

(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2015-529665

(P2015-529665A)

(43) 公表日 平成27年10月8日(2015.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07D 401/14 (2006.01)</b>	C07D 401/14 CSP	2G045
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4B063
<b>A61K 31/4545 (2006.01)</b>	A61K 31/4545	4C063
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00	4C084
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 141 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-528990 (P2015-528990)	(71) 出願人	515054000
(86) (22) 出願日	平成25年8月27日 (2013. 8. 27)		ツェーエムエム-フォルシュングスツェン
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月24日 (2015. 4. 24)		トルム フェア モレクラレ メディツイ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/067744		ン ゲーエムペーハー
(87) 国際公開番号	W02014/033136		オーストリア国 エー-1090 ウィー
(87) 国際公開日	平成26年3月6日 (2014. 3. 6)		ン ラツァレットガッセ 14 アーカー
(31) 優先権主張番号	12181920.5	(74) 代理人	110000796
(32) 優先日	平成24年8月27日 (2012. 8. 27)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	13162175.7		
(32) 優先日	平成25年4月3日 (2013. 4. 3)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MTH1阻害剤としてのアミノヘテロアリアル化合物

## (57) 【要約】

本発明は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーに関する。本発明は該化合物を含む医薬組成物に更に関する。本発明の別の態様は、アミノヘテロアリアル化合物の上記(S)-エナンチオマー又は上記医薬組成物の有効性を決定する*in vitro*方法であって、(a)被験体から細胞又は組織サンプルを得る工程と、(b)被験体のNUDT1/MTH1状態を決定する工程とを含み、NUDT1/MTH1陽性細胞又は組織サンプルが効果的な癌の治療及び/又は予防の指標となる、*in vitro*方法に関する。加えて、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーの標的を同定するスクリーニング方法が本明細書に提示される。さらに、本発明において、本明細書に記載の化合物はMTH1の生物活性を阻害する。

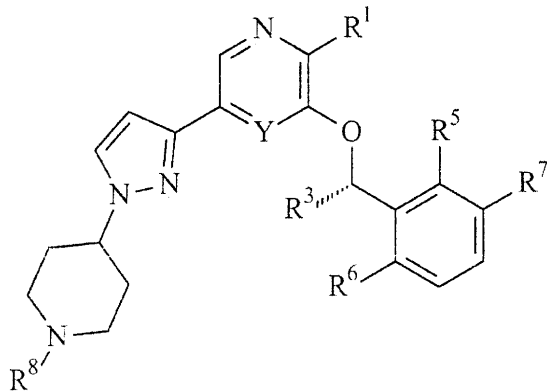
【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体における癌の治療及び/又は予防のために用いられる、  
式(1)によって表される以下の化学構造を有する、アミノヘテロアリアル化合物の(S)  
)-エナンチオマー、又は  
その薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ：

## 【化 1】



10

式 (1)

(式中、

R<sup>1</sup> は -NH<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>H、-OH又は-SHであり、  
R<sup>2</sup> はC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-<sub>6</sub>アルケニル又はC<sub>2</sub>-<sub>6</sub>アルキニルであり、  
R<sup>3</sup> はC<sub>1</sub>-<sub>3</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-<sub>3</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>-<sub>3</sub>アルキニル又はシクロプロピル  
であり、  
YはN又はCR<sup>4</sup>であり、  
R<sup>4</sup> は水素、ハロゲン、C<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>-<sub>6</sub>アルキニル又  
はC<sub>3</sub>-<sub>6</sub>シクロアルキルであり、  
R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>は各々独立してフッ素、塩素、臭素又はヨウ素であり、  
R<sup>8</sup> は水素又は-A-B<sub>n</sub>-Xであり、ここで、  
Aは単結合、-C(=O)-又は-C(=O)CH<sub>2</sub>-であり、  
BはC<sub>1</sub>-<sub>4</sub>アルキレン、C<sub>2</sub>-<sub>4</sub>アルケニレン又は-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-であり、  
nは0、1、2、3、4又は5であり、  
Xは-NHR<sup>2</sup>、-NH<sub>2</sub>、-SH、-OH又はO-アルキルである)。

20

30

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の用途に用いられる、  
R<sup>1</sup> が -NH<sub>2</sub>、-OH又はSHであり、  
R<sup>3</sup> がメチルであり、  
YがCR<sup>4</sup>であり、  
R<sup>4</sup> が水素又はハロゲンであり、  
R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>が各々独立してフッ素又は塩素であり、  
R<sup>8</sup> が水素又は-A-B<sub>n</sub>-Xであり、ここで、  
BがC<sub>1</sub>-<sub>4</sub>アルキレン又は-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-であり、  
nが1、2又は3であり、  
Xが-NH<sub>2</sub>である、  
請求項 1 に記載の化合物、又は  
その薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ。

40

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の用途に用いられる、  
R<sup>8</sup> が水素、  
-C(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、  
-C(=O)CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、又は、

50

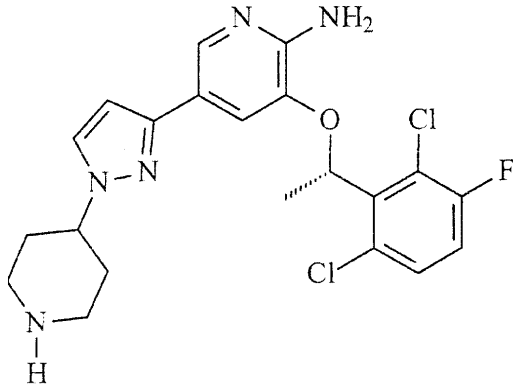
-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>である、  
請求項1又は2に記載の化合物、又は  
その薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ。

【請求項4】

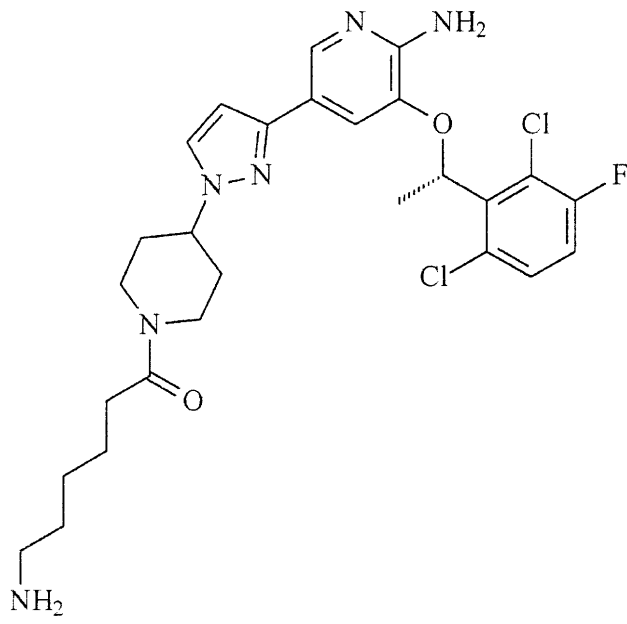
請求項1に記載の用途に用いられる、

式(2)～(5)によって表される以下の化学構造：

【化2】

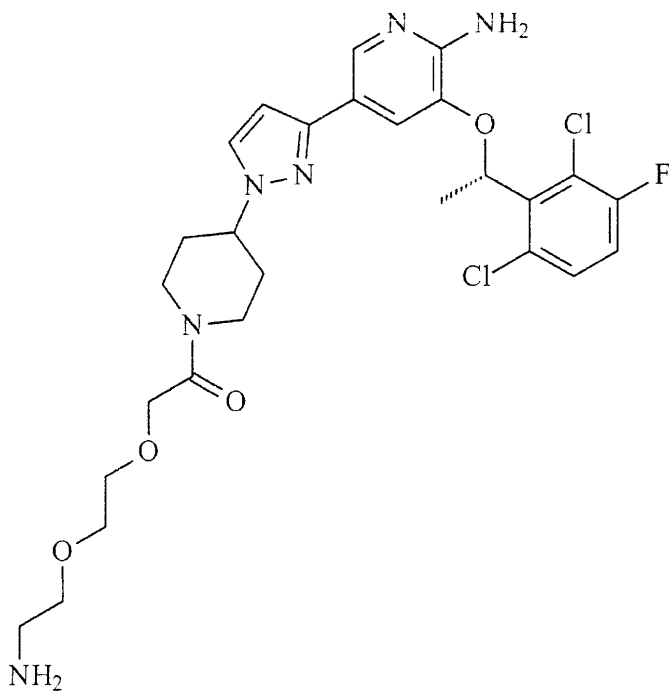


式 (2);



10

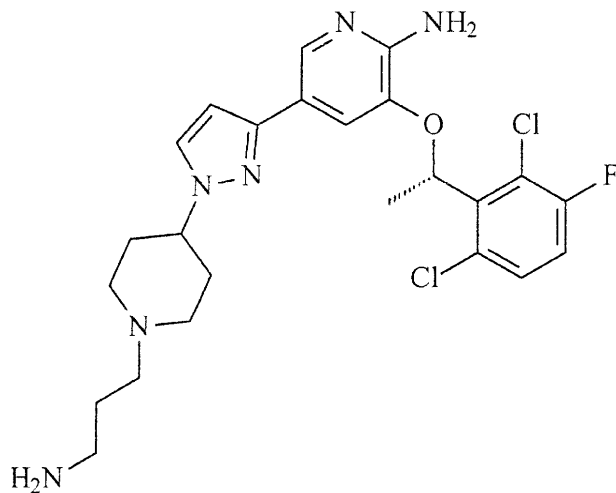
式 (3);



20

30

式 (4)又は



式 (5).

10

の1つを有する、化合物。

## 【請求項5】

癌の治療及び/又は予防に使用される医薬組成物であって、請求項1~4のいずれか一項に記載の化合物と薬学的に許容可能な賦形剤とを含む、医薬組成物。

## 【請求項6】

各々が式(1)~(5)によって表される化学構造の1つを有する少なくとも2つの成分を含む、請求項5に記載の医薬組成物。

20

## 【請求項7】

各々が式(2)~(5)によって表される化学構造の1つを有する少なくとも2つの成分を含む、請求項6に記載の医薬組成物。

## 【請求項8】

前記被験体の癌細胞又は組織が活性化RAS突然変異及び/又は活性化EGFR突然変異を有する、

請求項1~4のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は

請求項5~7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項9】

前記被験体の癌細胞又は組織が活性化RAS突然変異を有する、

請求項1~4及び8のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は

請求項5~8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

## 【請求項10】

前記活性化RAS突然変異が活性化KRAS突然変異である、

請求項8若しくは9に記載の用途に用いられる化合物、又は

請求項8若しくは9に記載の医薬組成物。

## 【請求項11】

被験体における癌の治療及び/又は予防が、該被験体の癌細胞又は組織のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係である、

請求項1~4及び8~10のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は

請求項5~10のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

## 【請求項12】

前記ALK状態がALK生物活性のレベル及び/又はALK発現のレベルである、

請求項11に記載の用途に用いられる化合物、又は

請求項11に記載の医薬組成物。

## 【請求項13】

前記c-Met状態がc-Met生物活性のレベル及び/又はc-Met発現のレベルである、

請求項11に記載の用途に用いられる化合物、又は

50

請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

前記被験体の癌細胞又は組織が A L K の遺伝子突然変異及び / 又は染色体転座を有しない、

請求項 1 ~ 4 及び 8 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は請求項 5 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記染色体転座が E M L 4 - A L K である、  
請求項 1 4 に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 6】

前記被験体の癌細胞又は組織において、 p 2 1 の生物活性及び / 又は発現が低減又は欠如している、

請求項 1 ~ 4 及び 8 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は請求項 5 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記被験体が哺乳動物である、  
請求項 1 ~ 4 及び 8 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 5 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 8】

前記哺乳動物がヒト患者である、  
請求項 1 7 に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記癌が結腸癌、肺癌、乳癌、白血病、リンパ腫、皮膚癌、肝臓癌、膵臓癌、脳腫瘍、腎臓癌、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、前立腺癌、膀胱癌及び食道癌からなる群から選択される、

請求項 1 ~ 4 及び 8 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は請求項 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

前記乳癌がエストロゲン受容体 - 及びプロゲステロン受容体の発現を欠いており、 H E R 2 / N E U 癌遺伝子の過剰発現又は増幅を欠いている、  
請求項 1 9 に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 2 1】

前記乳癌が B R C A 1 及び / 又は B R C A 2 遺伝子突然変異を有する、  
請求項 1 9 若しくは 2 0 に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 1 9 若しくは 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

前記化合物又は医薬組成物を放射線及び / 又は化学療法剤とともに同時投与する、  
請求項 1 ~ 4 及び 8 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 2 3】

前記化学療法剤が D N A 損傷薬、アルキル化剤、 D N A インターカレーター、トポイソメラーゼ阻害剤、 D N A に酸化的損傷をもたらす薬剤、細胞毒性化合物、代謝拮抗物質、 D N A 修復機構を妨げる化合物、 A T M キナーゼ阻害剤、 A T R キナーゼ阻害剤、 C H K 1 / 2 キナーゼ阻害剤、 P A R P 阻害剤、 E G F R 阻害剤、 D N A 依存性タンパク質キナーゼ阻害剤、一般的塩基除去修復阻害剤、 D N A ポリメラーゼ 阻害剤、 O - 6 - メチルグアニンメチルトランスフェラーゼ ( M G M T ) 阻害剤、スルビピン抑制剤、活性酸素種 ( R O S ) を生成する化合物、抗有糸分裂化合物又は以上のいずれかの組合せである、

50

請求項 2 2 に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 2 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記化学療法剤が P A R P 阻害剤及び / 又は E G F R 阻害剤である、  
請求項 2 3 に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記化学療法剤がシクロホスファミド、テモゾロマイド、メルファラン、カルムスチン、  
プスルファン、シスプラチン、プロカルバジン、アントラサイクリン、カンプトテシン、  
イリノテカン、エトポシド、過酸化水素、レゾルシノール、キノン、メトトレキサート  
、5 - フルオロウラシル、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、オラパリブ、A  
B T - 8 8 8、ネオカルジノスタチン、プレオマイシン、デシタピン、5 - アザシトシン  
、メトキシアミン塩酸塩 ( T R C 1 0 2 )、ロメグアトリブ、ピペルロングミン、ケルセ  
チン、ピンクリスチン、タキソール、ミトキサントロン、Y M 1 5 5、エルロチニブ、ゲ  
フィチニブ、ラパチニブ又は以上のいずれかの組合せである、  
請求項 2 2 若しくは 2 3 に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 2 2 若しくは 2 3 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 4 及び 8 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の用途に用いられる化合物、又は  
請求項 5 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物  
の有効性を決定する *in vitro* 方法であって、

20

( a ) 被験体から細胞又は組織サンプルを得る工程と、

( b ) 前記被験体の N U D T 1 / M T H 1 状態を決定する工程と、

を含み、N U D T 1 / M T H 1 陽性細胞又は組織サンプルが効果的な癌の治療及び / 又は  
予防の指標となる、*in vitro* 方法。

【請求項 2 7】

前記 N U D T / M T H 1 状態が M T H 1 生物活性のレベル及び / 又は M T H 1 発現のレ  
ベルである、請求項 2 6 に記載の *in vitro* 方法。

【請求項 2 8】

( c ) 前記被験体の R A S 状態を決定する工程、

30

を更に含み、N U D T 1 / M T H 1 に対して陽性かつ活性化 R A S 突然変異に対して陽性  
の細胞又は組織サンプルが、効果的な癌の治療及び / 又は予防の指標となる、請求項 2 6  
又は 2 7 に記載の *in vitro* 方法。

【請求項 2 9】

( c ) 前記細胞又は組織サンプルが活性化 R A S 突然変異を有するか否かを決定する工  
程、

を更に含み、N U D T 1 / M T H 1 に対して陽性かつ活性化 R A S 突然変異に対して陽性  
の細胞又は組織サンプルが、効果的な癌の治療及び / 又は予防の指標となる、請求項 2 6  
又は 2 7 に記載の *in vitro* 方法。

【請求項 3 0】

40

( d ) 前記細胞又は組織サンプルにおいて p 2 1 の発現及び / 又は生物活性が低減又は  
欠如しているか否かを決定する工程、

を更に含み、N U D T 1 / M T H 1 に対して陽性であり、p 2 1 の発現及び / 又は生物活  
性が低減又は欠如している細胞又は組織サンプルが、効果的な癌の治療及び / 又は予防の  
指標となる、請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の *in vitro* 方法。

【請求項 3 1】

前記細胞又は組織サンプルが癌細胞又は組織である、請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項  
に記載の *in vitro* 方法。

【請求項 3 2】

工程 ( b ) 及び / 又は ( c ) 及び / 又は ( d ) が P C R ( ポリメラーゼ連鎖反応 )、遺

50

伝子シーケンシング、ARMS（増幅不応性突然変異系）、ペプチド核酸-ロックド核酸（PNA-LNA）PCRクランプ、PCR-インベダー、SNaPshot、PCR/HRMA/dHPLC、PCR/fIRFLP、蛍光in-situハイブリダイゼーション（FISH）、免疫組織化学（IHC）、RT-PCR、遺伝子アレイ及び遺伝子チップからなる群から選択される少なくとも1つの検出方法を含む、請求項26~31のいずれか一項に記載のin vitro方法。

【請求項33】

請求項26~32のいずれか一項に記載のin vitro方法におけるキットの使用であって、該キットがNUDT1/MTH1を検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を含む、使用。

10

【請求項34】

前記キットがRASを検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を更に含む、請求項33に記載の使用。

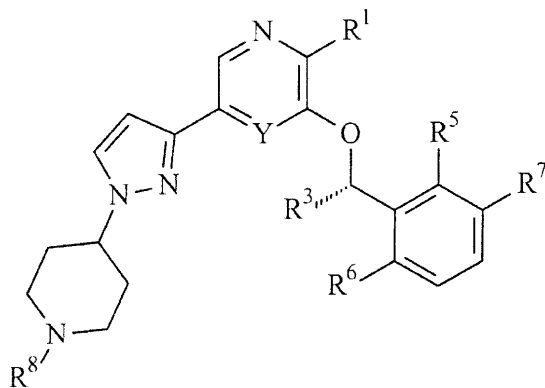
【請求項35】

前記キットがp21を検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を更に含む、請求項33又は34に記載の使用。

【請求項36】

式(1)によって表される以下の化学構造：

【化3】



20

式 (1)

30

(式中、

$R^1$  は  $-NH_2$ 、 $-NR^2H$ 、 $-OH$  又は  $-SH$  であり、

$R^2$  は  $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル又は  $C_{2-6}$  アルキニルであり、

$R^3$  は  $C_{1-3}$  アルキル、 $C_{2-3}$  アルケニル、 $C_{2-3}$  アルキニル又はシクロプロピルであり、

$Y$  は  $N$  又は  $CR^4$  であり、

$R^4$  は水素、ハロゲン、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{2-6}$  アルキニル又は  $C_{3-6}$  シクロアルキルであり、

$R^5$ 、 $R^6$  及び  $R^7$  は各々独立してフッ素、塩素、臭素又はヨウ素であり、

$R^8$  は水素又は  $-A-B_n-X$  であり、ここで、

40

$A$  は単結合、 $-C(=O)-$  又は  $-C(=O)CH_2-$  であり、

$B$  は  $C_{1-4}$  アルキレン、 $C_{2-4}$  アルケニレン又は  $-(OCH_2CH_2)-$  であり、

$n$  は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、

$X$  は  $-NHR^2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-OH$  又は  $O$ -アルキルである)、

を有するアミノヘテロアリール化合物の(S)-エナンチオマー、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグの標的を同定するスクリーニング方法であって、

(a) 細胞溶解物を得る工程と、

(b) 前記アミノヘテロアリール化合物と前記細胞溶解物とを接触させる工程と、

(c) 分子が前記アミノヘテロアリール化合物に結合するか否かを決定する工程と、

50

を含み、分子が前記アミノヘテロアリール化合物に結合することが見出された場合に、かかる分子を該アミノヘテロアリール化合物の標的として同定する、スクリーニング方法。

【請求項 37】

式(1)の化合物中、

$R^1$  が  $-NH_2$ 、 $-OH$  又は  $-SH$  であり、

$R^3$  がメチルであり、

Y が  $CR^4$  であり、

$R^4$  が水素又はハロゲンであり、

$R^5$ 、 $R^6$  及び  $R^7$  が各々独立してフッ素又は塩素であり、

$R^8$  が水素又は  $-A-B_n-X$  であり、ここで、

B が  $C_{1-4}$  アルキレン又は  $-(OCH_2CH_2)-$  であり、

n が 1、2 又は 3 であり、

X が  $-NH_2$  である、

請求項 36 に記載のスクリーニング方法。

10

【請求項 38】

式(1)の化合物中、 $R^8$  が水素、

$-C(=O)CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-NH_2$ 、

$-C(=O)CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH_2$ 、又は、

$-CH_2CH_2CH_2-NH_2$  である、

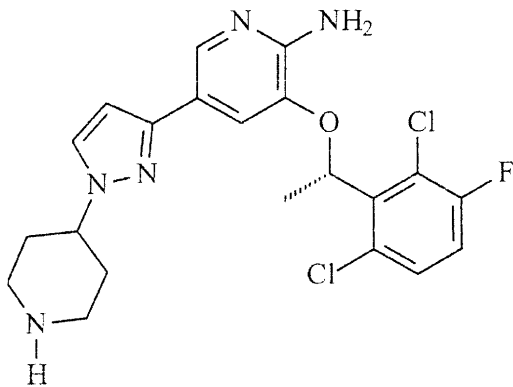
請求項 36 又は 37 に記載のスクリーニング方法。

20

【請求項 39】

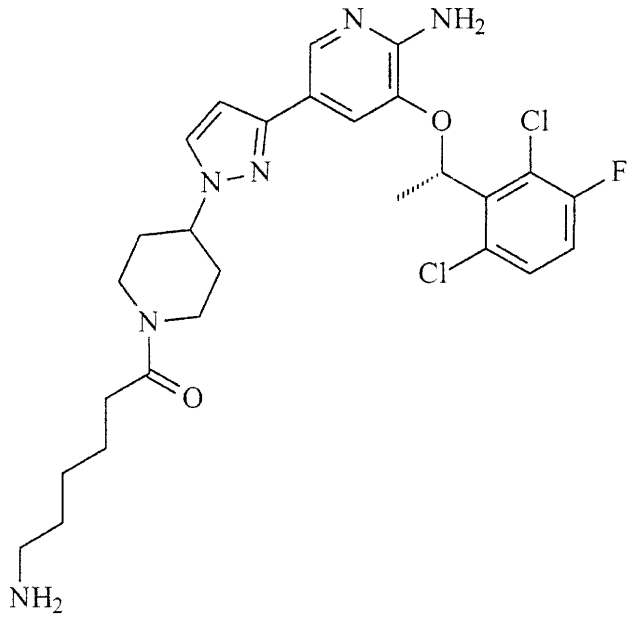
前記化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグが、式(2)～(5)によって表される以下の化学構造：

【化 4】



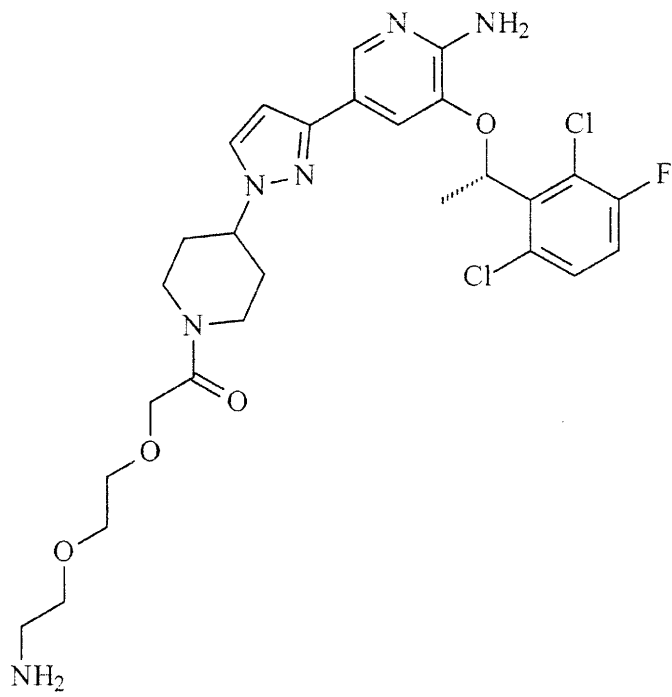
式 (2);

30



10

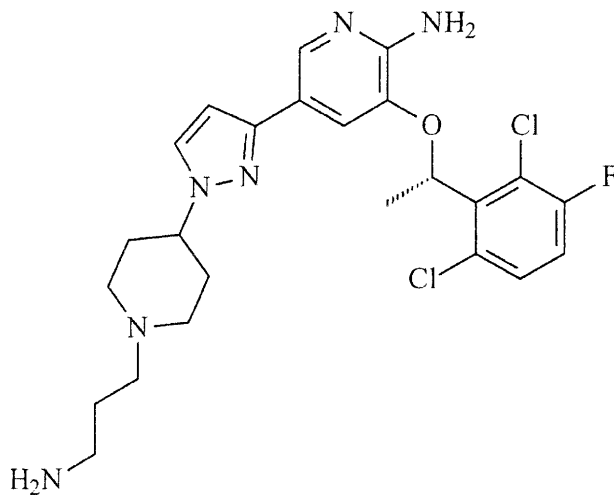
式 (3);



20

30

式 (4) 又は



式 (5).

10

の1つを有する、請求項36に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項40】

(d) アミノヘテロアリアル化合物の前記(s) - エナンチオマーが前記分子の生物活性を変化させるか否かを決定する工程、

を更に含み、アミノヘテロアリアル化合物の前記(S) - エナンチオマーが前記分子の生物活性を変化させることが見出された場合に、かかる分子をアミノヘテロアリアル化合物の該(S) - エナンチオマーの標的として同定する、請求項36~39のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

20

## 【請求項41】

前記細胞溶解物が癌患者、樹立癌細胞株又は非ヒト動物の細胞又は組織サンプルに由来する、請求項36~40のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項42】

前記生物活性の変化が生物活性の阻害である、請求項40又は41に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項43】

前記化合物がMTH1の生物活性を阻害する、請求項1~4及び8~25のいずれか一項に記載の使用される化合物、請求項5~25のいずれか一項に記載の医薬組成物、請求項26~32のいずれか一項に記載の*in vitro*方法、請求項33~35のいずれか一項に記載の使用、又は請求項36~42のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S) - エナンチオマーに関する。本発明は該化合物を含む医薬組成物に更に関する。本発明の別の態様は、アミノヘテロアリアル化合物の上記(S) - エナンチオマー又は上記医薬組成物の有効性を決定する*in vitro*方法であって、(a)被験体から細胞又は組織サンプルを得る工程と、(b)被験体のNUDT1/MTH1状態を決定する工程とを含み、NUDT1/MTH1陽性細胞又は組織サンプルが効果的な癌の治療及び/又は予防の指標となる、*in vitro*方法に関する。加えて、アミノヘテロアリアル化合物の(S) - エナンチオマーの標的を同定するスクリーニング方法が本明細書に提示される。さらに、本発明において、本明細書に記載の化合物はMTH1の生物活性を阻害する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒト使用を対象とする薬物は、有益な効果が潜在的副作用を上回ることを確実にするた

50

めに、最終的に患者に適用する前に広範な毒物学的研究を必要とする。しかしながら、或る特定のオフターゲット効果は、長期使用後及びより広範な患者コホートを化合物に曝露した後にしか見ることができない。これらの条件は標準臨床試験において完全には評価することができないことが明らかである。BCR - A b l キナーゼ阻害剤ダサチニブの化学的プロテオーム分析から、例えばこの化合物が慢性骨髄性白血病 (CML) 患者において BTK 及び T E C キナーゼの阻害のために非定型感染症を引き起こし得ることが解明された<sup>1</sup>。患者に対する潜在的にマイナスの結果を除き、或る特定の薬物が、その臨床的有効性が幾つかの細胞タンパク質及び全て疾患に関連するそれぞれのシグナル伝達経路の同時干渉によるものであることを意味する、いわゆる「多重薬理 (polypharmacology)」を示し得る<sup>2</sup>。このため、これらのオフターゲット活性も有益であり、患者にとって懸念すべきものではない可能性がある。しかしながら、薬物の分子標的プロファイル (すなわち遺伝子 - 薬物インタラクトーム) に関する広範な知識は、規定の分子的損傷に基づく患者の特異的な選択により治療有効性を更に向上し、副作用の予防を改善する可能性がある (「患者の層別化」)。さらに、新たな明白な患者群が、当初確立された標的とは独立して選択的にオフターゲット効果から恩恵を受ける場合がある。最終的に、この特に関連したオフターゲットに関する知識は、同じ又は異なる臨床状況において新規の標的化治療剤に対してより特異的なモジュレーターの開発を可能にするリード構造をもたらす場合もある。第2の医学的使用をかけるアプローチによって臨床的に確立された薬物について発見することができれば、当局による承認プロセスを大幅に加速することができるため、患者及び製薬会社はいずれもこの「薬物再活用」の恩恵を受けることができる。標的デコンボリューション戦略の中でも、化学プロテオミクスがあらゆる *i n v i t r o* スクリーニング戦略に優る、分子の細胞インタラクトームを解明する最も強力な技法である。第一に、*i n v i t r o* アッセイはキナーゼ等の或る特定のサブプロテオーム (subproteomes) に限定されるが、化学プロテオミクス実験では対象の化合物をキナーゼ、ヒストン脱アセチル化酵素だけでなく、転写因子等を含む全ての酵素群を包含する完全なプロテオームに曝露する。特に、化学プロテオミクスのみがその天然存在度並びにリン酸化及びアセチル化等の翻訳後修飾 (PTM) の状態におけるタンパク質の評価を可能とする。

#### 【0003】

クリゾチニブ (PF - 02341066、ザーコリ (Xalkori) (登録商標)) は、Pfizerによって開発された未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 及び肝細胞成長因子受容体キナーゼ (c - Met) の新規の二重阻害剤である<sup>3</sup>。クリゾチニブは食品医薬品局 (FDA) によって初めて承認された ALK キナーゼ阻害剤であり、ALK 陽性腫瘍と診断された患者の治療に使用される。異常な ALK シグナル伝達は形質転換、増殖を誘導し、細胞周期停止及びアポトーシスに拮抗する。発癌 ALK 活性の背後にある分子的損傷は、ALK 遺伝子増幅、突然変異又は染色体転座、例えば EML4 - ALK と関連し得る<sup>4</sup>。EML4 - ALK は、棘皮動物微小管関連タンパク質様<sup>4</sup> 及び ALK 遺伝子 (EML4 - ALK) からなる発癌融合タンパク質である<sup>5</sup>。この転座は非小細胞肺癌 (NSCLC) のおよそ 3% ~ 13% の腺癌において生じ、報告された一症例を除き、EGFR 又は KRAS の突然変異とは相互排他的であると考えられる<sup>6</sup>。患者は、EML4 - ALK を検出する必須の蛍光 *i n s i t u* ハイブリダイゼーション (FISH) 分析に基づきクリゾチニブでの治療について選択される。クリゾチニブは、未分化大細胞リンパ腫 (ALCL)、神経芽細胞腫 (NB) 及び炎症性筋線維芽細胞性腫瘍 (IMT) 等の他の ALK 陽性腫瘍においても疾患の制御から顕著な無進行生存及び寛解に及ぶ高い臨床的利益を示す<sup>7</sup>。

