

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6240083号
(P6240083)

(45) 発行日 平成29年11月29日(2017.11.29)

(24) 登録日 平成29年11月10日(2017.11.10)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
	A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 15 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2014-543501 (P2014-543501)	(73) 特許権者	500356887
(86) (22) 出願日	平成24年11月15日(2012.11.15)		トラスティーズ オブ タフツ カレッジ
(65) 公表番号	特表2014-533727 (P2014-533727A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(43) 公表日	平成26年12月15日(2014.12.15)		2 1 1 1 ポストン ハリソン アヴェニ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/065236		ュー 1 3 6
(87) 国際公開番号	W02013/078059	(74) 代理人	100073184
(87) 国際公開日	平成25年5月30日(2013.5.30)		弁理士 柳田 征史
審査請求日	平成27年11月5日(2015.11.5)	(74) 代理人	100090468
(31) 優先権主張番号	61/562,497		弁理士 佐久間 剛
(32) 優先日	平成23年11月22日(2011.11.22)	(72) 発明者	バチョヴチン, ウィリアム ダブリュー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
			2 1 4 2 ケンブリッジ ケンブリッジ
			パークウェイ 75 アpartment イ
			-609

最終頁に続く

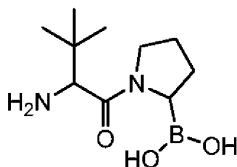
(54) 【発明の名称】 樹状細胞癌ワクチンのための小分子エンハンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者において腫瘍細胞に対する T 細胞免疫を増強するための組成物であって、(i) 腫瘍に対する T 細胞免疫を増強し、および (i i) G - C S F および C X C L 1 サイトカインの血清レベルを増加させるために治療的効果量の D A S H 阻害剤を含み、前記 D A S H 阻害剤は下記式により表される、組成物。

【化 1】



【請求項 2】

前記 D A S H 阻害剤が、癌ワクチン療法の一部として投与される、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記癌ワクチン療法が樹状細胞ワクチン療法である、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 4】

前記 D A S H 阻害剤が、抗体治療の抗体依存性細胞傷害を増強する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

前記抗体治療が、トラスツズマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、およびリツキシマブからなる群より選択される、請求項 4 記載の組成物。

【請求項 6】

前記 D A S H 阻害剤が、1 つ以上の化学療法剤と共に投与される、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 7】

前記 1 つ以上の化学療法剤が、イピリムマブ、ベムラフェニブ、G D C - 0 8 7 9、P L X - 4 7 2 0、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン硫酸塩、カルボプラチン、クロランブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン塩酸塩、ドセタキセル、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン塩酸塩、エピルピシン塩酸塩、エトポシド、エトポシドリン酸塩、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ゲムシタピン塩酸塩、ヒドロキシ尿素、イダルピシン塩酸塩、イホスファミド、インターフェロン、インターフェロン - 2 a、インターフェロン - 2 b、インターフェロン - n 3、インターフェロン - 1 b、インターロイキン、イリノテカン、メクロレタミン塩酸塩、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、マイトマイシン、ミトキサントロン、パクリタキセル、ペグアスパラガーゼ、ペントスタチン、プレドニゾン、ポルフィマーナトリウム、プロカルバジン塩酸塩、タキソール、タキソテレ、テニポシド、トポテカン塩酸塩、ビンブラスチン硫酸塩、ピンクリスチン硫酸塩、およびピノレルピン酒石酸塩からなる群より選択される、請求項 6 記載の組成物。

10

20

【請求項 8】

前記 D A S H 阻害剤が、癌、肉腫、白血病、リンパ腫および骨髄腫からなる群より選択される腫瘍に対する T 細胞免疫を増強する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 9】

前記 D A S H 阻害剤が、肺腫瘍、リンパ腫、乳房の腫瘍、結腸直腸腫瘍、甲状腺腫瘍、子宮腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍、皮膚腫瘍、腎臓腫瘍、肝臓腫瘍および脳腫瘍からなる群より選択される腫瘍に対する T 細胞免疫を増強する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 10】

前記 D A S H 阻害剤が、腫瘍細胞の再攻撃に対して免疫記憶を誘導する、請求項 1 記載の組成物。

30

【請求項 11】

前記患者がヒトである、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 12】

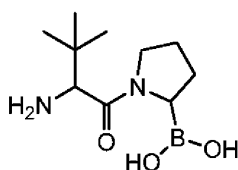
前記 D A S H 阻害剤が経口投与される、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 13】

再発を回避するために腫瘍の寛解状態にある患者を治療するための組成物であって、(i) 腫瘍に対する T 細胞免疫を増強し、および (i i) G - C S F および C X C L 1 サイトカインの血清レベルを増加させるために治療的効果量の D A S H 阻害剤を含み、前記 D A S H 阻害剤は下記式により表される、組成物。

40

【化 2】



【請求項 14】

前記患者がヒトである、請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

前記 D A S H 阻害剤が経口投与される、請求項 13 記載の組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、2011年11月22日に出願された米国仮特許出願第61/562497号に優先権の恩恵を主張するものである。

【技術分野】

【0002】

本発明は、樹状細胞癌ワクチンのための小分子エンハンサーに関する。

【背景技術】

【0003】

癌は、米国の二番目の主な死因である。認可された抗癌剤は、化学療法剤と標的剤の両方とも、毒性のために限定されており、癌死亡の85%超を占める固形腫瘍、例えば、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、膵臓癌、および前立腺癌に対しては最終的には効果的でない。体の免疫系を使用して腫瘍を殺すことが、失敗すると癌を出現させるので、長年に亘り、癌研究の目標となってきた。PT-100またはタラボスタットとしても知られているVal-boroProは、免疫活性化によりマウス内の腫瘍を縮小させる上で著しい有効性を示したジペプチドボロン酸である。しかしながら、ファスト・トラック第3相臨床試験において、その薬剤は、用量制限毒性のために、その目的を達成しなかった。

【0004】

米国の食品医薬品局は、2010年4月29日に、最初の癌ワクチンに膵臓癌用のProvengeを認可した。Provengeは樹状細胞(DCT)である；いくつかの心躍る新たな免疫療法の1つは、ときどき、「癌ワクチン」と呼ばれる。免疫系を強化することによって、そのようなワクチンは、原則として、どこに隠れていようと、一番最後の癌を見つけ、取り除き、それゆえ、一連の治療後の単なる小康状態を除外することができる。その概念は今では立証されているが、Provenge以外のDCTを含む癌ワクチンは、臨床試験において所望の有効性を達成できておらず、免疫促進剤、またはアジュバントを加える必要を示している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、この手法を臨床的に開発するためには、毒性の低いアジュバントが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の1つの態様は、癌を治療する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0007】

本発明の別の態様は、哺乳類における抗腫瘍免疫力を増加させる方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0008】

本発明の別の態様は、哺乳類における免疫応答を促進させるまたは増強する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0009】

本発明のさらに別の態様は、異常細胞増殖により特徴付けられる状態を治療する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0010】

10

20

30

40

50

本発明の別の態様は、哺乳類におけるサイトカインおよびケモカイン産生を増加させる方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

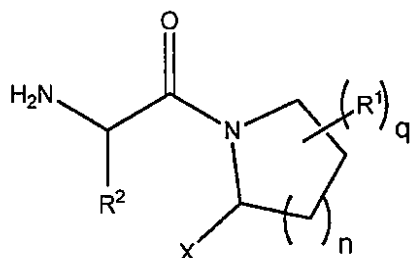
【0011】

本発明の別の態様は、哺乳類におけるT細胞の産生を促進させるまたは増強する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなり、前記T細胞が悪性細胞上の抗原を認識するものである方法に関する。

【0012】

ある実施の形態において、本発明は、前記化合物が式I：

10



式 I

【0013】

20

により表され、式中、

XはB(Y¹)(Y²)またはCNであり；

Y¹およびY²は、独立して、OHであるか、もしくはそれらが結合するホウ素原子と一緒に、ボロン酸に加水分解できる基を表し、またはそれらが結合するホウ素原子と一緒に、ボロン酸に加水分解できる5員から8員の環を形成し；

R¹は、ハロゲン、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、カルボニル、カルボキシル、エステル、ホルメート、ケトン、チオカルボニル、チオエステル、チオアセテート、チオホルメート、アミノ、アシルアミノ、アミド、ニトロ、スルフェート、スルホネート、スルホンアミド、-(CH₂)_m-R₇、-(CH₂)_m-OH、-(CH₂)_m-O-低級アルキル、-(CH₂)_m-O-低級アルケニル、-(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-R₇、-(CH₂)_m-SH、-(CH₂)_m-S-低級アルキル、-(CH₂)_m-S-低級アルケニル、-(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-R₇、アジド、シアノ、イソシアナート、チオシアナート、イソチオシアナート、シアナート、

30



【0014】

および



40

【0015】

からなる群より選択され；

R₇は、置換または未置換アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはヘテロ環を表し；

R₈は、独立して、ハロゲン、-CH₃、または-(CH₂)_n-CH₃を表し；

mは、0、1、2、3、4、5、または6であり；

R²は、n-プロピル、C₄~C₈アルキル、C₂~C₈アルケニル、C₂~C₈アルキニル、C₃~C₈シクロアルキル、C₂~C₇ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、ヘテロアラルキル、および天然に存在する疎水性アミノ酸の側鎖からなる群より

50

選択される疎水性基であり；

nは、0、1、または2であり；

qは、0、1、2、3、または4である、

上述した方法のいずれか1つに関する。

【0016】

ある実施の形態において、本発明は、前記化合物が t - ブチル Gly - b o r o P r o である、上述した方法のいずれか1つに関する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、Ala - b o r o P r o (A - b P) および Val - b o r o P r o (V - b P) の両方がプロリルオリゴプロテアーゼを阻害するが、Ala - b o r o P r o は免疫系を促進しないことを示している。Val - b o r o P r o は強力な免疫促進剤である。

10

【図2】図2は、PT - 100が初期腫瘍の完全な退縮を生じるが、定着腫瘍の縮退は生じないことを示している。

【図3】図3は、PT - 100 + 樹状細胞 (DC) ワクチンが定着腫瘍の縮退を生じること示している。

【図4】図4は、Val - b o r o P r o (図の2054) は、BALB / c マウスにおいて G - C F S および C X C L 1 / K C を促進するが、Ala - b o r o P r o (図の2054) は促進しないことを示している。G - C F S および C X C L 1 / K C は、抗癌免疫増強活性のマーカーである。この実験設定と結果が実施例3に記載されている。

20

【図5】図5は、Ari - 4175 (図の4175 - 2) が、インビトロのサイトカインの非常に強力な誘導物質であることを示している。この実験設定と結果が実施例3に記載されている。

【図6】図6は、Ari - 4175 (4175 - 2) が、抗癌免疫増強活性のマーカーである、G - C F S および C X C L 1 サイトカインを誘導する上で、PT - 100 (2054) よりもずっと強力であることを示している。この実験設定と結果が実施例3に記載されている。

