

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6407504号
(P6407504)

(45) 発行日 平成30年10月17日(2018.10.17)

(24) 登録日 平成30年9月28日(2018.9.28)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 31/4709 (2006.01)	A 6 1 K 31/4709
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 23 外国語出願 (全 22 頁)

(21) 出願番号

特願2012-217359 (P2012-217359)

(22) 出願日

平成24年9月28日(2012.9.28)

(65) 公開番号

特開2014-97929 (P2014-97929A)

(43) 公開日

平成26年5月29日(2014.5.29)

審査請求日

平成27年9月24日(2015.9.24)

審判番号

不服2017-2579 (P2017-2579/J1)

審判請求日

平成29年2月22日(2017.2.22)

(31) 優先権主張番号

61/704,053

(32) 優先日

平成24年9月21日(2012.9.21)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(73) 特許権者

512253006

アログ・ファーマシューティカルズ・イン
コーポレイテッド
A r o g P h a r m a c e u t i c a l
s, I n c.アメリカ合衆国75240テキサス州ダラ
ス、エルビージェイ・フリーウェイ542
0番、スウィート410

(74) 代理人

100100158

弁理士 鮫島 瞳

(74) 代理人

100126778

弁理士 品川 永敏

(74) 代理人

100162684

弁理士 吳 英燐

最終頁に続く

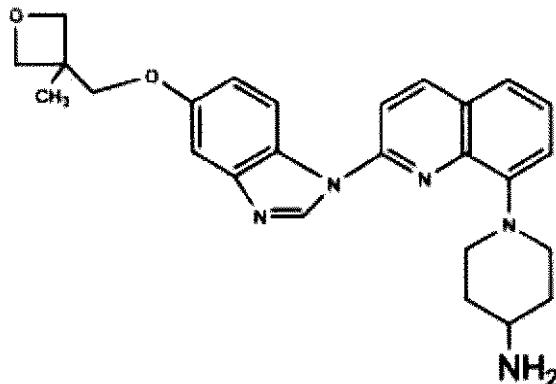
(54) 【発明の名称】恒常的に活性であるリン酸化型FLT3キナーゼの阻害方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脱制御化したFLT3チロシンキナーゼの活性または発現を阻害または低下させるための、血液系腫瘍の治療または予防用の医薬の製造における治療上または予防上の有効量の式(I)：

【化1】



10

の化合物であるクレノラニブまたはその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の使用であって、

血液系腫瘍がFLT3 - ITD変異、FLT3 - D835Y変異またはFLT3 - D8

20

35H変異の少なくとも1つのFLT3変異を有する血液系腫瘍であって、急性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病および骨髓異形成症候群からなる群から選択され、2型FLT3チロシンキナーゼ阻害剤に対し再発性または難治性であり、

医薬が1つまたはそれ以上の別の抗細胞増殖剤を用いた化学療法との組み合わせにおいて投与される、使用。

【請求項2】

治療上または予防上の有効量が1日あたり約50から500mgである、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

医薬が継続的、断続的、全身的、または局所的の少なくとも1つにより投与される、請求項1または2のいずれかに記載の使用。 10

【請求項4】

脱制御化したFLT3チロシンキナーゼが恒常的に活性な変異型FLT3チロシンキナーゼであるとさらに定義される、請求項1～3のいずれかに記載の使用。

【請求項5】

医薬が経口、静脈内、または腹腔内投与される、請求項1～4のいずれかに記載の使用。

【請求項6】

クレノラニブの医薬的に許容される塩が、クレノラニブベシル酸塩、クレノラニブリン酸塩、クレノラニブ乳酸塩、クレノラニブ塩酸塩、クレノラニブクエン酸塩、クレノラニブ酢酸塩、クレノラニブトルエンスルホン酸塩およびクレノラニブコハク酸塩の少なくとも1つである、請求項1～5のいずれかに記載の使用。 20

【請求項7】

医薬が1日3回までにおいて、またはそれ以上の回数において投与される、請求項1～6のいずれかに記載の使用。

【請求項8】

医薬が血液系腫瘍の寛解状態を維持するために、前記化学療法と連続してまたは同時のいずれかにおいて投与される、請求項1～7のいずれかに記載の使用。

【請求項9】

血液系腫瘍が小児血液系腫瘍である、請求項1～8のいずれかに記載の使用。 30

【請求項10】

2型FLT3チロシンキナーゼ阻害剤がソラフェニブ、キザルチニブ、アキシチニブ、スニチニブ、パゾパニブ、ミドスタウリンおよびレスタウルチニブからなる群から選択される少なくとも1つのチロシンキナーゼ阻害剤である、請求項1～9のいずれかに記載の使用。

【請求項11】

医薬が標準的または高用量の前記化学療法後に単剤として投与される、請求項1～10のいずれかに記載の使用。

【請求項12】

医薬が血液系腫瘍の特徴的な症状が顕在化する前に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項1～11のいずれかに記載の使用。 40

【請求項13】

血液系腫瘍の治療または予防のための、脱制御化したFLT3チロシンキナーゼの特異的阻害剤の製造における治療上または予防上の有効量のクレノラニブまたはその塩の使用であって、

血液系腫瘍がFLT3 - ITD変異、FLT3 - D835Y変異またはFLT3 - D835H変異の少なくとも1つのFLT3変異を有する血液系腫瘍であって、急性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病および骨髓異形成症候群からなる群から選択され、2型FLT3チロシンキナーゼ阻害剤に対し再発性または難治性であり、

阻害剤が1つまたはそれ以上の別の抗細胞増殖剤を用いた化学療法との組み合わせにお

50

いて投与される、使用。

【請求項 1 4】

治療上または予防上の有効量が 1 日あたり約 50 から 500 mg である、請求項 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 5】

阻害剤が継続的、断続的、全身的、または局所的の少なくとも 1 つにおいて投与される、請求項 1 3 または 1 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 1 6】

脱制御化した F L T 3 チロシンキナーゼが恒常的に活性な変異型 F L T 3 チロシンキナーゼであるとさらに定義される、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれかに記載の使用。 10

【請求項 1 7】

阻害剤が経口、静脈内、または腹腔内投与される、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 1 8】

クレノラニブの塩が、クレノラニブペルム酸塩、クレノラニブリン酸塩、クレノラニブ乳酸塩、クレノラニブ塩酸塩、クレノラニブクエン酸塩、クレノラニブ酢酸塩、クレノラニブトルエンスルホン酸塩およびクレノラニブコハク酸塩の少なくとも 1 つである、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれかに記載の使用。

【請求項 1 9】

阻害剤が 1 日 3 回までにおいて、またはそれ以上の回数において投与される、請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれかに記載の使用。 20

【請求項 2 0】

治療が、治療効果を決定するために 1 つまたはそれ以上の患者サンプルを得、血液系腫瘍が軽減または消失するまで治療を継続する段階を含む、請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 1】

阻害剤が血液系腫瘍の寛解状態を維持するために、前記化学療法と連続してまたは同時に、あるいは併用して投与される、請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 2】

血液系腫瘍が小児血液系腫瘍である、請求項 1 3 ~ 2 1 のいずれかに記載の使用。 30

【請求項 2 3】

2 型 F L T 3 チロシンキナーゼ阻害剤がソラフェニブ、キザルチニブ、アキシチニブ、スニチニブ、パゾパニブ、ミドスタウリンおよびレスタウルチニブからなる群から選択される少なくとも 1 つのチロシンキナーゼ阻害剤である、請求項 1 3 ~ 2 2 のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

なし。 40

【0002】

本発明は、細胞または対象における正常または変異型 F L T 3 のキナーゼ活性を低減または阻害する方法、ならびに F L T 3 と関連する細胞増殖性障害（複数可）の予防または治療におけるかかる方法の使用に関する。

【0003】

(連邦政府による資金提供を受けた研究の記載)

なし。

【0004】

(コンパクトディスクにより提出された援用資料)

なし。 50

【背景技術】**【0005】**

本発明の背景がプロテインキナーゼと関連して記載されるが、本発明の範囲を限定するものではない。

【0006】

プロテインキナーゼは、ヌクレオチド三リン酸（しばしば、アデノシン三リン酸（ATP））からのリン酸の転移を触媒し、アミノ酸残基セリン、スレオニンおよびチロシンの遊離ヒドロキシル基に共有結合させることにより他のタンパク質を化学的に修飾する酵素である。

【0007】

10

ヒトのタンパク質の内、約30%がキナーゼ活性により修飾される。プロテインキナーゼは、酵素活性、基質であるタンパク質の細胞内局在および主要な機能／相互作用に関連し、細胞のシグナル伝達および細胞機能の協調を制御する。

