

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 4 月 20 日(20.04.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/064558 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/519 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 33/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 33/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61P 33/06 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/IB2016/001543

(22) 国際出願日: 2016 年 10 月 28 日(28.10.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2015-203282 2015 年 10 月 14 日(14.10.2015) JP
特願 2016-148854 2016 年 7 月 28 日(28.07.2016) JP

(71) 出願人: 大鵬薬品工業株式会社(TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD) [JP/JP]; 〒1018444 東京都千代田区神田錦町 1-2-7 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 宮寺 和孝(MIYADERA, Kazutaka); 〒1018444 東京都千代田区神田錦町 1-2-7 大

鵬薬品工業株式会社内 Tokyo (JP). 深谷 智史(FUKAYA, Satoshi); 〒3002611 茨城県つくば市大久保 3 大鵬薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 青柳 芳美(AOYAGI, Yoshimi); 〒3002611 茨城県つくば市大久保 3 大鵬薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー 3 2 階 Tokyo (JP).

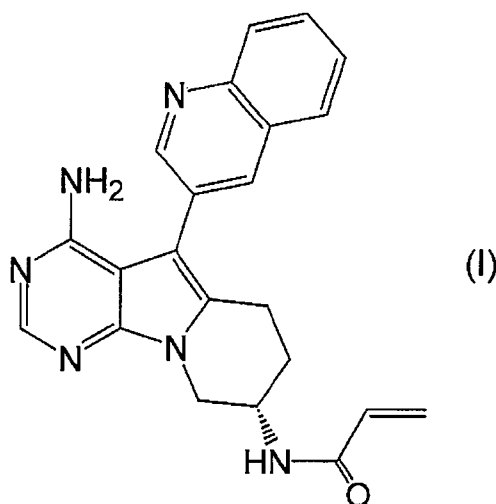
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー

[続葉有]

(54) Title: NOVEL IMMUNOSTIMULANT

(54) 発明の名称: 新規免疫賦活化剤



(57) Abstract: The present invention pertains to an immunostimulant comprising (S)-N-(4-amino-5-(quinolin-3-yl)-6,7,8,9-tetrahydropyrimido[5,4-b]indolizin-8-yl)acrylamide represented by formula (I) or salt thereof, and a pharmaceutical composition for preventing or treating a disease that can be ameliorated through immunostimulation.

(57) 要約: この発明は、下記の式 (I) で表される (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル) アクリルアミドまたはその塩を有効成分として含有する免疫賦活化剤、および免疫賦活化により改善することができる疾患を予防または治療するための医薬組成物に関する。



WO 2017/064558 A1



ロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 優先権主張に対する優先権の回復のための請
求に関する情報 (規則 26 の 2.3 及び 48.2(b)
(vii))

明 細 書

発明の名称

新規免疫賦活化剤

技術分野

本発明は、(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミド(本明細書では、以下、この化合物を「化合物(I)」とも称する)またはその塩を有効成分として含有する、免疫賦活化により改善することができる疾患を予防または治療するための医薬組成物に関する。

背景技術

免疫系は、生体内外から起因する様々な疾患に対し、自己を防御する重要なメカニズムである。免疫系の機能低下により、細菌やウイルスによる感染症発生、腫瘍発生、傷病回復の遅延等、疾患への悪影響がもたらされる。従って、免疫系を賦活化する事は、様々な疾患の予防や治療に非常に重要である。従来、免疫賦活化の方法としては、古くは、死菌や抗原投与によるワクチンが知られており、その他にも、ペプチドグリカン、リポ多糖類、キチン、ラクトフェリン、シクロフォスファミド等を用いる方法も知られている。また、近年では、IL-6 や TNF、IFN などのタンパク質を投与することにより免疫系を賦活化するサイトカイン療法、免疫細胞を採取してその活性を惹起した後に生体に戻す免疫細胞療法などが存在する。これらは、特定の感染症や腫瘍の予防または治療に対して効果を発揮している。

上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR)は、腫瘍の増殖において非常に大きい役割を担っている。現在、様々な EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が開発され、臨床で利用されている。EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の具体例としては、ゲフィチニブ(商品名イレッサ)、エルロチニブ(商品名タルセバ)、アファチニブ(商品名ジオトリフ)等が知られている。これらは EGFR チロシンキナ

一ゼに高い選択的な阻害作用を有し、特に EGFR 遺伝子変異を有する被験体において腫瘍選択的に抗腫瘍効果を発揮し、被験体の予後の改善に貢献すると考えられている。さらに最近においては耐性機序のひとつである T790M 変異に対して効果を有し、且つ変異型 EGFR に対して選択性を高めた AZ9291 を代表例とする第三世代型の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が開発されている。それら化合物の抗腫瘍効果は、高選択的 EGFR チロシンキナーゼ阻害のみにより、腫瘍細胞に直接作用することに基づいているといっても過言ではない(非特許文献 1 および 2)。

化合物(I)およびその塩は、EGFR チロシンキナーゼを高選択的に阻害し、腫瘍の増殖を抑制する効果があることが知られている(特許文献 1)。しかし、本発明の化合物、および前述の既知の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤のいずれについても、免疫賦活化作用を有することは知られていない。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 国際公開第 2013/125709 号

非特許文献

非特許文献 1 Nature Rev. Cancer, vol. 6, pp. 803-811(2006)

非特許文献 2 Journal of Thoracic Oncology ・ Vol. 3, No. 6, Supplement 2, June 2008

発明の概要

本発明は、免疫賦活化剤および免疫賦活化により改善することができる疾患を予防または治療するための医薬組成物を提供することを目的とする。

本発明はまた、医薬組成物による免疫賦活化剤および免疫賦活化により改善することができる疾患を予防または治療する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、化合物(I)の薬理作用の検討を重ねてきた結果、同化合物が免疫系を賦活化する作用を有することを見出し、本発明を完成した。本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化剤。

- (2) T 細胞を賦活化する、(1)に記載の免疫賦活化剤。
- (3) IL-2 産生を誘導する、(1)に記載の免疫賦活化剤。
- (4) IFN 産生を誘導する、(1)に記載の免疫賦活化剤。
- (5) 免疫細胞の遊走を誘導する、(1)に記載の免疫賦活化剤。
- (6) 免疫細胞の病変部への浸出・集積を誘導する、(1)に記載の免疫賦活化剤。
- (7) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫を賦活化する方法。
- (8) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化により感染症を予防または治療するための医薬組成物。
- (9) 感染症が寄生虫感染である、(8)に記載の医薬組成物。
- (10) 寄生虫が、トリパノソーマ原虫、マラリア原虫、およびトキソプラズマからなる群から選択される、(9)に記載の医薬組成物。
- (11) 感染症が細菌感染である、(8)に記載の医薬組成物。
- (12) 細菌が、肺炎球菌、結核菌、黄色ブドウ球菌、炭疽菌、コレラ菌、およびピロリ菌からなる群から選択される、(11)に記載の医薬組成物。
- (13) 感染症がウイルス感染である、(8)に記載の医薬組成物。
- (14) ウイルスが、ヒト T 細胞白血病ウイルス、パピローマウイルス、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、B 型肝炎ウイルス、および C 型肝炎ウイルスからなる群から選択される、(13)に記載の医薬組成物。
- (15) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、感染症を予防または治療する方法。
- (16) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化により免疫不全疾患を治療するための医薬組成物。

(17) 免疫不全疾患が HIV 感染によるものである、(16)に記載の医薬組成物。

(18) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、免疫不全疾患を治療する方法。

(19) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化により、加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患を予防または治療するための医薬組成物。

(20) 免疫機能減弱に起因する疾患が肺炎である、(19)に記載の医薬組成物。

(21) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患を予防または治療する方法。

(22) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化によりウイルス関連腫瘍を予防または治療するための医薬組成物。

(23) ウイルス関連腫瘍が、バーキットリンパ腫、肝細胞癌、子宮頸癌、成人T細胞白血病、カポジ肉腫、頭頸部がんである、(22)に記載の医薬組成物。

(24) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、ウイルス関連腫瘍を予防または治療する方法。

(25) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の作用を増強するための医薬組成物。

(26) 感染症予防ワクチンの作用を増強するための、(25)に記載の医薬組成物。

(27) 抗ウイルス剤の作用を増強するための、(25)に記載の医薬組成物。

(28) 抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体の作用を増強するための、(25)に記載の医薬

組成物。

(29) がんワクチンの作用を増強するための、(25)に記載の医薬組成物。

(30) 抗腫瘍免疫応答誘導剤の作用を増強するための、(25)に記載の医薬組成物。

(31) 抗腫瘍免疫応答誘導剤が抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体である、(30)に記載の医薬組成物。

(32) 抗腫瘍免疫応答誘導剤が抗 PD-1 抗体である、(31)に記載の医薬組成物。

(33) 抗腫瘍免疫応答誘導剤が抗 PD-L1 抗体である、(31)に記載の医薬組成物。

(34) (S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の作用を増強する方法。

本発明により、(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を有効成分として含有する、免疫賦活化剤、および免疫賦活化により改善することができる疾患を予防または治療するための新規医薬組成物が提供される。また、本発明により、各種感染症、免疫不全疾患、および腫瘍などの新たな治療法が提供される。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号 2015-203282 号および日本国特許出願番号 2016-148854 号の開示内容を包含する。

図面の簡単な説明

〔図 1〕 実施例 1 における、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体添加濃度を一定とし、化合物(I)添加濃度を可変させたときの、マウス脾細胞が産生した培養上清中の IL-2 の濃度を示す。

〔図 2〕 実施例 1 における、抗 CD3 抗体添加濃度を可変させ、抗 CD28 抗体添加濃度を一定としたときの、化合物(I)添加の有無による、マウス脾細胞が産生した培養上清中の IL-2 の濃度を示す。

〔図 3〕 実施例 2 における、化合物(I)を添加したとき、または AZD9291 を添加したときの、ヒト末梢血単核球細胞が産生した培養上清中の IL-2 の濃度の推移を示す。

〔図 4〕実施例 3 における、化合物(I)、AZD9291 またはエルロチニブを添加したときの、混合リンパ球反応を誘導した際の 3H-Thd 取り込み量を示す。

〔図 5〕実施例 4 における、各化合物を添加したときの、CD4 および CD8 のそれぞれが陽性である細胞の CFSE 量をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

〔図 6〕実施例 5 における、抗 PD-1 抗体または化合物(I)を添加したときの、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、および CD4 および CD8 陰性かつ NK1.1 陽性の細胞の相対数を算出した結果を示す。

〔図 7〕実施例 6 における、抗 PD-1 抗体および/または化合物(I)を添加したときの、CD4 陽性かつ CD69 陽性の細胞、および CD4 陽性かつ CD44 陽性かつ CD62L 陰性の細胞の相対数を算出した結果を示す。

〔図 8〕実施例 6 における、抗 PD-1 抗体および/または化合物(I)を添加したときの、CD4 陽性細胞の CD44 発現量および CD4 陽性細胞の CD62L 発現量を算出した結果を示す。

〔図 9〕実施例 7 における、各化合物を添加した群の、無処置群に対するヒト末梢血単核球が産生したサイトカイン濃度の相対比を示す。

〔図 10〕実施例 8 における、化合物(I)を投与したときのマウスメラノーマの移植 14 日目(投薬 15 日目)の各投与群の肺転移結節数を示す。

〔図 11〕実施例 9 における、抗 PD-1 抗体または化合物(I)を投与したときの、MC38 腫瘍株の各投与群の腫瘍容積の経時変化を示す。

〔図 12〕実施例 10 における、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体もしくは化合物(I)を単独で、または抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体のいずれかと化合物(I)を組み合わせ投与したときの、K1735M2 腫瘍株の各個体の腫瘍容積の経時変化を示す。

〔図 13〕実施例 11 における、抗 PD-1 抗体もしくは化合物(I)、またはそれらの組み合わせを投与したときの、MC38 腫瘍株の各投与群の腫瘍容積の経時変化を示す。

