

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7527207号

(P7527207)

(45)発行日 令和6年8月2日(2024.8.2)

(24)登録日 令和6年7月25日(2024.7.25)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N

5/0783

Z N A

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 1 1

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 0 5

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P

31/00

1 7 1

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P

35/00

請求項の数 16 (全112頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-571746(P2020-571746)

(86)(22)出願日 令和1年6月26日(2019.6.26)

(65)公表番号 特表2021-528969(P2021-528969
A)

(43)公表日 令和3年10月28日(2021.10.28)

(86)国際出願番号 PCT/GB2019/051803

(87)国際公開番号 WO2020/002911

(87)国際公開日 令和2年1月2日(2020.1.2)

審査請求日 令和4年6月24日(2022.6.24)

(31)優先権主張番号 1810486.9

(32)優先日 平成30年6月26日(2018.6.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

前置審査

(73)特許権者 519340400

インペリアル・カレッジ・イノベーションズ・リミテッド
IMPERIAL COLLEGE IN
NOVATIONS LIMITED
イギリス、エス・ダブリュ・7 2・エイ・ゼット ロンドン、エキシビション・ロード、インペリアル・カレッジ内、ファカルティ・ビルディング、レベル・1

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(74)代理人 100182305

弁理士 廣田 鉄平

(74)代理人 100096482

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ナチュラルキラー細胞

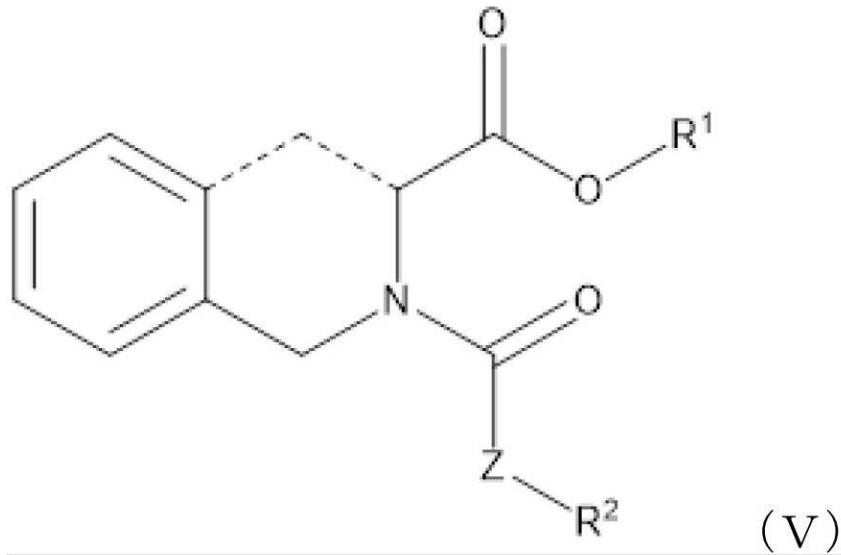
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

NK細胞集団を増殖させるためのエキスピボでの方法であって、

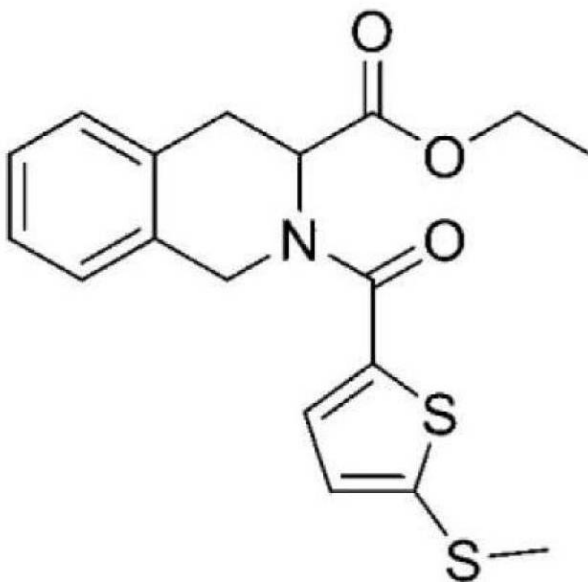
- a) 個体から得られた、造血前駆細胞（HPC）を含む試料を、培養するステップと、
b) 前記試料を、REV-ERBの作用を阻害する化合物に接触させるステップと、
c) 前記細胞をインビトロで増殖させてNK細胞集団を産生させるステップと
を含み、前記化合物が、式（Ⅴ）：

【化 1】



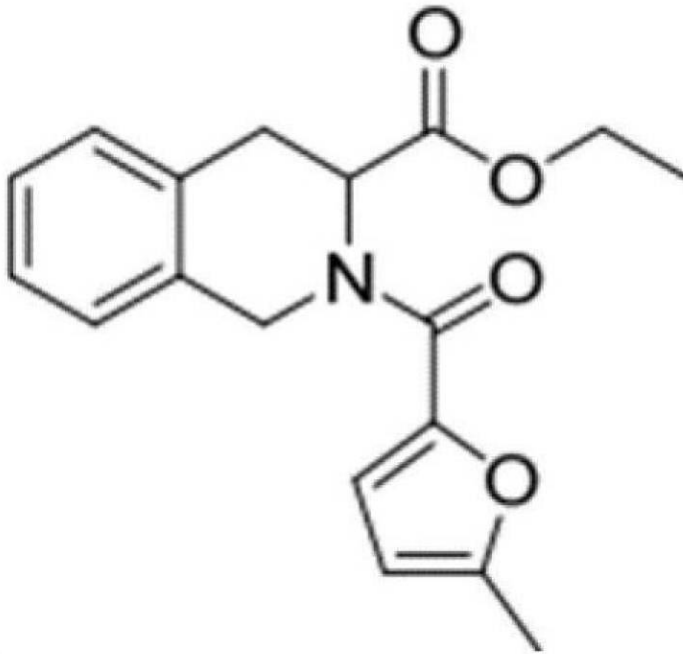
〔式中、-----は、すべて存在する結合又は存在しない結合のいずれかを表し、
 R^1 は、C₁ - 4 アルキルから選択され、
 R^2 は、5 ~ 6 員のヘテロ環、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、ベンズイミ
 ダゾリル、及びアザインドリルから選択される 9 員のヘテロ環、C₁ - 6 アルキル並びにフ
 ェニルから選択され、C₁ - 4 アルキル、及びハロゲンから独立的に選択される 1 又は 2 以
 上の基と置換されていてもよく、
 Z は、-O- 及び -NR' - から選択されるか又は存在せず、
 ただし、Z は -O- 及び -NR' - から選択され、 R^2 が置換されていてもよいフェニルで
 あり、
 R' は、H、及び C₁ - 4 アルキルから選択される〕
 を有するか又は薬学的に許容されるこの塩であり、
 ただし、前記化合物が、

【化 2】



又は

【化 3】

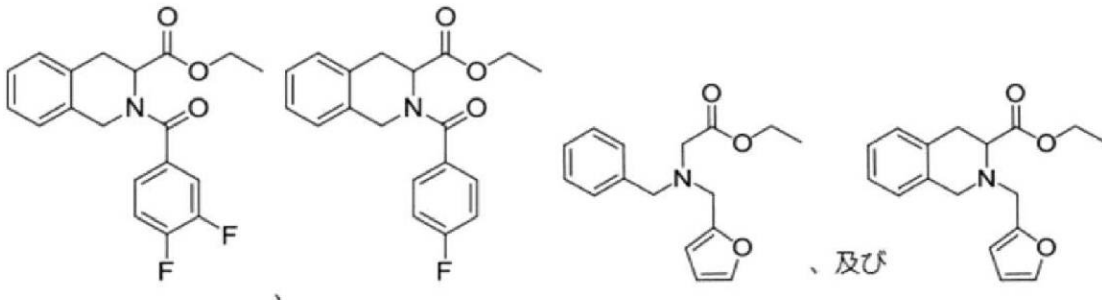


10

20

ではない、あるいは、前記化合物が、

【化 4】



30

から選択されるか又は薬学的に許容されるこの塩である、
前記方法。

【請求項 2】

-----が、すべて存在する結合を表す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

R² が、

(i) 置換されていてもよい、フラニル、チオフェニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、ピロリル、トリアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、及びアザインドリル、及び

40

(ii) 置換されていてもよいフェニル

から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

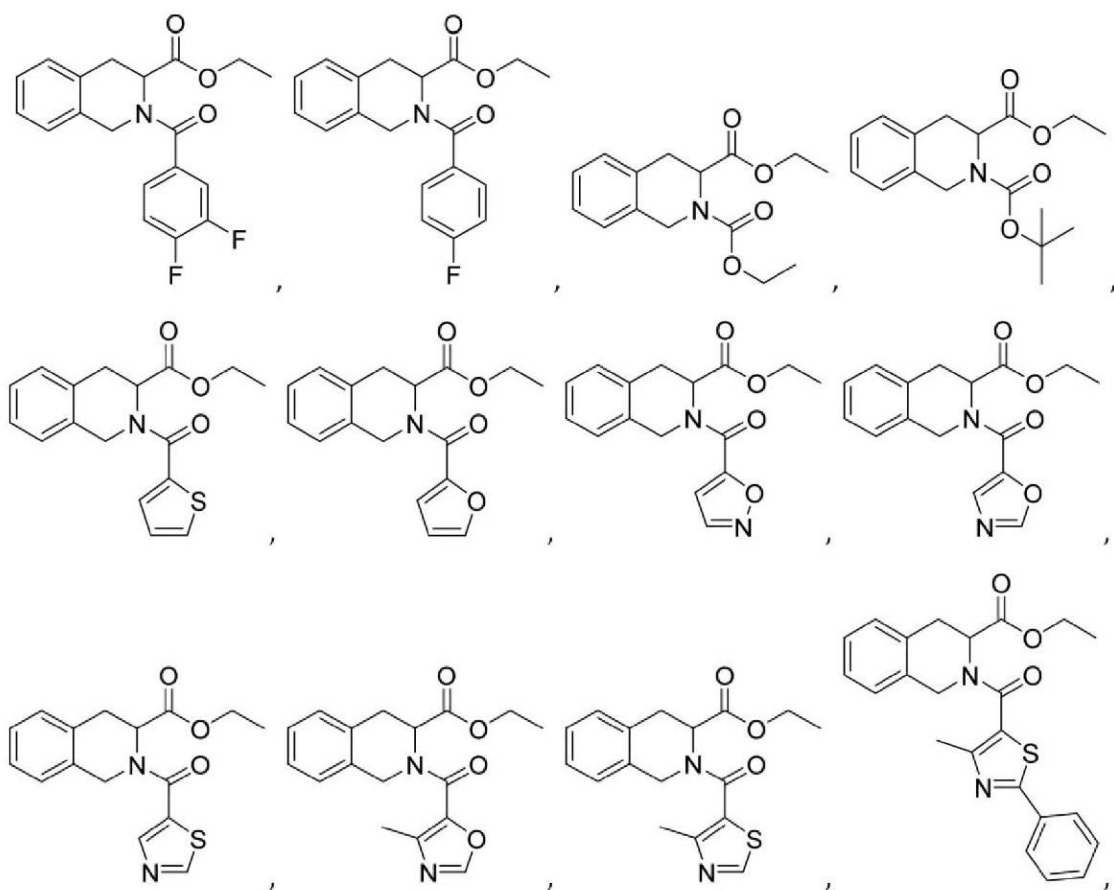
Z が、-O-であるか、若しくは存在しない、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

化合物が、

50

【化 8】



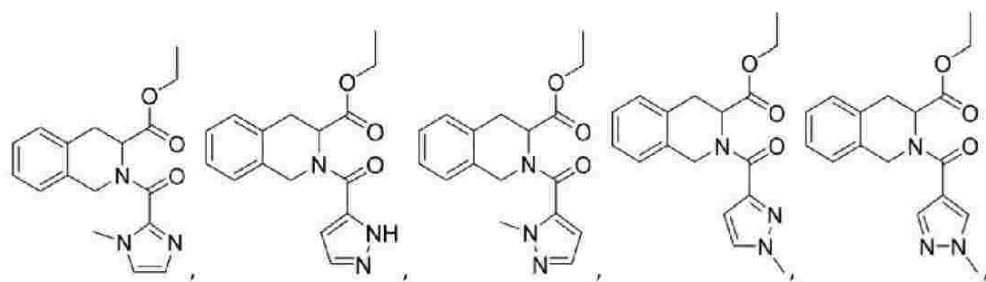
10

20

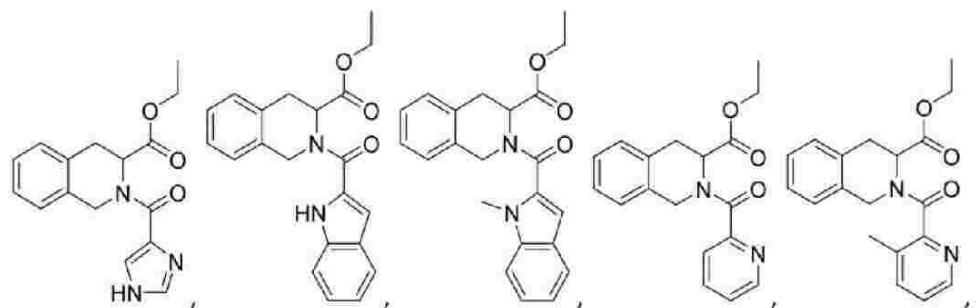
30

40

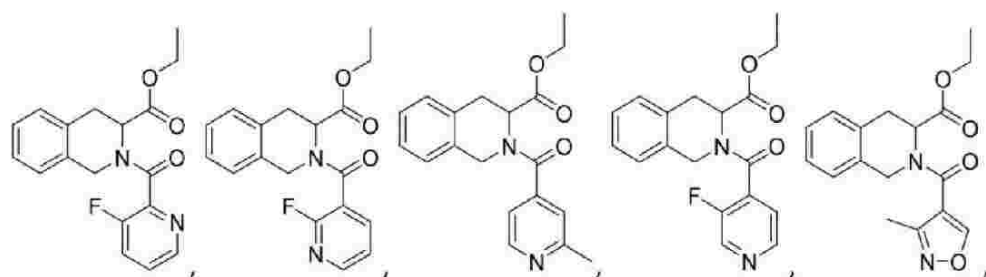
50



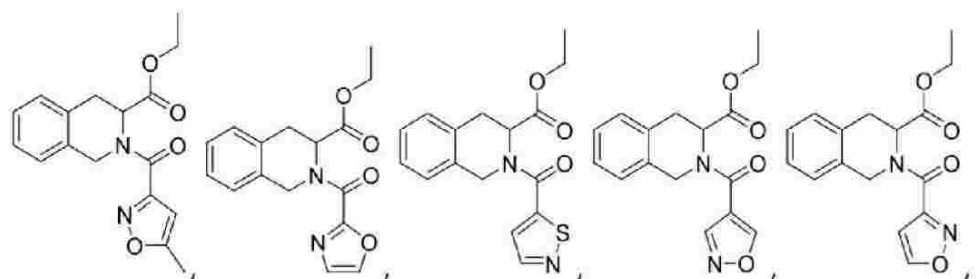
10



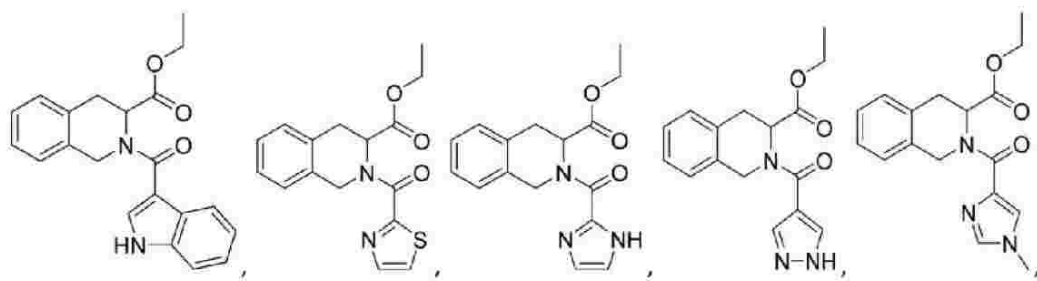
20



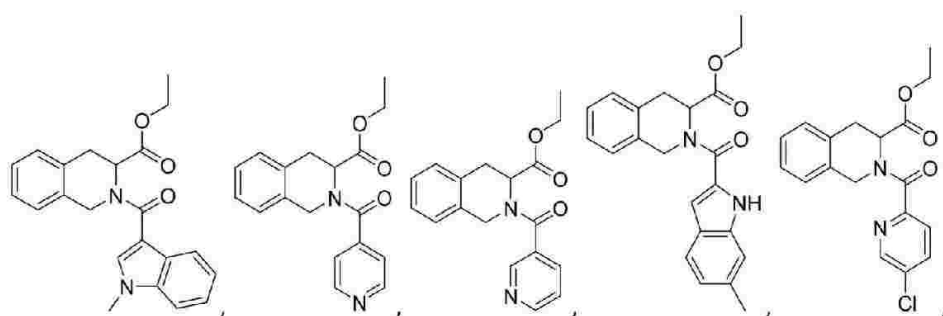
30



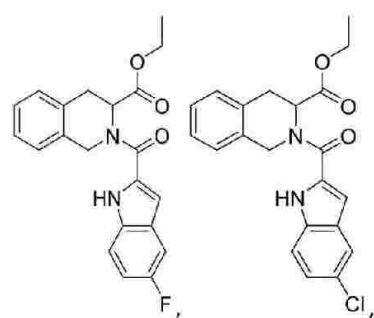
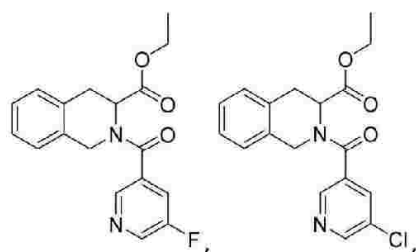
40



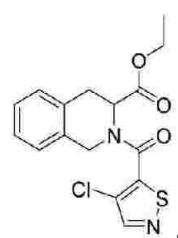
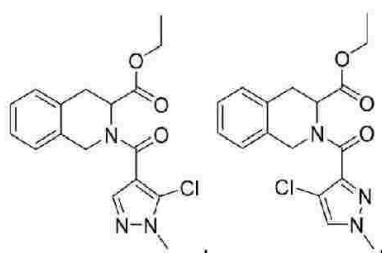
50



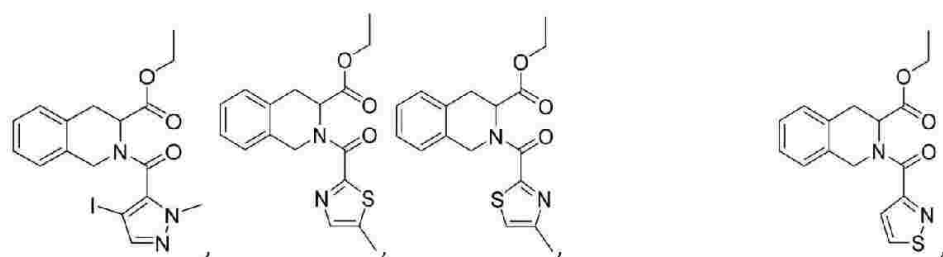
10



20

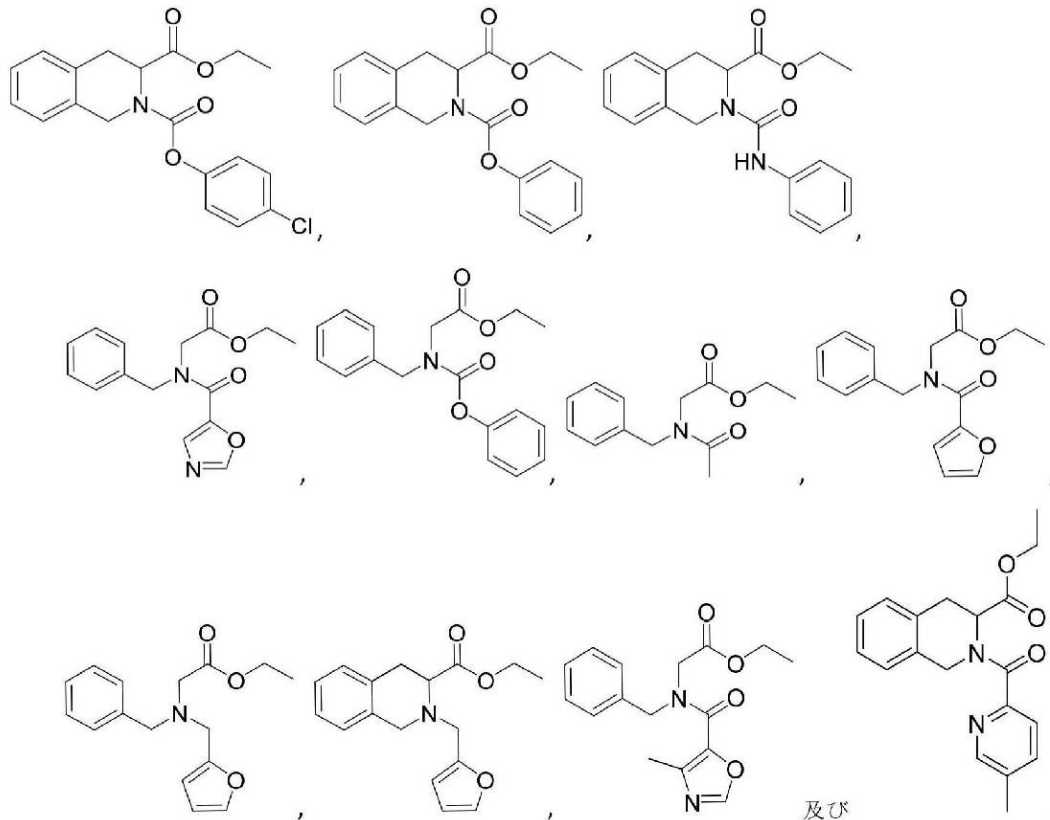


30



40

50



10

20

から選択される式を有する、
請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

化合物が、REV-ERB 活性を低下させることにより E 4 b p 4 発現を増加させる、
請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 7】

化合物が、REV-ERB- α 及び／又は REV-ERB- β の活性を低下させる、
請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

化合物が、REV-ERB アンタゴニストである、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

Notch リガンドの存在下で HPC を培養するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 8
のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

40

(a) Notch リガンドが、デルタ様リガンド 4 (DLL4)、又は DLL4 の機能を
保持するその断片であり、及び／又は

(b) Notch リガンドが、前記 HPC の単離の 4 日後に、又は前記 HPC の単離の 4
日後から存在する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

a) 細胞が、Notch リガンドの存在下で培養するステップの後に IL-15 の存在
下で培養され、並びに／又は

b) HPC が、IL-7、Flt3L 及び／若しくは幹細胞因子 (SCF) と組み合わせた Notch
リガンドの存在下で培養される、

請求項 9 又は 10 に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

H P CをE 4 b p 4の翻訳後修飾の変化を生じる化合物と接触させ、これによりE 4 b p 4活性の上昇を生じるステップをさらに含む、請求項 1 ～ 1 1のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】

H P Cの試料が、骨髓、臍帯血及び／又は末梢血から得られたものである、請求項 1 ～ 1 2のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4】

患者におけるナチュラルキラー（N K）細胞の産生を増加させることによる療法の方法における同時、別々、又は逐次の使用のための混合調製物として、R E V－E R Bの作用を阻害する化合物と、N o t c hリガンドを含む産物であって、前記化合物が、請求項 1 ～ 8のいずれかに定義される化合物である、前記産物。

10

【請求項 1 5】

療法の方法が、

a) がん、感染性疾患（急性又は慢性）、自己免疫疾患又は女性不妊症若しくは妊娠に関連する疾患若しくは障害から選択される疾患又は障害を治療する方法である、又は

b) ウイルス感染症、細菌感染症、プロテスト感染症、真菌感染症及び／又は蠕虫感染症の治療の方法である、請求項 1 4に記載の使用のための産物。

【請求項 1 6】

抗体媒介免疫療法と組み合わせて使用する、請求項 1 4又は 1 5に記載の使用のための産物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、増殖ナチュラルキラー（N K、Natural Killer）細胞集団、それを産生する方法及びその治療上の適用に関する。より具体的には、本発明は、N K細胞産生に関連する特定の転写因子の発現を増加させることによるN K細胞の増殖に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ナチュラルキラー（N K）細胞は、がん性細胞、病原体感染性細胞やその他損傷した細胞に対して細胞傷害性であるため、ナチュラルキラー（N K）細胞への関心は高まってきている。N K細胞は、自然リンパ球系細胞（I L C、innate lymphoid cell）、具体的には大型顆粒細胞傷害性リンパ球であり、これは、免疫応答の自然及び適応アームをつなぐ。このN K細胞は、末梢血中を循環するリンパ球の1 0～1 5 %を作り上げている。N K細胞はまた、免疫系において最も高いレベルの細胞傷害活性を示す。したがって、N K細胞の機能性又は数を変化させると、感染症及びがんに対する免疫系の機能に影響する。例えば、日本における広範な研究では、4 0歳を超える人のコホートにおけるN K細胞レベルの減少が、著しく高いがんの発生率と関連することが示されている。

30

【0 0 0 3】

B細胞及びT細胞と同様に、これらのN K細胞は、リンパ球系共通前駆（C L P、Common Lymphoid Progenitor）細胞に由来し、次いでこれは、造血幹細胞（H S C、Haematopoietic Stem Cell）に由来する。しかし、N K細胞は、特異的細胞表面抗原受容体を欠くためB及びT細胞とは異なる。このため、N K細胞は、がん性細胞及び病原体感染性細胞を事前感作なしに殺傷することが可能であり、これによりN K細胞は、自然免疫応答の一部であるとされる。このN K細胞はまた、適応免疫応答に直接影響することにより腫瘍免疫監視においても重要な役割を有する。

40

【0 0 0 4】

N K細胞を活性化すると、パーフォリン、及びグランザイムを含有する細胞質顆粒の放出が引き起こされる。パーフォリンは重合して、C a 2 +の存在下で標的細胞上に細孔を形成する。グランザイムは、これらの標的細胞内の細孔に入り、D N A断片化及びアポトーシスを引き起こし得る。N K細胞はまた、サイトカインを分泌することができ、これが

50

免疫の適応アームにおいて他の免疫細胞の作用を引き起こす。

【0005】

病原体感染及びがん細胞に対する免疫応答におけるNK細胞の重要性のため、複数の臨床試験において、養子移植プロトコルによるNK細胞の有効性が試験されている。養子移植では、ドナーの血液から単離したNK細胞をエクスピボで増殖させ、健常で機能性のNK細胞に成熟させた後、レシピエントへ輸注する。しかし、効果的とするために、NK細胞ドナーをそのKIR遺伝子型についてスクリーニングすることが重要であり、ここでドナーは、レシピエントに適切なKIR対立遺伝子多型を有し、標的細胞を認識して破壊可能とする必要がある。いずれにしても、増殖させた産物は、臨床的成功率が予想よりも低く、がん性又は感染性細胞を殺傷する能力が低いことが試験により見出された。したがって、現在の養子移植プロトコルに対する重要な障壁が存在する。

10

【0006】

代替的治療法は、内在性NK細胞の数を増加させることである。1つの方法は、NK細胞の発生に必須のサイトカインの投与である。IL-2及びIL-15の投与は、NK細胞の発生を増強することが予想された。IL-2は、NK細胞の増殖及び細胞傷害性を増進させ、一方、IL-15は、NK細胞の発生及び増殖を増進させる。しかし、インビボでの試験では、サイトカインは、非常に高用量であっても、NK細胞の最小限の増殖を刺激して半減期を減少させるのみであることが見出された。さらに、サイトカインを投与すると、免疫応答が不適切に活性化されNK細胞アポトーシスが誘導されるため、全身毒性を生じることが多い。

20

【0007】

したがって、従来方法及び技術を使用すると、大量のNK細胞の産生は、困難であり、高細胞傷害性を有する完全機能性のNK細胞の産生は、より困難である。NK細胞数を選択的に増加させる利用可能な薬物は現在、存在しない。したがって、治療的及び研究的使用のための大量の機能性NK細胞をエクスピボ及びインビボの両方で産生する、NK細胞産生の新規の方法を開発することが求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、がん性、病原体感染性又は損傷した細胞を破壊する免疫系において重要な役割を有する。NK細胞数又は機能性を強化すると、これらの細胞の殺傷が増加すると予想されている。NK細胞養子移植及び内在性NK細胞のサイトカイン増強などの既存の療法は、その有効性の点では非常に成功しているとは言えない。

30

【0009】

NK細胞は、骨髄中のHSCから分化し、リンパ節、脾臓、末梢血、肺及び肝臓を含む、リンパ球系及び非リンパ球系組織にわたって分布する。特定のサイトカイン及び転写因子は、HSCのNK細胞への発生を促すのに必要とされる。各サイトカイン及び転写因子は、正確な時間及び濃度で存在して、HSCからNK細胞への分化を推し進めなければならない。しかし、NK細胞成熟化を支配する、サイトカイン及び転写因子の正確な体系は、未だ完全には理解されていない。

40

【0010】

特に、本発明者らは、Nfil3としても公知の、E4結合タンパク質4（E4bp4、E4 binding protein 4）に着目した。HSCにおけるE4bp4の過剰発現によりインビトロでのNK細胞産生が非常に増強されるため、E4bp4の上方制御は、NK細胞の産生を増加させる有望な戦略である。しかし、転写因子は、その構造及び機能のため、薬物にするのが困難であり得る。例えば、転写因子は、通常、酵素活性又は補助因子結合部位を欠いている。本発明者らは、REV-ERBの作用を阻害すると、NK細胞産生が増加することをこれまでに示した。特に、本発明者らは、REV-ERBアンタゴニストSR8278を使用してREV-ERBの作用を阻害すると、E4bp4発現が増加し、次いで、NK細胞産生が増加することを実証した。REV-ERBの多くの合成リガン

50

ドが、当技術分野において生成されている。しかし、スクリーニングでは、圧倒的多数のこのようなリガンドが、アゴニストとして同定されている（300種を超えて同定されている）。アンタゴニストリガンドSR8278の薬理学的プロファイルは、臨床環境における使用に適しないものである。その上、SR8278の作用機序に関する情報がなく、この分子周辺の適する構造活性相関がないため、他のアンタゴニスト化合物の発見が妨げられている。

【0011】

本発明者らは、ここで、化合物のライブラリーを生成し、いくつかのこのような化合物において、REV-ERB阻害活性が、SR8278と比較して向上したことを実証した。したがって、このような化合物は、NK細胞のエクスピボでの増殖を向上させると同時に薬理学的特性の向上をもたらす可能性を有することにより、臨床適用における使用にさらに適切なものとなっている。また、化合物は、好ましい薬理学的特性、例えば、良好な代謝安定性及び低毒性を示し得る。

【課題を解決するための手段】

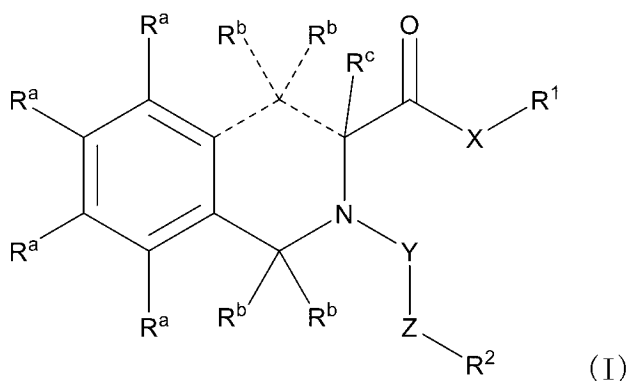
【0012】

したがって、本発明では、NK細胞集団を増殖させるためのエクスピボでの方法であって、

- a) 個体から得られた、造血前駆細胞（HPC、haematopoietic progenitor cell）を含む試料を、培養するステップと、
 - b) 前記試料をREV-ERBの作用を阻害する化合物に接触させるステップと、
 - c) 前記細胞をインビトロで増殖させてNK細胞集団を産生させるステップと
- を含み、前記化合物が、式（I）：

【0013】

【化1】

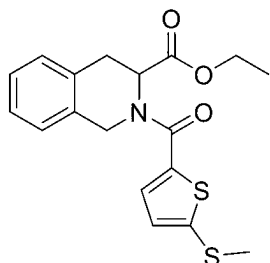


【0014】

〔式中、-----は、すべて存在する結合又は存在しない結合のいずれかを表し、
 R^1 は、 C_{1-6} ヒドロカルビルから選択され、 C_{1-4} ヒドロカルビル、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(OR')$ 、 $-NR_2'$ 、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 $-CF_3$ 及びハロゲンから独立的に選択される1又は2以上の基と置換されていてもよく、
 R^2 は、5～10員のヘテロ環及び C_{1-6} ヒドロカルビルから選択され、 C_{1-4} ヒドロカルビル、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-NR_2'$ 、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 CF_3 及びハロゲンから独立的に選択される1又は2以上の基と置換されていてもよく、
 X は、 $-O-$ 及び $-NR'-$ から選択されるか又は存在せず、
 Y は、 $-C(O)-$ 又は $-CR_2-$ から選択され、

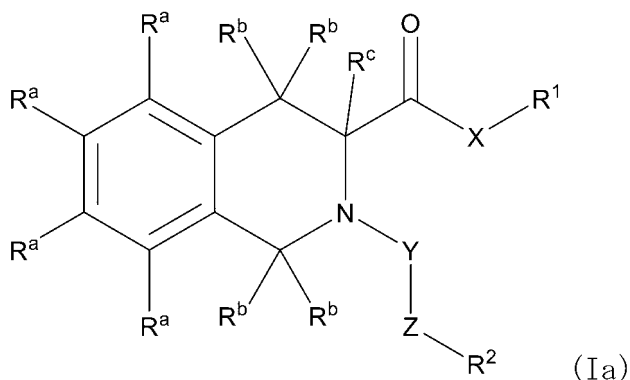
Zは、 $-O-$ 及び $-NR'$ から選択されるか又は存在せず、
 各 R^a は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-NR'_2$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 CF_3 及びハロゲンから独立的选择され、
 各 R^b は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル及び $-OR'$ から独立的选择され、
 R^c は、H及び C_{1-4} ヒドロカルビルから选择され、
 各 R' は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル及び $-Ph$ から独立的选择される]
 を有するか又は薬学的に許容されるこの塩であり、ただし上記化合物が、
 【0015】
 【化2】

10



20

【0016】
 ではない、方法を提供する。
 【0017】
 いくつかの実施形態では、-----は、すべて存在する結合を表し、化合物は、式I
 a :
 【0018】
 【化3】



30

【0019】
 による閉環構造である。
 【0020】

R^1 は、非置換であり、したがって、好ましくは、 C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} アルケニルから選択され、より好ましくは、 R^1 は、 C_{1-6} アルキルから、さらにより好ましくは、 C_{1-4} アルキルから、例えば、メチル、エチル及びプロピルから選択され得る。

【0021】
 R^2 は、(i) 置換されていてもよい5~10員のヘテロ環、好ましくは、置換されていてもよい5~10員のヘテロアリール環であって、5~10員のヘテロアリール環は、好ましくは、置換されていてもよい5、6又は9員のヘテロアリール環であり、5、6又

40

50

は9員のヘテロアリール環は、置換されていてもよい、フラニル、チオフェニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、ピロリル、トリアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル (benzimidazolyl)、アザインドリル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンズイソオキサゾリル (benzisoxazolyl) 及びベンゾオキサゾリルから選択されていてもよい、5～10員のヘテロ環、及び(ii)置換されていてもよいフェニル、好ましくは、置換されているフェニルから選択されてもよく、及び／又は R^2 は、非置換であるか、又は C_{1-4} アルキル、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-NR_2'$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-C(O)NR_2'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 $-CF_3$ 及びハロゲンから独立的に選択される1若しくは2の基と置換され、好ましくは、 R^2 は、非置換であるか、又は $-Me$ 、 $-OMe$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-I$ 及び $-SMe$ から独立的に選択される1若しくは2の基と置換されていてもよい。

【0022】

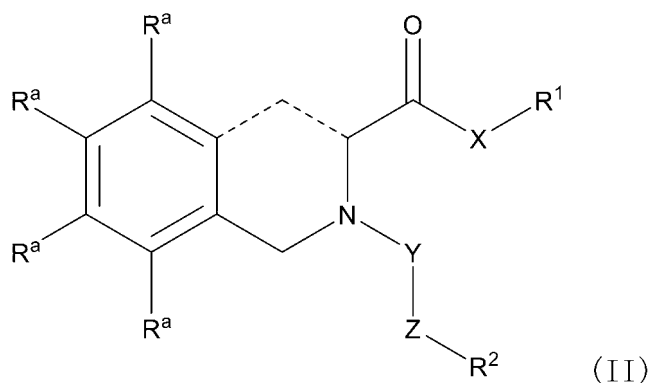
Xは、 $-O-$ であることがあり、Yは、 $-C(O)-$ であることがあり、Zは、 $-O-$ であるか、若しくは存在しないことがあり、好ましくは、Zは、存在しないことがあり、各 R^a は、H、 C_{1-4} アルキル及び $-OR'$ から、好ましくは、H及び C_{1-4} アルキルから独立的に選択されることがあり、より好ましくは、各 R^a は、Hであり、各 R^b は、H及び C_{1-4} アルキルから独立的に選択され、好ましくは、各 R^b は、Hであり、 R^c は、Hであることがあり、並びに／又は各 R' は、H及び C_{1-4} アルキルから、好ましくは、H、メチル及びエチルから、より好ましくは、メチル及びエチルから独立的に選択されることがある。

【0023】

いくつかの好ましい実施形態では、 R^b 及び R^c は、すべてHであり、これにより化合物は、式(II)：

【0024】

【化4】



【0025】

を有し、式中、 R^1 、 R^2 、 R^a 、X、Y及びZは、本明細書に定義される。

【0026】

いくつかの好ましい実施形態では、 R^a はまた、すべてHであり、これにより化合物は、式(III)：

【0027】

10

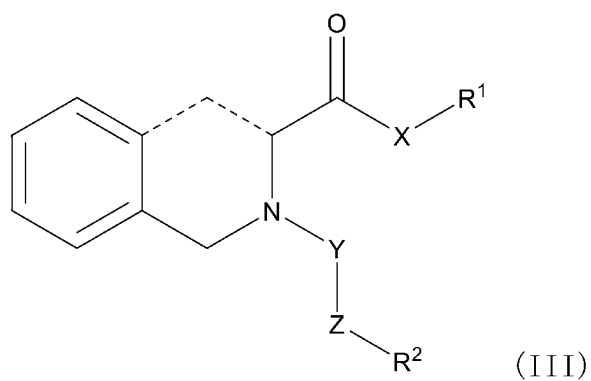
20

30

40

50

【化 5】



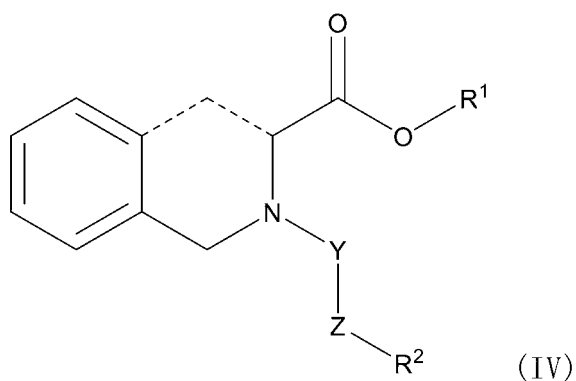
10

【 0 0 2 8 】

を有し、式中、 R^1 、 R^2 、 X 、 Y 及び Z は、本明細書において定義され、
好ましくは、 X は、 O であり、これにより化合物は、式 (IV) :

【 0 0 2 9 】

【化 6】



20

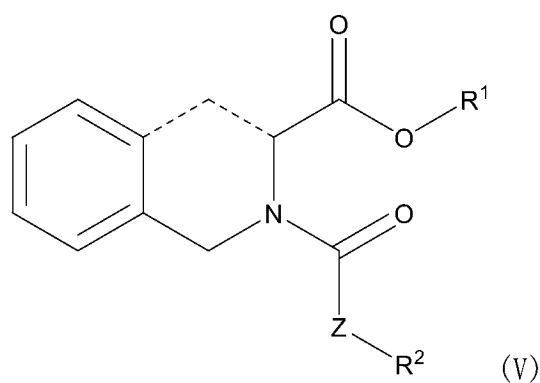
30

【 0 0 3 0 】

を有し、式中、 R^1 、 R^2 、 Y 及び Z は、本明細書において定義され、
より好ましくは、 Y は、 $C(O)$ であり、これにより化合物は、式 (V) :

【 0 0 3 1 】

【化 7】



40

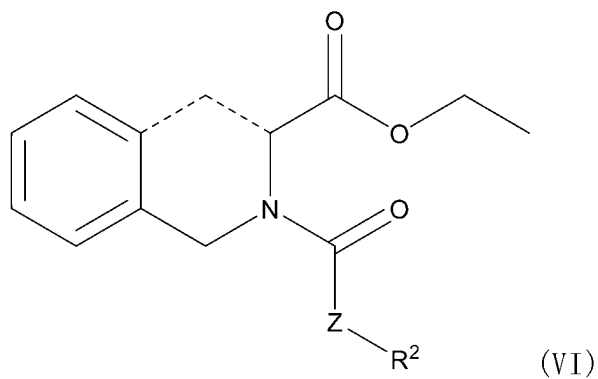
50

【 0 0 3 2 】

を有し、式中、 R^1 、 R^2 及び Z は、本明細書において定義され、
さらにより好ましくは、 R^1 は、エチルであり、これにより化合物は、式 (VI) :

【 0 0 3 3 】

【化 8】



10

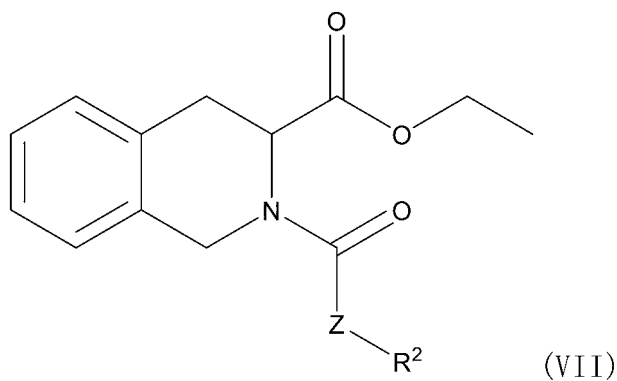
【 0 0 3 4 】

を有し、式中、 R^2 及び Z は、本明細書において定義され、
またさらにより好ましくは、化合物は、式 (VII) :

20

【 0 0 3 5 】

【化 9】



30

【 0 0 3 6 】

を有する閉環構造であり、式中、 R^2 及び Z は、本明細書に定義される。

【 0 0 3 7 】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、化合物は、

40

【 0 0 3 8 】

50

The figure displays 15 chemical structures of novel 2,3-dihydro-1,4-benzodiazepine-5-carboxamide derivatives, arranged in a 4x4 grid with the last row containing only two structures. Each structure is a derivative of the 2,3-dihydro-1,4-benzodiazepine-5-carboxamide core, featuring various substituents on the benzodiazepine ring and the amide group. The structures are labeled with their respective SMILES strings and are separated by commas.

1. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

2. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

3. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

4. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

5. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

6. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

7. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

8. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

9. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

10. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

11. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

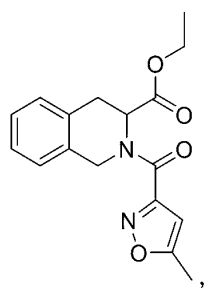
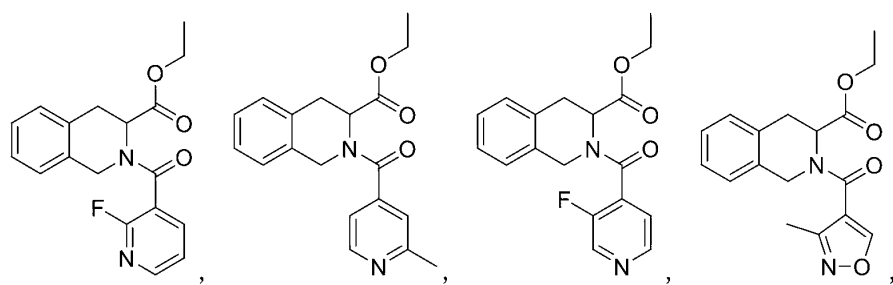
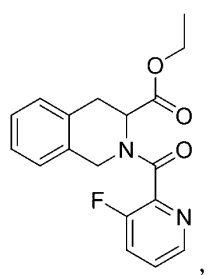
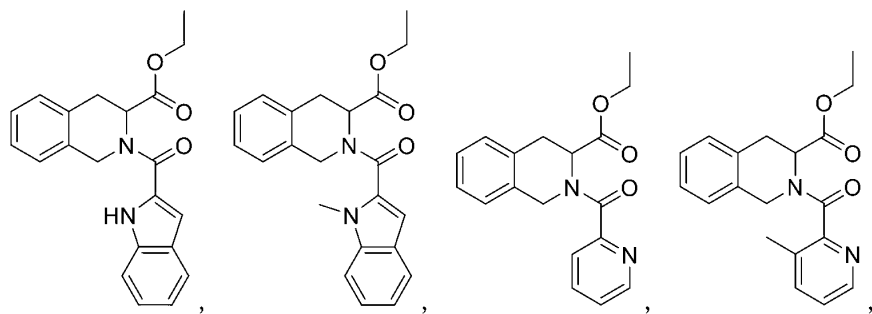
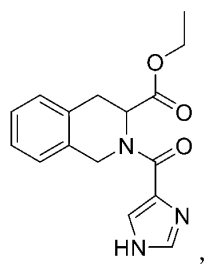
12. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

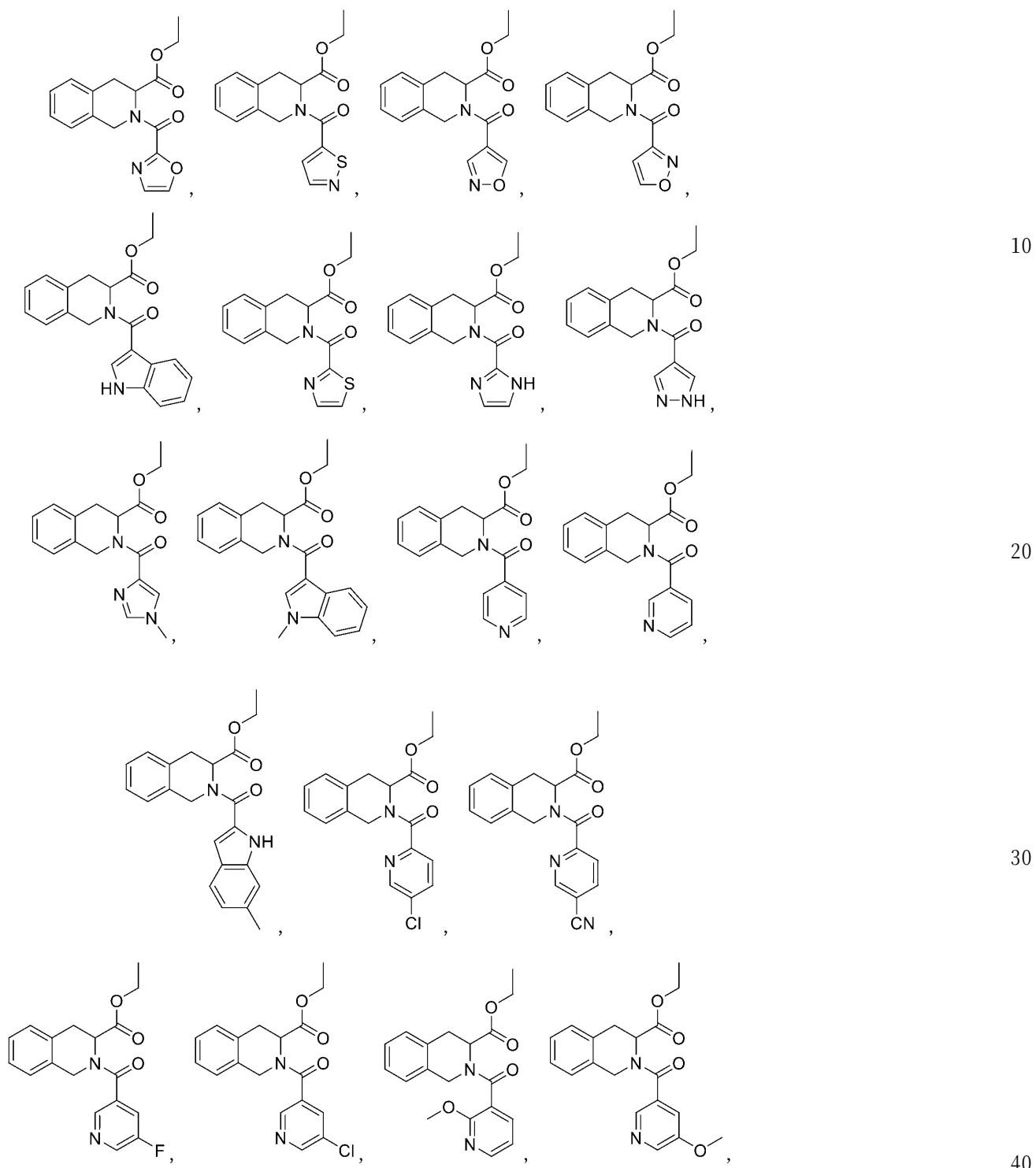
13. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

14. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

15. CCOC(=O)N1C(=O)C2=CC(=CC=C2)C(=C1)C3=CC(=CC=C3)C(=C2)C(=O)N1

40





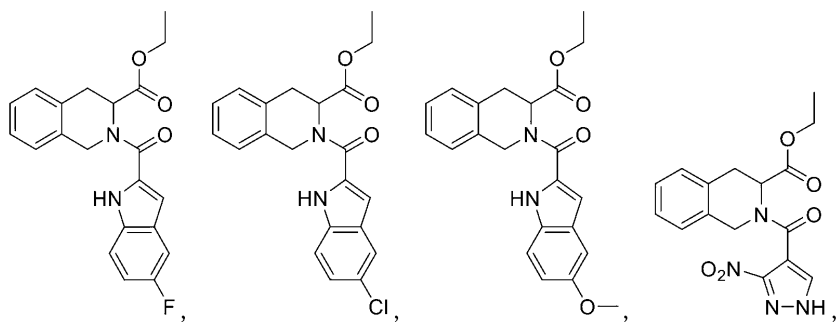
10

20

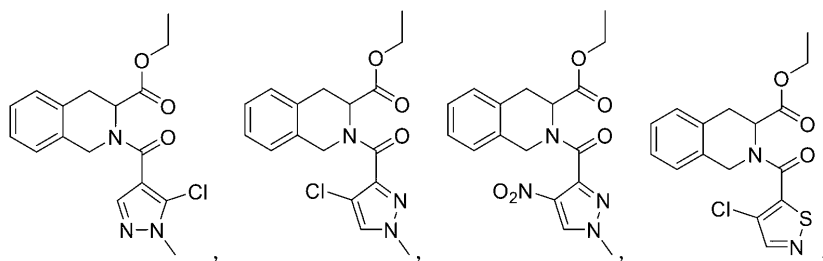
30

40

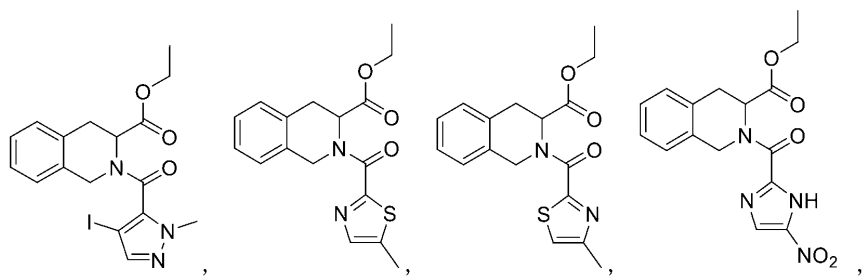
50



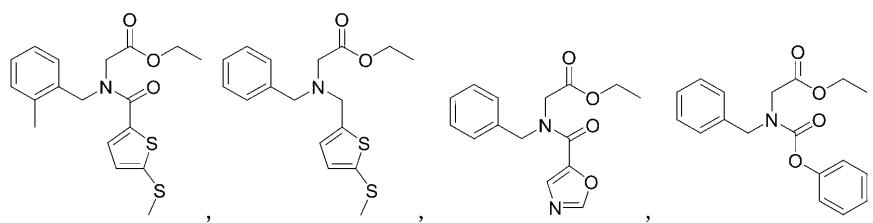
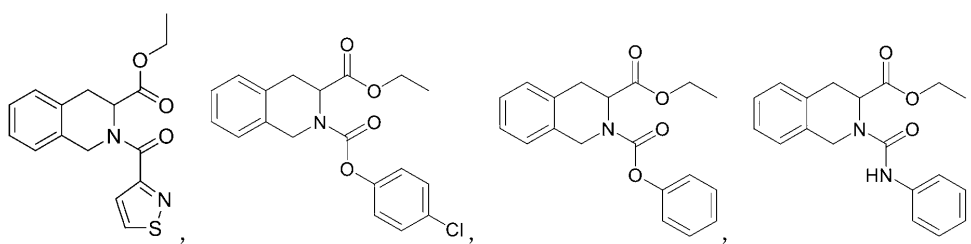
10



20

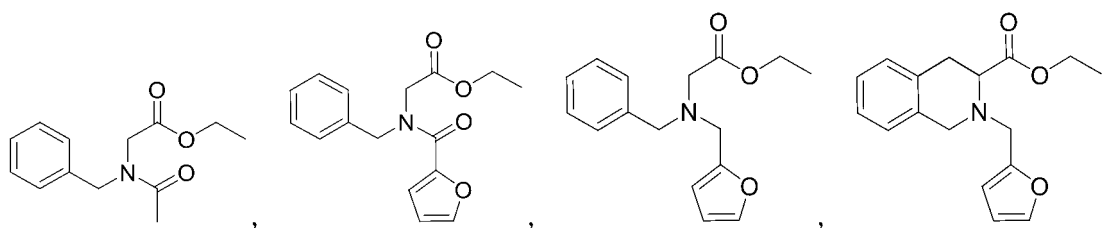


30

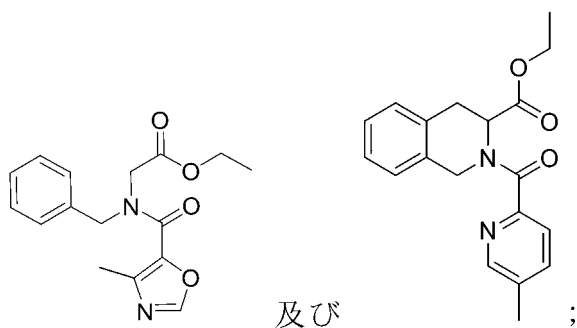


40

50



10



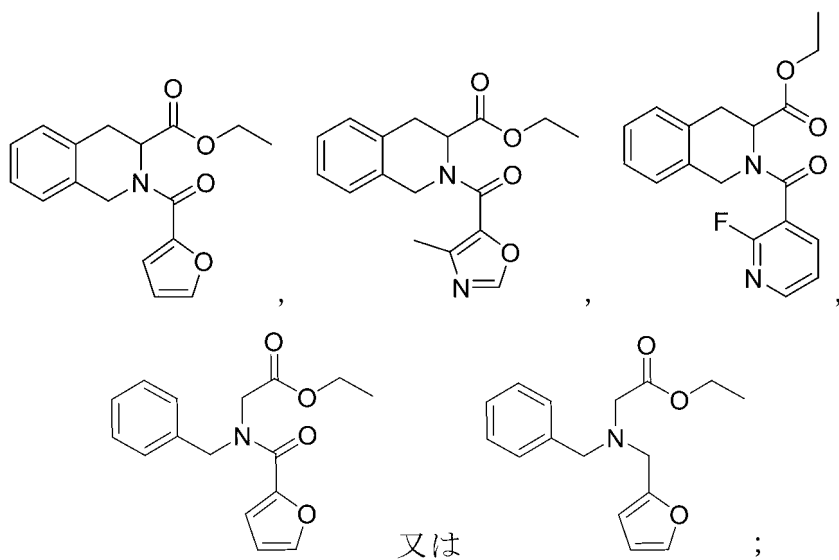
【 0 0 3 9 】

20

から選択される式を有し、好ましくは、化合物は、式：

【 0 0 4 0 】

【 化 1 1 】



30

【 0 0 4 1 】

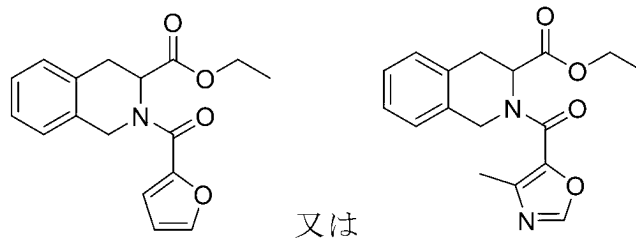
40

を有し、より好ましくは、化合物は、式：

【 0 0 4 2 】

50

【化 1 2】



10

【0043】

を有する。

【0044】

典型的には、前記化合物は、REV-ERB活性を低下させることによりE4bp4発現を増加させる。本発明の方法のいくつかの実施形態では、前記化合物は、REV-ERB- α 及び／又はREV-ERB- β 、好ましくは、REV-ERB- β 、より好ましくは、REV-ERB- α 及びREV-ERB- β の活性を低下させる。いくつかの好ましい実施形態では、前記化合物は、REV-ERBアンタゴニスト、好ましくは、REV-ERB- α 及びREV-ERB- β のアンタゴニストである。

20

【0045】

本発明によれば、前記方法は、Notchリガンドの存在下でHPCを培養するステップをさらに含んでもよく、HPCを培養する容器がNotchリガンドでコーティングされていてもよい。いくつかの実施形態では、(a) Notchリガンドは、デルタ様リガンド4 (DLL4) 又はDLL4の機能を保持するこの断片であり、及び／又は(b) Notchリガンドは、前記HPCの単離後4日に、又は前記HPCの単離後4日から存在する。細胞は、Notchリガンドの存在下で培養するステップの後にIL-15の存在下で培養されることがあり、並びに／又はHPCは、IL-7、Flt3L及び／若しくは幹細胞因子(SCF)と組み合わせたNotchリガンド、好ましくは、IL-7、Flt3L及びSCFと組み合わせたNotchリガンドの存在下で培養されることがあり、細胞をNotchリガンドの存在下で培養するステップ及びIL-15の存在下で培養するステップのいずれか又は両方が、間質支持細胞(stromal support cell)の非存在下で行われていてもよく、好ましくは、両方のステップが、間質支持細胞の非存在下で行われる。

30

【0046】

本発明によれば、方法は、HPCをE4bp4の翻訳後修飾の変化を生じる化合物と接触させ、これによりE4bp4活性の上昇を生じるステップであって、E4bp4の翻訳後修飾の変化が、E4bp4のSUMO化及び／又はリン酸化の減少であってもよく、好ましくは、E4bp4の翻訳後修飾の変化において生じる化合物が、(a) E4bp4の残基K10、K116、K219、K337及び／若しくはK394又はこれらに対応する残基の1若しくは2以上、又はこれらの任意の組合せにおいてSUMO化を減少させ、及び／又は(b) E4bp4の残基S286、S301及び／若しくはS454又はこれらに対応する残基の1若しくは2以上、又はこれらの任意の組合せにおいてリン酸化を減少させる、ステップをさらに含み得る。

40

【0047】

HPCの試料は、骨髓、臍帯血及び／又は末梢血から得ることができる。

【0048】

本発明は、NK細胞の少なくとも85%がCD56⁺及びCD45⁺である、本発明の方法により得られた増殖NK細胞集団をさらに提供する。

【0049】

50

本発明では、本発明の増殖NK細胞集団並びに薬学的に許容される担体、希釈剤及び／又は賦形剤を含む組成物をさらに提供する。

【0050】

また、患者におけるナチュラルキラー（NK）細胞の産生を増加させることによる療法の方法における使用のためのREV-ERB活性の作用を阻害する化合物であって、本明細書に定義する本発明の化合物である、化合物を本発明により提供する。

【0051】

本発明では、患者におけるナチュラルキラー（NK）細胞の産生を増加させることによる療法の方法における同時、別々、又は逐次の使用のための混合調製物として、REV-ERBの作用を阻害する化合物及びNctchリガンドを含む産物であって、前記化合物が、本発明の化合物であり、前記Nctchリガンドが、デルタ様リガンド4（DLL4）又はDLL4の機能を保持するこの断片であってもよい、産物をさらに提供する。本発明によれば、療法の前記方法は、（a）がん、感染性疾患（急性又は慢性）、自己免疫疾患、又は女性の不妊若しくは妊娠と関連する疾患若しくは障害から選択される疾患又は障害を治療する方法、又は（b）ウイルス感染症、細菌感染症、プロテスト感染症（protest infection）、真菌感染症及び／又は蠕虫感染症の治療の方法であり得る。

【0052】

本発明では、本発明による、REV-ERBの作用を阻害する治療有効量の化合物及び任意のNctchリガンドを前記患者に投与するステップを含む、それを必要とする患者におけるNK細胞数を増加させることによる治療の方法であって、好ましくは、Nctchリガンドが、デルタ様リガンド4（DLL4）又はDLL4の機能を保持するこの断片である、方法をさらに提供する。

【0053】

本発明の使用のための化合物若しくは産物、又は本発明の治療の方法は、抗体媒介免疫療法と組み合わせて使用することがあり、前記化合物又は産物は、抗体媒介免疫療法を施す前、同時、又は後の投与用であってもよい。

【0054】

また、本発明では、化合物が、

【0055】

10

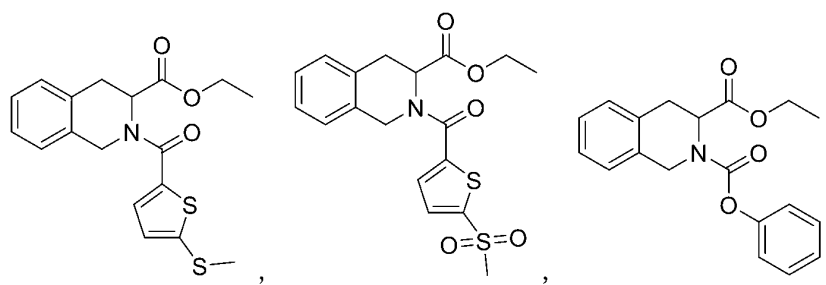
20

30

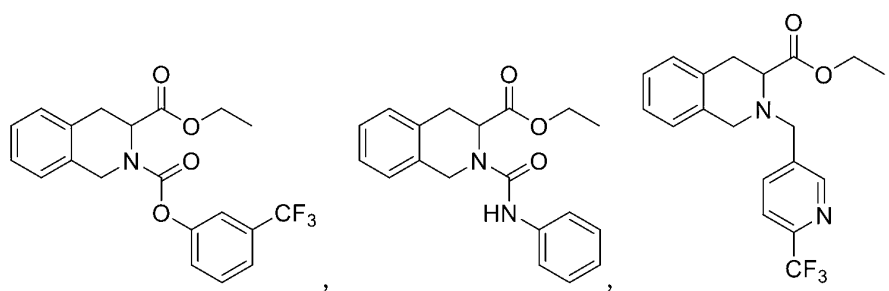
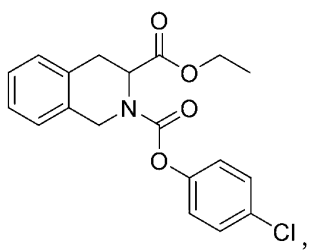
40

50

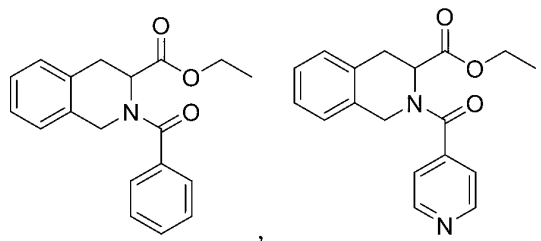
【化 1 3】



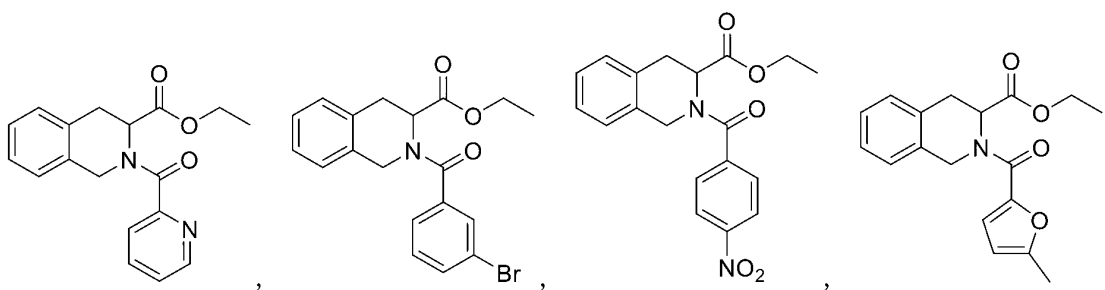
10



20

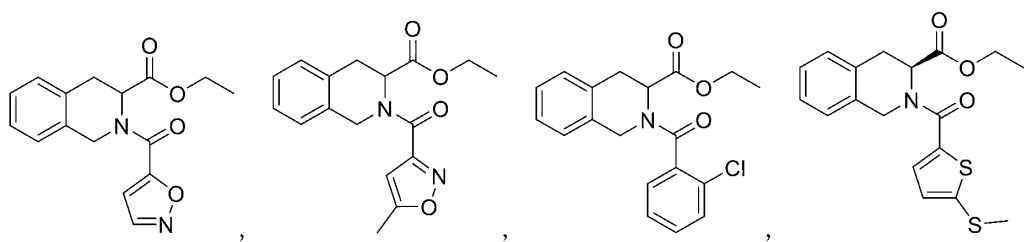


30

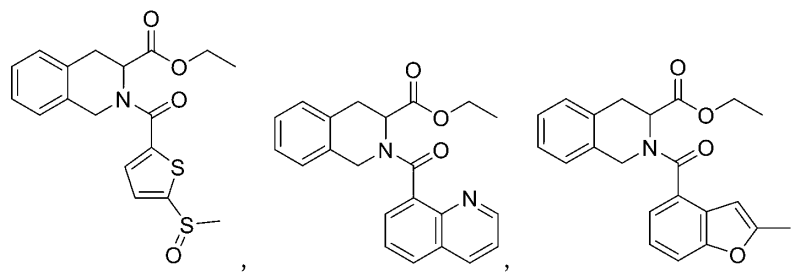


40

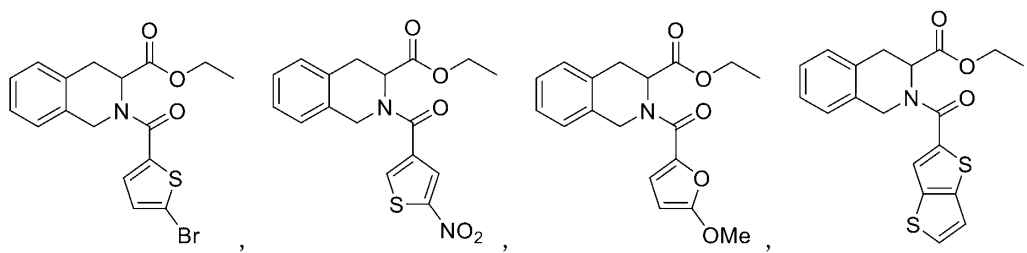
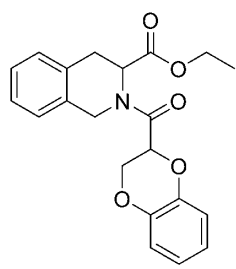
50



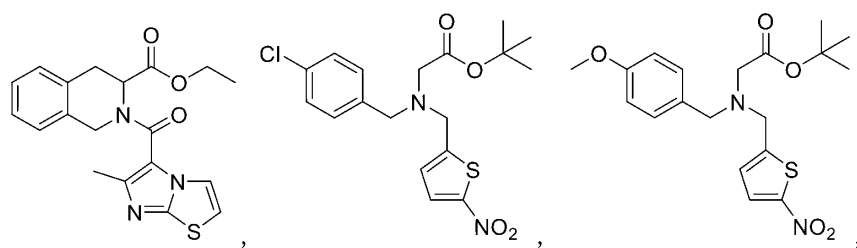
10



20

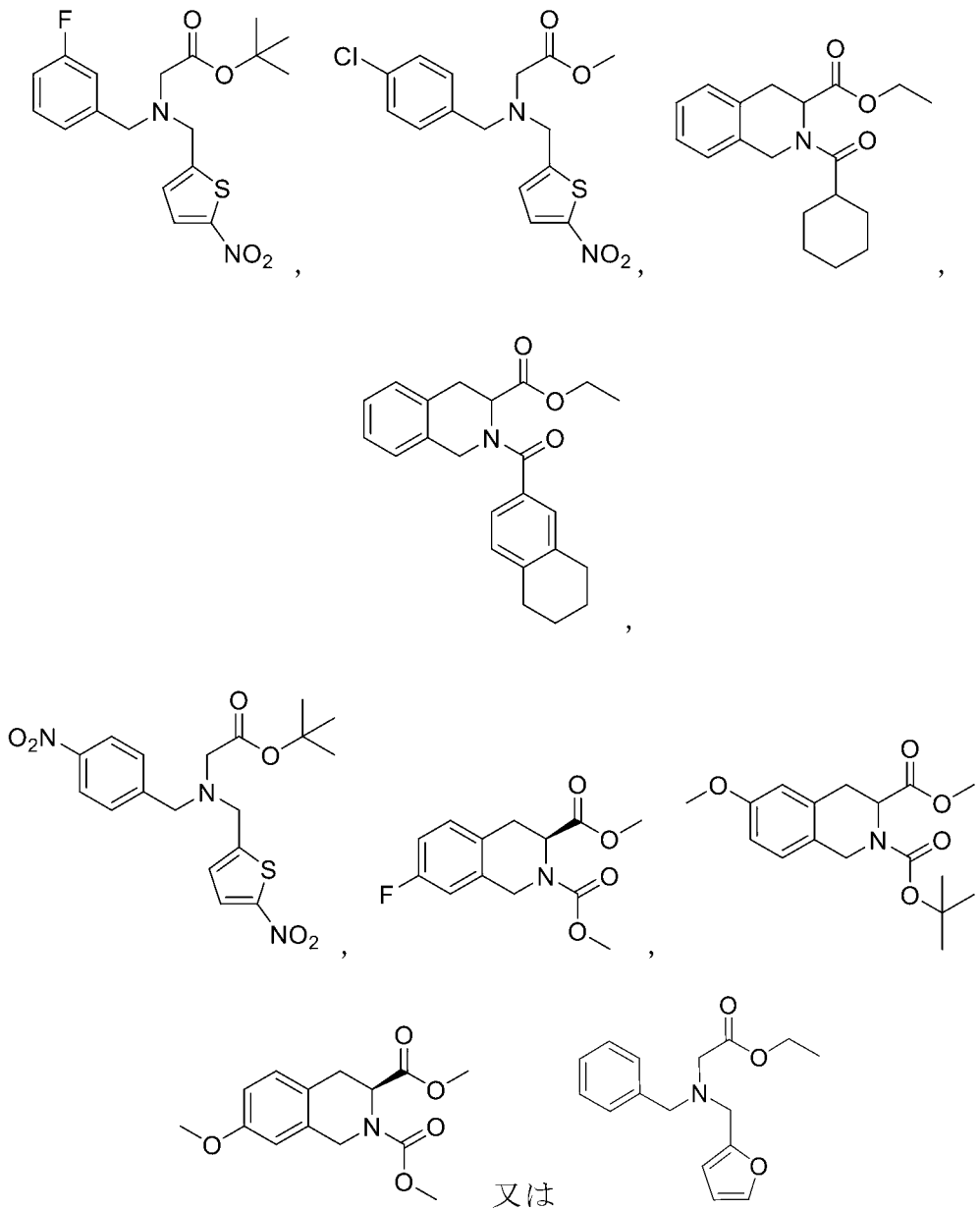


30



40

50



【0056】

ではないという条件で、本明細書に定義する式（I）の化合物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】NK細胞発生経路である。NK細胞は、造血幹細胞（HSC）から分化したものである。NK細胞は、HSCからリンパ球系共通前駆（CLP）細胞、NK前駆（NKP、NK progenitor）細胞、未熟NK（iNK、immature NK）細胞、成熟NK（mNK、mature NK）細胞及び最終的に通常型NK（cNK、conventional NK）細胞に発生し、これらは血中を循環する。経路図の下部は、NK細胞の発生に必要とされる、サイトカイン及び転写因子である。IL-15は、NK細胞の発生に必要とされる主要なサイトカインのうちの1つである。他は、図に示す移行に必要とされる転写因子である。

【図2】（A）例となる1段階NK細胞増殖方法のタイムラインである。HPCは、単離し、Flt3L、IL-7及びSCFサイトカインを加えて培養し得る。次いで2日目に

、これらを、REV-ERB阻害化合物を培養培地に加えたか又は加えず、IL-15サイトカインを加えていてもよいOP9間質細胞に移した。(B) REV-ERB阻害化合物及びNotchリガンドを使用したNK細胞の発生の例となる2段階培養の模式図である。

【図3】新たに生成した化合物のREV-ERB α 活性に対する作用である。ウミシイタケ10 ng、Bmal-luc 100 ng、REV-ERB α 10 ng及びBSM 280 ngを使用した薬物スクリーニングについての2重ルシフェラーゼの結果である。化合物を10 μ Mの濃度で試験した。化合物4、7、8、11及び12は、有意なアンタゴニスト活性を示してBmal-luc発現が増加し、一方、化合物AG1、AG2及びAG5は、アゴニストでありBmal-lucのシグナルが減少する(*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 及び****は $p < 0.0001$)。

10

【図4】新たに生成したさらなる化合物のREV-ERB α 活性に対する作用である。ウミシイタケ10 ng、Bmal-luc 100 ng、REV-ERB α 10 ng及びBSM 280 ngを使用した薬物スクリーニングについての2重ルシフェラーゼの結果である。化合物を10 μ Mの濃度で試験した。化合物72、4、7及び11は、有意なアンタゴニスト活性を示してBmal-luc発現が増加し、一方、化合物AG2は、アゴニストでありBmal-lucのシグナルが減少する(*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 及び***は $p < 0.001$)。

【図5】新たに生成したさらなる化合物のREV-ERB α 活性に対する作用である。ウミシイタケ10 ng、Bmal-luc 100 ng、REV-ERB α 10 ng及びBSM 280 ngを使用した薬物スクリーニングについての2重ルシフェラーゼの結果である。化合物を10 μ Mの濃度で試験した。化合物71~73、4、7及び11は、有意なアンタゴニスト活性を示してBmal-luc発現が増加し、一方、化合物AG2は、アゴニストでありBmal-lucのシグナルが減少する(*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 及び****は $p < 0.0001$)。

20

【図6】新たに生成した化合物のREV-ERB β 活性に対する作用である。ウミシイタケ10 ng、Bmal-luc 100 ng、REV-ERB β 10 ng及びBSM 280 ngを使用した薬物スクリーニングについての2重ルシフェラーゼの結果である。化合物を10 μ Mの濃度で試験した。化合物4は、有意なアンタゴニスト活性を示してBmal-luc発現が増加し、一方、化合物AG2は、アゴニストでありBmal-lucのシグナルが減少する(*は $p < 0.05$ 及び****は $p < 0.0001$)。

30

【図7】新たに生成したさらなる化合物のREV-ERB α 活性に対する作用である。ウミシイタケ10 ng、Bmal-luc 100 ng、REV-ERB α 10 ng及びBSM 280 ngを使用した薬物スクリーニングについての2重ルシフェラーゼの結果である。化合物を10 μ Mの濃度で試験した。化合物4、7、11、27及び28は、有意なアンタゴニスト活性を示してBmal-luc発現が増加し、一方、化合物AG5は、アゴニストでありBmal-lucのシグナルが減少する(*は $p < 0.05$ 、***は $p < 0.001$ 及び****は $p < 0.0001$)。

【図8】新たに生成したさらなる化合物のREV-ERB β 活性に対する作用である。ウミシイタケ10 ng、Bmal-luc 100 ng、REV-ERB β 10 ng及びBSM 280 ngを使用した薬物スクリーニングについての2重ルシフェラーゼの結果である。化合物を10 μ Mの濃度で試験した。化合物18及び19は、アンタゴニスト活性を示してBmal-luc発現が増加し、一方、化合物AG2は、アゴニストでありBmal-lucのシグナルが減少する(****は $p < 0.0001$)。

40

【図9】各アッセイ条件についてのNK細胞の総数を示すNK細胞発生アッセイの結果である。化合物7は、NK細胞数の有意な増加を示し、化合物11についても、SR8278及びアゴニスト化合物AG2と比較して増加が観察される(*は $p < 0.05$)。

【図10】各アッセイ条件についてのNK細胞の総数を示すNK細胞発生アッセイの結果である。化合物7、11及び72は、SR8278及びアゴニスト化合物AG2と比較してNK細胞数の有意な増加を示す(**は $p < 0.01$ 及び***は $p < 0.001$)。

50

【発明を実施するための形態】

【0058】

定義

本明細書において使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上明白に他に指示しない限り複数の参照対象を含む。

【0059】

用語、含むは、「含む」（開放的定義）と「からなる」（閉鎖的定義）の両方を包含する。言い換えれば、実施形態、説明、態様又は開示が列挙する特徴（複数可）を含む場合、本発明はまた、前記特徴（複数可）からなる前記実施形態、説明、態様又は開示を包含する。

10

【0060】

用語「化学的に実現可能な」は、有機構造の一般的に理解される法則に反しない、結合配列又は化合物を意味し、例えば、天然には存在しない5価の炭素原子を特定の状況において含む、特許請求の範囲の定義における構造は、特許請求の範囲内には存在しないことが理解される。本明細書において開示する構造は、これらの実施形態のすべてにおいて、「化学的に実現可能な」構造のみを含むことを意図し、化学的に実現可能ではない、列挙する任意の構造は、例えば、可変の原子又は基によって示す構造により、本明細書において開示することを意図せず、本発明の部分を形成しない。

【0061】

化学構造の「アナログ」は、用語を本明細書において使用する場合、親構造との実質的類似性を保存する化学構造を指すが、これは、親構造から容易には合成的に得られないことがある。親化学構造から容易に合成的に得られる関連化学構造は、「誘導体」と呼ぶ。

20

【0062】

置換基を特定の同一性を有する1又は2以上の原子、又は「結合」であると明示する場合、立体配置は、置換基が、化学的に実現可能な結合配置において特定の置換基に直接隣接した基が相互に直接結合する「結合」である場合を指す。

【0063】

特定の立体化学又は異性体形態を特に指示しない限り、キラル、ジアステレオマー、ラセミの形態のすべての構造を意図する。本発明において使用する化合物は、描写から明らかであるように、任意又はすべての不斉原子に濃縮又は分解した光学異性体を任意の濃縮度で含み得る。ラセミとジアステレオマーの両方の混合物並びに個々の光学異性体は、エナンチオマー又はジアステレオマーのこれらのパートナーを実質的に含まないように単離又は合成することができ、これらはすべて本発明の範囲内に存在する。

30

【0064】

本明細書において使用する場合、用語「安定化合物」及び「安定構造」は、反応混合物から有用な純度までの単離及び効果的な治療薬への製剤化に耐えるのに十分に頑強な化合物を示すことを意味する。安定化合物のみを本明細書において検討する。

【0065】

当技術分野において周知のような化学基の一般的略称を使用し、例えば、Me = メチル、Et = エチル、i-Pr = イソプロピル、Bu = ブチル、t-Bu = tert-ブチル、Ph = フェニル、Bn = ベンジル、Ac = アセチル、Bz = ベンゾイル等である。

40

【0066】

基を列挙する場合、例えば、カルボキサミド基 $C(=O)NR$ のように、基が、構造において2以上の配向で存在して、2以上の分子構造を生じる得るとき、分子構造における基の配向を文脈上明白に制限しない限り、例えば、 $X-C(=O)N(R)-Y$ 又は $X-N(R)C(=O)-Y$ のように、基は、可能な任意の配向で存在し得ることが理解される。

【0067】

ヒドロカルビル基は、炭素及び水素のみからなる基であるが、本明細書に定義するように、基は1又は2以上の回数、置換し得る。ヒドロカルビル基は、直鎖及び分枝状の基を

50

含む。式（I）の化合物は、炭素原子1～6、特に、炭素原子1～4又は炭素原子1～3を有するヒドロカルビル基を典型的に有する。本明細書において使用する場合、用語「ヒドロカルビル」は、芳香族及び非芳香族の基を包含する。好ましいヒドロカルビル基は、アルキル、アルケニル及びアルキニル基を含み、これらは以下にさらに記載する。

【0068】

アルキル基は、炭素原子1～約20、典型的には、炭素原子1～12、炭素原子1～8、炭素原子1～6を有する、直鎖及び分枝状のアルキル基及びシクロアルキル基を含む。直鎖アルキル基の例としては、炭素原子1～8を有するもの、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*n*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、及び*n*-オクチル基が挙げられる。分枝状アルキル基の例としては、イソプロピル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ネオペンチル、イソペンチル、及び2,2-ジメチルプロピル基が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において使用する場合、用語「アルキル」は、*n*-アルキル、イソアルキル、及びアンテイソアルキル（*anteisoalkyl*）基並びに他の分枝鎖形態のアルキルを包含する。代表的置換アルキル基は、本明細書に定義するように1又は2以上の回数、置換することができる。

【0069】

シクロアルキル基は、環式アルキル基、例えば、それらに限定されないが、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基である。いくつかの実施形態では、シクロアルキル基は、3から約8～12環員を有することがあるが、他の実施形態では、環状炭素原子の数は、3から4、5、6又は7員の範囲である。シクロアルキル基は、多環式シクロアルキル基、例えば、それらに限定されないが、ノルボルニル、アダマンチル、ボルニル、カンフェニル（*camphenyl*）、イソカンフェニル（*isocamphenyl*）、及びカレニル（*carenyl*）基、並びに縮合環、例えば、それらに限定されないが、デカリニル（*decalinyl*）等をさらに含む。また、シクロアルキル基は、上に定義する直鎖又は分枝鎖のアルキル基と置換する環を含む。代表的置換シクロアルキル基は、本明細書に定義するような、一置換又は2回以上置換した基であり得る。

【0070】

アルケニル基は、例えば、上記のアルキル基であるが、少なくとも1つの炭素-炭素2重結合を含むアルキル基である。したがって、アルケニル基は、直鎖及び分枝状のアルケニル基及び非芳香族シクロアルケニル基を含む。アルケニル基は、必然ではないが、好ましくは、2重結合の部分を形成する炭素によって残りの分子に結合する。代表的置換アルケニル基は、本明細書に定義するような、一置換又は2回以上置換した基であり得る。

