

明 細 書

発明の名称：血液がんの新規併用療法

技術分野

[0001] 本発明は血液がんの新規治療手段に関する。より詳細には、化合物（１）、その薬学的に許容される塩もしくは水和物と、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との組み合わせ、または、化合物（１）、その薬学的に許容される塩もしくは水和物とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との前記組み合わせに、更にBCL-2阻害剤を組み合わせることによる新たな治療手段の提供に関する。

背景技術

[0002] 血液がんは、血液細胞ががん化した病気の総称であり、大きくは、白血病や悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等に分類される。近年、様々な治療法および抗がん剤が開発されており、これらの血液がんの治療に用いられている。

骨髄異形成症候群（MDS）は、骨髄中の造血幹細胞に異常が起き、正常な血液が作られなくなる疾患である。MDSの患者のうち、約30%が急性骨髄性白血病（AML）に進行するとされている。近年、がんの発症や白血病化の原因の一つとして、がん抑制遺伝子の不活性化等を誘導するDNAメチル化の異常が考えられている。

このDNAの異常なメチル化を抑制するためにDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤が開発されている。アザシチジンやデシタピンを代表とするDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、シチジンに化学構造が類似していることから、生体内でDNAに組み込まれ、DNAメチルトランスフェラーゼを阻害してDNAのメチル化を抑制することで、DNA損傷およびアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を発揮する。

アザシチジンやデシタピンなどのDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、すでにMDSやAMLの治療薬として用いられているが、治療効果がない患者や治療中に効果がなくなり薬剤耐性になってしまうことが臨床上の問

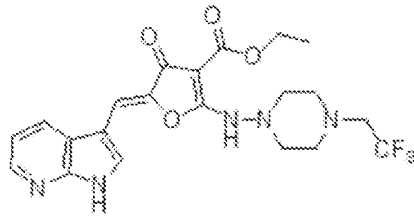
題となっている（非特許文献1）。

BCL-2（B-cell lymphoma 2）は、細胞死を制御するBCL-2ファミリーの一つであり、一部の血液がんでアポトーシスを阻害していることが知られている。これまでにベネトクラクスをはじめとする、いくつかのBCL-2阻害剤が報告されており、これらのBCL-2阻害剤は、BCL-2と選択的に結合することでBCL-2の作用を阻害し、単剤または他の治療薬との併用で強力にアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示すことが知られている（非特許文献2）。ベネトクラクスは、アザシチジンやデシタビンなどのDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤などとの併用療法として、AML患者の治療薬として承認されているが、本併用療法においても、治療継続が困難な重篤な副作用や不十分な治療効果が問題となっており、さらなる新しい治療方法の開発が望まれている（非特許文献3）。

CDC7（cell division cycle 7）は、セリンスレオニンキナーゼの一種で、細胞周期においてDNA複製を開始する上で必須の酵素である。CDC7はそのリン酸化作用を活性化させるDbf4（ASK）等のコファクターと複合体を形成し、基質であるMCM（ミニクロモソームメンテナン）タンパク質をリン酸化する。このリン酸化によりCdc45とDNAポリメラーゼがDNA上に集合してMCM複合体が形成され、DNA複製が開始すると考えられている（非特許文献4）。近年、CDC7は抗癌剤のターゲットとして注目されており、CDC7を選択的かつ強力に阻害するAS-0141は、種々のがん細胞株に対して抗腫瘍活性を有することが示されている（非特許文献5）。

[0003] AS-0141は、エチル 5-[(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)メチレン]-4-オキソ-2-{[4-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペラジニル]アミノ}-4,5-ジヒドロフラン-3-カルボキシレート[化合物(1)]で示される化合物である。

[化1]



(I)

化合物（I）は、国際公開公報第2012/133802号（特許文献1）および非特許文献5に開示されている。また化合物（I）とWee1阻害剤などのM期促進剤との組み合わせが抗がん作用を増強することが開示されている（特許文献2）。国際公開公報第2018/84266号では、化合物（I）を含むがんの治療方法について開示されている（特許文献3）。国際公開公報第2020/68347号には、併用療法においてSRA141（AS-0141）を投与する治療法が開示されている（特許文献4）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2012/133802号

特許文献2：国際公開第2015/115355号

特許文献3：国際公開第2018/84266号

特許文献4：国際公開第2020/68347号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Zhao G, et al., Front Oncol. 2021 Sep 28; 11:706030.

非特許文献2：Ashkenazi, A., et al., Nature Rev. Drug Discov., 2017, 16, 273-284.

非特許文献3：Estey EH., Am J Hematol. 2020 Nov; 95 (11) : 1368-1398.

非特許文献4：Sawa M, Masai H., Drug Des D

evel Ther., 2008 Feb 6; 2: 255-264.

