

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6389884号
(P6389884)

(45) 発行日 平成30年9月12日 (2018.9.12)

(24) 登録日 平成30年8月24日 (2018.8.24)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	31/404	(2006.01)	A 6 1 K	31/404	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
C O 7 D	209/38	(2006.01)	C O 7 D	209/38	C S P

請求項の数 22 (全 87 頁)

(21) 出願番号 特願2016-526034 (P2016-526034)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月20日 (2014.10.20)
 (65) 公表番号 特表2016-534084 (P2016-534084A)
 (43) 公表日 平成28年11月4日 (2016.11.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/061418
 (87) 国際公開番号 W02015/061229
 (87) 国際公開日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 審査請求日 平成29年10月3日 (2017.10.3)
 (31) 優先権主張番号 61/895,308
 (32) 優先日 平成25年10月24日 (2013.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 594140915
 ジョージタウン・ユニバーシティ
 GEORGETOWN UNIVERSITY
 アメリカ合衆国ディー・シー20057、
 ワシントン、エヌ・ダブリュー、サーティ
 ーセブンス・アンド・オー・ストリート (番地の表示なし)
 (74) 代理人 100121728
 弁理士 井関 勝守
 (74) 代理人 100165803
 弁理士 金子 修平

最終頁に続く

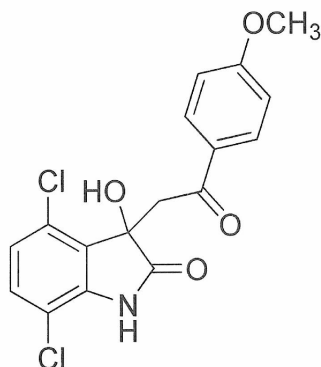
(54) 【発明の名称】 癌を治療するための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エキスピボで、腫瘍細胞を殺傷する、又は腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、
 式：

【化 1】



の構造である化合物、又はその薬学的に許容される塩を、細胞に有効量接触させることからなり、

前記腫瘍細胞は、肺腺癌細胞及び多形性膠芽腫細胞からなる群より選ばれる、方法。

【請求項 2】

前記多形性膠芽腫細胞は、D K M G細胞、D B T R G細胞、4 2 M G B A細胞、G A M G細胞、U 8 7 M G細胞、H 4細胞、及び8 M G B A細胞からなる群より選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記肺腺癌細胞は、A 5 4 9細胞、H 1 9 4 4細胞、H 3 5 8細胞、H 1 3 9 5細胞、及びH 5 9 6細胞からなる群より選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞は、哺乳動物の細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 4 に記載の方法。

10

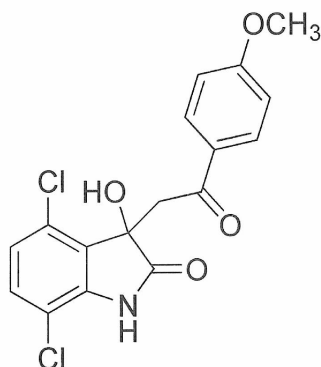
【請求項 6】

前記腫瘍細胞は、F L I 1、E T V 1、E T V 4、E R G、E T S 1、及びE T S 2 からなる群より選ばれる E T S 遺伝子を含む転座からなるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

癌を治療するための医薬組成物であって、
式：

【化 2】



20

の構造である化合物、又はその薬学的に許容される塩と、

30

薬学的に許容される添加剤とからなり、

前記癌は、肺腺癌及び多形性膠芽腫からなる群より選ばれる、医薬組成物。

【請求項 8】

追加の化学療法薬剤を含む、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記追加の化学療法薬剤は、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、エトポシド、及びビンブラスチンからなる群より選ばれる、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記化合物は、非経口投与用の化合物である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記化合物は、実質 (S) エナンチオマーからなる、請求項 7 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 12】

添加剤である - ヒドロキシプロピルシクロデキストリンを含む、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

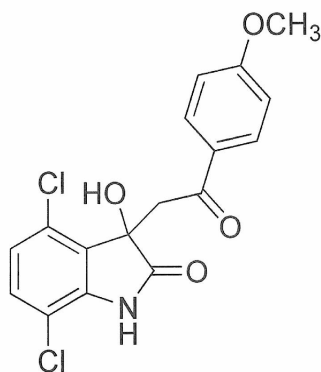
前記癌は、F L I 1、E T V 1、E T V 4、E R G、E T S 1、及びE T S 2 からなる群より選ばれる E T S 遺伝子を含む転座からなる、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

癌の治療薬の調製のための、化合物の使用であって、
前記化合物は、式：

50

【化 3】



10

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩であり、
前記癌は、肺腺癌及び多形性膠芽腫からなる群より選ばれる、化合物の使用。

【請求項 15】

追加の化学療法薬剤との組み合わせである、請求項 14 に記載の化合物の使用。

【請求項 16】

前記追加の化学療法薬剤は、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、エトポシド、及びビンブラスチンからなる群より選ばれる、請求項 15 に記載の化合物の使用。

【請求項 17】

前記化合物は、非経口投与用の化合物である、請求項 14 に記載の化合物の使用。

20

【請求項 18】

前記化合物は、実質 (S) エナンチオマーからなる、請求項 14 に記載の化合物の使用。

【請求項 19】

添加剤である - ヒドロキシプロピルシクロデキストリンとの組み合わせである、請求項 14 に記載の化合物の使用。

【請求項 20】

前記癌は、哺乳動物の癌である、請求項 14 に記載の化合物の使用。

【請求項 21】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 20 に記載の化合物の使用。

30

【請求項 22】

前記癌は、FLI1、ETV1、ETV4、ERG、ETS1、及びETS2からなる群より選ばれるETS遺伝子を含む転座からなる、請求項 14 に記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の参照]

本出願は、米国仮出願第 61 / 895 , 308 号 (題名「癌を治療するための方法及び組成物」、2013 年 10 月 24 日出願) の利益を主張するものである。その内容は本明細書に参考として組み込まれる。

40

【0002】

[連邦政府資金による研究開発の記載]

本発明は、アメリカ国立衛生研究所により認定された NIH グラント / コントラクト番号第 R01CA138212 号、第 R01CA133662 号、及び第 RC4CA156509 号に基づき、米国政府の支援を受けてなされたものである。米国政府は本発明に特定の権利を有する。

【0003】

本発明は、癌の治療に関する方法及び組成物を提供している。該組成物は、多形性膠芽腫及び肺癌を含む癌の治療に有用である。

50

【背景技術】

【0004】

米国の中央脳腫瘍レジストリ (C B T R U S) には、50 州全てにおける原発性悪性脳腫瘍死亡者の総計が挙げられており、2012 年のコロンビア特別区においては、13700 名に上ると推測される。膠芽腫 (G B M) は、最も一般的な悪性脳腫瘍であり、外科的切除、術後放射線療法、及びテモゾロマイドによる化学療法で構成される標準的な三併用治療を行った場合でも、ヒトの平均生存期間は、僅か 14.6 カ月である。これら腫瘍の本質的な浸潤性、並びに放射線及び化学療法に対する内因的な耐性に起因して、この療法は殆ど効果がない。最適治療を行った場合でも、平均生存期間は 15 カ月未満であり、再発せずに 2 年間生存している患者は、僅か 10% である。患者の生存率及び生活の質を改善するために、膠芽腫及び他の癌に対して、新規治療標的が必要なことは明らかである。

10

【0005】

さらに、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍 (E S F T) は、小児、青年、及び若年成人の骨と軟組織に起こる高悪性度腫瘍である。これらの患者は化学療法に反応するが、転移性 E S F T になった患者の 75% ~ 80% は、高投与量の化学療法を行っても、5 年以内に死亡する (G r i e r , H . E e t a l . , N . E n g l . J . M e d . 3 4 8 , 6 9 4 - 7 0 1 (2 0 0 3)) 。E S F T は、よく特徴付けられた染色体転座を有する。この染色体転座は、22 番染色体に存在するユーイング肉腫遺伝子 (E W S) を、e t s ファミリー遺伝子、多くの場合は 11 番染色体に存在する F L I 1 (f r i e n d l e u k e m i a i n s e r t i o n 1) 遺伝子に結合させ、種々の融合タンパク質の発現につながる t (1 1 : 2 2) 転座である (A y k u t U r e n , J e f f r e y A T o r e s t s k y E w i n g ' s s a r c o m a o n c o p r o t e i n s E W S - F L I 1 : t h e p e r f e c t t a r g e t w i t h o u t a t h e r a p e u t i c a g e n t , F u t u r e O n c o l . 1 (4) , 5 2 1 - 5 2 8 (2 0 0 5)) 。

20

【0006】

インビトロ及びインビボ研究では、腫瘍性タンパク質である E W S - F L I 1 の除去は、E S T F 細胞株増殖の減少及び腫瘍容積の減少をもたらすことが証明された。E W S - F L I 1 は酵素活性を欠くが、R H A ヘリカーゼ A (R H A) は、E W S - F L I 1 で調節された腫瘍形成を促進するので、この 2 つのタンパク質の間のタンパク質間相互作用が、腫瘍増殖の維持に必要である (H y a r i y e N E r k i z a n e t a l . A s m a l l m o l e c u l e b l o c k i n g o n c o g e n i c p r o t e i n E W S - F l i 1 i n t e r a c t i n g w i t h R H A h e l i c a s e A i n h i b i t s g r o w t h o f E w i n g ' s s a r c o m a . N a t u r e M e d i c i n e 1 5 (7) 7 5 0 - 7 5 6 (2 0 0 9)) 。重要なタンパク質相互作用を破壊するパラダイムは、類似の転座を有する肉腫、及び M L L 転座を有する白血病を含む疾患の治療に有用性があり得る (H e l m a n L J , M e l t z e r P . M e c h a n i s m s o f s a r c o m a d e v e l o p m e n t . N a t R e v C a n c e r 2 0 0 3 ; 3 (9) : 6 8 5 - 9 4) 、及び P u i C H , R e l l i n g M V , D o w n i n g J R . A c u t e l y m p h o b l a s t i c l e u k e m i a . N E n g l J M e d 2 0 0 4 ; 3 5 0 (1 5) : 1 5 3 5 - 4 8) 。また、変性タンパク質は、それらの固有の生化学的性質に基づいて、優れた治療標的であり得る (C h e n g Y , L e G a l l T , O l d f i e l d C J , e t a l . R a t i o n a l d r u g d e s i g n v i a i n t r i n s i c a l l y d i s o r d e r e d p r o t e i n . T r e n d s B i o t e c h n o l 2 0 0 6 ; 2 4 (1 0) : 4 3 5 - 4 2) 。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

50

【非特許文献1】Grier, H. E et al., N. Engl. J. Med. 348, 694 - 701 (2003)

【非特許文献2】Aykut Uren, Jeffrey A Torestsky Ewing's sarcoma oncoproteins EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent, Future Oncol. 1(4), 521 - 528 (2005)

【非特許文献3】Hyariye N Erkizan et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interacting with RHA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nature Medicine 15(7) 750 - 756 (2009)

10

【非特許文献4】Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. Nat Rev Cancer 2003; 3(9): 685 - 94

【非特許文献5】Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2004; 350(15): 1535 - 48

【非特許文献6】Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, et al. Rational drug design via intrinsically disordered protein. Trends Biotechnol 2006; 24(10): 435 - 42

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

EWS-FLI1に向けられる、アンチセンス及びsiRNAを用いたインビトロ及び異種移植の研究が長年に渡って行われてきたが、送達及び安定性が不十分であり、これまでヒトの治療として実用的なものはない。したがって、ESFTのような疾患を治療するために、治療法の改善が必要とされる。

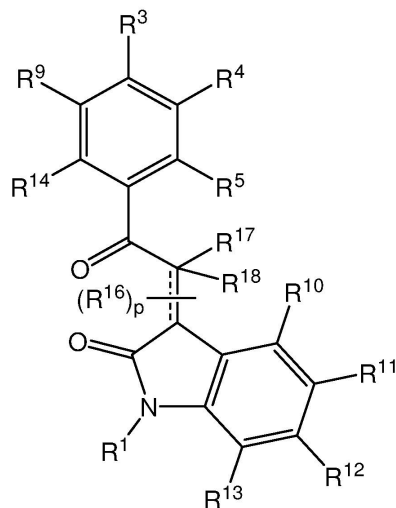
【課題を解決するための手段】

【0009】

30

一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な)第1の実施態様は、
式(I):

【化 1】



式 (I)

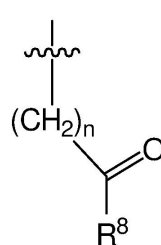
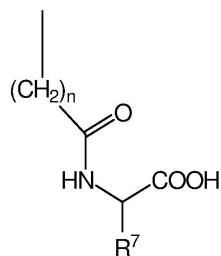
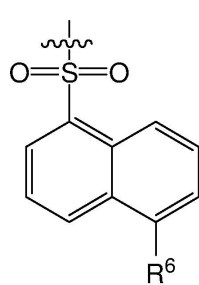
10

[式中、

R^1 は、水素、 C_{1-6} アルキル、1つのアミノ酸、互いに結合している2つのアミノ酸、互いに結合している3つのアミノ酸、

20

【化 2】



、及び

30

からなる群より選ばれ、

R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、 R^{14} 、 R^{17} 、及び R^{18} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、

R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、

40

R^6 は、 C_{1-6} ジアルキルアミンであり、

R^7 は、水素及び C_{1-6} アルキルからなる群より選ばれ、

R^8 及び R^{15} は、それぞれ独立して C_{1-6} アルキルであり、

各 R^{16} は、独立して水素、 $-OH$ 、又は C_{1-6} アルコキシであり、

n は、0 ~ 4 の整数であり、

p は、1 又は 3 であり、

破線は、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、及び R^{14} の少なくとも1つが $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群より選ばれるという条件で、シス及びトランスからなる群より選ばれる配置を有する任意の二重結合を表す] の化合物、又はその薬

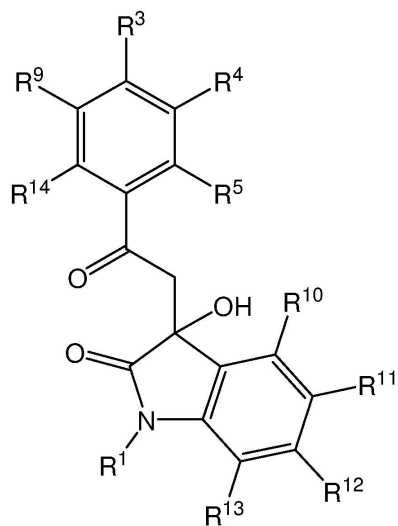
50

学的に許容される塩
を提供する。

【 0 0 1 0 】

第 1 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、式（ I ）の化合物は、式（ I a ）：

【 化 3 】



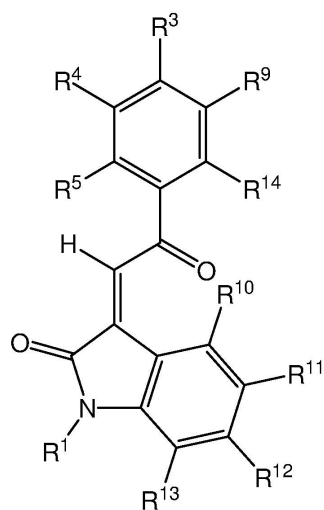
(I a)

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【 0 0 1 1 】

第 1 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、式（ I ）の化合物は、式（ I b ）：

【 化 4 】



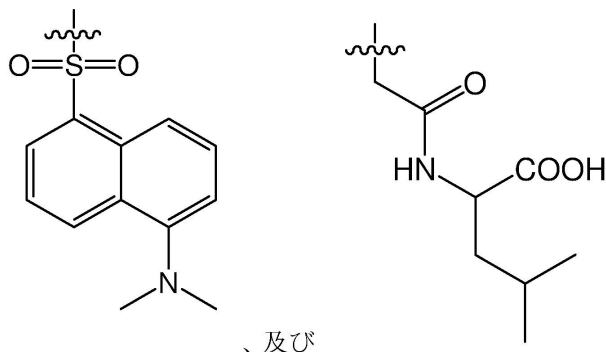
(I b)

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【 0 0 1 2 】

第 1 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^1 は、 Leu 、 Leu-Asp 、 Leu-Asp-Ala 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、

【 化 5 】



10

からなる群より選ばれる。

【 0 0 1 3 】

第 1 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^3 は、 $-\text{NH}(R^{15})$ 、 $-\text{N}(R^{15})_2$ 、及び $-\text{SR}^{15}$ から選ばれる。

【 0 0 1 4 】

第 1 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^3 は、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ である。

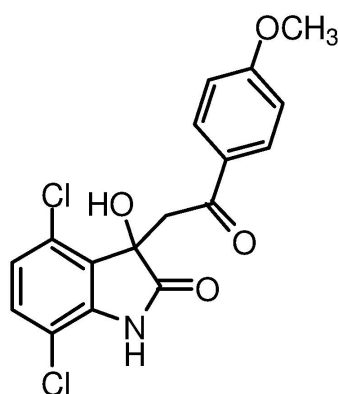
【 0 0 1 5 】

第 1 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^3 は、 $-\text{SCH}_3$ である。

【 0 0 1 6 】

第 1 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、式 (I) の化合物は、式：

【 化 6 】



40

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【 0 0 1 7 】

50

一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）第2の実施態様は、式（I）の化合物を、それを必要とする対象に有効量投与することを含む、癌の治療方法を提供する。

【0018】

第2の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、対象は哺乳動物である。

【0019】

第2の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、対象はヒトである。

【0020】

第2の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、癌は、肺腺癌及び多形性膠芽腫からなる群より選ばれる。

【0021】

第2の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、癌は、FLI1、ETV1、ETV4、ERG、ETS1、及びETS2からなる群より選ばれるETS遺伝子を含む転座を有する。

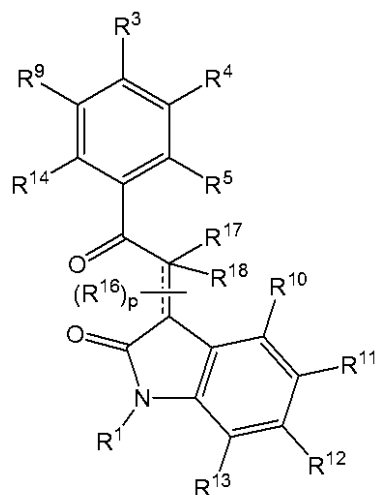
【0022】

第2の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、化合物を非経口投与する。

【0023】

一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）第3の実施態様は、式（I）：

【化7】

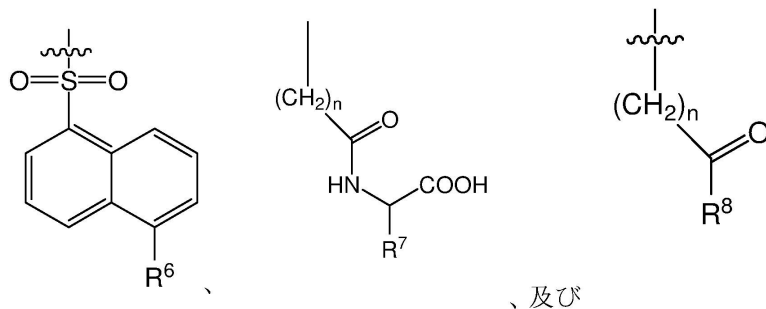


式（I）

[式中、

R¹ は、水素、C₁ - 6 アルキル、1つのアミノ酸、互いに結合している2つのアミノ酸、互いに結合している3つのアミノ酸、

【化 8】



10

からなる群より選ばれ、

R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、及び R^{14} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、

R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、

R^6 は、 C_{1-6} ジアルキルアミンであり、

R^7 は、水素及び C_{1-6} アルキルからなる群より選ばれ、

20

R^8 及び R^{15} は、それぞれ独立して C_{1-6} アルキルであり、

各 R^{16} は、独立して水素、 $-OH$ 、又は C_{1-6} アルコキシであり、

R^{17} 及び R^{18} は、独立してH又はFであり、

n は、0～4の整数であり、

p は、1又は3であり、

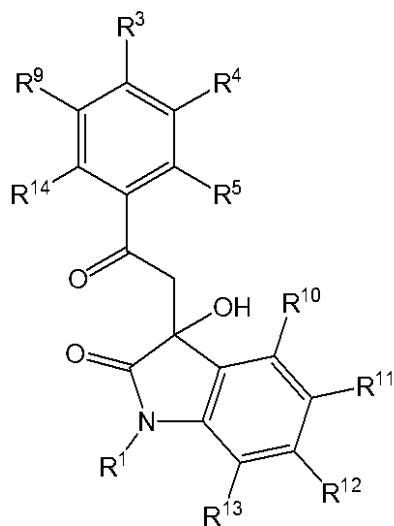
破線は、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、及び R^{14} の少なくとも1つが $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群より選ばれるという条件で、シス及びトランスからなる群より選ばれる配置を有する任意の二重結合を表す]の化合物、又はその薬学的に許容される塩を、腫瘍細胞に有効量接触させることを含む、腫瘍細胞を殺傷する、又は腫瘍細胞の増殖を阻害する方法を提供する。

30

【0024】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な)1つの実施形態では、式(I)の化合物は、式(Ia)：

【化 9】



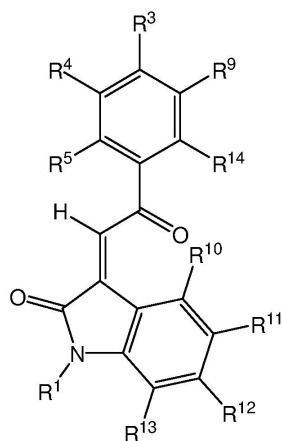
(I a)

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【 0 0 2 5 】

第 3 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、式（ I ）の化合物は、式（ I b ）：

【化 1 0】



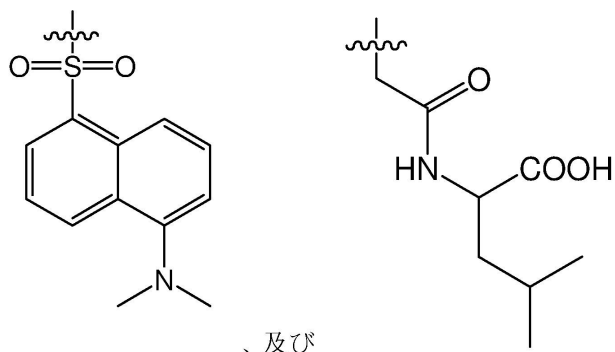
(I b)

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【 0 0 2 6 】

第 3 の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^1 は、Leu、Leu - Asp、Leu - Asp - Ala、 $-CH_2-C(=O)-NHCH_2COOH$ 、 $-CH_2-C(=O)-(CH_2)C(CH_3)_2$ 、

【化 1 1】



10

からなる群より選ばれる。

【0027】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^3 は、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ から選ばれる。

【0028】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^3 は、 $-N(CH_3)_2$ である。

20

【0029】

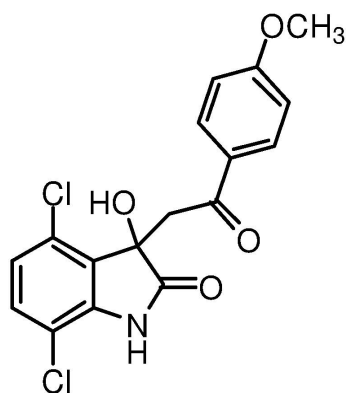
第3の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、 R^3 は、 $-SCH_3$ である。

【0030】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、式（I）の化合物は、式：

30

【化 1 2】



40

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【0031】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な）1つの実施形態では、細胞は、哺乳動物のものである。

【0032】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る（すなわち、ここで定義される実施態様

50

又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、細胞は、ヒトのものである。

【0033】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、細胞は、肺腺癌及び多形性膠芽腫からなる群より選ばれるものである。

【0034】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、細胞は、FLI1、ETV1、ETV4、ERG、ETS1、及びETS2からなる群より選ばれるETS遺伝子を含む転座を有する。

10

【0035】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、細胞はインビボのものである。

【0036】

第3の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、細胞はエクスピボのものである。

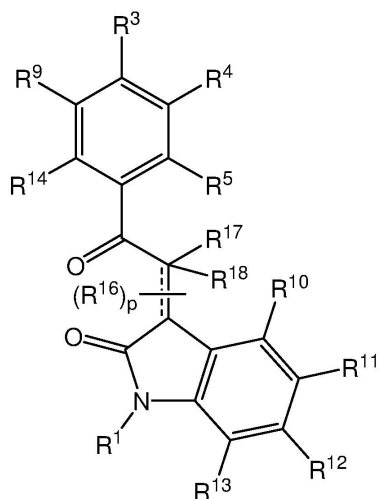
【0037】

20

一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 第4の実施態様は、

式(I)：

【化13】



30

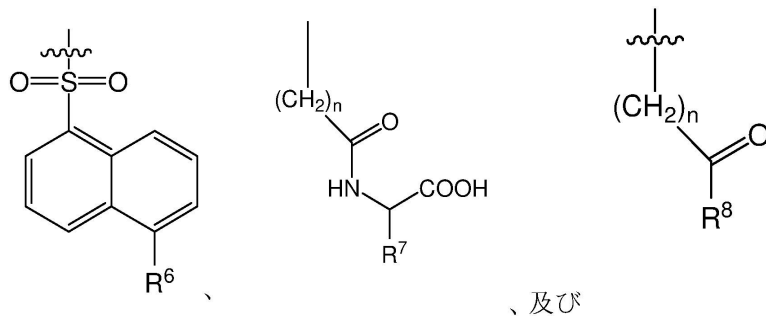
式(I)

40

[式中、

R¹は、水素、C₁ - 6アルキル、1つのアミノ酸、互いに結合している2つのアミノ酸、互いに結合している3つのアミノ酸、

【化 1 4】



10

からなる群より選ばれ、

R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、及び R^{14} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、

R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、

R^6 は、 C_{1-6} ジアルキルアミンであり、

R^7 は、水素及び C_{1-6} アルキルからなる群より選ばれ、

20

R^8 及び R^{15} は、それぞれ独立して C_{1-6} アルキルであり、

各 R^{16} は、独立して水素、 $-OH$ 、又は C_{1-6} アルコキシであり、

R^{17} 及び R^{18} は、独立してH又はFであり、

n は、0～4の整数であり、

p は、1又は3であり、

破線は、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、及び R^{14} の少なくとも1つが $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群より選ばれるという条件で、シス及びトランスからなる群より選ばれる配置を有する任意の二重結合を表す]の化合物、又はその薬学的に許容される塩

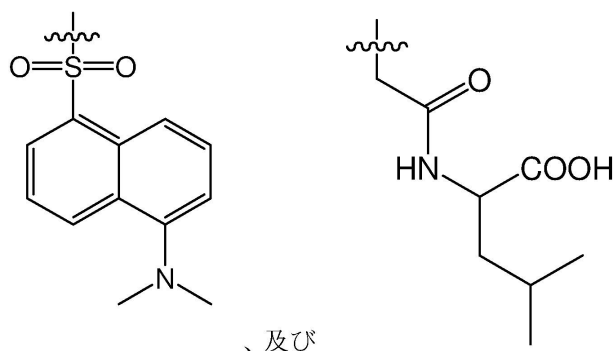
を提供する。

30

【0038】

第4の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な)1つの実施形態では、 R^1 は、Leu、Leu-Asp、Leu-Asp-Ala、 $-CH_2-C(=O)-NHCH_2COOH$ 、 $-CH_2-C(=O)-(CH_2)C(CH_3)_2$ 、

【化 1 5】



40

からなる群より選ばれる。

【0039】

第4の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様

50

又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、 R^3 は、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ から選ばれる。

【0040】

第4の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、 R^3 は、 $-N(CH_3)_2$ である。

【0041】

第4の実施態様において、一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 1つの実施形態では、 R^3 は、 $-SCH_3$ である。

【0042】

一般的に適用し得る(すなわち、ここで定義される実施態様又は実施形態のいずれかと、独立して組み合わせが可能な) 第5の実施態様は、式(I)の化合物を含む医薬組成物を提供する。

【0043】

第1～第5実施態様における実施形態の特徴のいずれかは、ここで定義される全ての実施態様及び実施形態に適応し得る。第1～第5実施態様における実施形態の特徴のいずれかは、ここで定義される他の実施形態と、多少なりとも、部分的に又は全体的に独立して組み合わせが可能である。例えば、1つ、2つ、又は3つ以上の実施形態が、全体的に又は部分的に組み合わせられてもよい。第1～第5実施態様における実施形態の特徴のいずれかは、他の実施形態又は実施態様に付加されてもよい。方法の実施態様又は実施形態のいずれかは、他の実施態様又は実施形態の化合物を用いることによって実施され得る。そして、化合物の実施態様又は実施形態のいずれかは、他の実施態様又は実施形態の方法において用いられるもので構成され得る。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1は、NSC635437の構造、及び特定の類似物のためのジェネリック構造を示す図である。

