コアは適切にコーティングして提供される。このためには、濃縮糖溶液を用いることができ、これは所望によりアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボールゲル、ポリエチレングリコール、または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含みうる。活性化合物用量の異なる組み合わせを特徴付けるかまたは識別のために錠剤または糖衣錠コーティングに染料または色素を加えることができる。

【0338】

経口使用することができる医薬は、ゼラチンでできたプッシュフィットカプセル、およびゼラチンおよび可塑剤(グリセロールまたはソルビトール)でできた軟質密封カプセルを含む。プッシュフィットカプセルは、充填剤、たとえばラクトース、結合剤、たとえばデンプン、または潤滑剤、たとえばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、および所望により安定化剤と混合した活性成分を含むことができる。軟質カプセル中の活性化合物は適切な液体、たとえば脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁することができる。さらに、安定化剤を加えることができる。

【0339】

本発明の薬剤の剤形は、このために特に指定された注射または埋込制御放出用具、またはこの方法でさらに作用するよう修飾した他の形の埋込剤も含みうる。本発明の薬剤の制御放出は、それをたとえば、アクリル樹脂、ワックス、高級脂肪族アルコール、ポリ乳酸およびポリグリコール酸を含む疎水性ポリマー、およびある種のセルロース誘導体、たと

10

20

30

40

50

えばヒドロキシプロピルメチルセルロースでコーティングすることにより達成することができる。さらに、制御放出は、他のポリマーマトリックス、リポソーム、またはマイクロスフェアを用いて達成することができる。

【0340】

本発明の薬剤は、医薬的に適合性の対イオンを含む塩として提供することができる。医薬的に適合性の塩は、限定されるものではないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などを含む多くの酸で形成することができる。塩は、対応する遊離塩基型である水性または他のプロトン性溶媒により溶解性である傾向がある。

【0341】

本発明の方法に用いるあらゆる化合物について、医薬的有效用量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。たとえば、細胞培養で決定した IC_{50} を含む循環濃度範囲を達成するように動物モデルで用量を処方することができる(たとえば、LSDポリペプチドの活性を最大の半分の阻害を達成する活性剤の濃度)。そのような情報を用いてヒトで有用な用量をより正確に決定することができる。

【0342】

そのような薬剤の毒性と治療効果は、 LD_{50} (ポピュレーションの50%致死用量)および ED_{50} (ポピュレーションの50%治療的有效用量)を決定することにより、細胞培養または実験動物を用いる標準的医薬的方法により決定することができる。毒性作用と治療効果の用量比は治療指数であり、比 LD_{50}/ED_{50} で表すことができる。治療指数が大きい化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよび動物試験から得られるデータはヒトで用いる用量範囲を処方するのに用いることができる。そのような化合物の用量は、好ましくはほとんどまたは全く毒性がない ED_{50} を含むある範囲の循環濃度内にある。用量は、用いた剤形と用いた投与経路に応じてこの範囲内で変化しうる。正確な処方、投与経路、および用量は、患者の病状を考慮して個々の医師が選ぶことができる。(たとえば、Fingl et al., 1975, 「The Pharmacological Basis of Therapeutic」、Ch.1 p1参照)

【0343】

あるいはまた、全身的より局所的に、しばしばデポーまたは持続放出製剤で、たとえば組織(皮下組織または大網組織が好ましい)中に化合物を直接注射することにより投与することができる。

【0344】

さらに、標的とする薬剤送達システムで、たとえば組織特異的抗体でコートしたリポソームで薬剤を投与することができる。リポソームは該組織を標的とし、該組織に選択的に取り込まれるだろう。

【0345】

局所投与または選択的取り込みの場合、該薬剤の有効局所濃度は、血漿濃度と関連しないかもしれない。

【0346】

本発明を容易に理解し、実用効果を示すために、特定の好ましい態様を下記の非限定的実施例により説明する。

実施例

【実施例1】

【0347】

CSCSおよびエピジェネティック調節

CSCは種々の重要なin vitro特性を有する。第1に、乳腺CSCは重要な表面マーカーの $CD4^{high} CD24^{low}$ を特徴とする(図1A)。第2に、CSC豊富化ポピュレーションは、浮遊培養で球状コロニー(乳腺CSCでは腫瘍様塊という)を形成する能力がある(図C)。第3に、CSC豊富化ポピュレーションは、化学療法およびイオン化放射線照射への抵抗性の増加を示す。第4に、該ポピュレーションは、異なるトランスクリプトーム特性を示す(図1B)。したがって、CSCは、その独特なin vitro特性を維持する異なる分子メカニズムを有する異なるがん細胞ポピュレーションを示す。

【実施例 2】

【0348】

ヒト乳腺CSCのエピジェネティック調節としてのLSD1機能

H3K4me1およびLSD1 ChIPアッセイを、3ヒトCSCモデルのCD44プロモーター領域にまたがって行った(EC、MCF-7上皮細胞株；BC、MDA-MB 231基礎細胞株)。図2に記載の結果は、LSD1、H3K4me1、およびH3K9me1ヒストン修飾が、転写産物が主として乳腺CSC(たとえば、CD44、UPAR、ラミニン)で豊富化される重要な遺伝子にまたがって豊富化されることを示す。

【実施例 3】

【0349】

10

ヒト正常および乳がん組織におけるLSD1の核染色

正常およびヒト乳がん組織の核染色を、抗LSD1抗体を用いて行った。図3に記載の結果は、正常乳腺組織が正常導管上皮および隣接間質細胞でLSD1(Abcam；1/50希釈)に対する強い核免疫反応性を示し(図3のパネルA参照)、グレード3の侵襲性導管がん(ER/PR-Her2+)は、LSD1に対する強い核免疫反応性を示すことを示す(図3のパネルB参照)。正常乳腺組織の顕微鏡写真の検討(図3のパネルC参照)は、正常導管上皮でCD44(BD Pharmingen；1/50希釈)のまばらな弱い膜性染色を示す。これに対し、該グレード3の侵襲性導管がんはCD44に対する抗体で強い周囲の膜性染色を示す(図3のパネルD参照)。

【実施例 4】

【0350】

20

ヒト乳腺CSCモデルにおけるLSD1 SIRNAノックダウンはCSCを消失させる。

本発明者らは、公表されたプロトコールに従って有効なプールsiRNA(Santa Cruz)を用いてすべてのCSCモデルでLSD1を成功裏にノックダウンさせた。LSD1の85%以上のノックダウンがこれらの系で観察された(図4A)。LSD1ノックダウンは、基礎/転移モデル(図4B)およびMCF IMモデル(図4C)でFACSにより測定したCSCの低下CSCマーカー遺伝子の転写の減少(たとえばCD44(図4D))；腫瘍様塊アッセイで測定した腫瘍様塊の減少(データ示さず)；クロマチン免疫沈殿(ChIP)により測定したLSD1およびH3K4me1マークの減少(図4E)；FAIREにより測定したCD44活性クロマチンドメインの阻害(図4F)をもたらした。

【0351】

30

全体として、これらのデータはLSD1がヒト乳腺CSCのエピジェネティック調節因子として機能することを示す。

【実施例 5】

【0352】

ヒト乳腺CSCモデルのLSD2 SIRNAノックダウンはCSCを消失させる。

本発明者らは、有効なプールsiRNA(Santa Cruz)を用いて乳腺CSCモデルでLSD2も成功裏にノックダウンさせた。また、フローサイトメトリーにおいてCD44^{high} CD24^{low} 乳がん細胞の>85%のノックダウンが見られた(図5AおよびB参照)。LSD1ノックダウンは、腫瘍様塊アッセイにより測定した腫瘍様塊の減少ももたらした(図5C)。

【0353】

40

全体として、これらのデータはLSD2がヒト乳腺CSCのエピジェネティック調節因子として機能することを示す

【実施例 6】

【0354】

特異的阻害剤によるLSD1の阻害はCSC形成を減少させる。

LSD1特異的阻害剤NCD-38は、FACS(図6AおよびB)および腫瘍様塊アッセイ(図1CおよびD)でモニターしたMCF-IMモデルのCSC形成阻害をもたらす。

【実施例 7】

【0355】

LSD1の阻害は間葉上皮転移(MET)をもたらす。

基礎転移モデル(MDA-MB 231)のLSD1特異的阻害剤NCD-38による処置は、CSC形成の減少(

50

図7AおよびB)および間葉細胞の上皮細胞への変換(図7C)をもたらす。

【実施例 8】

【0356】

LSD1阻害剤と化学療法の組み合わせによる腫瘍サイズの減少

LSD1阻害剤バルギリンは、マウス異種移植モデルで化学薬剤ドセタキセルとの組み合わせで腫瘍サイズの減少をもたらす(図8A、B、図9A、B)。

【実施例 9】

【0357】

化学療法およびLSD1阻害剤の組み合わせによるCSCサブポピュレーションの阻害

マウスのLSD1阻害剤バルギリンと化学薬剤ドセタキセルとの組み合わせによる処置は、FACS(図10A)および転写産物(図10B)により測定したCSCサブポピュレーションの減少をもたらす。

【実施例 10】

【0358】

PKC経路：EMTおよびCSC

PKC経路は、さまざまな細胞アッセイを利用するEMTおよびCSCを伴う。第一に、PKC経路誘導物質であるPMAは、MCF-IMモデルにおける形態学的変化(図11 AおよびB)、EMTマーカー-ラミニン-5の細胞内染色(図11 B)および創傷治癒(移動アッセイ)(図11 C)によって観察されるように、最高のEMT変化を引き起こした。第二に、CF-IMおよび基礎/転移モデルにおいて、PKCは、細胞質および核の両方において活性がある(図11 D)。第三に、フローサイトメトリー(FACS)分析(図11 EおよびF)、腫瘍様塊アッセイ(図11 G)およびCSC-誘導性遺伝子の転写産物分析転写産物(図11 H)およびmicroRNA(図11 I)によって観察されるように、PMAによるPKC経路の誘導は、CD44^{high}/CD24^{low}-CSC様細胞の生成をもたらす。

【0359】

全体的に、これらの結果は、PKC経路がEMTおよびCSC形成にとって重要であることを示す。

【実施例 11】

【0360】

PKC活性の阻害はEMTおよびCSC形成を抑制する。

MCF-IMモデルにおける形態学(図12 A)、FACS(図12 B & C)、腫瘍様塊アッセイ(図12 D & E)およびCSC-誘導性遺伝子の転写産物分析(図12 F & G)および基礎転移モデル(図12 I、J & K)によってモニターされるように、広範囲のPKC経路阻害剤は、EMTおよびCSC形成の阻害をもたらす。対照的に、従来のPKC阻害剤であるGo6976とのプレインキュベーションは、PMA誘導EMT様形態学的変化またはCSC形成を妨げなかった(図12 C & H)。

【0361】

全体として、これらの結果は、PKC活性がEMTおよびCSC形成に必須であることを示す。

【実施例 12】

【0362】

PKC-θシグナル伝達および核効果の阻害は、EMTおよびCSCの消失をもたらす。

MCF-IMモデルにおける形態学(図13 A)、FACS(図13 B)および転写産物分析(図13 C)によってモニターされるように、PKC-θ特異的ペプチド阻害剤は、EMTおよびCSCを消失させる。MCF-IMモデルにおいて、PKC-βではなくてPKC-θのノックダウンは、EMTおよびCSCの阻害をもたらす(図13 D、E & F)。MCF-IMモデルにおいて、PKC-θ NLS(核局在シグナル)突然変異の過剰発現は、核におけるPKC-θの侵入を減少させ、したがって、PKC-θ野生型ベクターと比較して、EMTおよびCSC効果の低下をもたらす(図13 G、HおよびI)。

【0363】

全体として、これらの結果は、PKC-θがEMTおよびCSC形成のマスター調節因子であることを示す。さらに、核PKC-θは、EMTおよびCSC形成にとって重要である。

【実施例 13】

【0364】

10

20

30

40

50

CSCにおける誘導性遺伝子プロモーターへの核PKC- θ の直接的結合

クロマチン免疫沈降アッセイ(ChIP)PKC- θ は、PKC- θ がさまざまなCSCモデルにおいてCSC誘導性遺伝子CD44のプロモーターに直接連結することを示した(図14 A)。MCF-IMモデルにおいて、PKC- θ の活性型(PKC- θ -ホスホ)は、CSC誘導性遺伝子-uPARおよびCD44上のクロマチンと会合し(図14 B & C)、この活性型は、活性転写マーカーRNAポリメラーゼ-II(Pol II)に存在する(図14 D)。PKC阻害剤およびPKC- θ のノックダウンは、CD44遺伝子プロモーターにおけるPKC- θ の結合を減少させる。