【0071】

アルキニル基は、例えば、上記のアルキル基であるが、少なくとも1つの炭素-炭素3重結合を含むアルキル基である。したがって、アルキニル基は、直鎖及び分枝状アルキニル基を含む。アルキニル基は、必然ではないが、好ましくは、3重結合の部分を形成する炭素によって残りの分子に結合する。代表的置換アルキニル基は、本明細書に定義するような、一置換又は2回以上置換した基であり得る。

【0072】

ヘテロ環基／ヘテロ環又は用語「ヘテロ環」は、3環員以上を含む芳香族及び非芳香族環化合物を含み、この環員の1又は2以上は、ヘテロ原子、例えば、N、O及びSであるが、これらに限定されない。したがって、ヘテロ環は、シクロヘテロアルキル、若しくはヘテロアリール、又は多環式である場合、これらの任意の組合せであり得る。いくつかの実施形態では、ヘテロ環基は、3から約20環員を含むが、式（I）の化合物では、ヘテロ環は、5から10環員を典型的に有する。ヘテロ環は、ヘテロ原子1を有する5員環、ヘテロ原子2を有する6員環等であり得る。炭素原子の数足すヘテロ原子の数の合計は、環原子の総数に等しい。また、ヘテロ環は、1又は2以上の2重結合を含み得る。ヘテロアリール環は、ヘテロ環基の実施形態である。句「ヘテロ環基」は、縮合芳香族及び非芳香族基を含むものを含む縮合環種を含む。例えば、ジオキソラニル（*dioxolanyl*）環及び

ベンズジオキサニル (benzdioxolanyl) 環系 (メチレンジオキシフェニル環系) はともに、本明細書における意味の範囲内において、ヘテロ環基である。また、句は、本明細書に記載のヘテロ原子を含む多環式の環系を含む。ヘテロ環基は、非置換であり得るか、又は上に考察したように置換し得る。

【0073】

ヘテロアリール基は、5以上の環員を含む芳香環化合物であり、この環員の1又は2以上は、ヘテロ原子、例えば、N、O及びSであるが、これらに限定されず、例えば、ヘテロアリール環は、5から約8～12環員を有し得る。式(I)の化合物では、ヘテロアリール環は、5から約10環員を典型的に有する。ヘテロアリール基は、芳香族電子構造を有する様々なヘテロ環基である。同様に、ヘテロアリールは、ヘテロ原子1を有する5員環、ヘテロ原子2を有する6員環等であり得る。炭素原子の数足すヘテロ原子の数の合計は、環原子の総数に等しい。ヘテロアリール基は、ピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、ピリジニル、チオフェニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾフラニル、インドリル、アザインドリル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、アザベンズイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、イミダゾピリジニル、イソオキサゾロピリジニル (isoxazolopyridinyl)、チアナフタレニル、プリニル、キサンチニル、アデニニル、グアニニル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、キノキサリニル、及びキナゾリニル基のような基を含むが、これらに限定されない。ヘテロアリール基は、非置換であり得るか、又は上に考察するような基と置換し得る。代表的置換ヘテロアリール基は、1又は2以上の回数、上に列挙したもののような基と置換し得る。

【0074】

ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素を指す。

【0075】

当業者に周知のような「塩」は、有機化合物、例えば、カルボン酸、スルホン酸、又はアミンを、イオンの形態で、対イオンと組み合わせて含む。例えば、アニオンの形態の酸は、カチオン、例えば、金属カチオン、例えば、ナトリウム、カリウム等を有する塩；テトラアルキルアンモニウム塩、例えば、テトラメチルアンモニウムを含む、例えば、NH₄⁺若しくは種々のアミンのカチオンを有するアンモニウム塩、又は他のカチオン、例えば、トリメチルスルホニウム等を有する塩を形成し得る。「薬学的に許容される」又は「薬理学的に許容される」塩は、塩化物塩又はナトリウム塩のように、ヒトが摂取するのに認可されているイオンから形成される塩であり、一般に非毒性である。「双性イオン」は、分子内塩であり、例えば、イオン化可能な少なくとも2つの基を有し、一方がアニオン及び他方がカチオンを形成して、相互に釣り合うように作用する分子において形成され得る。例えば、アミノ酸、例えば、グリシンは、双性イオンの形態で存在し得る。「双性イオン」は、本明細書における意味の範囲内において、塩である。本発明の化合物は、塩の形態を取り得る。用語「塩」は、遊離酸、又は本発明の化合物である、遊離塩基の付加塩を包含する。塩は、「薬学的に許容される塩」であり得る。用語「薬学的に許容される塩」は、薬学的適用における有用性を提供する範囲の毒性プロファイルを有する塩を指す。

【0076】

それにもかかわらず、薬学的に許容されない塩は、高結晶化度のような特性を有することがあり、例えば、本発明の化合物の合成、精製又は製剤化のプロセスにおける有用性のような、本発明の実践における有用性を有する。

【0077】

適する薬学的に許容される酸付加塩は、無機酸又は有機酸から調製し得る。無機酸の例としては、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸、及びリン酸が挙げられる。適切な有機酸は、脂肪族、脂環式、芳香族、アラリファティック (araliphatic)、ヘテロ環式、カルボキシ及びスルホンクラスの有機酸から選択されることがあり、この例としては、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、ピ

ルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、4-ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン酸（パモ酸）、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、スルファニル酸、シクロヘキシルアミノスルホン酸、ステアリン酸、アルギン酸、 β -ヒドロキシ酪酸、サリチル酸、ガラクトール酸、及びガラクトン酸が挙げられる。薬学的に許容されない酸付加塩の例としては、例えば、過塩素酸塩及びテトラフルオロホウ酸が挙げられる。

【0078】

本発明の化合物の適する薬学的に許容される塩基付加塩は、例えば、金属塩を含み、アルカリ金属、アルカリ土類金属及び遷移金属の塩、例えば、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム及び亜鉛のような塩を含む。また、薬学的に許容される塩基付加塩は、塩基性アミンから生成する有機塩、例えば、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）及びプロカインのような塩を含む。薬学的に許容されない塩基付加塩の例としては、リチウム塩及びシアン酸塩が挙げられる。薬学的に許容されない塩は、医薬としては一般に有用ではないが、このような塩は、例えば、式（I）の化合物の合成、例えば、再結晶によるこれらの精製における中間体として有用であり得る。このような塩のすべては、例えば、適切な酸又は塩基を式（I）による化合物と反応させることにより、式（I）による対応化合物から、従来の手段によって調製し得る。用語「薬学的に許容される塩」は、非毒性の無機若しくは有機酸及び／又は塩基付加塩を指し、例えば、参照により本明細書に組み込むLit et al., Salt Selection for Basic Drugs (1986), Int J. Pharm., 33, 201-217を参照されたい。

【0079】

「水和物」は、水分子を有する組成物に存在する化合物である。組成物は、1水和物若しくは2水和物のように、化学量論的量的の水を含み得るか、又はランダムな量的の水を含み得る。本明細書において用語を使用する場合、「水和物」は、固体を指し、すなわち、水溶液中の化合物は、水和し得るが、本明細書において用語を使用する場合、水和物ではない。

【0080】

「溶媒和物」は、水以外の溶媒が水に代わることを除いて類似の組成物である。例えば、メタノール又はエタノールは、「アルコール」を形成することができ、これもやはり化学量論的又は非化学量論的であり得る。本明細書において用語を使用する場合、「溶媒和物」は、固体を指し、すなわち、溶媒中の化合物は、溶媒和し得るが、本明細書において用語を使用する場合、溶媒和物ではない。

【0081】

当業者に周知のような「プロドラッグ」は、患者に投与可能な物質であり、この場合、物質は、患者の体内における生化学物質、例えば、酵素の作用により、活性な医薬成分にインビボで変換される。プロドラッグの例としては、カルボン酸基のエステルが挙げられ、これは、ヒト及び他の哺乳動物の血流に見出されるように、内因性エステラーゼにより加水分解され得る。適するプロドラッグ誘導体の選択及び調製のための従来の手順は、例えば、"Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985に記載されている。

【0082】

加えて、本発明の特徴又は態様がマーカッシュ群により記載されている場合、これによって本発明もまた、マーカッシュ群の任意の個々の構成要素又は構成要素の亜群により記載されていることを当業者は認識する。例えば、Xが、臭素、塩素、及びヨウ素からなる群から選択されるものとして記載されている場合、Xが臭素である請求項並びにXが臭素及び塩素である請求項は、十分に説明される。その上、本発明の特徴又は態様が、マーカッシュ群により記載されている場合、これによって本発明もまた、マーカッシュ群の個々の構成要素又は構成要素の亜群の任意の組合せにより記載されていることを当業者は認識する。したがって、例えば、Xが臭素、塩素、及びヨウ素からなる群から選択されるもの

として記載されており、Yがメチル、エチル、及びプロピルからなる群から選択されるものとして記載されている場合、Xが臭素であり、Yがメチルである請求項は、十分に説明される。

【0083】

必然的に整数である変数の値、例えば、アルキル基の炭素原子の数又は環上の置換基の数が、例えば、0～4の範囲として記載されている場合、値が0以上4以下の任意の整数、すなわち0、1、2、3又は4であり得ることを意味する。

【0084】

種々の実施形態では、本発明の方法において使用するような、化合物又は1組の化合物は、上に列挙する実施形態の任意の組合せ及び／又は部分的組合せのいずれか1つであり得る。

10

【0085】

種々の実施形態では、実施例のいずれか又は例となる化合物のうちに示す化合物を提供する。

【0086】

条件は、開示する範疇又は実施形態のいずれかに適用することがあり、この場合、上に開示する他の実施形態又は種のいずれか1又は2以上は、このような範疇又は実施形態から除外し得る。

【0087】

ナチュラルキラー細胞

20

ナチュラルキラー（NK）細胞は、免疫系の中で最も高いレベルの細胞傷害活性を示す。NK細胞は、B細胞及びT細胞に類似しているが、特定の細胞表面抗原受容体を欠いている。代わりに、NK細胞は、モチーフを認識する、活性化及び阻害受容体を有する。

【0088】

NK細胞は、血液並びにリンパ節及び脾臓などの末梢リンパ器官中を循環する。これらは、サイトカインにより、又は標的細胞に遭遇すると活性化された状態となり得る。標的細胞の認識及び除去は、阻害及び活性化シグナルの釣り合いに基づく。活性化シグナルは、リガンドに結合する活性化受容体（NK_{G2D}、NK_{p46}、NK_{p30}）により生成され、これは、がん性細胞、病原体感染性細胞及び損傷した細胞だけでなく、健常な細胞にも存在し得る。一方、阻害シグナルは、NK細胞上の阻害受容体（K_{IR}、CD₉₄/NK_{G2A}）が、通常すべての健常な細胞に存在する主要組織適合抗原（MHC、Major Histocompatibility Complex）クラスI分子に結合する場合に生成される。標的細胞上のMHCクラスI分子は、存在しないか、又は非常に下方制御され、そのため理想的なNK細胞標的となっている。これによりNK細胞が、標的と健常な細胞を識別することが可能となった。NK細胞が標的細胞を認識及び殺傷するために、活性化シグナル全体は、阻害シグナルよりも大きくなければならない。

30

【0089】

NK細胞は、がん性細胞、病原体感染性細胞及び損傷した細胞を事前感作なしに認識及び殺傷し、そのためNK細胞は、自然免疫応答の一部となっている。例えば、NK細胞は、ウイルス感染に対する初期応答をもたらし、その後、T細胞の感染細胞殺傷が生じる。NK細胞は、標的細胞を数分以内に殺傷することができる。NK細胞はまた、サイトカインを分泌し、免疫系の他の部分を「兵器化」する。例えば、NK細胞は、T細胞エフェクター機能を増進させ、抗体依存細胞傷害性（ADCC、antibody-directed cellular cytotoxicity）を増強する。

40

【0090】

NK細胞は、造血幹細胞（HSC）から図1に提示する経路を介して分化する。より詳細には、NK細胞は、HSCからリンパ球系共通前駆（CLP）細胞、プレNK前駆（pre-NKP）細胞、NK前駆（NKP）細胞、未成熟NK（iNK）細胞、成熟NK（mNK）細胞及び最終的に通常型NK（cNK）細胞に発生し、これらは血流を循環する。この用語は、マウスにおけるNK細胞発生に由来するが、対応する経路は、ヒトNK細胞

50

胞発生においても生じる。例えば、HSCは、複数の先駆体の段階（段階1、2及び3）、その後の成熟NK細胞への発生（段階4及び5）を通じて発生する。一貫性のために、HSC、CLP、プレNKP、NKP、iNK、mNK、cNK及びNK細胞の表現を本明細書において使用する。

【0091】

しかし、本発明の文脈において、これらの用語は、ヒト命名法の段階1～5と互換性を有する。図1の経路図の下部は、NK細胞発生に必須の、サイトカイン及び転写因子である。IL-15は、NK細胞の発生に必要とされる主要なサイトカインの1つである。特定の間質細胞などの他の外因子はまた、NK細胞の発生及び成熟に必要とされる。本発明によれば、造血前駆細胞（HPC）は、HSC、CLP及びまたNKPなどの多分化能前駆細胞を含有する異種集団である。HPCは、発生経路にまだ深く関与していないため、系列陰性細胞と呼ばれる。したがって、本発明の文脈において、HSC、CLP細胞及びNKP細胞は、すべてHPCであり、HPCに言及する場合、これと矛盾する明示的な記述がない限り、HSC、CLP細胞及び／若しくはCLP細胞のいずれか、又はこれらの任意の組合せへの言及となる。

【0092】

免疫応答におけるNK細胞の重要性のために、複数の臨床試験では、NK細胞の有効性を養子移植プロトコルにおいて試験した。典型的には、これは同種間の移植であり、NK細胞を健常なドナーから単離し、増殖させる。しかし、標的細胞上のMHCクラスI分子の下方制御は、部分的であり、ドナー及びレシピエント由来のKIR遺伝子型は、類似していてもよい。このため、レシピエントに注入されるNK細胞は、様々な個人由来であっても、そのKIRがMHCクラスI分子を認識する場合、標的細胞に結合しない可能性がある。したがって、NK細胞ドナーをそのKIR遺伝子型についてスクリーニングしなければならないことは重要であり、ここでドナーは、標的細胞を認識して破壊することを可能とする、レシピエントに適切なKIR対立遺伝子多型を有していなければならない。その上、増殖させた産物は、臨床的成功率が予想よりも低く、がん性又は感染性細胞を殺傷する能力が低いことが見出されている。

【0093】

NK細胞は、そのマーカー発現、その機能／活性、又はこれらの組合せの点から定義することができる。このような定義は、当分野において標準であり、マーカー発現及び／又はNK細胞活性を評価し得る方法は、公知である。したがって、当業者は、標準的方法及び定義を使用して、細胞をNK細胞として分類することが容易に可能である。

【0094】

例えば、mNK及びcNK細胞は、表面マーカーであるCD16（FcγRII）及び／又はCD56、典型的には、ヒトにおけるCD16とCD56の両方、並びにいくつかのマウス系統におけるNK1.1又はNK1.2の発現により認識することができる。NKp46は、mNK及びcNK細胞の別のマーカーであり、ヒト及びいくつかのマウス系統において発現する。したがって、NKp46は、CD16及び／若しくはCD56を（ヒトにおいて）有するか若しくは有しない、又はNK1.1若しくはNK1.2を（マウスにおいて）有するか若しくは有しないNK細胞のマーカーとして使用することができる。本発明によるNK細胞の同定／定義に使用され得るマーカーの他の例としては、Ly49、ナチュラル細胞傷害性受容体（NCR、natural cytotoxicity receptor）、CD94、NKG2、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR、killer-cell immunoglobulin-like receptor）及び／若しくは白血球阻害受容体（ILT又はLIR、leukocyte inhibitory receptor）、或いはCD16及び／若しくはCD56（ヒトにおいて）又はNK1.1／NK1.2（マウスにおいて）の組合せを含む、これらの任意の組合せが挙げられる。いくつかの好ましい実施形態では、本発明による成熟NK細胞（即ち、mNK及びcNK細胞）は、CD56⁺及びCD45⁺であり、またCD16⁺であり得る。本明細書において使用する場合、成熟ヒトNK細胞の用語は、CD56^{bright}（段階4）及びCD56^{dim}（段階5）であるNK細胞を包含し、これらは、ともにCD56⁺であ

10

20

30

40

50

る。成熟NK細胞はまた、CD34、並びにリンパ球マーカーであるCD3及び／又はCD19などのマーカーの非存在により定義することができる。したがって、本発明の成熟NK細胞は、CD56⁺、CD45⁺、CD16⁺、CD3⁻及び／若しくはCD19⁻、又はCD56⁺、CD45⁺、CD16⁺、CD3⁻及びCD19⁻など、これらの任意の組合せであり得る。

【0095】

加えて又は或いは、NKは、その活性の点から同定／定義することができる。例えば、NK細胞は、その細胞質内における細胞溶解性顆粒の存在により、 α デフェンシンなどの抗菌分子を分泌するその能力、及び／又はTNF- α 、IL-10、IFN- γ 及びTGF- β などのサイトカインを分泌するその能力により同定／定義することができる。

10

【0096】

本明細書において他に記述がない限り、NK細胞に言及する場合、iNK、mNK及びcNK細胞への言及を含む。HSC、CLP細胞及びNKPは、典型的にそれ自体を指す。

【0097】

増殖NK細胞集団

本明細書において開示するように、本発明は、NK細胞の増殖させた集団（本明細書において、増殖NK細胞集団又はNK細胞集団と互換的に呼ばれる）を生成する方法を提供する。本発明のNK細胞に関する、本明細書における任意の開示はまた、本発明の増殖NK細胞集団に適用することができる。

【0098】

20

したがって、本発明は、増殖NK細胞集団を提供する。典型的には、本発明の増殖NK細胞集団は、iNK細胞、mNK細胞及び／若しくはcNK細胞、又はこれらの組合せを含む。前記集団は、HSC、CLP細胞及び／若しくはNKP、又はこれらの組合せなどのHPCを含み得るが、これらのHPCの大部分が集団においてNK細胞に分化しているため、このような細胞の数は、NK細胞の数に対して典型的に少ない。前記集団は、他の免疫及び／又は非免疫細胞を含み得る。また、このような任意の細胞の数は、集団に存在するNK細胞の数に対して典型的に少ない。

【0099】

非限定的な例として、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又はそれ以上、最大100%の本発明の増殖NK細胞集団の細胞は、NK細胞であり得る。典型的には少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の本発明の増殖NK細胞集団の細胞は、NK細胞である。

30

【0100】

いくつかの実施形態では、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又はそれ以上、最大100%の本発明の増殖NK細胞集団の細胞は、成熟NK細胞（即ち、mNK細胞及び／又はcNK細胞）である。好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、及びさらに好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%又はそれ以上の本発明の増殖NK細胞集団の細胞は、成熟NK細胞である。

40

【0101】

HPC（HSC、CLP細胞及び／又はNKPを含む）の数は、増殖させたNK細胞集団の細胞の40%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満であり得る。典型的には、HPC（HSC、CLP細胞及び／又はNKPを含む）の数は、増殖させたNK細胞集

50

団の細胞の20%未満、好ましくは10%未満、より好ましくは5%未満、さらにより好ましくは2%未満又はそれ以下である。

【0102】

他の免疫及び／又は非免疫細胞の数は、増殖させたNK細胞集団の細胞の40%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満であり得る。典型的には、他の免疫及び／又は非免疫細胞の数は、増殖させたNK細胞集団の20%未満、好ましくは10%未満、より好ましくは5%、さらにより好ましくは2%未満又はそれ以下である。

【0103】

本明細書において記載するように、本発明の方法により作製した増殖NK細胞集団は、従来の養子移植方法により作製したNK細胞集団に対していくつかの利点を提供する。特に、本発明の方法は、従来の方法と比較して、より多数のNK細胞を有する増殖NK細胞集団の産生を可能とする。さらに、本発明の集団における、より大きい割合のNK細胞は、機能性であり、好ましくは、多数のNK細胞が「枯渇した(exhausted)」従来の方法により得られた集団と比較して、完全に機能性である。

【0104】

本明細書において使用する場合、用語「枯渇した」は、NK細胞の文脈において、NK細胞又は増殖NK細胞集団が、細胞傷害機能、サイトカイン産生及び／又はADCCなど、エフェクター機能のうちの少なくともいくつかを失ったことを意味する。したがって、枯渇したNK細胞又は増殖NK細胞集団は、生着の障害、細胞傷害機能の障害、サイトカイン産生の変化若しくは障害及び／又はADCCの障害を示し得る。例えば、枯渇したNK細胞又は枯渇したNK細胞集団は、そのエフェクター機能のうちの1つの少なくとも50%の減少を示し得る。例えば、サイトカイン分泌の少なくとも50%の減少、ADCCの少なくとも50%の減少及び／又は細胞傷害活性の少なくとも50%の減少を示し得る。これらの値は、本明細書において定義する適切な任意の対照に対して定量化され得る。適切な任意の技術を使用してエフェクター機能を判定し、したがって、それにより定量及び減少させることができる。適した技術は、当分野において公知である。或いは及び／又は加えて、枯渇したNK細胞は、1つ若しくは2つ以上の(本明細書に記載の)阻害受容体の発現の増加及び／又は1つ若しくは2つ以上の(本明細書に記載の)活性化受容体の発現の減少などのマーカー発現の変化を示し得る。いくつかの実施形態では、NKG2A及び／又はTim3の発現の増加は、NK細胞枯渇のマーカーとして使用され得る。また、これらのマーカーの発現は、本明細書において定義する適切な任意の対照に対して定量化され得る。

【0105】

対照的に、用語「機能性」及び「完全に機能性」は、NK細胞の文脈において、NK細胞又は増殖NK細胞集団が、所与の免疫チャレンジに応答する場合、予想されるエフェクター機能のすべてを有することを意味する。したがって、(完全に)機能性のNK細胞又は増殖NK細胞集団は、NK細胞が免疫チャレンジに応答して活性化される場合にインビボで観察されるような、細胞傷害機能、サイトカイン産生及び／又はADCCを典型的に示し、従来の方法を使用して産生したNK細胞と比較して生着の増強を典型的に示す。或いは及び／又は加えて、(完全)機能性NK細胞は、1つ若しくは2つ以上の(本明細書に記載の)活性化受容体の発現の増加及び／又は1つ若しくは2つ以上の(本明細書に記載の)阻害受容体の発現の減少などのマーカー発現の変化を示し得る。非限定的な例として、機能性(成熟)ヒトNK細胞は、CD56⁺及び／又はCD45⁺、好ましくはCD56⁺とCD45⁺の両方であり得る。

【0106】

非限定的な例として、NK細胞の細胞傷害性は、「標的細胞」と共インキュベートしたNK細胞における脱顆粒アッセイを使用して判定することができる。脱顆粒アッセイは、NK細胞集団におけるCD107aの発現の分析を含む。CD107aの量は、サイトカ

10

20

30

40

50

イン分泌及びNK細胞媒介性の標的細胞の溶解と相関する。NK細胞はまた、機能性NK細胞が活性化される場合に分泌される主要なサイトカインである、インターフェロン γ （IFN- γ ）の発現について分析することができる。機能性のNK細胞は、対照と比較した場合、CD107a並びにIFN- γ を同様に又は高く発現するはずである。

【0107】

本発明の方法により作製した増殖NK細胞集団におけるNK細胞数／機能性の任意の増加は、本明細書に記載の対照方法により得られたNK細胞集団のNK細胞数／機能と比較することができる。対照方法は、NK細胞集団を産生するための当分野において公知の任意の標準的方法であってもよい。例えば、対照方法は、本発明によるREV-ERB阻害物質を使用する方法ではなく従来の養子移植技術を使用し得る。このような対照／標準方法により産生したNK細胞及びNK細胞集団は、本明細書に記載の対照細胞及び集団として使用され得る。

10

【0108】

本発明の増殖NK細胞集団が、従来法で調製したNK細胞集団と比較して優位に少ない枯渇したNK細胞を含むが、代わりに、より高い割合の完全機能性NK細胞を含有するため、これにより患者を治療するために細胞をより少量使用することが有利にも可能となる。

【0109】

本明細書において記載するように、本発明の方法は、大量の「枯渇した」NK細胞を有する集団を産生する従来する方法と比較してより高い割合の（完全）機能性NK細胞を有する増殖させたNK細胞集団を産生する。典型的には、本発明の増殖NK細胞集団において、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又はそれ以上、最大100%の本発明の増殖NK細胞集団のNK細胞は、（完全）機能性である。典型的には、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも98%又はそれ以上の本発明の増殖NK細胞集団のNK細胞は、本明細書の任意の定義（例えば、マーカー及び／又はエフェクター機能の定義）に従って完全機能性である。

20

【0110】

本発明の増殖NK細胞集団は、本明細書に開示の任意の方法により産生することができる。典型的には、本発明の増殖NK細胞集団は、本明細書に開示のエクスビボでの方法により産生する。

30

【0111】

E4bp4

E4bp4（Nfil3としても公知）は、塩基性ロイシンジッパータンパク質転写因子であり、これはIL-3発現の制御に関与し、概日時計の調整に関与する。ヒトE4bp4遺伝子のゲノムDNA配列を、配列番号1（Genbank受託番号X64318、バージョンX64318.1）に示す。図1に示すように、E4bp4は、CLPにおいて発現し、血液幹前駆細胞からのNK細胞の産生において重要である。E4bp4遺伝子が欠失したマウスは、機能性NK細胞を有しないが、正常数のT及びB細胞を有する。対照的に、インビトロでのHSCにおけるE4bp4の過剰発現により、NK細胞産生が増加する。したがって、E4bp4は、HSCからのNKPの発生を制御する、系列分化決定因子である（図1）。抹消mNK細胞におけるE4bp4の特異的消失が、NK細胞数又はサイトメガロウイルス感染に対する応答に影響しないため、E4bp4のNK細胞における重要な機能は、発生経路の初期段階に特異的である。加えて、E4bp4は、Id2及びEomesなど、NK細胞発生において必須である他の転写因子を調節する。

40

【0112】

IL-7及びIL-15は、E4bp4発現を調節することが示されているが、一般に、外因性又は内因性の刺激がE4bp4にどのように影響するのかについては、ほとんど知られていない。E4bp4などの転写因子は、その構造及び機能のため、標的化するこ

50

とが困難であり得る。例えば、これらは通常、酵素活性又は補助因子結合部位を欠いている。しかし、本発明者らは、RE V-E R Bの活性を阻害する化合物を使用すると、E 4 b p 4発現が増加し得ることを、これまでに実証した（P C T / G B 2 0 1 8 / 0 5 0 5 4 2、特に実施例を参照、この全体を参照により本明細書に組み込む）。さらに、本発明者らは、E 4 b p 4発現を増加させるRE V-E R B阻害物質の使用により、NK細胞数の増加がもたらされることを実証した。理論に束縛されることは望まないが、RE V-E R Bは、ポルフィリンヘムに結合し、この特徴によりRE V-E R Bが新薬の開発につながる標的となると考えられる（下記参照）。まとめると、本発明者らは、RE V-E R Bを標的化し、その活性を阻害することにより、E 4 b p 4発現を増加させ、これにより、NK細胞数を増加させることが可能であることを示した。したがって、本発明は、RE V-E R Bの作用を阻害する化合物、並びにE 4 b p 4発現の増加、及びこれによるNK細胞数の増加におけるその使用に関係する。

【0113】

E 4 b p 4発現の増加

したがって、本発明は、増殖させたNK細胞集団を産生するためのエクスピボでの方法、並びにそれを必要とする患者においてNK細胞数を増加させるための治療的方法及び適用を提供する。本明細書において開示するように、前記方法及び適用は、RE V-E R Bの作用を阻害する化合物の使用を含む。典型的には、前記化合物は、E 4 b p 4発現を増加させることにより作用する。

【0114】

E 4 b p 4発現の増加は、対照に対して測定することができる。したがって、H P C、増殖させたNK細胞集団の試料、又は本発明により治療する患者から得られた試料におけるE 4 b p 4発現は、対照におけるE 4 b p 4発現と比較し得る。発現は、遺伝子及び／又はタンパク質発現の点から定量化することができ、対照（例えば、ハウスキーピング遺伝子又はタンパク質）の発現と比較することができる。E 4 b p 4遺伝子、mRNA転写物及び／若しくはタンパク質の質量、モル量、濃度若しくはモル濃度のような、E 4 b p 4遺伝子、mRNA転写物及び／若しくはタンパク質の実際量、又はH P C、増殖させたNK細胞集団の試料若しくは本発明により治療する患者及び対照から得られた試料中1細胞あたりのmRNA分子の数は、評価し、対照から得られた対応する値と比較することができる。或いは、H P C、増殖NK細胞集団の試料、又は本発明により治療する患者から得られた試料におけるE 4 b p 4遺伝子及び／又はタンパク質の発現は、1つ又は2つ以上の遺伝子及び／又はタンパク質の質量、モル量、濃度又はモル濃度を定量化することなく、対照のE 4 b p 4遺伝子及び／又はタンパク質の発現と比較することができる。

【0115】

典型的には、対照は、E 4 b p 4発現の増加が影響しない等価な集団又は試料である。非限定的な例として、E 4 b p 4発現を増加させるためにRE V-E R Bの作用を阻害する化合物により患者を治療する場合、適した対照は、化合物を投与されていない異なる個体、又は化合物を投与する前の同一の個体であり得る。公知の方法を含む、エクスピボでのNK細胞の増殖のための従来の方法は、本発明による対照方法であると考えることができる。

【0116】

本発明の文脈において、E 4 b p 4発現の増加に言及する場合、E 4 b p 4発現が、対照と比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%増加することを意味すると理解され得る。典型的には、E 4 b p 4発現は、対照と比較して少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%又はそれ以上増加する。

【0117】

E 4 b p 4 発現の増加に言及する場合、E 4 b p 4 発現が、対照に対して少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 2 . 1 倍、少なくとも 2 . 2 倍、少なくとも 2 . 3 倍、少なくとも 2 . 4 倍、少なくとも 2 . 5 倍、少なくとも 2 . 6 倍、少なくとも 2 . 7 倍、少なくとも 2 . 8 倍、少なくとも 2 . 9 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍又はそれ以上増加することを意味すると理解され得る。典型的には、E 4 b p 4 遺伝子発現は、対照と比較して少なくとも 2 倍、少なくとも 2 . 1 倍、少なくとも 2 . 2 倍、少なくとも 2 . 3 倍、少なくとも 2 . 4 倍、少なくとも 2 . 5 倍、少なくとも 2 . 6 倍、少なくとも 2 . 7 倍、少なくとも 2 . 8 倍、少なくとも 2 . 9 倍、少なくとも 3 倍又はそれ以上増加する。典型的には、E 4 b p 4 タンパク質発現は、対照と比較して少

10

【0118】

本発明による E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の発現は、定量的及び／又は定性的分析により判定することができる。典型的には、遺伝子発現は、mRNA レベルの点から表すことができる。

【0119】

本発明による E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の発現レベルは、E 4 b p 4 mRNA 転写物及び／又はタンパク質の質量、E 4 b p 4 遺伝子、mRNA 転写物及び／又はタンパク質のモル量、E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の濃度、並びに E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質のモル濃度を包含する。この発現レベルは、適切な任意の単位で示すことができる。例えば、E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の濃度は、p g / m l 、 n g / m l 又は μ g / m l で示すことができる。

20

【0120】

本発明による E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の発現レベルは、直接的又は間接的に測定することができる。

【0121】

本発明による E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の相対発現量は、対照に対して、適切な任意の技術を使用して判定することができる。適した標準的技術は、当分野において公知であり、例えば、ウエスタンブロット法、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) 及び RT-qPCR である。

30

【0122】

E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の発現レベルは、対照と比較して少なくとも 6 時間、少なくとも 1 2 時間、少なくとも 2 4 時間、少なくとも 3 0 時間、少なくとも 3 6 時間、少なくとも 4 2 時間、少なくとも 4 8 時間、少なくとも 5 4 時間、少なくとも 6 0 時間、少なくとも 7 2 時間、少なくとも 4 日間、少なくとも 5 日間、少なくとも 6 日間、少なくとも 1 週間増加し得る。好ましくは、E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の発現レベルは、少なくとも 1 2 ~ 7 2 時間増加する。典型的には、これは、REV-ERB 活性を阻害する化合物の最後の投与に対して評価される。

【0123】

40

E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の発現レベルは、対照と比較して少なくとも 1 回、少なくとも 2 回、少なくとも 3 回、少なくとも 4 回、少なくとも 5 回、少なくとも 1 0 回、少なくとも 2 0 回、少なくとも 3 0 回、少なくとも 4 0 回又はそれ以上の培養中の NK 細胞先駆体の継代で増加し得る。E 4 b p 4 遺伝子及び／又はタンパク質の発現レベルは、無制限に変化し得る。

【0124】

REV-ERB

REV-ERB タンパク質は、細胞内転写因子の核内受容体ファミリーのメンバーである。ヒト REV-ERB α 遺伝子 (Nr1d1) の mRNA 配列は、配列番号 3 (Genbank 受託番号 NM_021724、バージョ NM_021724.4) に示す。ヒ

50

トREV-ERBβ遺伝子(Nr1d2)のmRNA配列は、配列番号5(Genbank受託番号AB307693、バージョンAB307693.1)に示す。REV-ERBは、概日時計を調節し、軟骨組織の崩壊の調節とも関係づけられている。

【0125】

本発明者らは、REV-ERB活性の阻害が、E4bp4発現の顕著な増加を誘発するのに十分であり、次いで、これによりNK細胞の増殖がもたらされて、NK細胞数の増加が生じることを、これまでに実証した(PCT/GB2018/050542、特に実施例を参照、この全体を参照により本明細書に組み込む)。REV-ERB活性の阻害により、NK細胞数の増加がもたらされる可能性があり、典型的には、得られたNK細胞は、本明細書に定義するように(完全)機能性である。REV-ERB阻害効果は、E4bp4依存的に媒介される。理論に束縛されることは望まないが、REV-ERB活性を阻害すると、E4bp4発現が増加し(E4bp4発現は、通常、REV-ERBにより抑制される)、E4bp4が、NK細胞の産生を刺激するように作用する(図1に示すように)と考えられる。特に、本発明者らは、低分子のSR8278をREV-ERBのポルフィリンヘム部分に結合させて、REV-ERB活性の阻害及びNK細胞数の増加を生じさせることが可能であることをこれまでに実証した。

【0126】

しかし、SR8278の薬理的プロファイルは、臨床環境における使用には理想的でないものである。その上、SR8278の作用機序に関する情報がなく、この分子周辺の適する構造活性相関がないため、REV-ERB阻害活性を有する他の化合物の発見が妨げられている。実際、REV-ERBの多くの合成リガンドが、当技術分野において生成されているが、圧倒的多数のこのようなリガンドが、アゴニストとして同定されており、300種を超えるREV-ERBアゴニストが、同定されている。本発明者らは、新規化合物のライブラリーを生成し、このような化合物において、REV-ERB阻害活性が、公知のREV-ERB阻害物質SR8278と比較して向上したことを実証した。

【0127】

したがって、本発明は、このような改善REV-ERBアンタゴニスト、すなわち、REV-ERBの作用に対する阻害活性が向上した化合物、並びにE4bp4発現及びこれによるNK細胞数の増加における、このような化合物の使用に関する。

【0128】

REV-ERB活性の阻害

本発明は、REV-ERBの作用を阻害する化合物、即ち、REV-ERB活性を阻害する化合物の使用に関する。REV-ERB活性は、適切な任意の手段により阻害することができる。適した標準的技術は、当分野において公知である。阻害は、例えば、使用する化合物の性質(下記参照)、例えば、任意の直接的又は間接的相互作用における立体的干渉又はREV-ERBの阻害に応じた、適した任意の機序により生じ得る。本発明の文脈において、REV-ERB阻害物質(本明細書においてREV-ERBアンタゴニストと互換的に呼ばれる)は、REV-ERBの作用を部分的又は完全に阻害、減少、抑制又は除去する任意の化合物である。

【0129】

REV-ERB活性の減少は、対照に対して測定することができる。したがって、NK先駆若しくは前駆細胞、増殖させたNK細胞集団の試料中、又は本発明により治療する患者から得られた試料中のREV-ERB活性は、対照におけるREV-ERB活性と比較することができる。活性は、任意の適切な観点、例えば、REV-ERBのE4bp4遺伝子との結合、又は本明細書に定義するE4bp4発現の観点から定量化することができる。任意の適切な技術又は方法は、REV-ERB活性の定量化に使用することができる。適した技術は、当分野において公知であり、例えば、ルシフェラーゼアッセイを使用してレポーター遺伝子の発現を定量化する。

【0130】

典型的には、対照は、REV-ERB阻害化合物を添加していない、等価な集団又は試

10

20

30

40

50

料、例えば、化合物を投与していない異なる個体、又は化合物を投与する前の同一の個体から得られた試料である。公知の方法を含む、エクスピボでのNK細胞の増殖のための従来の方法は、本発明による対照方法であると考えることができる。

【0131】

本発明の文脈において、REV-ERB活性の阻害に言及する場合、REV-ERB活性が、対照と比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%減少し、最大で完全に(100%)REV-ERB活性を阻害することを意味すると理解され得る。典型的には、REV-ERB活性は、対照と比較して少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%又はそれ以上減少する。

10

【0132】

REV-ERBの活性は、定量的及び／又は定性的分析により判定することができ、直接的又は間接的に測定することができる。

【0133】

対照に対するREV-ERB活性は、適切な任意の技術を使用して判定することができる。適した標準的技術は、当分野において公知であり、例えば、E4bp4発現の定量化、及び／又はルシフェラーゼアッセイによる。

20

【0134】

REV-ERBの活性は、対照と比較して少なくとも6時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも30時間、少なくとも36時間、少なくとも42時間、少なくとも48時間、少なくとも54時間、少なくとも60時間、少なくとも72時間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも1週間阻害され得る。好ましくは、REV-ERBの活性は、少なくとも12~72時間減少する。典型的には、これは、REV-ERB活性を阻害する化合物の最後の投与に対して評価される。

【0135】

REV-ERBの活性は、対照と比較して少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも10回、少なくとも20回、少なくとも30回、少なくとも40回又はそれ以上の細胞の継代で阻害され得る(インビボ、又はエクスピボ若しくはインビトロで培養)。REV-ERBの活性は、阻害される可能性があり、並びに／又はE4bp4遺伝子及び／若しくはタンパク質の発現レベルは、無制限に変化し得る。

30

【0136】

本発明の文脈において、REV-ERB活性の阻害に任意に言及する場合、REV-ERB α 及び／又はREV-ERB β の活性を阻害することを意味すると理解され得る。好ましい実施形態では、REV-ERB α とREV-ERB β の両方の活性が阻害される。したがって、本発明は、REV-ERB α 活性を阻害する化合物(即ち、REV-ERB α アンタゴニストとも呼ばれる、REV-ERB α 阻害物質)及び／又はREV-ERB β 活性を阻害する化合物(即ち、REV-ERB β アンタゴニストとも呼ばれる、REV-ERB β 阻害物質)を含む、REV-ERB活性を阻害する化合物に関する。好ましい実施形態では、本発明は、REV-ERB α とREV-ERB β の両方の活性を阻害する化合物(即ち、REV-ERB α 及びREV-ERB β 阻害物質、REV-ERB α 及びREV-ERB β アンタゴニストとも呼ばれる)に関する。

40

【0137】

REV-ERBアンタゴニスト／阻害物質

本発明のREV-ERB阻害化合物は、REV-ERBに特異的であり得る。特異的には、化合物が、REV-ERB α 及び／又はREV-ERB β に結合し、他のいか

50

なる分子、特に他のいかなるタンパク質に対しても顕著な交差反応性がないことが理解される。例えば、REV-ERB α 及び／又はREV-ERB β に特異的な修飾物質は、ヒト好中球エラスターゼとの顕著な交差反応性を示さない。交差反応性は、任意の適した方法により評価することができる。REV-ERB α 及び／又はREV-ERB β 阻害物質のREV-ERB α 及び／又はREV-ERB β 以外の分子との交差反応性は、阻害物質が他の分子に少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は100% REV-ERB α 及び／又はREV-ERB β に結合するときと同程度に強く結合する場合に顕著であると考えられ得る。REV-ERB α 及び／又はREV-ERB β に特異的な阻害物質は、ヒト好中球エラスターゼなどの別の分子と90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%又は20%未満のREV-ERB α 及び／又はREV-ERB β に結合する強度で結合し得る。好ましくは、阻害物質は、他の分子に20%未満、15%未満、10%未満又は5%未満、2%未満又は1%未満のREV-ERB α 及び／又はREV-ERB β に結合する強度で結合する。

【0138】

本発明のREV-ERB阻害化合物は、オフターゲット効果を有し得る。オフターゲット効果は、REV-ERB以外の標的に対する活性である。典型的には、オフターゲット効果を有する化合物は、非REV-ERB標的に対する活性が、REV-ERBに対する活性と比較して顕著でない場合に、本発明により包含される。オフターゲット効果が顕著であるかどうかは、化合物の対象となる使用に依存し得る。非限定的な例として、オフターゲット効果を中枢神経系にもたらし得る化合物は、本明細書に開示するエキスピボでの方法において使用する化合物にとって重要ではないが、本明細書に開示するインビボでの治療適応にとって重要であり得る（オフターゲット効果の規模に応じて）。潜在的な任意のオフターゲット効果の存在及び規模は、当分野において公知の標準的方法を使用して容易に評価することができる。