【図2】図2は、YK-4-279の効力を高めるための方法例を示す図である。

【図3A】図3Aは、種々の濃度のYK-4-279及びPT-1-33によるTC71及びTC32細胞増殖阻害を示すグラフである。

【図3B】図3Bは、種々の濃度のYK-4-279、PT-1-33、及びPT-1-55によるTC71細胞増殖阻害を示すグラフである。

【図3C】図3Cは、種々の濃度のYK-4-279及びPT-1-123によるTC71細胞増殖阻害を示すグラフである。

【図4】図4は、YK-4-279で処置され、かつRHA、EWS-FLI1、又は総タンパク質で共沈されるTC32細胞からのタンパク質溶解物の免疫プロット顕微鏡写真である。

【図5A】図5Aは、種々の候補薬剤によるEWS-FLI1のRHAへの結合の阻害を測定するELISAアッセイにおける相対光学密度のグラフである。

【図5B】図5Bは、種々の候補薬剤によるEWS-FLI1のRHAへの結合の阻害を測定するELISAアッセイにおける相対光学密度のグラフである。

【図5C】図5Cは、種々の候補薬剤によるEWS-FLI1のRHAへの結合の阻害を測定するELISAアッセイにおける相対光学密度のグラフである。

【図5D】図5Dは、種々の候補薬剤によるEWS-FLI1のRHAへの結合の阻害を測定するELISAアッセイにおける相対光学密度のグラフである。

【図5E】図5Eは、種々の候補薬剤によるEWS-FLI1のRHAへの結合の阻害を測定するELISAアッセイにおける相対光学密度のグラフである。

【図5F】図5Fは、種々の候補薬剤によるEWS-FLI1のRHAへの結合の阻害を

10

20

30

40

50

測定するE L I S Aアッセイにおける相対光学密度のグラフである。

【図5 G】図5 Gは、種々の候補薬剤によるE W S - F L I 1のR H Aへの結合の阻害を測定するE L I S Aアッセイにおける相対光学密度のグラフである。

【図6 A】図6 Aは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤による相対ルシフェラーゼ活性の一般的な傾向を示すグラフである。

【図6 B】図6 Bは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤による相対ルシフェラーゼ活性の一般的な傾向を示すグラフである。

【図7 A】図7 Aは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

10

【図7 B】図7 Bは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

【図7 C】図7 Cは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

【図7 D】図7 Dは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

20

【図7 E】図7 Eは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

【図7 F】図7 Fは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

【図7 G】図7 Gは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

30

【図7 H】図7 Hは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

【図7 I】図7 Iは、E W S - F L I 1のN R O B 1プロモーターへの結合の阻害を測定するルシフェラーゼアッセイにおいて種々の濃度の候補薬剤によるルシフェラーゼ活性を示す。

【図8】図8は、「c B i o P o r t a l f o r c a n c e r g e n o m i c s」ウェブサイトのインターフェイスを示す。

【図9】図9は、B i a c o r e T 1 0 0装置で測定した定常状態の動態で、Y K - 4 - 2 7 9の、1 1 . 7 μ MのK DでのE R Gへの結合及び1 7 . 9 μ MのK DでのE T V 1への結合を示す。

40

【図10】図10は、Y K - 4 - 2 7 9感度と相関するF L I 1を過剰発現させるG B M細胞株を示す。上部パネルは、抗F L I 1でプローブされた免疫プロットで、ユーイング肉腫T C 3 2が陽性対照として含まれている。F L I 1の期待値は5 0 k D aで、E W S - F L I 1の期待値は6 8 k D aである。下部パネルは、I C 5 0とデンシトメトリー（濃度測定）とのグラフである。

【図11】図11は、正常脳と比較したF L I 1のG E M M過剰発現を示す。R N Aは、対照マウスの正常組織及び遺伝子組み換えマウスの腫瘍組織から抽出した。正常化に次ぐハイブリッド形成により、F L I 1プローブは、正常脳組織では上昇しなかったが、腫瘍では著しく上昇した。

50

【図12】図12は、FLI1のGBM発現を示す。ヒト膠芽細胞腫におけるFLI1に対する免疫染色は、血管内皮細胞及び炎症細胞と同様に、腫瘍細胞の多くで陽核染色を示す（対物40倍）。

【図13A】図13Aは、(S)-YK-4-279又はラセミ体での3日間の処置による、著しい腫瘍の軽減を示す。ES異種移植マウスを、400mg/kgの化合物又は所定対照物で処置した。既知の腫瘍（300mm³）で開始し、腹腔内化合物で3日間マウスに処置を施した。計6回の投与を行った。

【図13B】図13Bは、(S)-YK-4-279又はラセミ体での3日間の処置による、著しい腫瘍の軽減を示す。同様の実験により、H及びEは腫瘍を染色した。

【図14】図14は、ZEB1及びZEB2の発現を誘発するERGを示す。ZEB1及びZEB2は、肺癌の転移及び薬剤耐性を齎すEMTを活性化させる。

【図15】図15は、ERGタンパク質に直接作用するYK-4-279を示す。精製組み替えERGをBiacore CM5マイクロチップ上に固定し、8種の異なる濃度（0.1～50μM）のYK-4-279への直接結合を、SPRにより確認した。定常状態のKDをBiaevaluationソフトウェアにて算出した。

【図16A】図16Aは、YK-4-279によるERGの転写活性の阻害を示す。Cos-7細胞のルシフェラーゼアッセイにより、ERGとId-2レポータールシフェラーゼ構成とを共トランスフェクトした。YK-4-279処置により、ERGレベル（*：p<0.001）への影響なしで、Id-2プロモーター活性が低減された。

【図16B】図16Bは、YK-4-279によるERGの転写活性の阻害を示す。VCaP細胞はsiERG又はYK-4-279で48時間処置され、ERG標的mRNA及びタンパクレベルが決定された。YK-4-279処置により、PLAU mRNA、ADAM19 mRNA、及びPLAT mRNAの発現が低減された。PLAUレベルも低減された。

【図17】図17は、NSCLC細胞株によるERGタンパク質の発現を示す。NSCLC細胞株からの総タンパク溶解物は、PAGEによって分割された。ヒトERGタンパク質の発現は、anti-ERG抗体を用いたウェスタンブロット法によって確認された（上部パネル）。分子量マーカーは、左部に付与されている。等タンパク負荷は、同じ薄膜をanti-β-アクチン（anti-beta-actin）抗体でストリッピング及び再ブロットすることにより確認された（下部パネル）。

【図18A】図18Aは、EMTマーカーを誘発するERG発現を示す。H358 NSCLC細胞を、ヒトERGタンパク質をコードするcDNAでトランスフェクトした。増加したERG発現をウェスタンブロット法によって検出した。

【図18B】図18Bは、EMTマーカーを誘発するERG発現を示す。即時PCR解析により、ERG発現細胞においてZEB1及びFOX C2の発現がより高いことが明らかになった。データは、まず18S RNAについて正規化され、その後、空ベクタートランスフェクト細胞に対する誘導倍率（fold induction）として表される。

【図19】図19は、NSCLCにおいてEMTを阻害するYK-4-279を示す。A549細胞は、TGF-β発現を増加させるとともに、高レベルのZEB1及びFOX C2を発現させ、YK-4-279によるERG阻害レベルを低減させた。データは、まず18S RNAについて正規化され、各群に対する対照に分割することによって発現倍率（fold expression）が算出された。

【発明を実施するための形態】

【0045】

以下の記述及び実施例では、開示された発明のいくつかの例示的な実施形態を詳しく説明する。当業者は、本発明の範囲に含まれる本発明の多数の変形及び変更が存在すると理解されるべきである。したがって、特定の例示的な実施形態の説明は、本発明の範囲を限定するものではない。

【0046】

EWS-FLI1結合について、表面プラズモン共鳴を用いて3000小分子のNCI

10

20

30

40

50

/ D T P ライブラリをスクリーニングした。化合物 N S C 6 3 5 4 3 7 は、さらなる最適化及びさらなる研究に適した候補として選ばれた (図 1)。設計された類似物の第 1 シリーズにおいて、Y K - 4 - 2 7 9 は最も活性が強かった (図 2)。Y K - 4 - 2 7 9 は、E W S - F L I 1 及び E S F T 細胞を機能的に阻害し、カスパーゼ - 3 活性を増加させることが示されている (H y a r i y e N E r k i z a n e t a l . A s m a l l m o l e c u l e b l o c k i n g o n c o g e n i c p r o t e i n E W S - F L I 1 i n t e r a c t i n w i t h R H A h e l i c a s e A i n h i b i t s g r o w t h o f E w i n g ' s s a r c o m a . N a t u r e M e d i c i n e 1 5 (7) 7 5 0 - 7 5 6 (2 0 0 9))。本願は、改良された化合物、及びその化合物を用いて肺腺癌、多形性膠芽腫、並びに F L I 1、E T V 1、E T V 4、E R G、E T S 1、及び E T S 2 からなる群より選ばれる E T S 遺伝子を含む転座を有する癌などの疾患を治療する方法に関する。

10

【 0 0 4 7 】

本明細書で提供される方法及び組成物と共に有用な他の方法及び組成物は、国際公開 W O 2 0 0 8 / 0 8 3 3 2 6 号公報、米国公開 2 0 1 0 / 0 1 6 7 9 9 4 号公報、米国仮出願第 6 1 / 6 2 3 3 4 9 号明細書、及び国際公開 W O 2 0 1 3 / 1 5 5 3 4 1 号公報に開示されており、これらの全開示内容は、参照して明確に本明細書に組み込まれる。

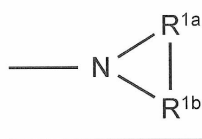
【 0 0 4 8 】

< 定義 >

本明細書において、例えば、R、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R^a、R^b などの (これらに限定されない) 任意の「R」基は、指定される原子に結合できる置換基を表す。R 基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。2 つの「R」基が「一緒になっている」と記載される場合、R 基とそれらが結合する原子とにより、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、又は複素環を形成できる。例えば、N R^{1a} R^{1b} 基における R^{1a} 及び R^{1b} は、「一緒になっている」と示される場合、R^{1a} と R^{1b} とは互いに共有結合して下記のような環：

20

【 化 4 】



30

を形成することを意味するが、これに限定されるものではない。

【 0 0 4 9 】

「任意に置換される」と記載される基は、置換されていなくてもよく、1 つ以上の指定される置換基で置換されていてもよい。同様に、「非置換又は置換」と記載される基が置換される場合、置換基は、1 つ以上の指定される置換基から選ばれてもよい。指定される置換基がない場合、「任意に置換される」又は「置換される」と示される基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、ヘテロアラルキル、(ヘテロアリシクリル) アルキル、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アシル、メルカプト、アルキルチオ、アリールチオ、シアノ、ハロゲン、チオカルボニル、O - カルバミル、N - カルバミル、O - チオカルバミル、N - チオカルバミル、C - アミド、N - アミド、S - スルホンアミド、N - スルホンアミド、C - カルボキシ、保護 C - カルボキシ、O - カルボキシ、イソシアナト、チオシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、シリル、スルフェニル、スルフィニル、スルホニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、トリハロメタンスルホニル、トリハロメタンスルホンアミド、アミノ、一置換アミ

40

50

ノ及び二置換アミノ基、並びにそれらの保護誘導体から、それぞれ独立して選ばれる1つ以上の基で置換されてもよいことを意味する。

【0050】

本明細書において、「 $C_a \sim C_b$ 」における「a」及び「b」は、アルキル、アルケニル若しくはアルキニル基における炭素原子数、又はシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール若しくはヘテロアリシクリル基の環における炭素原子数を表す整数である。すなわち、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル環、シクロアルケニル環、シクロアルキニル環、アリール環、ヘテロアリール環、又はヘテロアリシクリル環は、包括的に、「a」～「b」個の炭素原子を含んでもよい。したがって、例えば、「 $C_1 \sim C_4$ アルキル」基は、1個～4個の炭素原子を有するすべてのアルキル基、すなわち、 CH_3- 、 CH_3CH_2- 、 $CH_3CH_2CH_2-$ 、 $(CH_3)_2CH-$ 、 $CH_3CH_2CH_2CH_2-$ 、 $CH_3CH_2CH(CH_3)-$ 、及び $(CH_3)_3C-$ を指す。アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、又はヘテロアリシクリル基に関して、「a」及び「b」が指定されていない場合、これらの定義に記載された最も広い範囲であると考えられる。

10

【0051】

本明細書において、「アルキル」は、完全に飽和した（二重結合又は三重結合を有しない）炭化水素基を含む直鎖状又は分岐鎖状の炭化水素鎖を指す。アルキル基は、1個～20個の炭素原子（本定義は数値範囲が指定されていない用語「アルキル」の存在も包含するが、本明細書で示される場合、「1～20」などの数値範囲は、その指定された範囲における各整数を指す。例えば、「1個～20個の炭素原子」は、1個の炭素原子、2個の炭素原子、3個の炭素原子などの、20個以下の炭素原子からなり得るアルキル基を意味する）を有してもよい。アルキル基は、1個～10個の炭素原子を有する中間サイズのアルキルであってもよい。アルキル基は、1個～6個の炭素原子を有する低級アルキルであってもよい。化合物のアルキル基は、「 $C_1 \sim C_4$ アルキル」又は類似の名称として示されてもよい。例として、「 $C_1 \sim C_4$ アルキル」は、アルキル鎖において1個～4個の炭素原子があることを示す。すなわち、アルキル鎖は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、及びt-ブチルから選ばれる。典型的なアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、及びヘキシルが含まれるが、これらに限定されない。アルキル基は、置換又は非置換であってもよい。

20

30

【0052】

本明細書において、「アルケニル」は、直鎖状又は分岐鎖状の炭化水素鎖に1つ以上の二重結合を含むアルキル基を指す。アルケニル基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【0053】

本明細書において、「アルキニル」は、直鎖状又は分岐鎖状の炭化水素鎖に1つ以上の三重結合を含むアルキル基を指す。アルキニル基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

40

【0054】

本明細書において、「シクロアルキル」は、完全に飽和した（二重結合又は三重結合を有しない）単環式又は多環式炭化水素環系を指す。2つ以上の環から構成される場合、それらの環は、縮合環の形で互いに結合されてもよい。シクロアルキル基は、環に3個～10個の原子、又は3個～8個の原子を含んでもよい。シクロアルキル基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。典型的なシクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれるが、これらに限定されない。

【0055】

複数の二重結合が存在する場合、それらの二重結合はすべての環にわたって完全に非局

50

在化した 電子系を形成することはない（そうでなければ、その基は本明細書で定義される「アリール」になる）が、本明細書において、「シクロアルケニル」は、少なくとも1つの環に1つ以上の二重結合を含む単環式又は多環式炭化水素環系を指す。2つ以上の環から構成される場合、それらの環は、縮合環の形で互いに結合されてもよい。シクロアルケニル基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【0056】

本明細書において、「シクロアルキニル」は、少なくとも1つの環に1つ以上の三重結合を含む単環式又は多環式炭化水素環系を指す。複数の三重結合が存在する場合、それらの三重結合はすべての環にわたって完全に非局在化した 電子系を形成することはない。2つ以上の環から構成される場合、それらの環は、縮合環の形で互いに結合されてもよい。シクロアルキニル基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

10

【0057】

本明細書において、「アリール」は、すべての環にわたって完全に非局在化した 電子系を有する炭素環式（すべて炭素）の単環式又は多環式芳香環系（2つの炭素環が化学結合を共有する縮合環系を含む）を指す。アリール基の炭素原子数は変更可能である。例えば、アリール基は、 $C_6 \sim C_{14}$ アリール基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、又は C_6 アリール基であってもよい。アリール基の例としては、ベンゼン、ナフタレン、及びアズレンが含まれるが、これらに限定されない。アリール基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【0058】

20

本明細書において、「ヘテロアリール」は、1つ以上のヘテロ原子、すなわち、炭素以外の元素を含む単環式又は多環式芳香環系（完全に非局在化した 電子系を有する環系）を指す。そのヘテロ原子としては、窒素、酸素、及び硫黄が含まれるが、これらに限定されない。ヘテロアリール環の原子数は変更可能である。例えば、ヘテロアリール基は、環に4個～14個の原子、環に5個～10個の原子、又は環に5個～6個の原子を含んでもよい。さらに、用語「ヘテロアリール」は縮合環系を含み、その縮合環系において、2つの環、例えば少なくとも1つのアリール環及び少なくとも1つのヘテロアリール環、又は少なくとも2つのヘテロアリール環は、少なくとも1つの化学結合を共有する。ヘテロアリール環の例としては、フラン、フラザン、チオフェン、ベンゾチオフェン、フタラジン、ピロール、オキサゾール、ベンゾオキサゾール、1, 2, 3 - オキサジアゾール、1, 2, 4 - オキサジアゾール、チアゾール、1, 2, 3 - チアジアゾール、1, 2, 4 - チアジアゾール、ベンゾチアゾール、イミダゾール、ベンズイミダゾール、インドール、インダゾール、ピラゾール、ベンゾピラゾール、イソオキサゾール、ベンゾイソオキサゾール、イソチアゾール、トリアゾール、ベンゾトリアゾール、チアジアゾール、テトラゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、プリン、プテリジン、キノリン、イソキノリン、キナゾリン、キノキサリン、シンノリン、及びトリアジンが含まれるが、これらに限定されない。ヘテロアリール基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

30

【0059】

本明細書において、「ヘテロシクリル」又は「ヘテロアリシクリル」は、炭素原子と1個～5個のヘテロ原子とにより構成される、三員、四員、五員、六員、七員、八員、九員、十員、十八員までの単環式、二環式、及び三環式の環系を指す。複素環は、このように位置している1つ以上の不飽和結合を任意に含んでもよいが、完全に非局在化した 電子系がすべての環にわたって発生することはない。ヘテロ原子は、酸素、硫黄、及び窒素を含む、炭素以外の元素であるが、これらに限定されるものではない。複素環は、ラクタム、ラクトン、環状イミド、環状チオイミド、及び環状カルバマートなどのオキソ系及びチオ系を含むように定義されるために、1つ以上のカルボニル又はチオカルボニル官能基をさらに含んでもよい。2つ以上の環から構成される場合、それらの環は、縮合環の形で互いに結合されてもよい。また、ヘテロ脂環式環における任意の窒素は、四級化されてもよい。ヘテロシクリル又はヘテロ脂環式基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

40

50

い。このような「ヘテロシクリル」又は「ヘテロアリシクリル」基の例としては、1, 3 - ジオキシン、1, 3 - ジオキサン、1, 4 - ジオキサン、1, 2 - ジオキソラン、1, 3 - ジオキソラン、1, 4 - ジオキソラン、1, 3 - オキサチアン、1, 4 - オキサチン、1, 3 - オキサチオラン、1, 3 - ジチオール、1, 3 - ジチオラン、1, 4 - オキサチアン、テトラヒドロ - 1, 4 - チアジン、2 H - 1, 2 - オキサジン、マレイミド、スクシンイミド、バルピツール酸、チオバルピツール酸、ジオキソピペラジン、ヒダントイン、ジヒドロウラシル、トリオキサン、ヘキサヒドロ - 1, 3, 5 - トリアジン、イミダゾリン、イミダゾリジン、イソオキサゾリン、イソオキサゾリジン、オキサゾリン、オキサゾリジン、オキサゾリジノン、チアゾリン、チアゾリジン、モルホリン、オキシラン、ピペリジン - N - オキシド、ピペリジン、ピペラジン、ピロリジン、ピロリドン、ピロリジオン、4 - ピペリドン、ピラゾリン、ピラゾリジン、2 - オキソピロリジン、テトラヒドロピラン、4 H - ピラン、テトラヒドロチオピラン、チアモルホリン、チアモルホリンスルホキシド、チアモルホリンスルホン、及びそれらのベンゾ縮合類似物（例えば、ベンズイミダゾリジノン、テトラヒドロキノリン、3, 4 - メチレンジオキシフェニル）が含まれるが、これらに限定されない。

【0060】

本明細書において、「アラルキル」及び「アリール（アルキル）」は、低級アルキレン基を介して置換基として接続されるアリール基を指す。アラルキルの低級アルキレン及びアリール基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。例としては、ベンジル、2 - フェニルアルキル、3 - フェニルアルキル、及びナフチルアルキルが含まれるが、これらに限定されない。

【0061】

本明細書において、「ヘテロアラルキル」及び「ヘテロアリール（アルキル）」は、低級アルキレン基を介して置換基として接続されるヘテロアリール基を指す。ヘテロアラルキルの低級アルキレン及びヘテロアリール基は、置換されていてもよく、非置換であってもよい。例としては、2 - チエニルアルキル、3 - チエニルアルキル、フリルアルキル、チエニルアルキル、ピロリルアルキル、ピリジルアルキル、イソオキサゾリルアルキル、及びイミダゾリルアルキル、並びにそれらのベンゾ縮合類似物が含まれるが、これらに限定されない。

【0062】

「（ヘテロアリシクリル）アルキル」及び「（ヘテロシクリル）アルキル」は、低級アルキレン基を介して置換基として接続される複素環式又はヘテロ脂環式基を指す。（ヘテロアリシクリル）アルキルの低級アルキレン及びヘテロシクリルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。例としては、（テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル）メチル、（ピペリジン - 4 - イル）エチル、（ピペリジン - 4 - イル）プロピル、（テトラヒドロ - 2 H - チオピラン - 4 - イル）メチル、及び（1, 3 - チアジナン - 4 - イル）メチルが含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

「低級アルキレン基」は、直鎖状の - CH₂ - 連結基であり、その末端炭素原子に介して分子断片を接続するように結合を形成する。例としては、メチレン（- CH₂ - ）、エチレン（- CH₂CH₂ - ）、プロピレン（- CH₂CH₂CH₂ - ）、及びブチレン（- CH₂CH₂CH₂CH₂ - ）が含まれるが、これらに限定されない。低級アルキレン基は、低級アルキレン基における1つ以上の水素を、下記の用語「置換」の定義で記載される置換基に換えることによって、置換されてもよい。

【0064】

本明細書において、「アルコキシ」は、式 - OR を指し、ここで、R は、上記のように定義されるアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、又はシクロアルキニルである。アルコキシの例は、限定されないが、メトキシ、エトキシ、n - プロポキシ、1 - メチルエトキシ（イソプロポキシ）、n - ブトキシ、イソブトキシ、sec - ブトキシ、及びtert - ブトキシである。アルコキシは、置換されていても

よく、非置換であってもよい。

【 0 0 6 5 】

本明細書において、「アシル」は、カルボニル基を介して置換基として接続される水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、又はアリールを指す。例としては、ホルミル、アセチル、プロパノイル、ベンゾイル、及びアクリルが含まれる。アシルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 6 6 】

本明細書において、「ヒドロキシアルキル」は、1つ以上の水素原子がヒドロキシ基によって置換されるアルキル基を指す。ヒドロキシアルキル基の例としては、2 - ヒドロキシエチル、3 - ヒドロキシプロピル、2 - ヒドロキシプロピル、及び2, 2 - ジヒドロキシエチルが含まれるが、これらに限定されない。ヒドロキシアルキルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

10

【 0 0 6 7 】

本明細書において、「ハロアルキル」は、1つ以上の水素原子がハロゲンによって置換されるアルキル基（例えば、モノハロアルキル、ジハロアルキル、及びトリハロアルキル）を指す。このような基としては、クロロメチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、及び1 - クロロ - 2 - フルオロメチル、2 - フルオロイソブチルが含まれるが、これらに限定されない。ハロアルキルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 6 8 】

20

本明細書において、「ハロアルコキシ」は、1つ以上の水素原子がハロゲンによって置換されるアルコキシ基（例えば、モノハロアルコキシ、ジハロアルコキシ、及びトリハロアルコキシ）を指す。このような基としては、クロロメトキシ、フルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、1 - クロロ - 2 - フルオロメトキシ、及び2 - フルオロイソブトキシが含まれるが、これらに限定されない。ハロアルコキシは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 6 9 】

本明細書において、「アリーロキシ」及び「アリールチオ」は、RO - 及びRS - を指し、ここで、Rは、例えばフェニルなどのアリールであるが、これに限定されるものではない。アリーロキシ及びアリールチオは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

30

【 0 0 7 0 】

「スルフェニル」又は「チオ」基は、「-SR」基を指し、ここで、Rは水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。スルフェニルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。用語「スルフェニル」又は「チオ」は、-SH基（以下、「チオール」基とも呼ばれる）、及び-SR_A基（以下、R_Aが水素ではない場合、「チオエーテル」とも呼ばれる）を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 7 1 】

40

「スルフィニル」基は、「-S(=O)-R」基を指し、ここで、Rは「スルフェニル」に関して定義されるRと同じであってもよい。スルフィニルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 7 2 】

「スルホニル」基は、「SO₂R」基を指し、ここで、Rは「スルフェニル」に関して定義されるRと同じであってもよい。スルホニルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 7 3 】

「O - カルボキシ」基は、「RC(=O)O - 」基を指し、ここで、本明細書で定義されるように、Rは水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロア

50

ルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。O - カルボキシは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【0074】

用語「エステル」及び「C - カルボキシ」は、「 $-C(=O)OR$ 」基を指し、ここで、Rは「O - カルボキシ」に関して定義されるRと同じであってもよい。エステル及びC - カルボキシは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【0075】

「チオカルボニル」基は、「 $-C(=S)R$ 」基を指し、ここで、Rは「O - カルボキシ」に関して定義されるRと同じであってもよい。チオカルボニルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

10

【0076】

「トリハロメタンスルホニル」基は、「 X_3CSO_2- 」基を指し、ここで、Xはハロゲンである。

【0077】

「トリハロメタンスルホンアミド」基は、「 $X_3CS(O)_2N(R_A)-$ 」基を指し、ここで、Xはハロゲンであり、 R_A は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルである。

20

【0078】

本明細書において、用語「アミノ」は、 $-N(R)_2$ 基を指し、ここで、Rは、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルからなる群より独立して選ばれる。アミノは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。用語「アミノ」は、 $-NH_2$ 基（「アンモニウム」基とも呼ばれる）、 $-NHR$ 基（Rが水素ではない場合、「第2級アミン」とも呼ばれる）、又は $-NR_2$ 基（Rが水素ではない場合、「第3級アミン」とも呼ばれる）を含むが、これらに限定されない。

【0079】

本明細書において、用語「ヒドロキシ」は $-OH$ 基を指す。

30

【0080】

「シアノ」基は「 $-CN$ 」基を指す。

【0081】

本明細書において、用語「アジド」は、 $-N_3$ 基を指す。

【0082】

「イソシアナト」基は、「 $-NCO$ 」基を指す。

【0083】

「チオシアナト」基は、「 $-CNS$ 」基を指す。

【0084】

「イソチオシアナト」基は、「 $-NCS$ 」基を指す。

40

【0085】

「メルカプト」基は、「 $-SH$ 」基を指す。

【0086】

「カルボニル」基は、 $C=O$ 基を指す。

【0087】

「S - スルホンアミド」基は、「 $-SO_2N(R_A R_B)$ 」基を指し、ここで、 R_A 及び R_B は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。S - スルホンアミドは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

50

【 0 0 8 8 】

「N - スルホンアミド」基は、「 $\text{R SO}_2 \text{N}(\text{R}_A) -$ 」基を指し、ここで、R 及び R_A は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。N - スルホンアミドは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 8 9 】

「O - カルバミル」基は、「 $- \text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_A \text{ R}_B) -$ 」基を指し、ここで、 R_A 及び R_B は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。O - カルバミルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

10

【 0 0 9 0 】

「N - カルバミル」基は、「 $\text{ROC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_A) -$ 」基を指し、ここで、R 及び R_A は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。N - カルバミルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 9 1 】

「O - チオカルバミル」基は、「 $- \text{OC}(=\text{S}) - \text{N}(\text{R}_A \text{ R}_B) -$ 」基を指し、ここで、 R_A 及び R_B は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。O - チオカルバミルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

20

【 0 0 9 2 】

「N - チオカルバミル」基は、「 $\text{ROC}(=\text{S})\text{N}(\text{R}_A) -$ 」基を指し、ここで、R 及び R_A は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。N - チオカルバミルは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

30

【 0 0 9 3 】

「C - アミド」基は、「 $- \text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_A \text{ R}_B) -$ 」基を指し、ここで、 R_A 及び R_B は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。C - アミドは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

【 0 0 9 4 】

「N - アミド」基は、「 $\text{RC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_A) -$ 」基を指し、ここで、R 及び R_A は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、又は（ヘテロアリシクリル）アルキルであってもよい。N - アミドは、置換されていてもよく、非置換であってもよい。