【0365】

全体として、これらの結果は、活性型PKC- θ が、EMTおよびCSC形成のエピジェネティック調節因子であることを示す。

【実施例14】

【0366】

核活性PKC- θ ：浸潤性乳がんのマーカー

乳がん進行におけるPKC- θ の臨床的関連性を、正常乳房組織および患者からの浸潤性乳がんにおけるPKC- θ タンパク質発現を調べることによって分析した。健康な個人の乳房組織と比較して、ER/PR⁺/Her-2⁻浸潤がんサブタイプにおけるPKC- θ の強い細胞質発現が観察された。さらに、ER/PR⁺/Her-2⁻浸潤がんサブタイプは、活性-PKC- θ の弱い核染色を有した(図15)。すべての乳がんのタイプは、受容体の状態にかかわらず有糸分裂を受けている乳がん細胞に見られる強い核染色を伴う活性-PKC- θ に対する弱い細胞質免疫反応性を示した。

【0367】

全体として、これらの結果は、核内の活性型PKC- θ が、侵襲性/浸潤性乳がんの診断マーカーであることを示す。

【実施例15】

【0368】

特定の阻害剤を組み合わせることによるLSD1およびPKC- θ 経路の同時阻害は、いずれかの経路阻害剤単独と比較して、両方の阻害剤のより低い用量でのCSC形成を減じる。

【0369】

LSD1阻害剤である、NCD-38単独は、試験された阻害剤の2種類の異なる用量(それぞれ2.5 μ Mおよび5 μ M)で、~50-60%のCSC阻害をもたらす;MCF-IMモデルにおいて(図16 A & B)。

【0370】

PKC- θ 阻害剤であるC27単独は、MCF-IMモデルにおいて、100 nMで~30%の阻害をもたらす(図16 A & B)。対照的に、C27(500nM)単独を高用量で投与すると、MCF-IMモデルにおいて~90%のCSC阻害がもたらされた(図16 A & B)。

【0371】

MCF-IMモデルにおいて、2.5 nMでのNCD-38と100 nMでのC27阻害剤の組み合わせは、CD44およびuPARなどのCSC遺伝子に対するFACS(図16 A & B)および転写産物分析(図16 C & D)によってモニターされるように、~85%CSC阻害をもたらす。したがって、CSCにおけるPKC- θ およびLSD1経路の同時阻害は、両方の阻害剤の低用量の利用を可能にする。

【0372】

実施例1-9のための材料および方法

一般試薬

化学薬品

用いたすべての試薬は、分子生物学または分析グレードに分類された。

【0373】

アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)から得た細胞株

付着性ヒト乳がん細胞株(MCF-7(ATCC(登録商標)番号HTB-22)、MDA-MB-231(ATCC(登録商標)番号HTB-26)、MDA-MB-468(ATCC(登録商標)番号HTB-132)、ヒト付着性乳管がんT-47D(ATCC(登録商標)番号HTB-133)を含む)およびヒト頸がん(HeLa(ATCC(登録商標)番号CCL-2を

10

20

30

40

50

含む)をATCC(VA、USA)から得た。ストックを、RPMIまたはDMEM完全培地(45%加熱不活化ウシ胎児血清(FCS; Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)および9%ジメチルスルホキシド(DMSO)溶液(Cambridge Isotope Laboratories、Inc.、Andover、MA)を含む)中の 5×10^6 細胞/mL部分標本を-196°Cで保存した。細胞ストックを完全培地、RPMI、またはDMEM中で解凍し、マイコプラズマ汚染をチェックした。細胞株をクライオチューブ(NUNC、Roskilde、Denmark)中-70°Cで一夜ストックとして凍結し、液体窒素中で長期保存するために取り出した。

【0374】

培地、緩衝液、および溶液

すべての培地、緩衝液、および溶液は、JCSMR Media/Wash-up Facility、ANU、Canberra、Australiaから得るか。Gibco(Invitrogen Corporation、NY)から購入した。RPMI-1640(Gibco #11875-093)またはDulbecco変法イーグル培地(DMEM)(1X、液体、低グルコース、Gibco #12320-32)完全細胞培養液は、RPMI/DMEM+HEPESに10%加熱不活化FCS、0.1%PSN抗生物質、および2mM L-グルタミンを添加して実験的要求により組織培養用に新たに調製した。

【0375】

抗生物質

抗生物質ストックを0.22 μ mフィルター(Millipore、NSW、Australia)でろ過したDDMに溶解し、JCSMR Media Facility、ANU、Canberra、Australiaが調製した。ペニシリン、ストレプトマイシン、およびネオマイシン(PSN)抗生物質(1000 x ストック): 30.07g/L ペニシリンGナトリウム(MP Biomedicals、LLC)、50g/L硫酸ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、および50g/L硫酸ネオマイシン(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)。PSNは、特記しない限りすべてのRPMI/DMEM完全培地に加えた。

【0376】

オリゴヌクレオチド

遺伝子発現分析用のプライマー/プローブセットをTaqman(登録商標)Gene expression Assays(Applied Biosystems、Foster City、CA)からオンラインで購入した。定量的cDNAリアルタイムPCRに用いたヒトTaqMan(登録商標)プローブセットは、ラミニン-5、フィブロネクチン、インテグリン- β 、snail-1、uPAR、E-カドヘリン、ビメンチン、MMP-1、Zeb1、CD44、CD24、LSD1、PKC- θ 、およびシクロフィリンAを含む。転写産物の定量的cDNAリアルタイムPCR分析に用いたすべてのプライマー配列を表3に示す。

【0377】

すべてのゲノムDNAオリゴヌクレオチドは、EasyOligoes Australia(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)から保証付きオリゴ(Guaranteed Oligos)として100 μ Mストックでオンラインにて購入した。プライマー濃度を同じ遺伝子の異なるプライマーセット間で同様の増幅効率を達成するために最適化した。定量的リアルタイムPCRに用いたすべてのオリゴヌクレオチドプライマー配列を表4に示す。

【0378】

抗体およびコンジュゲート

この試験用のすべての抗体は市販供給源から購入した。すべての購入した市販抗体の詳細を表5に示す。

【0379】

キット

100mM dNTPセット(4x25 μ mol)キット(Astral scientific Pty. Ltd.、NSW、Australia)
Platinum(登録商標)Taqman DNA ポリメラーゼ(Invitrogen、Carlsbad、CA)
QIAmp(登録商標)血液ミニキット(Qiagen、Valencia、CA)
Superscript(登録商標)III RNaseH-逆転写酵素キット(Invitrogen、Carlsbad、CA)
PowerSYBERグリーンPCRマスターミックス(Applied Biosystems、Foster City、CA)
Taqman(登録商標)ユニバーサルPCRマスターミックス(Applied Biosystems、Foster City、CA)

10

20

30

40

50

Taqman(登録商標)MicroRNA逆転写キット

酵素およびマーカー

完全プロテアーゼ阻害剤カクテル錠(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)

DNAse I、RNAse不含(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)

プロテアーゼK(溶液)、RNAグレード(Invitrogen、Carlsbad、CA)

Superscript(登録商標)III RNaseH-逆転写酵素(Invitrogen、Carlsbad、CA)

細胞培養

【0380】

哺乳動物細胞株

10
付着ヒト乳がんMCF-7細胞株をDMEM完全培地中で増殖させた。解凍後、細胞を無菌75cm²中のDMEM完全培地中に最初の分割前2日間維持した。コンフルエント(2日後)になったら、細胞を10mLの予め温めたD-PBS(Gibco-BRL、Gaithersburg、MA)で洗浄し、次いで洗浄した細胞の1mLの0.05%トリプシン-EDTA(1X)(Gibco-BRL、Gaithersburg、MA)を加えた。次に、細胞を37℃で3分間インキュベーションして細胞を剥離し、次いで別の10mL DMEM培地を加えた。次に、細胞を300 x gで10分間遠心分離し、次いで1mLの新鮮完全DMEM培地に再浮遊させ、次いでVi-CELL-XRカウンターでカウントした後、望む細胞密度に分割した。次に、細胞を実験の必要に応じて2~3日間毎に継代し、80%コンフルエントに達したら継代した。ほとんどの実験で、特記しないかぎり、24ウェルプレートで4x10⁴細胞/ウェル、4x10⁵細胞/75cm²フラスコ、または4x10⁶細胞/375cm²フラスコを実験1日前に播種した。MDA-MB-231A11細胞を5%CO₂/O₂の加湿雰囲気中で増殖させ、Hepa-Filtered Infrared(IR)インキュベーター(Forma Scientific Inc.、Materietta、OH)中37℃でインキュベーションした。20
用いたすべての他の細胞株はRPMI-1640完全培地を用いる以外は同じように増殖および継代した。

表 3

【表 4】

表 3

TaqMan（登録商標）からのリアルタイムPCR用ヒトプライマー/プローブセット

遺伝子	NCBI位置 染色体	アッセイの詳細	登録番号	アンプリコン サイズ(bp)
CD44	Chr. 11-35160417-35253949	Hs00153304_m1	NM_000610.3	86
CD24	Chr. Y-21152526-21154705	Hs00273561_m1	NM_013230.2	162
uPAR	Chr. 19-44150248-44174502	Hs00182181_m1	NM_002659.2 NM_001005377.1 NM_001005376.1	64
Zeb1	Chr. 10-31608101-31818742	Hs00611018_m1	NM_001128128.2 NM_030751.4	77
LSD1	Chr. 1 : 23345941-23410184	Hs01002741_m1	NM_001009999.2 NM_015013.3	63
ラミニ ン-5	Chr. 1-183155174-183214262	Hs00194333_m1	NM_005562.2 NM_018891.2	132

10

20

表 4

【表 5】

30

表 4

EasyOligoからのリアルタイムPCR用ヒトプライマー/プローブセット

遺伝子	ゲノムプライマー (5'→3')	
CD44	OLIGO	Seq
	フォワードプライマー	TGAGCTCTCCCTCTTTCCAC
	リバースプライマー	TTGGATATCCTGGGAGAGGA
uPAR	OLIGO	Seq
	フォワードプライマー	GGGAAGCAAAGCAAGGGTTA
	リバースプライマー	GTTTTGTCAGGAGGGATACTGG

40

表 5

【表 6】

表 5

抗体の詳細

抗体	供給者	カタログ 番号	ストック濃度	用いた最終濃度
H3K4Me2	Millipore	07-030	ポリクローナル抗体	2.5 μ g/チューブ
H3K4Me1	Abcam	ab8895	0.3mg/mL	2.5 μ g/チューブ
LSD1	Millipore	07-705	ポリクローナル抗体	5 μ g/チューブ
Pol-II(c-21)	Abcam	ab817	1 mg/mL	5 μ g/チューブ
APCマウス抗ヒトCD44	BD Pharmingen	559942	ポリクローナル抗体	ストックの1:100
PEマウス抗ヒトCD24	BD Pharmingen	555428	ポリクローナル抗体	ストックの1:100

10

【0381】

細胞生存率および密度カウント

細胞生存率はVi-CELL-XRカウンター(Beckman Coulter Ireland Inc., Galway, Ireland)を用いて測定した。市販のVi-CELLカウンター試薬パックをBeckman Coulter Ireland Inc., Galway, Irelandから購入した。再浮遊細胞(1mL培地中)の50 μ L部分標本を450 μ L培地で1:10に希釈し、Vi-CELLカウンターカップにロードして細胞カウントと生存率チェックを行った。細胞生存率カウントは特記しないかぎり常に>98%であった。

20

【0382】

マイコプラズマの検出

凍結前と解凍後に、常に細胞のマイコプラズマ汚染をチェックし、マイコプラズマふりーの細胞のみをすべての実験に用いた。マイコプラズマの検出は、MycoAlert Qマイコプラズマ検出キット(Lonza, ME USA)を用いて行った。

【0383】

刺激条件

MCF-7細胞を実験の必要に応じて規定の密度で刺激1日前に播種した。ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)およびTGF β (R&D systems, Minneapolis, MN)を含むEMTの潜在的誘導物質を表6の種々の濃度とインキュベーションの長さで試験した。