非特許文献5: Irie T, et al., J Med Chem.
2021 Oct 14; 64 (19): 14153-14164.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、血液がん患者を治療するための、より治療効果が高く、および副作用の少ない新たな治療方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 化合物（１）、その薬学的に許容される塩または水和物とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の組み合わせについては一切報告がなく、化合物（１）、その薬学的に許容される塩または水和物とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との併用が血液がんに対する抗がん効果を増大させることについても全く報告されていない。また化合物（１）、その薬学的に許容される塩または水和物と、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤との三剤併用の組み合わせに関する報告もなく、当該三剤併用が血液がんに対する抗がん効果を増大させることについても全く知られていない。

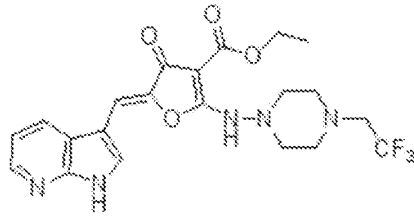
本発明者らは、前記課題を解決するため、鋭意研究した結果、１）化合物（１）、その薬学的に許容される塩または水和物と、２）DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤とを組み合わせること、さらには、これら１）および２）の組み合わせに加え、３）BCL-2阻害剤を組み合わせることで、その相乗効果により、本発明の課題が解決されることを見出し、本発明を完成させた。

より具体的には本発明は以下に関する。なお、本願明細書において、特に言及しない限り、化合物（１）には、その薬学的に許容される塩または水和物も包含される。アザシチジンおよびデシタピンにおいても同様である。

- [0008] （１）血液がんの治療に使用するために、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と組み合わせる患者に投与される、化合物（１）を有効成分として含

む医薬組成物。

[化2]



(I)

(2) 血液がんの治療に使用するために、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤に加えて、さらにBCL-2阻害剤と組み合わせて患者に投与される、(1)の医薬組成物。

(3) 血液がんが骨髓異形成症候群(MDS)および／または急性骨髄性白血病(AML)である、(1)または(2)の医薬組成物。

(4) 血液がんが骨髓異形成症候群(MDS)である、(1)または(2)の医薬組成物。

(5) 血液がんが急性骨髄性白血病(AML)である、(1)または(2)の医薬組成物。

[0009] (6) DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤がアザシチジンまたはデシタピンを有効成分として含む医薬組成物である、(1)または(2)の医薬組成物。

(7) DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤が、アザシチジンを有効成分として含む医薬組成物である、(6)の医薬組成物。

(8) DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤が、デシタピンを有効成分として含む医薬組成物である、(6)の医薬組成物。

(9) アザシチジンを有効成分として含む医薬組成物が、化合物(I)を有効成分として含む医薬組成物と、両方同時に、または別々に順次投与される、(7)の医薬組成物。

(10) デシタピンを有効成分として含む医薬組成物が、化合物(I)有効

成分として含む医薬組成物と、両方同時に、または別々に順次投与される、
(8) の医薬組成物。

(11) BCL-2 阻害剤がベネトクラクスを有効成分として含む医薬組成物である、(2) の医薬組成物。

(12) 血液がんが骨髄異形成症候群 (MDS) および／または急性骨髄性白血病 (AML) である、(9) から (11) のいずれかに記載の医薬組成物。

[0010] (13) 血液がんが骨髄異形成症候群 (MDS) である、(12) に記載の医薬組成物。(14) 血液がんが急性骨髄性白血病 (AML) である、(12) に記載の医薬組成物。

(15) (1) の組み合わせ投与に使用するための、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤および化合物 (I) をそれぞれ有効成分として含む医薬組成物を含むキット。

(16) (2) の組み合わせ投与に使用するための、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、BCL-2 害剤および化合物 (I) をそれぞれ有効成分として含む医薬組成物を含むキット。

(17) DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と組み合わせて、化合物 (I) を有効成分として含む医薬組成物を患者に投与する、血液がんの治療方法。

(18) DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、BCL-2 阻害剤と組み合わせて、化合物 (I) を有効成分として含む医薬組成物を患者に投与する、血液がんの治療方法。

(19) 血液がんが骨髄異形成症候群 (MDS) および／または急性骨髄性白血病 (AML) である、(17) または (18) の治療方法。

(20) DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤がアザシチジンまたはデシタピンを有効成分として含む医薬組成物である、(17) または (18) の治療方法。

(21) BCL-2 阻害剤がベネトクラクスを有効成分として含む医薬組成

物である、(18)の治療方法。

発明の効果

[0011] 化合物(1)、その薬学的に許容される塩または水和物とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との組み合わせにより、化合物(1)とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤のそれぞれを単独に使用した場合に比べて、より高い効率で細胞死をもたらすことができる。CDC7阻害剤は、がん細胞におけるゲノムの不安定化を引き起こし、DNA損傷およびアポトーシスを誘導することができる。一方、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、がん細胞の異常なDNAメチル化を抑制することで、がん抑制遺伝子を活性化し、DNA損傷およびアポトーシスを誘導する。従って、これらの化合物(1)とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との組み合わせは、抗がん作用としての増強効果が期待でき、各種血液がんに対して高い治療効果を得ることができる。

また、化合物(1)、その薬学的に許容される塩または水和物とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、さらにBCL-2阻害剤を組み合わせることで三剤併用することにより、さらに相乗効果が期待でき、各種血液がんに対して高い治療効果を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、ヒト急性単球性白血病細胞株(THP-1)に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン)と化合物(1)の組み合わせによる相互作用を示す細胞増殖阻害率の図である。

[図2A]図2Aは、THP-1細胞に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン)と化合物(1)の組み合わせによる影響を、DNAダメージの指標である γ H2AXと、アポトーシスの指標であるカスパーゼ-3の切断(cleaved caspase 3)の発現レベルの変化として調べた図である。

