

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-535675

(P2005-535675A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**A61K 31/506**  
**A61P 5/20**  
**A61P 17/00**  
**A61P 35/00**  
**A61P 43/00**

F 1

A 61 K 31/506  
A 61 P 5/20  
A 61 P 17/00  
A 61 P 35/00  
A 61 P 43/00

テーマコード(参考)

4 C 0 6 3  
4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-522385 (P2004-522385)	(71) 出願人	505028196 ユニバーシティ・オブ・シンシナティ UNIVERSITY OF CINCINNATI
(86) (22) 出願日	平成15年5月23日 (2003.5.23)		
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月2日 (2005.3.2)		
(86) 國際出願番号	PCT/IB2003/001984		
(87) 國際公開番号	W02004/009087		
(87) 國際公開日	平成16年1月29日 (2004.1.29)		
(31) 優先権主張番号	60/398,409	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葉
(32) 優先日	平成14年7月24日 (2002.7.24)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100064610 弁理士 中嶋 正二
		(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】変異型R E Tキナーゼ関連疾患を処置するための4- (4-メチルピペラジン-1-イルメチル) - N - [4-メチル-3- (4-ピリジン-3-イル) ピリミジン-2-イルアミノ] フェニ

## (57) 【要約】

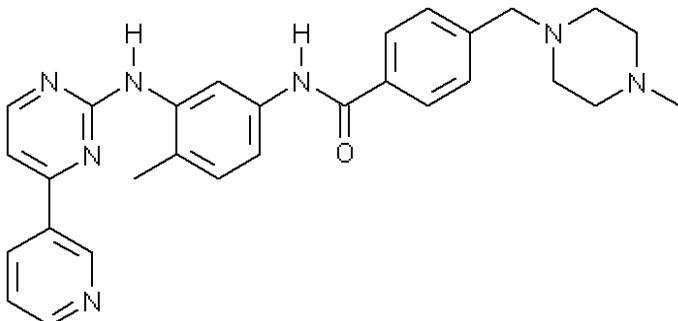
本発明は、変異型R E Tキナーゼ関連疾患、とりわけ変異型R E Tキナーゼ関連甲状腺癌の処置のための4- (4-メチルピペラジン-1-イルメチル) - N - [4-メチル-3- (4-ピリジン-3-イル) ピリミジン-2-イルアミノ] フェニル] - ベンズアミドまたは医薬上許容されるその塩の使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

## 変異型 RET キナーゼ関連疾患の処置用医薬の製造のための、式

【化 1 】



10

で示される 4 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イルメチル ) - N - [ 4 - メチル - 3 - ( 4 - ピリジン - 3 - イル ) ピリミジン - 2 - イルアミノ ) フェニル ] - ベンズアミドまたは医薬上許容されるその塩の使用。

## 【請求項 2】

変異型RETキナーゼ関連疾患の処置における4-(4-メチルピペラジン-1-イルメチル)-N-[4-メチル-3-(4-ピリジン-3-イル)ピリミジン-2-イルアミノ)フェニル]-ベンズアミドまたは医薬上許容されるその塩の使用。

20

### 【請求項3】

変異型RETキナーゼ関連疾患が甲状腺癌、褐色細胞腫、粘膜神経腫、副甲状腺機能亢進症、副甲状腺過形成、ヒルシュスブルング病または皮膚苔蘚アミロイドーシスを含む、請求項1または2に記載の使用。

#### 【請求項4】

甲状腺癌が甲状腺髓様カルシノーマおよび甲状腺乳頭様カルシノーマから選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の使用。

### 【請求項 5】

甲状腺髓様カルシノーマが遺伝性多発性内分泌腫瘍 2 型である、請求項 4 に記載の使用。

30

## 【請求項 6】

遺伝性多発性内分泌腫瘍 2 型が MEN 2 A、MEN 2 B または FMTC である、請求項目 5 に記載の使用。

### 【請求項 7】

変異型 RET キナーゼ関連疾患を患うヒトを含む温血動物の処置方法であつて、かかる処置を必要としている温血動物に、当該疾患に有効な用量の 4 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イルメチル ) - N - [ 4 - メチル - 3 - ( 4 - ピリジン - 3 - イル ) ピリミジン - 2 - イルアミノ ) フェニル ] - ベンズアミドまたは医薬上許容されるその塩を投与することを含んでなる方法。

