

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7613743号

(P7613743)

(45)発行日 令和7年1月15日(2025.1.15)

(24)登録日 令和7年1月6日(2025.1.6)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 215/38 (2006.01)

C 0 7 D 215/38

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 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/10

A 6 1 K 31/4709(2006.01)

A 6 1 K 31/4709

請求項の数 48 (全75頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-505202(P2021-505202)

(86)(22)出願日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(65)公表番号 特表2021-532158(P2021-532158
A)

(43)公表日 令和3年11月25日(2021.11.25)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/044278

(87)国際公開番号 WO2020/028461

(87)国際公開日 令和2年2月6日(2020.2.6)

審査請求日 令和4年7月27日(2022.7.27)

(31)優先権主張番号 62/712,434

(32)優先日 平成30年7月31日(2018.7.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 591003552

ザ、トラスティーズ オブ プリンストン
ユニバーシティアメリカ合衆国・ニュージャージー・0
8 5 4 0 - 6 0 0 0 ・プリンストン・ア
レクサンダー・ロード・6 1 9 ・スー
ト・1 0 2

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

(74)代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(74)代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(74)代理人 100163544

弁理士 平田 緑

最終頁に続く

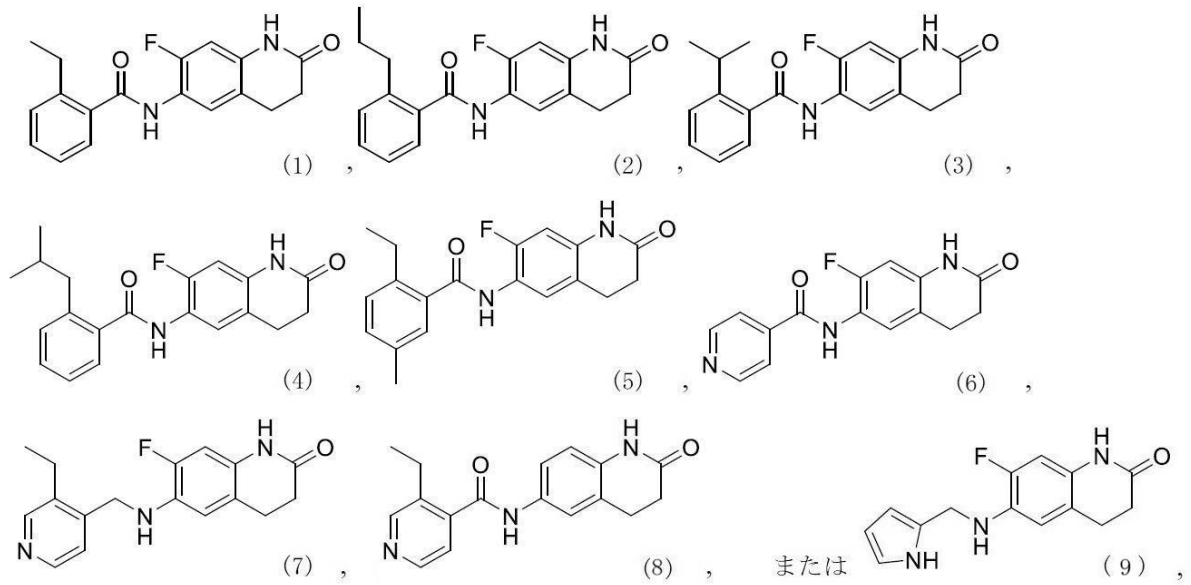
(54)【発明の名称】 転移性癌および化学療法抵抗性癌の治療のためのテトラヒドロキノリノ誘導体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造式(1)～(9)のいずれかで表される化合物：

【化 1】



10

またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 2】

20

請求項 1 に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩、および薬学的に許容可能な担体または賦形剤を含む組成物。

【請求項 3】

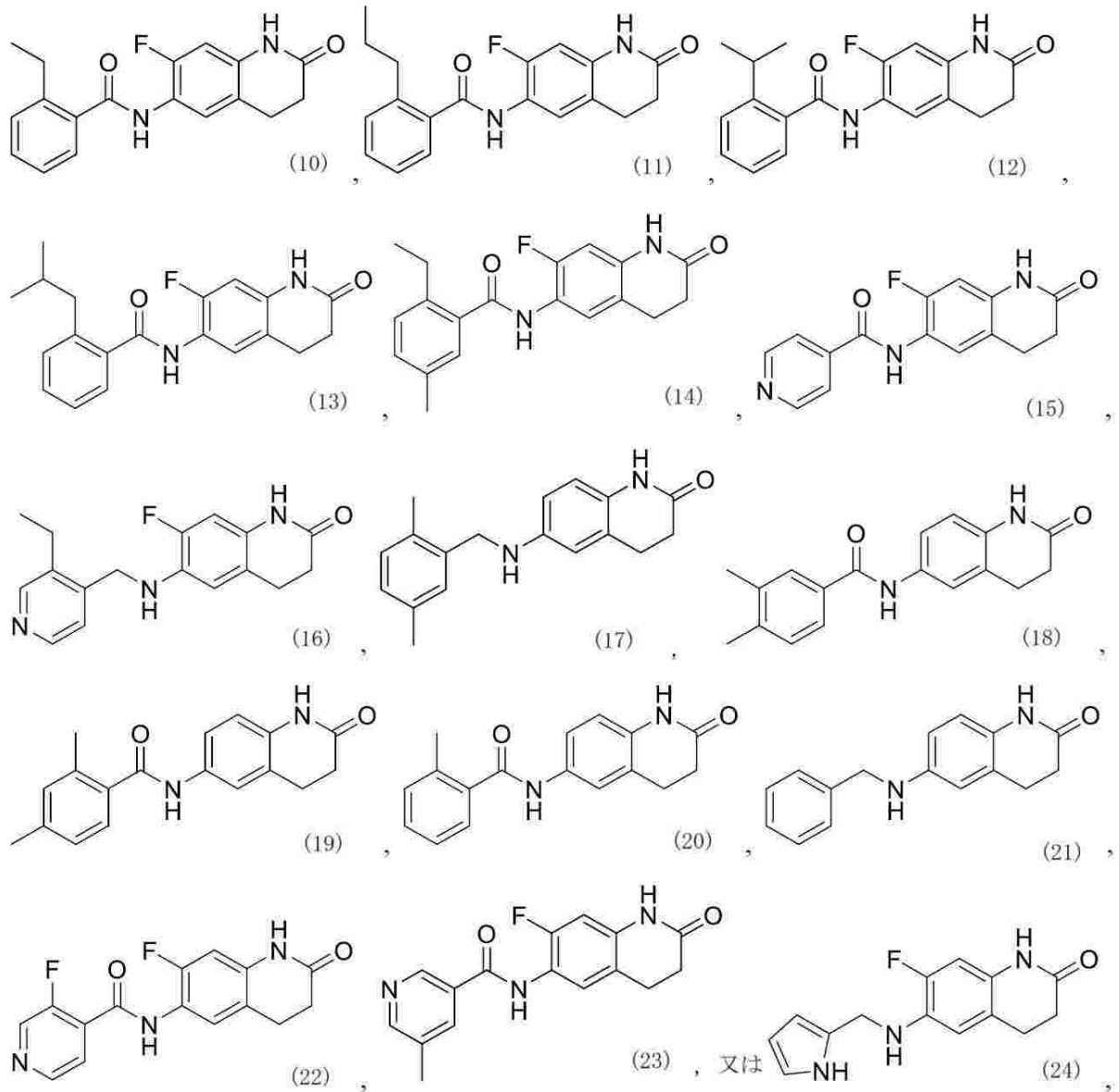
下記から選択されるいずれかの化合物：

30

40

50

【化 2】

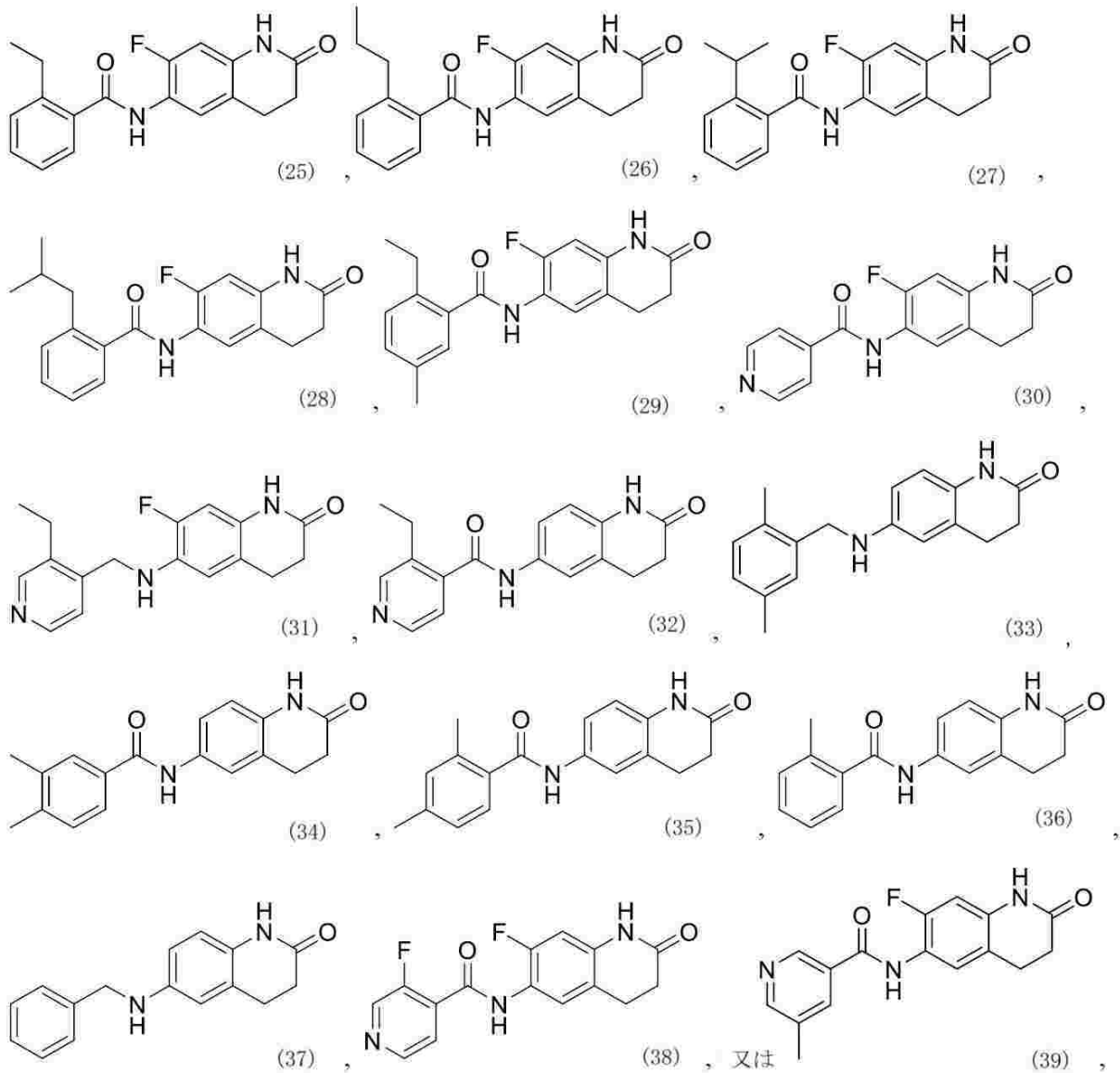


またはその薬学的に許容可能な塩を含む、転移性癌または化学療法抵抗性癌を治療するための薬剤。

【請求項 4】

下記から選択されるいずれかの化合物：

【化 3】



またはその薬学的に許容可能な塩を含む、転移性癌細胞または化学療法抵抗性癌細胞の増殖を阻害するための薬剤。

【請求項 5】

下記から選択されるいずれかの化合物：

10

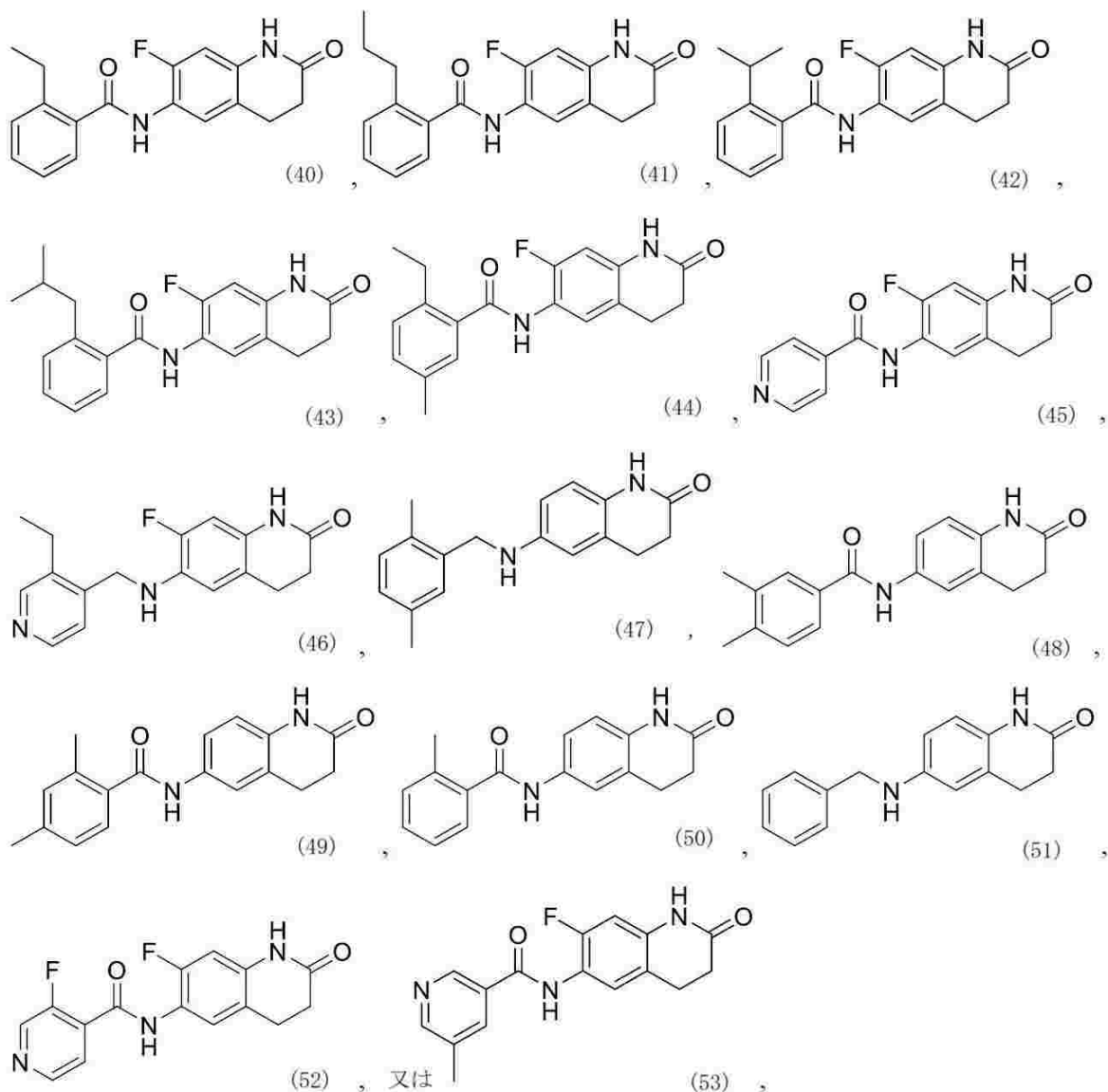
20

30

40

50

【化 4】

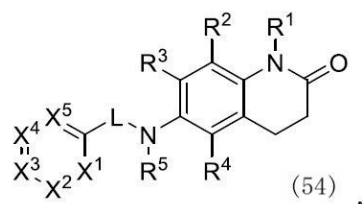


またはその薬学的に許容可能な塩を含む、2型糖尿病を治療するための薬剤。

【請求項 6】

下記構造式 (54) で表される化合物：

【化 5】



またはその薬学的に許容可能な塩を含む、転移性癌または化学療法抵抗性癌を治療するための薬剤

(式中、

R^1 および R^5 は、それぞれ独立して水素または ($C_1 - C_6$) アルキルであり；

R^2 、 R^3 および R^4 は、それぞれ独立して水素、ハロ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルキル、

10

20

30

40

50

(C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルコキシ、ハロ (C_1-C_3) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_3) アルキルアミノ、(C_1-C_3) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；

L は、 $-C(O)-$ または $-C(R^6)(R^7)-$ であり；

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、スルフヒドリル、ハロ、(C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルコキシまたはハロ (C_1-C_3) アルコキシであり；

X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 および X^5 は、それぞれ独立して $-C(R^8)-$ または $-N-$ であり；および

各 R^8 は、独立して水素、ハロ、ハロ (C_1-C_6) アルキル、(C_1-C_6) アルキル、(C_1-C_6) アルコキシ、ハロ (C_1-C_6) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_6) アルキルアミノ、(C_1-C_6) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである)。

10

【請求項 7】

R^2 および R^4 が、それぞれ水素である、請求項 6 に記載の薬剤。

【請求項 8】

R^1 が、水素である、請求項 6 または 7 に記載の薬剤。

【請求項 9】

R^5 が、水素である、請求項 6 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 10】

R^3 が、水素またはハロである、請求項 6 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

20

【請求項 11】

R^3 が、フルオロである、請求項 10 に記載の薬剤。

【請求項 12】

L が、 $-C(R^6)(R^7)-$ である、請求項 6 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 13】

L が、 $-C(O)-$ である、請求項 12 に記載の薬剤。

【請求項 14】

L が、 $-CH_2-$ である、請求項 12 に記載の薬剤。

【請求項 15】

各 R^8 が、独立して水素、ハロ、ハロ (C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルコキシ、ハロ (C_1-C_3) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_3) アルキルアミノ、(C_1-C_3) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである、請求項 6 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

30

【請求項 16】

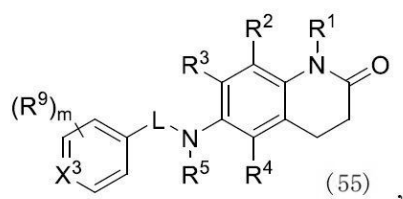
各 R^8 が、独立して水素、ハロまたは (C_1-C_6) アルキルである、請求項 6 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 17】

前記化合物が、下記構造式 (55) で表される化合物：

【化 6】

40



またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 6 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の薬剤 (式中、

各 R^9 は、独立してハロ、ハロ (C_1-C_6) アルキル、(C_1-C_6) アルキル、(C

50

$1-C_6$) アルコキシ、ハロ (C_1-C_6) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_6) アルキルアミノ、(C_1-C_6) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；および

m は 0、1、2、3 または 4 である)。

【請求項 18】

X^3 が、 $-C(R^8)-$ である、請求項 17 に記載の薬剤。

【請求項 19】

X^3 が、 $-N-$ である、請求項 17 に記載の薬剤。

【請求項 20】

各 R^9 が、独立してハロ、ハロ (C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルコキシ、ハロ (C_1-C_3) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_3) アルキルアミノ、(C_1-C_3) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである、請求項 17～19 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 21】

各 R^9 が、独立してハロまたは (C_1-C_6) アルキルである、請求項 17～19 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

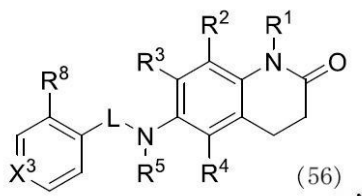
【請求項 22】

m が、0、1 または 2 である、請求項 17～21 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 23】

前記化合物が、下記構造式 (56) で表される化合物：

【化 7】



またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 6～19 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 24】

前記化合物が、下記表 A で定義される MBE 1、MBE 1. 2、MBE 1. 3、MBE 1. 5、MBE 1. 6、MBE 2、MBE 3. 1、MBE 3. 2、MBE 3. 3、MBE 3. 4、MBE 3. 5 もしくは MBE 3. 6 である化合物：

10

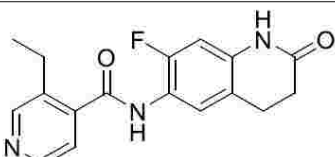
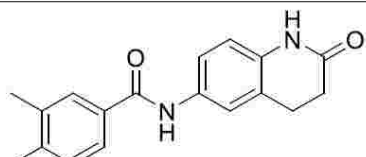
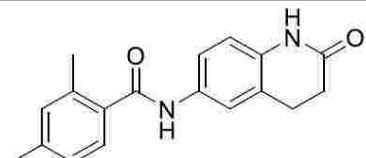
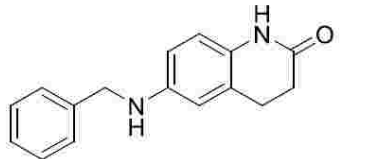
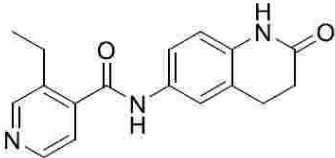
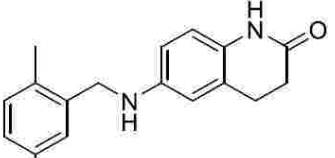
20

30

40

50

【表 A】

化合物 番号	化合物構造	化合物 番号	化合物構造
MBE1		MBE3.1	
MBE1.2		MBE3.2	
MBE1.3		MBE3.3	
MBE1.5		MBE3.4	
MBE1.6		MBE3.5	
MBE2		MBE3.6	

またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 6 に記載の薬剤。

【請求項 25】

前記癌が、転移性癌である、請求項 6～24 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 26】

前記転移性癌が、転移性乳癌、転移性結腸癌、転移性肺癌、転移性膵臓癌、転移性前立腺癌、転移性骨癌、転移性血液癌、転移性脳癌、および転移性肝臓癌からなる群から選択される、請求項 25 に記載の薬剤。

【請求項 27】

対象が骨転移を有する、請求項 25 または 26 に記載の薬剤。

【請求項 28】

前記癌が化学療法抵抗性癌である、請求項 6～27 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 29】

下記構造式 (57) で表される化合物：

10

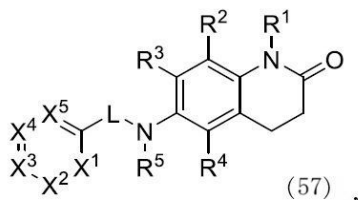
20

30

40

50

【化 8】



またはその薬学的に許容可能な塩を含む、転移性癌細胞または化学療法抵抗性癌細胞の増殖を阻害するための薬剤

(式中、

R^1 および R^5 は、それぞれ独立して水素または ($C_1 - C_6$) アルキルであり；

R^2 、 R^3 および R^4 は、それぞれ独立して水素、ハロ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルコキシ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルコキシ、アミノ、($C_1 - C_3$) アルキルアミノ、($C_1 - C_3$) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；

L は、 $-C(O)-$ または $-C(R^6)(R^7)-$ であり；

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、スルフヒドリル、ハロ、($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルコキシまたはハロ ($C_1 - C_3$) アルコキシであり；

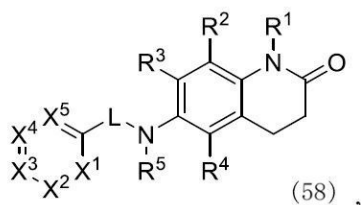
X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 および X^5 は、それぞれ独立して $-C(R^8)-$ または $-N-$ であり；および

各 R^8 は、独立して水素、ハロ、ハロ ($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルコキシ、ハロ ($C_1 - C_6$) アルコキシ、アミノ、($C_1 - C_6$) アルキルアミノ、($C_1 - C_6$) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである)。

【請求項 30】

下記構造式 (58) で表される化合物：

【化 9】



またはその薬学的に許容可能な塩を含む、2 型糖尿病を治療するための薬剤

(式中、

R^1 および R^5 は、それぞれ独立して水素または ($C_1 - C_6$) アルキルであり；

R^2 、 R^3 および R^4 は、それぞれ独立して水素、ハロ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルコキシ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルコキシ、アミノ、($C_1 - C_3$) アルキルアミノ、($C_1 - C_3$) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；

L は、 $-C(O)-$ または $-C(R^6)(R^7)-$ であり；

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、スルフヒドリル、ハロ、($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルコキシまたはハロ ($C_1 - C_3$) アルコキシであり；

X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 および X^5 は、それぞれ独立して $-C(R^8)-$ または $-N-$ であり；および

各 R^8 は、独立して水素、ハロ、ハロ ($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルキル

、(C₁－C₆)アルコキシ、ハロ(C₁－C₆)アルコキシ、アミノ、(C₁－C₆)アルキルアミノ、(C₁－C₆)ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである)。

【請求項 3 1】

R²およびR⁴が、それぞれ水素である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の薬剤。

【請求項 3 2】

R¹が、水素である、請求項 2 9 ～ 3 1 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 3 3】

R⁵が、水素である、請求項 2 9 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 3 4】

R³が、水素またはハロである、請求項 2 9 ～ 3 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 3 5】

R³が、フルオロである、請求項 3 4 に記載の薬剤。

【請求項 3 6】

L が、－C(R⁶)(R⁷)－である、請求項 2 9 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 3 7】

L が、－C(O)－である、請求項 3 6 に記載の薬剤。

【請求項 3 8】

L が、－CH₂－である、請求項 3 6 に記載の薬剤。

【請求項 3 9】

各R⁸が、独立して水素、ハロ、ハロ(C₁－C₃)アルキル、(C₁－C₃)アルキル、(C₁－C₃)アルコキシ、ハロ(C₁－C₃)アルコキシ、アミノ、(C₁－C₃)アルキルアミノ、(C₁－C₃)ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである、請求項 2 9 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

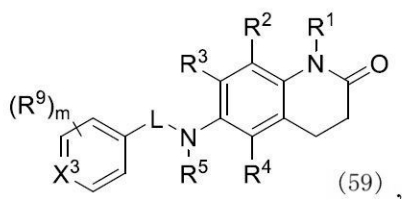
【請求項 4 0】

各R⁸が、独立して水素、ハロまたは(C₁－C₆)アルキルである、請求項 2 9 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 4 1】

前記化合物が、下記構造式(59)で表される化合物：

【化 1 0】



またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 2 9 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載の薬剤(式中、

各R⁹は、独立してハロ、ハロ(C₁－C₆)アルキル、(C₁－C₆)アルキル、(C₁－C₆)アルコキシ、ハロ(C₁－C₆)アルコキシ、アミノ、(C₁－C₆)アルキルアミノ、(C₁－C₆)ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；および

mは0、1、2、3または4である)。

【請求項 4 2】

X³が、－C(R⁸)－である、請求項 4 1 に記載の薬剤。

【請求項 4 3】

X³が、－N－である、請求項 4 1 に記載の薬剤。

【請求項 4 4】

各R⁹が、独立してハロ、ハロ(C₁－C₃)アルキル、(C₁－C₃)アルキル、(C

1-C₃) アルコキシ、ハロ (C₁-C₃) アルコキシ、アミノ、(C₁-C₃) アルキルアミノ、(C₁-C₃) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである、請求項 4 1～4 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 4 5】

各 R⁹ が、独立してハロまたは (C₁-C₆) アルキルである、請求項 4 1～4 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

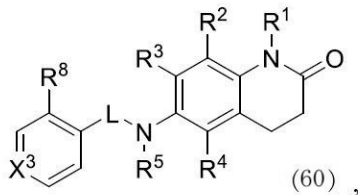
【請求項 4 6】

m が、0、1 または 2 である、請求項 4 1～4 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 4 7】

前記化合物が、下記構造式 (60) で表される化合物：

【化 1 1】



またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 2 9～4 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 4 8】

前記化合物が、下記表 B で定義される MBE 1、MBE 1. 2、MBE 1. 3、MBE 1. 5、MBE 1. 6、MBE 2、MBE 3. 1、MBE 3. 2、MBE 3. 3、MBE 3. 4、MBE 3. 5 もしくは MBE 3. 6 である化合物：

10

20

30

40

50

【表 B】

化合物 番号	化合物構造	化合物 番号	化合物構造
MBE1		MBE3.1	
MBE1.2		MBE3.2	
MBE1.3		MBE3.3	
MBE1.5		MBE3.4	
MBE1.6		MBE3.5	
MBE2		MBE3.6	

またはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 29 または 30 に記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年7月31日付けで出願された米国仮特許出願第62／712,434号の利益を主張するものである。上記出願（複数の場合もある）の全ての教示は、参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

背景

侵襲性および／または化学療法抵抗性の転移性癌を治療するための現在の治療法は、有効性が限られている。したがって、これらの癌の治療のための改善された有効性を有する治療薬が必要とされている。

