

(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
2016 年 11 月 3 日(03.11.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/175252 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/497 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/063246
- (22) 国際出願日: 2016 年 4 月 27 日(27.04.2016)
- (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 2015-092301 2015 年 4 月 28 日(28.04.2015) JP
- (71) 出願人: アステラス製薬株式会社(ASTELLAS PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 小長井 智史(KONAGAI, Satoshi); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 山本博子(YAMAMOTO, Hiroko); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 坂上 秀樹(SAKAGAMI, Hideki); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 森平 浩一郎, 外(MORIHIRA, Koichiro et al.); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5

番 1 号 アステラス製薬株式会社 知的財産部内 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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), ユーラシア (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))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING PYRAZINECARBOXAMIDE COMPOUND AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: ピラジンカルボキサミド化合物を有効成分とする医薬組成物

(57) Abstract: [Problem] To provide a pharmaceutical composition for treating BMX-related cancer, particularly a pharmaceutical composition for treating prostate cancer, bladder cancer and/or renal cell carcinoma. [Solution] The present inventors have studied on compounds each having a BMX-inhibiting activity, and have confirmed that a specific pyrazinecarboxamide compound has a BMX-inhibiting activity and that a pharmaceutical composition containing the compound as an active ingredient has a therapeutic effect on BMX-related cancer, particularly prostate cancer, bladder cancer and/or renal cell carcinoma. As a result, the present invention has been accomplished.

(57) 要約: 【課題】BMXに関連する癌の治療用医薬組成物、特に前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物を提供する。【解決手段】本発明者らは、BMX阻害作用を有する化合物について検討し、特定のピラジンカルボキサミド化合物がBMX阻害作用を有し、これらの化合物を有効成分として含有する医薬組成物が、BMXに関連する癌、特に前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌に対する治療効果を有することを確認し、本発明を完成した。



WO 2016/175252 A1

明 細 書

発明の名称：

ピラジンカルボキサミド化合物を有効成分とする医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、ピラジンカルボキサミド化合物又はその製薬学的に許容される塩を有効成分とするBMXに関連する癌の治療用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] BMX (bone marrow tyrosine kinase in chromosome X) はTecファミリーキナーゼに属する非受容体型チロシンキナーゼであり、PH (プレクストリン相同) ドメイン、Src相同3ドメイン、Src相同2ドメイン、およびキナーゼドメインを有するタンパク質である。正常組織においてBMXは上皮細胞、内皮細胞に発現することが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95:3644-3649)。癌組織においては、前立腺癌、膀胱癌、腎細胞癌において発現が確認されており、これらの癌種では病態の進行にBMXが関与する可能性が示唆されている (Cancer Res. 2006;66(16):8058-8064、PLoS ONE 2011;6(3):e17778、J. Exp. Clin. Cancer Res. 2014;33:25)。

[0003] これまでに、PTEN遺伝子が欠損した前立腺癌細胞株において、siRNAを用いてBMXの発現を低下させると、細胞増殖が阻害されることが報告されている (J. Biol. Chem. 2007;282:32689-32698)。また、ホルモン療法抵抗性ヒト前立腺癌組織において、BMXの発現が亢進すること、当該BMXの発現とアンドロゲン受容体のリン酸化とは相関することが知られている。また、ホルモン療法抵抗性前立腺癌細胞株においてBMXを過剰発現させると腫瘍の増殖が亢進し、反対にホルモン療法抵抗性前立腺癌細胞株においてshRNAを用いてBMXの発現を低下させると、腫瘍増殖が阻害される (Cancer Res. 2010;70(13):5587-5596)。これらの結果からBMXが前立腺癌におけるホルモン療法抵抗性に関与することが示唆される。

さらに、膀胱癌細胞株および腎細胞癌細胞株において、BMXの発現を低下さ

せると生存、遊走、浸潤が阻害されることが報告されている (PLoS ONE 2011 ;6(3):e177778、J. Exp. Clin. Cancer Res. 2014;33:25)。

[0004] これらの結果は、前立腺癌、膀胱癌、腎細胞癌を含むBMXに関連する癌、例えば、BMXが高発現又は活性化した癌において、BMXがこれらの癌の増殖に関与していることを示している。

[0005] 5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド (以下、「化合物A」ということがある。)又はその製薬学的に許容される塩は、EGFR T790M変異を有する癌治療用医薬組成物の有効成分として有用であることが知られている (特許文献1)。