[図2B]図2Bは、MV-4-11細胞に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(デシタビン)と化合物(1)の組み合わせによる影響を、DN

A ダメージの指標である γ H2AXと、アポトーシスの指標であるカスパーゼー3の切断 (cleaved caspase 3) の発現レベルの変化として調べた図である。

[図3]図3は、THP-1細胞に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン)と化合物(1)の組み合わせによるアポトーシスの誘導を調べた図である。

[図4A]図4Aは、THP-1細胞に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン)と化合物(1)の組み合わせによる相互作用を示すアイソボログラム(50%阻害)の図である。

[図4B]図4Bは、ヒト急性骨髄性白血病細胞株(MV-4-11)に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン)と化合物(1)の組み合わせによる相互作用を示すアイソボログラム(50%阻害)の図である。

[図4C]図4Cは、ヒト急性単球性白血病細胞株(MOLM-14)に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン)と化合物(1)の組み合わせによる相互作用を示すアイソボログラム(50%阻害)の図である。

[図4D]図4Dは、ヒト赤白血病細胞株(TF-1)に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン)と化合物(1)の組み合わせによる相互作用を示すアイソボログラム(50%阻害)の図である。

[図4E]図4Eは、ヒト急性骨髄性白血病細胞株(MV-4-11)に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(デシタビン)と化合物(1)の組み合わせによる相互作用を示すアイソボログラム(50%阻害)の図である。

[図4F]図4Fは、ヒト急性単球性白血病細胞株(MOLM-14)に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(デシタビン)と化合物(1)の組み合わせによる相互作用を示すアイソボログラム(50%阻害)の図である。

[図4G]図4 Gは、ヒト赤白血病細胞株（TF-1）に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（デシタビン）と化合物（I）の組み合わせによる相互作用を示すアイソボログラム（50%阻害）の図である。

[図5]図5は、ヒト急性骨髄性白血病細胞株（MV-4-11）に対するDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（アザシチジン）、BCL-2阻害剤（ベネトクラクス）および化合物（I）の組み合わせによる相互作用を示すFa-CIプロットである。

[図6A]図6 Aは、ヒト急性骨髄性白血病細胞株（MV-4-11）のマウス皮下移植モデルにおいて、化合物（I）およびDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（アザシチジン）の組み合わせによる腫瘍増殖を抑制していることを示す。

[図6B]図6 Bは、ヒト急性骨髄性白血病細胞株（MV-4-11）のマウス皮下移植モデルにおいて、化合物（I）およびDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（デシタビン）の組み合わせによる腫瘍増殖を抑制していることを示す。

[図7A]図7 Aは、ヒト急性骨髄性白血病細胞株（MV-4-11）のマウス皮下移植モデルにおいて、化合物（I）とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（アザシチジン）およびBCL-2阻害剤（ベネトクラクス）との組み合わせによる腫瘍増殖を抑制していることを示す。

[図7B]図7 Bは、ヒト急性骨髄性白血病細胞株（MV-4-11）のマウス皮下移植モデルにおいて、化合物（I）とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（デシタビン）およびBCL-2阻害剤（ベネトクラクス）との組み合わせによる腫瘍増殖を抑制していることを示す。

発明を実施するための形態

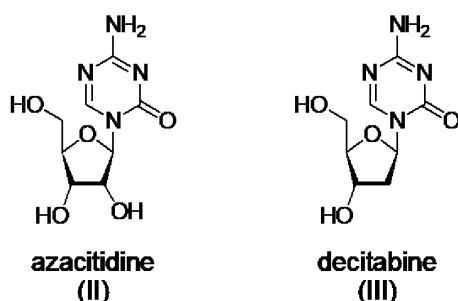
[0013] (1) DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤

本発明においてDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤とは、DNAメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する薬物を有効成分として含む医薬組成物をいい、低分子化合物、ポリペプチド、タンパク質、核酸（siRNA、m

iRNA、アプタマー等)、その他の高分子化合物等のDNAメチルトランスフェラーゼの生理機能を阻害する薬物を含む医薬組成物を包含する。また、生体内で活性化されてDNAメチルトランスフェラーゼの生理機能を阻害する薬剤、すなわちDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤のプロドラッグも包含される。

DNAメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する薬物としては、例えば、以下の構造を有する、アザシチジンおよびデシタビン等が挙げられ、これらの薬学的に許容される塩、水和物およびプロドラッグも包含される。

[化3]



(2) BCL-2 阻害剤

本発明において使用されるBCL-2阻害剤とは、細胞内でBCL-2の生理機能の阻害作用を有する薬剤をいい、低分子化合物、ポリペプチド、タンパク質、核酸(s iRNA、m iRNA、アプタマー等)、その他の高分子化合物等のBCL-2の生理機能を阻害する薬剤を包含する。

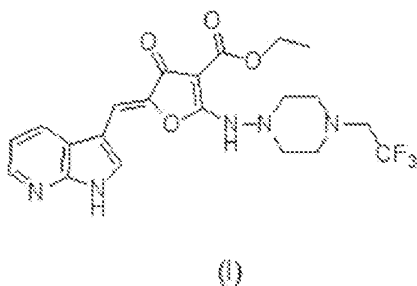
BCL-2は、細胞死を制御するBCL-2ファミリーの一つであり、アポトーシスを負に制御している。BCL-2は濾胞性リンパ腫、DLBCL)やCLLなどのリンパ系B細胞腫瘍のほか、多発性骨髄腫やT細胞腫瘍でも活性化しており、BCL-2阻害剤は、これらのがん細胞にアポトーシスを誘導して抗腫瘍効果を示すことから、単剤だけでなく、他の薬剤と併用することで、さらなる抗腫瘍効果が期待できる。