【0139】

低分子

本明細書に記載するようにREV-ERB活性を阻害するために使用する本発明の化合物は、低分子である。本明細書に定義するように、低分子は、低分子量化合物、典型的には、有機化合物である。典型的には、低分子は、900 Daの最大分子量を有し、細胞膜を通過して急速な拡散を可能とする。いくつかの実施形態では、低分子の最大分子量は、500 Daである。典型的には、低分子は、1 nmほどのサイズを有する。

【0140】

本発明によれば、低分子は、REV-ERBのポルフィリンヘム部分に結合することによりREV-ERB活性に阻害効果をもたらすことができる。したがって、いくつかの好ましい実施形態では、本発明によるREV-ERBの作用を阻害する化合物は、REV-ERBのポルフィリンヘム部分に結合し、これによりREV-ERBの作用を阻害する化合物である。或いは、低分子は、異なる機序により、例えば、REV-ERBの非ヘム部分に結合することにより作用し得る。低分子の産生のための標準的技術は、当分野において公知であり、この低分子は、本明細書に記載するREV-ERB阻害作用について容易に試験することができるものである。

【0141】

10

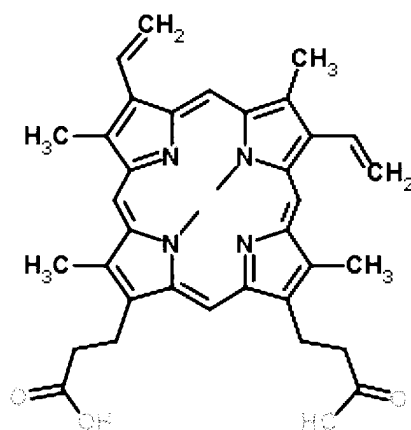
20

30

40

50

【化 1 4】



10

【0 1 4 2】

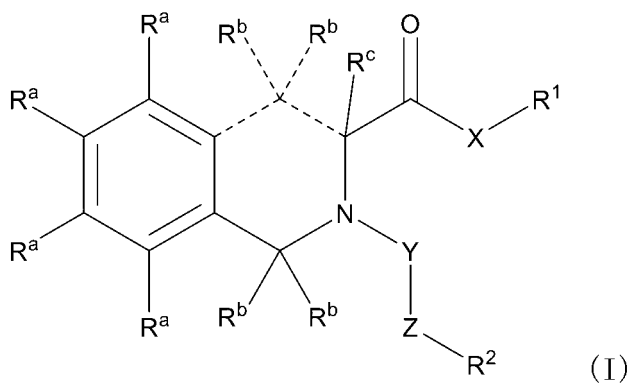
ポルフィリンヘムの構造

発明者らは、SR8278の足場に基づく、REV-ERB活性を阻害する（本明細書において互換的にREV-ERBの作用の阻害と呼ぶ）新たな化合物を、特に、アミド置換基及び／又はエチルエステル基を変異させることにより生成した。したがって、本発明において使用する化合物は、式（I）：

20

【0 1 4 3】

【化 1 5】



30

【0 1 4 4】

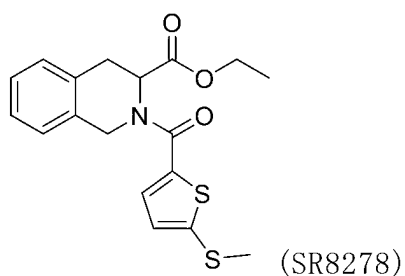
〔式中、-----は、すべて存在する結合又は存在しない結合のいずれかを表し、
 R^1 は、 C_{1-6} ヒドロカルビルから選択され、 C_{1-4} ヒドロカルビル、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(OR')$ 、 $-NR_2'$ 、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 $-CF_3$ 及びハロゲンから独立的に選択される1又は2以上の基と置換されていてもよく、
 R^2 は、5～10員のヘテロ環及び C_{1-6} ヒドロカルビルから選択され、 C_{1-4} ヒドロカルビル、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-NR_2'$ 、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 CF_3 及びハロゲンから独立的に選択される1又は2以上の基と置換されていてもよく、
 X は、 $-O-$ 及び $-NR'-$ から選択されるか又は存在せず、

40

50

Y は、 $-C(O)-$ 及び $-CR'_2-$ から選択され、
 Z は、 $-O-$ 及び $-NR'-$ から選択されるか又は存在せず、
 各 R^a は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-NR'_2$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 CF_3 及びハロゲンから独立的に選択され、
 各 R^b は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル及び $-OR'$ から独立的に選択され、
 R^c は、H 及び C_{1-4} ヒドロカルビルから選択され、
 各 R' は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル及び $-Ph$ から独立的に選択される]
 を有するか又は薬学的に許容されるこの塩であり、ただし上記化合物が、
 【0145】
 【化16】

10



20

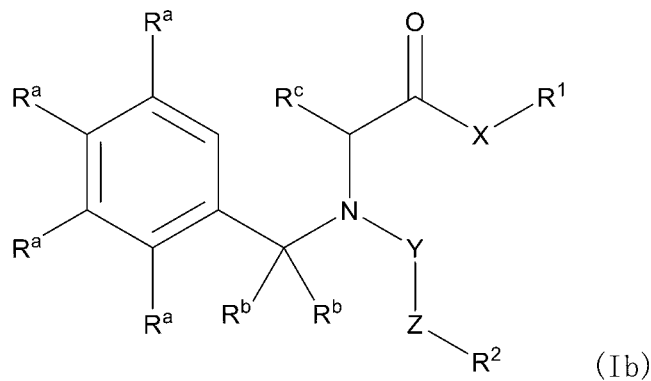
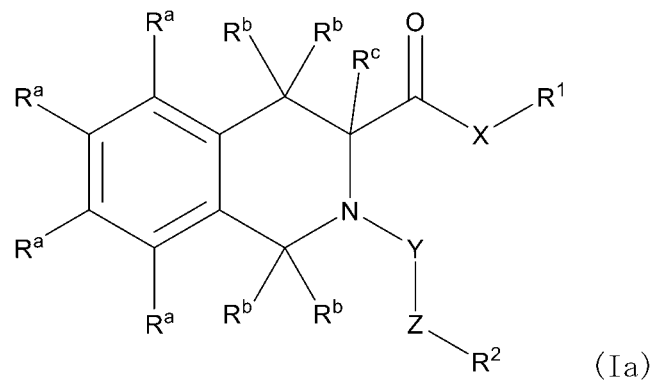
【0146】
 ではない。
 【0147】
 上記のように、-----は、すべて存在する結合又は存在しない結合のいずれかを表す。したがって、本発明は、式 (Ia) の閉環構造と式 (Ib) の開環構造の両方：
 【0148】

30

40

50

【化 17】



【0149】

に関する。

【0150】

好ましくは、-----は、すべて存在する結合を表し、化合物は、式 (Ia) の閉環構造である。

【0151】

式 (I) の化合物では、 R^1 は、 C_{1-6} ヒドロカルビルから選択され、 C_{1-4} ヒドロカルビル (好ましくは C_{1-4} アルキル)、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-SR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O_2)R'$ 、 $-NR'_2$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-Ph$ 、 CF_3 及びハロゲンから独立的に選択される 1 又は 2 以上の基と置換されていてもよい。 R^1 は、好ましくは、非置換であり、例えば、好ましくは、 C_{1-6} ヒドロカルビルから、好ましくは、 C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} アルケニルから選択される。より好ましくは、 R^1 は、 C_{1-6} アルキルから、好ましくは、 C_{1-4} アルキルから、例えば、メチル、エチル及びプロピルから選択される。エチル基は、特に好ましい。

【0152】

式 (I) の化合物では、 R^2 は、5~10 員のヘテロ環及び C_{1-6} ヒドロカルビルから選択され、置換されていてもよい。好ましくは、 R^2 は、置換されていてもよい 5~10 員のヘテロ環から選択される。

【0153】

R^2 の 5~10 員のヘテロ環は、好ましくは、1~4、より好ましくは 1 又は 2 のヘテ

10

20

30

40

50

口原子を含む。ヘテロ原子は、好ましくは、酸素、窒素及びイオウから選択される。ヘテロ環は、複数の同一のヘテロ原子、例えば、窒素原子2、又はヘテロ原子の混合物、例えば、窒素原子及び酸素原子を含み得ることが理解される。

【0154】

R^2 は、好ましくは、5～10員のヘテロアリール環から、より好ましくは、5、6又は9員のヘテロアリール環から選択される。5員ヘテロアリール環の非限定的な例としては、フラニル、チオフェニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、ピロリル及びトリアゾリルが挙げられる。6員ヘテロアリール環の非限定的な例としては、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニルが挙げられる。9員ヘテロアリール環の非限定的な例としては、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、アザインドリル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンズイソオキサゾリル及びベンゾオキサゾリルが挙げられる。置換されていてもよい5員ヘテロアリール環は、特に好ましい。

10

【0155】

R^2 が、置換されていてもよい C_{1-6} ヒドロカルビルである場合、これは、好ましくは、置換されていてもよいフェニル及び置換されていてもよい C_{1-6} アルキルから選択される。

【0156】

R^2 が、置換されていてもよいフェニルである場合、フェニル基は、好ましくは、置換されている。

20

【0157】

R^2 が、置換されていてもよい C_{1-6} アルキルである場合、アルキル基は、好ましくは、非置換であり、例えば、 R^2 は、好ましくは、 C_{2-4} アルキルから、例えば、エチル、プロピル（例えば-*i*Pr）及びブチル（例えば-*t*Bu）から選択される。

【0158】

R^2 は、 C_{1-4} ヒドロカルビル（好ましくは C_{1-4} アルキル）、-OR'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-SR'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-NR₂'、-NR'C(O)R'、-C(O)NR₂'、-CN、-NO₂、-Ph、CF₃及びハロゲンから独立的选择される1又は2以上の基と置換されていてもよい。好ましくは、 R^2 は、非置換であるか、又は1又は2のこのような基と置換されている。 R^2 の特に好ましい置換基は、-Me、-OMe、-CN、-NO₂、-F、-Cl、-I及び-SMeを含む。

30

【0159】

式(I)の化合物では、Xは、-O-及び-NR'-から選択されるか、又は存在しない。Xは、好ましくは、-O-である。

【0160】

式(I)の化合物では、Yは-C(O)-及び-CR'₂-から選択される。Yは、好ましくは、-C(O)-である。

【0161】

式(I)の化合物では、Zは、-O-及び-NR'-から選択されるか、又は存在しない。好ましくは、Zは、-O-から選択されるか、又は存在しない。 R^2 が、アルキル基である場合、Zは、好ましくは、-O-及び-NR'-から選択され、好ましくは-O-である。 R^2 が、ヘテロ環である場合、Zは、好ましくは、存在しない。

40

【0162】

式(I)の化合物では、各 R^a は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル（好ましくは C_{1-4} アルキル）、-OR'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-SR'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-NR₂'、-NR'C(O)R'、-C(O)NR₂'、-CN、-NO₂、-Ph、CF₃及びハロゲンから独立的选择される。好ましくは、各 R^a は、H、 C_{1-4} アルキル及び-OR'から、より好ましくは、H及び C_{1-4} アルキルから独立的选择される。より好ましくは、各 R^a は、好ましくはHである。

【0163】

50

式 (I) の化合物では、各 R^b は、H、 C_{1-4} ヒドロカルビル（好ましくは C_{1-4} アルキル）及び $-OR'$ から独立的选择される。好ましくは、各 R^b は、H 及び C_{1-4} アルキルから独立的选择され、より好ましくは H である。

【0164】

式 (I) の化合物では、 R^c は、H 及び C_{1-4} ヒドロカルビル（好ましくは C_{1-4} アルキル）から选择される。好ましくは、 R^c は H である。

【0165】

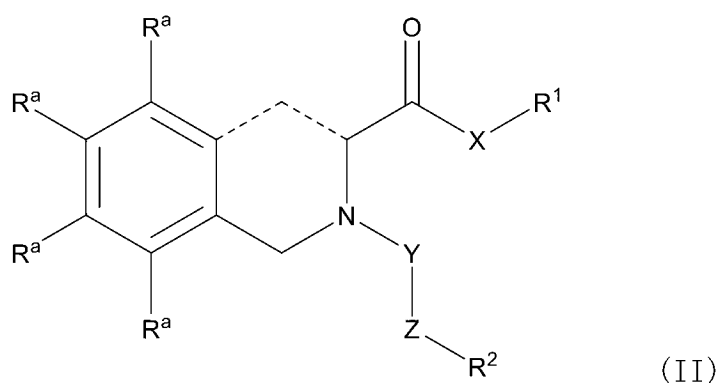
式 (I) の化合物では、各 R' は、H 及び C_{1-4} ヒドロカルビル（好ましくは C_{1-4} アルキル）及び $-Ph$ から独立的选择される。好ましくは、各 R' は、H 及び C_{1-4} アルキルから、より好ましくは、H、メチル及びエチルから、より好ましくは、メチル及びエチルから独立的选择される。

【0166】

好ましい実施形態では、 R^b 及び R^c は、すべて H であり、このため本発明において使用する化合物は、式 (II) :

【0167】

【化18】



【0168】

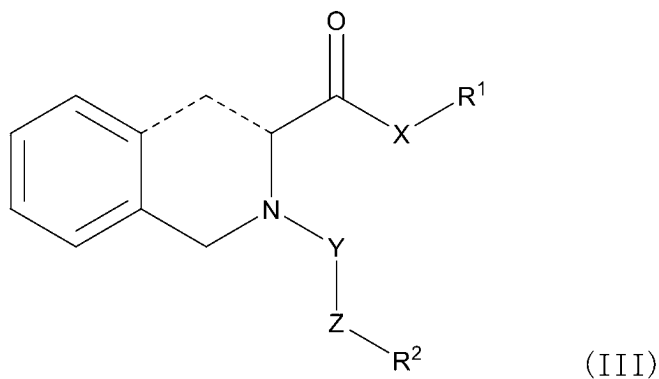
を有し、式中、 R^1 、 R^2 、 R^a 並びに X、Y 及び Z は、これまでに定義するものである。

【0169】

さらに好ましい実施形態では、 R^a はまた、すべて H であり、このため本発明において使用する化合物は、式 (III) :

【0170】

【化19】



10

20

30

40

50

【0171】

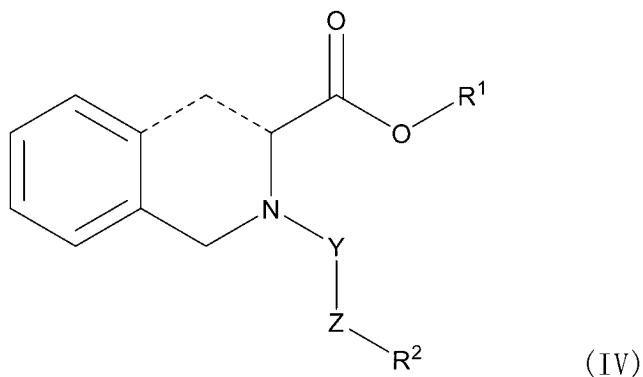
を有し、式中、 R^1 、 R^2 、 X 、 Y 及び Z は、これまでに定義するものである。

【0172】

さらに好ましい実施形態では、 X は、 $-O-$ であり、本発明において使用する化合物は、式(IV)：

【0173】

【化20】



【0174】

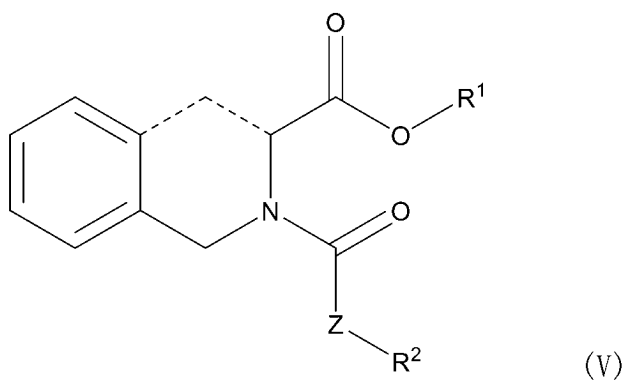
を有し、式中、 R^1 、 R^2 、 Y 及び Z は、これまでに定義するものである。

【0175】

さらに好ましい実施形態では、 Y は、 $-C(O)-$ であり、本発明において使用する化合物は、式(V)：

【0176】

【化21】



【0177】

を有し、式中、 R^1 、 R^2 及び Z は、これまでに定義するものである。

【0178】

またさらに好ましい実施形態は、 R^1 が、エチルである化合物であり、式(VI)：

【0179】

10

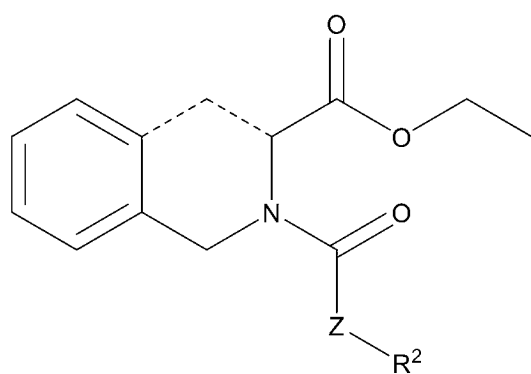
20

30

40

50

【化 2 2】



10

【 0 1 8 0】

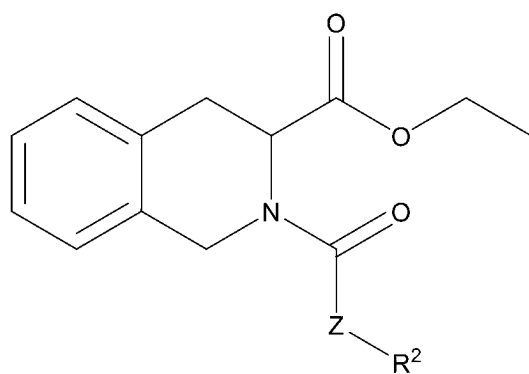
を有し、式中、 R^2 及び Z は、これまでに定義するものである。

【 0 1 8 1】

例えば、化合物は、閉環構造であることがあり、式 (VII) :

【 0 1 8 2】

【化 2 3】



20

30

【 0 1 8 3】

を有し、式中、 R^2 及び Z は、これまでに定義するものである。

【 0 1 8 4】

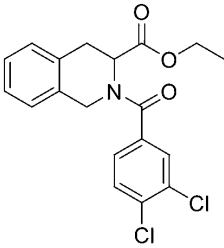
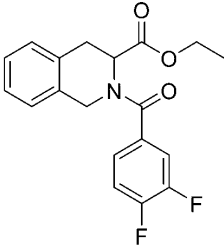
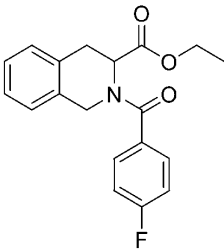
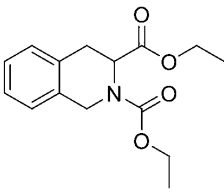
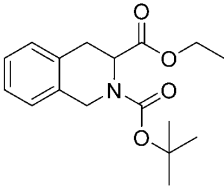
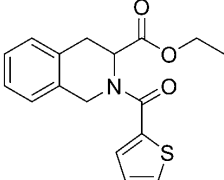
本発明による化合物の特定の例は、以下の表 1 に提示する。

【 0 1 8 5】

40

50

【表 1】

化合物	構造
1	 <chem>CCOC(=O)N1Cc2ccccc2CC1C(=O)c3cc(Cl)cc(Cl)c3</chem>
2	 <chem>CCOC(=O)N1Cc2ccccc2CC1C(=O)c3cc(F)cc(F)c3</chem>
3	 <chem>CCOC(=O)N1Cc2ccccc2CC1C(=O)c3ccc(F)cc3</chem>
4	 <chem>CCOC(=O)N1Cc2ccccc2CC1C(=O)OCC</chem>
5	 <chem>CCOC(=O)N1Cc2ccccc2CC1C(=O)OC(C)(C)C</chem>
6	 <chem>CCOC(=O)N1Cc2ccccc2CC1C(=O)c3ccsc3</chem>

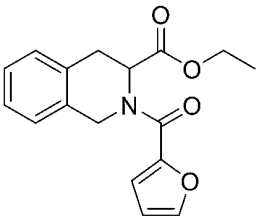
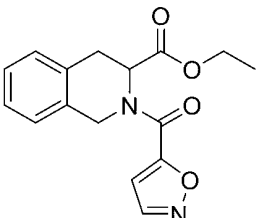
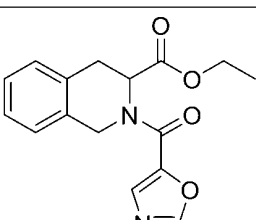
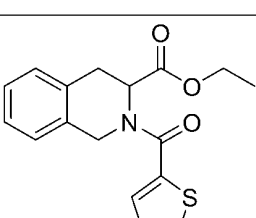
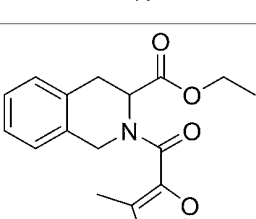
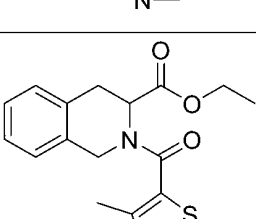
10

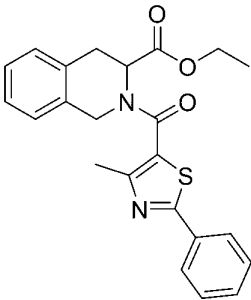
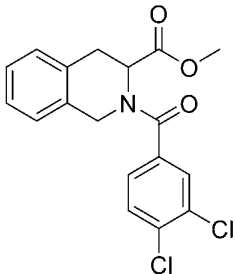
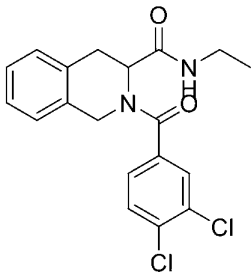
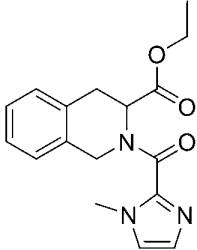
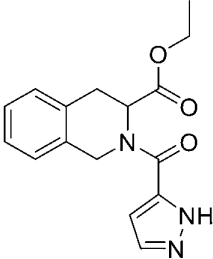
20

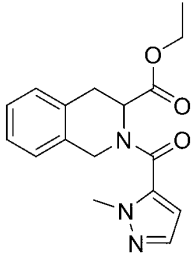
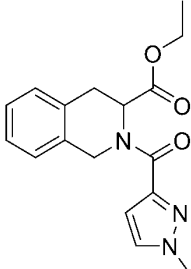
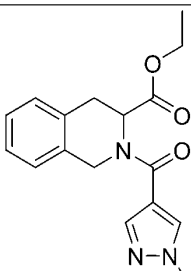
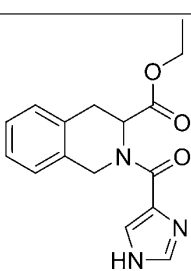
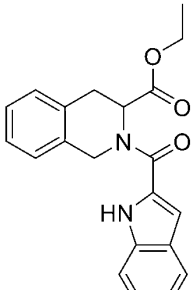
30

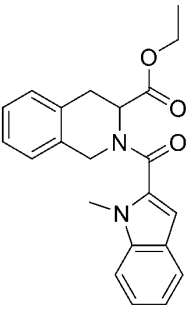
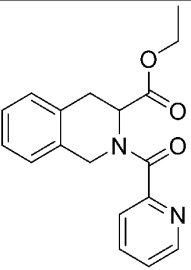
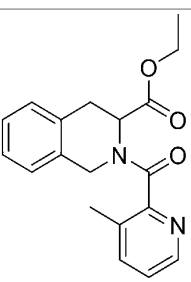
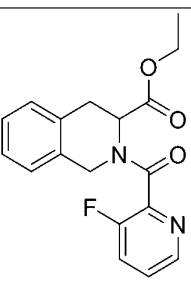
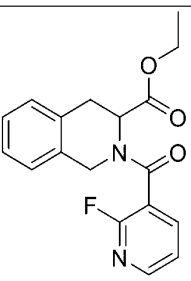
40

50

7		
8		10
9		20
10		
11		30
12		40

13		10
14		20
15		30
16		40
17		

18	
19	
20	
21	
22	

23	
24	
25	
26	
27	

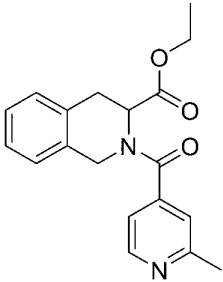
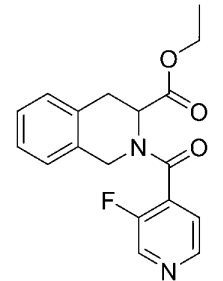
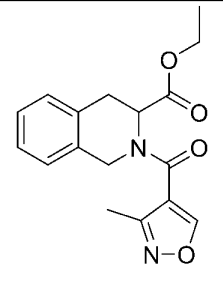
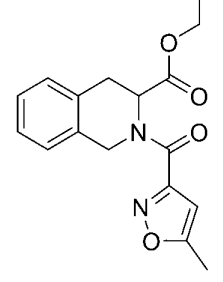
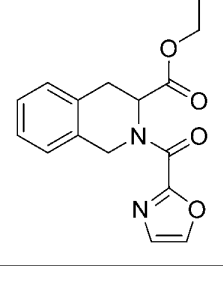
10

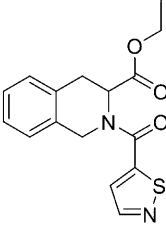
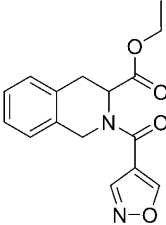
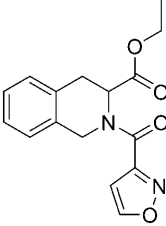
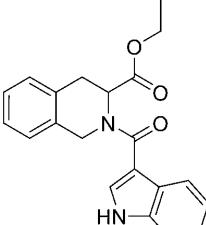
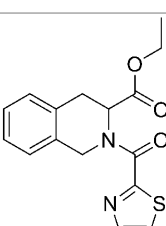
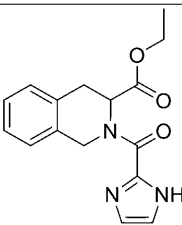
20

30

40

50

28		
29		10
30		20
31		30
32		40

33	
34	
35	
36	
37	
38	

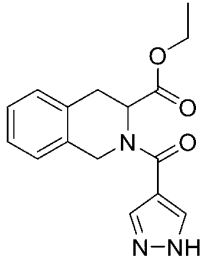
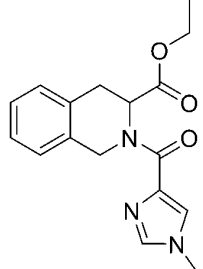
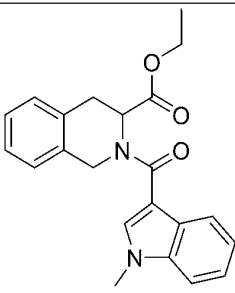
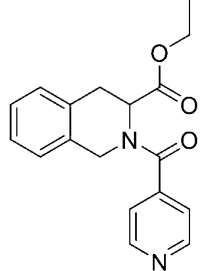
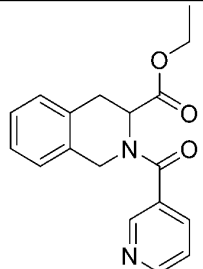
10

20

30

40

50

39	
40	
41	
42	
43	

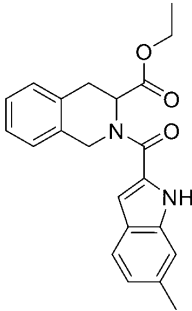
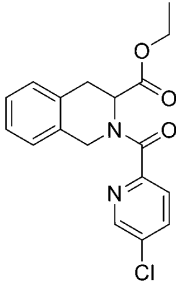
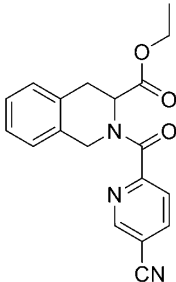
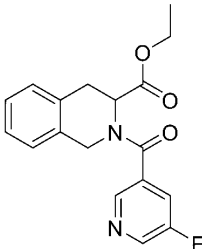
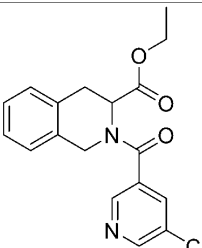
10

20

30

40

50

44	
45	
46	
47	
48	

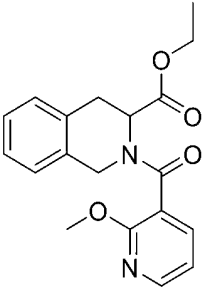
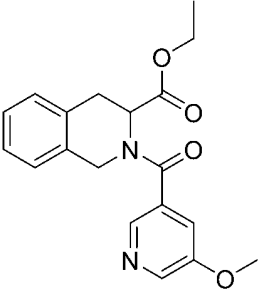
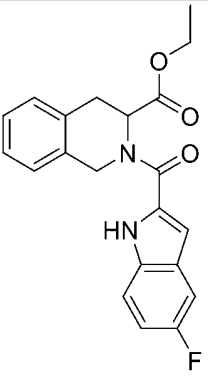
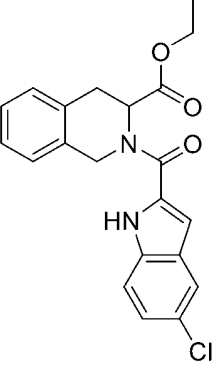
10

20

30

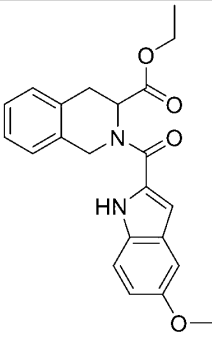
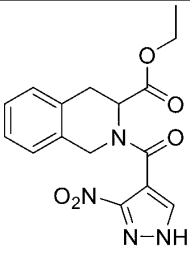
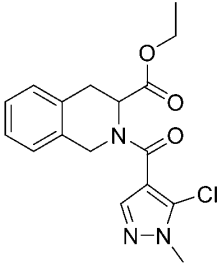
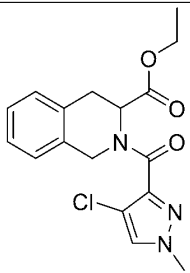
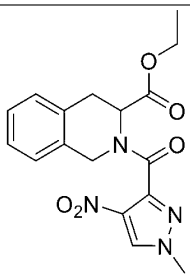
40

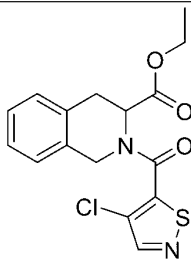
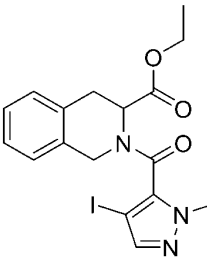
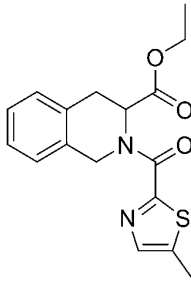
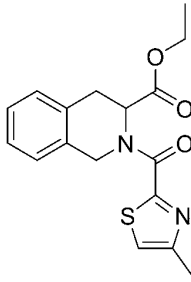
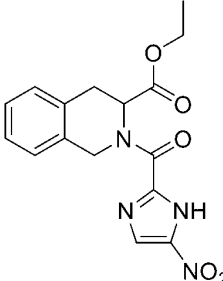
50

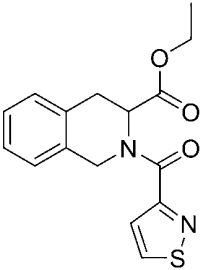
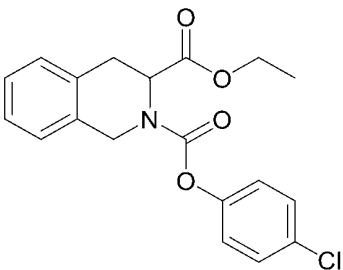
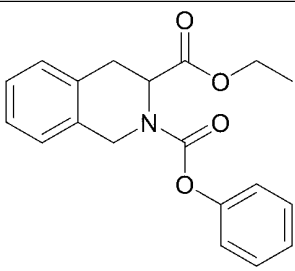
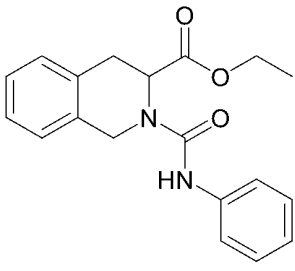
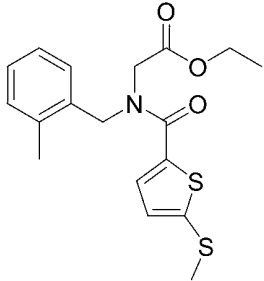
49		
50		10
51		20
52		30

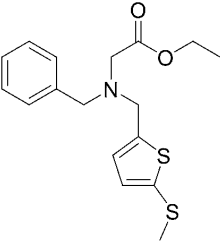
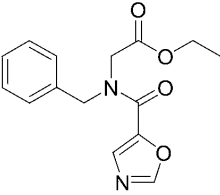
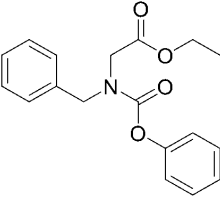
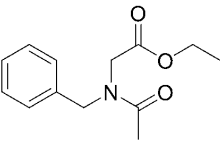
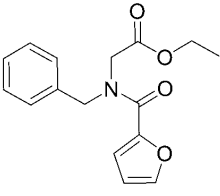
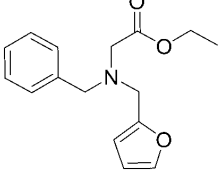
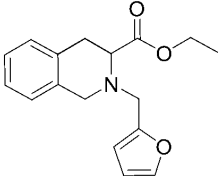
40

50

53		10
54		
55		20
56		30
57		40

58		
59		10
60		20
61		30
62		40

63		
64		10
65		20
66		30
67		40

68	
69	
70	
71	
72	
73	
74	

10

20

30

40

50

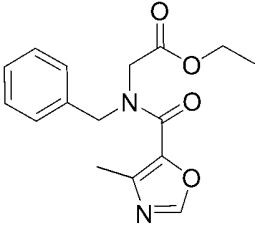
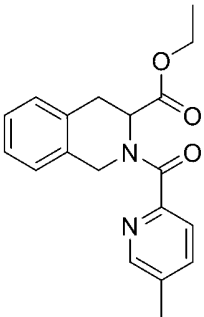
75	
76	

表1:本発明の例となる化合物

【 0 1 8 6 】

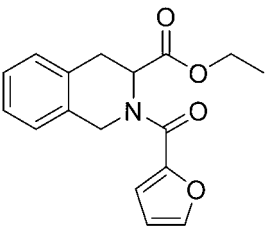
化合物 7、 1 1、 2 7、 7 2 及び 7 3 は、好ましい。

【 0 1 8 7 】

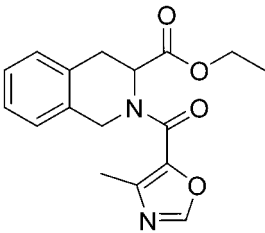
化合物 7 及び 1 1 は、特に好ましい。

【 0 1 8 8 】

【 化 2 4 】



(化合物7)



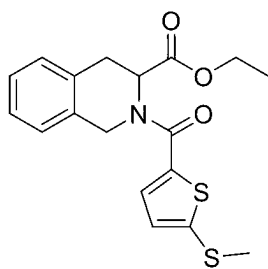
(化合物11)

【 0 1 8 9 】

式 (I) の化合物は、 S R 8 2 7 8 ではなく、すなわち、

【 0 1 9 0 】

【化 2 5】



10

【 0 1 9 1】

ではない。

【 0 1 9 2】

いくつかの実施形態では、式（I）の化合物はまた、国際公開第 2 0 1 3 / 0 3 3 3 1 0 号パンフレット又は国際公開第 2 0 1 5 / 1 0 3 5 2 7 号パンフレットのいずれにも開示されていない。例えば、本発明の化合物それ自体に関して、式（I）の化合物は、

【 0 1 9 3】

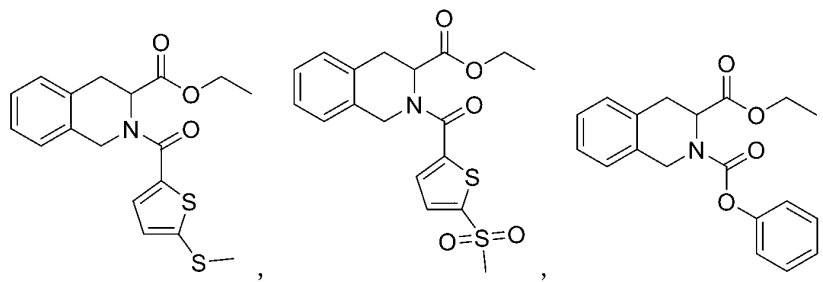
20

30

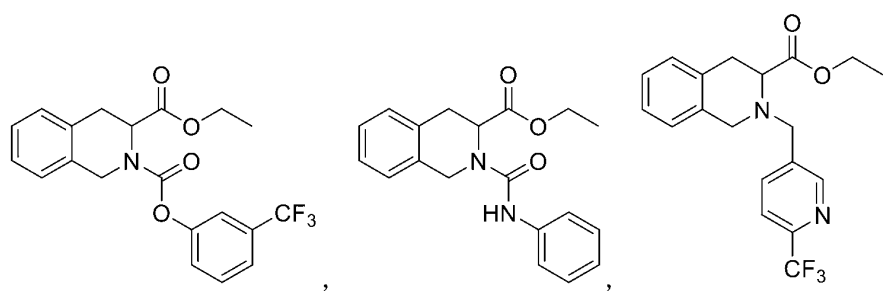
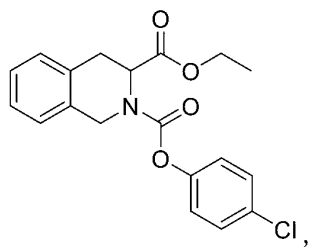
40

50

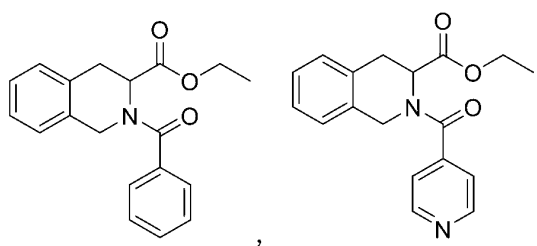
【化 2 6】



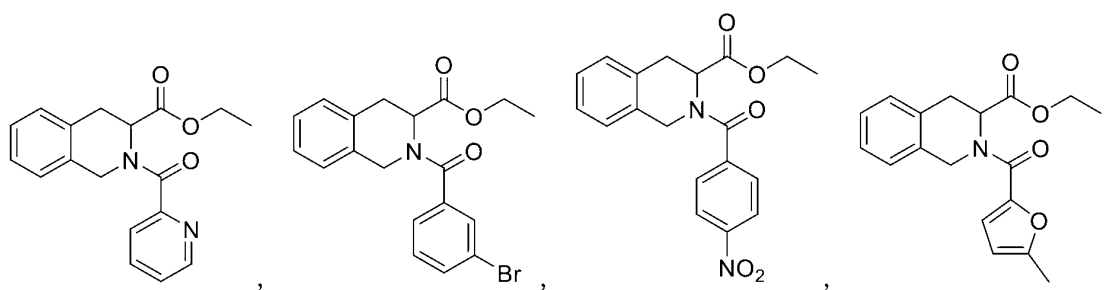
10



20

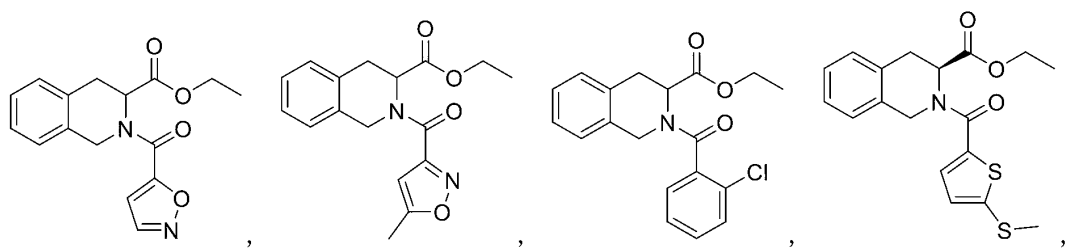


30

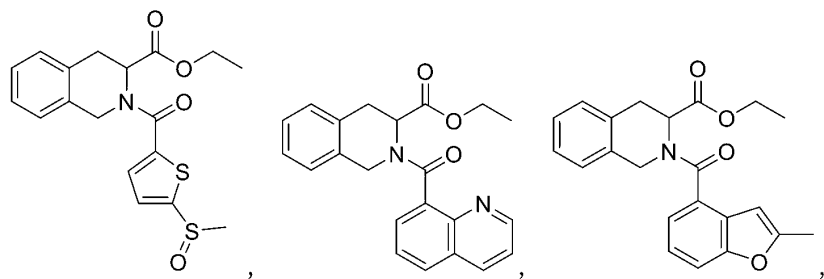


40

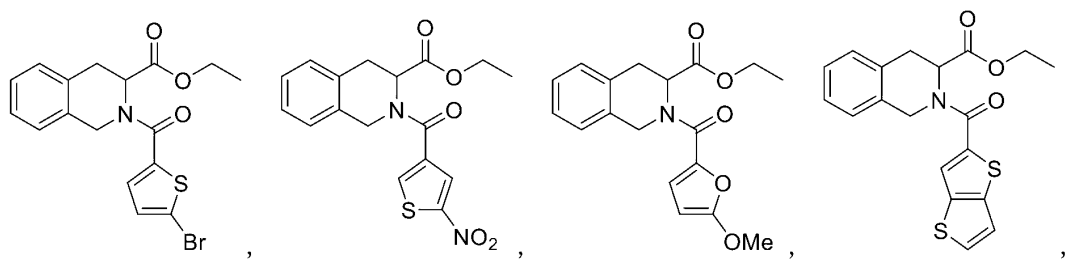
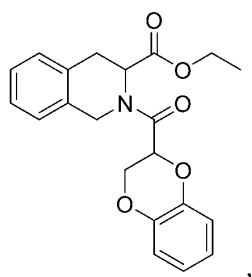
50