#### 【0004】

クリゾチニブの (R) - エナンチオマーが、c - Met 活性の阻害においてラセミ型クリゾチニブよりも僅かに強力であり、クリゾチニブの (S) - エナンチオマー (本明細書で (S) - クリゾチニブとも呼ばれる) よりも顕著に強力であることが示されている<sup>9</sup>。c - Met 活性の阻害における (R) - クリゾチニブとクリゾチニブの (S) - エナンチオマーとの異なる能力は、c - Met に結合するクリゾチニブの共結晶構造において解明

10

20

30

40

50

された特異的結合と一致する<sup>9</sup>。実際に、臨床的には(R)-クリゾチニブのみが使用されている。加えて、上記に示したように、クリゾチニブがALK陽性及びc-Met依存性細胞において細胞増殖を潜在的に阻害することが全般的理解である<sup>3, 23</sup>。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

癌は経済先進国における死因の第1位であるとともに、発展途上国における死因の第2位である(World Health Organization, The Global Burden of Disease: 2004 Update, Geneva: World Health Organization; 2008; Jemal (2011) CA Cancer J Clin. 61: 69-90)。加えて、癌を標的とし、例えばALK陽性及び/又はc-Met依存性の選択癌細胞又は組織ではなく例えばRAS、例えばKRAS依存性癌/癌細胞に限定される新規の療法の所望されている。したがって、本発明の根底にある技術的課題は増殖性疾患、特に癌性疾患/癌の医学的介入のための手段及び方法を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

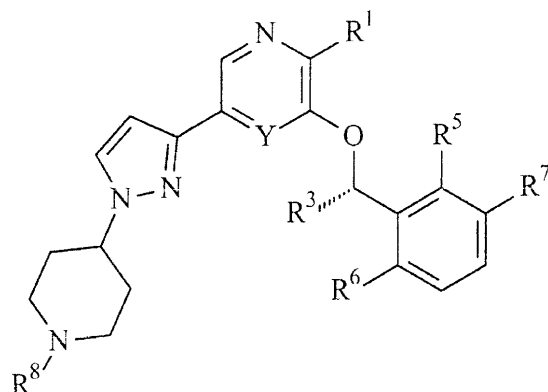
この技術的課題は本明細書に提示され、特許請求の範囲において特徴付けられる実施形態によって解決される。

【0007】

したがって、本発明は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用されるアミノヘテロアリール化合物の(S)-エナンチオマー、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグであって、該化合物が式(1)によって表される以下の化学構造

20

【化1】



30

式 (1)

(式中、

R<sup>1</sup> は -NH<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>H、-OH 又は -SH であり、

R<sup>2</sup> は C<sub>1</sub>-6 アルキル、C<sub>2</sub>-6 アルケニル 又は C<sub>2</sub>-6 アルキニル であり、

R<sup>3</sup> は C<sub>1</sub>-3 アルキル、C<sub>2</sub>-3 アルケニル、C<sub>2</sub>-3 アルキニル 又は シクロプロピル であり、

40

Y は N 又は CR<sup>4</sup> であり、

R<sup>4</sup> は 水素、ハロゲン、C<sub>1</sub>-6 アルキル、C<sub>2</sub>-6 アルケニル、C<sub>2</sub>-6 アルキニル 又は C<sub>3</sub>-6 シクロアルキル であり、

R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> 及び R<sup>7</sup> は 各々独立してフッ素、塩素、臭素 又は ヨウ素 であり、

R<sup>8</sup> は 水素 又は -A-B<sub>n</sub>-X であり、ここで、

A は 単結合、-C(=O)- 又は -C(=O)CH<sub>2</sub>- であり、

B は C<sub>1</sub>-4 アルキレン、C<sub>2</sub>-4 アルケニレン 又は -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)- であり、

n は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、

X は -NHR<sup>2</sup>、-NH<sub>2</sub>、-SH、-OH 又は O-アルキル である) を有する、

アミノヘテロアリール化合物の(S)-エナンチオマー、又はその薬学的に許容可能な塩

50

、溶媒和物若しくはプロドラッグに関する。

【0008】

本発明において、驚くべきことに、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(例えば、(S)-3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミン;本明細書で「クリゾチニブの(S)-エナンチオマー」とも称される)をRAS依存性癌の治療又は予防に用いることができることが見出された。

【0009】

クリゾチニブの(S)-エナンチオマーは良好な発癌キナーゼc-Metの阻害剤ではないため、抗癌薬として有用でないことが従来科学的見解である。特に、Cui (2011) J. Med. Chem. 54: 6342-6363は、癌の治療のためのクリゾチニブ(すなわち(R)-クリゾチニブ)の使用を開示している。この従来技術の研究では、クリゾチニブが活性化c-Met又はALK融合タンパク質を発現する細胞において抗腫瘍効果を有することが結論付けられている。重大なことには、Cui(前掲)は、クリゾチニブ(すなわち(R)-クリゾチニブ)とは対照的に、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーがc-Metを阻害しない又は(仮にあったとしても)殆ど阻害しないことを更に開示している。クリゾチニブがc-Metを効果的に阻害する(一方で(S)-エナンチオマーはc-Met阻害活性を有しない)という従来技術における発見は、(R)-クリゾチニブがc-Met結合ポケットに特異的に結合するという事に起因すると考えられた(Cui(前掲))。c-Metの阻害は、癌の治療に必要とされないため、Cui(前掲)はクリゾチニブの(S)-エナンチオマーによって癌を治療することはできないと教示している。加えて、国際公開第2006/021881号は、物質3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミンの純粋な(R)-エナンチオマー(すなわちクリゾチニブ)が、クリゾチニブのラセミ体よりも著しく良好にc-Metを阻害することを開示している。このため、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)が実質的又は効果的にc-Metを阻害しないため、抗癌薬として好適でないということが従来技術における共通理解である。これと一致して、従来技術ではクリゾチニブ(すなわち(R)-クリゾチニブ)のみが癌細胞の成長の阻害に使用され、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーは使用されていない。

【0010】

このため、従来技術における当業者には、これら2つのエナンチオマー化合物が完全に異なる生物学的挙動を有することが教示される。したがって、当業者は、クリゾチニブの(R)-エナンチオマーの生物活性からアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(例えばクリゾチニブの(S)-エナンチオマー)の活性を予想することができない。

【0011】

さらに、従来技術では、活性化ALK再構成がRASの突然変異とは相互排他的であることが見出されているため、クリゾチニブ(すなわち(R)-クリゾチニブ)がRAS(例えばKRAS)依存性癌の治療に好適でないことが直接的に及び明確に教示される(Gainor (2013) Clinical Cancer Research 19, 4273-4281)。これと一致して、下記の例示的な実施例では、c-Met阻害がKRAS突然変異SW480細胞の成長を抑制することが示される。しかしながら、本発明者らは本明細書において、下記の例示的な実施例に実証されるように、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)が*in vitro*及び*in vivo*でのRAS(例えばKRAS)突然変異癌細胞の阻害において極めて強力であることを示す。したがって、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーがRAS依存性癌の治療又は予防に有用であるという本発明の発見は、利用可能な科学的証拠に基づいて予測することができなかった。

【0012】

言い換えると、従来技術では、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーではなく(R)

10

20

30

40

50

- エナンチオマーが癌の治療に有用であり、(R) - エナンチオマーがRAS依存性癌の治療に好適でないことが教示されている。このことは、クリゾチニブの純粋な(S) - エナンチオマーのようなアミノヘテロアリアル化合物の(S) - エナンチオマーが癌、特にRAS依存性癌の阻害において極めて強力であるという本発明の発見と著しく相違している。

【0013】

さらに、癌において活性化ALKが活性化RASとは相互排他的であるため、クリゾチニブ(すなわち(R) - クリゾチニブ)はRAS依存性癌の治療に好適でない。驚くべきことに、本明細書に提示されるアミノヘテロアリアル化合物の(S) - エナンチオマー(例えばクリゾチニブの(S) - エナンチオマー)は、癌、特に活性化RAS突然変異(例えばK - RASの活性化突然変異)を有する癌の治療に効果的である。

10

【0014】

さらに、下記の実施例及び添付の図面から明らかなように、驚くべきことに、癌細胞(複数の場合もあり)又は癌組織を、対応するキナーゼが該細胞(複数の場合もあり)及び/又は組織(複数の場合もあり)において活性/機能的でなくとも、キナーゼ阻害剤で首尾よく治療することができることが本発明において見出された。かかるキナーゼの一例は本明細書に記載の未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)である。本明細書で開示される抗ALKキナーゼ阻害剤が機能的であり、該キナーゼが全く存在しない若しくは活性でないか、又は該キナーゼの活性が単に低減した細胞において抗癌剤として使用することができることを見出され、本明細書に報告された。本明細書で示され、説明されるように、ALK阻害剤が未分化リンパ腫キナーゼ、すなわち(ヒト)mutTホモログ1/NUDT1/MTH1、すなわちトリホスファターゼ(本明細書では7, 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニン - トリホスファターゼ)とは異なる驚くべき標的を有することが更に見出された。本明細書においてキナーゼ阻害剤が逆の触媒活性を有する酵素の活性の阻害において首尾よく使用されることは極めて(insofar very)驚くべきことである。

20

【0015】

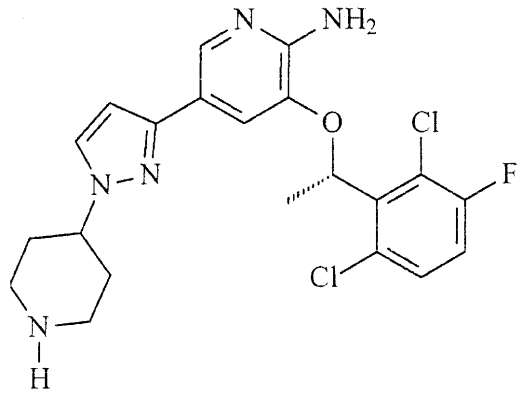
本発明において、「NUDT1」は遺伝子に関し、「MTH1」は上記のトリホスファターゼの発現タンパク質に関する。

【0016】

本発明は、R<sup>1</sup>が-NH<sub>2</sub>、-OH又は-SHであり、R<sup>3</sup>がメチルであり、YがCR<sup>4</sup>であり、R<sup>4</sup>が水素又はハロゲンであり、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>が各々独立してフッ素又は塩素であり、R<sup>8</sup>が水素又は-A-B<sub>n</sub>-Xであり、ここでBがC<sub>1-4</sub>アルキレン又は-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-であり、nが1、2又は3であり、Xが-NH<sub>2</sub>である上記の式(1)の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグに関する。より好ましい実施形態では、本発明は、R<sup>8</sup>が水素、-C(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、-C(=O)CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>又は-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>である上記の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグに関する。最も好ましい実施形態では、本発明は式(2)~(5)によって表される以下の化学構造:

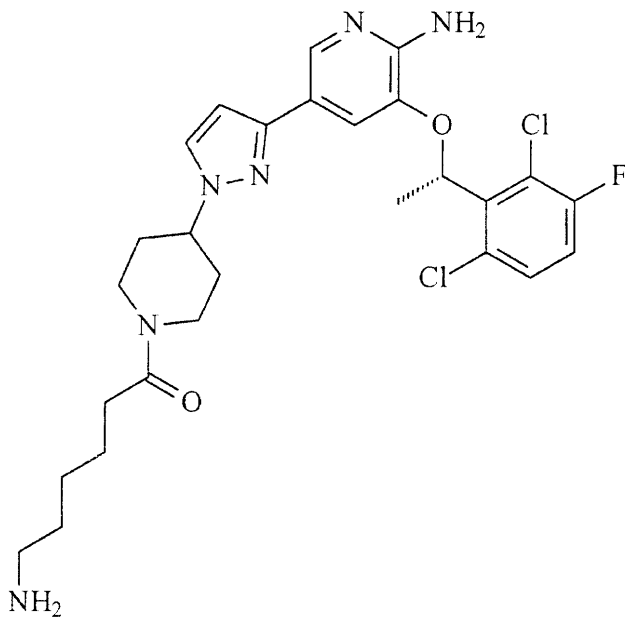
30

【化 2】



10

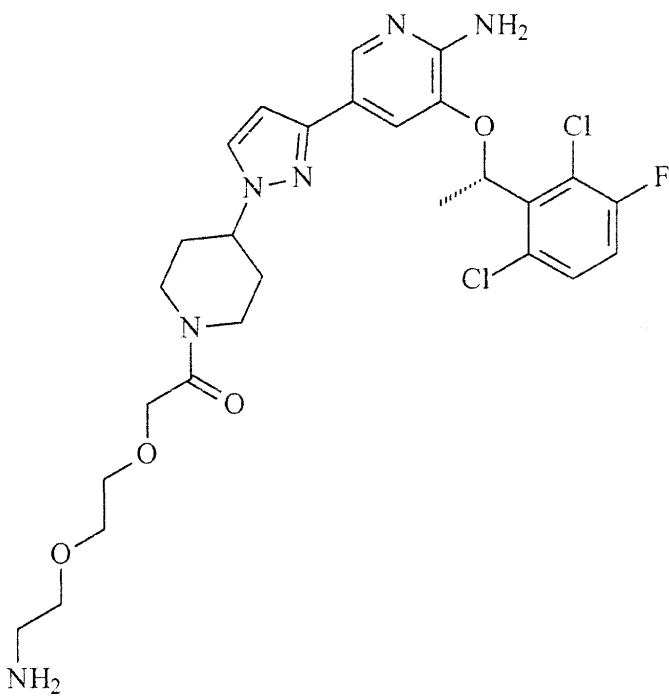
式 (2);



20

式 (3);

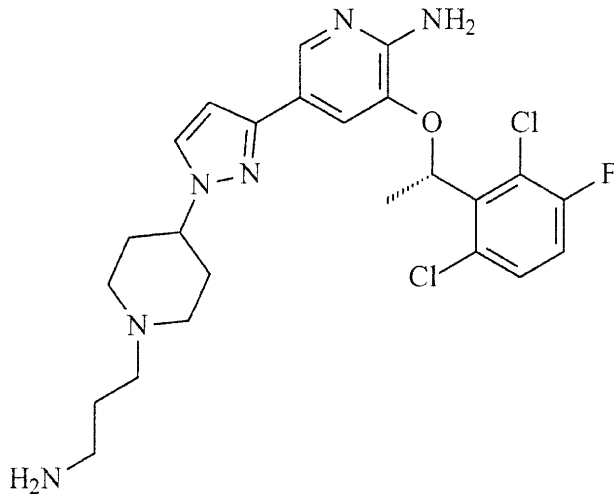
30



40

式 (4) 又は

50



式 (5).

10

の1つを有する、上記の化合物に関する。

## 【0017】

本発明は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用される本明細書で規定されるアミノヘテロアリール化合物であって、該アミノヘテロアリール化合物がその(S)-エナンチオマー配置にある、アミノヘテロアリール化合物に関する。

20

## 【0018】

したがって、本発明は、かかる治療を必要とする被験体において癌を治療及び/又は予防する方法であって、該被験体に治療的に有効な量の本明細書で規定されるアミノヘテロアリール化合物の(S)-エナンチオマーを投与することを含む、方法に関する。したがって、本発明は、かかる治療(治療的又は予防的)を必要とする、癌を患う被験体を治療する手段及び方法を提供する。治療及び/又は予防が癌のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係であることに留意されたい。したがって、治療及び/又は予防対象の癌はALK陰性癌(すなわち、活性化ALK異常を有しない癌)及び/又はc-Met陰性癌であり得る。

## 【0019】

このため、本発明の一態様は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用される上記のアミノヘテロアリール化合物の(S)-エナンチオマーであって、治療及び/又は予防が上記被験体の癌細胞又は組織のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係である、アミノヘテロアリール化合物の(S)-エナンチオマーに関する。ALK状態はALK生物活性のレベル及び/又はALK発現のレベルであり得る。ALK生物活性のレベルは、例えばALKキナーゼ活性を測定することによって決定することができる。患者におけるALKキナーゼ活性を測定するために、該患者の癌細胞又は組織を単離し、ALKの下流の標的のリン酸化を、リン酸化特異的抗体を用いるウエスタンブロット法によって決定することができる。ALK発現のレベルは、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リアルタイムPCR(RT-PCR)又はウエスタンブロット法によって決定することができる。ALK生物活性及び/又はALK発現が上記癌細胞又は組織において健常対照者のサンプルと比較して増大している場合に、癌細胞又は組織のALK状態は陽性である。ALK状態(すなわち、ALK生物活性のレベル及び/又はALK発現のレベル)がALK遺伝子における活性化異常(例えば染色体転座)の存在に依存することが当該技術分野で一般に知られている。例えば、ALK陽性癌細胞又は組織は、ALK遺伝子が活性化異常(EML4-ALK又はキナーゼドメイン活性化突然変異、例えばALK F1174L等)を有する癌細胞又は組織に関する。これと一致して、ALK陰性癌細胞又は組織は、ALK遺伝子が活性化異常(EML4-ALK又はキナーゼドメイン活性化突然変異等)を有しない癌細胞又は組織に関する。活性化ALK異常の存在は、例えばシーケンシング、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リアルタイムPCR(RT-PCR)又はウエスタンブロット法によって決

30

40

50

定することができる。

【0020】

上記のように、本明細書で提供されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーは、癌のc-Met状態とは無関係の癌の治療に有用である。本発明によると、c-Met状態はc-Met生物活性のレベル及び/又はc-Met発現のレベルであり得る。c-Met生物活性のレベルはc-Metのキナーゼ活性を測定することによって決定することができる。患者におけるc-Metキナーゼ活性を測定するために、該患者の癌細胞又は組織を単離し、c-Metの下流の標的のリン酸化を、リン酸化特異的抗体を用いるウエスタンブロット法によって決定することができる。c-Met発現のレベルは、例えばPCR、RT-PCR又はウエスタンブロット法によって決定することができる。c-Met生物活性及び/又はc-Met発現が上記癌細胞又は組織において健常対照者のサンプルと比較して増大している場合に、癌細胞又は組織のc-Met状態は陽性である。例えば、c-Met状態はc-Metにおける活性化突然変異の結果として陽性であり得る。かかる活性化突然変異は、健常対照被験体の細胞又は組織におけるc-Metの生物活性と比較した、癌細胞又は組織におけるc-Metの生物活性の増大をもたらし得る。

10

【0021】

驚くべきことに、本明細書で提供されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(例えばクリゾチニブの(S)-エナンチオマー)は、下記の実施例の*in vitro*及び*in vivo*実験において実証されるように、癌のALK-又はc-Met状態とは無関係の(すなわち、癌細胞又は組織におけるALK又はc-Metの生物活性のレベル又は発現のレベルとは無関係の)癌の治療に好適である。このため、上記癌細胞又は組織はALK陰性(すなわち活性化ALK異常を有し得ない)及び/又はc-Met陰性(すなわち、健常対照被験体の細胞又は組織と比較したc-Met又はキナーゼ活性化突然変異の発現の増大を有し得ない)であり得る。このことは、クリゾチニブ(すなわち(R)-クリゾチニブ)がALK陽性及びc-Met陽性癌細胞にしか効果的でないと記載されているため驚くべきことである。

20

【0022】

本明細書に記載され、下記の実施例で説明されるように、驚くべきことに、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)及び肝細胞成長因子受容体キナーゼ(c-Met)の二重阻害剤であるクリゾチニブが、癌遺伝子誘導悪性形質転換及び癌細胞の老化からの逃避に関連付けられていたヒトMutTホモログ1(MTH1)である7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン-トリホスファターゼの極めて強力な阻害剤であることが見出された。さらに、驚くべきことに、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーが、このエナンチオマーがラセミ型又は(R)-クリゾチニブよりも著しく良好なMTH1阻害活性を示したため、特に良好なMTH1阻害剤であることが見出された。

30

【0023】

これらの発見は、現在、クリゾチニブがALK陽性及びc-Met依存性細胞でしか細胞増殖を効果的に阻害しないことが一般的な理解であるために、極めて驚くべきことである<sup>3, 23</sup>。さらに、臨床的に、(R)-クリゾチニブしか使用されないことを考えると、このエナンチオマーがc-Metキナーゼ活性の阻害において(S)-エナンチオマーよりも著しく強力であることが示されることから<sup>9</sup>、本明細書に記載の発明は更に驚くべきものである。

40

【0024】

薬物の細胞内標的プロファイルに関する広範な知識は、患者の層別化の重要な前提条件であり、それにより副作用を最小限に抑える一方で治療有効性が最大限に高められる。その上、癌等の深刻な疾患の治療に特に活性のあることが証明された薬物は、依然として付加的な又は更には完全に未知の作用様式を有する場合があります、これが解明されると新規の治療剤の開発につながる可能性がある。

【0025】

50

クリゾチニブは、キナーゼ活性部位内のアデノシン三リン酸（ATP）結合ポケットに結合することによって悪性ALKシグナル伝達を無効にするため、（ATP）競合的キナーゼ阻害剤として作用する。本発明の発明者らは、クリゾチニブの高い有効性が、癌細胞の生存に関連するALK以外の幾つかの標的による干渉に少なくとも部分的に起因し得ると仮定し、化学プロテオミクスによるクリゾチニブのプロファイルを開始した。特に、下記の実施例に示されるように、臨床的に極めて効率的なファーストインクラスの二重ALK/c-Metキナーゼ阻害剤クリゾチニブ（ザーコリ（登録商標））の潜在的に関連するオンターゲット又はオフターゲットを調査するために、本発明の発明者らは、幾つかの腫瘍細胞株を種々の遺伝子病変を用いて調査する化学プロテオミクスアプローチを適用した。幾つかのヒト腫瘍細胞株を調査することで、本発明の発明者らは驚くべきことに、突然変異体RASによって誘導される悪性形質転換に関連付けられており、腫瘍が癌遺伝子誘導老化（OIS）障壁を克服することを可能にすることが示されている予期せぬ非キナーゼ標的ヒトMTH1を含む、幾つかの未知のクリゾチニブのオフターゲットを同定した。

10

#### 【0026】

特に、下記の実示的な実施例で実証されるように、ラセミ型クリゾチニブによるMTH1触媒活性の阻害が*in vitro*発光ベース酵素アッセイにおいて確認することができ、低いナノモル効力が示された。ラセミ型クリゾチニブは、コメットアッセイによって実証されるようにMRC-5肺線維芽細胞におけるDNA損傷も誘導した。加えて、（R）-クリゾチニブではなく（S）-クリゾチニブがコメットアッセイにおいて顕著なテールモーメントをもたらした。同時に、細胞をクリゾチニブの（S）-エナンチオマーで処理した場合に、抗MTH1 siRNAで観察される効果と一致してDNA損傷の特異的マーカーである53BP1の染色が増大した。MTH1と発癌RASの発現、活性酸素種（ROS）、酸化損傷及び腫瘍発生との強い関連性を考えると、本明細書で提示されるデータから驚くべきことにクリゾチニブ、好ましくはラセミ型クリゾチニブ、又はより好ましくはクリゾチニブの（S）-エナンチオマー等の小分子MTH1阻害剤も、幾つかの多様なALK陰性癌の治療に適用され得ることが示唆される。

20

#### 【0027】

「クリゾチニブ」という用語が「PF-2341066」としても知られ、化学物質3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミンの（R）-エナンチオマーに関することに留意されたい（例えば、Zou (2007) *Cancer Res.* 67: 4408-4417<sup>3</sup>、Cui (2011) *J. Med. Chem.* 54: 6342-6363<sup>9</sup> 及びChristensen (2007) *Mol Cancer Ther.* 6: 3314-3322<sup>2,3</sup> を参照されたい）。「クリゾチニブ」、「（R）-クリゾチニブ」及び「クリゾチニブの（R）-エナンチオマー」という用語は本明細書で区別なく使用される。簡潔に述べると、本明細書で使用される場合、「ラセミ型クリゾチニブ」又は「クリゾチニブのラセミ体」という用語は、化学物質3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミンのラセミ形態に関する。これと一致して、本明細書で使用される場合、「（S）-クリゾチニブ」及び「クリゾチニブの（S）-エナンチオマー」という用語は、化学物質3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミンの（S）-エナンチオマーに関する。

30

40

#### 【0028】

下記の実示的な実施例において実証されるように、ラセミ型クリゾチニブ、クリゾチニブの（R）-クリゾチニブ及び（S）-エナンチオマーのMTH1触媒活性を阻害する効力は著しく異なる。特に、MTH1触媒活性の阻害を決定するアッセイにおいて、ラセミ型クリゾチニブについて決定されるIC<sub>50</sub>値は、エナンチオマー的に純粋な（R）-クリゾチニブについて観察されるものより約10倍高かった。さらに、クリゾチニブの（S）-エナンチオマーは（R）-クリゾチニブよりも100倍超高い阻害効力を示した。明

50

らかに、(S)-配座はアミノヘテロアリアル化合物のMTH1に対する親和性の増大を示した。したがって、本発明において、驚くべきことにクリゾチニブ、より好ましくはラセミ型クリゾチニブ、更により好ましくはクリゾチニブの純粋な(S)-エナンチオマーがRAS誘導性癌の発生、進行及び維持に関連付けられていた酵素であるMTH1の極めて強力な阻害剤であることが実証された。

#### 【0029】

したがって、本発明は、本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)がMTH1の生物活性(特に触媒活性)を効果的に阻害するという驚くべき発見をもたらす。MTH1が突然変異体RASによって誘導される悪性形質転換に関連付けられていたことを考えると、本発明の一態様は、本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)を癌の治療及び/又は予防に使用することができることである。加えて、MTH1の阻害は、癌のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係であることから、本発明の更なる態様は、本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)をALK陰性及び/又はc-Met陰性癌の治療及び/又は予防に使用することができることである。

10

#### 【0030】

本明細書に記載されるように、本発明は、癌の治療及び/又は予防に使用される式(1)のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグに関する。本発明によると、治療及び/又は予防は治療対象の癌のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係である。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0031】

【図1】化学プロテオミクスのワークフローを示す図である(図1は、Superti-Furga (2012) Designing Multi-target Drugs, (eds. Richard Morphy and John Harris), Drug Discovery Series, Royal Society of Chemistry, Cambridge<sup>8</sup>(その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする)から引用した図を変更したものである)。

【図2】クリゾチニブ及び新たに合成された連結可能な誘導体の構造を示す図である。

【図3】両方のクリゾチニブエナンチオマーの化学構造を示す図である。

30

【図4】固定化された化合物のALKに結合するその能力に関する評価を示す図である。CeMM-146のみが、SH-SY5Y細胞において発現される両方のALKアイソフォームについて効果的に富化する。

【図5】同定されたクリゾチニブの相互作用物質を示す図である(表示は公式の遺伝子記号である)。キナーゼを円で示し、非キナーゼタンパク質を菱形で示す。

【図6】MTH1阻害アッセイを示す図である。2つの異なるラセミ型クリゾチニブのバッチは、MTH1触媒活性の阻害において光学的に純粋な(R)-クリゾチニブよりもおよそ10倍強力である。対照的に、非特異的(promiscuous)BCR-ABLキナーゼ阻害剤ボスチニブは顕著なMTH1阻害を全く示さない。

【図7】MTH1阻害アッセイを示す図である。ラセミ型クリゾチニブから調製したN-アミノプロピル置換クリゾチニブ誘導体CeMM-146もMTH1触媒活性のナノモル阻害を示し、光学的に純粋な(R)-クリゾチニブよりも強力である。

40

【図8】MTH1阻害アッセイを示す図である。ラセミ型クリゾチニブから調製されたN-アミノヘキシルカルボン酸誘導体CeMM-144は、およそ500nMのIC50値でMTH1触媒活性を阻害する。

【図9】MTH1阻害アッセイを示す図である。ラセミ型クリゾチニブのピペリジン環のPEGベースのアミノアルキル置換基導入はMTH1阻害活性を妨げない。

【図10】光学的に純粋な(R)-クリゾチニブ対ラセミ体について差次的MTH1結合効力を示すSK-ES-1ユースティング肉腫細胞溶解物のウエスタンブロット分析を示す図である。

50

【図11】MTH1阻害アッセイを示す図である。クリゾチニブの(S)-エナンチオマーはMTH1触媒活性の低ナノモル阻害剤である。クリゾチニブの(S)-エナンチオマーは、(R)-エナンチオマー又はラセミ体と比較して顕著に低いIC50値をもたらし、(S)-配置が化合物の親和性を増大させることが示される。結果から少なくとも二連の実験(n=2)の代表的な技術的復元SEMが示される。

【図12】コロニー形成アッセイを示す図である。MCF7(上)及びMDA-MB-231(下)ヒト乳癌細胞を6-ウェルフォーマットで播種し、続いて指定濃度での薬物又はモック処理をプレATINGの24時間後に行った。4週間後、細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色した。

【図13】CeMM-144、CeMM-145及びCeMM-146の調製を示す図である。

【図14】クリゾチニブの(S)-エナンチオマーの立体選択的調製を示す図である。試薬及び条件：(a)Ph<sub>3</sub>P、DIAD、THF、0、4時間；(b)Fe、AcOH/EtOH、還流、1時間；(c)NBS、MeCN、0、15分間；(d)(Boc)<sub>2</sub>O、DMAP、DMF、常温、18時間；(e)Pd(dppf)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、KOAc、DMSO、80、18時間；(f)Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、DME/H<sub>2</sub>O、87、16時間；(g)脱保護(例えば4NHCl、1,4-ジオキサン/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、40、12時間)。

【図15】ヒトMTH1に結合したクリゾチニブの(S)-エナンチオマーの共結晶構造を示す図である。

【図16】アミノヘテロアリアルベースのMTH1阻害剤の好ましい構造的特徴を示すMTH1阻害剤ファーマコフォアを示す図である。

【図17A】SW480細胞に対するクリゾチニブの(S)-エナンチオマー対SCH51344の抗増殖有効性の比較を示す図である。

【図17B】(R)-クリゾチニブ及びクリゾチニブの(S)-エナンチオマーによるMTH1のITCを示す図である。

【図17C】クリゾチニブの(S)-エナンチオマーがPANC1(膵臓癌)及びSW480(結腸癌)細胞のコロニー形成を阻害することを示す図である。

【図18A】コメットアッセイを示す図である。SCH51344及びクリゾチニブの(S)-エナンチオマーの両方が一本鎖切断を誘導するが、(R)-クリゾチニブは誘導しない(陽性対照=H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(150μM、10分；MTM、平均テールモーメント)。