BCL-2阻害剤の例としては、ベネトクラクス、ナビトクラックス、オバトクラックス、オバトクラックスメシル酸塩、サブトクラックス、APG-

1252、AZD-0466、APG-2575、ABBV-167、S-65487、S-55746等が挙げられる。

[0014] (3) 化合物(1)を含む医薬組成物

本発明において化合物(1)とは、エチル 5-[(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)メチレン]-4-オキソ-2-{[4-(2,2-トリフルオロエチル)ピペラジニル]アミノ}-4,5-ジヒドロフラン-3-カルボキシレートで示されるフラノン誘導体(1)であり、
[化4]



その薬学的に許容される塩、水和物およびプロドラッグも化合物(1)に包含される。

[0015] 化合物(1)は、国際公開公報第2012/133802号(特許文献1)および非特許文献5に開示されており、CDC7を選択的かつ強力に阻害する化合物として知られている。

また、本発明で用いられる化合物(1)の薬学的に許容される塩としては、塩酸、硫酸、炭酸、リン酸等との無機酸塩、フマル酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等との有機酸塩等が挙げられる。また、ナトリウム、カリウム等とのアルカリ金属塩、マグネシウム、カルシウム等とのアルカリ土類金属塩、トリエチルアミン、エタノールアミン等との有機アミン塩、リジン、アルギニン、オルニチン等との塩基性アミノ酸塩の他、アンモニウム塩等も本発明に包含される。

[0016] 本発明で用いられる化合物(1)、その薬学的に許容される塩または水和物は、経口投与、非経口投与または局所的投与に適した従来の薬学製剤(医

薬組成物)の形態に調製することができる。

経口投与のための製剤は、錠剤、顆粒、粉末、カプセルなどの固形剤、およびシロップなどの液体製剤を含む。これらの製剤は従来の方法によって調製することができる。固形剤は、ラクトース、コーンスターチなどのデンプン、微結晶性セルロースなどの結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルシウムカルボキシメチルセルロース、タルク、ステアリン酸マグネシウムなどのような従来の薬学的担体を用いることによって調製することができる。カプセルは、このように調製した顆粒または粉末をカプセルに包むことによって調製することができる。シロップは、ショ糖、カルボキシメチルセルロースなどを含む水溶液中で、本発明の化合物、その薬学的に許容される塩または水和物を溶解または懸濁することによって調製することができる。

非経口投与のための製剤は、点滴注入などの注入物を含む。注入製剤もまた従来の方法によって調製することができ、等張化剤（例えば、マンニトール、塩化ナトリウム、グルコース、ソルビトール、グリセロール、キシリトール、フルクトース、マルトース、マンノース）、安定化剤（例えば、亜硫酸ナトリウム、アルブミン）、防腐剤（例えば、ベンジルアルコール、p-オキシ安息香酸メチル）中に適宜組み入れることができる。

[0017] (4) 併用療法

本発明の併用療法では、化合物(1)を有効成分として含む医薬組成物が、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と組み合わせた二剤併用、もしくは、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤と組み合わせた三剤併用として、血液がんの患者に投与される。

本発明の一態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と組み合わせて投与される、化合物(1)を有効成分として含む医薬組成物であって、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物(1)をそれぞれ有効成分として含む医薬組成物を含むキットも包含される。当該キットは、両薬剤の使用説明書を含むことができる。

[0018] 本発明の一態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と同時に投与される、化合物（I）を有効成分として含む医薬組成物である。

本発明の別の態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤を投与した後で投与される、化合物（I）を有効成分として含む医薬組成物である。

本発明の別の態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤を投与する前に投与される、化合物（I）を有効成分として含む医薬組成物である。

本発明の一態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤と組み合わせて投与される、化合物（I）を有効成分として含む医薬組成物であって、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、BCL-2阻害剤および化合物（I）をそれぞれ有効成分として含む医薬組成物を含むキットも包含される。当該キットは、両薬剤の使用説明書を含むことができる。

本発明の一態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤と同時に投与される、化合物（I）を有効成分として含む医薬組成物である。

本発明の別の態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤を投与した後で投与される、化合物（I）を有効成分として含む医薬組成物である。

本発明の別の態様は、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤を投与する前に投与される、化合物（I）を有効成分として含む医薬組成物である。

[0019] アザシチジン、デシタビンおよびベネトクラクスは既に上市されていて、血液がんの治療に用いられている。当業者は、血液がんの種類、患者の体重、年齢や疾患の重篤度等を考慮し、これらを単剤として投与する場合を基にして、適宜、本発明の併用療法におけるアザシチジンまたはデシタビンの投与量を決定することができる。

また、当業者は、血液がんの種類、患者の体重、年齢や疾患の重篤度等を考慮し、これらの併用療法として投与する場合を基にして、適宜、本発明の

三剤併用療法におけるアザシチジン等のDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤とベネトクラクス等のBCL-2阻害剤の投与量を決定することができる。