【0003】

10

20

30

40

50

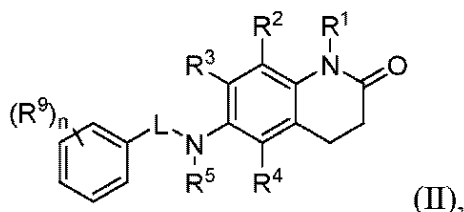
概要

それを必要とする対象における癌、例えば、転移性癌（例えば、基底様乳癌、HER-2陽性乳癌などの転移性乳癌）、化学療法抵抗性癌（例えば、パクリタキセルおよび／またはドキソルビシン抵抗性癌）を治療するための化合物、組成物および方法が本明細書中で提供される。

【0004】

一実施形態は、構造式Ⅱの化合物：

【化1】



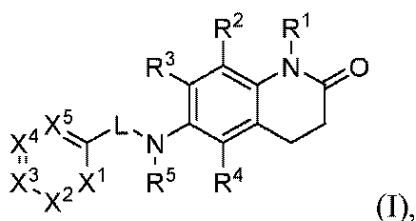
10

またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、可変値（例えば、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁹、L、n）は本明細書中に記載される通りである。

【0005】

別の実施形態は、構造式Ⅰの化合物：

【化2】



20

またはその薬学的に許容可能な塩を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における転移性癌または化学療法抵抗性癌の治療方法であって、式中、可変値（例えば、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁹、L、X¹、X²、X³、X⁴、X⁵）は本明細書中に記載される通りである。転移性癌または化学療法抵抗性癌の治療に使用するための化合物であって、構造式Ⅰで表される化合物、またはその薬学的に許容可能な塩も提供される。転移性癌または化学療法抵抗性癌の治療のための医薬の製造のための、構造式Ⅰの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩の使用も提供される。

30

【0006】

さらに別の実施形態は、転移性癌細胞または化学療法抵抗性癌細胞の増殖の阻害方法であって、有効量の構造式Ⅰの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を該細胞に投与することを含む方法である。転移性癌細胞または化学療法抵抗性癌細胞の増殖を阻害するための化合物であって、構造式Ⅰで表される化合物、またはその薬学的に許容可能な塩も提供される。転移性癌細胞または化学療法抵抗性癌細胞の増殖を阻害するための医薬の製造のための、構造式Ⅰの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩の使用も提供される。

40

【0007】

別の実施形態は、構造式Ⅰの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における2型糖尿病の治療方法である。2型糖尿病の治療に使用するための化合物であって、構造式Ⅰで表される化合物、またはその薬学的に許容可能な塩も提供される。2型糖尿病の治療のための医薬の製造のための、構造式Ⅰの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩の使用も提供される。

【0008】

本明細書中に記載される化合物、組成物および方法は、転移および／または化学療法に

50

対する抵抗性に重要であり、そして多くの腫瘍型において広く発現される酵素標的（A L D H 1 a 3）を阻害するために使用され得る。本明細書に記載される化合物の多くは、A L D H 1 a 3 に対して低いナノモル親和性を有し、そして化合物 M B E 1 は、マウスにおいて毒性なしに転移巣を縮小させることが示されている。

【0009】

図面の簡単な説明

本特許又は出願書類は、色彩を付して作成された少なくとも1の図面を含む。本特許又は特許出願公開の写しでカラー図面を付したものは、請求および必要な手数料の納付がされたときに米国特許商標庁により提供される。

【0010】

前述の事項は、例示的な実施形態の以下のより具体的な説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】図1Aは、本明細書中に記載される種々の化合物の存在下でのA L D E F L U O R（商標）陽性細胞のパーセンテージの棒グラフであり、そして100ナノモル濃度の化合物と共に本明細書中に記載される標準的なA L D E F L U O R（商標）プロトコールを使用したインキュベーション後のフローサイトメトリーにより検出される、バックグラウンド蛍光レベルを超えるS U M 1 5 9 - M 1 a - A l d h 1 a 3細胞のパーセンテージを示す。バックグラウンド蛍光のゲーティングは、陰性対照として1ミリモル濃度のN，N-ジエチルアミノベンズアルデヒド（D E A B）を使用して行われた。

【図1B】図1Bは、様々な濃度のM B E 1またはM B E 1.5の存在下でのA L D E F L U O R（商標）陽性細胞のパーセンテージの折れ線グラフであり、そしてM B E 1またはM B E 1.5の用量滴定と組み合わせた、本明細書に記載の標準的なA L D E F L U O R（商標）プロトコールに従ったインキュベーション後のフローサイトメトリーにより検出される、バックグラウンド蛍光レベルを上回るS U M 1 5 9 - M 1 a - A l d h 1 a 3細胞のパーセンテージを示す。[i n h - m i n] 閾値は、対照試料の2つの標準偏差の下限に設定され、一方、I C 5 0 閾値は、対照試料の平均の50%に設定された。

【図1C】図1Cは、様々な濃度のM B E 1およびM B E 1.5の存在下での高A L D Hパーセンテージの折れ線グラフであり、そしてM B E 1またはM B E 1.5の用量滴定と組み合わせた、本明細書に記載の標準的なA L D E F L U O R（商標）プロトコールに従ったインキュベーション後のフローサイトメトリーにより検出される、高蛍光レベルであるS U M 1 5 9 - M 1 a - A l d h 1 a 3細胞のパーセンテージを示す。高い活性は、10ナノモル濃度のM B E 1.5濃度で99パーセントの細胞でゲーティングされた。[i n h - m i n] 閾値は、対照試料の2つの標準偏差の下限に設定された。

【図2A】図2Aは、ヒトA l d h 1 a 1、A l d h 1 a 3またはA l d h 3 a 1が安定的に形質導入され、そして列挙された濃度のD M S OまたはM B E 1と組み合わせたフローサイトメトリーによりA L D E F L U O R（商標）プロトコールを使用して分析されたM C F 7細胞のヒストグラムであり、そして各酵素により誘導されたA L D E F L U O R（商標）活性に対するD M S OまたはM B E 1の効果を示す。

【図2B】図2Bは、ヒトA l d h 1 a 2またはA l d h 1 a 3が一過性にトランスフェクトされ、そして列挙された濃度のD M S OまたはM B E 1.5と組み合わせたフローサイトメトリーによりA L D E F L U O R（商標）プロトコールを使用して分析された293T細胞のヒストグラムであり、そして各酵素により誘導されたA L D E F L U O R（商標）活性に対するD M S OまたはM B E 1.5のいずれかの効果を示す。

【図3A】図3Aは、D E A BまたはM B E 1の存在下での種々の癌型におけるA L D E F L U O R（商標）陽性細胞の棒グラフであり、そしてA L D H 1 a 3活性がM L a（乳癌）およびM D A - 4 6 8（乳癌）に加えて多くの癌型において観察され、そして多くの癌型においてM B E 1により阻害されることを示す。

【図3B】図3Bは、1 mM D E A B（p a n - A L D H阻害剤）または100 nM M B E 1.5（特異的A L D H 1 a 3阻害剤）の存在下での種々の癌型におけるA L D E

10

20

30

40

50

FLUOR（商標）活性の棒グラフであり、そしてヒト癌細胞株の大部分がALDH1a3活性を示すことを示す。

【図4A】図4Aは、フローサイトメトリースペクトルであり、そしてCD45陽性骨髄細胞がALDEFLUOR（商標）陽性であるが、MBE1.5により影響を受けないことを示す。

【図4B】図4Bは、フローサイトメトリースペクトルであり、そしてCD11c陽性骨髄細胞がALDEFLUOR（商標）陽性であるが、MBE1.5により影響を受けないことを示す。

【図5A】図5Aは、静脈内尾静脈注射（intravenous tail-vein injection）を介してM1a-ALDH1a3細胞を注射されたマウスにMBE1およびパクリタキセルを投与するために使用される投薬戦略の線図であり、そして転移性癌の治療におけるMBE1の有効性を試験するために設計されたインビボ実験の設計を示す。

10

【図5B】図5Bは、生物発光イメージング（BLI）を使用して測定された、肺転移対時間（日）の折れ線グラフであり、そして図5Aに概説される実験からのマウスにおけるMBE1の存在下および非存在下での肺転移を比較するものである。スチューデントt検定、両側、仮定不等分散。

【図6A】図6Aは、心臓内注射を介してM1a-ALDH1a3細胞を注射されたマウスにMBE1およびパクリタキセルを投与するために使用される投薬戦略の線図であり、そして転移性癌の治療におけるMBE1の有効性を試験するために設計されたインビボ実験の設計を示す。

20

【図6B】図6Bは、BLIを使用して測定された、骨転移対時間（日）の折れ線グラフであり、そして図6Aに概説される実験からのマウスにおけるMBE1の存在下および非存在下での骨転移を比較するものである。スチューデントt検定、片側、仮定不等分散。

【図7A】図7Aは、フローサイトメトリースペクトルであり、そしてMDA-MB-468乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウト（中央および右端スペクトル）が対照MDA-MB-468細胞（左端スペクトル）と比較してALDEFLUOR（商標）活性を実質的に減少させることを示す。

【図7B】図7Bは、腫瘍体積（mm³）対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてMDA-MB-468乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウトが原発腫瘍増殖を遅らせ、そしてパクリタキセルに対して腫瘍を感作させることを示す。

30

【図7C】図7Cは、腫瘍質量（g）対遺伝子ノックアウトの棒グラフであり、そしてMDA-MB-468乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウトが原発腫瘍増殖を遅らせ、そしてパクリタキセルに対して腫瘍を感作させることを示す。

【図8A】図8Aは、生物発光（ph/s）対時間（日）の折れ線グラフであり、そして3つのALDH酵素、ALDH1a1、ALDH1a3およびALDH3a1をコードするベクターを形質導入されたSUM159-M1b細胞を注入されたマウスにおける肺転移の発生を示す。

【図8B】図8Bは、図8Aに記載される実験の終了点でエキスピボでカウントされた肺結節（lung nodes）のプロットである。スチューデントt検定、両側、仮定不等分散。

40

【図9A】図9Aは、フローサイトメトリースペクトルであり、そしてSum159-M1a乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウトが細胞におけるALDEFLUOR（商標）活性をほぼ消失させること、およびALDEFLUOR（商標）活性が細胞にレスキューベクターを形質導入することによりレスキューされ得ることを示す。

【図9B】図9Bは、生物発光（ph/s）により測定された、骨転移対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてSum159-M1a乳癌細胞におけるALDH1a3のノックアウトが骨転移増殖を遅らせることを示す。

【図9C】図9Cは、経時的な骨転移のない生存のKaplan-Meierプロットであり、そしてSum159-M1a乳癌細胞におけるALDH1a3のノックアウトが生

50

存時間を有意に増加させることを示す。

【図10A】図10Aは、`kmpplot.com`で提供されるデータ解析ツールに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（黒）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数として腎明細胞癌患者の遠隔転移のない生存を示す。

【図10B】図10Bは、`kmpplot.com`で提供されるデータ解析ツールに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（黒）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数としてトリプルネガティブ乳癌患者の全生存を示す。

【図10C】図10Cは、`kmpplot.com`で提供されるデータ解析ツールに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（黒）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数として胃癌患者の全生存を示す。

10

【図10D】図10Dは、`kmpplot.com`で提供されるデータ解析ツールに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（黒）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数として膀胱癌患者の全生存を示す。

【図10E】図10Eは、`kmpplot.com`で提供されるデータ解析ツールに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（黒）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数として卵巣癌患者の全生存を示す。

【図10F】図10Fは、`kmpplot.com`で提供されるデータ解析ツールに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（黒）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数として肺扁平上皮癌患者の全生存を示す。

20

【図10G】図10Gは、`The Cancer Genome Atlas`からの生存時系列データおよび患者レベルのRNA発現データに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（青）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数として結腸直腸癌患者の全生存を示す。

【図10H】図10Hは、`The Cancer Genome Atlas`からの生存時系列データおよび患者レベルのRNA発現データに基づく `Aldh1a3` の高発現（赤）および低発現（青）により層別化された患者生存曲線であり、そして `ALDH1a3` 発現レベルの関数として低悪性度神経膠腫患者の全生存を示す。

【図11A】図11Aは、`METABRIC`臨床乳癌データセットからの `Aldh1a3` のmRNA発現のグラフであり、そして乳癌サブタイプ別および化学療法歴による `Aldh1a3` の発現を示す。

30

【図11B】図11Bは、`Erasmus Medical Center-Memorial Sloan-Kettering (EMC-MSK)` データセットに基づく一連の生存曲線であり、そしてサブタイプ別および中央値 `ALDH1a3` 発現レベルによる層別化により乳癌患者の生存期間を示す。

【図12】図12は、`ALDEFLUOR`（商標）活性対濃度のグラフであり、そして10 nMおよび100 nMの濃度での本明細書に記載されるいくつかの化合物の `ALDEFLUOR`（商標）活性を示す。

【図13A】図13Aは、ウェスタンブロットであり、そして `MCF7` 細胞および `SEIM159` 細胞における1a1、1a2、1a3および3a1を含む種々の `ALDH` アイソフォームの発現を示す。

40

【図13B】図13Bは、示された `ALDH` アイソフォームを発現する `ALDEFLUOR`（商標）陽性 `MCF7` 細胞のパーセンテージ対 `MBE1.5` 濃度の対数の折れ線グラフであり、そして `MBE1.5` が10 μM未満の濃度で `ALDH1a3` を特異的に阻害することを示す。

【図13C】図13Cは、示された `ALDH` アイソフォームを発現する `ALDEFLUOR`（商標）陽性 `SEIM159` 細胞のパーセンテージ対 `MBE1.5` 濃度の対数の折れ線グラフであり、そして `MBE1.5` が10 pM未満の濃度で `ALDH1a3` を特異的に阻害することを示す。

50

【図14】図14は、生物発光イメージング（BLI）により測定された肺転移対時間（日）の折れ線グラフであり、そして17、19および21日目に投与された25 mg/kgのパクリタキセルと組み合わせた50 mg/kgのMBE1.5の3つの用量が、マウス異種移植モデルにおいて樹立された転移性疾患の退行を引き起こしたことを示す。スチューデントt検定、両側、仮定不等分散。

【図15A】図15Aは、体重（g）対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてこの実験においてMBE1.5処理に関連する著しい毒性がなかったことを示す。

【図15B】図15Bは、腫瘍体積（mm³）対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてMBE1.5での12日間の処理がMDA-MB-468原発性乳腺腫瘍の退行を引き起こしたことを示す。スチューデントt検定による統計。 $*p < 0.05$ 。

【図16A】図16Aは、肺転移生物発光対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてMBE1.5または溶媒での処理の前後の肺転移の進行を示す。スチューデントt検定による統計。 $*p < 0.05$ 。

【図16B】図16Bは、処理群の関数としての経時的なマウス生存のKaplan-Meierプロットであり、そしてMBE1.5による12日間の処理が後期樹立乳癌肺転移を有するマウスにおける生存を延長したことを示す。コックス比例ハザードモデルによる統計。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

化合物、組成物および方法は、部分的にはアルデヒドデヒドロゲナーゼ（Aldh、ALDH）、および特にALDHアイソフォーム1a3（ALDH1a3）が多くの癌型および他のALDH1a3媒介疾患および障害（例えば、2型糖尿病）に関与するという発見に基づく。

したがって、本明細書中で提供される化合物、組成物および方法は、ALDH、例えばALDH1a3を調節する（例えば、阻害する）ことに関する。

【0013】

例示的な実施形態の説明は、以下の通りである。

【0014】

定義

本明細書に記載される化合物は、一般的に記載されるものを含み、そして本明細書に開示されるクラス、サブクラス、および種によりさらに例示される。本明細書で使用される場合、以下の定義は、別段の指示がない限り適用されるものとする。本発明のために、化学元素は、元素の周期表、CAS版、化学と物理のハンドブック第75版（the Periodic Table of the Elements, CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed）、に従い同定される。さらに、有機化学の一般原理は、“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999、および“March’s Advanced Organic Chemistry”, 5th Ed., Ed.: Smith, M. B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001に記載されており、これらの全内容は、参照により本明細書に援用される。

【0015】

本明細書中で特に明記しない限り、本明細書中で使用される命名法は、一般に、有機化学の命名法、セクションA、B、C、D、E、F、およびH、Pergamon Press、Oxford、1979（Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F, and H, Pergamon Press, Oxford, 1979）に記載された例および規則に従い、その化学構造名および命名化学構造に関する規則について参照により本明細書に

援用される。任意選択的に、化合物の名前は、化学命名プログラム（例えば、CHEMDRAW（登録商標）、version 17.0.0.206、PerkinElmer Informatics, Inc.）を使用して生成されてもよい。

【0016】

本発明の化合物は、キラル中心、キラル軸、およびキラル面（例えば、E. L. Eliel and S. H. Wilen, Stereochemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New York, 1994, pages 1119-1190に記載されるもの）を有してもよく、そしてラセミ体、ラセミ混合物、および個々のジアステレオマーもしくはエナンチオマーとして生じ、全ての可能な異性体およびそれらの混合物（光学異性体を含む）が本発明に含まれる。

10

【0017】

「アルキル」とは、特定の数の炭素原子を有する飽和脂肪族分枝鎖又は直鎖一価炭化水素基をいう。したがって、「(C₁-C₃) アルキル」とは、1〜3個の炭素原子を直鎖又は分枝鎖配列で有する基を意味する。アルキルには、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが含まれる。「(C₁-C₃) アルキル」には、メチル、エチル、プロピル及びイソプロピルが含まれる。

【0018】

「アミノ」とは、-NH₂を意味する。

【0019】

「アルキルアミノ」とは、(アルキル)(H)-N-を意味し、ここで該アルキル基は、本明細書中に記載される通りである。一態様では、アルキルアミノは、(C₁-C₃) アルキルアミノである。特定のアルキルアミノ基には、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノおよびイソプロピルアミノが含まれる。

20

【0020】

「ジアルキルアミノ」とは、(アルキル)₂-N-を意味し、ここで該アルキル基は、同じであっても異なってもよいが、本明細書中に記載される通りである。特定のジアルキルアミノ基は、((C₁-C₃) アルキル)₂-N-であり、ここで該アルキル基は、同じであっても異なってもよい。ジアルキルアミノ基には、ジメチルアミノ、ジエチルアミノおよびメチルエチルアミノが含まれる。

30

【0021】

「ハロゲン」および「ハロ」は、本明細書において互換的に使用され、そしてそれぞれフッ素、塩素、臭素、またはヨウ素を指す。いくつかの実施形態では、ハロゲンは、フルオロまたはクロロから選択される。

【0022】

「クロロ」とは、-Clを意味する。

【0023】

「フルオロ」とは、-Fを意味する。

【0024】

「シアノ」とは、-CNを意味する。

40

【0025】

「ニトロ」とは、-NO₂を意味する。

【0026】

「ヒドロキシ」とは、-OHを意味する。

【0027】

「スルフヒドリル」とは、-SHを意味する。

【0028】

「アルコキシ」とは、酸素結合原子を介して結合したアルキルラジカルをいい、ここで「アルキル」は、本明細書中に記載される通りである。「(C₁-C₆) アルコキシ」には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシおよびヘキソキシが含まれ

50

る。

【0029】

「チオアルコキシ」とは、イオウ結合原子を介して結合されたアルキルラジカルをいい、ここで「アルキル」は、本明細書中に記載される通りである。

【0030】

「ハロアルキル」には、モノ、ポリ、およびペルハロアルキル基が含まれ、ここで各ハロゲンは、独立してフッ素、塩素、および臭素から選択され、そしてアルキルは、本明細書中に記載される通りである。一態様では、ハロアルキルは、ペルハロアルキル（例えば、ペルフルオロアルキル）である。ハロアルキル基には、トリフルオロメチルおよびペンタフルオロエチルが含まれる。

【0031】

「ハロアルコキシ」とは、酸素結合原子を介して結合されたハロアルキルラジカルをいい、ここで「ハロアルキル」は、本明細書中に記載される通りである。

【0032】

本発明の化合物上の置換基は、化学的に安定であり、かつ当該技術分野で公知の技術および以下に記載される方法により容易に合成され得る化合物を提供するために、当業者により選択され得ることが理解される。本発明により想定される置換基の組み合わせ（例えば、 R^1-R^9 、 m 、 n 、 L 、 X^1-X^5 ）は、好ましくは安定なまたは化学的に実現可能な化合物の生成をもたらすものである。本明細書中で使用される用語「安定」とは、それらの製造、検出、および、特定の実施形態では、それらの回収、精製、および本明細書で開示される1つ以上の目的のための使用を可能にする状態に供された場合に実質的に変化しない化合物を指す。

【0033】

本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に許容可能な塩」とは、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答などなしに、ヒトおよび下等動物の組織との接触用途に適し、そして妥当な利益／危険比に相応する塩をいう。薬学的に許容可能な塩は、当該技術分野で周知である。例えば、S. M. Bergeらは、J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19に薬学的に許容可能な塩を詳細に記載し、その関連する教示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

本明細書中に記載される化合物の薬学的に許容可能な塩は、対象の治療に適合する適切な無機酸および有機酸および無機塩基および有機塩基から誘導される塩を含む。

【0034】

薬学的に許容可能な非毒性の酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸および過塩素酸などの無機酸により、または酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸またはマロン酸などの有機酸により、またはイオン交換などの当該技術分野で使用される他の方法を使用することにより形成されるアミノ基の塩である。他の薬学的に許容可能な酸付加塩には、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが含まれる。

【0035】

いくつかの実施形態では、適切な塩を形成する例示的な無機酸には、塩酸、臭化水素酸

10

20

30

40

50

、硫酸およびリン酸、ならびに酸金属塩（例えば、オルトリン酸一水素ナトリウムおよび硫酸水素カリウムなど）が含まれるが、これらに限定されない。好適な塩を形成する例示的な有機酸には、モノカルボン酸、ジカルボン酸およびトリカルボン酸が含まれる。このような酸の例は、例えば、酢酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、ケイ皮酸、サリチル酸、2-フェノキシ安息香酸、p-トルエンスルホン酸、ならびにメタンスルホン酸および2-ヒドロキシエタンスルホン酸などの他のスルホン酸である。一酸塩または二酸塩のいずれかが形成され得、そしてこのような塩は、水和物、溶媒和物または実質的に無水物の形態のいずれかで存在し得る。一般に、これらの化合物の酸付加塩は、水および種々の親水性有機溶媒においてより溶解しやすく、そして一般に、それらの遊離塩基形態と比較してより高い融点を示す。

10

【0036】

いくつかの実施形態では、酸付加塩は、薬学的に許容可能な酸から最も適切に形成され、そして例えば、無機酸（例えば、塩酸、硫酸またはリン酸）および有機酸（例えば、コハク酸、マレイン酸、酢酸またはフマル酸）により形成されるものを含む。

【0037】

好適な塩を形成する例示的な無機塩基には、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウムまたは水酸化バリウムが含まれるが、これらに限定されない。好適な塩を形成する例示的な有機塩基には、脂肪族アミン、脂環式アミンまたは芳香族有機アミン（例えばメチルアミン、トリメチルアミンおよびピコリンなど）、またはアンモニアが含まれる。適切な塩の選択基準は、当業者に公知であろう。

20

【0038】

適切な塩基から誘導される塩には、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウムおよび $N^+(C_1-C_4)$ アルキル₄塩が含まれる。代表的なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどが含まれる。さらに薬学的に許容可能な塩には、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボキシル、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、低級アルキルスルホン酸塩およびアリアルスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成される非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンが含まれる。

30

【0039】

さらに、特に明記しない限り、本明細書中で図示される構造は、1つ以上の同位体濃縮原子の存在下においてのみ異なる化合物を含むことも意図される。例えば、水素を重水素もしくはトリチウムで置換することにより、または炭素を ^{13}C もしくは ^{14}C 濃縮炭素で置換することにより製造される化合物は、本発明の範囲内である。このような化合物は、例えば、分析ツールとして、生物学的アッセイにおけるプローブとして、または本発明による治療剤として有用である。

【0040】

本明細書に開示される要素を導入する場合、冠詞「a」、「an」、「the」、および「said」は、1つ以上の要素が存在することを意味することが意図される。用語「comprising」、「having」、および「including」は、開放形式（open-ended）であることが意図され、そして列挙された要素以外の追加の要素が存在してもよいことを意味する。

40

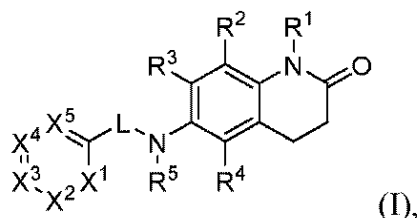
【0041】

化合物

第1の実施形態は、構造式Iで表される化合物：

50

【化 3】



またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中：

R^1 および R^5 は、それぞれ独立して水素または ($C_1 - C_6$) アルキルであり；

R^2 、 R^3 および R^4 は、それぞれ独立して水素、ハロ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルコキシ、($C_1 - C_3$) チオアルコキシ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルコキシ、アミノ、($C_1 - C_3$) アルキルアミノ、($C_1 - C_3$) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；

L は、 $-C(O)-$ 、 $-C(R^6)(R^7)-$ 、 $-C(CH_2CH_2)-$ 、 $-C(OCH_2)-$ または $-C(N(H)CH_2)-$ であり；

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、スルフヒドリル、ハロ、($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルコキシ、($C_1 - C_3$) チオアルコキシまたはハロ ($C_1 - C_3$) アルコキシであり；

X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 および X^5 は、それぞれ独立して $-C(R^8)-$ または $-N-$ であり；および

各 R^8 は、独立して水素、ハロ、ハロ ($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルコキシ、($C_1 - C_6$) チオアルコキシ、ハロ ($C_1 - C_6$) アルコキシ、アミノ、($C_1 - C_6$) アルキルアミノ、($C_1 - C_6$) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである。

【0042】

第1の実施形態の第1の態様では、化合物は、MBE1、MBE2、MBE3.1、MBE3.2、MBE3.3、MBE3.4、MBE3.5もしくはMBE3.6、または前述のもののいずれかの薬学的に許容可能な塩ではない。変数の値は、第1の実施形態で説明した通りである。

【0043】

第1の実施形態の第2の態様では、 R^2 および R^4 は、それぞれ水素である。残りの変数の値は、第1の実施形態またはその第1の態様で説明した通りである。

【0044】

第1の実施形態の第3の態様では、 R^1 は、水素である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1もしくは第2の態様で説明した通りである。

【0045】

第1の実施形態の第4の態様では、 R^5 は、水素である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第3の態様で説明した通りである。

【0046】

第1の実施形態の第5の態様では、 R^3 は、水素またはハロ（例えば、ハロ）である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第4の態様で説明した通りである。

【0047】

第1の実施形態の第6の態様では、 R^3 は、ハロ（例えば、フルオロ）である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第5の態様で説明した通りである。

【0048】

第1の実施形態の第7の態様では、 L は、 $-C(O)-$ または $-C(R^6)(R^7)-$ である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第6の態様で説明した通りである。

【0049】

第1の実施形態の第8の態様では、Lは、 $-C(O)-$ である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第7の態様で説明した通りである。

【0050】

第1の実施形態の第9の態様では、Lは、 $-CH_2-$ である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第8の態様で説明した通りである。

【0051】

第1の実施形態の第10の態様では、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 および X^5 の1つは、 $-N-$ である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第9の態様で説明した通りである。

【0052】

第1の実施形態の第11の態様では、 X^3 は、 $-N-$ であり；ならびに X^1 、 X^2 、 X^4 および X^5 は、それぞれ独立して $-C(R^8)-$ である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第10の態様で説明した通りである。

【0053】

第1の実施形態の第12の態様では、各 R^8 は、独立して水素、ハロ、ハロ(C_1-C_3)アルキル、(C_1-C_3)アルキル、(C_1-C_3)アルコキシ、(C_1-C_3)チオアルコキシ、ハロ(C_1-C_3)アルコキシ、アミノ、(C_1-C_3)アルキルアミノ、(C_1-C_3)ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第11の態様で説明した通りである。

【0054】

第1の実施形態の第13の態様では、各 R^8 は、独立して水素、ハロまたは(C_1-C_6)アルキル（例えば、水素または(C_1-C_6)アルキル）である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第12の態様で説明した通りである。

【0055】

第1の実施形態の第14の態様では、 R^6 および R^7 は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、ハロ、(C_1-C_3)アルキルまたは(C_1-C_3)アルコキシであり、例えば、 R^6 および R^7 は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシまたはハロであり、例えば、 R^6 および R^7 は、それぞれ水素である。残りの変数の値は、第1の実施形態、またはその第1～第13の態様で説明した通りである。

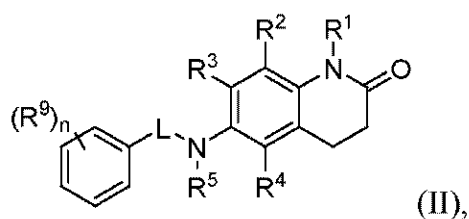
【0056】

構造式Iの化合物には、MBE1、MBE1.2、MBE1.3、MBE1.5、MBE1.6、MBE2、MBE3.1、MBE3.2、MBE3.3、MBE3.4、MBE3.5およびMBE3.6、または前述のもののいずれかの薬学的に許容可能な塩が含まれる。構造式Iの化合物には、MBE1.5A、MBE1.5B、MBE1.5CおよびMBE1.5D、または前述のものの薬学的に許容可能な塩も含まれる。