【0008】

正常または変異型プロテインキナーゼの異常な発現が数多くの疾患の形成および伝搬に高頻度で関連することが研究により示されている。研究により、プロテインキナーゼの過剰な発現または異常な発現が癌、心血管系疾患、関節リウマチ、糖尿病、癌疾患、神経障害および自己免疫疾患と関連することが示された。故に、プロテインキナーゼの活性および機能を強力に阻害する化合物の研究によりプロテインキナーゼの生理的役割に関する理解がさらに深まることになる。

20

【0009】

FMS様チロシンキナーゼ3（FLT3）遺伝子は、造血に影響することにより血液疾患および血液系腫瘍を引き起こす膜結合型受容体型チロシンキナーゼをコードする（Drexler, HG et al. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. Leukemia. 1996; 10:588-599; Gilliland, DG and JD Griffin. The roles of FLT3 in hematopoiesis and Leukemia. Blood. 2002;100:1532-1542; Stirewalt, DL and JP Radich. The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. Nat Rev Cancer. 2003;3:650-665を参照）。FLT3受容体型チロシンキナーゼの活性化は、造血前駆細胞および幹細胞で発現されるFLT3受容体（Stem cell tyrosine kinase-1 (STK-1) および fetal liver kinase-2 (flk-2)としても知られる）へのFLT3リガンド（FLT3L）の結合により開始される。

30

【0010】

FLT3は血液系腫瘍において最も頻繁に変異が見られる（現在のところ、成人の急性骨髓性白血病（AML）の約30%）遺伝子である（Nakao M, S Yokota and T Iwai. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia. 1996;10:1911-1918; H Kiyoi, M Towatari and S Yokota. Internal Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation, which causes constitutive activation of the product. Leukemia.1998;12:1333-1337;PD Kottaridis, RE Gale, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood. 2001;98:1742-1759; Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood. 2001;97:2434-2439; Thiede C, C Steudel, Mohr B. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood. 2002;99:4326-4335を参照）。FLT3の変異は骨髓異形成症候群（MDS）の中程度のおよび高いリスクを有すると診断される患者の約2%において検出されている（S Bains, Luthra R, Medeiros LJ and Zuo Z. FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes:

40

50

Frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid leukemia. American Journal of Clinical Pathology. January 2011;135:62-69;PK Bhamidipati, Daver NG, Kantarjian H, et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndromes(MDS) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). 2012. Journal of Clinical Oncology. Suppl; abstract 6597 を参照）。MDSと同様に、急性前骨髓球性白血病（APL）患者でFLT3の変異を有する患者数は少ない。最もよく見られるFLT3の変異は、FLT3受容体の膜近傍ドメイン内におけるインフレーム挿入を引き起こす遺伝子内縦列重複（ITD）である。FLT3 - ITD変異は成人のAML患者の15 - 35 %で報告されている（Nakao M, S Yokota and T Iwai. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia. 1996;10:1911-1918; H Kiyoi, M Toyotomi and S Yokota. Internal Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation, which causes constitutive activation of the product. Leukemia. 1998;12:1333-1337; H Kiyoi, T Naoe and S Yokota. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). Leukemia. 1997;11:1447-1452; S Schnittger, C Schoch and M Duga. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood. 2002;100:59-66 を参照）。FLT3 - ITD変異は患者の予後不良の独立予測因子であり、標準的な化学療法後の再発のリスクの増大、ならびに無病生存率および全生存の減少と相關する（FM Abu-Duhier, Gooodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high risk group. British Journal of Haematology. 2000;111:190-195; H Kiyoi, T Naoe, Y Nakano, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood. 1999;93:3074-3080 を参照）。FLT3受容体の活性化ループ内で生じるFLT3の点変異はより発生頻度の低いものである。最も頻繁に影響されるコドンはアスパラギン酸835（D835）である。D835残基の核酸の置換は成人急性骨髓性白血病患者の約5 - 10 %で発生する（DL Stirewalt and JP Radich. The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. Nature Reviews Cancer. 2003;3:650-665; Y Yamamoto, H Kiyoi and Y Nakano, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematological malignancies. Blood. 2001;97:2434-2439; C Thiede, Steudal C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood. 2002;99:4326-4335; U Bacher, Haferlach C, W Kern, et al. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients. Blood. 2008;111:2527-2537 を参照）。

【0011】

成人AMLにおいて恒常に活性である変異型FLT3が非常に高頻度で見られることにより、FLT3遺伝子はこのタイプの腫瘍における非常に魅力的な薬剤標的となった。異なる強度および標的選択性を有するいくつかのFLT3阻害剤について、AML患者における研究および試験が行われてきたか、あるいは現在進行中である。T Kindler, Lipka DB, and Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. Blood. 2010;116:5089-102を参照されたい。

【0012】

技術分野で周知のFLT3キナーゼ阻害剤は、レスタウルチニブ（CEP 701としても知られ、以前はKT-555（Kyowa HakkoがCephalonにライセンスを供与）としても知られる）；CHIR-258（Chiron Corp.）；EB10およびIMC-EB10（ImClone Systems Inc.）；ミドスタウリン（PKC412（Novartis AG）としても知られる）；タンザチニブ（MLN-518としても知られ、以前はMillennium Pharmaceuticals Inc.にライセンス供与されたCT53518（COR Ther

apeutics Inc.) としても知られる) ; スニチニブ (SU11248 (Pfizer USA) としても知られる) ; キザルチニブ (AC220 (Ambit Biosciences) としても知られる) ; XL 999 (Exelixis USA、Symphony Evolution, Inc. にライセンス供与) ; GTP 14564 (Merck Biosciences UK) ; AG1295 および AG1296 ; CEP-5214 および CEP-7055 (Cephalon) を含む。以下の PCT 国際出願および米国特許出願は、FLT3 のモジュレーターを含むさらなるキナーゼのモジュレーターを開示する : WO 2002032861, WO 2002092599, WO 2003035009, WO 2003024931, WO 2003037347, WO 2003057690, WO 2003099771, WO 2004005281, WO 2004016597, WO 2004018419, WO 2004039782, WO 2004043389, WO 2004046120, WO 2004058749, WO 2004058749, WO 2003024969 および米国公開番号第20040049032号。Levis M, KF Tse, et al. 2001 「A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations.」 Blood 98(3): 885-887; Tse K F, et al., Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. Leukemia. July 2001; 15 (7): 1001-1010; Smith, B. Douglas et al., Singlet agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia Blood, May 2004; 103: 3669-3676; Griswold, Ian J. et al., Effects of MLN518, A Dual FLT3 and KIT Inhibitor, on Normal and Malignant Hematopoiesis. Blood, Nov 2004; 104 (9): 2912-2918 [Epub ahead of print Jul 8]; Yee, Kevin W.H. et al., SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. Blood, Oct 2002; 100(8): 2941-2949. O'Farrell, Anne-Marie et al., SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. Blood, May 2003; 101(9): 3597-3605; Stone, R. M et al., PKC-412 FLT3 inhibitor therapy in AML: results of a phase II trials. Ann. Hematol. 2004; 83 Suppl 1:S89-90; and Murata, K. et al., Selective cytotoxic mechanism of GTP-14564, a novel tyrosine kinase inhibitor in leukemia cells expressing a constitutively active Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3). J Biol Chem. Aug. 29, 2003; 278 (35): 32892-32898 [Epub 2003 Jun 18]; Levis, Mark et al., Small Molecule FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors. Current Pharmaceutical Design, 2004, 10, 1183-1193 も参照されたい。

【0013】

FLT3 阻害剤は 1 型および 2 型に分類される。これらの 2 つの分類は、リン酸化および非リン酸化受容体サイトへの結合の相対的な親和性およびメカニズムに基づくものである。1 型阻害剤はキナーゼの活性な構造を認識する。この構造はリン酸基転移につながるものである。一般的に、1 型阻害剤はヘテロ環式環系を含む。Liu, Y and N Gray. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. Nature Chem. Biol. 2006;2:358-354 を参照されたい。1 型 FLT3 阻害剤の例は、例えば、クレノラニブおよびミドスタウリンである。A Ramachandran, Marshall H and Jain V. Crenolanib, a novel type I, mutant specific inhibitor of class III receptor tyrosine kinases, preferentially binds to phosphorylated kinases. Cancer Res. 2012;72 (8 supplement): 368; J Cools, et al. Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. Cancer Res. 2004;64:6385-6389 を参照されたい。受容体型チロシンキナーゼのキナーゼ部位を恒常的にリン酸化された状態に維持するような抵抗性の変異は、リン酸化されたキナーゼにより高い親和性を有する 1 型阻害剤に感受性がある。