【図18B】SW480細胞における53BP1フォーカス(foci)の増大を示す図である。

【図18C】ヒトMTH1に結合したクリゾチニブの(S)-エナンチオマーの共結晶構造を示す図である。水素結合相互作用は破線によって示される。

【図18D】(R)-クリゾチニブ及びクリゾチニブの(S)-エナンチオマーとのMTH1相互作用を示す図である。左パネルは(R)-クリゾチニブを示し、細線はこの電子密度で分解されなかった(R)-クリゾチニブの部分を示す。右パネルはクリゾチニブの(S)-エナンチオマーを示し、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーの非存在下での代替タンパク質配座をより濃い色で示す。

【図18E】SW480マウス異種移植研究による結果を示す図である。上パネル：MTH1阻害剤(S)-クリゾチニブ(すなわちクリゾチニブの(S)-エナンチオマー)による35日間の処理(25mg/kg 1日1回、毎日皮下)の腫瘍成長に対する効果(生存曲線はp<0.01で有意に異なる(マンテル-コックス検定))。下パネル：終了日(35日間の処理)の腫瘍成長に対する効果(データは平均±SEMとして示す)。

【図19】クリゾチニブの(S)-エナンチオマーが、(R)-クリゾチニブと比較して非特異的な細胞毒性の増大を全く示さないことを示す図である。対照的に、(R)-エナンチオマーは、コロニー形成アッセイにおいて非形質転換BJ皮膚線維芽細胞の成長を低マイクロモル濃度で顕著に損なう。化合物を播種の24時間後に細胞に添加し、プレートを10日間インキュベートし、洗浄し、固定し、クリスタルバイオレットで染色した。画

10

20

30

40

50

像は二連実験の代表的なものである。

【図20】極めて強力な阻害剤 (JNJ-38877605) による薬理的 c-Met キナーゼ阻害が、MTH1 阻害剤 SCH51344 及びクリゾチニブの (S) - エナンチオマーとは対照的に K-Ras - 突然変異 SW480 細胞の成長を抑制しないことを示す図である。

【図21A】MTH1 阻害剤 SCH51344 及びクリゾチニブの (S) - エナンチオマーが SW480 細胞における 53BP1 フォーカスの数を増大させるが、(R) - クリゾチニブは増大させないことを示す図である。

【図21B】同様に、MTH1 の一時的なノックダウンも SW480 細胞における 53BP1 フォーカスの形成を誘導することを示す図である。

【図22A】クリゾチニブの (S) - エナンチオマーによる MTH1 結晶構造の概要を示す図である。

【図22B】図22Aと同様の結合部位ループを除く MTH1 をカバーする分子表面を示す図である。

【図23A】1 で輪郭を付けた 2F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub> 電子密度図を示す (R) - クリゾチニブによる MTH1 結晶構造を示す図である。

【図23B】1 で輪郭を付けた 2F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub> 電子密度図を示すクリゾチニブの (S) - エナンチオマーによる MTH1 結晶構造を示す図である。

【図24】Oncome data のメタ分析を示す図である。MTH1 発現は上方調節された Ras と強く関連し、これは肺癌及び結腸癌等の Ras 突然変異の保有率が高い癌が他の非関連癌型よりも高い MTH1 レベルを発現することによっても反映される。

【図25】化合物 2-tert-ブチル(2-(2-(2-(6-メトキシ-3-メチル-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-イル)アミノ)エトキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(4)の合成を示す図である。文献(米国特許出願公開第5608067号)によると、水素化ナトリウム(3.3mg、0.087mmol、60%分散液)を N-Boc-2,2'-(エチレンジオキシ)ジエチルアミン(723mg、2.8mmol)に添加し、混合物を室温で20分間攪拌した。4-クロロ-6-メトキシ-3-メチル-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン(3)(Yang (2012) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22, 235-239)(18mg、0.07mmol)の添加の後、反応物を 110 に加熱し、一晚攪拌した。冷却後、水(5mL)を添加し、続いて酢酸エチル(3×10mL)で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、真空で濃縮した。フラッシュカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン/エタノール 10:1)により帯黄色の結晶性固体が得られた。収率: 12.2mg (37%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) 12.50 (s, 1H)、7.64 (d, J = 9.3Hz, 1H)、7.55 (d, J = 2.7Hz, 1H)、7.30 (dd, J = 9.3、2.7Hz, 1H)、6.68 (s, 1H)、6.21 (s, 1H)、3.88 (s, 3H)、3.82 (q, J = 5.5Hz, 2H)、3.67 (t, J = 5.5Hz, 2H)、3.55~3.49 (m, 2H)、3.44 (dd, J = 5.9、3.5Hz, 2H)、3.35~3.29 (m, 2H)、3.01 (q, J = 11.9、6.0Hz, 2H)、2.70 (s, 3H)、1.35 (s, 9H); MS ESI m/z (相対強度、%) 360 [M<sup>+</sup> + H] (100)。N-(2-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)エチル)-6-メトキシ-3-メチル-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-アミン(2)。トリフルオロ酢酸(40μL)をジクロロメタン(4mL)中の化合物4(8mg、y mmol)の溶液に添加し、混合物を室温で45分間攪拌した。溶媒を除去した後、粗生成物を MPLC (ジクロロメタン/メタノール 9:1)によって精製し、黄色のろう様固体を得た。収率: 3mg (48%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) 12.53 (s, 1H)、7.65 (d, J = 9.3Hz, 1H)、7.57 (d, J = 2.7Hz, 1H)、7.31 (dd, J = 9.3、2.7Hz, 1H)、6.25 (s, 2H)、3.89 (s, 3H)、3.83 (t, J = 5.6Hz, 2H)、3.68 (t, J = 5.5Hz, 2H)、3.61~3.37 (m, 7

40

50

H)、2.83 (t, J = 5.3 Hz, 2H)、2.70 (s, 3H); MS ESI m/z (相対強度、%) 460 [M<sup>+</sup> + H] (97)、404 (100)、360 (47)。

【図26】MTH1の安定なロックダウンがSW480細胞のコロニー形成を損なうことを示す図である。MTH1の安定なロックダウンは、SW480細胞のコロニー形成を顕著に低減する。

【図27】(S)-3-(1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ)-5-(1-(ピペリジン-4-イル)-1H-ピラゾール-3-イル)ピリジン-2-アミンの誘導体化が、(S)-5-(1-(1-(3-アミノプロピル)ピペリジン-4-イル)-1H-ピラゾール-3-イル)-3-(1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ)ピリジン-2-アミンをもたらすことを示す図である。図27は、(S)-tert-ブチル(3-(4-(3-(6-アミノ-5-(1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ)ピリジン-3-イル)-1H-ピラゾール-1-イル)ピペリジン-1-イル)プロピル)カルバメートを示す。1H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.74 (d, J = 1.7 Hz, 1H)、7.58~7.46 (m, 2H)、7.30 (dd, J = 8.9、4.8 Hz, 1H)、7.04 (dd, J = 8.9、7.9 Hz, 1H)、6.87 (d, J = 1.7 Hz, 1H)、6.07 (q, J = 6.7 Hz, 1H)、4.78 (s, 2H)、4.18~4.02 (m, 1H)、3.48 (s, 1H)、3.20 (d, J = 6.0 Hz, 2H)、3.05 (d, J = 11.8 Hz, 2H)、2.47 (t, J = 6.7 Hz, 2H)、2.27~1.95 (m, 6H)、1.85 (d, J = 6.7 Hz, 3H)、1.75~1.62 (m, 2H)、1.44 (s, 9H); ESI-MS: 607 (M+H)。図27は、(S)-5-(1-(1-(3-アミノプロピル)ピペリジン-4-イル)-1H-ピラゾール-3-イル)-3-(1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)-エトキシ)ピリジン-2-アミンを更に示す。1H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.76 (d, J = 1.5 Hz, 1H)、7.61~7.46 (m, 2H)、7.30 (dd, J = 8.9、4.8 Hz, 1H)、7.04 (dd, J = 8.9、7.9 Hz, 1H)、6.87 (d, J = 1.6 Hz, 1H)、6.07 (q, J = 6.7 Hz, 1H)、4.76 (s, 2H)、4.20~4.01 (m, 1H)、3.07 (d, J = 11.7 Hz, 2H)、2.81 (t, J = 6.5 Hz, 2H)、2.47 (t, J = 7.1 Hz, 2H)、2.23~1.94 (m, 6H)、1.85 (d, J = 6.7 Hz, 3H)、1.80 (s, 2H)、1.73~1.63 (m, 2H)。ESI-MS: 507 (M+H)。

【図28】抗癌特異性を示す図である。様々な同系BJ線維芽細胞株を、コロニー形成アッセイにおいて幾つかの濃度のクリゾチニブの(S)-エナンチオマーで処理した。示されるように、調査した細胞株パネルは非形質転換(「野生型」)細胞、テロメラゼ(hTERT)で不死化した細胞、hTERT及びSV40ラージT抗原(SV40T)で形質転換した細胞、並びにhTERT、SV40T及びKRAS突然変異体V12で形質転換した細胞を含むものであった。

【図29】クリゾチニブの(S)-エナンチオマーによるMTH1触媒活性の阻害が基質依存性でないことを示す図である。図29は、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーがMTH1による2-OH-dATPの加水分解も用量依存的に阻害することを示す。

【図30】クリゾチニブの(S)-エナンチオマーの活性に対するp53/p21状態及びミスマッチ修復経路の影響を示す図である。図30は、p53状態及び機能的MLH1の存在又は非存在が、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーの活性に影響を及ぼさないことを示す。しかしながら、p21の喪失はクリゾチニブの(S)-エナンチオマーによる処理に対するHCT116細胞の感度を増大するようである。

【図31A】MTH1酵素機能がDNA中の8-オキソ-グアニンの含量を増大することを示す図である。(S)-クリゾチニブによるBJ線維芽細胞の処理は抗8-オキソ-グアニンマウスモノクローナル抗体の染色を増大させるが、(R)-クリゾチニブは増大さ

10

20

30

40

50

せない。同時に、抗 MTH1 siRNA について観察される効果と一致して DNA 損傷の特異的マーカーである 53BP1 の染色が増大する。

【図 31B】MTH1 酵素機能が DNA 中の 8-オキソ-グアニンの含量を増大することを示す図である。(S)-クリゾチニブによる BJ 線維芽細胞の処理は抗 8-オキソ-グアニンマウスモノクローナル抗体の染色を増大させるが、(R)-クリゾチニブは増大させない。同時に、抗 MTH1 siRNA について観察される効果と一致して DNA 損傷の特異的マーカーである 53BP1 の染色が増大する。

【図 32】クリゾチニブの (S)-エナンチオマーが DNA 修復機構を活性化し、活性化塩基除去修復 (BER) により一本鎖切断の形成を誘導することを示す図である。クリゾチニブの (S)-エナンチオマーをアルカリコメットアッセイによって調査したが、これにより単一細胞電気泳動による DNA 一本鎖切断が明らかになる。SW480 細胞を用い、両方の (S)-クリゾチニブがコメットアッセイにおいて顕著なテールモーメントをもたらすが、(R)-クリゾチニブはもたらさないことが見出された。また、DNA 損傷経路の活性化を示す ATM リン酸化の増大が観察され、同様に (S)-クリゾチニブ特異的な効果を実証された。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明の一実施形態は、

R<sup>1</sup> が -NH<sub>2</sub>、-OH 又は SH であり、

R<sup>3</sup> がメチルであり、

Y が CR<sup>4</sup> であり、

R<sup>4</sup> が水素又はハロゲンであり、

R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> 及び R<sup>7</sup> が各々独立してフッ素又は塩素であり、

R<sup>8</sup> が水素又は -A-B<sub>n</sub>-X であり、ここで、

B が C<sub>1-4</sub> アルキレン又は -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)- であり、

n が 1、2 又は 3 であり、

X が -NH<sub>2</sub> である、

本発明の用途のために用いられる化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグに関する。

【0033】

本発明の更なる実施形態は、R<sup>8</sup> が水素、

-C(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、

-C(=O)CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、又は、

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> である、

本発明の用途のために用いられる化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグに関する。

【0034】

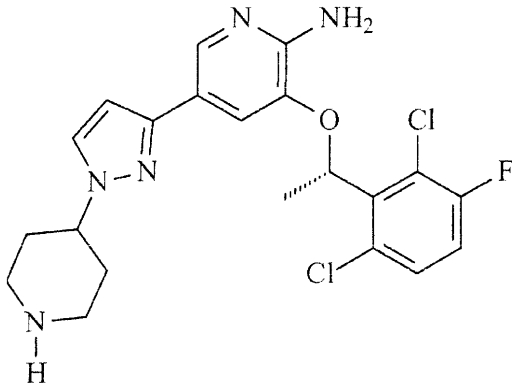
本発明の別の実施形態は、式 (2) ~ (5) によって表される以下の化学構造：

10

20

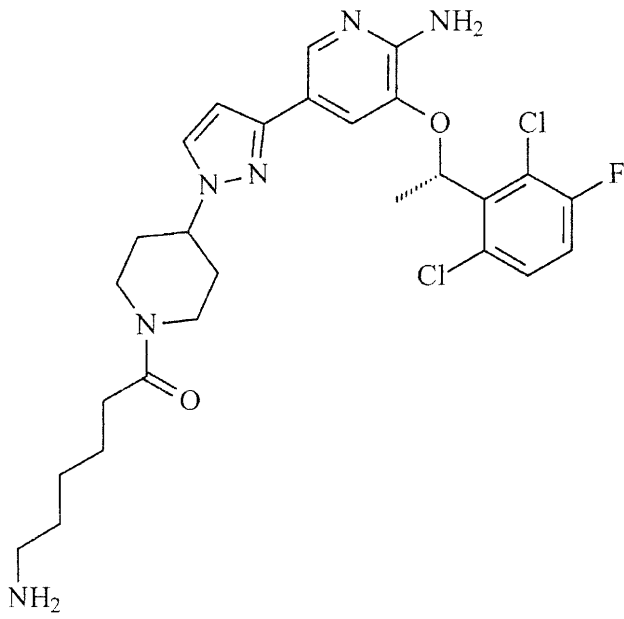
30

【化 3】



式 (2);

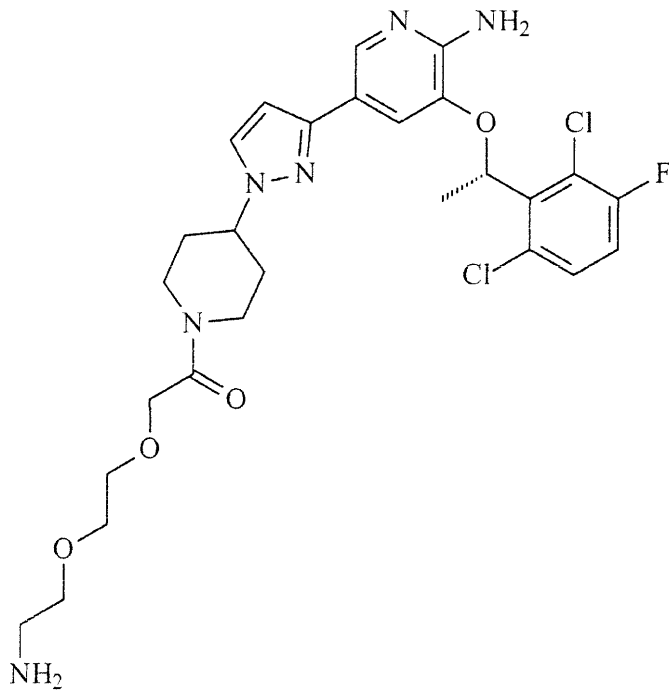
10



式 (3);

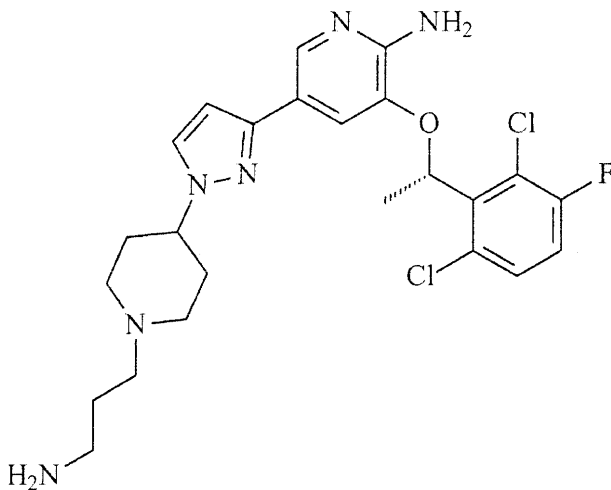
20

30



10

式 (4)又は



20

式 (5).

30

の1つを有する、本発明の用途のために用いられる化合物に関する。

## 【0035】

本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーを、被験体にファーマコフォア若しくは医薬組成物の使用における化合物自体として投与するか、又は薬剤として配合することができることも想定される。

## 【0036】

したがって、本発明は、本発明の用途のために用いられる化合物と薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物に関する。したがって、本発明の一態様は、癌の治療及び/又は予防に使用される医薬組成物であって、本明細書で提示されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーと薬学的に許容可能な賦形剤とを含む、医薬組成物に関する。

40

## 【0037】

本発明の一態様は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用される、本明細書で提示されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーと薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物であって、治療及び/又は予防が上記被験体の癌細胞又は組織のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係である、医薬組成物に関する。上記ALK状態はALK生物活性のレベル及び/又はALK発現のレベルであり得る。これと一致して、上記c-Met状態はc-Met生物活性のレベル及び/又はc-Met発現の

50

レベルであり得る。A L K又はc - M e tの生物活性のレベル又は発現のレベルを決定する方法は、本明細書で上記及び下記に記載している。

【0038】

このため、治療対象の上記癌はA L K陰性（すなわち、活性化A L K異常を有し得ない）及び/又はc - M e t陰性であり得る。本発明によると、上記の薬学的に許容可能な賦形剤は担体、希釈剤、充填剤、崩壊剤、平滑剤、結合剤、着色剤、顔料、安定剤、保存料又は酸化防止剤であり得る。

【0039】

本明細書に記載されるように、本発明の一実施形態は、各々が式(1)~(5)によって表される化学構造の1つを有する少なくとも2つの成分を含む、本発明の医薬組成物に関する。本発明の別の実施形態は、各々が式(2)~(5)によって表される化学構造の1つを有する少なくとも2つの成分を含む、本発明の医薬組成物に関する。

【0040】

上記に示したように、本発明は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S) - エナンチオマー及び医薬組成物に関する。本発明は、被験体における癌の治療及び/又は予防が該被験体の癌細胞又は組織のA L K状態及び/又はc - M e t状態とは無関係である、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に更に関する。このため、治療及び/又は予防対象の癌はA L K陰性（すなわち、活性化A L K異常を有し得ない）及び/又はc - M e t陰性であり得る。

【0041】

クリゾチニブは未分化リンパ腫キナーゼ(A L K)及び肝細胞成長因子受容体キナーゼ(c - M e t)の二重阻害剤である<sup>3</sup>。現在、クリゾチニブはA L K陽性腫瘍と診断された患者の治療にのみ使用されている。発癌A L K活性の背後にある分子的損傷は、A L K遺伝子増幅、突然変異又は染色体転座、例えばE M L 4 - A L Kと関連し得る<sup>4</sup>。E M L 4 - A L Kは棘皮動物微小管関連タンパク質様4及びA L K遺伝子(E M L 4 - A L K)からなる発癌融合タンパク質である<sup>5</sup>。

【0042】

上記に示したように、本発明において驚くべきことに、アミノヘテロアリアル化合物(クリゾチニブ等)、好ましくはアミノヘテロアリアル化合物の(S) - エナンチオマー(クリゾチニブの(S) - エナンチオマー等)がM T H 1の生物活性を阻害することが可能であり、したがって癌のA L K状態及び/又はc - M e t状態とは無関係の被験体における癌の治療及び/又は予防にも使用することができることを見出された。したがって、本発明の更なる実施形態は、上記被験体の上記癌細胞又は組織がA L Kの遺伝子突然変異及び/又は染色体転座を有しない、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。本発明の一態様は、上記染色体転座がE M L 4 - A L Kである、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。

【0043】

この転座は非小細胞肺癌(N S C L C)のおよそ3%~13%の腺癌において生じ、報告された一症例を除き、E G F R又はK R A Sの突然変異とは相互排他的であると考えられる<sup>6</sup>。さらに、A L K再構成が肺癌患者においてR A S又はE G F Rファミリー遺伝子の突然変異と相互排他的であることを見出されたことから(Gainor (2013) Clinical Cancer Research 19, 4273-4281)、A L Kキナーゼ阻害剤(R) - クリゾチニブはK R A S又はE G F Rに突然変異を有する患者の治療には好適でない。(R) - クリゾチニブ(ザーコリ(登録商標))に対する耐性を示した患者であってもK R A S又はE G F Rの突然変異を獲得しないように思われることに注目すべきであり(Gainor(前掲))、癌がR A S突然変異又はE G F R発現の増大を有する患者を(R) - クリゾチニブ(ザーコリ(登録商標))で治療する論拠に欠けることが更に強調される。これと一致して、下記の例示的な実施例ではc - M e t阻害はK R A S突然変異S W 4 8 0細胞の成長を抑制しないことが示される。対照的に、クリゾチニブの(S) - エナンチオマーはS W 4 8 0細胞の細胞成長をin vitro及びin vivoマウスモデルにおいて低減する。これらの

10

20

30

40

50

結果から、クリゾチニブ(すなわち(R)-クリゾチニブ)とは対照的に、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーがRAS陽性癌の治療に有用であることが実証される。

【0044】

驚くべきことに、下記の実施例においてクリゾチニブの純粋な(S)-エナンチオマーが従来技術ではRAS誘導性癌の発生、進行及び維持に関連付けられている酵素であるMTH1の極めて強力な阻害剤であることが実証された<sup>1 3</sup>。従来技術では近年、EGFR及びMTH1の両方を抑制するマイクロRNA MiR-145がこれらの腫瘍において下方調節されるため、MTH1が、EGFRを発現する腺癌の有望な標的でもあり得ることが実証されていると述べられる<sup>3 7</sup>。同様に従来技術において示されているように、MiR-145の再発現はmRNA及びタンパク質レベルの両方でEGFR及びMTH1の下方調節をもたらし、EGFR陽性細胞株の成長を損なった。加えて、下記の実施例に示されるように、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーは、どちらも活性化RAS突然変異を有するヒト結腸腺癌細胞(SW480)及び膵臓癌細胞(PANC1)のコロニー形成を効率的に阻害した。これらの結果と一致して、安定したMTH1のノックダウンはSW480細胞のコロニー形成を顕著に低減した。さらに、本明細書に記載されるように、ヒト結腸腺癌細胞(SW480)を使用するマウス異種移植研究から、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーが腫瘍進行を損なうことが可能であることが実証された。特に、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーの投与は50%を超える腫瘍体積の低減をもたらした。同様にこの実験から明らかのように、動物が正常に挙動し、血液学的パラメーター又は体重の顕著な変化は観察されなかったため、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーは良好な耐容性を示す。

10

20

【0045】

このため、本発明の一実施形態は、上記被験体の癌細胞又は組織が活性化RAS突然変異及び/又は活性化EGFR突然変異を有する、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。本発明の特定の一実施形態は、上記被験体の癌細胞又は組織が活性化RAS突然変異を有する、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。上記活性化RAS突然変異は活性化KRAS突然変異(例えばG12D、G12V又はG12C)であり得る。突然変異体RASで形質転換した細胞を標的化MTH1で処理することで、従来技術と一致して、突然変異体RASによる細胞の形質転換がROSの産生の増大をもたらし得ることが示される<sup>1 2</sup>。正常細胞については、ROSによって引き起こされる酸化損傷は、癌細胞を休止又は老化(OIS)、最終的にアポトーシスの状態にし得る。老化を克服するために、RAS形質転換細胞は細胞を酸化損傷から保護するMTH1を上方調節する。例えば、従来技術ではHRASをトランスフェクトしたヒト皮膚線維芽細胞は老化を受けるが、この表現型がMTH1の同時過剰発現により奪回されると記載されている<sup>1 2</sup>。その結果として、MTH1抑制は突然変異体RASを発現する癌細胞において増殖欠損を引き起こし得る<sup>1 3</sup>。MTH1ノックアウトマウスは非常に軽度の表現型を示すため<sup>1 4</sup>、小分子によるMTH1の標的化は治療が困難なRAS突然変異癌に対する新規の良好な耐容性を示す治療選択をもたらす。実際に、同様に下記の実施例で示されるように、臨床的に使用されるクリゾチニブの(R)-エナンチオマーは非形質転換細胞に対してクリゾチニブの(S)-エナンチオマーよりも高い毒性を示した。これと一致し、同様に下記の例示的な実施例に示されるように、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーは形質転換細胞と比較して野生型細胞又はテロメラーゼによってのみ不死化される細胞に対する毒性が低い。この結果からクリゾチニブの(S)-エナンチオマーの癌特異的効果が強調される。

30

40

【0046】

活性化RAS GTPアーゼシグナル伝達は発癌形質転換及び悪性疾患の重要な誘導因子である(Pylayeva-Gupta (2011) Nat Rev Cancer 11, 761-774)。約20%~30%のヒト癌が1つのRASアイソフォームに突然変異を含有し(Parada (1982) Nature 297, 474-478; Der (1982) Proceedings of the National Academy of Sciences 79, 3637-3640)、予後不良及び低い全生存率を伴い、新たな阻害剤を同定する緊急の必要性が強調さ

50

れる。しかしながら、R A S タンパク質はその構造のために小分子に対して不良な標的である。代替的に、R A S 依存性癌の細胞モデルは従来技術において S C H 5 1 3 4 4 等の特異的阻害剤の開発に使用されてきたが、分子標的は依然として殆ど謎である (Kumar (1995) Cancer Research 55, 5106-5117)。小分子による R A S 活性の直接的な変調は創薬において大きな難題となっている。したがって、例えば翻訳後修飾、例えばバルミトイル化によって調節される R A S プロセッシングを妨げるため、活性タンパク質の成熟及び血漿膜への転座を防ぐために、代替アプローチが従来技術では用いられている (Xu (2012) Blood 119, 1032-1035; Dekker (2010) Nat Chem Biol 6, 449-456)。これらの標的化アプローチに加えて、表現型スクリーニングが従来技術では R A S 形質転換癌細胞を選択的に標的とするが、非形質転換細胞の成長には影響を及ぼさない小分子を検索するために用いられてきた (Yagoda (2007) Nature 447, 865-869)。かかる戦略の利益は、活性化化合物が癌細胞に対するその特異性及びその細胞活性に基づいて既に選択されていることである。1995年には、このアプローチにより R A S 形質転換線維芽細胞並びにヒト結腸癌及び膵臓癌細胞株の定着非依存性成長を抑制する S C H 5 1 3 4 4 と呼ばれるピラゾロキノリン化合物が発見された (Kumar (1995) Cancer Research 55, 5106-5117)。重大なことには、下記の実施例で実証されるように、本明細書に提示されるアミノヘテロアリアル化合物の (S) - エナンチオマー (例えばクリゾチニブの (S) - エナンチオマー) は、R A S 依存性癌細胞の治療において化合物 S C H 5 1 3 4 4 よりも著しく効果的である。

#### 【0047】

幾つかのタンパク質が損傷 D N A の修復において役割を果たす。これらのタンパク質としては、D N A リガーゼ、P C N A (スライディングクランプ) 並びに p 5 3、p 2 1 及び M L H 1 が挙げられる。モデル系における研究から、M T H 1 抑制の抗増殖効果が、既知の腫瘍抑制遺伝子である p 5 3 に依存し得ることが示された (Rai (2009) Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 169-174; Rai (2010) Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 703, 71-81)。特に、p 5 3 機能の喪失が M T H 1 遺伝子サイレンシングによる老化誘導を防ぐことが実証された。したがって、機能的 p 5 3 シグナル伝達を有する患者は好ましくは M T H 1 阻害剤による治療から利益を得るようである。しかしながら、下記の例示的な実施例から、p 5 3 状態及び機能的 M L H 1 の存在又は非存在がクリゾチニブの (S) - エナンチオマーの活性に影響を及ぼさないことが示される。しかしながら、p 2 1 の喪失は、クリゾチニブの (S) - エナンチオマーによる治療に対する癌細胞 (例えば H C T 1 1 6 細胞) の感度を増大する。したがって、非機能的 p 2 1 シグナル伝達を有する患者は好ましくは本発明のアミノヘテロアリアル化合物の (S) - エナンチオマーによる治療から利益を得るようである。このため、本発明の一態様は、被験体の癌細胞又は組織において p 2 1 の生物活性及び/又は発現が低減又は欠如している、上記被験体における癌の治療及び/又は予防に使用される本明細書に提示されるアミノヘテロアリアル化合物の (S) - エナンチオマー又は本明細書に記載の医薬組成物に関する。この点で、「低減した」という用語は p 2 1 の生物活性及び/又は p 2 1 の発現が、健常対照被験体 (例えば健常対照者) の細胞又は組織サンプルにおける p 2 1 の生物活性又は発現と比較して低減していることを意味する。ヒト p 2 1 はサイクリン - C D K 2 及びサイクリン - C D K 4 複合体を阻害し、G 1 期における細胞周期進行を調節する。p 2 1 発現の低減は前立腺、膀胱及び食道の癌を含む様々なヒト癌に關与する。腫瘍抑制因子 p 2 1 は、主にサイクリン依存性キナーゼ (C D K) C D K 2 及び C D K 1 (C D C 2 としても知られる) に結合し、キナーゼ活性を阻害することによってその様々な生物活性を媒介する。このため、p 2 1 の生物活性を決定するために、C D K 2 又は C D K 1 のキナーゼ活性を阻害する精製 p 2 1 の能力を決定してもよい。C D K 活性 (例えば C D K 2 の活性) は、放射性標識 A T P を用いて基質リン酸化を決定することによってモニタリングすることができる。例えば、C d k 2 活性の測定のために、PerkinElmerの [ 3 3 P ] A T P シンチレーション近接アッセイを使用することができる (例えば、[http://www.perkinelmer.com/pages/020/proximitynews/enzymes/measurement\\_ofcdk2.xhtml](http://www.perkinelmer.com/pages/020/proximitynews/enzymes/measurement_ofcdk2.xhtml)を参照されたい)。p 2 1 の発現は例えば P C R、R T - P C T 又はウエス