40

## 【請求項 8】

10～1000mgの1日用量の式Iの4-(4-メチルピペラジン-1-イルメチル)-N-[4-メチル-3-(4-ピリジン-3-イル)ピリミジン-2-イルアミノ)フェニル]-ベンズアミドを成体に投与することを含んでなる、請求項7に記載の方法。

## 【請求項9】

4 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イルメチル ) - N - [ 4 - メチル - 3 - ( 4 - ピリジン - 3 - イル ) ピリミジン - 2 - イルアミノ ) フェニル ] - ベンズアミドのモノメタンスルホン酸塩が投与される、請求項 8 に記載の方法。

### 【請求項 10】

4 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イルメチル ) - N - [ 4 - メチル - 3 - ( 4 - ピリジン - 3 - イル ) ピリミジン - 2 - イルアミノ ) フェニル ] - ベンズアミドがメシリ酸塩

の形態かつ 結晶形態である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の使用または方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、変異型 RET キナーゼ関連疾患、とりわけ RET キナーゼ中に少なくとも 1 つの変異を有する甲状腺癌の処置用医薬の製造のための 4 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イルメチル ) - N - [ 4 - メチル - 3 - ( 4 - ピリジン - 3 - イル ) ピリミジン - 2 - イルアミノ ) フェニル ] - ベンズアミド ( 以下、「化合物 I」という ) または医薬上許容されるその塩の使用、変異型 RET キナーゼ関連疾患、とりわけ RET キナーゼ中に少なくとも 1 つの変異を有する甲状腺癌の処置における化合物 I または医薬上許容されるその塩の使用、変異型 RET キナーゼ関連疾患、とりわけ RET キナーゼ中に少なくとも 1 つの変異を有する甲状腺癌を患う哺乳類を含む温血動物、とりわけヒトの処置方法であって、かかる処置を必要としている動物に、有効量の化合物 I または医薬上許容されるその塩を投与することを含んでなる方法に関する。 10

【0002】

クロモソーム 10 q 11.2 に局在するヒト RET 遺伝子は、タンパク質 RET キナーゼ、レセプターチロシンキナーゼをコードする 21 エキソンを含む ( Takahashi M. and G. M. Cooper, 1987, Mol. Cell. Biol. 3: 1378-1385 ) 。レセプターチロシンキナーゼは、細胞成長、生存およびプログラム細胞死、分化および遊走といった多様なプロセスの細胞外シグナルを変換する。成熟したグリコシル化タンパク質は、170 kD のサイズであり、そして 3 つの主要なドメインを含む：カドヘリン様領域およびシスティンに富む領域 ( cysteine-rich region ) からなるリガンド結合に関与する細胞外ドメイン；膜貫通ドメイン；および 27 個のアミノ酸挿入により分けられたチロシンキナーゼドメイン ( TK ) を含む細胞内部分。 20

【0003】

RET プロトオンコジーンは、神経堤起原細胞の増殖、生存、分化および遊走の調節に関与する。RET キナーゼの 4 つのリガンド：グリア細胞株由来神経栄養因子、neurturin、persephin、および artemin が同定されている。リガンド結合の後、RET キナーゼは二量体化を誘導し、これは、レセプターのキナーゼ活性の活性化、選択的なチロシン残基の自己リン酸化、およびレセプターの特異的なチロシン - リン酸化ドメインとのエフェクターの相互作用を介する細胞内シグナル伝達の開始をもたらす。甲状腺臓様癌または甲状腺乳頭様癌の発生に関する RET 遺伝子の変異は、活性化を制御する重要な調節機能の 1 つが反転する構成的に活性なレセプターをコードする。特発性甲状腺乳頭様カルシノーマにおいて、チロシンキナーゼ機能の構成的活性化をもたらす RET の再配置 ( RET / PTC ) が観察される。この癌遺伝子ヒット ( oncogenic hit ) は、サイログロブリン遺伝子プロモーターにより甲状腺における RET / PTC の標的化された発現を有するマウスの乳頭様カルシノーマの発生により証明されるように、疾患の原因に関与しているようである。 30

【0004】

約 18,000 の甲状腺癌の新規ケースが、米国において毎年診断されている。これらのうち約 90 % が、甲状腺濾胞細胞から起こる甲状腺乳頭様カルシノーマ ( PTC ) である。甲状腺臓様カルシノーマ ( MTC ) はカルシトニン分泌傍濾胞 C 細胞に由来し、そしてすべての甲状腺癌の 5 ~ 10 % を示す。 40