【図7】図7は、ARI - 4175がM3 - 9 - M RMSモデルにおける腫瘍の再接種に対して免疫を確立することを示している。この実験設定と結果が実施例4に記載されている。

30

【図8A】図8Aは、ARI - 4175が、横紋筋肉腫 (RMS) モデルにおいてDCワクチンの有効性を増加させて、定着RMSの成長を阻害することを示している。C57BL / 6 マウスに0日目にRMS細胞を筋肉内注射した。マウスは、実施例1に記載されているように、10日目に単独皮下ワクチン接種を受け、その後、毎日、10mg / kg (5日間) および5mg / kg (10日間) のARI - 4175、1mg / kgのPT - 100 (15日間) 、またはビヒクルの強制飼養が行われた。

【図8B】図8Bは、ARI - 4175が、横紋筋肉腫 (RMS) モデルにおいてDCワクチンの有効性を増加させて、マウスの生存率を増加させることを示している。C57BL / 6 マウスに0日目にRMS細胞を筋肉内注射した。マウスは、実施例1に記載されているように、10日目に単独皮下ワクチン接種を受け、その後、毎日、10mg / kg (5日間) および5mg / kg (10日間) のARI - 4175、1mg / kgのPT - 100 (15日間) 、またはビヒクルの強制飼養が行われた。

40

【図9】図9は、実施例1に記載された実験における個々のマウスにおける腫瘍増殖を示している。

【図10】図10は、ARI - 4175 (4175) が、結腸直腸癌細胞株に対して著しいインビトロ活性を示さないことを示している。4175がセツキシマブ (CTX) と組み合わせられたときでも、活性はない。ARI - 4175およびセツキシマブの抗腫瘍効果は、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) により介在されると考えられるので、このことは予測される。

50

【図11】図11は、CD16発現が、ARI-4175により治療されたヌードマウスから採取したNK細胞上で上方制御されることを示している。

【図12】図12は、LAMP-1(CD107)が、ARI-4175により治療されたヌードマウスから採取したNK細胞上で上方制御されることを示している。

【図13A】図13Aは、結腸癌異種移植片のARI-4175によるインビボ阻害を示しており、単独の、またはセツキシマブ(CTX)との組合せのARI-4175によるDL1異種移植片の阻害を示している。

【図13B】図13Bは、結腸癌異種移植片のARI-4175によるインビボ阻害を示しており、単独の、またはセツキシマブ(CTX)との組合せのARI-4175によるHCT-116の阻害を示している。

10

【図14】図14は、ARI-4175および/またはセツキシマブ(CTX)により治療されたC57BI/6非担癌マウスからの脾細胞の細胞傷害性がHCT116腫瘍細胞に対して増強されることを示している。

【図15】図15は、ARI-4175がヒトNK細胞上でCD69を誘導することを示している。示された結果は、1日間のインキュベーション後の2人の健康な提供者からの培養されたヒトPBLに関する。

【図16】図16は、ARI-4175が、PT-100と同じくらい効果的であるが、高用量で毒性が低いことを示している。

【図17】図17のAおよびBは、腫瘍感作T細胞移入に対するアジュバントとして、ARI-4175は、遅延治療RMS M3-9-Mモデルにおける腫瘍縮退を誘導することを示している。

20

【図18】図18のAおよびBは、Tag1^{-/-}受容者におけるARI-4175および養子T細胞移入の併用療法がRMS M3-9-Mの体積を著しく減少させることを示している。(A)雌のRag1^{-/-}マウスは、腫瘍接種から1日後に、ナイーブまたはRMS感作T細胞を受けた。(B)10日目までに、ARI-4175で治療したマウスは、生理食塩水で治療したマウスよりも、著しく小さい腫瘍を有した(ナイーブ: n=5、p=0.0159; 刺激: n=5、p=0.0079)。ARI-4175と組み合わせて腫瘍感作T細胞で治療したRag1^{-/-}マウスは、全体で最も小さい腫瘍を有した。

【図19】ARI-4175は、著しく改善された生存率および減少したRMS M3-9-M体積から明らかのように、DCワクチン接種にとって強力なアジュバントであることを示している。

30

【図20】図20は、SDラットを使用した最大耐量(MTD)研究の結果を示しており、データは、投与の30分後にとった。

【図21】図21は、PT-100およびARI-4175に関する用量-血漿応答曲線を示している。

【図22】図22は、ARI-4175の開いた形態対閉じた形態に関する薬物動態データを示している。酸性条件下で、ARI-4175は、開いた、すなわち線状で存在し; 中性または塩基性条件下では、閉じた環化形態が極めて促進される。

【図23-1】図23-1は、RMSモデル内の個々のマウスにおける腫瘍増殖を示している。

40

【図23-2】図23-2は、図23-1の続きである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の1つの態様は、癌を治療する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0019】

本発明の別の態様は、癌を治療する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなり、その化合物がVal-boroProではない方法に関する。

50

【 0 0 2 0 】

本発明の別の態様は、前記化合物が、G C S FおよびC X C L 1からなる群より選択されるサイトカインの産生を誘導する、上述した方法のいずれか1つに関する。

【 0 0 2 1 】

本発明の別の態様は、前記癌が、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨肉腫、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、絨毛癌、C N S 癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭部と頸部の癌、胃癌(gastric cancer)、上皮内腫瘍、腎臓癌(kidney cancer)、喉頭癌、白血病、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、肝臓癌、小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、腎臓癌(renal cancer)、呼吸器系癌、肉腫、皮膚癌、胃癌(stomach cancer)、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、および泌尿器系癌からなる群より選択される、上述した方法のいずれか1つに関する。

10

【 0 0 2 2 】

他の実施の形態において、癌は、前立腺癌、結腸直腸癌、多発性骨髄腫、および非小細胞性肺癌からなる群より選択される。

【 0 0 2 3 】

ある他の実施の形態において、癌は、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、膵臓癌および前立腺癌からなる群より選択される。

【 0 0 2 4 】

1つの実施の形態において、癌は肺癌である。

20

【 0 0 2 5 】

別の実施の形態において、癌は非小細胞性肺癌である。

【 0 0 2 6 】

さらに別の実施の形態において、癌は結腸直腸癌である。

【 0 0 2 7 】

ある実施の形態において、癌は乳癌である。

【 0 0 2 8 】

ある他の実施の形態において、癌は膵臓癌である。

【 0 0 2 9 】

別の実施の形態において、癌は前立腺癌である。

30

【 0 0 3 0 】

ある実施の形態において、癌は転移性である。

【 0 0 3 1 】

本発明の別の態様は、前記哺乳類に、治療に効果的な量の腫瘍感作T細胞を併用投与する工程をさらに含む、上述した方法のいずれか1つに関する。

【 0 0 3 2 】

ある実施の形態において、腫瘍感作T細胞は、前記化合物の投与の前に投与される。

【 0 0 3 3 】

ある実施の形態において、腫瘍感作T細胞は、前記化合物の投与の後に投与される。

40

【 0 0 3 4 】

ある実施の形態において、腫瘍感作T細胞は、前記化合物の投与と同時に投与される。

【 0 0 3 5 】

本発明の別の態様は、前記哺乳類に、治療に効果的な量の経口活性腫瘍抗原を併用投与する工程をさらに含む、上述した方法のいずれか1つに関する。

【 0 0 3 6 】

本発明のさらに別の態様は、前記哺乳類に、治療に効果的な量の樹状細胞ワクチンを併用投与する工程をさらに含む、上述した方法のいずれか1つに関する。

【 0 0 3 7 】

本発明のまたさらに別の態様は、アジュバントを投与する工程をさらに含む、上述した

50

方法のいずれか1つに関する。

【0038】

本発明の別の態様は、前記哺乳類を、外科手術、放射線療法および化学療法からなる群より選択される二次療法で治療する工程をさらに含む、上述した実施の形態のいずれか1つに関する。

【0039】

1つの実施の形態において、二次療法は外科手術である。

【0040】

別の実施の形態において、二次療法は放射線療法である。

【0041】

さらに別の実施の形態において、二次療法は化学療法である。

【0042】

ある実施の形態において、前記化学療法は、イピリムマブ、ベムラフェニブ、GDC-0879、PLX-4720、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン硫酸塩、カルボプラチン、クロランブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン塩酸塩、ドセタキセル、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン塩酸塩、エピルピシン塩酸塩、エトポシド、エトポシドリン酸塩、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ゲムシタピン塩酸塩、ヒドロキシ尿素、イダルピシン塩酸塩、イホスファミド、インターフェロン、インターフェロン-2a、インターフェロン-2b、インターフェロン-n3、インターフェロン-1b、インターロイキン、イリノテカン、メクロレタミン塩酸塩、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、マイトマイシン、ミトキサントロン、パクリタキセル、ペグアスパラガーゼ、ペントスタチン、プレドニゾン、ボルフィマーナトリウム、プロカルバジン塩酸塩、タキソール、タキソテレ、テニポシド、トポテカン塩酸塩、ビンブラスチン硫酸塩、ピンクリスチン硫酸塩、およびビノレルビン酒石酸塩からなる群より選択される。

【0043】

ある実施の形態において、化学療法は、プレオマイシン硫酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン塩酸塩、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ゲムシタピン塩酸塩、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、パクリタキセル、タキソール、タキソテレ、ビンブラスチン硫酸塩およびピンクリスチン硫酸塩からなる群より選択される。

【0044】

ある実施の形態において、化学療法はジベプチジルペプチダーゼIV阻害剤である。

【0045】

ある他の実施の形態において、化学療法は、FAP活性化化学療法薬、FAP活性化ジベプチジルペプチダーゼIV阻害剤、またはFAP活性化プロテアソーム阻害剤である。

【0046】

さらにまた他の実施の形態において、化学療法はFAP活性化プロテアソーム阻害剤である。

【0047】

ある実施の形態において、化学療法は抗体である。

【0048】

ある他の実施の形態において、前記抗体は、トラスツズマブ、セツキシマブ、ペバシズマブ、およびリツキシマブからなる群より選択される。

【0049】

本発明の1つの態様は、哺乳類における抗腫瘍免疫力を増加させる方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0050】

10

20

30

40

50

ある実施の形態において、前記化合物はVal-boroProではない。

【0051】

ある他の実施の形態において、前記化合物は、GCSFおよびCXCL1からなる群より選択されるサイトカインの産生を誘導する。

【0052】

さらに他の実施の形態において、前記抗腫瘍免疫力は、肺腫瘍、リンパ腫様、乳房の腫瘍、結腸直腸腫瘍、甲状腺腫瘍、子宮腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍、皮膚腫瘍、腎臓腫瘍、肝臓腫瘍および脳腫瘍からなる群より選択される腫瘍に対して増加させられる。

【0053】

他の実施の形態において、抗腫瘍免疫力は、肺腫瘍、乳房の腫瘍、結腸直腸腫瘍、膵臓腫瘍および前立腺腫瘍からなる群より選択される腫瘍に対して増加させられる。

10

【0054】

ある他の実施の形態において、抗腫瘍免疫力は抗体依存性細胞傷害を含む。

【0055】

本発明の別の態様は、哺乳類における免疫応答を促進させるまたは増強する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0056】