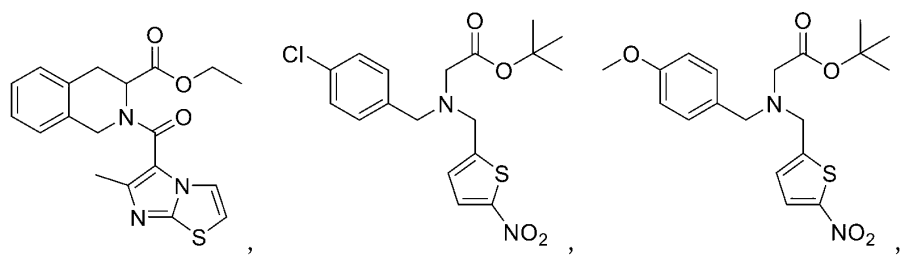
10



20

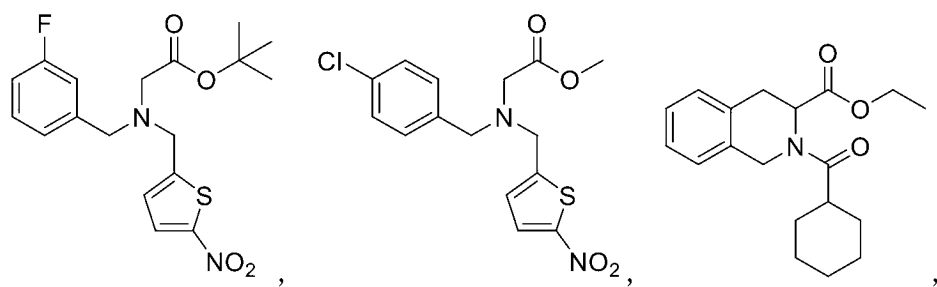


30

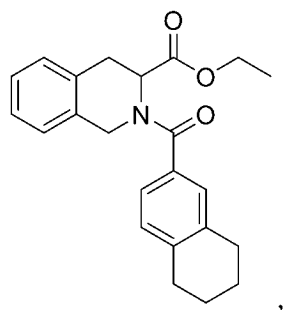


40

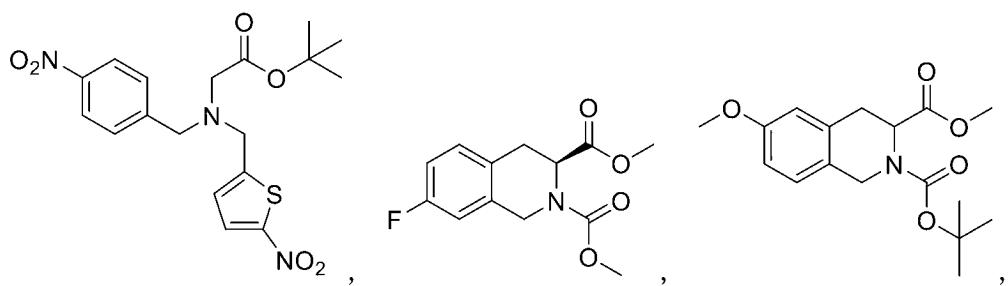
50



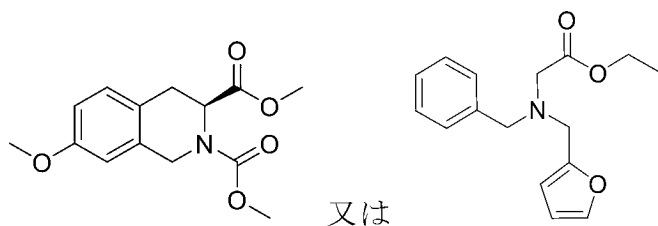
10



20



30



【0194】
から選択されない。

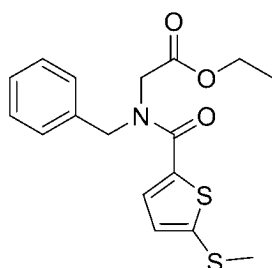
【0195】

いくつかの実施形態では、及び本発明の化合物それ自体に関して、式（I）の化合物は、
【0196】

40

50

【化 27】



10

【0197】

ではない。

【0198】

しかし、上に同定する化合物それ自体は、本発明の産物ではない。それにもかかわらず、このような化合物は、本明細書に記載する方法及び医学的使用／治療的症状において使用し得る。

【0199】

本発明の化合物が、1又は2以上のキラル中心を含む場合、化合物は、存在する可能性があり、純粋なエナンチオマー若しくはジアステレオマーの形態として、又はラセミ混合物として単離し得ることが理解される。したがって、本発明は、本発明の化合物の、可能な任意のエナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ化合物又はこの混合物を含む。したがって、式(I)の化合物は、ラセミ混合物において、又は単一のエナンチオマー、すなわち：

20

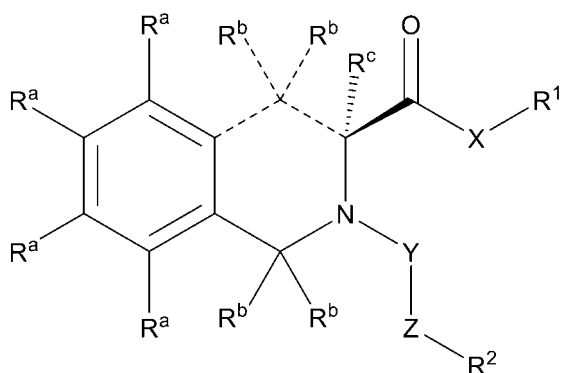
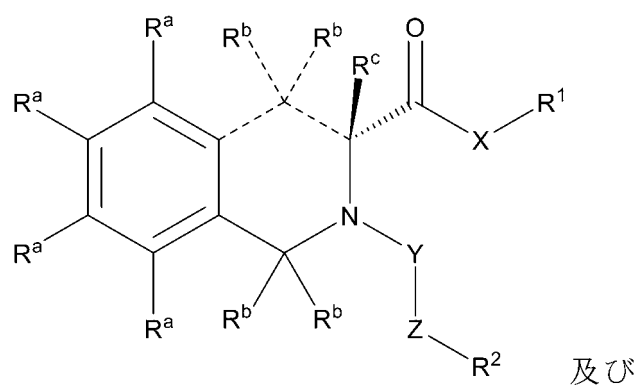
【0200】

30

40

50

【化 2 8】



【0 2 0 1】

として使用し得る。

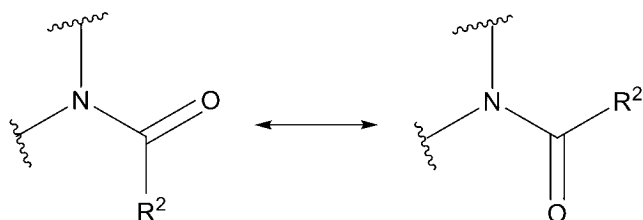
【0 2 0 2】

式（I）の化合物は、回転異性体形態を有し得るか、又は回転活性を有さないことがある。回転異性体形態は、緩く回転する形態及び速く回転する形態を含む。いくつかの好ましい実施形態では、式（I）の化合物の速く回転する形態が、好ましい。例えば、以下である。

30

【0 2 0 3】

【化 2 9】



【0 2 0 4】

式（I）の化合物又はこの塩は、2つの化学化合物が、2原子間の水素原子の交換により、共有結合を形成するいずれかと容易に相互変換可能な、互変異性の現象を示し得る。互変異性化合物が、相互に移動平衡で存在するため、これらは、同一の化合物の異なる異性体形態であると考えられ得る。本明細書における式図が、可能な互変異性形態のうちの1つのみを表し得ることが理解される。しかしまた、本発明は、任意の互変異性形態を包

50

含し、式図において利用する互変異性形態のいずれか1つであっても制限するべきではないことが理解される。本明細書における式図は、可能な互変異性形態の1つのみを表すことがあり、本明細書は、本明細書において図示するのに好都合な形態だけでなく、描かれる化合物のすべての可能な互変異性形態を包含することが理解される。したがって、本発明による式(I)の化合物は、互変異性体を包含する(ケト・エノール及びアミド・イミド酸の形態を含む)。

【0205】

したがって、1つの互変異性体として本明細書に示す構造は、他の互変異性体を含むことをも意図する。

【0206】

化合物は、本明細書における定義の節に定義するように、体内で式(I)の化合物に変換するプロドラッグの形態、並びに塩、水和物及び溶媒和物の形態で使用し得る。

【0207】

本発明の化合物は、SR8278と比較して向上したREV-ERB阻害活性を典型的に有する。この阻害活性は、適切な任意の手段、例えば、当技術分野で公知の従来の手段及び／又は本明細書に記載の方法により測定し得る。本発明の文脈において、REV-ERB阻害活性が向上した化合物に言及する場合、化合物により、REV-ERB活性が、対照REV-ERB阻害化合物、例えばSR8278を使用して得られるREV-ERB活性における低下よりも少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%低下することを意味することが理解され得る。典型的には、REV-ERB活性は、少なくとも40%、少なくとも50%、好ましくは、少なくとも70%、より好ましくは、少なくとも80%、さらにより好ましくは、少なくとも90%以上、対照REV-ERB阻害化合物、例えばSR8278を使用して得られるREV-ERB活性における低下と比較して低下する。

【0208】

REV-ERB阻害活性が向上した化合物に言及する場合、前記化合物が、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍又はこれ以上、対照REV-ERB阻害化合物、例えばSR8278と比較して、REV-ERB活性の阻害において有効であることを意味することが理解され得る。言い換えれば、改善REV-ERBアンタゴニストによるREV-ERBの阻害は、対照REV-ERB阻害化合物、例えばSR8278によるREV-ERB活性の阻害よりも少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍又はこれ以上、優れている。典型的には、改善REV-ERB阻害化合物は、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍又はこれ以上、対照REV-ERB阻害化合物、例えばSR8278と比較して、REV-ERB活性の阻害において有効である。

【0209】

本発明の低分子は、標的タンパク質分解キメラ(PROTAC又はPROTAC試薬とも呼ばれる)の形態で使用し得る。PROTACは、標的タンパク質とユビキチンリガーゼを同時に結合させて、標的のユビキチン化及び分解を可能とする異種二機能性低分子である。より詳細には、PROTAC試薬は、典型的に、標的タンパク質(本発明の場合は、REV-ERB)のリガンド及びE3リガーゼ認識ドメインのリガンドを含む。このようなPROTACの使用により、E3リガーゼをPROTAC結合REV-ERBに動員して、ユ

10

20

30

40

50

ビキチンの E3 リガーゼ複合体から標的タンパク質（本発明の場合は、REV-ERB）への移行を誘導する。PROTAC が標的のユビキチン化を十分な程度誘導すると、この PROTAC はプロテアソームにより認識及び分解される。

【0210】

非限定的な例として、PROTAC 試薬は、E3 リガーゼのリガンドを本明細書に記載の低分子阻害物質にリンカーを介してコンジュゲートさせることにより生成することができる。好ましい実施形態では、PROTAC 試薬は、本発明の低分子阻害物質にリンカーを介して連結する、E3 RING Cullin リガーゼのフォンヒッペル・リンドウタンパク質（VHL、von Hippel Lindau）又は CRL4 E3 RING Cullin リガーゼ複合体の一部である、セレブロンのリガンドを含む。

10

【0211】

変異体配列

少なくとも 80% の配列同一性は、少なくとも 82%、少なくとも 84%、少なくとも 86%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 及び 100% の配列同一性（本明細書に提示する、ありとあらゆる配列及び／又は本明細書に提示する、ありとあらゆる配列番号に対する）を含む。

【0212】

多様な任意の配列アラインメント方法は、包括的方法、個別的方法及びハイブリッド法、例えば、セグメントアプローチ法等をこれらに限定することなく含む。パーセント同一性を判定するために使用することができる。パーセント同一性を判定するプロトコルは、当業者の範囲内における日常的手順である。包括的方法では、分子の初めから終わりまでの配列を整列させ、それぞれの残基対のスコアを加算することにより、及びギャップペナルティを課すことにより最良のアラインメントを判定する。非限定的な方法としては、例えば、CLUSTAL W、例えば、Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22 (22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994) を参照；及び反復改良、例えば、Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996) を参照、が挙げられる。個別的方法では、入力したすべての配列に共有される 1 つ又は 2 つ以上の保存モチーフを同定することにより配列を整列させる。非限定的な方法としては、例えば、Match-box、例えば、Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992) を参照；Gibbs sampling、例えば、C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262 (5131) Science 208-214 (1993) を参照；Align-M、例えば、Ivo Van Walle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20 (9) Bioinformatics:1428-1435 (2004) を参照、が挙げられる。したがって、パーセント配列同一性は、従来の方法により判定する。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Biol. 48: 603-16, 1986 及び Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992 を参照されたい。

20

30

40

【0213】

上記に提供する特定の配列の変異体は、変異体配列と上記に提供する特定の参照配列との間で異なるヌクレオチド又はアミノ酸の数を列挙することにより代替的に定義することができる。したがって、一実施形態では、配列は、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下のヌクレオチドの位置、例えば、1 以下のヌクレオチドの位置で上記に提供する特定の配列と異なるヌクレオチド配列を含む（又はからなる）ことができる。保存的置換が好ましい。

50

【0214】

本明細書に記載するバリエーション核酸分子及びペプチドは、典型的に、対応する分子の活性をさらに保持する。したがって、例えば、本発明のバリエーションREV-ERB分子は、E4bp4の発現を阻害する野生型REV-ERBの能力を保持する。バリエーション分子は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、最大100%までの対応する野生型配列の活性を保持し得る。これは、本明細書に記載する他の任意のバリエーションにも等しく適用する。

【0215】

本発明の化合物は、標識化（又はタグ化）してもよい。適切な任意の標識を使用することができる。適した標識は、当分野において公知である。

【0216】

Notchリガンド

Notchシグナル伝達経路は、T細胞の発生の促進及び付随するB細胞の発生の抑制と主に関連する。哺乳動物は、4種のNotch受容体-Notch1、Notch2、Notch3及びNotch4を有し、このすべては、ヘテロ2量体の1回膜貫通タンパク質である。哺乳動物は、2種の標準的Notchリガンド-デルタ（Delta）型及びジャグド（Jagged）型を有し、これらはまとめてDSLリガンドとして知られる。3つのデルタ様リガンド（DLL）、DLL1、DLL3及びDLL4、並びに2つのジャグド（JAG）リガンド、JAG1及びJAG2が存在する。DLL及びJAGリガンドは、次のドメイン：NotchリガンドのN末端のモジュール（MNNL）ドメイン及びDelta/Serrate/Lag-2（DSL）ドメインを典型的に含み、これらはともに多数のEGF反復を有する。DLL3は、6つのEGF反復を含む。DLL1及びDLL4は、8つのEGF反復を含む。JAG1及びJAG2は、16のEGF反復を含む。また、多数の非標準的リガンドが存在し、これらは、膜結合型又は分泌型であり得る。

【0217】

本明細書において明示的な記述がない限り、本明細書におけるNotchリガンドへの言及は、任意のNotchリガンド、例えば、Notch1、Notch2、Notch3及び／又はNotch4のリガンド、好ましくは、少なくともNotch1のリガンドへの言及である。ヒトNotch1のタンパク質配列は、配列番号10に示す（GenBank受託番号CR457221、バージョンCR457221.1）。典型的には、本発明における使用のNotchリガンドは、標準的Notchリガンドである。いくつかの好ましい実施形態では、Notchリガンドは、DLL、より好ましくはDLL4である。ヒトDLL4のタンパク質配列は、配列番号8に示す（GenBank受託番号AF253468、バージョンAF253468.1）。

【0218】

また、本明細書におけるNotchリガンドへの言及は、前記断片が、Notch結合及びこの断片が由来するNotchリガンドの賦活活性を保持する条件で、この断片を包含する。本発明における使用に適するNotchリガンドの断片は、本発明者らにより、これまでに記載されている（その全体を参照により本明細書に組み込むPCT/GB2018/050818、特には15及び16頁並びに実施例を参照）。Notchリガンド断片の好ましい例としては、Notchリガンド（N-EGF1）及びNotchリガンド（N-EGF2）、例えば、DLL4（N-EGF1）及びDLL4（N-EGF2）が挙げられる。

【0219】

或いは、又は加えて、Notchリガンド、この断片、又はNotchリガンド、例えばDLL4の作用（例えば、機能／活性）を模倣する分子は、リガンド／断片／ミメティックのNotch受容体に対する親和性を変化させ、典型的には上昇させるアミノ酸の変異のような修飾を含み得る。このような修飾を同定するための技術は、当技術分野において公知である。例えば、Notchリガンド／断片／ミメティックの親和性を上昇させるアミノ酸は、酵母表面提示を使用して同定することができる。また、このような修飾は、

10

20

30

40

50

本発明者らにより、これまでに記載されている（この全体を参照により本明細書に組み込むPCT/GB2018/050818、特に16頁を参照）。いくつかの好ましい実施形態では、本発明のDLL4リガンド、この断片又はミメティックは、アミノ酸の置換、G28S、F107L及びL206P、より好ましくはG28S、F107L、N118I、I143F、H194Y、L206P及び／又はK215Eを含む。

【0220】

非限定的なさらなる例として、DLL4の機能性断片は、完全長DLL4の少なくとも残基65～114及び179～219を含み、好ましくは、これらをNotchリガンドとの相互作用を可能とする正しい立体構造で保持する。

【0221】

加えて、本発明は、Notchリガンドの作用（例えば、活性／機能）を模倣する分子（本明細書においてミメティックとも呼ぶ）の使用を包含する。例えば、所望のNotchリガンド（例えばDLL4）の作用を模倣する、ペプチド、ステーブルペプチド、ペプチド及びペプチドミメティックの使用を、本発明により包含する。ペプチドミメティックは、天然ペプチドと関連する安定性及びバイオアベイラビリティに関してペプチドに対して利点を有し得る。ペプチドミメティックは、生物学的機能のために設計した親ペプチドの主鎖又は側鎖の修飾を有し得る。ペプチドミメティックのクラスの例としては、ペプチド及びβ-ペプチド、並びにD-アミノ酸を組み込むペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0222】

合成ペプチド及びペプチドミメティック（例えば、ペプチド）を生成するための方法は、標準的及び非標準的Notchリガンドの配列のように、当技術分野において公知である。したがって、所望のNotchリガンドの作用を模倣する、適する分子を、公知の技術を使用し、公知のNotchリガンド配列に基づいて生成することは、当業者にとって日常的である。非限定的な例として、ペプチドミメティックは、DLL4への結合に関与することが知られているNotch（例えばNotch1）の鍵となる残基、例えば、Notch（Notch1）の残基415（E415）、418（L418）、420（A420）、421（N421）、422（P422）、424（E424）、425（H425）、436（F436）、447（P447）、448（R448）、450（E450）、452（D452）、469（D469）、477（I477）、480（P480）の1又は2以上、又はこれらの任意の組合せと相互作用するように設計し得る。

【0223】

本発明の方法は、NK細胞の産生又はこの作用を模倣する分子を増加させることが可能な、特に、本明細書に開示するようにREV-ERB活性を阻害する本発明の化合物、又はE4bp4の翻訳後修飾の変化を生じ、このため、本明細書に開示するようにE4bp4活性を上昇させる化合物と相乗的に作用し得る、任意のNotchリガンド又はこの断片の使用を包含し得る。

【0224】

E4bp4が、Notch1遺伝子の制御領域にインビボで直接結合し、このためNotchの転写制御を増強し得ること、及びNotch1発現E4bp4^{-/-}マウスが、著しく減少することを本発明者らは、これまでに示した。これを受けて、本発明者らは、NotchリガンドのマウスHSC及び超早期前駆細胞への短期的曝露により、重要な転写因子E4bp4の非存在下であっても、NK細胞の発生が促進し得ることを見出した。さらには、本発明者らは、Notchリガンドのデルタ様リガンド4（DLL4）が、NK細胞増殖の刺激において特に有効であることを示した。

【0225】

したがって、本発明は、本明細書に記載するREV-ERBの作用を阻害する化合物の使用と組み合わせた、HPCのNotchリガンドへの曝露によるNK細胞の増殖に関する。本発明のエキスポ又はインビトロでの方法では、これは、Notchリガンドの存在下でHPCを培養するステップを含み得る。インビボ方法では、これは、化合物をNo

10

20

30

40

50

Notchリガンドとともに投与するステップを含み得る。好ましい実施形態では、Notchリガンドは、DLL4、又はDLL4の機能を保持する、この断片若しくはバリエーションである。

【0226】

バリエーション配列は、REVERBと関連して本明細書において記載する。この開示は、とりわけ、Notchリガンドのバリエーション及びこの断片／ミメティックに等しく及び独立的に適用する。本発明のバリエーションNotchリガンド／断片／ミメティックは、典型的には、対応する本発明のNotchリガンド／断片／ミメティックの活性を少なくとも保持する。したがって、例えば、本発明のバリエーションDLL4リガンド又はこの断片は、Notch1に結合し、及び／又はNK細胞産生を増強する、対応するDLL4分子の能力を保持する。いくつかの実施形態では、バリエーションDLL4リガンド／断片／ミメティックは、対応する非修飾DLL4リガンド／断片／ミメティックよりも優れた活性を有する。このようなバリエーションは、本発明者らにより、これまでに記載されている（その全体を参照により本明細書に組み込むPCT/GB2018/050818、特に17及び18頁を参照）。非限定的な例として、Notchリガンド／この断片／ミメティック／バリエーション（例えば、DLL4リガンド／この断片／ミメティック／バリエーション）は、1 μ M未満、900 nM未満、800 nM未満、700 nM未満、600 nM未満、500 nM未満、400 nM未満、300 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、90 nM未満、80 nM未満、70 nM未満、60 nM未満、50 nM未満又はこれ以下、好ましくは、500 nM未満、400 nM未満、300 nM未満又はこれ以下のNotch1への結合についてのK_D値を有し得る。いくつかの実施形態では、バリエーションNotchリガンド／断片／ミメティック（例えば、バリエーションDLL4リガンド／断片／ミメティック）は、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍又はこれ以上、対応する非修飾Notchリガンド／断片／ミメティックに対して、NK細胞数を増加させるか、又はNK細胞産生の増加を生じさせ得る。バリエーションNotchリガンド／断片／ミメティック（例えば、バリエーションDLL4リガンド／断片／ミメティック）は、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%又はこれ以上、対応する非修飾DLL4リガンド／断片／ミメティックと比較して、NK細胞数を増加させ得る。

【0227】

本発明のNotchリガンド／断片／ミメティックは、標識（又はタグ化）し得る。任意の適切な標識を使用し得る。適する標識は、当技術分野において公知である。

【0228】

E4bp4の翻訳後修飾

本発明者らは、E4bp4の翻訳後修飾の変化により、E4bp4活性が高まり得ることをこれまでに示した（その全体を参照により本明細書に組み込むPCT/GB2018/050818、特に33～36頁及び実施例1～5を参照）。その上、E4bp4活性が翻訳後修飾の変化により高まると、（本明細書に定義するように）NK細胞数が増加する。

【0229】

したがって、本発明の方法は、個体／患者から得られた、造血前駆細胞（HPC）を含む試料を、E4bp4の翻訳後修飾の変化を生じる化合物に接触させ、これによりE4bp4活性の上昇を生じるステップをさらに含み得る。したがって、本明細書に記載するようにE4bp4の翻訳後修飾を変化させる化合物は、REVERB活性を阻害する本発明の方法及び化合物と組み合わせて使用し得る。この組合せは、本明細書に記載するようにNotchリガンド（例えばDLL4）の使用と組み合わせて、さらに使用し得る。

【0230】

同様に、E4bp4の翻訳後修飾を変化させるか若しくはこれに影響する化合物は、したがって、患者におけるNK細胞の産生を増加させて、E4bp4活性を上昇させるために、又はそれを必要とする患者におけるNK細胞数を増加させることによる治療の方法における使用のために、REV-ERB活性を低下させることによるE4bp4発現の増加に関する本明細書に開示する効能、及びNctchリガンドの存在下でHPCを培養することによるNK細胞数の増加に関する本明細書に開示する任意の効能とともに、本発明に従って使用し得る。

【0231】

NK細胞数を増加させる方法、REV-ERBの作用を阻害する化合物の文脈においてNK細胞を増殖させる方法、並びに／又はNctchリガンド、前記化合物及び集団に関する前記方法及び治療的症状により産生された増殖NK細胞集団に関連する本明細書における開示のいずれかは、とりわけ、E4bp4活性を上昇させてNK細胞数を増加させる開示の方法に適用する。非限定的な例として、フィーダー細胞層、増殖因子及び／又は他の培養条件並びに治療する疾患は、本明細書に開示する、REV-ERB阻害に関する翻訳後修飾の態様及び／又はNctchリガンドの態様に関連して、同一であり得る。REV-ERB阻害化合物、Nctchリガンド及び／又はE4bp4翻訳後修飾因子は、同時に、別々に又は逐次、使用し得る。E4bp4の翻訳後修飾を変化させる化合物を、REV-ERBの作用を阻害する化合物と組み合わせて使用する場合、典型的には、試料をREV-ERB阻害化合物に接触させた後、翻訳後修飾因子に接触させる。Nctchリガンドをも使用する場合、典型的には、E4bp4翻訳後修飾因子は、REV-ERB阻害化合物及びNctchリガンドの後に使用し、好ましくは、REV-ERB阻害化合物は、ともに使用するか、又はより好ましくは、REV-ERB阻害化合物は、（本明細書に記載するように）Nctchリガンドの前に使用する。

【0232】

翻訳後修飾の種類

前記方法は、E4bp4活性の上昇を生じる翻訳後修飾のいかなる変化をも包含する。翻訳後修飾の非限定的な例としては、リン酸化、SUMO化、疎水基の付加（例えば、ミリストイル化、パルミトイル化）、共同因子の付加、小さな化学基の付加（例えば、アシル化、アルキル化、アミド化、グリコシル化）、糖化、カルバミル化、カルボニル化、化学修飾（例えば、アミド分解）及び／又は構造変化が挙げられる。典型的には、本発明による翻訳後修飾の変化により、野生型（未修飾）E4bp4内の1又は2以上のリン酸化部位におけるリン酸化の減少、及び／若しくは野生型（未修飾）E4bp4内の1又は2以上のSUMO化部位におけるSUMO化の減少、又はこれらの組合せが生じる。発明者らによりこれまでに示したように（その全体を参照により本明細書に組み込むPCT/GB2018/050818、特には33～36頁及び実施例1～5を参照）、野生型（未修飾）E4bp4は、残基K10、K116、K219、K337及び／若しくはK394若しくはこれらに対応する残基の1若しくは2以上、又はこれらの任意の組合せにおいて典型的にSUMO化される。典型的には、野生型（未修飾）E4bp4は、少なくとも残基K219（又は対応する残基）においてSUMO化される。或いは、又は加えて、野生型（未修飾）E4bp4は、残基S286、S301及びS454若しくはこれらに対応する残基、又はこれらの任意の組合せにおいて典型的にリン酸化される。したがって、いくつかの実施形態では、E4bp4の翻訳後修飾を変化させる化合物は、残基K219（又はこれに対応する残基）においてSUMO化を減少、阻害若しくは切断し、及び／又は残基S286、S301及びS454（又は対応する残基）若しくはこれらの任意の組合せにおいてリン酸化を減少、阻害若しくは切断する。したがって、本発明によれば、化合物は、（a）E4bp4の残基K10、K116、K219、K337及び／若しくはK394若しくはこれらに対応する残基の1若しくは2以上、又はこれらの任意の組合せにおいてSUMO化を減少させ、及び／又は残基S286、S301及び／若しくはS454若しくはこれらに対応する残基の1若しくは2以上、又はこれらの任意の組合せにお

いてリン酸化を減少させるために使用し得る。

【0233】

E4bp4の翻訳後修飾を変化させて、E4bp4の活性を上昇させるか、又はこのE4bp4の翻訳後修飾に影響することが可能な任意の化合物は、本発明に従って使用し得る。いくつかの実施形態では、前記化合物は、野生型（未修飾）E4bp4において生じる、リン酸化及び／又はSUMO化を阻害、減少又は切断する。任意の適切なキナーゼ阻害物質は、E4bp4のリン酸化を阻害、減少又は切断するために使用し得る。適するキナーゼ阻害物質は、当技術分野において公知であり、これらの選択は、当業者にとって日常的である。例えば、E4bp4をリン酸化するキナーゼの現在の理解に基づいて、ホスホイノシチド依存タンパク質キナーゼ-1（PK1）及び／又はカゼインキナーゼ1イプシロン（CK1イプシロン）の阻害物質を使用することは、適切であり得る。適するキナーゼ阻害物質の非限定的な例としては、4-（4-（2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イル）-5-ピリジン-2-イル-1H-イミダゾール-2-イル）ベンズアミド（D4476）及び4,5,6,7-テトラブプロモ-2-アザベンズイミダゾール,4,5,6,7-テトラブプロモベンゾトリアゾール（TBB）が挙げられる。

【0234】

E4bp4活性の上昇

E4bp4活性（例えば、E4bp4の翻訳後修飾によりもたらされるもの）の上昇は、対照に対して測定し得る。したがって、増殖NK細胞集団であるNK先駆体又は前駆体細胞の試料、又は本発明に従って治療する個体／患者から得られた試料におけるE4bp4の活性は、対照におけるE4bp4の活性と比較し得る。活性は、適切な条件、例えば、E4bp4の任意の下流標的の発現の増加により定量し得る。適切な任意の技術又は方法を、E4bp4活性を定量するために使用し得る。適する技術は、当技術分野において公知であり、例えば、レポーター遺伝子の発現を定量するためのルシフェラーゼアッセイが挙げられる。

【0235】

典型的には、対照は、本発明に従って処理されたことがない、等価な集団又は試料である。例えば、化合物を使用してE4bp4の翻訳後修飾を変化させるか又はこれに影響させる例では、対応する対照は、E4bp4の翻訳後修飾を変化させるか又はこれに影響させるために、いかなる化合物も加えていない、集団又は試料であり得る。別の例として、化合物を使用してREV-ERBの作用を阻害する例では、対応する対照は、REV-ERBの作用を阻害するために、いかなる化合物も加えていない、集団又は試料であり得る。別の例として、化合物を使用してREV-ERBの作用を阻害し、化合物を使用してE4bp4の翻訳後修飾を変化させるか又はこれに影響させる例では、対応する対照は、REV-ERBの作用を阻害するため、又はE4bp4の翻訳後修飾を変化させるか若しくはこれに影響させるために、いかなる化合物も加えていない、集団又は試料であり得る。

【0236】

対照は、本発明に従って治療された異なる個体、又は治療前の同一の個体から得られた試料であり得る。公知の方法を含む、NK細胞のエクスピボでの増殖のための従来の方法は、本発明による対照方法であると考えられ得る。

【0237】

本発明の文脈では、E4bp4活性の上昇に言及する場合、E4bp4の活性が、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍又はこれ以上、対照に対して上昇することを意味すると理解され得る。典型的には、E4bp4活性は、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも

3 倍又はこれ以上、対照と比較して上昇する。E 4 b p 4 活性は、NK細胞数の増加の判定において、間接的に測定し得る。したがって、NK細胞数は、少なくとも1.5 倍、少なくとも2 倍、少なくとも2.1 倍、少なくとも2.2 倍、少なくとも2.3 倍、少なくとも2.4 倍、少なくとも2.5 倍、少なくとも2.6 倍、少なくとも2.7 倍、少なくとも2.8 倍、少なくとも2.9 倍、少なくとも3 倍、少なくとも4 倍、少なくとも5 倍、少なくとも6 倍、少なくとも7 倍、少なくとも8 倍、少なくとも9 倍、少なくとも10 倍又はこれ以上、対照に対して増加し得る。典型的には、NK細胞数は、少なくとも2 倍、少なくとも2.1 倍、少なくとも2.2 倍、少なくとも2.3 倍、少なくとも2.4 倍、少なくとも2.5 倍、少なくとも2.6 倍、少なくとも2.7 倍、少なくとも2.8 倍、少なくとも2.9 倍、少なくとも3 倍又はこれ以上、対照と比較して増加する。

10

【0238】

E 4 b p 4 の活性は、定量的及び／又は定性的分析により判定することがあり、直接的又は間接的に測定することがある。対照に対するE 4 b p 4 の活性は、適切な任意の技術を使用して判定し得る。適する標準的技術は、当技術分野において公知である。

【0239】

E 4 b p 4 の活性は、対照と比較して少なくとも6 時間、少なくとも12 時間、少なくとも24 時間、少なくとも30 時間、少なくとも36 時間、少なくとも42 時間、少なくとも48 時間、少なくとも54 時間、少なくとも60 時間、少なくとも72 時間、少なくとも4 日間、少なくとも5 日間、少なくとも6 日間、少なくとも1 週間、上昇し得る。好ましくは、E 4 b p 4 の活性は、少なくとも12～72 時間、上昇する。典型的には、これは、E 4 b p 4 を翻訳後修飾する化合物の最後の投与に対して評価する。

20

【0240】

E 4 b p 4 の活性は、対照と比較して少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40 又はこれ以上の培養細胞の継代の間、上昇し得る。E 4 b p 4 の活性は、無制限に上昇し得る。

【0241】

NK細胞を増殖させる方法

本発明は、NK細胞集団を増殖させるための方法に関する。この方法は、インビトロ、インビボ又はエクスピボであり得る。前記方法は、(本明細書に記載するように)REV-E RBの作用を阻害する化合物とともにHPCを含有させるステップ、及び前記細胞を増殖させてNK細胞集団を産生するステップを含む。本発明の方法により、NK細胞の迅速な増殖が可能となり、その培養に必要とされる時間が低減し、これにより枯渇のリスクが低減し、患者に輸注した場合にNK細胞の細胞傷害性が増強する。

30

【0242】

前記方法をインビボで実行した場合、前記方法は、本明細書に記載の治療的方法となる。このような実施形態では、本発明の治療適応及び適用に関する、本明細書におけるすべての開示は、前記方法に適用可能である。

【0243】

典型的には、本発明の方法は、エクスピボである。したがって、本発明は、(a) 個人から得られた試料を含むNK先駆細胞を培養するステップと、(b) 前記試料をREV-E RBの作用を阻害する化合物に接触させるステップと、(c) 前記細胞をインビトロで増殖させてNK細胞集団を産生するステップとを含むNK細胞集団を増殖させるためのエクスピボでの方法を提供する。化合物は、本明細書に記載の本発明の任意のREV-E RB阻害化合物であり得る。典型的には、前記化合物により、本明細書に記載するようにREV-E RB活性が減少することによってE 4 b p 4 発現が増加する。好ましい実施形態では、化合物は、本明細書に定義する式(II)を有し、より好ましくは、化合物は、本明細書に定義する式(III)を有し、さらにより好ましくは、化合物は、本明細書に定義する式(IV)を有し、さらにより好ましくは、化合物は、本明細書に定義する式(V)を有する。本発明の方法において使用し得る特定の化合物の例は、本明細書に記載し、化合物7

40

50

及び 11 は、特に好ましい。

【0244】

さらなる外的刺激、例えば、増殖因子及び／又はサイトカインは、NK細胞の産生をさらに増強するために使用し得る。適する外的刺激の非限定的な例としては、IL-7、IL-15、Flt3L、幹細胞因子（SCF）、トロンプオエチン（TPO）、IL-3 及び／若しくはIL-6、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。いくつかの好ましい実施形態では、IL-7、Flt3L 及び／若しくはSCF、又はこれらの任意の組合せを使用する。より好ましくは、IL-7、Flt3L 及びSCFを使用する。

【0245】

非限定的な例として、IL-7 は、約1 ng/ml～約100 ng/ml、約1 ng/ml～約50 ng/ml、約1 ng/ml～約25 ng/ml、約1 ng/ml～約10 ng/ml又はこれ以下の濃度で使用し得る。いくつかの実施形態では、IL-7 は、約50 ng/ml、約25 ng/ml、約20 ng/ml、約15 ng/ml、約10 ng/ml又は約5 ng/ml、好ましくは、約10 ng/mlの濃度で使用する。非限定的な例として、Flt3L は、約1 ng/ml～約100 ng/ml、約1 ng/ml～約50 ng/ml、約1 ng/ml～約25 ng/ml、約1 ng/ml～約10 ng/ml又はこれ以下の濃度で使用し得る。いくつかの実施形態では、Flt3L は、約50 ng/ml、約25 ng/ml、約20 ng/ml、約15 ng/ml、約10 ng/ml又は約5 ng/ml、好ましくは、約10 ng/mlの濃度で使用する。非限定的な例として、SCF は、約1 ng/ml～約200 ng/ml、約1 ng/ml～約150 ng/ml、約1 ng/ml～約100 ng/ml、約1 ng/ml～約50 ng/ml又はこれ以下の濃度で使用し得る。いくつかの実施形態では、SCF は、約150 ng/ml、約125 ng/ml、約120 ng/ml、約110 ng/ml、約100 ng/ml、約90 ng/ml、約80 ng/ml又は約75 ng/ml、好ましくは、約100 ng/mlの濃度で使用する。

【0246】

非限定的な例として、IL-15 は、約1 ng/ml～約100 ng/ml、約1 ng/ml～約50 ng/ml、約1 ng/ml～約40 ng/ml、約1 ng/ml～約30 ng/ml、約1 ng/ml～約20 ng/ml、約1 ng/ml～約10 ng/ml又はそれ以下の濃度で使用し得る。いくつかの実施形態では、IL-15 は、約50 ng/ml、約40 ng/ml、約35 ng/ml、約30 ng/ml、約25 ng/ml、約20 ng/ml又は約10 ng/ml、好ましくは、約30 ng/mlの濃度で使用する。

【0247】

或いは、又は加えて、HPC は、適する支持／間質細胞又は細胞層上又はこれとともに培養し得る。任意の適切な間質細胞を使用することができ、OP9間質細胞及び／又はEL08-1D2間質細胞を含むがこれらに限定されない。

【0248】

いくつかの実施形態では、エキスピボでの方法は、典型的には、実質的に一定の培養条件下で、患者から得られた試料中のHPCを培養し、本発明の化合物に接触させ、増殖させてNK細胞集団を形成する単一の段階を含む。典型的には、これは、IL-3、IL-7、SCF、Flt3L 及び／又はIL-15、好ましくはこれらの因子のすべてのような因子とHPCをインキュベートするステップを含む。HPCはまた、好ましくは、EL08-1D2間質細胞などの、間質細胞／細胞層上、又は間質細胞／細胞層により培養する。

【0249】

いくつかの実施形態では、エキスピボでの方法は、2つの段階を含む。第1の段階は、リンパ球系産生段階であり、ここで患者から得られた試料中のHPCを培養する。典型的には、これは、リンパ球系産生に関連するサイトカイン及び増殖因子、例えば、Flt3L、IL-7 及び／又はSCFとHPCをインキュベートするステップを含む。この段階

10

20

30

40

50

は、少なくとも1日、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間又はそれ以上持続し得る。いくつかの好ましい実施形態では、この段階は、2日間持続する。エキスピボでの方法の第2の段階は、NK細胞増殖の段階である。典型的には、これは、培養したHSCを適した間質（支持）細胞層、例えば、OP9間質細胞に移すステップ並びにNK細胞発生と関連するサイトカイン及び増殖因子、例えば、IL-15により培養するステップを含む。本発明の化合物は、典型的に、この第2の段階の間に、好ましくは、この第2の段階の開始時に添加する。第2の段階は、残りのエキスピボでの培養期間（上記に定義するように）持続する。培養培地は、この第2の段階の間、必要に応じてたびたび交換して、NK細胞増殖を促進してもよい。この第2の段階は、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間又はこれ以上、持続し得る。いくつかの好ましい実施形態では、この段階は、少なくとも1週間、持続する。

【0250】

HPCを含む試料は、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間又はそれ以上エキスピボで培養することができる。典型的には、前記試料は、少なくとも9日間培養して増殖NK細胞集団を産生する。これらの培養期間は、エキスピボでの方法の全培養期間である。即ち、2つの段階がある場合、これらの期間は、全体（段階1に加えて段階2）である。NK細胞の産生のためのHPCの例となる培養スキームは、図2Aに提示する。

【0251】

本発明のREV-ERB阻害化合物は、試料中のHPCを単離して1週間以内、6日以内、5日以内、4日以内、3日以内、2日以内、1日以内、又はNK細胞先駆体を単離した同日にHPCを含む試料に添加することができる。典型的には、これは、試料が患者から得られた同日である。好ましくは、本発明の化合物は、試料中のHPCを単離して2日以内、さらにより好ましくは、HPCの単離後2日目に試料に添加する。いくつかの実施形態では、化合物は、複数の時点で、例えば、培養培地を交換するときに加える。非限定的な例として、本発明の化合物は、HPCを単離後2日に加え、次いで、HPCの単離後5日目に再び加え得る。本開示は、例えば、本明細書に記載する、1段階及び2段階方法、並びに／又は本明細書に記載する、Notchリガンド及び／若しくはE4bp4の翻訳後修飾を変化させる化合物をも使用する方法についての、本発明のすべての方法に適用する。