化合物A又はその製薬学的に許容される塩は、特許文献1において、実施例54としてそのフリー体が、実施例261としてそのモノメタンスルホン酸塩が開示されており、EGFR変異キナーゼに対する阻害作用が確認されている。

また本願の優先日後に公開された特許文献2に、化合物A又はその製薬学的に許容される塩は、BTK(Bruton's tyrosine kinase)、JAK3(Janus kinase 3)、ITK(IL2 inducible T cell kinase)のうち1種又は複数のキナーゼが関与するがんの治療用医薬組成物の有効成分として有用であることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第 2013/108754号

特許文献2：国際公開第 2015/182628号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] BMXに関連する癌の治療用医薬組成物、特に前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物を提供する。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物の創製を目的に鋭意検討した結果、5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド又はその製薬学的に許容される塩が、BMX活性を阻害し、腫瘍の増殖抑制作用を有することを知見して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド又はその製薬学的に許容される塩を含有する、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物、特に前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物に関する。

[0009] また、本発明は、化合物A又はその製薬学的に許容される塩を含有するBMXに関連する癌の治療剤、特に前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療剤に関する。

[0010] また、本発明は、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物の製造のための化合物A又はその製薬学的に許容される塩の使用、ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物の製造のための化合物A又はその製薬学的に許容される塩の使用；BMXに関連する癌の治療のための化合物A又はその製薬学的に許容される塩の使用、ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療のための化合物A又はその製薬学的に許容される塩の使用；BMXに関連する癌の治療のための化合物A又はその製薬学的に許容される塩、ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療のための化合物A又はその製薬学的に許容される塩；及び、化合物A又はその製薬学的に許容される塩の有効量を対象に投与することからなるBMXに関連する癌の治療方法、ある態様として化合物A又はその製薬学的に許容される塩の有効量を対象に投与することからなる前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療方法に関する。なお、「対象」とは、その治療を必要とするヒト又はその他の動物であり、ある態様としては、その治療を必要とするヒトである。

発明の効果

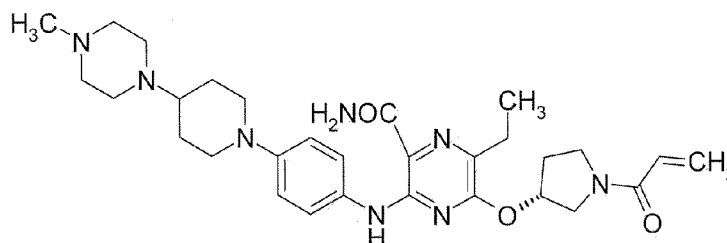
[0011] 本発明の医薬組成物の有効成分である化合物A又はその製薬学的に許容される塩は、BMX阻害作用を有し、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物、特に、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物の有効成分として使用できる。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

上述の通り、化合物Aの化学名は5-[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-(4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミドであり、その化学構造は以下に示すとおりである。

[化1]



[0013] BMXに関連する癌とは、癌の原因の一つがBMXである癌を意味し、例えば、BMXが高発現及び／又は活性化した癌である。ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌である。ある態様としては、前立腺癌であり、ある態様としては、膀胱癌であり、ある態様としては、腎細胞癌であり、ある態様としては、ホルモン療法抵抗性を獲得した前立腺癌であり、ある態様としては、アンドロゲン受容体が活性化した前立腺癌であり、ある態様としては、アンドロゲン受容体拮抗薬に抵抗性を獲得した前立腺癌である。

[0014] 本発明のある態様を以下に示す。

(1) 化合物A又はその製薬学的に許容される塩を含有する、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物。ある態様として、化合物A又はその製薬学的に許容される塩を含有する、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬

組成物。ある態様として、化合物 A モノメタンスルホン酸塩を含有する、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物。ある態様として、化合物 A モノメタンスルホン酸塩を含有する、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物。

(2) BMXに関連する癌の治療用医薬組成物の製造のための、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩の使用。ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物の製造のための、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩の使用。ある態様として、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物の製造のための、化合物 A モノメタンスルホン酸塩の使用。ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物の製造のための、化合物 A モノメタンスルホン酸塩の使用。

(3) BMXに関連する癌の治療のための、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩の使用。ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療のための、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩の使用。ある態様として、BMXに関連する癌の治療のための、化合物 A モノメタンスルホン酸塩の使用。ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療のための、化合物 A モノメタンスルホン酸塩の使用。