ある実施の形態において、前記化合物はVal-boroProではない。

【0057】

ある他の実施の形態において、前記化合物は、GCSFおよびCXCL1からなる群より選択されるサイトカインの産生を誘導する。

20

【0058】

さらに他の実施の形態において、免疫応答が促進される。

【0059】

またさらに他の実施の形態において、免疫応答が増強される。

【0060】

ある実施の形態において、免疫応答は抗体依存性細胞傷害を含む。

【0061】

ある他の実施の形態において、前記哺乳類は、癌を有するか、または癌を発症する恐れがある。

30

【0062】

さらに他の実施の形態において、前記哺乳類は癌の小康状態にある。

【0063】

またさらに他の実施の形態において、前記哺乳類は難治性癌または耐性癌を有する。

【0064】

本発明の別の態様は、異常細胞増殖により特徴付けられる状態を治療する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0065】

ある実施の形態において、前記化合物はVal-boroProではない。

40

【0066】

ある実施の形態において、前記化合物は、GCSFおよびCXCL1からなる群より選択されるサイトカインの産生を誘導する。

【0067】

ある実施の形態において、前記異常細胞増殖は、癌、血管増殖性疾患または線維性疾患である。

【0068】

ある実施の形態において、前記異常細胞増殖は異常血管形成である。

【0069】

50

本発明の別の態様は、哺乳類におけるサイトカインおよび/またはケモカイン産生を増加させる方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなる方法に関する。

【0070】

ある実施の形態において、前記化合物はVal-boroProではない。

【0071】

ある他の実施の形態において、前記化合物は、GCSFおよびCXCL1からなる群より選択されるサイトカインの産生を誘導する。

【0072】

本発明の別の態様は、哺乳類におけるT細胞の産生を促進させるまたは増強する方法であって、その必要のある哺乳類に、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する化合物を治療に効果的な量、投与する工程を有してなり、前記T細胞が悪性細胞上の抗原を認識するものである方法に関する。

10

【0073】

ある実施の形態において、前記化合物はVal-boroProではない。

【0074】

ある他の実施の形態において、前記化合物は、GCSFおよびCXCL1からなる群より選択されるサイトカインの産生を誘導する。

【0075】

ある他の実施の形態において、T細胞の産生が促進される。

20

【0076】

さらに他の実施の形態において、T細胞の産生が増強される。

【0077】

またさらに他の実施の形態において、前記悪性細胞は、癌、肉腫、白血病、リンパ腫または骨髄腫である。

【0078】

ある実施の形態において、前記哺乳類は、霊長類、イヌ、ウマ、ネコまたはウシである。

【0079】

ある他の実施の形態において、前記哺乳類はヒトである。

30

【0080】

ある実施の形態において、前記化合物は、経口または非経口投与される。

【0081】

ある他の実施の形態において、前記化合物は非経口投与される。

【0082】

さらに他の実施の形態において、前記化合物は経口投与される。

【0083】

ある実施の形態において、前記化合物は固形の剤型で投与される。

【0084】

ある他の実施の形態において、前記固形の剤型は、錠剤、カプセルまたはピルである。

40

【0085】

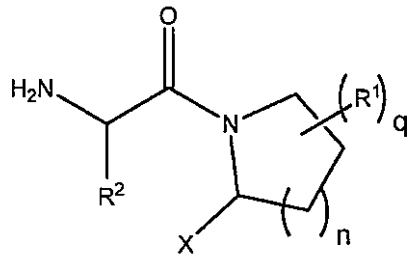
さらに他の実施の形態において、前記固形の剤型は錠剤である。

【0086】

ある実施の形態において、前記化合物は、用量制限毒性なく、免疫系を促進するのに十分な量で投与される。

【0087】

ある実施の形態において、本発明は、前記化合物が式I：



式 I

【0088】

10

により表され、式中、

XはB(Y¹)(Y²)またはCNであり；

Y¹およびY²は、独立して、OHであるか、もしくはそれらが結合するホウ素原子と一緒に、ボロン酸に加水分解できる基を表し、またはそれらが結合するホウ素原子と一緒に、ボロン酸に加水分解できる5員から8員の環を形成し；

R¹は、ハロゲン、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、カルボニル、カルボキシル、エステル、ホルメート、ケトン、チオカルボニル、チオエステル、チオアセテート、チオホルメート、アミノ、アシルアミノ、アミド、ニトロ、スルフェート、スルホネート、スルホンアミド、-(CH₂)_m-R₇、-(CH₂)_m-OH、-(CH₂)_m-O-低級アルキル、-(CH₂)_m-O-低級アルケニル、-(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-R₇、-(CH₂)_m-SH、-(CH₂)_m-S-低級アルキル、-(CH₂)_m-S-低級アルケニル、-(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-R₇、アジド、シアノ、イソシアナート、チオシアナート、イソチオシアナート、シアナート、

20



【0089】

および



30

【0090】

からなる群より選択され；

R₇は、置換または未置換アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはヘテロ環を表し；

R₈は、独立して、ハロゲン、-CH₃、または-(CH₂)_n-CH₃を表し；

mは、0、1、2、3、4、5、または6であり；

R²は、n-プロピル、C₄~C₈アルキル、C₂~C₈アルケニル、C₂~C₈アルキニル、C₃~C₈シクロアルキル、C₂~C₇ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、ヘテロアラルキル、および天然に存在する疎水性アミノ酸の側鎖からなる群より選択される疎水性基であり；

40

nは、0、1、または2であり；

qは、0、1、2、3、または4である、

上述した方法のいずれか1つに関する。

【0091】

ある実施の形態において、qは、0、1、または2である。

【0092】

ある他の実施の形態において、qは0である。

【0093】

さらに他の実施の形態において、nは0である。

50

【 0 0 9 4 】

またさらに他の実施の形態において、 n は1である。

【 0 0 9 5 】

ある他の実施の形態において、 n は2である。

【 0 0 9 6 】

ある実施の形態において、 X は $B(Y^1)(Y^2)$ である。

【 0 0 9 7 】

ある他の実施の形態において、 X は $B(OH)_2$ である。

【 0 0 9 8 】

ある実施の形態において、 n は1であり、 q は0であり、 X は $B(OH)_2$ である。 10

【 0 0 9 9 】

ある実施の形態において、 R^2 は、*t*-ブチル、イソブチル、ペンチル、シクロヘキシル、ベンジル、およびナフチルからなる群より選択される。

【 0 1 0 0 】

ある他の実施の形態において、 R^2 は、*t*-ブチル、イソブチル、およびペンチルからなる群より選択される。

【 0 1 0 1 】

またさらに他の実施の形態において、 R^2 は*t*-ブチルである。

【 0 1 0 2 】

ある実施の形態において、 R^2 は天然に存在する疎水性アミノ酸の側鎖である。 20

【 0 1 0 3 】

ある他の実施の形態において、 R^2 は、ロイシン、イソロイシン、*tert*-ロイシン、フェニルアラニン、またはトリプトファンの側鎖である。

【 0 1 0 4 】

ある実施の形態において、式Iの化合物は*t*-ブチルGly-boroProである。

【 0 1 0 5 】

ある実施の形態において、 X を担持する炭素での立体化学配置はLである。

【 0 1 0 6 】

ある他の実施の形態において、 X を担持する炭素での立体化学配置はDである。

【 0 1 0 7 】

ある実施の形態において、 R^2 を担持する炭素での立体化学配置はLである。 30

【 0 1 0 8 】

ある他の実施の形態において、 R^2 を担持する炭素での立体化学配置はDである。

【 0 1 0 9 】

ある実施の形態において、 X を担持する炭素での立体化学配置はLであり、 R^2 を担持する炭素での立体化学配置はLである。

【 0 1 1 0 】

ある他の実施の形態において、 X を担持する炭素での立体化学配置はLであり、 R^2 を担持する炭素での立体化学配置はDである。

【 0 1 1 1 】

さらに他の実施の形態において、 X を担持する炭素での立体化学配置はDであり、 R^2 を担持する炭素での立体化学配置はLである。 40

【 0 1 1 2 】

ある実施の形態において、 X を担持する炭素での立体化学配置はDであり、 R^2 を担持する炭素での立体化学配置はDである。

【 0 1 1 3 】

「DASHセリンプロテアーゼ」という用語は、ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)IV活性および/またはその構造的な同族体を意味する。これらのタンパク質は、それらの共通のポストプロリン開裂セリンジペプチダーゼ機構により結びつけられる酵素である。例えば、元々は静止細胞プロリンジペプチダーゼ(QPP)と命名されたDPP-VII 50

は、DASHセリンプロテアーゼである。

【0114】

PT-100またはタラボスタットとしても知られているVal-boroProは、マクロファージにおけるカスパーゼ-1の活性化およびIL-1ベータの誘導によって免疫を促進するようであり、これは、次に、マクロファージおよび間質線維芽細胞におけるサイトカインおよびケモカインを上方制御する。細胞内DPP8および/または9活性は、マクロファージにおけるPT-100の関連標的であるようである。この作用機構は、免疫系における細胞内DPPのこれまで予見できない規制の役目を示す。

【0115】

第3ブチル(t-ブチルと省略される)Gly-boroProであるARI-4175は、癌の治療のための樹状細胞ワクチンのアジュバントとしてセリンプロテアーゼのプロリルペプチダーゼファミリーの6つの構成員全てを強力に阻害するジペプチドボロン酸である。PT-100と同様に、ARI-4175はDPP8/9活性を阻害する。好ましくは、イソロイシン-boroPro、ブチルグリシン-boroPro、フェニルアラニン-boroPro(Phe-boroPro)、およびシクロヘキシルグリシン-boroPro(Cyg-boroPro)などの高張る疎水性側鎖を有する、他のジペプチドボロン酸は、同様に機能すると予測される。当業者により日常的な実験により、複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害するどの化合物(例えば、式Iの化合物)が、請求項に記載された方法にうまく使用できるかが決定できるであろう。

【0116】

PT-100は、腫瘍および所属(drainage)リンパ節におけるサイトカイン/ケモカイン上方制御によってマウスにおける腫瘍免疫を活性化させる。癌ワクチンアジュバントとしてのサイトカインの使用は新しくはない:例えば、Sipuleucel-Tに関するGM-CSFおよび開発中のワクチンに関するIL-2およびIFN- γ 。しかしながら、これらの用途と比べて、経口活性のDPP8/9阻害剤であるPT-100およびARI-4175には、腫瘍関連マクロファージおよび間質細胞を誘導して、協働して腫瘍特異的エフェクターT細胞を活性化できるサイトカインとケモカインの組合せを生成する利点がある。PT-100により上方制御されるサイトカインとケモカインの中で、IL-1 β 、CXCL9およびCXCL10が特に注目に値する。腫瘍関連マクロファージにより産生されるIL-1 β は、炎症性応答を活性化すると、腫瘍の微環境におけるTh1細胞の発生を促進する上で極めて重要な役割を果たす。