【0005】

さまざまな比率の特発性および放射線誘導性甲状腺乳頭様カルシノーマ ( PTC ) が、チロシンキナーゼ ( TK ) を含む RET キナーゼの 3' 側部分および他の遺伝子の 5' 端に関与する体細胞転座 ( somatic translocation ) を有することが見いだされた。これらの再配置に由来する融合タンパク質は、通常、PTC の形成をもたらす RET チロシンキナーゼを構成的に活性化する。

【0006】

10

20

30

40

50

すべての甲状腺腫瘍カルシノーマの 75 % が特発性であり、そして甲状腺腫瘍カルシノーマの約 25 % が、多発性内分泌腫瘍 2 型 (MEN 2) または家族性甲状腺腫瘍カルシノーマ (F M T C) のいずれかの一部として、家族性である。RET プロトオンコジーンの生殖細胞系列突然変異は、常染色体優性様式の伝達を介して、すべての遺伝型の M T C に素因を与える。

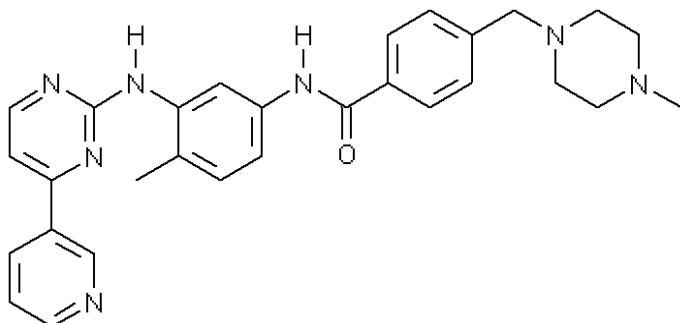
## 【0007】

遺伝形態の M T C 、 M E N 2 は、関与する器官に依存して 3 つのサブタイプに分かれる。多発性内分泌腫瘍は、 M T C 、その場合の約 50 % の褐色細胞腫 (P C) およびその場合の 15 ~ 30 % の副甲状腺機能亢進症を含む。 M E N 2 A 型は、すべての M E N のケースの 90 % 以上を占めることが多いようである。 M E N 2 A および F M T C の家族の RET 分析により、感染した個体において生殖細胞系列突然変異が見られたが、非感染個体または正常対照においては見られなかった。それぞれの場合において、エキソン 10 の 5 つの特定のシステインコドン (C 609 、 C 611 、 C 618 、 C 620 、 C 790) または V 804 またはエキソン 11 (C 634) の 1 つが変異していることが見いだされた。変異は、無関係の伝統的 M E N 2 A 家族の 98 % において検出され、そして F M T C 家族の 85 % において見いだされた。 M E N 2 B において、単一点変異 (single point mutation) が同定された：当該ケースの 95 % においてエキソン 16 のアミノ酸 918 、アミノ酸 883 またはアミノ酸 922 。

## 【0008】

4 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イルメチル) - N - [4 - メチル - 3 - (4 - ピリジン - 3 - イル) ピリミジン - 2 - イルアミノ) フェニル] - ベンズアミド (以下、「化合物 I」と称する。) は、以下の式

## 【化1】



10

20

30

40

を有する。

化合物 I の遊離塩基およびその許容される塩は欧州特許出願 0564409 において開示されている。

## 【0009】

化合物 I の医薬上許容される塩は、たとえば無機酸、たとえば塩酸、硫酸またはリン酸との、あるいは適当な有機カルボン酸またはスルホン酸、たとえば脂肪族モノ- またはジ- カルボン酸、たとえばトリフルオロ酢酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、ヒドロキシマレイン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸もしくはシュウ酸、またはアミノ酸、たとえばアルギニンもしくはリジン、芳香族カルボン酸、たとえば安息香酸、2 - フェノキシ - 安息香酸、2 - アセトキシ - 安息香酸、サリチル酸、4 - アミノサリチル酸、芳香族 - 脂肪族カルボン酸、たとえばマンデル酸もしくは桂皮酸、ヘテロ芳香族カルボン酸、たとえばニコチン酸もしくはイソニコチン酸、脂肪族スルホン酸、たとえばメタン - 、エタン - もしくは 2 - ヒドロキシエタン - スルホン酸、または芳香族スルホン酸、たとえばベンゼン - 、 p - トルエン - もしくはナフタレン - 2 - スルホン酸との塩のような、医薬上許容される酸付加塩である。