40

【 0 0 9 5 】

本明細書で使用される用語「ハロゲン原子」又は「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素などの元素の周期表の第 17 族における任意の放射性安定した原子を意味する。

【 0 0 9 6 】

置換基の数が特定されない場合（例えば、ハロアルキル）、1 つ以上の置換基が存在してもよい。例えば、「ハロアルキル」は、1 つ以上の同一又は異なるハロゲンを含んでもよい。別の例として、「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルコキシフェニル」は、1 つ以上の同一又は異なる

50

、 1 個、 2 個、 又は 3 個の炭素原子を有するアルコキシ基を含んでもよい。

【 0 0 9 7 】

本明細書において、任意の保護基、アミノ酸、及び他の化合物の略称は、特に指定されない限り、それらの慣例、広く認められている略称、又は I U P A C ・ I U B 合同委員会生化学命名法 (B i o c h e m . 1 1 : 9 4 2 - 9 4 4 (1 9 7 2) を参照) と一致している。

【 0 0 9 8 】

本明細書に記載の化合物は、同位体で標識され得ると理解される。重水素などの同位体による置換によって、より高い代謝安定性に起因する特定の治療上の利点、例えば、インビボ半減期の増加、又は必要投与量の減少などの利点を得られる。化合物構造に示されるような各化学元素は、上記元素の任意の同位体を含んでもよい。例えば、化合物構造において水素原子は、その化合物に存在することが明示されるか、又は理解される。水素原子が存在し得る化合物の任意の位置において、水素原子は、水素 - 1 (軽水素) 及び水素 - 2 (重水素) を含む (これらに限定されない) 任意の水素同位体であってもよい。したがって、本明細書における化合物は、特段の定めがない限り、すべての潜在的な同位体形態を包含する。

【 0 0 9 9 】

本明細書に記載の方法及び組み合わせは、結晶形 (元素組成が同じである化合物の異なる結晶充填配置を含む多形としても知られる)、非晶相、塩、溶媒和物、及び水和物を含むと理解される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の化合物は、水、エタノールなどの薬学的に許容される溶媒との溶媒和形態で存在する。他の実施形態において、本明細書に記載の化合物は、非溶媒和形態で存在する。溶媒和物は、化学量論又は非化学量論量の溶媒を含み、水、エタノールなどの薬学的に許容される溶媒による結晶化プロセスにおいて形成され得る。溶媒が水である場合には、水和物を形成し、溶媒がアルコールである場合には、アルコールを形成する。また、本明細書で提供される化合物は、溶媒和形態だけでなく、非溶媒和形態でも存在する。一般的に、本明細書で提供される化合物及び方法の目的に対して、溶媒和形態は、非溶媒和形態と同等であると考えられる。

【 0 1 0 0 】

数値範囲を提供する場合、上限及び下限、並びにその範囲における上限と下限との間の各介在値は、実施形態の範囲内に含まれると理解される。

【 0 1 0 1 】

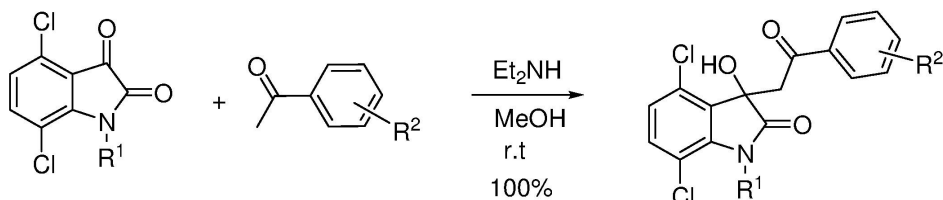
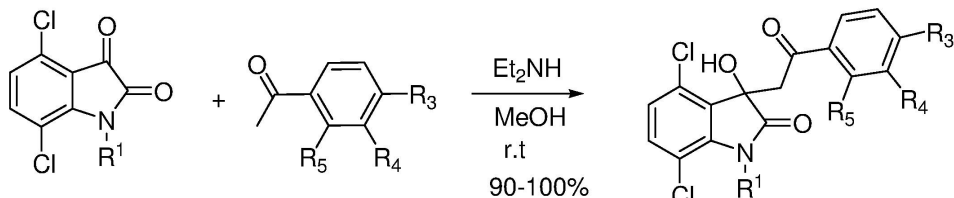
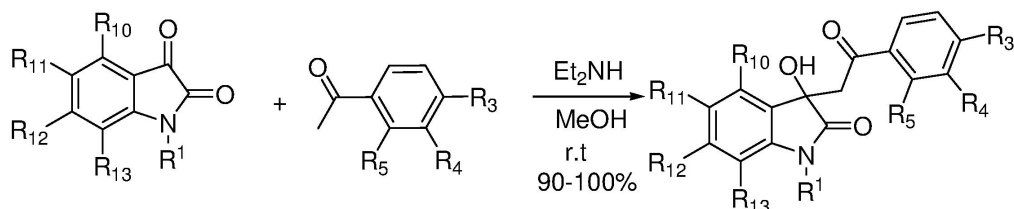
< 特定の合成法 >

いくつかの実施形態において、適切なアセトフェノン (4 . 0 当量) 及び触媒量のジエチルアミン (1 0 滴) を、 4 , 7 - ジクロロイサチン (1 . 0 当量) のメタノール (5 m L) 溶液に加えた。出発物質 (4 , 7 - ジクロロイサチン) が完全に消失するまで、混合液を室温で攪拌した。得られた溶液を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーに付してヘキサン / 酢酸エチルで溶出し、定量的収率で純粋生成物を得た。ヘキサン / 酢酸エチルで再結晶することにより、さらなる精製を行った。 V a r i a n - 4 0 0 分光計を用いて、¹ H (4 0 0 M H z) N M R スペクトルを記録した。化学シフト () は、内部標準テトラメチルシランから低磁場側に p p m で表し、結合定数 (J 値) は、ヘルツ (H z) で表した。元素分析は、 A t l a n t i c M i c r o l a b で行った。

【 0 1 0 2 】

本明細書で提供される特定の化合物は、下記の合成スキームに従って調製できる。

【化 17】



10

20

【0103】

これらのスキームにおいて、ケトン（4.0当量）及び触媒量のジエチルアミン（1.0滴）を、置換イサチン（1.0当量）のメタノール（5 mL）溶液に加えた。出発物質（置換イサチン）が完全に消失するまで、混合液を室温で攪拌した。得られた溶液を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーに付してヘキサン／酢酸エチルで溶出し、定量的収率で純粋生成物を得た。ヘキサン／酢酸エチルで再結晶することにより、さらなる精製を行った。

【0104】

2つの環系を連結する基における炭素 - 炭素二重結合に組み込まれる阻害剤は、当技術分野において既知の合成技術を使用して化合物を還元することにより、対応する飽和阻害剤から調製できる。

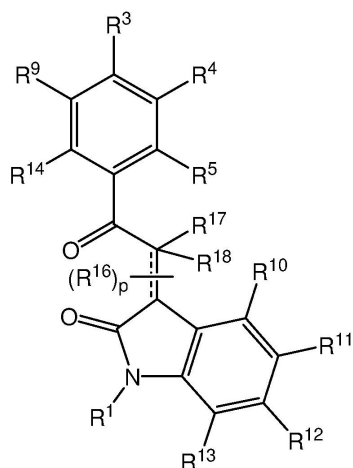
30

【0105】

< 特定の化合物 >

本明細書で提供される特定の化合物は、一般式（I）：

【化 18】



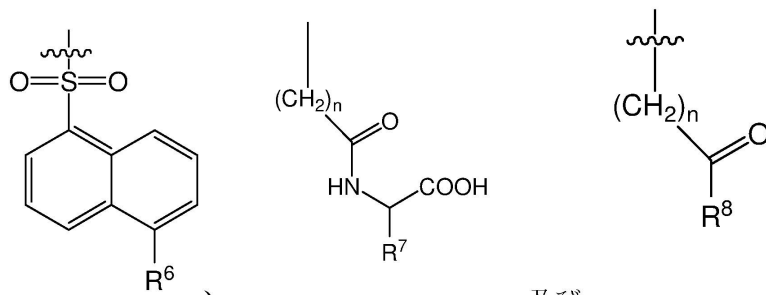
式 (I)

40

50

〔式中、 R^1 は、水素、 C_{1-6} アルキル、1つのアミノ酸、互いに結合している2つのアミノ酸、互いに結合している3つのアミノ酸、

【化19】



10

、及び

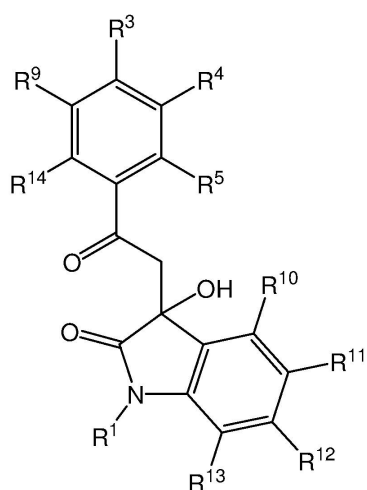
からなる群より選ばれ、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、 R^{14} 、 R^{17} 、及び R^{18} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、水素、ハロゲン、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群よりそれぞれ独立して選ばれ、 R^6 は、 C_{1-6} ジアルキルアミンであり、 R^7 は、水素及び C_{1-6} アルキルからなる群より選ばれ、 R^8 及び R^{15} は、それぞれ独立して C_{1-6} アルキルであり、各 R^{16} は、独立して水素、 $-OH$ 、又は C_{1-6} アルコキシであり、 n は、0～4の整数であり、 p は、1又は3であり、破線は、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^9 、及び R^{14} の少なくとも1つが $-NH(R^{15})$ 、 $-N(R^{15})_2$ 、及び $-SR^{15}$ からなる群より選ばれるという条件で、シス及びトランスからなる群より選ばれる配置を有する任意の二重結合を表す]の化合物、又はその薬学的に許容される塩を含む。

20

【0106】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は、式(Ia)：

【化20】



30

(Ia)

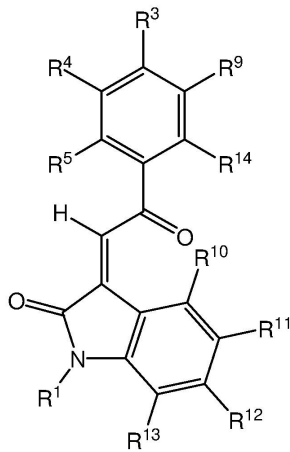
40

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【0107】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は、式(Ib)：

【化 2 1】



(I b)

10

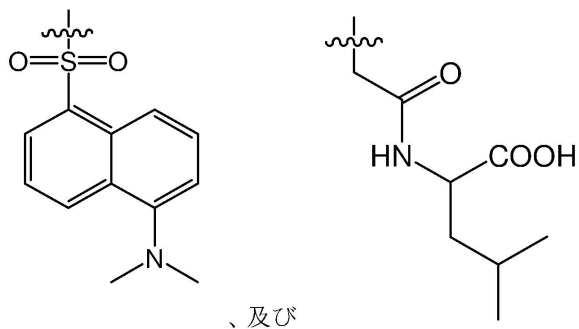
の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【0108】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、Leu、Leu-Asp、Leu-Asp-Ala、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、

20

【化 2 2】



、及び

30

からなる群より選ばれる。

【0109】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、 $-\text{NH}(\text{R}^{15})$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{15})_2$ 、及び $-\text{SR}^{15}$ から選ばれる。

【0110】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ である。

40

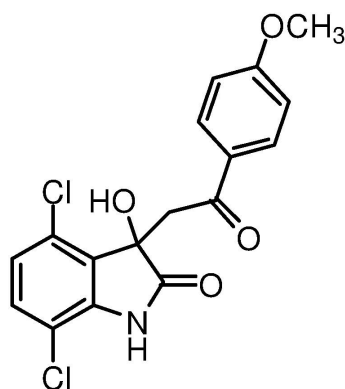
【0111】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、 $-\text{SCH}_3$ である。

【0112】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式：

【化 2 3】



10

の構造であるか、又はその薬学的に許容される塩である。

【0113】

置換基の存在により、小分子阻害剤は、薬学的に許容される塩の形であってもよい。本明細書において、「薬学的に許容される塩」は、広義の用語であり、当業者にとって通常かつ慣用的な意味である（特別な意味又はカスタマイズされた意味に限定されるべきではない）。また、薬学的に許容される非毒性の酸又は塩基で調製される塩を指すが、これに限定されない。適切な薬学的に許容される塩としては、アルミニウム、亜鉛の塩、リチウム、ナトリウム、及びカリウムの塩などのアルカリ金属塩、カルシウム及びマグネシウムの塩などのアルカリ土類金属塩が例示される金属塩と、リシン、N, N' - ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（N - メチルグルカミン）、プロカイン、並びに遊離酸及び遊離塩基の三塩などが例示される有機塩と、硫酸塩、塩酸塩、及び臭化水素酸塩などが例示される無機塩と、例えば Merck Index のような当業者に周知の情報源に記載され、現在広範な医薬用途に用いられる他の塩と、が含まれる。本明細書において検討される治療薬の塩を製造するために、所望の活性を実質上阻害しない限り、任意の適切な成分を選ぶことができる。

20

【0114】

好ましい実施形態に係る化合物は、異性体、ラセミ体、光学異性体、エナンチオマー、ジアステレオマー、互変異性体、及びシス/トランス配座異性体を含んでもよい。これらの異性体は全て、これらの混合物を含み、混合物も好ましい実施形態の範囲内に含まれる。上述のように、好ましい実施形態に係る化合物は、不斉中心を有してもよい。例えば、これらの化合物は、不斉炭素原子を有する場合、エナンチオマー又はジアステレオ異性体、及び例えばラセミ体などのこれらの混合物の形で存在してもよい。不斉炭素原子は、(R) 配置、(S) 配置、又は (R, S) 配置、好ましくは (R) 配置又は (S) 配置で存在してもよく、これらの混合物として存在してもよい。異性体混合物は、必要に応じて、純粋な異性体を得るための従来の方法により単離されてもよい。

30

【0115】

化合物は非晶形であってもよく、結晶形であってもよい。好ましい実施形態に係る化合物の結晶形は、好ましい実施形態に含まれる多形であってもよい。さらに、好ましい実施形態に係るいくつかの化合物は、水又は他の有機溶媒とともに溶媒和物を形成してもよい。このような溶媒和物は、同様に、好ましい実施形態の範囲内に含まれる。

40

【0116】

< 特定の医薬組成物 >

一般的には、好ましい実施形態に係る阻害剤を静脈内又は皮下の単位剤形で投与することが好ましいが、他の投与経路も考えられる。考えられる投与経路としては、経口、非経口、静脈内、及び皮下が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態に係る阻害剤は、例えば経口投与などのための液体製剤に製剤化することができる。適切な剤形は

50

、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤などを含む。経口投与のための特に好ましい単位剤形は、錠剤及びカプセル剤を含む。単位剤形は、1日1回投与するように構成されることが特に好ましいが、特定の実施形態において、1日2回又はそれ以上の回数で投与するように構成されることが望ましい場合もある。

【0117】

好ましい実施形態に係る医薬組成物は、受容者の血液又は他の体液と等張であることが好ましい。組成物の等張性は、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、又は他の無機若しくは有機溶質によって得られる。塩化ナトリウムは特に好ましい。例えば、酢酸及びその塩、クエン酸及びその塩、ホウ酸及びその塩、並びにリン酸及びその塩などの緩衝剤を使用することができる。非経口用賦形剤は、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、又は不揮発性油を含む。静脈内用賦形剤は、流体及び栄養補充液、電解質補充液（例えば、リンゲルデキストロースに基づくもの）などを含む。

10

【0118】

医薬組成物の粘度は、薬学的に許容される増粘剤を使用して、選択されたレベルに維持することができる。メチルセルロースは、簡単に入手可能かつ経済的に利用可能で、使いやすいため、好ましい。他の適切な増粘剤としては、例えば、キサンタンゴム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが含まれる。増粘剤の好ましい濃度は、選択された増粘剤によって決まる。選択された粘度が得られる量を使用することが好ましい。粘性組成物は、通常、このような増粘剤を添加することによって溶液で調製される。

20

【0119】

薬学的に許容される保存剤は、医薬組成物の貯蔵寿命を増加させるために使用することができる。例えば、パラベン、チメロサル、クロロブタノール、又は塩化ベンザルコニウムを含む種々の保存剤が使用できるが、ベンジルアルコールは、適切であり得る。保存剤の適切な濃度は、選択された保存剤によってより多くの量又はより少ない量が望ましいが、典型的に、組成物の総重量に基づいて約0.02%～約2%である。前述のような還元剤は、製剤の良好な貯蔵寿命を維持するために有利に使用することができる。

【0120】

好ましい実施形態に係る阻害剤は、適切な担体、希釈剤、又は滅菌水、生理食塩水、グルコースなどの賦形剤と混合されてもよく、所望の投与経路及び製剤に応じて、湿潤又は乳化剤、pH緩衝剤、ゲル化又は増粘剤、保存剤、香味剤、着色剤などの補助物質を含んでもよい。例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」Lippincott Williams & Wilkins; 20th edition (June 1, 2003)、及び「Remington's Pharmaceutical Sciences」Mack Pub. Co.; 18th and 19th editions (December 1985, and June 1990, respectively)を参照する。このような製剤としては、錯化剤、金属イオン、ポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル、デキストランなどの高分子化合物、リボソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層若しくは多層ベシクル、赤血球ゴースト、又はスフェロブラストを含んでもよい。リボソーム製剤に適した脂質としては、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが含まれるが、これらに限定されない。そのような追加成分の存在は、物理的状態、溶解度、安定性、インビボ放出速度、及びインビボクリアランス速度に影響を与えることができるので、例えば、担体の特性が選択された投与経路に合わせるように、意図された用途に応じて選択される。

30

40

【0121】

経口投与の場合、医薬組成物は、錠剤、水性又は油性懸濁液、分散性粉末又は顆粒剤、エマルジョン、硬カプセル剤若しくは軟カプセル剤、シロップ剤、又はエリキシル剤として提供することができる。経口用組成物は、医薬組成物を製造するための当技術分野で既

50

知の任意の方法に応じて調製することができ、甘味料、香味剤、着色剤、及び保存剤のうちの1つ以上の添加剤を含んでもよい。水性懸濁剤は、水性懸濁剤の製造に適した賦形剤と混合される活性成分を含んでもよい。

【0122】

経口使用のための製剤は、活性成分が炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、又はカオリンなどの不活性固体希釈剤と混合される硬ゼラチンカプセル剤として提供されてもよく、軟ゼラチンカプセル剤として提供されてもよい。軟カプセル剤において、阻害剤は、水、又はピーナッツ油、オリーブ油、脂肪油、流動パラフィン、若しくは液体ポリエチレングリコールなどの油媒体のような適切な液体に溶解又は懸濁することができる。経口投与用の安定剤及びミクロスフェアを使用することができる。カプセル剤は、ゼラチンからなるプッシュフィットカプセル剤と、ゼラチン及びグリセロール又はソルビトールなどの可塑剤からなる軟密閉カプセル剤とを含んでもよい。プッシュフィットカプセル剤は、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどのバインダー、及びノ又は、タルク若しくはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、並びに任意に選択した安定剤と混合される活性成分を含んでもよい。

10

【0123】

錠剤は、素錠であってもよく、又は、崩壊及び消化管での吸収を遅らせることによって、長期間にわたって持続作用を提供するように、既知の方法でコーティングされてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリンなどの時間遅延材料を使用することができる。錠剤型などの固形で投与する場合、固形は典型的に、約0.001重量%以上、約50重量%以下の活性成分を含み、好ましくは、約0.005重量%、0.01重量%、0.02重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、又は1重量%から、約2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、又は45重量%までの活性成分を含む。

20

【0124】

錠剤は、不活性物質を含む非毒性の薬学的に許容される賦形剤と混合される活性成分を含んでもよい。例えば、錠剤は、任意に1つ以上の追加成分とともに、圧縮又は成形によって製造することができる。圧縮錠剤は、粉末又は顆粒などの自由流動形態の活性成分をバインダー、潤滑剤、不活性希釈剤、界面活性剤、又は分散剤と任意に混合して、適当な機械で圧縮することによって製造することができる。湿製錠剤は、不活性液体希釈剤に濡れた粉状阻害剤と混合して、適切な機械で成形することによって製造することができる。

30

【0125】

好ましくは、各錠剤又はカプセル剤は、約1mg以上、約1000mg以下の好ましい実施形態に係る阻害剤を含み、より好ましくは、約10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、又は100mgから、約150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、又は900mgまでの好ましい実施形態に係る阻害剤を含む。最も好ましくは、錠剤又はカプセル剤は、分割投与量を可能にするための用量範囲で提供される。患者に適している投与量及び1日当たりの投与回数は、このように便利に選択することができる。特定の実施形態において、2つ以上の治療薬を併用して単一の錠剤又は他の剤形で投与する（例えば、併用療法において）ことが好ましいが、他の実施形態において、別個の剤形で治療薬を提供することが好ましい。

40

【0126】

適切な不活性物質は、炭水化物、マンニトール、ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾デキストラン、デンプンなどの希釈剤、又は、三リン酸カルシウム、リン酸カルシウム、リン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸マグ

50

ネシウム、及び塩化ナトリウムなどの無機塩類を含む。製剤には崩壊剤又は造粒剤を含んでもよく、崩壊剤又は造粒剤としては、例えば、コーンスターチなどのデンプン、アルギン酸、デンプングリコール酸ナトリウム、アンバーライト、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸カルボキシメチルセルロース、天然スポンジ及びベントナイト、不溶性陽イオン交換樹脂、寒天、カラヤゴム若しくはトラガカントゴムなどの粉末ゴム、又はアルギン酸若しくはその塩などが含まれる。

【0127】

硬い錠剤を形成するために、バインダーを使用することができる。バインダーとしては、アカシア、トラガカント、デンプン及びゼラチン、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの天然物由来の材料が含まれる。

10

【0128】

錠剤製剤には、例えば、ステアリン酸又はそのマグネシウム若しくはカルシウム塩、ポリテトラフルオロエチレン、流動パラフィン、植物油及びワックス、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、デンプン、タルク、焼成シリカ、シリコアルミネート水和物などの潤滑剤を含むことができる。

【0129】

界面活性剤を使用することができ、界面活性剤としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、及びジオクチルスルホン酸ナトリウムなどの陰イオン界面活性剤、塩化ベンザルコニウム若しくは塩化ベンゼトニウムなどの陽イオン界面活性剤、又は、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート、蔗糖脂肪酸エステル、メチルセルロース、若しくはカルボキシメチルセルロースなどの非イオン界面活性剤が含まれる。

20

【0130】

拡散又は浸出機構のいずれかにより放出を可能にする不活性マトリックスにアミホスチン又はその類似物が組み込まれる放出制御製剤を使用することができる。徐々に変性するマトリックスは、製剤に組み込むことができる。他の送達システムとしては、徐放、遅延放出、又は持続放出送達システムが含まれ得る。

【0131】

コーティングを使用することができ、コーティングとしては、例えば、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシ-エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、ナトリウムカルボキシ-メチルセルロース、プロビドン、及びポリエチレングリコールなどの非腸溶性材料、又は、フタル酸エステルなどの腸溶性材料が含まれる。染料又は色素は、識別のため、又は阻害剤の用量の異なる組み合わせを特徴づけるために添加することができる。

30

【0132】

液体形態で経口投与する場合、水、石油などの液体担体、ピーナッツ油、鉱油、大豆油、若しくはゴマ油などの動物性又は植物性油脂又は合成油は、活性成分に添加することができる。また、生理食塩水溶液、デキストロース、若しくは他の糖溶液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール、若しくはポリエチレングリコールなどのグリコールは、適切な液体担体である。医薬組成物は、水中油型エマルジョンの形態であってもよい。油相は、オリーブ油若しくはラッカセイ油などの植物油、流動パラフィンなどの鉱油、又はそれらの混合物であってもよい。適切な乳化剤としては、アカシアゴム及びトラガカントゴムなどの天然ゴムと、大豆レシチンなどの天然リン脂質と、モノオレイン酸ソルビタンなどの、脂肪酸及び無水ヘキシトールに由来するエステル又は部分エステルと、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンなどの、それらの部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物とが含まれる。エマルジョンは、甘味剤及び香味剤を含んでもよい。

40

【0133】

50

また、肺送達を利用することができる。化合物は、吸入の間に肺に送達され、肺上皮層を透過して血流に達する。治療薬の肺送達のために設計された種々の機械装置を使用することができ、その機械装置としては、当業者によく知られているネブライザー、定量吸入器、及び粉末吸入器が含まれるが、これらに限定されない。これらの装置は、化合物の投薬に適している製剤を使用する。典型的に、各製剤は、使用する装置の種類によって特定され、治療に有効である希釈剤、補助剤、及び／又は担体に加え、適切な噴射剤材料を使用することができる。

【 0 1 3 4 】

化合物及び／又は他の任意の活性成分は有利に、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下、より好ましくは約 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.6\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.7\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ 、又は $0.9\text{ }\mu\text{m}$ から、約 $1.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $4.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $4.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $5.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $5.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $6.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $6.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $7.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $7.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $8.0\text{ }\mu\text{m}$ 、 $8.5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $9.0\text{ }\mu\text{m}$ 、又は $9.5\text{ }\mu\text{m}$ までの平均粒径を有する微粒子の形態で、肺送達のために調製される。阻害剤の肺送達のための薬学的に許容される担体としては、トレハロース、マンニトール、キシリトール、スクロース、ラクトース、及びソルビトールなどの炭水化物が含まれる。製剤に使用する他の成分は、DPPC、DOPE、DSPC、及びDOPCを含んでもよい。天然又は合成の界面活性剤を使用することができ、その界面活性剤としては、ポリエチレングリコール、及びシクロデキストランなどのデキストランが含まれる。胆汁酸塩及び他の関連するエンハンサー、並びにセルロース及びセルロース誘導体、及びアミノ酸を使用することができる。リポソーム、マイクロカプセル、ミクロスフェア、包接錯体、及び他の種類の担体を使用することもできる。

【 0 1 3 5 】

ジェット式又は超音波式のいずれかのネブライザーによる使用に適している医薬製剤は、典型的に、水に溶解又は懸濁される阻害剤を、約 0.01 mg/mL 以上、約 100 mg/mL 以下の阻害剤の溶液における濃度で、好ましくは約 0.1 mg/mL 、 1 mg/mL 、 2 mg/mL 、 3 mg/mL 、 4 mg/mL 、 5 mg/mL 、 6 mg/mL 、 7 mg/mL 、 8 mg/mL 、 9 mg/mL 、又は 10 mg/mL から、約 15 mg/mL 、 20 mg/mL 、 25 mg/mL 、 30 mg/mL 、 35 mg/mL 、 40 mg/mL 、 45 mg/mL 、 50 mg/mL 、 55 mg/mL 、 60 mg/mL 、 65 mg/mL 、 70 mg/mL 、 75 mg/mL 、 80 mg/mL 、 85 mg/mL 、又は 90 mg/mL までの阻害剤の溶液における濃度で含む。また、製剤は、緩衝液及び単糖を含んでもよい（例えば、タンパク質安定化及び浸透圧の調節のために）。ネブライザー製剤には、エアロゾルを形成する際に溶液の噴霧化による阻害剤の表面誘起凝集を減少又は防止するために、界面活性剤を含んでもよい。

【 0 1 3 6 】

定量吸入装置とともに使用するための製剤は、一般的に、界面活性剤の助けを借りて噴射剤に懸濁される活性成分を含有する微粉を含む。噴射剤は、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、及び炭化水素などの従来の噴射剤を含んでもよい。好ましい噴射剤としては、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン、及びそれらの組み合わせが含まれる。適切な界面活性剤としては、ソルビタントリオレート、大豆レシチン、及びオレイン酸が含まれる。

【 0 1 3 7 】

粉末吸入装置から投薬するための製剤は、典型的に、阻害剤を含有するとともにラクトース、ソルビトール、スクロース、マンニトール、トレハロース、又はキシリトールなどの充填剤を任意に含有する乾燥微粉を、装置からの粉末の分散を促進する量で、典型的に製剤の約1重量%以上、約99重量%以下、好ましくは製剤の約5重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%、又は50重量%から、55重量%、60重量%、65重量%、70重量%、75重量