10

20

30

40

50

タンブロット法によって決定することができる。

【0048】

本発明の一実施形態では、本明細書で提供されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー又は医薬組成物で治療される被験体の癌細胞又は組織は、遺伝子構成 p21<sup>+</sup>/- を有する(すなわち、p21の一方の対立遺伝子が欠失又は不活性化している)。本発明の別の実施形態では、上記癌細胞又は組織は遺伝子構成 p21<sup>-</sup>/- を有する(すなわち、p21の両方の対立遺伝子が欠失又は不活性化している)。

【0049】

上記のように、本発明は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーに関する。本発明の一態様は、上記被験体が哺乳動物である、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。本発明の更なる態様は、上記哺乳動物がヒト患者である、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。

10

【0050】

本明細書に記載され、下記の実施例で説明されるように、クリゾチニブ、好ましくはラセミ型クリゾチニブ、より好ましくはクリゾチニブの(S)-エナンチオマー、及びその構造的誘導体をALK/Met誘導性肺癌を除く様々な異なる腫瘍型だけでなく、RAS誘導性結腸癌、乳癌、肺癌、膵臓癌、ユーイング肉腫等の治療にも適用することができることを見出された。本明細書で示されるように、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーはRAS依存性癌細胞の成長及び進行を効率的に阻害する。したがって、活性化RAS突然変異を有する癌を治療及び/又は予防するために本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーの使用が優先される。この癌は例えば結腸癌であり得る。したがって、本発明の一実施形態は、前記癌が結腸癌、肺癌、乳癌、白血病、リンパ腫、皮膚癌、肝臓癌、膵臓癌、脳腫瘍、腎臓癌、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、前立腺癌、膀胱癌及び食道癌からなる群から選択される、本発明の用途のために用いられる化合物、又は本発明の医薬組成物に関する。

20

【0051】

三種陰性乳癌細胞株は酸化性DNA損傷に感受性が高く、この損傷はこれらの癌をPARP阻害剤等の他の化学療法剤に感受性にし得ることが従来技術において示されている<sup>1</sup><sup>8</sup>。したがって、酸化性DNA病変を誘導すると考えられているMTH1阻害剤を用いてこれらの腫瘍型を治療することができる。加えて、幾つかの乳癌型で突然変異しているBRCA1及びBRCA2遺伝子が8-オキソ-グアニンベースの病変を含む酸化性DNA損傷の修復に関与することが報告されている<sup>17, 39</sup>。その結果として、本発明の一態様は、これらの腫瘍を標的とする本明細書で特定されたMTH1阻害剤の使用に関する。これに関連して、MTH1阻害剤もPARP阻害剤等の他の標準治療薬剤と協同し得る。このため、MTH1阻害剤を乳癌、好ましくは三種陰性乳癌の治療及び/又は予防に使用することが本発明において想定される。したがって、本発明は、被験体における乳癌の治療及び/又は予防のための本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に更に関する。本発明の一実施形態は、上記乳癌がエストロゲン受容体-及びプロゲステロン受容体の発現を欠いており、HER2/NEU癌遺伝子の過剰発現又は増幅を欠いている(すなわち三種陰性乳癌)、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。本発明の特定の態様は、上記乳癌がBRCA1及び/又はBRCA2遺伝子突然変異を有する、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物による治療及び/又は予防対象の乳癌又は肺癌は更にEGFR依存性であり得る。

30

40

【0052】

MTH1抑制の生理的効果に基づくと、MTH1阻害剤は放射線療法及び/又は化学療法剤、好ましくはDNA損傷化合物、DNA修復機構を妨げる化合物、又はROSの産生を誘導するか若しくはROSの除去を阻害する化合物と協同するようである。

【0053】

50

したがって、本発明の一実施形態は、前記化合物又は医薬組成物を放射線及び/又は化学療法剤とともに同時投与する、本発明の用途のために用いられる化合物、又は本発明の医薬組成物に関する。本発明の一態様は、前記化学療法剤がDNA損傷薬、アルキル化剤、DNAインターカレーター、トポイソメラーゼ阻害剤、DNAに酸化的損傷をもたらす薬剤、細胞毒性化合物、代謝拮抗物質、DNA修復機構を妨げる化合物、ATMキナーゼ阻害剤、ATRキナーゼ阻害剤、CHK1/2キナーゼ阻害剤、PARP阻害剤、EGFR阻害剤、DNA依存性タンパク質キナーゼ阻害剤、一般的塩基除去修復阻害剤、DNAポリメラーゼ阻害剤、O-6-メチルグアニンメチルトランスフェラーゼ(MGMT)阻害剤、スルピピン抑制剤、活性酸素種(ROS)を生成する化合物、抗有糸分裂化合物又は以上のいずれかの組合せである、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。上記に示したように、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物は化学療法剤とともに同時投与することができる。本発明の好ましい態様は、上記化学療法剤がPARP阻害剤及び/又はEGFR阻害剤である、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物に関する。しかしながら、PARP阻害剤及び/又はEGFR阻害剤に加えて、幾つかの他の化学療法薬を本発明の化合物又は本発明の医薬組成物とともに同時投与することができる。したがって、本発明の別の態様は、前記化学療法剤がシクロホスファミド、テモゾロマイド、メルファラン、カルムスチン、ブスルファン、シスプラチン、プロカルバジン、アントラサイクリン、カンプトテシン、イリノテカン、エトポシド、過酸化水素、レゾルシノール、キノン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、オラパリブ、ABT-888、ネオカルジノスタチン、プレオマイシン、デシタピン、5-アザシトシン、メトキシアミン塩酸塩(TRC102)、ロメグアトリブ、ピペルロングミン、ケルセチン、ピンクリスチン、タキソール、ミトキサントロン、YM155、エルロチニブ、ゲフィチニブ、ラパチニブ又は以上のいずれかの組合せである、本発明の用途のために用いられる化合物、又は本発明の医薬組成物に関する。したがって、本明細書に記載されるように、本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーは、アルキル化剤等のDNA損傷薬(例えばシクロホスファミド、テモゾロマイド、メルファラン、カルムスチン、ブスルファン、シスプラチン、プロカルバジン等)、DNAインターカレーター(例えばアントラサイクリン)又はトポイソメラーゼ阻害剤(例えばカンプトテシン、イリノテカン、エトポシド)、DNAに酸化的損傷をもたらす薬剤(例えば過酸化水素、レゾルシノール、キノン)、他の細胞毒性化合物(例えばメトトレキサート、5-フルオロウラシル、サリドマイド及びその類似体、ネオカルジノスタチン、プレオマイシン、デシタピン、5-アザシトシンを含む代謝拮抗物質)、DNA修復機構を妨げる化合物(例えばATM-、ATR-又はCHK1/2キナーゼ阻害剤、PARP阻害剤、DNA依存性タンパク質キナーゼ阻害剤、メトキシアミン塩酸塩(TRC102)等の一般的な塩基除去修復阻害剤、DNAポリメラーゼ阻害剤、O-6-メチルグアニンメチルトランスフェラーゼ(MGMT)阻害剤(例えばロメグアトリブ)、活性酸素種(ROS)を生成する化合物(例えばピペルロングミン、ケルセチン)、ピンクリスチン又はタキソール等の抗有糸分裂化合物、EGFR阻害剤(例えばエルロチニブ、ゲフィチニブ、ラパチニブ)、並びにミトキサントロン及びYM155を含む幾つかの化学療法薬とともに同時投与することができる。

#### 【0054】

本明細書に提示されるように、クリゾチニブ、より好ましくはラセミ型クリゾチニブ、更により好ましくはクリゾチニブの純粋な(S)-エナンチオマーはMTH1の極めて強力な阻害剤である。これはa)MTH1の小分子阻害剤がこれまでに報告されていないため、b)クリゾチニブで治療される患者がそのc-Met発現状態又はより好ましくはALK発現状態により選択されるが、MTH1が考慮されないため、及びc)下記の実施例で実証されるように、クリゾチニブのピペリジン窒素でのアミノアルキル置換基の導入がALK及びMTH1阻害の両方に関して良好な耐容性を示すために特に興味を持たれている。後者の発見から国際公開第2008/053157号、国際公開第2006/021

881号、国際公開第2006/021886号及び国際公開第2006/021884号に開示の化合物が強力であり、生物が利用可能なMTH1阻害剤であることも示唆される。したがって、本発明の一態様はMTH1を阻害し、それにより癌を治療及び/又は予防するための国際公開第2008/053157号、国際公開第2006/021881号、国際公開第2006/021886号及び国際公開第2006/021884号に開示の化合物の使用に関する。

【0055】

本明細書に記載されるように、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーがMTH1の生物活性を効果的に阻害することが見出されている。したがって、本発明の化合物は、癌、特にMTH1が癌の発生及び/又は癌の進行に關与する癌の治療及び/又は予防に使用することができる。MTH1が癌の発生及び/又は進行に關与するか否かを決定するために、MTH1の状態(例えば遺伝子構成、発現及び/又は活性)を分析することができる。癌のMTH1状態は、該癌の発生及び/又は進行へのMTH1の關与の適切な指標である。したがって、癌患者をそのMTH1状態に関して層別化することが本発明の更なる態様である。

10

【0056】

したがって、本発明の更なる実施形態は、本発明の用途のために用いられる化合物、又は本発明の医薬組成物の有効性を決定する*in vitro*方法であって、

(a) 被験体から細胞又は組織サンプルを得る工程と、

(b) 前記被験体のNUDT1/MTH1状態を決定する工程と、

を含み、NUDT1/MTH1陽性細胞又は組織サンプルが効果的な癌の治療及び/又は予防の指標となる、*in vitro*方法に関する。

20

【0057】

この*in vitro*方法の一態様では、前記NUDT1/MTH1状態がMTH1生物活性のレベル及び/又はMTH1発現のレベルである。MTH1生物活性のレベルは、MTH1を上記被験体に由来する上記細胞又は組織サンプルから精製し、MTH1媒介8-オキソ-dGTP加水分解によって生成するPPiの産生を測定することによってモニタリングすることができる。特に、精製MTH1を8-オキソ-dGTPと接触させ、PPi Light無機ピロリン酸アッセイ(Lonza Rockland Inc.)を用いてPPiの産生を測定することができる。本明細書に記載のクリゾチニブの(S)-エナンチオマー又は本明細書に記載の医薬組成物が癌患者の治療に好適であるか否かを決定するために、上記癌患者のサンプルにおけるMTH1のMTH1生物活性のレベル(すなわち産生されるPPiの量)を、健常対照者のサンプルにおけるMTH1のMTH1生物活性のレベル(すなわち産生されるPPiの量)と比較することができる。癌患者の細胞又は組織サンプルは、MTH1生物活性のレベル(すなわち産生されるPPiの量)が健常対照者のサンプルと比較して癌患者のサンプルで高い場合に「NUDT1/MTH1陽性」である。この場合、本明細書に記載のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー又は本明細書に記載の医薬組成物は上記癌患者の治療に好適である。

30

【0058】

MTH1発現のレベルは、例えばPCR、RT-PCR又はウエスタンブロット法によって決定することができる。細胞又は組織サンプルは、MTH1の発現(すなわちMTH1 mRNA又はMTH1タンパク質の量)が健常対照者のサンプルと比較して癌患者のサンプルで高い場合に「NUDT1/MTH1陽性」である。この場合、本明細書に記載のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー又は本明細書に記載の医薬組成物は上記癌患者の治療に好適である。加えて、下記により詳細に記載されるように、MTH1状態の決定には幾つかの他の検出方法を適用することができる。

40

【0059】

本発明の一態様は、

(c) 前記被験体のRAS状態を決定する工程、

を更に含み、NUDT1/MTH1に対して陽性かつ活性化RAS突然変異に対して陽性

50

の細胞又は組織サンプルが、効果的な癌の治療及び／又は予防の指標となる、本発明の *in vitro* 方法に関する。したがって、これに関連して、「RAS状態」という用語は活性化RAS突然変異の存在に関する。

【0060】

したがって、本発明の一態様は、

(c) 前記細胞又は組織サンプルが活性化RAS突然変異を有するか否かを決定する工程、

を更に含み、NUDT1/MTH1に対して陽性かつ活性化RAS突然変異に対して陽性の細胞又は組織サンプルが、効果的な癌の治療及び／又は予防の指標となる、前記の *in vitro* 方法に関する。

10

【0061】

活性化RAS突然変異はRASの活性化異常である。特に、活性化RAS突然変異はRASの生物活性(すなわち触媒活性)の増大をもたらすRASにおける突然変異に関する。当業者であれば幾つかの活性化RAS突然変異を知ることが容易である。活性化RAS突然変異の例は、例えばKRASのG12突然変異(例えばG12D、G12V又はG12C)又はKRASのQ61突然変異(例えばQ61H)である。これらの突然変異は例えばシーケンシングによって決定することができる。多数の活性化RAS突然変異の更なる例も本明細書で下記に提示される。

【0062】

上述のように、本発明において、驚くべきことにp21の喪失がクリゾチニブの(S)-エナンチオマーによる治療に対する癌細胞の感度を増大することが特定された。したがって、本明細書に提示される *in vitro* 方法は、

20

(d) 前記細胞又は組織サンプルにおいてp21の発現及び／又は生物活性が低減又は欠如しているか否かを決定する工程、

を更に含むことができ、NUDT1/MTH1に対して陽性であり、p21の発現及び／又は生物活性が低減又は欠如している細胞又は組織サンプルが、効果的な癌の治療及び／又は予防の指標となる。

【0063】

本発明において、驚くべきことに、本発明の用途のために用いられる化合物を用いた癌の効果的な治療が患者のALK状態及び／又はc-Met状態とは無関係であることが特定された。このため、具体的な一態様では、本発明は、

30

(d) 被験体のc-Met状態を決定する工程、及び／又は、

(e) 被験体のALK状態を決定する工程、

を更に含み、NUDT1/MTH1に対して陽性かつc-Metに対して陰性の細胞又は組織サンプルは効果的な治療の指標となり、及び／又はNUDT1/MTH1に対して陽性かつALKに対して陰性の細胞又は組織サンプルは効果的な癌の治療及び／又は予防の指標となる、上記の *in vitro* 方法に関する。

【0064】

本発明の *in vitro* 方法において得られる細胞又は組織サンプルは、癌患者から得られる癌細胞又は組織サンプルであり得る。したがって、本発明の更なる実施形態は、上記細胞又は組織サンプルが癌細胞又は組織である、本発明の *in vitro* 方法に関する。MTH1、RAS、c-Met及び／又はALKの状態の決定のために、幾つかの検出法を適用することができる。したがって、本発明の一態様は、工程(b)及び／又は(c)がPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、遺伝子シーケンシング、ARMS(増幅不応性突然変異系)、ペプチド核酸-ロックド核酸(PNA-LNA)PCRクランプ、PCR-インベーター、SNaPshot、PCR/HRMA/dHPLC、PCR/fIRFLP、蛍光 *in-situ* ハイブリダイゼーション(FISH)、免疫組織化学(IHC)、RT-PCR、遺伝子アレイ及び遺伝子チップからなる群から選択される少なくとも1つの検出方法を含む、本発明の *in vitro* 方法に関する。本発明の別の態様は、工程(b)、(c)、(d)及び／又は(e)がPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、

40

50

遺伝子シーケンシング、ARMS（増幅不応性突然変異系）、ペプチド核酸-ロックド核酸（PNA-LNA）PCRクランプ、PCR-インベダー、SNaPshot、PCR/HRMA/dHPLC、PCR/fIRFLP、蛍光in-situハイブリダイゼーション（FISH）、免疫組織化学（IHC）、RT-PCR、遺伝子アレイ及び遺伝子チップからなる群から選択される少なくとも1つの検出方法を含む、本発明のin vitro方法に関する。これらの方法は当該技術分野で既知であり、本明細書で下記にも記載されている。

【0065】

本明細書に提示されるin vitro方法は、癌患者がアミノヘテロアリアル化合物の（S）-エナンチオマーによる治療から利益を得るか否かを評価するために、本明細書に記載のアミノヘテロアリアル化合物の（S）-エナンチオマーを投与する前に行うことができる。したがって、かかる治療を必要とする被験体において癌を治療及び/又は予防する方法であって、

（i）上記のin vitro方法を行うことと、

（ii）工程（i）で得られる結果が癌の効果的な癌の治療及び/又は予防の指標となる場合に、上記被験体に有効量の本明細書に提示されるアミノヘテロアリアル化合物の（S）-エナンチオマーを投与することと、

を含む、方法が本明細書に提示される。

【0066】

このため、本発明は、かかる治療を必要とする被験体において癌を治療及び/又は予防する方法であって、

（a）上記被験体から細胞又は組織サンプルを得ることと、

（b）被験体のNUDT1/MTH1状態を決定することと、

（c）任意に、被験体のRAS状態を決定することと、

（d）任意に、上記細胞又は組織サンプルにおいてp21の発現及び/又は生物活性が低減又は欠如しているか否かを決定することと、

を含み、NUDT1/MTH1に対して陽性であり、任意に活性化RAS突然変異に対して陽性であり、任意にp21の発現及び/又は生物活性が低減又は欠如している細胞又は組織サンプルが、上記被験体における効果的な癌の治療及び/又は予防の指標となる、方法を提供する。

【0067】

本発明のin vitro方法は適切なキットを用いて実現することができる。したがって、本発明の別の実施形態は、本発明のin vitro方法を行うためのキットであって、NUDT1/MTH1を検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を含む、キットに関する。一態様では、本発明は、RASを検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を更に含む上記キットに関する。キットはALK及び/又はc-Metを検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を付加的に含んでもよい。キットは、p21を検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を更に含み得る。NUDT1/MTH1、RAS、ALK、c-Met及びp21の検出のための幾つかのポリヌクレオチド及び抗体が当該技術分野で既知であり、本明細書の下記にも提示される。

【0068】

したがって、本発明は、本発明の用途のために用いられる化合物又は本発明の医薬組成物の有効性を決定するin vitro方法を行うためのキットであって、該方法が、

（a）被験体から細胞又は組織サンプルを得る工程と、

（b）被験体のNUDT1/MTH1状態を決定する工程と、

を含み、NUDT1/MTH1陽性細胞又は組織サンプルが効果的な癌の治療及び/又は予防の指標となる、キットに関する。

【0069】

本発明のin vitro方法に関連して開示される実施形態は、本発明のキットに変

10

20

30

40

50

更すべきところは変更して適用される。

【0070】

有利に、本発明のキットは、任意に(a)反応バッファー(複数の場合もあり)、貯蔵溶液、洗浄溶液及び/又は本明細書に記載されるアッセイの実施に必要なとされる残りの試薬又は材料を更に含む。さらに、本発明のキットの部品はバイアル若しくはボトルに、又は容器若しくはマルチコンテナ単位の組合せで個々にパッケージングすることができる。これらのバイアル/ボトル/容器又はマルチコンテナは、本明細書に記載されるようなポリヌクレオチド及び/又は抗体に加えて貯蔵のための保存料又はバッファーを含んでいてもよい。加えて、キットは使用説明書を含んでいてもよく、特にキットは患者のNUDT1/MTH1状態、任意に同様に患者のRAS状態、ALK状態及び/又はc-Met状態の決定を行うための取扱説明書を含んでいてもよい。

10

【0071】

本発明のキットは、とりわけ本明細書に記載されるin vitro方法を行うために有利に使用することができ、及び/又は様々な更なる用途に、例えば診断キット、研究ツール又は治療ツールとして用いることができる。加えて、本発明のキットは、科学的目的、医療目的及び/又は診断目的に好適な検出のための更なる手段を含み得る。本発明のキットの製造は、当業者に既知の標準手順に従うのが好ましい。

【0072】

本発明の更なる実施形態は、本発明のin vitro方法におけるキットの使用であって、該キットがNUDT1/MTH1を検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を含む、使用に関する。本発明は、キットがRASを検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を更に含む上記使用に更に関する。加えて、本発明は、キットがALK及び/又はc-Metを検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を更に含む上記使用にも関する。さらに、本明細書に提示されるin vitro方法における本明細書に記載のキットの使用であって、該キットがp21を検出することが可能なポリヌクレオチド及び/又は抗体を更に含む、使用が本明細書に提示される。

20

【0073】

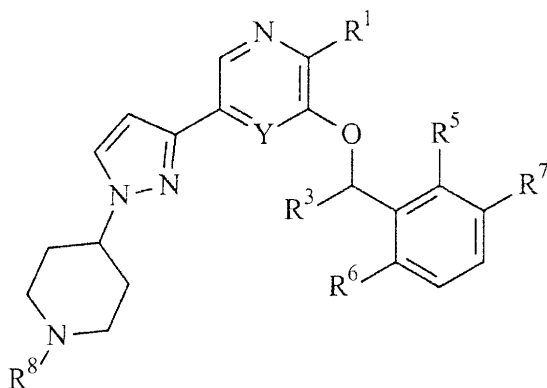
本発明において、驚くべきことに、MTH1がアミノヘテロアリアル化合物(クリゾチニブ等)の新規の標的になることが特定された。さらに、下記の例示的な実施例では、クリゾチニブの(S)-エナンチオマーの標的を同定するスクリーニング方法を、突然変異体KRASを発現する結腸癌細胞株であるSW480細胞において行う。得られる結果から、MTH1(遺伝子名NUDT1)がクリゾチニブの(S)-エナンチオマーの主な標的であることが明らかに実証され、化合物の特異性が強調される。したがって、本発明は、アミノヘテロアリアル化合物の標的を同定するスクリーニング方法に更に関する。

30

【0074】

このため、本発明の一実施形態は、式(6)によって表される以下の化学構造：

【化4】



式(6)

40

(式中、

R<sup>1</sup>は-NH<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>H、-OH又は-SHであり、

50

$R^2$  は  $C_1 \sim 6$  アルキル、 $C_2 \sim 6$  アルケニル又は  $C_2 \sim 6$  アルキニルであり、  
 $R^3$  は  $C_1 \sim 3$  アルキル、 $C_2 \sim 3$  アルケニル、 $C_2 \sim 3$  アルキニル又はシクロプロピル  
 であり、

$Y$  は  $N$  又は  $CR^4$  であり、

$R^4$  は水素、ハロゲン、 $C_1 \sim 6$  アルキル、 $C_2 \sim 6$  アルケニル、 $C_2 \sim 6$  アルキニル又は  
 $C_3 \sim 6$  シクロアルキルであり、

$R^5$ 、 $R^6$  及び  $R^7$  は各々独立してフッ素、塩素、臭素又はヨウ素であり、

$R^8$  は水素又は  $-A-B_n-X$  であり、ここで、

$A$  は単結合、 $-C(=O)-$  又は  $-C(=O)CH_2-$  であり、

$B$  は  $C_1 \sim 4$  アルキレン、 $C_2 \sim 4$  アルケニレン又は  $-(OCH_2CH_2)-$  であり、

$n$  は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、

$X$  は  $-NHR^2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-OH$  又は  $O$ -アルキルである)、

を有するアミノヘテロアリアル化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくは  
 プロドラッグの標的を同定するスクリーニング方法であって、

(a) 細胞溶解物を得る工程と、

(b) 前記アミノヘテロアリアル化合物と前記細胞溶解物とを接触させる工程と、

(c) 分子が前記アミノヘテロアリアル化合物に結合するか否かを決定する工程と、

を含み、分子が前記アミノヘテロアリアル化合物に結合することが見出された場合に、か  
 かる分子を該アミノヘテロアリアル化合物の標的として同定する、スクリーニング方法に  
 関する。

#### 【0075】

本発明の一態様は、式(6)の化合物において、

$R^1$  が  $-NH_2$ 、 $-OH$  又は  $-SH$  であり、

$R^3$  がメチルであり、

$Y$  が  $CR^4$  であり、

$R^4$  が水素又はハロゲンであり、

$R^5$ 、 $R^6$  及び  $R^7$  が各々独立してフッ素又は塩素であり、

$R^8$  が水素又は  $-A-B_n-X$  であり、ここで、

$B$  が  $C_1 \sim 4$  アルキレン又は  $-(OCH_2CH_2)-$  であり、

$n$  が 1、2 又は 3 であり、

$X$  が  $-NH_2$  である、

本発明のスクリーニング方法に関する。

#### 【0076】

本発明の更なる態様は、式(6)の化合物において、

$R^8$  が水素、

$-C(=O)CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-NH_2$ 、

$-C(=O)CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH_2$ 、又は、

$-CH_2CH_2CH_2-NH_2$  である、

本発明のスクリーニング方法に関する。

#### 【0077】

本発明の別の態様は、上記化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくは  
 プロドラッグが、式(7)~(10)によって表される以下の化学構造：

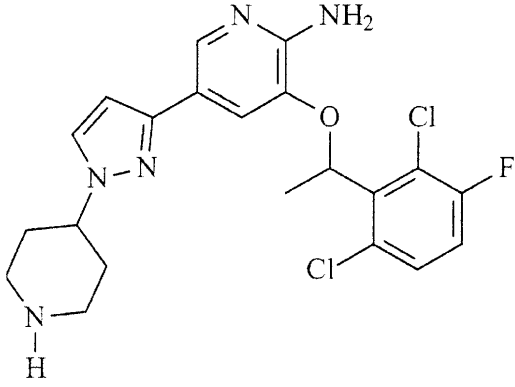
10

20

30

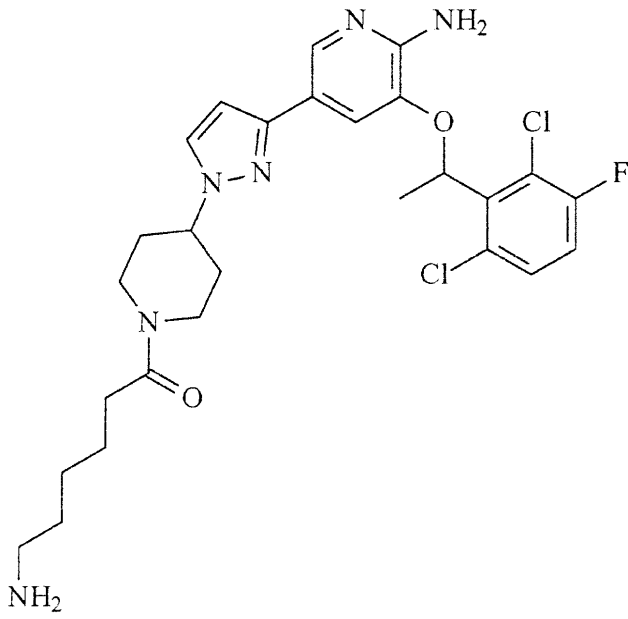
40

【化 5】



式 (7);

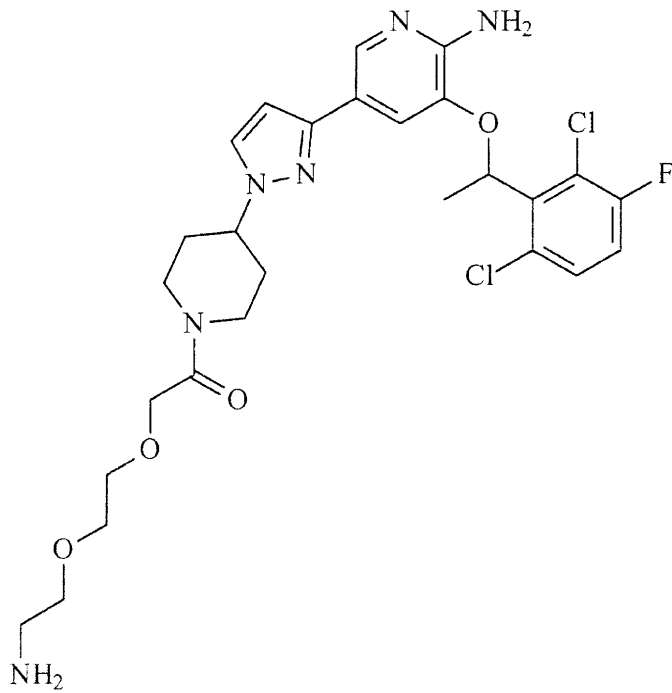
10



式 (8);

20

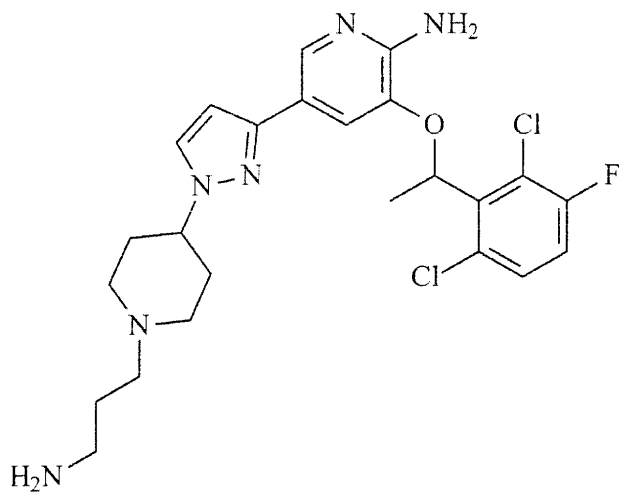
30



式 (9);

10

20



式 (10),

30

の1つを有する、本発明のスクリーニング方法に関する。

## 【0078】

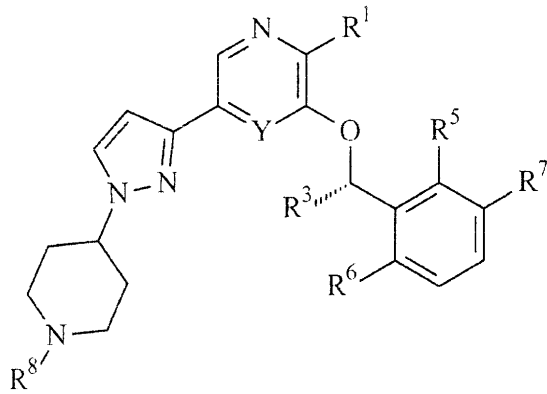
両方のエナンチオマーを考慮する本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の完全なインタラクトムを評価するために、アミノヘテロアリアル化合物のラセミ形態を使用することができる。しかしながら、(R)-又は(S)-エナンチオマー配座のアミノヘテロアリアル化合物を使用することも想定される。しかしながら、本発明において、(R)-エナンチオマー配座よりも(S)-エナンチオマー配座を使用することがより好ましい。したがって、本発明の特定の一実施形態は、上記アミノヘテロアリアル化合物が(S)-エナンチオマー配座にある、本発明のスクリーニング方法に関する。したがって、本発明のスクリーニング方法に適用される上記アミノヘテロアリアル化合物は、本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーであり得る。

40

## 【0079】

このため、本発明の優先的な一態様は、式(1)によって表される以下の化学構造：

## 【化6】



式 (1)