## 【0010】

化合物 I のメシリ酸塩 (以下、「塩 I」という) および化合物 I のメシリ酸塩の および 結晶形は、1999年1月に公開された国際特許出願 WO 99/03854 におい

50

て開示されている。

【0011】

驚くべきことに、今回、化合物I、たとえば塩Iが、変異型RETキナーゼ関連疾患、とりわけRETキナーゼ中に少なくとも1つの突然変異を有する甲状腺癌の処置用治療剤として使用され得ることが見いだされた。

【0012】

化合物Iまたは医薬上許容されるその塩、たとえば塩Iは、変異型RETキナーゼ形質転換線維芽細胞の増殖をインビトロで阻害する。RETキナーゼ-融合タンパク質 (RET / PTC1 および RET / PTC3 のような RET 再配置) の自己リン酸化およびホスホリパーゼC ガンマ (RETキナーゼのPLC ガンマ下流エフェクター) のリン酸化は、化合物Iまたは医薬上許容されるその塩、たとえば塩Iにより阻害される。

【0013】

それゆえ、本発明は、変異型RETキナーゼ関連疾患、とりわけRETキナーゼ中に少なくとも1つの変異を有する甲状腺癌を患う温血動物の処置方法であって、かかる処置を必要としている動物に、有効量の化合物Iまたは医薬上許容されるその塩を投与することを含んでなる方法に関する。

【0014】

本発明は、変異型RETキナーゼ関連疾患、とりわけRETキナーゼ中に少なくとも1つの変異を有する甲状腺癌を患うヒト対象に、化合物Iまたはその酸付加塩および好ましくは4-(4-メチルピペラジン-1-イルメチル)-N-[4-メチル-3-(4-ピリジン-3-イル)ピリミジン-2-イルアミノ)フェニル]-ベンズアミドのモノメタンスルホン酸塩を投与する方法に関する。

【0015】

RET再配置は、特に特発性甲状腺乳頭様カルシノーマにおいてよく見られる。

【0016】

1つの実施態様において、本発明は特に特発性甲状腺カルシノーマの処置方法を提供する。

【0017】

別の実施態様において、本発明は、放射線への曝露により引き起こされる甲状腺癌の処置方法を提供する。

【0018】

本明細書において使用される「変異型RETキナーゼ関連疾患」なる語は、以下の疾患：

\* 甲状腺癌

\* 乳癌

\* RETオンコジーンの活性化に関係する他の新生物、たとえば副腎髄質の種様 (褐色細胞腫 (PCT)) および粘膜神経腫

\* 副甲状腺機能亢進症 (HPT) および副甲状腺過形成、

\* ヒルシュスブルング病

\* 皮膚苔蘚アミロイドーシス (Cutaneous Lichen amyloidosis)

を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0019】

本明細書において使用される「甲状腺癌 (thyroid cancer)」なる用語は、たとえば、2型の多発性内分泌腫瘍 (MEN2)、甲状腺髄様カルシノーマまたは甲状腺乳頭様カルシノーマおよび甲状腺未分化癌を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0020】

好ましくは、化合物Iまたは医薬上許容されるその塩は、2型の多発性内分泌腫瘍 (MEN2)、甲状腺髄様カルシノーマまたは甲状腺乳頭様カルシノーマの処置に使用される。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明にしたがって、化合物Ⅰまたは医薬上許容されるその塩は、甲状腺未分化癌ではない甲状腺癌の処置のために使用される。

【0022】

「処置」なる用語は、腫瘍を治すか、または腫瘍縮退もしくは疾患の進行遅延に効果を有することを目的として、処置を必要としている温血動物への、化合物Ⅰまたは医薬上許容されるその塩、たとえば塩Ⅰの投与を含む。

【0023】

本明細書において使用される「進行遅延」なる用語は、腫瘍増殖または一般に疾患の進行が処置により少なくとも遅くなるかまたは阻害されることを意味し、そして患者が、処置されていない患者またはプラセボで処置された患者よりも高い生存率を示すことを意味する。

10

【0024】

「変異型RETキナーゼ」なる用語は、コドン内に少なくとも1つの点変異を有するか、または融合タンパク質もしくは脱調節性発現をもたらす遺伝子再配置を有するRETキナーゼタンパク質を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0025】