〔図 14〕実施例 11 においてサンプリングした腫瘍における、CD3、CD4 および CD8 遺伝子の発現の相対比を示す。

〔図 15〕実施例 11 においてサンプリングした腫瘍における、NK1.1、IL-2

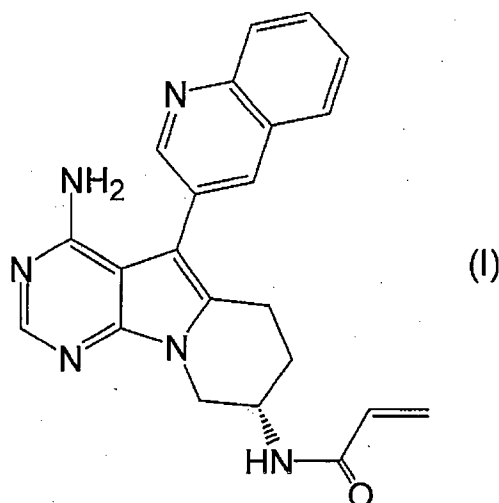
および IFN- γ 遺伝子の発現の相対比を示す。

〔図 1 6〕 実施例 11 においてサンプリングした腫瘍における、Perforin、Granzyme B および CD69 遺伝子の発現の相対比を示す。

発明を実施するための形態

化合物(I)である(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドは、以下の構造式(I)により表される化合物である。化合物(I)は公知化合物であり、その製造方法は、特許文献1として挙げた国際公開第2013/125709号に開示されている。

〔化1〕



化合物(I)は、遊離形態または塩形態のいずれであってもよい。塩形態である場合は結晶であってもよく、その場合、結晶形は単一であっても多形混合物であってもよく、また溶媒和物(例えば水和物)であっても無溶媒和物であってもよい。塩形態としては酸付加塩が挙げられ、具体例としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸および過塩素酸塩などの無機酸塩、メタンスルホン酸、イセチオン酸、ベンゼンスルホン酸およびp-トルエンスルホン酸などのスルホン酸塩、ならびにギ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、トリフルオロ酢酸などのその他の有機酸塩が挙げられる。

化合物(I)およびその塩は、被験体としてのヒトおよびその他の哺乳動物、例えばサル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジなど、

好ましくはヒトに対して免疫賦活化作用を有する。本明細書において「免疫賦活化作用」とは、免疫細胞を活性化することを意味し、すなわち、免疫細胞の分裂や分化を誘導し、各種サイトカインの産生を誘導し、免疫細胞を遊走させ、免疫細胞を病変部（すなわち、病的変化の起こっている部分をいう。たとえば腫瘍組織、感染組織、炎症組織などである。）に浸出及び／又は集積させ、或いは、自己由来の異物的成分または外来性の異物の排除機能の亢進することを意味する。化合物(I)およびその塩は、免疫細胞の中でも特にT細胞を賦活化する作用を有する。誘導されるサイトカインとしては、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-17、IL-23、GM-CSF、IFN- γ 、MCPA、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF- α が挙げられ、特にIL-2である。また、化合物(I)およびその塩は、特に末梢血単核球に対してサイトカインの産生を誘導する作用を有し、サイトカインの中でも特にIL-2および／またはIFNの産生を誘導する。また、化合物(I)およびその塩は、免疫細胞を遊走させる。また、化合物(I)およびその塩は、免疫細胞の遊走・浸出及び／又は集積を誘導する。免疫細胞の遊走、病変部への浸出及び／又は集積は、病変部の組織染色や、病変部組織における免疫細胞に特徴的な遺伝子（たとえばCD3、CD4、CD8、NK1.1、IL-2、IFN- γ 、Perforin、Granzyme B、CD69等）の発現の変化によって測定できる。本発明は、化合物(I)またはその塩を含む免疫賦活化剤、および免疫賦活化剤としての化合物(I)またはその塩、ならびに化合物(I)またはその塩の有効量を、予防または治療を必要とする被験体に投与することを含む、当該被験体における免疫賦活化法に関する。

化合物(I)およびその塩の免疫賦活化作用によれば、化合物(I)は各種の感染症、免疫不全疾患、加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患、ウイルス関連腫瘍を予防または治療することができる。

化合物(I)およびその塩が予防または治療することができる感染症の具体例としては、寄生虫感染（例えば、トリパノソーマ原虫、マラリア原虫、およびトキソプラズマからなる群から選択される寄生虫による感染）、細菌感染（例えば、肺炎球菌、結核菌、黄色ブドウ球菌、炭疽菌、コレラ菌、マイコプラズマ、およびピロリ菌（ヘリコバクターピロリ）からなる群から選択される細菌による感染）、ならびにウイルス感染（ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-1）、パピローマウイルス

(HPV)、エプスタインバーウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、インフルエンザウイルス(FLU)、B型肝炎ウイルス(HBV)、ヘルペスウイルス、およびC型肝炎ウイルス(HCV)からなる群から選択されるウイルスによる感染)が挙げられる。本発明は、別の側面において、化合物(I)またはその塩を含む、免疫賦活化により感染症を予防または治療するための医薬組成物、および免疫賦活化により感染症を予防または治療するための化合物(I)またはその塩、ならびに化合物(I)またはその塩の有効量を、予防または治療を必要とする被験体に投与することを含む、当該被験体における感染症を免疫賦活化により予防または治療する方法に関する。

また、化合物(I)およびその塩が治療することができる免疫不全疾患の具体例としては、先天性免疫不全疾患および後天性免疫疾患、とりわけヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染による後天性免疫不全が挙げられる。従って、本発明は、別の側面において、化合物(I)またはその塩を含む、免疫賦活化により免疫不全疾患を治療するための医薬組成物、および免疫賦活化により免疫不全疾患を治療するための化合物(I)またはその塩、ならびに化合物(I)またはその塩の有効量を、治療を必要とする被験体に投与することを含む、当該被験体における免疫不全疾患を免疫賦活化により治療する方法に関する。

また、化合物(I)およびその塩が予防又は治療できる加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患の具体例としては、肺炎が挙げられる。従って、本発明は、別の側面において、化合物(I)またはその塩を含む、免疫賦活化により加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患を予防または治療するための医薬組成物、および免疫賦活化により加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患を予防または治療するための化合物(I)またはその塩、ならびに化合物(I)またはその塩の有効量を、予防または治療を必要とする被験体に投与することを含む、当該被験体における加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患を免疫賦活化により予防または治療する方法に関する。

また、化合物(I)およびその塩が予防または治療することができるウイルス関連腫瘍、すなわちウイルス感染によって発症する腫瘍の具体例としては、バーキットリンパ腫、肝細胞癌、子宮頸癌、成人T細胞白血病、カポジ肉腫、頭頸部がん

が挙げられる。従って、本発明は、別の側面において、化合物(I)またはその塩を含む、免疫賦活化によりウイルス関連腫瘍を予防または治療するための医薬組成物、および免疫賦活化によりウイルス関連腫瘍を予防または治療するための化合物(I)またはその塩、ならびに化合物(I)またはその塩の有効量を、予防または治療を必要とする被験体に投与することを含む、当該被験体におけるウイルス関連腫瘍を免疫賦活化により予防または治療する方法に関する。

また、化合物(I)およびその塩の免疫賦活化作用によれば、免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の効果を増強することができる。免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の具体例としては、感染症予防ワクチン(例えば、ジフテリア、破傷風、百日咳などの感染症予防ワクチン)、抗ウイルス剤(例えば、インフルエンザワクチン、B型肝炎ワクチン、インターフェロン α 製剤、インターフェロン β 製剤、テラプレビル、リバビリン、シメプレビル、ビダラビン、アシクロビル、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、ヌクレオシドアナログ逆転写酵素インヒビター(NRTI)(例えば、AZT(ジドブジン)、ddI(ジダノシン)、ddC(ザルシタビン)、d4T(スタブジン)、または3TC(ラミブジン))、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター(NNRTI)(例えば、ネビラピンまたはデラビルジン)、プロテアーゼインヒビター(サキナビル、リトナビル、インジナビル、またはネルフィナビル))、抗腫瘍免疫応答誘導剤(例えば、免疫賦活化作用を有するCD28様ファミリーのメンバーまたはCD28様ファミリーリガンドのメンバー等の調節剤、具体的には、プログラム細胞死-1(Programmed Death-1; PD-1)抑制剤、プログラム細胞死-L1(Programmed Death-Ligand 1; PD-L1)抑制剤、プログラム細胞死-L2(Programmed Death-Ligand 2; PD-L2)抑制剤、抗CTLA-4抑制剤、抗BTLA抑制剤、抗CD28調節剤、抗ICOS調節剤、抗ICOS-L調節剤、抗B7-1調節剤、抗B7-2調節剤、抗B7-H3調節剤、または抗B7-H4調節剤、より具体的には、抗PD-1抗体、PD-1ペプチド阻害剤、抗PD-1 RNAi、抗PD-1 アンチセンス RNA、抗PD-L1抗体、PD-L1ペプチド阻害剤、抗PD-L1 RNAi、抗PD-L1 アンチセンス RNA、抗PD-L2抗体、PD-L2ペプチド阻害剤、抗PD-L2 RNAi、抗PD-L2 アンチセンス RNA、抗CTLA4抗体、中でも、抗PD-1抗体および抗PD-L1抗体)、がんワクチン(例えば、シプロイセルT)が挙げられる。従って、本発明は、別の側面において、化合物(I)

またはその塩を含む、免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の作用を増強するための医薬組成物、および免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の作用を増強するための化合物(I)またはその塩、ならびに化合物(I)またはその塩の有効量を、免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬と併用して被験体に投与することを含む、当該医薬の作用の増強方法に関する。

本発明はまた、上記で挙げた免疫賦活化剤および医薬組成物の製造における、化合物(I)またはその塩の使用にも関する。

本発明の免疫賦活化剤および医薬組成物は、必要に応じて製薬上許容される希釈剤もしくは賦形剤、または補助剤を含有していてもよく、投与形態に適した剤型に製剤されていてもよい。剤型の具体例としては、経口剤(例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤など)、注射剤、坐剤、軟膏剤、貼付剤などが挙げられる。いずれの剤型も公知の製剤方法により製造することができる。本発明の免疫賦活化剤および医薬組成物は、投与が容易である経口剤であることが好ましい。補助剤の具体例としては、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、溶解補助剤、矯味・矯臭剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などが挙げられる。また、必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、安定化剤などの製剤添加物を含有していてもよい。

本発明の免疫賦活化剤および医薬組成物の投与量は、その投与目的、投与対象である被験体の年齢、性別および体重、ならびに投与経路によっても異なるが、例えば体重 50kg の成人の場合、化合物(I)またはその塩として、1日あたり 0.05 ~ 5000 mg、特に 0.1 ~ 1000 mg の範囲の投与量とすることが好ましい。投与頻度は、例えば2日に1回、1日1回、または1日あたり2~3回とすることができる。

本発明に係る化合物(I)およびその塩は、後述する実施例により示されるように免疫賦活化作用を有し、ヒトおよび他の哺乳動物における生体機能の調節、保健増強、自己由来の異物的成分または外来性の異物の排除機能の亢進に寄与する。

実施例

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例

に限定されるものではない。

(実施例 1) 抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体刺激マウス脾細胞における化合物(I)によるサイトカイン産生誘導

マウス脾臓を摘出し、フロストスライドグラスで破碎後、溶血処理を行い、脾細胞を調製した。これを完全培地(RPMI-1640、10% 熱不活性化 FBS、100U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、55 μ M 2-メルカプトエタノール)を用いて 2×10^6 cells/mL に調製し、抗 CD3 抗体を終濃度 3 μ g/mL となるように、および抗 CD28 抗体を終濃度 0.5 μ g/mL となるようにそれぞれ添加し、さらに化合物(I)を各終濃度になるように添加した。この培養液を 200 μ L/well で 96 ウェルプレートへ播種後、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で 2 日間培養した。培地上清を回収し、そこに含まれる IL-2 の濃度を、抗 mIL-2 抗体を用いた ELISA 法で測定した。

また、同様にして、抗 CD3 抗体の終濃度を可変とし、抗 CD28 抗体を終濃度 0.5 μ g/mL となるように添加し、さらに化合物(I)を終濃度 0.0 μ M または 0.1 μ M となるように添加して培養し、培養上清中の IL-2 濃度を測定した。

図 1 は、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体の濃度を一定とし、化合物(I)の濃度を可変とした場合の、培養上清中のマウス脾細胞が産生した IL-2 の濃度の推移を示したグラフである。グラフに示されるように、化合物(I)の添加量の増加に従ってマウス脾細胞が産生した IL-2 の濃度が増加した。