30

【0384】

LSD1阻害条件

用いた市販LSD1阻害剤と供給元情報を表7に示す。溶解培地またはビークル((特記しないかぎり)通常DMSO)の同濃度の対応するコントロール試料も各実験に含めた。

【0385】

上皮間葉転換(EMT)アッセイ

EMTアッセイを24ウェルプレート(Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA)中で行った。このアッセイでは、通常、MCF-7細胞を特記しないかぎり実験1日前に4x10⁴/ウェル/500 μ L培地で播種した。細胞を翌日温培地中で調製した種々のEMT刺激物で刺激し、下記のごとく顕微鏡下でEMT変化をモニターした。EMTのパーセンテージは、一般的には、顕微鏡下で、視野あたり100細胞でカウントした表現型に基づいて計算した。本明細書で用いているすべての潜在的EMT刺激物質を表6に記載し、供給者の説明書に従って調製および保存した。

40

表 6

【表 7】

表 6

潜在的EMT刺激の詳細

EMT誘導因子	供給者とカタログ番号	ストック濃度	最終濃度と刺激時間
PMA	Sigma-Aldrich (P8139)	1mg/mL	20ng/mL~0.2ng/mL、 2~60時間
組換えヒトTGF- β	R&D systems(240/b-CF)	PBS中10 μ g/mL	2.5ng/mL、2~60時間

10

表 7

【表 8】

表 7

LSD1阻害剤情報

阻害剤	供給者とカタログ番号	最終濃度とプレインキュベーション時間
パルギリン	Cayman (10007852)	3mM、17時間
フェネルジン	Sigma (P6777)	500 μ M、17時間
トラニルシプロミン	Enzo life sciences (EL-217)	1 μ M、17時間

20

【0386】

腫瘍様塊アッセイ

下記腫瘍様塊培養液成分をStemCell Technologies Inc.、BC、Canadaから購入した：Mammocult基礎培地(Human)(カタログ番号05621)、Mammocult増殖添加物(ヒト)(カタログ番号05622)、ヘパリン(カタログ番号07904)、およびハイドロコルチゾン(カタログ番号07904)。ハイドロコルチゾン粉末を実験日に新たにmammocult基礎培地に溶解して 10^{-4} M溶液を得た。次に、50mLのMammocult完全培地を45mL Mammocult基礎培地、5mL mammocult増殖添加物、100 μ Lの0.2%ヘパリンストック、500 μ Lの 10^{-4} Mハイドロコルチゾンストック、および50 μ LのPNSを加えて調製した。Mammocult完全培地は、同日に用いるか、または7日間以下で4℃に保存した。

30

【0387】

MCF-7細胞を、175cm²細胞培養フラスコで増殖させ、細胞スクレーパー(Zellschaber、Switzerland)を用いて採取するか、または下記のごとくFACSでソートした。重要なことは、トリプシン処理は腫瘍様塊アッセイを妨げるので細胞の採取に用いなかった。次に、採取した細胞を1mLのmammocult完全培地に再浮遊させ、500 x gにて20℃で3分間遠心分離した。次に、細胞ペレットを1mLのmammocult完全培地に再浮遊し、次いでVi-CELLカウンターで細胞をカウントした。次に、細胞希釈液を調製して40,000細胞/2mLを染色し、2mLの細胞を6ウェル超低付着平底プレート(Costar、Corning Inc、Corning、NY、USA)に播種した。細胞を実験プロトコルに従って刺激するかまたは非処理とし、Hepa-Filtered Infrared(IR)インキュベーター(Forma Scientific Inc.、Materietta、OH)中で5%CO₂下、37℃で7日間インキュベーションした。第7日に1ウェル当たりの60 μ mより大きい腫瘍様塊をカウントし、Olympus顕微鏡で写真を撮影した。すべての腫瘍様塊アッセイをデュプリケートのウェルで行い、全手順を少なくとも2回繰り返した。

40

【0388】

免疫蛍光

50

蛍光活性化セルソーティング(FACS)

各ウェル/フラスコから細胞をトリプシン処理で採取し、次いでPBSで2回洗浄した。次に、洗浄した細胞を1%FCS-PBS溶液中の抗CD44-APC、抗CD24-PE抗体(表5に詳述)およびHoechst 33258染料(最終希釈1:1000)(Invitrogen、Carlsbad、CA)からなる抗体カクテル中に再浮遊させた。抗体カクテルに再浮遊した細胞を4℃で20分間インキュベーションした。次に、細胞をPBSで2回洗浄し、1%FCS-PBS溶液(細胞数に基づく量)に再浮遊し、FACS分析まで氷上に保った。前方散乱(FSC)および側方散乱パラメーターを、488nmアルゴンイオンレーザーで励起したFITC蛍光色素、488nmで励起したPE蛍光色素、および350nmヘリウム-カドミウムUVレーザーで励起したHoechst蛍光色素にて選択した。

【0389】

フローサイトメトリデータをBD FACS LSRフローサイトメーター(Becton Dickinson Biosciences)またはBD FACS Aria(登録商標)IIフローサイトメーター(Becton Dickinson Biosciences)を用いて得、データ収集ソフトウェアCellQuest Pro(Becton Dickinson Biosciences)およびFlowJo(Tree Star Inc.、Ashland、OR)ソフトウェア(MCRF機関、JCSMR、ANU、Canberra、Australia)を用いて分析した。単色コントロールを補正パラメーターを設定するのに用いた。アイソトープコントロールを各実験ですべての対応する一次抗体について用いた。

【0390】

MCF-7細胞におけるCD44およびCD24染色の最適化

このテーマで用いたFACSゲーティング戦略を、CD44^{high}およびCD24^{low}発現に基づいて細胞をソートした先駆的乳がん幹細胞公表物(Al-Hajj et al.、2003)から選び、修飾する。CD44^{high}およびCD24^{low}の発現は、ヒト乳がん幹細胞(Al-Hajj et al.、2003; Sleeman et al.、2006; Mani. et al.、2008)と関連することが示された。抗CD44-APCおよび抗CD24-PE抗体が特異的であることを確認するため、アイソタイプコントロール抗体を用いた。抗CD24-PEに用いたアイソタイプ(陰性コントロール)はPEマウス抗ヒトIgG2aKであり、抗CD44-APCにはAPC-マウス抗ヒトIgG2bKを用いた。第1に、すべての細胞をHoechst 33258で染色し、細胞生存率をモニターした。さらに、細胞を種々の濃度のAPCまたはPEアイソタイプコントロールで染色した。

【0391】

顕微鏡検査

蛍光顕微鏡検査

細胞を上記のごとく染色し、カバースリップにマウントした。染色した細胞を、Olympus 蛍光IX71顕微鏡(Olympus、Tokyo、Japan)を用い油浸下で倍率X¹⁰⁰、または倍率60x、またはLeica共焦点顕微鏡(Leica microsystems)で観察した。Olympus 蛍光IX71顕微鏡の画像をDPコントローラーカメラソフトウェアバージョン1.2.1.108(2002 Olympus optical Co.、LTD)を用いて保存し、Leica共焦点顕微鏡の画像をLeicaアプリケーション一式、2.0.0プログラムを用いて保存した。画像をPhotoshop CS3(Adobe Systems Inv.、San Jose、CA)を用いて分析した。GFP/FAMベクターでトランスフェクトしたウェルまたはフラスコを、Olympus 蛍光IX71顕微鏡でFITC励起フィルター406-495nmフィルター(WIB)を用いて観察した。

【0392】

位相差顕微鏡

位相差顕微鏡検査を、EMTおよび癒傷アッセイについてOlympus 蛍光IX71顕微鏡の倍率10xまたは20x下で行った。癒傷アッセイ写真をImage Jソフトウェア(NIHが開発した公共ドメイン中の無料ソフトウェア)でも分析した以外は上記のごとく画像保存および分析した。

【0393】

トランスフェクション

DNAトランスフェクション

市販のトランスフェクション剤、FuGENE 6(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)(F

10

20

30

40

50

uGENE 6に関する詳細な方法は以下に記載する)によるMCF-7およびT-47D細胞のDNAトランスフェクションのために条件を最適化した。最大トランスフェクション効率を達成するため、最初に、トランスフェクション試薬を種々の試薬：DNA/オリゴ(最適化用のGFP-発現ベクター)比で試験した。すべてのDNAトランスフェクションは、細胞を24ウェルプレートでトランスフェクションを開始する24時間前に抗生物質不含培地500 μ L中に 1×10^5 細胞で播種し、製造者の指針に従って行った。トランスフェクション用に用いた希釈培地は、OptiMEM(登録商標)I 低血清培地(1X)、液体(Invitrogen、Carlsbad、CA)であった。トランスフェクションパーセンテージを36~48時間後に上記FACSによりチェックした。

【0394】

FuGENE 6を用いるDNAトランスフェクション

10

500 μ L総容量(24ウェルプレートの1ウェルあたり)中の単回反応について、0.9 μ L FuGENE 6を10 μ LのOptiMEM(登録商標)I低血清培地を含む1.5 mL Eppendorfチューブに加えて十分混合し、室温で5分間インキュベーションした。5分後、0.4 μ gまたは0.3 μ g GFP標的DNA(DNAの容量は用いる特定のDNAオリゴヌクレオチドの濃度に応じて計算した)をチューブに加え、それぞれFuGENE 6を2.25:1または3:1の割合にした。次に、DNAおよび該複合体を室温で45分間インキュベーションした。45分後、20 μ LのFuGENE-DNA複合体を細胞の上に滴下し、プレートを旋回させて混合し、次いでプレートを37°Cで36~48時間インキュベーションした。

【0395】

siRNAトランスフェクション

20

Lyophilized silencer(登録商標)FITCコンジュゲート陰性コントロールsiRNA(Mock)(sc-36869)；有効LSD1 siRNA(sc-60970)およびLSD2 siRNA(sc-95467)はSanta Cruz Biotechnologies、Californiaから購入した。これらのsiRNA特異性は先に公表されている(Sutcliffe et al., 2011. Molecular Cell 6:704-719; Yang et al., 2010. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:21499-21504)。10nM siRNAを用いるフォワードトランスフェクションを、MCF-7細胞でLipofectamine 2000(Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて行った。フォワードトランスフェクション法は、EMTアッセイおよび転写産物分析では24ウェルプレート(4×10^4 細胞)中で行ったが、より大量の細胞が必要なクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイでは、25cm²フラスコ(4×10^5 細胞)中でトランスフェクションを行った。

【0396】

30

簡単には、24ウェルプレート中のフォワードトランスフェクション反応を行うために、 4×10^4 MCF-7細胞/ウェルをトランスフェクションの24時間前に500 μ Lの抗生物質不含培地に播種した。250 μ L DEPC-水を20nmol凍結乾燥siRNAストックに加え、20 μ M濃度のストックを得た。10nMの最終siRNA濃度(24ウェルプレートの1ウェル中の総量500 μ Lの培地中の1反応について)を達成するため、3 μ Lの20 μ M siRNAストックをさらに50 μ L Opti-MEM(登録商標)Iで希釈し、室温で5分間インキュベーションした。この工程の直後に50 μ L Opti-MEM(登録商標)I中の1 μ L Lipofectamine(1反応について)を加えることによりLipofectamineをさらに希釈し、次いで、室温で5分間インキュベーションした。次に、50 μ Lの希釈siRNAおよび50 μ Lの希釈Lipofectamine溶液を一緒に混合して100 μ LのsiRNA-Lipofectamine複合体を得た。次に、この複合体を暗部、室温にて20分間インキュベーションした。得られたsiRNA-Lipofectamine複合体を細胞表面に注意深くピペットで移し、プレートを静かに前後に揺らして混合した。プレートを48~72時間インキュベーションし、トランスフェクション効率をフローサイトメトリー(上記のフローサイトメトリー分析の詳細な方法を参照)によりチェックした。ノックダウンを3つの方法でチェックした：(1)興味ある遺伝子の転写産物分析を行ってTaqManからのリアルタイムPCRについて特定遺伝子のノックダウン(たとえば、LSD1オリゴヌクレオチド(表3に記載)を用いるLSD1に対するsiRNAによるLSD1ノックダウン)を確認した。(2)ChIPレベル(特定遺伝子に関するChIPの結果参照)(3)最適化実験を各siRNAについて行い、MCF-7の最大トランスフェクション効率(70~80%)を確認した。したがって、本明細書に記載の結果は再現性がある。各mock(コントロール)および遺伝子特異的siRNAノックダウン実験は3回独立して行い、1つの代表的な実験のみ

40

50

をこの項に示す。

【0397】

分子生物学技術

RNA単離手順では、すべてのピペット、チューブホルダー、およびグローブを常にRNase Zap(Ambion、VIC、Australia)で準備した。RNase、DNase、パイロジェンフリー無菌マイクロチューブ(Axygen Scientific、Inc.、Union City)および予め滅菌したエアロゾル耐性チップおよび新鮮ベンチコートがこの項に記載のすべての分子生物学実験で日常的に用いた。