本発明で用いられる化合物(1)の用量は、疾患の重症度、患者の年齢および体重、投薬形態などに従って変化させることができるが、通常は成人において1日あたり10mg～400mgの範囲であり、それは経口経路または非経口経路によって、1回、または2回もしくは3回に分割して投与することができる。

実施例

[0020] 試験例1 単剤の細胞増殖抑制試験

(細胞培養)

ヒト急性単球性白血病細胞株(THP-1)、ヒト急性骨髄性白血病細胞株(MV-4-11)、ヒト急性単球性白血病細胞株(MOLM-14)およびヒト赤白血病細胞株(TF-1)は10%Fetal bovine serum(Thermo Scientific社、SIGMA-ALDRICH社またはCytiva社)および1%ペニシリンストレプトマイシン(ナカライ社)を含むRPMI1640培地(Roswell Park Memorial Institute培地、ナカライ社)を用いて5%CO₂インキュベーター内で培養した。

(細胞増殖抑制試験)

THP-1細胞およびMV-4-11細胞を 2×10^4 cells/wellで、MOLM-14細胞およびTF-1細胞を 5×10^3 cells/wellで96穴プレートにそれぞれ播種し(細胞プレート)、そこに培地で希釈した被験化合物を最終濃度3nM～30μM(最終DMSO濃度0.3%)になるように添加し、72時間培養後、レサズリン試薬(ナカライ社)を加えた。3時間後、励起波長560nm/蛍光波長590nmの蛍光を測定し、化合物非添加かつ細胞非添加のウェルを100%、化合物非添加かつ細胞添加のウェルを0%として、阻害活性のIC₅₀値を求めた。結果を表1に

示す。

[表1]

	細胞増殖抑制活性 IC ₅₀ (μM)			
	THP-1	MV-4-11	MOLM-14	TF-1
アザシチジン	7.39	1.20	2.85	1.92
デシタビン	>30	0.54	0.16	0.12
化合物 (I)	4.07	0.19	0.16	0.34

[0021] 実施例1 化合物 (I) 存在下におけるDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の用量反応性試験

化合物 (I) 存在下におけるDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (アザシチジン) のIC₅₀値の変化を検討した。

化合物 (I) 単剤の結果から、1用量の化合物 (I) の濃度を選択し、DMSO添加群をコントロールとしてDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の濃度を3 nM～30 μM (最終DMSO濃度、0.4%) になるように、細胞プレートに添加し、試験例1と同様にして化合物 (I) 存在下におけるIC₅₀値を求めた。

THP-1細胞を用いたときの化合物 (I) 存在下におけるアザシチジンのIC₅₀値の変化を図1および表2に示す。

本試験において、図1および表2に示す通り、ヒト急性単球性白血病細胞株であるTHP-1細胞において、化合物 (I) 存在下では、アザシチジンのIC₅₀値が低下した。

[表2]

化合物 (I) の濃度 (μM)	THP-1細胞増殖抑制活性 アザシチジン IC ₅₀ (μM)
0	6.93
3	2.03

実施例1の結果は、本発明の化合物 (I) とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の併用が、血液がん細胞に対して併用効果を有することを示している。

[0022] 実施例2 DNAダメージおよびアポトーシス誘導の評価

DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物(1)の組み合わせによる影響を、DNAダメージの指標である γ H2AXと、アポトーシスの指標であるカスパーゼ3の切断(cleaved caspase 3)の発現レベルの変化として調べた。

THP-1細胞またはMV-4-11細胞を 2×10^5 cells/wellで12ウェルプレートに播種し、CO₂インキュベーターで一晩培養した。播種翌日、化合物(1)とアザシチジンまたはデシタピンをそれぞれ細胞に添加し、更に24時間インキュベートした。薬剤添加24時間後、細胞をRIPAバッファーを用いて溶解し、タンパクを回収した。抗 γ H2AX抗体および抗cleaved caspase 3抗体(Cell Signaling Technologies社)を用いて、ウエスタンブロット法にて各タンパクの発現を調べた。

図2A、図2Bに示す通り、化合物(1)存在下でDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤による γ H2AXの誘導およびカスパーゼ3の切断が促進された。このことは、化合物(1)とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の併用により、血液がんのDNAダメージおよび細胞死が促進されることを示している。

[0023] 実施例3 アポトーシスおよび細胞死誘導の評価

DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物(1)の組み合わせによるアポトーシスの誘導を調べた。

THP-1細胞を 1×10^5 cells/wellで24ウェルプレートに播種し、化合物(1)とアザシチジンをそれぞれ細胞に添加した。CO₂インキュベーターで48時間培養し、細胞を回収した。細胞懸濁液を同量のGuava Nexin REAGENT(Millipore社)と混合し、SA3800フローサイトメーター(ソニー社)にて解析した。

図3に示す通り、アザシチジン単剤と比較して化合物(1)を併用した群ではアネキシンV陽性、7-AAD陽性のアポトーシスによる死細胞の割合が顕著に増大し、二剤の間に強い併用効果があることが示された。

[0024] 実施例4 アイソボログラム法によるDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物(1)の薬剤併用効果の評価

アイソボログラム(isobologram)法は、併用する二剤が相加、相乗、拮抗作用のいずれの併用効果を示すかを評価する手法の一つである(Chou Cancer Res. 70(2):440-6(2010))。このアイソボログラム法を用いて、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物(1)の血液がん細胞に対する増殖阻害に対する併用効果を解析した。