図 2 は、抗 CD3 抗体の濃度を可変とし、抗 CD28 抗体の濃度を一定とした場合の、化合物(I)の添加の有無による、培養上清中のマウス脾細胞が産生した IL-2 の濃度の差を示すグラフである。グラフに示されるように、化合物(I)を添加した場合では抗 CD3 抗体の刺激に伴って IL-2 産生が誘導されたが、化合物(I)を添加しない場合ではその誘導は弱かった。

これらの結果から、化合物(I)がマウス脾細胞において IL-2 産生の誘導を増強することが示され、化合物(I)が免疫賦活化作用を有することが示された。

(実施例 2) ヒト末梢血単核球における化合物(I)によるサイトカイン産生誘導

ヒト末梢血単核球を、ヒト完全培地(RPMI-1640、10% 熱不活性化 FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン)を用いて 1×10^6 cells/mL の細胞懸

濁液に調製した。これにフィトヘマグルチニン M (PHA-M) を終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ となるように添加し、さらに化合物 (I) または EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AZD9291 を各終濃度になるように添加した。この培養液を $200 \mu\text{L/well}$ で 96 ウェルプレートへ播種後、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ のインキュベーター内で 3 日間培養した。培地上清を回収し、そこに含まれる IL-2 濃度を、抗 hIL-2 抗体を用いた ELISA 法で測定した。

図 3 は、ヒト末梢血単核球細胞が産生した培養上清中の IL-2 の濃度の推移を、化合物 (I) を添加した場合および AZD9291 を添加した場合のそれぞれについて示したグラフである。グラフに示されるように、化合物 (I) はヒト末梢血単核球細胞において IL-2 産生を誘導したのに対し、化合物 (I) と同じ EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AZD9291 にはそのような IL-2 産生誘導作用はほとんどみられなかった。このことから、化合物 (I) が免疫賦活化作用を有すること、およびその作用は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に共通するものではなく、化合物 (I) に固有のものであることが示された。

(実施例 3) 混合リンパ球反応における化合物 (I) による T 細胞の賦活化

混合リンパ球反応 (Mixed Lymphocyte Reaction; MLR) は、例えば J. Exp. Med. 127(5):879-90, 1968 により知られている T 細胞賦活化の代表的な実験手法である。この反応を用いて化合物 (I) の T 細胞賦活化への影響を検討した。

C57BL/6N マウスおよび BALB/c マウスからそれぞれ脾臓を摘出し、フロストスライドグラスで破碎後、溶血処理を行い、各脾細胞を調製した。調製した C57BL/6N マウス脾細胞および BALB/c マウス脾細胞を、完全培地 (RPMI-1640、 10% 熱不活性化 FBS、 100 U/mL ペニシリン、 $100 \mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン、 $55 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール) を用いて調製した。BALB/c マウス脾細胞については 30 Gy の X 線照射を行って増殖活性を失わせた。これら異系マウスの脾細胞を終濃度 $1 \times 10^5 \text{ cells/well}$ ずつ添加して混合し (Allogeneic; Alo)、さらに各濃度に調製した化合物 (I)、または EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AZD9291 もしくはエルロチニブを添加した。なお、対照として、C57BL/6N マウス脾細胞同士を混合したもの (Syngeneic; Syn) も併せて用意した。これらの培養液を $200 \mu\text{L/well}$ で 96 ウェルプレートへ播種後、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ のインキュベーター内で 3 日間培養した。培

養開始 2 日目にトリチウム標識チミジン (3H-Thd) を添加した。取り込まれた 3H-Thd 量を、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

図 4 は、混合リンパ球反応を誘導した際の 3H-Thd 取り込み量を、各化合物および濃度ごとに示したグラフである。取り込まれた 3H-Thd の量は、混合リンパ球反応によって増殖した T 細胞の指標となる。図 4 のグラフに示されるように、化合物 (I) は、混合リンパ球反応により惹起される C57BL/6N マウス由来の T 細胞の増殖を誘導した。一方、他の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤にはそのような活性はみられなかった。この結果から、化合物 (I) が免疫賦活化作用を有すること、およびその作用は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に共通するものではなく、化合物 (I) に固有のものであることが示された。

(実施例 4) 化合物 (I) による T 細胞の増殖惹起

マウス脾臓を摘出し、フロストスライドグラスで破碎後、溶血処理を行い、脾細胞を調製した。これを 5 mL の染色バッファー (0.5% BSA、2 mM EDTA、PBS (-)) に懸濁し、5 μ M CFSE (5-カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル) で染色した。染色後、氷冷した完全培地 (RPMI-1640) を用いて洗浄した。このように CFSE で染色した脾細胞を、完全培地 (RPMI-1640、10% 熱不活性化 FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、55 μ M 2-メルカプトエタノール) を用いて 1×10^6 cells/mL に調製し、抗 CD3 抗体 1 μ g/mL、および抗 CD28 抗体 1 μ g/mL 添加し、さらに各濃度に調製した化合物 (I)、または EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AZD09291、エルロチニブ、Co1686 (ロシレチニブ)、イブルチニブ、スニチニブ、もしくはダサチニブを 0.1 μ M の濃度で添加した。なお、対照として EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を加えないものも併せて用意した。これらの培養液を 200 μ L/well で 96 ウェルプレートへ播種後、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で 3 日間培養した。細胞を回収し、抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体を用いて染色し、CD4 および CD8 のそれぞれが陽性である細胞の CFSE 量をフローサイトメトリーにより解析した。図 5 にその解析結果を示す。

CFSE は、一旦細胞内に取り込まれた後は細胞内の量が一定となる性質を有する。従って、細胞分裂が生じると細胞当たりの CFSE 量は半減するので、フローサイトメトリーによる解析では、細胞分裂が進行するほど CFSE 染色強度が減弱し、グラ

フが左側(低値側)へシフトする。図5に示されるように、化合物(I)を添加したサンプルでは、CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞のそれぞれの細胞あたりの CFSE 量が減少しており、それらの細胞の増殖が増強したことを示していた。一方、他の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を添加したサンプルでは、そのような細胞増殖を増強する作用はみられなかった。なお、ダサニチブを添加した群では細胞死が誘導された。この結果から、化合物(I)が免疫賦活化作用を有すること、およびその作用は他の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に共通するものではなく、化合物(I)に固有のものであることが示された。

(実施例 5) OVA 発現マウス胸腺腫細胞株皮下移植モデルにおける末梢血免疫細胞解析

OVA 発現マウス胸腺腫細胞株(EG. 7-OVA)の細胞懸濁液を、PBS(-)および 50% マトリゲルを用いて調製し、 1×10^4 cells/mouse で細胞株と同系の C57BL/6n マウス皮下に注射して移植した。移植後 1 日目に体重に基づいて群分けした後、化合物(I)を 50 mg/kg で、または抗 PD-1 抗体を 100 μ g/mouse で投与した。なお、対照としてそのいずれも投与しない群も併せて用意した。移植後 14 日目に末梢血を採取し、免疫細胞表面マーカーに対する抗体を用いてフローサイトメトリーによる解析を行い、全体に含まれる CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、および CD4 および CD8 陰性かつ NK1.1 陽性の細胞の相対数を算出した。図6にその解析結果を示す。化合物(I)を投与した群では、いずれの細胞においても、対照群および抗 PD-1 抗体投与群と比較して細胞数が増加していた。この結果から、化合物(I)が *in vivo* においても免疫細胞サブセットの数を増加させる活性を有し、免疫賦活化作用を有することが示された。

(実施例 6) マウス大腸癌細胞株皮下移植モデルにおける脾細胞中の免疫細胞解析

マウス大腸癌細胞株(colon26)の細胞懸濁液を、PBS(-)および 50% マトリゲルを用いて調製し、 2×10^3 cells/mouse で細胞株と同系の BALB/c マウス皮下に注射して移植した。移植後 1 日目に体重に基づいて群分けした後、化合物(I)を 50 mg/kg で、および/または抗 PD-1 抗体を 100 μ g/mouse で投与した。なお、対照としてそのいずれも投与しない群も併せて用意した。移植後 21 日後に脾細胞を採取し、各種免疫細胞表面マーカーに対する抗体を用いてフローサイトメトリーによ

る解析を行った。

図 7 は、CD4 陽性かつ CD69 陽性の細胞、および CD4 陽性かつ CD44 陽性かつ CD62L 陰性の細胞の相対数を算出した結果を示すグラフである。化合物(I)を投与した群では、対照群と比較して、CD4 陽性かつ CD69 陽性細胞の割合、および CD4 陽性かつ CD44 陽性かつ CD62L 陰性細胞の割合が高かった。さらに、化合物(I)と抗 PD-1 抗体を併用した群では、その割合はより顕著に高かった。

図 8 は、CD4 陽性細胞における CD44 発現量、および CD4 陽性細胞における CD62L 発現量を算出した結果を示すグラフである。CD44 発現量と CD62L 発現量は、それぞれの表面マーカーの平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity, MFI) で示す。化合物(I)を投与した群では、対照群と比較して、CD4 陽性細胞における CD44 の発現量が増加し、かつ CD62L の発現量が減少した。さらに、化合物(I)と抗 PD-1 抗体を併用した群では、それがより顕著であった。この結果から、化合物(I)の投与により、colon26 を認識する脾細胞中のエフェクターメモリー T 細胞数が増加したことが推察された。

以上の結果から、化合物(I)が *in vivo* においても免疫細胞の活性化を誘導し、免疫賦活化作用を有することが示された。

(実施例 7) ヒト末梢血単核球における化合物(I)によるサイトカイン産生誘導

ヒト末梢血単核球を、ヒト完全培地 (RPMI-1640、10% 熱不活性化 FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン) を用いて 1×10^5 cells/mL の細胞懸濁液に調製した。これに化合物(I)または EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AZD9291 もしくはエルロチニブ、あるいはサイトカインを誘導する陽性対照としてイミキモドを添加した。なお、対照として EGFR チロシンキナーゼ阻害剤などを加えない無処置群も併せて用意した。この培養液を 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で 2 日間培養した。培地上清を回収し、種々のサイトカインを Bio-Plex Pro ヒトサイトカインアッセイキットを用いて測定した。

図 9 は、各化合物を添加した群の、無処置群に対する、サイトカイン濃度の相対比を示したグラフである。データから、化合物(I)が種々のサイトカイン産生を誘導しているのに対し、同じ EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AZD9291 もしくはエルロチニブではそのような誘導がみられなかったことがわかる。この結果か

ら、化合物(I)がサイトカイン産生を誘導し、免疫賦活化作用を有すること、およびその作用はEGFR チロシンキナーゼ阻害剤に共通するものではなく、化合物(I)に固有のものであることが示された。

(参考例1) *in vitro* モデルにおけるマウスメラノーマ細胞株およびマウス大腸がん細胞株の細胞増殖に対する化合物(I)の影響

マウスメラノーマ細胞株B16F10およびK1735M2ならびにマウス大腸がん細胞株MC38を 3×10^3 cells/wellの濃度で96 ウェルディッシュに播種した。24 時間後、化合物(I)またはEGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるエルロチニブ、アファチニブ、AZD9291 もしくは Co1686(ロシレチニブ)を所定の濃度に希釈して添加した。その後、3 日間培養し、細胞数をCellTiter-Glo2.0(Promega、G9243)により計測した。化合物(I)は、いずれの細胞についても、その増殖を抑制しなかった。また、他のEGFR チロシンキナーゼ阻害剤も同様に、いずれの細胞についてもその増殖を抑制しなかった。

(実施例8) *in vivo* モデルにおけるマウスメラノーマ細胞株の細胞増殖に対する化合物(I)の影響

マウスメラノーマ細胞株 B16F10 の細胞懸濁液を PBS(-)を用いて調製し、 5×10^5 cells/mouse の量でマウス尾部の静脈に注射した。このマウスモデルに対し、化合物(I)を 12.5 mg/kg または 50 mg/kg の用量で、B16F10 移植の前日から経口投与した。移植 14 日目(投薬 15 日目)に肺転移結節数を評価した。図 10 にその結果を示す。化合物(I)投与群では非投与群(対照)に対して用量依存的に肺転移結節数の減少が認められた。この結果、および参考例1の *in vitro* モデルでは腫瘍増殖抑制効果が認められなかったとの結果から、この肺転移結節数の減少は化合物(I)の免疫賦活化作用によりもたらされたものと推察された。