【0117】

強力な前臨床抗腫瘍活性および新規の作用機構に基づいて、PT-100は、癌におけるヒトの試験に前進し、FDAによってファスト・トラック指定が許可された。しかしながら、非ホジキンリンパ腫(NHL)、転移性黒色腫および非小細胞性肺癌(NSCLC)の非ランダム化第2相研究における臨床活性のいくつかの徴候にもかかわらず、PT-100は、最終的に、NSCLCにおいて極めて重要な第3相試験の目標を達成できなかった。2つの要因が、この失敗に寄与したようである。最も重要なことに、前臨床研究は、マウスにおけるPT-100の最適な抗腫瘍活性について、腫瘍に対する内因性免疫応答が要求されることを示した。そのような根本的な腫瘍免疫はいずれも第3相で研究した遅延段階のNSCLC患者に残っていることはありそうもなかった。第2に、癌患者における用量制限毒性により、患者間での一貫した免疫促進のために十分に高いPT-100用量の投与が妨げられるようであった。Fry等による研究は、PT-100の作用機構は、癌ワクチンを高めるために使用された場合、臨床的に最も効果的であるべきことを示唆している。PT-100が、腫瘍特異的T細胞を刺激できる適切なワクチンと共に使用した場合、臨床的に成功するかもしれない;しかし、ヒトにおいて臨床的性抗を達成する、毒性の低い類似体を特定することが、本発明の目的である。

【0118】

単独で、または樹状細胞療法(DCT)、トラスツズマブ、セツキシマブ、イピリムマブ、ペムラフェニブ、ソラフェニブ、または他の癌免疫療法との組合せで、ARI-41

10

20

30

40

50

75または複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する他の化合物(例えば、式Iの化合物)は、経口活性である小分子であるので、他の癌免疫療法を上回る著しい利点を有する。それらは、困難で高価なDCITまたは抗体治療と類似の免疫活性化を引き起こすが、ずっと容易に投与できる。ARI-4175および複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼ(例えば、式Iの化合物)を阻害する化合物は、それらの種類の最初の「経口活性である腫瘍抗原」である。

【0119】

多くの患者は、セツキシマブに应答しない、または治療に対する初期应答後に耐性を生じない。これは、患者の免疫系に対して耐性を生じる癌のためである。その免疫应答はまだ存在するが、もはや腫瘍を殺すのに十分に強力ではないか、または腫瘍が免疫系にとって見えなくなる。一例は、悪性結腸直腸癌の約40%に見つかるKRAS突然変異である。近年の臨床試験(Lievre et al., Cancer Res. 2006, 66 (8), 3992)により、KRAS突然変異が、セツキシマブに対する耐性と相関したのに対し、セツキシマブに应答した患者の全てがKRAS突然変異を欠如したことが分かった。セツキシマブが臨床应答を生じる分子機構は依然として知られていないが、ARI-4175による免疫应答の再活性化は、単独で、またはセツキシマブまたは他の免疫療法との組合せで、その免疫应答が腫瘍を殺すのに不十分である患者または難治性癌を有する患者における臨床転帰を改善する。

10

【0120】

ARI-4175または複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する他の化合物(例えば、式Iの化合物)を、T細胞養子免疫伝達療法と組み合わせて使用してもよい。この治療法では、癌細胞を攻撃するためにT細胞に基づく細胞傷害反応を使用する。ARI-4175のアジュバント特性により、腫瘍浸潤リンパ球、またはTILの投与前の前治療として、または養子細胞移入の投与後の治療後処置として、ARI-4175を使用することができるであろう。

20

【0121】

ARI-4175(または複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する他の化合物(例えば、式Iの化合物))の低い毒性により、ARI-4175を、その癌が現在小康状態にある癌患者におけるアジュバントとして使用できる。そのような患者は、再発を避けるために増大した抗腫瘍免疫应答から恩恵を受けるであろう。

30

【0122】

ARI-4175および複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する他の化合物(例えば、式Iの化合物)が、免疫活性を増加させる受容体拮抗薬である、イピリムマブ(Yervoy(登録商標))などのCTLA4阻害剤と相乗的に機能するであろう。CD152としても知られているこのCTLA4(細胞傷害性Tリンパ球抗原4)は、免疫系を下方制御するタンパク質受容体である。ARI-4175または複数の哺乳類DASHセリンプロテアーゼを阻害する他の化合物(例えば、式Iの化合物)は、CD28受容体拮抗薬との組合せで、T細胞の活性を増加させるために類似の様式で機能するであろう。

40

【実施例】

【0123】

本発明をここに一般的に説明してきたが、以下の実施例を参照することにより、本発明はより容易に理解されるであろう。それらの実施例は、本発明の特定の態様および実施の形態を説明する目的のためだけに含まれ、本発明を制限することを意図していない。

【0124】

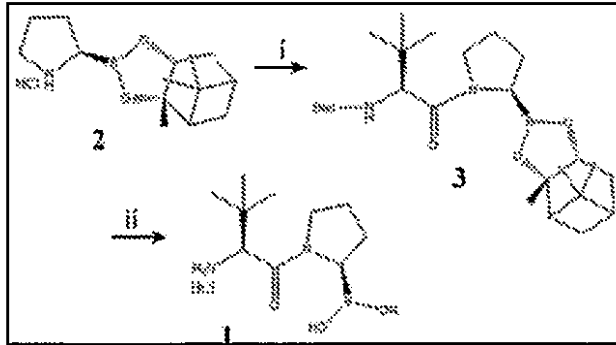
実施例1

論理的説明、化合物の合成、およびRMS腫瘍増殖の阻害

ARI-4175の合成 HATUを使用して、市販のL-boroPro-pn2をN-Boc保護非天然アミノ酸Boc-Tle-OH3(CAS No. 62965-35-9)にカップリングさせて、保護されたジペプチドボロン酸塩Boc-Tle-b

50

oroPro-pnを生成した。両方の保護基をトリクロロボラン (BCl_3) により同時に除去し、その後、逆相 HPLC 精製によって、HCl 塩として所望の生成物 1 (ARI-4175) を生成した。



スキーム1. ARI-4175に関する合成スキーム。
試薬および条件:(i) Boc-L-Tle-OH,
HATU/DIPEA/DMF, (ii) BCl_3

10

【0125】

PT-100の合成 PT-100を先に記載したように、以下の実施例に記載される研究にとって十分な量、合成した。

20

【0126】

ARI-4175は、PT-100の免疫の作用機構における指定標的であるDPP8および9(表1)を含む、DPP-IV様セリンプロテアーゼのナノモル阻害剤である。DPP-IVおよびFAP活性の阻害も、DPP-IVまたはFAP活性の選択的抑止が腫瘍増殖を遅延させるようであるので、PT-100の抗腫瘍効果に寄与するであろう。

【0127】

【表1】

阻害剤	IC_{50}^1 (nM)					
	DPP-IV	DPP8	DPP9	DPP-II	FAP	PREP ^c
PT-100 (Val-boroPro)	0.7	3.6	1.7	8.2	17.0	35.0
ARI-4175 (t-butylGly-boroPro)	1.6	5.1	1.9	88.0	32.0	24.0
50%平均阻害濃度						
² プロリルエンドペプチダーゼ						

30

【0128】

定着RMSを持っているC57BL/6マウスを、腫瘍接種後の10日目にRMS DCワクチンを後肢に筋肉内ワクチン接種した。ここに記載したように、10日目以降、各5日間の3周期について、強制飼養によって、ARI-4175、PT-100またはビヒクルを毎日投与した：ARI-4175、10mg/kg、周期1および5mg/kg、周期2および3；PT-100、1mg/kg、周期1から3。別のマウスの群は、ワクチン接種を受けたが、化合物は受けず、ワクチン接種しなかったマウスの群は、化合物またはビヒクルを受けた。各投与計画において、8匹の複製マウスを治療した。

40

【0129】

図8に示されるように、ARI-4175単独の投与が、腫瘍増殖を著しく遅延させ(図8A)、25日目までに3/8のマウスにおいて腫瘍の退縮を生じた(図9)。ワクチンとの組合せでは、ARI-4175は、6/8のマウスにおいて退縮を生じ(図9)、マウスの生存率を著しく増加させた($P = 0.0045$; 図8B)。対照的に、DCワクチン接種の有無にかかわらず、1mg/kgの用量で投与されたPT-100は、25日

50

目までに腫瘍の退縮（図2）または腫瘍増殖の著しい阻害（図8A）を生じることができず、腫瘍増殖は、PT-100およびワクチンで治療した6匹のマウスの内で2匹でしか減少しなかった（図9）。PT-100の1mg/kgの用量は、C57BL/6マウスにおける腫瘍免疫の活性化にとって最適であることが以前に示されたが、その用量は、PT-100のMTDがC57BL/6マウスにおいて~2mg/kgであるので、それよりずっと多く増加させることができない。したがって、ARI-4175の10/5-mg/kgの用量の著しいワクチンアジュバント効果は、ARI-4175がPT-100よりも毒性が弱いこと、およびより大きい腫瘍退縮およびより高いマウスの生存率を達成するために、ARI-4175の用量を、RMSマウスモデルにおいて耐性用量でPT-100に可能であるよりも増加させられることを示唆している。

10

【0130】

実施例2

RMS DC腫瘍ワクチンモデルにおけるARI-4175の有効性

図17のAは、T細胞供与体およびT細胞受容体の初回刺激のための実験設定を示している。図17のBは、腫瘍体積曲線（平均±標準偏差）および生存率曲線を示している。ARI-4175のみを受けたマウスは、生理食塩水と比べて、著しく小さい腫瘍を有した（n=10、p=0.0019）。ARI-4175+刺激したT細胞受容体は小さい腫瘍を有したが、ARI-4175+ナイーブT細胞受容体と比べると、差は有意ではなかった（n=10、p=0.0755）。10匹のARI-4175+刺激したT細胞受容体の内の8匹は80日目まで生存したが、これは、ARI-4175+ナイーブT細胞受容体の40%の生存率と比べて、有意ではなかった（n=10、p=0.0658）。

20

【0131】

図18のAおよびBは、Rag1^{-/-}受容体におけるARI-4175と養子T細胞移入の併用療法は、RMS M3-9-Mの体積を著しく減少させることを示している。（A）雌のRag1^{-/-}マウスは、腫瘍接種から1日後に、ナイーブまたはRMS感作T細胞を受けた。（B）10日目までに、ARI-4175で治療したマウスは、生理食塩水で治療したマウスよりも、著しく小さい腫瘍を有した（ナイーブ：n=5、p=0.0159；刺激：n=5、p=0.0079）。ARI-4175と組み合わせて腫瘍感作T細胞で治療したRag1^{-/-}マウスは、全体で最も小さい腫瘍を有した。