【0014】

逆に、2 型阻害剤はキナーゼの不活性な構造への結合に選択的である。この構造は、一般的には、そのモチーフの再配置により「DFG - out」と呼ばれる (J Zhang, Yang PL, and Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer. 2009;9:28-39 を参照)。イマチニブ、ソラフェニブおよびニロチニブといった阻害剤は 2 型の構造に結合する (PW Manley, Cowan-Jacob SW, Mestan J. Advances in

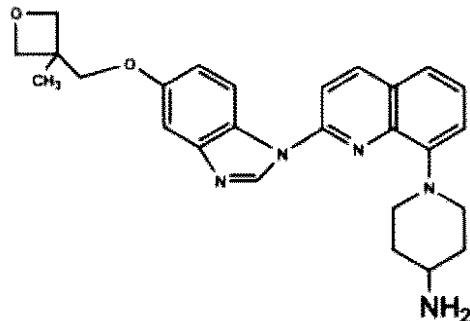
the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. Biochim. Biophys. Acta. 2005;1754:3-13; PT Wan, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell. 2004;116:855-867 を参照）。2型阻害剤に抵抗性の変異は、受容体型チロシンキナーゼのキナーゼドメインを恒常にリン酸化された状態に維持するような変異である。リン酸化されたキナーゼを標的とした1型阻害剤は2型阻害剤による治療から生じる抵抗性を克服することができ、故に、これらの抵抗性変異を有する疾患の治療に使用できる可能性を有する。

【発明の概要】

【0015】

増殖性疾患に罹患している対象において脱制御化したFLT3チロシンキナーゼの活性または発現を阻害または低下させる方法であって、増殖性疾患に罹患している対象またはその疑いがある対象に治療上または予防上の有効量の式(I)：

【化1】



10

20

の化合物またはその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を投与することを特徴とする方法を包含する。一態様において、増殖性疾患は、白血病、骨髄腫、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群、特発性好酸球增多症候群(HES)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、CNS癌、大腸癌、食道癌、頭頸部癌、肝臓癌、肺癌、上咽頭癌、神経内分泌癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、唾液腺癌、小細胞性肺癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、および血液系腫瘍の少なくとも1つから選択される。別の一態様において、治療上および予防上の有効量は、1日あたり約50から500mgである。別の一態様において、該化合物は、継続的、断続的、全身的、または局所的の少なくとも1つにおいて投与される。別の一態様において、脱制御化したFLT3は恒常に活性な変異型FLT3であるとさらに定義される。別の一態様において、該化合物は経口、静脈内または腹腔内投与される。別の一態様において、クレノラニブは、クレノラニブベシル酸塩、クレノラニブリニ酸塩、クレノラニブ乳酸塩、クレノラニブ塩酸塩、クレノラニブクエン酸塩、クレノラニブ酢酸塩、クレノラニブトルエンスルホン酸塩およびクレノラニブコハク酸塩である。別の一態様において、FLT3は、FLT3-ITD、FLT3-TKD、FLT3-D835Y、FLT3-D835H、FLT3-K663Q、またはFLT3-R834Qの少なくとも1つである。別の一態様において、該対象が増殖性疾患の治療を必要とする限り、治療上または予防上の有効量の化合物が1日3回までにおいて、またはそれ以上の回数において投与される。別の一態様において、既存の患者または再発性/難治性増殖性疾患患者の寛解状態を維持するために、組成物は、新たに増殖性疾患であると診断された患者における別の医薬品と連続してまたは同時の少なくとも1つにおいて投与される。別の一態様において、既存の患者または再発性/難治性増殖性疾患患者の寛解状態を維持するために、該化合物は単剤として、または新たに増殖性疾患であると診断された患者における別の医薬品との組み合わせにおいて投与される。別の一態様において該患者は2型チロシンキナーゼ阻害剤に対し再発性/難治性である。別の実施態様において、本発明は、治療上の有効量のクレノラニブまたはその塩を患者に投与することを特徴とする増殖性疾患患者の治疗方法であって、細胞増殖性障害が脱制御化したFLT3受容体型チロシンキナーゼ活性で特徴付けられ、増殖性疾患が白血病、骨髄腫、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候

30

40

50

群、特発性好酸球增多症候群（H E S）、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、C N S 癌、大腸癌、食道癌、頭頸部癌、肝臓癌、肺癌、上咽頭癌、神経内分泌癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、唾液腺癌、小細胞性肺癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、および血液系腫瘍の少なくとも1つから選択される方法を包含する。別の一態様において、該化合物は経口、静脈内、または腹腔内投与される。別の一態様において、クレノラニブは、クレノラニブベシル酸塩、クレノラニブリン酸塩、クレノラニブ乳酸塩、クレノラニブ塩酸塩、クレノラニブクエン酸塩、クレノラニブ酢酸塩、クレノラニブトルエンスルホン酸塩およびクレノラニブコハク酸塩である。別の一態様において、F L T 3 は、F L T - I T D、F L T - T K D、F L T 3 - D 8 3 5 Y、F L T 3 - D 8 3 5 H、F L T 3 - K 6 6 3 Q、またはF L T - R 8 3 4 Q の少なくとも1つである。別の一態様において、既存の患者または再発性／難治性増殖性疾患患者の寛解状態を維持するために、クレノラニブは、新たに増殖性疾患であると診断された患者における化学療法、放射線療法または外科手術と連続してまたは同時の少なくとも1つにおいて投与される。別の一態様において、増殖性疾患小児患者を治療するために、クレノラニブは単剤として、または化学療法、放射線療法もしくは外科手術との組み合わせにおいて投与される。別の一態様において、新たに増殖性疾患と診断された患者において、クレノラニブは、標準的な導入療法または高用量の導入療法の少なくとも1つの後に単剤として投与される。別の一態様において、標準的または高用量の化学療法、放射線療法または外科手術後に難治性または再発性である増殖性疾患患者を治療するためにクレノラニブは単剤として投与される。別の一態様において、該患者は、ソラフェニブ、キザルチニブ、アキシチニブ、スニチニブ、パゾパニブ、ミドスタウリンまたはレスタウルチニブを含む少なくとも1つの別のチロシンキナーゼ阻害剤に対し再発性／難治性である。
10

別の一実施態様において、本発明は、白血病患者の治療方法であって、白血病の疑いを有する患者からサンプルを得；該患者サンプルから該患者が脱制御化したF L T 3 受容体型チロシンキナーゼを有していることを決定し；該患者に治療上の有効量のクレノラニブまたはその塩を投与することを特徴とし、該白血病が脱制御化したF L T 3 受容体型チロシンキナーゼ活性で特徴付けられるものである方法を包含する。

別の一実施態様において、本発明は、脱制御化した受容体型チロシンキナーゼを特異的に阻害する方法であって、患者サンプルを得てどの受容体型チロシンキナーゼが脱制御化したかを決定し；哺乳類に治療上の有効量のクレノラニブまたはその塩を投与することを特徴とし、脱制御化した受容体型チロシンキナーゼがF L T 3 受容体型チロシンキナーゼである方法を包含する。一態様において、治療上の有効量のクレノラニブまたはその塩はc - k i t の活性をその生理的活性が阻害されるほどダウンレギュレートしない量において投与される。別の一態様において、増殖性疾患は白血病、骨髄腫、骨髄増殖性疾患、骨髓異形成症候群、特発性好酸球增多症候群（H E S）、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、C N S 癌、大腸癌、食道癌、頭頸部癌、肝臓癌、肺癌、上咽頭癌、神経内分泌癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、唾液腺癌、小細胞性肺癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、および血液系腫瘍の少なくとも1つから選択される。別の一態様において、治療上または予防上の有効量は、1日あたり約50から500mgである。別の一態様において、該化合物は継続的、断続的、全身的、または局所的の少なくとも1つにおいて投与される。別の一態様において、脱制御化したF L T 3 は恒常に活性な変異型F L T 3 であるとさらに定義される。別の一態様において、該化合物は経口、静脈内、または腹腔内投与される。別の一態様において、クレノラニブは、クレノラニブベシル酸塩、クレノラニブリン酸塩、クレノラニブ乳酸塩、クレノラニブ塩酸塩、クレノラニブクエン酸塩、クレノラニブ酢酸塩、クレノラニブトルエンスルホン酸塩およびクレノラニブコハク酸塩である。別の一態様において、F L T 3 は、F L T - I T D、F L T - T K D、F L T 3 - D 8 3 5 Y、F L T 3 - D 8 3 5 H、F L T 3 - K 6 6 3 Q、またはF L T - R 8 3 4 Q の少なくとも1つである。別の一態様において、該対象が増殖性疾患の治療を必要とする限り、治療上または予防上の有効量の化合物は1日3回までにおいて、またはそれ以上の回数において投与される。一態様において、該患者は治療を提供され、さらに、治療効果を決定
20
30
40
50