【0057】

第2の実施形態では、化合物は、構造式IIで表される化合物：

【化4】



またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中：

R^1 および R^5 は、それぞれ独立して水素または(C_1-C_6)アルキルであり；

R^2 および R^4 は、それぞれ独立して水素、ハロ、ハロ(C_1-C_3)アルキル、(C_1-C_3)アルキル、(C_1-C_3)アルコキシ、(C_1-C_3)チオアルコキシ、ハロ(C

$1-C_3$) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_3) アルキルアミノ、(C_1-C_3) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；

R^3 は、ハロ、ハロ (C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルコキシ、(C_1-C_3) チオアルコキシ、ハロ (C_1-C_3) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_3) アルキルアミノ、(C_1-C_3) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；

L は、 $-C(O)-$ 、 $-C(R^6)(R^7)-$ 、 $-C(CH_2CH_2)-$ 、 $-C(OCH_2)-$ または $-C(N(H)CH_2)-$ であり；

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ、スルフヒドリル、ハロ、(C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルコキシ、(C_1-C_3) チオアルコキシまたはハロ (C_1-C_3) アルコキシであり；

各 R^9 は、独立してハロ、ハロ (C_1-C_6) アルキル、(C_1-C_6) アルキル、(C_1-C_6) アルコキシ、(C_1-C_6) チオアルコキシ、ハロ (C_1-C_6) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_6) アルキルアミノ、(C_1-C_6) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；および

n は、0、1、2、3、4、または5である。変数の代替値は、第1の実施形態、またはそのいずれかの態様で説明した通りである。

【0058】

第2の実施形態の第1の態様では、各 R^9 は、独立してハロ、ハロ (C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルキル、(C_1-C_3) アルコキシ、(C_1-C_3) チオアルコキシ、ハロ (C_1-C_3) アルコキシ、アミノ、(C_1-C_3) アルキルアミノ、(C_1-C_3) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである。残りの変数の値は、第1の実施形態、もしくはそのいずれかの態様、または第2の実施形態で説明した通りである。

【0059】

第2の実施形態の第2の態様では、各 R^9 は、独立してハロまたは (C_1-C_6) アルキル（例えば、ハロまたは (C_1-C_3) アルキル）である。残りの変数の値は、第1の実施形態、もしくはそのいずれかの態様、または第2の実施形態、もしくはその第1の態様で説明した通りである。

【0060】

第2の実施形態の第3の態様では、 n は、0、1または2である（例えば、 n は0、 n は1または n は2である）。残りの変数の値は、第1の実施形態、もしくはそのいずれかの態様、または第2の実施形態、もしくはその第1もしくは第2の態様で説明した通りである。

【0061】

第2の実施形態の第4の態様では、各 R^9 は、独立して (C_1-C_6) アルキルである。残りの変数の値は、第1の実施形態、もしくはそのいずれかの態様、または第2の実施形態、もしくはその第1～第3の態様で説明した通りである。

【0062】

第2の実施形態の第5の態様では、 n は、1または2（例えば、1）である。残りの変数の値は、第1の実施形態、もしくはそのいずれかの態様、または第2の実施形態、もしくはその第1～第4の態様で説明した通りである。

【0063】

構造式 I I の化合物には、MBE 1.5、またはその薬学的に許容可能な塩が含まれる。構造式 I I の化合物には、MBE 1.5 A、MBE 1.5 B、MBE 1.5 C および MBE 1.5 D、または前述のものの薬学的に許容可能な塩も含まれる。

【0064】

第3の実施形態は、構造式 I I I で表される化合物：

10

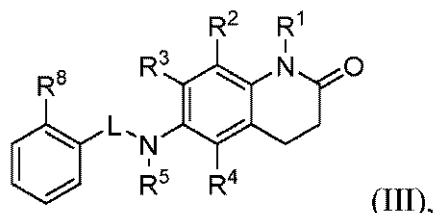
20

30

40

50

【化 5】

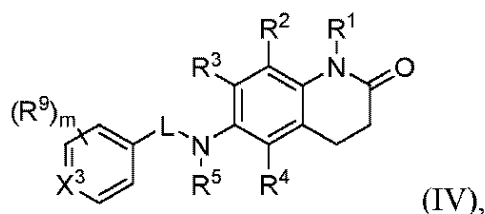


またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、変数の値は、第 1 または第 2 の実施形態、または前述のいずれかの態様で説明した通りである。

【0065】

第 4 の実施形態は、構造式 I V で表される化合物：

【化 6】



またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中：

各 R^9 は、独立してハロ、ハロ ($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルコキシ、($C_1 - C_6$) チオアルコキシ、ハロ ($C_1 - C_6$) アルコキシ、アミノ、($C_1 - C_6$) アルキルアミノ、($C_1 - C_6$) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルであり；および

m は、0、1、2、3 または 4 である。変数 R^9 の代替値および残りの変数の値は、第 1 または第 2 の実施形態、または前述のいずれかの態様で説明した通りである。

【0066】

第 4 の実施形態の第 1 の態様では、 X^3 は、 $-C(R^8)-$ である。残りの変数の値は、第 1 または第 2 の実施形態または前述のいずれかの態様、または第 4 の実施形態で説明した通りである。

【0067】

第 4 の実施形態の第 2 の態様では、 X^3 は、 $-N-$ である。残りの変数の値は、第 1 または第 2 の実施形態または前述のいずれかの態様、または第 4 の実施形態、またはその第 1 の態様で説明した通りである。

【0068】

第 4 の実施形態の第 3 の態様では、 m は、0、1 または 2 である。残りの変数の値は、第 1 または第 2 の実施形態、または前述のいずれかの態様、または第 4 の実施形態、またはその第 1 もしくは第 2 の態様で説明した通りである。

【0069】

第 4 の実施形態の第 4 の態様では、 R^3 は、ハロ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルキル、($C_1 - C_3$) アルコキシ、($C_1 - C_3$) チオアルキルコキシ、ハロ ($C_1 - C_3$) アルコキシ、アミノ、($C_1 - C_3$) アルキルアミノ、($C_1 - C_3$) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリルである。残りの変数の値は、第 1 または第 2 の実施形態、または前述のいずれかの態様、または第 4 の実施形態、またはその第 1 ~ 第 3 の態様で説明した通りである。

【0070】

第 4 の実施形態の第 5 の態様では、化合物は、M B E 1 または M B E 3 . 6、または前述のものの薬学的に許容可能な塩ではない。残りの変数の値は、第 1 または第 2 の実施形態、または前述のいずれかの態様、または第 4 の実施形態、またはその第 1 ~ 第 4 の態様

10

20

30

40

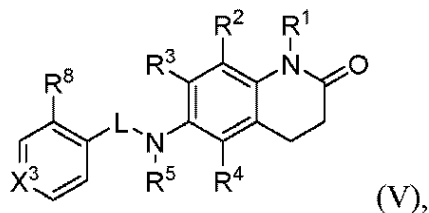
50

で説明した通りである。

【0071】

第5の実施形態は、構造式Vで表される化合物：

【化7】



10

またはその薬学的に許容可能な塩である。変数の値は、第1、第2または第4の実施形態、または前述のいずれかの態様で説明した通りである。

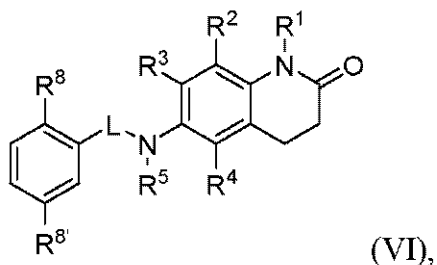
【0072】

構造式Vの化合物には、MBE1.2、MBE1.3およびMBE1.6、または前述のものの薬学的に許容可能な塩が含まれる。

【0073】

第6の実施形態は、構造式VIで表される化合物：

【化8】



20

またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、R⁸は、水素、ハロ、ハロ(C₁ - C₆)アルキル、(C₁ - C₆)アルキル、(C₁ - C₆)アルコキシ、(C₁ - C₆)チオアルコキシ、ハロ(C₁ - C₆)アルコキシ、アミノ、(C₁ - C₆)アルキルアミノ、(C₁ - C₆)ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ又はスルフヒドリル（例えば、水素又は(C₁ - C₆)アルキル)である。残りの変数の値は、第1、第2または第4の実施形態、または前述のいずれかの態様で説明した通りである。

30

【0074】

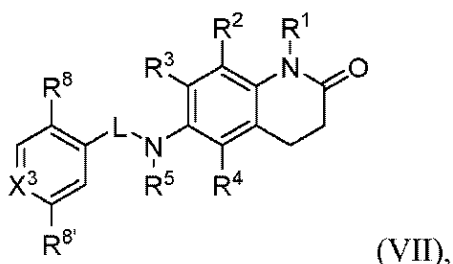
第6の実施形態の第1の態様では、R⁸は、(C₁ - C₆)アルキルである。残りの変数の値は、第1、第2または第4の実施形態、または前述のいずれかの態様、または第6の実施形態で説明した通りである。

【0075】

第7の実施形態は、構造式VIIで表される化合物：

40

【化9】



またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、R⁸は、水素、ハロ、ハロ(C₁ -

50

C₆) アルキル、(C₁–C₆) アルキル、(C₁–C₆) アルコキシ、(C₁–C₆) チオアルコキシ、ハロ(C₁–C₆) アルコキシ、アミノ、(C₁–C₆) アルキルアミノ、(C₁–C₆) ジアルキルアミノ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシまたはスルフヒドリル(例えば、水素または(C₁–C₆) アルキル)である。残りの変数の値は、第1、第2、第4または第6の実施形態、または前述のいずれかの態様で説明した通りである。

【0076】

組成物およびキット

ALDH1a3を阻害する薬剤(例えば、構造式I~Vのいずれかの化合物、または前述のものの薬学的に許容可能な塩)、および薬学的に許容可能な担体もしくは賦形剤を含む組成物(例えば、薬学的に許容可能な組成物)が、本明細書中で提供される。特定の
10
実施形態では、本発明の組成物は、該組成物を必要とする対象(例えば、患者)に投与するために配合される。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、それを必要とする対象への経口投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与または皮膚科学的投与のために配合される。

【0077】

「薬学的に許容可能な担体または賦形剤」という語句は、ともに処方される薬剤の薬理学的活性を破壊せず、かつ治療量の薬剤を送達するのに十分な用量で投与された場合に非毒性である、非毒性の担体または非毒性の賦形剤をいう。本明細書中に記載される組成物において使用されてもよい薬学的に許容可能な担体または賦形剤には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブ
20
ミン、緩衝物質、例えばリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩類、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が含まれるが、これらに限定されない。

【0078】

本明細書に記載の組成物は、経口的、非経口的(皮下、筋肉内、静脈内および皮内を含む)、吸入スプレーにより、局所的、直腸的、経鼻的、口腔的、経膈的にまたは埋め込まれたリザーバを介して、投与されてもよい。いくつかの実施形態では、提供される化合物
30
または組成物は、静脈内および／または腹腔内に投与可能である。

【0079】

本明細書中で使用される用語「非経口」には、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、眼内、硝子体内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、病変内(intralesional)、肝臓内、腹腔内、病変内および頭蓋内注射もしくは注入技術が含まれる。好ましくは、組成物は、経口、皮下、腹腔内または静脈内に投与される。

【0080】

本明細書中で提供される組成物は、カプセル、錠剤、水性懸濁液、分散液および溶液を含むがこれらに限定されない、任意の経口的に許容可能な剤形で経口投与され得る。経口
40
使用のための錠剤の場合、一般に使用される担体には、ラクトースおよびコーンスターチが含まれる。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤も典型的に添加される。カプセル形態での経口投与のために、有用な希釈剤には、ラクトースおよび乾燥コーンスターチが含まれる。水性懸濁液および／または乳剤が経口使用のために必要とされる場合、活性成分は、油相中に懸濁または溶解され得、そして乳化剤および／または懸濁剤と組み合わせられ得る。所望であれば、ある種の甘味料、香味料または着色剤が添加されてもよい。

【0081】

いくつかの実施形態では、経口製剤は、即放性または徐放性／遅延放出のために配合される。

【0082】

10

20

30

40

50

経口投与のための固体剤形には、カプセル剤、錠剤、丸剤、粉剤および顆粒剤が含まれる。このような固体剤形において、活性化合物は、少なくとも1つの不活性な、薬学的に許容可能な賦形剤または担体（例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸ニカルシウム）および／または（a）充填剤または増量剤（例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸）、（b）結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、およびアカシア）、（c）保湿剤（例えば、グリセロール）、（d）崩壊剤（例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム）、（e）溶解抑制剤（*solution retarding agents*）（例えば、パラフィン）、（f）吸収促進剤（例えば、第4級アンモニウム塩）、（g）湿潤剤（例えば、アセチルアルコールおよびグリセロールモノステアレート）、（h）吸収剤（例えば、カオリンおよびベントナイト粘土）、ならびに（i）潤滑剤（例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム及びそれらの混合物）と混合される。カプセル、錠剤および丸剤の場合、剤形は、緩衝剤も含んでもよい。

【0083】

口腔または舌下投与に適した組成物には、錠剤、トローチ（*lozenges*）およびトローチ（*pastilles*）が含まれ、ここで活性成分は、糖およびアカシア、トラガント、またはゼラチンおよびグリセリンなどの担体と共に配合される。

【0084】

同様のタイプの固体組成物は、ラクトースまたは乳糖などの賦形剤、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどを使用した軟質および硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤としても使用されてもよい。錠剤、糖衣錠、カプセル、丸剤および顆粒剤の固体剤型は、腸溶性コーティングおよび医薬処方分野において周知の他のコーティングなどのコーティングおよびシェルと共に調製され得る。それらは、任意選択的に不透明化剤を含有してもよく、そして任意選択的に、遅延される様式で、腸管の特定の部分においてのみ、または優先的に、活性成分（複数の場合もある）を放出する組成物でもあり得る。使用され得る包埋組成物の例には、高分子物質およびワックスが含まれる。

【0085】

薬剤は、上記のように、1つ以上の賦形剤と共にマイクロカプセル化された形態でもあり得る。このような固体剤形では、薬剤は、スクロース、ラクトースまたはデンプンなどの少なくとも1つの不活性希釈剤と混合され得る。このような剤形は、通常の実施のように、不活性希釈剤以外の追加の物質（例えば、ステアリン酸マグネシウムおよび微結晶性セルロースなどの錠剤化滑沢剤（*tableting lubricants*）および他の錠剤化助剤（*tableting aids*））も含み得る。

【0086】

経口投与のための組成物は、例えば、錠剤またはカプセル上の製剤の外側のコーティングにより、消化管を通過する際の分解に対して活性成分を保護するように設計されてもよい。

【0087】

別の実施形態では、薬剤は、長期（*extended*）（または「遅延」または「持続」）放出組成物で提供され得る。この遅延放出組成物は、遅延放出成分と組み合わせた薬剤を含む。このような組成物は、下部胃腸管、例えば、小腸、大腸、結腸および／または直腸への提供される薬剤の標的化された放出を可能にする。特定の実施形態では、遅延放出組成物は、酢酸フタル酸セルロースおよび他のフタル酸（例えば、ポリ酢酸ビニルフタレート、メタクリレート（*Eudragits*））などの腸溶性またはpH依存性コーティングをさらに含む。代替的に、遅延放出組成物は、pH感受性メタクリレートコーティング、pH感受性ポリマー微小球、または加水分解による分解を受けるポリマーの提供により小腸および／または結腸への徐放性を提供する。遅延放出組成物は、疎水性賦形剤もしくは疎水性コーティングまたはゲル化賦形剤もしくはゲル化コーティングで配合され得

10

20

30

40

50

る。結腸送達は、アミロースまたはペクチンなどの細菌酵素により消化されるコーティングによって、pH依存性ポリマーによって、時間とともに膨潤するヒドロゲルプラグ（Pulsincap）によって、時間依存性ヒドロゲルコーティングによって、および／またはアゾ芳香族結合コーティングに結合されたアクリル酸によってさらに提供され得る。

【0088】

本明細書中に記載される組成物は、直腸投与のための坐剤の形態でも投与され得る。これらは、薬剤を、室温では固体であるが直腸温度では液体であるため、直腸内で溶解して薬剤を放出する、適切な非刺激性賦形剤と混合することによって調製され得る。このような物質には、カカオ脂、密蝟およびポリエチレングリコールが含まれる。

【0089】

本明細書中に記載される組成物は、特に治療の標的が、眼、皮膚、または下部腸管の疾患を含む、局所適用により容易に到達可能な領域または器官を含む場合、局所的にも投与され得る。適切な局所製剤は、これらの領域または器官の各々について容易に調製される。

【0090】

下部腸管の局所適用は、直腸坐薬製剤（上記を参照されたい）または適切な注腸製剤において行われ得る。局所経皮パッチも使用され得る。

【0091】

他の局所適用のために、組成物は、1つ以上の担体に懸濁または溶解された活性成分を含む適切な軟膏中に配合され得る。薬剤の局所投与のための担体には、鉱油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化蝟および水および浸透促進剤が含まれるが、これらに限定されない。代替的に、組成物は、1つ以上の薬学的に許容可能な担体に懸濁または溶解された活性成分を含む適切なローションまたはクリーム中に配合され得る。代替的に、組成物は、適切な乳化剤で担体中に懸濁または溶解された活性化合物を含む適切なローションまたはクリームを配合され得る。いくつかの実施形態では、適切な担体には、鉱油、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水が含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態では、適切な担体には、鉱油、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水ならびに浸透促進剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0092】

眼科用途のために、組成物は、塩化ベンジルアルコニウムなどの防腐剤の有無にかかわらず、等張性の、pH調整された滅菌生理食塩水中の微粉化懸濁液として、または、好ましくは、等張性の、pH調整された滅菌生理食塩水中の溶液として配合され得る。代替的に、眼科用途のために、組成物は、ワセリンなどの軟膏中に配合され得る。

【0093】

組成物は、経鼻エアロゾルまたは吸入によっても投与され得る。このような組成物は、医薬製剤の技術分野で周知の技術に従って調製され、そしてベンジルアルコールまたは他の適切な防腐剤、生物学的利用能を増強するための吸収促進剤、フルオロカーボン、および／または他の従来の可溶化剤または分散剤を使用して、生理食塩水中の溶液として調製され得る。

【0094】

単一投与形態の組成物を製造するために担体材料と組み合わせ得る薬剤の量は、治療されるホスト、特定の投与様式および使用される薬剤の活性に依存して変化するであろう。好ましくは、組成物は、約0.01 mg/kg～約100 mg/kg体重/日の用量の薬剤が組成物を受ける対象に投与され得るように配合されるべきである。

【0095】

任意の特定の患者に対する特定の投与レジメンおよび治療レジメンは、使用される特定の薬剤の活性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組合せ、治療する医師の判断および治療される特定の疾患の重症度を含む、様々な因子

10

20

30

40

50

に依存するであろうことも理解されるべきである。組成物中の薬剤の量は、組成物中の特定の薬剤にも依存するであろう。

【0096】

本発明の組成物において使用され得る他の薬学的に許容可能な担体、アジュバントおよび溶媒には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、自己乳化薬物送達システム（SEDDS）、例えばd-α-トコフェロールポリエチレングリコール1000コハク酸塩、医薬剤形において使用される界面活性剤、例えばTweenまたは他の類似のポリマー送達マトリックス、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が含まれるが、これらに限定されない。α-、β-、およびγ-シクロデキストリンなどのシクロデキストリン、または2-および3-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを含むヒドロキシアシルシクロデキストリンなどの化学修飾誘導体、または他の可溶化誘導体も、本明細書中に記載される薬剤の送達を増強するために有利に使用され得る。

10

【0097】

組成物は、例えば、無菌で注射可能な水性または油性懸濁液として、無菌で注射可能な調製物の形態であり得る。この懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤（例えば、Tween 80など）および懸濁剤を使用して、当該技術分野で公知の技術に従って配合され得る。無菌で注射可能な調製物は、例えば1, 3-ブタンジオール中の溶液として、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の無菌で注射可能な溶液または懸濁液であり得る。使用され得る許容可能な溶媒および溶剤の中には、マンニトール、水、リンゲル溶液および等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の、不揮発性油は、溶剤または懸濁媒体として常用される。この目的のために、合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドを含む任意の無菌の（bland）不揮発性油が使用され得る。オレイン酸などの脂肪酸およびそのグリセリド誘導体は、オリーブ油またはひまし油などの天然の薬学的に許容可能な油、特にそれらのポリオキシエチル化型と同様に、注射剤の調製に有用である。これらの油溶液または懸濁液は、長鎖アルコール希釈剤もしくは長鎖アルコール分散剤、またはカルボキシメチルセルロースもしくは類似の分散剤も含むことができ、これらは乳剤および／または懸濁液などの薬学的に許容可能な剤形の配合において一般的に使用されるものである。他の一般に使用される界面活性剤、例えばTweenまたはSpanおよび／または他の類似の乳化剤または生物学的利用能増強剤（これらは、薬学的に許容可能な固体、液体、または他の剤形の製造において一般に使用される）なども配合の目的のために使用され得る。

20

30

【0098】

いくつかの実施形態では、ALDH1a3を阻害する薬剤（例えば構造式I~VIIのいずれかの化合物、または前述のものの薬学的に許容可能な塩）を含む組成物は、1つ以上の他の治療剤（例えば、化学療法剤、例えば、パクリタキセル、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、タモキシフェン、オクトレオチド）を含むこともできる。本発明の組成物がALDH1a3を阻害する薬剤と1つ以上の他の治療剤との組み合わせを含む場合、該薬剤は、単独療法レジメンにおいて通常投与される用量の約1~100%、そしてより好ましくは約5%~約95%の用量レベルで存在すべきである。追加の薬剤（複数の場合もある）は、複数回投与レジメンの一部として、ALDH1a3を阻害する薬剤とは別々に投与され得る。代替的に、追加の薬剤（複数の場合もある）は、単一の組成物中のALDH1a3を阻害する薬剤と一緒に混合される、単一の剤形の一部であり得る。

40

【0099】

本明細書中に記載の組成物は、例えば、注射により、静脈内、動脈内、眼内、硝子体内

50

、皮下、経口的、口腔、経鼻的、経粘膜的、局所的に、眼科用剤中に、または吸入によって、約 0.5 mg/kg ～ 約 100 mg/kg 体重の範囲の用量で、または、代替的に、約 1 mg/用量 ～ 約 1000 mg/用量の範囲の用量で、4 ～ 120 時間ごとに、または特定の薬物の要件に従って、投与され得る。典型的には、組成物は、1 日当たり約 1 ～ 約 6 回、または、代替的に、連続注入として投与されるであろう。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、治療されるホストおよび特定の投与様式に応じて変化するであろう。典型的な調製物は、約 5 % ～ 約 95 % の活性化合物 (w/w) を含有するであろう。代替的に、調製物は、約 20 % ～ 約 80 % の活性化合物 (w/w) を含有することができる。

【0100】

上記の用量よりも低いまたは高い用量が必要とされてもよい。任意の特定の患者に対する特定の投与レジメンおよび治療レジメンは、使用される特定の薬剤の活性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組合せ、疾患の重症度および経過、病状もしくは症状、疾患、病状もしくは症状に対する患者の素因、ならびに治療する医師の判断を含む、様々な要因に依存するであろう。

【0101】

対象の病状が改善されると、本発明の薬剤（例えば、構造式 I ～ V のいずれかの化合物、または前述のものの薬学的に許容可能な塩）、組成物または組み合わせの維持用量が、必要に応じて投与され得る。その後、投与の用量もしくは頻度、またはその両方は、症状が所望のレベルに緩和された場合に改善された状態が保持されるレベルまで、症状の関数として、低減され得る。しかしながら、対象は、疾患症状の再発に際し、長期間にわたる間欠的な治療を必要とし得る。

【0102】

本明細書中に記載の薬剤（例えば、構造式 I ～ V のいずれかの化合物、または前述のものの薬学的に許容可能な塩）および追加の薬剤（複数の場合もある）を含むキットも本明細書中で提供される。一実施形態では、キットは、本明細書中に記載の疾患、障害もしくは病状（例えば、癌、2 型糖尿病）を治療するための有効量の本明細書中に記載の薬剤、および該疾患、障害もしくは病状を治療するための有効量の追加の薬剤（複数の場合もある）を含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書中に記載の疾患、障害もしくは病状（例えば、癌、2 型糖尿病）を治療するために、薬剤および追加の薬剤（複数の場合もある）を対象に投与するための説明書をさらに含む。

【0103】

方法

アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDHs) は、内因性および外因性の両方で生成されたアルデヒドのそれぞれのカルボン酸への酸化を不可逆的に触媒することによりアルデヒドの代謝において役割を果たす、NAD(P)⁺ 依存性酵素のスーパーファミリーに属する。ALDH は、レチノイン酸 (RA) の生合成およびアルコール代謝などを含む広範囲の生物学的活性を有する。

【0104】

酵素の ALDH ファミリーは、多様な機能を有する 19 のメンバーを含む。このファミリー内の酵素は、NAD⁺/NADP⁺ を NADH/NADPH に還元しながら、対応するカルボン酸へのアルデヒドの酸化を不可逆的に触媒する。これらの酵素は、いくつかの細胞区画にみられるが、ほとんどは細胞質ゾルまたはミトコンドリアに局在している。いくつかの ALDH 酵素は、肝臓における発現を介して全体的な代謝に関与し、そこでそれらは、アルコールデヒドロゲナーゼから形成されるアセチルアルデヒドを解毒し、レチナール立体異性体からビタミン A を生合成し、または他の反応性アルデヒドを解毒するように機能する。対照的に、ほとんどの ALDH 酵素は、細胞特異的または疾患特異的に発現し、そして細胞生化学を調節するが、作用メカニズムは不明であることが多い。

【0105】

アルデヒドデヒドロゲナーゼアイソフォーム 1a3 (ALDH1a3) は、RA の生合

10

20

30

40

50

成および R A シグナル伝達の制御において極めて重要であり、そして細胞特異的かつ疾患特異的である、A L D H 1 a サブファミリーのアイソフォーム／アイソザイムである。A L D H 1 a 3 は、2 0 0 0 年以前は A L D H 6 として、そして 2 0 0 0 年～2 0 0 7 年は R a l d h 3 として知られていた。正常な状態では、A L D H 1 a 3 は、胚発生の間にのみ必要であり、そして健康な成体マウスには不要である。通常の生理学におけるその小さな役割とは対照的に、A L D H 1 a 3 は、最近、ほとんどの癌型にわたる A L D E F L U O R (商標) 反応性の主要な決定因子であることが示されている。A L D E F L U O R (商標) 活性が腫瘍の進行に影響するかどうか／どのように影響するかについては過度に無知であるにもかかわらず、A L D E F L U O R (商標) 活性は、長い間、侵襲性 (a g g r e s s i v e) 癌細胞をバルク腫瘍と区別するマーカーとして使用されてきた。

10

【0106】

A L D H 1 a 3 によってドライブされる A L D E F L U O R (商標) 活性は、癌侵襲性の機能的ドライバーであり、そして腫瘍進行、転移、および化学療法に対する抵抗性に極めて重要であることが発見されている。したがって、ヒト A L D H 1 a 3 (U n i P r o t K B アクセション番号: P 4 7 8 9 5) は、乳癌を含む、癌における化学療法抵抗性および転移性表現型の機能的ドライバーである。したがって、A L D H 1 a 3 は、複数の病態における治療標的となる可能性を示し、そして A L D H 1 a 3 を標的とすることで、腫瘍が従来の治療法に抵抗性を示すステージ 3 / 4 の患者の治療における現在の障壁を克服し得る。

【0107】

20

したがって、有効量の A L D H 1 a 3 を阻害する薬剤 (例えば、構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物、もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩、または構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩を含む組成物) を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における癌 (例えば、転移性癌、化学療法抵抗性癌) の治療方法が本明細書中で提供される。したがって、いくつかの実施形態では、それを必要とする対象における癌 (例えば、転移性癌、化学療法抵抗性癌) の治療方法であって、有効量の構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物、もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩、または構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩を含む組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。さらなる実施形態では、有効量の表 1 の化合物 (例えば、M B E 1、M B E 1 . 5、M B E 1 . 5 A、M B E 1 . 5 B、M B E 1 . 5 C、M B E 1 . 5 D)、もしくはその薬学的に許容可能な塩、または表 1 の化合物 (例えば、M B E 1、M B E 1 . 5、M B E 1 . 5 A、M B E 1 . 5 B、M B E 1 . 5 C、M B E 1 . 5 D) もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における癌 (例えば、転移性癌、化学療法抵抗性癌) の治療方法が提供される。