【0398】

総RNA単離

ほとんどの実験で、特記しないかぎり、総RNAを $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ MCF-7細胞から抽出した。細胞を最初に1mLのTrizol(登録商標)試薬(Invitrogen、Carlsbad、CA)中、室温で5分間解凍してRNaseを不活化し、次いでトリチュレーションして細胞ペレットを除去した。Tizol(1 mL)に浮遊させた分離細胞を1.5mL Eppendorfチューブに移し5分間ホモゲナイズした。次に、RNAを、200 μ Lクロロホルムを加えて抽出し、勢いよく混合し、次いで試料を8,000 x gで4℃30分間遠心分離した。次に、水性層を新鮮1.5mL Eppendorfチューブに回収し、等容量のイソプロパノールを水性層に加え、静かに混合した。室温で5分間後、試料をドライアイスで急速冷凍し、-70℃で一夜または単離手順を再開するまで保存した。試料を急速解凍後、試料を再度8,000 x gにて4℃30分間遠心分離してRNAを沈殿させた。すべての微量のイソプロパノールを、水性層を除去するために、次にRNAペレットを1mLの氷冷80%エタノール(Analytical UNIVAR、Seattle、WA)で洗浄し、次いで3,600 x gにて4℃10分間遠心分離した。次にすべてのエタノールを除去し、ペレットを5分間空気乾燥させた。次に、RNA試料を50 μ Lのヌクレアーゼ不含DEPC(ジエチルピロカルボネート処理)水(Ambion、VIC、Australia)に再懸濁して可溶化した。次に、2 μ Lの試料をとり、Nano-drop(登録商標)分光光度計ND 1000(Nanodrop Technologies、Inc.、Wilmington、DE、USA)でND-1000 V3.30ソフトウェアを用いてRNAの質と量を測定した。すべてのRNA試料は、UVスペクトルで吸収される夾雑物(たとえばタンパク質)に対するRNAi物質の純度の推定値をもたらずA260/A280比が1.9~2.1であることから純粋であることがわかった。

【0399】

第1鎖cDNA合成

Superscript TM(登録商標)IIIキット(Invitrogen、Carlsbad、CA)をcDNA合成に用いた。マスターミックス-1を1 μ Lの5 μ Mオリゴ(dT)および1 μ Lの100mM dNTPを加えて調製し、指ではじいて混合した。マスターミックス-2を、2 μ LのRT緩衝液、2 μ Lの3mM mgCl_2 、2 μ LのDTTミックス、1 μ LのRNase out、1 μ Lのスーパースク립トIIIを加えて調製し、指ではじいて混合した。1 μ g RNAにつき2 μ Lのマスターミックス-1を試料に加え、65℃で5分間インキュベーションし、次いで、試料を氷上において反応を止めた。この工程に次いで10 μ Lのマスターミックス-2/試料を加え、試料を50℃で50分間インキュベーションした。次に、試料を85℃で5分間インキュベーションし、次いで試料を氷上に2分間おいて反応を止めた。最後に、1 μ LのRNaseHを各試料に加え、試料を37℃で20分間インキュベーションした。すべての試料をドライアイスで急速凍結するか、または速やかに定量的リアルタイムPCR分析に用いた。

【0400】

定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)分析

TaqMan(登録商標)遺伝子発現アッセイ(Applied Biosystems、Foster City、CA)を用い、ABI PRISM 7900 HT高速リアルタイムPCR配列検出器(PerkinElmer/PE、Applied Biosystems、Foster City、CA)でFAMプローブチャンネルを用いてqRT-PCRを実施した。総反応容量10 μ Lを、製造業者のガイドライン(PerkinElmer/PE、Applied Biosystems、プロトコールPN 4333458)に記載のごとくPCR用にDEPC水で1:20に希釈したcDNAとともに用いた。すべてのゲノムDNAについて、パワーSYBRグリーンリアルタイムPCR(PerkinElmer/PE、Applied Biosystems、Foster City、CA)反応を行い、ChIP試料を1:5に希釈した。各PCRを以

10

20

30

40

50

下のごとくサーモサイクラー条件を用いてデュプリケートウェル中で行った：段階1-50℃で2分間を1サイクル；段階2-95℃で10分間を1サイクル；段階3-95℃15秒および60℃1分間を40サイクル。すべてのプライマーセットについて、PCRミックス内のあらゆる夾雑DNAのPCR増幅を試験するためのテンプレートコントロールは通常含まなかった。解離曲線を各プライマーセットで行い、下記PCR条件を用いる単一生成物の増幅を確認した：段階1-95℃で15秒間；段階2-60℃で20秒間；最小傾斜速度で段階3-95℃で15秒間に到達。PCR反応は、Optical PCR 384ウェル反応プレート(Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いて行った。

【0401】

cDNA実験のデータ分析

10

PCR増幅プロットからのすべての閾値サイクル(C_t)値を、Microsoftエクセルスプレッドシートの式 $100000/2^{(C_t-17)}$ (ここで、 C_t 値の17を 10^5 コピーに設定し、各サイクルの増加がインプットDNAの2倍の増加に等しいと仮定した)を用いて任意のコピー数に変換した。すべてのプライマーをアンプリコン標準曲線に対してチェックし、上記式が増幅標準曲線法で得られた結果と同様の結果をもたらすことを示した。シクロフィリンAプライマー(セクション0)PCR反応を各実験で同時に行い、RNAインプットおよびcDNA合成の差を正規化した。

【0402】

MicroRNAのcDNA合成

20

TaqMan(登録商標)MicroRNA逆転写キット(Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いて、特異的TaqMan(登録商標)miRNAプライマーアッセイを用いるmicroRNA分析のために総RNAをcDNAに変換した。TaqMan(登録商標)MicroRNA逆転写キットの試薬を氷上で完全に解凍し、次いで下記成分/15 μ L反応容量を加えてRTマスターミックスを調製した；0.15 μ L dNTPミックス(100mM)、1 μ L Multiscribe(登録商標)RT酵素(50U/ μ L)、1.5 μ L 10 x RT緩衝液、0.19 μ L RNase阻害剤(20U/ μ L)および4.16 μ Lヌクレアーゼ不含水、総容量を7 μ Lとする。各成分を静かに混合し、短時間遠心分離し、次いでこのRTマスターミックスを、RT反応プレートを調製するまで氷上においた。次に、RT反応プレートを、総RNA(1~10ng/15 μ L反応)と5 μ L RNA：7 μ L RTマスターミックスの比のRTマスターミックスを最初に混合することにより調製した。次に、MicroRNA RTプライマーを氷上で解凍し、RT反応に用いるチューブに適切な番号をラベルした。次に、総RNAを含む12 μ LのRTマスターミックスを各チューブに分注し、次いで3 μ Lの5x RTプライマーを適切なチューブに加えて総容量を15 μ L/チューブとした。次に、すべてのチューブを静かに混合し、短時間遠心分離し、氷上で5分間または15 μ L反応容量で以下のサーマルサイクルで逆転写するためにサーマルサイクラーにロードする直前までインキュベーションした：サイクル1で16℃、30分間ホールド；サイクル2で42℃、30分間ホールド；サイクル3で85℃、5分間ホールド；およびサイクル4で4℃、 ∞ 。操作が完結した後、試料を-20℃で保存するか、またはすぐにqPCRに用いた。

30

【0403】

MicroRNA cDNAのqPCR増幅

40

以下の成分を適切なチューブに加えて20 μ L qPCR反応ミックスを調製してqPCR反応を行った：1 μ LのTaqMan(登録商標)小RNAアッセイ(20x)；1.33 μ LのRT反応からの生成物；10 μ LのTaqMan(登録商標)ユニバーサルPCRマスターミックスII(2X、UNGなし)、および7.67 μ Lヌクレアーゼ不含水。次に、成分を静かに混合し、短時間遠心分離した。すべてのqPCR反応はトリプリケートで行った。次に、20 μ Lの完全qPCR反応ミックス(アッセイおよびRT生成物を含む)を384ウェルプレートの各3ウェルに移した。次に、プレートを密封し、短時間遠心分離し、次いでPCR増幅を2.5.2項に記載のごとく行った。

【0404】

クロマチンアッセイ

クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイ

1~5 x 10^6 細胞を実験の必要性に応じて種々に処理して採取し、次いでVi-CELLカウン

50

ターでカウント後、室温で10mL DMEM完全培地に再浮遊させた。次に、細胞を、ロータリーホイール上で連続的にゆっくり回転させながら室温で10分間、新たに調製した1%パラホルムアルデヒド(PFA)(Analytical UNIVAR、Seattle、WA)で架橋した。次に、2Mグリシン溶液(AnalaR、Merck、Darmstadt、Germany)を最終濃度125mMに加えて反応を止め、さらにロータリーホイール上で室温で10分間混合した。次に、細胞を10mLの氷冷PBSで3回洗浄し、細胞ペレットをドライアイスで急速凍結するか、またはその後速やかに用いた。SDS溶解緩衝液(Upstate Biotechnology、Billerica、MA)を1 x 完全プロテアーゼ阻害剤溶液(1錠を1mL DEPC水に溶解)(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)を加えて調製し、次いで細胞ペレットを250 μ LのSDS溶解緩衝液に室温で10分間再浮遊させた。細胞をCole Palmer超音波処理装置(Cole Palmer、Vernon Hills、IL)を用いて超音波処理(1Lの氷冷水(氷と混合)で2分間10秒パルス、70%最大アウトプット)してクロマチンを剪断し、250~500bpの平均DNA断片サイズを得た。超音波処理後、試料を10,200 x gにて室温で5分間遠心分離して細胞デブリを除き、次いで上清をChIP希釈緩衝液(Upstate Biotechnology、Billerica、MA)で1:10に希釈した。実験の必要性に応じて抗体を1.5 mL Eppendorfチューブに等分し、次いで希釈緩衝液で希釈した0.5~1 x 10⁶細胞から得た超音波処理クロマチンを加え、次いで、ロータリーホイール上で4℃で一夜抗体とインキュベーションした。すべての実験について、各条件についていかなる抗体も含まない総ゲノムDNA(総インプットという)を急速凍結して-70℃で保存し、いかなる抗体も含まない試料(無抗体という)もChIP試料と並行して処理した。次に、免疫複合体を、ロータリーホイールで60 μ Lのサケ精子DNA/プロテインAアガロースビーズを4℃で1時間加えて結合させた。次に、試料を2500 x gにて4℃で2分間遠心分離して上清を捨て、次いでビーズを以下の各洗浄用緩衝液(Upstate Biotechnology(Billerica、MA))を同順序で用いロータリーホイール上で4℃で5分間洗浄した：第1洗浄-500 μ Lの低塩免疫複合体洗浄緩衝液；第2洗浄-500 μ Lの高塩免疫複合体洗浄緩衝液；第3洗浄-500 μ LのLiCi免疫複合体洗浄緩衝液；第4洗浄-500 μ Lの低塩免疫複合体洗浄緩衝液および第4洗浄-1mL TE緩衝液(10mM トリス-HCl pH 8.0、1mM EDTA)。プロテアーゼ阻害剤-完全、1 x(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)を使用直前にすべての洗浄緩衝液に加えた。次に、DNA-タンパク質複合体をビーズから400 μ Lの新たに作製した溶出緩衝液(1% (w/v) SDS、100mM NaHCO₃)でロータリーホイール上30分間溶出した。次に、試料および総インプットコントロールを16 μ Lの5M塩化ナトリウム(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)を添加後に66℃で一夜インキュベーションして架橋(または逆架橋)を加水分解した。翌日、試料を1 μ LのプロテアーゼK溶液(20 μ g/ μ L)(Invitrogen、Carlsbad、CA)で45℃で1時間処理した。消化したタンパク質を10mM トリス、pH 8.0、1mM EDTA(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)で飽和した、等量のフェノールクロロホルム-イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、試料を混合し、次いで10,200 x gにて室温で20分間遠心分離して水性層を採取しChIP試料から除去した。ゲノムDNAを2.5容量の氷冷無水エタノール(Analytical UNIVAR、Seattle、WA)、0.1容量の3M酢酸ナトリウム緩衝液pH5.2(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、および25 μ gのGeneElute(登録商標)直鎖ポリアクリルアミド(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)を-20℃で少なくとも24時間加えて水性分画から沈殿させた。次に、試料を遠心分離によりペレットとし、80%氷冷エタノールで洗浄し、次いでペレットを空気乾燥し、次いで20 μ LのDEPC水に懸濁し、リアルタイムPCR分析を行った。ChIP試料に対するリアルタイムPCRを行うのに用いたオリゴヌクレオチドを表4に示す。