するために1つまたはそれ以上の患者サンプルを得、増殖性疾患が軽減または消失するまで治療が継続される。別の一態様において、既存の患者または再発性／難治性増殖性疾患患者の寛解状態を維持するために、該化合物は、新たに増殖性疾患であると診断された患者における別の医薬品と連続してまたは同時の少なくとも1つにおいて投与される。別の一態様において、新たに増殖性疾患であると診断された患者に、寛解状態を維持するために、または再発性／難治性増殖性疾患患者に、本発明の化合物は単剤として、または別の医薬品との組み合わせにおいて投与される。別の一態様において、既存の小児患者または再発性／難治性増殖性疾患小児患者の寛解状態を維持するために、本発明の化合物は単剤として、または新たに増殖性疾患であると診断された小児患者における化学療法、放射線療法もしくは外科手術との組み合わせにおいて投与される。別の一態様において、該患者は2型チロシンキナーゼ阻害剤に対し再発性／難治性である。

別の一実施態様において、本発明は、癌患者の治療方法であって、癌である疑いのある患者からサンプルを得；該患者が2型プロテインチロシンキナーゼ阻害剤に抵抗性を有するようになるかどうかを決定し；2型プロテインチロシンキナーゼ阻害剤に対する抵抗性を克服するために治療上の有効量のクレノラニブまたはその塩を投与することを特徴とする方法を包含する。別の一態様において、クレノラニブまたはその塩の治療上の有効量は薬剤投与後において生理的なレベルのc - k i t キナーゼを阻害することがない。

【0016】

本発明は、細胞または対象においてFLT3のキナーゼ活性を低減または阻害する方法、ならびにFLT3が関連する細胞増殖性障害（複数可）の予防または治療のためのかかる方法の使用を提供する。本発明の他の特性および長所は以下の詳細な説明および特許請求項から明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

本発明の特性および長所をより完全に理解するため、付属の図面を用いた本発明の詳細な説明に関する言及がこれより為される。

【0018】

【図1】は、FLT3、PDGFR α 、PDGFR β 、CSF1RおよびKITを含むクラス3受容体型チロシンキナーゼに対する本発明のベシル酸塩の特異性を示す。

【0019】

【図2】は、非自己阻害型および自己阻害型のFLT3に対する本発明のベシル酸塩の親和性を示す（左側のパネル：非自己阻害型FLT3；右側のパネル：自己阻害型FLT3）。

【0020】

【図3】は、他のFLT3チロシンキナーゼ阻害剤と比較して、野生型FLT3に対する本発明のベシル酸塩の結合定数を示す。

【0021】

【図4】は、他のFLT3チロシンキナーゼ阻害剤と比較して、恒常的に活性なFLT3-ITD変異体に対する本発明のベシル酸塩の結合定数を示す。

【0022】

【図5】は、他のFLT3チロシンキナーゼ阻害剤と比較して、恒常的に活性なFLT3-D835Y変異体に対する本発明のベシル酸塩の結合定数を示す。

【0023】

【図6】は、他のFLT3チロシンキナーゼ阻害剤と比較して、恒常的に活性なFLT3-D835H変異体に対する本発明のベシル酸塩の結合定数を示す。

【0024】

【図7】は、リン酸化ABL1、非リン酸化ABL1、リン酸化ABL1(T315I)および非リン酸化ABL1(T315I)に対する本発明のベシル酸塩の結合定数を示す。

【0025】

10

20

30

40

50

(発明の詳細な説明)

以下において本発明の様々な実施態様の製造および使用が詳細に記載されるが、本発明は広範な種々の特定の関連分野において実施できる多くの適用可能な発明概念を提供するものであることは当然である。本明細書中で議論される特定の実施態様は本発明の製造および使用の具体的な方法を説明することのみを目的とするものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0026】

本発明の理解を促すため、多くの用語を以下に定義する。本明細書中で定義される用語は、本発明の関連分野の当業者に一般的に理解されるような意味を有する。「a」、「an」および「the」といった用語は単数形のみを意味すると意図されるものではなく、説明に用いられ得る具体的な例の一般的クラスを包含する。専門用語は本発明の特定の実施態様を記載するために本明細書中で用いられるが、それらの使用は、特許請求項で説明される場合を除き、本発明を限定するものではない。10

【0027】

本発明は、細胞または対象においてFLT3キナーゼ活性を阻害するため、あるいは対象におけるFLT3キナーゼの活性または発現が関連する障害を治療するための本発明の化合物の使用を包含する。

【0028】

この態様の一実施態様において、本発明は、本発明の化合物を用いて細胞に接触する段階を特徴とする、細胞におけるFLT3のキナーゼ活性の低減または阻害方法を提供する。本発明はまた、本発明の化合物を対象に投与する段階を特徴とする、対象におけるFLT3のキナーゼ活性の低減または阻害方法を提供する。本発明はさらに、本発明の化合物を用いて細胞に接触することを特徴とする、細胞における細胞増殖の阻害方法を提供する。20

【0029】

用語「対象」は、哺乳類またはヒトといった動物を意味し、治療、観察または実験の対象物である。

【0030】

用語「接触する」は、本発明の化合物またはその医薬的に許容される塩が細胞により取り込まれるよう該化合物を細胞に添加することを意味する。30

【0031】

この態様の別の実施態様において、本発明は、FLT3のキナーゼ活性の異常により促進される細胞増殖性障害を発症するリスクのある、または発症しやすい状況にある対象を治療するための予防および治療方法を提供する。1つの例において、本発明は、本発明の化合物を含む予防上の有効量の医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、FLT3が関連する細胞増殖性障害の予防方法を提供する。該予防剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいは、その進行が遅延されるように、FLT3が促進する細胞増殖性障害の特徴的な症状が顕在化する前に行うことができる。

【0032】

用語「予防上の有効量」は、障害の発症を、研究者、獣医師、医師または他の臨床家に求められるように阻害または遅延する活性化合物または医薬的塩の量を意味する。40

【0033】

用語「治療上の有効量」は、本明細書中で用いられるように、獣医師、医師または他の臨床家に求められるような、例えば、治療対象の疾患または障害の症状の緩和のような生物学的または医学的応答を誘起する活性化合物またはその塩の量を意味する。

【0034】

本発明の化合物を含む医薬組成物の治療上および予防上の有効量を決定する方法は技術分野で周知である。

【0035】

本明細書中で用いられるように、用語「組成物」は、特定の成分を特定の量において含50

有する製剤、ならびに特定の量における特定の成分の組み合わせから直接もしくは間接的に得られる任意の製剤を包含する。

【0036】

本明細書中で用いられるように、用語「F LT 3 が関連する障害」、または「F LT 3 受容体が関連する障害」、または「F LT 3 により促進される細胞増殖性障害」は、F LT 3 活性、例えばF LT 3 の恒常的な活性化を引き起こす突然変異が関連または関係する疾患を包含する。「F LT 3 が関連する障害」の例は、F LT 3 の突然変異によるF LT 3 の過剰な刺激から引き起こされる障害、またはF LT 3 における異常に高い量の突然変異によるF LT 3 の異常に高い活性化により引き起こされる障害である。F LT 3 の過剰な活性は以下に列挙される細胞増殖性障害、腫瘍性障害および癌を含む多くの疾患の病因に関与することが知られている。10

【0037】

用語「細胞増殖性障害」は、多細胞性生物に対し有害となる（即ち、不快にする、または平均寿命を低下させる）ような多細胞性生物における1つまたはそれ以上のサブセットの細胞の過剰な増殖を意味する。細胞増殖性障害は様々な種類の動物およびヒトにおいて起こり得る。本明細書中で用いられるように、「細胞増殖性障害」は腫瘍性障害を含む。

【0038】

用語「腫瘍性障害」は、本明細書中で用いられるように、異常または制御不能な細胞増殖により引き起こされる腫瘍を意味する。腫瘍性障害の例は、例えば、限定されないが、以下の障害である：血小板減少症、本態性血小板増加症(ET)、原発性骨髄線維症、骨髄線維症(MF)、骨髄化生を伴う骨髄硬化症(MMM)、慢性特発性骨髄線維症(UIMF)、および真性赤血球増加症(PV)などの骨髄増殖性障害、血球減少症、ならびに前癌性骨髄異形成症候群；神経膠腫、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌などの癌、ならびに脊髄形成異常症、多発性骨髄腫、白血病、およびリンパ腫を含む血液系腫瘍である。血液系腫瘍の例は、例えば、白血病、リンパ腫、ホジキン病、および骨髄腫である。さらに、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、急性前骨髄球性白血病(APL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性好中球性白血病(CNL)、急性未分化白血病(AUL)、分化大細胞型リンパ腫(ALCL)、前リンパ球性白血病(PML)、若年性骨髄単球性白血病(JMML)、成人T細胞白血病リンパ腫、骨髄異形成を伴う急性骨髄性白血病(AMLITMDS)、混合型白血病(MLL)、骨髄異形成症候群(MDS)、骨髄増殖性疾患(MPD)、および多発性骨髄腫(MM)も含まれる。2030