(実施例9) *in vivo* モデルにおけるマウス大腸がん細胞株の細胞増殖に対する化合物(I)の影響

マウス大腸がん細胞株MC38の細胞懸濁液をPBS(-)および50%マトリゲルを用いて調製し、 1×10^6 cells/mouse の量でマウス皮下に注射した。このマウスを、皮下の腫瘍容積の平均がおおよそ 50 mm³ に達したときに群分けを行い、化合物(I)を 50 mg/kg の用量で、または抗 PD-1 抗体を 100 μg/mouse の用量で投与し、経時的

に腫瘍容積を測定した。腫瘍容積は、経皮的に測定した腫瘍の長径と短径から以下の式 A に従って算出した。

$$\text{腫瘍容積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}^2 / 2 \quad \dots (\text{式 A})$$

図 11 に各群の腫瘍容積の経時変化を示す。化合物(I)投与群では非投与群（対照）と比較して腫瘍増殖の抑制が認められた。この結果、および参考例 1 の *in vitro* モデルでは腫瘍増殖抑制効果が認められなかったとの結果から、この腫瘍増殖の抑制は化合物(I)の免疫賦活化作用によりもたらされたものと推察された。（実施例 10）*in vivo* モデルにおける化合物(I)の抗腫瘍免疫応答誘導剤（抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体）の増強作用

マウスメラノーマ細胞株 K1735M2 の細胞懸濁液を PBS(-) および 50%マトリゲルを用いて調製し、 1×10^6 cells/mouse の量でマウス皮下に注射した。このマウスを、移植後 1 日目に体重を用いて群分けした後、化合物(I)を 50 mg/kg の用量で、または抗 PD-1 抗体もしくは抗 PD-L1 抗体を 100 μ g/mouse の用量で、それぞれ単独で、あるいは抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体のいずれかと化合物(I)を組み合わせで投与し、経時的に腫瘍容積を測定した。腫瘍容積は、経皮的に測定した腫瘍の長径と短径から上記の式 A に従って算出した。

図 12 に、各個体の腫瘍容積の経時変化を示す。化合物(I)単独投与群および抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体単独投与群では十分な腫瘍増殖の抑制が認められなかった。一方、化合物(I)と抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体を併用した群では有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。この結果から、化合物(I)が抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体の免疫賦活化作用を増強していることが示された。

（実施例 11）*in vivo* モデルにおける化合物(I)のマウス大腸がん細胞株の細胞増殖に対する影響及び腫瘍部の免疫細胞への影響

マウス大腸がん細胞株 MC38 の細胞懸濁液を PBS(-) および 50%マトリゲルを用いて調製し、 1×10^6 cells/mouse の量でマウス皮下に注射した。このマウスを、皮下の腫瘍容積の平均がおよそ 50 mm^3 に達したときに群分けを行い、化合物(I)を 50 mg/kg の用量で、または抗 PD-1 抗体を 50 μ g/mouse の用量で、それぞれ単独で、あるいは 50 mg/kg の化合物(I)と 50 μ g/mouse の抗 PD-1 抗体を組み合わせで投与し、経時的に腫瘍容積を測定した。腫瘍容積は、経皮的に測定した腫瘍の長

径と短径から以下の式 A に従って算出した。

$$\text{腫瘍容積}(\text{mm}^3) = \text{長径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm})^2 / 2 \quad \dots (\text{式 A})$$

図 13 に各群の腫瘍容積の経時変化を示す。化合物(I)投与群では非投与群（対照）と比較して腫瘍増殖の抑制が認められた。この結果、および参考例 1 の *in vitro* モデルでは腫瘍増殖抑制効果が認められなかったとの結果から、この腫瘍増殖の抑制は化合物(I)の免疫賦活化作用によりもたらされたと思われる。また、化合物(I)が抗 PD-1 抗体の免疫賦活化作用を増強していることが示された。

図 14～16 に、化合物(I)投与の最終日における各群の腫瘍における免疫関連の遺伝子変動を示す。化合物(I)投与の最終日に各群の腫瘍をサンプリングし、cDNA を調製した。作製した cDNA から各種免疫関連遺伝子のプローブを用いて realtimePCR で遺伝子発現確認を行い、その結果をプロットした。各プロットは β -actin を対照とし、対照群の 1 例の値と比較したときの相対的な遺伝子発現割合を示す。化合物(I)投与群では非投与群と比較して CD3、CD4、CD8、NK1.1、IL-2、IFN- γ 、Perforin、Granzyme B および CD69 の遺伝子発現上昇が認められた。この結果から、化合物(I)は免疫賦活化作用により、腫瘍内に浸出する免疫細胞を増加させており、これが腫瘍増殖を抑制していると推察された。

産業上の利用可能性

本発明により、免疫賦活化により改善することができる疾患を予防または治療することができる、また、各種感染症、免疫不全疾患、および腫瘍などの新たな治療法が提供される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項 1]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化剤。

[請求項 2]

T 細胞を賦活化する、請求項 1 に記載の免疫賦活化剤。

[請求項 3]

IL-2 産生を誘導する、請求項 1 に記載の免疫賦活化剤。

[請求項 4]

IFN 産生を誘導する、請求項 1 に記載の免疫賦活化剤。

[請求項 5]

免疫細胞の遊走を誘導する、請求項 1 に記載の免疫賦活化剤。

[請求項 6]

免疫細胞の病変部への浸出・集積を誘導する、請求項 1 に記載の免疫賦活化剤。

[請求項 7]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫を賦活化する方法。

[請求項 8]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化により感染症を予防または治療するための医薬組成物。

[請求項 9]

感染症が寄生虫感染である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

[請求項 10]

寄生虫が、トリパノソーマ原虫、マラリア原虫、およびトキソプラズマからなる群から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

[請求項 11]

感染症が細菌感染である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

[請求項 1 2]

細菌が、肺炎球菌、結核菌、黄色ブドウ球菌、炭疽菌、コレラ菌、およびピロリ菌からなる群から選択される、請求項 11 に記載の医薬組成物。

[請求項 1 3]

感染症がウイルス感染である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

[請求項 1 4]

ウイルスが、ヒト T 細胞白血病ウイルス、パピローマウイルス、エプスタインバールウイルス、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、B 型肝炎ウイルス、および C 型肝炎ウイルスからなる群から選択される、請求項 13 に記載の医薬組成物。

[請求項 1 5]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、感染症を予防または治療する方法。

[請求項 1 6]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化により免疫不全疾患を治療するための医薬組成物。

[請求項 1 7]

免疫不全疾患が HIV 感染によるものである、請求項 16 に記載の医薬組成物。

[請求項 1 8]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド [5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、免疫不全疾患を治療する方法。

[請求項 1 9]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド

[5, 4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化により、加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患を予防または治療するための医薬組成物。

[請求項 20]

免疫機能減弱に起因する疾患が肺炎である、請求項 19 に記載の医薬組成物。

[請求項 21]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6, 7, 8, 9-テトラヒドロピリミド [5, 4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、加齢に伴う免疫機能減弱に起因する疾患を予防または治療する方法。

[請求項 22]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6, 7, 8, 9-テトラヒドロピリミド [5, 4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫賦活化によりウイルス関連腫瘍を予防または治療するための医薬組成物。

[請求項 23]

ウイルス関連腫瘍が、バーキットリンパ腫、肝細胞癌、子宮頸癌、成人T細胞白血病、カポジ肉腫、頭頸部がんである、請求項 22 に記載の医薬組成物。

[請求項 24]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6, 7, 8, 9-テトラヒドロピリミド [5, 4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫賦活化することによる、ウイルス関連腫瘍を予防または治療する方法。

[請求項 25]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6, 7, 8, 9-テトラヒドロピリミド [5, 4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む、免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の作用を増強するための医薬組成物。

[請求項 26]

感染症予防ワクチンの作用を増強するための、請求項 25 に記載の医薬組成物。

[請求項 27]

抗ウイルス剤の作用を増強するための、請求項 25 に記載の医薬組成物。

[請求項 28]

抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体の作用を増強するための、請求項 25 に記載の医薬組成物。

[請求項 29]

がんワクチンの作用を増強するための、請求項 25 に記載の医薬組成物。

[請求項 30]

抗腫瘍免疫応答誘導剤の作用を増強するための、請求項 25 に記載の医薬組成物。

[請求項 31]

抗腫瘍免疫応答誘導剤が抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体である、請求項 30 に記載の医薬組成物。

[請求項 32]

抗腫瘍免疫応答誘導剤が抗 PD-1 抗体である、請求項 31 に記載の医薬組成物。

[請求項 33]

抗腫瘍免疫応答誘導剤が抗 PD-L1 抗体である、請求項 31 に記載の医薬組成物。

[請求項 34]

(S)-N-(4-アミノ-5-(キノリン-3-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロピリミド[5,4-b]インドリジン-8-イル)アクリルアミドまたはその塩を含む医薬組成物を被験体に投与することを含む、被験体において免疫に作用することにより疾病を予防または治療する医薬の作用を増強する方法。