(4) BMXに関連する癌の治療のための、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩。ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療のための、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩。ある態様として、BMXに関連する癌の治療のための、化合物 A モノメタンスルホン酸塩。ある態様として、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療のための、化合物 A モノメタンスルホン酸塩。

(5) 化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩の有効量を対象に投与することからなる、BMXに関連する癌の治療方法。ある態様として、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩の有効量を対象に投与することからなる、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療方法。ある態様として、化合物 A モノメタンスルホン酸塩の有効量を対象に投与することからなる、BMXに関連

する癌の治療方法。ある態様として、化合物 A モノメタンスルホン酸塩の有効量を対象に投与することからなる、前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療方法。

[0015] 化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩は、上記特許文献 1（国際公開第 2013/108754号）に記載の方法に従って、あるいはその変法によって入手することができる。

[0016] また、「化合物 A の製薬学的に許容される塩」とは、化合物 A の酸付加塩を意味し、具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸（メシル酸）、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩が挙げられる。なお、「化合物 A の製薬学的に許容される塩」には、化合物 A の溶媒和物、具体的には、例えば水和物やエタノール和物を含み、さらに、化合物 A の酸付加塩の溶媒和物を含む。

なお、「化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩」のある態様としては、化合物 A（フリー体）が挙げられ、別の態様としては、化合物 A モノメタンスルホン酸塩が挙げられる。

[0017] 化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物は、当分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用されている方法によって調製することができる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、又は、関節内、静脈内、筋肉内等の注射剤、坐剤、経皮用液剤、軟膏剤、経皮用貼付剤、経粘膜液剤、経粘膜貼付剤、吸入剤等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。

[0018] 経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、1 種又は 2 種以上の有効成分が、少

なくとも1種の不活性な賦形剤と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な添加剤、例えば滑沢剤や崩壊剤、安定化剤、溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤又はエリキシル剤等を含む。当該液体組成物は、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水又はエタノールを含み、さらに可溶化剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

[0019] 非経口投与のための注射剤は、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤又は乳濁剤を含有する。水性の溶剤としては、例えば注射用蒸留水又は生理食塩液が含まれる。非水性の溶剤としては、例えばエタノールのようなアルコール類がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、又は溶解補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解又は懸濁して使用することもできる。

[0020] 通常経口投与の場合、1日の投与量は、体重当たり約0.001~100 mg/kg、ある態様として0.01~30 mg/kg、更にある態様として0.1~10 mg/kgが適当であり、更にある態様として0.3~7mg/kgが適当であり、これを1回であるいは2回~4回に分けて投与する。静脈内投与される場合は、1日の投与量は、体重当たり約0.0001~10 mg/kgが適当で、1日1回~複数回に分けて投与する。また、経粘膜剤としては、体重当たり約0.001~100 mg/kgを1日1回~複数回に分けて投与する。投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に依じて適宜決定される。

[0021] 投与経路、剤形、投与部位、賦形剤や添加剤の種類によって異なるが、本発明の医薬組成物は0.01~99重量%、ある態様としては0.01~50重量%の化合物A又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する。

[0022] 本発明の医薬組成物は、癌に有効性を示す種々の治療剤と併用することができる。当該併用は、同時投与、あるいは別個に連続して、若しくは所望の時間間隔をおいて投与してもよい。同時投与の場合には、配合剤であっても別個に製剤化されていてもよい。特に併用することができる薬剤として、スニチニブやソラフェニブのようなキナーゼ阻害剤、テムシロリムスやエベロリムスのようなmTOR阻害剤、ベバシズマブのような抗VEGF（血管内皮細胞増殖因子）製剤、インターフェロンやインターロイキンのようなサイトカイン製剤、BCGのような生菌製剤、シクロホスファミドやイホスファミドのようなアルキル化剤、マイトマイシンC、メトトレキサート、ビンブラスチン、5-FU、パクリタキセル、ミトキサントロン、エトポシド、ドキソルビシンやシスプラチンのような抗悪性腫瘍剤、ビンクリスチンのような微小管重合阻害剤、プレドニゾン、プレドニゾロンやデキサメタゾンのような副腎皮質ホルモン剤、ゲムシタビンやペメトレキセドのような代謝拮抗剤、ビカルタミドやエンザルタミドのような抗アンドロゲン剤、クロドロネートのようなビスフォスフォネート、ゴセリリンやリュープロレリンのようなGnRH（性腺刺激ホルモン放出ホルモン）アゴニスト、デガレリクスのようなGnRHアンタゴニスト、アビラテロンのようなCYP17阻害剤、プロゲステロンのような黄体ホルモン製剤、デノスマブのような抗RANKL製剤が挙げられる。