10

(式中、

R<sup>1</sup> は -NH<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>H、-OH 又は -SH であり、R<sup>2</sup> は C<sub>1</sub>-<sub>6</sub> アルキル、C<sub>2</sub>-<sub>6</sub> アルケニル 又は C<sub>2</sub>-<sub>6</sub> アルキニル であり、R<sup>3</sup> は C<sub>1</sub>-<sub>3</sub> アルキル、C<sub>2</sub>-<sub>3</sub> アルケニル、C<sub>2</sub>-<sub>3</sub> アルキニル 又は シクロプロピル であり、Y は N 又は CR<sup>4</sup> であり、R<sup>4</sup> は 水素、ハロゲン、C<sub>1</sub>-<sub>6</sub> アルキル、C<sub>2</sub>-<sub>6</sub> アルケニル、C<sub>2</sub>-<sub>6</sub> アルキニル 又は C<sub>3</sub>-<sub>6</sub> シクロアルキル であり、

20

R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> 及び R<sup>7</sup> は 各々独立して フッ素、塩素、臭素 又は ヨウ素 であり、R<sup>8</sup> は 水素 又は -A-B<sub>n</sub>-X であり、ここで、A は 単結合、-C(=O)- 又は -C(=O)CH<sub>2</sub>- であり、B は C<sub>1</sub>-<sub>4</sub> アルキレン、C<sub>2</sub>-<sub>4</sub> アルケニレン 又は -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)- であり、

n は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、

X は -NHR<sup>2</sup>、-NH<sub>2</sub>、-SH、-OH 又は O-アルキル である)、

を有するアミノヘテロアリール化合物の (S)-エナンチオマー、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグの標的を同定するスクリーニング方法であって、

(a) 細胞溶解物を得る工程と、

30

(b) 前記アミノヘテロアリール化合物と前記細胞溶解物とを接触させる工程と、

(c) 分子が前記アミノヘテロアリール化合物に結合するか否かを決定する工程と、

を含み、分子が前記アミノヘテロアリール化合物に結合することが見出された場合に、かかる分子を該アミノヘテロアリール化合物の標的として同定する、スクリーニング方法に関する。

## 【0080】

本発明の一実施形態は、式(1)の化合物において、

R<sup>1</sup> が -NH<sub>2</sub>、-OH 又は -SH であり、R<sup>3</sup> が メチル であり、Y が CR<sup>4</sup> であり、

40

R<sup>4</sup> が 水素 又は ハロゲン であり、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> 及び R<sup>7</sup> が 各々独立して フッ素 又は 塩素 であり、R<sup>8</sup> が 水素 又は -A-B<sub>n</sub>-X であり、ここで、B が C<sub>1</sub>-<sub>4</sub> アルキレン 又は -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)- であり、

n が 1、2 又は 3 であり、

X が -NH<sub>2</sub> である、

このスクリーニング方法に関する。

## 【0081】

本発明の特定の実施形態は、式(1)の化合物において、

R<sup>8</sup> が 水素、

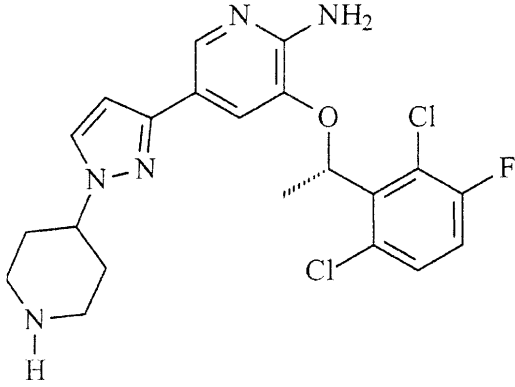
50

- C(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、
  - C(=O)CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、又は、
  - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>である、
- このスクリーニング方法に関する。

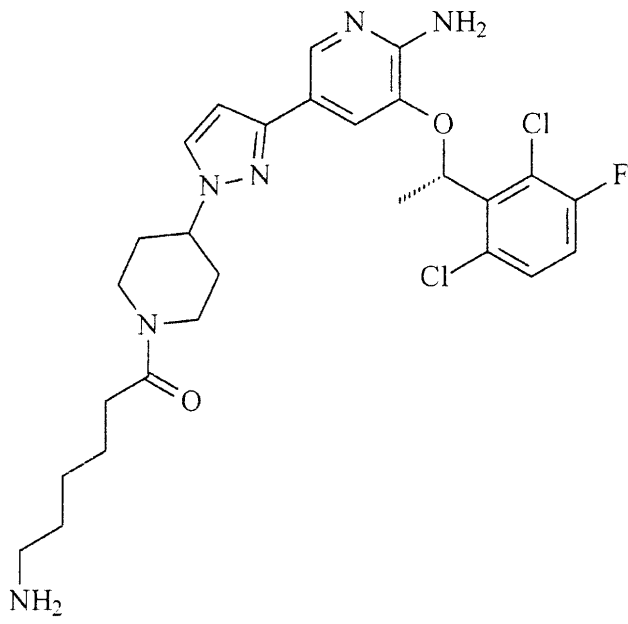
【0082】

本発明の優先的な態様は、上記化合物、又はその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグが、式(2)~(5)によって表される以下の化学構造：

【化7】

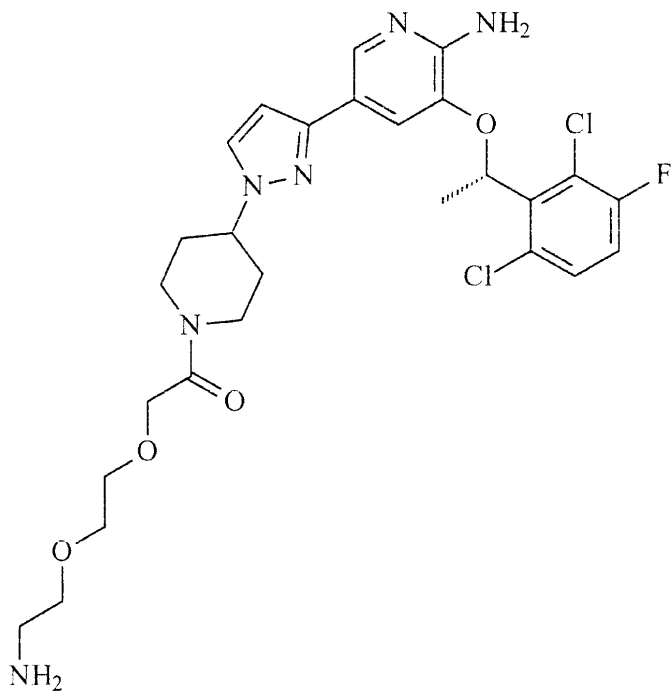


式(2);



10

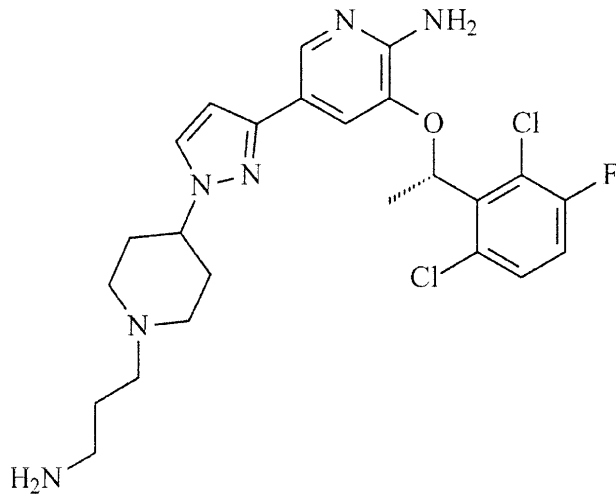
式 (3);



20

30

式 (4) 又は



式 (5).

10

の1つを有する、このスクリーニング方法に関する。

## 【0083】

言及したように、本発明は、上記の工程(a)~(c)を含むスクリーニング方法に関する。本発明の特定の態様は、

(d) アミノヘテロアリアル化合物の前記(S)-エナンチオマーが前記分子の生物活性を変化させるか否かを決定する工程、

を更に含み、アミノヘテロアリアル化合物の前記(S)-エナンチオマーが前記分子の生物活性を変化させることが見出された場合に、かかる分子を該アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーの標的として同定する、本発明のスクリーニング方法に関する。

20

## 【0084】

本発明のスクリーニング方法において、細胞溶解物を得て、アミノヘテロアリアル化合物(例えばアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー)と接触させる。この細胞溶解物を生成するための細胞はヒト癌患者から得られる癌細胞であり得る。例えば、ヒト癌患者から得られる上記細胞は生検材料の生体物質を含み得る。「生検材料」の意味は当該技術分野で既知である。例えば、生検材料は、例えば主治医によって癌を患う患者から採取された癌細胞(複数の場合もあり)又は癌組織(複数の場合もあり)を含む。代替的には、細胞溶解物を生成する細胞は、(a)非ヒト動物(複数の場合もあり)、又は樹立ヒト癌細胞株等の樹立癌細胞株、又は改変細胞株から得られる。

30

## 【0085】

したがって、本発明の一実施形態は、前記細胞溶解物が癌患者、樹立癌細胞株又は非ヒト動物の細胞又は組織サンプルに由来する、本発明のスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング方法を行うために、ヒト癌患者から得られる腫瘍サンプルを用いて細胞溶解物を生成するのが好ましい。例えば、ヒト癌患者から得られる上記細胞は生検材料の生体物質を含み得る。細胞溶解物を樹立ヒト癌細胞株等の樹立癌細胞株を用いて生成するのも好ましい。例えば、上記細胞溶解物を生成するために、ユーイング肉腫ファミリーの腫瘍(ESFT)の細胞(例えばSK-ES-1及びSK-N-MC細胞)を使用することができる。本発明のスクリーニング方法において、幾つかの細胞溶解物を並行して生成及び分析することができる。例えば、細胞溶解物を調製するために、遺伝的背景の異なるヒト癌細胞株(例えばALK陽性及びALK陰性)を並行して使用及び分析することができる。

40

## 【0086】

上述のように、本発明のスクリーニング方法において、アミノヘテロアリアル化合物の上記(S)-エナンチオマーが上記分子の生物活性を変化させるか否かを決定することができる。上記分子の生物活性はアミノヘテロアリアル化合物の上記(S)-エナンチオマーによって増大又は阻害し得る。しかしながら、上記分子の生物活性が阻害されることが

50

好ましい。したがって、本発明の一態様は、生物活性の変化が生物活性の阻害である、本発明のスクリーニング方法に関する。

【0087】

本発明の要旨は、アミノヘテロアリアル化合物、好ましくはアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーがMTH1の極めて強力な阻害剤であることである。このため、本発明の好ましい実施形態は、前記化合物がMTH1の生物活性を阻害する、本発明の用途のために用いられる化合物、本発明の医薬組成物、本発明の*in vitro*方法、本発明のキット、本発明の使用、又は本発明のスクリーニング方法に関する。

【0088】

上述のように、本発明はアミノヘテロアリアル化合物の標的を同定するスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は薬物プルダウンアッセイを含み得る。したがって、対象の化合物(例えばアミノヘテロアリアル化合物)をセファロースビーズに固定化する直接的な化学プロテオミクスアプローチを用いることができる。かかる直接的な化学プロテオミクスアプローチは当該技術分野で既知であり、例えばSuperti-Furga (2012) *Designing Multi-Target Drugs*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2012; p 256<sup>8</sup>に記載されている。本発明のスクリーニング方法において用いることができる実験的設定を図1に提示する。図1において「化合物中心化学プロテオミクス(Compound-centric chemical proteomics)」と記載される方法を本発明において使用するのが好ましい。活性に基づいたプローブプロファイリングも、本明細書で開示した化合物の1つを変更したものをを用いて適用することができる。

10

20

【0089】

セファロースビーズでの固定化は、化合物とビーズ基質との間の共有結合を確立する化学反応によって達成することができる。したがって、化合物は反応を行うのに適切な反応性官能基を必要とし、多くの場合、元の化合物の化学修飾が行われる。当然ながら、分子構造の変化により調査する化合物の相互作用挙動及び標的スペクトルも変化し得る。化合物を固定化する分子内の位置が結合に影響を及ぼし得ることに留意されたい。このため、連結可能な全ての誘導体に対する既知の標的の結合を検査及び確認することが慣行である。下記の実施例において説明されるように、様々なリンカー長及び疎水性に関する化学的性質を包含する異なる化学的リンカーを有する3つのクリゾチニブの誘導体(すなわち、本明細書で規定されるCeMM-144、CeMM-145及びCeMM-146)を調製した。クリゾチニブ誘導体CeMM-144、CeMM-145及びCeMM-146の化学合成は図13に概説される。驚くべきことに、例示的な下記の実施例に示されるように、アミノプロピル置換CeMM-146は両方のALKアイソフォームを最も高度に富化し、その後PEG-誘導体CeMM-145が続く。未変性クリゾチニブ及びCeMM-144は、CeMM-146及びCeMM-145よりも少ない程度でALKに結合する。

30

【0090】

本発明のスクリーニング方法において、細胞溶解物とアミノヘテロアリアル化合物とを接触させた後に、上記アミノヘテロアリアル化合物に結合する分子をアミノヘテロアリアル化合物の親和性精製によって同時精製する。親和性精製の方法は当該技術分野で既知であり、例えばSuperti-Furga (2012) *Designing Multi-Target Drugs*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2012; p 256<sup>8</sup>に記載されている。上記アミノヘテロアリアル化合物に結合する分子(例えばタンパク質)の精製の後、分子の同一性を決定することができる(例えば、アミノヘテロアリアル化合物に結合するタンパク質を決定することができる)。この同定工程には質量分析が適用され得る。質量分析方法は当該技術分野で既知であり、例えばSuperti-Furga (2012) *Designing Multi-Target Drugs*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2012; p 256<sup>8</sup>に記載されている。

40

【0091】

従来技術に報告されているように、MTH1抑制は、癌細胞の増殖欠損を引き起こすことが示された<sup>1-3</sup>。このため、上記に示したように、MTH1の標的化は、癌の治療に対

50

する新規の治療選択をもたらし得る。これと一致して、MTH1状態（特にMTH1活性のレベル）を用いて、癌患者の治療（すなわち療法）をモニタリングする（すなわちその有効性にアクセスする）ことができる。MTH1の活性はMTH1の発現によって反映され得るため、MTH1発現のレベルを用いて、癌患者の治療（すなわち療法）をモニタリングする（すなわちその有効性にアクセスする）こともできる。治療はMTH1阻害剤（複数の場合もあり）を含み得る。このため、癌患者の治療の有効性をモニタリングする方法であって、

（a）上記癌患者に由来する第1の組織サンプルにおけるMTH1活性及び／又は発現を第1の時点で決定する工程と、

（b）上記癌患者に由来する第2の組織サンプルにおけるMTH1活性及び／又は発現を第2の時点で決定する工程と、

（c）工程（a）で決定されたMTH1活性及び／又は発現と工程（b）で決定されたMTH1活性及び／又は発現とを比較する工程と、

を含み、工程（a）で決定されたMTH1活性及び／又は発現と比較して、工程（b）で決定されたMTH1の低減した活性及び／又は発現が効果的な治療の指標となり、

工程（a）で決定されたMTH1活性及び／又は発現と比較して、工程（b）で決定されたMTH1の向上した又は同一の活性及び／又は発現が効果のない治療の指標となる、方法が本明細書に提示される。

#### 【0092】

治療、特に癌療法の有効性は、参照値を用いることによってもモニタリングすることができる。このため、癌患者の治療の有効性をモニタリングする方法であって、

（a）上記癌患者に由来する組織サンプルにおけるMTH1活性及び／又は発現を決定する工程と、

（b）工程（a）で決定されたMTH1活性及び／又は発現と参照値とを比較する工程と、

を含み、参照値と比較して、工程（a）で決定されたMTH1の低減した活性及び／又は発現が効果的な治療の指標となり、

参照値と比較して、工程（a）で決定されたMTH1の向上した又は同一の活性及び／又は発現が効果のない治療の指標となる、方法も本明細書に提示される。

#### 【0093】

本明細書に記載されるように、癌患者の治療の有効性をモニタリングする方法は *in vitro* 方法であり得る。癌患者の治療の有効性をモニタリングする上記の方法において、上記組織サンプルは、好ましくは癌組織サンプルである。

#### 【0094】

上記のように、MTH1と発癌RAS、活性酸素種（ROS）、酸化損傷及び腫瘍発生の発現との間には強い関連性がある。したがってMTH1の阻害剤は、癌の治療の有望な薬剤となる。このため、抗癌性物質を同定する方法を本明細書に提示する。この方法は、MTH1活性の阻害剤であることが疑われる少なくとも1つの物質を同定する上で極めて有用である。この方法によって同定される強力な阻害剤は、癌の医学的介入に用いることができる。抗癌性物質を同定する方法は、

（a）MTH1、又はMTH1を含む細胞、組織若しくは非ヒト動物と少なくとも1つの試験物質とを接触させる工程と、

（b）MTH1活性及び／又は発現を決定する工程と、

（c）MTH1活性及び／又は発現を低減する物質を選択する工程と、

を含み、MTH1活性及び／又はMTH1発現を低減する能力が選択された物質の抗癌活性の指標となる。

#### 【0095】

抗癌性物質を同定する上記方法は、工程（a）が精製MTH1タンパク質を含む無細胞組成物であり、工程（b）が少なくとも1つの試験物質がMTH1の生物活性を阻害するか否かを決定することを含むことを特徴とし得る。抗癌性物質を同定する方法は、工程（

10

20

30

40

50

a) が MTH1 を発現する細胞、組織又は非ヒト動物を含み ( 該 MTH1 の発現は、導入遺伝子の形態での MTH1 の発現でもあり得る )、工程 ( b ) が少なくとも 1 つの試験物質が MTH1 の生物活性及び / 又は発現を阻害するか否かを決定することを含むことも特徴とし得る。抗癌性物質を同定する方法の工程 ( b ) は、細胞、組織又は非ヒト動物に由来する細胞溶解物において MTH1 生物活性の低減及び / 又は MTH1 発現の低減を検出することを含む得る。

【 0 0 9 6 】

抗癌性物質を同定する方法の工程 ( a ) に適用される MTH1 の殆どが機能的である、すなわち 2 - O H - d A T P 及び 8 - オキソ - d G T P 等の酸化ヌクレオチドを加水分解する能力を有するとみなされる。工程 ( a ) に適用される MTH1 の少なくとも 2 5 % 又は 5 0 %、好ましくは少なくとも 5 0 %、7 5 % 又は 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、9 8 % 又は 9 9 % が機能的であることが想定される。

10

【 0 0 9 7 】

抗癌性物質を同定する方法の工程 ( a ) において、「MTH1 又は MTH1 を含む細胞、組織若しくは非ヒト動物を少なくとも 1 つの試験物質と接触させる」という用語は、「MTH1 の誘導体若しくは MTH1 の機能的断片、又は MTH1 の誘導体若しくは MTH1 の機能的断片を含む細胞、組織若しくは非ヒト動物を少なくとも 1 つの試験物質と接触させる」ことにも関することを留意されたい。「MTH1 の誘導体」及び「MTH1 の機能的断片」という用語の定義は本明細書の下記に提示する。

【 0 0 9 8 】

本明細書に記載の抗癌性物質を同定する方法によると、少なくとも 1 つの試験物質を、MTH1 を含む細胞、組織又は非ヒト動物と接触させる。例えば、上記細胞、組織又は非ヒト動物は MTH1 遺伝子、特に同様に MTH1 遺伝子の付加的なコピー ( 単数又は複数 )、MTH1 突然変異遺伝子 ( 複数の場合もあり )、組み換え MTH1 遺伝子構築物等を発現し得る。したがって、MTH1 活性及び / 又は発現を低減させる試験物質の能力は、MTH1 又は対応する遺伝子構築物のかかる遺伝子産物の発現レベル ( 例えば mRNA 又はタンパク質 ) を測定することによって決定することができ、( 標準又は参照値と比較して ) 低い発現レベルは MTH1 活性及び / 又は発現を低減する試験物質の能力の指標となる。

20

【 0 0 9 9 】

本明細書に記載されるように、同定方法の一態様において抗癌性物質、上記細胞、組織又は非ヒト動物が遺伝子操作される。上記細胞、組織又は非ヒト動物はレポーター遺伝子発現構築物を含み得る。特に、上記レポーター遺伝子発現構築物は MTH1 プロモーター及び / 又はエンハンサー、又はレポーター遺伝子に結合した MTH1 依存性因子の MTH1 依存性プロモーター及び / 又はエンハンサーを含み得る。MTH1 依存性プロモーター ( すなわち MTH1 依存性因子のプロモーター ) は、MTH1 の下流に作用するタンパク質のプロモーターであり得る。例えば、上記タンパク質は、2 - O H - d A T P 及び 8 - オキソ - d G T P 等の酸化ヌクレオチドの加水分解に応答して転写的に上方調節又は下方調節され得る。したがって、上記タンパク質が MTH1 酵素活性に応答して転写的に上方調節される場合、レポーター遺伝子構築物の転写の低減が MTH1 活性及び / 又は発現の低減の指標となり得る。一方、上記因子が MTH1 酵素活性に応答して転写的に下方調節される場合、レポーター遺伝子構築物の転写の向上が MTH1 活性及び / 又は発現の低減の指標となり得る。したがって、本明細書で規定及び開示される場合、「MTH1 を含む」という用語は当該技術分野で既知であり、本明細書に記載される MTH1 遺伝子 ( 複数の場合もあり ) 又はタンパク質 ( 複数の場合もあり ) だけを指すものではない。MTH1 のプロモーター及び / 又はエンハンサー領域を含むレポーター構築物も抗癌性物質を同定する方法に使用することができる。したがって、抗癌性物質を同定する方法において使用される細胞 ( 複数の場合もあり )、組織 ( 複数の場合もあり ) 及び / 又は非ヒト動物 ( 複数の場合もあり ) はレポーター構築物を含み得る。例示的なレポーターはルシフェラーゼ及び GFP、RFP 等のような蛍光タンパク質である。MTH1 ( 又は MTH1 依存性因

30

40

50

子)を含むプロモーター及び/又はエンハンサー領域を含むレポーター構築物も使用することができる。したがって、本発明において使用される細胞(複数の場合もあり)、組織(複数の場合もあり)及び/又は非ヒト動物(複数の場合もあり)に、レポーター構築物を安定に又は一時的にトランスフェクトすることができる。

#### 【0100】

使用される非ヒト動物又は細胞は、トランスジェニック又は非トランスジェニックであり得る。上記トランスジェニック細胞又は非ヒト動物において、少なくとも1つのMTH1遺伝子が過剰発現されている場合もあり、それにより非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック細胞におけるMTH1活性が向上し得る。概して、MTH1が本明細書に記載の抗癌性物質を同定する方法に使用される細胞(複数の場合もあり)、組織(複数の場合もあり)、非ヒト動物(複数の場合もあり)において高度に発現されていることが本明細書で好ましい。「トランスジェニック非ヒト動物」、「トランスジェニック細胞」又は「トランスジェニック組織」という用語は、本明細書で使用される場合、種々の遺伝物質を含む非ヒト動物、組織又は細胞を指す。これに関連する「遺伝物質」という用語は、任意の種類核酸分子又はその類似体であり得る。「異なる」という用語は、野生型動物又は細胞のゲノムと比較して付加的な又はより少ない遺伝物質を意味する。トランスジェニック細胞/動物の生成に使用される異なる発現系の概要は、例えばMethods in Enzymology 153 (1987), 385-516, in Bitter et al. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544) and in Sawers et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9)、Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4)、Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463)、Griffiths et al., (Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440)を指す。

10

20

30

40

50

#### 【0101】

(トランスジェニック)非ヒト動物又はそれに由来する(トランスジェニック)細胞の非限定的な例は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット及びショウジョウバエからなる群から選択される。好ましい実施形態では、(トランスジェニック)非ヒト動物又は(トランスジェニック)細胞は哺乳動物の細胞であるか又はそれに由来する。概して、(トランスジェニック)細胞は真核細胞であり得る。例えば、本発明による(トランスジェニック)細胞は酵母、真菌、植物又は動物の細胞であり得るが、これらに限定されない。(トランスジェニック)細胞はヒト、例えばヒト癌組織に由来し得る。(トランスジェニック)細胞は樹立癌細胞株であり得る。概して、核酸構築物又はベクターによる細胞の形質転換又は遺伝子操作は、例えばSambrook and Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990に記載される標準方法によって行うことができる。

#### 【0102】

抗癌性物質を同定する方法によると、決定されたMTH1の活性及び/又は発現は、それぞれMTH1活性及び/又は発現の標準又は参照値と比較することができる。標準/参照値は、試験物質と接触させていない細胞、組織又は非ヒト動物において決定することができる。MTH1の活性及び/又は発現の低減は、日常的に使用される参照物質(複数の場合もあり)によってMTH1活性及び/又は発現の低減と比較することもできる。当業者は、MTH1の活性及び/又は発現が(好ましくは統計的に有意に)低減されているかを容易に決定/評価する立場にある。

#### 【0103】

抗癌性物質を同定する方法において、「接触させる」という用語はMTH1又はMTH1を含む細胞、組織若しくは非ヒト動物への少なくとも1つの試験物質の添加を指す。「接触させる」という用語は、試験物質が細胞取込みにより細胞に効果的となり、それによりMTH1に対するその阻害機能を発揮する形でのMTH1を含む細胞への試験物質の添加も指す。

#### 【0104】

「試験物質」という用語は本明細書で使用される場合、抗癌性物質を同定する方法によって試験される分子若しくは物質若しくは組成物若しくは薬剤又はそれらの任意の組合せを指す。試験物質は原則的に任意の供給源から得ることができる。少なくとも1つの試験物質は、自然発生物質又はトランスジェニック生物によって産生され、任意に或る程度まで精製した及び/又は更に改変した物質である。実際的には、試験物質は化合物ライブラリーから取り出すことができる。

【0105】

試験物質はMTH1の活性及び/又は発現の潜在的阻害剤であり得る。試験物質は任意の化学物質、例えば、無機化学物質、有機化学物質、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、MTH1に対するsiRNA、MTH1に対するshRNA、若しくはそれらの組合せ、又は本明細書に記載される化合物若しくは組成物のいずれかであり得る。本明細書で使用される試験物質は、とりわけ自然発生し、及び/又は合成的に、組換えにより及び/又は化学的に作製された化学的又は生物学的な起源の物質又は組成物であり得る。このため、試験物質はタンパク質、タンパク質断片、ペプチド、アミノ酸及び/又はその誘導体、又はMTH1、MTH1機能の調節タンパク質/配列若しくはその機能的断片に結合し及び/又はそれと相互作用する別の物質であり得る。合成化合物ライブラリーはMaybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, N.J.)、Brandon Associates (Merrimack, N.H.)及びMicrosource (New Milford, Conn.)から市販されている。希少化学物質ライブラリーはAldrich (Milwaukee, Wis.)から利用可能である。代替的には、細菌、真菌、植物及び動物抽出物の形態の天然物質ライブラリーが例えばPan Laboratories (Bothell, Wash.)又はMycosSearch (N.C.)から利用可能であるか、又は容易に作製可能である。加えて、天然の及び合成的に作製されるライブラリー及び化合物は従来の化学的、物理的及び生化学的な手段によって容易に変更することができる。系統発生分析方法に基づく非オーファン化 (deorphanisation) プログラムにより得られる結果は、MTH1に結合し又はそれと相互作用する天然因子の発見の助けとなり、例えば潜在的にMTH1活性及び/又は発現を低減する能力を有する物質のコンピューターによるプロファイリングを可能とする。MTH1に結合するか又はそれと相互作用する物質はMTH1の阻害剤であり、したがって抗癌性物質であり得る。

【0106】

MTH1に結合するか又はそれと相互作用する潜在的因子の化学的ライブラリーの生成は当該技術分野で既知である。例えば、コンビナトリアル化学を用いて物質のライブラリーを生成することができる。コンビナトリアル化学ライブラリーは、多数の化学的「構成要素」試薬を組み合わせることで化学合成又は生物学的合成によって生成する多様な化学物質のコレクションである。例えば、ポリペプチドライブラリー等の線形コンビナトリアル化学ライブラリーは、アミノ酸を所与の長さのペプチドを得るのに考え得る全ての組合せで組み合わせることによって形成される。理論上は何百万という化学物質を、化学的構成要素のかかるコンビナトリアル混合によって合成することができる。例えば、或る評論家は、100個の代替可能な化学的構成要素の系統的なコンビナトリアル混合が1億個の四量体化合物又は100億個の五量体化合物の理論的合成をもたらすことを観察している (例えば、Gallop, Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 37, No. 9, 1233-1250 (1994)を参照されたい)。天然産物ライブラリーを含む当業者に既知の他の化学的ライブラリーを用いることもできる。生成後、望ましい生物学的特性を有する物質についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする。例えば、薬物として又は薬物の開発に有用であり得る物質は、標的タンパク質 (例えばMTH1) に結合する能力を有する可能性がある。

【0107】

加えて、本発明において、物質のライブラリーをスクリーニングして、MTH1のアンタゴニスト又は阻害剤として機能し得る物質を同定することができる。初めに、小分子のライブラリーを当該技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリー形成方法を用いて生成することができる。米国特許第5,463,564号及び同第5,574,656号は

10

20

30

40

50

2つのかかる教示である。次いで、ライブラリーの物質をスクリーニングして、所望の構造的及び機能的特性を有するこれらの物質を同定することができる。ライブラリーをスクリーニングする方法は当該技術分野で既知であり、例えば米国特許第5,684,711号において論考されている。加えて、標的タンパク質の生化学的機能が既知である場合に多数の自然発生標的について広範なスクリーニング技法が知られている。例えば、幾つかの技法は、薬物リードを同定及び開発するために標的タンパク質を生化学的にかつ遺伝子学的に調査及び分析する小ペプチドの生成及び使用を含む。かかる技法としては、国際公開第99/35494号、同第98/19162号及び同第99/54728号に記載の方法が挙げられる。

#### 【0108】

試験物質は多数の化学物質群を包含し、好ましくは有機化合物であり、より好ましくは本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物等の小(有機)分子であり得る。

#### 【0109】

試験物質はタンパク質(特にMTH1)との構造的相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含み、典型的には少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシル又はカルボキシル基、好ましくは少なくとも2つの機能的化学基を含み得る。試験物質は上記の官能基の1つ又は複数で置換された炭素環又は複素環構造及び/又は芳香族若しくは多環芳香族構造を含むことが多い。試験物質及び/又は選択抗癌性物質は有効性、安定性、薬学的適合性等を向上するように修飾することができる。抗癌性物質の構造的同定を用いて、付加的な抗癌性物質を同定、生成又はスクリーニングすることができる。

#### 【0110】

抗癌性物質を同定する本明細書に記載の方法によると、第1のスクリーニングにおいて選択された物質を、先の発見を検証し、最も強力なMTH1の阻害剤/アンタゴニストを選択するためにその後のスクリーニングに供することができる。複数回のスクリーニング及び選択により、MTH1を阻害/拮抗する顕著な能力を示すこれらの物質が選択される。