図 1

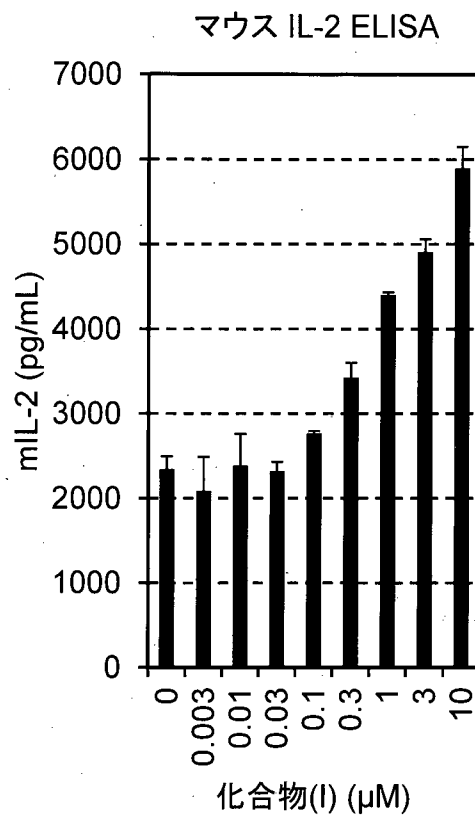


図 2

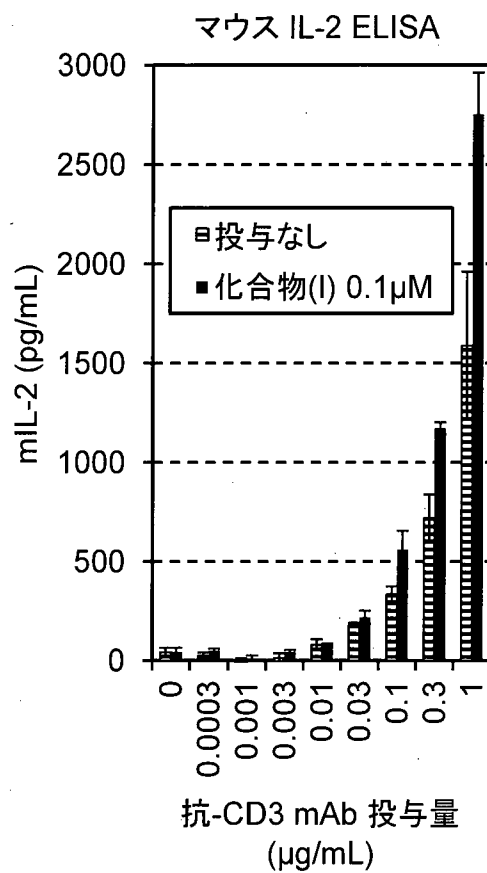


図 3

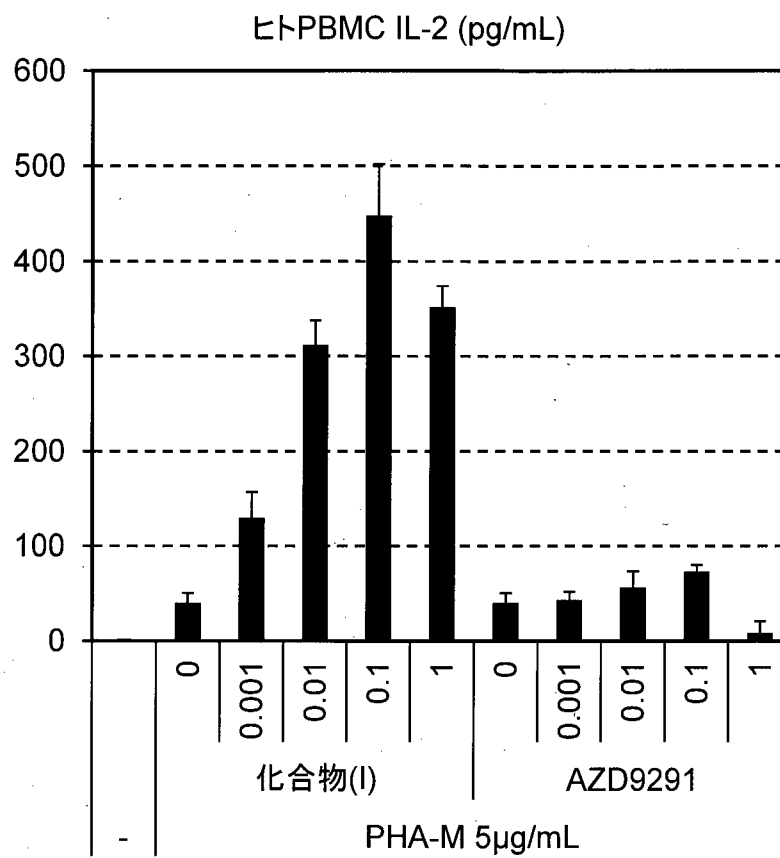


図 4

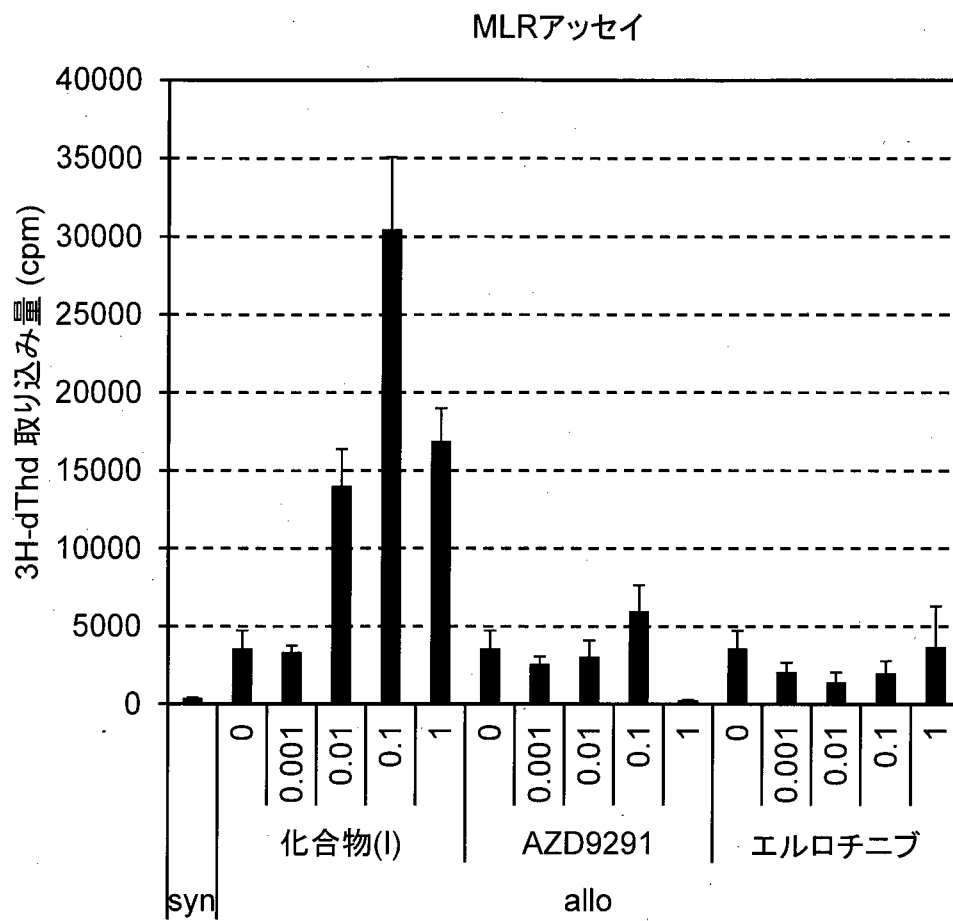


図 5

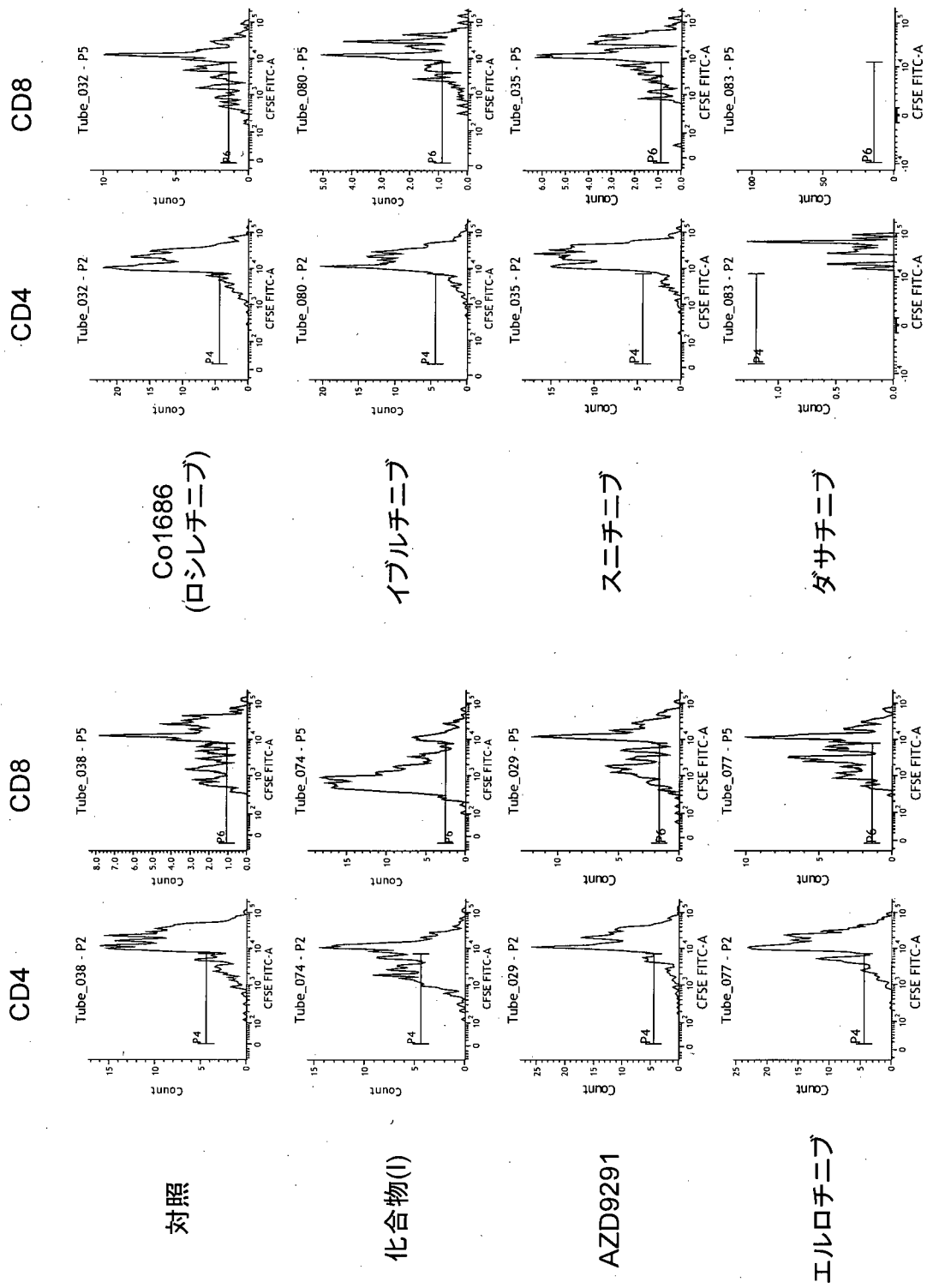