【0405】

一連のChIP

一次ChIPをTE緩衝液洗浄工程まで上記のごとく行った。すなわち、一次ChIPからの免疫沈降物をDEPC水中の10mM DTT(Superscript(登録商標)III RNaseH-逆転写酵素キット(Invitrogen、Carlsbad、CA))を含む溶出溶液60 μ Lに溶解し、37℃の水浴中で1時間インキュベーションした。このインキュベーション期間中15分間毎にチューブを軽くたたいた。次に、試料をChIP希釈緩衝液で1:40に希釈し、次いで400 μ Lの試料をとって-70℃で凍結し、二次ChIPのための総ゲノムインプットとして用いた。これらの試料に二次抗体を加え、再

度、免疫沈降を、免疫複合体を60 μ Lのサケ精子DNA/プロテインAアガロースビーズと4°Cで2時間結合させる以外ChIPプロトコル(上記)のごとく行った。次に、一連のChIP試料を溶出し、架橋を逆転させ、次いでゲノムDNAを上記の方法のごとく沈殿させた。一連のChIP分析は下記のChIP豊富化比法を用いて行い、次いで非刺激試料に対する倍数変化で表した。

【0406】

ChIP実験用のデータ分析

すべてのChIPアッセイを無抗体コントロールおよびアイソタイプ特異的コントロール抗体の存在下で行った。陰性コントロールは無抗体コントロールであり、これからの濃縮値は日常的に低く、ChIP豊富化比の計算においてバックグラウンド除去に含める。リアルタイムPCR増幅プロットからの C_t 値を最初に式 $100000/2^{(C_t-17)}$ を用いて任意のコピー数に変換した。試料データに対応する総インプット任意コピー数に正規化した。次に、無抗体コントロールを超える倍数変化を計算し、ChIP豊富化比を得た。ChIP豊富化比値は、ヒストン修飾に対するChIP豊富化比値を除き10倍した。この分析方法は、Pokholok et al.(2006. Science 313: 533-536)(均等スケールで示したChIP豊富化比は対数スケール(Pokholok et al., 上記)のChIP-on-ChIPデータの表示のシグナル対ノイズをさらに強調することを確認した)から採用した。したがって、この論文のすべてのChIPデータを均等スケールで表す。すべてのchipアッセイは、3つの独立した実験の平均±標準誤差(SE)を表し、リアルタイムPCRによりデュプリケートで分析した。ある場合には、倍数変化を非刺激試料(1に設定した)に対して計算した。統計的有意性は、Windows用GaraphPad Prism 5.03を用いる両側対応のあるt検定により決定した。

【0407】

すべてのchip試料を常に各対応試料の総インプット(TI)で正規化した。ChIP試料の回収が刺激細胞およびCSCサブセットで低ければリアルタイムPCR分析で達成した任意のコピーは低く(しかしそうでなかった)、試料からの任意のコピーは他と同じ C_t 範囲であった。「ChIP豊富化比」法を分析に用いたので、異なる試料にわたるChIP DNAの回収はデータの分析と解釈に影響を及ぼさなかった。「ChIP豊富化比」を用いることによるこのChIP分析法は、ChIPデータを計算する最良の方法と考えられる(Pokholok et al., 上記)。したがって、該結果は、ChIP回収が不十分なことによるものではないようであった。

【0408】

一連のChIP分析では、一連のChIP実験から回収したゲノムDNAをuPARまたはmiR 200cのプロモーター領域に特異的なプライマーを用いるSYBRグリーンリアルタイムPCRにより定量した。PCR増幅プロットからの C_t 値を式 $100000/2^{(C_t-17)}$ を用いて任意のコピーに変換した。無抗体コントロールを各試料のデータから差引き、次いで、最初の免疫沈降の前に得た対応する総インプット(TI-1)に対して正規化した。次に、得られたデータをそれらの各第2総免疫沈降インプット(TI-2)に対して正規化した。次いで、最後に倍数変化を非刺激試料(1に設定した)に対して計算した。次に、これらの値を用いて図に示す一連のChIPプロットを作製した。この一連のChIP分析法は、Sutcliffe et al., 2009から採用した。統計的有意性は、Windows用GaraphPad Prism 5.03を用いる両側対応のあるt検定により決定した。この一連のChIP分析法は、Sutcliffe et al., 2009から採用した。

【0409】

IN VIVOネズミ異種移植モデル

in vivoの腫瘍再発に対するLSD1阻害剤の効果をモニターするため、乳がんの再発のin vivoネズミ異種移植モデルを用いた。最もしっかりしたよく確立されたモデルのひとつであるMDA-MB 231細胞株モデルを6週齢のBALB/c雌ヌードマウスに用いた。5x10⁶ MDA MB 231細胞を各マウスの乳腺脂肪体中に注射した。マウスは、腫瘍の出現と増殖を観察した。腫瘍が50mm³体積サイズ(ノギスで測定)に達したら処置を開始した。マウスを腫瘍が500mm³に達するまでモニターし、屠殺して腫瘍を採取した。各処置群は、各14匹のマウスからなった(腫瘍増殖曲線にマウス5匹+3時点ー処置開始日ー第0週、化学療法腫瘍減少ー約第4週、および腫瘍が500mm³に達するまでー約第7週に各マウス3匹)。腫瘍体積を毎週測定し

、各群から3匹を上記3時点でIHC、FACS、およびRNA抽出用に屠殺した。

【0410】

腫瘍の発生

1. 細胞をロット標示MDA-MB-231(9/2/14)から解凍した。
2. 細胞を54 x 150cm²フラスコに増殖させた。
3. 次に、細胞浮遊液を室温で5分間、1500rpmにて遠心沈殿させた。
4. 次に、上清を捨て、細胞ペレットを2.5mLの冷PBSおよび2.5mL冷Matrigel(登録商標)

(注：Matrigelは氷上に保ったときのみ液体状態である。)に再浮遊させた。

5. 次に、マウスに50 μ LのMatrigel(登録商標)+PBS中の 5×10^6 細胞浮遊液を26"針および麻酔薬としてイソフルランを用いて注射した。各50 μ Lの混合物は 2×10^6 MDA-MB-231細胞を含む。

6. マウスを、モニターおよび体重測定し、15/05/2014まで毎日モニターした。

7. 腫瘍体積の測定をMDA-MB-231の注射後第7日に開始した。次に、腫瘍体積を15/05/2014まで毎日測定した。

マウスの治療を、腫瘍がおおよそ50mm³の体積に達したMDA-MB-231注射後第16日に開始した。

【0411】

マウスの治療

グループA：コントロール-20 μ lのDMSO

グループB：4mg/kgのドセタキセル(11匹)

グループC：100mg/kgのパルギリン(11匹)

グループD：4mg/kgのドセタキセル+100mg/kgのパルギリン(11匹)

【0412】

試料の採取

腫瘍、脾臓、肝臓、肺、および腎臓を、(1)IHC用固定剤および(2)₂つの異なるRNase不含1.5ml Eppendorfチューブに採取し、第0日に-80冷凍庫中で凍結した(1匹/グループA~C)。

【0413】

処置後第4週に、CD44、CD24およびHoechst染色によるフローサイトメトリー用に腫瘍試料を採取した(3マウス/グループ；最大、最小、および平均サイズの腫瘍を採取)。各試料から各単一細胞浮遊液1mlを遠心沈殿し、RNA用に細胞ペレットを回収した。

【0414】

処置後第7週に、残りの腫瘍試料をCD44、CD24およびHoechst染色によるフローサイトメトリー用に採取した。残りの試料をRNA抽出に用いた。

【0415】

単一細胞浮遊液およびフローサイトメトリー染色

1. 腫瘍を15mLチューブ中の2.5%FCS添加DMEM 5mLに採取した。
2. 次に、腫瘍の重量を個々に測定し、加えるコラゲナーゼの量を決定した。注：1mgのコラゲナーゼ/1gの腫瘍を使用。コラゲナーゼ濃度=DMEM中100mg/mL。

3. 腫瘍をペトリ皿中外科用ブレードを用いて細かく切り刻み、次いで適切な量の培地を含む15mLチューブに戻した(たとえば腫瘍が1gならば培地を10mLまで満たし、100 μ Lのコラゲナーゼストックを加える)。

4. 次に、試料を5分毎にチューブを振盪/傾斜させながら37°Cで1時間インキュベーションした。

5. 1時間後、試料を室温で5分間500 x gで遠心沈殿させた。

6. 次に、細胞を10mLの2.5%FCS+DMEMに再浮遊させ、0.2 μ mフィルターを用いて50mLチューブ中にろ過した。

7. 次に、細胞をトリパンブルー染色を用いてカウントした。

8. 総数 2×10^5 の細胞をCD44-APC、CD24-PE、およびHoechstで染色した。

【0416】

10

20

30

40

50

染色は、暗所中、4℃で35分間回転させながら、1.5ml Eppendorfチューブ中の100 mLのCD44-APC(1:50)、CD24(1:50)、およびHoechst(1:1000)で行った。

次に、細胞を1mLのFACS緩衝液(1%FCS+PBS)で洗浄し、捕捉用の小RACSチューブ中100 μLに再浮遊させた。

フローサイトメトリーをJCSMR、ANUのLSR IIを用いて行った。

【0417】

実施例10-14のための材料および方法

NCSCからのCSCの細胞培養および分離

接着性ヒト乳がんMCF-7およびMDA-MB-231細胞を、10% FCS、2mM L-グルタミンおよび0.1% PSN抗生物質を補足した低グルコースDMEM(Gibco)中で培養した。細胞を、0.65 ng/mlのホルボール 12-ミリスレート 13-アセテート(PMA)(Sigma-Aldrich)または20 ng/mlのTGF-β(R&D systems)で、指示された時間、刺激した。ビスインドリルマレイミド-I(Calbiochem)またはPKC-θペプチド阻害剤(Calbiochem)研究のために、MCF-7細胞における刺激の前に、細胞を、1 μMまたは30 μMの阻害剤でそれぞれ1時間前処理した。MDA-MB-231の場合、細胞を、4 μMまたは30 μMのビスインドリルマレイミド-IまたはPKC-θペプチド阻害剤でそれぞれ処理した。

【0418】

非CSC(NCSC)からCSCを分離するために、Hoechst 33258とともに抗CD44-APC抗体(559942、BD Biosciences)および抗CD24-PE抗体(555428、BD Biosciences)で染色された単細胞懸濁液で、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)を行なって、細胞生存能力をモニターした。この作業全体を通して使用されているように、CSCは、少数集団であるCD44^{high}/CD24^{low}によって定義され、NCSCは、残りの細胞集団によって定義される。

【0419】

腫瘍様塊培養培地成分を、StemCell Technologieから購入し、製造者ガイドラインに推奨されるように、腫瘍様塊アッセイを行なった。簡単に述べると、次いで、40,000個の細胞/2 mlの細胞希釈液を調製し、2 mlの細胞を、6ウェル超低接着平底プレート(Costar)に播種した。第7日に、60 μmより大きい腫瘍様塊を、ウェル毎にカウントし、画像を撮った。

【0420】

位相差顕微鏡法

位相差顕微鏡法を行なって、オリンパス蛍光IX71顕微鏡(オリンパス)を用いて細胞を×4倍率(創傷治癒アッセイ)または×10倍率(EMT)で観察し、DPControllerソフトウェア(2002 Olympus Optical Co. LTD)を用いて画像を捕捉し、Photoshop CS3(Adobe Systems Inc.)を用いて分析した。走査は10 μmのスケールバーを用いて行った。

【0421】

創傷治癒アッセイ

MCF-7細胞単層を滅菌プラスチックチップで傷つけた。細胞をPBSで2回、DMEMで1回洗浄した。各ウェルについてディッシュ上に参照マークを作成し、顕微鏡で時間ゼロの画像を取得した。細胞をPMA(0.65 ng/ml)で60時間処理し、第2の画像を対応領域で取得した。Photoshop CS3(Adobe Systems Inc.)を使用して、創傷単層の2辺の縁を描き、重ねた。

【0422】

プラスミド

以前に記載されたように(Sutcliffeら、2012. Front Immunol. 3:260)、全長PKC-θ野生型遺伝子配列の中で、核局在部位(NLS)を変異させ、そしてC末端HAタグを用いてフレーム内pTracer-CMVベクターにクローニングした。