30

【0108】

有効量の A L D H 1 a 3 を阻害する薬剤 (例えば、構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物、もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩、または構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩を含む組成物) を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における 2 型糖尿病の治療方法も本明細書中で提供される。したがって、いくつかの実施形態では、有効量の構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物、もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩、または構造式 I ~ V I I のいずれかの化合物もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩を含む組成物を、対象に投与することを含む、それを必要とする対象における 2 型糖尿病の治療方法が提供される。さらなる実施形態では、有効量の表 1 の化合物 (例えば、M B E 1、M B E 1 . 5、M B E 1 . 5 A、M B E 1 . 5 B、M B E 1 . 5 C、M B E 1 . 5 D)、もしくはその薬学的に許容可能な塩、または表 1 の化合物 (例えば、M B E 1、M B E 1 . 5、M B E 1 . 5 A、M B E 1 . 5 B、M B E 1 . 5 C、M B E 1 . 5 D) もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における 2 型糖尿病の治療方法が提供される。

40

50

【0109】

本明細書中で使用される場合、用語「治療（処理）する（*treat*）」、「治療（処理）すること（*treating*）」又は「治療（処理）（*treatment*）」は、医学的状態（例えば、癌に関連する病状）が臨床的に許容される基準（例えば、対象における癌転移数の減少）に従って改善される程度まで医学的状態を軽減することを意味する。

【0110】

一実施形態では、対象（例えば、患者）は、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウスまたは他のウシ属、ヒツジ属（*ovine*）、ウマ科、イヌ科、ネコ科、またはげっ歯類の生物）である。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。「それを必要とする対象」とは、本明細書中に記載される疾患もしくは病状（例えば、癌、転移性癌）を有するか、または発症するリスクがある対象をいう。熟練した医療専門家（例えば、医師）は、対象が本明細書中に記載される疾患もしくは病状（例えば、癌）を有するか、または発症するリスクがあるかを容易に決定することができる。

【0111】

一実施形態では、それを必要とする対象は、癌（例えば、転移性癌、化学療法抵抗性癌）を有する。癌は、固形腫瘍、白血病、リンパ腫または骨髄腫であり得る。特定の実施形態では、それを必要とする対象は、乳癌、結腸癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、骨癌、血液癌、脳癌、または肝臓癌を有する。いくつかの実施形態では、癌は、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）、腎明細胞癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、扁平上皮肺癌、結腸直腸癌または神経膠腫（例えば、低悪性度神経膠腫）である。

【0112】

癌には以下のものが含まれる：急性リンパ芽球性白血病、成人期；急性リンパ芽球性白血病、小児期；急性骨髄性白血病、成人期；副腎皮質癌；副腎皮質癌、小児期；AIDS関連リンパ腫；AIDS関連悪性腫瘍；肛門癌；星状細胞腫、小児期小脳（*Childhood Cerebellar*）；星状細胞腫、小児期大脳（*Childhood Cerebral*）；胆管癌、肝外；膀胱癌；膀胱癌、小児期；骨癌、骨肉腫／悪性線維性組織球腫；脳幹神経膠腫、小児期；脳腫瘍、成人期；脳腫瘍、脳幹神経膠腫、小児期；脳腫瘍、小脳星状細胞腫、小児期；脳腫瘍、大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、小児期；脳腫瘍、上衣腫、小児期；脳腫瘍、髄芽腫、小児期；脳腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍（*Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumors*）、小児期；脳腫瘍、視覚路グリオーマおよび視床下部神経膠腫、小児期；脳腫瘍、小児期（その他）；乳癌；乳癌および妊娠；乳癌、小児期；乳癌、男性；気管支腺腫／カルチノイド、小児期；カルチノイド腫瘍、小児期；カルチノイド腫瘍、胃腸部；癌腫、副腎皮質；癌腫、膵島細胞；原発不明癌、中枢神経系リンパ腫、原発性；小脳星状細胞腫、小児期；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、小児期；子宮頸癌；小児癌；慢性リンパ性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性疾患；腱鞘の明細胞肉腫；結腸癌；結腸直腸癌、小児期；皮膚T細胞リンパ腫；子宮内膜癌；上衣腫、小児期；上皮癌、卵巣；食道癌；食道癌、小児期；ユーイング腫瘍；頭蓋外胚細胞腫瘍、小児期；性腺外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；眼癌、眼球内黒色腫；眼癌、網膜芽細胞腫；胆のう癌；胃（胃）癌（*Gastric (Stomach) Cancer*）；胃（胃）癌、小児期；消化管カルチノイド；胚細胞腫瘍、頭蓋外、小児期；胚細胞腫瘍、性腺外；胚細胞腫瘍、卵巣；妊娠性絨毛腫瘍；神経膠腫、小児期脳幹；神経膠腫、小児期視覚路および視床下部性；有毛細胞白血病；頭頸部癌；肝細胞（肝）癌、成人期（原発性）；肝細胞（肝）癌、小児期（原発性）；ホジキンリンパ腫、成人期；ホジキンリンパ腫、小児期；妊娠中のホジキンリンパ腫；下咽頭癌；視床下部神経膠腫および視覚路グリオーマ、小児期；眼球内黒色腫；膵島細胞癌（膵臓内分泌部）；カポジ肉腫；腎癌；喉頭癌；喉頭癌、小児期；白血病、急性リンパ芽球性、成人期；白血病、急性リンパ芽球性、小児期；白血病、急性骨髄性、成人期；白血病、急性骨髄性、小児期；白血病、慢性リンパ性；白血病、慢性骨髄性；白血病、有毛細胞；口唇および口腔癌；肝癌、成人期（原発性）；肝癌、小児期（原発性）；肺癌、非

小細胞；肺癌、小細胞；リンパ芽球性白血病、成人期急性；リンパ芽球性白血病、小児期急性；リンパ芽球性白血病、慢性；リンパ腫、AIDS関連；リンパ腫、中枢神経系（原発性）；リンパ腫、皮膚T細胞；リンパ腫、ホジキン、成人期；リンパ腫、ホジキン、小児期；リンパ腫、妊娠中のホジキン；リンパ腫、非ホジキン、成人期；リンパ腫、非ホジキン、小児期；リンパ腫、妊娠中の非ホジキン；リンパ腫、原発性中枢神経系；マクログロブリン血症、ワルデンシュトレーム型；男性乳癌；悪性中皮腫、成人期；悪性中皮腫、小児期；悪性胸腺腫；マントル細胞リンパ腫；髄芽腫、小児期；黒色腫；黒色腫、眼球内；メルケル細胞癌；中皮腫、悪性；潜在性原発転移性扁平上皮頸部癌；多発性内分泌腫瘍症候群、小児期；多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍；菌状息肉症；骨髄異形成症候群；骨髄性白血病、慢性；骨髄性白血病、小児期急性；骨髄腫、多発性；骨髄増殖性疾患、慢性；鼻腔癌および副鼻腔癌；上咽頭癌；上咽頭癌、小児期；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫、成人期；非ホジキンリンパ腫、小児期；妊娠中の非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔癌、小児期；口腔および口唇癌；中咽頭癌；骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫；卵巣癌、小児期；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；腭癌；腭癌、小児期；腭癌、腭島細胞；副鼻腔癌および鼻腔癌；副甲状腺癌；陰茎癌；褐色細胞腫；松果体腫瘍およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児期；下垂体腫瘍；形質細胞腫瘍／多発性骨髄腫；胸膜肺芽腫；妊娠および乳癌；妊娠およびホジキンリンパ腫；妊娠および非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；原発性肝癌、成人期；原発性肝癌、小児期；前立腺癌；直腸癌；腎細胞（腎臓）癌；腎細胞癌、小児期；腎盂および尿管、移行上皮癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫、小児期；唾液腺癌；唾液腺癌、小児期；肉腫、ユーイング腫瘍；肉腫、カポジ；肉腫（骨肉腫）／骨の悪性線維性組織球腫；肉腫、横紋筋肉腫、小児期；肉腫、軟部組織、成人期；肉腫、軟部組織、小児期；セザリー症候群；皮膚癌；皮膚癌、小児期；皮膚癌（黒色腫）；皮膚癌、メルケル細胞；小細胞肺癌；小腸癌；軟部肉腫、成人期；軟部肉腫、小児期；潜在性原発扁平上皮頸部癌、転移性；胃（胃）癌；胃（胃）癌、小児期；テント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児期；T細胞リンパ腫、皮膚性；精巣癌；胸腺腫、小児期；胸腺腫、悪性；甲状腺癌；甲状腺癌、小児期；腎盂および尿管の移行上皮癌；トロホブラスト腫瘍、妊娠性；原発不明部位、癌の、小児期；小児期の稀な癌；尿管および腎盂、移行上皮癌；尿道癌；子宮肉腫；陰癌；視覚路グリオーマおよび視床下部神経膠腫、小児期；外陰癌；ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；およびウィルムス腫瘍。

【0113】

上記の癌の転移はまた、本明細書中に記載される方法に従って治療され得る。したがって、いくつかの実施形態では、癌は転移性癌である。

【0114】

「転移性癌」とは、本明細書で使用される場合、その起源の原発部位または最初に形成された箇所から対象の身体の他の領域に広がった癌をいう。転移性癌の例には、転移性乳癌、転移性結腸癌、転移性肺癌、転移性膵臓癌、転移性前立腺癌、転移性骨癌、転移性血液癌、転移性脳癌、および転移性肝臓癌が含まれる。一実施形態では、対象は、乳癌の骨転移（例えば、自然骨転移）を有する。別の実施形態では、対象は、乳癌の肺転移を有する。さらに別の実施形態では、対象は、骨転移を有する。

【0115】

特定の実施形態では、それを必要とする対象は、乳癌（例えば、転移性乳癌）を有する。本明細書中に記載される方法を使用する治療に特に適切である乳癌サブタイプには、基底様乳癌およびHER2陽性乳癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0116】

「抵抗性癌」とは、本明細書で使用される場合、治療に反応しない癌である。「抵抗性癌」には、治療開始時に治療に反応しない癌、および治療中に治療に反応しなくなる癌が含まれる。一実施形態では、癌は抵抗性癌である。

【0117】

一実施形態では、それを必要とする対象は、1つ以上の化学療法剤による治療に抵抗性

10

20

30

40

50

ALDH1a3を阻害する薬剤は、例えば、所望の治療効果（例えば、癌転移の阻害）を達成するのに適した順序およびスケジュールで、単回用量または複数回用量で投与され得る。投与の適切な用量およびレジメンは、通常の技術を有する臨床医により決定され得る。

【0124】

ALDH1a3を阻害する薬剤は、1つ以上の他の治療法または治療と組み合わせても投与され得る。1つ以上の他の治療法または治療（アジュバント、標的化、癌治療関連など）と組み合わせた薬剤の投与に関して、薬剤は、典型的には単回用量（例えば、注射、点滴、経口）として投与され、その後、所望または指示される場合、特定の間隔（例えば、1時間以上）で反復投与される。

10

【0125】

一実施形態では、薬剤は、メトロノミック投与レジメンで投与され得、それにより最大耐量と比較して、より低用量がより頻繁に投与される。多くの前臨床研究は、最大耐量（MTD）カウンターパートと比較して、メトロノミックレジメンの優れた抗腫瘍活性、強力な抗血管新生作用、ならびに毒性および副作用（例えば、骨髄抑制）の減少を示している（Bocci, et al., Cancer Res, 62:6938-6943, (2002); Bocci, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 100(22):12917-12922, (2003); and Bertolini, et al., Cancer Res, 63(15):4342-4346, (2003)）。メトロノミック化学療法は、化学療法に伴ういくつかの欠点を克服するのに有効であると思われる。

20

【0126】

ALDH1a3を阻害する薬剤は、一次治療として（例えば、治療法または治療レジメンにおける主要な治療剤として）；補助療法として（例えば、治療法または治療レジメンにおいて別の治療剤と一緒に使用される治療剤として、ここで治療剤の組合せが所望の治療を提供し；「adjunct therapy」（補助療法）は「adjunctive therapy」（補助療法）とも呼ばれる）；補助療法との組合せで；アジュバント療法として（例えば、治療法または治療レジメンにおいて主要な治療剤が与えられた後に、それを必要とする対象に与えられる治療剤として）；またはアジュバント療法との組合せで、それを必要とする対象に投与され得る。アジュバント療法には、例えば、化学療法（例えば、パクリタキセル、ドキソルビシン、タモキシフェン、シスプラチン、マイトマイシン、5-フルオロウラシル、ソラフェニブ、オクトレオチド、ダカルバジン（DTIC）、シスプラチン、シメチジン、シクロホスファミド）、放射線療法（例えば、陽子線治療）、ホルモン療法（例えば、抗エストロゲン療法、アンドロゲン除去療法（ADT）、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LH-RH）アゴニスト、アロマターゼ阻害剤（AIs、例えばアナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール）、エストロゲン受容体モジュレーター（例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、トレミフェン）、または生物学的療法が含まれる。疼痛（麻薬、鍼）、胃部不快感（制酸剤）、めまい（抗めまい薬療法（anti-vertigo medications））、悪心（制吐薬療法）、感染（例えば、赤血球／白血球数を増加させるための薬物療法）などを管理する治療法を含む、疾患の影響および／または癌治療の副作用を軽減するために、多くの他の治療法は、癌治療レジーム中にも投与され得、これらの全ては当業者により容易に認識される。

30

40

【0127】

いくつかの実施形態では、当該方法は、1つ以上の追加の治療法（例えば、化学療法、放射線および／または腫瘍（複数の場合もある）の外科的除去）と組み合わせて、有効量のALDH1a3を阻害する薬剤を投与することを含む。併用療法で投与される場合、薬剤は、他の治療法（例えば、パクリタキセルまたはドキソルビシンなどの化学療法剤の投与）の前、後、または同時に投与され得る。同時に（simultaneously）（例えば、同時に（concurrently））同時投与される場合、薬剤および他の治療法は、別々の配合または同じ配合であり得る。代替的に、薬剤および他の治療法は、熟

50

練した臨床医によって決定される（例えば、治療の薬学的効果の重複を可能にするのに十分な時間）適切な時間枠（例えば、約1.5～約5時間などの癌治療セッション／間隔）内に、別々の組成物として、連続的に投与され得る。

【0128】

ALDH1a3を阻害する薬剤は、薬剤および治療される特定の癌に応じて、例えば、経口、食事、局所、経皮、直腸、非経口（例えば、動脈内、静脈内、筋肉内、皮下注射、皮内注射）、静脈内点滴および吸入（例えば、気管支内、鼻腔内または経口吸入、鼻腔内点滴）投与経路を含む、様々な投与経路を介して投与され得る。投与は、示されるように、局所的または全身的であり得る。好ましい投与様式は、選択される特定の薬剤に依存して変化し得る。

10

【0129】

治療剤および治療レジメンの実際の用量は、例えば、癌の性質（原発性または転移性）、腫瘍の数およびサイズ、与えられている他の治療法、および対象の特徴を考慮して、医師によって決定され得る。

【0130】

癌細胞（例えば、転移性癌細胞、化学療法抵抗性癌細胞）の増殖の阻害方法も本明細書中で提供される。当該方法は、（例えば、有効量の）ALDH1a3を阻害する薬剤（例えば、構造式I～VIIのいずれかの化合物、もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩、または構造式I～VIIのいずれかの化合物もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩を含む組成物）を細胞に投与することを含む。特定の実施形態において、癌細胞は、乳癌細胞（例えば、基底細胞様（basal-like）乳癌細胞またはHER-2陽性乳癌細胞）である。細胞は、培養細胞（例えば、株化細胞）または対象中の細胞であり得る。特定の実施形態では、細胞は、ヒト対象（例えば、癌を有するヒト対象）中に存在する。

20

【0131】

それを必要とする対象においてALDH1a3を阻害する方法も本明細書中で提供される。当該方法は、（例えば、有効量の）ALDH1a3を阻害する薬剤（例えば、構造式I～VIIのいずれかの化合物、もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩、または構造式I～VIIのいずれかの化合物もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩を含む組成物）を対象に投与することを含む。

30

【0132】

それを必要とする対象における、ALDH1a3により介在される疾患または障害（例えば、本明細書中に記載される癌型など）の治療方法も本明細書中で提供される。当該方法は、有効量のALDH1a3を阻害する薬剤（例えば、構造式I～VIIのいずれかの化合物、もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩、または構造式I～VIIのいずれかの化合物もしくは前述のものの薬学的に許容可能な塩を含む組成物）を対象に投与することを含む。ALDH1a3は、2型糖尿病にも関与している。したがって、2型糖尿病は、ALDH1a3を介在した疾患または障害の別の例である。

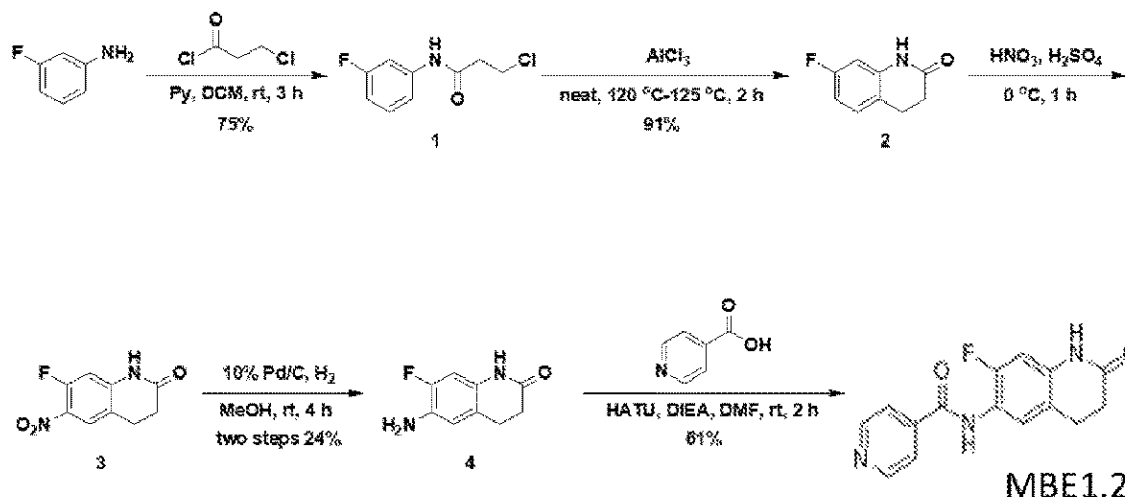
【実施例】

【0133】

N-（7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル）イソニコチンアミドの合成

40

【化10】



【0134】

3-クロロ-N-(3-フルオロフェニル)プロペンアミド：2-L丸底フラスコに、3-フルオロアニリン（48.0 g、0.432モル、1.00当量）およびジクロロメタン（440 mL）の混合物が入れた。ピリジン（85.8 mL、1.08モル、2.50当量）および3-クロロプロピオニルクロリド（49.5 mL、0.518モル、1.20当量）が順に滴下された。反応混合物は、TLC分析によって示されるように、出発物質が消失するまで室温で3時間攪拌された。次に、反応混合物は、水（440 mL）で希釈され、そして酢酸エチル（2.2 L × 3）で抽出された。合わせた有機層は、ブライン（1.0 L × 2）で洗浄され、無水硫酸ナトリウムで乾燥され、そして真空中で濃縮されて、淡褐色固体として64.0 g（75%）の3-クロロ-N-(3-フルオロフェニル)プロパンアミドが得られた。LC-MS（ES）[M+1]⁺ m/z：202.1。

【0135】

7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン：1-L丸底フラスコに、3-クロロ-N-(3-フルオロフェニル)プロパンアミド（64.0 g、0.317モル、1.00当量）と三塩化アルミニウム（148 g、1.11モル、3.50当量）の混合物が入れた。反応混合物は、TLC分析によって示されるように、出発物質が消失するまで120 °C～125 °Cで2時間攪拌された。反応混合物は、氷水（1.2 L）に注がれ、そして濾過された。濾過ケーキは、回収され、そして水（60 mL × 3）およびメチルtert-ブチルエーテル（60 mL × 3）で洗浄された。これにより、47.8 g（91%）の7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オンが淡褐色固体として得られた。LC-MS（ES）[M+1]⁺ m/z：166.1。

【0136】

7-フルオロ-6-ニトロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン：2-L丸底フラスコに、7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン（47.8 g、0.289モル、1.00当量）および濃硫酸（290 mL）の混合物が入れた。硝酸（20.8 mL、0.304モル、1.05当量）が滴下された。反応混合物は、TLC分析によって示されるように、出発物質が消失するまで0 °Cで2時間攪拌された。反応混合物は、氷/水（600 mL）に注がれ、そして濾過された。フィルターが回収され、そして水（60 mL × 3）およびメチルtert-ブチルエーテル（60 mL × 3）で洗浄された。これにより、37.0 g（粗製）の7-フルオロ-6-ニトロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オンが淡褐色固体として得られた。LC-MS（ES）[M+1]⁺ m/z：211.1。¹H NMR（DMSO-d₆）は、7-フルオロ-6-ニトロ-3,4-ジヒドロキノリン-2

(1H) - オンの構造を有する化合物と一致した。

【0137】

6-アミノ-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン: 3-L 丸底フラスコに、7-フルオロ-6-ニトロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン (37.0 (粗製)、0.176 mol、1.00 当量)、メタノール (1800 mL) および Pd/C (3.70 g) の混合物が入れられた。反応混合物は、TLC 分析によって示されるように、出発物質が消失するまで水素雰囲気下で室温で4時間攪拌された。反応混合物は濾過され、そして濾液は濃縮された。残渣は、カラムクロマトグラフィーシリカゲル (DCM/MeOH = 200/1) により精製された。これにより、12.1 g (2工程24%) の6-アミノ-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オンが橙色固体として得られた。LC-MS (ES) [M+1]⁺ m/z. 211.1。

【0138】

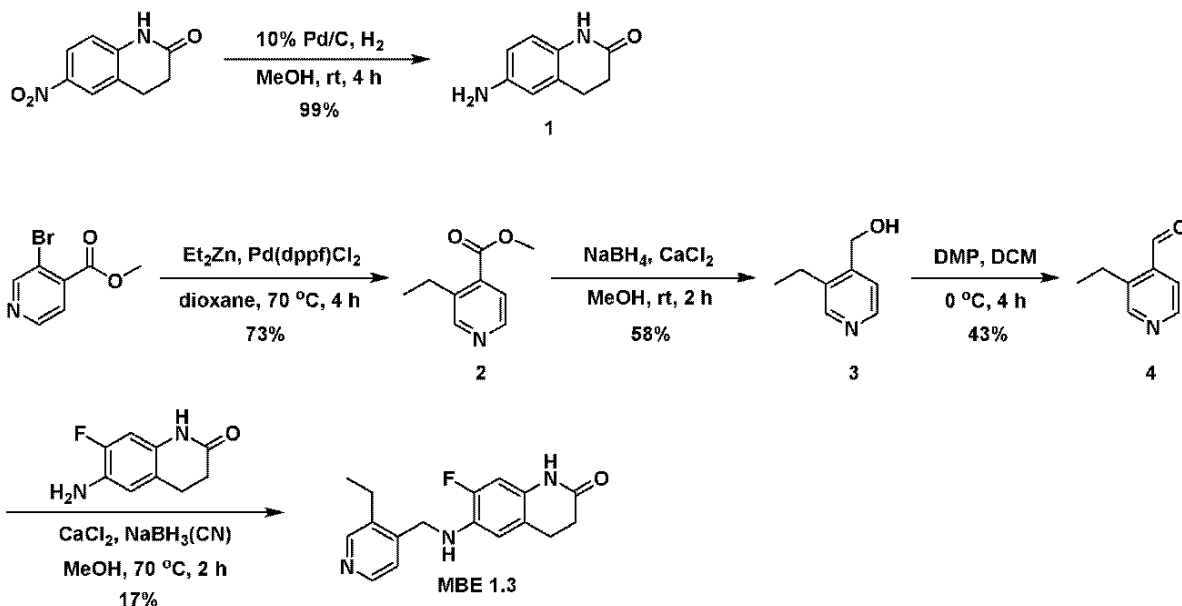
N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル) イソニコチンアミド

(MBE 1.2): 40-mL バイアルに、6-アミノ-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン (180 mg、1.00 ミリモル、1.00 当量)、N,N-ジメチルホルムアミド (5 mL)、イソニコチン酸 (135 mg、1.10 ミリモル、1.10 当量)、N-エチル-N-イソプロピルプロパン-2-アミン (387 mg、3.00 ミリモル、3.00 当量) および 1-((ジメチルアミノ)(ジメチルイミノ)メチル)-1H-[1,2,3]トリアゾロ[4,5-b]ピリジン3-オキシドヘキサフルオロホスフェート(V) (570 mg、1.50 ミリモル、1.50 当量) の混合物が入れられた。反応混合物は、室温で2時間攪拌された。反応混合物は濾過され、そして濾液は prep-HPLC により精製された。これにより、175 mg (61%) の N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル) イソニコチンアミドが灰白色固体として得られた。LC-MS (ES) [M+1]⁺ m/z 286.0。¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) は、N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル) イソニコチンアミドの構造を有する化合物と一致した。

【0139】

6-((3-エチルピリジン-4-イル)メチルアミノ)-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン (MBE 1.3) の合成

【化11】



【0140】

6-アミノ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン: 100-mL 丸底フラスコに、6-ニトロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン (1.92 g、10.0ミリモル、1.00当量)、メタノール (50 mL) および Pd/C (200 mg) の混合物が入れられた。反応混合物は、TLC 分析によって示されるように、出発物質が消失するまで水素雰囲気下で室温で4時間攪拌された。反応混合物は濾過され、そして濾液は濃縮された。これにより、1.60 g (99%) の6-アミノ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オンが淡緑色固体として得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z: 163.1。

【0141】

3-エチルisonicotinic acid methyl: 1-L三口丸底フラスコに、3-bromoisonicotinic acid methyl (21.6 g、100ミリモル、1.00当量)、ジオキサン (300 mL) および Pd(dppf)Cl₂ (3.66 g、5.00ミリモル、0.05当量) の混合物が入れられた。ジオクチル亜鉛のトルエン溶液 (100 mL、100ミリモル、1.00当量) が室温で滴下された。反応混合物は、窒素雰囲気下で70℃で4時間攪拌された。反応混合物は、水 (100 mL) に注がれ、酢酸エチル (200 mL × 3) で抽出された。有機層は、無水硫酸ナトリウムで乾燥され、濾過され、そして真空下で濃縮された。残渣は、PE/EtOAc (10/1) により溶離されるシリカゲルフラッシュにより精製されて、12.0 g (73%) の3-エチルisonicotinic acid methylが淡黄色液体として得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z: 166.0。

【0142】

(3-エチルピリジン-4-イル)メタノール: 100-mL 丸底フラスコに、3-エチルisonicotinic acid methyl (3.75 g、22.7ミリモル、1.00当量)、メタノール (50 mL) および塩化カルシウム (2.52 g、22.7ミリモル、1.00当量) の混合物が入れられた。水素化ホウ素ナトリウム (1.72 g、45.5モル、2.00当量) は、0℃で少しずつ添加された。反応混合物は、TLC 分析によって示されるように、出発物質が消失するまで室温で2時間攪拌された。反応混合物は、水 (50 mL) に注がれ、酢酸エチル (100 mL × 3) で抽出された。有機層は、無水硫酸ナトリウムで乾燥され、濾過され、そして濃縮された。これにより、1.80 g の(3-エチルピリジン-4-イル)メタノールが白色固体として得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z: 138.1。

【0143】

3-エチルisonicotinaldehyde: 100-mL 丸底フラスコに、(3-エチルピリジン-4-イル)メタノール (823 mg、6.00モル、1.00当量)、ジクロロメタン (25 mL) およびDMP (510 mg、7.20モル、1.20当量) の混合物が入れられた。反応混合物は、TLC 分析によって示されるように、出発物質が消失するまで室温で4時間攪拌された。反応混合物は、ジクロロメタン (25 mL) で希釈され、そして重炭酸ナトリウム飽和溶液 (25 mL × 3) で洗浄された。有機層は、含水硫酸ナトリウムにより乾燥され、濾過され、そして濃縮された。残渣は、カラムクロマトグラフィーシリカゲル (PE/EtOAc = 3/1) により精製された。これにより、350 mg (43%) の3-エチルisonicotinaldehydeが橙色固体として得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z: 136.1。

【0144】

6-((3-エチルピリジン-4-イル)メチルアミノ)-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン: 40-mL バイアルに、6-アミノ-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン (252 mg、1.40ミリモル、1.00当量)、メタノール (5 mL)、3-エチルisonicotinaldehyde (189 mg、1.00ミリモル、1.00当量)、塩化カルシウム (776 mg、6.99ミリモル、5.00当量) およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム (132 mg、1.50ミリモル、2.10当量) の混合物が入れられた。反応混合物は、70℃で2時間攪拌され