【0039】

さらなる実施態様において、対象におけるF LT 3 が関連する細胞増殖性障害を治療するまたはその発症を阻害するために、本発明は併用療法として他の療法と組み合わせることができる。併用療法は、予防上または治療上の有効量の本発明の化合物および1つまたはそれ以上の別の抗細胞増殖療法、例えば、限定されないが、化学療法および放射線療法の投与を特徴とする。

【0040】

本発明の実施態様の1つにおいて、本発明の化合物は化学療法と組み合わせて投与されてもよい。本明細書中で用いられるように、化学療法は化学療法薬が関与する療法を意味する。様々な化学療法薬が本発明と組み合わせて用いることができる。例示のみを目的とするものだが、タキセン化合物、特にドセタキセルは、75mg / 平方メートル(体表)(mg / m²)の用量において本発明の化合物と組み合わせて安全に投与することができる。40

【0041】

化学療法は当業者に周知のものである。化学療法の適当な用量およびスキームは、該化学療法が他の療法と組み合わせて、あるいは単独で用いられている臨床治療において既に用いられているものと同様のものである。

【0042】

本発明の別の一実施態様において、本発明の化合物は放射線療法と組み合わせて投与されてもよい。本明細書中で用いられるように、「放射線療法」は、対象を放射線に曝露することを特徴とする。放射線療法は当業者に周知のものである。放射線療法の適当な用量およびスキームは、該放射線療法が他の療法と組み合わせて、あるいは単独で用いられている臨床治療において既に用いられているものと同様のものである。

【0043】

本発明の別の一実施態様において、本発明の化合物は、分子標的治療と組み合わせて投与されてもよい。本明細書中で用いられるように、「分子標的治療」は、腫瘍増殖または癌化シグナリングに関わる特定のクラスのタンパク質を標的とした療法である。例えば、血管内皮増殖因子に対するチロシンキナーゼ阻害剤が癌の治療に用いられる。

10

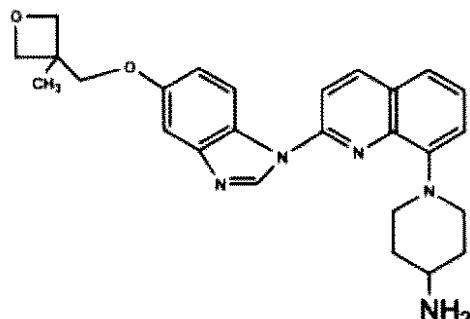
【0044】

本発明はまた、本発明の化合物に加えた第2の医薬品の使用を含む方法を包含し、これら2つは同時または連続して（どちらの順序でもよい）投与されてもよい。

【0045】

一態様において、式(I)：

【化2】



20

を有する本発明の化合物またはその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物が治療上もしくは予防上の有効量において増殖性疾患に対して用いられる（ここで、増殖性疾患は、白血病、骨髄腫、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群、特発性好酸球增多症候群（HES）、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、CNS癌、大腸癌、食道癌、頭頸部癌、肝臓癌、肺癌、上咽頭癌、神経内分泌癌、卵巣癌、肺腺癌、前立腺癌、腎癌、唾液腺癌、小細胞性肺癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、および血液系腫瘍の少なくとも1つから選択される）。

30

【0046】

医薬的に許容される塩は、例えば、塩酸塩、リン酸塩および乳酸塩であり、ベンゼンスルホン酸塩と同様にして製造され、当業者に周知である。

【0047】

本発明の化合物は、対象に全身的に、例えば、経口、静脈内、皮下、筋肉内、経皮または非局所投与されてもよい。本発明の化合物はまた、対象に局所的に投与することもできる。

40

【0048】

本発明の化合物は、所望の範囲の時間内において本発明の化合物と標的の組織の接触を維持することを目的とした徐放性または即放性の製剤に製剤化されてもよい。

【0049】

経口投与に適した組成物は、丸剤、錠剤、カプレット剤、カプセル剤、顆粒および散剤といった固形剤形、溶液、乳剤および懸濁液といった液体剤形である。非経口投与に有用な剤形は、滅菌溶液、乳剤および懸濁液である。

【0050】

本発明の化合物の1日投与量は、成人1日あたり50から500mgの広い範囲で異なる。経口投与では、組成物は好ましくは20および100ミリグラムを含む錠剤の剤形において提供される。本発明の化合物は1日あたり3回まで、またはそれ以上のレジメンに

50

より投与されてもよい。好ましくは1日3回である。至適用量は当業者により決定されてもよく、用いられる本発明の化合物、投与経路、投与時間、製剤の強度、疾患状態の詳細により異なるであろう。患者の特性に関連する因子、例えば、年齢、体重、および食事が用量調節の際に考慮されるであろう。

【0051】

本発明の化合物の製造

式(I)の化合物の製造に言及し得る一般的な合成方法は、米国特許番号第5,990,146号(1999年11月23日刊行)(Warner-Lambert Co.)およびPCT公開公報第WO 99/16755号(1999年4月8日刊行)(Merck & Co.)、WO 01/40217号(2001年7月7日刊行)(Pfizer, Inc.)、米国特許出願番号第US 2005/0124599号(Pfizer, Inc.)および米国特許番号第7,183,414号(Pfizer, Inc.)で提供され、関連する部分を引用により本明細書中に取り込む。

【0052】

塩酸塩、リン酸塩および乳酸塩といった医薬的に許容される塩はベンゼンスルホン酸塩と同様の方法により製造され、当業者に周知のものである。以下の代表的な本発明の化合物は例示のみが目的のものであり、本発明を限定するものではない：クレノラニブとしてのクレノラニブペシル酸塩、クレノラニブリン酸塩、クレノラニブ乳酸塩、クレノラニブ塩酸塩、クレノラニブクエン酸塩、クレノラニブ酢酸塩、クレノラニブトルエンスルホン酸塩およびクレノラニブコハク酸塩。

【0053】

生物学的活性

【0054】

インビトロアッセイ

以下の代表的なインビトロアッセイは、本発明におけるFLT3の生物学的活性を決定するために行われた。これらは本発明を説明するためにのみ提供されるものであり、限定するためのものではない。

【0055】

野生型および変異型FLT3酵素活性の阻害ならびにリン酸化型FLT3の阻害の特異性は、FLT3酵素ならびにFLT3活性に依存する細胞プロセスの特異的な阻害を反映するものである。本明細書中で示される全ての例は、有意かつ特異的なFLT3キナーゼおよびFLT3依存的な細胞プロセスの阻害を示す。

【0056】

競合的結合アッセイ

本発明の活性をインビトロにおけるキナーゼアッセイで決定した。ヒトFLT3受容体のキナーゼドメインの阻害はKINOMEScan Kdetectアッセイプロトコルを用いて行った。KINOMEScanプラットフォームはハイスループット競合的結合テクノロジーを用いたものである。アッセイは、DNAでタグ標識したキナーゼ、固相化したリガンド、および本発明の化合物を組み合わせることにより行った。本発明の化合物の固相化リガンドとの競合能はDNAタグの定量的PCRにより測定した。競合的結合アッセイは、96種類のヒトのプロテインキナーゼのパネルについて本発明の化合物を評価するために用いられた。

【0057】

キナーゼでタグしたT7ファージ株を24ウェルのブロックにおいてBL21株由来のE.coli宿主と並行して増殖させた。E.coliを対数期に増殖させ、冷凍したストックからT7ファージに感染させ、溶菌まで32で振盪してインキュベートした。次いで、溶菌液を遠心し、濾過した。残りのキナーゼはHEK-293細胞で産生させ、定量的PCRで検出するためにDNAでタグ標識した。キナーゼアッセイ用のアフィニティ樹脂は、ストレプトアビシンでコートした磁性ビーズをビオチン化した低分子リガンドで室温において30秒間処理することにより作製した。非特異的なファージの結合を減少させるため、リガンドを結合させたビーズを過剰なビオチンでブロッキングし、Sea Block、1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.05%Tween 20、1mMジチオスレ

10

20

30

40

50

イトール(D T T)を含むブロッキングバッファーで洗浄した。本発明の 11 点の 3 倍段階希釈液を 40 × ストック / 100 % ジメチルスルホキシド(D M S O)を調製し、アッセイで直接 1 × に希釈した。