本発明の医薬組成物は自体公知の方法で製造され得、そしてヒトを含む温血動物への経腸的、たとえば経口的または経直腸的、および非経腸的投与に適し、かつ単独または1もしくはそれ以上の医薬上許容される抗体、とりわけ経腸もしくは非経腸適用に適したものと組み合わせて、少なくとも1つの薬理活性成分の治療上有効量を含むものである。本発明の投与形態の投与の好適な経路は経口である。

20

【0026】

当業者であれば、変異型RETキナーゼ関連疾患、とりわけRETキナーゼ中に少なくとも1つの変異を有する甲状腺癌に対する本明細書に記載の有利な効果を証明するための適当な試験モデルを選択することが十分に可能である。かかる化合物の薬理活性は、たとえば下記の実施例により、インビトロ試験およびヌードマウスもしくはトランスジェニックマウスにおけるインビトロ試験または適当な臨床試験において証明され得る。適当な臨床試験は、たとえば、転移性甲状腺髓様カルシノーマを有する患者におけるオープンラベル非無作為化、用量漸増試験である。処置の効果は、これらの試験において、たとえば、適当な血清腫瘍マーカーによる6週ごとの腫瘍サイズの評価により、または活性成分と適合させたプラセボで達成される対照を用いるシンチグラフィー腫瘍検出により測定される。

30

【0027】

化合物Ⅰまたは医薬上許容されるその塩、たとえば塩Ⅰの有効用量は、使用される特定の化合物または医薬組成物、投与様式、処置される甲状腺癌の種類または処置される甲状腺癌の重度に依存して変動し得る。投薬レジメンは、患者の腎および肝機能を含む種々のさらなる因子にしたがって選択される。通常の知識を有する医師(physician)、臨床医(clinician)または獣医であれば、病状の進行を予防、対抗または阻止するのに必要な化合物の有効量を容易に決定し、そして処方することができる。

【0028】

種、年齢、個々の状態、投与様式、および問題の臨床像に依存して、化合物Ⅰまたは医薬上許容されるその塩、たとえば塩Ⅰの有効用量、たとえば約10~1000mgの活性化合物(遊離塩基)、好ましくは50~600mg、とりわけ100~400mgに相当する1日用量が、体重約70kgの温血動物に投与される。甲状腺癌または関係する疾患を有する成体患者のために、1日200または400mgの開始用量が推奨され得る。年少者のための1日用量は、100~400mg/m<sup>2</sup>(体表面)、最も好ましくは340mg/m<sup>2</sup>である。治療に対する応答の評価後に不十分な応答を示す患者のために、用量漸増を安全に考慮することが可能であり、そして患者が処置から利益を受け、そして制限的な毒性が存在しない限り患者は処置され得る。

40

【0029】

本発明は、また、変異型RETキナーゼ関連疾患、とりわけRETキナーゼ中に少なく

50

とも1つの変異を有する甲状腺癌を患うヒト対象に、化合物Iまたは医薬上許容されるその塩を投与する方法であって、化合物Iまたは医薬上許容されるその塩の医薬有効量を、当該ヒト対象に、たとえば1日1回、たとえば3ヶ月を超える期間投与することを含んでなる方法に関する。本発明は、とりわけ50～600mg、好ましくは100～400mgの1日用量を成体に投与し、そして200～400mg/m<sup>2</sup>（体表面）、最も好ましくは340mg/m<sup>2</sup>（体表面）の用量を年少者に投与する方法に関する。

## 【0030】

## 実施例

細胞株：P C C L 3、ラット甲状腺細胞株を、Coon's培地/5%FBS添加F12高亜鉛、0.3mg/mlのL-グルタミン、1mU/mlのTSH、10μg/mlのインスリン、5μg/mlのアポ-トランスフェリン、10nMのヒドロコルチゾン、およびペニシリン/ストレプトマイシンからなるH4完全培地中で維持する。ドキシサイクリンとのE. coli tetリプレッサー-オペレーターの相互作用の高い特異性に基づくドキシサイクリン-誘導性発現を送達するために使用される発現系がブジャード(Bujard)および協力者により開発された。安定トランスフェクションを、トランスアクチベーター-tTA(r t t R DNA結合ドメインおよびVP16活性ドメインの融合体からなる)を構成的に発現するクローン株を確立するために最初に行う。次いで、個々のr t T A-発現クローンを、tet-オペレーターの制御下、ルシフェラーゼレポーター構築物での一過性トランスフェクションによりドキシサイクリン誘導性発現について調べる。非常に低いかまたは検出不可能な基底ルシフェラーゼ活性を示し、そしてドキシサイクリンによる顕著な誘導(すなわち>100倍)を示すr t T Aのクローンを、RET/PTC1またはRET/PTC3のいずれかのcDNAの上流にクローン化されたtet-オペレーター配列を含む最小CMVプロモーターからなる構築物での二次的安定トランスフェクションのための宿主として選択する。