#### 【0111】

抗癌性物質を同定する方法の工程(c)における「MTH1活性及び/又は発現を低減する」という用語は、「MTH1の活性及び/又は発現」がMTH1又はMTH1を含む細胞、組織若しくは非ヒト動物と少なくとも1つの試験物質との接触の際に、好ましくは(対照)標準又は参照値と比較して低減することを意味し、MTH1活性及び/又は発現の低減が選択された物質の抗癌活性(すなわち、選択された物質の癌を改善する能力)の指標となる。

#### 【0112】

本明細書に記載されるように、「MTH1活性を低減する」物質は、MTH1の生物活性(すなわち、2-OH-dATP及び8-オキソ-dGTP等の酸化ヌクレオチドを加水分解する能力)を低減する物質に関する。MTH1生物活性を測定する方法は当該技術分野で既知であり、本明細書にも提示される。加えて、「MTH1発現を低減する」物質は、MTH1タンパク質(複数の場合もあり)をコードする遺伝子(複数の場合もあり)の発現の低減に関する。したがって、MTH1タンパク質(複数の場合もあり)をコードする遺伝子(複数の場合もあり)の発現の低減を評価するために、遺伝子産物(例えばタンパク質又はスプライスされた、スプライスされていない若しくは部分的にスプライスされたmRNA)の定量的評価を行うことができる。当業者はこれに関連して使用される標準方法を認識しているか、又は標準的な教科書(例えば、Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001))からこれらの方法を推定することができる。例えば、MTH1に由来するmRNAのそれぞれの濃度/量に関する定量的データはノーザンプロット法、リアルタイムPCR等によって得ることができる。

#### 【0113】

好ましくは、MTH1活性及び/又は発現は、対照サンプルと比較して少なくとも約1

10

20

30

40

50

0%、20%、30%、40%、好ましくは少なくとも50%、60%、70%、80%、90%又は100%低減し得る。言及したように、当業者はMTH1の活性又はMTH1（又はその断片）をコードする核酸分子の発現の決定又は定量化に使用される標準方法を認識している。加えて、MTH1の活性を決定及び定量化する方法は本明細書及び下記の実施例に詳細に記載されている。加えて、MTH1の発現は免疫凝集、免疫沈降（例えば免疫拡散、免疫電気泳動、免疫固定）、ウエスタンブロット法（例えば（*in situ*）免疫組織化学、（*in situ*）免疫細胞化学、親和性クロマトグラフィー、酵素免疫測定）等を利用することによってタンパク質レベルで決定することができる。溶液中の精製ポリペプチドの量は物理的方法、例えば測光によって決定することができる。混合物中の特定のポリペプチドを定量化する方法は、例えば抗体の特異的結合に依存する。抗体の特異性を用いた具体的な検出及び定量化方法は、例えば免疫組織化学（*in situ*）を含む。例えば細胞、組織又は非ヒト動物におけるMTH1タンパク質の濃度/量は酵素結合免疫吸着法（ELISA）によって決定することができる。代替的には、ウエスタンブロット分析又は免疫組織化学的染色を行うことができる。ウエスタンブロット法は、電気泳動によるタンパク質の混合物の分離と抗体を用いた特異的検出とを組み合わせたものである。電気泳動は2D電気泳動等の多次元であってもよい。通常は、ポリペプチドを1次元に沿う見掛けの分子量及び他の方向に沿う等電点によって2D電気泳動で分離する。

10

#### 【0114】

発現は核酸レベル（例えば、遺伝子産物/コーディング核酸配列の産物がスプライスされていない/部分的にスプライスされた/スプライスされたmRNAである場合）でもノーザンブロット法又は*in-situ*PCR若しくはリアルタイムPCRのようなPCR法を利用することによって決定することができる。mRNAの定量的決定は、ノーザンブロット法、mRNA転写産物に特異的な1つ若しくは複数のプローブ若しくはプローブセットを備えるマイクロアレイ若しくはDNAチップでのハイブリダイゼーション、又は上記で言及した、リアルタイムPCR等の定量的PCR法のようなPCR法を利用することによって行うことができる。（特異的な）mRNA又はタンパク質（複数の場合もあり）/ポリペプチド（複数の場合もあり）の濃度/量の検出及び/又は決定のためのこれらの及び他の好適な方法は当該技術分野で既知であり、例えばSambrook（2001）（上記引用文中）に記載されている。

20

30

#### 【0115】

当業者はmRNA又はポリペプチド/タンパク質、特に本明細書で上記した遺伝子産物の量を、例えば決定されるmRNA又はポリペプチド/タンパク質の検出シグナルの強度と量との間の相関、好ましくは線形相関を利用することによって決定することが可能である。

#### 【0116】

抗癌性物質を同定する方法によると、MTH1活性及び/又は発現の低減量は、MTH1（又は対応するレポーターシグナル）の活性及び/又は発現が強く低減する、好ましくは非常に低いか又は検出可能でない場合に統計的に有意であり、物質を選択することができる。例えば、MTH1（又は対応するレポーターシグナル）の活性及び/又は発現は（対照）標準値と比較して少なくとも50%、60%、70%、80%、より好ましくは少なくとも90%低減し得る。

40

#### 【0117】

本明細書で、特に式（1）及び（6）に関する実施形態において使用される場合、以下の定義が適用される。

#### 【0118】

「ハロゲン」という用語には、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素が含まれる。

#### 【0119】

C<sub>1-6</sub>アルキルは、直鎖又は分岐アルキルを指す。例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチ

50

ル、*n*-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシルが挙げられる。したがって、 $C_{1-3}$ アルキルは、直鎖又は分岐アルキル、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルを指す。

【0120】

$C_{2-6}$ アルケニルは、その任意の位置に1つ又は複数の二重結合を有する直鎖又は分岐アルケニルを指す。例としては、ビニル、アリル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、プレニル、ブタジエニル、ペンテニル、イソペンテニル、ペンタジエニル、ヘキセニル、イソヘキセニル、ヘキサジエニルが挙げられる。したがって、 $C_{2-3}$ アルケニルは、その任意の位置に1つ又は複数の二重結合を有する直鎖又は分岐アルケニルを指す。例としては、ビニル、アリル、プロペニル、イソプロペニルが挙げられる。

10

【0121】

$C_{2-6}$ アルキニルは、その任意の位置に1つ又は複数の三重結合を有する直鎖又は分岐アルキニルを指す。例としては、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニルが挙げられる。アルキニル基は、その任意の位置に二重結合を更に有していてもよい。したがって、 $C_{2-3}$ アルキニルは、その任意の位置に1つ又は複数の三重結合を有する直鎖又は分岐アルキニルを指す。例としては、エチニル及びプロピニルが挙げられる。

【0122】

$C_{1-4}$ アルキレンは、直鎖の二価炭化水素鎖を指す。例としては、メチレン、エチレン、プロピレン及びブチレンが挙げられる。

20

【0123】

$C_{2-4}$ アルケニレンは、その任意の位置に1つ又は複数の二重結合を有する直鎖の二価炭化水素鎖を指し、例えば、ビニレン、プロペニレン及びブテニレンを含む。

【0124】

本発明によると、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」及び「本発明の使用される化合物」という用語は、本明細書で規定される「アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」に関する。加えて、本明細書で使用される場合、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」及び「本発明の使用される化合物」という用語は、式(1)~(5)のいずれか1つに示され、添付の特許請求の範囲の請求項1に記載される「アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」の同義語である。好ましくは、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」及び「本発明の使用される化合物」という用語は、項目1~4、8~20及び37に記載される「アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」の同義語である。

30

【0125】

本明細書で実証されるように、(R)-クリゾチニブとは対照的に、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」は、ALK陽性癌の治療における使用に限定されない。このため、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」はALK陰性癌の治療にも使用することができる。したがって、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」及び「本発明の使用される化合物」という用語は、「癌の治療及び/又は予防が上記被験体の癌細胞又は組織のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係である、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」に更に関する。

40

【0126】

より具体的には、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」

50

、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」及び「本発明の使用される化合物」という用語は、MTH1の生物活性(特に触媒活性)を阻害する能力を有する化合物に関する。したがって、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」及び「本発明の使用される化合物」という用語は、被験体において癌の治療及び/又は予防に使用されるMTH1の生物活性を阻害することが可能なアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーに関する。

【0127】

上述のように、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」という用語は、ALK陽性癌の治療における使用に限定されない。このため、「本発明のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」及び「本発明の使用される化合物」という用語は、被験体における癌の治療及び/又は予防に使用されるMTH1の生物活性を阻害する能力を有し、癌の治療及び/又は予防が上記被験体の癌細胞又は組織のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係であるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーに更に関する。特定の化合物がMTH1の生物活性を阻害する能力を有するかどうかを決定する手段及び方法は当該技術分野で既知であり、本明細書で下記に提示される。

10

【0128】

「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」は、クリゾチニブの誘導体の(S)-エナンチオマー(CeMM-144、CeMM-145又はCeMM-146等)であり得る。好ましくは、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」はCeMM-146である。より好ましくは、「本発明の使用されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー」は(S)-クリゾチニブ(すなわち、化学物質3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミンの(S)-エナンチオマー)である。

20

【0129】

当業者は、クリゾチニブの(S)-エナンチオマー(すなわち、化学物質3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミンの(S)-エナンチオマー)を合成する能力を有する。加えて、クリゾチニブの(S)-エナンチオマー(すなわち、化学物質3-[1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロ-フェニル)-エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イル-1H-ピラゾール-4-イル)-ピリジン-2-イルアミンの(S)-エナンチオマー)の調製が本明細書で図14に記載される。この合成戦略は光学的に純粋な出発物質の使用に依存し、以前に公表されたラセミ型及び/又は(R)-クリゾチニブの合成手順に従い得る。ラセミ型及び/又は(R)-クリゾチニブを合成する手順は、例えばde Koning (2011) Organic Process Research & Development, 15: 1018-1026<sup>3 8</sup>(その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に与えられる。

30

40

【0130】

MTH1の「機能的断片」は、MTH1の断片を含み、MTH1の生物活性を有するポリペプチドである。本明細書で上記及び下記に記載されるように、MTH1の生物活性はMTH1の触媒活性、すなわち2-OH-dATP及び8-オキソ-dGTP等の酸化ヌクレオチドを加水分解する能力である。MTH1の機能的断片は、配列番号2、4、6、8、10、12、14~16として本明細書に提示されるMTH1のアミノ酸配列の1つの断片を含むポリペプチドであり得る。MTH1の機能的断片は、配列番号1、3、5、7、9、11及び13として本明細書に提示されるMTH1のヌクレオチド配列の1つの断片によってコードされるポリペプチドであってもよい。MTH1の機能的断片は、配列番号2、4、6、8、10、12、14~16として本明細書に提示されるMTH1のア

50

ミノ酸配列の1つの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%又は少なくとも99%を含むポリペプチドであり得る。MTH1の機能的断片は、配列番号1、3、5、7、9、11及び13として本明細書に提示されるMTH1のヌクレオチド配列の1つの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%又は少なくとも99%を含むヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドであり得る。

#### 【0131】

MTH1の「誘導体」はMTH1に対して相同性を有し、MTH1の生物活性を有するポリペプチドである。MTH1の誘導体は、配列番号2、4、6、8、10、12、14~16として本明細書に提示されるMTH1のアミノ酸配列の1つに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%又は少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の相同性を有するポリペプチドであり得る。MTH1の誘導体は、配列番号1、3、5、7、9、11及び13として本明細書に提示されるMTH1のヌクレオチド配列の1つに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%又は少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドであってもよい。本明細書で上記及び下記に記載されるように、MTH1の生物活性はMTH1の触媒活性、すなわち2-OH-dATP及び8-オキソ-dGTP等の酸化ヌクレオチドを加水分解する能力である。

#### 【0132】

本発明において、「に対して相同性を有する」という用語は、それぞれのアミノ酸又はヌクレオチド配列が本明細書に示される配列、例えばMTH1の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有することを意味し、より高い同一性の値がより低いものよりも好ましい。本発明によると、2つ以上の核酸又はアミノ酸配列との関連での「同一性(単数又は複数)」又は「同一率(単数又は複数)」という用語は、当該技術分野で既知の配列比較アルゴリズムを用いて、又は手動のアラインメント及び目視検査によって測定される比較領域(window of comparison)又は指定された領域にわたる最大的一致で比較し、アラインメントした場合に同じであるか、又は特定の割合の同じアミノ酸残基又はヌクレオチド(例えば配列番号1、3、5、7、9、11及び13のヌクレオチド配列、又は例えば配列番号2、4、6、8、10、12、14~16のアミノ酸配列との例えば60%又は70%の同一性、好ましくは70%~95%の同一性、より好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の同一性)を有する2つ以上の配列又は部分配列(subsequences)を指す。

#### 【0133】

記載の同一性は、少なくとも約25~75アミノ酸又はヌクレオチド長の領域にわたって存在するのが好ましい。記載の同一性が約75~150アミノ酸又はヌクレオチド長の領域にわたって存在するのがより好ましい。ヌクレオチド配列の場合、記載の同一性は少なくとも約75~225ヌクレオチド長の領域にわたって、より好ましくは少なくとも約225~450ヌクレオチド長の領域にわたって存在することが最も好ましい。当業者は、例えば当該技術分野で既知のCLUSTALWコンピュータプログラム(Thompson; 1994; Nucl Acids Res; 2; 4673-4680)又はFASTDB(Brutlag; 1990; Comp App Biosci; 6; 237-245)に基づくもののようなアルゴリズムを用いて配列間の同一率を決定する方法を知っているであろう。

#### 【0134】

本発明によると、ALK陰性癌の治療及び/又は予防に使用されるアミノヘテロアリー

10

20

30

40

50

ル化合物の(S)-エナンチオマーが、MTH1の生物活性を阻害する能力を有することが想定される。

【0135】

「生物活性」という用語は、本明細書で使用される場合、分子(例えばMTH1等のポリペプチド)の機能性に関する。分子(例えばポリペプチド)が「機能的」であるとは、本発明において、分子(例えばポリペプチド)が特異的な「機能」を行う能力を有することを意味する。したがって、「生物活性」という用語は、特異的機能を行う分子(例えばMTH1等の特異的タンパク質)の能力に関する。例えば、本発明において、MTH1の生物活性は、MTH1の触媒活性、すなわち2-OH-dATP及び8-オキソ-dGTP等の酸化ヌクレオチドを加水分解し、対応する一リン酸塩及びピロリン酸塩(PPi)を生じる能力を含む。アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーがMTH1の生物活性を変化させる(例えば阻害する)能力を有するか否かを分析するために、組み換えMTH1を用いる酵素アッセイを行うことができる。例えば、MTH1媒介8-オキソ-dGTP加水分解によって生成するPPiの産生をモニタリングする発光ベースのアッセイを、MTH1酵素動態を決定するために用いられてきたプロトコルに従って用いることができる(例えば、Svensson (2011) FEBS Lett. 585: 2617-2621<sup>1,5</sup>を参照されたい)。

10

【0136】

より具体的には、MTH1の生物活性を阻害する化合物の能力を決定するために、MTH1を適切な宿主細胞(細菌細胞等)において発現させ、MTH1を精製することができる。続いて、精製MTH1を対象のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーとともにインキュベートすることができる。MTH1の活性は、MTH1媒介8-オキソ-dGTP加水分解によって生成するPPiの産生を測定することによってモニタリングすることができる。

20

【0137】

加えて、本発明において、分子(例えばMTH1等のタンパク質)の「向上した」又は「高い」生物活性は、対照と比較して分子(例えばMTH1)の生物活性が向上していることを意味する。これと一致して、本発明において、分子(例えばMTH1)の「阻害された」、「低減した」、「低い」又は「より低い」生物活性は、分子(例えばMTH1)の生物活性が対照と比較して低減していることを意味する。例えば、対照と比較して分子(例えばMTH1等のタンパク質)の生物活性が低減する理由は、分子(例えばMTH1)の生物活性を阻害する化合物(例えばアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー)の存在であり得る。この点で、対照は同じサンプルであってもよいが、分子の生物活性を阻害する化合物を含まない。

30

【0138】

本明細書に記載の医薬組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Editionに公表されている技法のような当業者に既知の技法によって配合することができる。医薬組成物は、例えば経口投与用の投薬形態として配合することができる。しかしながら、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、皮内投与、動脈内投与、直腸投与、経鼻投与、局所投与又は腔内投与等の非経口投与も想定される。本発明において、本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)の最も好ましい投与経路は経口投与である。

40

【0139】

経口投与の投薬形態としては、被覆及び非被覆錠剤、ソフトゼラチンカプセル剤、ハードゼラチンカプセル剤、ロゼンジ剤、トローチ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤(elixiers)、再構成用の粉末剤及び顆粒剤、分散性粉末剤及び顆粒剤、薬用ガム、咀嚼錠剤並びに発泡錠剤が挙げられる。

【0140】

非経口投与の投薬形態としては、液剤、乳剤、懸濁剤、分散剤、再構成用の粉末剤及び顆粒剤が挙げられる。乳剤が非経口投与に好ましい投薬形態である。直腸投与及び腔内投

50

与用の投薬形態としては、坐剤及び腔坐剤 (ovula) が挙げられる。経鼻投与用の投薬形態は吸入及び吹送、例えば定量吸入器によって投与することができる。

【0141】

本発明に使用することができる化合物の薬学的に許容可能な塩は、様々な有機及び無機酸及び塩基によって形成することができる。酸付加塩の例としては、アセテート、アジペート、アルジネート、アスコルベート、ベンゾエート、ベンゼンスルホネート、硫酸水素、ボレート、ブチレート、シトレート、カンホラート、カンファースルホネート、シクロペンタンプロピオネート、ジグルコネート、ドデシルスルフェート、エタンズルホネート、フマレート、グルコヘプタノエート、グリセロホスフェート、ヘミスルフェート、ヘプタノエート、ヘキサノエート、ヒドロクロリド、ヒドロプロミド、ヒドロヨージド、2-ヒドロキシエタンズルホネート、ラクテート、マレエート、メタンズルホネート、2-ナフタレンズルホネート、ニコチネート、ニトレート、オキサレート、ペクチネート、パーンスルフェート、3-フェニルズルホネート、ホスフェート、ピクレート、ピバレート、プロピオネート、サリシレート、スルフェート、スルホネート、タータレート、チオシアネート、トシレート等のトルエンズルホネート、及びウンデカノエート等が挙げられる。塩基付加塩の例としては、アンモニウム塩、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウム塩、リチウム塩及びカリウム塩；アルカリ土類金属塩、例えば、カルシウム塩及びマグネシウム塩；有機塩基（例えば、有機アミン）との塩、例えば、例えば、アルギニン、及びリシン等のアミノ酸との、ベンザゼチン (benzazethine) 塩、ジシクロヘキシルアミン塩、ヒドラピン (hydrabine) 塩、N-メチル-D-グルカミン塩、N-メチル-D-グルカミド塩、t-ブチルアミン塩が挙げられる。

10

20

【0142】

本発明に使用することができる化合物の薬学的に許容可能な溶媒和物は水との溶媒和物、例えば水和物、又はメタノール、エタノール若しくはアセトニトリル等の有機溶媒との溶媒和物、すなわちそれぞれメタノール付加物、エタノール付加物又はアセトニトリル付加物の形態で存在し得る。

【0143】

本発明に使用することができる化合物の薬学的に許容可能なプロドラッグは、化学的又は代謝的に切断可能な基を有し、加溶媒分解によって又は生理学的条件下にて *in vivo* で薬学的に活性な本発明の化合物となる誘導体である。プロドラッグ誘導体形態は、哺乳動物において溶解性、組織適合性又は遅延放出の利点をもたらすことが多い (Bundgaard, H., Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985を参照されたい)。

30

【0144】

本明細書に記載されるこれらの医薬組成物は、被験体に好適な用量で投与することができる。投薬計画は主治医及び臨床的因子によって決定される。医療分野で既知であるように、任意の一患者の投与量は患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間及び経路、全身健康状態及び同時に投与される他の薬物等の多くの因子に依存する。概して、本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーを含む医薬組成物の定期的投与としての計画は、1日あたり0.1 µg ~ 5000 mg 単位、一部の実施形態では1日あたり0.1 µg ~ 1000 mg 単位の範囲である。計画が経口投与である場合、これは1日あたり100 mg 単位 ~ 5000 mg 単位、好ましくは1日あたり500 mg 単位の範囲であり得る。この1日あたり500 mg 単位は、1日に2回250 mg の投与量で投与してもよい。計画が持続注入である場合、これはそれぞれ体重1キログラム当たり1分に0.1 ng ~ 10 µg 単位の範囲であってもよい。進行は定期評価によってモニタリングすることができる。用量漸増をもたらす計画を使用することも想定される。本明細書に提示される医学的介入を必要とする患者が高投与量の本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーを受けることが特に好ましい。かかる高投与量は1 mg / kg ~ 500 mg / kg を含み得るが、他の投与計画も想定され、主治医によって対応され得る。下記の実施例に示されるように

40

50

、異種移植マウス研究においては、25 mg/kg体重のクリゾチニブの(S)-エナンチオマーが良好な耐容性を示し、50%を超える腫瘍体積の顕著な低減をもたらした。したがって、本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーは25 mg/kg体重で投与することができる(例えばマウス等の動物に投与する場合)。本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーを含む医薬組成物を化学療法剤、好ましくはPARP阻害剤及び/又はEGFR阻害剤と組み合わせた定期的投与としての計画が更に提供され、該複合調製物は同時、別個又は順次の使用のためである。本発明において、本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーを含む医薬組成物を放射線療法と組み合わせて投与することも想定され、該複合投与は同時、別個又は順次の投与である。

10

**【0145】**

本発明において、単独又は放射線療法及び/又は化学療法剤(PARP阻害剤及び/又はEGFR阻害剤等)と組み合わせた以下のアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)の投与様式が好ましい:

- 一定の又は漸増用量での経口投与、
- 一定の又は漸増用量での皮下投与、及び/又は、
- 一定の又は漸増用量での静脈内投与。

**【0146】**

最も好ましい投与様式は一定の用量での経口投与である。

**【0147】**

本明細書で上記及び下記に記載されるように、本発明は、かかる治療を必要とする被験体において癌を治療及び/又は予防する方法であって、有効量の本明細書に提示されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー又は本明細書に提示される医薬組成物を上記被験体に投与することを含む、方法を提供する。本発明の一態様は、被験体において癌を治療及び/又は予防する方法であって、治療及び/又は予防が上記被験体の癌細胞又は組織のALK状態及び/又はc-Met状態とは無関係であり、上記被験体に治療的に有効な量の本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマーを投与することを含む、方法に関する。このため、治療及び/又は予防対象の癌はALK陰性(すなわち活性化ALK異常を有し得ない)及び/又はc-Met陰性であり得る。

20

30

**【0148】**

したがって、本発明はかかる治療(治療的又は予防的)を必要とする、癌を患う被験体を治療する手段及び方法を提供する。この癌はALK陰性癌(すなわち、癌細胞又は癌組織が活性化ALK異常を有しない癌)及び/又はc-Met陰性癌であり得る。かかる障害を治療する方法は、薬学的に活性化量の本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)を、単独で又は放射線療法及び/又は化学療法剤(PARP阻害剤及び/又はEGFR阻害剤等)と組み合わせて投与することを含む。したがって、本発明において、本明細書に記載の治療方法は、付加的な化合物/薬剤と本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)との同時投与も含み得る。特に、治療方法は本明細書で規定されるアミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)の同時投与を含むのが好ましい。これらの連携療法アプローチ及び併用療法アプローチが本発明に関して想定される。

40

**【0149】**

「治療」、「治療する」等の用語は、本明細書で概して所望の薬理的及び/又は生理的効果を得ることを意味するように使用される。効果は疾患又はその症状を完全又は部分的に予防するという点で予防的なものであっても、及び/又は疾患及び/又は疾患に起因する有害作用を部分的又は完全に治癒するという点で治療的のものであってもよい。「治療」という用語は、本明細書で使用される場合、被験体における任意の疾患の治療を包含し、(a)疾患の影響を受けやすい被験体において癌性疾患が起こるのを予防及び/又は改

50

善すること、(b)疾患を阻害する、すなわち癌進行の阻害及び/又は転移の発生の阻害のようにその発生を抑えること、又は(c)疾患を軽減する、すなわち腫瘍及び/又は転移の抑制のように疾患を退行させることを含む。

【0150】

本発明によると、癌/癌性疾患を「予防」又は「予防する」という用語は、癌自体が発生又は更に悪い状況へと進行するのを妨げることができることを意味する。したがって、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)を癌、癌の進行及び/又は転移の発生の回避に用いることができることが本発明の利点の1つである。したがって、本発明によると、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)は、癌の発生の前に用いることができる。

10

【0151】

しかしながら、本明細書に開示及び提示されるように、アミノヘテロアリアル化合物の(S)-エナンチオマー(クリゾチニブの(S)-エナンチオマー等)は、病的状態が既に発生した障害の改善及び/又は治療、すなわち既存の癌の治療に用いることもできる。したがって、「治療」という用語は、本明細書で使用される場合、既に確定し、現れた癌の治療のような既に現れた障害の医学的介入にも関する。

【0152】

「患者」及び「被験体」という用語は本明細書で区別なく使用される。本発明の目的のための「患者」又は「被験体」は脊椎動物であり得る。該脊椎動物はヒト等の哺乳動物であり得る。該脊椎動物はウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラクダ、ニワトリ、シチメンチョウ又は他の商業上重要な家畜であり得る。本発明の目的のための「患者」又は「被験体」はヒト及び他の動物の両方、特に哺乳動物及び他の生物を含む。このため、方法はヒト療法及び獣医学用途の両方に適用可能である。好ましい実施形態では患者は哺乳動物であり、最も好ましい実施形態では患者はヒトである。

20

【0153】

本発明による治療される又は治療を必要とする「患者」又は「被験体」は脊椎動物であり得る。該脊椎動物はヒト等の哺乳動物であり得る。該脊椎動物はウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラクダ、ニワトリ、シチメンチョウ又は他の商業上重要な家畜等の家畜であってもよい。本発明による治療される又は治療を必要とする「患者」又は「被験体」は哺乳動物であるのが好ましい。治療される「患者」又は「被験体」はヒトであるのが最も好ましい。特に、治療される「患者」又は「被験体」は、癌を患うヒト患者である。

30

【0154】

本発明によると、「状態」、特に「NUDT1/MTH1状態」、「RAS状態」、「ALK状態」又は「c-Met状態」という用語は、それぞれのタンパク質の遺伝子の遺伝子構成、それぞれのタンパク質の発現及び/又はそれぞれのタンパク質の生物活性に関する。特に、NUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Metの「状態」は、それぞれNUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Metの活性化又は不活性化異常の存在又は非存在によって反映され得る。したがって、「状態」という用語は、本明細書で使用される場合、対象の遺伝子又はタンパク質(例えばNUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Metの遺伝子又はタンパク質)における活性化又は不活性化突然変異の存在にも関する。

40

【0155】

加えて、本発明において、遺伝子又はタンパク質の「状態」はそれぞれの遺伝子及び/又はタンパク質の「レベル」、すなわちNUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Metのレベルにも関する。したがって、例えば本明細書で使用される「NUDT1/MTH1状態」との関連での「状態」という用語は当該技術分野で既知であり、MTH1生物活性及び/又はMTH1発現のレベル(例えば、MTH1 mRNA及び/又はMTH1タンパク質のレベル)に関する。したがって、本明細書で使用される「RAS状態」という用語は当該技術分野で既知であり、RAS生物活性及び/又はRAS発現のレベル(

50

例えば、RAS mRNA及び/又はRASタンパク質のレベル)に関する。したがって、本明細書で使用される「ALK状態」という用語は当該技術分野で既知であり、ALK生物活性及び/又はALK発現のレベル(例えば、ALK mRNA及び/又はALKタンパク質のレベル)に関する。したがって、本明細書で使用される「c-Met状態」という用語は当該技術分野で既知であり、c-Met生物活性及び/又はc-Met発現のレベル(例えば、c-Met mRNA及び/又はc-Metタンパク質のレベル)に関する。NUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Met発現のレベルはそれぞれNUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Metの生物活性に反映され得る。したがって、「状態」という用語は本明細書で使用される場合、タンパク質、例えばMTH1、RAS、ALK又はc-Metの生物活性にも関する。

10

## 【0156】

特定のタンパク質のレベル(例えば、該タンパク質の発現レベル及び/又は生物活性のレベル)は増大又は低減し得る。特に、NUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-MetのレベルはそれぞれNUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Metの活性化異常によって増大し得る。代替的には、NUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-MetのレベルはそれぞれNUDT1/MTH1、RAS、ALK又はc-Metの不活性化異常によって低減し得る。したがって、「状態」という用語は、本明細書で使用される場合、対象の遺伝子又はタンパク質における活性化又は不活性化突然変異の存在にも関する。加えて、本発明において、不活性化異常は機能喪失型突然変異体をもたらす突然変異であり得る。不活性化異常はそれぞれのタンパク質(例えばMTH1、RAS、ALK又はc-Met)をコードする遺伝子の欠失又は部分的欠失であってもよい。これと一致して、本発明において、活性化異常は発現又は活性が向上したタンパク質(例えばMTH1、RAS、ALK又はc-Met)をもたらす突然変異であり得る。かかる活性化異常は例えば活性化ALK異常であり得る。活性化ALK異常は例えば、EML4-ALK等の遺伝子突然変異又は染色体転座であり得る。

20

## 【0157】

加えて、本明細書で使用される場合、「患者のNUDT1/MTH1状態」、「患者のRAS状態」、「患者のALK状態」又は「患者のc-Met状態」等の「患者の状態」という用語は、「癌のNUDT1/MTH1状態」、「癌のRAS状態」、「癌のALK状態」又は「癌のc-Met状態」等の上記患者の癌の状態に関する。特に、「患者の状態」(「患者のNUDT1/MTH1状態」等)という用語は、上記患者の癌細胞又は組織の状態に関する。このため、「患者の状態」(「患者のNUDT1/MTH1状態」等)という用語は、それぞれのタンパク質の遺伝子の遺伝子構成、それぞれのタンパク質の発現及び/又はそれぞれのタンパク質の生物活性に関する上記患者の癌細胞又は組織の状態に関する。