图 6

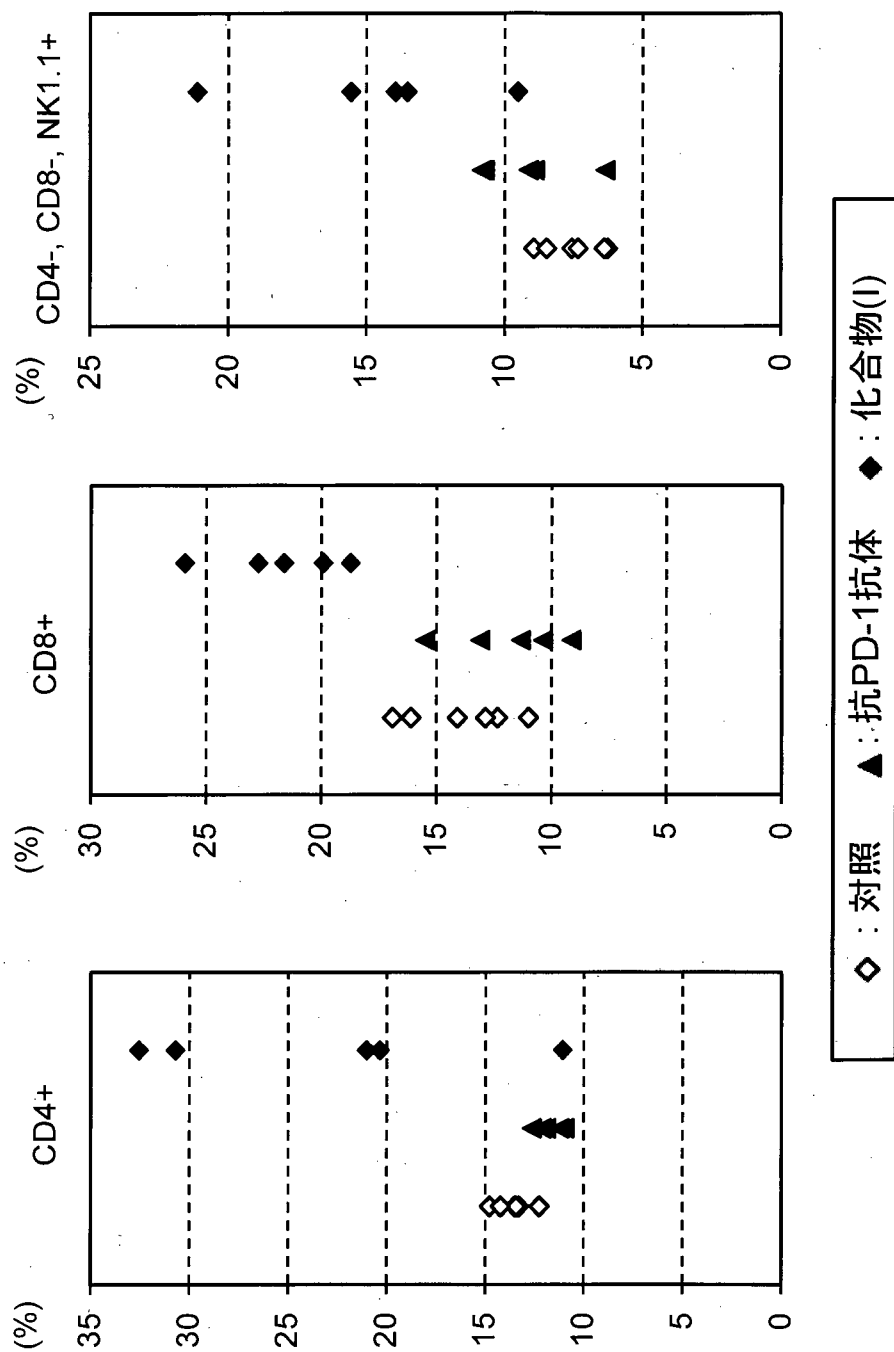


図 7

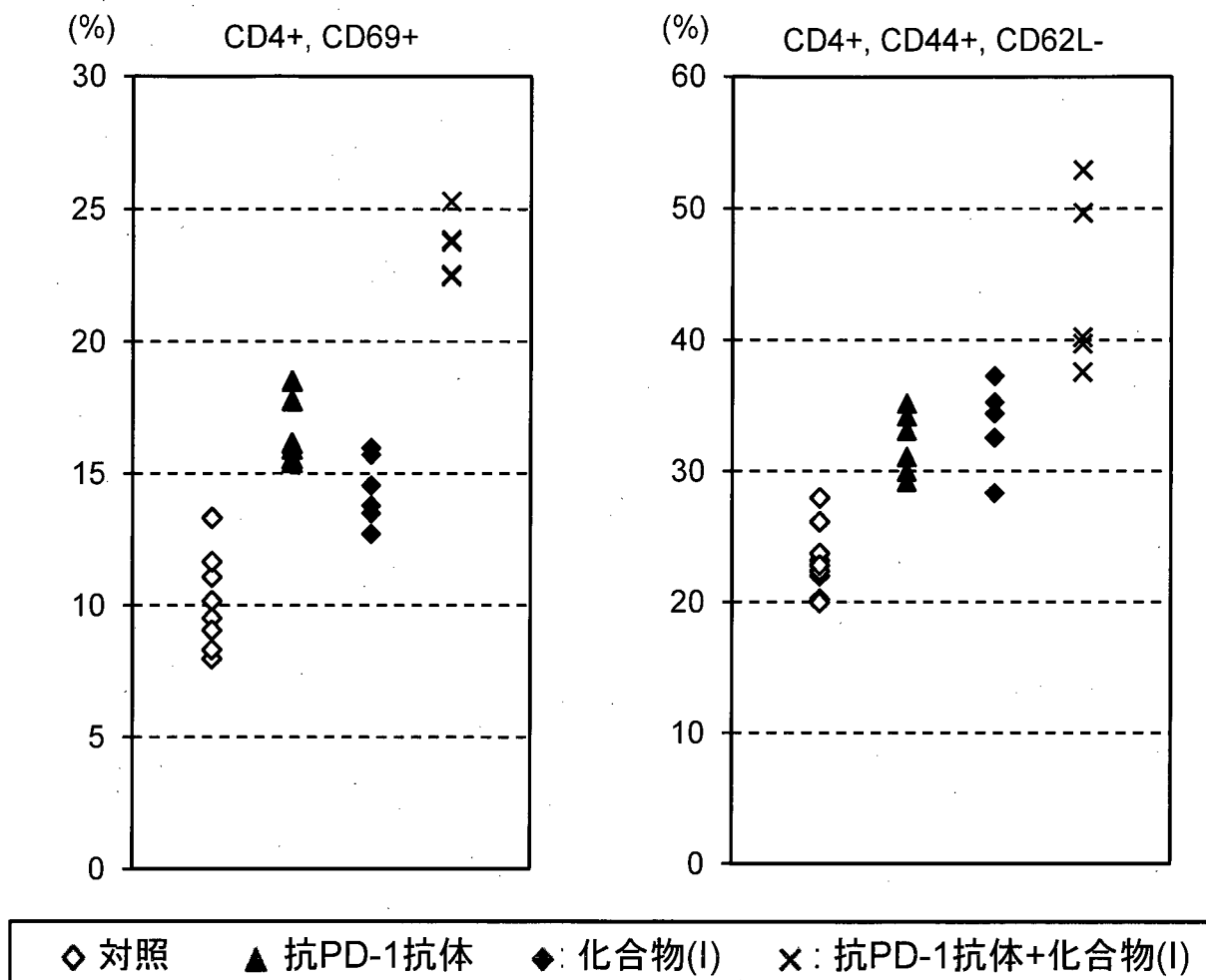


図 8

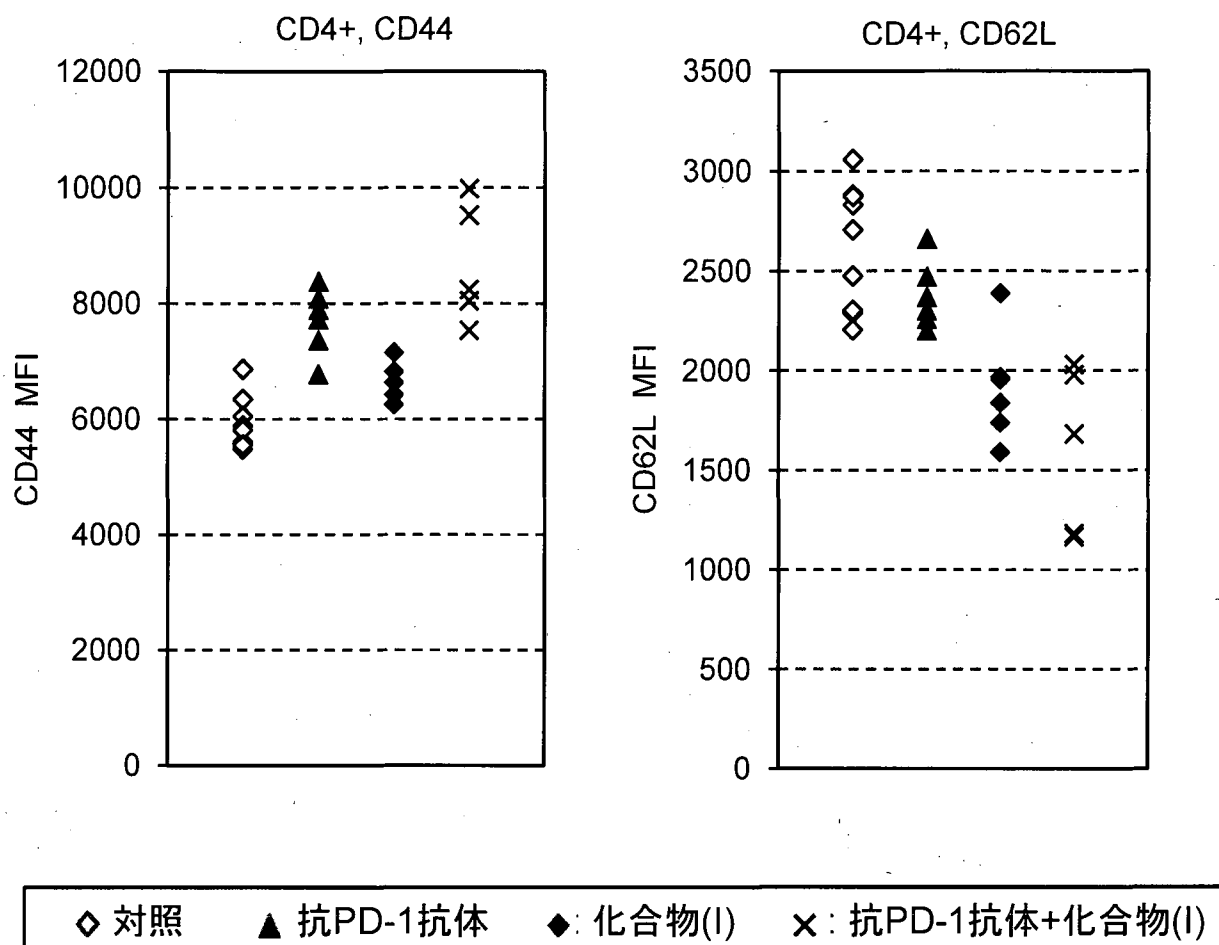


図9

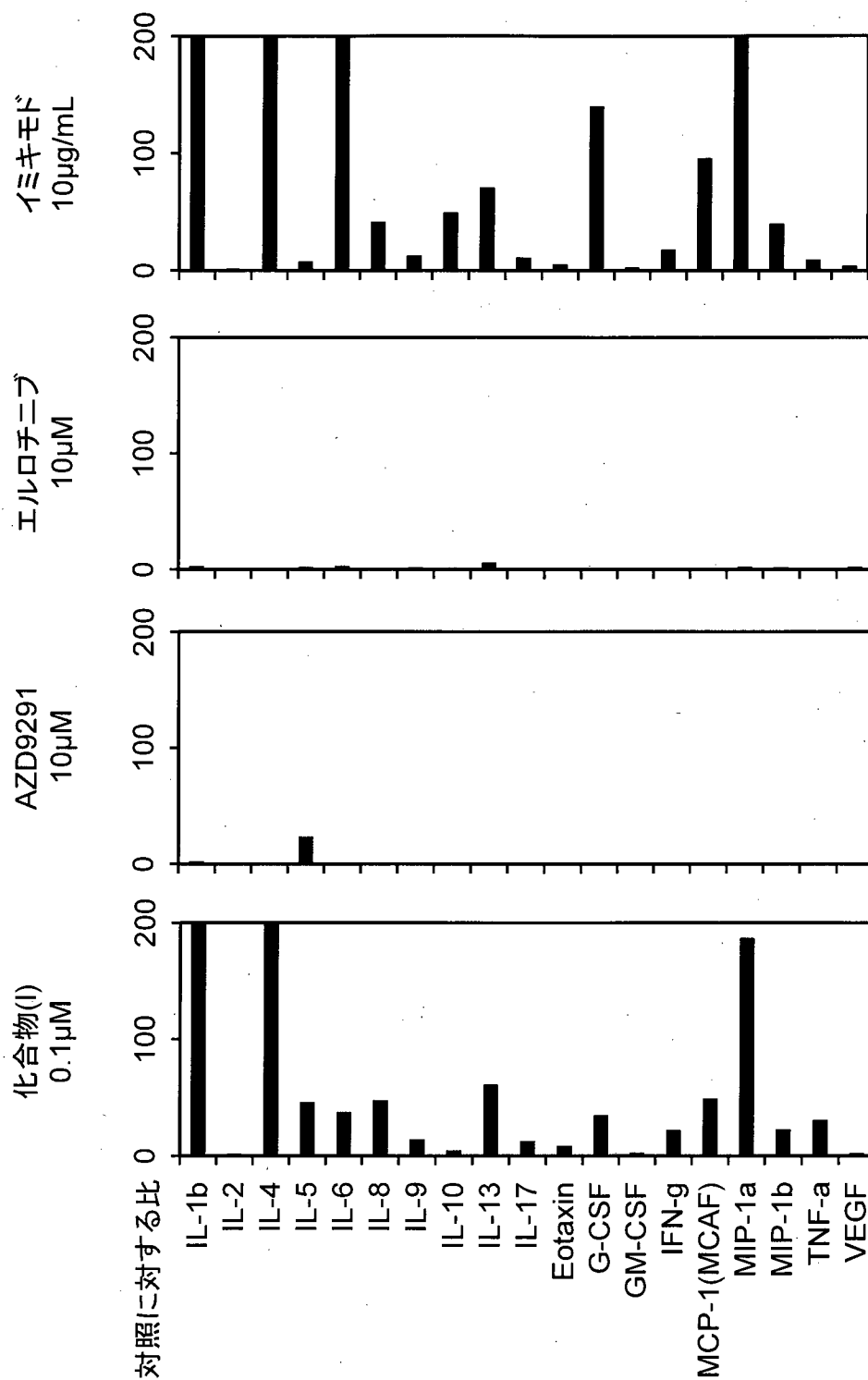
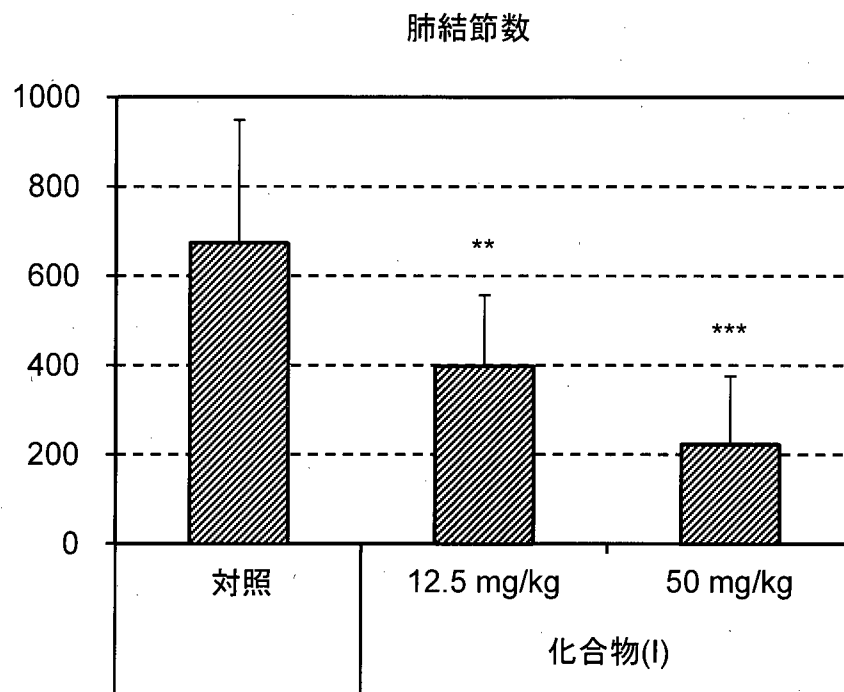