10

20

30

40

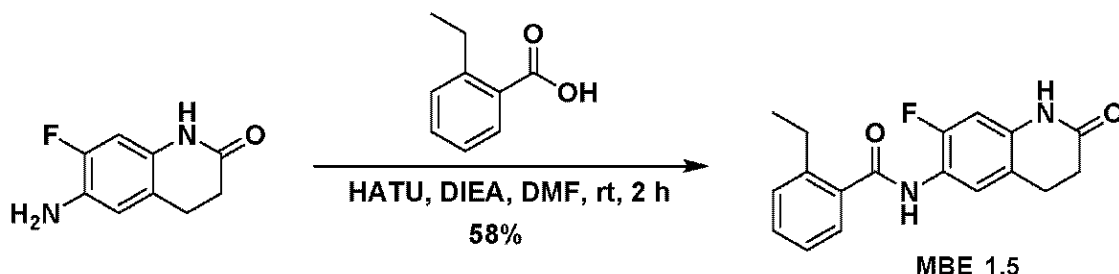
50

た。反応混合物は濾過され、そして濾液は *prep*-HPLC により精製された。これにより、69.9 mg (17%) の 6-((3-エチルピリジン-4-イル)メチルアミノ)-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オンが灰白色固体として得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z : 300.1。 ^1H NMR (DMSO- d_6 3/4, 300 MHz) は、6-((3-エチルピリジン-4-イル)メチルアミノ)-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オンの構造を有する化合物と一致した。

【0145】

2-エチル-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミド (MBE 1.5) の合成

【化12】



【0146】

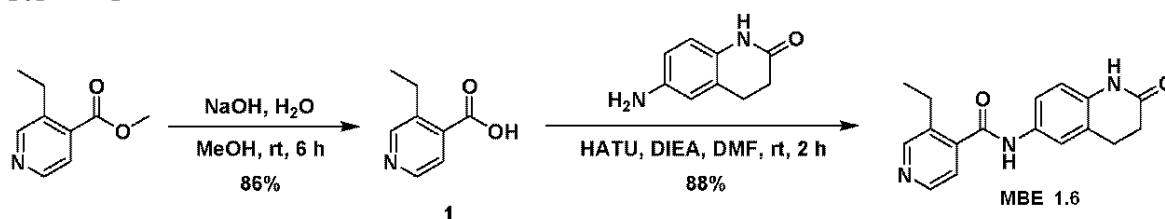
2-エチル-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミド: 40-mL バイアルに、6-アミノ-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン (180 mg、1.00ミリモル、1.00当量)、N,N-ジメチルホルムアミド (5 mL)、2-エチル安息香酸 (135 mg、1.10ミリモル、1.10当量)、N-エチル-N-イソプロピルプロパン-2-アミン (387 mg、3.00ミリモル、3.00当量) および 1-((ジメチルアミノ)(ジメチルイミニオ)メチル)-1H-[1,2,3]トリアゾロ[4,5-b]ピリジン3-オキシドヘキサフルオロホスフェート (V) (570 mg、1.50ミリモル、1.50当量) の混合物が入れられた。反応混合物は、室温で2時間攪拌された。反応混合物は濾過され、そして濾液は *prep*-HPLC により精製された。これにより、181 mg (58%) の 2-エチル-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミドが灰白色固体として得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z : 313.1。

^1H NMR (DMSO- d_6 3/4, 300 MHz) は、2-エチル-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミドの構造を有する化合物と一致した。

【0147】

3-エチル-N-(2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミド (MBE 1.6) の合成

【化13】



【0148】

3-イソニコチン酸エチル: 100-mL 丸底フラスコに、3-エチルイソニコチン酸

メチル (3.30 g、20.0ミリモル、1.00当量)、メタノール (20 mL)、水 (4 mL) および水酸化ナトリウム (1.60 g、40.0ミリモル、2.00当量) の混合物が入れられた。反応混合物は、室温で6時間攪拌された。pHは、2 M塩酸溶液で約4のpHに調整された。混合物は濾過され、そして濾過ケーキが回収された。これにより、2.60 g (86%) の3-エチルイソニコチン酸が白色固体として得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z: 152.0。

【0149】

3-エチル-N-(2-オキソ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミド: 40-mLバイアルに、6-アミノ-7-フルオロ-3, 4-ジヒドロキノリン-2 (1H)-オン (180 mg、1.00ミリモル、1.00当量)、N, N-ジメチルホルムアミド (5 mL)、3-イソニコチン酸エチル (166 mg、1.10ミリモル、1.10当量)、N-エチル-N-イソプロピルプロパン-2-アミン (387 mg、3.00ミリモル、3.00当量) および1-((ジメチルアミノ)(ジメチルイミノ)メチル)-1H-[1, 2, 3]トリアゾロ[4, 5-b]ピリジン3-オキシドヘキサフルオロホスフェート (V) (570 mg、1.50ミリモル、1.50当量) の混合物が入れられた。反応混合物は、室温で2時間攪拌された。反応混合物は濾過され、そして濾液はprep-HPLCにより精製された。これにより、260 mg (88%) の3-エチル-N-(2-オキソ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミドが得られた。LC-MS (ES) $[M+1]^+$ m/z: 296.1。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) は、3-エチル-N-(2-オキソ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミドの構造を有する化合物と一致した。

【0150】

細胞株と細胞培養

MDA-MB-468、MCF7、293T、B16F10、HCT116、HepG2、LN229、HTB140およびSW480細胞は、DMEM+10% FBS中で培養され、DET145細胞およびその誘導体、PC3、AsPC-1、NCI-H358は、RPMI-1640+10% FBS中で培養され、そしてSUM159細胞およびその誘導体は、10% FBS、10 pg/mLインスリンおよび20 ng/mL EGFが補充されたF12培地中で培養された。細胞株は、イメージングおよびフローサイトメトリー実験を容易にするため、GFP/ホタルルシフェラーゼのバイシストロニック発現を有するレトロウイルスベクターで標識された。全ての細胞株は、月1回のPCR解析によりマイコプラズマ汚染が陰性であることが確認された。ここで使用される細胞株は、一般的に誤認細胞株 (ICLAC) のデータベースには現れない。全ての細胞株は、STR分析で検証され、そしてNCBIリポジトリデータと比較された。

【0151】

クローニング、ウイルス産生、および形質導入

ALDH1a1、ALDH1a2、ALDH1a3およびALDH3a1のコード配列は、プールされたヒト参照RNA試料から作製されたcDNAからクローニングされた。AgeIおよびXhoI制限酵素部位に隣接するクローン化配列は、pLexレンチウイルスプラスミドに挿入された。クローンは配列決定され、そしてNCBI発現配列タグ (ESTs) と正確性について比較された。各酵素のウイルス産生は、PsPax2およびVSVGパッケージングベクターと共にPEIを用いて293Tパッケージング細胞株にトランスフェクションすることによって行われた。ウイルスは回収され、そして0.45 μm で濾過され、次いで細胞はポリブレン (8 pg/mL) を用いて12時間形質導入され、続いて実験期間中に1 pg/mLのピューロマイシンで培養された。すべてのウイルス形質導入および選抜は、細胞集団全体ベースで実施された。

【0152】

発生および成体の生理学におけるALDH1a3; 作用機序

ALDHファミリー内の特定の酵素は、十分に特徴付けられた基質選択性、調節、およ

び機能を有するが、このファミリーのほとんどのメンバーは、十分に研究されていないか、または主要な作用機序が理解されていない。例えば、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸（10-formyl-THF）を酸化することによって、葉酸塩の代謝におけるALDH1L1およびALDH1L2がどのように機能するかが示されている。

十分に特徴付けられたALDH酵素の別の主要な例はALDH3a1であり、これは可溶性角膜タンパク質の50%を構成し、そして4-ヒドロキシノネナールを酸化することによって網膜および角膜の紫外線誘発酸化的損傷から保護するように機能する。おそらく最も研究されているALDH酵素は、肝臓ミトコンドリアにおけるアセチルアルデヒドの酢酸への酸化の主要な触媒であるALDH2である。ALDH2は、物質乱用を防ぐためにアルコール中毒者に行われる治療法であるANTABUSE（登録商標）（ジスルフィラム）によって阻害される。一方、ALDH1aサブファミリーは、発生生物学および様々な病理学にわたって広範な意義を示しているが、その作用機序および主要な調節因子は未だ解明されていない。

【0153】

ALDH1aサブファミリーは、ALDHファミリーの中で最も生物学的に重要なグループであり、そして発生生物学に対するその重要性、および特に癌における幹細胞を同定するためのALDEFLUOR（商標）アッセイ（幹細胞技術）の注目に値する能力を考慮して、最近、かなりの研究の焦点となっている。本明細書中に記載されるように、ALDEFLUOR（商標）アッセイは、主にALDH1a3からの活性を測定する。

【0154】

ALDH1a3の全体のノックアウトは、鼻閉欠損による出生後のマウス死亡をもたらす。重要なことに、この表現型は、妊娠の短い期間（window）にオールトランスレチノイン酸を補充することによってレスキューされ得、正常な成体をもたらし得る。ヒトでは、ALDH1a3におけるホモ接合型変異は小眼症と関連するが、この表現型は完全な浸透性ではなく、そしてさらなる病理学については言及されていない。ALDH1a3が発生的に制限されているという考えをさらに支持する最近の研究は、ALDH1a3が特定の発生組織中で特異的に抑制されてビタミンAシグナル伝達を妨げることを示している。追加の解析は、ALDH1a3が発生中の卵巣には不要であり、そして成体の前立腺および唾液腺においてのみ発現されることを示している。結腸、肝臓、肺、膀胱、前立腺および卵巣のうち、卵巣のみが有意なALDEFLUOR（商標）陽性集団を有し、そしてこの小集団はALDH1a3阻害剤によって部分的にのみ阻害される。

【0155】

代謝性疾患において、ALDH1a3は不全膵島細胞のマーカーである。さらなる研究は、ALDH1a3発現が膵島細胞クローンによるインシュリン分泌を直接低下させる一方、グルカゴン分泌を増加させることを示す。このことは、ALDH1a3が2型糖尿病の病状をドライブすることもできることを示唆する。

【0156】

総合すると、これらの結果は、ALDH1a3が有意なオンターゲット毒性なく潜在的に除去され得ることを示唆する。データは、ALDH1a3が成体哺乳類には不要であることを示す。妊娠中のALDH1a3の阻害は、禁忌である可能性がある。

【0157】

公表された研究は、ALDH1a3のがん促進作用について主に2つの機序を主張している。これらは、活性酸素種の解毒またはレチナールの生理活性レチノイン酸への酸化の間で分けられる。その作用機序と比較したALDH1a3発現の機能的帰結を詳述する論文の数の間の不一致には、複数の理由が存在する。第一に、活性酸素種は一過性であり、そして検出が困難である。現在の方法は、DCFDAおよびDHEなどの蛍光レポーターを使用し、これらはいずれも非感受性である。さらに、インビトロ条件における酸化ストレスは、インビボ条件を反映していない。パクリタキセルを用いてインビトロで酸化ストレスを誘導し、そしてDCFDAを介して検出する試みがなされてきたが、このアッセイの検出範囲は、データ内に固有の偏差よりも小さい。しかし、追加の文献の証拠は、RO

10

20

30

40

50

S 関連の機序を支持する：A L D H 1 a 3 は、雄馬の精子試料中の 4 - H N E を解毒し、それが運動性の改善をもたらすことが見出された。A L D H 1 a 3 は、頭頸部扁平上皮癌（S C C）において放射線療法によっても誘導され、細胞傷害に反応する可能性を示している。

【0158】

興味深いことに、黒色腫における注目を集める研究は、酸化ストレスが転移性播種の主要な決定因子であることを実証している。この研究では、酸化ストレスは原発腫瘍には存在しないが、劇的に誘導され、そして転移細胞の適応度に影響することが示された。全身抗酸化剤送達は、その後通常非転移性細胞における肺転移を促進することができた。A L D H 1 a 3 発現の操作は、化学療法などの酸化ストレスで攻撃されるまでは原発腫瘍増殖に強く影響しない。一方、A L D H 1 a 3 阻害の最大の影響は、高レベルの酸化ストレスを有する部位である肺転移または骨転移に及ぼすことが観察されている（図 5 A ~ 6 B）。

【0159】

A L D H 1 a 3 に依存するレチノイン酸（R A）シグナル伝達の研究は、組織培養条件におけるレチナールによる外因性の補給を必要とし、そして腫瘍の微小環境条件からかけ離れているため、同様に困難である。乳癌患者由来の腫瘍における各 A L D H 1 a 酵素および R A シグナル伝達経路の各成分の間の遺伝子相関を示すデータが開発されており、そして A L D H 1 a 1、A L D H 1 a 2 および A L D H 1 a 3 のうち、A L D H 1 a 3 は乳癌における R A シグナル伝達経路の構成要素と最も低い相関を示すことを実証している。さらに、A L D H 1 a 3 が R A シグナル伝達経路に影響を及ぼしていれば、組織培養増殖または原発腫瘍増殖が影響を受けることが期待されるであろう。乳癌細胞に関する研究では、原発腫瘍またはインビトロでの増殖において差は観察されていない。

【0160】

治療抵抗性、腫瘍の進行およびほとんどの固形腫瘍タイプにわたる転移に対する A L D H 1 a 3 の機能的な重要性は、創薬のための魅力的な標的となる。オンターゲット毒性の可能性が低いことと相まって、A L D H 1 a 3 単独または他の治療薬（例えば承認された治療薬）との併用の全身性薬理学的阻害は、原発癌、ならびに緩慢性および顕性の転移性疾患の治療に有用であることが期待される。

【0161】

A L D E F L U O R（商標）アッセイ

A L D E F L U O R（商標）アッセイは、b o d i p y - アミノアセトアルデヒド（B A A A）を、自発的にエステル化して非細胞膜透過性産物を形成する b o d i p y - アミノ酢酸（B A A）に酸化する細胞の能力を評価する。この活性は、生細胞を選別し、そしてそれによって異種性の集団内の A L D H 活性レベルを識別するために使用され得る。A L D E F L U O R（商標）陽性癌細胞はより腫瘍形成性であり、そしてより悪い臨床転帰が予測されることが 2007 年に初めて発見された際、A L D E F L U O R（商標）活性は腫瘍の侵襲性を促進するより広い転写プログラムのマーカーであると推定された。これらの初期の研究以来、A L D E F L U O R（商標）活性は、腫瘍細胞集団の「悪性度（s t e r n n e s s）」または侵襲性を評価するための最も引用された方法となっている。

【0162】

この将来性のある発見の後、A L D E F L U O R（商標）活性は、しばしば A L D H 1 酵素の機能をほとんど考慮せずに評価された。むしろ、刊行物は、A L D E F L U O R（商標）アッセイが原発腫瘍の部位にかかわらず、侵襲性または転移性癌細胞を単離したことを示した。以来、数百の論文が、ほとんど全ての癌型にわたって癌細胞形質を評価する際に A L D E F L U O R（商標）アッセイを使用してきた。2011 年に M a r c a t o らから始まって初めて、A L D H 1 a 3 がほとんどの乳癌細胞株において A L D E F L U O R（商標）活性の原因であることが示された。

【0163】

M a r c a t o らの発表以来、加速度的な新興の研究は、A L D H 1 a 3 はほとんどの

癌型にわたるALDEFLUOR（商標）活性の原因であるだけでなく、癌の増殖、治療抵抗性、および転移を機能的に促進することも立証している。様々な質の研究が、ALDH1a3が発現し、そして黒色腫患者由来異種移植片または細胞株における増殖、間葉様神経膠腫または神経膠芽腫における代謝、化学療法抵抗性および放射線抵抗性、肺癌における造腫瘍性およびシスプラチン抵抗性、膵臓癌における増殖および放射線抵抗性、結腸および甲状腺細胞におけるFAR阻害剤抵抗性、中皮腫におけるシスプラチン抵抗性、前立腺癌におけるグリソンスコアおよび増殖、乳癌におけるアポトーシス抵抗性および転移、および胆管癌における予後に重要であることを立証している。ALDH1a3が、ほとんどの固形腫瘍型にわたる優性ALDEFLUOR（商標）誘導酵素であることが、本明細書において示される（図3Aおよび3Bを参照されたい）。

10

【0164】

発現および予後の研究は、ALDH1a3が癌の種類を超えて予後不良を強く予測することをさらに示している。ALDH1a3発現の低下につながるALDH1a3プロモーターの高メチル化は、一連の原発性膠芽腫患者における良好な予後の最も強力な予測因子であった。高ALDH1a3は、胆管癌患者におけるリンパ節転移を予測した。ALDH1a3の発現は、アンドロゲンが前立腺癌細胞の主要なミトジェンである前立腺癌においてアンドロゲンによってドライブされるが、mir187は前立腺癌におけるALDH1a3を標的とし、そして高mir187は良好な予後と関連した。

【0165】

本明細書中で使用されるALDEFLUOR（商標）アッセイにおいて、細胞は、50～80%コンフルエンスに達するまで増殖され、0.25%トリプシン/EDTA（Sigma）で回収され、そして遠心分離/再懸濁（4℃で5分間190g）によってPBSで1回洗浄された。細胞はカウントされ、遠心分離され、そしてALDEFLUOR（商標）緩衝液（Stemcell Technologies）中に1,000,000細胞/mLで再懸濁された。ALDEFLUOR（商標）基質（Stemcell Technologies、1:200）および試験化合物または1mM DEABは、細胞懸濁液に添加され、そして15分毎にボルテックスされながら37℃で45分間インキュベートされた。細胞は遠心分離され、そして5 pg/mLのDAPIを含むALDEFLUOR（商標）緩衝液中で再懸濁された。試料は、BD LSR2フローサイトメトリープラットフォームで分析された。ゲーティングは、陰性対照としてDEABを用いて行われた。

20

30

【0166】

図1Aは、本明細書中に記載される種々の化合物の存在下でのALDEFLUOR（商標）陽性細胞のパーセンテージの棒グラフであり、そして100 nMの濃度の化合物で本明細書中に記載される標準的なALDEFLUOR（商標）プロトコールを使用したインキュベーション後のフローサイトメトリーにより検出される、バックグラウンド蛍光レベルを上回るSUM159-M1a-ALDH1a3細胞のパーセンテージを示す。バックグラウンド蛍光についてのゲーティングは、陰性対照として1ミリモルのDEABを用いて行われた。図1Aは、MBE1-5、MBE1およびMBE1-6がALDH1a3活性の阻害に対する高親和性化合物であることを実証するものである。

40

【0167】

図1Bは、様々な濃度のMBE1またはMBE1.5の存在下でのALDEFLUOR（商標）陽性細胞のパーセンテージの折れ線グラフであり、そしてMBE1またはMBE1-5の用量滴定と組み合わせた本明細書に記載の標準的なALDEFLUOR（商標）プロトコールに従ったインキュベーション後にフローサイトメトリーにより検出される、バックグラウンド蛍光レベルを上回るSERML59-M1a-ALDH1a3細胞のパーセンテージを示す。[inh-min] 閾値は、対照試料の2つの標準偏差の下限に設定され、一方IC50閾値は、対照試料の平均値の50%に設定された。図1Bは、MBE1およびMBE1-5が8～10ナノモル範囲のIC50値を示し、2ナノモル程度の低濃度で阻害活性が検出されることを実証する。

50

【0168】

図1Cは、様々な濃度のMBE1およびMBE1.5の存在下での高いALDHパーセンテージの折れ線グラフであり、そしてMBE1またはMBE1.5の用量滴定と組み合わせた本明細書に記載のALDEFLUOR（商標）プロトコールに従ったインキュベーション後にフローサイトメトリーにより検出される、高い蛍光レベルであるSEIML59-M1a-Aldh1a3細胞のパーセンテージを示す。高活性は、10ナノモルのMBE1.5濃度で99パーセントの細胞でゲーティングされた。[inh-min]閾値は、対照試料の2つの標準偏差の下限に設定された。図1Cは、MBE1.5がMBE1よりも高度にALDH1a3活性細胞を阻害することに優れていることを実証する。

【0169】

図2Aは、ヒトAldh1a1、Aldh1a3またはAldh3a1で安定的に形質導入され、そして列挙された濃度でDMSOまたはMBE1と組み合わせたフローサイトメトリーによりALDEFLUOR（商標）プロトコールを使用して分析されたMCF7細胞のヒストグラムであり、そして各酵素によって誘導されたALDEFLUOR（商標）活性に対するDMSOまたはMBE1の効果を示す。図2Aは、MBE1が10 μM未満の濃度でAldh1a1またはAldh3a1活性を阻害しないが、別の癌細胞株であるMCF7においてAldh1a3活性を阻害することに有効であることを実証する。

【0170】

図2Bは、ヒトAldh1a2またはAldh1a3で一過性にトランスフェクトされ、そして列挙された濃度でDMSOまたはMBE1.5と組み合わせたフローサイトメトリーによりALDEFLUOR（商標）プロトコールを使用して分析された293T細胞のヒストグラムであり、そして各酵素により誘導されたALDEFLUOR（商標）活性に対するDMSOまたはMBE1.5のいずれかの効果を示す。図2Bは、MBE1.5が10 pM未満の濃度でAldh1a2活性を阻害しないが、ヒトAldh1a3でトランスフェクトされた293T細胞においてAldh1a3活性を阻害することに有効であることを実証する。

【0171】

図3Aは、DEABまたはMBE1の存在下での種々の癌型におけるALDEFLUOR（商標）陽性細胞の棒グラフであり、そしてALDH1a3活性が、Suml59-M1a（乳癌）およびMDA-468（乳癌）に加えて多くの癌型において観察され、そして多くの癌型においてMBE1により阻害されることを示す。図3Bは、1 mM DEAB（pan-ALDH阻害剤）または100 nM MBE1.5（特異的ALDH1a3阻害剤）の存在下での種々の癌型におけるALDEFLUOR（商標）陽性細胞の棒グラフであり、そしてヒト癌細胞株の大部分がALDH1a3活性を示すことを示す。注目すべき例外は肝臓癌であり、大きなALDEFLUOR（商標）陽性集団が存在することが予想され、そしてALDH1a1によりドライブされる。

【0172】

ALDEFLUOR（商標）アッセイは、SEIML59-M1a-Aldh1a3細胞に対する本明細書に記載されるいくつかの化合物の相対活性を評価するためにも使用された。100 nMの濃度でのアッセイにおけるいくつかの化合物の活性は、各化合物に関連する化学構造および化合物名と共に、表1において報告される。

【0173】

10

20

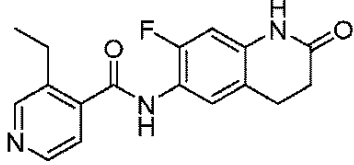
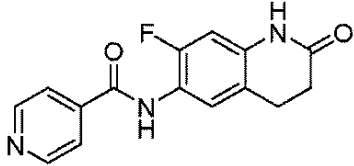
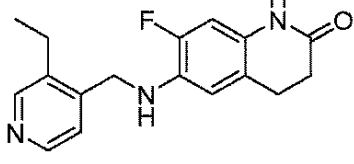
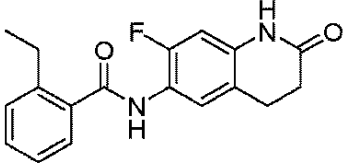
30

40

50

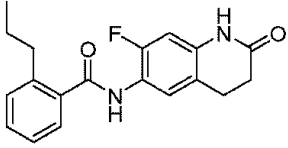
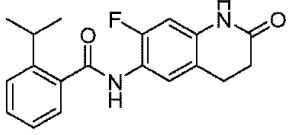
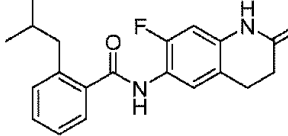
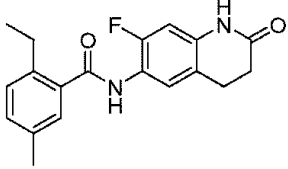
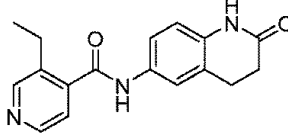
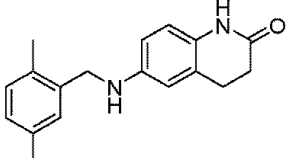
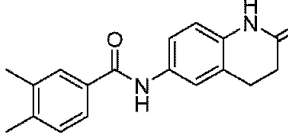
【表 1 - 1】

Table 1.

Cmpd. No.	Compound Structure 化合物構造	Compound Name 化合物名	Percent of Cells Positive for ALDEFLUOR ^T at 100 nM 陽性細胞のパーセンテージ	Inhibitory Activity at 100 nM 阻害 (%) 活性
MBE1		3-ethyl-N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)isonicotinamide	0.73 3-エチル-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミド	99
MBE1.2		N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)isonicotinamide	70 N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミド	8
MBE1.3		6-(((3-ethylpyridin-4-yl)methyl)amino)-7-fluoro-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one	34 6-(((3-エチルピリジン-4-イル)メチル)アミノ)-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン	55
MBE1.5		2-ethyl-N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)benzamide	0.03 2-エチル-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミド	100

【 0 1 7 4 】

【表 1 - 2】

Cmpd. No.	Compound Structure 化合物構造	Compound Name 化合物名	Percent of Cells Positive for ALDEFLUOR ^T _M at 100 nM 陽性細胞のパーセンテージ	Inhibitory Activity at 100 nM 阻害 (%) 活性
MBE1.5 A		N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)-2-propylbenzamide	N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)-2-プロピルベンズアミド	
MBE1.5B		N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)-2-isopropylbenzamide	N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)-2-イソプロピルベンズアミド	
MBE1.5C		N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)-2-isobutylbenzamide	N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)-2-イソブチルベンズアミド	
MBE1.5 D		2-ethyl-N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)-5-methylbenzamide	2-エチル-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)-5-メチルベンズアミド	
MBE1.6		3-ethyl-N-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)isonicotinamide	13 3-エチル-N-(2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミド	83
MBE2		6-((2,5-dimethylbenzyl)amino)-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one	42 6-((2,5-ジメチルベンジル)-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン	45
MBE3.1		3,4-dimethyl-N-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)benzamide	76 3,4-ジメチル-N-(2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミド	0.60

【 0 1 7 5 】

10

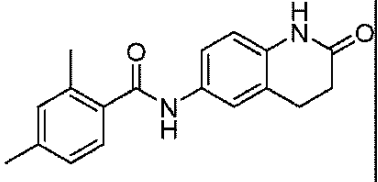
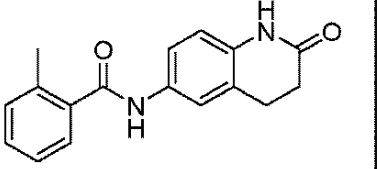
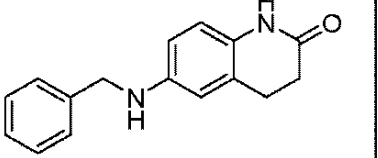
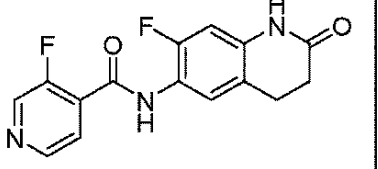
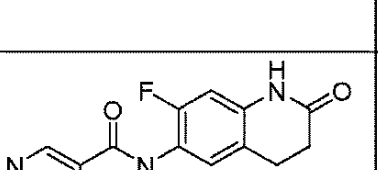
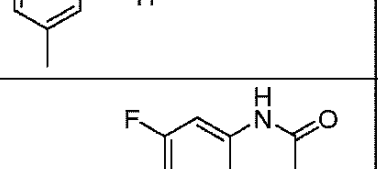
20

30

40

50

【表 1 - 3】

Cmpd. No.	Compound Structure 化合物構造	Compound Name 化合物名	Percent of Cells Positive for ALDEFLUOR ^T M at 100 nM 陽性細胞のパーセンテージ	Inhibitory Activity at 100 nM 阻害 (%) 活性
MBE3.2		2,4-dimethyl-N-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)benzamide	74 2,4-ジメチル-N-(2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミド	3.3
MBE3.3		2-methyl-N-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)benzamide	45 2-メチル-N-(2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)ベンズアミド	42
MBE3.4		6-(benzylamino)-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one	68 6-(ベンジルアミノ)-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン	11
MBE3.5		3-fluoro-N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)isonicotinamide	63 3-フルオロ-N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)イソニコチンアミド	18
MBE3.6		N-(7-fluoro-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)-5-methylnicotinamide	55 N-(7-フルオロ-2-オキソ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-6-イル)-5-メチルニコチンアミド	29
MBE3.8		6-(((1H-pyrrol-2-yl)methyl)amino)-7-fluoro-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one	75 6-(((1H-ピロル-2-イル)メチル)アミノ)-7-フルオロ-3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オン	2

【0176】

図12は、ALDEFLUOR（商標）活性対濃度のグラフであり、そして10 nMおよび100 nMの濃度でのSUM159-M1a-Al dh1a3細胞に対する本明細書に記載のいくつかの化合物のALDEFLUOR（商標）活性を示す。対照（DMSO）またはDEAB処理細胞と比較して、MBE1.5Cは、10 nMの濃度で、MBE1.5、MBE1.5AまたはMBE1.5Dのほぼ2倍の効力を有する。