10

20

30

40

50

％、80重量％、85重量％、又は90重量％までの量で含む。

【0138】

好ましい実施形態に係る化合物は、静脈内、非経口、又は他の注射経路により投与される場合、発熱物質を含まない、非経口的に許容される水溶液又は油性懸濁液の形態であることが好ましい。懸濁液は、当技術分野でよく知られている方法に従って、適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤を用いて調製することができる。適切なpH、等張性、安定性などを有し、許容できる水溶液の調製は、当業者によく知られている範囲内にある。好適な注射用医薬組成物は、1,3-ブタンジオール、水、等張塩化ナトリウム溶液、リンゲル溶液、デキストロース溶液、デキストロース及び塩化ナトリウム溶液、乳酸リンゲル溶液などの等張賦形剤、又は当技術分野でよく知られている他の賦形剤を含むことが好ましい。さらに、滅菌不揮発性油は、従来の溶媒又は懸濁媒体として使用することができる。この目的のために、合成のモノグリセリド又はジグリセリドを含む任意の無菌性不揮発性油は、使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸は、同様に、注射用製剤の調製に使用することができる。医薬組成物は、安定剤、保存剤、緩衝液、抗酸化剤、又は当業者によく知られている他の添加剤を含んでもよい。

10

【0139】

注射持続時間は、種々の要因に応じて調整することができ、数秒以内の間に投与される単回注射と、0.05時間、0.1時間、0.25時間、0.5時間、0.75時間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、又は24時間以上までの持続静脈内投与とを含んでもよい。

20

【0140】

好ましい実施形態に係る化合物は、医薬組成物によく見られる従来の補助成分を、それらの技術分野で慣用の方法、及び慣用のレベルでさらに使用することができる。したがって、例えば、組成物は、併用療法のために添加される相溶性のある薬学的活性物質（例えば、補助的抗菌剤、止痒剤、収斂剤、局所麻酔剤、抗炎症剤、還元剤、化学療法剤など）を含んでもよく、また、好ましい実施形態に係る種々の剤形を物理的に調製するのに有用である特定の材料、例えば賦形剤、染料、増粘剤、安定剤、保存剤又は抗酸化剤などを含んでもよい。好ましい実施形態に係る化合物と併用可能である抗癌剤は、ビンブラスチン及びピンクリスチンなどのピンカアルカロイド、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシンなどのアントラサイクリン、ビスアントレン及びミトキサントロンなどのアントラセン、エトポシド及びテニポシドなどのエピポドフィロトキシシン、及び他のアクチノマイシンD、マイトマイシンC、ミトラマイシン、メトトレキサート、ドセタキセル、エトポシド(VP-16)、パクリタキセル、ドセタキセル、及びアドリアマイシンなどの抗癌剤、並びに免疫抑制剤（例えば、シクロスポリンA、タクロリムス）を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される化合物、組成物、及び方法は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤(HDAC)、オーロラキナーゼ阻害剤、脱メチル化剤（例えば、5-AZAシチジン）、ナチュラルキラー細胞による免疫療法、IGF-IR抗体、ユーイング抗原抗体、免疫抑制薬、及びヒドロキシウレアと併用されてもよい。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の例としては、ボリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、バルプロ酸、ベリノスタット、モセチノスタット(mocetinostat)、ギビノスタット(givinostat)、及びトリコスタチンAが含まれる。オーロラキナーゼ阻害剤の例としては、ZM447439、ヘスペラジン(hesperadin)、及びVX-680が含まれる。脱メチル化剤の例としては、5-アザシチジン、5-アザデオキシシチジン、及びプロカインが含まれる。免疫抑制薬の例としては、6-メルカプトプリン、及びアザチオプリンが含まれる。

30

40

【0141】

<特定のキット>

好ましい実施形態に係る化合物は、キットの形で、医師又は他の医療専門家による投与

50

に提供され得る。キットは、適切な医薬組成物における化合物の収納容器、及び対象に医薬組成物を投与するための使用説明を収容するパッケージである。また、キットは、例えば、本明細書に記載される肉腫の治療に現在使用される化学療法薬などの1つ以上の付加的治療薬を任意に含んでもよい。例えば、1つ以上の付加的化学療法薬と併用する好ましい実施形態に係る化合物が含まれる1つ以上の組成物を含有するキットを提供することができ、又は好ましい実施形態に係る阻害剤が含まれる医薬組成物と付加的治療薬とを分けるキットを提供することができる。キットは、順次又は連続投与のために、個別投与量の好ましい実施形態に係る化合物を含んでもよい。キットは、1つ以上の診断ツール及び使用説明を任意に含んでもよい。キットは、例えば注射器などの適切な送達デバイスを、阻害剤及び他の任意の治療薬を投与するための使用説明とともに含んでもよい。キットは、それに含まれる一部又は全ての治療薬の保管、再構成（必要な場合）、及び投与のための使用説明を任意に含んでもよい。キットは、対象に与えられる投与回数に対応する複数の容器を含んでもよい。

10

【0142】

< 特定の治療法 >

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（ESFT）を治療する方法に関する。ESFTは、特有の融合タンパク質であるEWS-FLI1を含む。ESFTは、3歳～40歳の間の患者に影響を与え、ほとんどの場合10代の患者に発生する。ESFTが由来する発生学的細胞型は不明であるにもかかわらず、腫瘍は骨に近接して成長するが多いが、軟組織塊として発生する可能性もある。転位性ESFTを呈する患者の75%～80%は、高用量の化学療法にもかかわらず、5年以内に死亡することになる一方、局所腫瘍を呈する患者の40%以上は、再発性疾患を発症することになるとともに、これらの患者の大部分は、ESFTで死亡することになる（Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 2003; 348(8): 694-701)。これらの患者の生存率は、用量強化化学治療（dose-intensifying chemotherapy）後でも、過去20年間に改善していない。生存率を改善し治療関連死亡率を減少させるために、好ましい実施形態で提供されるような、ESFT患者を治療するための新規標的戦略を使用することができる。

20

30

【0143】

ESFTは、95%の腫瘍において、22番染色体に存在するEWS遺伝子（ユーイング肉腫）の中央エクソンとetsファミリー遺伝子の中央エクソンとの間、すなわち、11番染色体に存在するFLI1（フレンド白血病統合体）との間 t(11;22) 又は21番染色体に存在するERGとの間 t(21;22)、で発生する転座によって特徴付けられる。EWS-FLI1融合転写物は、2つのプライマリドメインを有する55 kDaタンパク質（約68 kDの電気泳動移動度）をコードする。FLI1ドメインは、高度に保存されたets DNA結合ドメインを含有する。一方、EWSドメインは、強力な転写活性化因子である（May WA, Lessnick SL, Braun BS, et al. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 1993; 13(12): 7393-8)。得られたEWS-FLI1融合タンパク質は、異常な転写因子として作用する。マウス線維芽細胞のEWS-FLI1形質転換は、EWS及びFLI1双方の機能ドメインが無傷であることを必要とする（May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric

40

50

ric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(12): 5752-6)。

【0144】

EWS-FLI1は、腫瘍細胞のみで発現され、ESFT細胞株の増殖を維持するために必要とされる点において、優れた治療標的である。アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)(Toretzky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK. Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. J Neurooncol 1997; 31(1-2): 9-16; Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. J Clin Invest 1997; 99(2): 239-47)、又は低分子干渉RNA(siRNA)(Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES. Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. Oncogene 1995; 11(6): 1049-54; Maksimenko A, Malvy C, Lambert G, et al. Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. Pharm Res 2003; 20(10): 1565-7; Kovar H, Aryee DN, Jug G, et al. EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. Cell Growth Differ 1996; 7(4): 429-37)の使用によってEWS-FLI1の発現量が減少し、ヌードマウスにおいてESFT細胞株の増殖減少及び腫瘍の退縮が誘発される。ナノテクノロジーの最近の進歩により、siRNAの送達及び制御放出は改善されたが、ヒトにおいて、アンチセンスODN又はsiRNAでEWS-FLI1を減少させることは、現在の技術では不可能である(Maksimenko A, Malvy C, Lambert G, et al. Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. Pharm Res 2003; 20(10): 1565-7; Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, et al. EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits Ewing sarcoma-related tumor in mice. Biochem Biophys Res Commun 2000; 279(2): 401-6)。EWS-FLI1標的の興味深いアプローチの1つでは、Ara-Cによる現在の臨床試験につながる、EWS-FLI1を減少させるsiRNAと小分子ライブラリとの間の比較発現が利用されていた(Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, et al. Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. PLoS medicine 2007; 4(4): e122)。Ara-Cの同定方法では、ドキソルピシン及びピューロマイシンがEWS-FLI1レベルを減少させることも示された。ドキソルピシンは、現在ESFT患者の標準的治療として使用されているが、生存率が許容範囲にあるとは言えなかった(Grier H

10

20

30

40

50

E, Krailo MD, Tarbell NJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 2003; 348(8): 694 - 701)。ESFT患者におけるAra-Cの使用は、現在、第二相試験で評価されている。これは必要な臨床突破口を示すと期待されている一方、EWS-FLI1の小分子標的の重要性を確実に示している。好ましい実施形態は、重要なタンパク質パートナーからEWS-FLI1を破壊する小分子タンパク質間相互作用阻害剤(SMPPII)を提供することによって、EWS-FLI1の腫瘍特異性及びより正確な標的を達成する。

10

【0145】

EWS-FLI1融合タンパク質機能は、転座しないEWS又はFLI1と異なるという結論を下すのに十分な証拠がある(May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(12): 5752 - 6)。EWS-FLI1発現細胞株の遺伝子発現プロファイル(Braun BS, Frieden R, Lessnick SL, May WA, Denny CT. Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol Cell Biol* 1995; 15(8): 4623 - 30)又はESFT患者から得る腫瘍細胞における変化は、EWS-FLI1発現欠損腫瘍と比べて、EWS-FLI1が転写調節に関与する可能性を示している(Khan J, Wei JS, Ringner M, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001; 7(6): 673 - 9; Baer C, Nees M, Breit S, et al. Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2004; 110(5): 687 - 94)。EWS-FLI1調節遺伝子発現のメカニズムの明確なイメージがすでに出現する一方、この活性は、EWS-FLI1と、RNA合成及びスプライシングの調節因子との間の直接的又は二次的相互作用の結果である可能性が高い(Uren A, Toretsky JA. Ewing's Sarcoma Oncoprotein EWS-FLI1: the Perfect Target without a Therapeutic Agent. *Future Onc* 2005; 1(4): 521 - 8)。

20

30

40

【0146】

EWS-FLI1は、腫瘍細胞のみで発現するので、重要な治療標的であるが、その腫瘍特異性が遺伝子を標的とする能力は、これまでは十分に発揮されていない。小分子の開発に向けた課題の1つは、EWS-FLI1が、標的治療に重要であると考えられる任意の既知の酵素ドメインを欠いていることである。さらに、EWS-FLI1は、構造情報に基づく医薬品設計に利用できる強固な構造が見られないことを示す変性タンパク質である(Uren A, Tcherkasskaya O, Toretsky JA. Recombinant EWS-FLI1 oncoprotein activates transcription. *Biochemistry* 2004; 43(42): 13579 - 89)。実際には、EWS-FLI1の変性特質は、その転写調節にとって

50

重要である (Ng KP, Potikyan G, Savene RO, Denny CT, Uversky VN, Lee KA. Multiple aromatic side chains within a disordered structure are critical for transcription and trans forming activity of EWS family oncoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(2): 479-84)。変性タンパク質は、特に、それらの生化学的変性特性のため、小分子タンパク質間相互作用阻害剤のより魅力的な標的と考えられる (Cheng Y, Le Gall T, Oldfield CJ, et al. Rational drug design via intrinsically disordered protein. Trends Biotechnol 2006; 24(10): 435-42)。

10

【0147】

EWS-FLI1は、インビトロ及びインビボでRNAヘリカーゼAを結合する。EWS-FLI1のタンパク質間相互作用は、その発癌性に寄与する可能性があると考えられるので、新規タンパク質は、EWS-FLI1と直接に相互作用し、かつEWS-FLI1を機能的に調節すると考えられる。転写活性のある組み換えEWS-FLI1 (Uren A, Tcherkasskaya O, Toretsky JA. Recombinant EWS-FLI1 oncoprotein activates transcription. Biochemistry 2004; 43(42): 13579-89)は、市販のペプチドファージディスプレイライブラリをスクリーニングするための標的として使用している。EWS-FLI1と特異的に結合している28個の新規ペプチドは、ファージシーケンシングから同定される。これらのペプチドと相同のヒトタンパク質を検索するための国立生物工学情報センターのデータベースは、ヒトRNAヘリカーゼAのaa823-832と相同のペプチドを同定した (RHA、遺伝子バンク登録番号A47363) (Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, et al. Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. Cancer Res 2006; 66(11): 5574-81)。

20

【0148】

タンパク質の高度に保存されたDEXD/HボックスヘリカーゼファミリーのメンバーであるRHAは、ヒトトランスクリプトームの不可欠な多機能メンバーである (Zhang S, Grosse F. Multiple functions of nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) in nucleic acid metabolism. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2004; 36(3): 177-83; von Hippel PH, Delagoutte E. A general model for nucleic acid helicases and their "coupling" within macromolecular machines. Cell 2001; 104(2): 177-90)。これらのタンパク質は、古細菌、真正細菌、下等及び高等真核生物、並びに多数のウイルスから、フラビウイルスファミリーのプラス鎖RNAウイルスを含む種々の生物の多様な機能に関わる。RHAは、NF- κ Bの転写コアクチベーターであり、CREB結合タンパク質 (CBP) (Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, et al. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. Cell 1997; 90(6): 1107-12)、RNAポリメラーゼII (Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, et al. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. Cell 1997; 90(6): 1107-12)、乳癌腫瘍抑制因子BRCA1 (Anderson SF, Schlegel BP, Nakajima T, Wolpin ES, Parv

30

40

50

in JD. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. Nat Genet 1998; 19(3): 254-6)、及びごく最近の EWS-FLI1 (Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, et al. Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. Cancer Res 2006; 66(11): 5574-81) と、複合体を形成することが示される。EWS-FLI1 は、特有で、かつ他の任意の RHA 結合パートナーの結合部位としては知られていない RHA の領域に結合する (Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, et al. Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. Cancer Res 2006; 66(11): 5574-81)。RHA の不活性化変異はコロニー形成を防止する一方、RHA 発現は EWS-FLI1 媒介足場非依存性のコロニー形成を促進した (Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, et al. Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. Cancer Res 2006; 66(11): 5574-81)。この構造的及び機能的相互作用は、好ましい実施形態に係る治療薬の基礎である。

【0149】

転写が腫瘍形成に重要であるにもかかわらず、このプロセスにおけるヘリカーゼの役割は十分に研究されていない。RHA は、多様な機能を持つヒトトランスクリプトームの不可欠なメンバーである (Zhang S, Grosse F. Multiple functions of nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) in nucleic acid metabolism. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2004; 36(3): 177-83; von Hippel PH, Delagoutte E. A general model for nucleic acid helicases and their "coupling" within macromolecular machines. Cell 2001; 104(2): 177-90)。発明者らの最近発表されたデータにより、RHA は多機能の EWS-FLI1 腫瘍性タンパク質と相互作用することが示されている (Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, et al. Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. Cancer Res 2006; 66(11): 5574-81)。この相互作用は、転写開始及び転写後双方の RNA 修飾において EWS-FLI1 が機能する能力を有すると認められる主要因である。また、RNA ヘリカーゼは、スプライシング因子 U1C (Chen JY, Stands L, Staley JP, Jackups RR, Jr., Latus LJ, Chang TH. Specific alterations of U1-C protein or U1 small nuclear RNA can eliminate the requirement of Prp28p, an essential DEAD box splicing factor. Mol Cell 2001; 7(1): 227-32; Knoop LL, Baker SJ. The splicing factor U1C represses EWS/FLI-mediated transactivation. J Biol Chem 2000; 275(32): 24865-71)、CREB 結合タンパク質 (CBP) (Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, et al. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. Cell 1997; 90(6): 1107-12)、及び RNA ポリメラーゼ II (Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, et al. RNA helicase A mediates as

10

20

30

40

50

sociation of CBP with RNA polymerase II. Cell 1997; 90(6): 1107-12)を含む、EWS-FLI1の結合パートナーとして同定された同じ因子の一部に結合して、ブリッジの役割を果たすことが知られている。RHAは、EWS-FLI1及びRNA Pol IIと同様の機能を果たすことができ、キープロセシングタンパク質の補充において役割を果たす。また、RHAは、その機能がエネルギーソースとしてRHAのATPアーゼ活性に依存している大きな転写複合体の一部として、EWS-FLI1を維持することによって、ESFT腫瘍形成に寄与する可能性がある。最後に、RHAなどのヘリカーゼは、mRNA種を安定化させることができる(Iost I, Dreyfus M. mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. Nature 1994; 372(6502): 193-6)。RHAによるEWS-FLI1転写mRNAの安定化及び代謝は、EWS-FLI1の発癌性を増大させるかもしれない。

10

【0150】

EWS-FLI1がESFT細胞に非常に特異的である一方、EWS及びRHAは、普遍的に発現される。EWS-FLI1は腫瘍のみで発現されるとともに、RHAとの相互作用点が特有であるので、EWS-FLI1とRHAとの間の領域は、特異性のある分子治療薬の標的とされる。治療薬、すなわち、小分子タンパク質間相互作用阻害剤は、EWS-FLI1機能を阻害するように本明細書中で提供される。

【0151】

ESFTを含むほとんどの転座融合タンパク質肉腫は、予後不良の前兆となる。特有で重要な融合タンパク質EWS-FLI1につながる染色体転座t(11;22)は、完全な癌標的である。他の多くの肉腫は、同様の転座変異体を共有する(Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. Nat Rev Cancer 2003; 3(9): 685-94の表2)。

20

【0152】

EWS-FLI1転座は、膵臓の充実性偽乳頭腫瘍(solid pseudopapillary neoplasms)で報告されている(Maitra A., et al., Detection of t(11;22)(q24;q12) translocation and EWS-FLI-1 fusion transcript in a case of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. Pediatr Dev Pathol 2000; 3: 603-605)が、全ての充実性偽乳頭腫瘍におけるEWS-FLI1の役割は、まだ解明されていない(Katharina Tiemann et al., Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas are associated with FLI-1 expression, but not with EWS/FLI-1 translocation)。

30

【0153】

EWS又はFLI1のホモログ(相同物)は、広範囲の肉腫及び白血病で発生する転座のパートナーである。EWS又はそのホモログであるTLS若しくはFUSは、明細胞肉腫、粘液性脂肪肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、軟骨肉腫、及び急性骨髄性白血病の染色体転座に関与する。FLI1は、遺伝子のetsファミリーに属する。FLI1のホモログであるERGは、約10%のユーイング肉腫及び20%の急性骨髄性白血病で転座する。これによって、EWS-FLI1は、多数の患者に影響する疾患群(転座パートナーによって関連付けられる)に影響を与える可能性のあるモデルシステムとして役立つことが示唆されている。(Uren A., Tcherkasskaya O. and Toretsky J. A. Recombinant EWS-FLI1 oncoprotein activates transcription. Biochemistry 43(42) 13579-89(2004))。

40

【0154】

50

また、ERGは、TMPRSS2:ERG融合が疾患進行のリスクを定義できる特異的な分子サブタイプを示唆する前立腺がんにおいても、転座することがある(F. Demichelis et al., TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* (2007) 26, 4596 - 4599)。EWS又はFLI1ファミリーメンバーの転座が認められる他の疾患は、etsファミリーメンバーであるETV6がNTRK3と並置される先天性線維肉腫及び細胞中胚葉性腎腫を含む。他の転座遺伝子融合は、BCR-ABL融合タンパク質の発現につながる慢性骨髄性白血病と、18番染色体由来のSYT遺伝子がX染色体由来のSSX1又はSSX2と並置される滑膜肉腫とを含む(Aykut Uren and Jeffrey A. Toretsky, Pediatric malignancies provide unique cancer therapy targets. *Curr Opin Pediatr* 17:14 - 19 (2005))。

10

【0155】

したがって、好ましい実施形態に係る治療薬は、他の多くの腫瘍に適用する可能性がある。さらに広く見れば、最も困難な白血病のいくつかは、混合系統白血病遺伝子(MLL, 11q23)に関与する転座発生融合タンパク質を有し、発明者らの仕事は、非常に治療抵抗性のある癌グループのためのパラダイムとして役立つ(Pui CH, Chessells JM, Camitta B, et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia* 2003; 17(4): 700 - 6.)。そのため、本発明の実施形態は、転座が発生した癌を含む。転座融合遺伝子は、表1に示される。

20

【0156】

【表 1】

表 1

転座	遺伝子	融合遺伝子の種類
ユーイング肉腫		
t(11;22)(q24;q12)	EWSR1-FLI1	転写因子
t(21;22)(q22;q12)	EWSR1-ERG	転写因子
t(7;22)(p22;q12)	EWSR1-ETV1	転写因子
t(17;22)(q21;q12)	EWSR1-ETV4	転写因子
t(2;22)(q33;q12)	EWSR1-FEV	転写因子
明細胞肉腫		
t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1	転写因子
線維形成性小円形細胞腫瘍		
t(11;22)(p13;q12)	EWSR1-WT1	転写因子
粘液性軟骨肉腫		
t(9;22)(q22-31;q11-12)	EWSR1-NR4A3	転写因子
粘液性脂肪肉腫		
t(12;16)(q13;p11)	FUS-DDIT3	転写因子
t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-DDIT3	転写因子
胞巣状横紋筋肉腫		
t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1A	転写因子
t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FOXO1A	転写因子
滑膜肉腫		
t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX	転写因子
隆起性皮膚線維肉腫		
t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	成長因子
先天性線維肉腫		
t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	転写因子レセプター
炎症性筋線維芽細胞性腫瘍		
2p23 転位	TMP3-ALK;TMP4-ALK	成長因子レセプター
胞巣状軟部肉腫		
t(X;17)(p11.2;q25)	ASPL-TFE3	転写因子

【0157】

< 特定の適応症 >

本明細書で提供される特定の化合物、組成物及び方法は、転座遺伝子融合、ユーイング肉腫、明細胞肉腫、粘液性脂肪肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、粘液性軟骨肉腫、急性骨髄性白血病、先天性線維肉腫、前立腺がん、乳がん、及び膵臓がんを含む、腫瘍などの多数の疾患を治療するために使用できる。いくつかの実施形態では、癌は、肺腺癌又は多形性膠芽腫である。いくつかの実施形態では、癌は、FLI1、ETV1、ETV4、ERG、ETS1、及びETS2 からなる群より選ばれるETS 遺伝子を含む転座を有している。

【実施例】

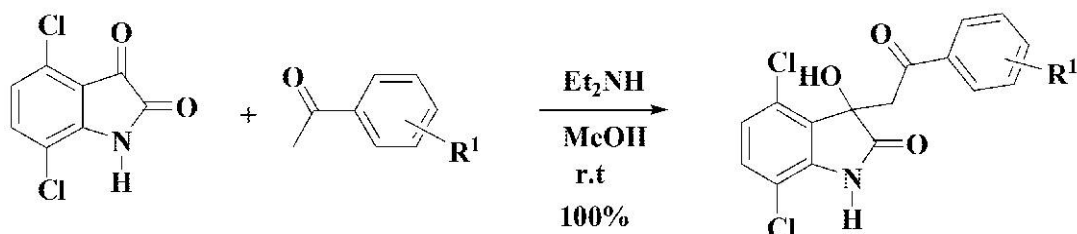
【0158】

完成した実験及び結果を含む以下の実施例は、説明のみを目的として提供されるものであり、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。化学構造は不完全な原子価(unfilled valency)を有する原子を表現する場合、1つ以上の水素原子によってその原子価を満たすと理解される。

【0159】

(実施例1：4,7-ジクロロイサチン類似物の合成)

【化24】



10

【0160】

触媒量のジエチルアミンの存在下で、適切なアセトフェノンと4,7-ジクロロイサチンとを縮合させ、定量的収率で所望の化合物を調製した。

20

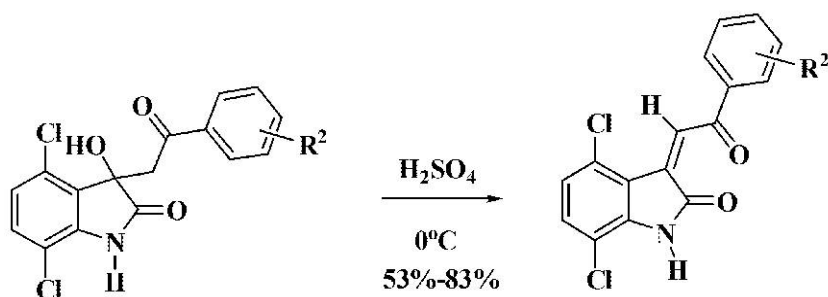
実施例化合物：R¹ = 4'-CN (PT-1-11)、2'-OCH₃ (PT-1-12)、3'-OCH₃ (PT-1-18)、2',4'-OCH₃ (PT-1-19)、2',3'-OCH₃ (PT-1-20)、3',4'-OCH₃ (PT-1-21)、3',5'-OCH₃ (PT-1-22)、2',3',4'-OCH₃ (PT-1-23)、3',4',5'-OCH₃ (PT-1-13)、4'-OC₂H₅ (PT-1-14)、4'-CF₃ (PT-1-15)、4'-OCF₃ (PT-1-16)、4'-N(CH₃)₂ (PT-1-17)、4'-OPh (PT-1-60)、4'-SCH₃ (PT-1-67)、及び4'-C(CH₃)₂ (PT-1-67)。

【0161】

(実施例2：脱水4,7-ジクロロイサチン類似物の合成)

30

【化25】



40

【0162】

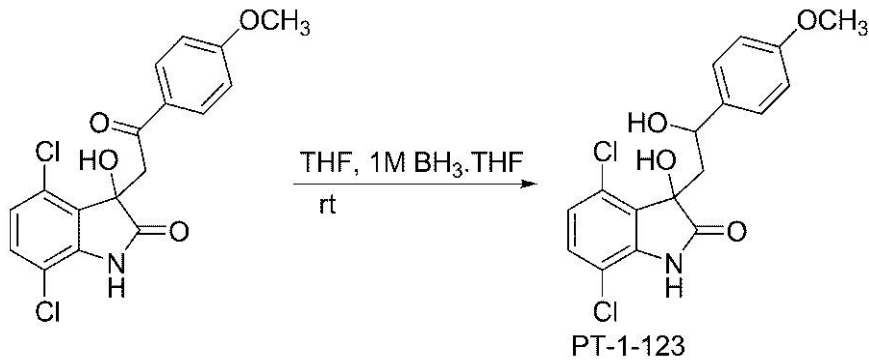
4,7-ジクロロイサチンの96% H₂SO₄溶液を室温で攪拌し、還元類似物を得た。

実施例化合物：R² = 4'-OCH₃ (PT-1-33)、2',4'-OCH₃ (PT-1-39)、2',3',4'-OCH₃ (PT-1-41)、4'-OC₂H₅ (PT-1-43)、及び4'-N(CH₃)₂ (PT-1-38)。

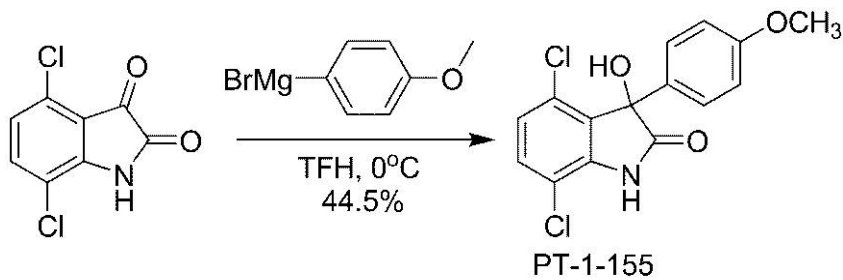
【0163】

(実施例3：還元4,7-ジクロロイサチン類似物の合成)

【化 2 6】



10

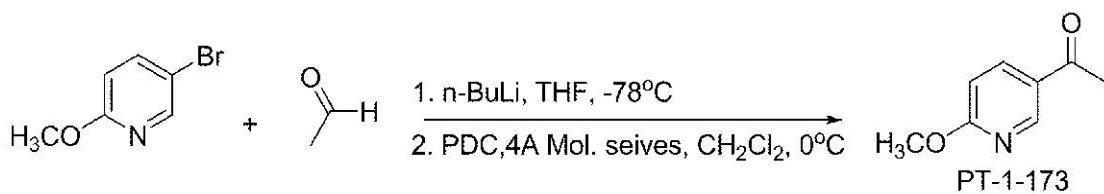


20

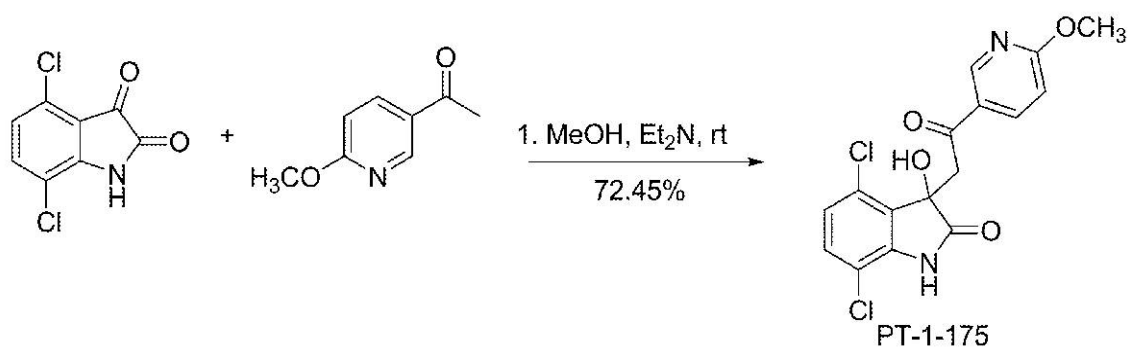
【 0 1 6 4】

(実施例 4 : 還元 4 , 7 - ジクロロイサチンピリジン誘導体の合成)