【0423】

プライマー

使用したヒトTaqMan(商標)プライマーセットは：CD44、Hs00153304、CD24、Hs00273561、uPAR、Hs00182181、Laminin-5、Hs00194333、Zeb-1、Hs00611018、Fibronectin、Hs00415006およびIntegrin-β、Hs00168458(Applied Biosystems)であった。SYBR Greenリアル

タイムPCRのために用いたプライマーは：Zeb1(センス：5'-GTGCTGTAAGTGCCATTTCTCAGTA-3' およびアンチセンス：5'-CAAGAGACAAATCAACAAATGCTAGTT-3') およびシクロフィリンA(センス：5'-CTCCTTTGAGCTGTTTGACAG-3' およびアンチセンス：5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3')

であった。

【0424】

トランスフェクション条件

Santa Cruz BiotechnologiesからヒトPKC- θ siRNA(sc-36252)、p50 siRNA(sc-44211) およびp65 siRNA(sc-44212)を購入し、リポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて、10 nMのsiRNAによるフォワードトランスフェクションを行った。

10

【0425】

全RNA単離および定量的リアルタイムPCR分析

TRIzol(登録商標)試薬(Invitrogen)を用いて全RNAを抽出し、Superscript(登録商標)II RNase H-逆転写酵素キット(Invitrogen)を用いて第一鎖cDNAを合成した。TaqMan(登録商標)遺伝子発現アッセイおよびSYBR GreenリアルタイムPCRを、以前に記載されたように実施した(Sutcliffeら、2009. MolecularおよびCellular Biology. 29:1972-86)。TaqMan(登録商標)MicroRNA逆転写キット(ABI 4366596)を用いてMicroRNAアッセイを行い、データを、以前にSutcliffeら(2010, Molecular Cell. 41:704-719)に記載されたようにRNU6Bに対して標準化した。

【0426】

ChIPおよびSequential ChIPアッセイ

ChIP緩衝液を、Upstate BiotechnologyおよびChIPアッセイから購入し、以前に記載されたようにUpstate Biotechnologyによって供給されたプロトコルに従って実施した(Sutcliffeら、2011. Molecular Cell. 41:704-719)。使用した抗体は、抗PKC- θ (Santa Cruz, sc-212)、抗PKC- θ Phospho s695(Abcam, ab76568)およびPol II c-21(Abcam, ab817)であった。RT-PCRのために用いたプロモータープライマーは、ヒトCD44(Fwd: TGAGCTCTCC CTCCTTCCAC, Rev: TTGGATATCCTGGGAGAGGA)、uPAR(Fwd: GGAAGCAAAGCAAGGGTTA, Rev: GTT TTGTCAGGAGGATACTGG)およびIL-6(Fwd: CTCACCTCCAACAAAGATTT, Rev: CAGAATGAGCCTCAGACATC)であった。Sequential ChIPアッセイを、先のSutcliffeら (2011. Molecular Cell. 41:704-719)に記載のように行った。

30

【0427】

PKC活性アッセイ

PKC活性アッセイはEnzo Life Sciences(DI-EKS-420A)から購入し、アッセイは前述のように製造者のプロトコルに従って行った(Sutcliffe、2012. 上記)。

【0428】

免疫蛍光

標準的なプロトコルに従って、ボンド自動化システム(Vision Biosystems)で免疫組織化学を行った。簡単に説明すると、5 μ Mの組織切片を脱ろうし、等級アルコールを用いて再水和し、抗PKC- θ 抗体またはPKC- θ ホスホ抗体で別々に染色した(0539に記載のよう)。pH8にて、28分間の熱回収を用いた。Chromogen Fast Red(Leica Biosystems)およびDAKO Envisionキットを用いてシグナルを視覚化した。ヘマトキシリン対比染色を用いて核を可視化した。各試験において陽性および陰性のアイソタイプがマッチしたコントロールを各スライドに含めて、偽陽性染色がないことを確認した。

40

【0429】

細胞内染色wo、以前にSutcliffeら、2011. Molecular Cell. 41:704-719に記載されているように行った。

【0430】

データ解析

マイクロソフト・エクセル(Microsoft)を用いてデータを分析し、Prism(バージョン5.0、GraphPadソフトウェア)を用いてグラフを作成した。

50

【0431】

実施例15のための材料および方法細胞培養およびFACS

接着性ヒト乳がんMCF-7細胞を、10% FCS、2mM L-グルタミンおよび0.1% PSN抗生物質を補足した低グルコースDMEM(Gibco)中で培養した。細胞を、0.65 ng/mlのホルボール 12-ミリステート 13-アセテート(PMA)(Sigma-Aldrich)または20 ng/mlのTGF- β (R&D systems)で、60時間、刺激した。先に詳細に記載されたように、Hoechst 33258(561908、BD Biosciences)とともに抗CD44-APC抗体(559942、BD Biosciences)および抗CD24-PE抗体(555428、BD Biosciences)で染色された単細胞懸濁液で、FACSを行なって、細胞生存能力をモニターした(Zafarら、Chromatinized PKC-theta directly regulates inducible genes in epithelial to mesenchymal transition and breast cancer stem cells. Molecular and Cellular Biology, 2014, 34:16 2961-2980)。本研究で用いられたFACSゲーティングストラテジーは、ヒト乳がんCSCに関連することが明らかにされているCD44^{high}/CD24^{low}表現型に基づいて細胞を選別し、CSC表面マーカーとして一般に使用されている(Maniら、The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells。Cell、2008、133：704-715)、先駆的な乳がんCSCの出版物(Al-Hajjら、Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 100：3983-3988)から採用し、変更した。

10

【0432】

転写産物分析

全RNA抽出、cDNA合成およびRT-PCRを、先に記載されているように実施した(Sutcliffeら、Dynamic histone variant exchange accompanies gene induction in T cells. Molecular and Cellular Biology, 2009, 29:1972-1986 and Zafar et al., Chromatinized PKC-theta directly regulates inducible genes in epithelial to mesenchymal transition and breast cancer stem cells. Molecular and Cellular Biology, 2014, 34:16 2961-2980)。

20

【0433】

本明細書に記載のすべての特許、特許出願、および刊行物の開示は本明細書の一部を構成する。

【0434】

本明細書におけるあらゆる参考文献への言及は、そのような参考文献を本願に対する「先行技術(Prior Art)」として利用可能であることを了承するものと解釈すべきでない。

30

【0435】

本明細書を通して、本発明をいずれかの態様または特定の特徴の集合に限定することなく本発明の好ましい態様を述べることを目的とした。したがって、当業者は、本開示に照らして、本発明の範囲から逸脱することなく例示した特定の態様に種々の修飾および変更をなすことができると認識するだろう。すべてのそのような修飾および変更は添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることを意図する。

【図 1】

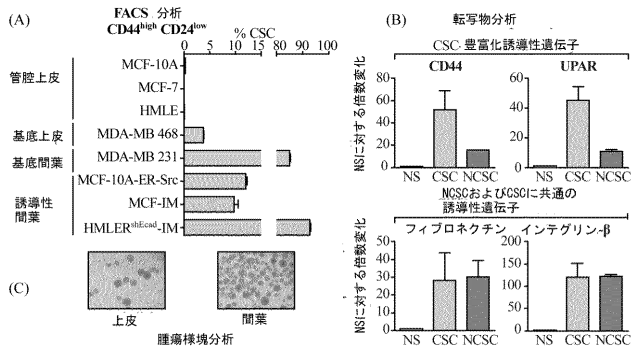


FIGURE 1

【図 3】

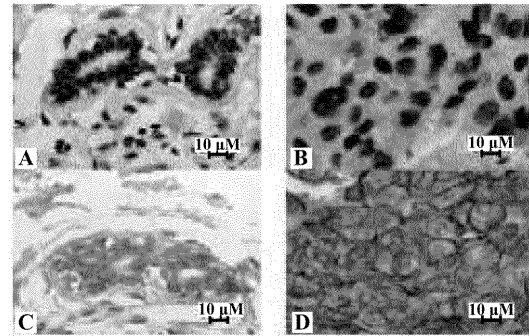
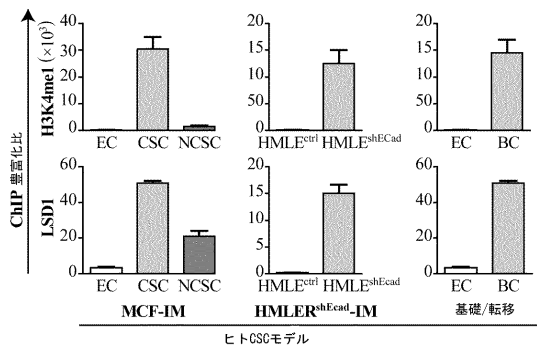