30

## 【0158】

これに関連して、「MTH1陽性」、「NUDT1/MTH1陽性」、「MTH1に対して陽性の」及び「NUDT1/MTH1に対して陽性の」という用語は本明細書で区別なく使用され、NUDT1/MTH1の生理学的な(すなわち「正常な」)及び増大した発現及び/又は生物活性両方に関する。NUDT1/MTH1の「生理学的な」又は「正常な」発現及び/又は生物活性は、MTH1を発現するが、活性化又は不活性化MTH1異常を有しない細胞におけるMTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。NUDT1/MTH1の「増大した」発現及び/又は生物活性は、MTH1を発現し、活性化MTH1異常を有する細胞におけるMTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。NUDT1/MTH1の「増大した」発現及び/又は生物活性は、MTH1を発現するが、活性化MTH1異常を有しない細胞と比較して増大したMTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に更に関する。活性化MTH1異常はMTH1の増大した発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)をもたらす。したがって、「MTH1陽性」という用語は、MTH1の発現及び/又は生物活性の増大にも関する。活性化MTH1異常の例は、MTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒

40

50

活性)の増大をもたらす遺伝子増幅、遺伝子突然変異又は染色体転座である。

【0159】

これと一致して、「MTH1陰性」、「NUDT1/MTH1陰性」、「MTH1に対して陰性の」及び「NUDT1/MTH1に対して陰性の」という用語は本明細書で区別なく使用され、NUDT1/MTH1の低減した発現及び/又は生物活性に関する。MTH1の「低減した」発現及び/又は生物活性は、MTH1を発現しない細胞におけるMTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。NUDT1/MTH1の「低減した」発現及び/又は生物活性は、MTH1を発現するが、不活性化MTH1異常を有しない細胞と比較して低減したMTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に更に関する。加えて、MTH1の「低減した」発現及び/又は生物活性は、MTH1を発現し、不活性化MTH1異常を有する細胞におけるMTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。不活性化MTH1異常の例は、MTH1の発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)の低減をもたらす遺伝子突然変異又は染色体転座である。

10

【0160】

同様に、本明細書で使用される場合、「c-Met陽性」及び「c-Metに対して陽性の」という用語は本明細書で区別なく使用され、生理学的な(すなわち「正常な」)及び増大したc-Metの発現及び/又は生物活性の両方に関する。c-Met陽性細胞はc-Met依存性の細胞、すなわち生存及び/又は増殖がc-Metの発現に依存する細胞であり得る。c-Metの「生理学的な」又は「正常な」発現及び/又は生物活性は、c-Metを発現するが、活性化又は不活性化c-Met異常を有しない細胞におけるc-Metの発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。c-Metの「増大した」発現及び/又は生物活性は、c-Metを発現し、活性化c-Met異常を有する細胞におけるc-Metの発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。c-Metの「増大した」発現及び/又は生物活性は、c-Metを発現するが、活性化c-Met異常を有しない細胞と比較したc-Metの増大した発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に更に関する。活性化c-Met異常はc-Metの増大した発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)をもたらす。したがって、「c-Met陽性」という用語は、c-Metの増大した発現及び/又は生物活性にも関する。活性化c-Met異常の例は、c-Metの増大した発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)をもたらす遺伝子増幅、遺伝子突然変異又は染色体転座である。

20

30

【0161】

これと一致して、「c-Met陰性」及び「c-Metに対して陰性の」という用語は本明細書で区別なく使用され、c-Metの低減した発現及び/又は生物活性に関する。c-Met陰性細胞はc-Met非依存性の細胞、すなわち生存及び/又は増殖がc-Metの発現に依存しない細胞である。c-Metの「低減した」発現及び/又は生物活性は、c-Metを発現しない細胞におけるc-Metの発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。c-Metの「低減した」発現及び/又は生物活性は、MTH1を発現するが、不活性化c-Met異常を有しない細胞と比較して低減したc-Metの発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に更に関する。加えて、c-Metの「低減した」発現及び/又は生物活性は、c-Metを発現し、不活性化c-Met異常を有する細胞におけるc-Metの発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)に関する。不活性化c-Met異常の例は、c-Metの発現及び/又は生物活性(すなわち触媒活性)の低減をもたらす遺伝子突然変異又は染色体転座である。

40

【0162】

「ALK陰性」、「ALKに対して陰性の」及び「活性化ALK異常を有しない」という用語は本明細書で区別なく使用されることに留意されたい。したがって、「ALK陰性」という用語は、ALKの生理学的な(すなわち「正常な」)及び低減した発現及び/又は生物活性の両方に関する。ALKの「生理学的な」又は「正常な」発現及び/又は生物活性は、ALKを発現するが、活性化ALK異常を有しない細胞におけるALK発現及び

50

／又はA L K生物活性（すなわち触媒活性）に関する。A L Kの「生理学的な」又は「正常な」発現及び／又は生物活性は、健全な非癌性細胞又は組織のA L K発現及び／又はA L K生物活性に更に関する。この非癌性細胞又は組織は活性化A L K異常を有しないとみなされる。

【0163】

A L Kの「低減した」発現及び／又は生物活性は、一態様において、A L Kキナーゼの発現及び／又は生物活性（すなわち触媒活性）がないことに関する。A L Kの「低減した」発現及び／又は生物活性は、本明細書で上記に規定されるように生理学的A L K発現及び／又は生理学的A L K生物活性と比較して定性的又は定量的に低減したA L Kの発現及び／又は生物活性（すなわち触媒活性）に更に関する。

10

【0164】

「A L K陽性」、「A L Kに対して陽性の」及び「活性化A L K異常を有する」という用語は本明細書で区別なく使用され、活性化A L K異常を有する癌細胞又は組織に関する。A L K陽性細胞はA L K依存性の細胞、すなわち生存及び／又は増殖がA L Kの発現に依存する（癌及び／又は腫瘍）細胞であり得る。活性化A L K異常は、A L Kの増大した発現及び／又は生物活性（すなわち触媒活性）に関する。A L Kの「増大した」発現及び／又は生物活性は、A L Kを発現するが、活性化A L K異常を有しない細胞と比較して増大したA L Kの発現及び／又は生物活性（すなわち触媒活性）に関する。加えて、「増大した」A L K発現及び／又はA L K生物活性は、健全な非癌性細胞におけるA L Kキナーゼの生理学的発現及び／又は生物活性と比較して向上したA L Kの発現及び／又は生物活性に関する。したがって、「A L K陽性」という用語は、A L Kの向上した発現及び／又は生物活性に関する。活性化A L K異常の例は、A L Kの発現及び／又は生物活性（すなわち触媒活性）の増大をもたらす遺伝子増幅、遺伝子突然変異又は染色体転座である。活性化A L K異常を示す染色体転座の例はE M L 4 - A L Kである。

20

【0165】

タンパク質M T H 1の遺伝子名はN U D T 1である。現在、N U D T 1 / M T H 1の4つのアイソフォーム（p 1 8、p 2 1、p 2 2及びp 2 6）が報告されており、p 1 8が優性アイソフォームであると考えられている。アイソフォームp 1 8を本明細書に記載の実験に用いた。N U D T 1 / M T H 1のヌクレオチド及びアミノ酸配列を本明細書の下記に提示する。M T H 1の突然変異は報告されているが、その生理学的又は臨床的関連性は解明されていない。N U D T / M T H 1状態を決定する（例えば、N U D T / M T H 1のレベル（発現レベル等）を検出するか、又はN U D T / M T H 1のヌクレオチド若しくはアミノ酸配列が特異的突然変異を含有するか否かを決定する）方法が当該技術分野で既知であり、本明細書で下記に記載される。

30

【0166】

R A Sに関して、幾つかの遺伝子が存在する（すなわちH R A S、K R A S、N R A S及びM R A S）。代替スプライシングのために幾つかの既存のアイソフォームが存在する。既知の活性化R A S突然変異としては、K R A Sの突然変異、例えばG 1 2突然変異（例えばG 1 2 C）又はQ 6 1突然変異（例えばQ 6 1 H）が挙げられる。R A Sのヌクレオチド及びアミノ酸配列は本明細書で下記に提示される。加えて、例えば肺癌に見られる突然変異体G 1 2 C K R A Sのアミノ酸配列は、本明細書で下記に配列番号23として提示される。R A S状態を決定する（例えば、R A Sのレベル（例えば発現レベル）を検出するか、又はR A Sのヌクレオチド若しくはアミノ酸配列が特異的突然変異を含有するか否かを決定する）方法は当該技術分野で既知であり、本明細書で下記に記載される。加えて、A L K及びc - M e tのヌクレオチド及びアミノ酸配列が本明細書で開示される（下記を参照されたい）。さらに、それぞれR A S、A L K及びc - M e tの幾つかの異常及び突然変異をもたらすR A S、A L K及びc - M e tのアミノ酸配列の配列注釈が本明細書で開示される（下記を参照されたい）。

40

【0167】

活性化及び不活性化異常としては、遺伝子突然変異等の遺伝子異常、遺伝子コピー数の

50

増大、遺伝子発現の異常及びmRNA発現の異常が挙げられる。上記異常を検出する遺伝子異常の技法の一般的概要を下記表1に示す。

【0168】

【表1】

表 (Tabelle) 1 : 遺伝子異常及び遺伝子異常を検出する技法の一般的概要

異常	試験材料	位置	検出方法
遺伝子突然変異	DNA	核	シーケンシング等の突然変異分析
遺伝子コピー数の増大	DNA	核	核蛍光 <i>in-situ</i> ハイブリダイゼーション (FISH)
遺伝子発現	タンパク質	遺伝子に応じて異なる	免疫組織化学 (IHC)
遺伝子mRNA発現	RNA	核	RT-PCR

10

【0169】

腫瘍生検材料に由来するDNAにおける増幅又は突然変異等のNUDT1/MTH1、ALK、RAS又はc-Met異常(例えば遺伝子異常)の検出に使用することができる他の技法としては、本明細書で下記に記載されるようなペプチド核酸-ロックド核酸(PNA-LNA)PCRクランプ、PCR-インベーター、SNAPshot、PCR/HRMA/dHPLC、PCR/fIRFLP、蛍光 *in-situ* ハイブリダイゼーション(FISH)及び免疫組織化学(IHC)が挙げられる。

20

【0170】

ペプチド核酸-ロックド核酸(PNA-LNA)PCRクランプは、例えばEGFR突然変異を非腫瘍細胞に由来する野生型EGFRの100倍~1000倍バックグラウンドの存在下で検出することができる、迅速かつ高感度の突然変異の検出系である<sup>2,4</sup>。この方法は当該技術分野で既知であり、例えばNagai (2005) Cancer Res 65: 7276-7282<sup>2,4</sup>に記載されている。

【0171】

PCR-インベーター。この系は、DNA配列中の既知の単一核酸変化を同定し、シグナルを増幅するのに2つの同時反応を使用する。この方法は当該技術分野で一般に知られており、例えばTadokoro (2011) Transl Res. 158:169-79及び<http://www.twt.com/invader/invader.html>に記載されている。

30

【0172】

SNAPshot。SNAPshotは、既知の単一ヌクレオチド突然変異の検出に使用することができる単一ヌクレオチドプライマー伸長アッセイである。この方法は当該技術分野で一般に知られており、例えばHurst (2009) BMC Research Notes 2:66及び<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600762&tab=DetailInfo>に記載されている。

【0173】

PCR/HRMA/dHPLC。生検材料のDNAをPCRによって増幅し、高分解能融解分析及び/又は変性高速液体クロマトグラフィーに供して、突然変異を検出する<sup>2,5,6</sup>。この方法は当該技術分野で一般に知られており、例えばJaenne (2006) Clin Cancer Res 12: 751-758<sup>2,5</sup>及びNomoto (2006) Am J Clin Pathol 126: 608-615<sup>2,6</sup>に記載されている。

40

【0174】

PCR/fIRFLP。DNAを蛍光標識プライマーによるPCRを用いて増幅する。断片を、突然変異を含有する領域を標的とする制限酵素で消化し、生成物を断片分析に供して、消化断片及び非消化断片を検出する<sup>2,7</sup>。この方法は当該技術分野で一般に知られており、例えばPao (2005) PLoS Med 2 (3): e73<sup>2,7</sup>に記載されている。

【0175】

50

蛍光 *in-situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 及び免疫組織化学 (IHC) 。 FISH は対象の遺伝子の DNA のコピー数を測定するものであり、IHC は細胞内の一致したタンパク質を測定するものである。FISH は当該技術分野で一般に知られており、例えば Koivunen (2008) *Clinical Cancer Research* 14: 4275-4283 に記載されている。IHC は当該技術分野で一般に知られており、例えば Chen (2010) *Cancer Research* 70: 9827-9836 に記載されている。ALK については、特定の FISH キットが利用可能である (Abbott Laboratories の *Vysis ALK Break Apart FISH* プロブキット (製品名: *Vysis ALK Break Apart FISH* プロブキット、Abbott の注文番号: 06N38-020) ) 。

【0176】

10

細胞遺伝学的異常の検出については、幾つかの検出方法が当該技術分野で既知であり、例えば Speicher (2005) *Nat Rev Genet* 6 (10): 782-792<sup>2 9</sup> に概説されている。

【0177】

全ての突然変異検出方法を最良の慣行で行うものとする。これは、全ての突然変異検出方法がロバストであり、確立された標準操作手順 (SOP) により最高水準まで行われることを意味する。プロセスの各々の工程の品質管理は適切である必要がある。突然変異検出方法を最良の慣行で行う方法は当該技術分野で既知であり、例えば Eberhard (2008) *Clin Oncol* 26 (6): 983-993<sup>2 8</sup> に記載されている。

【0178】

患者の NUDT1 / MTH1 状態の検出に用いられる抗体、プローブ及びプライマーは当該技術分野で一般に知られており、以下にも示される。

20

【0179】

患者の NUDT1 / MTH1 状態の検出のための抗体は、例えば Novus Biologicals の MTH1 抗体 (NB100-109) である。

【0180】

患者の NUDT1 / MTH1 状態の検出のためのプライマーは、例えば Kennedy (1998) *FEBS Lett.* 429 (1): 17-20<sup>3 6</sup> (その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に示されている。加えて、患者の NUDT1 / MTH1 状態の検出のためのプライマーは、本明細書で下記及び添付の配列表にも提示されている。

NUDT1 / MTH1 の検出のためのプライマー配列 (配列番号 17)

5 P - A G C C T C A G C G A G T T C T C C T G - 3 P

NUDT1 / MTH1 の検出のためのプライマー配列 (配列番号 18)

5 P - G A T C T G G C C C A C C T T G T G C - 3 P

30

【0181】

患者の RAS 状態の検出に用いることができる抗体、プローブ及びプライマーは当該技術分野で一般に知られており、以下にも示される。

【0182】

患者の RAS 状態の検出のための抗体は、例えば Cell Signaling の Ras 抗体 # 3965 である。

【0183】

40

患者の RAS 状態の検出のためのプライマーは、例えば Keohavong (1996) *Clin. Cancer Res.* 2 (2): 411-418<sup>3 3</sup> 及び Gerry (1999) *Mol. Biol.* 292 (2): 251-262<sup>3 4</sup> (その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に示されている。

【0184】

患者の c - M e t 状態の検出に用いることができる抗体、プローブ及びプライマーは当該技術分野で一般に知られており、以下にも示される。

【0185】

患者の c - M e t 状態の検出のための抗体は、例えば Cell Signaling の M e t 抗体 # 4560 である。

【0186】

50

患者の c - M e t 状態の検出のためのプライマー及びプローブは、例えばKubo (2009) Int. J. Cancer 124 (8): 1778-1784<sup>3 5</sup> (その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に示されている。

【0187】

患者の A L K 状態の検出に用いることができる抗体、プローブ及びプライマーは当該技術分野で一般に知られており、以下にも示される。

【0188】

患者の A L K 状態の検出のための抗体は、例えばCell Signalingの# 3 6 3 3 A L K ( D 5 F 3 ) X P ( 商 標 ) ウ サ ギ m A b 及び A L K ( C 2 6 G 7 ) ウ サ ギ m A b # 3 3 3 3 である。

10

【0189】

患者の A L K 状態の検出のためのプローブ及びプライマーは、例えばKoivunen (2008) Clin. Cancer. Res. 14 (13): 4275-4283<sup>3 0</sup> 及びLin (2009) Mol. Cancer Res. 7 (9): 1466-1476<sup>3 1</sup> (その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に示されている。

【0190】

患者の A L K 状態の検出のための更なるプライマーは、例えばChen (2008) Nature 455 (7215): 971-974<sup>3 2</sup> (その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に示されている。

【0191】

患者の p 2 1 状態の検出に用いることができる抗体、プローブ及びプライマーは当該技術分野で一般に知られており、以下にも示される。

20

【0192】

p 2 1 を ( 例 えば q P C R を 用 いる こと に よ っ て ) 検 出 す る こと が 可 能 な ポ リ ヌ ク レ オ チ ド は 、 以 下 の 配 列 を 有 す る ヒ ト p 2 1 / W A F 1 - オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド である :

5 ' - C T G T G A T G C G C T A A T G G C G - 3 ' ( 配 列 番 号 4 9 )

5 ' - A A G T C G A A G T T C C A T C G C T C A - 3 ' ( 配 列 番 号 5 0 )

( 例 えば 、 Zeng (2006) Cancer Research 66, 10701-10708)を参照されたい)

【0193】

p 2 1 を 検 出 す る こと が 可 能 な 抗 体 は 、 例 えば Abcam の 抗 p 2 1 抗 体 ( a b 7 9 6 0 ) 及びCell Signalingの p 2 1 W a f 1 / C i p 1 ( D C S 6 0 ) マ ウ ス m A b # 2 9 4 6 である。

30

【0194】

「ポリヌクレオチド(複数の場合もあり)」という用語は、本明細書で使用される場合、プライマー(複数の場合もあり)及びプローブ(複数の場合もあり)を包含することに留意されたい。したがって、「ポリヌクレオチド(複数の場合もあり)」という用語は、本明細書で使用される場合、プライマー(複数の場合もあり)及びプローブ(複数の場合もあり)の両方を意味する。プライマー(例えば患者の N U D T 1 / M T H 1 状態、患者の R A S 状態、患者の A L K 状態及び/又は患者の c - M e t 状態を検出するプライマー)は、例えば P r i m e r 3 P l u s ( 以 下 の U R L で 利 用 可 能 である : bioinformatics .nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi ; Rozen and Skaletsky, In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, N.J., pp. 365-386, 2000を参照されたい)及びInvitrogenのベクター N T I 専売ソフトウェア等の利用可能なソフトウェアを用いて設計することができる。プライマーを設計する他の方法が当業者に既知である。

40

【0195】

添付の図面は本発明を示し、説明するものである。

【実施例】

【0196】

以下の非限定的な実施例をもって本発明を説明する。

50

## 【0197】

材料及び方法：

一般的情報。NMRスペクトルをBruker Avance III 400 (Bruker, Billerica, MA, U.S.) で記録した。化学シフトをppmで示し、結合定数をヘルツで示す。質量スペクトルをXevo-UPLC-TQ-MSシステム (Waters, Milford, MA, U.S.) を用いて記録した。フラッシュカラムクロマトグラフィー (FCC) による精製を、シリカゲル60 (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて行い、MPLCをBiota-Isoleraシステム (Biotage, Uppsala, Sweden) で行った。合成した化合物の純度を求め、UPLC分析によって確認した。

## 【0198】

全ての合成化学物質はSigma-Aldrich及びSanta Cruzから購入し、更に精製することなく使用した。

## 【0199】

化学物質。全ての化学物質はSigma Aldrich又はFluka (Sigma Aldrich Austria) から購入し、更に精製することなく使用した。ラセミ型 (RS) - クリゾチニブ及びJNJ-38877605はSelleck Chemicals (Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA) から入手し、(R) - クリゾチニブはSelleck Chemicals、Tocris (Tocris Bioscience, Bristol, UK) 及びChemieTek (ChemieTek, Indianapolis, IN, USA) から購入した。クリゾチニブの(S) - エナンチオマーはChemFuture (ChemFuture PharmaTech Ltd, Jiangsu, China) から入手した。SCH51344はCalbiochem (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) から購入した。化合物2の合成を図25に示す。

## 【0200】

固体化及び親和性精製。薬物 - 親和性マトリックスは基本的に先に記載されるように調製した (Rix (2007) Blood 110, 4055-4063)。簡潔に述べると、25 nmolの化合物を50 µLのNH<sub>5</sub>活性化Sephacrose 4 Fast Flowビーズ (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) に固定化した。親和性クロマトグラフィー及び溶出を、1反復当たり10 mgの全細胞溶解物をタンパク質インプットとして用いて先に報告されているように二連で行った (Fernbach (2009) Journal of Proteome Research 8, 4753-4765)。

## 【0201】

溶液トリプシン消化及びペプチド精製。溶出の後、富化されたタンパク質をジチオスレイトールによって還元し、ヨードアセトアミドとのインキュベーションによってシステイン残基をアルキル化し、サンプルを変性豚トリプシン (Promega, Madison, WI) で消化した。3パーセント (及びその倍数) の消化溶出物を精製し、ゲルフリー一次元液体クロマトグラフィー質量分析 (1D-LCMS) によるその後の二連分析のためにC18逆相材料によって濃縮した。LCMS方法の詳細は先に記載されている通りである (Maurer (2012) Journal of Proteome Research 12, 1040-1048)。

## 【0202】

タンパク質同定。その後のタンパク質同定のために、ピーク抽出及びRAWファイルのMGFフォーマットへの変換をmsconvert (ProteoWizard Library v2.1.2708) で行った。初回のデータベース検索をより広い質量許容差で行い、最適な最終タンパク質同定のための質量リストを再検査した。初回のタンパク質データベース検索のために、Mascot (www.matrixscience.com、バージョン2.3.02) を使用した。前駆体及び断片イオンの許容誤差はそれぞれ±10 ppm及び±0.6 Daであり、データベース検索は最大で1つの切断ミスの完全なトリプシンペプチドに制限され、カルバミドメチルシステイン及びメチオニン酸化をそれぞれ不変及び可変修飾として設定した。Mascotペプチドイオンスコア閾値を30に設定し、1タンパク質当たり少なくとも3つのペプチド同定が必要であった。全タンパク質アイソフォームを含むヒトUniProtKB/SwissProtデータベース (www.uniprot.org release 2012-05) に対して検索を行った。

10

20

30

40

50

## 【0203】

初回のペプチド同定を用いて、理論値からの測定質量の平均二乗偏差を最小限に抑える前駆体及び断片質量に関する独立した線状変換を推測した。再検査した質量リストのファイルを、より狭い質量許容差 ( $\pm 4$  ppm及び $\pm 0.3$  Da)を用いる Mascot及び Phenyx (GeneBio, SA、バージョン2.5.14)検索エンジンの組合せによって同じヒトタンパク質データベースに対して検索した。1つのトリプシン切断部位のミスが許容された。カルバミドメチルシステインを不変修飾、酸化メチオニンを変修飾として設定した。タンパク質を確認するために、内部で開発されたパーサーによって Mascot及び Phenyxアウトプットファイルを処理した。スコア $T_1$ を超える2つ以上の独特なペプチド、又はスコア $T_2$ を超える単一ペプチドを有するタンパク質を明確な同定として選択した。スコアが $T_3$ を超えるこれらの確認されたタンパク質の付加的なペプチドも認められた。Mascot検索については、以下の閾値を使用した： $T_1 = 14$ 、 $T_2 = 40$ 及び $T_3 = 10$ ；Phenyxの閾値はそれぞれ4.2、4.75及び3.5 ( $P$ 値 $< 10^{-3}$ )に設定した。2つのアルゴリズムにより検索した確認されたタンパク質をマージし、スペクトル衝突を切り捨て、共通のペプチドに従ってグループ分けした。タンパク質同定については1%未満及びペプチドについては0.1%未満の偽発見率 (FDR) (より低いスコアでエクスポートされるものを含む)を、逆のタンパク質配列のデータベースに対して同じ手順を適用することによって求めた。

10

## 【0204】

バイオインフォマティクス分析。非特異的結合剤を、SAINTソフトウェア (バージョン2.3.4)を用いて薬物プルダウンからフィルタリングした (Choi (2011) Nat Meth 8, 70-73)。タンパク質スペクトルカウントをタンパク質量の尺度として用い、実際のプルダウン対陰性対照実験のデータを比較し、SAINTにより真のベイト (bait) 相互作用物質としてのプレイ (prey) タンパク質の確率を算出する。

20

## 【0205】

SAINT確率カットオフ閾値はTUBA1B及びRPS3Aとして0.99に設定し、既知の汚染物質が本発明者らの施設での千回を超えるMS実験で観察され、それぞれ0.9993及び0.9882の確率であった。

## 【0206】

結晶化のためのMTH1の発現及び精製。発現構築物を、市販のRosetta細胞に由来するpRARE2プラスミドを含有する大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3)コンピテント細胞に形質転換した。形質転換によるコロニーを使用して、 $34 \mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコール及び $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含有する $100 \text{mL}$ のLB培地に接種した。培養物を $37^\circ\text{C}$ で振盪しながらバッフル付き振盪フラスコで一晩成長させた。この培養物を使用して、 $10 \text{mL}$ の培養物を $1 \text{L}$ のLB ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含有する)に添加することによってバッフル付き振盪フラスコ内のLB培地に接種した。培養物がおよそ0.6のOD<sub>600</sub>を有した時、温度を $18^\circ\text{C}$ に下げ、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシドを $0.5 \text{mM}$ まで添加することによってタンパク質発現を誘導した。培養物を $18^\circ\text{C}$ で一晩振盪し続けた後、細胞ペレットを遠心分離によって採取した。細胞を、 $0.5 \text{mM}$ トリス (2-カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)及び $0.2 \text{mM}$ フッ化フェニルメタンスルホニル (PMSF)を添加した結合バッファー ( $20 \text{mM}$ イミダゾール、 $500 \text{mM}$  NaCl、 $50 \text{mM}$  Hepes (pH 7.4)、5%グリセロール)に再懸濁した。再懸濁した細胞を $-20^\circ\text{C}$ で保管した。

30

40

## 【0207】

再懸濁した細胞を融解し、超音波処理によって溶解させた。ポリエチレンイミンを0.15%の濃度まで添加し、溶解物を $4^\circ\text{C}$ で遠心分離し、不溶性物質を除去した。上清を $7.5 \text{mL}$ のニッケル-キレート樹脂にロードした。樹脂を結合バッファー、及び $40 \text{mM}$ イミダゾール、その後 $60 \text{mM}$ イミダゾールを含有する結合バッファーで洗浄した。タンパク質を、 $250 \text{mM}$ イミダゾールを含有する結合バッファーで溶出させた。ヘキサヒスチンタグを、TEVプロテアーゼを用いて $4^\circ\text{C}$ で一晩処理することによって除去した。

50

消化したサンプルを5 ml容量まで濃縮し、GFバッファー(50 mM HEPES (pH 7.5)、300 mM NaCl、0.5 mM TCEP)で予め平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラム(HiLoad 16/60、GE Healthcare)にロードした。MTH1を含有する画分をプールし、2.5 mlニッケル-キレート樹脂のカラムに通した。フロースルー及び10 mMイミダゾールを含有するGFバッファーによる溶出物を合わせた。タンパク質同一性をエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析(Agilent LC/MSD)により検証した。

#### 【0208】

MTH1複合体を、10:1というおおよそのモル比で希釈タンパク質溶液に(R)-クリゾチニブ又はクリゾチニブの(S)-エナンチオマーを添加することによって調製した。MTH1:クリゾチニブ複合体を20 mg/mlのタンパク質濃度まで限外濾過によって共に濃縮した。

#### 【0209】

結晶化及びデータ収集。MTH1複合体を、表3に詳述される150 nLのドロップを用いるシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化した。全ての結晶を25% (v/v) エチレングリコールを添加したリザーバ溶液中で凍結防止処理し、液体窒素で急速冷凍した。X線回折データをDIAMONDシンクロトロン、100 Kで収集した。

#### 【0210】

構造決定及び精密化。回折像をMOSFLM (Leslie in *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography* Vol. 245 NATO Science Series; eds Randy J Read & Joell Sussman; Ch. 4, 41-51; Springer Netherlands, 2007)を用いて処理した。総合データをスケーリングし、AIMLESS (Evans (2006) *Acta Crystallographica Section D* 62, 72-82)及びCCP4プログラム一式 (Winn (2011) *Acta Crystallographica Section D* 67, 235-242)を用いてマージした。PHASER (McCoy (2007) *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658-674)を用いる分子置換によって構造を解明した。全ての構造モデルをCOOT (Emsley (2010) *Acta Crystallographica Section D* 66, 486-501)を用いて構築し、REFMAC5 (Murshudov (2011) *Acta Crystallographica Section D* 67, 355-367)を用いて精密化した。リガンド抑制をPRODRG (Schuettelkopf (2004) *Acta Crystallographica Section D* 60, 1355-1363)で生成した。Molprobit (Chen (2010) *Acta Crystallographica Section D* 66, 12-21)を構造確認に用いた。データ収集及び精密化の統計は表4に見ることができる。

#### 【0211】

細胞培養及び免疫プロット法。BJ細胞はATCCから入手した。SW480及びDL D1はWalter Bergerにより好意提供されたものであり、PAN C1はRudolf Oehlerにより好意提供されたものである。他の全ての細胞株はAmerican Type Culture Collection (ATCC)又はLeibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)から入手した。SW480、PAN C1及びBJ細胞はDMEM中、DL D1はRPMI中で培養した。全ての培地が10%ウシ胎仔血清(FBS)及び10 U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco)を含有するものであった。MCF-7を10% FBS、10 U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン及び0.01 mg/mlのウシインスリンを含有するDMEM中で培養した。MDA-MB-231を、10% FBS及び10 U/mlのペニシリン/ストレプトマイシンを含有するリーボピツル-15中で成長させた。抗体。抗ALK抗体はCell Signaling Technologyから入手し、抗MTH1はNovus (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)から購入した。以下の抗体をメーカーの使用説明書に従って使用した:ウサギ抗MTH1 (NB100-109、Novus Biologicals)、ウサギ抗アクチン (AAN01、Cytoskeleton)、ウサギ抗ALK (C26G7、Cell Signaling Technology及び513900、Invitrogen、Life Technologies)。

#### 【0212】

組み換えMTH1の発現。Hisタグ及びTEV部位を特徴とするpETM-11ベク

10

20

30

40

50

ター (Gunther Stier, EMBL) にサブクローニングした、コドン最適化したヒト MTH1 cDNA を GenScript (GenScript, NJ, USA) により得て、大腸菌株 BL21 DE3 (Life Technologies) で発現させた。採取後、リゾチーム (Sigma-Aldrich) 及び DNase I (Roche) を含有するバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl、5% グリセロール、5 mM -メルカプトエタノール、1 mM PMSF) で細菌を溶解させた。His タグ付きタンパク質を NiNTA アガロース (Qiagen) で精製し、バッファーで洗浄し、イミダゾール勾配で溶出させた。TEV プロテアーゼとのインキュベーションによる His タグの除去の後、画分を透析し、サイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex, GE Healthcare) によって精製した。精製画分のタンパク質濃度を UV ( $A_{280}$ ) によって求めた。タンパク質の同一性を MALDI-TOF によって確認し、タンパク質活性を  $K_m$  測定によって求めたところ、文献データ (Svensson (2011) FEBS Letters 585, 2617-2621) に一致する値が得られた。