【化 2 7】



30



40

【 0 1 6 5】

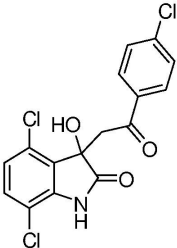
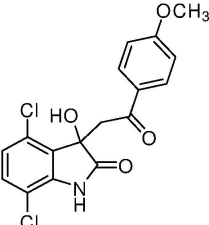
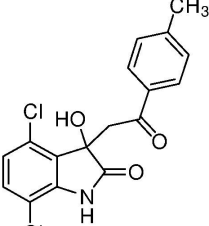

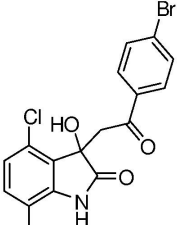
(実施例 5 : 特定の化合物の生物活性)

本明細書に記載の方法と同様の方法によって、表 2 に示す化合物を調製した。特定の化合物の構造、並びに PANC 1 (ヒト膵臓癌) 細胞、TC32 (ヒト ESFT 細胞株) 細胞及び TC71 (ヒト ESFT 細胞株) 細胞における IC₅₀ 活性を表 2 にまとめる。

【 0 1 6 6】

【表 2】

表 2

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
YK-4-275		11	40	23.95
YK-4-279		19.98; 33.96	0.9395; 0.7657	0.9178; 1.426
YK-4-280		40	12.11	30.08
YK-4-281		40	7.218	29.61
YK-4-283		12.66	8.911	25.96

10

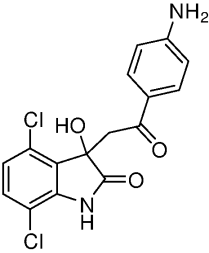
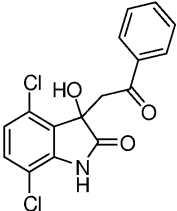
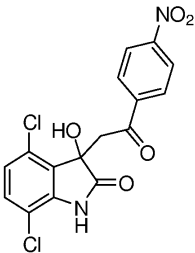
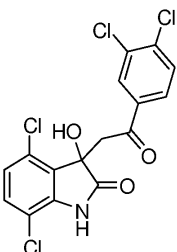
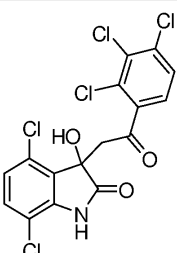
20

30

40

【表 3】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
YK-4-284		40	40	40
YK-4-285		40	40	40
YK-4-286		40	4.631	9.149
YK-4-287		12.6	6.32	15.82
YK-4-288		40	3.002	9.345

10

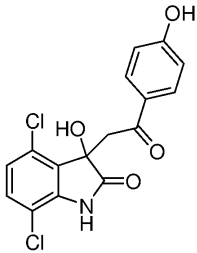
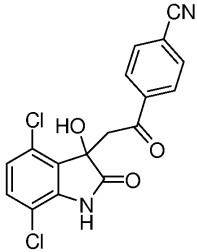
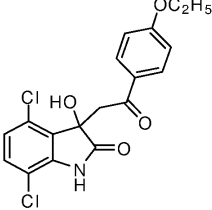
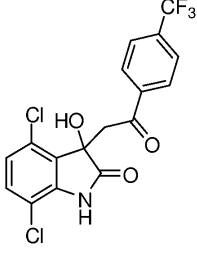
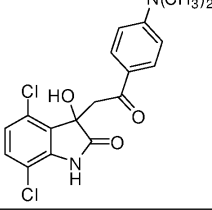
20

30

40

【表 4】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
YK-4-289		40	40	40
PT-1-11		40	10.34	12.28
PT-1-14		11.11	2.698	3.568
PT-1-15		10.91	2.952	6.941
PT-1-17		40;40	0.2589; 0.2836	0.4008; 0.2945

10

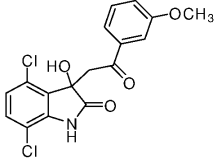
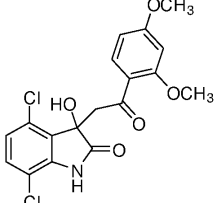
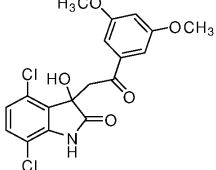
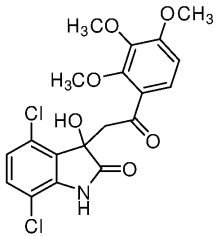
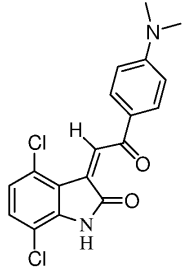
20

30

40

【表 5】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-1-18		40	40	40
PT-1-19		22.94	2.609	2.819
PT-1-22		40	8.988	40
PT-1-23		40	2.698	4.422
PT-1-38		15.5;40	0.2908; 0.3833	40;0.5682

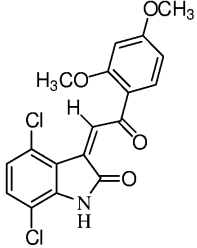
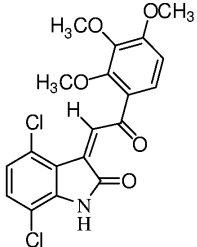
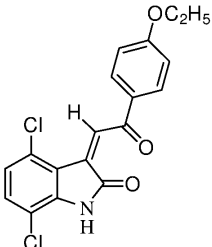
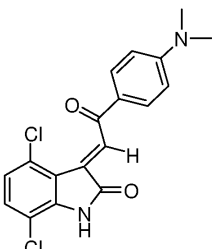
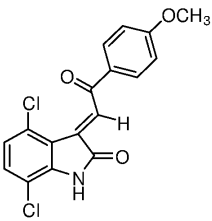
10

20

30

【表 6】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-1-39		5.413; 6.763	1.052; 1.664	1.806; 2.318
PT-1-41		2.855; 5.158	1.194; 1.611	2.142; 1.599
PT-1-43		10.98	1.409	5.655
PT-1-53		2.202	40	4.08
PT-1-54		2.127;40	1.498;2.57	1.362; 2.202

10

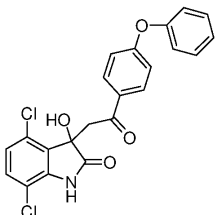
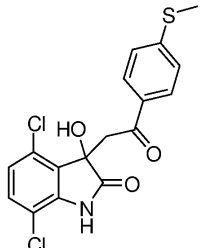
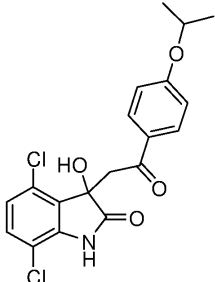
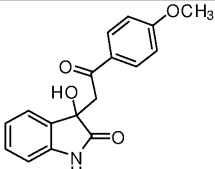
20

30

40

【表 7】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-1-60		40	40	40
PT-1-64		40	32.8	40
PT-1-67		28.1; 40	0.9822; 1.203	0.9086; 1.409
PT-1-69		40	40	40
PT-1-267		40	40	40

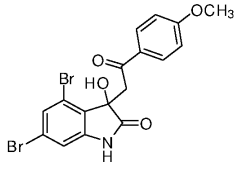
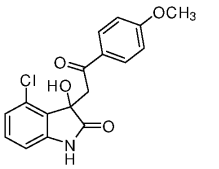
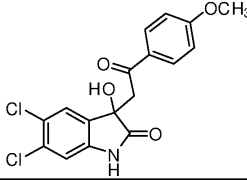
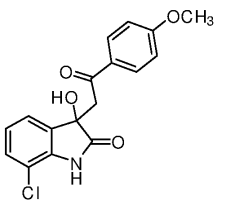
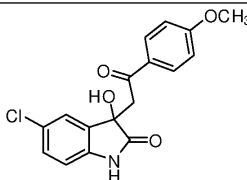
10

20

30

【表 8】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-1-271		40	40	40
PT-1-275		40	40	40
PT-2-39		40	40	40
PT-2-52		40	40	40
PT-2-56		40	12.36	40

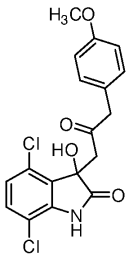
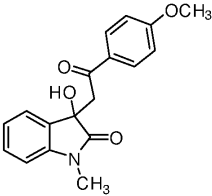
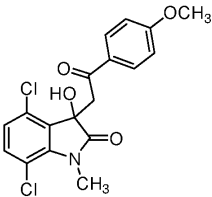
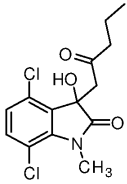
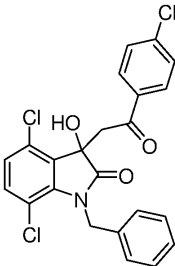
10

20

30

【表 9】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-2-59		40	40	40
PT-2-64		40	40	40
PT-2-69		40; 40	2. 178; 2. 305	0. 7145; 2. 341
PT-2-71		40	40	40
YK-4-276		40	40	40


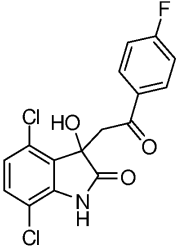
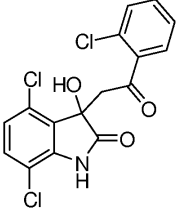
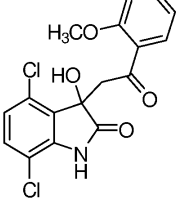
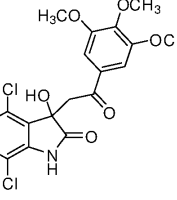
10

20

30

【表 10】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
YK-4-277		40	40	40
YK-4-278		40	40	40
YK-4-282		40	40	40
PT-1-12		40	40	40
PT-1-13		40	40	40

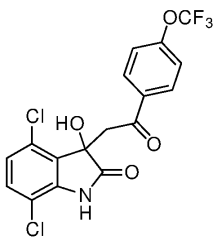
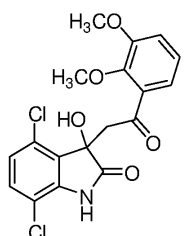
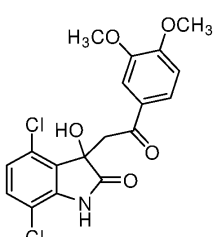
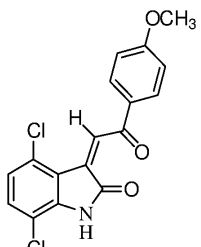
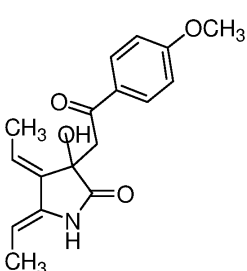
10

20

30

【表 1 1】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-1-16		40	40	40
PT-1-20		40	40	40
PT-1-21		40	40	40
PT-1-33		40	1.035	1.636
PT-2-37		40	40	40

10

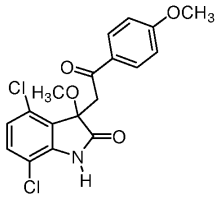
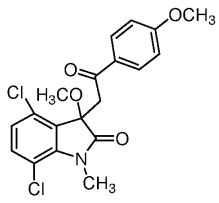
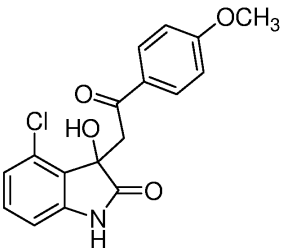
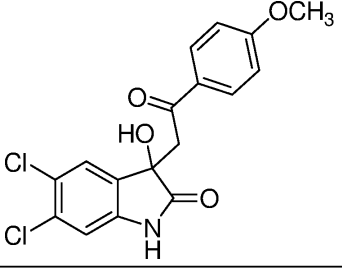
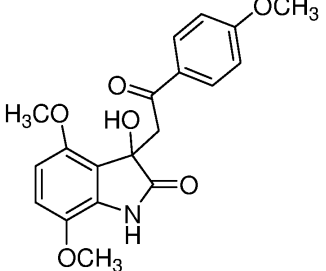
20

30

40

【表 1 2】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-2-78		40	40	40
PT-2-79		11.19	12.13	16.98
PT-2-47				
PT-2-39				
PT-2-99				

10

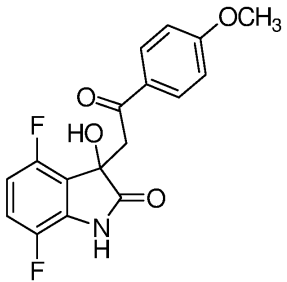
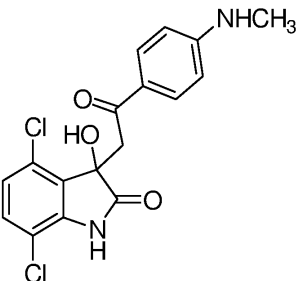
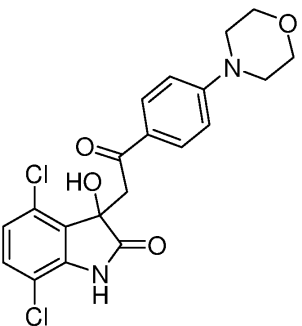
20

30

40

【表 13】

表 2 (続き)

実施例	構造	IC ₅₀ (μM)		
		PANC1	TC32	TC71
PT-2-94				
PT-2-84				
PT-2-89				

10

20

30

【0167】

(実施例6：置換類似物によるEWS-FLI1細胞の増殖阻害)

ESFT細胞の増殖阻害を確認することによって、YK-4-279類似物のESFT細胞に対する効果を試験した。リード化合物のIC₅₀は、単分子層で増殖する細胞に対して、900nMであった。種々の濃度の特定の化合物で、ESFT細胞の増殖阻害を測定した。種々の濃度のYK-4-279及びPT-1-33で、TC71及びTC32細胞の増殖阻害を測定した(図3A)。種々の濃度のYK-4-279、PT-1-33、及びPT-1-55で、TC71細胞の増殖阻害を測定した(図3B)。種々の濃度のYK-4-279及びPT-1-123で、TC71細胞の増殖阻害を測定した(図3C)。いくつかの類似物は、YK-4-279と同様の活性を有する。脱水類似物及びアルコール類似物は、ESFT細胞(図3A)に対して同様の活性を示した。ケトンの修飾は、化合物の活性を改善しなかった(図3B及び図3C)。

40

【0168】

(実施例7：EWS-FLI1細胞のアポトーシス)

YK-4-279で処理され、RHA、EWS-FLI1又は総タンパクと共沈殿したTC32細胞からのタンパク質溶解物により、免疫プロットを行った(図4)。YK-4-279は、EWS-FLI1又はRHAのレベルに直接影響を与えないが、それらの相互作用を分断した。RHAとEWS-FLI1との相互作用の分断により、ユーイングフ

50

アミリーの肉腫腫瘍に対する潜在的な治療薬として小分子クラスの開発手段が示された。YK-4-279がタンパク質間相互作用を分断する一方、PT-1-17は、TC71細胞においてより強い効力を呈する。YK-4-279の脱水類似物は、化合物の効力を著しく増加させなかった。

【0169】

(実施例8：EWS-FLI1/RHA結合の分断)

ELISAアッセイで、EWS-FLI1とヒスチジンで標識されたRHAタンパク質であるHisタグRHA(647-1075)との間の結合を分断する候補小分子の活性をスクリーニングした。つまり、EWS-FLI1によりコーティングしたプレートにおいて候補薬剤をRHAとともに培養した。プレートを洗浄した後、一次抗RHA抗体及び

10

【0170】

96ウェルプレートのウェルを、100 µl / ウェルの20 nM EWS-FLI1タンパク質溶液(1 M イミダゾール、20 mM トリス、500 mM NaCl)とともに4 で一晩培養した。プレートをPBSで洗浄した後、150 µl / ウェルの4 % BSAにより、室温で少なくとも2時間ブロックし、その後、ELISA洗浄液(PBS + 0.1 % T20、200 µl / ウェル)で再度洗浄した。プレートを、100 µl / ウェルの候補薬剤とともに、PBS(10 µM又は最終50 µM)又はDMSO対照において、室温で1時間培養した。プレートを100 µl / ウェルの20 nM His-RHAタンパク質溶液(0.5 M イミダゾール、125 mM NaCl、20 mM トリス)とともに、4 で一晩培養した後、ELISA洗浄液(PBS + 0.1 % T20、200 µl / ウェル)で洗浄した。プレートを、100 µl / ウェルの一次抗RHA抗体(1:1000 goat Anti-DHX9/EB09297、エベレスト)とともに、室温で1時間培養した後、ELISA洗浄液(PBS + 0.1 % T20、200 µl / ウェル)で洗浄することによって、プレートに結合したRHAを検出した。プレートを、100 µl / ウェルの二次抗ヤギ抗体(1:500 donkey anti-goat IgG-HRP:sc-2020)とともに、室温で1時間培養した後、ELISA洗浄液(PBS + 0.1 % T20、200 µl / ウェル)で洗浄することによって、一次抗体を検出した。450 nmにおけるプレートリーダーにより、西洋ワサビペルオキシダーゼアッセイキットを用いて、各ウェル(Bio Rad-TMBペルオキシダーゼEIA

基質キット 172-1066)における二次抗ヤギ抗体の量を測定した。低い量のHRPを示す相対的に低い光学密度は、EWS-FLI1-RHA結合に対する阻害活性が増加した候補薬剤を意味する。その結果を、図5A~5Gにまとめた。図5Aは、候補分子YK-4-275、YK-4-285、PT-1-12、PT-1-18、PT-1-19、PT-1-20、PT-1-21、PT-1-22、PT-1-23、PT-1-175の結果をまとめる。図5Bは、候補分子PT-2-84、PT-2-59、PT-1-17、PT-2-71、PT-2-89、PT-1-123、PT-1-15、PT-1-60、PT-1-67、PT-1-69の結果をまとめる。図5Cは、候補分子YK-4-285、YK-4-286、PT-1-33、PT-1-38、PT-1-271、PT-1-52、PT-1-56、PT-1-64、PT-2-94、PT-1-267の結果をまとめる。図5Dは、候補分子YK-4-282、YK-4-287、YK-4-280、YK-4-289、YK-4-288、YK-4-278、YK-4-276、YK-4-283、YK-4-277、YK-4-281の結果をまとめる。図5Eは、候補分子PT-1-54、YK-4-279、YK-4-279(R)、PT-1-55、PT-2-75、PT-2-39、PT-2-79、PT-1-16、PT-1-13、PT-2-64の結果をまとめる。図5Fは、候補分子YK-4-284、PT-1-14、PT-1-39、PT-1-41、PT-1-43、PT-1-53、PT-2-56、PT-2-52、PT-1-61、PT-1-183の結果をまとめる。図5Gは、候補分子PT-1-275、PT-2-69、PT-2-99、YK-4-288、PT-1-19、PT-1-20、PT-1-69、PT-2-89、PT-1-17

20

30

40

50

、PT-2-94の結果をまとめる。

【0171】

(実施例9：EWS-FLI1転写因子活性の妨害)

NROB1プロモーターに結合するEWS-FLI1がルシフェラーゼ発現を増加させるルシフェラーゼアッセイを用いて、EWS-FLI1転写因子活性を妨害する候補小分子の活性をスクリーニングした。つまり、ルシフェラーゼ発現を駆動するNROB1プロモーターと、EWS-FLI1発現ベクターとを含むベクターにより細胞をトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を種々の濃度の候補薬剤によって処理し、ルシフェラーゼ発現の相対レベルの変化を測定した。COS7細胞を96ウェルプレートに播種し、pciNEO/EFベクター及びpGL3-NROB1によってトランスフェクトした。対照群は、各ベクターによるトランスフェクションのみを含んだ。トランスフェクトされた細胞を種々の濃度の候補薬剤によって処理し、処理された細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性の低下は、ルシフェラーゼの転写を促進し、転写因子として機能するEWS-FLI1の阻害活性を有する候補薬剤を示す。図6A及び図6Bは、種々の濃度の候補薬剤による相対ルシフェラーゼ活性の一般的な傾向を示す。図7A~図7Iは、種々の濃度の候補薬剤による阻害活性を示す。

【0172】

(実施例10：多形性膠芽腫の治療)

多形性膠芽腫(GBM)は、分子隔離へ導くその遺伝的特徴の視点から、古典的な、前神経系の、神経系の、及び間葉性の分類がある、非常に注釈が多い腫瘍である(Puro BW, Schiff D. Glioblastoma genetics: in rapid flux. *Discov Med*. 2010 Feb; 9(45):125-31. PubMed PMID: 20193638. Pubmed Central PMCID: 3365574)。GBMを分類する遺伝的特徴の変化には、シグナル伝達経路の構成的活性化、腫瘍抑制因子の損失、代謝伝達経路における突然変異、異常DNA修復、及び有糸分裂規制の損失が含まれる(Suzuki E, Williams S, Sato S, Gilkeson G, Watson DK, Zhang XK. The transcription factor Fli-1 regulates monocyte, macrophage and dendritic cell development in mice. *Immunology*. 2013 Jul; 139(3):318-27. PubMed PMID: 23320737. Pubmed Central PMCID: 3701178; Chow LM, Endersby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, et al. Cooperative activity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. *Cancer Cell*. 2011 Mar 8; 19(3):305-16. PubMed PMID: 21397855. Pubmed Central PMCID: 3060664; Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahoul AG, Harris BT, et al. Mutational inactivation of S TAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science*. 2011 Aug 19; 333(6045):1039-43. PubMed PMID: 21852505. Epub 2011/08/20. eng)。これらの分類内であっても、GBMは、重要な腫瘍内異質性を伴う腫瘍として認識されている(Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 2013 Mar 28; 153(1):17-37. PubMed PMID: 23540688; Nabils NH, Delleyrolle LP, Darst RP, Riva A, Reynolds BA, Kladd MP. Multiplex mapping of chromatin accessibility and DNA methylation within

10

20

30

40

50

targeted single molecules identifies epigenetic heterogeneity in neural stem cells and glioblastoma. *Genome Res.* 2013 Oct 8. PubMed PMID: 24105770). 遺伝的特徴における並外れた可変性にもかかわらず、転写制御因子はほとんど注目されてきていない。GBMにおいて転写因子がほとんど充分には研究されなかった理由の1つは、効果的な小分子阻害剤が存在しないことであると考えられる。この例外はp53であり、p53の野生型機能は、小分子タンパク質相互作用阻害剤Nutlin-3で維持され得る(Vassilev LT. p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J Med Chem.* 2005 Jul 14; 48(14): 4491-9. PubMed PMID: 15999986)。

【0173】

遺伝的多様性にもかかわらず、GBMについての標的及び非標的療法を評価する多くの臨床試験が完成している。これらの試験全て(放射線療法及び分子的に誘導された外科的切除を含む全て)をもってしても、効果的で長期間に渡るGBMについての療法は、大多数の患者にとっては進展していない(Yin AA, Cheng JX, Zhang X, Liu BL. The treatment of glioblastomas: A systematic update on clinical Phase III trials. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013 Sep; 87(3): 265-82. PubMed PMID: 23453191)。最も近年のVEGFR小分子阻害剤とテモゾロマイドとの第3相試験もまた、テモゾロマイドと放射線療法との標準的な治療を超える改善効果を示さなかった(Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B, Nabors LB, Campone M, Wick A, et al. Phase III Randomized Trial Comparing the Efficacy of Cediranib As Monotherapy, and in Combination With Lomustine, Versus Lomustine Alone in Patients With Recurrent Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2013 Sep 10; 31(26): 3212-8. PubMed PMID: 23940216)。いくつかのGBMについての療法に対して重要な挑戦が行われ、これにより、血液脳関門(BBB)が克服されている。このことは、多くの潜在的な標的療法に影響を及ぼしてきている(Juratli TA, Schackert G, Krex D. Current status of local therapy in malignant gliomas - a clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther.* 2013 Sep; 139(3): 341-58. PubMed PMID: 23694764)。

【0174】

GBMの生態の理解及び新規療法の発展のためにマイクロRNA(miRNA)を使用することにより、ジアシルグリセロールキナーゼアルファが潜在的な標的となるかもしれないという新規発見が導かれ、これらの阻害剤について小分子最適化が目下進行中である(Dominguez CL, Floyd DH, Xiao A, Mullins GR, Kefas BA, Xin W, et al. Diacylglycerol kinase alpha is a critical signaling node and novel therapeutic target in glioblastoma and other cancers. *Cancer Discov.* 2013 Jul; 3(7): 782-97. PubMed PMID: 23558954. Pubmed Central PMCID: 3710531)。さらに、miRNAは、GBM腫瘍形成にとって転写制御のネットワークが明らかに重要であることを示唆する生物情報モデル創造するために使用されてきている(Sun J, Gong X, Purow

10

20

30

40

50

B, Zhao Z. Uncovering MicroRNA and Transcription Factor Mediated Regulatory Networks in Glioblastoma. PLoS computational biology. 2012; 8(7): e1002488. PubMed PMID: 22829753. Pubmed Central PMCID: 3400583).