図 10



Dunnett type 多重比較 *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$

図 1 1

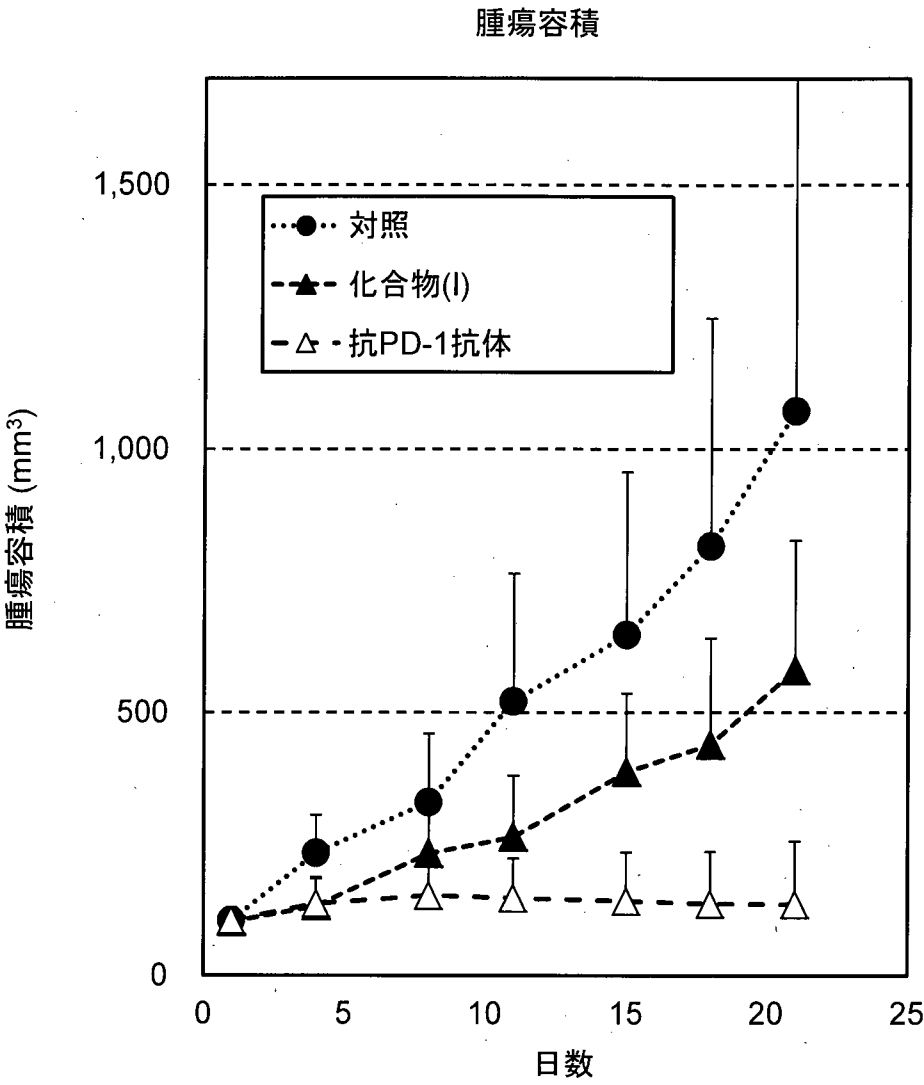


图 12

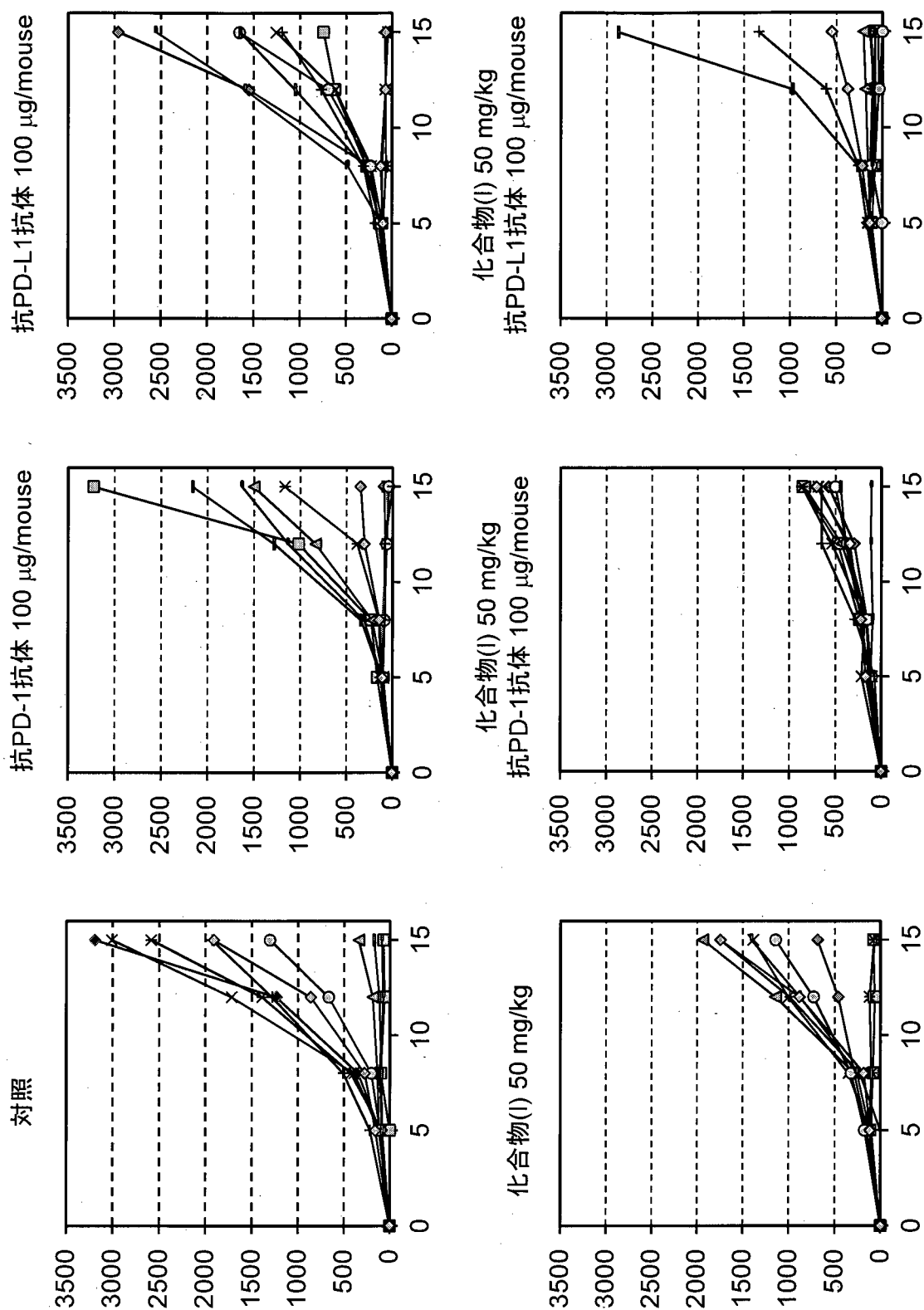
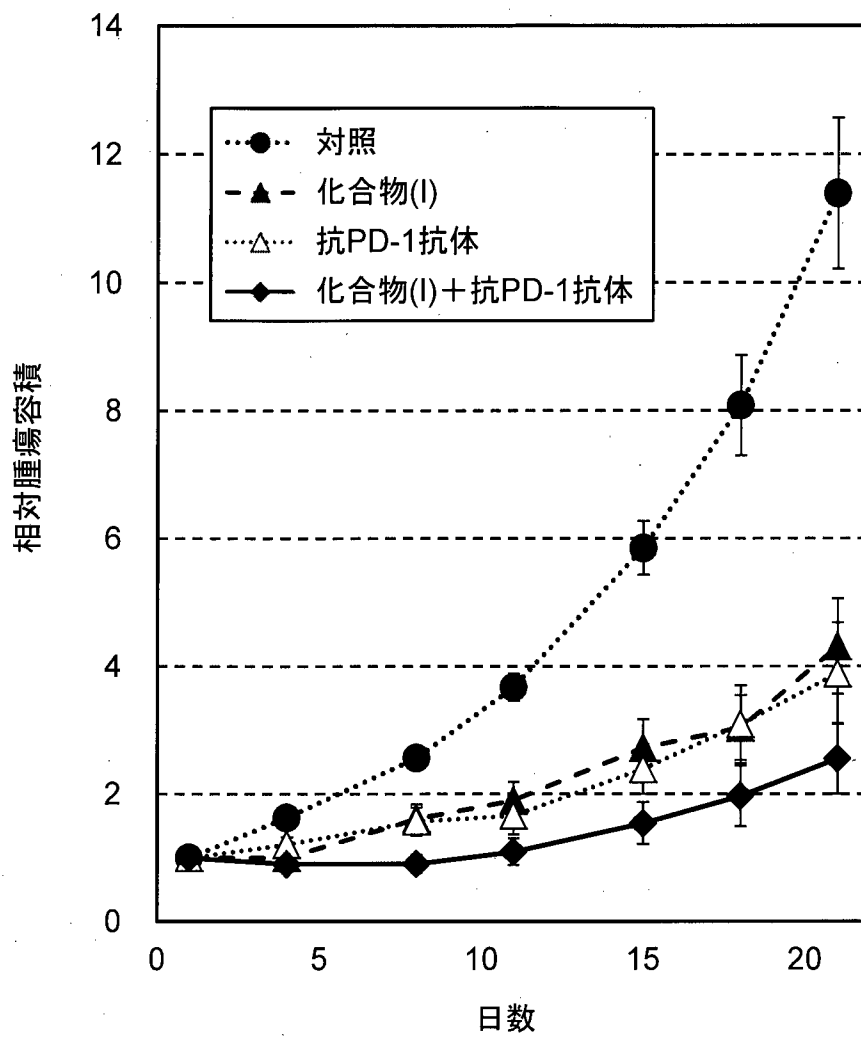


図 1 3



(1日目=腫瘍接種後14日後、MEAN±S.E., N=15)