## 【0031】

RET/PTC1およびRET/PTC3は、無関係の遺伝子のプロモーターを、細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを欠くRETキナーゼのC末端フラグメントに結合させる染色体再配置(chromosomal rearrangement)に由来する。この再配置は、構成的に活性化されたRETキナーゼのトランケート形の産生をもたらす。

## 【0032】

RETキナーゼの最もありふれた生殖細胞系列突然変異は、アミノ酸634-システイン変異であり、これは、構成的二量体化およびレセプターの活性化をもたらす。

## 【0033】

## 実施例1：インピトロキナーゼ反応

ドキシサイクリンを添加して、または添加せずに24時間インキュベートしたRET/PTC3(P C C L 3)細胞のコンフルエントT-75フラスコを、0.2mMオルトバナジン酸ナトリウム含有氷冷PBSで洗浄する。細胞を、4で20分間攪拌しながら、氷冷RIPA緩衝液(20mMトリス(Tris)pH7.4、150mMNaCl、1%Nonidet P-40、1%Tween 20、20mMフッ化ナトリウム、1mMオルトバナジン酸ナトリウム、1mM EGTA、5mM EGTA、0.2mM PMSFおよびシグマプロテアーゼ(Sigma Protease)インヒビターミックス)で溶解させる。細胞溶解物を、大きい凝集塊を分散するために26ゲージ針を通過させ、そして4にて10,600×gで20分間遠心分離し、総細胞溶解物を得る。透明な上清を抗-RETキナーゼ抗体(Santa Cruz goat polyclonal)で4にて2時間インキュベートし、次いで予めRIPAバッファーで洗浄したプロテイン(Protein) AGアガロース(Santa Cruz)とともにインキュベートし、続いて4にてさらに90分間インキュベートする。免疫複合体を、洗浄バッファー(50mM HEPES pH7.2、20mM MnCl<sub>2</sub>、5mM MgCl<sub>2</sub>)で2回、およびキナーゼバッファー(洗浄バッファー+0.5mMジチオトレイトール)で1回洗浄する。キナーゼアッセイを20μlのDMSO(0.5%)含有インキュベーションバッファーまたはDMSOで希釈したインヒビター中で行う。

10

20

30

40

50

反応を、 $140\text{ nCi}/\text{pmol}$  の比放射能を有する  $\text{P}^{32}\text{-ATP}$  (Perkin-Elmer > 6000 Ci/mmol) 含有 ATP ミックスの添加によりデュプリケートで行い、そして室温にて 25 分間インキュベートする。反応を、STOP バッファー (10 mM リン酸バッファー、1% Triton X-100、0.1% デスオキシコレートナトリウム、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM ATP、5 mM EDTA、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アプロチニン) で 2 回洗浄することにより止める。2 回目の洗浄後に、反応液を 35  $\mu\text{l}$  の Laemmli バッファー中で 10 分間沸騰させ、タンパク質を SDS-PAGE (7.5%) に付し、そしてそれらのリン酸化を、ニトロセルロース膜に移した後にホスホイメージャー (Phospholmager) デンシティメトリー (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) により測定する。次いで、タンパク質負荷を、ヤギポリクローナル抗-RET キナーゼ抗体 (Santa Cruz) またはマウスモノクローナル抗体 (University of Cincinnati) を用いるウエスタンプロット分析により測定した総 RET キナーゼタンパク質に対して標準化する。  
10

## 【0034】

100 nM の塩 I は、RET / PTC 3 の自己リン酸化を 40% 阻害する。

## 【0035】

実施例 2：構成的に活性な RET MEN2A を発現している NIH3T3 細胞の増殖に対する塩 I の効果

RET C634 变異は、多発性内分泌腫瘍 2A 型の 85% に起こる RET キナーゼの最もありふれた生殖細胞系列突然変異である。構成的に活性な RET キナーゼ (RET C634 变異) を安定に発現している NIH3T3 細胞の成長に対する塩 I の効果を調べる。  
20