【0252】

適切な任意の濃度の本発明の化合物は、これが、本明細書に記載するようにREV-ERBの作用を阻害し、NK細胞集団の増殖において有用性を有するという条件で、使用し得る。非限定的な例として、本発明の任意の態様では、本発明の化合物は、約2～約20 μM 、約2～約15 μM 、約5～約15 μM 、約5～約14 μM 、約4～約13 μM 、約5～約12 μM 、約5～約11 μM 、又は好ましくは、約5～約10 μM の最終濃度で使用し得る。

【0253】

本発明者らは、Notchリガンド（例えばDLL4）及びREV-ERB阻害の使用を組み合わせると、NK細胞集団を増強し、エキスピボでの治療的使用に適する大量の機能性NK細胞の産生を、現在の方法よりも迅速に可能とするための強力な手段となることを、これまでに実証した。

【0254】

したがって、本発明では、NK細胞集団を増殖させるためのエキスピボでの方法であって、（a）個体／患者から得られた、HPCを含む試料を、（本明細書に記載する）RE

V-E R Bの作用を阻害する化合物とともに培養するステップと、(b) N o t c h リガンド(例えばD L L 4)の存在下で前記細胞を培養するステップと、(c) 前記細胞をインビトロで増殖させてN K細胞集団を産生させるステップとを含む、方法を提供する。ステップ(a)及び(b)は、同時発生的に又は任意の順序で実行し得る。例えば、ステップ(a)は、はじめに実行し、その後ステップ(b)を実行することがあり、これにより、細胞は、はじめにR E V-E R B阻害化合物に曝露され、次いで、N o t c h リガンドの存在下で培養される。或いは、ステップ(b)は、はじめに実行し、その後ステップ(a)を実行することがあり、これにより、細胞は、はじめにN o t c h リガンドの存在下で、次いで、R E V-E R B阻害化合物の存在下で培養される。或いは、ステップ(a)及び(b)は、同時発生的に実行することがあり、これにより、細胞は、R E V-E R B阻害化合物及びN o t c h リガンドの存在下で同時に培養される。

10

【0255】

いくつかの好ましい実施形態では、ステップ(a)をはじめに、その後ステップ(b)を実行することがあり、これにより、細胞は、はじめにR E V-E R B阻害化合物の存在下で、次いで、N o t c h リガンドの存在下で培養される。したがって、このような実施形態において、本発明では、N K細胞集団を増殖させるためのエキスピボでの方法であって、(a) 個体/患者から得られた、H P Cを含む試料を、(本明細書に記載する) R E V-E R Bの作用を阻害する化合物とともに培養するステップと、(b) N o t c h リガンド(例えばD L L 4)の存在下で前記細胞を培養するステップと、(c) 前記細胞をインビトロで増殖させてN K細胞集団を産生させるステップとを含む、方法を提供する。

20

【0256】

典型的には、N o t c h リガンドは、本明細書に記載するN o t c h リガンドである。好ましくは、N o t c h リガンドは、本明細書に記載する、D L L 4、又はD L L 4の機能を保持するこの断片である。

【0257】

N o t c h リガンド(例えばD L L 4)は、溶液中(例えば、培養培地中)に存在するか、又はH P Cを培養する容器をコーティングするために使用し得る。好ましくは、N o t c h リガンド(例えばD L L 4)は、H P Cを培養する容器をコーティングするために使用する。非限定的な例として、N o t c h リガンドを使用する、本発明の任意の態様では、N o t c h リガンド(例えばD L L 4)は、約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ~約 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ~約 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ~約 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ~約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 又はこれ以下の濃度で使用し得る。いくつかの実施形態では、N o t c h リガンド(例えばD L L 4)は、約 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は約 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは、約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用する。さらなる基質及び/又はリンカーは、N o t c h リガンド(例えばD L L 4)の培養容器の表面への付着を促進するために使用し得る。このような基質の例は、当技術分野において公知であり、例えば、ポリーラージンが挙げられる。

30

【0258】

上記のように、H P Cは、間質支持細胞若しくはフィーダー細胞、又はこの集団の存在下又は非存在下で培養し得る。N o t c h リガンドを使用するいくつかの好ましい実施形態では、細胞は、間質支持細胞又はこの集団の非存在下で培養する。

40

【0259】

いくつかの実施形態では、エキスピボでの方法は、典型的には、実質的に一定の培養条件下で(すなわち、方法のステップ(a)及び(b)を同時発生的に実行する)、個体/患者から得られた試料中のH P Cを培養し、本発明の化合物及びN o t c h リガンドに接触させ、増殖させてN K細胞集団を形成させる、単一の段階を含む。典型的には、これは、I L-3、I L-7、S C F、F l t 3 L及び/又はI L-15のような因子、好ましくは、このような因子のすべてとともにH P Cをインキュベートするステップを含む。H P Cは、間質細胞/細胞層、例えば、E L O 8-1 D 2 間質細胞の存在下又は非存在下で培養し得る。

50

【0260】

いくつかの実施形態では、エキスビボでの方法は、2つの段階（図2に示すスキームに類似する）を含む。第1の段階は、個体／患者から得られた試料中のHPCを培養する、リンパ系産生段階である。典型的には、これは、リンパ系産生と関連するサイトカイン及び増殖因子、例えば、Flt3L、IL-7及び／又はSCFとともにHPCをインキュベートするステップを含む。この段階は、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間又はこれ以上、持続し得る。いくつかの好ましい実施形態では、この段階は、2日間、持続する。

【0261】

この後に、NK細胞増殖の段階が続く。典型的には、これは、NK細胞の発生と関連するサイトカイン及び増殖因子、例えば、IL-15中で細胞を培養するステップを含み、培養したHSCを適する間質（支持）細胞層、例えば、OP9間質細胞に移すステップを含み得る。第2の段階は、（本明細書に定義する）残りのエキスビボでの培養期間持続する。培養培地は、第2の段階において必要に応じて交換して、NK細胞増殖を促進し得る。交換する前に培養培地中に存在する任意のREV-ERB阻害化合物、Notchリガンド及び／又はE4bp4の翻訳後修飾を変化させる化合物は、同一又は異なる濃度のいずれかで、新鮮培養培地とともに再び投与し得る。非限定的な例として、HPCの単離後2日に本発明の化合物を加え、HPCの単離後5日目に培地を交換する場合、化合物は、単離後5日目に、新鮮培地とともに再び投与し得る。

【0262】

いくつかの実施形態では、本発明のREV-ERB阻害化合物は、段階1（リンパ系産生）において、Notchリガンドは、第2の段階（NK細胞増殖）において加える。他の実施形態では、Notchリガンドは、段階1（リンパ系産生）において、REV-ERB阻害化合物は、第2の段階（NK細胞増殖）において加える。さらに他の実施形態では、REV-ERB阻害化合物とNotchリガンドの両方は、第1の段階（リンパ系産生）において加える。さらなる実施形態では、REV-ERB阻害化合物とNotchリガンドの両方は、第2の段階（NK細胞増殖段階）において加える。REV-ERB阻害化合物及びNotchリガンドを同一の段階（段階1又は段階2のいずれか）において加える場合、この段階は、さらに分割して、(i) REV-ERB阻害化合物をNotchリガンドの前に加え得るか、又は(ii) NotchリガンドをREV-ERB阻害化合物の前に加え得る。或いは、Notchリガンド及びREV-ERB阻害化合物は、同一の段階において同時に加え得る。図2Bでは、本発明のREV-ERB阻害化合物及びNotchリガンドの組合せの態様についての、種々の方法スキームのいくつかの実施形態を例示する。図2Bに含む投与のタイミングは、非限定的であり、適切な任意の投与タイミング、例えば、本明細書に記載するタイミングを使用し得る。いくつかの好ましい実施形態では、REV-ERB阻害剤は、段階1において（例えば、0日目又は2日目に）加え、Notchリガンドは、後に（例えば、2又は4日目にそれぞれ）加える。

【0263】

典型的には、REV-ERB阻害化合物は、第1の段階において加え、Notchリガンドは、第2の段階において、好ましくは、この第2の段階の開始時に加える。

【0264】

HPCを含む試料は、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間又はこれ以上、エキスビボで培養し得る。典型的には、前記試料は、少なくとも9日間培養して、増殖NK細胞集団を産生させる。このような培養期間は、エキスビボでの方法の総培養期間である。すなわち、2つの段階が存在する場合、このような期間は、総計期間（段階1足す段階2）である。

【0265】

本発明のREV-ERB阻害化合物は、試料中のHPCを単離して1週間以内、6日以

10

20

30

40

50

内、5日以内、4日以内、3日以内、2日以内、1日以内に、又はNK細胞先駆体を単離した同日に、HPCを含む試料に加える。典型的には、これは、患者から試料を得る同日である。好ましくは、本発明のREV-ERB阻害化合物は、試料中のHPCを単離して2日以内、例えば、HPCを単離した日に、試料に加える。最も好ましくは、本発明のREV-ERB阻害化合物は、HPCの単離後2日に、試料に加える。いくつかの実施形態では、化合物は、複数の時点で、例えば、培養培地を交換するときに加える。非限定的な例として、本発明の化合物は、HPCの単離後2日に加え、次いで、HPCの単離後5日目に再び加える。

【0266】

本発明のNotchリガンドは、試料中のHPCを単離して1週間以内、6日以内、5日以内、4日以内、3日以内、2日以内、1日以内に、又はNK細胞先駆体を単離した同日に、HPCを含む試料に加える。典型的には、これは、患者から試料を得る同日である。好ましくは、本発明のNotchリガンドは、試料中のHPCを単離して4日以内、例えば、HPCの単離後2日目に、試料に加える。最も好ましくは、本発明のNotchリガンドは、HPCの単離後2又は4日に、試料に加える。したがって、典型的には、Notchリガンドは、HPCの単離後4日に又はHPCの単離後4日から存在する。

【0267】

本発明の好ましい実施形態は、(i) HPCを単離する日に、REV-ERB阻害化合物及びNotchリガンドを試料に加えるステップ、(ii) HPCを単離する日に、REV-ERB阻害化合物を試料に加え、HPCの単離後2日に、Notchリガンドを試料に加えるステップ、又は(iii) HPCの単離後2日に、REV-ERB阻害化合物を試料に加え、HPCの単離後4日目に、Notchリガンドを試料に加えるステップを含み、選択肢(iii)は、特に好ましい。発明者らによりこれまでに実証したように、このような特定の条件により、REV-ERB阻害とNotchリガンドとの間の相乗作用が最大化され、このためNK細胞の増殖が最大化される。

【0268】

加えて、細胞は、(本明細書に記載する)さらなる外的刺激の存在下で、Notchリガンドと組み合わせて培養し得る。非限定的な例として、Notchリガンドは、IL-15とともに使用し得る。例えば、細胞は、はじめにNotchリガンドに、次いでIL-15に曝露し得る。或いは、細胞は、はじめにIL-15の存在下で、次いでNotchリガンドの存在下で培養し得る。或いは、細胞は、Notchリガンド及びIL-15の存在下で同時に培養し得る。好ましくは、細胞は、はじめにNotchリガンド、次いでIL-15の存在下で培養する。

【0269】

HPCは、少なくとも6時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも30時間、少なくとも36時間、少なくとも42時間、少なくとも48時間、少なくとも54時間、少なくとも60時間、少なくとも72時間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも1週間、Notchリガンド(例えばDLL4)の存在下で培養し得る。典型的には、72時間～1週間である。細胞は、少なくとも6時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも30時間、少なくとも36時間、少なくとも42時間、少なくとも48時間、少なくとも54時間、少なくとも60時間、少なくとも72時間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間又はこれ以上、所望の数のNK細胞が産生されるまでIL-15の存在下で培養し得る。例えば、IL-15中で培養するステップは、1週間若しくはこれ以上の長さ、7～9日の長さ、又は約2週間の長さであり得る。

【0270】

或いは、このような期間は、細胞継代数の条件により測定し得る。例えば、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40又はこれ以上の細胞継代である(インビボ

10

20

30

40

50

、又はエキスピボ若しくはインビトロでの培養のいずれか)。

【0271】

No t c hリガンド及びI L - 1 5への曝露期間は、独立的であり、任意のNo t c h培養期間を、任意のI L - 1 5培養期間と組み合わせて使用し得る。いくつかの好ましい実施形態では、No t c hの曝露／培養は、72時間～1週間の長さであり、I L - 1 5の曝露／培養は、1週間（又はこれ以上）の長さである。

【0272】

典型的には、I L - 7、F l t 3 L及び／又はS C Fは、No t c hリガンドとともに使用する。いくつかの好ましい実施形態では、H P Cは、I L - 7、F l t 3 L及びS C Fの存在下で、No t c hリガンドとともに培養する。

【0273】

本発明の方法（H P CをNo t c hリガンドと接触させるステップを含む方法と含まない方法の両方）は、本明細書に記載するように、E 4 b p 4の翻訳後修飾の変化を生じ、これによりE 4 b p 4活性の上昇を生じる化合物と、H P Cを接触させるステップをさらに含み得る。E 4 b p 4の翻訳後修飾の変化は、本明細書に記載する、E 4 b p 4のS U M O化及び／又はリン酸化の減少であってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、E 4 b p 4の翻訳後修飾の変化を生じる化合物は、E 4 b p 4の残基K 1 0、K 1 1 6、K 2 1 9、K 3 3 7及び／若しくはK 3 9 4若しくはこれらに対応する残基の1若しくは2以上、又はこれらの任意の組合せにおいてS U M O化を減少させ、及び／又はE 4 b p 4の残基S 2 8 6、S 3 0 1及び／若しくはS 4 5 4若しくはこれらに対応する残基の1若しくは2以上、又はこれらの任意の組合せにおいてリン酸化を減少させる。

【0274】

E 4 b p 4の翻訳後修飾の変化を生じる、適切な任意の濃度の化合物は、これが、本明細書に記載するようにE 4 b p 4の活性を上昇させ、N K細胞集団の増殖において有用性を有するという条件で、使用し得る。非限定的な例として、本発明の任意の態様では、E 4 b p 4の翻訳後修飾の変化を生じる化合物は、約0.1～約20 μ M、約0.1～約15 μ M、約0.5～約15 μ M、約0.5～約14 μ M、約0.5～約12 μ M、約0.5～約11 μ M、又は約0.5～約10 μ M、例えば、約5～約10 μ Mの最終濃度で使用し得る。いくつかの好ましい実施形態では、E 4 b p 4の翻訳後修飾の変化を生じる化合物は、約0.5～約5 μ M、より好ましくは、約0.5～約2 μ M、さらにより好ましくは、約0.5～約1 μ Mの最終濃度で使用し得る。

【0275】

R E V - E R B阻害化合物、No t c hリガンド及び／又はE 4 b p 4翻訳後修飾を変化させる化合物は、本明細書に記載するように、同時に、別々に、又は逐次、使用し得る。

【0276】

R E V - E R B阻害化合物、No t c hリガンド及び／又はE 4 b p 4翻訳後修飾を変化させる化合物のそれぞれは、単一の治療若しくは適用として、又は複数の治療若しくは適用において（本明細書に記載するようにインビトロとエキスピボの両方又はインビボ方法において）独立して使用し得る。複数の適用では、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回、少なくとも8回、少なくとも9回又はこれ以上の適用を使用し得る。複数の適用は、本発明の方法又は治療に従って、適切な任意の時点で適用し得る。非限定的な例として、本発明のR E V - E R B阻害化合物、No t c hリガンド及び／又はE 4 b p 4翻訳後修飾を変化させる化合物は、1日2回、1日1回、1日おきに、3日に1回又は毎週、それぞれ独立的に適用し得る。典型的には、本発明のR E V - E R B阻害化合物、No t c hリガンド及び／又はE 4 b p 4翻訳後修飾を変化させる化合物は、培養培地を交換するときに必要に応じて、独立的に適用し得る。

【0277】

本発明の方法は、モジュレートする（1つ又は2つ以上の追加の遺伝子及び／又はタンパク質のH P Cにおける発現及び／又は活性を増加又は減少させてN K細胞増殖を促進す

10

20

30

40

50

る) ステップをさらに含むことができる。このモジュレーションは、REVERB活性を阻害するために使用するものと同一の本発明の化合物を含む、本発明の化合物により誘発することができる。或いは、1つ又は2つ以上の追加の化合物は、1つ又は2つ以上の追加の遺伝子及び／又はタンパク質の発現及び／又は活性をモジュレートするために使用することができる。前記モジュレーションは、直接的又は間接的に生じ得る。間接的モジュレーションは、REVERB活性を阻害する本発明の化合物により生じる下流効果を包含する。

【0278】

本発明のすべての方法では、個体／患者から得られた、HPCを含む試料は、骨髓、臍帯血及び／又は末梢血から得られた試料であり得る。したがって、試料は、臍帯血若しくは末梢血試料、又は骨髓試料或いは生検であり得る。試料は、本発明の方法によって産生されたNK細胞集団により治療される個体（すなわち、患者）から得られ得る。或いは、試料は、健常な個体から得られる。

【0279】

本発明によれば、HPCを含む試料は、（本明細書に記載する）十分な数のHPCを含み、これにより、本発明に従って前記試料を化合物と接触させることにより増殖NK細胞集団を得ることが可能な、個体由来の任意の試料である。典型的には、試料は、HSCを含む。好ましくは、前記試料は、本明細書に記載する臍帯血若しくは末梢血試料又は骨髓試料或いは生検のように、HSCを濃縮する。

【0280】

本発明の方法は、対照に対して少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍又はそれ以上のNK細胞数の増加をもたらすことができる。典型的には、NK細胞の数は、対照と比較して少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも3倍又はそれ以上増加する。

【0281】

本発明の方法は、表現型的に成熟したNK細胞の産生を促進し得る。言い換えれば、本発明の方法は、成熟NK細胞集団に達するのに掛かる時間を削減し得る。方法の実行時間の削減により、当技術分野において公知のNK細胞増殖のための従来の方法に対するさらなる利点をもたらされる。非限定的な例として、NK細胞の増殖のための現在の臨床的手順では、約20%の成熟NK細胞を含むNK細胞集団の産生に2週間以上掛かり得る。対照的には、本発明の方法は、等価な集団を10日又はこれ以下、好ましくは、1週間又はこれ以下で達成し得る。本発明の方法は、少なくとも40%の成熟NK細胞、好ましくは、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%又は少なくとも49%の成熟NK細胞、さらにより好ましくは、少なくとも50%の成熟NK細胞の集団を、3週間若しくはこれ以下、20日若しくはこれ以下、19日若しくはこれ以下、18日若しくはこれ以下、17日若しくはこれ以下、16日若しくはこれ以下、15日若しくはこれ以下、2週間若しくはこれ以下、13日若しくはこれ以下、又は12日若しくはこれ以下で達成し得る。好ましくは、本発明の方法は、少なくとも45%の成熟NK細胞の集団を2週間以内又はこれ以下で達成することができる。

【0282】

典型的には、本発明のエキスピボでの方法は、増殖NK細胞集団を精製する最終ステップを含む。これにより、本明細書に記載する治療的投与のための純粋な集団が確保される。増殖NK細胞集団の精製は、適切な任意の手段によってであってもよい。標準的細胞精製方法、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS、fluorescence-activated cell sorting）及び磁気活性化細胞選別（MACS、magnetic-activated cell sorting）を含む細

10

20

30

40

50

胞選別は、当分野において公知である。

【0283】

それらに限定されないが、N o t c hリガンド及びR E V－E R B阻害化合物の組合せを含む方法を含む、本発明のいくつかの方法では、最終細胞集団におけるNK細胞の％は、非常に高いことがある（典型的には85％よりも高く、好ましくは90％よりも高く、より好ましくは95％よりも高く、100％に接近し得る）。このような例では、最終精製ステップは、省略してもよい。

【0284】

治療適応

本発明は、患者におけるNK細胞の産生を増加させることによる療法の方法における使用のためのR E V－E R Bアンタゴニストを提供する。

10

【0285】

療法の前記方法における使用のためのR E V－E R Bアンタゴニストは、本明細書に記載する任意のR E V－E R Bアンタゴニストであり得る。典型的には、前記方法における使用のためのR E V－E R Bアンタゴニストにより、R E V－E R B活性を減少させることによってE 4 b p 4発現が増加する。

【0286】

典型的には、療法の方法は、（本明細書に記載する）R E V－E R Bの作用を阻害する化合物を患者又は対象に投与するステップを含む。

【0287】

また、本発明では、患者におけるNK細胞の産生を増加させることによる療法の方法における同時、別々、又は逐次の使用のための混合調製物として、R E V－E R Bの作用を阻害する化合物及びN o t c hリガンドを含む産物を提供する。

20

【0288】

療法の前記方法における使用のためのN o t c hリガンドは、本明細書に記載する任意のN o t c hリガンドであり得る。いくつかの好ましい実施形態では、N o t c hリガンドは、D L L 4又はD L L 4の機能を保持するこの断片である。本発明の任意のR E V－E R Bアンタゴニスト及び任意のN o t c hリガンドを、組み合わせて使用し得る。

【0289】

典型的には、前記R E V－E R Bアンタゴニスト及びN o t c hリガンド産物に関する療法の方法は、（本明細書に記載する）産物を患者又は対象に投与するステップを含む。N o t c hリガンド及びR E V－E R Bアンタゴニストは、同時に、別々に、又は逐次、投与し得る。別々又は逐次の投与では、N o t c hリガンドをはじめに、その後、R E V－E R Bアンタゴニストを投与し得るか、又はこの逆である。

30

【0290】

逐次の投与は、2つの産物を直ちに相次いで投与すること、又は第2の産物を、第1の産物を投与して1分以内、2分以内、3分以内、4分以内、5分以内、10分以内、15分以内、20分以内、25分以内、30分以内、45分以内、1時間以内若しくはこれ以上に投与することを意味し得る。

【0291】

別々の投与は、第2の産物を、第1の産物を投与して1時間以内、2時間以内、3時間以内、6時間以内、12時間以内、24時間以内、2日以内、3日以内、4日以内、5日以内、6日以内、7日以内又はこれ以上に投与することを意味し得る。

40

【0292】

本明細書において使用する場合、用語「NK細胞の数を増加させる」及び「NK細胞の産生を増加させる」は、本発明の化合物が、患者におけるNK細胞数の顕著な増加を誘発することを意味すると理解され得る。このNK細胞数の増加は、対照に対して測定することができる（E 4 b p 4発現の増加及びR E V－E R B活性の阻害の文脈において本明細書に記載するように）。

【0293】

50

NK細胞数の増加及び／又はNK細胞産生の増加に言及する場合、対照に対する増加倍数の点から定量化することができる。典型的には、本発明の化合物は、対照に対して少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍又はそれ以上の、NK細胞数を増加させるか、又はNK細胞産生の増加を生じさせることができる。

【0294】

或いは、NK細胞数の増加及び／又はNK細胞産生の増加に言及する場合、NK細胞数が、対照と比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%又はそれ以上増加することを意味すると理解され得る。典型的には、NK細胞数は、対照と比較して少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%又はそれ以上増加する。

【0295】

いくつかの実施形態では、NK細胞数の増加及び／又はNK細胞産生の増加は、試料又は患者におけるNK細胞の絶対数、例えば、NK細胞の割合、例えば、循環するリンパ球集団におけるNK細胞の割合の点で定義することができる。例えば、本発明の化合物は、NK数の増加をもたらし、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%又はそれ以上のNK細胞の割合を生じることができる。

【0296】

NK細胞の数は、定量的及び／又は定性的分析により判定することができ、直接的又は間接的に測定することができる。NK細胞の数は、対照に対して、適切な任意の技術を使用して判定することができる。適した標準的技術、例えば、フローサイトメトリー、FACS及びMACSは、当分野において公知である。

【0297】

NK細胞の数は、対照と比較して少なくとも6時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも30時間、少なくとも36時間、少なくとも42時間、少なくとも48時間、少なくとも54時間、少なくとも60時間、少なくとも72時間、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1カ月又はそれ以上増加し得る。典型的には、これは、REV-ERB活性を阻害する化合物の最後の投与に対して評価する。

【0298】

NK細胞の数は、患者由来の試料又は（本発明のエキスピボでの方法由来の）培養試料中の全NK細胞数の点から定量化することができる。

【0299】

本発明の治療的使用及び方法の文脈において、「対象」又は「患者」（これらの用語は本明細書において互換的に使用される）は、NK細胞数の増加から恩恵を得る任意の動物患者である。典型的な動物患者は、哺乳動物、例えば、霊長類である。好ましくは、患者は、ヒトである。

【0300】

したがって、本発明は、（本明細書に記載するように）REV-ERBの作用を阻害する、治療有効量の化合物を前記患者に投与するステップを含む、それを必要とする患者においてNK細胞数を増加させることによる治療の方法を提供する。また、（本明細書に記載する）REV-ERBの作用を阻害する治療有効量の化合物及び（本明細書に記載する）Notchリガンドを前記患者に投与するステップを含む、それを必要とする患者にお

10

20

30

40

50

けるNK細胞数を増加させることによる治療の方法を提供する。

【0301】

加えて、本発明は、医薬の製造における、REV-ERBの作用を阻害する化合物の使用を提供する。前記医薬により、患者におけるNK細胞の数が増加する。加えて、本発明では、医薬の製造におけるREV-ERBの作用を阻害する化合物及びNotchリガンドの使用を提供する。前記医薬により、患者におけるNK細胞数が増加する。

【0302】

本発明の治療的使用又は方法は、治療有効量の本発明の化合物又は産物を、単独又は他の治療薬と併せて、患者に投与するステップを含むことができる。

【0303】

本明細書において使用する場合、用語「治療」又は「治療する」は、治療的又は予防性(preventative)／予防的(prophylactic)手段を包含する。

【0304】

本発明の化合物はまた、予防療法として使用することができる。本明細書において使用する場合、用語「予防する」は、NK細胞数を増加させ、及び／又は症状の重症度若しくは強度を減少させることにより治療することができる疾患又は障害と関連する前記症状の発症を予防することを含む。用語「予防する」は、このような疾患又は障害、特に本明細書に記載する感染性疾患に対する防御免疫を誘導又は提供することを含む。免疫は、適切な任意の技術を使用して定量化することができ、この例は、当分野において公知である。

【0305】

本発明の化合物又は産物は、NK細胞数を増加させることにより治療することができる疾患又は障害を既に有する患者に投与することができる。例えば、患者は、本明細書に記載する感染性疾患又はがんを有するのではないかと疑われることがあり、前記疾患又は障害の症状を示すこともあり又は示さないこともある。このような患者に投与した場合、本発明の化合物又は産物により、1つ若しくは2つ以上の症状の重症度が治癒、遅延、減少するか、若しくは改善し、及び／又はこのような治療を行わない場合の予想を超えて対象の生存を延長することができる。

【0306】

或いは、本発明の化合物又は産物は、特定の感染性疾患に最終的に感染するか、又は本明細書に記載する疾患若しくは障害を発症する可能性のある患者に投与して、1つ若しくは2つ以上の症状の重症度が治癒、遅延、減少するか、若しくは改善し、及び／又はこのような治療を行わない場合の予想を超えて対象の生存を延長するか、或いは、感染性疾患の場合、患者を前記疾患の伝染から防ぐことを助けることができる。

【0307】

本発明の治療及び予防療方法は、種々の年齢の多様な種々の対象に適用可能である。ヒトに関しては、療方法は、子供（例えば、乳児、5歳未満の小児、年長の小児又は10代の若者）及び大人に適用可能である。他の動物対象（例えば、霊長類などの哺乳動物）に関しては、療方法は、未熟な対象及び成熟した／大人の対象に適用可能である。

【0308】

本発明は、患者におけるNK細胞の数を増加させることにより有利に治療することができる任意の疾患又は障害の治療に関する。このような疾患及び障害は、がん、感染性疾患（急性及び慢性）、自己免疫疾患及び女性不妊症又は妊娠に関連する疾患又は障害を含む。本発明により治療することができる感染性疾患は、ウイルス感染症、及び細菌、原生生物、真菌又は蠕虫病原体を含む他の病原体による感染症を含む。典型的には、前記病原体は、その生活環において少なくとも1つの細胞内相を有する細胞内病原体である。特に所望の感染症は、ウイルス感染症、及び公衆衛生の観点から特に重要な人畜共通感染症を含む。本発明により治療することができるがんは、膀胱がん、血液がん、白血病、骨がん、腸がん、脳腫瘍、乳がん、腎がん、肝がん、肺がん、メラノーマ、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、精巣がん及び子宮がんを含む。本発明により治療することができる自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性硬化症及び肥

10

20

30

40

50

満によるインスリン抵抗性を含む。本発明において使用する場合、女性不妊症又は妊娠に関連する疾患又は障害の用語は、胎児発育遅延、早期分娩、子宮血管再構築の異常及び妊娠高血圧腎症を含むが、これらに制限されない。

【0309】

本発明の化合物又は産物は、1つ又は2つ以上の追加の治療薬又は治療と併せて使用することができ、これは典型的に、治療する疾患又は障害のための従来の治療から選択することができる。非限定的な例として、本発明の化合物又は産物が、肺がんなどのがんの治療における使用のためのものである場合、前記化合物又は産物は、放射線療法、化学療法又は手術などの、肺がんのための従来の治療と併せて使用することができる。1つ又は2つ以上の追加の治療薬又は治療と併せて使用する場合、本発明の化合物又は産物、1つ又は2つ以上の追加の治療薬又は治療を施す前、同時、又は後に投与することができる。

10

【0310】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明の化合物又は産物は、抗体媒介免疫療法と併せて使用するためのものである。抗体媒介免疫療法は、抗体を患者へ投与して疾患特異的抗原を標的化するステップを含む。このような抗体は、NK細胞の特異性及び殺活性を増加させるために使用することができ、IgG抗体のFc領域の受容体を発現する。これらのFc受容体の活性化は、NK細胞活性化を誘導し、活性化したNK細胞によりサイトカインの分泌及び細胞傷害性顆粒の放出を生じ、疾患抗原を発現する細胞の溶解を引き起こす。このような併用療法は、（腫瘍特異的抗原に対する抗体を使用する）がんの治療に特に好ましい。免疫療法において使用するいかなる抗体も、本発明の化合物と併せて使用することができる。このような抗体の非限定的な例として、抗CD20mAb（非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫）、抗ガングリオシドD2（抗GD2）mAb（神経芽細胞腫、メラノーマ）、抗ヒト上皮増殖因子（抗HER2）mAb（乳及び胃がん）、抗上皮増殖因子受容体（抗EGFR）mAb（直腸結腸及び頭頸部がん）が挙げられる。

20

【0311】

他の態様では、本発明は、（本明細書に記載する）増殖させたNK細胞集団の本明細書に記載する治療的使用又は方法における使用を提供する。本発明の化合物又は産物の治療適応に関するありとあらゆる本明細書における開示は、本発明の増殖NK細胞集団の治療上の適用に等しくかつ独立して適用することができる。非限定的な例として、本発明は、療法の方法における、例えば、がん、感染性疾患、自己免疫疾患又は女性不妊症若しくは妊娠に関連する疾患若しくは障害の治療における使用のための（本明細書に記載する）増殖NK細胞集団を提供する。別の非限定的な例として、本発明は、治療有効量の増殖NK細胞集団を患者に投与するステップを含む、それを必要とする前記患者におけるNK細胞数を増加させることによる治療の方法を提供する。

30

【0312】

医薬組成物及び製剤

「化合物及び産物」は、本明細書において本発明の「治療的／予防的組成物」、「製剤」又は「医薬」を含み得る。

【0313】

本発明の（上に定義する）化合物又は増殖NK細胞集団は、薬学的に許容される担体、希釈剤及び／又は賦形剤と組み合わせるか又はそれらに加えて投与することができる。或いは又は加えて、本発明の化合物又は増殖NK細胞集団は、塩、賦形剤、希釈剤、アジュバント、免疫調節剤及び／又は抗菌化合物のうちの1つ又は2つ以上とさらに組み合わせることができる。

40

【0314】

式(I)の化合物は、塩、特に、薬学的に許容される塩の形態であり得る。薬学的に許容される塩は、例えば、塩酸若しくはリン酸などの無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸等などの有機酸で形成される酸付加塩を含む。遊離のカルボキシ基で形成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化第二鉄などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミ

50

ノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等などの有機塩基に由来し得る。

【0315】

免疫原性組成物、治療製剤、医薬及び予防製剤の投与は、一般に、従来の経路、例えば、静脈内、皮下、腹腔内、又は粘膜経路による。投与は、非経口的注入、例えば、皮下、皮内又は筋肉内注射によってであってもよい。例えば、抗体又は本発明の増殖NK細胞集団を含む製剤は、静脈内、筋肉内、皮内、又は皮下投与に特に適し得る。低分子REV-ERB阻害物質の投与は、静脈内、筋肉内、皮内、若しくは皮下などの注射、又は経口投与によってであり得る（経口バイオアベイラビリティを典型的に示す500Da未満の分子量を有する低分子）。

【0316】

したがって、本発明の免疫原性組成物、治療製剤、医薬及び予防製剤は、液体溶液又は懸濁液として注射剤として調製することができる。注射前の液体の溶液又は懸濁液に適した固体形態は、代替的に調製することができる。調製物はまた、乳化、又はリポソーム若しくはマイクロカプセル中にペプチドで被包することができる。

【0317】

免疫原性有効成分（本発明の化合物又は増殖させたNK細胞集団など）は、薬学的に許容され、有効成分と適合する賦形剤と混合することが多い。適した賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセリン、エタノール等及びこれらの組合せである。加えて、必要に応じて、ワクチンは、湿潤若しくは乳化剤、pH緩衝剤、及び／又はワクチンの有効性を増強するアジュバントのような少量の補助物質を含有してもよい。

【0318】

一般に、担体は、薬学的に許容される担体である。薬学的に許容される担体の非限定的な例として、水、生理食塩水、及びリン酸緩衝食塩水が挙げられる。しかし、いくつかの実施形態では、組成物が本発明の化合物を含む場合、これは、凍結乾燥形態であってもよく、その場合、これは、BSAなどの安定剤を含んでもよい。いくつかの実施形態では、組成物をチオメルサル又はアジ化ナトリウムなどの保存剤とともに処方して長期保管を容易とすることが望まれ得る。

【0319】

有効であり得る追加のアジュバントの例としては、完全フロイントアジュバント（CFA、complete Freund's adjuvant）、不完全フロイントアジュバント（IFA、Incomplete Freund's adjuvant）、サポニン、Quil Aなどのサポニンの精製抽出分画、QS-21などのサポニンの誘導体、ISCOM/ISCOMATRIXなどのサポニンをベースとした脂質粒子、LTk63及び／又はLTk72のような大腸菌（E. coli）易熱性毒素（LT、labile toxin）変異株、水酸化アルミニウム、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（CGP11637、ノル-MDPと呼ばれる）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-（1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ）-エチルアミン（CGP19835A、MTP-PEと呼ばれる）、2%のスクアレン/Tween 80エマルジョン中の、細菌、モノホスホリルリピドA、トレハロースジミコレート及び細胞壁骨格（MPL+TDM+CWS）から抽出した3つの成分を含有するRIBI、Novartis社により開発されたMF59製剤、並びにGSK Biologicals社（リクサンサル、ベルギー）により開発されたAS02、AS01、AS03及びAS04アジュバント製剤を含むが、これらに制限されない。

【0320】

緩衝剤の例としては、コハク酸ナトリウム（pH6.5）、及びリン酸緩衝食塩水（PBS、phosphate buffered saline；pH6.5及び7.5）を含むが、これらに制限されない。

【0321】

他の投与方式に適する追加の製剤は、坐薬、及び場合によっては、経口製剤又はエアロ

10

20

30

40

50

ゾルとしての散布に適した製剤を含む。坐薬では、従来の結合剤及び担体は、例えば、ポリアルキレングリコール又はトリグリセリドを含むことができ、このような坐薬は、0.5%～10%、好ましくは1%～2%の範囲の有効成分を含有する混合物から形成することができる。

【0322】

経口製剤は、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常利用する賦形剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放製剤又は散剤の形態を取る。

【0323】

本発明の化合物又は産物の投与の用量範囲は、所望の治療作用を生じる範囲である。必要とされる用量範囲が、化合物の詳細な性質、投与経路、製剤の性質、患者の年齢、患者の状態の、性質、程度又は重症度、もしあれば禁忌、及び主治医の判断に依存することが認識される。これらの用量レベルの差異は、最適化のための標準の経験的通例を使用して調整することができる。同様に、本発明の方法、特にエキスピボでの方法における使用のための本発明の化合物又は産物の用量は、当業者により容易に決定することができ、NK細胞数の所望の増加を生じ、及び／又はNK細胞の所望の増殖を誘発して、増殖させたNK細胞集団を産生する任意の用量である。非限定的な例として、本発明による化合物7又は11の用量は、約2～約20 μM 、約2～約15 μM 、約5～約15 μM 、約5～約14 μM 、約4～約13 μM 、約5～約12 μM 、約5～約11 μM 、又は好ましくは約5～約10 μM の最終濃度を生じ得る。

【0324】

本発明はまた、(本明細書に記載する)増殖させたNK細胞集団の製剤処方における使用を提供する。本発明の化合物の処方に関する本明細書のありとあらゆる開示は、本発明の増殖NK細胞集団の治療上の適用に等しくかつ独立して適用することができる。

【0325】

配列番号の説明

配列番号1-E4bp4遺伝子配列(X64318.1)

```
1 gcccccttct tctcctcgt cggcccgaga gcaggaacac gataacgaag gagggcccaac
61 ttcatccaat aaggagcctg acggatttat ccagacgggt agaacaaaag gaagaatatt
121 gatggatttt aaaccagagt ttttaaagag cttgagaata cggggaaatt aatttgttct
181 cctacacaca tagatagggt aaggttgttt ctgatgcagc tgagaaaaat gcagaccgtc
241 aaaaaggagc aggcgtctct tgatgccagt agcaatgtgg acaagatgat ggtccttaat
301 tctgctttta cggaagtgtc agaagactcc acaacagggt aggacgtgct tctcagttaa
361 ggaagtgtgg ggaagaacaa atcttctgca tgtcggagga aacgggaatt cattcctgat
421 gaaaagaaag atgctatgta ttgggaaaaa aggcggaaaa ataataaagc tgccaaaaga
481 tctcgtgaga agcgtcgact gaatgacctg gttttagaga acaaactaat tgcactggga
541 gaagaaaacg ccactttaaa agctgagctg ctttactaa aattaaagt ttggttaatt
601 agtccacag catatgctca agagattcag aaactcagta attctacagc tgtgtacttt
661 caagattacc agacttccaa atccaatgtg agttcatttg tggacgagca cgaaccctcg
721 atggtgtcaa gtagttgtat ttctgtcatt aaacactctc cacaagctc gctgtccgat
781 gtttcagaag tgtcctcagt agaacacacg caggagagct ctgtgcaggg aagctgcaga
841 agtcctgaaa acaagttcca gattatcaag caagagccga tggaattaga gagctacaca
901 agggagccaa gagatgaccg aggccttac acagcgtcca tctatcaaaa ctatatgggg
961 aattctttct ctgggtactc acactctccc ccactactgc aagtcaaccg atcctccagc
1021 aactccccga gaacgtcgga aactgatgat ggtgtggtag gaaagtcac tgatggagaa
1081 gacgagcaac aggtcccaa gggcccatc cattctccag ttgaactcaa gcatgtgat
1141 gcaactgtgg ttaaagtcc agaagtgaat tcctctgcct tgccacacaa gtcctggatc
1201 aaagccaaag ccatgcagat caaagtagaa gcctttgata atgaatttga ggccacgcaa
1261 aaactttcct cacctattga catgacatct aaaagacatt tcgaactcga aaagcatagt
```

10

20

30

40

50

1321 gccccaaagta tggtagattc ttctcttact cttttctcag tgcaagtgcac taacattcaa
 1381 gattgggtctc tcaaatcgga gacttgatc caaaaagaac tgagtggcaa aactcagaat
 1441 agtttcaaaa ctggagttgt tgaatgaaa gacagtggct acaaagtttc tgaccagag
 1501 aacttgatt tgaagcaggg gatagcaaac ttatctgcag aggttgctc actcaagaga
 1561 cttatagcca cacaaccaat ctctgcttca gactctgggt aaattactac tgagtaagag
 1621 ctgggcattt agaaagatgt ctttgcaat agagcagtc atttgtatt atgctgaatt
 1681 ttcactggac ctgtgatgtc atttactgt gatgtgcaca tgtgtctgt ttgggtgtctt
 1741 tttgtgcaca gattatgatg aagattagat tgtgttatca ctctgcctgt gtatagtcag
 1801 atagtcatat gcgtaaggct gtatatatta agnttttatt tttgtgttc tattataaag
 1861 tgtgtaagtt accagtttca ataaaggatt ggtgacaaac acagaaaaaa aaaaaaaaaa
 1921 aaa

10

配列番号 2 - E 4 b p 4 アミノ酸配列 (X 6 4 3 1 8 . 1)