FIGURE 3

【図 2】



ヒトCSCモデル

【図 4】

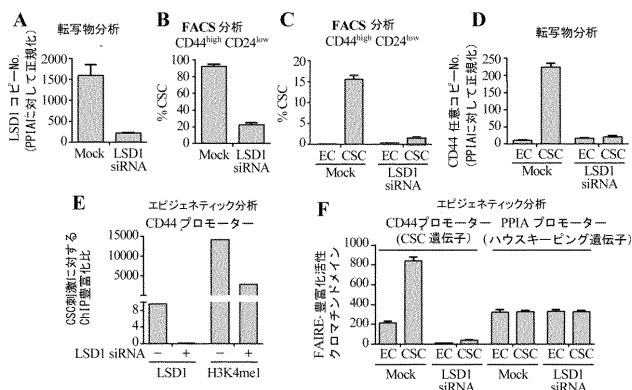


FIGURE 4

【図 5】

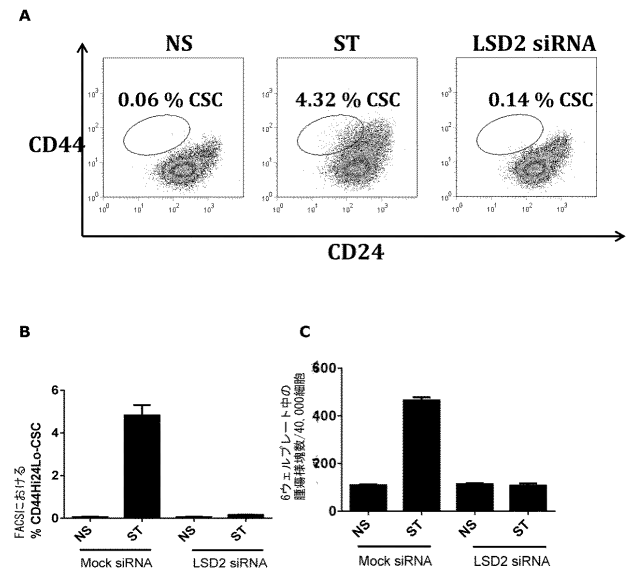


FIGURE 5

【図 6】

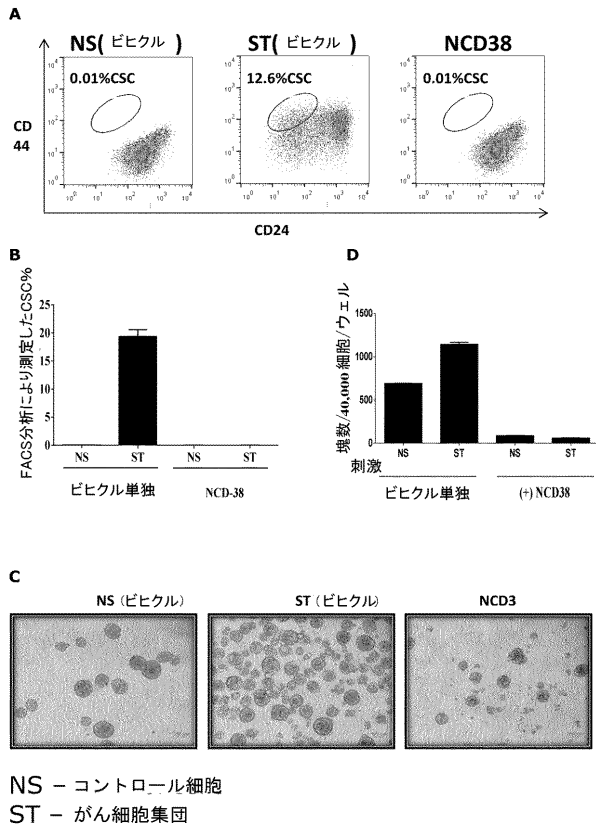


FIGURE 6

【図 8】

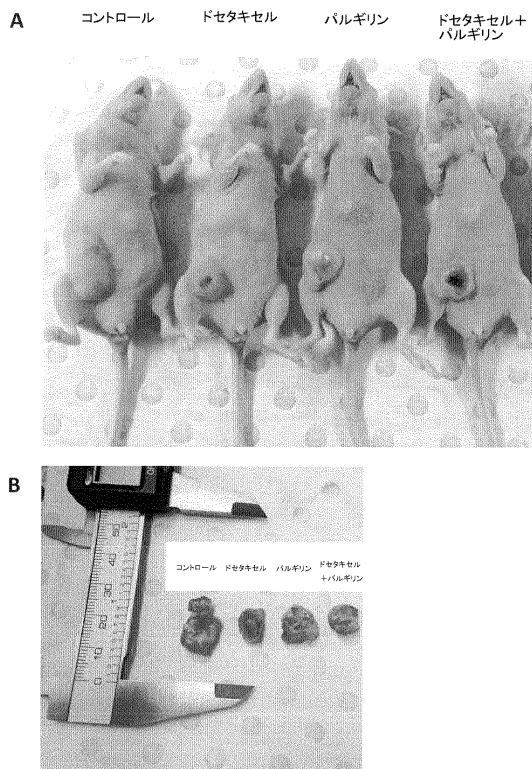


FIGURE 8

【図 7】

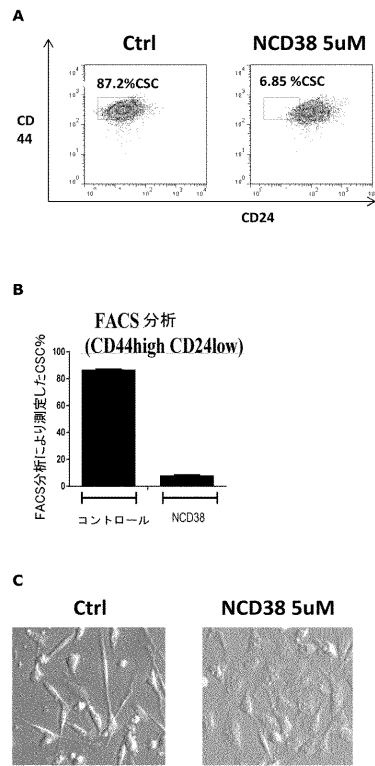


FIGURE 7

【図 9】

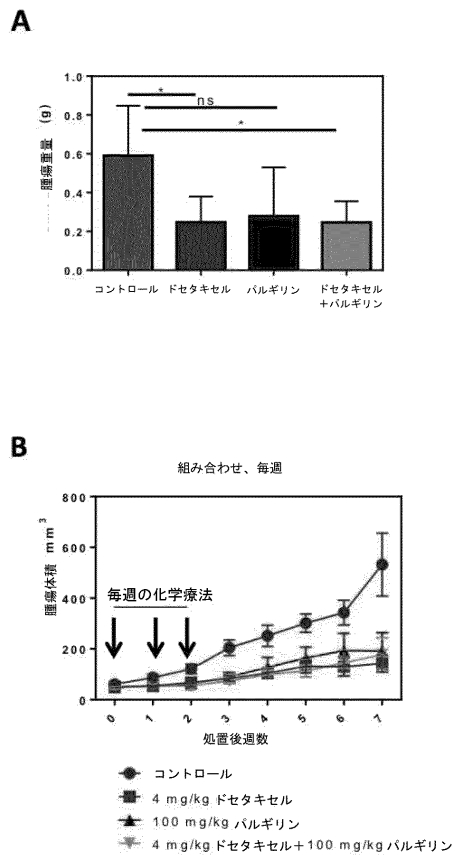


FIGURE 9

【図 10】

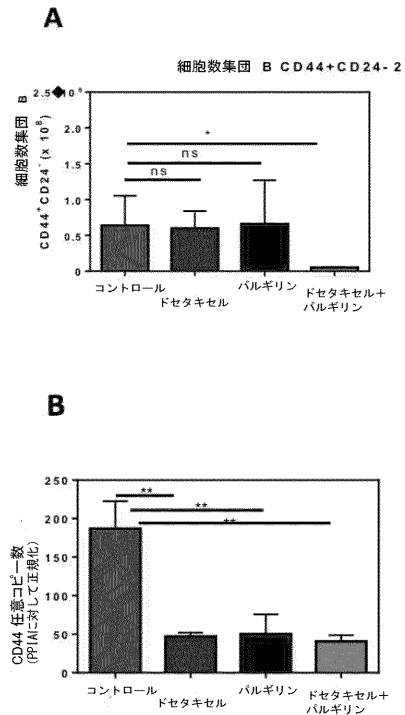


FIGURE 10

【図 11 - 1】

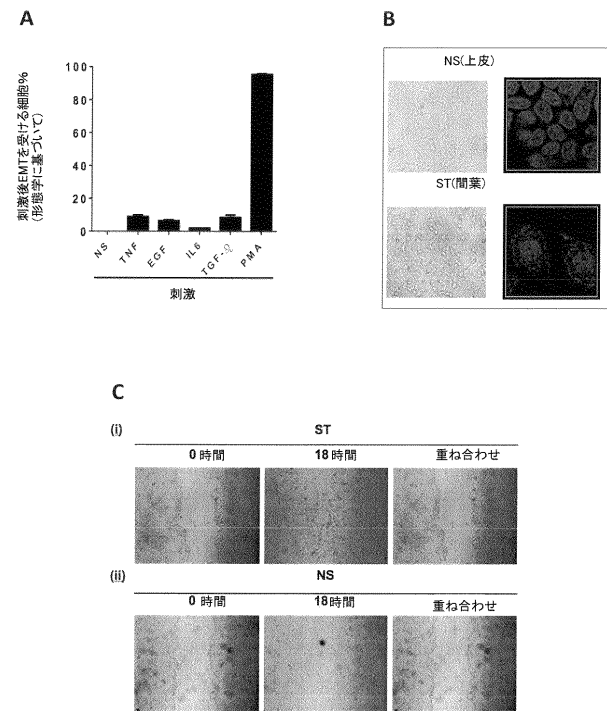


FIGURE 11

【図 11 - 2】

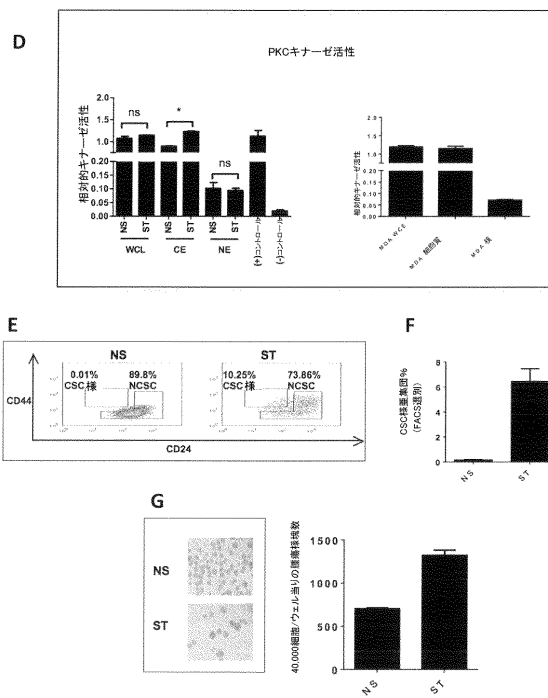


FIGURE 11 cont'd

【図 11 - 3】

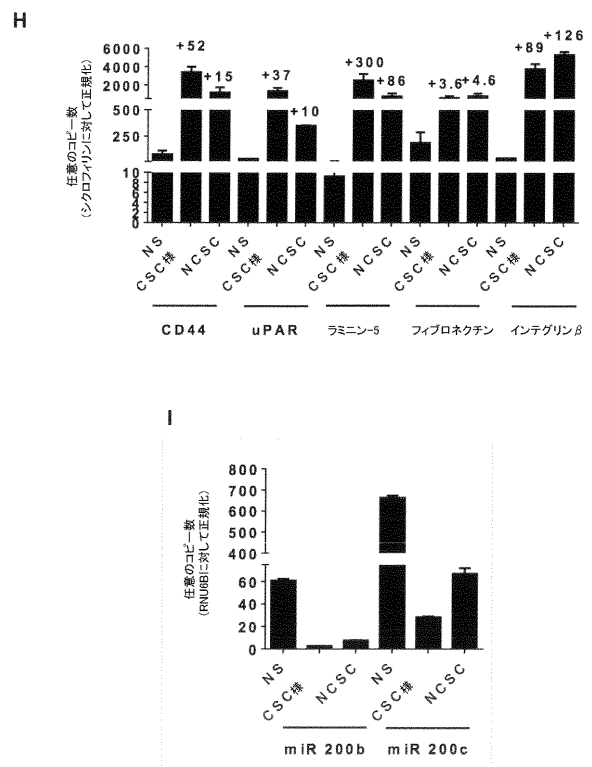


FIGURE 11 cont'd

【図 12-1】

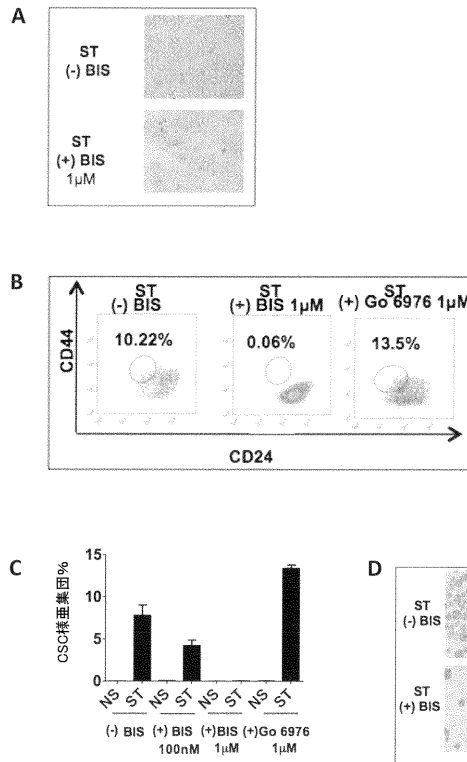


FIGURE 12

【図 12-2】

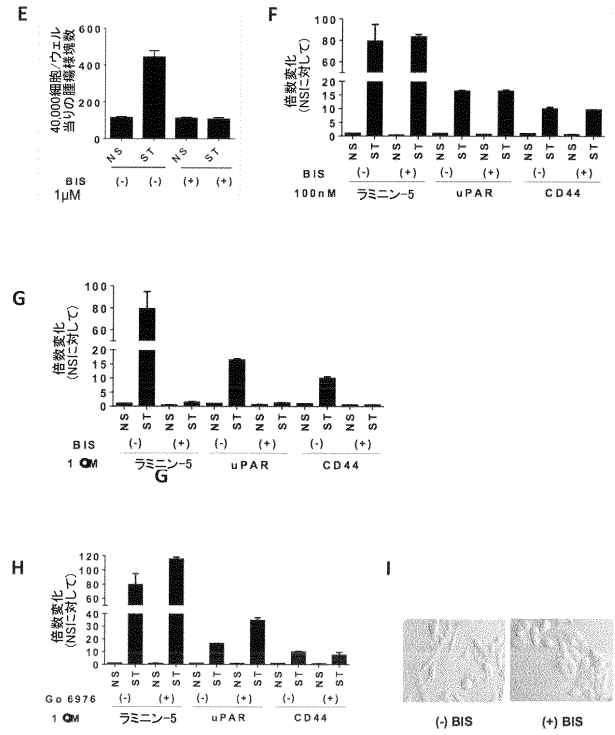


FIGURE 12 cont'd

【図 12-3】

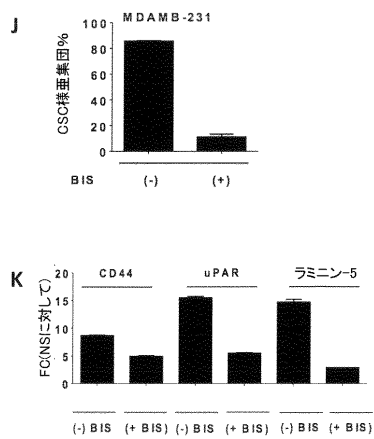


FIGURE 12 cont'd

【図 13-1】

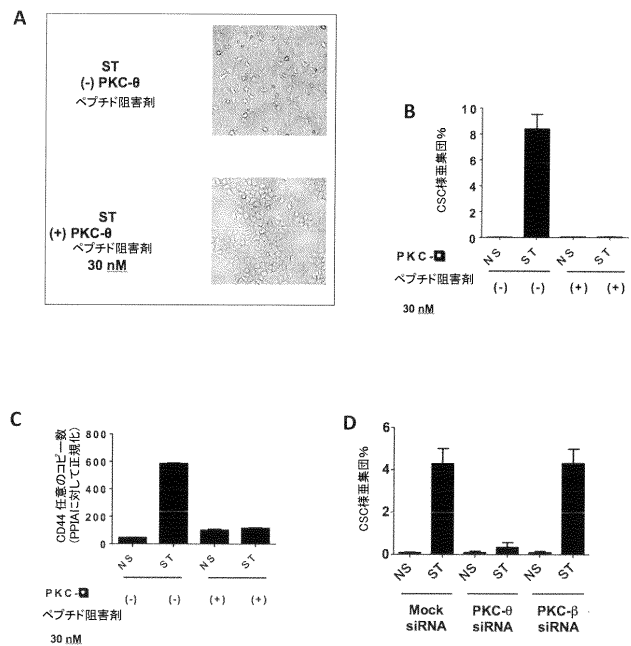


FIGURE 13

【図 13 - 2】

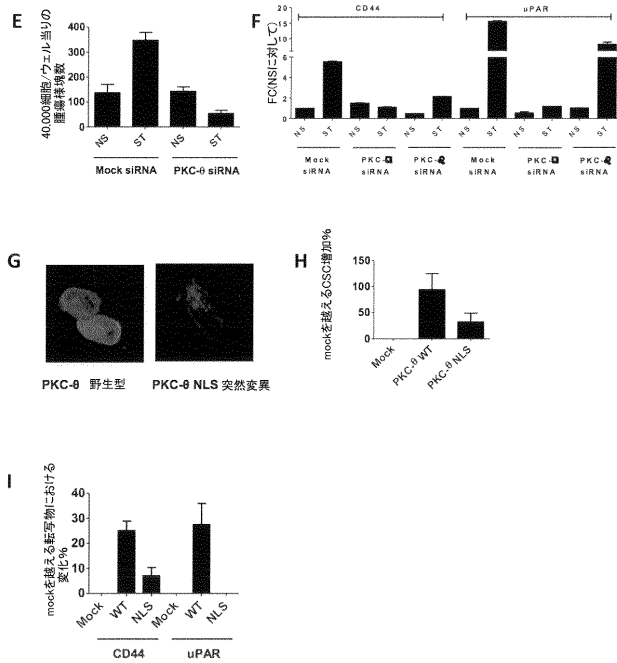


FIGURE 13 cont'd

【図 14】

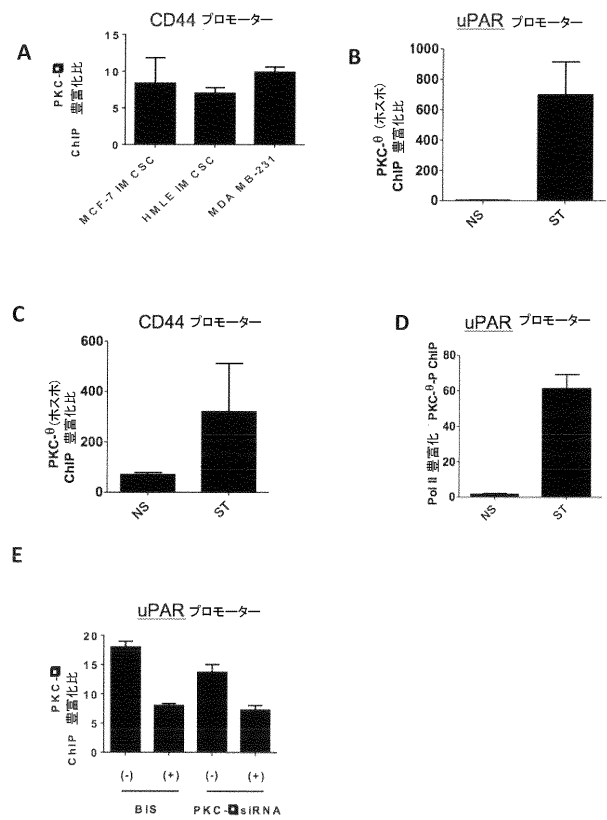


FIGURE 14

【図 15】

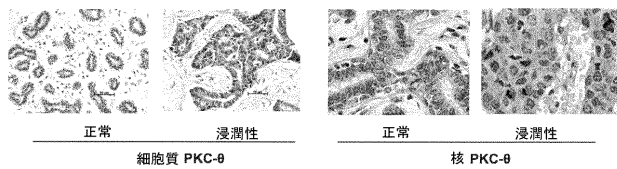


FIGURE 15

【図 16 - 1】

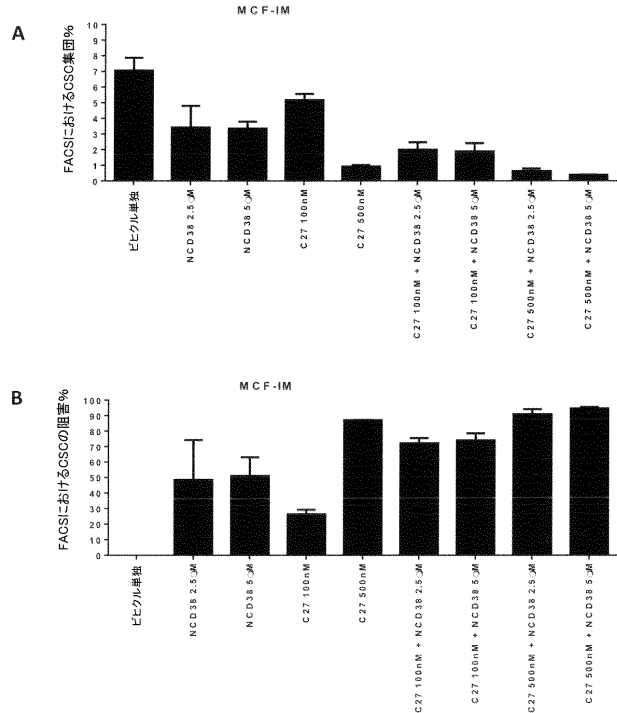


FIGURE 16

【図 16 - 2】

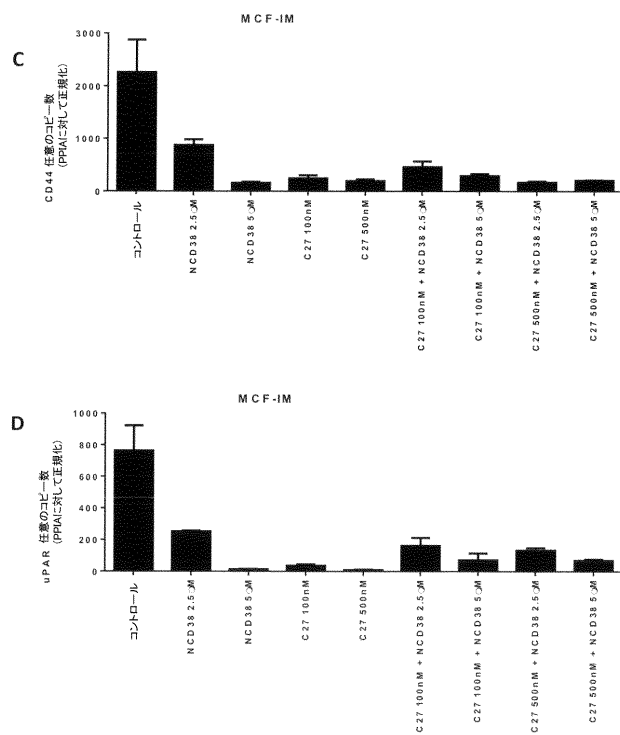


FIGURE 16 cont'd

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050489
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/00 (2006.01) A61K 35/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CA, WPIAP, EPODOC, MEDLINE and keywords: Lysine specific demethylase, LSD1, LSD2, protein kinase C- θ , inhibiting, antagonising, modulating, cancer, metastasis, pluripotent cancer cell and like terms		
Patentscope: RAO S., ZAFAR A.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 25 September 2015		Date of mailing of the international search report 25 September 2015
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au		Authorised officer Nathalie Tochon-Danguy AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262833101

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2015/050489
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/094273 A1 (VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 04 August 2011 abstract, [0019-0020], [0094-0116], [0121], [0145-0154], [0160], Examples	1-10, 12-26, 55-83, 88-90
Y	WO 2008/051826 A2 (N.V. ORGANON & PHARMACOPEDIA INC.) 02 May 2008 abstract, [0008], [0012], [0044], [0094-0111], [0117], [0121-127], claims 19, 26, 27, 37)-	1-10, 12-26, 55-83, 88-90
Y	WO 2012/009475 A1 (OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY) 19 January 2012 abstract, pages 19, 25, 29, 30, Example 6	1-10, 12-26
Y	WO 2013/033688 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 07 March 2013 abstract, pages 1-6, 16, 26, 31, 33, 39, 40, 48	1-10, 12-26, 55-83, 88-90