構成的に活性な RET MEN2A を発現している NIH3T3 細胞を、6 ウェルプレートに一夜まく。次いで、それらを、塩 I (500 nM) またはビヒクル溶媒 (対照) の入った 1 または 5% 血清の存在下で、3 日ごとに培地を交換しながら、9 日間成長させる。処置開始後第 9 日目に、EDTA / トリプシン溶液で回収した後に細胞を計数する。

## 【表 1】

条件	血清	1%		5%	
	対照ビヒクル	+	+	+	+
	塩 I 500 nM	-	+	-	+
細胞減少の%		0	42	0	15

30

## 【0036】

塩 I は、RET キナーゼ - 形質転換 NIH3T3 線維芽細胞の成長を阻害する。

## 【0037】

実施例 3：RET / PTC による (ホスホリパーゼ C) PLC の活性化に対する塩 I の効果

RET キナーゼは、PLC と結合し、そしてリン酸化する。RET キナーゼ活性に対する塩 I の効果をさらに調べるために、PLC のリン酸化に対する塩 I での前処理を調べる。  
40

## 【0038】

RET-PTC 3 細胞を、6 ウェル Corning プレート中で  $10^5$  細胞 / ウェル にて播種する。3 日後、細胞を、ドキシサイクリンとともに、またはドキシサイクリンなしで 250 nM の塩 I の存在下にて 24 時間処置する。細胞を、0.1 mM オルトバナジン酸ナトリウム含有冷 (リン酸緩衝性生理食塩水) PBS で 2 回すすぎ、そして 4 にて緩やかに振盪しながら氷冷 RIPA バッファー中で 20 分間置く。細胞溶解物を、4 にて 10,600  $\times g$  で 20 分間遠心分離することにより集める。タンパク質アッセイを、クーマシーブルーアッセイ (Pierce, Rockford, IL) により上清のアリコートで行う。ウエスタンプロット分析を、SDS-PAGE (5%) 上で  $100 \mu\text{g}$  のタンパク質を泳動させ、ニトロセルロース膜に移し、そして標準化のために最初に抗 - ホスホ PLC 抗体 (Cell Signaling)、次いで抗 - PLC (Cell Signaling) でプロープ化することにより 50

行う。

【0039】

250nMの塩Iの存在下で、PLCのリン酸化の阻害は、塩Iを含まない試料と比較して28%である。

【0040】

実施例4：4-[ (4-メチル-1-ピペラジン-1-イルメチル)-N-[4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル]アミノ]フェニル]ベンズアミド メタンスルホン酸塩、-結晶形を有するカプセル

活性物質として100mgの化合物I(遊離塩基)に相当する119.5mgの塩Iを含有するカプセルを、以下の組成で製造する：

【表2】

組成

塩I	119.5mg
セルロース MK GR	92 mg
クロスボビドン XL	15 mg
アエロジル (Aerosil) 200	2 mg
ステアリン酸マグネシウム	1.5mg
	230 mg

【0041】

成分を混合し、そして混合物をサイズ1の硬ゼラチンカプセルに充填することにより、カプセル剤を製造する。

【0042】

実施例5：4-[ (4-メチル-1-ピペラジン-1-イルメチル)-N-[4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル]アミノ]フェニル]ベンズアミド メタンスルホン酸塩、-結晶形を有するカプセル

活性物質として100mgの化合物I(遊離塩基)に相当する119.5mgの塩Iを含有するカプセルを、以下の組成で製造する：

【表3】

組成物

活性物質	119.5mg
アビセル	200 mg
PVP XL	15 mg
アエロジル (Aerosil)	2 mg
ステアリン酸マグネシウム	1.5mg
	338.0mg