MQLRKMQTVKKEQASLDASSNVDKMMVLNSALTEVSEDSTTGEDVLLSEGSVGKNKSSA
 CRRKREFIPDEKDKAMYWEKRRKNNEAAKRSREKRRNLNDLVLENKLIALGEENATLKAEL
 LSLKLFGLISSTAYAQEIQKLSNSTAVYFQDYQTSKSNVSSFVDEHEPSMVSSSCISVIKH
 SPQSSLSDVSEVSSVEHTQESSVQGSCRSPENKFQIIKQEPMELESYTREPRDDRGSYTASI
 YQNYMGNSFSGYSHSPPLLQVNRSSNSPRTSETDDGVVGKSSDGEDEQVPGPIHSPV
 ELKHVHATVVKVPEVNSSALPHKLRIKAKAMQIKVEAFDNEFEATQKLSSPIDMTSKRHF
 ELEKHSAPSMVHSSLTPFSVQVTNIQDWSLKSEHWHQKELSGKTQNSFKTGVMEMKDSG
 YKVSDPENLYLKQGIANLSAEVSLKRLIATQPISASDSG

20

配列番号 3 - R E V - E R B α 遺伝子配列 (NM_021724.4)

1 gggcacgagg cgctccctgg gatcacatgg tacctgctcc agtgccgcgt gcggcccggg
 61 aaccctgggc tgctggcgcc tgcgcagagc cctctgtccc agggaaaggc tcgggcaaaa
 121 ggcggtctgag attggcagag tgaatatatta ctgccgaggg aacgtagcag ggcacacgtc
 181 tcgcctcttt gcgactcggg gccccgtttc tccccatcac ctacttactt cctggttgca
 241 acctctcttc ctctgggact tttgcaccgg gagctccaga ttgccacccc cgcagcgtg
 301 cggagccggc aggcagaggc acccgtaca ctgcagagac ccgaccctcc ttgctacctt
 361 ctagccagaa ctactgcagg ctgattcccc ctacacactc tctctgctct tccatgcaa
 421 agcagaactc cgttgcttca acgtccaacc cttctgcagg gctgcagtc ggccacccca
 481 agaccttgct gcagggtgct tcggatcctg atcgtgagtc gcggggtcca ctccccgccc
 541 ttagccagtgc cccagggggc aacagcggcg atcgcaacct ctagtttgag tcaaggtcca
 601 gtttgaatga ccgctctcag ctggtgaaga catgacgacc ctggactcca acaacaacac
 661 aggtggcgctc atcacctaca ttggctccag tggctcctcc ccaagccgca ccagccctga
 721 atccctctat agtgacaact ccaatggcag cttccagtc ctgacccaag gctgtccac
 781 ctacttccca ccatcccca ctggctcct caccgaagac ccggctcgt cctttgggag
 841 cattccaccc agcctgagtg atgacggctc ccttcttcc tcatcttct cgctgctatc
 901 ctctctctcc ttctataatg ggagcccccc tgggagtcta caagtggcca tggaggacag
 961 cagccgagtg tccccagca agagcaccag caacatcacc aagctgaatg gcatggtgtt
 1021 actgtgtaaa gtgtgtgggg acgttgctc gggcttccac tacggtgtgc acgctgcga
 1081 gggctgcaag ggcttttcc gtcggagcat ccagcagaac atccagtaca aaaggtgtct
 1141 gaagaatgag aattgctcca tcgtccgcat caatcgcaac cgctgccagc aatgtcgctt
 1201 caagaagtgt ctctctgtgg gcatgtctcg agacgtgtg cgttttgggc gcatcccaa
 1261 acgagagaag cagcggatgc ttgctgagat gcagagtgc atgaacctgg ccaacaacca
 1321 gttgagcagc cagtgccgc tggagacttc accaccag caccaccc caggcccat
 1381 gggccctcg ccacccctg ctccggtccc ctacccctg gtgggcttct cccagtttc
 1441 acaacagctg acgctccca gatcccaag cctgagccc acagtggagg atgtgatatc
 1501 ccaggtggcc cgggcccac gagagatctt cacctacgcc catgacaagc tgggcagctc
 1561 acctggcaac ttcaatgcca accatgcac aggtagccct ccagccacca cccacatcg
 1621 ctgggaaaat cagggtgcc cactgcccc caatgacaac aacacctgg ctgccagcg
 1681 tcataacgag gccctaatg gtctgcgcca ggctccctcc tctaccctc ccacctggcc

30

40

50

1741 tcctggccct gcacaccaca gctgccacca gtccaacagc aacgggcacc gtctatgccc
 1801 caccacagt tatgcagccc cagaaggcaa ggcacctgcc aacagtcccc ggcaggggcaa
 1861 ctcaaagaat gttctgctgg catgtcctat gaacatgtac ccgcatggac gcagtgggag
 1921 aacgggtgcag gagatctggg aggatttctc catgagcttc acgcccgtg tgcgggaggt
 1981 ggtagagttt gccaacacaca tcccgggctt ccgtgacctt tctcagcatg accaagtcac
 2041 cctgcttaag gctggcacct ttgagggtgct gatggtgcgc tttgcttcgt tgttcaacgt
 2101 gaaggaccag acagtgatgt tcctaagccg caccacctac agcctgcagg agcttgggtgc
 2161 catgggcatg ggagacctgc tcagtgccat gttcgacttc agcgagaagc tcaactccct
 2221 ggcgcttacc gaggaggagc tgggcctctt caccgcggtg gtgcttgtct ctgcagaccg
 2281 ctcgggcatg gagaattccg cttcggtgga gcagctccag gagacgtgc tgcgggctct
 2341 tcgggctctg gtgctgaaga accggcctt ggagacttcc cgcttcacca agctgctgct
 2401 caagctgccg gacctgcgga cctgaacaa catgcattcc gagaagctgc tgtccttccg
 2461 ggtggacgcc cagtgacctg cccggccggc cttctgccgc tgcccccttg tacagaatcg
 2521 aactctgcac ttctctctcc ttacgagac gaaaaggaaa agcaaaccag aatcttattt
 2581 atattgttat aaaatattcc aagatgagcc tctggccccc tgagccttct tgtaaatacc
 2641 tgcctccctc ccccatcacc gaacttcccc tctccctta tttaaaccac tctgtctccc
 2701 ccacaacctt cccctggccc tctgatttgt tctgttctg tctcaaatcc aatagttcac
 2761 agctgagctg gttcaaaaa aaaaaaaaaa aaa

配列番号 4 - R E V - E R B α アミノ酸配列 (NM_021724.4)

MTTLDSSNNNTGGVITYIGSSGSSPSRTSPESLYSDNSNGSFQSLTQGCPTYFPPSPTGSLT
 QDPARSFGSIPPSLSDGSPSSSSSSSSSSSYNGSPPGSLQVAMEDSSRVSPSKSTSNITK
 LNGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACEGCKGFFRRSIQQNIQYKRCLKNENCSIVRINRNR
 CQQCRFKKCLSVGMSRDAVRFRIPKREKQRMALAEQMSAMNLANNQLSSQCPLETSPTQ
 HPTPGPMGPPPPAPVPSPLVGFSQFPQQLTPRSPSPEPTVEDVISQVARAHREIFTYA
 HDKLGSSPGNFNANHASGSPATTPHRWENQGCPPAPNDNNTLAAQRHNEALNGLRQA
 PSSYPPTWPPGPAHHSCHQSNSNGHRLCPTHVYAAPEGKAPANSRQGNSKNVLLACP
 MNMYPHGRSGRTVQEIWEDFSMSFTPAVREVVEFAKHIPGFRDLSQHDQVTLKAGTFE
 VLMVRFASLFNVKDQTMFLSRTTYSLQELGAMGMGDLLSAMFDFSEKLNSLALTEEEL
 GLFTAVVLVSADRSKMENSASVEQLQETLLRALRALVLKNRPLETSRFTKLLLKLPLDLRT
 LNNMHSEKLLSFRVDAQ

配列番号 5 - R E V - E R B β 遺伝子配列 (AB307693.1)

1 atggaggtga atgcaggagg tgtgattgcc tatatcagtt cttccagctc agcctcaagc
 61 cctgcctctt gtcacagtga gggttctgag aatagtttcc agtccctctc ctcttctgtt
 121 ccattctctc caaatagctc taattctgat accaatggta atccaagaa tggatgatctc
 181 gccaatattg aaggcatctt gaagaatgat cgaatagatt gttctatgaa aacaagcaaa
 241 tcgagtgcac ctgggatgac aaaaaatcat agtgggtgta caaaatttag tggcatgggt
 301 ctactgtgta aagtctgtgg ggatgtggcg tcaggattcc actatggagt tcatgcttgc
 361 gaaggctgta agggtttctt tcggagaagt attcaacaaa acatccagta caagaagtgc
 421 ctgaagaatg aaaactgttc tataatgaga atgaatagga acagatgtca gcaatgtcgc
 481 ttcaaaaagt gtctgtctgt tggaatgtca agagatgctg ttcggtttgg tcgtattcct
 541 aagcgtgaaa aacagaggat gctaattgaa atgcaaagtgc caatgaagac catgatgaac
 601 agccagttca gtggtcactt gcaaaatgac acattagtag aacatcatga acagacagcc
 661 ttgccagccc aggaacagct gcgacccaag cccaactgg agcaagaaaa catcaaaagc
 721 tcttctctc catcttctga ttttgcaaag gaagaagtga ttggcatggt gaccagagct
 781 cacaaggata ctttatgta taatcaagag cagcaagaaa actcagctga gagcatgcag
 841 cccagagag gagaacggat tccaagaac atggagcaat ataatttaaa tcatgatcat
 901 tgcggcaatg ggcttagcag ccattttccc tgtagtgaga gccagcagca tctcaatgga
 961 cagttcaaag ggaggaatat aatgcattac ccanatggcc atgccatttg tattgcaaat
 1021 ggacattgta tgaacttctc caatgcttat actcaaagag tatgtgatag agttccgata
 1081 gatggatttt ctcaaatga gaacaagaat agttacctgt gcaacactgg aggaagaatg

1141 catctgggtt gtccaatgag taagtctcca tatgtggatc ctcataaatc aggacatgaa
 1201 atctgggaag aattttcgat gagcttcact ccagcagtga aagaagtggg ggaatttgca
 1261 aagcgtattc ctgggttcag agatctctct cagcatgacc aggtcaacct tttaaaggct
 1321 gggacttttg aggttttaat ggtacgggtc gcatcattat ttgatgcaaa ggaacgtact
 1381 gtcacctttt taagtggaaa gaaatatagt gtggatgatt tacactcaat gggagcaggg
 1441 gatctgctaa actctatgtt tgaatttagt gagaagctaa atgccctcca acttagtgat
 1501 gaagagatga gtttgtttac agctgttgtc ctggatatctg cagatcgatc tggaatagaa
 1561 aacgtcaact ctgtggaggc ttgacaggaa actctcattc gtgcactaag gacctaata
 1621 atgaaaaacc atccaaatga ggcctctatt ttacaaaac tgcttctaaa gttgccagat
 1681 cttcgatctt taaacaacat gcactctgag gagctcttgg ctttaaaagt tcacccttaa

10

配列番号 6 - R E V - E R B β アミノ酸配列 (A B 3 0 7 6 9 3 . 1)

MEVNAGGVIAYISSSSASSPASCHSEGSSENSFQSSSSVPSSPNSSNSDTNGNPKNGDLA
 NIEGILKNDRIDCSMKTSKSSAPGMTKNHSGVTKFSGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACE
 GCKGFFRRSIQQNIQYKKCLKNENCSIMRMNRNRCQQCRFKKCLSVGMSRDAVRFGRIK
 REKQRM LIEMQSAMKTMMSQFSGHLQNDTLVEHHEQTALPAQEQLRPKPQLEQENIK
 SSSPPSSDFAKEEVIGMVTRAHKDTFMYNQEQQENSAESMQPQRGERIPKNMEQYNLNH
 DHCGNGLSSHFPCESESQQHLNGQFKGRNIMHYPXGHAICIANGHCMNFSNAYTQRVCDR
 VPIDGFSQENENKNSYLCNTGGRMHLVCPMSKSPYVDPHKSGHEIWEFEFSMSFTPAVKEV
 VEFKRIPGFRDLSQHDQVNLKAGTFEVL MVRFASLFD AKERTVTFLSGKKYSVDDLHS
 MGAGDLLNSMFEFSEKLNALQLSDEEMSLFTAVVLVSADRS GIENVNSVEALQETLIRAL
 RTLIMKNHPNEASIFTKLLLKLPLRLSLNMHSEELLAFAKVH

20

配列番号 7 - デルタ様リガンド 4 遺伝子配列 (A F 2 5 3 4 6 8 . 1)

1 atggcggcag cgtcccgag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcactttgg
 61 cagcagcgcg cggccggctc cggcgtcttc cagctgcagc tgcaggagtt catcaacgag
 121 cgcggcgtac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggt gccggacttt cttccgcgtc
 181 tgccttaagc acttccaggc ggtcgtctcg cccggaccct gcaccttcgg gaccgtctcc
 241 acgccggtat tgggcaccaa ctcttcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc
 301 aaccctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta cttctcgtc catcatgaa
 361 gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc
 421 agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa
 481 accagcacc tcacaaggct gcgctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat
 541 ggagacaact gctccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc
 601 cagccagatg gcaacttgct ctgcctgccc ggttggactg gggaatattg ccaacagcct
 661 atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc
 721 tgccgcccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc
 781 cacggcacct gcagcactccctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgttt
 841 tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactcccat gcaagaatgg ggcaacgtgc
 901 tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgtggac
 961 tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaag
 1021 gaccaggagg atggctacca ctgccttgtt cctccgggct actatggcct gcatttgtgaa
 1081 cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcttcaatg ggggctcctg ccgggagcgc
 1141 aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaact tcaccggctc caactgcgag
 1201 aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagt cctgaaccga
 1261 ggtccaagcc gcatgtgccg ctgccgtctt ggattcacgg gcacctactg tgaactccac
 1321 gtcagcgact gtgcccgtaa cccttcgccc cacgggtggca cttgccatga cctggagaat
 1381 gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc
 1441 atcgatgcct gtgcctcgag tccctgcttc aacagggcca cctgctacac cgacctctcc
 1501 acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggcttgttgg gcagccgctg cgagttcccc
 1561 gtgggcttgc cgccagctt cccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagtg
 1621 ctgctggtac tgctgggcat ggtggcagtg gctgtgcggc agctgcggct tcgacggccg

30

40

50

1681 gacgacggca gcagggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt
1741 cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaagtgga ctgtggcctg
1801 gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccagg
1861 cccctggggc gggggacat gccaggaaag tttcccaca gtgacaagag cttaggagag
1921 aaggcgccac tgcggttaca cagtgaagc ccagagtgtc ggatatcagc gatatgtctc
1981 cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc
2041 attgccacgg aggtataa

配列番号 8 - デルタ様リガンド 4 アミノ酸配列 (A F 2 5 3 4 6 8 . 1)

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFR
VCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLLI
EAWHAPGDDLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNY
YGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAE
CLCRPGWQGRCLNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHSPCKN
GATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELSECDSPCRNGGSKDQEDGYHCLCPPGYYG
LHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGG
QCLNRGPSRMCRCRPGFTGT YCELHVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRR
CEVRTSIDACASSPCFN RATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCF PVGLPPSFPWVAVSLG
VGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKEL
EVDCLDKSNC GKQQNHTLDYNLAPGLGRGTM PGKFP HSDKSLGEKAPLRLHSEKPEC
RISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV

配列番号 9 - ヒト N o t c h 1 c D N A 配列 (C R 4 5 7 2 2 1 . 1)

1 atgtcaaaca tgagatgtgt ggactgtggc acttgccctgg gtcacacacg gaggcacct
61 acccttttct ggggaaagac actgcctggg ctgaccccg tggcggcccc agcacctcag
121 cctgcacagt gtccccagg ttccgaagaa gatgtccag caacacagcc tgggccccag
181 ctgcgggac cggaccccc gtgggctccc gtgttttga ggagactgc cagagccggg
241 cacattgagc tgtgcaacgc cgtgggctgc gtccttttgt cctgtccccg cagccctggc
301 agggggcatg cggtcgggca ggggctggag ggaggcgggg gctgcccttg ggccaccct
361 cctagtttgg gaggagcaga tttttgcaat accaagtata gcctatggca gaaaaaatgt
421 ctttaa

配列番号 10 - ヒト N o t c h 1 タンパク質配列 (C R 4 5 7 2 2 1 . 1)

MSNMRCVDCGTCLGHTRRHPTLFWGKTLPLTPVAAPAPQPAQCPPGSEEDAPATQPG
PQLAGPDPPWAPVFCRRLARAGHIELCNAVGCVLWSCPRSPGRGHAVGQGLEGGGGCP
WATPPSLGGADFCNTKYS LWQKKCL

【0326】

【実施例】

本発明を以下の実施例によりさらに明らかにするが、これは、純粹に本発明の例示であり、制限では決してないことを意図する。

【実施例 1】

【0327】

新たな化合物の設計

未変化の S R 8 2 7 8 の中心的足場及びエステル置換基を維持して、発明者らは、はじめに、チオフェン環を置換ベンゼン環により置換した、化合物 1 ~ 3 を設計した。このような化合物の分析及び特性決定により、次の化合物：アルコキシ鎖を有する 4 ~ 5、単純ヘテロ芳香族 5 員環を有する 6 ~ 10 及びヒンダードヘテロ芳香族 5 員環を有する 11 ~ 13 を設計した。このような化合物の合成については、これらの特性決定とともに、以下の関連する節に記載する。すべての化合物は、(S R 8 2 7 8 及び誘導体についての文献と一致するように) 合成してラセミ化合物として試験した。

【0328】

10

20

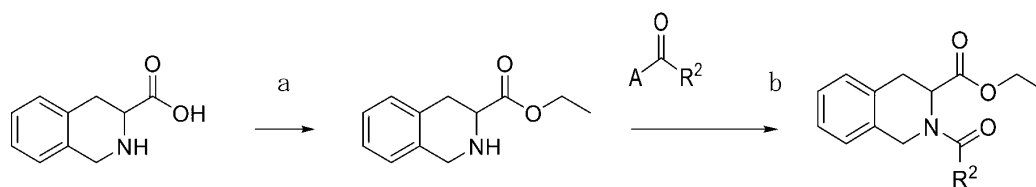
30

40

50

【化 3 0】

スキーム1: 化合物1~13の一般的合成



化合物	R ²	化合物	R ²
1		8	
2		9	
3		10	
4		11	
5		12	
6		13	
7			

【0 3 2 9】

反応条件：(a) EtOH、濃縮H₂SO₄、灌流、一晚。(b) Aについて=C l、TEA、DCM、rt、一晚；Aについて=OH、EDC、HOBt、TEA、DMF、rt、一晚。

【0 3 3 0】

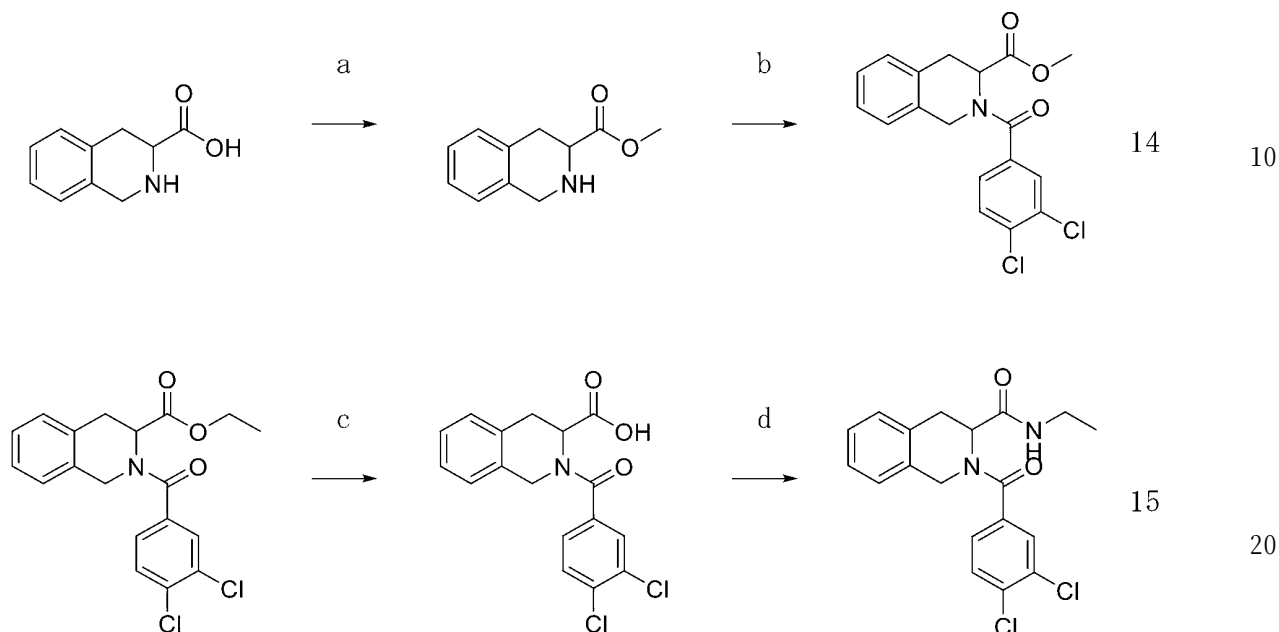
1の調製のために記載のものと類似の手順に従って、硫酸を触媒として使用したメタノール (MeOH) 中のカルボン酸のエステル化、及びTEAを塩基として使用した3, 4-ジクロロベンゾイルクロリドによる中間体16の縮合により、エチルエステル14を得た。化合物15は、1から調製した。これまでに記載したように、エステル基の加水分解

は、塩基性条件を使用して実施し、アミド基の導入は、エタノールアミンによる EDC / HOBt カップリングにより達成した。

【0331】

【化31】

スキーム2: 化合物14及び15の合成



【0332】

合成条件：(a) MeOH、H₂SO₄、灌流、一晚：(b) 3,4-ジクロロベンゾイルクロリド、TEA、DMC、rt、一晚：(c) NaOH 2.0M、MeOH:H₂O (80:20)、rt、4時間；(d) エチルアミン、EDC、HOBt、TEA、DMF、rt、一晚。

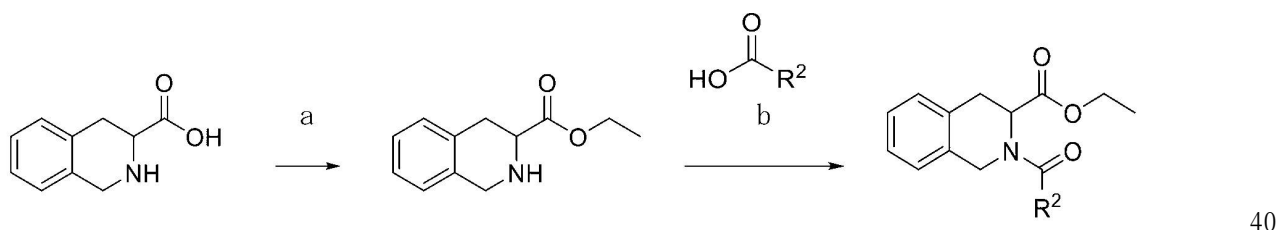
【0333】

化合物16～63及び76を、スキーム3に従って得た。

【0334】

【化32】

スキーム3: 化合物16～63及び76の合成:



【0335】

反応条件：(a) EtOH、濃縮H₂SO₄、灌流、16時間。(b) T₃P、DIPEA、THF、rt、16時間。

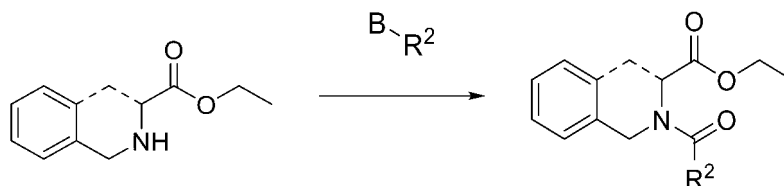
【0336】

化合物64～75を、スキーム4に従って得た。

【0337】

【化 3 3】

スキーム4: 化合物64～75の一般的合成



10

【0 3 3 8】

反応条件：Bについて＝－OC(O)Cl又は－NCO（すなわち64～66及び70について）、DCM、TEA、rt、18時間；Bについて＝－COOH（すなわち67、69、71、72及び75について）、EDC、HOBt、TEA、DMF、rt、18時間；Bについて＝－C(O)H（すなわち68、73及び74について）、AcOH、NaBH(OAc)₃、DCE又はDCM、rt、72時間。

【0 3 3 9】

エチル1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、中間体 (Int.)

20

無水エタノール (25 mL) 中の1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸 (1.00 g, 4.68 mmol) の溶液を室温 (rt) 及びN₂雰囲気下で、濃縮H₂SO₄ (1.00 mL, 7.15 mmol) により処理し、反応混合物を、分子ふるい4 Åの存在下で18時間灌流させながら攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残余物を酢酸エチル (EtOAc) (30 mL) 中に再懸濁して飽和NaHCO₃ (aq, 3×15 mL) 及び鹼水 (3×15 mL) で洗浄し、乾燥 (MgSO₄)、ろ過、並びに減圧下で蒸発させた。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex対EtOAc, 3:1, R_f:0.51) により精製してInt.を黄色の油 (650 mg, 67%) として得た。1H-NMR (CDCl₃) δ=7.20~7.12 (m, 3H, Ar)、7.09~7.04 (m, 1H, Ar)、4.26 (q, J=7.1, 2H, H₂)、4.17 (d, J=16.2, 1H, H_{12i})、4.11 (d, J=16.2, 1H, H_{12ii})、3.76 (dd, J=10.2, 4.6, 1H, H₄)、3.12 (dd, J=18.0, 16.2, 1H, H_{5i})、2.98 (dd, J=18.0, 16.2, 1H, H_{5ii})、2.13 (s, 1H, NH)、1.33 (t, J=7.1, 3H, H₁)；¹³C/ppm (CDCl₃) δ=173.21 (C₃)、135.90、133.82、129.34、126.38、126.26、126.20、60.68 (C₂)、55.55 (C₄)、46.97 (C₁₂)、31.50 (C₅)、14.57 (C₁)；LC-MS (20~98% MeCN) rt=1.73分；m/z 206.29 ([M+H]⁺)；HRMS (m/z)：[M+H]⁺ C₁₂H₁₆NO₂の計算値：206.1181；実測値：206.1175。

30

【0 3 4 0】

エチル2-(3, 4-ジクロロベンゾイル)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物1

DCM (20 mL) 中のInt. (200 mg, 0.964 mmol) の溶液を0°及びN₂雰囲気下で、TEA (0.20 mL, 1.4 mmol) により処理した。この混合物に、DCM (5 mL) 中の3, 4-ジクロロベンゾイルクロリド (202 mg, 0.964 mmol) の溶液を滴下して加え、反応混合物を一晩、室温に温めて置いた。溶媒を減圧下で除去し、残余物を酢酸エチル (EtOAc) (30 mL) 中に再懸濁して1.0 MのHCl (2×15 mL)、NaHCO₃ (3×15 mL) 及び鹼水 (3×15 mL) で洗浄し、乾燥 (MgSO₄)、ろ過、並びに減圧下で蒸発させた。粗製物をクロマトグ

40

50

ラフィー（*n*-Hex 対 EtOAc、5：1、Rf：0.40）により精製して、白色の固体（225mg；収率：62%）として1を得た。回転異性体の比率は、5.4：4であり、室温での¹H-NMR積分値から得られた。¹H-NMR（（CD₃）₂SO）回転異性体A δ=7.81（d，J=8.2，1H，H18）、7.72（s，1H，H15）、7.47（d，J=8.2，1H，H19）、7.33～7.09（m，4H，H7～10）、5.12（t，J=5.3，1H，H4）、4.59（d，J=15.6，1H，H12i）、4.52（d，J=15.6，1H，H12ii）、4.06（q，J=7.0，2H，H2）、3.28（m，2H，H5）、1.11（t，J=7.0，3H，H1）。回転異性体B δ=7.76（d，J=8.2，1H，H18）、7.67（s，1H，H15）、7.40（d，J=8.2，1H，H19）、7.33～7.09（m，4H，H7～10）、4.97（d，J=17.7，1H，H12i）、4.80（br，1H，H4）、4.46（d，J=17.7，1H，H12ii）、3.98（q，J=7.0，2H，H2）、3.18（m，2H，H5）、1.00（t，J=7.0，3H，H1）；¹³C／ppm（（CD₃）₂SO）δ=170.27（C3）、170.09（C3）、168.56（C13）、167.76（C13）、136.38、136.16、133.11、132.75、132.49、131.90、131.61、131.56、131.10、128.94、128.62、128.28、127.81、127.16、126.77、126.66、126.54、125.97、61.20（C2）、60.75（C2）、56.21（C4）、52.72（C4）、47.45（C12）、43.09（C12）、30.66（C5）、30.18（C5）、13.95（C1）、13.83（C1）；LC-MS（50～98% MeCN）rt=7.49分；m/z 378.26（[M+H]⁺）；HRMS（m/z）：[M+H]⁺ C₁₉H₁₈NO₃Cl₂の計算値：378.0664；実測値：378.0677。

【0341】

エチル2-（3，4-ジフルオロベンゾイル）-1，2，3，4-テトラヒドロイソキノリン3-カルボキシレート、化合物2

化合物2は、3，4-ジフルオロベンゾイルクロリド（0.30mL、2.4mmol）を使用して、化合物1のために記載する手順に従ってint.（500mg、2.41mmol）から調製した。粗製物をクロマトグラフィー（*n*-Hex 対 EtOAc、5：1、Rf：0.37）により精製して、経時的に結晶化する淡黄色の油（547mg；収率：66%）として2を得た。回転異性体の比率は、5.4であり、室温での¹H-NMR積分値から得られた。¹H-NMR（（CD₃）₂SO）回転異性体A δ=7.63～7.05（m，8H）、5.09（t，J=5.3，1H，H4）、4.58（d，J=15.6，1H，H12i）、4.51（d，J=15.6，1H，H12ii）、4.04（q，J=6.9，2H，H2）、3.25（dd，J=15.8，5.9，2H，H5）、1.09（t，J=7.0，3H，H1）。回転異性体B δ=7.63～7.05（m，8H）、4.95（d，J=17.6，1H，H12i）、4.78（br，1H，H4）、4.42（d，J=17.7，1H，H12ii）、3.96（q，J=7.0，2H，H2）、3.16（m，2H，H5）、0.97（t，J=7.0，3H，H1）；¹³C／ppm（（CD₃）₂SO）δ=170.34（C3）、170.09（C3）、168.84（C13）、167.96（C13）、150.35（C16）、150.25（C16）、148.39（C17）、148.28（C17）、133.17、133.00、132.78、131.88、131.65、129.36、128.32、127.84、127.46、127.16、126.66、126.56、125.94、124.42、123.94、118.15、118.01、116.76、116.62、116.41、116.27、61.19（C2）、60.73（C2）、56.24（C4）、52.78（C4）、47.56（C12）、43.12（C12）、30.63（C5）、30.21（C5）、13.95（C1）、13.81（C1）。LC-MS（50～98% MeCN）rt=7.31分；m/z 34

6.22 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₉H₁₈NO₃F
2の計算値: 346.1255; 実測値: 346.1264。

【0342】

エチル 2-(4-フルオロベンゾイル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物 3

化合物 3 は、4-フルオロベンゾイルクロリド (0.19 mL、1.6 mmol) を使用して、化合物 1 のために記載する手順に従って int. (330 mg、1.59 mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex 対 EtOAc、3:1、R_f:0.21) により精製した後、Isolera 上で n-Hex:EtOAc のスローグラジエント法 (2~98% EtOAc) を行って、経時的に結晶化する透明な油 (315 mg; 収率: 61%) として 3 を得た。回転異性体の比率は、5.4:4 であり、室温での ¹H-NMR 積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 回転異性体 A δ=7.64~7.03 (m, 8H, Ar)、5.15 (t, J=4.7, 1H, H₄)、4.62 (d, J=16.0, 1H, H_{12i})、4.54 (d, J=16.0, 1H, H_{12ii})、4.07 (q, J=6.7, 2H, H₂)、3.28 (dd, J=15.8, 5.9, 2H, H₅)、1.12 (t, J=6.7, 3H, H₁)。回転異性体 B δ=7.64~7.03 (m, 8H, Ar)、5.01 (d, J=17.7, 1H, H_{12i})、4.78 (br, 1H, H₄)、4.48 (d, J=17.7, 1H, H_{12ii})、3.97 (q, J=6.7, 2H, H₂)、3.18 (m, 2H, H₅)、0.99 (t, J=6.7, 3H, H₁); ¹³C/ppm ((CD₃)₂SO) δ=170.47 (C₃)、170.23 (C₃)、170.14 (C₁₃)、169.19 (C₁₃)、133.25、132.86、131.84、129.53、129.11、128.30、127.88、127.14、126.66、125.87、115.76、115.59、61.14 (C₂)、60.68 (C₂)、56.33 (C₄)、52.70 (C₄)、47.67 (C₁₂)、43.13 (C₁₂)、30.75 (C₅)、30.19 (C₅)、13.96 (C₁)、13.82 (C₁)。LC-MS (50~98% MeCN) rt=6.42 分; m/z 328.21 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₉H₁₉NO₃F の計算値: 328.1349; 実測値: 328.1349。

【0343】

ジエチル 3,4-ジヒドロイソキノリン-2,3(1H)-ジカルボキシレート、化合物 4

化合物 4 は、クロロギ酸エチル (0.05 mL、0.5 mmol) を使用して、化合物 1 のために記載する手順に従って Int. (110 mg、0.530 mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex 対 EtOAc、3:2、R_f:0.36) により精製して、淡黄色の油 (235 mg; 収率: 87%) として 4 を得た。回転異性体の比率は、5:4 であり、室温での ¹H-NMR 積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 回転異性体 A δ=7.24~7.07 (m, 4H, H_{7~10})、5.13 (dd, J=6.0, 3.2, 1H, H₄)、4.77~4.73 (d, J=16.0, 2H, H_{12i})、4.57~4.53 (d, J=16.0, 2H, H_{12ii})、4.21 (m, 2, H₁₄)、4.07 (m, 2H, H₂)、3.28~3.15 (dd, J=38.0, 16.0, 2H, H₅)、1.33 (t, J=7.1, 3H, H₁₅)、1.11 (m, 3H, H₁)。回転異性体 B δ=7.24~7.07 (m, 4H, H_{7~10})、4.90 (m, 1H, H₄)、4.78~4.74 (d, J=16.0, 2H, H_{12i})、4.60~4.56 (d, J=16.0, 2H, H_{12ii})、4.21 (m, 2H, H₁₄)、4.07 (m, 2H, H₂)、3.27~3.13 (dd, J=38.0, 16.0, 2H, H₅)、1.25 (t, J=7.1, 3H, H₁₅)、1.11 (m, 3H, H₁); ¹³C/ppm ((CD₃)₂SO) δ=167.59 (C₃)、157.21 (C₁₃)、144.65、132.04、129.82、127.90、127.13、126.65、68.56、66.62、61.13、53.93 (C₄)、44.59 (C₁₂)、31.33 (C₅)、14.41 (C₁₅)、1

4.32 (C1)。LC-MS (20~98% MeCN) r_t = 10.35分; m/z 278.21 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₅H₂₀NO₄の計算値: 278.1392; 実測値: 278.1396。

【0344】

2-tert-ブチル3-エチル3,4-ジヒドロイソキノリン-2,3(1H)-ジカルボキシレート、化合物5

化合物5は、ジ-tert-ブチルデカルボネート (Boc無水物) (252mg、1.15mmol) 及びTEA (0.20mL、1.5mmol) を使用して、無水THF (20mL) 中のInt (200mg、0.964mmol) から調製した。反応混合物をN₂雰囲気下、 r_t で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残余物を酢酸エチル (EtOAc) (30mL) 中に再懸濁して飽和NaHCO₃ (aq、3×15mL) 及び鹼水 (3×15mL) で洗浄し、乾燥 (MgSO₄)、ろ過、並びに減圧下で蒸発させた。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex対EtOAc、5:1、R_f:0.56) により精製して、透明な油 (233mg; 収率: 79%) として5を得た。回転異性体の比率は、5:4であり、室温での¹H-NMR積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 回転異性体A δ = 7.37~6.97 (m, 4H, Ar)、4.72~4.64 (t, J = 4.7, 1H, H₄)、4.66~4.38 (m, 2H, H₁₂)、4.06~4.01 (m, 2H, H₂)、3.20~3.04 (dd, J = 48.0, 15.1, 1H, H_{5i})、3.3.21~3.03 (dd, J = 60.0, 12.1, 1H, H_{5ii})、1.39 (s, 9H, H₁₅)、1.08 (t, J = 7.1, 3H, H₁)。回転異性体B δ = 7.37~6.97 (m, 4H, Ar)、4.91 (t, J = 4.7, 1H, H₄)、4.66~4.38 (m, 2H, H₁₂)、4.01~3.95 (q, J = 8.0, 4.0, 2H, H₂)、3.14 (d, J = 4.6, 2H, H₅)、1.47 (s, 9H, H₁₅)、1.06~1.01 (t, J = 7.1, 3H, H₁); ¹³C/ppm ((CD₃)₂SO) δ = 171.95 (C₃)、171.48 (C₃)、155.08 (C₁₃)、154.52 (C₁₃)、134.44、133.44、133.08、132.40、128.57、128.08、127.33、127.10、126.65、126.55、80.24 (C₁₄)、80.04 (C₁₄)、61.03 (C₂)、54.50 (C₄)、52.95 (C₄)、44.76 (C₁₂)、44.15 (C₁₂)、31.44 (C₅)、31.22 (C₅)、28.52 (C₁₅)、28.35 (C₁₅)、14.50 (C₁)、14.40 (C₁)。LC-MS (20~98% MeCN) r_t = 7.59分; m/z 306.31 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₇H₂₄NO₄の計算値: 306.1705; 実測値: 306.1707。

【0345】

エチル2-(チオフェン-2-カルボニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物6

化合物6は、2-チオフェンカルボニルクロリド (0.13mL、1.2mmol) を使用して、化合物1のために記載する手順に従ってInt. (230mg、1.11mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex対EtOAc、3:1、R_f:0.31) により精製した後、H₂O:MeCNのスローグラジエント法 (2~98% MeCN) による逆相Isoleraを行って (271mg; 収率: 77%) 黄色の油 (145mg; 収率: -) として6を得た。回転異性体の比率は、5:4であり、室温での¹H-NMR積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) では、非常に急速に分解され、NMRの評価が不可能であり、¹³C/ppm ((CD₃)₂SO) では、非常に急速に分解され、NMRの評価が不可能であった。LC-MS (20~98% MeCN) r_t = 11.09分; m/z 316.19 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₇H₁₈NO₃Sの計算値: 316.1007; 実測値: 316.1016。

【0346】

10

20

30

40

50

エチル 2-（フラン-2-カルボニル）-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物 7

DMF（20 mL）中の 2-フロ酸（161 mg、1.44 mmol）の溶液を TEA（0.27 mL、1.9 mmol）、EDC カップリング剤（257 mg、1.34 mmol）及び HOBt（181 mg、1.34 mmol）により処理し、rt で 5 分間、攪拌して置いた。この混合物に、Int.（200 mg、0.960 mmol）を加え、反応混合物を N₂ 雰囲気下、rt で一晩、攪拌して置いた。dH₂O 60 mL を加えて反応を停止させ、産物を EtOAc（3×15 mL）により抽出した。すべての有機画分をともに混合させ、5%の LiCl（3×15 mL）で洗浄して、微量の DMF、NaHCO₃（3×15 mL）及び 鹹水（3×15 mL）を除去し、乾燥（MgSO₄）、ろ過、並びに減圧下で蒸発させた。粗製物をクロマトグラフィー（n-Hex 対 EtOAc、3.5 : 1、Rf : 0.22）により精製して、淡黄色の油（266 mg；収率：93%）として 7 を得た。回轉異性体の比率は、室温での ¹H NMR においてシグナルが融合して現れたため、評価が不可能であった。¹H NMR（(CD₃)₂SO）δ = 8.16 ~ 7.77（d, J = 44.0, 1H, H15）、7.37 ~ 7.00（m, 5H, H7 ~ 10, H16）、6.69（d, J = 22.3, 1H, H17）、5.44（br, 0.35H, H4b）、5.13（br, 0.65H, H4a）、5.11 ~ 5.07（d, J = 16.0, 0.6H, H12ai）、4.93 ~ 4.89（d, J = 16.0, 0.6H, H12aai）、4.83 ~ 4.79（d, J = 16.0, 0.4H, H12bi）、4.59 ~ 4.55（d, J = 16.0, 0.4H, H12bii）、4.00（m, 2H, H2）、3.24（br, 2H, H5）、1.02（s, 3H, H1）；¹³C / ppm（(CD₃)₂SO）δ = 171.30（C3）、170.92（C3）、159.86（C13）、159.67（C13）、147.67、147.05、146.03、145.66、133.65、133.20、132.87、132.76、128.26、127.53、127.24、126.89、126.61、117.35（C17）、116.87（C17）、112.06（C16）、61.38（C2）、61.09（C2）、55.92（C4）、53.49（C4）、47.09（C12）、44.46（C12）、32.11（C5）、30.99（C5）、14.37（C1）；LC-MS（20 ~ 98% MeCN）rt = 4.16 分；m/z 300.33（[M+H]⁺）；HRMS（m/z）：[M+H]⁺ C₁₇H₁₈NO₄ の計算値：300.1236；実測値：300.1247。

【0347】

エチル 2-（イソオキサゾール-5-カルボニル）-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物 8