【0175】

推定新規GBM標的であるフレンド白血病統合体 - 1 (FLI1)

転写因子は、酵素活性を有しないため「新薬の開発にはつながらない」と考えられてきたが、多くの癌において局所性推進発癌遺伝子である。今まで、GBMについてのTCGAデータベースがあるにもかかわらず、臨界転写結節の療法的な標的指向性は生じていない。etsファミリー転写因子FLI1は、TCGAデータベースへの検索要求に基づいてGBM中に発現される(図8)。初期のETS-1研究では、ETS-1発現と、ヒト星細胞腫における悪性潜在とが関連付けられていた(Kitange G, Kishikawa M, Nakayama T, Naito S, Iseki M, Shibata S. Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors. Mod Pathol. 1999 Jun; 12(6): 618-26. PubMed PMID: 10392639)。さらに、上記研究では、ETS-1は星細胞腫における血管形成を推進するかもしれないことが示されていた(Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavennee WK, Wiestler OD, Pietsch T, et al. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. Cancer Res. 1999 Nov 1; 59(21): 5608-14. PubMed PMID: 10554042)。多くの研究により、GBM転写及び全生態におけるetsファミリーELKメンバーについての重要な役割が示唆されている(Day BW, Stringer BW, Spanevello MD, Charmsaz S, Jamieson PR, Ensbeys KS, et al. ELK4 neutralization sensitizes glioblastoma to apoptosis through downregulation of the anti-apoptotic protein Mcl-1. Neuro Oncol. 2011 Nov; 13(11): 1202-12. PubMed PMID: 21846680. Pubmed Central PMCID: 3199151; Shukla AA, Jain M, Chauhan SS. Ets-1/Elk-1 is a critical mediator of dipeptidyl-peptidase III transcription in human glioblastoma cells. Febs J. 2010 Apr; 277(8): 1861-75. PubMed PMID: 20236318; Uht RM, Amos S, Martin PM, Riggan AE, Hussaini IM. The protein kinase C- ϵ isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1 pathway. Oncogene. 2007 May 3; 26(20): 2885-93. PubMed PMID: 17146445)。ある免疫組織化学研究では、GBMにおけるFLI1発現は認められなかったが、この研究には、これらの陰性結果に影響を与えていたかもしれない抗体選択及び抗原回復における重要な課題がある(Mhawech-Fauceglia P, Herrmann FR, Bshara W, Odunsi K, Terracciano L, Sauter G, et al. Friend le

10

20

30

40

50

ukaemia integration - 1 expression in malignant and benign tumours: a multiple tumour tissue microarray analysis using polyclonal antibody. *J Clin Pathol*. 2007 Jun; 60(6): 694 - 700. PubMed PMID: 16917000. Pubmed Central PMCID: 195505)。

【0176】

「cBioPortal for cancer genomics」ウェブサイトのインターフェイスを用い、癌に関連したetsファミリーメンバーのサブセットを評価した。これらの変化には、増幅（赤色で塗り潰した棒）、突然変異（小さな緑色の四角）、及びmRNA上昇制御（赤色で囲んだ棒）が含まれている（図8参照）。

10

【0177】

GBM中のFLI1標的指向性は、MDM2の転写活性化に基づいてさらに支持されている (Truong AH, Cervi D, Lee J, Ben-David Y. Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene*. 2005 Feb 3; 24(6): 962 - 9. PubMed PMID: 15592502)。この場合、高いMDM2は、主要となる腫瘍抑制タンパク質の損失につながるp53の分解を誘発する。注目すべきは、7つのGBM細胞株の中で、高いFLI1と高いMDM2との緩い相関関係があることである（表3及び図10）。タンパク質が相同的組み換えによって除去されるとき、多発性免疫不全によって示されているように、造血発生においてFLI1は明らかに重要なタンパク質である (Suzuki E, Williams S, Sato S, Gilkeson G, Watson DK, Zhang XK. The transcription factor Fli-1 regulates monocyte, macrophage and dendritic cell development in mice. *Immunology*. 2013 Jul; 139(3): 318 - 27. PubMed PMID: 23320737. Pubmed Central PMCID: 3701178; Kruse EA, Loughran SJ, Baldwin TM, Josefsson EC, Ellis S, Watson DK, et al. Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Aug 18; 106(33): 13814 - 9. PubMed PMID: 19666492. Pubmed Central PMCID: 2728977; Liu F, Walmsley M, Rodaway A, Patient R. Fli1 acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Curr Biol*. 2008 Aug 26; 18(16): 1234 - 40. PubMed PMID: 18718762)。FLI1は胚発生から決定的である一方、その発現は免疫細胞及び内皮の分画に限られるため、成熟組織においては決定的ではなさそうである (Watson DK, Smyth FE, Thompson DM, Cheng JQ, Testa JR, Papas TS, et al. The ERGB/Fli-1 gene: isolation and characterization of a new member of the family of human ETS transcription factors. *Cell Growth Differ*. 1992 Oct; 3(10): 705 - 13. PubMed PMID: 1445800; Truong AH, Ben-David Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene*. 2000 Dec 18; 19(55): 648

20

30

40

50

2 - 9 . PubMed PMID : 11175364 ; Prasad DD , Rao V N , Reddy ES . Structure and expression of human Fli - 1 gene . Cancer Res . 1992 ; 52 (20) : 5833 - 7) 。さらに、FLI1を標的とするアプローチは、その発現を除去することよりも、YK - 4 - 279でタンパク質相互作用からそれを妨害することである。

【0178】

YK - 4 - 279によるetsファミリーメンバーERG、ETV1及びEWS - FLI1の機能の阻害

小児 / 若年成人の癌であるユーイング肉腫において、EWS転写活性化ドメインは、新規融合タンパク質であるEWS - FLI1を導くetsファミリーメンバーに融合される。小分子YK - 4 - 279が特定され、これは、EWS - FLI1のRHAへの結合を妨害することが確認された。RHAは、ユーイング肉腫細胞株パネルにおける細胞アポトーシスを誘発するものである (Erkizan HV , Kong Y , Merchant M , Schlottmann S , Barber - Rotenberg JS , Yuan L , et al . A small molecule blocking oncogenic protein EWS - FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing ' s sarcoma . Nat Med . 2009 Jul ; 15 (7) : 750 - 6 . PubMed PMID : 19584866 . eng) 。また、同投与量にて、腫瘍を含有する非EWS - FLI1の増殖には影響を及ぼさず、ユーイング肉腫異種移植モデルにおける腫瘍増殖の削減が実証された。特異性の重要な証拠として、YK - 4 - 279の (S) 光学異性体のみが、RHAへの結合、転写活性化、及び選択的スプライシングを含むEWS - FLI1の機能活性を阻害することができる (Barber - Rotenberg JS , Selvanathan SP , Kong Y , Erkizan HV , Snyder TM , Hong PS , et al . Single Enantiomer of YK - 4 - 279 Demonstrates Specificity in Targeting the Oncogene EWS - FLI1 . Oncotarget . 2012 Feb ; 3 (2) : 172 - 82 . PubMed PMID : 22383402 . Epub 2012 / 03 / 03 . eng) 。進行性前立腺癌は、染色体転座又は遺伝子増幅によって、ERG、ETV1、又はETV4を過剰発現させる。ERG、ETV1、又はETV4活性は、浸潤及び転移の増加に直接的に関与してきている。これら3つは全て、FLI1への重要な相同関係を共有しているetsファミリータンパク質であり、ドメインに結合している本質的に同一のDNAを有する。ERG又はETV1により齎される前立腺細胞は、YK - 4 - 279で処置されたとき、浸潤が非常に減少した (Rahim S , Beauchamp EM , Kong Y , Brown ML , Toretsky JA , Uren A . YK - 4 - 279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion . PLoS ONE . 2011 ; 6 (4) : e19343 . PubMed PMID : 21559405 . Pubmed Central PMCID : 3084826 . Epub 2011 / 05 / 12 . eng) 。ets転写因子の相関関係に基づくこの交配腫瘍活性 (cross - tumoral activity) により、1つのets転写因子により齎される一部分であるかもしれない付加的な腫瘍の詳細が導かれた。

【0179】

etsファミリーメンバーFLI1は、したがって、新規分子標的であるかもしれず、YK - 4 - 279は、GBMにおいて潜在的な標的治療である。GBMの同所異種移植及び遺伝子組み換えマウスモデルは、ヒト臨床試験への昇格のための論拠をサポートする原理証明研究に有益である。FLI1は、GBMに対する新規生体標的であるかもしれず、また、YK - 4 - 279は、将来的な治療として有用であるかもしれない。

【0180】

GBMは、解析に利用し得る多重データセットを伴う、癌ゲノムアトラス (The C

10

20

30

40

50

ancer Genome Atlas (TCGA)) の標的腫瘍タイプの1つである。高い同種タンパク質と同様に、FLI1の変化が検索されており、GBM標本の23%が、FLI1が新規標的であることを裏付けする変化を有していることが分かった(図8)。

【0181】

FLI1、ERG、及びETV1の間の密接した相同関係を考慮して、YK-4-279のERG及びETV1への結合が評価された(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011; 6(4): e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. eng)。EWS-FLI1に対するYK-4-279の親和性(KD)は、9.5 μMと測定された(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009 Jul; 15(7): 750-6. PubMed PMID: 19584866. Eng; Barber-Rotenberg JS, Selvananth)。表面プラズモン共鳴を用いた、組み換えERG及びETV1に結合するYK-4-279の定常状態の動態によれば、結合親和性(KD)は、非特異性タンパク質BSAに対しては122.4 μMといった弱いものである一方で、ERGに対しては11.7 μMであり、ETV1に対しては17.4 μMであった。図9には、YK-4-279が、ERG及びETV1に、各々11.7 μM及び17.9 μMのKDで結合していることが示されている。定常状態の動態は、前述のとおり、Biacore T100装置で測定し(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009 Jul; 15(7): 750-6. PubMed PMID: 19584866. Eng; Barber-Rotenberg JS, Selvananth)、SPRセンサーグラムは示していない。

【0182】

XX細胞株の解析を含むGBMの大解読プロジェクトが完成している(Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahlon AG, Harris BT, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. Science. 2011 Aug 19; 333(6045): 1039-43. PubMed PMID: 21852505. Epub 2011/08/20. eng)。GBMで発生する遺伝的異常のスペクトルによって7つの細胞株が選択された。表3に、GBM細胞株の異質性を示す。GBM細胞株パネルは、疾患の異質性の表れである。符号(+)は、野生型又は突然変異型にリストされたタンパク質の発現を示す。符号(-)は、免疫プロットにおける発現がないことを示す。これらの細胞株は、阻害剤YK-4-279に対する感度と同様に、FLI1の発現を評価するために用いられた(図3)。

【0183】

【表 1 4】

表 3

	DKMG	DBTRG	42MGBA	GAMG	U87MG	H4	8MGBA
EGFR	+	-	+	+	+	-	+
Myc	+	-	+	+	+	+	+
PTEN	+	-	-	+	+	-	+
MDM2	+	+	-	+	-	-	-
p53	+	+	+	+	-	-	+
p14ARF	-	-	-	-	-	-	+
21WAF1/CIP	+	+	+	+	+	+	+
CDK4	+	+	+	+	+	+	+
CDK6	+	+	+	+	-	+	+
p16INK4a	-	-	-	-	-	-	+
p18INK4c	+	+	+	+	-	+	+
RB	+	+	-	+	+	+	-

10

20

【0184】

7つのGBM細胞株のうち6つ(85%)が、免疫プロットによりFLI1発現を実証した(図10の上部パネル)。これらの細胞株各々の増殖は、YK-4-279によって、IC50が0.5~9.9μMの範囲で減少し、FLI1のレベルとYK-4-279に対する感度との間で逆の相関関係が観察された($r^2 = 0.8$ 、図10)。

【0185】

GBM標的としてのFLI1の潜在性を評価するために、2つの遺伝子組み換えモデルを解析した(Chow LM, Enderby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, et al. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induce high-grade astrocytoma in adult brain. Cancer Cell. 2011 Mar 8;19(3):305-16. PubMed PMID: 21397855. Pubmed Central PMCID: 3060664)。正常脳幹、脳幹星状細胞、及び皮質星状細胞を含む2つのFLI1プロンプセットについて、非常に低い発現が観察された(図11)。しかしながら、22中20の二重欠損腫瘍(PTEN/p53)及び14中13の三重欠損腫瘍(PTEN/p53/Rb)は、2つのプロンプセット解析に基づくFLI1の重要な発現を示した(図11)。

30

【0186】

ヒトGBMにおけるFLI1発現レベルを決定するために、GBMパネルをFLI1抗体で染色した。このパネルは、無作為に選択されたグレード4の腫瘍6つからなる。6つ中4つ(66%)が、抗体が最適化され、交差反応しているタンパク質及び非特異性シグナルが除去された後に、FLI1に対して納得のいくIHC(免疫組織化学)染色を示した(図12)。内部陽性標準(内皮細胞)は陽性ではないので、4つの付加的な腫瘍は評価不可であると考えた。

40

【0187】

GBMに対する新規標的療法を得る重要な挑戦の1つは、血液脳関門(BBB)を克服することである。YK-4-279の薬物動態評価の一部として、75mg/kgのラセミ体YK-4-279を静脈内投与(IV)した12匹のマウスにおいて、組織レベルを測定し、これらをプラズマで比較した。脳組織におけるYK-4-279レベルは、ユー

50

イング肉腫前脛骨異種移植腫瘍の74%であり、FLI1を阻害するのに適度であった。さらに、化合物の静脈内投与(IV)によってラット薬物動態を行った場合、ラットは、急激な注入の後に、緩やかな点滴では起こらなかった眠気に襲われた。このことは、BBBを越えて中枢神経系に入る可能性があることを裏付けている。

【0188】

ここで得られたデータにより、FLI1がGBMに対する推定標的であると認められる。TCGAデータ、細胞株パネル、GEMMモデル、及びヒト腫瘍からのIHCパネルの組み合わせにより、FLI1のさらなる検証が裏付けられる。

【0189】

GBMにおける新規標的としてのFLI1の検証

10

GBM細胞増殖に必要な否か評価することにより、推定標的としてのFLI1を検証する。グリア幹細胞においてFLI1は陽性癌遺伝子か否かを確認する。標的FLI1の治療指数に対応させるために、FLI1の重要性について、GBM細胞は、正常ヒト星状膠細胞及びグリア幹細胞と比較される。正常脳細胞との比較は、FLI1を好適な治療指数でもって検証標的であると確立させるのに有用である。

【0190】

生存、増殖、及び浸潤のためにFLI1発現を必要とするGBM細胞株の識別

FLI1の3'UTRを標的とするEGFPでタグ付けされたshRNAベクターを用いて、生存、増殖、及び浸潤のためにFLI1発現を必要とするGBM細胞株が識別される。shRNAを、レンチウイルス系を用いて細胞内に感染させた。これにより、遺伝子型異質性の大半に及び7つのGBM細胞株におけるFLI1の相対的な重要性を評価する(表3)。shRNAによってFLI1が減少した後、単層増殖、浸潤、足場非依存性増殖、及び腫瘍形成アッセイにおけるスクランブルshRNA対照とFLI1減少との間の変化を測定する。前述の報告のとおり、細胞培養実験が行われている(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009 Jul; 15(7): 750-6. PubMed PMID: 19584866. Eng; Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011; 6(4): e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. eng)。浸潤アッセイは、悪性腫瘍細胞によって内皮細胞の浸潤を即時に観測及び定量する電気インピーダンス基礎方法により、腫瘍細胞及びこれらの臍帯内皮細胞への浸潤を用いて行われる。xCELLigence装置(Roche製造)を用いる。xCELLigence装置では、電気インピーダンスの変化を、付着する細胞として、そしてこの付着を妨害する腫瘍細胞として測定する(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011; 6(4): e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. Eng; Rahim S, Uren A. A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. Journal of visualized experiments: JoVE. 2011(50). P

20

30

40

50

ubMed PMID: 21490581. Pubmed Central PMCID: 3169283)。7つの細胞株全てにおいて、異種移植実験には、FLI1を減少させた多クローン性shRNAを用いる。shRNA FLI1及びスクランブル細胞株は各々、5匹の無胸腺マウスに定位的に投与される(Fiandancaによる補佐)。(7細胞株、細胞株につき5匹の動物、+/-FLI1=70匹)。増殖を、7~10日の間隔で、共有リソースのGU Animal ImagingにおけるMRIによって観測する。腫瘍増殖動態の計測は、記載のとおり、Bruker Paravision 5.0ソフトウェア又はImageJ(NIH)を用いて、興味度解析の領域で行う(Truong AH, Cervi D, Lee J, Ben-David Y. Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene*. 2005 Feb 3; 24(6): 962-9. PubMed PMID: 15592502; Pimanda JE, Chan WY, Donaldson IJ, Bowen M, Green AR, Gottgens B. Endoglin expression in the endothelium is regulated by Fli-1, Erg, and Elf-1 acting on the promoter and a -8-kb enhancer. *Blood*. 2006 Jun 15; 107(12): 4737-45. PubMed PMID: 16484587)。腫瘍の増殖統計により、進行及び処置の時間依存性プロファイルが得られる。

【0191】

完全長FLI1 cDNAでの正常ヒト星状膠細胞のトランスフェクション

星状膠細胞へのFLI1の形質転換効果を確認するために、レンチウイルス系を用いて、正常ヒト星状膠細胞を完全長FLI1 cDNAでトランスフェクトさせ、軟寒天中で、インビボ同所注入アッセイでの形質転換を評価する。対照(空ベクター)及びFLI1トランスフェクト多クローン細胞を、足場非依存性増殖アッセイのための軟寒天中に載置する(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med*. 2009 Jul; 15(7): 750-6. PubMed PMID: 19584866. eng)。上述のとおり、異種移植研究が行われる(2細胞株 +/-FLI1、細胞株につき5匹の動物=20匹の動物)。上述のとおり、10日ごとに動物をMRIで撮像し、腫瘍増殖を評価する。

【0192】

FLI1が外因的に発現するとき、グリア幹細胞は、FLI1の先天性発現及び腫瘍形成作用の双方について評価される。公知の(Lelievre E, Lionneton F, Mattot V, Spruyt N, Soncin F. Ets-1 regulates fli-1 expression in endothelial cells. Identification of ETS binding sites in the fli-1 gene promoter. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12; 277(28): 25143-51. PubMed PMID: 11991951)、及び新規細胞株を用いる。足場非依存性増殖及び浸潤アッセイの評価を、対照及びFLI1発現の双方について行う。さらに、対照及びFLI1発現の双方でトランスフェクトされたこれらの細胞株を、異種移植実験で用いる(評価の前の免疫プロットにより常に判明する)。これらの細胞全てを、本来の神経素質を維持するための血清よりもむしろ、外因性増殖因子で、最少増殖培地において注意深く増殖させる(Rossi S, Orvieto E, Furlanetto A, Laurino L, Ninfo V, Dei Tos AP. Utility of the immunohistochemical detection of FLI-1 expressio

n in round cell and vascular neoplasm using a monoclonal antibody. Mod Pathol. 2004 May; 17(5): 547-52. PubMed PMID: 15001993)。(3細胞株 + / - FLI1、細胞株につき5匹の動物 = 15匹の動物)。

【0193】

YK-4-279 毒性とFLI1レベルとの間の相関関係を測定する。YK-4-279は、EWS-FLI1のFLI1成分を標的とする(Barber-Rotenberg JS, Selvanathan SP, Kong Y, Erkizan HV, Snyder TM, Hong PS, et al. Single Enantiomer of YK-4-279 Demonstrates Specificity in Targeting the Oncogene EWS-FLI1. Oncotarget. 2012 Feb; 3(2): 172-82. PubMed PMID: 22383402. Epub 2012/03/03. Eng; Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011; 6(4): e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. eng)。細胞株パネルでのFLI1阻害剤YK-4-279の効果、及び阻害とFLI1発現との相関関係の評価の後、これらの結果をshRNAデータと比較する。FLI1発現との相関関係を伴う7つのGBM細胞株についての予備データがある。これは、図9を作成するために用いられる技法により、さらなる細胞株へと拡張される。非腫瘍性グリア細胞株がこれらの比較に含まれる。

【0194】

FLI1発現が他の既知のGBM遺伝子型及び表現型と相関関係を有するか否かを確認する。我々の細胞株データでの相関関係と同様に、TCGAからのオンライン情報ツールシリーズを用いる。解析には、FLI1 cDNA又はタンパク質発現が含まれ、FLI1が、PTEN損失、p16、p53突然変異、IDH1点突然変異、又はEGFR突然変異といった他の既知のGBM遺伝子事象との相関関係を有するか否かが、解析によって評価される。これは、診断時及び評価された遺伝子マーカーパネルへのFLI1の含有時に切除された患者の腫瘍が含まれるように拡張される。

【0195】

YK-4-279を治療剤として評価するための、GBMの動物モデルの利用

YK-4-279が、GBMについて、増殖の緩和又は軽減の誘発に有効か否かを実証するために、YK-4-279を、実証されているGBMとともにマウスに投与する。これにより、GBMの異種移植モデル及び遺伝子組み換えモデルの双方が評価される。

【0196】

1匹ではなくマウス群において一度に、MRIによって頭蓋内病巣を評価する方法を実証する。MRIによってGBM腫瘍の高詳細グラフィック及び代謝スペクトルが得られる一方、マウスをスクリーニングする時間により、膨大な研究のためのその用途は制限される。2つのGBM細胞株は、キセノーゲン頭蓋内イメージング(Xenogen intracranial imaging)のために用いられる7つの細胞株のGBM同所スクリーニングから選択され、作成される。これら2つのGBM細胞株は、上述のごときFLI1に対する要求及び増殖動態に基づいて選択される。これら2つのGBM細胞株は、安定してルシフェラーゼでトランスフェクトされ、動物群を、キセノーゲンシステム(Xenogen system)を用いてスクリーニング/観察することができる。さらなる詳細な研究及び定量比較のために、選択された動物はMRIを用いて評価される。細胞株は、インビトロでスクリーニングされ、続いて同所異種移植パイロット研究に供される(2細胞株×5動物=10動物)。キセノーゲンイメージング(Xenogen imaging)の前に、ルシフェラーゼ基質を動物の腹腔内に注入する。

【0197】

動物を、症候性腫瘍注入後7日間処置することにより、異種移植GBM腫瘍へのYK-4-279を評価する。初期の腫瘍を、キセノーゲンシステムにて、MRIと相関しているサイズで、及び動物の5mm³病変時に開始した処置でスクリーニングする。YK-4-279は血液脳関門を通過する。ユーイング肉腫腫瘍の軽減を導く投与量に類似したBID注入量のYK-4-279で、動物を処置する(図13)。この研究により、脳腫瘍の容量、動物の症候、及び全生存期間が査定されるであろう。剖検で、腫瘍及び正常隣接脳は、GBMマーカー、アポトーシス、及びFLI1調節標的遺伝子について免疫組織化学によって評価されるであろう。図13は、(S)-YK-4-279又はラセミ体での3日間の処置による、著しい腫瘍の軽減を示す。図13A:ES異種移植マウスを、400mg/kgの化合物又は所定対照物で処置した。既知の腫瘍(300mm³)で開始し、腹腔内化合物で3日間マウスに処置を施した。計6回の投与を行った。図13B:同様の実験により、H(ヘマトキシリン)及びE(エオジン)は腫瘍を染色した。

10

【0198】

GBMでの被検動物の大部分において、症候及び比較的大きな腫瘍が存在しているので、より大きな症候性腫瘍に対してYK-4-279が処置される。これにより、MRIを用いて、腫瘍が定着して症候の最初の表示があった後に動物を処置することにより、既知のGBM 20mm³へのYK-4-279が評価される。このときの腫瘍は、キセノーゲンシステムで検出可能である。動物は、処置中、キセノーゲン評価を1週間に2回受ける。この研究により、腫瘍の容量、動物の症候、及び全生存期間が比較される。剖検で、腫瘍及び正常隣接脳は、GBMマーカー、アポトーシス、及びFLI1調節標的遺伝子について免疫組織化学によって評価される。

20

【0199】

GBMのGEMMモデルが用いられる。動物を、公知のとおり繁殖させる(Chow LM, Endersby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, et al. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. Cancer Cell. 2011 Mar 8;19(3):305-16. PubMed PMID: 21397855. Pubmed Central PMCID: 3060664)。生後約90日で、動物は、GBMの発症を探索するために、10~14日ごとにMRI評価を受ける。実験例1では、動物は、90日で開始して、YK-4-279で処置されるか又は対照である(対照及び処置で10動物ずつ=20動物)。実験例2では、動物は、症候、又はいずれかの次元における2mmよりも大きいMRI測定腫瘍の発症のときに処置される(対照及び処置で10動物ずつ=20動物)。処置に次いで、動物は上述のとおり評価される。YK-4-279は、腹腔内投与される。

30

【0200】

データの供給により、FLI1及びGBMを運ぶ役割の潜在的な他のetsファミリーメンバーのさらなる探査がサポートされる。

40

【0201】

選択された癌に関連する参考技術には、以下のものが含まれる。

CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008 (March 23, 2012 Revision). Central Brain Tumor Registry of the United States [Internet]. 2012; <http://www.cbtrus.org>. Available from: <http://www.cbtrus.org>

【0202】

(実施例11:肺癌治療のためのYK-4-279の使用)

50

上皮間葉転換 (E M T) は、癌の病因の鍵となる構成である。 E M T は、細胞形態と転移及び薬剤耐性表現型を齎す阻害との重要な変化を誘発する。さらに、 E M T が癌幹細胞の生成に関与することを示唆する証拠がある。肺癌は、主に、治療が困難な進行ステージで診断されることが典型的であるので、癌に関連した死亡率の先導となっている。癌の分子遺伝的特徴に対する我々の理解の進歩により、腫瘍形成に必要とされる独自の分子が定義されてきた。これにより、特定の癌の治療に有用な標的治療の開発が導かれてきた。これら分子標的の例には、細胞表面増殖因子レセプター及び細胞内タンパク質チロシンキナーゼが含まれる。残念ながら、このような治療によっても、肺癌患者についての全生存期間又は生活の質は著しく改善されてはいない。

【 0 2 0 3 】

本明細書に記載の近年の発見により、転写因子の e t s ファミリーメンバーである、 E - 2 6 形質転換配列 (T r a n s f o r m i n g S e q u e n c e) (E T S) 関連遺伝子 E R G の生成物が、 E M T において重要な役割を担う、という仮説が導かれてきている。さらに、それは、亜鉛フィンガー E - b o x 結合ホメオボックス 1 及び 2 遺伝子 (Z E B 1 、 Z E B 2) の発現の直接的な上方調節によって、 E M T 及び上皮細胞の悪性進行を誘発する。 Z E B 1 は、肺癌細胞中の E M T に結び付くとともに、 E M T を置き換えるだけでなく、インビトロ及びインビボにて腫瘍増殖を阻害する s i R N A を用いて、その発現を阻害する。肺癌細胞が高レベルの E R G を発現するので、 E R G は、 Z E B 1 によって E M T を誘発するかもしれない。 E R G が、 Z E B 1 / 2 によって齎される肺癌細胞の E M T に関与するか否かを確定する実験が行われる。 Y K - 4 - 2 7 9 の新しい処方が行われ、肺癌治療について評価される。

【 0 2 0 4 】

転写因子としての E R G は、発癌にとって重要な多くの遺伝子の発現を調節する。初期の観測で、 E R G の発癌性には、上皮間葉転換 (E M T) を誘発する能力が含まれることが示唆された。異なる実験系において、 E R G は、癌細胞において E M T の正調節因子である亜鉛フィンガー E - b o x 結合ホメオボックス 1 及び 2 遺伝子 (Z E B 1 、 Z E B 2) の発現を誘発することが示されてきている。 E M T は、 N S C L C における転移及び薬剤耐性を齎すので、 E M T を導く分子経路の阻害が重要な臨床的有用性を有するかもしれない。

【 0 2 0 5 】

肺癌細胞において E M T を媒介している E R G の役割が確定される。 E R G 発現の変化に応じた E M T 及び N S C L C 細胞株の薬剤耐性表現型が確定される。 E R G が、他の上皮腫瘍における場合のように E M T を誘発するか否かが確定される。さらに、 N S C L C 中の E M T を媒介した E R G が、 Z E B 1 / 2 遺伝子によるものか否かが確定される。これらの実験には、 E R G の阻害及び R N A i 技術による N S C L C 細胞における Z E B 発現が含まれる。 E M T 表現型は、定着 E M T マーカーについての即時 P C R 解析及びウェスタンブロット法によって評価される。

【 0 2 0 6 】

非経口で投与可能な Y K - 4 - 2 7 9 の処方得られ、肺癌細胞の増殖及び有害な特性に対する Y K - 4 - 2 7 9 の効果が評価される。添加剤の一例は、 - ヒドロキシプロピルシクロデキストリン (- H P C D) である。 N S C L C 細胞は Y K - 4 - 2 7 9 で処置され、これらの反応を、複数のインビトロ及びインビボモデルにおいて測定した。免疫無防備状態のマウスにおける細胞生存能力、走化性、内皮細胞浸潤、及び異種移植増殖を観測する。 Y K - 4 - 2 7 9 と N S C L C について最も常識的な化学療法剤との間の潜在的な相乗効果が確定される。 E M T によって媒介される、 N S C L C 細胞の薬剤耐性及び高転移能といった特性は、 N S C L C 患者の予後不良に大きく寄与している。

【 0 2 0 7 】

E M T によって媒介される、 N S C L C 細胞の薬剤耐性及び高転移能といった特性は、 N S C L C 患者の予後不良に大きく寄与している。肺癌において E M T 表現型を置き換える特定のタンパク質は、小分子を用いて標的とされる。図 1 4 は、 Z E B 1 及び Z E B 2

10

20

30

40

50

の発現を誘発する E R G を示す。Z E B 1 及び Z E B 2 は、肺癌の転移及び薬剤耐性を齎す E M T を活性化させる。

【 0 2 0 8 】

薬剤を癌細胞の増殖に必要とされる特定分子の標的とすることは、分子及び細胞生物学における近年の進展にもかかわらず、困難な挑戦のままである。癌細胞の無秩序な再生を推進するタンパク質が知られてはいるが、効果的な治療の標的として役立つものはほんの僅かである。慢性骨髄性白血病の治療に用いられるメシル酸イマチニブという小分子と、胸部癌の治療に用いられるモノクローナル抗体（トラスツズマブ）とによってその活性が阻害される細胞内タンパク質チロシンキナーゼが例示され、細胞表面増殖因子レセプターへの標的とされる。このような、制限されてはいるが、重要かつ非常に心強い成功により、医薬工業による継続的及び着実な調査が促されている。これらタンパク質の生化学は十分に研究されているので、酵素の活性又はレセプターの活性化を阻害することは、癌に加えて多くの疾患に対する薬剤開発の揺るぎのない最終目的である。これに対して、タンパク質同士の結合に関与する生化学は遥かに複雑であり、その研究は不十分である。

【 0 2 0 9 】

E R G は、核に局在し、酵素活性を欠いているので、標的治療の設計のさらなる挑戦に供される。Y K - 4 - 2 7 9 は、E R G の転写活性を阻害する小分子であり、N S C L C において自身の規則性について詳査されている。E M T に必要とされる E R G と結合し、E R G 機能を妨げることによって、Y K - 4 - 2 7 9 であるか否かが確認され（図 1 4 ）、N S C L C の処置に使用され得る。