【0043】

成分を混合し、そして混合物をサイズ1の硬ゼラチンカプセルに充填することにより、カプセル剤を製造する。

10

20

30

40

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/IB 03/01984									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K31/506 A61P35/00											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K A61P											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">           HOME-PAGE OF THE WASHINGTON UNIVERSITY            SCHOOL OF MEDICINE, DEPARTMENT OF SURGERY,            'Online! XPO02251225            Retrieved from the Internet:  &lt;URL: http://www.surgery.wustl.edu/rs/residents.asp?subcategoryid=11&amp;drid=204&gt;            'retrieved on 2003-08-13!            see presentations of Cohen MS.            page 2, paragraphs 4,7,8,10            page 3, paragraph 1              -----         </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-4,7,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-/-</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	HOME-PAGE OF THE WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, DEPARTMENT OF SURGERY, 'Online! XPO02251225 Retrieved from the Internet: <URL: http://www.surgery.wustl.edu/rs/residents.asp?subcategoryid=11&drid=204> 'retrieved on 2003-08-13! see presentations of Cohen MS. page 2, paragraphs 4,7,8,10 page 3, paragraph 1  -----	1-4,7,9	-	-/-	-
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	HOME-PAGE OF THE WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, DEPARTMENT OF SURGERY, 'Online! XPO02251225 Retrieved from the Internet: <URL: http://www.surgery.wustl.edu/rs/residents.asp?subcategoryid=11&drid=204> 'retrieved on 2003-08-13! see presentations of Cohen MS. page 2, paragraphs 4,7,8,10 page 3, paragraph 1  -----	1-4,7,9									
-	-/-	-									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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											
Date of the actual completion of the international search  19 August 2003		Date of mailing of the international search report  08/09/2003									
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bazzanini, R									

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB 03/01984

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 03854 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ; NOVARTIS AG (CH); BUERGER HANS MICHA) 28 January 1999 (1999-01-28) cited in the application page 3, paragraph 4 -page 4, paragraph 1 page 9, paragraph 3 page 10, paragraph 1 page 17, paragraph 1 examples 1-4,6	1,2,7-10
Y	---	1-10
X	FAGIN JAMES A: "Perspective: Lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer: Insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets." ENDOCRINOLOGY, vol. 143, no. 6, June 2002 (2002-06), pages 2025-2028, XP002251224 June, 2002 ISSN: 0013-7227 page 2025, left-hand column, paragraph 1 -right-hand column, paragraph 2 page 2026, right-hand column, paragraph 2	1,2,7,9
Y	---	1-10
A	MERIC F ET AL: "Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer" CLINICAL CANCER RESEARCH 2002 UNITED STATES, vol. 8, no. 2, 2002, pages 361-367, XP002251226 ISSN: 1078-0432 abstract page 365, right-hand column, paragraphs 1,2 page 366, right-hand column, paragraphs 1,2 -----	1,2,7-10

International Application No. PCT/IB 03 01984

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.2

Present claims 1,2,7-10 relate to a disease which actually is not well defined. The use of the definition "mutated-RET kinase associated disease" in the present context is considered to lead to a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT. In fact, it is not fully possible to determine all the diseases for which protection might legitimately be sought. The lack of clarity is such as to render a meaningful complete search impossible.

Consequently, the search has been restricted to the real and defined diseases mentioned in claims 3-6 and in the description from page 4, paragraph 7 to page 5, paragraph 2.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB 03/01984

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 2-10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB 03/01984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9903854	A 28-01-1999	AU 740713 B2	15-11-2001
		AU 8975998 A	10-02-1999
		BR 9810920 A	15-08-2000
		CN 1264375 T	23-08-2000
		WO 9903854 A1	28-01-1999
		EP 0998473 A1	10-05-2000
		HU 0003230 A2	28-06-2001
		JP 3276359 B2	22-04-2002
		JP 2001510192 T	31-07-2001
		NO 20000227 A	17-01-2000
		NZ 502295 A	21-12-2001
		PL 338129 A1	25-09-2000
		SK 432000 A3	12-06-2000
		TR 200000060 T2	21-09-2000
		TW 491845 B	21-06-2002
		US 2002115858 A1	22-08-2002
		ZA 9806362 A	22-01-1999

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
C 07D 401/04 C 07D 401/04

(81) 指定国 EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SE, SG, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ジェイムズ・アレキサンダー・フェイギン  
アメリカ合衆国 4 5 2 6 7 - 0 8 2 9 オハイオ州シンシナティ、フェリー・ホール・ジー7、イーデン・アベニュー 3 2 2 3 番、ユニバーシティ・オブ・シンシナティ

F ターム(参考) 4C063 AA01 BB01 CC31 DD12 EE01  
4C086 AA01 AA02 BC50 GA07 GA08 GA12 MA01 MA04 ZB26 ZC20

(54) 【発明の名称】変異型 R E T キナーゼ関連疾患を処置するための 4 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イルメチル ) - N - [ 4 - メチル - 3 - ( 4 - ピリジン - 3 - イル ) ピリミジン - 2 - イルアミノ ] フェニル ] - ベンズアミド