30

【0132】

ARI-4175は、著しく改善された生存率および減少したRMS M3-9-M体積から分かるように、DCワクチン接種にとって強力なアジュバントである（図19）。図19のAは、DCワクチン接種およびARI-4175治療に関する晩期治療モデルを示している。図19のBは、腫瘍体積曲線（平均+標準偏差）および生存率曲線を示している。ARI-4175で治療した両方の群は、対照と比べて、著しく改善された生存率を有した（偽ワクチン：n=7、p<0.001、DCワクチン：n=7、p<0.001）。ARI-4175およびDCワクチンを使用した併用治療により治療したマウスは、ARI-4175単独で治療したマウスと比べて、著しく小さい腫瘍を有した（n=7、p=0.0481）。

40

【0133】

RMS細胞株は、悪性RMSを高い浸透度で発生させる肝細胞増殖因子/散乱係数（HGF/SF）について遺伝子組換えされたInk4a/Arf^{-/-}マウスに由来した。DCワクチンは、前述したように、骨髄由来DCをRMSから生成したアポトーシス小体とインキュベーションすることによって調製される。腫瘍増殖は、2日に一度、キャリパー測定した。

【0134】

実施例3

IL-1の誘導、並びにAla-boroPro(2243)、Val-boroPro(PT-100、2054)、およびt-BuGly-boroPro(ARI-4175)による腫瘍および

50

所属リンパ節におけるサイトカインおよびケモカインの発現の上方制御

BALB/cマウスにおけるサイトカインアッセイのための方法 雌のBALB/cマウスを、経口強制飼養(PO)および腹腔内(IP)注射により、様々な用量のPT-100またはARI-4175で治療し、血清をケモカインについて分析した(図4、5、および6)。投与後の様々な時点で心穿刺により血液を採取し、ELISAによる分析のために血清を調製した。マウスサイトカインG-CSFおよびマウスCXCL1について、R&D Systems社からのELISAキット(それぞれ、カタログ番号MCS00およびMKC00B)を使用して、これらのサンプルを分析した。全ての測定は二重に行った。アッセイの範囲内の値を得るために、血清サンプルを必要に応じて希釈した。要求される最適な希釈は、検査薬に応じて様々であり、対照サンプルまたは活性を有さない試験薬についての無希釈から、活性の非常に高いサンプルについての1:1000の希釈までに及び得る。肯定応答を生じる試験薬について、最強のシグナルが、CXCL1については、投与後2時間で、G-CSFについては、投与後6時間で観察された。用量反応は、試験薬により異なるが、20µg/マウスの用量が、反応評価のための許容できる基準用量である。典型的に、各時点で各試験薬について、6匹の動物を測定する。

10

【0135】

図4は、BALB/cマウスにおいて、Val-boroPro(2054)は、G-CSFおよびCXCL1/KCを促進したが、Ala-boroPro(2243)は、促進しないことを示している。G-CSFおよびCXCL1/KCは、抗癌免疫増強活性のマーカーである。

20

【0136】

ARI-4175(図5および6における4175-2)は、サイトカインの非常に強力な誘導物質である。G-CSFの促進は、投与から6時間後まで増加した;CXCL1は、投与から3時間後に急激に誘導されたが、6時間までに消失した(図5)。ARI-4175(4175-2)は、G-CSFおよびCXCL1サイトカインを誘導するのに、PT-100(2054)よりも少なくとも5倍強力である(図6)。ARI-4175治療マウスからの血清も、ビヒクルと比べて、IL-18、IL-1 およびIFN-γを増加させたが、G-CSFおよびCXCL1よりもずっと低いレベルでしか増加させなかった。

30

【0137】

PT-100は、担癌マウスに経口投与してから2時間後に、炎症性サイトカインおよびケモカインmRNAの発現を促進する。このPT-100反応は、腫瘍およびリンパ節組織におけるIL-1、G-CSF、IL-6、CXCL1、CXCL9およびCXCL10の上方制御により特徴付けられる。ARI-4175は、IL-17の発生を促進して、インビトロでTh17細胞を産生することが最近分かった(V.Kuchroo、未公表データ)。Th17細胞は、特定の癌における効果的な抗腫瘍免疫に寄与するようである;したがって、IL-17は、RMS-DCワクチン接種マウスへのARI-4175およびPT-100の投与後に調査する、PT-100に対する反応を特徴付けるサイトカイン/ケモカインパネルと共に含まれる。RNA発現は、最適用量での化合物の投与の2時間後に、RMS腫瘍および所属リンパ節組織において分析される。A549肺癌異種移植片を持つマウスにおけるPT-100によるサイトカインおよびケモカインの上方制御を分析するために以前に使用したRT-PCR手法を使用する。cDNAは、Trizol(カリフォルニア州、カールズバッド所在のInvitrogen社)により抽出された全RNAから、iScriptキット(カリフォルニア州、ハーキュリーズ所在のBiorad社)により合成し、水中で1:10に希釈し、2X iQ Sybergreen Supermix(Biorad社)内で10-µMの非標識プライマー対を使用して、サーマルサイクラー(cDNA変性、95 / 15秒;アニーリングおよび伸展、60° / 30秒)内で40周期に亘り増幅した。反応は、HEX、FAMまたはTexas Redで5'標識されたTaqmanプローブおよびブラックホール消光剤(カリフォルニア州、ナヴァト所在のBiosearch Technologies社)で3'標識

40

50

されたTaqmanプローブを使用する。Beacon Designerソフトウェア（カリフォルニア州、パロアルト所在のPremier Biosoft International社）を使用して、サイトカイン/ケモカイン標的mRNAおよび18sRNA基準対照順方向/逆方向プライマー対およびTaqmanプローブを設計する。mRNAコピー数は、サイズ特徴付け基準cDNAに関する標準曲線を使用して、周期閾値から計算される。このcDNAは、マウス組織RNAから合成され、増幅され、電気泳動およびゲル精製キット（カリフォルニア州、バレンシア所在のQiagen社）によって精製され、PicoGreen（カリフォルニア州、カールスバッド所在のInvitrogen社）により定量される。

【0138】

10

図11および12に示されるように、ARI-4175によるマウスの治療で、FcRIII受容体、CD16および脱顆粒マーカーLAMP-1のNK細胞発現が増加した。ヒトNK細胞のインビトロ治療によっても、活性化マーカーのCD69が増加した（図15）。ARI-4175の治療効果は、ある程度は、CD16（FcRIIIA）の発現の上昇およびNK細胞の活性化（CD69の上方制御に基づく）によるADCCの増大によるものであったかもしれない。

【0139】

実施例4

腫瘍退縮および拒絶が生じる、ワクチン接種したマウスの腫瘍再接種による免疫記憶

20

癌の効果的なワクチンには、初期治療に対する臨床反応後に播種性転移または腫瘍再増殖を防ぐことができる免疫記憶を確立するという利点があるであろう。実施例1におけるRMS DCワクチン接種とそれに続くARI-4175またはPT-100治療の後に、筋肉内RMS腫瘍が拒絶されるマウスに、原発性腫瘍の拒絶から少なくとも20~30日後に 10×10^6 のRMS細胞の筋肉内注射によって、再接種を行った。マウスを、どのような追加の治療処置もせず、さらに20~30日間に亘り、二次性腫瘍についてモニタした。保護の免疫学的特異性を明らかにするために、マウスにC57BL/6腫瘍細胞株のEL4（ATCC、TIB-39）も接種する。4匹のマウスの群を免疫記憶について試験した。PT-100治療後の腫瘍特異的記憶を明らかにする同様の実験を記載する。

30

【0140】

図7に示されるように、雌のC57BL/6マウスに、0日目に 1×10^6 のRMS M3-9-Mを筋肉内に接種した。マウスに、3~7、17~21、24~28、および31~35日目に、200 μ gのARI-4175を経口強制飼養した。腫瘍のない生存マウスに、56日目に 5×10^5 のRMS M3-9-Mを再接種し、追加の4175治療を行わずにモニタした。再接種後、RMS M3-9-Mは、全てのマウスにおいて初期の増殖とそれに続く拒絶を示した（ $n = 7$ 、 $p = 0.0175$ ）。

【0141】

実施例5

RMS DCワクチン接種マウスにおける腫瘍特異的CTLの分析

40

実施例1に記載された、RMS DCワクチンおよびARI-4175またはPT-100治療を受けたRMS腫瘍を持つマウスの腫瘍所属リンパ節および脾臓において、CTLを ^{51}Cr -放出試験によって、生体外で分析する。この試験は、EL4腫瘍接種C57BL/6マウスにおいてPT-100により促進された腫瘍特異的CTL反応の測定について先に記載したように行われる。CTLの特異性は、RMS対EL4細胞に対する細胞毒性を比較することによって調査される。

【0142】

実施例6

C57BL/6マウスにおけるARI-4175およびPT-100のMTD

以前、MTD（ $\sim 2 \text{ mg / kg / 日}$ ）を超えた用量でPT-100が投与されたC57

50

B L / 6 マウスにおいて、死亡する前に、明白な毒性の兆候は観察されなかった；したがって、MTDを決定するための端点は、この実験において死亡率であった。毒性の原因を見抜くために、組織病理を調査して、血漿サイトカインおよびケモカインのレベルの用量反応を決定した。サイトカイン/ケモカイン試験を使用して、毒性が、PT - 100の推定作用機構に関連付けられるか否かを決定した。予備実験は、サイトカイン/ケモカインの阻害は、IL - 1 R拮抗薬であるアナキンラと反応し、ラットにおけるPT - 100の毒性を変えず、PT - 100の毒性は、系統サイトカイン/ケモカイン産生によるものではないであろうことを示した。

【0143】

ラット毒性の概要 最大耐量(MTD)研究を行って、Sprague Dawley (登録商標)ラットにおいて、ARI - 4175 (t-BuGly-boroPro) およびPT - 100 (Val-boroPro, ARI - 2054)のMTDを比較した。これらの動物に、皮下注射(SQ)または経口強制飼養(PO)のいずれかにより投与を行った。各投与に、6匹の動物を使用した。血液サンプルを、投与の30分後に尻尾から採血し、これを使用して、血漿薬物濃度を測定した。両方の化合物の出発用量は、0.05 mg/kg体重であり、次いで、各薬物について、用量を増減により調節して、100%の生存率の最大用量を決定した。0.05 mg/kg体重のSQの出発用量で、ARI - 4175およびPT - 100治療の両方とも、最初の24時間以内で少なくとも1匹の動物が死亡した。0.01 mg/kg体重の用量では、SQでは、死には至らず、投与後48時間に亘り悪影響は観察されなかった。第3の実験は、0.025 mg/kg体重の用量で行い、これにより、ARI - 4175の群では1匹が死亡したが、PT - 100の群では死亡しなかった。この研究を、再び0.05 mg/kg体重で開始する経口投与について繰り返した。両方の薬物は明らかに、経口投与によってより許容された。何故ならば、0.05 mg/kgのPOで、この実験においては悪影響は観察されなかったからである。用量を0.1 mg/kgのPOに増やすと、PT - 100の群においては2匹が死亡したが、ARI - 4175には悪影響は観察されなかった。0.25 mg/kgのARI - 4175のPOでは、1匹が死亡した。したがって、SQに観察されたMTDは、PT - 100については0.025 mg/kgであり、ARI - 4175については0.01 mg/kgであった。経口経路では、MTDは、PT - 100については0.05 mg/kgであり、ARI - 4175については0.1 mg/kgであった。血漿薬物濃度の評価は、投与の経路にかかわらず、同等の血漿薬物濃度で毒性結果を示す。毒性は、 100 ± 50 nMの血漿薬物濃度となる薬物の用量について観察される。このデータが図20に纏められている。