【0177】

ALDHアイソフォーム1a1、1a2、1a3および3a1は、MCF7またはSEIM159細胞中で発現され、続いてALDEFLUOR（商標）アッセイにおいて使用

された。図13Aは、ウェスタンブロットであり、そして示された細胞における各ALDHアイソフォームの発現を示す。図13Bは、示されたALDHアイソフォームを発現するALDEFLUOR（商標）陽性MCF7細胞のパーセンテージ対MBE1.5濃度の対数の折れ線グラフであり、そしてMBE1.5が10 mM未満の濃度でALDH1a3を特異的に阻害することを示す。図13Cは、示されたALDHアイソフォームを発現するALDEFLUOR（商標）陽性SETM159細胞のパーセンテージ対MBE1.5濃度の対数の折れ線グラフであり、そしてMBE1.5が10 μM未満の濃度でALDH1a3を特異的に阻害することを示す。

【0178】

マウスリンパ球におけるALDH活性のエキスピオ解析

10

骨髓細胞は、PBSでフラッシュした脛骨および大腿骨を介して、12週齢のC56BL/6マウスから採取され、そして100-pm細胞ふるいに通された。胸腺細胞および脾細胞は対応する組織から単離され、そして100 pm細胞ふるいに対する物理的破壊により単離された。細胞は遠心分離／再懸濁により洗浄され、次いで10⁷細胞／mLで懸濁された。その後、抗CD3ε（Biolegend #100308）、抗CD11c（BD Pharmingen #561119）、抗CD45（eBioscience 30-F11）、または抗CD317（Biolegend 129c1）のいずれかを1：200のインキュベーション期間中に添加することを含み記載された通りに、これらの細胞に対してMBE1有りまたは無しでALDEFLUOR（商標）アッセイが実施された。

20

【0179】

図4Aは、フローサイトメトリスpekトルであり、そしてCD45陽性骨髓細胞がALDEFLUOR（商標）陽性であるが、MBE1.5により影響を受けないことを示す。図4Bは、フローサイトメトリスpekトルであり、そしてCD11c陽性骨髓細胞がALDEFLUOR（商標）陽性であるが、MBE1.5により影響を受けないことを示す。CD45陽性およびCD3e陽性（CD45+CD3e+）ならびにCD11c陽性およびCD317陽性（CD11+CD317+）を含む、検査された他の集団において同様の結果（図示せず）が得られた。したがって、試験された全ての集団は、ALDEFLUOR（商標）陽性であったが、MBE1.5により影響を受けず、毒性の可能性はほとんどなかった。

30

【0180】

マウスモデルおよび異種移植片

全てのマウスは、初めにJackson Laboratory（Bar Harbor、ME）から注文され、そして繁殖は特定の病原体を含まない（SPF）バリア施設において行われた。毒性実験は、8～12週齢の雄及び雌のC57B/6マウスで行われた。MBE1は、DMSO中に50 mg/mLで溶解され、続いてKolliphor ELに1：2希釈され、続いてPBSに1：5希釈され、5 mg/mLのMBE1溶液（10% DMSO、10% Kolliphor EL、80% PBS）が得られた。これは、24時間隔で3匹のマウスのセットにおいて、12.5～200 mg/kg体重の漸増用量でIP注射により投与された。身体状態スコア、食物摂取、糞便／尿産生、行動および体重が毒性のリードアウトとして測定された。次いで、5匹のマウスが25 mg/kgのMBE1で3日毎に18日間処理された。いずれの実験も、急性毒性または慢性毒性のどちらの徴候も示さなかった。

40

【0181】

全ての異種移植実験は、8週齢の雌マウス（胸腺欠損Nu/Nu、またはNOD/SCID Gamma）で行われた。尾静脈または心臓内注射のために100 μL PBS中の125,000個のSUM159-M1a細胞を用いて異種移植実験が行われた。マウスは、注射後に無作為化された。生物発光イメージング（BLI）は、IVIS 200システムおよび後眼窩ルシフェリン注射を用いて行われた。薬物処理のために、（上記のように調製された）MBE1は、図5A（尾静脈注射）および図6A（心臓内注射）に示

50

す時間間隔および用量で、パクリタキセル（10%エタノール中5 mg/mL、10% Kolliphor EL、80% PBS）と併せてIP注射によりマウスに投与された。
【0182】

図5Bは、生物発光イメージング（BLI）を用いて測定された肺転移対時間（日）の折れ線グラフであり、そして図5Aに概説された実験からのマウスにおけるMBE1の存在下および非存在下における肺転移を比較するものである。図6Bは、BLIを用いて測定された骨転移対時間（日）の折れ線グラフであり、そして図6Aに概説された実験からのマウスにおけるMBE1の存在下および非存在下での骨転移を比較するものである。図5Bおよび図6Bは、MBE1が樹立された転移性疾患を治療するための有効な治療薬であることを実証し、そしてMBE1および本明細書中に開示される化合物がALDH1a3およびその下流効果をインビボで効果的に阻害するために使用され得ることを立証するものである。

10

【0183】

別の異種移植実験では、マウスは上記のように尾静脈注射によりSUM159-MLP44細胞を注射され、そして注射後に無作為化された。転移負荷は、生体内イメージングを介して16日目に画像化された。マウスは、次いで17、19および21日目に、パクリタキセル（25 mg/kg）および溶媒もしくはMBE1.5（50 mg/kg）のいずれかで処理された。次いで、肺転移負荷が22日目に画像化された。シグナルは16日目に標準化された。

【0184】

20

図14は、生物発光イメージング（BLI）により測定された肺転移対時間（日）の折れ線グラフであり、そして17、19および21日目に投与された25 mg/kgのパクリタキセルと組み合わせた50 mg/kgのMBE1.5の3つの用量が、マウス異種移植モデルにおいて樹立された転移性疾患の退縮を引き起こしたことを示す。

【0185】

さらに別の異種移植実験では、マウスは乳腺脂肪パッドを介してMDA-MB-468細胞を注射され、そして注射後に無作為化された。マウスは、MBE1.5（1日25 mg/kg、n=6）または溶媒（n=12）、及びパクリタキセル（隔日12.5 mg/kg）を12日間投与された。原発腫瘍の測定は、各処理群間でキャリパーにより行われた。

30

【0186】

図15Aは、体重（g）対時間（日）の折れ線グラフであり、そして本実験においてMBE1.5処理に関連する肉眼的な毒性がなかったことを示す。図15Bは、腫瘍体積（mm³）対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてMBE1.5での12日間の処理が原発性乳腺腫瘍の退縮を引き起こしたことを示す。MBE1.5処理群の2匹のマウスの腫瘍は、該処理により完全に排除された。

【0187】

別の異種移植実験では、マウスは尾静脈注射によりSum-159-M1a-ALDH1a3細胞を注射され、そして注射後に無作為化された。マウスは、MBE1.5（1日25 mg/kg）もしくは溶媒、およびパクリタキセル（隔日12.5 mg/kg）で12日間処理された。肺転移の進行は、生体内生物発光により追跡された。

40

【0188】

図16Aは、肺転移生物発光対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてMBE1.5または溶媒での処理前後の肺転移の進行を示すものである。図16Bは、処理群の関数としての経時的なマウス生存のKaplan-Meierプロットであり、そしてMBE1.5による12日間の処理が、後期樹立乳癌肺転移を有するマウスの生存を延長したことを示す。

【0189】

薬物動態評価

薬物動態実験は、16週齢のC57BL6雄マウスに対して行われた。マウスは、MB

50

MBE 1.5 (15% DMSO、5% Kolliphor EL、80% PBS) を IP 注射により投与された。血液は、注射後 15 分、30 分、1 時間、3 時間、および 24 時間に、末期心臓穿刺によって採取された。血清は、16200 RCF で 1 分間の遠心分離による血液分離により得られた。次いで、組織が全採血後に採取された。血清および組織は、液体窒素中で急速凍結され、そして薬物動態評価に供された。

【0190】

マウス PK 研究のための LC/MS/MS による MBE 1.5 の血漿濃度定量

血漿 MBE 1.5 濃度は、マウス PK 研究において LC/MS/MS アッセイで測定された。

【0191】

化学物質：MBE 1.5 および MBE 2.0 は、1% DMSO を含む MeOH 中のストック (1 mg/mL) として供給された。MBE 2.0 は、内部標準として使用された。HPLC グレードのアセトニトリルおよび水は、J. T. Baker (Center Valley, PA) から購入された。マウス血漿は、血漿校正標準の調製のために Innovative Research (Novi, MI) から購入された。

【0192】

LC/MS/MS アッセイ：

【0193】

標準溶液の調製：MBE 1.5 ストックは、対照マウス血漿中で希釈されて、8.2 ng/mL ~ 18 pg/mL の校正範囲が得られた。メタノール中の 1 pg/mL の MBE 2.0 がワーキング内部標準 (IS) として使用された。

【0194】

試料調製：血漿標準およびマウス血漿試料 (20 pL) は、5 μL IS をスパイクされ、そして 120 μL アセトニトリルおよびメタノール (v/v 5:1) で除タンパクされた。13000 rpm で 15 分間遠心分離後、25 μL の上清が LC-MS により分析された。

【0195】

液体クロマトグラフィー/質量分析：MBE 1.5 の定量は、Xcalibur データ取得ソフトウェア (Thermo Electron, San Jose, CA, ETSA) を備えた、API エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 源、Surveyor MS ポンプ、Surveyor オートサンプラーを装備した TSQ Quantum トリプル四重極質量分析計 (triple quadrupole mass spectrometer) を用いて行われた。

【0196】

LC 条件は以下の通りであった：移動相 A：水溶液 (0.1% ギ酸)；移動相 B：アセトニトリル (0.1% ギ酸)；流速 500 pL/分；勾配溶出 0~1 分、60% A；1~2.5 分、60%~20% A；2.5~7.0 分、0% A；7.0~9.0 分、0% A；9.0~11.0 分、0%~60% A；およびカラム：Luna (登録商標) C18、150 X 4.6 mm、5 μm (Phenomenex, Torrance, CA)。MBE 1.5 及び IS の保持時間は、それぞれ 6.3 分及び 6.6 分であった。

【0197】

MS/MS 条件は、以下の通りであった：単一反応モニタリングモードにおいて、m/z 313.2/178.2 (MBE 1.5)、m/z 281.2/119.1 (MBE 2.0、IS)；イオンスプレー電圧、4500 V；キャピラリー温度 350°C；シースガス圧 20 任意単位；Aux ガス圧 50 任意単位；衝突圧 1.5 任意単位。衝突エネルギーおよびチューブレンズは、各化合物について最適化された。

【0198】

計算：血漿校正標準は、血漿サンプル中の MBE の定量のために使用された。対数線形回帰が校正曲線に使用されて血漿サンプル中の濃度を決定された。

【0199】

10

20

30

40

50

結果：

【0200】

LC/MS/MSアッセイ：MBE1.5の血漿校正曲線は、8.2 ng/mL～18 pg/mLの範囲の濃度を用いてプロットされた。定量の限界は、8.2 ng/mL (LOD)であった。LC/MS/MSアッセイは、校正範囲において良好な直線性であった ($R^2 > 0.99$)。表2は、アッセイ内の正確性および精度を要約する。本アッセイにおいてマトリックス効果は観察されなかった。

【0201】

【表2】

アッセイのアッセイ内の正確性および精度

Table 2. MBE1.5 LC/MS/MS assay intra-assay accuracy and precision

QC concn (pg/ml)	Measured (ng/mL, mean±SD)	RSD (%)	Bias (%)
0.0082	0.0084±0.006	7.1	2.1
0.0246	0.0241±0.002	7.3	-2.0
0.222	0.214±0.009	4.2	-3.6
18.0	17.84±0.793	4.4	-0.8

【0202】

マウスにおけるMBE1.5の血漿中PK：マウスPK研究におけるMBE1.5の血漿濃度は表3に示される。予備的なPKデータは、Winnonlin 2.0による非コンパートメントモデルを用いて解析された。PKパラメータは、表4に要約される。

【0203】

【表3】

Table 3. Concentration of MBE1.5 in mouse plasma (pg/ml).

マウス血漿中のMBE1.5の濃度

Time (hr) 時間	#1	#2	#3	Mean 平均	SD
0	<LOD	<LOD	<LOD	-	
0.25	5.783	5.760	6.927	6.157	0.667
0.5	6.932	3.411	4.650	4.998	1.786
1	2.842	6.295	2.815	3.984	2.001
3	1.704	3.447	0.849	2.000	1.324
24	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
	0.002*	0.006*	0.005*	0.004*	0.002

*Integrated peak area was less than LOD (limit of detection), forced to calculate.

*積分ピーク面積は、LOD(検出限界)未満であり、強制的に計算された。

10

20

30

40

50

【0204】

【表4】

Table 4. Pharmacokinetic parameters of MBE1.5 in mice (dose 25mg/kg, i.p.)
マウスにおけるMBE1.5の薬物動態パラメータ

Calculation method 計算 方法	AETC i_{inf} (pg/mL*h)	$t_{1/2}$ (hr)	Clearance 排出能 (mL/hr)
Time point to 3hr 3時間までの時点	15.70	1.90	39.87
Time point to 24hr 24時間までの時点	16.90	2.32	36.96

10

【0205】

ALDH1a3の遺伝子ノックアウト

ゲノムALDH1a3に対する相同配列を含むCas9遺伝子およびgRNA配列の両方を含むCRISPR-Cas9ベクターは、レンチウイルス感染によりMDA-MB-468細胞に形質導入され、続いてウイルス組み込みのためピューロマイシン選抜され、そしてその結果得られた細胞はALDEFLUOR（商標）アッセイにより分析された。2つのALDH1a3標的gRNAベクターが2つの派生細胞株を作製するために使用され、そしてスクランブル配列を有する1つのgRNAが対照派生細胞株を生成するために使用された。

20

【0206】

図7Aは、フローサイトメトリースペクトルであり、そしてMDA-MB-468乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウト（中央および右端のスペクトル）が、対照MDA-MB-468細胞（左端のスペクトル）と比較して、ALDEFLUOR（商標）活性を実質的に減少させることを示すものである。図7Bは、腫瘍体積（mm³）対時間（日）の折れ線グラフであり、そしてMDA-MB-468乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウトが原発腫瘍増殖を遅らせ、そしてパクリタキセルに対して腫瘍を感作させることを示す。図7Cは、腫瘍質量（g）対遺伝子ノックアウトの棒グラフであり、そしてMDA-MB-468乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウトが、原発腫瘍増殖を遅らせ、そしてパクリタキセルに対して腫瘍を感作させることを示すものである。

30

【0207】

Cas9遺伝子およびゲノムALDH1a3に対する相同配列を含むgRNA配列の両方を含むCRISPR-Cas9ベクターは、Sum159-M1a細胞にトランスフェクトされ、続いてフローサイトメトリーにより陽性トランスフェクト細胞に対する選抜が行われた。陽性トランスフェクト細胞は、次いでベクター骨格または全長ヒトALDH1a3のいずれかを含むレンチウイルスベクターでウイルス形質導入された。陽性形質導入体はピューロマイシンにより選抜され、そしてその結果得られた細胞はALDEFLUOR（商標）アッセイにより分析された。異種移植実験では、ノックアウトベクターまたはノックアウトALDH1a3または野生型ベクターまたは野生型ALDH1a3細胞がマウスに心臓内注射され、そして生体内生物発光イメージングにより骨転移増殖が追跡された。骨転移のない生存は、生物発光により追跡され、そしてKaplan-Meierモデルを用いてプロットされた。

40

【0208】

図9Aは、フローサイトメトリースペクトルであり、そしてSum159-M1a乳癌細胞におけるALDH1a3の遺伝子ノックアウトが細胞におけるALDEFLUOR（商標）活性をほぼ消失させること、およびALDEFLUOR（商標）活性がレスキューベクターで細胞を形質導入することによりレスキューされ得ることを示す。図9Bは、生物発光（ph/s）対時間（日）により測定された骨転移の折れ線グラフであり、そして

50

Sum159-M1a乳癌細胞におけるALDH1a3のノックアウトが骨転移成長を遅らせることを示す。図9Cは、経時的な骨転移のない生存のKaplan-Meierプロットであり、そしてSum159-M1a乳癌細胞におけるALDH1a3のノックアウトが、生存時間を有意に増加させることを示す。

【0209】

ALDH1a3の遺伝子発現

3つのヒトALDH遺伝子、ALDH1a1、ALDH1a3またはALDH3a1の1つをコードするレンチウイルスベクターは、ルシフェラーゼ標識Sum159-M1b細胞にウイルス形質導入により導入され、続いてピューロマイシンにより陽性選抜され、そして導入細胞はマウスへの尾静脈注射により注入された。肺転移の増殖は、週1回の生体内生物発光イメージングにより追跡された。肺結節は、エクスビボでカウントされた。

10

【0210】

図8Aは、生物発光(ph/s)対時間(日)の折れ線グラフであり、そして3つのALDH酵素、ALDH1a1、ALDH1a3およびALDH3a1をコードするベクターをトランスフェクトされたSUM159-M1b細胞を注射されたマウスにおける肺転移の発生を示すものである。図8Bは、図8Aに記載された実験の端点でエクスビボでカウントされた肺結節のプロットである。

【0211】

生存予測

TCGAおよびKaplan-Meier plotter(kmplot.com)データは、ALDH1a3発現レベルの関数として種々の癌に対する発現データおよび生存曲線を生成するために使用された。各データセットからの癌患者は、中央発現値または最適層別化値のいずれかに従って、高Al dh 1 a 3発現または低Al dh 1 a 3発現により層別化された。Kaplan-Meier分析は、次いで遠隔転移のない生存または全生存のどちらを測定するかにかかわらず、患者の生存をプロットし、患者間のAl dh 1 a 3の相対レベルと対応する生存指標との関係を評価するために使用された。

20

【0212】

図10A~10Hは、kmplot.comで提供されるデータ解析ツールに基づき、高Al dh 1 a 3発現(赤)および低Al dh 1 a 3発現(黒)により層別化された予後患者生存曲線であり、そしてALDH1a3発現レベルの関数として、トリプルネガティブ乳癌患者の遠隔転移なしの生存(図10A)、および腎明細胞癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、肺扁平上皮癌、結腸直腸癌および低悪性度神経膠腫癌患者の全生存(それぞれ図10B~10H)を示す。

30

【0213】

別の予測セットでは、METABRIC臨床乳癌データセットからのAl dh 1 a 3のmRNA発現が腫瘍型および化学療法による前処理によって分離された。EMC-MSKデータセットの生存曲線は、患者をサブタイプに応じて分割し、中央値Al dh 1 a 3発現により層別化することにより作成された。

【0214】

図11Aは、METABRIC臨床乳癌データセットからのALDH1a3のmRNA発現のグラフであり、そして乳癌サブタイプおよび化学療法歴によるALDH1a3の発現を示す。図11Bは、EMC-MSKデータセットに基づく予測生存曲線であり、そしてサブタイプおよび中央値ALDH1a3発現レベルによる乳癌患者の予測生存期間を示す。

40

【0215】

表5は、Kaplan-Meier plotterデータベースに由来するエストロゲン受容体(ER)陰性乳癌におけるALDH1a1またはALDH1a3が高発現している患者のハザード比(p値)を報告するものであり、そして転移発生リスクの高いHer2およびトリプルネガティブ乳癌(TNBC)集団を含む。ALDH1a3は、転移を発生する可能性が最も高い集団であるER陰性乳癌患者における予後不良予測因子である。

50

【 0 2 1 6 】

【表 5】

Kaplan-Meier plotterデータベース由来のER陰性乳癌患者集団においてALDH1a1またはALDH1a3が高発現している患者のハザード比(p値)

Table 5. Hazard ratio (p-value) of patients expressing high ALDH1a1 or ALDH1a3 in ER-negative breast cancer patient populations derived from the Kaplan-Meier plotter database

遺伝子 Gene	全体 All	化学療法 Chemotherapy	化学療法なし No Chemotherapy
ALDH1a1	0.48 (0.00039)	2.34 (0.065)	0.48 (0.0071)
ALDH1a3	1.85 (0.004)	3.3 (0.026)	1.81 (0.032)

10

【 0 2 1 7 】

参考文献

- 1 Vasiliou, V., Thompson, D. C., Smith, C., Fujita, M. & Chen, Y. Aldehyde dehydrogenases: from eye crystalline to metabolic disease and cancer stem cells. *Chem Biol Interact* 202, 2-10, doi: 10. 1016/j.cbi.2012. 10.026 S0009-2797(12)00233-5 [pii](2013).
- 2 Dupe, V. et al. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl AcadSci USA* 100, 14036-14041, doi: 10. 1073/pnas.2336223100 23362 23100 [pii](2003).
- 3 Anthony, T. E. & Heintz, N. The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *J Comp Neurol* 500, 368-383, doi: 10.1002/cne.2H79 (2007).
- 4 Ducker, G. S. et al. Reversal of Cytosolic One-Carbon Flux Compensates for Loss of the Mitochondrial Folate Pathway. *CellMetab* 24, 640-641, doi:S1550 4131(16)30491-0 [pii]10. 1016/j.cmet.2016.09.011(2016).
- 5 Pappa, A. et al. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. *J Biol Chem* 280, 279 98-28006, doi:M503698200 [pii]10.1074/jbc.M503698200(2005).
- 6 Black, W. et al. Molecular mechanisms of ALDH3 A 1-mediated cellular protection against 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* 52, 1937-1944, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.050 S0891-5849(12)00156-6 [pii](2012).
- 7 Blanco-Gandia, M. C. & Rodriguez-Arias, M. Pharmacological treatments for opiate and alcohol addiction: a historical perspective of the last 50 years. *Eur J Pharmacol*, doi :S0014-2999(18)30451-5 [pii] 10. 1016/J.ejphar.2018.08. 007 (2018).
- 8 Rodriguez-Torres, M. & Allan, A. L. Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors. *Clin Exp Metastasis* 33, 97-113, doi : 10.1007/sl 0585-015-9755-9 10.1007/S10585-015-9755-9 [pii] (2016).
- 9 Plaisancie, J. et al. Incomplete penetrance of biallelic ALDH1 A3 mutations. *Eur J MedGenet* 59, 215-218, doi:10.1016/j.ejmg.2016.02.004 S1769-7212(16)30015-5 [pii] (2016).
- 10 Yao, H. et al. CHD7 represses the retinoic acid synthesis enzyme ALDH1A3 during inner ear development. *JCI Insight* 3, doi: 10.1172/jci.insight.97440 97440 [pii] (2018).

20

30

40

50

- 11 Minkina, A. et al. Retinoic acid signaling is dispensable for somatic development and function in the mammalian ovary. *Dev Biol* 424, 208-220, doi:S0012-1606(16)30849-1 [pii]10.1016/j.ydbio.2017.02.015(2017).
- 12 Wang, S. et al. ALDH1 A3 correlates with luminal phenotype in prostate cancer. *Tumour Biol* 39, 1010428317703652, doi : 10.1177/1010428317703652 (2017).
- 13 Kim-Muller, J. Y. et al. Aldehyde dehydrogenase la3 defines a subset of failing pancreatic beta cells in diabetic mice. *Nat Commun* 7, 12631, doi: 10.1038/ncomms12631ncomms12631 [pii] (2016).
- 14 Shimamura, M., Karasawa, H., Sakakibara, S. & Shinagawa, A. Raldh3 expression in diabetic islets reciprocally regulates secretion of insulin and glucagon from pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 401, 79-84, doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.013 S0006-291X(10)01688-8 [pii](2010).
- 15 Berenguer, M., Lancman, J. J., Cunningham, T. J., Dong, P. D. S. & Duester, G. Mouse but not zebrafish requires retinoic acid for control of neuromesodermal progenitors and body axis extension. *Dev Biol* 441, 127-131, doi:S0012-1606(18)30290-2 [pii]10.1016^ .ydbio.2018.06.019(2018).
- 16 Niederr either, K., Subbarayan, V., Dolle, P. & Chambon, P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21, 444-448, doi: 10.1038/7788(1999).
- 17 Feng, R. et al. Retinoic acid homeostasis through aldhla2 and cyp26a1 mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci Rep* 5, 10131, doi: 10.1038/srep10131 srep10131 [pii](2015).
- 18 Hall, J. A., Grainger, J. R., Spencer, S. P. & Belkaid, Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 35, 13-22, doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.002 S1074-7613Q 1)00270-6 [pii](2011).
- 19 Mucida, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317, 256-260, doi: 1145697 [pii]10. H26/science.1145697 (2007).
- 20 Lee, S. W. et al. Cutting edge: 4-1BB controls regulatory activity in dendritic cells through promoting optimal expression of retinal dehydrogenase. *J Immunol* 189, 2697-2701, doi: 10.4049/jimmunol.1201248jimmunol.1201248 [pii] (2012).
- 21 Zhu, B. et al. IL-4 and retinoic acid synergistically induce regulatory dendritic cells expressing Aldhla2. *J Immunol* 191, 3139-3151, doi: 10.4049/jimmunol.1300329jimmunol.1300329 [pii] (2013).
- 22 Guilliams, M. et al. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* 115, 1958-1968, doi: 10.1182/Blood-2009-09-245274blood-2009-09-245274 [pii](2010).
- 23 Spiegl, N., Didichenko, S., McCaffery, P., Langen, H. & Dahinden, C. A. Human basophils activated by mast cell-derived IL-3 express retinaldehyde dehydrogenase-II and produce the immunoregulatory mediator retinoic acid. *Blood* 112, 3762-3771, doi : 10.1182/blood-2008-0 1-13525 lblood-2008-0 1-135251 [pii](2008).
- 24 Fan, X. et al. Targeted disruption of Aldhlal (Raldhl) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol Cell Biol* 23, 4637-4648(2003).
- 25 Bowles, J. et al. Male-specific expression of Aldhlal in mouse and chicken fetal testes: implications for retinoid balance in gonad development. *Dev Dyn*

10

20

30

40

50

238, 2073-2080, doi: 10.1002/dvdy.22024 (2009).

26 Levi, B. P., Yilmaz, O. H., Duester, G. & Morrison, S. J. Aldehyde dehydrogenase is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood* 113, 1670-1680, doi : 10.1182/blood-2008-05-156752 [pii](2009).

27 Chute, J. P. et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 11707-11712, doi:0603806103 [pii]10.1073/pnas.0603806103 (2006).

28 Cooper, T. T. et al. Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase-Activity Expands Multipotent Myeloid Progenitor Cells with Vascular Regenerative Function. *Stem Cells* 36, 723-736, doi: 10.1002/stem.2790 (2018).

29 Arnold, S. L. et al. Importance of ALDH1 A enzymes in determining human testicular retinoic acid concentrations. *J Lipid Res* 56, 342-357, doi : 10.1194/jlr.M054718 [pii](2015).

30 Kiefer, F. W. et al. Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat Med* 18, 918-925, doi: 10.1038/nm.2757 [pii] (2012).

31 Kim, J. I. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* 350, 102-106, doi: 10.1126/science.aac4690350/6256/102 [pii] (2015).

32 Ginestier, C. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555-567, doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014S1934-5909(07)00133-6 [pii](2007).

33 Charafe-Jauffret, E. et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 16, 45-55, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1630 [pii] (2010).

34 Charafe-Jauffret, E. et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 69, 1302-1313, doi : 10.1158/0008-5472.CAN-08-2741 [pii](2009).

35 Brooks, M. D., Bumess, M. L. & Wicha, M. S. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* 17, 260-271, doi: 10.1016/j.stem.2015.08.014S1934-5909(15)00369-0 [pii] (2015).

36 Marcato, P. et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1 A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells* 29, 32-45, doi: 10.1002/stem.563 (2011).

37 Luo, Y. et al. ALDH1 A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells* 30, 2100-2113, doi:10.1002/stem.H93 (2012).

38 Perez-Alea, M. et al. ALDH1A3 is epigenetically regulated during melanocyte transformation and is a target for melanoma treatment. *Oncogene* 36, 5695-5708, doi: 10.1038/onc.2017.160 [pii] (2017).

39 Sullivan, K. E., Rojas, K., Cerione, R. A., Nakano, I. & Wilson, K. F. The stem cell/cancer stem cell marker ALDH1 A3 regulates the expression of the survival factor tissue transglutaminase, in mesenchymal glioma stem cells. *Oncotarget* 8, 22325-22343, doi: 10.18632/oncotarget.16479 [pii] (2017).

40 Flahaut, M. et al. Aldehyde dehydrogenase activity plays a Key role in the

10

20

30

40

50

aggressive phenotype of neuroblastoma. *BMC Cancer* 16, 781, doi: 10.1186/s12885-016-2820-1 [pii](2016).

41 Mao, P. et al. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 8644-8649, doi: 10.1073/pnas.1221478110 [pii](2013).

42 Wu, W. et al. Aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1 A3) is regulated by autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Lett* 417, 112-123, doi:10.1016/j.canlet.2017.12.036 (2018).