【 0058 】

結合反応は、リガンドを結合させたアフィニティビーズ、キナーゼおよび本発明の化合物を 1 × 結合バッファー(20 % Sea Block、0.17 リン酸緩衝生理食塩水(P B S)、0.05 % Tween 20 、 6 mM D T T 含有) 中で混合することにより開始した。全ての反応は、ポリプロピレン 384 ウェルプレート内において最終体積 0.04 mL で行われた。プレートを室温で振盪しながら 1 時間インキュベートした。アフィニティビーズを 1 × P B S および 0.05 % Tween 20 バッファーで洗浄し、溶出バッファー(1 × P B S 、 0.05 % Tween 20 、 0.5 μM 非ビオチン化アフィニティーリガンド含有) で再懸濁した。再懸濁後、アフィニティビーズを室温で振盪しながらインキュベートした。溶出されたキナーゼの濃度を定量的 P C R により測定した。

【 0059 】

結合定数(K d)はスタンダードの用量応答曲線から H i l l の方程式を用いて算出した。非線形最小二乗近似を用いて曲線を Levenberg-Marquardt アルゴリズムにフィッティングした。本発明の K d を D M S O ネガティブコントロールおよびポジティブコントロール化合物のものと比較した。本発明の結合親和性は化合物プロフィール可視化相互作用マップ、 T R E E s p o t を用いて可視化した。

【 0060 】

直接酵素リン酸化アッセイ

Millipore Kinase IC50 Profiler Assay を用いて野生型 F L T 3 および変異型 F L T 3 キナーゼのパネルに対する本発明のスクリーニングを行った。両方のキナーゼのアッセイでは、 F L T 3 酵素を 8 mM の 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(M O P S)(pH 7.0)、 0.2 mM エチレンジアミンテトラ酢酸(E D T A)、 50 μM 合成 A b 1 ペプチド基質 E A I Y A A P F A K K K 、 10 mM 酢酸マグネシウムおよび [-33 P - A T P] と共にインキュベートした。反応は M g A T p 混合物の添加により開始した。該反応混合物を室温で 40 分間インキュベートし、 3 % リン酸溶液の添加により停止させた。 10 μL の反応溶液を P 3 フィルターマットにスポットし、 75 mM リン酸で 5 分間、 3 回洗浄し、次いでメタノールで 1 回洗浄し、乾燥し、シンチレーション測定を行った。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールを含む各複製のシンチレーション値を X L F i t (バージョン 5.1) で解析し、野生型および変異型 F L T 3 に対する本発明の I C 50 値を算出した。

【 0061 】

野生型 F L T 3 の生物学的データ

野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩の活性を図 3 に示す。全ての結合定数はナノモル濃度で表示される。図 3 において、野生型 F L T 3 に対する本発明の活性を技術分野で周知の他の阻害剤と比較した。 Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, et al. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnol 2011;29:1046-51 を参照されたい。本発明のベシル酸塩の結合定数(K d)は 0.74 nM であった。野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤 A S T - 487 の K d を比較した場合、本発明のベシル酸塩は野生型 F L T 3 に対し A S T - 487 (K d = 0.79 nM) の等倍の親和性を有していた。野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤キザルチニブの K d を比較した場合、本発明のベシル酸塩は野生型 F L T 3 に対しキザルチニブ(K d = 1.3 nM) の 2 倍の親和性を有していた。野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤 M L N - 518 の K d を比較した場合、本発明のベシル酸塩は野生型 F L T 3 に対し M L N - 518 (K d = 3 nM) の 4 倍の親和性を有していた。野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤レスタウルチニブの K d を比較した場合、本発明のベシル酸塩は野生型 F L T 3 に対しレスタウルチニブ(K d = 8.5 nM) の 4 倍の親和性を有し

ていた。野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤ミドスタウリンの K_d を比較した場合、本発明のベシル酸塩は野生型 F L T 3 に対しミドスタウリン ($K_d = 11 \text{ nM}$) の約 15 倍の親和性を有していた。野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤ソラフェニブの K_d を比較した場合、本発明のベシル酸塩は野生型 F L T 3 に対しミドスタウリン ($K_d = 13 \text{ nM}$) の約 18 倍の親和性を有していた。

【 0 0 6 2 】

直接酵素的な Millipore IC50 Profiler Assay を用いて本発明のベシル酸塩の活性を決定した。全ての IC50 値はナノモル濃度で表示される。直接的な酵素測定アッセイでは、野生型 F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩の IC50 は 3 nM であった。図 1 はクラス 3 受容体型チロシンキナーゼ (F L T 3、P D G F R A、P D G F R B、C S F 1 R および K I T を含む) に対する本発明のベシル酸塩の特異性を示す。

【 0 0 6 3 】

F L T 3 - I T D 変異体に関する生物学的データ

遺伝子内縦列重複 (I T D) を有する F L T 3 に対する本発明のベシル酸塩の活性を図 4 に示す。全ての結合定数はモル濃度で示される。図 4において、F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明の活性が当該分野で周知の他の阻害剤のものと比較される。Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, et al. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnol 2011;29:1046-51 を参照されたい。本発明のベシル酸塩の K_d は 0 . 43 nM であった。F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤スニチニブの K_d を比較した場合、F L T 3 - I T D 変異体に対し本発明のベシル酸塩はスニチニブ ($K_d = 0 . 99 \text{ nM}$) の 2 倍以上の親和性を有していた。F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤レスタウルチニブの K_d を比較した場合、F L T 3 - I T D 変異体に対し本発明のベシル酸塩はスニチニブ ($K_d = 1 . 5 \text{ nM}$) の 3 倍以上の親和性を有していた。F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤キザルチニブの K_d を比較した場合、F L T 3 - I T D 変異体に対し本発明のベシル酸塩はキザルチニブ ($K_d = 8 . 8 \text{ nM}$) の 20 倍以上の親和性を有していた。F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤 M L N - 518 の K_d を比較した場合、F L T 3 - I T D 変異体に対し本発明のベシル酸塩は M L N - 518 ($K_d = 9 . 1 \text{ nM}$) の 23 倍以上の親和性を有していた。F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤 P K C - 412 の K_d を比較した場合、F L T 3 - I T D 変異体に対し本発明のベシル酸塩は P K C - 412 ($K_d = 11 \text{ nM}$) の 25 倍以上の親和性を有していた。F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤 A S T - 487 の K_d を比較した場合、F L T 3 - I T D 変異体に対し本発明のベシル酸塩は A S T - 487 ($K_d = 11 \text{ nM}$) の 25 倍以上の親和性を有していた。F L T 3 - I T D 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野の他の阻害剤ソラフェニブの K_d を比較した場合、F L T 3 - I T D 変異体に対し本発明のベシル酸塩は A S T - 487 ($K_d = 79 \text{ nM}$) の 183 倍以上の親和性を有していた。

【 0 0 6 4 】

F L T 3 - D 835 変異体に関する生物学的データ

F L T 3 チロシンキナーゼドメインの変異体 D 835 Y および D 835 H に対する本発明のベシル酸塩の活性を図 5 および図 6 に示す。全ての結合定数はナノモル濃度で表示される。図 5 および図 6 の両方において、F L T 3 - D 835 変異体に対する本発明の活性が当該分野で周知の他の阻害剤のものと比較される。Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, et al. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnol 2011;29:1046-51 を参照されたい。本発明のベシル酸塩の F L T 3 - D 835 Y 変異体に対する結合定数 (K_d) は 0 . 18 nM であり、F L T 3 - D 835 H 変異体に対するものは 0 . 4 nM であった。F L T 3 - D 835 Y および D 835 H 変異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野で周知の他の阻害剤レスタウルチニブの K_d を比較した場合、本