図 1 4

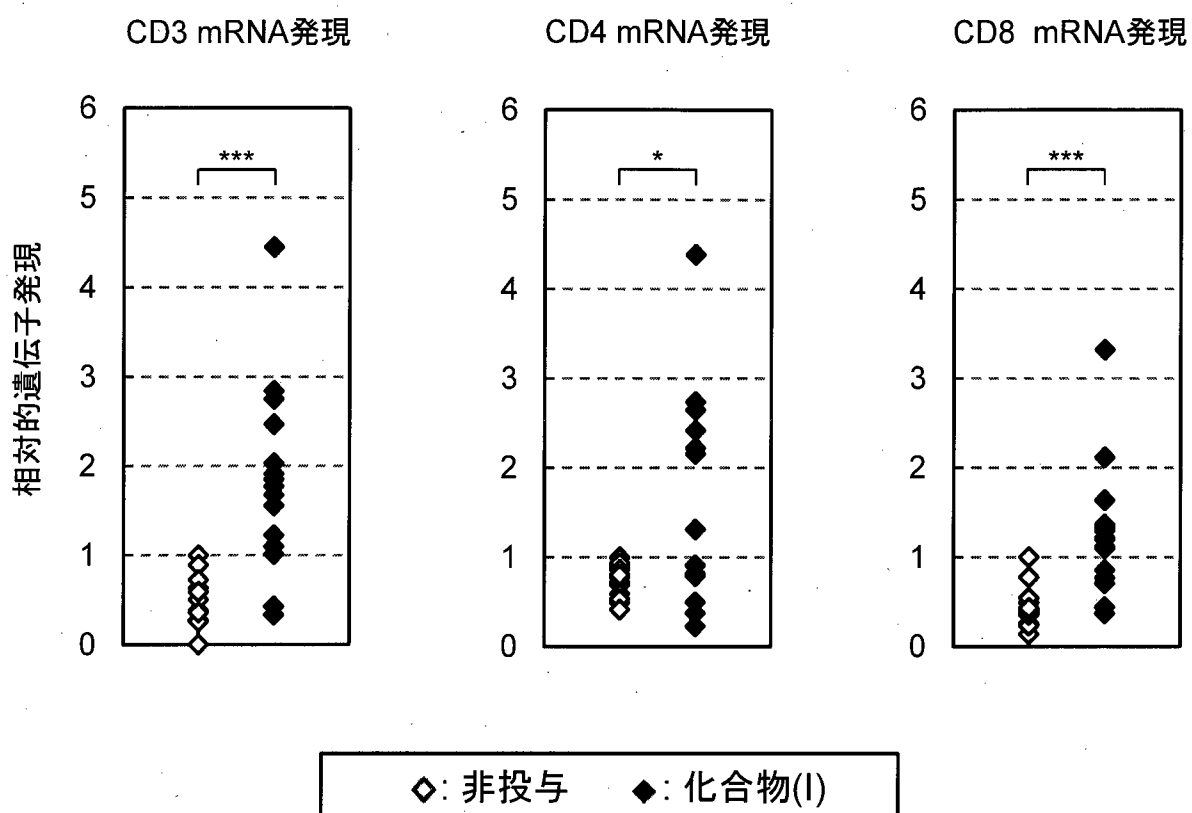


図 1 5

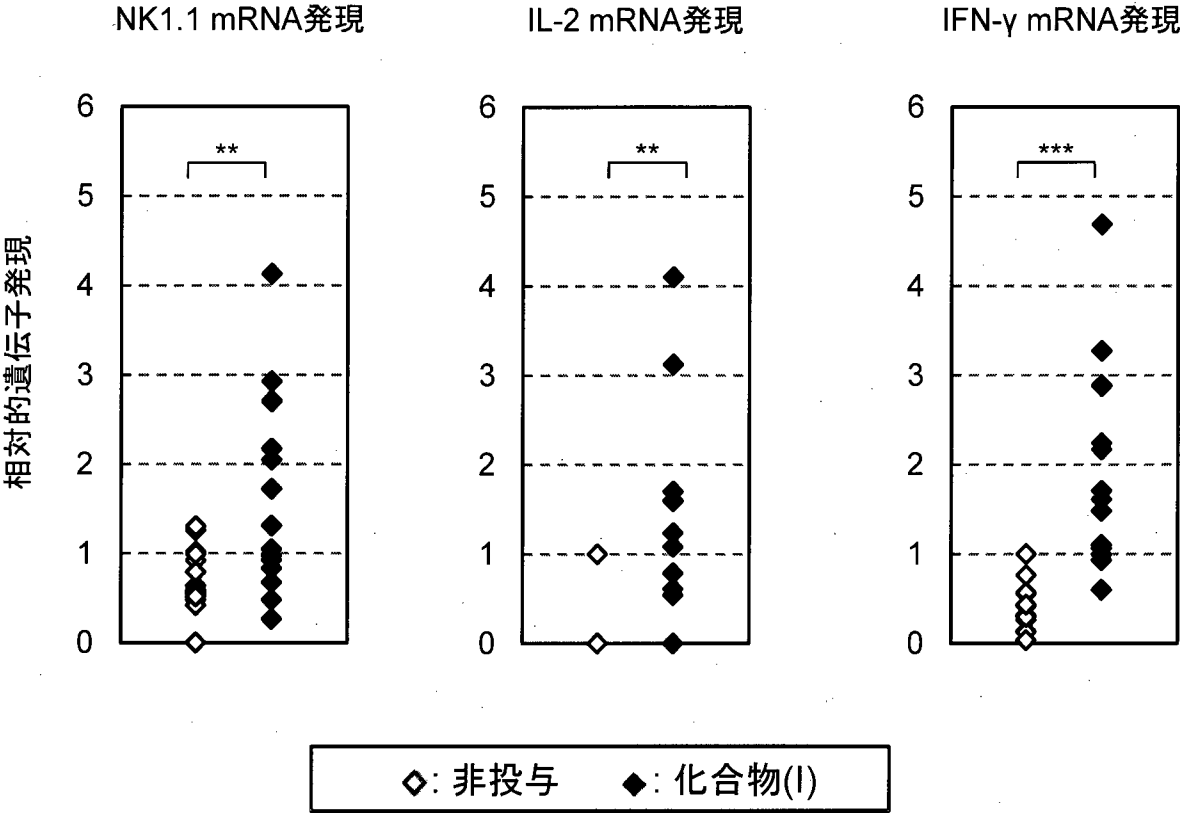
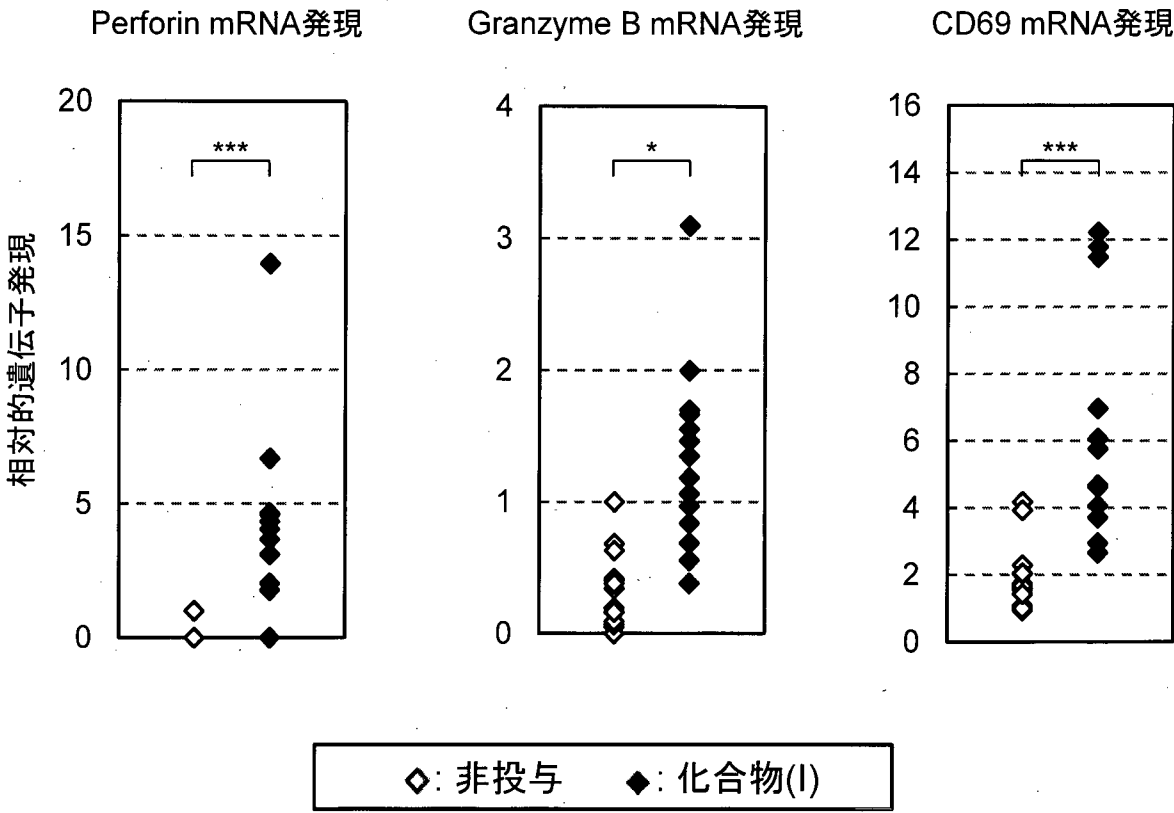


図 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2016/001543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/519, A61K39/395, A61P11/00, A61P31/04, A61P31/06, A61P31/12, A61P31/14, A61P31/16, A61P31/18, A61P31/20, A61P33/00, A61P33/02, A61P33/06, A61P35/00, A61P35/02, A61P37/04, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/125709 A1 (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 August 2013 (29.08.2013), example 1; test examples; claims & US 2014/0057899 A1 example 1; test examples; claims & EP 2722332 A1 & CN 104136438 A & KR 10-2014-0117647 A	1-34
A	KUMAI T, et al., EGFR inhibitors augment antitumour helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy, British Journal of Cancer, 2013, Vol. 109, p. 2155-2166, ISSN 0007-0920, particularly, Abstract	1-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 December 2016 (08.12.16)

Date of mailing of the international search report
20 December 2016 (20.12.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2016/001543

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN Nan, et al., Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation, Journal of Thoracic Oncology, 2016.06, Vol. 10, No. 6, p. 910-923, ISSN 1556-0864, particularly, Abstract	1-34
A	SHEK Derek, et al., A phase II trial of gefitinib and pegylated IFN α in previously treated renal cell carcinoma, International Journal of Clinical Oncology, 2011, Vol. 16, p. 494-499, ISSN 1341-9625, particularly, Abstract	1-34
A	JP 2012-512883 A (The Regents of the University of California), 07 June 2012 (07.06.2012), entire text; particularly, claims; examples & US 2011/0236349 A1 entire text; particularly, examples; claims & WO 2010/123527 A2 & EP 2373329 A2 & CA 2744947 A1 & AU 2009344851 A1	1-34
A	CRABTREE, Jean E., et al., Effects of EGFR Inhibitor on Helicobacter pylori Induced Gastric Epithelial Pathology in Vivo, Pathogens, 2013, Vol. 2, p. 571-590, ISSN 2076-0817, particularly, Abstract	1-34
A	US 2015/0079079 A1 (WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES), 19 March 2015 (19.03.2015), examples; claims & WO 2015/038755 A1 & EP 3043817 A1 & CA 2923837 A1	1-34
A	YANG, Zhaoshou, et al., Gefitinib Inhibits the Growth of Toxoplasma gondii in HeLa Cells, Korean Journal of Parasitology, 2014, Vol. 52, No. 4, p. 439-441, ISSN 0023-4001, particularly, Abstract	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2016/001543

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

A61K31/519(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i,
A61P31/04(2006.01)i, A61P31/06(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i,
A61P31/14(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i,
A61P31/20(2006.01)i, A61P33/00(2006.01)i, A61P33/02(2006.01)i,
A61P33/06(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i,
A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K31/519, A61K39/395, A61P11/00, A61P31/04, A61P31/06, A61P31/12, A61P31/14, A61P31/16, A61P31/18, A61P31/20, A61P33/00, A61P33/02, A61P33/06, A61P35/00, A61P35/02, A61P37/04, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2013/125709 A1（大鵬薬品工業株式会社）2013.08.29, 実施例1、試験例、請求の範囲 & US 2014/0057899 A1 Example 1, Test Examples, Claims & EP 2722332 A1 & CN 104136438 A & KR 10-2014-0117647 A	1-34
A	KUMAI T, et al., EGFR inhibitors augment antitumour helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy, British Journal of Cancer, 2013, Vol. 109, p. 2155-2166, ISSN 0007-0920, 特にAbstract	1-34

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.2016

国際調査報告の発送日

20.12.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

金田 康平

4C

5373

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CHEN Nan, et al., Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation, Journal of Thoracic Oncology, 2016.06, Vol. 10, No. 6, p. 910-923, ISSN 1556-0864, 特に Abstract	1-34
A	SHEK Derek, et al., A phase II trial of gefitinib and pegylated IFN α in previously treated renal cell carcinoma, International Journal of Clinical Oncology, 2011, Vol. 16, p. 494-499, ISSN 1341-9625, 特に Abstract	1-34
A	JP 2012-512883 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2012.06.07, 全文、特に特許請求の範囲、実施例等 & US 2011/0236349 A1 全文、特に Examples, Claims & WO 2010/123527 A2 & EP 2373329 A2 & CA 2744947 A1 & AU 2009344851 A1	1-34
A	CRABTREE, Jean E., et al., Effects of EGFR Inhibitor on Helicobacter pylori Induced Gastric Epithelial Pathology in Vivo, Pathogens, 2013, Vol. 2, p. 571-590, ISSN 2076-0817, 特に Abstract	1-34
A	US 2015/0079079 A1 (WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES) 2015.03.19, Examples, Claims & WO 2015/038755 A1 & EP 3043817 A1 & CA 2923837 A1	1-34
A	YANG, Zhaoshou, et al., Gefitinib Inhibits the Growth of Toxoplasma gondii in HeLa Cells, Korean Journal of Parasitology, 2014, Vol. 52, No. 4, p. 439-441, ISSN 0023-4001, 特に Abstract	1-34

発明の属する分野の分類

A61K31/519(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i,
A61P31/04(2006.01)i, A61P31/06(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i,
A61P31/16(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P31/20(2006.01)i, A61P33/00(2006.01)i,
A61P33/02(2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i,
A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i