A	BELGUISE K. et al., "The PKC θ pathway participates in the aberrant accumulation of Fra-1 protein in invasive ER-negative breast cancer cells", ONCOGENE, 2012, vol. 31, pages 4889-4897 whole document	1-90
A	WANG J. et al., "Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties", CANCER RESEARCH, 2011, vol. 71, no. 23, pages 7238-7249 whole document	1-90
A	ZAFAR A. et al., "Chromatinized protein kinase C- θ directly regulates inducible genes in epithelial to mesenchymal transition and breast cancer stem cells", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, August 2014, vol. 34, no. 16, pages 2961-2980 Published ahead of print 2 June 2014 whole document	1-90
P,Y	WO 2014/205511 A1 (UNIVERSITY OF CANBERRA) 31 December 2014 Abstract, [0008-0048], [0332-370], Examples 4-9	1-90
P,Y	WO 2015/039187 A1 (UNIVERSITY OF CANBERRA) 26 March 2015 Abstract, [0008-0036], [0516-0554], Examples 2-6	1-90
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2015/050489	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2011/094273 A1	04 August 2011	WO 2011094273 A1	04 Aug 2011
		AR 080856 A1	16 May 2012
		AU 2011209726 A1	09 Aug 2012
		CA 2787315 A1	04 Aug 2011
		CN 102858769 A	02 Jan 2013
		EP 2528917 A1	05 Dec 2012
		JP 2013518111 A	20 May 2013
		MX 2012008644 A	23 Nov 2012
		US 2012071494 A1	22 Mar 2012
		US 9067932 B2	30 Jun 2015
WO 2008/051826 A2	02 May 2008	WO 2008051826 A2	02 May 2008
		AU 2007309167 A1	02 May 2008
		BR PI0717435 A2	18 Mar 2014
		CA 2666940 A1	02 May 2008
		CN 101657453 A	24 Feb 2010
		CN 101657453 B	12 Jun 2013
		CO 6160294 A2	20 May 2010
		EC SP099342 A	30 Jun 2009
		EP 2078019 A2	15 Jul 2009
		JP 2010507581 A	11 Mar 2010
		KR 20090075854 A	09 Jul 2009
		MX 2009004154 A	09 Sep 2009
		NO 20091597 A	14 Jul 2009
		RU 2009118963 A	27 Nov 2010
		US 2011046131 A1	24 Feb 2011
		ZA 200902640 A	26 May 2010
WO 2012/009475 A1	19 January 2012	WO 2012009475 A1	19 Jan 2012
WO 2013/033688 A1	07 March 2013	WO 2013033688 A1	07 Mar 2013
		US 2014206757 A1	24 Jul 2014
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2015/050489	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2014/205511 A1	31 December 2014	WO 2014205511 A1	31 Dec 2014
WO 2015/039187 A1	26 March 2015	WO 2015039187 A1	26 Mar 2015
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 33/10	(2006.01)	A 6 1 P 33/10	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/10	(2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	

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

(72)発明者 スダ・ラオ
オーストラリア 2 6 1 7 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー、マッケラー、ヘニー・クロ
ーズ 3 0 番

(72)発明者 アンジュム・ザファル
オーストラリア 2 6 1 7 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー、ブルース、クリスプ・サー
キット 2 / 3 3 番

F ターム (参考) 4C084 AA17 AA20 AA24 NA14 ZB261 ZB262 ZB321 ZB322 ZB331 ZB332
ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZB381 ZB382 ZB391 ZB392 ZC201 ZC202