各細胞株の単剤の細胞増殖抑制試験の結果をもとに、化合物(1)またはDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤単剤の IC_{50} 値に相当する濃度を基準として IC_{50} 値 $\times$ 1万倍濃度のDMSO溶液を作製した。二剤を1:0、5:1、3:1、1:1、1:5、0:1の6種類の比率で混合し、この混合液を最終濃度が IC_{50} 値 $\times$ 0.003倍から30倍濃度となるよう、各細胞株の細胞プレートに添加した(最終DMSO濃度0.3%)。72時間培養後、レサズリン試薬を加え、3時間後に励起波長560nm/蛍光波長590nmの蛍光を測定し、各混合比の IC_{50} 値を求めた。

単剤の IC_{50} 値と二剤の混合比から、50%増殖阻害作用を示すための化合物(1)およびDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の濃度を算出し、縦軸をDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の濃度、横軸を化合物(1)の濃度としてプロットした結果を図4に示す。

[0025] (アイソボログラムによる評価)

薬剤Aおよび薬剤Bに対し、それぞれ単独で一定の作用を示す用量を D_A 、 D_B とする。両薬物の用量-反応曲線が平行であるとき、両薬物を併用して単独投与時と同様の作用が示される用量が直線 $D_A D_B$ 上にあるならば相加作用、直線 $D_A D_B$ の左下にくるならば相乗作用、また直線 $D_A D_B$ の右上にくるときは拮抗的な反応と判別される。

本試験において、図4A、図4B、図4C、図4D、図4E、図4F、図4Gに示す通り、50%増殖阻害作用を示すための各混合比の濃度が単剤の IC_{50}

値を結ぶ直線の左下に来ることから、実施例4の結果は、本発明の化合物（I）とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との併用が強い相乗効果を有することを示している。

[0026] 実施例5 Median-effect analysisによるDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物（I）の薬剤併用効果の評価

Median-effect analysisはChouとTallalによって提唱された理論で、併用する二剤が相加、相乗、拮抗作用のいずれの併用効果を示すかを評価する手法の一つである（Chou Cancer Res., 70（2）：440-6（2010））。薬剤濃度をD、50%抑制濃度（median-effect dose）をD_m、抑制細胞率をF_a（fraction affected）、非抑制細胞率をF_u（fraction unaffected）、mを係数とすると、

$$D = D_m (F_a / F_u)^{1/m}$$

なる関係式が成立する。

併用効果の定量的指標となる併用係数C_I（combination index）は、二剤の効果の作用点が排他的な場合、併用時の薬剤Aの濃度を（D_{A+B}）_A、A単剤のx%抑制濃度を（D_x）_A、併用時の薬剤Bの濃度を（D_{A+B}）_B、B単剤のx%抑制濃度を（D_x）_Bとすると、

$$C_I = (D_{A+B})_A / (D_x)_A + (D_{A+B})_B / (D_x)_B$$

で与えられる。

[0027] C_Iは上記よりF_aの関数で表され、横軸にF_a、縦軸にC_IをプロットしたものがF_a-C_Iプロットと呼ばれる相関図である。C_Iが1未満の場合は相乗作用、1の場合は相加作用、1より大きい場合は拮抗作用を示している。実施例4のアイソボログラムの実験データを用いて、血液がん細胞におけるDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物（I）のF_a=0.5のときの併用係数C_Iを求めた。

[表3]

細胞株	アザシチジン+化合物（I） 併用係数C I
THP-1	0.66
MV-4-11	0.84
MOLM-14	0.81
TF-1	0.81

[表4]

細胞株	デシタビン+化合物（I） 併用係数C I
MV-4-11	0.36
MOLM-14	0.51
TF-1	0.78

表3および表4に示すとおり、C Iが1未満となり、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と化合物（I）の併用に強い相乗効果があることを示している。

実施例6 化合物（I）にDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤の二剤を組み合わせた三剤併用効果の評価

実施例5のChou-TalalayのMedian-effect analysisと同様な手法を用い、三剤併用時のC Iを求めた。

併用時の薬剤Aの濃度を $(D_{A+B+C})_A$ 、A単剤のx%抑制濃度を $(D_x)_A$ 、併用時の薬剤Bの濃度を $(D_{A+B+C})_B$ 、B単剤のx%抑制濃度を $(D_x)_B$ 、併用時の薬剤Cの濃度を $(D_{A+B+C})_C$ 、C単剤のx%抑制濃度を $(D_x)_C$ とすると、

$$C I = (D_{A+B+C})_A / (D_x)_A + (D_{A+B+C})_B / (D_x)_B + (D_{A+B+C})_C / (D_x)_C$$

で与えられる。

血液がん細胞におけるDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、BCL-2阻害剤および化合物（I）のFa=0.5のときの併用係数C Iを求めた。

[表5]

細胞株	アザシチジン+ベネトクラクス 併用係数 C I	アザシチジン+ベネトクラクス +化合物 (I) 併用係数 C I
MV-4-11	0.70	0.52
MOLM-14	0.75	0.63