10

20

30

40

50

発明のベシル酸塩はレスタウルチニブ (D 8 3 5 Y Kd = 0 . 5 7 nM、D 8 3 5 H Kd = 0 . 6 6 nM) に比べ F L T 3 D 8 3 5 Y 变異体に対し 3 倍、F L T 3 D 8 3 5 H 变異体に対し等倍の親和性を有していた。F L T 3 D 8 3 5 Y および D 8 3 5 H 变異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野で周知の他の阻害剤スニチニブの Kd を比較した場合、本発明のベシル酸塩はスニチニブ (D 8 3 5 Y Kd = 2 . 3 7 nM、D 8 3 5 H Kd = 4 . 3 nM) に比べ F L T 3 D 8 3 5 Y 变異体に対し 1 2 倍、F L T 3 D 8 3 5 H 变異体に対し 1 0 倍の親和性を有していた。F L T 3 D 8 3 5 Y および D 8 3 5 H 变異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野で周知の他の阻害剤キザルチニブの Kd を比較した場合、本発明のベシル酸塩はキザルチニブ (D 8 3 5 Y Kd = 7 . 1 nM、D 8 3 5 H Kd = 3 . 7 nM) に比べ、F L T 3 D 8 3 5 Y 变異体に対し 3 9 倍、F L T 3 D 8 3 5 H 变異体に対し 9 倍の親和性を有していた。F L T 3 D 8 3 5 Y および D 8 3 5 H 变異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野で周知の他の阻害剤 A S T - 4 8 7 の Kd を比較した場合、本発明のベシル酸塩は A S T - 4 8 7 (D 8 3 5 Y Kd = 1 1 nM、D 8 3 5 H Kd = 4 . 9 nM) に比べ、F L T 3 D 8 3 5 Y 变異体に対し 6 1 倍、F L T 3 D 8 3 5 H 变異体に対し 1 2 倍の親和性を有していた。F L T 3 D 8 3 5 Y および D 8 3 5 H 变異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野で周知の他の阻害剤 P K C - 4 1 2 の Kd を比較した場合、本発明のベシル酸塩は P K C - 4 1 2 (D 8 3 5 Y Kd = 1 5 nM、D 8 3 5 H Kd = 6 . 8 nM) に比べ、F L T 3 D 8 3 5 Y 变異体に対し 8 3 倍、F L T 3 D 8 3 5 H 变異体に対し 9 倍の親和性を有していた。F L T 3 D 8 3 5 Y および D 8 3 5 H 变異体に対する本発明のベシル酸塩および当該分野で周知の他の阻害剤ソラフェニブの Kd を比較した場合、本発明のベシル酸塩はソラフェニブ (D 8 3 5 Y Kd = 8 2 nM、D 8 3 5 H Kd = 3 0 nM) に比べ、F L T 3 D 8 3 5 Y 变異体に対し 4 5 5 倍、F L T 3 D 8 3 5 H 变異体に対し 7 5 倍の親和性を有していた。

【0065】

直接酵素的な Millipore IC50 Profiler Assay を用いて本発明のベシル酸塩の活性を測定した。全ての IC50 値はナノモル濃度で表示される。直接的な酵素測定アッセイにおいて、F L T 3 T K D 变異体 D 8 3 5 Y に対する本発明のベシル酸塩の IC50 は 2 nM であった。

【0066】

リン酸化キナーゼに対する親和性の生物学的データ

【0067】

本発明の親和性に対する A B L 1 の A ループリン酸化の影響を図 7 に示す。キナーゼ A B L 1 および A B L (T 3 1 5 I) に対する本発明のベシル酸塩の親和性の解析により、該分子が 1 型阻害剤の特徴的なメカニズムを示すことが分かった。本発明のリン酸化 A B L 1 (Kd = 8 8 nM) および A B L (T 3 1 5 I) (Kd = 7 6 0 nM) に対する結合定数は、非リン酸化 A B L 1 (Kd = 6 0 0 nM) および A B L (T 3 1 5 I) (Kd = 1 2 0 0 0 nM) に対するものよりそれぞれ 7 倍および 1 5 倍低いものであった。本発明は A B L に対する活性を有しないが、本発明のベシル酸塩がリン酸化キナーゼに対し著しく高い親和性を有することによりクレノラニブが 1 型 T K I であることが示唆される。

【0068】

非自己阻害型および自己阻害型 F L T 3 に対し本発明のベシル酸塩が異なる親和性を有することによっても該分子が 1 型阻害剤として機能することが示唆される。図 2 に示されるように、本発明のベシル酸塩は非自己阻害型 F L T 3 に対し 0 . 6 1 nM の Kd 値を有し、自己阻害型 F L T 3 に対し 6 . 7 nM の Kd 値を有していた。故に、本発明のベシル酸塩は F L T 3 に非自己阻害状態および自己阻害状態の間で約 1 0 倍の親和性シフトを有することになる。この値は他の 1 型チロシンキナーゼ阻害剤で報告される親和性シフトの範囲内にあり、2 型 T K I で報告される 1 0 0 から 1 0 0 0 倍の親和性シフトの範囲から大きく外れている (Davis, MI et al., Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnology. 2011; 29 (10): 1046-1051; Zhang, J et al., Target

10

20

30

40

50

ing cancer with small molecule kinase inhibitors. Nat Rev Cancer. 2009; 9(1): 28-39; Liu, Y et al., Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. Nat Chem Biol. 2006; 2(7): 358-364を参照)。

【0069】

本明細書で議論される任意の実施態様は任意の方法、キット、試薬または本発明の組成物について実行することができると考えられ、逆も同様である。さらに、本発明の組成物は本発明の方法の実現に用いることができる。

【0070】

本明細書で記載される特定の実施態様が説明を目的とするものであって本発明を限定するものではないことは明らかであろう。本発明の本質的な特性は本発明の範囲から逸脱することなく様々な実施態様に用いることができる。当業者は、単なる通常の実験手順を使用するだけで、本明細書に記載される特定の手順に対して非常に多くの同等物を認識するか、または確認することができよう。かかる同等物は、本発明の範囲内にあると考えられ、特許請求の範囲によって保護される。本出願の全体にわたって引用した、すべての文献、公表された特許、および公開特許出願の内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0071】

本明細書中で引用された全ての刊行物および特許出願は、本発明が関与する当業者の技術レベルを示すものである。全ての刊行物および特許出願は、あたかもそれら個々の刊行物または特許出願が特別に、個々に引用により取り込まれるものとして示されたと同程度に、引用により本明細書に取り込まれる。

20

【0072】

用語「含む (comprising)」と組み合わせて用いられる場合の請求項および／または明細書中における単語「a」または「an」の使用は、「1 (one)」を意味していてもよいが、「1つまたはそれ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1つより多い」の意味とも合致する。本開示は選択肢のみ、および「および／または」を意味する定義を支持するが、請求項における用語「または (or)」の使用は、選択肢のみであるか選択肢が互いに排他的であると明確に指示されない限り、「および／または」を意味するよう用いられる。本願を通し、用語「約 (about)」は、その値の決定に用いられる装置、方法に固有の誤差、または研究対象間に存在する変動を含む値を意味することに用いられる。

30

【0073】

本明細書および請求項（複数可）で用いられるように、単語「comprising」（ならびに、「comprise」および「comprises」などの「comprising」の任意の形態）、「having」（ならびに、「have」および「has」などの「having」の任意の形態）、「including」（ならびに、「includes」および「include」などの「including」の任意の形態）またはcontaining（ならびに、「contains」および「contain」などの「containing」の任意の形態）は、包括的又は無制限であって、追加的な、列挙されていない要素又は方法ステップを排除するものではない。

【0074】

40

用語「またはその組み合わせ (or combinations thereof)」は、本明細書中で用いられるように、該用語の前に列挙される項目の全ての順列および組み合わせを意味する。例えば、「A、B、C、またはその組み合わせ」は、A、B、C、A B、A C、B C、またはA B Cの少なくとも1つを包含すると意図され、特定の文脈において順序が重要である場合、B A、C A、C B、C B A、B C A、A C B、B A C、またはC A Bも包含される。この例の続きとして、1つまたはそれ以上の項目または用語の繰り返しを含む組み合わせ、例えば、B B、A A A、M B、B B C、A A A B C C C C、C B B A A A、C A B A B Bなども明らかに包含される。特に文脈から明らかでない限り、一般的に任意の組み合わせにおいて項目または用語数に制限がないことは当業者に自明であろう。

【0075】

50

本明細書中で用いられるように、概算を示す単語、例えば、限定されないが、「約 (about)」、「実質的 (substantialまたはsubstantially)」は、そのように修飾された場合、必ずしも絶対的または完全である必要はないと理解され、該条件が現状を示すと当業者が保証するに十分なほど近接していると認識される条件を意味する。その記載の変動する度合いは、どの程度の大きさの変化が策定されるか、および当業者が修飾された特性が依然として未修飾の特性の必要とされる特徴および能力を有していると依然として見做すことに依存する。一般的に、先の議論の影響下ではあるが、本明細書中において「約 (about)」といった概算を示す単語により修飾される数値は、記載された数値から少なくとも±1、2、3、4、5、6、7、10、12または15%変動する。

【0076】

10

本明細書中で開示および請求される全ての組成物およびまたは方法は、本発明を踏まえると必要以上の実験を行うことなく製造および実行することができる。本発明の組成物および方法は好ましい実施態様に関して記載されるが、組成物およびまたは方法ならびに本明細書中に記載される方法における工程または工程の順序が本発明の概念、精神および技術範囲から逸脱することなく改変され得ることは当業者に自明であろう。当業者に明らかであるかかる全ての類似の代替物および改変は、付属の特許請求項で定義される本発明の精神、技術範囲および概念の範囲内にあると見做される。

【0077】

引用文献

20

その他の刊行物

Drexler, HG et al. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. Leukemia. 1996; 10:588-599.