【 0 2 1 0 】

E R G は発癌性タンパク質である。E - 2 6 形質転換配列（T r a n s f o r m i n g S e q u e n c e ）（E T S ）関連遺伝子 E R G は、多くの組織における内皮恒常性、分化、及び血管形成に不可欠な、転写因子の e t s ファミリーメンバーをコードする（L i u F , P a t i e n t R . G e n o m e - w i d e a n a l y s i s o f t h e z e b r a f i s h E T S f a m i l y i d e n t i f i e s t h r e e g e n e s r e q u i r e d f o r h e m a n g i o b l a s t d i f f e r e n t i a t i o n o r a n g i o g e n e s i s . C i r c u l a t i o n r e s e a r c h . 2 0 0 8 ; 1 0 3 : 1 1 4 7 - 5 4 ; S a s h i d a G , B a z z o l i E , M e n e n d e z S , L i u Y , N i m e r S D . T h e o n c o g e n i c r o l e o f t h e E T S t r a n s c r i p t i o n f a c t o r s M E F a n d E R G . C e l l c y c l e . 2 0 1 0 ; 9 : 3 4 5 7 - 9 ）。証拠により、E R G によって調節される特定の遺伝子の活性が血管形成に必要とされることが示唆されている。例えば、それ自身の発現のために E R G を必要とする V E - カドヘリンは、血管形成において、内皮接合安定性及び内皮生存率の双方の重要工程のために不可欠である（Y u a n L , S a c h a r i d o u A , S t r a t m a n A N , L e B r a s A , Z w i e r s P J , S p o k e s K , e t a l . R h o J i s a n e n d o t h e l i a l c e l l - r e s t r i c t e d R h o G T P a s e t h a t m e d i a t e s v a s c u l a r m o r p h o g e n e s i s a n d i s r e g u l a t e d b y t h e t r a n s c r i p t i o n f a c t o r E R G . B l o o d . 2 0 1 1 ; 1 1 8 : 1 1 4 5 - 5 3 ）。発癌において、E T S 転写因子は、細胞外マトリクスの分解を含む転移、並びに細胞 - 細胞間接合及び細胞 - マトリクス間接合の形成に必要とされる工程に加わっている多くの遺伝子の調節に関与している（L e l i e v r e E , L i o n n e t o n F , S o n c i n F , V a n d e n b u n d e r B . T h e E t s f a m i l y c o n t a i n s t r a n s c r i p t i o n a l a c t i v a t o r s a n d r e p r e s s o r s i n v o l v e d i n a n g i o g e n e s i s . T h e i n t e r n a t i o n a l j o u r n a l o f b i o c h e m i s t r y & c e l l b i o l o g y . 2 0 0 1 ; 3 3 : 3 9 1 - 4 0 7 ）。特定の例には、血管内皮増殖因子、エンドグリン、マトリクスメタロプロテイナーゼ、コラゲナーゼ 1、及びヘムオキシゲナーゼ 1 のためのレ

セプターが含まれる。ERGは、造血性及び上皮細胞癌において過剰発現し、ヒト前立腺癌において強力な発癌遺伝子として動作する(Chen Y, Chi P, Rockowitz S, Iaquinta PJ, Shamu T, Shukla S, et al. ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss. *Nature medicine*. 2013; Rahim S, Uren A. Emergence of ETS transcription factors as diagnostic tools and therapeutic targets in prostate cancer. *American journal of translational research*. 2013; 5: 254 - 68; Turner DP, Watson DK. ETS transcription factors: oncogenes and tumor suppressor genes as therapeutic targets for prostate cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2008; 8: 33 - 42)。

10

【0211】

ERG及びEMTは、NSCLCにおいて不十分な臨床転帰を表す。肺癌におけるERGの役割へと我々の興味を導く注目すべき発見には、正常組織と比較した肺腫瘍サンプル100%中の、NSCLCにおける比較的高レベルのERG発現の検出及び選択的スプライス型ERGの存在が含まれる(Xi L, Feber A, Gupta V, Wu M, Bergemann AD, Landreneau RJ, et al. Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. *Nucleic acids research*. 2008; 36: 6535 - 47)。マイクロアレイによるmRNA発現の解析: ERG mRNA発現ランキングは、上位8%内であり(Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature genetics*. 2003; 33: 49 - 54)、NSCLC組織サンプルでは上位11%内である(Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008; 455: 1069 - 75)。ERG標的遺伝子はEMT表現型に関与しているので、ERG媒介EMTは、NSCLCの悪性表現型に寄与するかもしれないことが仮定される。

20

30

【0212】

細胞がその上皮特徴を損失し、間葉表現型を獲得するとき、EMTはまず、初期の胚発生において描写された(Sato M, Shames DS, Hasegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. *Respirology*. 2012; 17: 1048 - 59)。EMTが進展するにつれて、細胞は、より運動性で侵略的な表現型を獲得する。したがって、EMTは、発癌において重要な成分として浮上した。薬剤耐性及び抗アポトーシス表現型と同様に、EMTと、NSCLC局所的侵略、血管形成、遠隔転移との間の関連が、インビボ及びインビトロで実施した多くの研究によって実証されてきている(表4)。例えば、EMTに関与する分子の発現は、転移の増大及び患者の全生存期間の短縮を含むNSCLCの臨床病理的な特徴と相関している(Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G, et

40

50

al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. Lung cancer. 2013; 81: 117-22)。さらに、発癌におけるEMTの重要な役割は、幹細胞の細胞表現型特徴によって示される (Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell. 2008; 133: 704-15)。纏めると、これらの研究により、肺癌の進行において発生するEMTの阻害は非常に正当であることが提示されている。表4に、NSCLCにおける臨床的な特徴と相関するEMTに関与する分子を掲載する。

【0213】

【表15】

表 4

EMT 遺伝子	臨床的な特徴	参考文献
E-カドヘリン	長期全生存期間	Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hanagiri T, Morita M, et al. The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. Cancer. 2006; 106: 2190-9.
	リンパ節転移に対する陰性	Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2000; 6: 4789-96.
スラッグ	術後再発	Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, Yu CJ, et al. Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005; 11: 8070-8.

10

20

30

40

【表 16】

表 4 (続き)

EMT 遺伝子	臨床的な特徴	参考文献
スラッグ	短期全生存期間	Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. Cancer research. 2010; 70:10433-44.
スネイル	短期全生存期間	Yanagawa J, Walser TC, Zhu LX, Hong L, Fishbein MC, Mah V, et al. Snail promotes CXCR2 ligand-dependent tumor progression in non-small cell lung carcinoma. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009; 15: 6820-9.
ツイスト	短期全生存期間	Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. Thorax. 2009; 64: 1082-9.
HIF-1 アルファ	短期無再発生存期間	

【0214】

ERG 標的遺伝子 ZEB1 は、EMT を媒介する。EMT は、多重シグナル経路に関与する複合細胞レスポンスである。亜鉛フィンガー E-box 結合ホメオボックス (ZEB) タンパク質は、EMT の鍵となる調節遺伝子である (Takeyama Y, Sato M, Horio M, Hase T, Yoshida K, Yokoyama T, et al. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. Cancer letters. 2010; 296: 216-24)。特に、ZEB1 は、EMT に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節することによって、肺癌の EMT 関連発癌性表現型において重要な役割を担う。例えば、肺癌細胞株における siRNA による ZEB1 発現の阻害は、インビトロ及びインビボにおける、ドセタキセルに対する感度の増大及び肺癌細胞の増殖の減少といった、EMT の克服という結果を齎す (Ren J, Chen Y, Song H, Chen L, Wang R. Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line. Journal of cellular biochemistry. 2013; 114: 1395-403)。最も重要なのは、ERG は、ZEB 中枢に

よって前立腺癌細胞中のEMTを媒介することである(Leshem O, Madar S, Kogan-Sakin I, Kamer I, Goldstein I, Brosh R, et al. *TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model*. *PloS one*. 2011; 6:e21650)。さらに、miR-30は、ERG発現を直接標的とすることによって、前立腺癌細胞中のEMTを抑制する(Kao C J, Martiniez A, Shi XB, Yang J, Evans CP, Dobbi A, et al. *miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT. Oncogene*. 2013)。これら及び他の研究により、肺癌中のEMTを克服するためにZEB1及びZEB2を標的とする試みは成功であると結論付けられるのは妥当であることが示されている。RNAi技術は、臨床適用に十分なほどは発展していないので、肺癌においてZEB1発現を阻害する別のメカニズムを特定する必要があるであろう。ERG結合部位は、ZEB1及びZEB2プロモーター領域に存在することが知られている(Leshem O, Madar S, Kogan-Sakin I, Kamer I, Goldstein I, Brosh R, et al. *TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model*. *PloS one*. 2011; 6:e21650)。2009年に、我々は、EWS-FLI1の阻害剤として、ユーイング肉腫における腫瘍特異性の再配列遺伝子によってコードされた融合タンパク質である、YK-4-279を発見した(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. *A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma*. *Nature medicine*. 2009; 15:750-6)。より最近では、2つのETSメンバー、FLI1及びERG、の間での相同関係に基づき、YK-4-279は、ERGに直接結合し、その転写活性を阻害していることが分かった(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. *YK-4-279 inhibits ERG and ETV1 mediated prostate cancer cell invasion*. *PloS one*. 2011; 6:e19343)。肺癌細胞中のERG機能の阻害は、ZEBタンパク質によって媒介されるEMTを克服し、転移増殖の阻害及び化学療法薬剤に対する感度の増大を導くかもしれない。

【0215】

ERGへのYK-4-279の結合

YK-4-279は、EWS-FLI1に直接結合し、ユーイング肉腫細胞の増殖を阻害する小分子である(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. *A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma*. *Nature medicine*. 2009; 15:750-6)。EWS-FLI1は染色体転座の生成物である。FLI1は、保存されたDNA結合ドメインを有するetsファミリー転写因子である。他のetsファミリーメンバー、ERG、でのFLI1の配置調整で、アミノ酸配列は著しい類似性を示す(同一性63.5%、相同性80.2%)。市販の組み換えERGタンパク質(Origene, Rockville, MD)が得られており、これについて、レポーター部分なしで即時に分子間相互作用を

検出するBiacore T-100上で、YK-4-279への直接結合親和性が測定された(図15)。組み換えタンパク質をBiacoreマイクロチップ上で固定し、濃度を変化させたYK-4-279の存在下で結合を測定した。11.7 μ Mの定常状態のKDでERGに結合するYK-4-279が検出された。図15は、ERGタンパク質に直接作用するYK-4-279を示す。精製組み換えERGをBiacore CM5マイクロチップ上に固定し、8種の異なる濃度(0.1~50 μ M)のYK-4-279への直接結合を、SPRにより確認した。定常状態のKDをBiaevaluationソフトウェアにて算出した。

【0216】

YK-4-279は、ERGの転写活性を阻害する。ETSタンパク質は、標的遺伝子の発現を制御する。この標的遺伝子は、その多くが発癌性増殖の一因となる多様な生化学的プロセスに関与しているタンパク質をコードする(Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. Annual review of biochemistry. 2011; 80: 437-71)。ERGの転写活性に対するYK-4-279の効果を、プロモーターレポーターアッセイ及び内在性遺伝子発現プロファイリングを利用して試験した。YK-4-279は、COS7細胞中のルシフェラーゼ発現を制御するETS標的遺伝子プロモーター(ID2)のERG活性化を阻害した(図16A)。VCaP前立腺癌細胞は、TMPRSS2/ERG融合遺伝子を保有し、ここで、ERGは、PLAU、ADAM19、及びPLATといった特定の内在性標的遺伝子の発現を誘発する。即時(RT)-PCR解析により、YK-4-279は、ERG発現のものではなく、これら内在性標的遺伝子の発現を著しく阻害することが明らかになった(図16B)。これらの発見は、ERG及びPLAUについてタンパク質レベルにまで拡大された。YK-4-279による阻害は、細胞がERG siRNAで処置されたときに観察されるものに相当した(図16B)(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 inhibits ERG and ETV1 mediated prostate cancer cell invasion. PloS one. 2011; 6: e19343)。上皮細胞はFLI1を発現しないので、TK-4-279の効果は、ERG阻害による可能性が最も高い。このことにより、YK-4-279は、単に転写及び置き換えの一般的な阻害剤ではなく(ERG mRNA及びタンパク質レベルは変化しなかった)、etsファミリータンパク質の転写活性を特異的に阻害する、というさらなる証拠が得られる。

【0217】

NSCLC細胞株で発現され、EMTマーカーを誘発するERG

ヒト腫瘍サンプルで観察されるものと類似して著しいERG発現が存在することを確認するために、5つのNSCLC細胞株について実験した。A549、H1944、H358、H1395、及びH596細胞溶解物についてウェスタンブロット解析を行った(図17)。5つのうち4つの細胞株が、高レベルのERGタンパク質を発現した。ERGをほとんど発現しなかったH358細胞株は、我々の研究において、陰性対照として使用されるであろう。

【0218】

他の腫瘍型における初期の研究では、ERGはEMTを誘発するかもしれないことが示唆された。NSCLC細胞において同じ効果があるか否かを試験するために、相対的に非常に低レベルの内在性ERGタンパク質を有するERG発現ベクターが、H358細胞へトランスフェクトされた(図18A)。H358細胞が高レベルのERGタンパク質を発現したとき、2つのEMTマーカー(ZEB1及びFoxc2)の発現の著しい増加が観察された(図18B)。これは、ERGはNSCLC細胞中のEMTの誘発が可能であることを示唆している。

【0219】

図18A及び18Bは、EMTマーカーを誘発するERG発現を示す。H358 NSCLC細胞を、ヒトERGTンパク質をコードするcDNAでトランスフェクトした。増加したERG発現をウェスタンブロット法によって検出した(図18A)。即時PCR解析により、ERG発現細胞においてZEB1及びFOXC2の発現がより高いことが明らかになった(図18B)。データは、まず18S RNAについて正規化され、その後、空ベクタートランスフェクト細胞に対する誘導倍率として表された。

【0220】

YK-4-279によるEMTマーカー依存性ERGの発現の阻害

A549細胞は、相対的に高レベルのERGタンパク質を発現する(図17)。これらの細胞におけるEMTマーカー遺伝子発現を、即時定量PCR解析によって評価した。A549細胞のTGF- β (既知のEMT誘導物質)処置により、ZEB1及びFOXC2発現が増大する結果となった。トランスフェクトされていないA549細胞がERG阻害剤YK-4-279で処置されたとき、ZEB及びFOXC2双方の発現が阻害されるという、完全に反対の結果が観察された。

【0221】

本明細書の予備データにより、YK-4-279は、ERGタンパク質に直接結合し、転写因子としてのその機能を阻害することが確認されている。さらに、ERGは、NSCLC細胞中のEMTマーカーを誘発することができ、これは、YK-4-279によって克服され得ることが実証された。

【0222】

このセクションにおいて要約された実験により、ERGが、(EMT)を誘発することによるNSCLCの発病の一因となり、肺癌治療のための標的としての機能を果たすという仮定が試験されている。ERGはYK-4-279によってうまく阻害されるかもしれないことが、新規治療のアプローチとして立証されている。

【0223】

肺癌細胞中のEMT媒介におけるERGの役割

肺癌細胞株上のERG発現のレベルを調節する効果、特にEMTについて、評価する。非小細胞肺癌由来のH358細胞株は、相対的に低レベルの内在性ERGタンパク質を発現する(図17)。これらの細胞においてERGレベルを上昇させるために、ERG発現ベクターが導かれる。他の肺癌細胞株(A549、H1944、H1395、及びH596)は非常に高レベルの内在性ERGを発現する。これらの細胞におけるその発現レベルを低減させるために、ERGへの標的とされるRNA干渉技術(shRNA又はsiRNA)が用いられる。各々の場合、mRNAの発現レベル及びEMTに対する特異性マーカーとしての機能を果たすそれらの同種タンパク質(E-カドヘリン、ビメンチン、スネイル(Snail)、スラッグ(Slug)、及びZEB1)を確認することによって、EMTへの効果が評価される。ERGを過剰発現するH358細胞において上昇したEMT発現プロファイル、又はRNA干渉によってERG発現が阻害されている細胞(A549、H1944、H1395、及びH596)において減少したEMT発現プロファイルが観察され、これらの研究は、ZEB1及びZEB2 siRNAの効果を確定することによって拡張される。ZEB1及びZEB2発現が阻害されるときにEMTに対するERGの効果が軽減されるのであれば、ERGが、ZEB1及びZEB2を介してEMT機能を媒介するという仮説が立証される。

【0224】

5つのNSCLC細胞株上で、一般的な化学療法薬剤(シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、エトポシド、及びビンブラスチン)についてのIC50値が確定される。電気インピーダンス及びWSTアッセイによって、細胞生存率が確定される。一度基準IC50値が成立すると、ERG発現の変化を伴う実験が繰り返される。ERG発現は、A549、H1944、H1395、及びH596細胞において、shRNAで阻害される。安定したshRNA発現及び減少したERGタンパク質発現が達成され得ないならば

、E R Gを標的とする s i R N Aの一時的なトランスフェクションでもってこれらの実験は行われる。N S C L C細胞株においてE R G発現を減少させることにより、細胞がこれらの化学療法薬剤に対してさらに敏感になるようにI C 5 0カーブが大きく左にシフトすることが期待される。これらの実験を補足して、哺乳動物発現ベクターからの高レベルのE R Gタンパク質を発現する、安定したH 3 5 8細胞株が立証される。この細胞株において、細胞が化学療法に対してさらに耐性を得るようにI C 5 0カーブが大きく右にシフトすることが分かる。

【 0 2 2 5 】

非経口で投与し得るY K - 4 - 2 7 9の新しい処方得られ、肺癌細胞の分芽増殖及び悪性特性に対するY K - 4 - 2 7 9の効果が確定している。

10

【 0 2 2 6 】

主な添加剤は - ヒドロキシプロピルシクロデキストリン (- H P C D) であり、- H P C Dは、臨床的に実用可能な賦形剤である。上位7つの処方について、H P C Dに対する動態を比較する。0、5、10、15、30、60、120、180、240、及び480分でのタイムポイントに続いて、C D - 1は腹腔内投与 (I P) される。24時間ポイントではまた、遅延クリアランスをチェックする。0、5、10、15、30、60、120、180、及び240でのタイムポイントに続いて静脈内投与 (I V) されたC D - 1マウスシリーズを、吸収レベルの測定に用いる。プラズマを解析し、薬物動態パラメータを算出する。これらの研究の終点は、吸収と半減期との比較により、H P C Dに対して優れた製剤があるか否かを確定することである。ある処方が、I P吸収を達成することができ、3 μ Mよりも高いプラズマレベルを24時間持続させることができるのであれば、これは著しい改善であると考えられる。このことにより、連続的な点滴治療と比較して、毎日の投与が評価される。連続したI Vよりも毎日の投与を採用した方が、将来的な動物及び臨床研究に好適である。

20

【 0 2 2 7 】

細胞をY K - 4 - 2 7 9で処置することによって、E R G機能は阻害される。前述の通り、Y K - 4 - 2 7 9処置により、E R G (s i R N A又はs h R N A) の不足と同じE M Tマーカー発現プロファイル結果が得られることが、E M Tマーカーの変化によって確認され、認定される。以下の実験の終点は、E M Tが変化したときに機能転帰に対する効果を評価することである。このような目的で、悪性形質 (細胞運動性、走化性、内皮細胞単層の浸潤、プラスチック上での増殖、軟寒天での増殖、及びキセノグラフトとしてのインビボ増殖) の代替マーカーが評価される。並行した実験において、細胞は、Y K - 4 - 2 7 9、並びに、N S C L Cに対する濃度を变化させた種々の化学治療薬剤 (シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、エトポシド、及びビンブラスチン) で処置される。Y K - 4 - 2 7 9にこれらの薬剤を組み合わせることにより、相乗的な阻害効果が観察される。E R G発現を阻害すると、Z E B 1 / 2を介してE M Tが軽減するという仮説を裏付けるために、Z E B 1 / 2の強制的な過剰発現により、細胞表現型に対するY K - 4 - 2 7 9の効果が覆されるか否かを確定する。

30

【 0 2 2 8 】

N S C L C細胞運動性及び浸潤に対するY K - 4 - 2 7 9の効果を試験する。x C E L L i g e n c e装置を用い、Y K - 4 - 2 7 9がN S C L C細胞浸潤を阻害する能力を試験する。この新しい手法により、古典的なボイデンチャンバーフォーマット (B o y d e n c h a m b e r f o r m a t) において、多孔質膜 (x C E L L i g e n c e s i m - プレート) の真下の表面上の金電極層で、細胞運動性の即時測定を行うことができる。細胞は、膜を介して、上部チャンバーから下部チャンバーの走化性因子へと向かって移動するとき、膜の下面上の電気インピーダンスを増大させ、これは即時に記録される。同じ機器はまた、内皮単層を介した浸潤の測定に用いられる (R a h i m S , U r e n A . A r e a l - t i m e e l e c t r i c a l i m p e d a n c e b a s e d t e c h n i q u e t o m e a s u r e i n v a s i o n o f e n d o t h e l i a l c e l l m o n o l a y e r b y c a n c e r c e l l s . J o

40

50

urnal of visualized experiments: JoVE. 2011)。この実験フォーマットにおいて、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、表面に金電極を有する通常の細胞培養プレート(xCELLigence E-プレート)上で培養される。内皮細胞が安定した単層を形成した時点で、NSCLC細胞を最上面に加える。癌細胞は、内皮細胞間の締まった接続を破壊し、内皮単層を介して浸透するので、電気インピーダンスを変化させる。これらの実験により、YK-4-279が、NSCLC細胞の運動性、走化性、及び浸潤表現型を変化させるか否かが評価される。

【0229】

YK-4-279及び化学療法薬剤(シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、エトポシド、及びビンブラスチン)を滴定することによって、細胞培養における相乗効果の研究を行う。細胞死を終点とし、何らかの潜在的相乗効果を、組み合わせ指数(CI)アイソボログラム等式法(combination index(CI)isobologram equation method)にて算出する(Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological reviews. 2006; 58: 621-81)。

【0230】

3つの異なるヒトNSCLCキセノグラフト(2つは高ERG発現で、1つは低ERG発現)の増殖に対するERG阻害の効果を試験する。マトリゲル中で調製された細胞懸濁液を、4~6週齢オスSCIDマウスに皮下移植する。服用割合を調整し、2つの動物グループ(10動物/キセノグラフト株)には、各キセノグラフト株についての処方研究に基づいて、阻害剤YK-4-279及びプラシーボのみのキャリアーが投与される。腫瘍が200mm³のサイズに到達したら、薬剤処置を開始する。腫瘍増殖及び体重を週に2回測定する。全ての実験グループは、総腫瘍容積における35%差を検出するために、p<0.05で83%のパワーを有する。動物は、8週で、又は支障を来す状態になる(原発性腫瘍が2000mm³に到達する、原発性腫瘍が潰瘍となる、又はマウスが痛み及び苦痛を示す)ならばそれよりも早くに、回収する。腫瘍組織の半分は、免疫組織化学解析のためにパラフィンに埋め込まれ、残りの半分は、分子解析のために急速冷凍される。NSCLCキセノグラフト中のERG活性の防御により、原発性腫瘍サイズが低減すると仮定される。

【0231】

本開示は、図面及び前述の記載で詳しく例証及び説明されるが、このような例証及び説明は、実例又は例示にすぎず、限定的に解釈されるべきではない。本開示は、開示された実施形態に限定されるものではない。特許請求された開示を実施する際に、開示された実施形態の変形は、図面、本開示、及び添付された特許請求の範囲への研究から、当業者によって理解及び達成され得る。

【0232】

本明細書で引用した全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。参考として組み込まれる刊行物および特許又は特許出願は、本明細書に含まれる開示と矛盾する場合、本明細書は任意のこのような矛盾する素材に優先することを意図している。

【0233】

別段の定めがない限り、すべての用語(技術用語及び科学用語を含む)は、当業者に通常かつ慣用の意味を与えるものであり、本明細書で明白に定義しない限り、特別な又はカスタマイズされた意味に限定されるものではない。本開示の特定の特徴又は様態を説明する場合に特定の専門用語の使用は、専門用語が関連する本開示の特徴又は様態の任意の特定の特性を含むように制限されるために、本明細書中でその専門用語が再定義される意味に解釈されるべきではないことを注意すべきである。本願に使用される用語及び表現、並びにそれらの変形は、特に添付の特許請求の範囲において、特に明記しない限り、制限に

対立する開放式として解釈されるべきである。前述の実施例に示すように、用語「含む (including)」は「含むが、これらに限らない (including, without limitation)」、「含むが、これらに限定されない (including but not limited to)」などの意味に解釈されるべきである。本明細書で使用される用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」、「含む (containing)」、又は「特徴づけられる (characterized by)」と同義で、包含的又は開放式であり、追加、記載されていない要素又は方法ステップを除外しない。用語「有する (having)」は、「少なくとも有する」と解釈されるべきである。用語「含む (includes)」は、「含むが、これらに限定されない (includes but is not limited to)」と解釈されるべきである。用語「(実施)例 (example)」は、討論されるアイテムの典型的な事例を提供するために使用され、それらの完全又は限定的なリストではない。「既知の (known)」、「慣用の (normal)」、「標準の (standard)」などの形容詞、及び類似した意味の用語は、所定の期間に記載されるアイテム、又は所定の時点で利用可能なアイテムに限定されるものとして解釈されるべきではないが、その代わりに、現在又は将来の任意の時点で入手可能又は知られる、既知、慣用又は標準の技術を包含すると解釈されるべきである。「好ましい (preferably)」、「好ましい (preferred)」、「所望 (desired)」、又は「所望 (desirable)」などの用語、及び類似した意味の言葉の使用は、特定の特徴が本発明の構造や機能に対して重大、本質的、又は重要であることを意味すると理解すべきではないが、その代わりに、単に、本発明の特定の実施形態に利用可能又は利用できない代替的又は追加の特徴を強調することを意図している。同様に、接続詞「及び (and)」に関連しているアイテムグループは、それらのアイテムの一つ一つがグルーピングに存在する必要があると理解されるべきではないが、別段の記載がない限り、むしろ、「及び / 又は (and / or)」として理解されるべきである。同様に、接続詞「又は (or)」に関連しているアイテムグループは、それらのグループの間で相互排他性を必要とすることが理解されるべきではないが、別段の記載がない限り、むしろ、「及び / 又は (and / or)」と理解されるべきである。

【0234】

数値範囲を提供する場合、上限及び下限、並びにその範囲における上限と下限との間の各介在値は、実施形態の範囲内に包含されると理解されるべきである。

【0235】

本明細書で実質的に任意の複数形及び / 又は単数形の用語の使用に関して、当業者は、複数形から単数形への変換、及び / 又は、単数形から複数形への変換を文脈及び / 又は適用に合わせるように行うことができる。種々の単数形 / 複数形の置き換えは、明確にするために、本明細書に明示的に説明されてもよい。不定冠詞「a」又は「an」は複数を除外しない。単一の処理装置又は他のユニットは、特許請求の範囲に記載されるいくつかのアイテムの機能を満たすことができる。特定の手段が互に異なる従属請求項に記載されるという単なる事実は、これらの手段の組み合わせを有利に使用できないことを示すものではない。特許請求の範囲における任意の引用符号は、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0236】

導入される請求項の記載における特定の数字が意図される場合に、そのような意図が請求項に明確に記載される一方、そのような記載が存在しない場合に、そのような意図は存在しないことは、当業者にとって理解されるであろう。例えば、理解の助けとして、以下に添付される特許請求の範囲は、請求項の記載を導入する導入句「少なくとも1つ (at least one)」及び「1つ以上 (one or more)」の使用を含むことができる。しかしながら、このような語句の使用は、同一の請求項が導入句「1つ以上 (one or more)」又は「少なくとも1つ (at least one)」、及び「a」又は「an」などの不定冠詞（例えば、「a」及び / 又は「an」は、一般的

に、「少なくとも1つ(at least one)」又は「1つ以上(one or more)」を意味すると解釈されるべきである)を含む場合であっても、不定冠詞「a」又は「an」による請求項の記載の導入が、そのような導入された請求項の記載を含む任意の特定の請求項を、このような記載の1つのみを含む実施形態に限定すると解釈されるべきではない。請求項の記載を導入するために使用される定冠詞の使用についても同じである。さらに、導入された請求項の記載における特定の数字を明示的に記載する場合であっても、そのような記載が典型的に少なくとも記載の数を意味するように解釈されるべきであることは、当業者にとって理解されるであろう(例えば、他の修飾のない「2つの記載」という最低限の記載は、典型的に、少なくとも2つの記載、又は2つ以上の記載を意味する)。さらに、「A、B、及びCなどの少なくとも1つ」に類似している慣例を使用するこれらの例において、一般的に、このような構成は、その慣例について当業者が理解する意味で意図されている(例えば、「A、B、及びCの少なくとも1つを有するシステム」は、単独のA、単独のB、単独のC、AとBと一緒に、AとCと一緒に、BとCと一緒に、及び/又は、AとBとCとと一緒になどを有するシステムを含むが、これらに限定されない。)。 「A、B、及びCなどの少なくとも1つ」に類似している慣例を使用するこれらの例において、一般的に、このような構成は、その慣例について当業者が理解する意味で意図されている(例えば、「A、B、及びCの少なくとも1つを有するシステム」は、単独のA、単独のB、単独のC、AとBと一緒に、AとCと一緒に、BとCと一緒に、及び/又は、AとBとCとと一緒になどを有するシステムを含むが、これらに限定されない。)。 2つ以上の選択可能な用語が存在する実質的に任意の離接語及び/又は語句は、明細書、特許請求の範囲、又は図面にあるなしを問わず、その選択可能な用語の1つ、いずれか一方、又は両方ともを含む可能性を意図すると理解されるべきであることは当業者にとってさらに理解されるであろう。例えば、語句「A又はB」は、「A」又は「B」又は「A及びB」の可能性を含むと理解されるであろう。