実施例

[0023] 本発明の医薬組成物の薬理的効果は、以下の実施例により確認した。なお、化合物A又はその製薬学的に許容される塩として、以下の実施例では化合物A モノメタンスルホン酸塩（以下、「化合物B」ということがある。）を使用した。それぞれの実施例において、化合物Bの濃度は、化合物A（フリー体）の濃度に換算して算出した。

[0024] 実施例1 BMX阻害活性評価

BMX阻害活性についてはBMX QSS Assist™ Mobility Shift Assayキット（カルナバイオサイエンス）を用いて評価した。

化合物Bをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、試験濃度の100倍濃度

の溶液を調製した。その溶液をさらに付属のアッセイバッファーにて25倍希釈して被験物質溶液とした。なお、反応にはキットに付属しているBMXを用いた。

上記のアッセイバッファーにて調製した5 μ Lの4倍濃度被験物質溶液及び10 μ Lの2倍濃度BMX溶液を384ウェルプレートのウェル内で混合し、室温にて30分間放置した。続いて、5 μ Lの4倍濃度基質ペプチド/ATP/MgCl₂溶液を添加し、室温にて1時間反応させた。基質ペプチドは終濃度1 μ M、ATPは終濃度1mM、MgCl₂は終濃度5mMにて使用した。その後、付属のターミネーションバッファー60 μ Lを添加して反応を停止させた。BMX活性は、基質ペプチドピーク高さと生産物（リン酸化基質ペプチド）ピーク高さから求められる生成物の変換率をLabChip EZ Reader II（PerkinElmer）で定量して算出した。

データ解析は、全ての反応コンポーネントを含むコントロールウェルの平均変換率を0%阻害、BMX以外の全ての反応コンポーネントを含むバックグラウンドウェルの平均変換率を100%阻害とし、化合物Bの各試験ウェルの平均変換率から阻害率を計算した。IC₅₀値は被験物質濃度と阻害率によるプロットを基に非線形回帰から求めた。

その結果、化合物BはBMX活性を阻害し、IC₅₀値は0.46nMであった。

[0025] 実施例2 前立腺癌細胞株PC-3細胞における増殖抑制評価

PC-3細胞は、ヒト前立腺癌由来の細胞株であり、BMXの発現およびBMX依存性が確認されている（Cell Death Dis. 2014;5:e1409）。10%牛血清を含有するD-MEM培地（シグマ）を用いて培養したPC-3細胞（American Type Culture Collection、CRL-1435）を約1x10³個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。翌日に終濃度1nMから10 μ Mとなる化合物BのDMSO溶液、又はDMSOのみ（DMSO群）を添加し、5%CO₂存在下、37℃にて5日間培養した。その後、細胞数測定試薬（CellTiter-Glo（登録商標） Luminescent Cell Viability Assay（Promega））を用いて、DMSO群での測定値を生存率100%、培地のみウェルの測定値を生存率0%として細胞生存率を算出した。IC₅₀値は被験物質濃度と細胞生存率によるプロットを基に非線形回帰から求めた。

その結果、化合物BはPC-3細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} 値は800nMであった。

[0026] 実施例3 前立腺癌細胞株DU145細胞における増殖抑制評価

DU145細胞は、ヒト前立腺癌由来の細胞株であり、BMXの発現が確認されている (Cell Death Dis. 2014;5:e1409)。10%牛血清を含有するD-MEM培地 (シグマ) を用いて培養したDU145細胞 (American Type Culture Collection、HTB-81) を約 1×10^3 個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。翌日に終濃度1nMから10 μ Mとなる化合物BのDMSO溶液、又はDMSOのみ (DMSO群) を添加し、5%CO₂存在下、37°Cにて5日間培養した。その後、細胞数測定試薬 (CellTiter-Glo (登録商標) Luminescent Cell Viability Assay (Promega)) を用いて、DMSO群での測定値を生存率100%、培地のみのウェルの測定値を生存率0%として細胞生存率を算出した。 IC_{50} 値は被験物質濃度と細胞生存率によるプロットを基に非線形回帰から求めた。

その結果、化合物BはDU145細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} 値は410nMであった。