【0144】

マウスの毒性血漿対用量の図面 C57BL/6マウスを、5日間に亘り毎日、40 mg/kgまでの様々な用量のARI - 4175および10 mg/kgまでの様々な用量のPT - 100 (ARI - 2054)で経口強制飼養により治療した。5日目に、投与前と、投与の30分後に採血し、血漿薬物濃度をLCMSによって測定した。10 mg/kgの用量での血漿濃度から分かるように、PT - 100の経口利用能は、ARI - 4175のものより3~4倍大きい。血漿濃度は、試験した範囲に亘る用量に対してほぼ比例する。この実験において生存率は100%であったが、全ての群は、5日間の治療期間に亘り著しい体重減少を示した。その結果が図21に示されている。

【0145】

マウスにおける4175のPK 経口強制飼養(PO)により、腹腔内(IP)、皮下(SQ)および静脈内(IV)注射により、薬物の開いた(線状)形態および閉じた(環状)形態の両方で、ARI - 4175の薬物動態学を正常なBALB/cマウスにおいて測定した。この薬物の開いた形態は、pH2で一晩の室温での薬物のインキュベーションによって調製した。閉じた形態は、pH7.4(PBS中)で一晩のインキュベーションによって調製した。開いた(線状)サンプルは、投与前に、PBS中への希釈によって中和した。治療群が下記に列挙されている(表2)。

【 0 1 4 6 】

【 表 2 】

表 2

群	用量	経路	数
1	1 mpk	PO	4
2	1 mpk	IP	4
3	1 mpk	SQ	4
4	0.5 mpk	IV	6

10

【 0 1 4 7 】

I V 群を除いた全ての群について、尾静脈から採血した。I V 注射は尾静脈に行い、したがって、血液は、遠位部位（顎下腺）から採取した。血漿サンプルを調製し、各サンプル中の A R I - 4 1 7 5 の濃度を L C - M S によって測定した。その結果が図 2 2 に示されている。

20

【 0 1 4 8 】

実施例 7

高まる用量の A R I - 4 1 7 5 および P T - 1 0 0 を受けるマウスにおける組織病理の調査

3 匹のマウスの群に、R M S 細胞を筋肉内接種し、実施例 1 において決定した M E D から、実施例 6 において決定した M T D まで増加する用量で強制飼養によって、P T - 1 0 0 および A R I - 4 1 7 5 を投与した。腫瘍の接種後の 1 0 日目から 1 4 日目に、各化合物の 1 回の 5 日周期を与え、1 8 日目に、腫瘍、所属リンパ節、脾臓、肝臓、肺および腎臓の組織の検体をホルマリン中で固定し、パラフィン中に包埋した。試験マウスからの H & E 染色組織切片を、対照マウスの切片と組織学的に比較する。P T - 1 0 0 は、固形腫瘍の白血球浸潤を促進することが示された。腫瘍浸潤は、腫瘍と間質組織の境界で濃縮された好中球により特徴付けられる。A R I - 4 1 7 5 治療マウスからの腫瘍切片を、P T - 1 0 0 治療マウスからの切片と比較することにより、A R I - 4 1 7 5 も腫瘍浸潤を促進させるか否かが決定される。P T - 1 0 0 の毒性が、非腫瘍組織の白血球浸潤から生じ、臓器不全を生じる炎症反応がもたらされる可能性がある。したがって、P T - 1 0 0 および A R I - 4 1 7 5 により治療したマウスにおける白血球の存在について、非腫瘍組織サンプルを調査する。

30

【 0 1 4 9 】

実施例 8

I L - 1 受容体欠損マウスを使用した毒性における全身的なサイトカインの役割の調査

P T - 1 0 0 に対するサイトカイン/ケモカインの反応が、I L - 1 R 1 欠損 B 6 . 1 2 9 S 7 - I 1 1 r 1 ^{tm11mx} / J マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y) において抑止されている；したがって、毒性が全身のサイトカイン/ケモカインの活性のためである場合、M T D は、類似遺伝子型 C 5 7 B L / 6 マウスに対して I L - R 1 突然変異マウスにおいて、著しく増加しているはずである。したがって、血清 G - C S F および C X C L 1 サイトカインの用量反応が E L I S A (S & D S y s t e m s 社) により比較され、B 6 . 1 2 9 S 7 - I 1 1 r 1 ^{tm11mx} / J マウス対 C 5 7 B L / 6 マウスにおいて、A R I - 4 1 7 5 および P T - 1 0 0 の M T D が比較される。M T D は、増加する用量レベルで治療された 3 匹のマウスの群において決定される。G - C S F および C X C L -

40

50

1のレベルは、化合物の投与から3時間後と8時間後でサンプリングされた血清中で決定される。IL-1R1欠損マウスが毒性に耐性がある場合、および実施例6における病理組織学が非腫瘍組織の白血球浸潤を明らかにする場合、IL-1R1欠損マウスおよび十分マウスが病理組織的に比較されて、毒性が臓器機能の炎症性破壊に関連つけられるかが決定される。

【0150】

実施例9

KRAS突然変異結腸直腸癌細胞株におけるARI-4175の見込みがある抗腫瘍作用および免疫作用；ARI-4175のセツキシマブとの併用投与

セツキシマブ(CTX)は、多数の悪性腫瘍における効果的な治療薬である。現行のデータは、突然変異K-rasを有する結腸直腸癌患者の約40%がこの薬から恩恵を受けないことを示している。セツキシマブの抗腫瘍効果の可能な機構は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を通じて媒介される。この研究では、単剤として、またはセツキシマブとの併用で、K-ras突然変異結腸直腸癌異種移植片の治療において、ARI-4175の活性の可能性を調査した。

【0151】

単独で、またはセツキシマブとの併用のARI-4175の効果をインビトロとインビボの両方で評価した。インビトロでは、K-ras突然変異結腸癌細胞株のDLD-1およびHCT-116の増殖を、様々な濃度のARI-4175またはセツキシマブを含有する培地中での3日間の培養後に検出した(図10)。ARI-4175(10nM~2000μM)単独またはセツキシマブとの併用で、細胞培養においてDLD-1またはHCT-116いずれにおいても著しい細胞毒性は示さなかった(図10)。インビボにおいて、DLD-1およびHCT-116異種移植片腫瘍を持つヌードマウスを、対照、ARI-4175単独、セツキシマブ単独およびARI-4175とセツキシマブの4つの群に無作為に分けた。ARI-4175は、100μg、1日1回(q.d)または1日2回(b.i.d)、経口投与し、セツキシマブは、毎週200μgで腹腔内注射した。腫瘍測定は、毎週2回行った。マウスにおいて、DLD-1およびHCT-116腫瘍両方の増殖は、用量依存様式でのARI-4175の投与によって著しく妨げられた(図13Aおよび13B)。ARI-4175のセツキシマブとの併用により、腫瘍サイズはさらに減少したが、おそらく動物の数が少ないために、統計的には有意ではなかった。セツキシマブ単独では、HCT-116異種移植片にどのような治療効果も示さなかったが、DLD-1腫瘍には穏やかな有効性を有した。

【0152】

実施例10

PT-100およびARI-4175の薬物動態プロファイルの比較； 2つの化合物の間の他の違い

図16に示されるように、雌のC57BL/6マウスに 1×10^6 のMB49を皮下で投与した。マウスに3~7および10~14日目に経口強制飼養した。腫瘍体積をキャリパー測定によりモニタした。20μgの用量で、PT-100およびARI-4175の両方とも抗腫瘍活性を誘導した。200μgでのARI-4175の投与で、5匹のマウスの内の5匹において完全な退縮を誘導したのに対し、PT-100は同じ用量で毒性であった。

【0153】

PT-100およびARI-4175の間の化学構造の小さな違いにもかかわらず、これら2つの化合物の薬物動態(PK)プロファイルにおいて予期せぬ大きい違いがある。特に、ARI-4175の毒性はずっと低い。

【0154】

引用

ここに挙げられた米国特許および米国特許出願公開の全ては、引用によりここに含まれる。

10

20

30

40

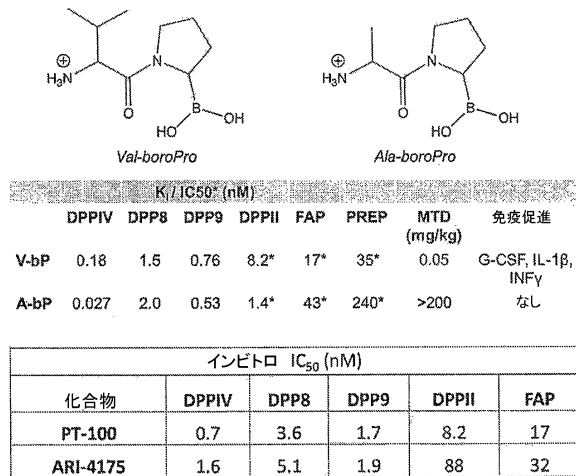
50

【 0 1 5 5 】

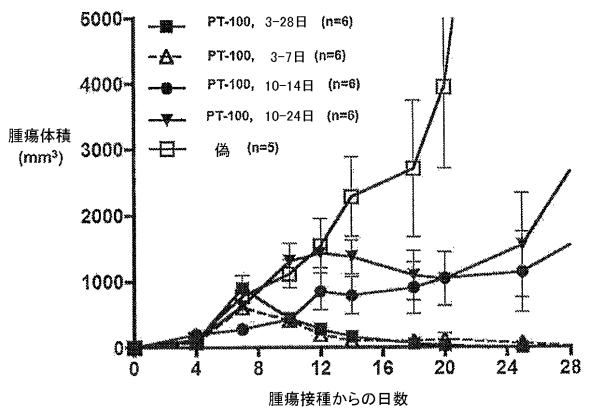
同等物

当業者には、ただの日常的な実験を使用して、ここに記載された本発明の特定の実施の形態に対する多くの同等物を認識する、または説明できるであろう。そのような同等物は、以下の特許請求の範囲により包含されることが意図されている。