図5および表5に示すとおり、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤とBCL-2阻害剤二剤併用時に比べて、化合物(I)にDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤とBCL-2阻害剤を組み合わせた三剤併用時のほうがC Iが小さくなり、化合物(I)にDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤とBCL-2阻害剤を組み合わせた三剤併用がより強い相乗効果を有することを示している。

実施例7 化合物(I)とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との併用における抗腫瘍効果

化合物(I)とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン、デシタピン)との薬剤併用効果を、MV-4-11細胞株のヌードマウス皮下移植モデルを用いて検討した。

(担癌モデルの作製)

試験例1と同様に培養したMV-4-11細胞を、細胞密度 2.5×10^7 個/mLになるようにマトリゲル(50%、BD社)を含むHBSS(ナカライテスク社)で調整し、移植用細胞調製液を作製した。この移植用細胞調製液0.1mLを、BALB/c Slc-nu/nuマウス(雌、5週齢、日本エスエルシー社)の背部皮下に注射した。がん細胞を移植してから20日目に担癌マウスの腫瘍体積(下記計算式参照)の平均値が近似するように群分けを行った($n=8$)。

(被験物質の投与用試料溶液の調製)

化合物(I)の2塩酸塩をフリー体換算で6mg/mLになるように、0.1M HCl/0.5%メチルセルロース溶液(溶媒A)に溶解し、化合物(I)の投与用試料溶液を作製した。

アザシチジンを0.5mg/mLになるように、5%(v/v)DMSO/

30% (w/v) PEG300水溶液 (溶媒B) に溶解し、アザシチジンの投与用試料溶液を作製した。

デシタビンを0.025 mg/mLになるように、蒸留水 (溶媒C) に溶解し、デシタビンの投与用試料溶液を作製した。

(抗腫瘍効果試験)

がん細胞を移植した各マウス (n = 7 – 8) に、アザシチジン (表6) もしくはデシタビン (表7) の各被験物質の投与スケジュールに従って、それぞれの当日の体重から求めた投与量の被験物質を、1日2回 (BID、5時間間隔以上) もしくは1日1回 (QD)、経口 (PO) もしくは腹腔内 (IP) に投与した。各マウスの腫瘍体積を以下の式を用いて算出し、抗腫瘍効果を評価した。

腫瘍体積＝長径×短径×短径×0.5

[表6]

試験群	被験物質	投与経路	投与用量 (mg/kg)	投与スケジュール
G1	溶媒B 溶媒A	IP	—	QD, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)
		PO	—	BID, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)
G2	アザシチジン 溶媒A	IP	2.5	QD, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)
		PO	—	BID, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)
G3	溶媒B 化合物 (I)	IP	—	QD, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)
		PO	60	BID, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)
G4	アザシチジン 化合物 (I)	IP	2.5	QD, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)
		PO	60	BID, D1–D19 (off: D6, D7, D13, D14)

offは休薬日を表す

[表7]

試験群	被験物質	投与経路	投与用量 (mg/kg)	投与スケジュール
G5	溶媒C	IP	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒A	PO	—	BID, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
G6	デシタピン	IP	0.25	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒A	PO	—	BID, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
G7	溶媒C	IP	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	化合物 (I)	PO	60	BID, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
G8	デシタピン	IP	0.25	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	化合物 (I)	PO	60	BID, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)

offは休業日を表す

本試験において、図6Aおよび図6Bに示す通り、化合物(I)とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(アザシチジン、デシタピン)との併用群で、腫瘍増殖が最も抑制されており、実施例7の結果は、本発明の化合物(I)とDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤との併用がインビボにおいても強い相乗効果を有することを示している。

実施例8 化合物(I)にDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤の二剤を組み合わせた三剤併用における抗腫瘍効果
三剤併用効果を、実施例7と同様にしてMV-4-11細胞株のヌードマウス皮下移植モデルを用いて検討した。

(被験物質の投与用試料溶液の調製)

化合物(I)の2塩酸塩をフリー体換算で3mg/mLになるように、0.1M HCl/0.5%メチルセルロース溶液(溶媒A)に溶解し、化合物(I)の投与用試料溶液を作製した。

アザシチジンを0.25mg/mLおよび0.125mg/mLになるように、5%(v/v)DMSO/30%(w/v)PEG300水溶液(溶媒B)に溶解し、アザシチジンの投与用試料溶液を作製した。

デシタピンを0.025mg/mLになるように、蒸留水(溶媒C)に溶解し、デシタピンの投与用試料溶液を作製した。

ベネトクラクスを0.5mg/mLおよび0.25mg/mLになるように

、5%（v/v）DMSO／50%（w/v）PEG300／5%（w/v）Tween80水溶液（溶媒D）に溶解し、ベネトクラクスの投与用試料溶液を作製した。

（抗腫瘍効果試験）

がん細胞を移植してから19日目に群分けし、がん細胞を移植した各マウス（n＝6－8）に、表8もしくは表9の各被験物質の投与スケジュールに従って、それぞれの当日の体重から求めた投与量の被験物質を、1日2回（BID、5時間間隔以上）もしくは1日1回（QD）、経口（PO）もしくは腹腔内（IP）に投与し、抗腫瘍効果を評価した。

[表8]