[0027] 実施例4 前立腺癌細胞株22Rv1細胞における増殖抑制評価

22Rv1細胞は、ヒト前立腺癌由来の細胞株であり、BMXの発現が確認されている (Oncogene 2006;25:70-78)。10%牛血清を含有するRPMI-1640培地 (シグマ) を用いて培養した22Rv1細胞 (American Type Culture Collection、CRL-2505) を約 1×10^3 個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。翌日に終濃度1nMから10 μ Mとなる化合物BのDMSO溶液、又はDMSOのみ (DMSO群) を添加し、5%CO₂存在下、37°Cにて5日間培養した。その後、細胞数測定試薬 (CellTiter-Glo (登録商標) Luminescent Cell Viability Assay (Promega)) を用いて、DMSO群での測定値を生存率100%、培地のみのウェルの測定値を生存率0%として細胞生存率を算出した。 IC_{50} 値は被験物質濃度と細胞生存率によるプロットを基に非線形回帰から求めた。

その結果、化合物Bは22Rv1細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} 値は560nMであった。

[0028] 実施例5 膀胱癌細胞株UM-UC-3細胞における増殖抑制評価

UM-UC-3細胞は、ヒト膀胱癌由来の細胞株であり、BMXの発現およびBMX依存性が確認されている (PLoS ONE 2011;6(3):e17778)。10%牛血清を含有するR

PMI-1640培地（シグマ）を用いて培養したUM-UC-3細胞（American Type Culture Collection、CRL-1749）を約 2×10^3 個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。翌日に終濃度1nMから10 μ Mとなる化合物BのDMSO溶液、又はDMSOのみ（DMSO群）を添加し、5%CO₂存在下、37℃にて5日間培養した。その後、細胞数測定試薬（CellTiter-Glo（登録商標） Luminescent Cell Viability Assay（Promega））を用いて、DMSO群での測定値を生存率100%、培地のみウェルの測定値を生存率0%として細胞生存率を算出した。IC₅₀値は被験物質濃度と細胞生存率によるプロットを基に非線形回帰から求めた。

その結果、化合物BはUM-UC-3細胞の増殖を抑制し、IC₅₀値は560nMであった。

[0029] 実施例 6 腎細胞癌細胞株OS-RC-2細胞における増殖抑制評価

OS-RC-2細胞は、ヒト腎細胞癌由来の細胞株であり、BMXの発現が確認されている（J. Exp. Clin. Cancer Res. 2014;33:25）。10%牛血清を含有するRPMI-1640培地（シグマ）を用いて培養したOS-RC-2細胞（理研、RCB0735）を約 2×10^3 個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。翌日に終濃度1nMから10 μ Mとなる化合物BのDMSO溶液、又はDMSOのみ（DMSO群）を添加し、5%CO₂存在下、37℃にて5日間培養した。その後、細胞数測定試薬（CellTiter-Glo（登録商標） Luminescent Cell Viability Assay（Promega））を用いて、DMSO群での測定値を生存率100%、培地のみウェルの測定値を生存率0%として細胞生存率を算出した。IC₅₀値は被験物質濃度と細胞生存率によるプロットを基に非線形回帰から求めた。

その結果、化合物BはOS-RC-2細胞の増殖を抑制し、IC₅₀値は620nMであった。

[0030] 実施例 7 PC-3皮下担癌マウスモデルに対する抗腫瘍評価

免疫不全マウス（CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrlj(nu/nu)、雄、4週齢（日本チャールスリバー））の背部に前立腺癌細胞株PC-3細胞を 3×10^6 個/0.1 mL/マウスで皮下移植し、PC-3皮下担癌マウスモデルを作製した。腫瘍体積（ $[\text{短径}]^2 \times \text{長径} / 2$ ）をもとに群分けしたPC-3皮下担癌マウスモデルに対して、0.5%メチ

ルセルローズ溶液（コントロール群：10mL/kg/day、QD、po（n=5））、化合物 B（化合物 B 投与群：100mg/kg/day、QD、po（n=5）、0.5%メチルセルローズ懸濁液として）を14日間投与し、腫瘍体積の変化を経時的に測定した。

その結果、コントロール群では、投与開始日に平均238mm³であった腫瘍体積が、14日後には平均1162mm³まで増加した。一方、化合物 B 投与群では、投与開始日の平均腫瘍体積は242mm³であったが、14日後の平均腫瘍体積は822mm³であった。