43 Zhang, W. et al. ALDH1 A3 : A Marker of Mesenchymal Phenotype in Glioma as Associated with Cell Invasion. *PLoS One* 10, e0142856, doi: 10.1371/journal.pone.0142856 [pii](2015).

44 Cheng, P. et al. FOXD1-ALDH1 A3 Signaling Is a Determinant for the Self-Renewal and Tumorigenicity of Mesenchymal Glioma Stem Cells. *Cancer Res* 76, 7219-7230, doi :10.1158/0008-5472.CAN-15-2860 [pii](2016).

45 Shao, C. et al. Essential role of aldehyde dehydrogenase 1 A3 for the maintenance of non-small cell lung cancer stem cells is associated with the STAT3 pathway. *Clin Cancer Res* 20, 4154-4166, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3292 [pii](2014).

46 Yun, X. et al. Targeting USP22 Suppresses Tumorigenicity and Enhances Cisplatin Sensitivity Through ALDH1 A3 Downregulation in Cancer-Initiating Cells from Lung Adenocarcinoma. *Mol Cancer Res* 16, 1161-1171, doi 10.1158/1541-7786.MCR-18-0042 [pii](2018).

47 Jia, J. et al. An integrated transcriptome and epigenome analysis identifies a novel candidate gene for pancreatic cancer. *BMC Med Genomics* 6, 33, doi: 10.1186/1755-8794-6-33 [pii](2013).

48 Kim, I. G., Lee, J. H., Kim, S. Y., Kim, J. Y. & Cho, E. W. Fibulin-3 negatively regulates ALDH1 via c-MET suppression and increases gamma-radiation-induced sensitivity in some pancreatic cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 454, 369-375, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.084 [pii](2014).

49 Golubovskaya, V. et al. Down-regulation of ALDH1A3, CD44 or MDR1 sensitizes resistant cancer cells to FAK autophosphorylation inhibitor Y15. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 1613-1631, doi: 10.1007/s00432-015-1924-3 (2015).

50 Canino, C. et al. A STAT3-NFkB/DDIT3/CEBPbeta axis modulates ALDH1A3 expression in chemoresistant cell subpopulations. *Oncotarget* 6, 12637-12653, doi:10.18632/oncotarget.3703 [pii](2015).

51 Cortes-Dericks, L., Froment, L., Boesch, R., Schmid, R. A. & Karoubi, G. Cisplatin-resistant cells in malignant pleural mesothelioma cell lines show ALDH (high)CD44(+) phenotype and sphere-forming capacity. *BMC Cancer* 14, 304, doi: 10.1186/1471-2407-14-304 [pii](2014).

52 di Martino, S. et al. HSP90 inhibition alters the chemotherapy-driven rearrangement of the oncogenic secretome. *Oncogene* 37, 1369-1385, doi: 10.1038/s41388-017-0044-8 [pii](2018).

53 Casanova-Salas, I. et al. MiR-187 Targets the Androgen-Regulated Gene ALDH1A3 in Prostate Cancer. *PLoS One* 10, e0125576, doi: 10.1371/journal.pone.0125576 [pii](2015).

54 Kashii-Magaribuchi, K. et al. Induced Expression of Cancer Stem Cell Markers ALDH1 A3 and Sox-2 in Hierarchical Reconstitution of Apoptosis-resistant

10

20

30

40

50

- Human Breast Cancer Cells. *Acta Histochem Cytochem* 49, 149-158, doi: 10.1267/ahc.16031 JST.JSTAGE/ahc/16031 [pii](2016).
- 55 Marcato, P. et al. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. *Mol Oncol* 9, 17-31, doi: 10.1016/j.molone.2014.07.010 S1574-7891(14)00165-3 [pii] (2015).
- 56 Thomas, M. L. et al. Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1 A3. *Mol Oncol* 10, 1485-1496, doi:S1574-7891(16)30085-0 [pii]10.1016/j.molonc.2016.08.004 (2016).
- 57 Chen, M. H. et al. ALDH1 A3, the Major Aldehyde Dehydrogenase Isoform in Human Cholangiocarcinoma Cells, Affects Prognosis and Gemcitabine Resistance in Cholangiocarcinoma Patients. *Clin Cancer Res* 22, 4225-4235, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-18001078-0432. CCR-15-1800 [pii] (2016).
- 58 Zhang, W. et al. Genome-wide DNA methylation profiling identifies ALDH1 A3 promoter methylation as a prognostic predictor in G-CIMP-primary glioblastoma. *Cancer Lett* 328, 120-125, doi: 10.1016/j.canlet.2012.08.033 S0304-3835(12)00534-4 [pii](2013).
- 59 Yang, Z. L. et al. Positive ALDH1 A3 and negative GPX3 expressions are biomarkers for poor prognosis of gallbladder cancer. *Dis Markers* 35, 163-172, doi: 10.1155/2013/187043(2013).
- 60 Trasino, S. E., Harrison, E. H. & Wang, T. T. Androgen regulation of aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) in the androgen-responsive human prostate cancer cell line LNCaP. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 762-771, doi:232/6/762 [pii](2007).
- 61 Coyle, K. M. et al. Breast cancer subtype dictates DNA methylation and ALDH1A3-mediated expression of tumor suppressor RARRES1. *Oncotarget* 7, 44096-44112, doi: 10.18632/oncotarget.9858 9858 [pii] (2016).
- 62 Croker, A. K. et al. Differential Functional Roles of ALDH1 A1 and ALDH1 A3 in Mediating Metastatic Behavior and Therapy Resistance of Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 18, doi:E2039 [pii]10.3390/ijms18102039 ijms18102039 [pii](2017).
- 63 Shimamura, M., Kurashige, T., Mitsutake, N. & Nagayama, Y. Aldehyde dehydrogenase activity plays no functional role in stem cell-like properties in anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocrine* 55, 934-943, doi:10.1007/s12020-016-1224-y10.1007/s12020-016-1224-y [pii](2017).
- 64 Moreb, J. S. et al. ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Mol Cancer* 7, 87, doi:10.1186/1476-4598-7-87 1476-4598-7-87 [pii](2008).
- 65 Moreb, J. S. et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1 A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact* 195, 52-60, doi:10.1016/j.cbi.2011.10.007S0009-2797(11)00311-5 [pii](2012).
- 66 Liu, Y. et al. ALDH1 A1 mRNA expression in association with prognosis of triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 6, 41360-41369, doi:10.18632/oncotarget.6023 6023 [pii] (2015).
- 67 Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. & Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 7, 11018-11032, doi:10.18632/Oncotarget.6920 6920 [pii] (2016).
- 68 Koppaka, V. et al. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical

10

20

30

40

50

nical application. Pharmacol Rev 64, 520-539, doi:10. H24/pr.111.005538 pr.111.005538 [pii] (2012).

69 Yasgar, A. et al. A High-Content Assay Enables Automated Screening and Identification of Small Molecules with Specific ALDH1A1-Inhibitory Activity. PLoS One 12, e0170937, doi:10.1371/journal.pone.0170937 PONE-D-16-39942 [pii] (2017).

70 Gibb, Z., Lambourne, S. R., Curry, B. T., Hall, S. E. & Aitken, R. J. Aldehyde Dehydrogenase Plays a Pivotal Role in Maintenance of Stallion Sperm Motility. Biol Reprod 94, 133, doi:10.1095/biolreprod.116.140509 biolreprod.116.140509 [pii] (2016).

71 Kurth, I. et al. Cancer stem cell related markers of radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. Oncotarget 6, 34494-34509, doi:10.18632/oncotarget.5417 5417 [pii] (2015).

72 Piskounova, E. et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. Nature 527, 186-191, doi:10.1038/nature15726 nature15726 [pii] (2015).

【0218】

本明細書に引用される全ての特許、公開された出願および参考文献の教示は、その全体が参照により援用される。

【0219】

例示的な実施形態が特に示され、そして説明されたが、添付の特許請求の範囲によって包含される実施形態の範囲から逸脱することなく、形態および詳細において様々な変更を行うことができることが当業者によって理解されよう。

【符号の説明】

【0220】

図1A

Cells 細胞

Lead name リード名

図1B

Drug Concentration 薬物濃度

Control 対照

Poly. ポリ

Linear 線状

図1C

High 高

Drug Concentration 薬物濃度

Control 対照

Poly. ポリ

Linear 線状

図2A

Count カウント

Specimen 標本

stable expression 安定発現

図2B

Specimen 標本

contour 輪郭

transfectants トランスフェクタント

図3A

positive 陽性

Pancreatic 膵臓

10

20

30

40

50

Mouse Melanoma マウス黒色腫

Prostate 前立腺

Lung 肺

Colon 結腸

Liver 肝臓

Melanoma 黒色腫

Glioblastoma 膠芽腫

Prostate 前立腺

図3B

Activity 活性

Breast 乳

Colon 結腸

Liver 肝臓

Lung 肺

Melanoma 黒色腫

Pancreatic 膵臓

Prostate 前立腺

Control 対照

Cancer cellline 癌細胞株

図4A

specimen-boneMarrow 標本-骨髓

contour 輪郭

図4B

specimen-BoneMarrow 標本-骨髓

図5A

Day 18, 22, 25, 28, 32 18、22、25、28、32日目

intravenous 静脈内

Day 1 1日目

Tail-vein injection 尾静脈注射

cells 細胞

Day 16 16日目

normalized 正規化

Day 18.5, 22.5, 25.5, 28.5, 32.5 18.5、22.5、25.5、28.5、32.5日目

Paclitaxel intraperitoneal パクリタキセル腹腔内

Day 36 36日目

Final BLI measurement 最終BLI測定

図5B

Lung Metastasis 肺転移

Vehicle 溶媒

Days 日

図6A

Day 9, 11, 13, 16 9、11、13、16日目

MBE1 or vehicle intraperitoneal MBE1または溶媒腹腔内

Day 1 1日目

Intra-cardiac injection 心臓内注射

cells 細胞

Day 8 8日目

normalized 正規化

Paclitaxel intraperitoneal パクリタキセル腹腔内

Day 27 27日目

10

20

30

40

50

measurement 測定

図6B

Bone Metastasis 骨転移

Days 日

Vehicle 溶媒

One-tailed 片側

図7B

Tumor Volume 腫瘍体積

Days 日

図7C

Tumor mass 腫瘍量

図8A

Bioluminescence 生物発光

Days 日

Vector ベクター

図8B

Lung nodes 肺結節

図9A

Wild-typeCell 野生型細胞

Vector ベクター

Knockout ノックアウト

図9B

Bone Metastasis 骨転移

Days 日

Vector ベクター

Knockout ノックアウト

Rescue レスキュー

図9C

Bone metastasis-free Survival 骨転移のない生存

Days 日

Knockout ノックアウト

Rescue レスキュー

Vector ベクター

図10A

Probability 確率

Time (months) 期間 (月)

logrank ログランク

Expression 発現

low 低

high 高

図10B

Probability 確率

Time (months) 期間 (月)

logrank ログランク

Expression 発現

low 低

high 高

図10C

Probability 確率

Time (months) 期間 (月)

10

20

30

40

50

logrank ログランク

Expression 発現

low 低

high 高

図10D

Probability 確率

logrank ログランク

Expression 発現

low 低

high 高

図10E

Probability 確率

Time (months) 期間 (月)

logrank ログランク

Expression 発現

low 低

high 高

図10F

Probability 確率

Time (months) 期間 (月)