化合物 8 は、5-カルボニルクロリド（0.31 mL、1.5 mmol）を使用して、化合物 1 のために記載する手順に従って Int.（375 mg、1.82 mmol）から調製した。粗製物をクロマトグラフィー（n-Hex 対 EtOAc、1 : 1、Rf : 0.73 及び n-Hex 対 EtOAc、3 : 1、Rf : 0.24）により精製して、淡黄色の油（395 mg；収率：69%）として 8 を得た。回轉異性体の比率は、4.7 : 4 であり、室温での ¹H NMR 積分値から得られた。¹H-NMR（(CD₃)₂SO）回轉異性体 A δ = 8.82（d, J = 32.9, 1H, H16）、7.34 ~ 7.21（m, 4H, H7 ~ 10）、7.09（d, J = 71.4, 1H, H15）、5.20（m, 1H, H4）、4.93 ~ 4.89（d, J = 15.7, 1H, H12i）、4.83 ~ 4.79（d, J = 15.7, 1H, H12ii）、4.02（m, 2H, H2）、3.26（m, 2H, H5）、1.06（t, J = 7.1, 3H, H1）。回轉異性体 B δ = 8.82（d, J = 32.9, 1H, H16）、7.34 ~ 7.21（m, 4H, H7 ~ 10）、7.09（d, J = 71.4, 1H, H15）、5.20（m, 1H, H4）、4.84（m, 1H, H12i）、4.65 ~ 4.61（d, J = 15.7, 1H, H12ii）、4.02（m, 2H, H2）、3.26（m, 2H, MRes Drug Discovery & Development 2017 H5）、0.99（t, J = 7

. 1, 3 H, H1) ; $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) $\delta=170.66$ (C3)、
170.32 (C3)、162.68 (C13)、162.20 (C13)、158.7
4 (C14)、158.30 (C14)、151.67 (C15)、151.54 (C1
5)、133.10、132.53、132.33、128.39、128.27、12
7.77、127.45、127.34、126.99、126.64、107.90 (C
16)、107.56 (C16)、61.67 (C2)、61.32 (C2)、56.
07 (C4)、53.67 (C4)、46.97 (C12)、44.51 (C12)、3
1.84 (C5)、30.80 (C5)、14.37 (C1)、14.26 (C1)。LC-MS (20~98%MeCN) $r_t=10.03$ 分; m/z 301.31 ([M+
H] +); HRMS (m/z) : [M+H] + $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ の計算値: 301
.1188; 実測値: 301.1189。

10

【0348】

エチル 2- (オキサゾール-5-カルボニル) -1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノ
リン-3-カルボキシレート、化合物 9

化合物 9 は、1, 3-オキサゾール-5-カルボン酸 (150mg、1.32mmol)
) を使用して、化合物 7 のために記載する EDC カップリング手順に従って Int. (3
25mg、1.58mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex
対 EtOAc、1.5:1、Rf:0.42) により精製した後、逆相 Isolera 上
で H₂O:MeCN のスローグラジエント法 (2~98%MeCN) を行つて、透明な油
(320mg; 収率: 68%) として 9 を得た。回転異性体の比率は、ほとんどのシグナ
ルが融合して現れたため、評価が困難であった。ピークのいくつかは、別々に現れて 7.
6:4 の比率を示し、これは室温での ^1H NMR 積分値から得られた。 ^1H -NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 回転異性体 A $\delta=8.67$ (s, 1H, H15)、8.03 (s,
1H, H16)、7.32~7.21 (m, 4H, H7~10)、5.20 (t, J=5
.3, 1H, H4)、5.04 (d, J=15.4, 1H, H12i)、4.92 (d,
J=15.5, 1H, H12ii)、4.06~3.95 (m, 2H, H2)、3.23
(br, 2H, H5)、1.01 (br, 3H, H1)。回転異性体 B $\delta=8.59$ (s,
1H, H15)、7.75 (s, 1H, H16)、7.32~7.21 (m, 4H,
H7~10)、5.40 (br, 1H, H4)、4.83 (d, J=17.2, 1H, H
12i)、4.59 (d, J=17.2, 1H, H12ii)、4.06~3.95 (m
, 2H, H2)、3.27 (br, 2H, H5)、1.01 (br, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) $\delta=170.99$ (C3)、170.63 (C3)、1
58.75 (C13)、158.29 (C13)、154.28 (C15)、153.7
8 (C15)、144.89 (C14)、144.46 (C14)、133.19、13
3.00、132.74、132.01、131.36、128.28、127.60、
127.28、126.94、126.74、61.57 (C2)、61.18 (C2)
、55.82 (C4)、53.36 (C4)、46.81 (C12)、44.41 (C1
2)、31.96 (C5)、30.98 (C5)、14.53 (C1)、14.34 (C
1)。LC-MS (20~98%MeCN) $r_t=8.95$ 分; m/z 301.31 (
[M+H] +); HRMS (m/z) : [M+H] + $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ の計算値:
301.1188; 実測値: 301.1201。

20

30

40

【0349】

エチル 2- (チアゾール-5-カルボニル) -1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノ
リン-3-カルボキシレート、化合物 10

化合物 10 は、1, 3-チアゾール-5-カルボン酸 (150mg、1.16mmol)
) を使用して、化合物 7 のために記載する EDC カップリング手順に従って Int. (2
86mg、1.39mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex
対 EtOAc、2:3、Rf:0.37) により精製して、透明な油 (125mg; 収率
: 35%) として 10 を得た。回転異性体の比率は、室温での ^1H NMR においてピー
クが融合して現れたため、評価が不可能であった。 ^1H -NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ

50

= 9.32 (s, 1H, H15)、8.56~8.06 (m, 1H, H16)、7.29~7.18 (m, 4H, H7~10)、5.19 (s, 1H, H4)、4.96 (m, 1.7H, H12a, H12bi)、4.53 (d, J=13.6, 0.3H, H12bi)、4.01 (q, J=8, 2H, H2)、3.24 (br, 2H, H5)、1.10 (br, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =163.01 (C3)、162.10 (C3)、158.23 (C13)、157.49 (C13)、145.06 (C15)、143.68 (C15)、133.38、133.05、132.52、129.36、128.66、128.27、127.60、127.24、126.74、125.77、61.73 (C2)、61.19 (C2)、57.04 (C4)、53.86 (C4)、48.08 (C12)、44.45 (C12)、31.58 (C5)、31.02 (C5)、14.35 (C1)。LC-MS (20~98% MeCN) r_t =9.38分; m/z 317.23 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₆H₁₇N₂O₃Sの計算値: 317.0960; 実測値: 317.0968。

【0350】

エチル2-(4-メチルオキサゾール-5-カルボニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物11

化合物11は、4-メチルオキサゾール-5-カルボン酸 (150mg、1.52mmol) を使用して、化合物7のために記載するEDCカップリング手順に従ってInt. (291mg、1.42mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (nHex 対 EtOAc、1:1、Rf: 0.20) により精製して、透明な油 (216mg; 収率: 58%) として11を得た。回転異性体の比率は、ほとんどのシグナルが融合して現れたため、評価が困難であった。ピークのいくつかは、別々に現れて4.7:4の比率を示し、これは室温での¹H-NMR積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) δ =8.53 (s, 0.55H, H15a)、8.42 (s, 0.45H, H15b)、7.23 (br, 4H, H7~10)、5.26 (br, 0.45H, H4b)、5.07 (br, 0.55H, H4a)、4.92 (d, J=16.0, 0.45H, H12bi)、4.80 (m, 1.1H, H12a)、4.56 (d, J=16.0, 0.45H, H12bi)、4.03 (br, 2H, H2)、3.25 (m, 2H, H5)、2.33 (s, 3H, H17)、1.08~0.99 (m, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =171.45 (C3)、170.74 (C3)、159.74 (C13)、158.01 (C13)、152.21 (C15)、151.92 (C15)、139.86、139.39、134.59、134.08、132.98、132.44、129.35、128.65、128.28、127.89、127.59、127.23、125.76、61.23 (C2)、55.74 (C4)、53.53 (C4)、46.67 (C12)、44.38 (C12)、32.04 (C5)、30.74 (C5)、14.35 (C1)、13.18 (C17)。LC-MS (20~98% MeCN) r_t =9.55分; m/z 315.28 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₇H₁₉N₂O₄の計算値: 315.1345; 実測値: 315.1352。

【0351】

エチル2-(4-メチルチアゾール-5-カルボニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物12

化合物12は、4-メチルチアゾール-5-カルボン酸 (150mg、1.04mmol) を使用して、化合物7のために記載するEDCカップリング手順に従ってInt. (257mg、1.25mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (nHex 対 EtOAc、2:3、Rf: 0.43) により精製して、透明な油 (196mg; 収率: 60%) として12を得た。回転異性体の比率は、ほとんどのシグナルが融合して現れたため、評価が困難であった。ピークのいくつかは、別々に現れて7.2:4の比率を示し、これは室温での¹H-NMR積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO

) = 9.18 (s, 1H, H15)、7.22 (m, 4H, H7~10)、5.16 (br, MRes Drug Discovery & Development 2017 0.65H, H4a)、4.97 (d, J=15.5, 0.35H, H12bi)、4.84 (s, 0.35H, H4b)、4.56 (br, 1.65H, H12a+H12bi)、4.03 (br, 2H, H2)、3.22 (m, 2H, H5)、2.46 (br, 3H, H17)、1.11 (m, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ = 170.67 (C3)、163.66 (C13)、154.96、152.47、133.41、132.09、128.34、127.72、127.19、126.49、124.79、61.39 (C2)、53.52 (C4)、47.43 (C12)、30.58 (C5)、16.25 (C17)、14.39 (C1)。LC-MS (20~98% MeCN) rt=9.59分; m/z 330.94 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₇H₁₉N₂O₃Sの計算値: 331.1116; 実測値: 331.1130。

【0352】

エチル2-(4-メチル-2-フェニルチアゾール-5-カルボニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物13

化合物13は、4-メチル-2-フェニルチアゾール-5-カルボン酸 (213mg、0.974mmol) を使用して、化合物7のために記載するEDCカップリング手順に従ってInt. (240mg、1.17mmol) から調製した。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex対EtOAc、5:2、Rf:0.32) により精製して、オレンジ色の油 (298mg; 収率: 75%) として13を得た。回転異性体の比率は、室温での¹H-NMRにおいてシグナルが融合して現れたため、評価が不可能であった。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) = 7.97 (br, 2H, H17+H21)、7.53 (m, 3H, H18~20)、7.23 (m, 4H, H7~10)、5.15~5.54 (m, 3H, H4+H12)、4.06 (br, 2H, H2)、3.24 (m, 2H, H5)、2.48 (s, 3H, H23)、1.11 (br, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ = 170.60 (C3)、167.22 (C15)、153.10 (C13)、132.83、131.30、129.82、128.40、127.19、126.75、61.47 (C2)、53.57 (C4)、47.60 (C12)、30.68 (C5)、16.59 (C23)、14.40 (C1)。LC-MS (20~98% MeCN) rt=12.85分; m/z 407.44 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₂₃H₂₃N₂O₃Sの計算値: 407.1429; 実測値: 407.1418。

【0353】

メチル2-(3,4-ジクロロベンゾイル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート、化合物14

化合物14は、int.のために記載する手順に従って、メタノール (10mL) 中の1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリンカルボン酸 (150mg、0.702mmol) のエステル化後の中間体から調製した。16は、さらには精製せずに使用し (90mg、0.47mmol)、化合物1のためのこれまでに記載する手順に従い、3,4-クロロベンゾイルクロリド (98mg、0.47mmol) を使用した。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex対EtOAc、2:1、Rf:0.54) により精製して、白色の粉末 (123mg; 収率: 73%) として14を得た。回転異性体の比率は、5.4:4であり、室温での¹H-NMR積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 回転異性体A δ = 7.8 (d, J=8.2, 1H, H18)、7.71 (s, 1H, H14)、7.47 (d, J=8.1, 1H, H17)、7.28~7.10 (m, 4H, H6~9)、5.17 (t, J=8, 1H, H3)、4.56 (dd, J=24.0, 16.0, 2H, H11)、3.62 (s, 3H, H1)、3.28 (dd, J=16.0, 6.1, 2H, H4)。回転異性体B δ = 7.74 (d, J=8.2, 1H, H18)、7.69 (s, 1H, H14)、7.40 (d, J=8.1, 1H, H17)、7.

2.8~7.10 (m, 4H, H6~9)、5.01 (d, $J=17.7$, 1H, H11i)、4.84 (br, 1H, H3)、4.42 (d, $J=17.7$, 1H, H11ii)、3.53 (s, 3H, H1)、3.22~3.12 (m, 2H, H4); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) $\delta=171.32$ (C2)、171.14 (C2)、169.03 (C12)、168.26 (C12)、136.76、136.58、133.47、133.28、133.16、132.26、132.08、131.56、129.46、129.17、128.81、128.36、127.67、127.15、126.45、56.64 (C3)、55.36 (C3)、53.05 (C1)、52.70 (C1)、47.88 (C11)、43.40 (C11)、30.95 (C4)、30.52 (C4)。LC-MS (20~98% MeCN) $r_t=12.44$ 分; m/z 364.28 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₈H₁₆NO₃Cl₂の計算値: -364.0507; 実測値: 364.0499。

【0354】

2-(3,4-ジクロロベンゾイル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、中間体17

中間体17は、塩基性条件下で加水分解後に化合物1 (250mg、0.663mmol) から調製した。1は、MeOH:H₂O (80:20) (15mL) 中に溶解し、2.0MのNaOH (7.5mL) を混合物に滴下して加えた。反応混合物を r_t で5時間、攪拌して置いた。溶媒を減圧下で除去し、残余物を水 (30mL) 中に再懸濁した。混合物を1.0MのHClによりpH4に酸性化し、産物をEtOAc (3×15mL) により抽出し、鹹水 (3×15mL) で洗浄、乾燥 (MgSO₄)、ろ過し、溶媒を減圧下で蒸発させた。17は、白色の固体 (230mg; 収率: 100%) として得、さらには精製せずに使用した。回転異性体の比率は、1:1であり、室温での¹H NMR積分値から得られた。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 回転異性体A $\delta=12.98$ (s, 1H, OH)、7.78 (d, $J=15.7$, 1H, H16)、7.68 (s, 1H, H13)、7.44 (d, $J=23.0$, 1H, H17)、7.31~7.08 (m, 4H, H5~8)、5.14 (t, $J=4.8$, 1H, H2)、4.54 (s, 2H, H10)、3.27~3.09 (m, 2H, H3)。回転異性体B $\delta=12.98$ (s, 1H, OH)、7.76 (d, $J=15.7$, 1H, H16)、7.66 (s, 1H, H13)、7.42 (d, $J=23.0$, 1H, H17)、7.31~7.08 (m, 4H, H5~8)、4.97 (d, $J=17.7$, 1H, H10i)、4.68 (br, 1H, H2)、4.48 (d, $J=17.7$, 1H, H10ii)、3.27~3.09 (m, 2H, H3); LC-MS (50~98% MeCN) $r_t=4.99$ 分; m/z 350.25 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₇H₁₄NO₃Cl₂の計算値: 350.0351; 実測値: 350.0356。

【0355】

2-(3,4-ジクロロベンゾイル)-N-エチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキサミド、化合物15

化合物15は、中間体17から調製した。DMF (15mL) 中の17 (100mg、0.286mmol) の溶液をTEA (0.080mL、0.57mmol)、EDCカップリング剤 (76.5mg、0.400mmol) 及びHOBt (54.1mg、0.400mmol) により処理し、 r_t で5分間、攪拌して置いた。この混合物に2.0Mのエチルアミン (0.17M Res Drug Discovery & Development 2017mL、0.34mmol) を加え、反応混合物をN₂雰囲気下、 r_t で一晩、攪拌して置いた。dH₂O 40mLを加えて反応を停止させ、産物をEtOAc (3×15mL) により抽出した。すべての有機画分をともに混合させ、5%のLiCl (3×15mL) で洗浄して、微量のDMF、NaHCO₃ (3×15mL) 及び鹹水 (3×15mL) を除去し、乾燥 (MgSO₄)、ろ過、並びに減圧下で蒸発させた。粗製物をクロマトグラフィー (n-Hex対EtOAc、1:1、Rf: 0.26) により精製して、淡黄色の油 (74mg; 収率: 69%) として15を得た。回転異性体の比率は、5.4:4であり、室温での

^1H NMR積分値から得られた。 ^1H -NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 回転異性体A $\delta = 7.94$ (t, $J = 5.5$, 1H, NH)、 7.79 (s, 1H, H15)、 7.77 (d, $J = 8.1$, 1H, H19)、 7.49 (d, $J = 7.8$, 1H, H18)、 $7.24 \sim 7.05$ (m, 4H, H7~10)、 4.88 (br, 1H, H4)、 4.50 (m, 2H, H12)、 3.11 (m, 2H, H5)、 3.03 (q, $J = 4.0$, 2H, H2)、 0.90 (t, $J = 6.7$, 3H, H1)。回転異性体B $\delta = 7.94$ (t, $J = 5.5$, 1H, NH)、 7.72 (d, $J = 8.1$, 1H, H19)、 7.62 (s, 1H, H15)、 7.36 (d, $J = 7.8$, 1H, H18)、 $7.24 \sim 7.05$ (m, 4H, H7~10)、 4.96 (d, $J = 17.1$, 1H, H12i)、 4.56 (m, 1H, H12ii)、 4.36 (br, 1H, H4)、 3.11 (m, 2H, H5)、 2.92 (m, 2H, H2)、 0.81 (t, $J = 6.7$, 3H, H1) ; $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) $\delta = 169.45$ (C3)、 169.14 (C3)、 168.27 (C13)、 167.97 (C13)、 137.09 、 136.64 、 133.67 、 133.47 、 132.60 、 132.44 、 132.30 、 132.17 、 131.29 、 130.98 、 130.85 、 129.23 、 128.37 、 128.03 、 127.77 、 127.48 、 127.05 、 126.70 、 126.48 、 126.34 、 125.80 、 56.88 (C4)、 53.60 (C4)、 47.68 (C12)、 43.49 (C12)、 33.53 (C2)、 33.45 (C2)、 31.64 (C5)、 30.74 (C5)、 14.73 (C1)、 14.56 (C1) ; LC-MS (20~98% MeCN) $r_t = 10.87$ 分 ; m/z 377.18 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ; HRMS (m/z) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ C₁₉H₁₉N₂O₂Cl₂の計算値 : 377.0824 ; 実測値 : 377.0821。

【実施例2】

【0356】

REV-ERB α アンタゴニスト活性についての化合物のスクリーニング

HEK293T細胞を解凍し、10%のFCS及び1%のP/Sを添加したDMEM中に37℃及び5%CO₂で維持した。細胞を24ウェルプレート内に播種した (DMEM 0.5mL + 10% FCS 中 $7 \cdot 10^4$ 細胞/ウェル)。播種後24時間に、細胞にBmal-luc 100ng、内部対照としてpRL-CMVウミシイタケ10ng、及びREV-ERB α 10ng又は対照として空のベクターpcDNA3をトランスフェクトした。すべての条件は、BSMを使用することによりDNA総計400ngと等しくした。トランスフェクション試料を調製するために、各条件に必要とする算出量のDNAをOpti-MEMにより調製し、Fugeneを5:2のFugene:DNA比で加えた。混合物をボルテックスして確実に均一とし、 r_t で15分間インキュベートして置いた。後に、各DNA混合物を、事前に播種した細胞を含む24ウェルプレート内に移し、各条件は、3連で反復した。トランスフェクション後5時間に、細胞を化合物2~12、AG1~AG5又は媒体としてのDMSOにより処理した。DMEM中の化合物の溶液を、最終的に所望のものよりも2倍の濃度で調製し、このような溶液0.5mLを各ウェルに加えた。トランスフェクション後24時間に、細胞を溶解し、Dual-Luciferase Reporter Assay System E2920 (Promega社) を使用してルシフェラーゼ活性を測定した。実験を実施するために、受動的溶解緩衝液 (PLB) (1:5希釈) 50 μL を各ウェルに加え、30分間穏やかに攪拌することにより細胞を溶解した。各細胞ライセートを96ウェルプレートに移した。Dual-Glo試薬50 μL を各ウェル内に分注し、穏やかに軽くたたいて混合し、10分間インキュベートした。ホタルルシフェラーゼの発光は、Tecan VICTOR Light Luminescent計数機器を使用して測定した。次いで、Stop&Glo試薬50 μL を分注してホタル活性を停止させ、ウミシイタケルシフェラーゼを活性化し、10分間インキュベートして測定した。ホタル活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対して正規化した。結果は、補正したパラメトリックなウェルチのt検定を使用して分析した。

【0357】

10

20

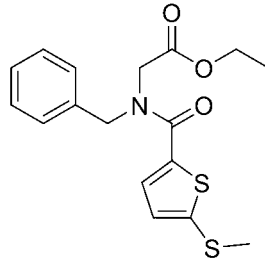
30

40

50

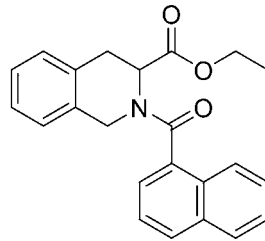
【化 3 4】

開SR

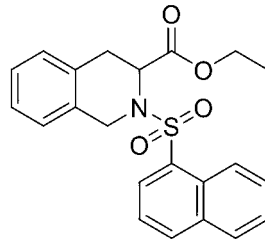


10

AG1

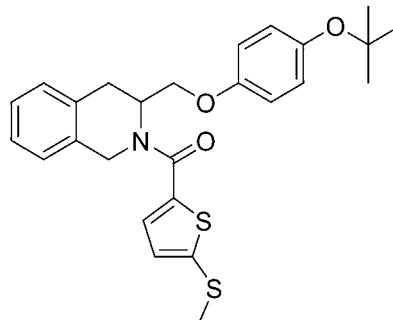


AG2



20

AG5



30

【 0 3 5 8 】

2. 得られたデータは、図 3 に示し、3 連で行う 3 回の独立の実験から得られた平均値及び標準誤差として表す。

【 0 3 5 9 】

図 3 から明らかなように、化合物 4、7、8、11 及び 12 はすべて、SR8278 と比較してルシフェラーゼ発現の有意な増加をもたらし（*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 及び****は $p < 0.0001$ ）、これらが SR8278 よりも強力な REV-ERB α アンタゴニストであることを示した。

40

【実施例 3】

【 0 3 6 0 】

REV-ERB α アンタゴニスト活性についてのさらなる化合物のスクリーニング

化合物 70～72（実施例 1 に記載のように生成）を使用して、実施例 2 の方法を反復した。化合物 4、7 及び 11（実施例 2 において試験）を、REV-ERB 阻害活性のための陽性対照として使用し、アゴニスト化合物 AG2（これも実施例 2 において試験）及び DMSO も比較物として試験した。

【 0 3 6 1 】

得られたデータを図 4 に示し、3 連で行う 2 回の独立の実験から得られた平均値及び標

50

準誤差として表す。化合物 72 では、SR8278 を使用して得られる作用よりも優れた、REV-ERB に対する阻害作用が観察され、結果は、統計学的に有意であり（*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 及び***は $p < 0.001$ ）、これが SR8278 よりも強力な REV-ERB α アンタゴニストであることを示した。

【実施例 4】

【0362】

REV-ERB α アンタゴニスト活性についてのさらなる化合物のスクリーニング

化合物 64～66、69 及び 70～73（実施例 1 に記載のように生成）を使用して、実施例 2 の方法を反復した。再度、化合物 4、7 及び 11（実施例 2 において試験）を、REV-ERB 阻害活性のための陽性対照として使用し、アゴニスト化合物 AG2（これ

10

【0363】

得られたデータを図 5 に示し、3 連で行う 3 回の独立の実験から得られた平均値及び標準誤差として表す。REV-ERB に対する阻害作用が、すべての化合物、特に、化合物 71～73 について観察され、結果は、統計学的に有意であった（*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 及び****は $p < 0.0001$ ）。

【実施例 5】

【0364】

REV-ERB β アンタゴニスト活性についての化合物のスクリーニング

実施例 2 の方法を反復したが、REV-ERB β 10 ng を REV-ERB α の代わりに使用した。化合物 4、66、69 及び 73 を試験した（実施例 1 に記載のように生成）。アゴニスト化合物 AG2 及び DMSO も比較物として試験した。

20

【0365】

得られたデータを図 6 に示し、3 連で行う 3 回の独立の実験から得られた平均値及び標準誤差として表す。REV-ERB に対する阻害作用が、すべての化合物、特に、化合物 4 について観察され、結果は、統計学的に有意であった（*は $p < 0.05$ 及び***は $p < 0.0001$ ）。

【実施例 6】

【0366】

REV-ERB α アンタゴニスト活性についてのさらなる化合物のスクリーニング

化合物 16～19、27、28 及び 44（実施例 1 に記載のように生成）を使用して、実施例 2 の方法を反復した。再度、化合物 4、7 及び 11（実施例 2 において試験）を、REV-ERB 阻害活性のための陽性対照として使用し、アゴニスト化合物 AG2（これも実施例 2 において試験）及び DMSO も比較物として試験した。

30

【0367】

得られたデータを図 7 に示し、3 連で行う 3 回の独立の実験から得られた平均値及び標準誤差として表す。REV-ERB に対する阻害作用が、特に、化合物 27 及び 28 について観察され、結果は、統計学的に有意であった（*は $p < 0.05$ 、***は $p < 0.001$ 及び****は $p < 0.0001$ ）。

【実施例 7】

【0368】

REV-ERB β アンタゴニスト活性についてのさらなる化合物のスクリーニング

化合物 18 及び 19（実施例 1 に記載のように生成）を使用して、実施例 5 の方法を反復した。アゴニスト化合物 AG5 及び DMSO も比較物として試験した。

40

【0369】

得られたデータを図 8 に示し、3 連で行う 2 回の独立の実験から得られた平均値及び標準誤差として表す。REV-ERB に対する阻害作用が、両方の化合物について観察された（****は $p < 0.0001$ ）。

【実施例 8】

【0370】

50

REV-ERB α の阻害物質により、産生されたNK細胞の総数が増加する
化合物7及び11をSR8278とともにスクリーニングした。

【0371】

マウス。この試験において使用するすべてのマウスは、C57BL/6の遺伝的背景に関して野生型であり、6～12週齢であった。すべての畜産及び実験手順は、英国内務省の規制及び研究所のガイドラインに従って実施した。

【0372】

OP9細胞株及び細胞培養物。OP9は、これとともに共培養すると、造血前駆細胞のリンパ球の分化を支持することで知られる、マウス骨髄由来の間質細胞株である。OP9-GFP細胞は、20%のウシ胎仔血清(FBS)及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン(P/S)を添加したイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(Sigma-Aldrich社)で培養した。これらを2500細胞/ウェルで24ウェルプレート内に分割して2日後、Lin細胞をこれらの上に移した。細胞を5%CO₂、37℃の加湿雰囲気下で維持した。

【0373】

骨髄からの系統陰性細胞の単離。マウスの脚骨及び寛骨を、2%のFBSを加えたリン酸緩衝食塩水(PBS)中に粉碎して、骨髄細胞を解放した。細胞懸濁液を40 μ mのろ過器によりろ過し、PBS+2%FBSを40mLまでつぎ足し、500 $\times$ gで4分間、遠心分離した。細胞をPBS 2mL+2%FBSに再懸濁し、フィコエリトリン(PE)コンジュゲートカクテル(抗B220(RA3/6B2)抗体20 μ L、抗CD2(RM2-5)抗体20 μ L、抗Ter119(TE119)抗体20 μ L、抗NK1.1(PK136)抗体20 μ L、抗CD11b(M1/70)抗体5 μ L及びGr1(RB6-8C5)抗体5 μ L(すべてeBioscience社より))により4℃で5分間、染色した。次いで、細胞を洗浄し、遠心分離し、anti-PE Microbeads(Miltenyi社)とともに4℃で15分間インキュベートした。次に、細胞をPBSで洗浄し、LDカラム(Miltenyi社)を通過させて、カラムを流れる非染色Lin細胞の負の選択を可能とした。細胞50 μ Lを採取し、フローサイトメトリーを使用して枯渇後の純度を確認した。

【0374】

インビトロでの系統陰性細胞からのNK細胞の発生。24ウェルプレート内10%の胚性幹細胞適性FBS(ES-FBS)、1%のP/S、50 μ Mの β -メルカプトエタノール(β -ME)、10ng/mLのFlt3リガンド(Flt3L)(R&D Systems社)、10ng/mLのIL-7(R&D Systems社)及び100ng/mLの幹細胞因子(SCF)(R&D Systems社)を各ウェルに添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(Sigma-Aldrich社)1mLに、Lin細胞を5 $\times$ 10⁵細胞で播種し、2日間培養した。OP9-GFP間質細胞との共培養のために、24ウェルプレート内20%のES-FBS、1%のP/S、50 μ Mの β -ME及び10ng/mLのIL-15(R&D Systems社)を各ウェルに添加したアルファMEM(Sigma Aldrich社)1mLに、細胞を3 $\times$ 10⁴細胞で移し、7日間培養した。2日目に、細胞をOP9とともに移すと同時に、化合物を加えた。5日目に上清を除去し、新たな培地を化合物とともに加えた。細胞を5%CO₂、37℃の加湿雰囲気下で維持した。

【0375】

フローサイトメトリー。7日間培養した後、細胞を回収し、40 μ mのろ過器を通してろ過してOP9細胞を除去し、PBSで洗浄した。500 $\times$ g、4℃で5分間の遠心分離後、適切な蛍光色素コンジュゲート抗体を蛍光活性化細胞選別(FACS)緩衝液(1%BSAを加えたPBS)100 μ Lにより1:300希釈で用いて、4℃で15分間、暗所で、これらを染色した。抗体は、CD3(e450)、NK1.1(APC)、NKp46(Percep710)及びPLを含み、これらのすべては、抗マウスであり、eBioscience社から入手可能である。次いで、細胞をFACS緩衝液1mLで洗浄し、遠心分離して、FACS緩衝液300 μ Lに再懸濁した。補正は、抗マウスIg, k及び抗ラット/ハムスターIg, k Compensation Particles Set(BD(商標)Combead社)を

10

20

30

40

50

使用して設定した。フローサイトメトリー分析は、BD LSRFortessa（商標）セルアナライザー（Becton Dickinson Bioscience社）を使用して行い、データ分析は、FlowJoを使用して実施した。

【0376】

10 μ Mの化合物7及び11の両方を加えると、SR8278と比較してNK細胞の総数の増加が示され、化合物7の場合では、有意に増加した（図9）（*は $p < 0.05$ ）。

【実施例9】

【0377】

REV-ERB α のさらなる阻害物質により、産生されたNK細胞の総数が増加する

5 μ Mの化合物7及び11並びに5及び10 μ Mの化合物72を使用して、実施例7の方法を反復した。

【0378】

5 μ Mの7及び11並びに5及び10 μ Mの化合物72を加えると、SR8278と比較してNK細胞の総数の有意な増加が示された（図10）（**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ ）。

10

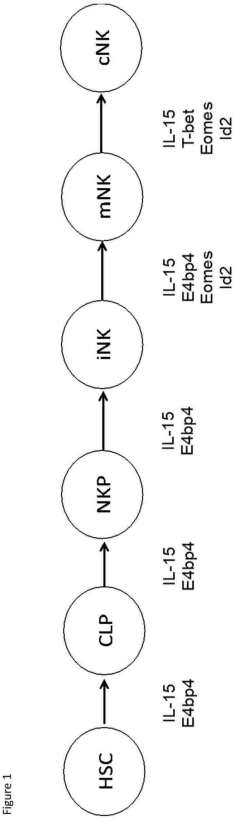
20

30

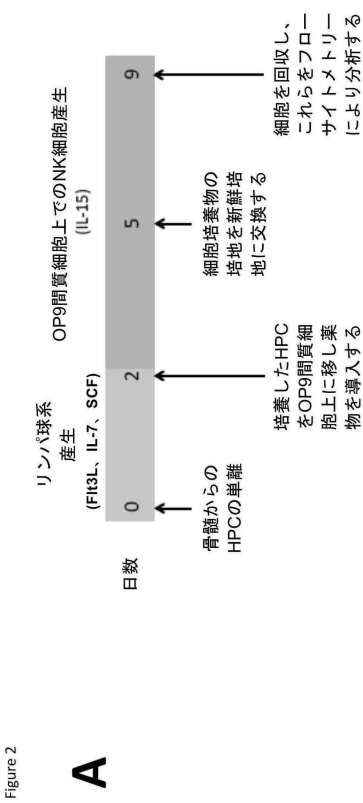
40

50

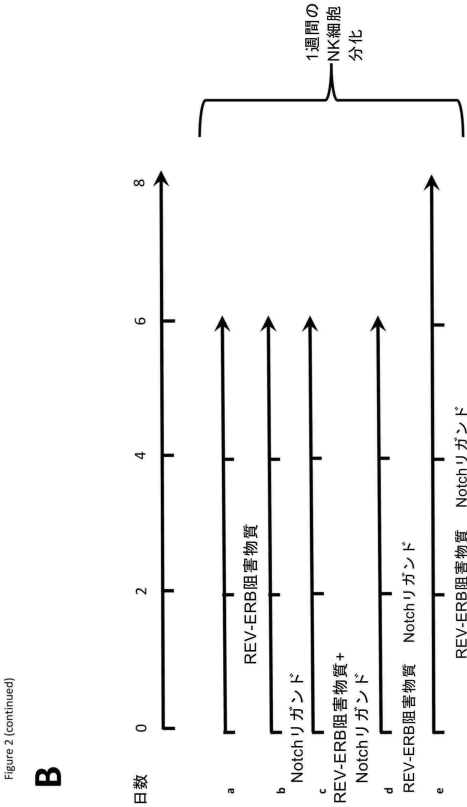
【図面】
【図 1】



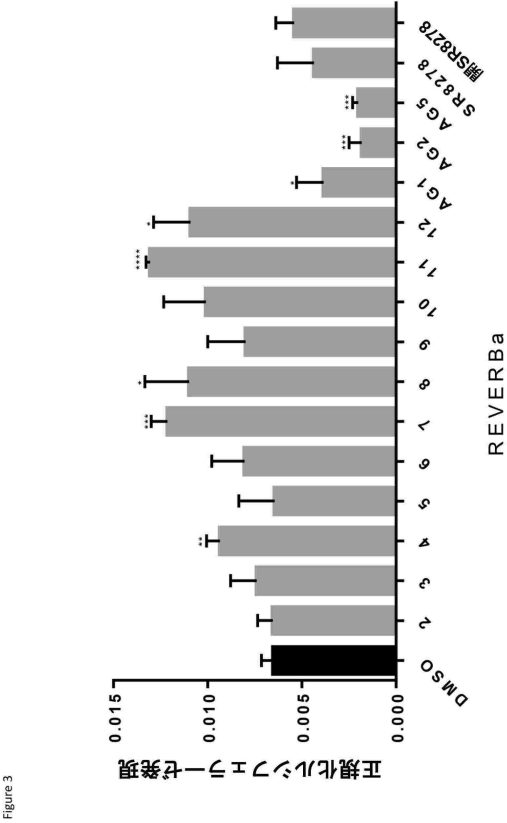
【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



【図 3】



10

20

30

40

50

【図 4】

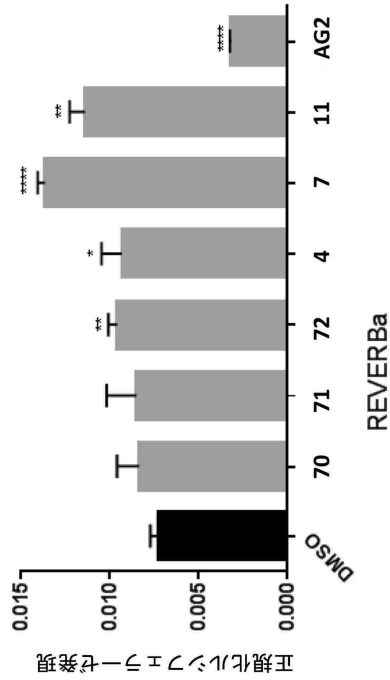


Figure 4

【図 5】

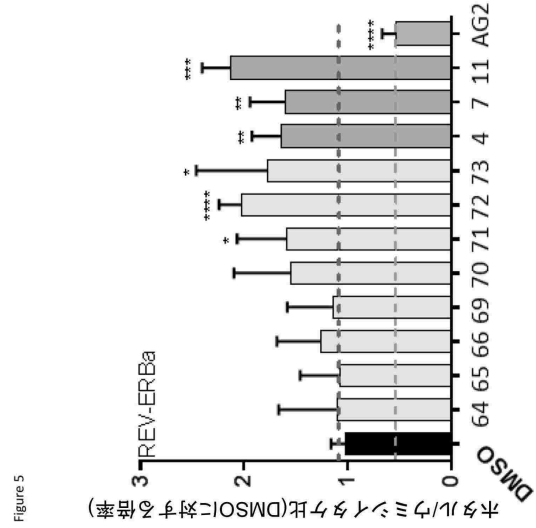


Figure 5

【図 6】

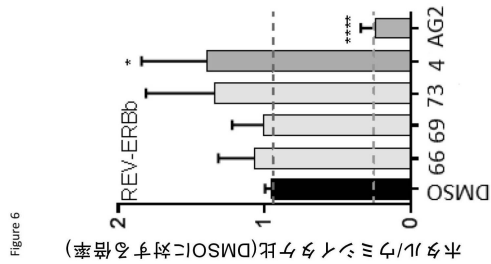


Figure 6

【図 7】

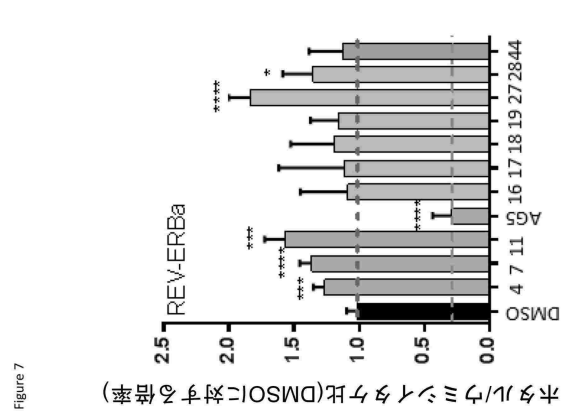


Figure 7

10

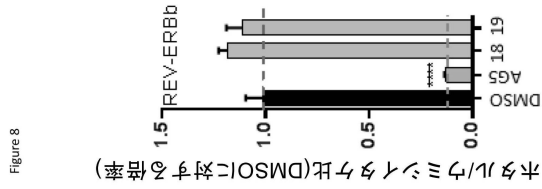
20

30

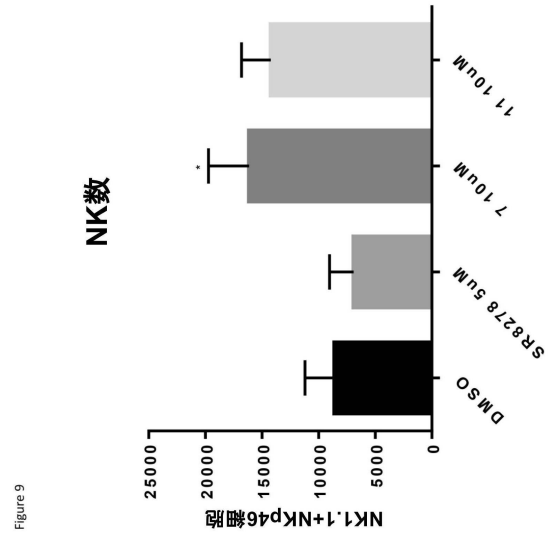
40

50

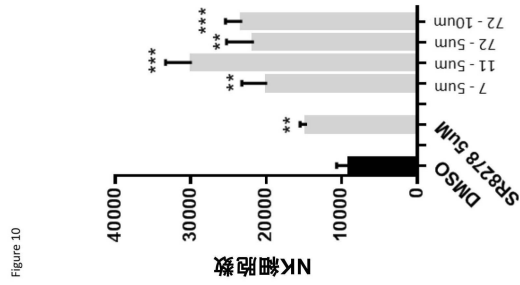
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0007527207000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	15/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	15/08
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 K	31/472 (2006.01)	A 6 1 P	31/10
A 6 1 K	31/4725 (2006.01)	A 6 1 K	31/472
		A 6 1 K	31/4725

弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100221958

弁理士 篠田 真希恵

(74)代理人 100192441

弁理士 渡辺 仁

(72)発明者 フックター マシュー ジェー.

イギリス国 エスダブリュー7 2エーゼット ロンドン エキシビションロード インペリアルカレッジロンドン サウスケンジントンキャンパス

(72)発明者 ウアルテ アマイア ウリス

イギリス国 エスダブリュー7 2エーゼット ロンドン エキシビションロード インペリアルカレッジロンドン サウスケンジントンキャンパス

(72)発明者 ブレディー ヒュー ジェー. エム.

イギリス国 エスダブリュー7 2エーゼット ロンドン エキシビションロード インペリアルカレッジロンドン サウスケンジントンキャンパス

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第2013/033310 (WO, A1)

国際公開第2015/103527 (WO, A1)

特表2002-536364 (JP, A)

特開2016-187341 (JP, A)

特許第7225107 (JP, B2)

Chimika chronika, New Series, 1989年, Vol.18, p.3-17

Angew. Chem. int. Ed., 2015年, Vol.54, p.12389-12393

nature immunology, 2009年, vol.10, no.10, p.1118-1124

比較内分泌学, 2010年, Vol.36, p.118-126

Biol Blood Marrow Transplant, 2009年, vol.15, p.1026-1037

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

A61P 43/00

A61P 31/00

A61P 35/00

A61P 37/00

A61P 15/00

A61K 31/472

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)