[0031] 以上の結果から、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩がBMX活性を阻害することが確認され、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物の有効成分として有用であることが示された。また、前立腺癌細胞株であるPC-3細胞、DU145細胞、22Rv1細胞、膀胱癌細胞株であるUM-UC-3細胞、腎細胞癌細胞株であるOS-RC-2細胞の増殖を抑制することが確認され、これらのBMXに関連する癌への治療効果が確認できた。さらに、前立腺癌細胞株であるPC-3細胞を皮下移植した皮下担癌マウスモデルにおいても、化合物 A モノメタンスルホン酸塩を投与した群において、腫瘍の増殖抑制という顕著な抗腫瘍効果が確認できた。

産業上の利用可能性

[0032] 本発明の医薬組成物の有効成分である、化合物 A 又はその製薬学的に許容される塩は、BMX阻害作用を有し、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物、特に前立腺癌、膀胱癌、及び／又は腎細胞癌の治療用医薬組成物の有効成分として使用できる。

請求の範囲

- [請求項1] 5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド又はその製薬学的に許容される塩を含有する、BMXに関連する癌の治療用医薬組成物。
- [請求項2] BMXに関連する癌が、前立腺癌である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] BMXに関連する癌が、膀胱癌である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項4] BMXに関連する癌が、腎細胞癌である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド又はその製薬学的に許容される塩が、5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド モノメタンスルホン酸塩である、請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項6] BMXに関連する癌の治療用医薬組成物の製造のための、5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド又はその製薬学的に許容される塩の使用。
- [請求項7] BMXに関連する癌の治療のための、5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド又はその製薬学的に許容される塩の使用。
- [請求項8] BMXに関連する癌の治療のための、5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イ

ル)ピペリジン-1-イル]フェニル}アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド
又はその製薬学的に許容される塩。

[請求項9] 5-{[(3R)-1-アクリロイルピロリジン-3-イル]オキシ}-6-エチル-3-
({4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル}
アミノ)ピラジン-2-カルボキサミド又はその製薬学的に許容される塩
の有効量を対象に投与することからなる、BMXが関連する癌の治療方
法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/063246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/497(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)

A61K31/497, A61P35/00, 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.
X Y A	WO 2013/108754 A1 (Astellas Pharma Inc.), 25 July 2013 (25.07.2013), paragraphs [0105], [0108], [0111], [0295] & JP 5532366 B & US 2014/0323463 A1 tables 1 to 3, 137 & EP 2805940 A1	1, 5-9 1, 5-9 2-4
Y A	JP 2011-526299 A (Avila Therapeutics, Inc.), 06 October 2011 (06.10.2011), paragraphs [0325], [1455] to [1456], [1462] to [1468] & WO 2009/158571 A1 paragraphs [00147], [001294] to [001351] & US 2010/0029610 A1 & EP 2361248 A1	1, 5-9 2-4



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

30 June 2016 (30.06.16)

Date of mailing of the international search report

12 July 2016 (12.07.16)

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/JP2016/063246

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2014/025486 A1 (ACEA BIOSCIENCES INC.), 13 February 2012 (13.02.2012), paragraphs [0049], [0381] to [0397] & JP 2015-524468 A & US 9034885 B2 & EP 2880035 A1	1, 5-9 2-4

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/497(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. A61K31/497, A61P35/00, 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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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)
CAplus/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
X	WO 2013/108754 A1 (アステラス製薬株式会社) 2013.07.25,	1、5-9
Y	段落 [0105]、[0108]、[0111]、[0295]	1、5-9
A	& JP 5532366 B & US 2014/0323463 A1 table1-3, table137 & EP 2805940 A1	2-4

☒ 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

3 0 . 0 6 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 7 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
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）

前田 亜希

4 C

3 9 5 6

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
Y A	JP 2011-526299 A (アビラ セラピューティクス, インコーポレイテッド) 2011.10.06, 段落[0325]、[1455]－[1456]、[1462]－[1468] & WO 2009/158571 A1[00147], [001294]－[001351] & US 2010/0029610 A1 & EP 2361248 A1	1、5－9 2－4
Y A	WO 2014/025486 A1 (ACEA BIOSCIENCES INC) 2012.02.13, 段落 [0049]、[0381]－[0397] & JP 2015-524468 A & US 9034885 B2 & EP 2880035 A1	1、5－9 2－4