10

20

【0237】

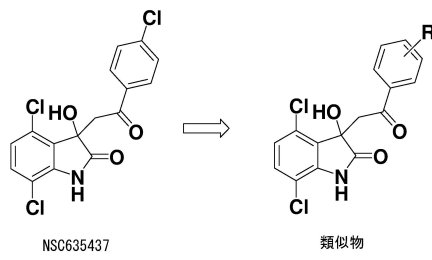
明細書中で使用される成分、反応条件などの数量を表すすべての数字は、すべての例において用語「約(about)」により修飾されるものとして理解されるべきである。それで、反対に示されない限り、本明細書で説明される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変更できる近似値である。本出願の優先権を主張する任意の出願における任意の特許請求の範囲に対しては、少なくとも均等論が適用されるが、これに限定されず、各数値パラメータは、有効数字及び通常の丸めアプローチの数字に照らして解釈されるべきである。

30

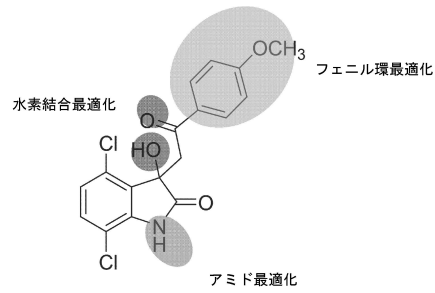
【0238】

さらに、前述において、明瞭さ及び理解のために例示及び実施例を手段として多少詳しく述べられるが、特定の変更及び修飾が実施できることは、当業者にとって明らかである。したがって、説明及び実施例は、本発明の範囲を本明細書に記載される特定の実施形態及び実施例に限定するものとして解釈されるべきではないが、むしろ、本発明の真の範囲及び趣旨に伴うすべての修飾及び代替物を包含する。

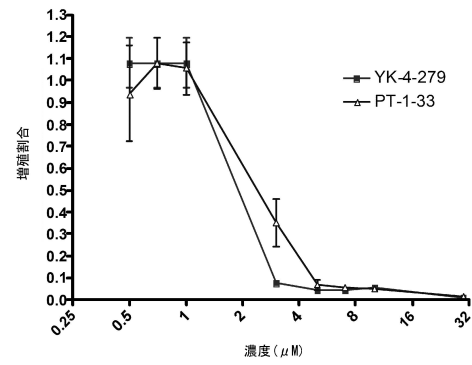
【図 1】



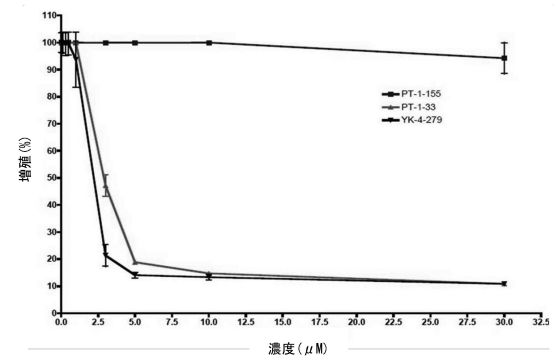
【図 2】



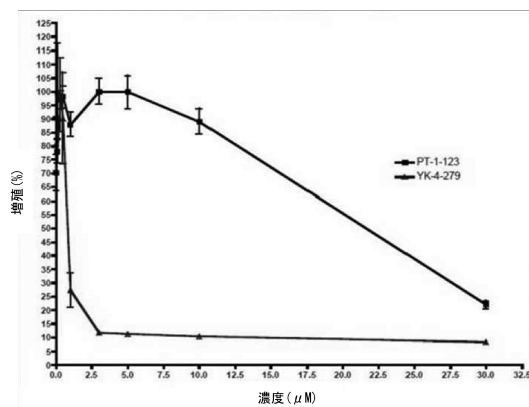
【図 3 A】



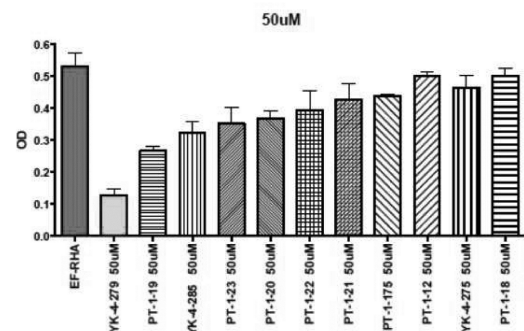
【図 3 B】



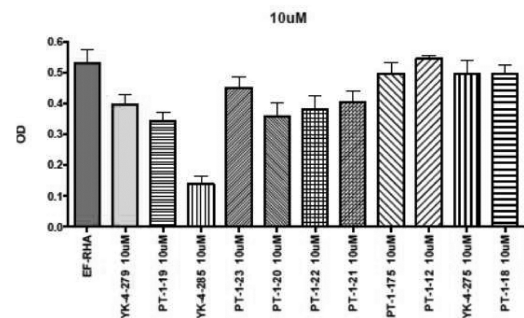
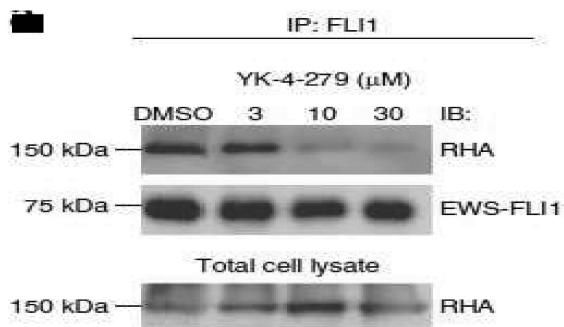
【図 3 C】



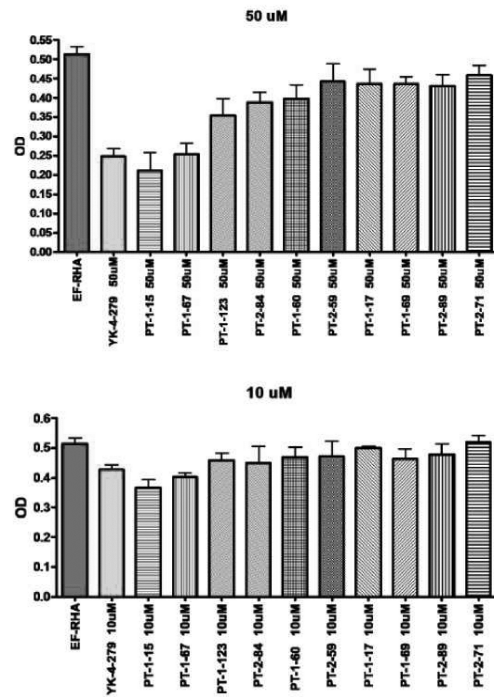
【図 5 A】



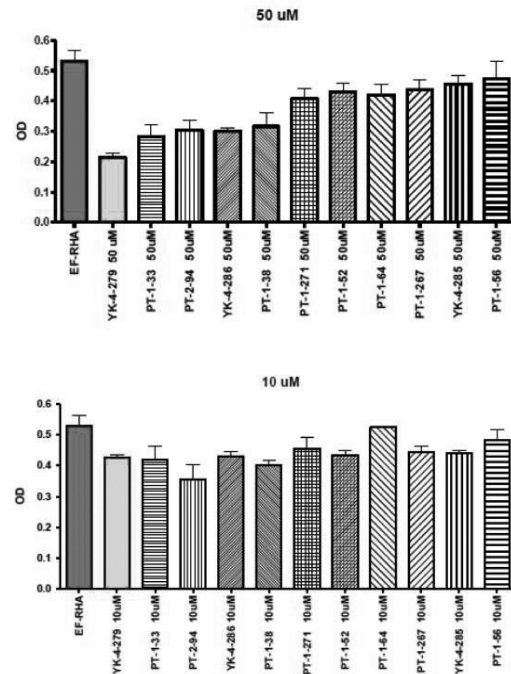
【図 4】



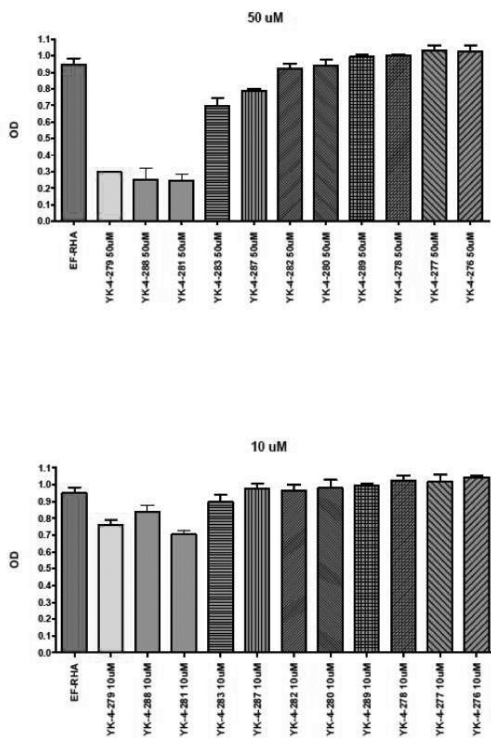
【図 5 B】



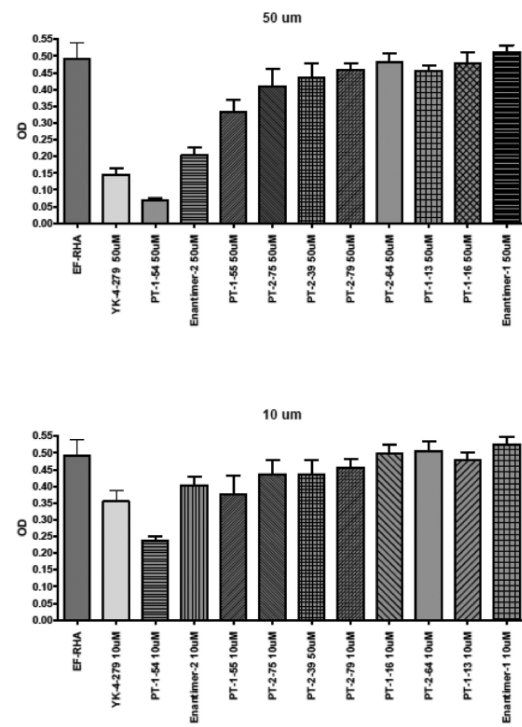
【図 5 C】



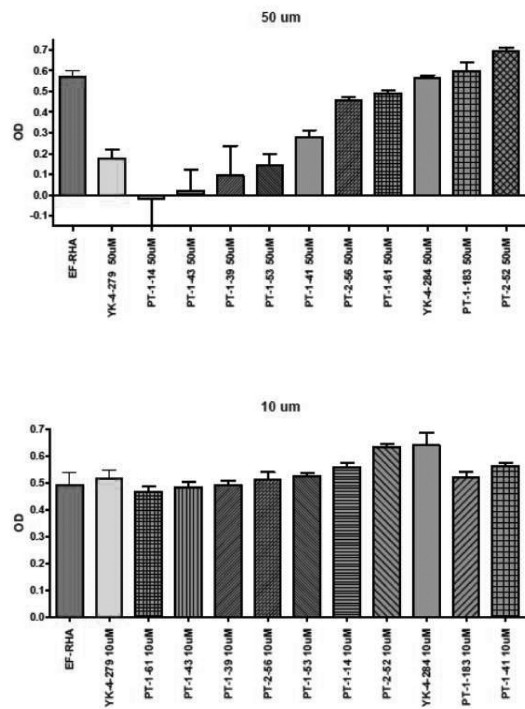
【図 5 D】



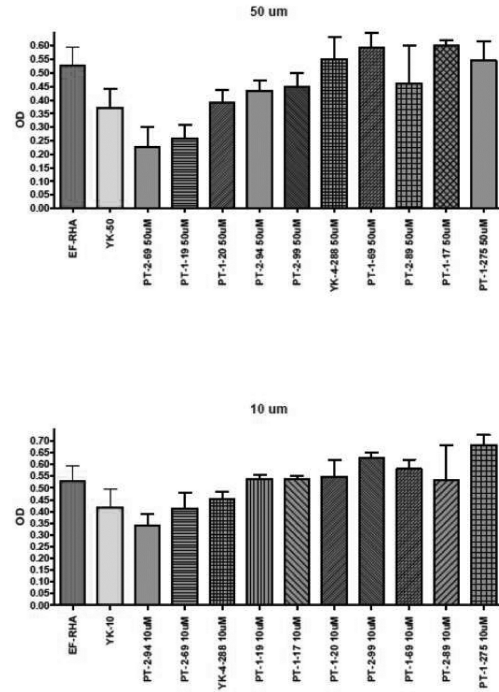
【図 5 E】



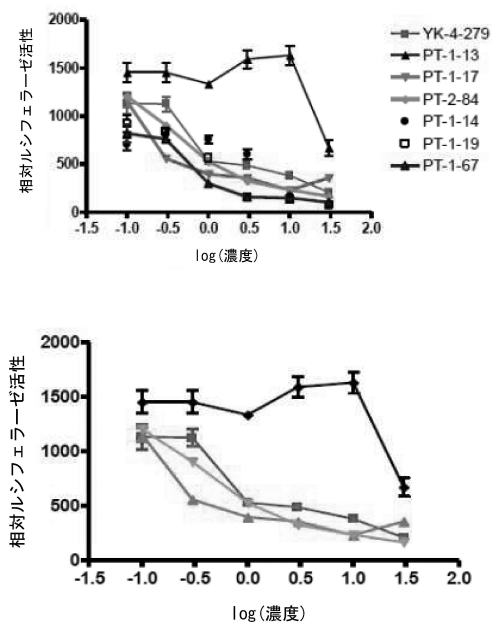
【図 5 F】



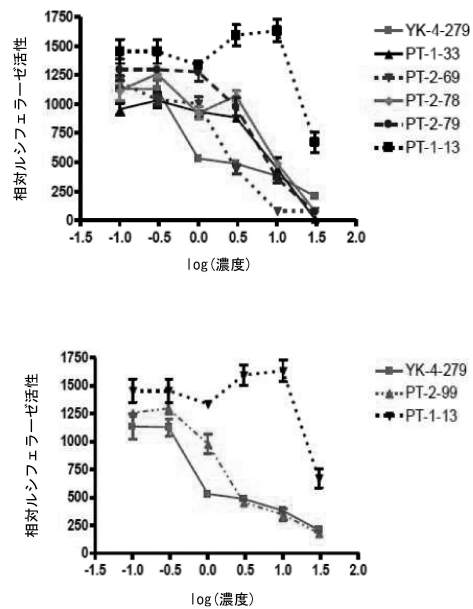
【図 5 G】



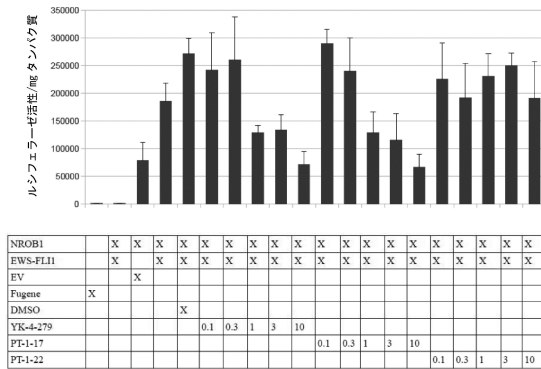
【図 6 A】



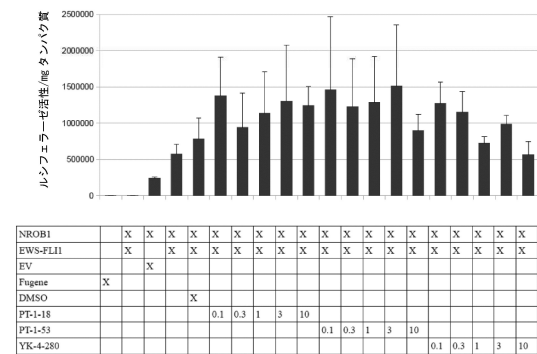
【図 6 B】



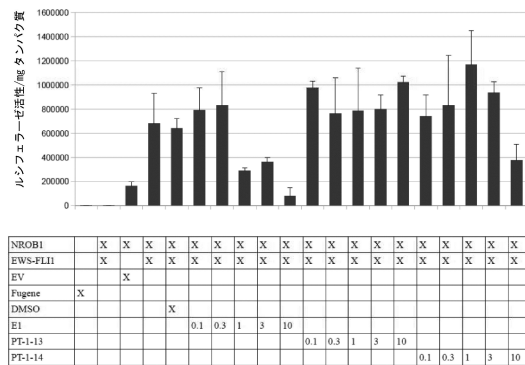
【図 7 A】



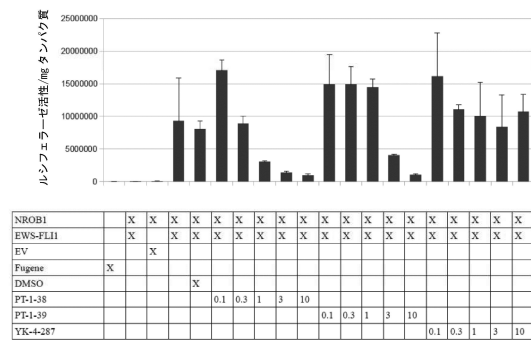
【図 7 C】



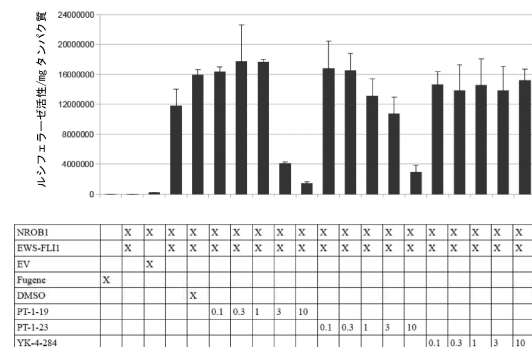
【図 7 B】



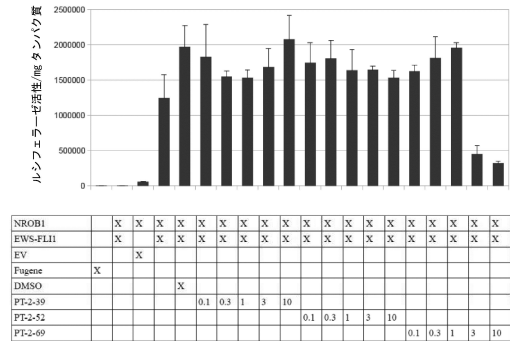
【図 7 D】



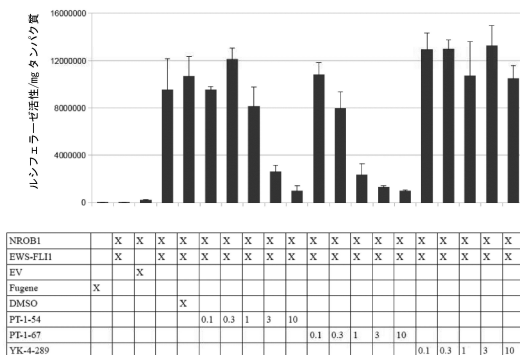
【図 7 E】



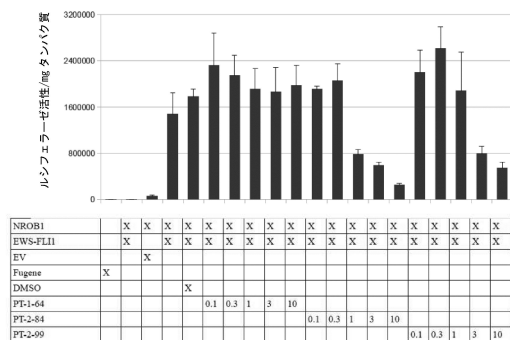
【図 7 G】



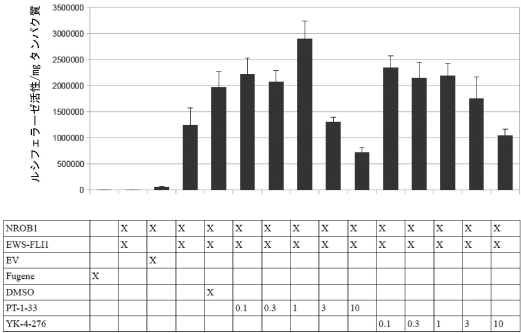
【図 7 F】



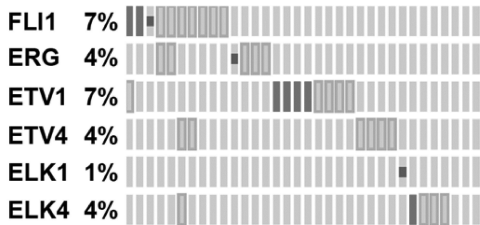
【図 7 H】



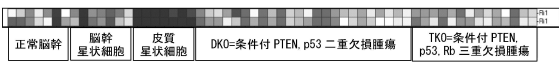
【図 7 I】



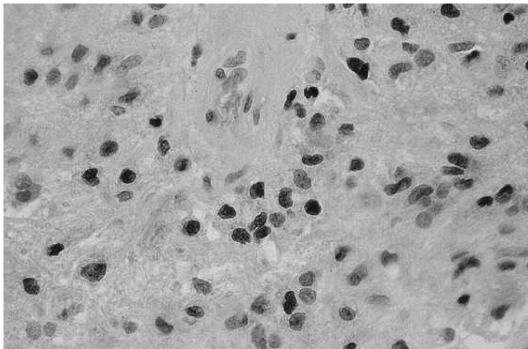
【図 8】



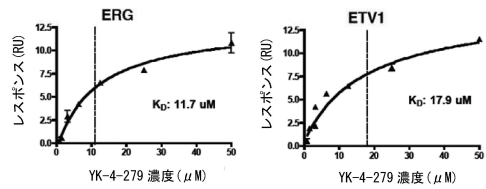
【図 1 1】



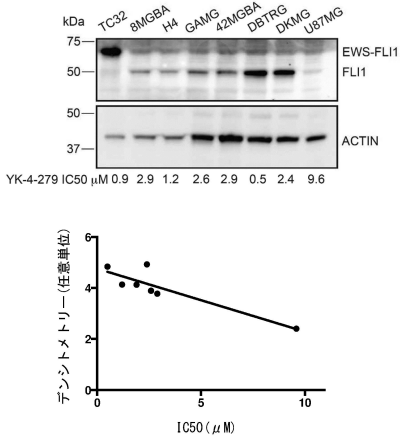
【図 1 2】



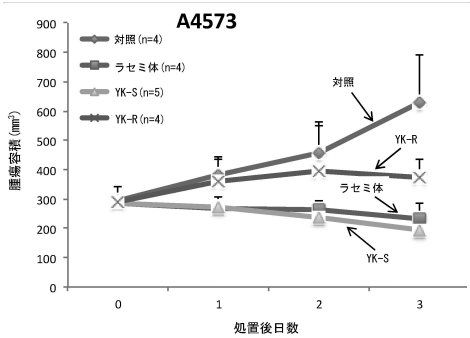
【図 9】



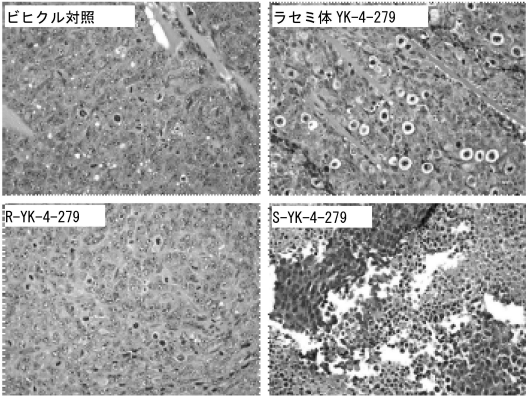
【図 1 0】



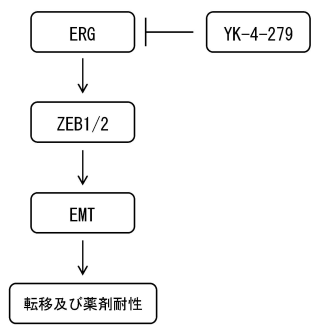
【図 1 3 A】



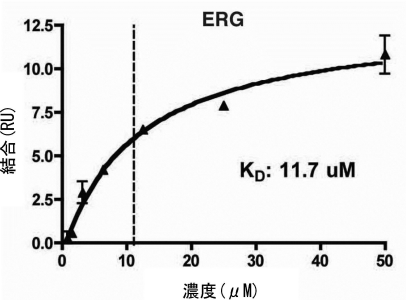
【図 1 3 B】



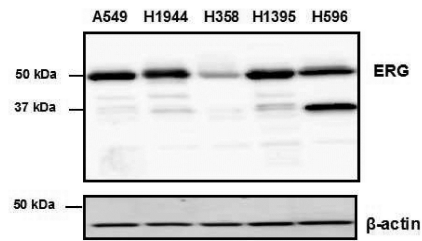
【図 1 4】



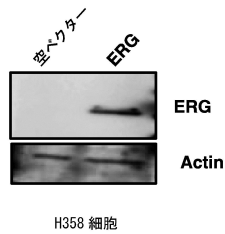
【図 1 5】



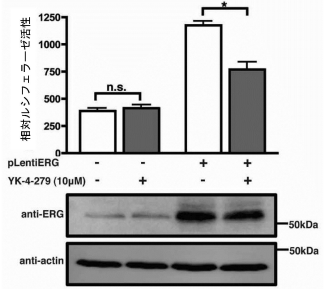
【図 1 7】



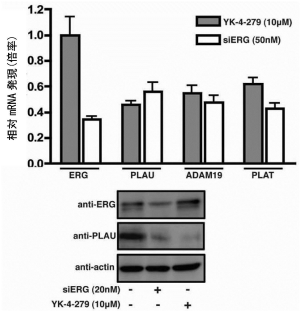
【図 1 8 A】



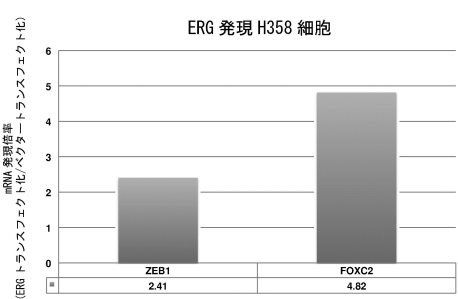
【図 1 6 A】



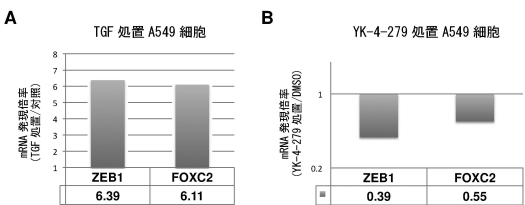
【図 1 6 B】



【図 1 8 B】



【図 1 9】



フロントページの続き

- (72)発明者 トレッツキー、ジェフリー、エー．
アメリカ合衆国ディー・シー 2 0 0 5 7、ワシントン、エヌ・ダブリュー、サーティ - セブンス・
アンド・オー・ストリート ジョージタウン・ユニバーシティ内
- (72)発明者 ウラン、エイカット
アメリカ合衆国ディー・シー 2 0 0 5 7、ワシントン、エヌ・ダブリュー、サーティ - セブンス・
アンド・オー・ストリート ジョージタウン・ユニバーシティ内

審査官 今村 明子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 5 3 4 1 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 8 / 0 8 3 3 2 6 (W O , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 5 9 9 2 7 (U S , A 1)
NATURE MEDICINE , 2 0 0 9 年 7 月 , Vol.15, No.7 , pp.750-757
Journal of Clinical Pathology , 2 0 0 7 年 , Vol.60 , pp.694-700 , DOI:10.1136/jcp.2006.03
9230
Plos One , 2 0 1 1 年 4 月 , Vol.6 Issue4 , e19343
Biochemical and Biophysical Research Communications , 2 0 0 0 年 , Vol.279 , pp.401-406 ,
DOI:10.1006/bbrc.2000.3963.

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 K 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 4
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
C 0 7 D 2 0 9 / 3 8