logrank ログランク

Expression 発現

low 低

high 高

図10G

Survival probability 生存確率

Time in days 日単位の時間

Expression Level 発現レベル

High expression 高発現

Low/Medium-expression 低/中発現

low/medium 低/中

high 高

図10H

Survival probability 生存確率

Time in days 日単位の時間

Expression Level 発現レベル

High expression 高発現

Low/Medium-expression 低/中発現

low/medium 低/中

high 高

図11A

Expression 発現

Chemotherapy 化学療法

Normal 正常

Basal 基底

図11B

Basal 基底

Survival 生存

Months 月

Low expression 低発現

10

20

30

40

50

High expression 高発現

Normal 正常

Survival 生存

Months 月

High expression 高発現

Low expression 低発現

図12

Activity 活性

median 中央値

Inhibitor 阻害剤

Control 対照

図13A

β -actin β アクチン

図13B

positive 陽性

Vector ベクター

図13C

positive 陽性

Vector ベクター

図14

Lung Metastasis 肺転移

3 Doses vehicle or MBE1.5 Day 17, 19, 21 And Paclitaxel 3つの用量の溶媒またはMBE1.5 17、19、21日目およびパクリタキセル

Vehicle 溶媒

図15A

Treatment period 処理期間

Body Mass 体重

Days 日

Vehicle 溶媒

図15B

Tumor volume 腫瘍体積

Days 日

Vehicle 溶媒

図16A

Treatment period 処理期間

Lung Metastasis Bioluminescence 肺転移生物発光

Days 日

Vehicle 溶媒

図16B

Survival 生存率

Days 日

Hazard ratio ハザード比

p-value p値

Untreated 非処理

Paclitaxel パクリタキセル

Vehicle 溶媒

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

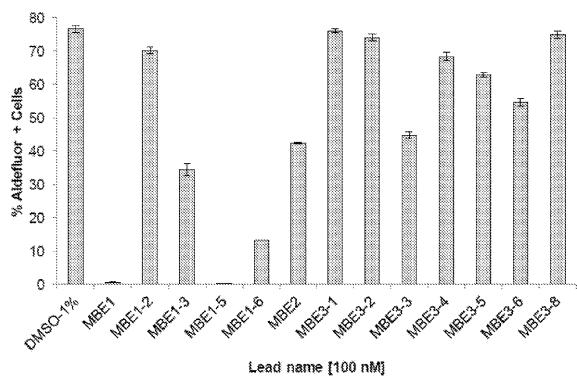


FIG. 1A

【図 1 B】

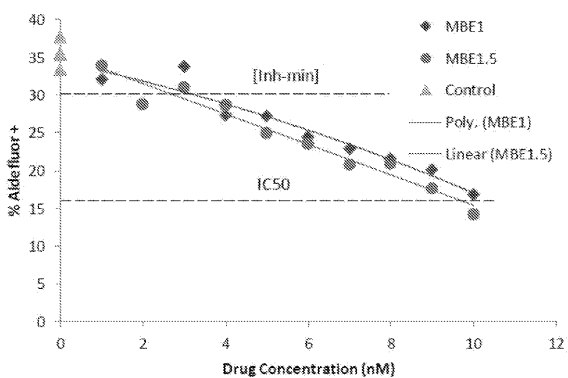


FIG. 1B

【図 1 C】

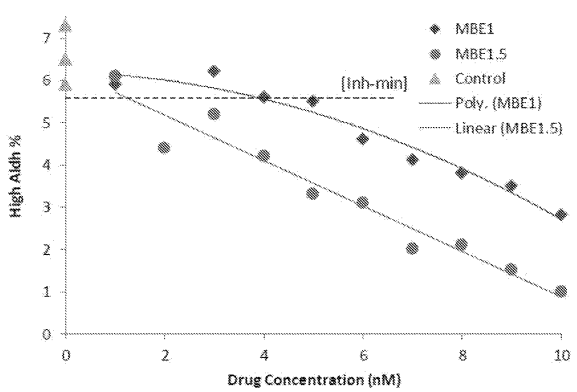


FIG. 1C

【図 2 A】

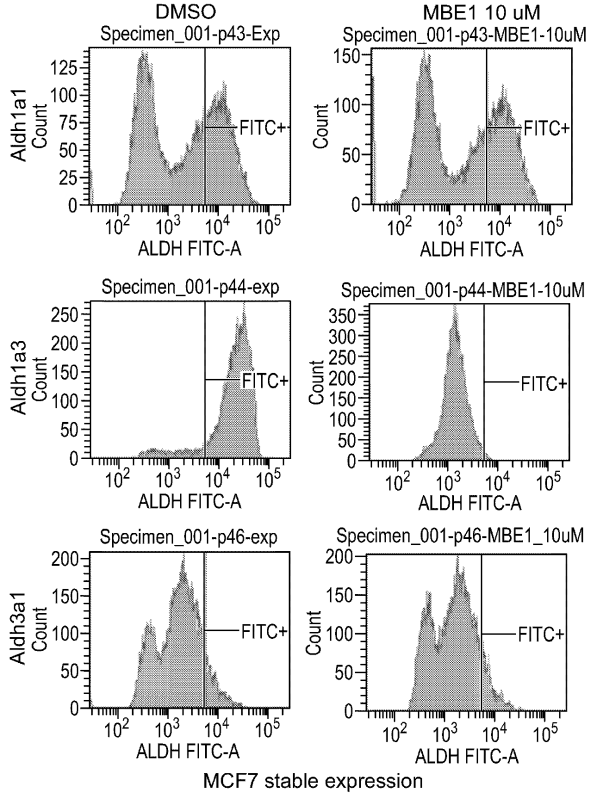


FIG. 2A

10

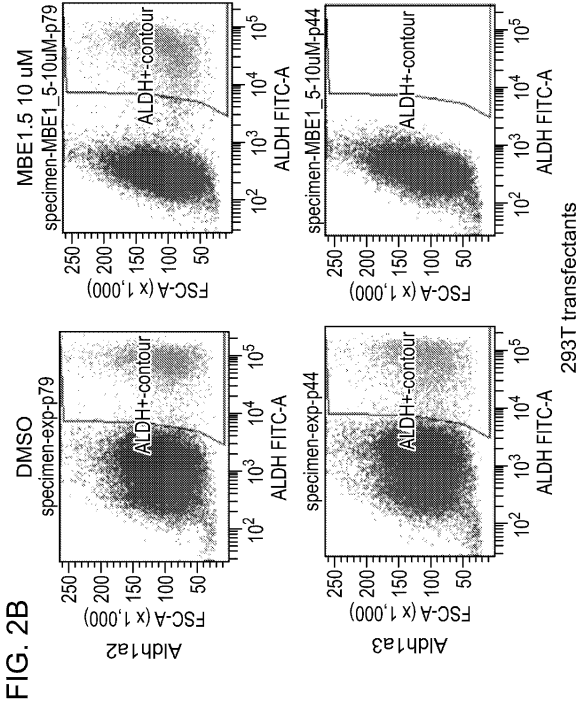
20

30

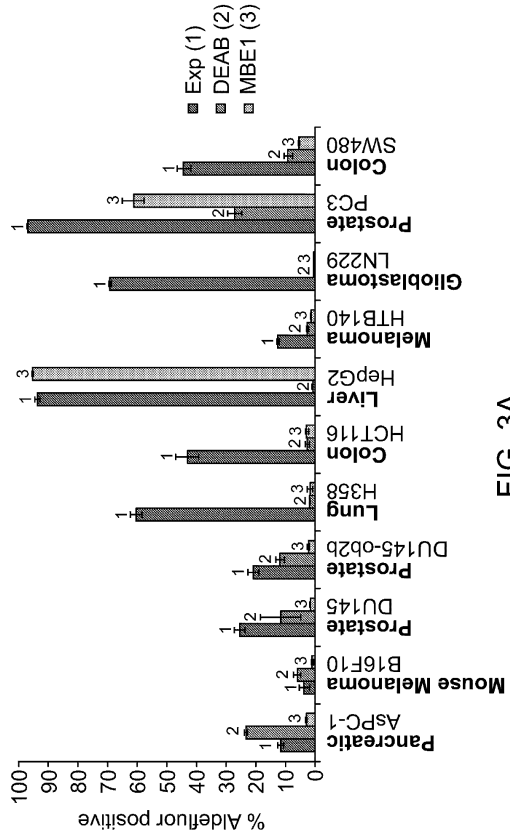
40

50

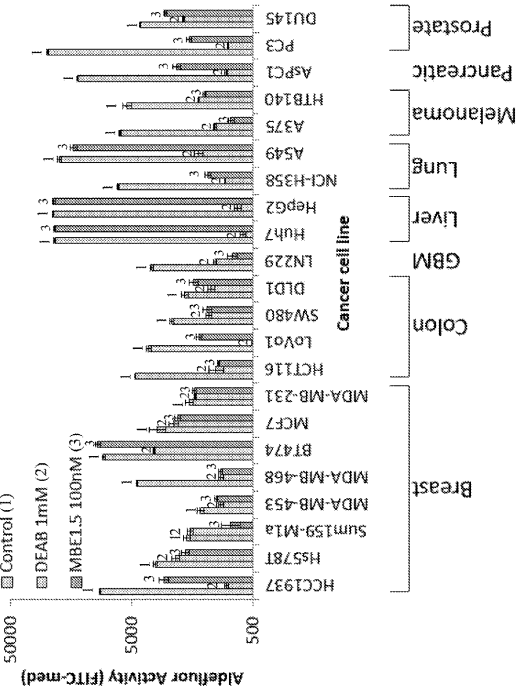
【図 2 B】



【図 3 A】



【図 3 B】



【図 4 A】

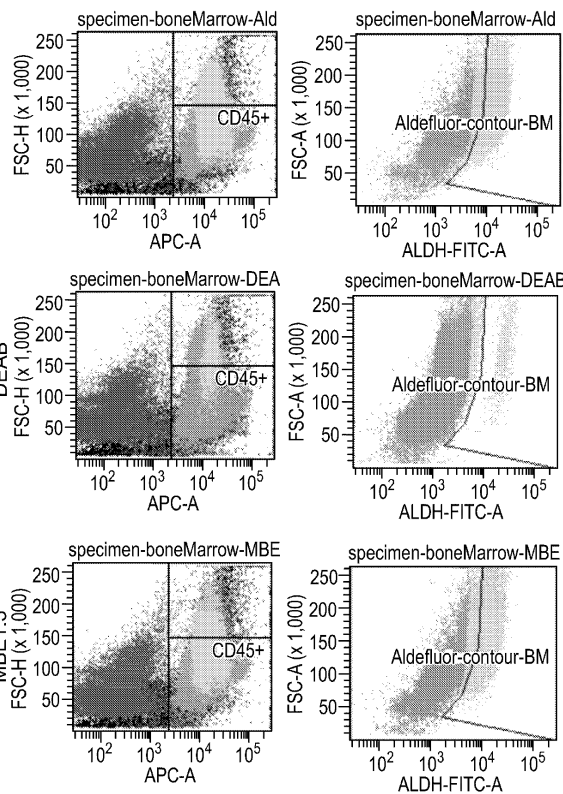


FIG. 4A

【図 4 B】

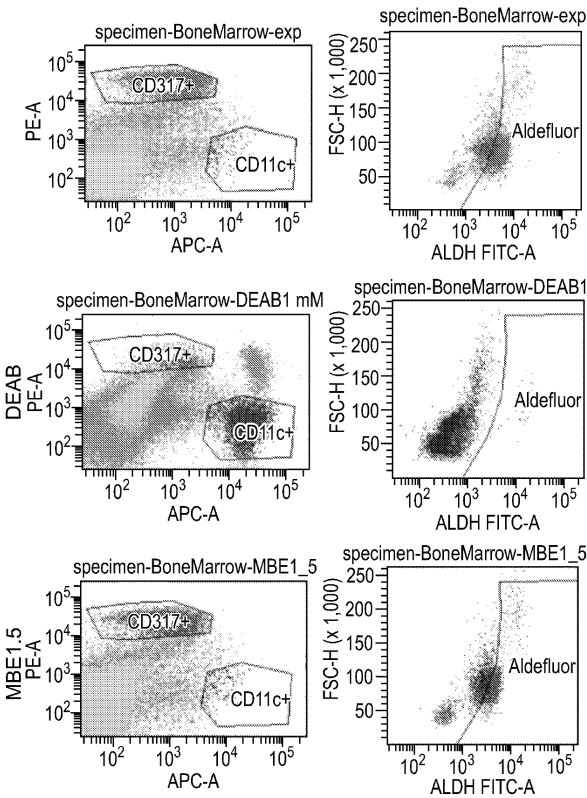


FIG. 4B

【図 5 A】

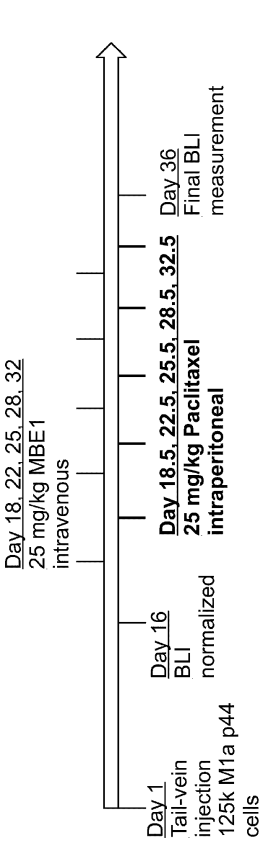


FIG. 5A

【図 5 B】

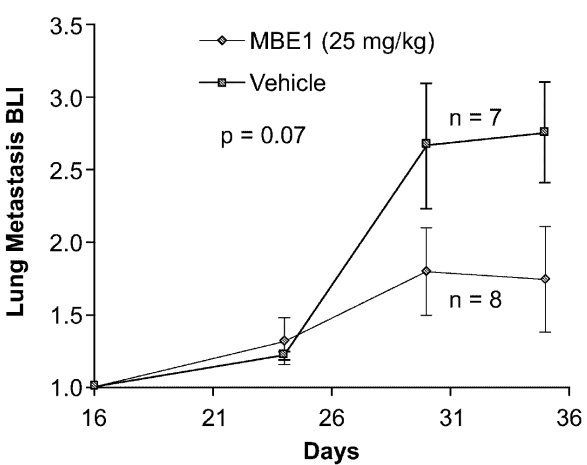


FIG. 5B

【図 6 A】

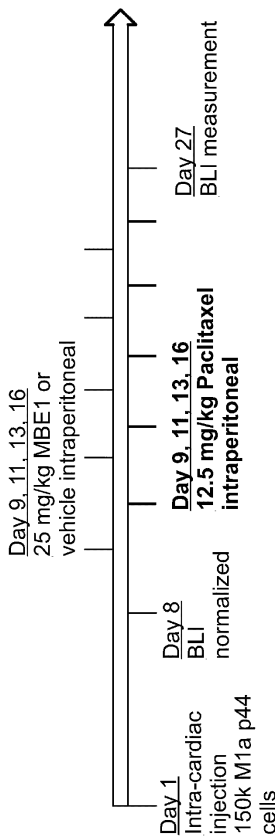


FIG. 6A

10

20

30

40

50

【図 6 B】

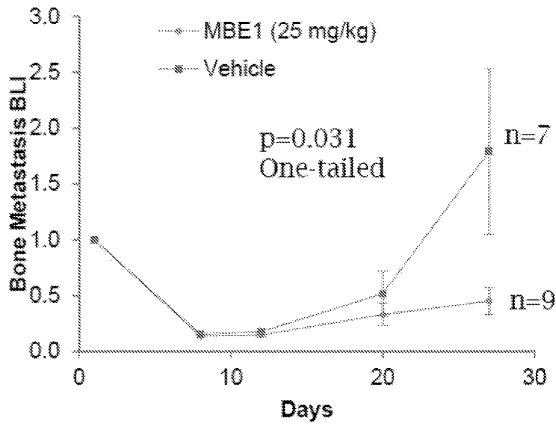


FIG. 6B

【図 7 A】

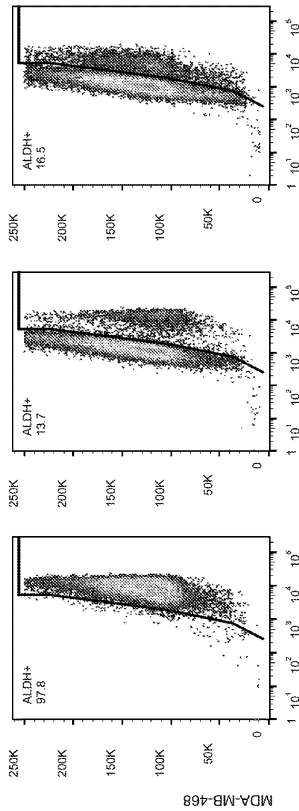


FIG. 7A

【図 7 B】

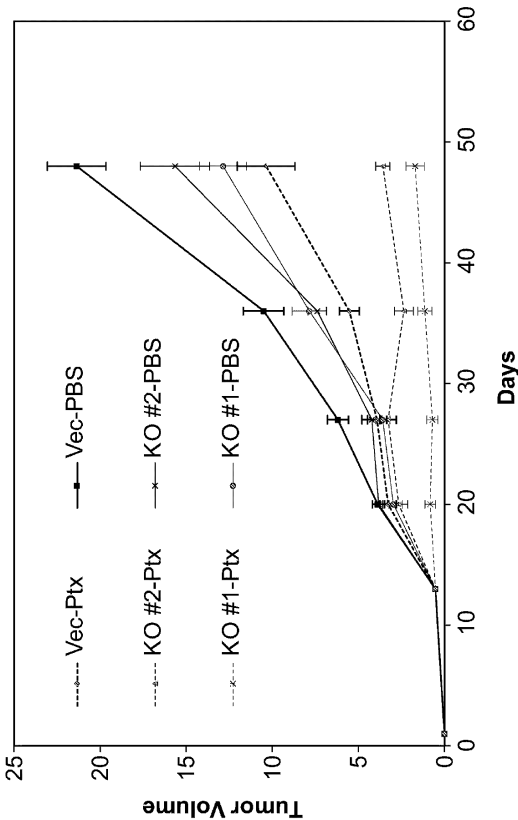


FIG. 7B

【図 7 C】

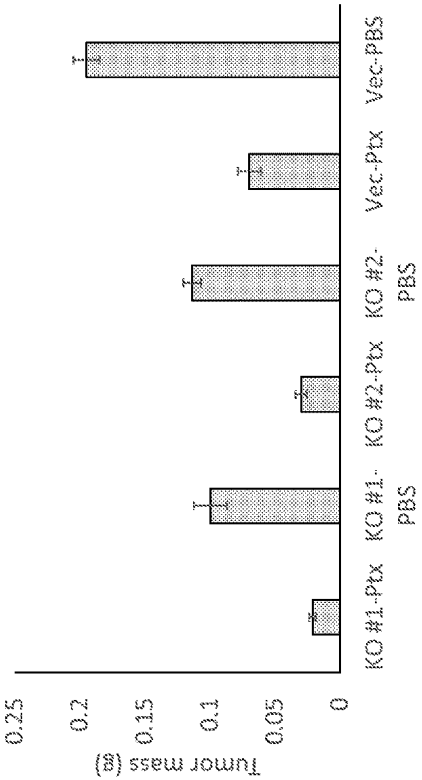


FIG. 7C

10

20

30

40

50

【図 8 A】

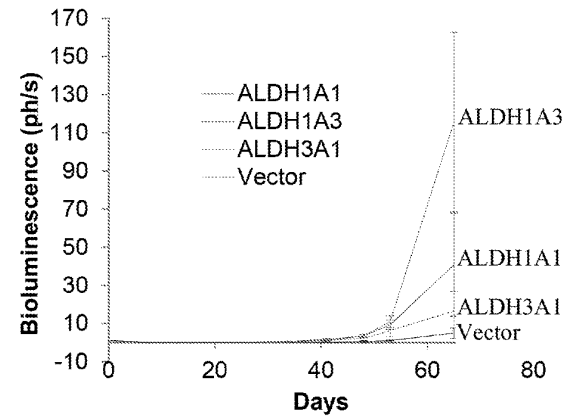


FIG. 8A

【図 8 B】

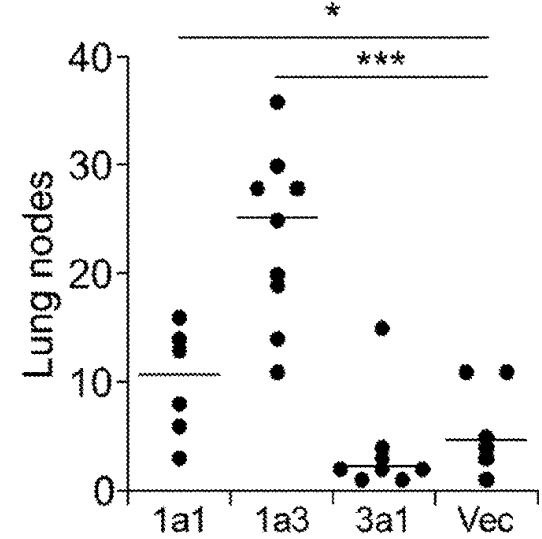


FIG. 8B

【図 9 A】

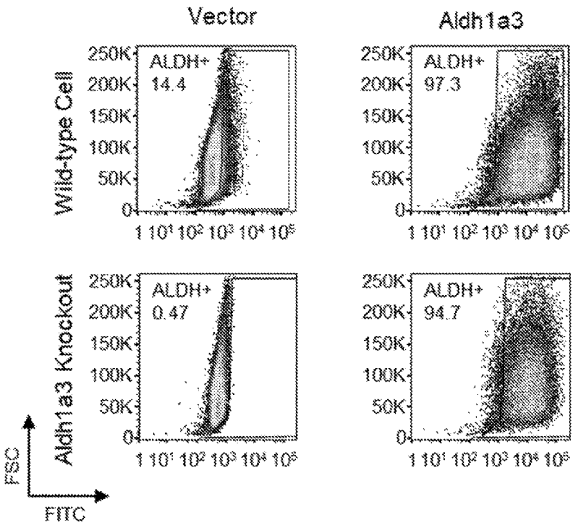


FIG. 9A

【図 9 B】

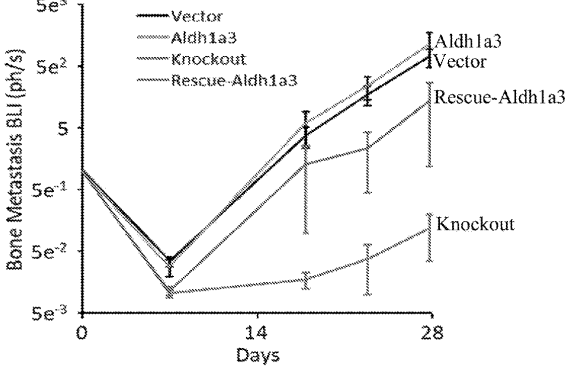


FIG. 9B

10

20

30

40

50

【図 9 C】

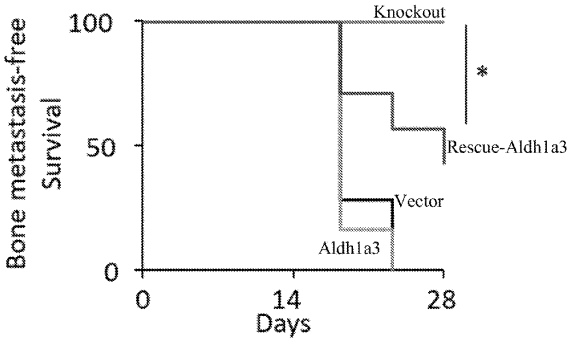


FIG. 9C

【図 10 A】

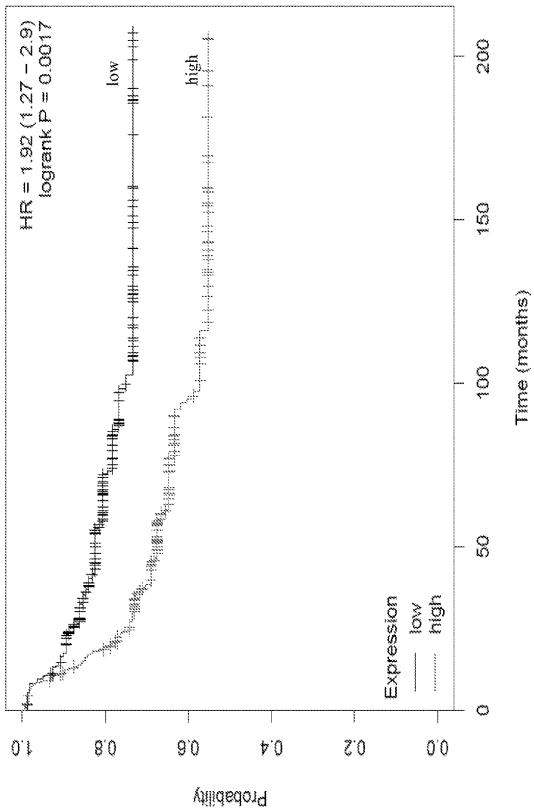


FIG. 10A

【図 10 B】

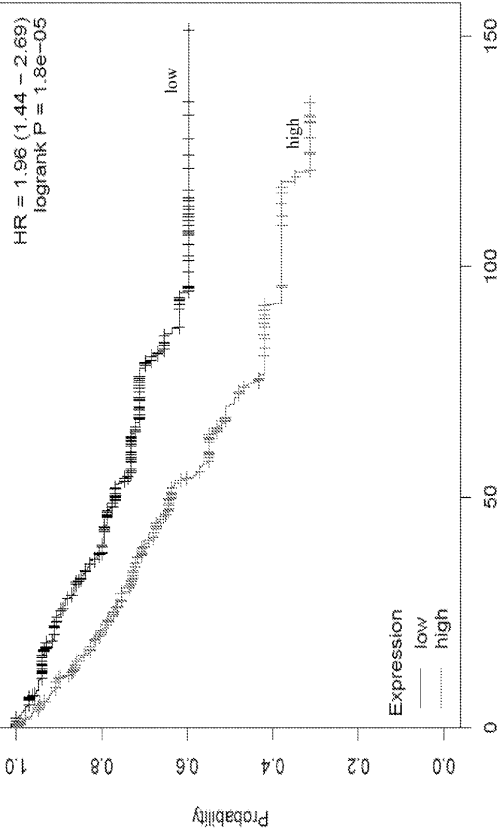


FIG. 10B

【図 10 C】

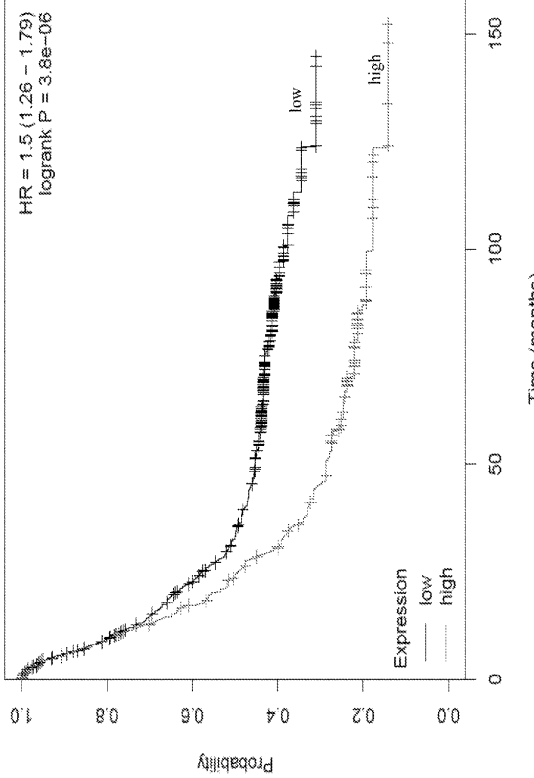


FIG. 10C

10

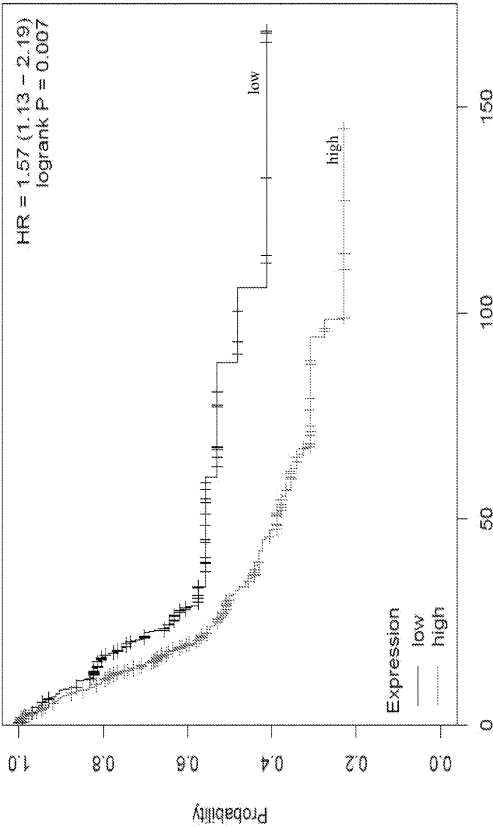
20

30

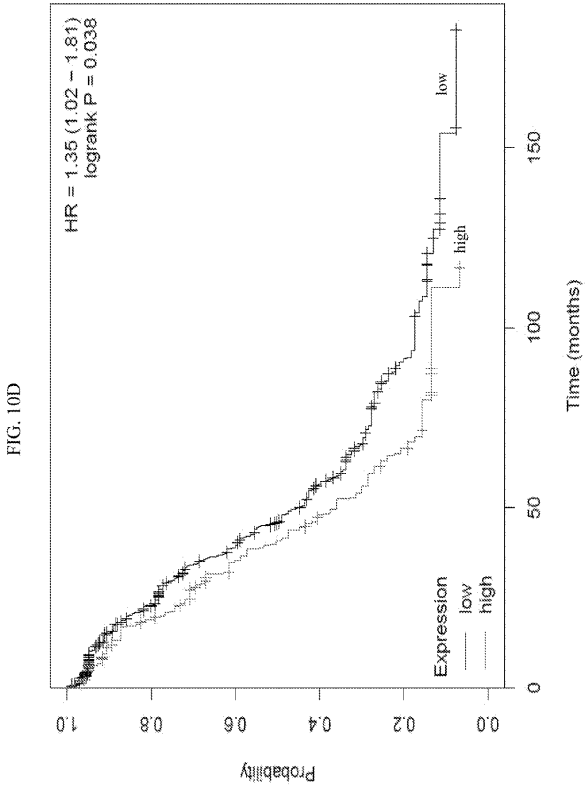
40

50

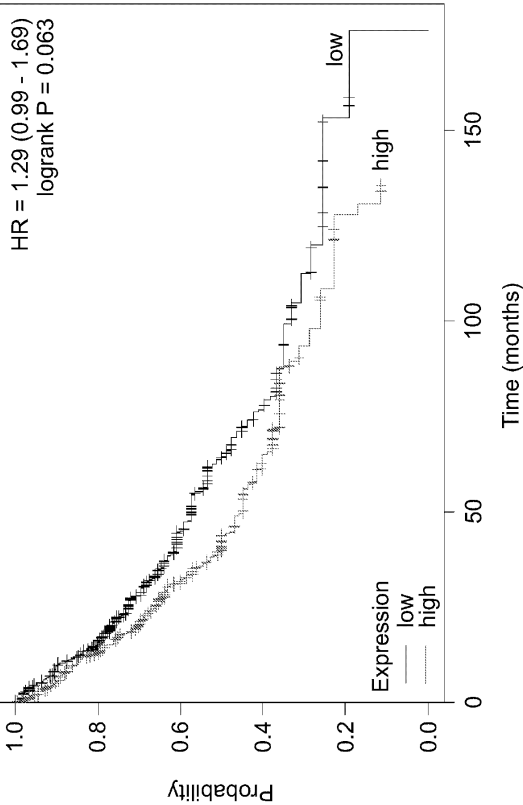
【図 10 D】



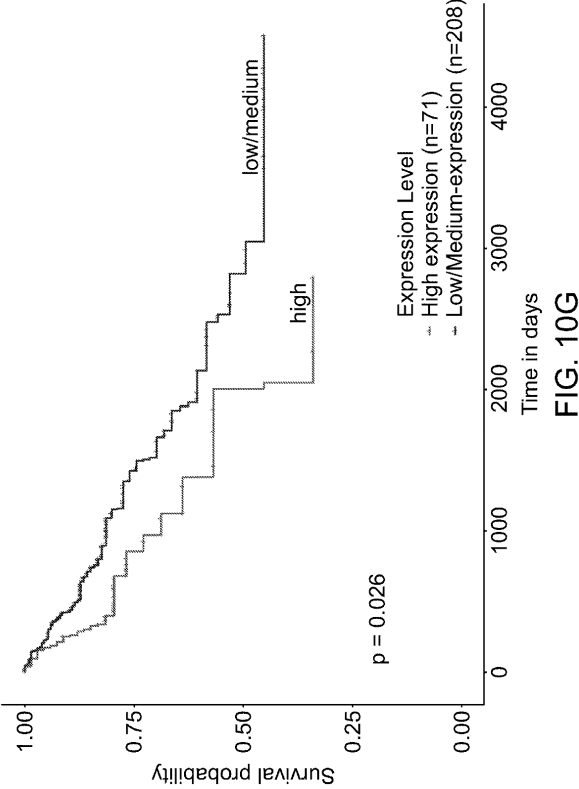
【図 10 E】



【図 10 F】



【図 10 G】



10

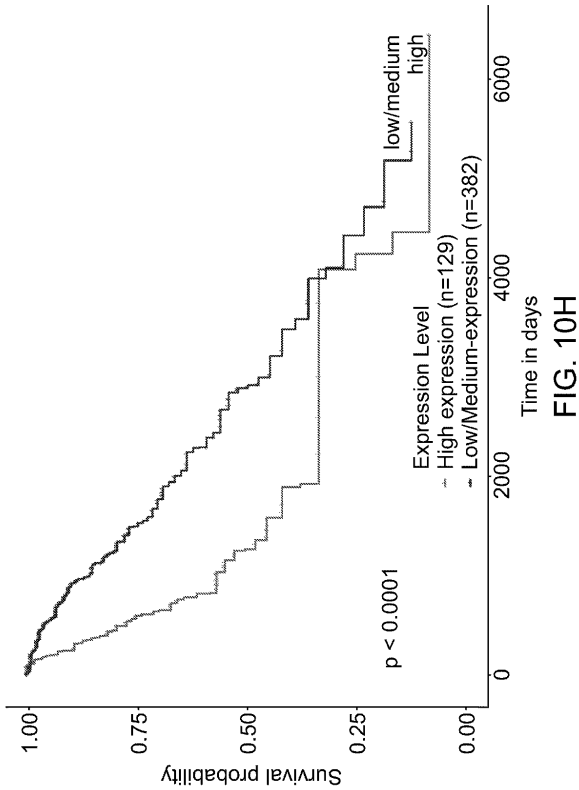
20

30

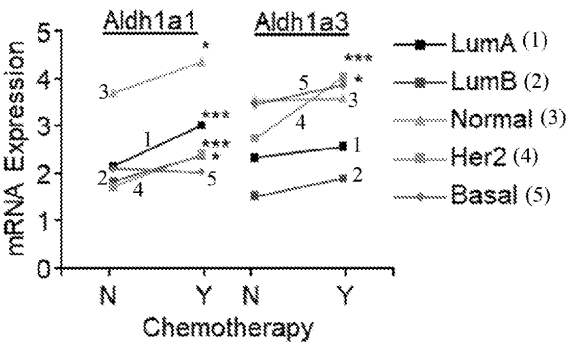
40

50

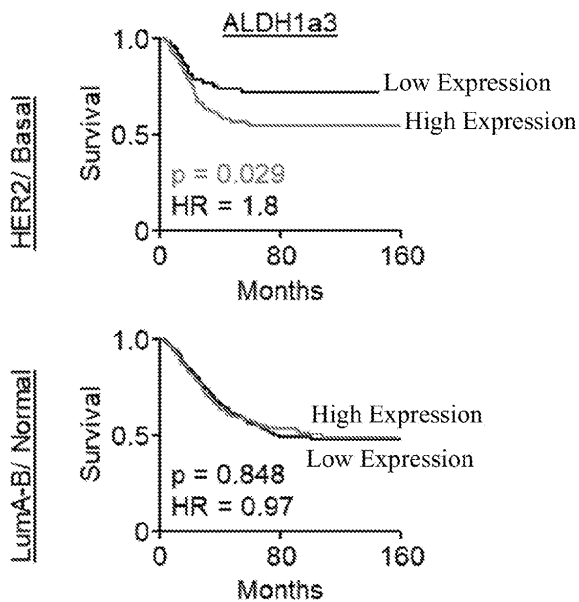
【図 10 H】



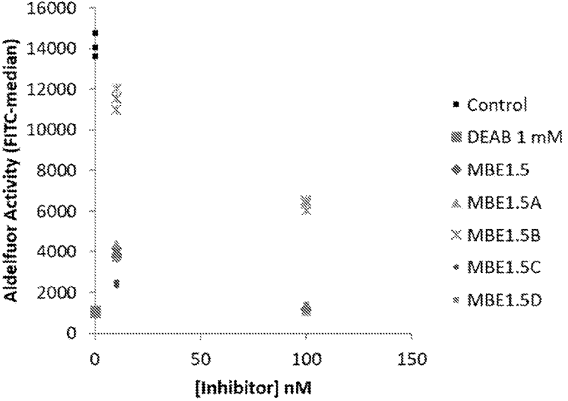
【図 11 A】



【図 11 B】



【図 12】



10

20

30

40

50

【図 1 3 A】

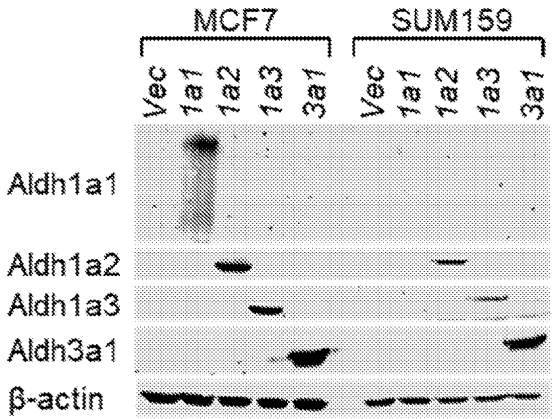


FIG. 13A

【図 1 3 B】

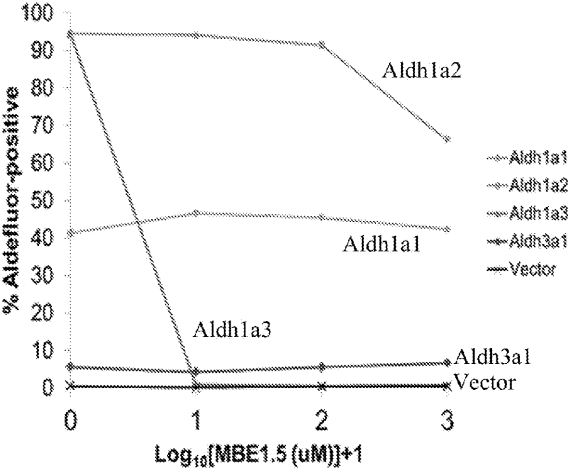


FIG. 13B

【図 1 3 C】

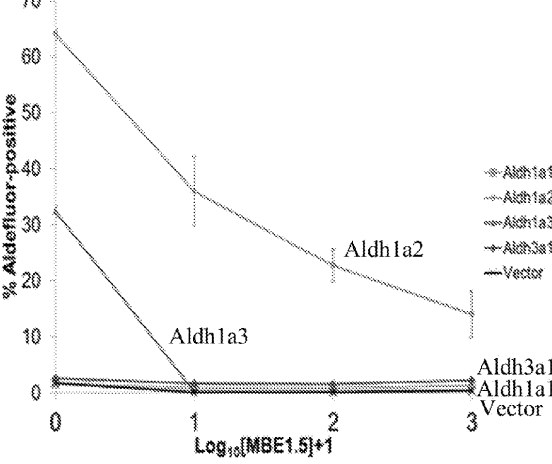


FIG. 13C

【図 1 4】

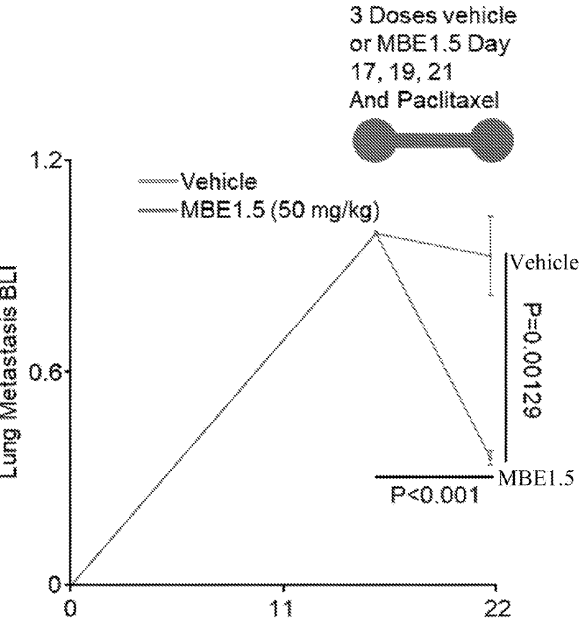


FIG. 14

【図 15 A】

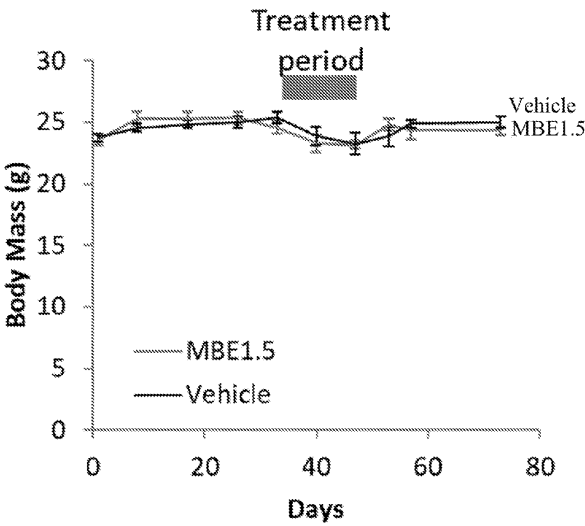


FIG. 15A

【図 15 B】

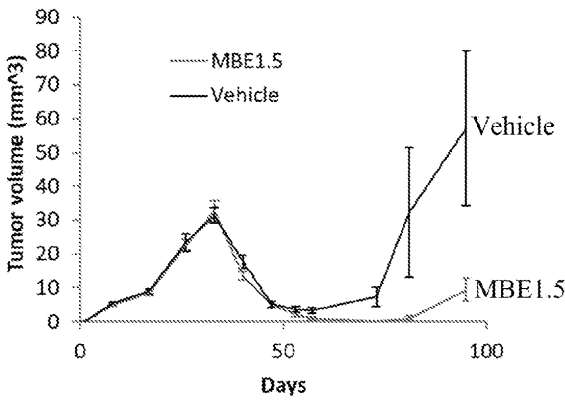


FIG. 15B

【図 16 A】

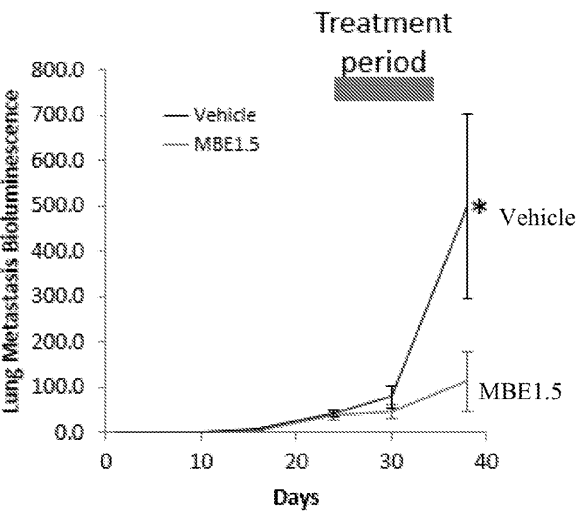


FIG. 16A

【図 16 B】

Hazard ratio: 0.165 (MBE1.5 vs Veh)
p-value = 0.009

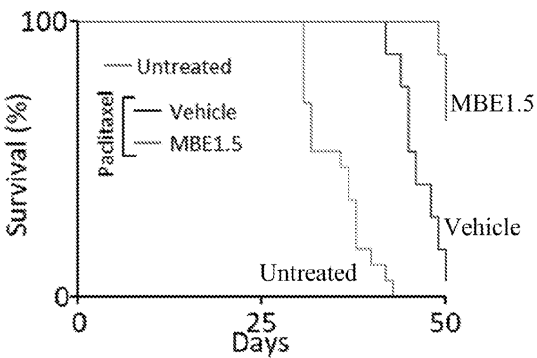


FIG. 16B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 31/4704(2006.01)
C 0 7 D 401/12 (2006.01)

F I

A 6 1 K 31/4704
C 0 7 D 401/12

C S P

(74)代理人 100183656

弁理士 庄司 晃

(72)発明者 エスポジート, マーク

アメリカ, ニュージャージー州 0 8 5 4 4, プリンストン, 8 7 プロスペクト アヴェニュー

(72)発明者 カン, イービン

アメリカ, ニュージャージー州 0 8 5 4 4, プリンストン, 8 7 プロスペクト アヴェニュー

審査官 早川 裕之

(56)参考文献

特開 2 0 0 6 - 3 4 9 9 0 2 (J P , A)

特開平 0 1 - 3 1 9 4 5 3 (J P , A)

特開昭 6 3 - 1 9 2 7 7 3 (J P , A)

特開昭 6 1 - 1 4 5 1 6 2 (J P , A)

Huaxue Shiji , 2005年, 2 7 , 9 5 - 9 6

CAPLUS (STN) [online] , 2005年, CAS 登録番号: 635674-82-7

Huaxue Shiji , 2003年, 2 5 , 2 2 2 - 2 2 4

CAPLUS (STN) [online] , 2003年, CAS 登録番号: 635674-82-7

Org. Biomol. Chem. , 2019年, 17 , 4629-4639

J. Chem. Inf. Model. , 2017年, 57 , 1309-1320

REGISTRY (STN) [online] , 2018年07月30日, N-(7-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-2-oxo-6-quinolinyl)-4-(tetrahydro-2H-pyran-3-yl)-benzamide他、1210化合物

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 D

A 6 1 P

A 6 1 K 3 1 /

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)