試験群	被験物質	投与経路	投与用量 (mg/kg)	投与スケジュール
G1	溶媒B	IP	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒D	PO	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒A	PO	—	BID, D1-D19
G2	溶媒B	IP	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒D	PO	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	化合物（I）	PO	30	BID, D1-D19
G3	アザシチジン	IP	0.625	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	ベネトクラクス	PO	5	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒A	PO	—	BID, D1-D19
G4	アザシチジン	IP	0.625	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	ベネトクラクス	PO	5	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	化合物（I）	PO	30	BID, D1-D19

offは休薬日を表す

[表9]

試験群	被験物質	投与経路	投与用量 (mg/kg)	投与スケジュール
G5	溶媒C	IP	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒D	PO	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒A	PO	—	BID, D1-D19
G6	溶媒C	IP	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒D	PO	—	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	化合物 (I)	PO	30	BID, D1-D19
G7	デシタビン	IP	0.25	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	ベネトクラクス	PO	5	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	溶媒A	PO	—	BID, D1-D19
G8	デシタビン	IP	0.25	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	ベネトクラクス	PO	5	QD, D1-D19 (off: D6, D7, D13, D14)
	化合物 (I)	PO	30	BID, D1-D19

offは休業日を表す

本試験において、図 7 A および図 7 B に示す通り、化合物 (I) と、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤および BCL-2 阻害剤との三剤併用群で、腫瘍増殖が最も抑制されており、実施例 8 の結果は、化合物 (I) と DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤および BCL-2 阻害剤との本発明の三剤併用がインビボにおいても強い相乗効果を有することを示している。

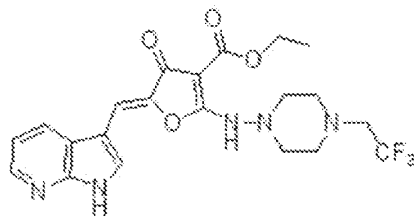
産業上の利用可能性

[0028] 本発明により、化合物 (I) および DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤の二剤を組み合わせることにより、また、化合物 (I)、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤および BCL-2 阻害剤の三剤を組み合わせることによって、血液がんに対してより高い効果の治療方法、およびその治療方法を行うための医薬組成物の組み合わせもしくはキットが提供される。

請求の範囲

- [請求項1] 血液がんの治療に使用するために、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と組み合わせて患者に投与される、化合物（I）：

[化1]



(I)

その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物。

- [請求項2] 血液がんの治療に使用するために、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤に加えて、さらにBCR-2阻害剤と組み合わせて患者に投与される、請求項1の医薬組成物。
- [請求項3] 血液がんが骨髄異形成症候群（MDS）および／または急性骨髄性白血病（AML）である、請求項1または請求項2の医薬組成物。
- [請求項4] 血液がんが骨髄異形成症候群（MDS）である、請求項1または請求項2の医薬組成物。
- [請求項5] 血液がんが急性骨髄性白血病（AML）である、請求項1または請求項2の医薬組成物。
- [請求項6] DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤がアザシチジン、その薬学的に許容される塩もしくは水和物、またはデシタビン、その薬学的に許容される塩もしくは水和物を有効成分として含む医薬組成物である、請求項1または請求項2の医薬組成物。
- [請求項7] DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤が、アザシチジン、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物である、請求項6の医薬組成物。

- [請求項8] DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤が、デシタビン、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物である、請求項6の医薬組成物。
- [請求項9] アザシチジン、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物が、化合物（I）、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物と、両方同時に、または別々に順次投与される、請求項7の医薬組成物。
- [請求項10] デシタビン、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物が、化合物（I）、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物と、両方同時に、または別々に順次投与される、請求項8の医薬組成物。
- [請求項11] BCL-2阻害剤がベネトクラクス、その薬学的に許容される塩もしくは水和物を有効成分として含む医薬組成物である、請求項2の医薬組成物。
- [請求項12] 血液がんが骨髄異形成症候群（MDS）および／または急性骨髄性白血病（AML）である、請求項9から請求項11のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項13] 血液がんが骨髄異形成症候群（MDS）である、請求項12に記載の医薬組成物。
- [請求項14] 血液がんが急性骨髄性白血病（AML）である、請求項12に記載の医薬組成物。
- [請求項15] 請求項1の組み合わせ投与に使用するための、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤および化合物（I）、その薬学的に許容される塩または水和物をそれぞれ有効成分として含む医薬組成物を含むキット。
- [請求項16] 請求項2の組み合わせ投与に使用するための、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、BCL-2阻害剤および化合物（I）、その薬学的に許容される塩または水和物をそれぞれ有効成分として含む医薬

組成物を含むキット。

- [請求項17] DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤と組み合わせて、化合物（I）、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物を患者に投与する、血液がんの治療方法。
- [請求項18] DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびBCL-2阻害剤と組み合わせて、化合物（I）、その薬学的に許容される塩または水和物を有効成分として含む医薬組成物を患者に投与する、血液がんの治療方法。
- [請求項19] 血液がんが骨髓異形成症候群（MDS）および／または急性骨髄性白血病（AML）である、請求項17または請求項18の治療方法。
- [請求項20] DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤がアザシチジン、その薬学的に許容される塩もしくは水和物；またはデシタビン、その薬学的に許容される塩もしくは水和物をそれぞれ有効成分として含む医薬組成物である、請求項17または請求項18の治療方法。
- [請求項21] BCL-2阻害剤がベネトクラクス、その薬学的に許容される塩もしくは水和物を有効成分として含む医薬組成物である、請求項18の治療方法。