【0078】

Gilliland, DG and JD Griffin. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood. 2002;100:1532-1542.

【0079】

Stirewalt, DL and JP Radich. The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. Nat Rev Cancer. 2003;3:650-665.

【0080】

Nakao M, S Yokota and T Iwai. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia. 1996;10:1911-1918.

30

【0081】

H Kiyo, M Towatari and S Yokota. Internal Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. Leukemia.1998;12:1333-1337.

【0082】

PD Kottaridis, , RE Gale, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood. 2001;98:1742-1759.

40

【0083】

Yamamoto Y, Kiyo H, Nakano Y. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood. 2001;97:2434-2439.

【0084】

Thiede C, C Steudel, Mohr B. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood. 2002;99:4326-4335.

【0085】

S Bains, Luthra R, Medeiros LJ and Zuo Z. FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndrome. Blood. 2002;99:4326-4335.

50

lastic syndromes: Frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid 白血病. American Journal of Clinical Pathology. January 2011;135:62-69.

【 0 0 8 6 】

PK Bhamidipati, Dauer NG, Kantarjian H, et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndromes(MDS) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). 2012. Journal of Clinical Oncology. Suppl; abstract 6597.

【 0 0 8 7 】

Nakao M, S Yokota and T Iwai. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia. 1996;10:1911-1918.

10

【 0 0 8 8 】

H Kiyoi, M Towatari and S Yokota. Internal Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. Leukemia.1998;12:1333-1337.

【 0 0 8 9 】

H Kiyoi, T Naoe and S Yokota. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). Leukemia.1997;11:1447-1452.

【 0 0 9 0 】

S Schnittger, C Schoch and M Duga. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood. 2002;100:59-66.

20

【 0 0 9 1 】

FM Abu-Duhier, Goodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high risk group. British Journal of Haematology. 2000;111:190-195.

【 0 0 9 2 】

H Kiyoi, T Naoe, Y Nakano, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood. 1999;93:3074-3080.

30

【 0 0 9 3 】

DL Stirewalt and JP Radich. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. Nature Reviews Cancer. 2003;3:650-665

【 0 0 9 4 】

Y Yamamoto, H Kiyoi and Y Nakano, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood. 2001;97:2434-2439.

【 0 0 9 5 】

C Thiede, Steudal C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood. 2002;99:4326-4335.

40

【 0 0 9 6 】

U Bacher, Haferlach C, W Kern, et al. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients. Blood. 2008;111:2527-2537.

【 0 0 9 7 】

T Kindler, Lipka DB, and Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. Blood.2010;116:5089-102.

【 0 0 9 8 】

Liu, Y and N Gray. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase

50

conformations. *Nature Chem. Biol.* 2006;2:358-354.

【0099】

A Ramachandran, Marshall H and Jain V. Crenolainb, a novel type I, mutant specific inhibitor of class III receptor tyrosine kinases, preferentially binds to p phosphorylated kinases. *Cancer Res.* 2012;72 (8 supplement): 3683.

【0100】

J Zhang, Yang PL, and Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer.* 2009;9:28-39.

【0101】

PW Manley, Cowan-Jacob SW, Mestan J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1754:3-13. 10

【0102】

PT Wan, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004;116:855-867.

【0103】

生物学的方法の引用文献

【0104】

MA Fabian et al. A small molecule-kinases interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol.* 2005; 23:329-336.

20

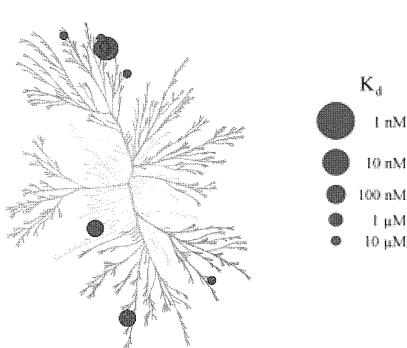
【0105】

MW Karaman et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol.* 2008; 26:127-132.

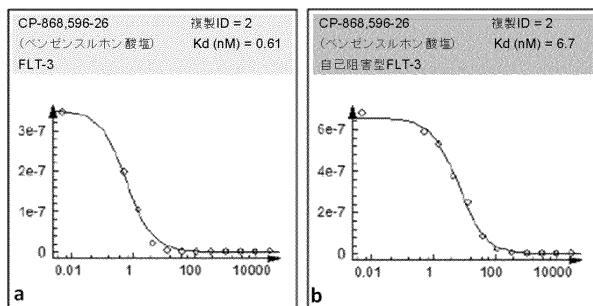
【0106】

TA Carter et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102:11011-11016.

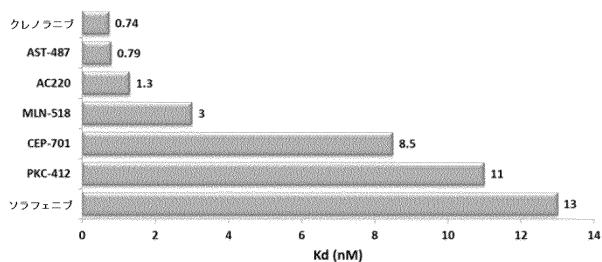
【図1】



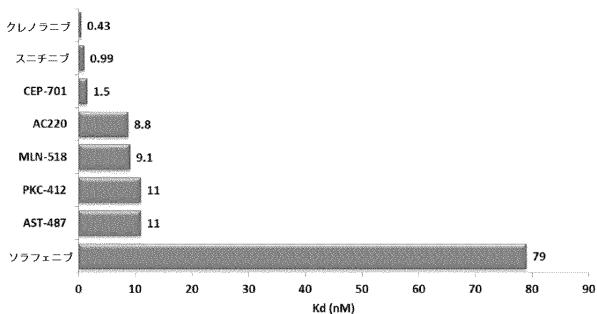
【図2】



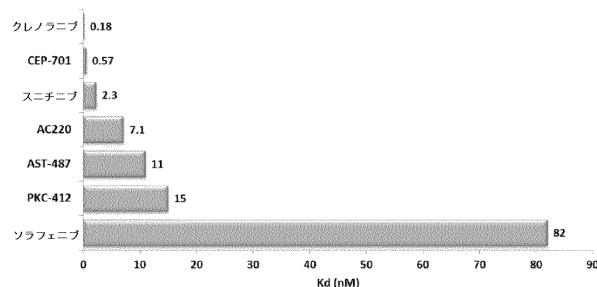
【図3】



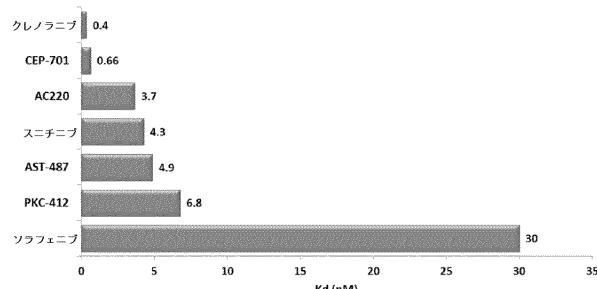
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

キナーゼターゲット	CP-868,596-26 (ベンゼンスルホン酸塩)
KINOMEscan 遺伝子記号	Kd (nM)
ABL1(T315I) - 非リン酸化型	1200
ABL1(T315I) - リン酸化型	760
ABL1 - 非リン酸化型	600
ABL1 - リン酸化型	88

フロントページの続き

(72)発明者 ピナイ・ケイ・ジェイン

アメリカ合衆国 75251 テキサス州ダラス、インウッド・ロード 10710 番

合議体

審判長 村上 騎見高

審判官 蔵野 雅昭

審判官 穴吹 智子

(56)参考文献 國際公開第 2012 / 052757 号

Journal of Clinical Oncology, 2009年, Vol. 27(31), pp. 5262 - 5269

British Journal of Cancer, 2010年, Vol. 103, pp. 1554 - 1561

Clinical Cancer Research, 2012年 8月, Vol. 18(16), pp. 4375 - 4384

Cancer. Res., 2012年 6月, 72(8 Supplement), 3683

Blood, 2010年, Vol. 116(24), pp. 5089 - 5102

Journal of Hematology & Oncology, 2011年, Vol. 4(13), pp. 1 - 10

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K31/00

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / BIOSIS / MEDLINE / REGISTRY (STN)