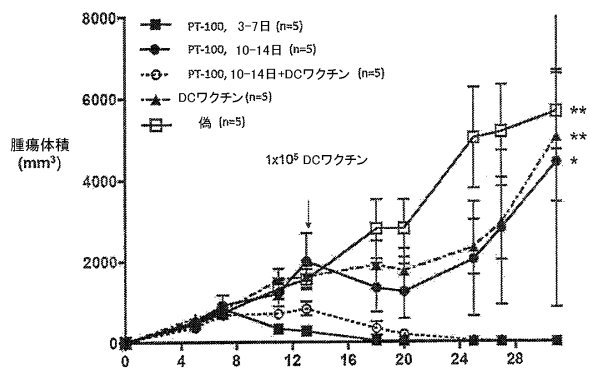
【 図 1 】



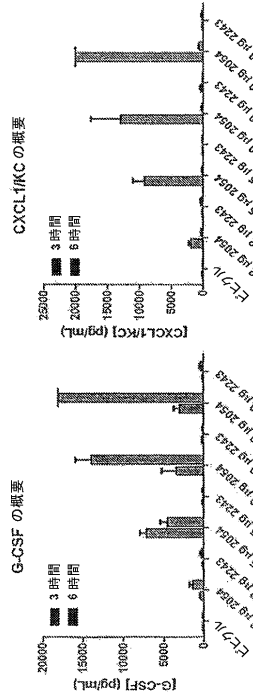
【 図 2 】



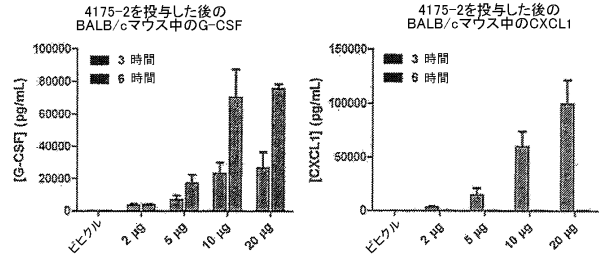
【 図 3 】



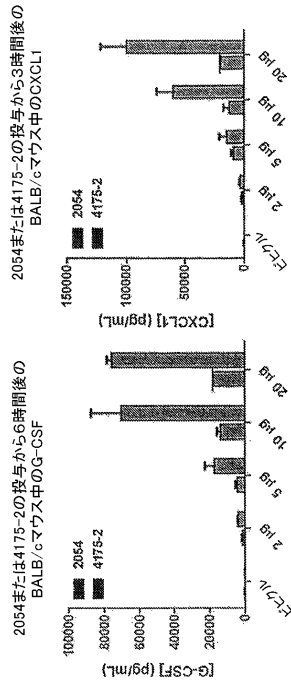
【 図 4 】



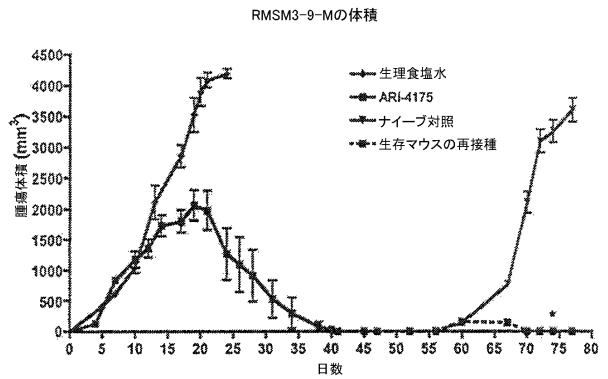
【 図 5 】



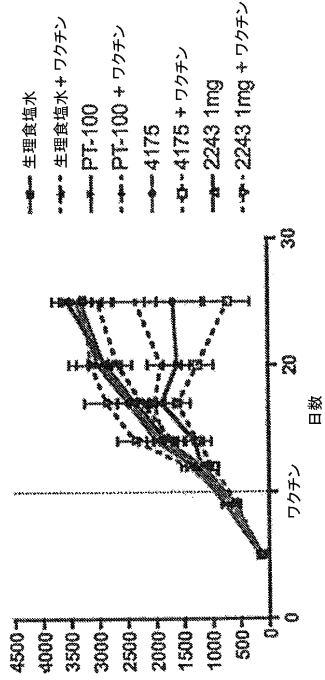
【 図 6 】



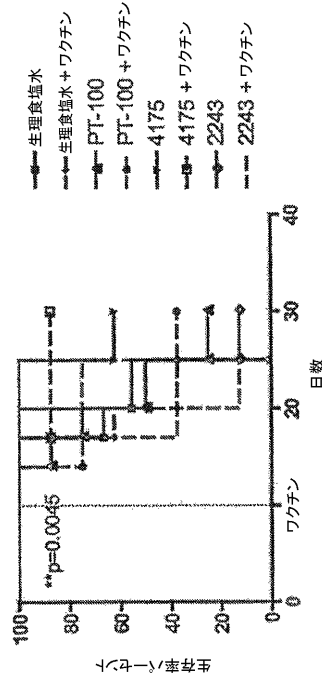
【 図 7 】



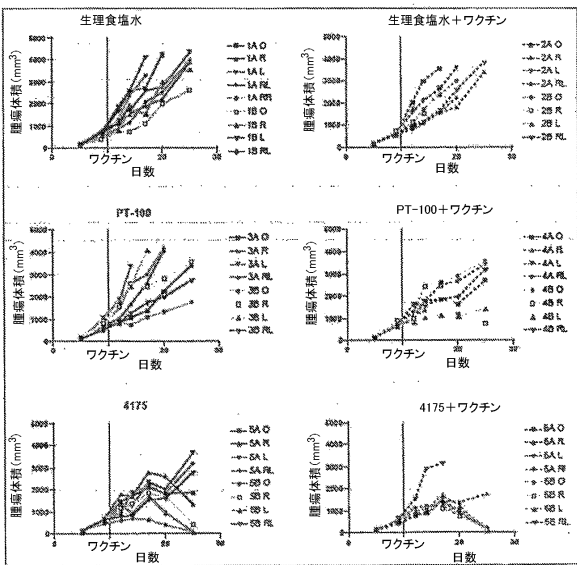
【 図 8 A 】



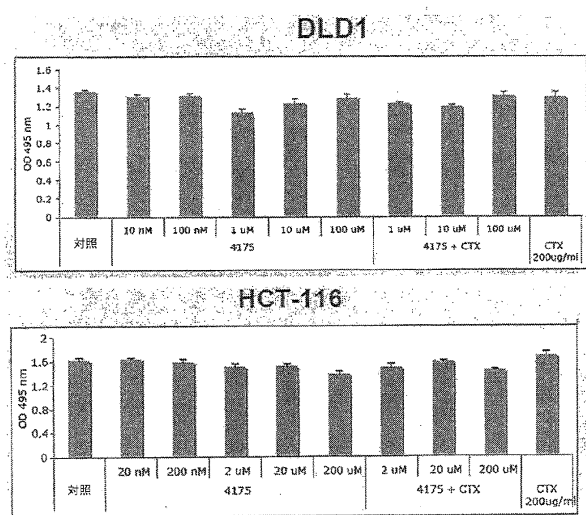
【 図 8 B 】



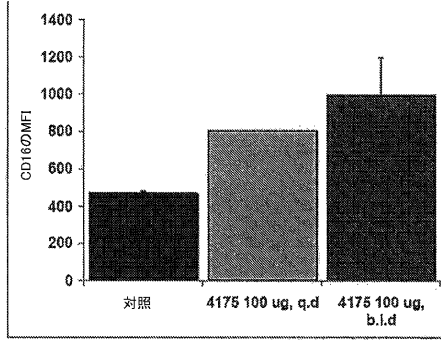
【 図 9 】



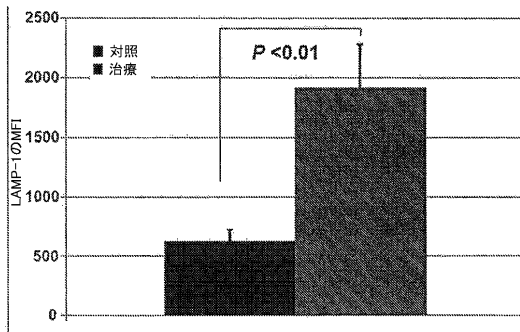
【 図 10 】



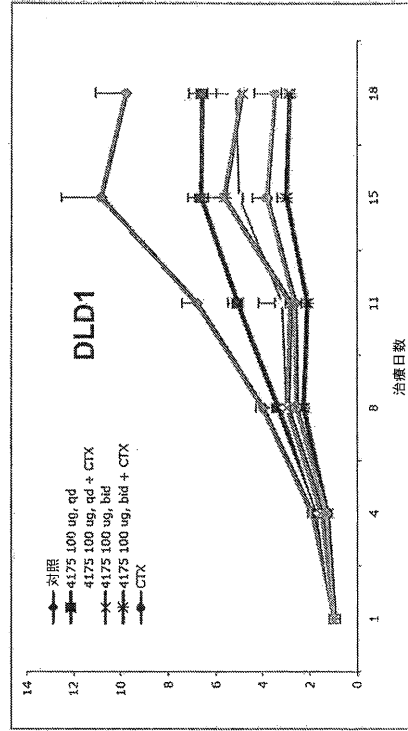
【 図 1 1 】



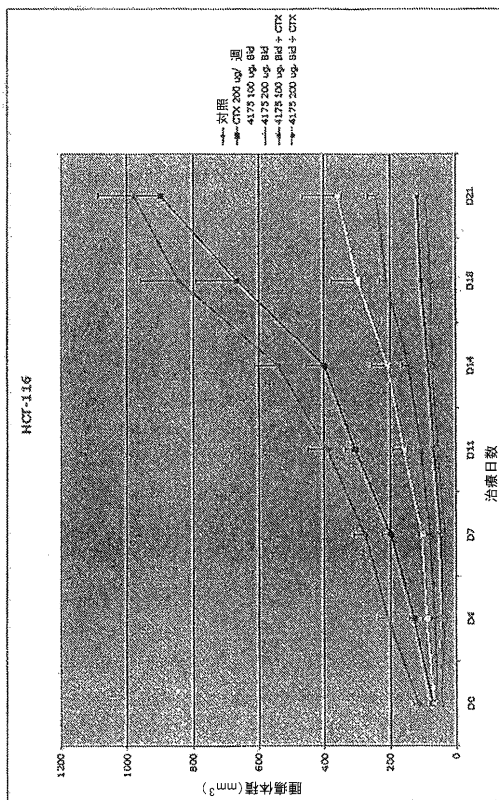
【 図 1 2 】



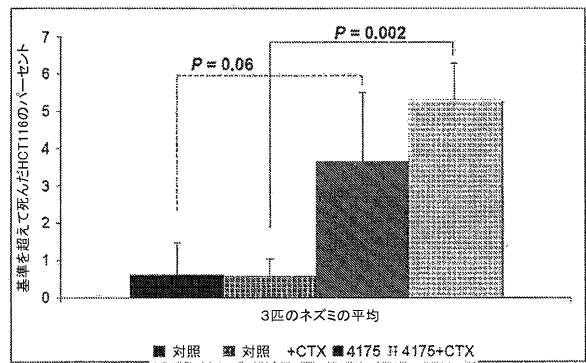
【 図 1 3 A 】



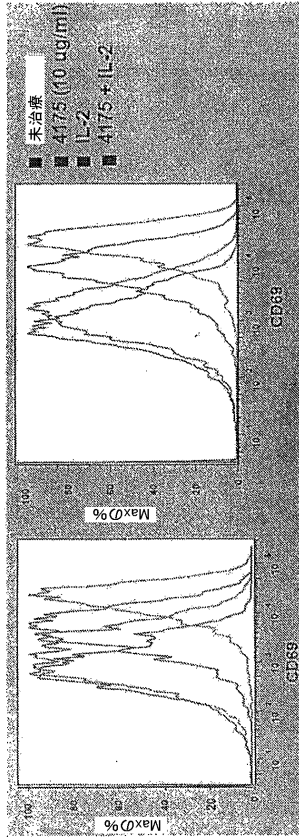
【 図 1 3 B 】



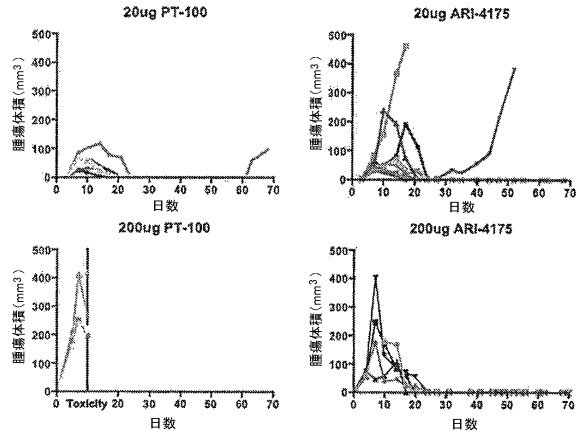
【 図 1 4 】



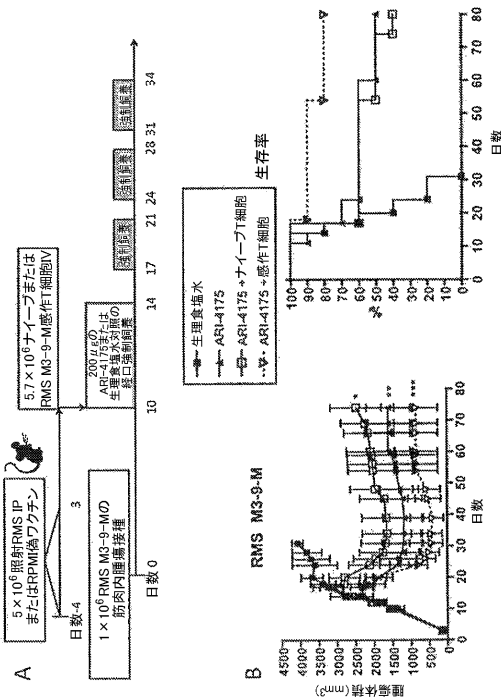
【 図 15 】



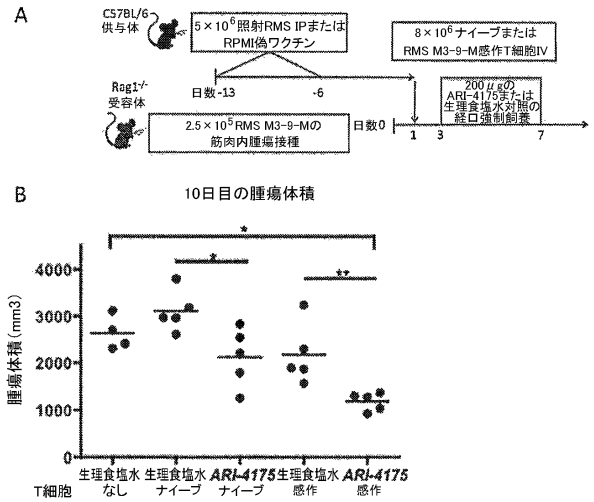
【 図 16 】



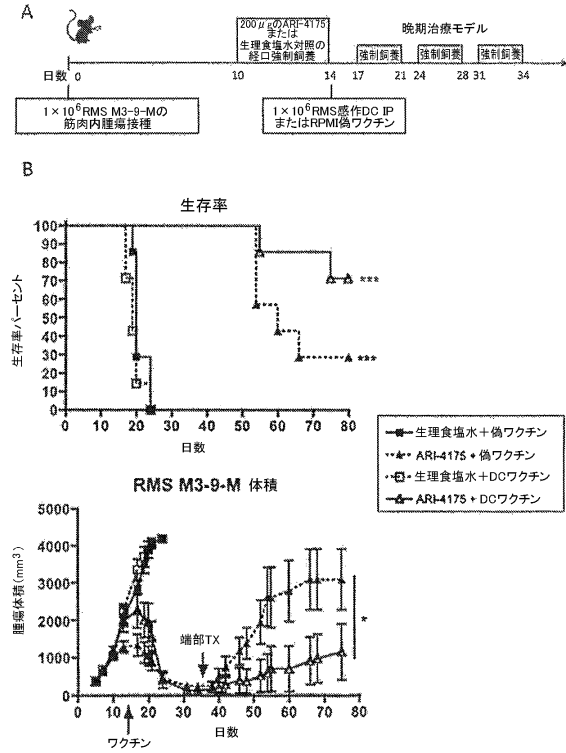
【 図 17 】



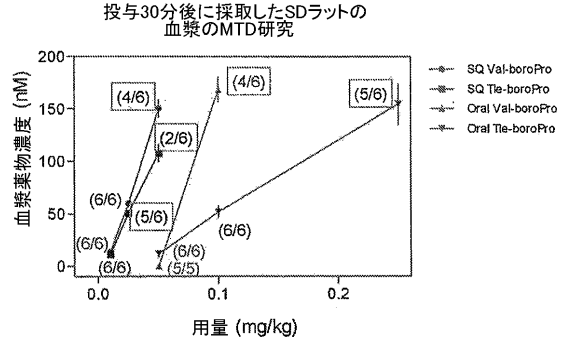
【 図 18 】



【図19】



【図20】

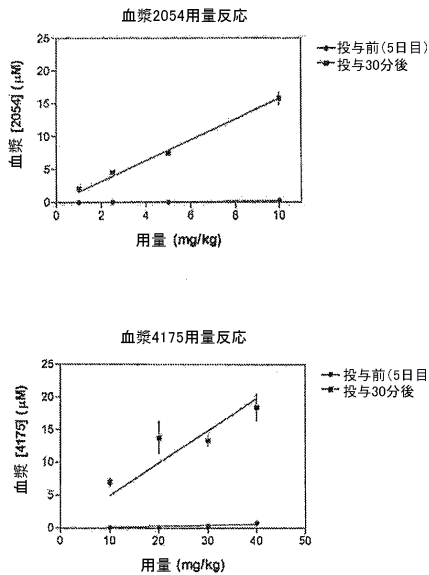


各実験について列挙された生存率 (生存数/群当たりの合計)

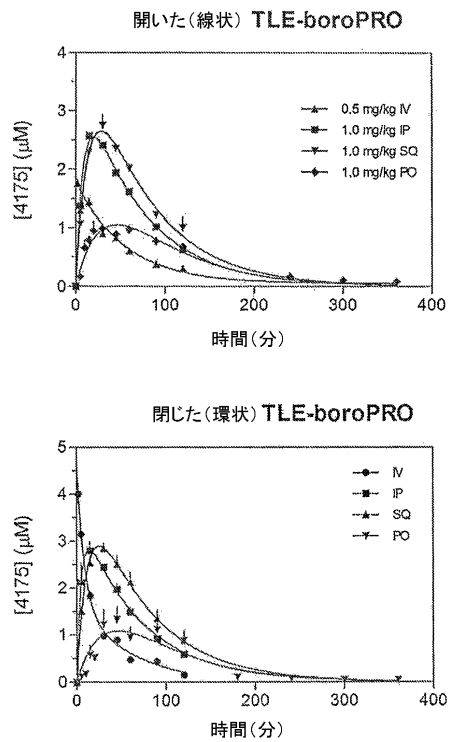
用量 (mg/kg)	薬物濃度 (nM)			
	Val-bPro (SQ)	Tie-bPro (SQ)	Val-bPro (PO)	Tie-bPro (PO)
0.01	13.87 (0.64)	11.11 (0.19)		
0.025	59.58 (2.25)	50.63 (1.41)		
0.05	150.54 (8.49)	107.80 (8.41)	0.45 (0.58)	11.90 (1.82)
0.1			168.44 (11.41)	51.87 (5.30)
0.25				164.74 (19.76)

括弧内は標準誤差

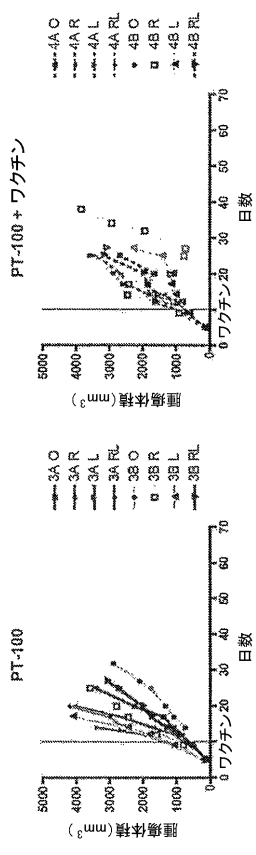
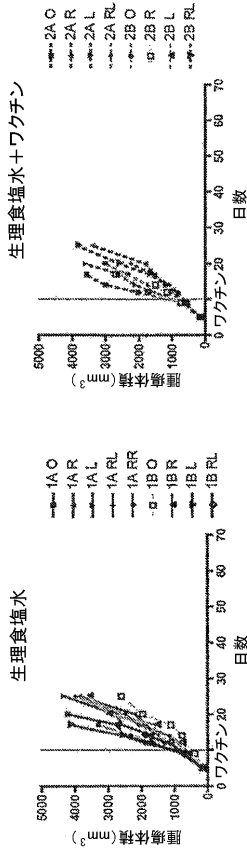
【図21】



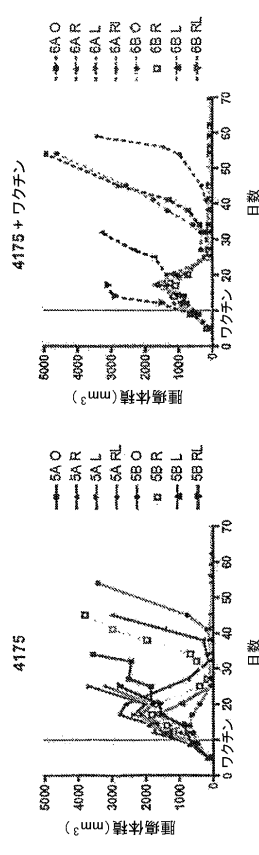
【図22】



【 2 3 - 1 】



【 2 3 - 2 】



フロントページの続き

審査官 岩下 直人

- (56)参考文献 国際公開第2007/123686(WO, A1)
特表2003-500360(JP, A)
Cancer Investigation, 2006年, vol.24, p.553-561
Cancer Research, 2004年, vol.64, p.5471-5480
British Journal of Haematology, 2009年, vol.145, p.775-787
J. Med. Chem., 1996年, vol.39, p.2087-2094

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/39

A61K 39/395

A61P 35/00

A61P 43/00

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