10

20

30

40

50

### 【0213】

化学プロテオミクス実験。薬物ブルダウン実験は基本的に、1 反復当たり 10 mg の全溶解タンパク質を用いて先に記載されるように行った。競合実験のために、溶解物を純粋な未変性クリゾチニブ (最終濃度 20  $\mu$ M) とともに 30 分間ブレインキュベートした。ブルダウン溶出物をトリプシンで消化し、iTRAQ 試薬で標識し、LC によって分取し、Orbitrap Velos 質量分析計で分析した。ピークリスト情報を得られた MS データから抽出し、ヒト SwissProt データベースバージョン v2010.09\_20100812 (varsplc.pl により得られるアイソフォームを含む) から検索エンジン MASCOT (v2.3.02, MatrixScience, London, UK) 及び Phenyx (v2.5.14, GeneBio, Geneva, Switzerland) で検索した<sup>20</sup>。タンパク質データベース検索基準の詳細は他の部分に示す<sup>21</sup>。定量的プロテオミクスデータの分析を、R/Bioconductor パッケージ isobar で行った<sup>22</sup>。

### 【0214】

MTH1 アッセイ。ヒト MTH1 (NUDT1) をコードし、大腸菌における発現について最適化された cDNA は GenScript から購入した。His タグ付き MTH1 は大腸菌 BL-21 (DE3) (Stratagene) において pETM-11 から発現させた。細菌を採取し、溶解させ、Ni-NTA アガロース (Qiagen) を用いて His タグ付き MTH1 を精製した。His タグを TEV 切断によって除去し、MTH1 タンパク質を、Sephadex カラム (GE Healthcare) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて pH 7.5 で更に精製した。タンパク質の同一性及び純度を、質量分析を用いて確認した。MTH1 の活性を、PPLight 無機ピロリン酸アッセイ (Lonza Rockland Inc.) を用い、8-オキソ-dGTP (TriLink Biotechnologies) を使用してモニタリングした。GraphPad Prism ソフトウェアを利用する非線形回帰分析を用いて IC50 値を求めた。

### 【0215】

より具体的には、MTH1 触媒アッセイを以下のように行った。最大半量阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を、僅かに変更した先に記載されるような (Svensson (2011) FEBS Letters 585, 2617-2621) 発光ベースのアッセイを用いて求めた。簡潔に述べると、化合物の段階希釈物をアッセイバッファー (0.005% Tween-20 及び 2 mM ジチオスレート (DTT) を含有する 100 mM Tris-アセテート (pH 8.0)、40 mM NaCl 及び 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>) に溶解した。MTH1 組み換えタンパク質 (最終濃度 2 nM) を添加した後、プレートをプレートシェーカー上で室温にて 15 分間インキュベートした。8-オキソ-dGTP (TriLink Biotechnologies、最終濃度 16  $\mu$ M) を添加した後、MTH1 による 8-オキソ-dGTP 加水分解の結果としてのピロリン酸塩 (Ppi) の生成を、PPLight 無機ピロリン酸アッセイキット (Lonza Rockland) を用いて 15 分間にわたってモニタリングした。IC<sub>50</sub> 値を、GraphPad Prism ソフトウェアを利用する非線形回帰分析を用いて用量応答曲線をデータ点

に適合させることによって求めた。

【0216】

siRNA実験。市販の抗MTH1 siRNAセット(SMARTpool ON-TARGETplus、Dharmacon)及びカスタム合成したsiRNA(Sigma-Aldrich)の両方を得た。カスタムsiRNA配列はCGACGACAGCUACUGGUUUであり、AllStars Negative Control siRNA(Qiagen)を対照として使用した。トランスフェクションのために、細胞をsiRNA処理の24時間前に24ウェルプレートにおよそ30%コンフルエンスで播種した。翌日、培地を吸引し、トランスフェクションをINTERFERin(Polyplus)でメーカーの使用説明書に従って10nMの最終siRNA濃度を用いて行った。細胞を2、3日間インキュベートし、洗浄し、トリプシンで剥離させ、6ウェルプレートに再プレatingした。7日~10日後、培地を吸引し、細胞をPBSで洗浄し、氷冷メタノールで固定し、クリスタルバイオレット溶液(25%メタノール中0.5%)で染色し、一晚乾燥させた。結果の定量化のために、クリスタルバイオレットのUV吸光度を70%エタノールによる可溶化後に595nmで求めた。GraphPad Prismソフトウェア(t検定、 $P < 0.05$ )を用いてデータを分析した。

10

【0217】

SW480細胞を用いたコロニー形成アッセイ。処理の前日に、6ウェルプレートに1ウェル当たり $10^4$ 個の細胞を播種し、24時間インキュベートする。翌日、DMSO(最高量の化合物希釈に等しい、最大で0.2%)又は漸増濃度の化合物を添加し、細胞を37、5%CO<sub>2</sub>で7日間~10日間インキュベートした。PBS(Gibco)で洗浄した後、細胞を氷冷メタノールで固定し、クリスタルバイオレット溶液(25%メタノール中0.5%)で染色し、一晚乾燥させた。結果の定量化のために、70%エタノールによる可溶化の後にクリスタルバイオレットのUV吸光度を595nmで求めた。GraphPad Prismソフトウェアを利用した非線形回帰分析を用いてデータを分析した(このコロニー形成アッセイはMCF7及びMDA-MB-231細胞を用いることによっても行い、図12に示される同様の結果をもたらした)。

20

【0218】

MCF7及びMDA-MB-231細胞を用いたコロニー形成アッセイ。1ウェル当たり1000個の細胞を2mLの完全培地に播種した(0日目)。培地を交換しながら薬物又はDMSO(モック)を24時間後(1日目)、15日目及び21日目に薬物を添加した。プレatingの4週間後に、細胞をメタノールで固定した後、クリスタルバイオレットで染色した。

30

【0219】

コメットアッセイ。細胞を化合物で6日間処理し、DNA一本鎖切断をアルカリ性条件下でコメットアッセイを用いてアッセイした。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>対照については、細胞をPBS中150μMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Sigma-Aldrich)で10分間処理した。細胞をPBSで2回洗浄し、ゴムスクレーパーを用いて採取し、遠心分離によってペレット化し、PBSに再懸濁し、1%低ゲル化温度アガロース(SigmaのタイプVII)と混合し、37で維持した。細胞とアガロースとの混合物を、0.5%アガロースをプレコートした艶消しガラススライド上に成層し、スライドを氷上に置き、ゲル化した。後続の全ての工程の間スライドを暗所に維持した。スライドを予冷した溶解バッファー(2.5M NaCl、0.1M EDTA、10mM Tris-HCl(pH7.70)、1%Triton X-100、1%DMSO)に1時間浸漬し、予冷した蒸留水で20分間3回洗浄し、予冷したアルカリ電気泳動バッファー(50mM NaOH、1mM EDTA、1%DMSO(pH12.8))中で45分間インキュベートした。25ボルトで25分間の電気泳動の後、スライドを4で一晩暗所に置いた。翌日、スライドを0.4M Tris-HCl(pH7.0)で1時間中和し、SYBR Gold(Invitrogen、蒸留水で10000倍に希釈する)で30分間染色した。コメットテールモーメント(コメットテールのDNA画分を乗算した、DNAによって移動した平均距離として規定される)を、CellP

40

50

rofiler 細胞画像分析ソフトウェアを用いてスコアリングした。

【0220】

間接的免疫蛍光。細胞を化合物で6日間処理した後、ガラスカバースリップに付着させ、PBSで洗浄した後、PBS中の3%パラホルムアルデヒドで20分間固定した。固定した細胞をPBSですすぎ、0.5% Triton-X-100で5分間透過処理した。PBS洗浄したスライドをPBS中の10% FCS及び0.1% Triton-X-100とともに1時間インキュベートした後、細胞をPBS中の10% FCS及び0.1% Triton-X-100において抗53BP1モノクローナル抗体(H-300、Santa Cruz、600倍希釈)で染色した。PBSですすいだ後、カバースリップをPBS中の10% FCS及び0.1% Triton-X-100においてアレキサフルオール(Alexa fluor) (登録商標) 568ヤギ抗ウサギIgG二次抗体(Invitrogen、400倍希釈)とともに1時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、DNAをDAPI (Sigma-Aldrich)で10分間対比染色し、カバースリップをFluorescent Mounting Medium (Dako)でマウントした。画像をZeissの蛍光顕微鏡で支援ソフトウェアを用いて63倍の倍率で分析した。

10

【0221】

異種移植研究。SCIDマウス(雌性、5週齢~6週齢、Scanbur、Germany)に、 $1 \times 10^6$ 個のSW480細胞をマトリックスゲル(1:1)とともに仙骨部に皮下注射した。処理を細胞接種の1日後に開始した。ビヒクル又はMTH1阻害剤を25mg/kgで35日間、1日1回皮下投与した。MTH1阻害剤を1% DMSO、10% エタノール、10% cremaphore、10% Tween 80、69% PBSで希釈した。腫瘍サイズを週2回、体重を週1回測定した。終了時に、肉眼による検視を行った。血液を血液学的パラメーター及びASAT、ALAT、クレアチニン測定のために採取し、腫瘍をパラホルムアルデヒド(4%)中に採取した後、免疫組織学的分析のためにパラフィン包埋した(inbedded)。動物に関わる全ての実験は、Stockholms Norra djurfoersoksetiska naemnd (ストックホルム動物実験倫理委員会)によって承認されたプロトコルに従うものとした。全ての動物は1週間順応させ、実験中に水及び食餌を自由摂取させた。動物は12時間の明サイクル、並びに実験動物ガイドライン及び規則に従う温度及び湿度下に置いた。

20

【0222】

8-オキソ-グアニン染色。24ウェルプレートに1ウェル当たり5000個のBJ細胞を播種し、24時間後に指定の化合物又はDMSOで処理した。細胞を72時間後に固定し、それぞれの抗体(抗オキソグアニン8抗体[2Q2311](ab64548)、abcam)で染色した。

30

【0223】

実験及び結果：

実施例1：クリゾチニブ及びクリゾチニブの誘導体の固体化、並びにALKへのその結合  
クリゾチニブの細胞間相互作用物質を調査するために、対象の化合物をセファロースビーズに固定化する直接化学プロテオミクスアプローチを遂行した(図1、「化合物中心化学プロテオミクス」)<sup>8</sup>。固体化は、化合物とビーズマトリックスとの間の共有結合を確立する化学反応によって達成される。したがって、化合物は反応が生じるのに適切な反応性官能基を必要とし、これにより元の化合物の化学修飾が強化されることが多い。当然ながら、分子構造の変化により調査対象の化合物の相互作用挙動及び標的スペクトルを変化させることができる。化合物を固定化する分子内の位置も結合に影響し得ることに留意されたい。このため、連結可能な全ての誘導体について既知の標的の結合を検査及び確認することが慣行である。3つのクリゾチニブの誘導体を、様々なリンカー長及び疎水性に関する化学的性質を包含する異なる化学的リンカーを用いて調製した(図2)。

40

【0224】

クリゾチニブは、メチル(CH<sub>3</sub>)基が結合する炭素にキラル中心を有する。したがって、2つのクリゾチニブのエナンチオマー、すなわち(R)-クリゾチニブ及びクリゾチ

50

ニブの(S)-エナンチオマーが存在する(図3)。c-Metキナーゼ活性の阻害において(S)-エナンチオマーよりも著しく強力であることが示されているため、臨床的には(R)-クリゾチニブのみが使用されている(c-Met  $K_i$ (R) = 0.002  $\mu$ M、 $K_i$ (S) = 0.161  $\mu$ M)<sup>9</sup>。実際には、クリゾチニブが特異的c-Metキナーゼ阻害剤として実際に開発されている。両方のエナンチオマーを考慮して完全なインタラクトームを評価するために、ラセミ型クリゾチニブ((R)-及び(S)-エナンチオマーの1:1混合物)を薬物プルダウンアッセイにおいて使用した。

#### 【0225】

クリゾチニブ誘導体CeMM-144、CeMM-145及びCeMM-146の化学合成は図13に概説される。

10

#### 【0226】

クリゾチニブ自体もN非置換ピペリジン部分の存在のために固体化手順に適合することから、CeMM-144、CeMM-145及びCeMM-146を用いたリンカー評価実験に含めた。固体化がその同族標的に結合するクリゾチニブの能力を妨げないことを確認するために、4つ全ての化合物について薬物-ビーズマトリックスを生成した後、ALK陽性SH-SY5Y神経芽細胞腫細胞を用いるプルダウン実験を行った。同様にALKに結合する非特異的BCR-Ab1キナーゼ阻害剤であるボスチニブ<sup>10</sup>を陽性対照として使用した。溶出物をSDS-PAGE及びウエスタンブロット法によって分析した(図4)。

20

#### 【0227】

図4に示されるように、SH-SY5Y細胞は分子量の異なる2つのALKアイソフォームを発現する。アミノプロピル置換CeMM-146は両方のALKアイソフォームを、続いてPEG-誘導体CeMM-145を最も高い程度に富化する。非変性クリゾチニブ及びCeMM-144は、ALKにCeMM-146及びCeMM-145よりも少ない程度で結合する。これらの結果に基づき、先の全ての実験にCeMM-146を使用することとした。

#### 【0228】

実施例2：クリゾチニブの相互作用物質の同定：クリゾチニブの新たな標的としてのMTH1

プロファイリングのために、異なる遺伝的背景を有する3つのヒト癌細胞株を選択した：SH-SY5Y(NB、ALK陽性)、NCI-H3122(NSCLC、EML4-ALK陽性)及びNCI-H1648(c-Met増幅、ALK陰性)。直接的な結合剤と間接的又は非特異的な結合剤とを区別するために、親和性精製工程の前に細胞溶解物を非変性クリゾチニブとともに20  $\mu$ Mの最終濃度で30分間ブレインキュベートする競合実験を行った。相対的及び絶対的定量化(iTRAQ)の標識化用のイソバリックタグを、MS実験におけるペプチドの定量化に使用した。全ての実験を二連で行った。通常対競合的プルダウンにおける標識ペプチドの比を比較するために、親和性ランキングを生成し、クリゾチニブの上位の直接相互作用物質である可能性があることから最も効率的に競合したタンパク質の優先順位を付けた。これら3つの全ての細胞株から同定された上位のタンパク質の分析の結果を図5にまとめる。

30

40

#### 【0229】

予想の通り、ALKをALK陽性SH-SY5Y及びH3122サンプルの両方において標的として同定することができた一方で、c-MetがH1648及びH3122プルダウンにおいて捕捉され、全実験的戦略が確認された。興味深いことに、幾つかの未知のキナーゼ標的を除いて、全サンプルにおけるクリゾチニブの共通標的として7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン-トリホスファターゼMTH1(遺伝子記号:NUDT1)が発見された。

#### 【0230】

MTH1がクリゾチニブと相互作用するという結果が、組み換えMTH1タンパク質を用いたサーマルシフト安定性アッセイにおいて小キナーゼ阻害剤コレクションをスクリー

50

ニングすることによって確認された。このサーマルシフト安定性アッセイを適用することによって、本発明者らは、二重Met / ALK阻害剤クリゾチニブがMTH1に対して高い親和性を示すことを発見した（データは示さない）。

#### 【0231】

ヒトMutTホモログ1 (MTH1) は、2-OH-dATP及び8-オキソ-dGTP等の酸化ヌクレオチドの主要な除去酵素を表す<sup>1 1</sup>。DNA又はヌクレオチドプールへの活性酸素種 (ROS) の攻撃によって生成する酸化ヌクレオチドは、DNA損傷及び突然変異を引き起こし得る。ROSの発生源としては、ミトコンドリア呼吸、化学物質又は放射線が挙げられる。頻繁に生じる8-オキソ-グアニン (8-オキソ-G) は例えば、複製中のトランスポージョン突然変異をもたらし得る。非酸化グアニンとは対照的に、8-オキソ-Gはシトシン又はアデニンとほぼ等しい効率で対合することが可能であり、それにより8-オキソ-Gが新生DNA鎖の反対のAに挿入される場合又は逆の場合に突然変異を生成する。誤って取り込まれた酸化ヌクレオチドがDNA修復系により認識されると、病変は塩基除去修復 (BER) によって修復され得る。BERは、誤って挿入された塩基及び後続の置換を除去する一時的な一本鎖切断の誘導を伴う。しかしながら、多量の8-オキソ-Gは、最終的に二本鎖切断 (DSB) へと進行することにより細胞周期停止 (休止又は老化) 及びアポトーシスを誘導する一本鎖切断の蓄積をもたらし得る。酸化三リン酸ヌクレオチドを、DNAポリメラーゼがもはや基質として使用することができない対応する一リン酸塩へと変換することによって、MTH1は酸化塩基のDNAへの組み込み、ひいてはROSによって誘導される突然変異及び酸化的DNA損傷を防ぐ。全腫瘍の約20%で生じる突然変異体RAS等の癌遺伝子による細胞の形質転換は、ROS産生の増大ももたらし得る<sup>1 2</sup>。正常細胞については、ROSによって引き起こされる酸化的損傷は、癌細胞を休止又は老化 (OIS)、最終的にはアポトーシスの状態にする可能性がある。老化を克服するために、RAS形質転換細胞は細胞を酸化的DNA損傷から保護するMTH1を上方調節する。例えば、HRASをトランスフェクトしたヒト皮膚線維芽細胞は老化を受けるが、この表現型をMTH1の同時過剰発現によって奪回することができることが示されている<sup>1 2</sup>。その結果として、MTH1抑制が突然変異体RASを発現する癌細胞において増殖欠損を引き起こすことが報告により示されている<sup>1 3</sup>。MTH1-/-ノックアウトマウスは非常に軽度の表現型を示すため<sup>1 4</sup>、小分子によるMTH1の標的化は、治療が困難なRAS突然変異体癌に対する新規かつ良好な耐容性を示す治療選択をもたらし得る。

#### 【0232】

実施例3：クリゾチニブはMTH1の触媒活性を阻害する

公的に利用可能なタンパク質間相互作用データベースを調査して、MTH1が「ピギーバック」、すなわち間接的相互作用をもたらし得るクリゾチニブのキナーゼ標的と相互作用し得るか否かを検査したが、これは本発明者らの分析においてMTH1ペプチドの富化をもたらすことも可能であった。しかしながら、かかる相互作用は報告されていない。クリゾチニブがこれらの細胞の成長を低ナノモル濃度で阻害することが見出されているため、この調査を異なる癌型であるユーイング肉腫ファミリーの腫瘍 (ESFT) にも拡大した。この場合も、いずれもEWS-FLI1癌遺伝子によって誘導されると考えられているSK-ES-1及びSK-N-MC細胞を調査する全ブルダウンにおいてMTH1が同定された。クリゾチニブが実際にMTH1の触媒活性を阻害することを確認するために、組み換えMTH1を用いて酵素アッセイを行った。細胞内でMTH1は2-OH-dATP及び8-オキソ-dGTP等の酸化ヌクレオチドを加水分解し、対応する一リン酸塩及びピロリン酸塩 (PPi) を生じる。MTH1媒介8-オキソ-dGTP加水分解によって生成するPPiの産生をモニタリングする発光ベースのアッセイを、MTH1酵素動態を求めるために用いられてきたプロトコルに従って行った<sup>1 5</sup>。IC50値を、臨床的に適用される光学的に純粋な(R)-エナンチオマー、並びに(R)-及び(S)-エナンチオマーを含有するラセミ型混合物の両方を考慮してクリゾチニブについて求めた (図6~図9)。ブルダウン結果を確認したところ、ラセミ型及び純粋な(R)-クリゾチ

10

20

30

40

50

ニブの両方が 8 - オキソ - d G T P を加水分解する M T H 1 の能力を阻害した。しかしながら、ラセミ体の阻害効力は、エナンチオマー的に純粋な ( R ) - クリゾチニブについて観察されるよりも約 10 倍高かった。これらの結果を、異なる供給業者から入手した純粋な ( R ) - 及びラセミ型クリゾチニブの両方の種々のバッチの分析によって確認した。異なる A L K 阻害剤 N V P - T A E 6 8 4 <sup>1 6</sup> も調査したが、これは 100  $\mu$  M の濃度で M T H 1 触媒活性の顕著な阻害を示さなかった ( データは示さない )。このことから、M T H 1 阻害が A L K キナーゼ阻害剤の一般現象ではなく、クリゾチニブの特定の化学型の特徴であることが示唆される。しかしながら、キナーゼ阻害剤はキナーゼ活性部位に結合すると A T P を模倣するため、他のキナーゼ阻害剤もその天然基質が A T P 及び G T P の誘導体であることから強力な M T H 1 阻害剤である可能性がある。

10

**【 0 2 3 3 】**

加えて、S K - E S - 1 細胞における競合的ブルダウン実験をベイトとしてラセミ型 C e M M - 1 4 7、及び漸増濃度の光学的に純粋な ( R ) - クリゾチニブ又はラセミ体を用いて行った ( 図 10 )。I C 50 結果によって示唆されるように、ラセミ型クリゾチニブのみが最大 20  $\mu$  M のプレインキュベーション濃度で M T H 1 の結合を効果的に妨げた。

**【 0 2 3 4 】**

M T H 1 に結合し阻害するクリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーの選好性を確認するために、光学的に純粋なクリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーのバッチを再合成した ( 図 14 )。合成戦略は光学的に純粋な出発物質の使用によって異なり、先に公開されたラセミ型及び / 又は ( R ) - クリゾチニブの合成手順に従うものである ( de Koning (2011) Organic Process Research & Development, 15: 1018-1026 <sup>3 8</sup> ( その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする ) を参照されたい )。実際に、M T H 1 触媒アッセイにおいて評価したところ、クリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーについて求められた I C <sub>50</sub> 値は、( S ) - 対 ( R ) - エナンチオマーで 100 倍超高い効力を示した ( 図 11 )。

20

**【 0 2 3 5 】**

臨床的に使用されている純粋な ( R ) - クリゾチニブ及びこれまで調査されていないクリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーの両方を調製し、試験した。純粋なクリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーが低ナノモル M T H 1 阻害剤であり、( R ) - エナンチオマーがマイクロモル範囲の I C <sub>50</sub> 値をもたらすことが本発明者らにより見出されたことから、M T H 1 触媒アッセイにおける両方のエナンチオマーの分析により、スクリーニングヒットバッチがラセミ型混合物を含有することが示唆された ( 図 11 )。結果を直接結合アッセイ ( I T C ) によって確認したところ、M T H 1 に対する ( S ) - エナンチオマーの 16 倍高い親和性が示された ( 図 17 )。

30

**【 0 2 3 6 】**

ヒト癌細胞に対する ( S ) - エナンチオマーの抗増殖活性を評価するために、2 つの乳癌細胞株 M C F - 7、及び K R A S 突然変異 ( G 1 3 D ) を有する M D A - M B - 2 3 1 を用いるコロニー形成アッセイを行った ( 図 12 )。10  $\mu$  M 濃度では、( R ) - 及び ( S ) - エナンチオマーの両方が D M S O 処理細胞と比較して両細胞株の成長を顕著に低減した。

40

**【 0 2 3 7 】**

これらのデータと一致して、クリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーは、S C H 5 1 3 4 4 と同様に S W 4 8 0 結腸癌及び K - R a s 突然変異 P A N C 1 膵臓癌細胞のコロニー形成を効率的に阻害した ( 図 17 A 及び図 17 C )。重要なことには、正常ヒト B J 皮膚線維芽細胞を漸増濃度の ( R ) - クリゾチニブ又はクリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーで処理したところ、臨床的に使用されている ( R ) - エナンチオマーが非形質転換細胞に対してクリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーよりも高い毒性を有することが見出された ( 図 19 )。このため、クリゾチニブの ( S ) - エナンチオマーで観察された抗増殖効果は、非特異的細胞毒性の任意の増大によるものではなかった。別の 2 つの A L K 及び 3 つの市販の M e t 阻害剤も M T H 1 を阻害するその能力について試験したが、他の化合物

50

は同等の効力を示さなかった（データは示さない）。クリゾチニブの（S）-エナンチオマーについて公表されている  $c - M e t \quad K i$  値を考慮すると、本発明のデータから、クリゾチニブの（S）-エナンチオマーが M T H 1 について少なくとも 4 倍選択的であることが示唆される（Cui (2011) Journal of Medicinal Chemistry 54, 6342-6363）。クリゾチニブの（S）-エナンチオマーの抗増殖効果が潜在的オフターゲット  $c - M e t$  の阻害によって媒介されることを除外するために、S W 4 8 0 細胞を特異的な低ナノモル  $c - M e t$  阻害剤で処理したが、増殖に対する顕著な効果は検出されなかった（図 2 0）。このため、クリゾチニブの（S）-エナンチオマーは R a s 形質転換癌細胞に対する抗増殖活性を有する新規かつ強力な M T H 1 阻害剤である。

【 0 2 3 8 】

M T H 1 は 8 - オキソ - d G T P を含む酸化ヌクレオチドのヌクレオチドプールを除去する (sanitise) ことにより D N A へのその組込みを妨げると考えられているため、本発明者らは M T H 1 酵素機能の阻害が D N A 中の 8 - オキソ - グアニン含量を増大すると推論した。結果として引き続いて D N A 修復機構が活性化され、活性化塩基除去修復 (B E R) により一本鎖切断の形成が誘導される (Rai (2009) Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 169-174)。このことを試験するために、アルカリコメットアッセイにおいてクリゾチニブの（S）-エナンチオマー及び S C H 5 1 3 4 4 を調査したところ、単一細胞電気泳動により D N A 一本鎖切断が明らかとなった。クリゾチニブの（S）-エナンチオマー及び S C H 5 1 3 4 4 の両方がコメットアッセイにおいて顕著なテールモーメントを生じるが、（R）-クリゾチニブは生じないことが見出された（図 1 8 A）。同時に、抗 M T H 1 s i R N A で観察される効果と一致して、D N A 損傷の特異的マーカーである 5 3 B P 1 の染色が増大した（図 1 8 B 及び図 2 1）。

【 0 2 3 9 】

実施例 4：アミノヘテロアリアルベースの M T H 1 阻害剤の好ましい構造的特徴

M T H 1 に結合する阻害剤の分子要件を決定するために、（R）-クリゾチニブ及びクリゾチニブの（S）-エナンチオマーの両方を M T H 1 と共結晶化した。構造により、キラル中心のメチル基の望ましくないエク립ス配座及びベンジル環のハロゲン置換基が、活性部位における結合（R）-クリゾチニブのエネルギー優先傾向 (energetic favourability) 低減し得ることが明らかになった（図 1 8 C、図 1 8 D、図 2 2、図 2 3 及び表 3、表 4）。この観察結果は I T C データによっても支持され、（R）-クリゾチニブとクリゾチニブの（S）-エナンチオマーとの間の結合の差が完全にエントロピックであり、したがってタンパク質との異なる結合相互作用によるものではないことが示唆される。

【 0 2 4 0 】

上で述べたように、ヒト M T H 1 に結合するクリゾチニブの（S）-エナンチオマーの共結晶構造を生成した（図 1 5 を参照されたい）。ヒト M T H 1 に結合するクリゾチニブの（S）-エナンチオマーの共結晶構造に基づいて、図 1 6 に示される M T H 1 阻害剤ファーマコフォアモデルを開発した。このファーマコフォアモデルは、アミノヘテロアリアル化合物ベースの M T H 1 阻害剤の好ましい構造的特徴を示すものである。特に、図 1 6 に示されるように、M T H 1 阻害剤ファーマコフォアは、互いにオルト位に 1 つの水素結合アクセプタ（例えば - N H 2、- R N H、- R N R、- O H、- O R、- S H、- S R）及び 1 つの水素結合ドナー（例えば - N H 2、- R N H、- O H、- S H）を有する 5 員又は 6 員芳香族複素環を含む。水素結合アクセプタは、ハロゲン化ベンジル等の親油性ベンジル置換基を有するのが好ましい。ベンジル置換基は C H 2 - 炭素に付加的なメチル基を有するのが好ましい。得られるキラル中心に対して、M T H 1 阻害の点では（S）-配置が好ましい。主要な芳香族複素環に対してパラ位に 5 員芳香族複素環（例えばピラゾール）等の付加的なアリアル置換基を導入することができる。水素結合ドナー（例えばアミノプロピル、ピペリジン、ピペラジン）として作用することも可能であり得る陽イオン性官能基を特徴とする 5 員環は、脂肪族又は環状置換基を有するのが好ましい。

【 0 2 4 1 】

このファーマコフォアモデルはアミノヘテロアリアル化合物の（S）-エナンチオマーであ

10

20

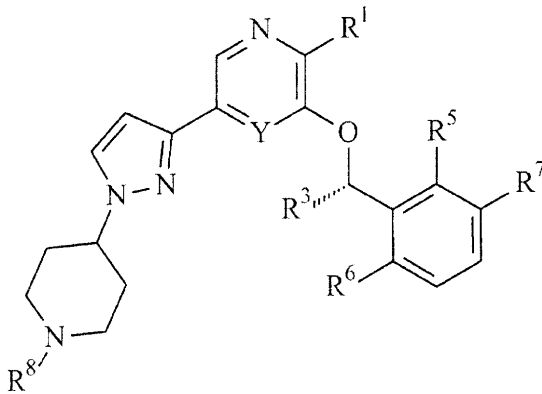
30

40

50

る、MTH1阻害剤の下記式(1)：

【化8】



式(1)

(式中、

R<sup>1</sup>は-NH<sub>2</sub>、-NR<sup>2</sup>H、-OH又は-SHであり、

R<sup>2</sup>はC<sub>1</sub>~6アルキル、C<sub>2</sub>~6アルケニル又はC<sub>2</sub>~6アルキニルであり、

R<sup>3</sup>はC<sub>1</sub>~3アルキル、C<sub>2</sub>~3アルケニル、C<sub>2</sub>~3アルキニル又はシクロプロピルであり、

YはN又はCR<sup>4</sup>であり、

R<sup>4</sup>は水素、ハロゲン、C<sub>1</sub>~6アルキル、C<sub>2</sub>~6アルケニル、C<sub>2</sub>~6アルキニル又はC<sub>3</sub>~6シクロアルキルであり、

R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>は各々独立してフッ素、塩素、臭素又はヨウ素であり、

R<sup>8</sup>は水素又は-A-B<sub>n</sub>-Xであり、ここで、

Aは単結合、-C(=O)-又は-C(=O)CH<sub>2</sub>-であり、

BはC<sub>1</sub>~4アルキレン、C<sub>2</sub>~4アルケニレン又は-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-であり、

nは0、1、2、3、4又は5であり、

Xは-NHR<sup>2</sup>、-NH<sub>2</sub>、-SH、-OH又はO-アルキルである)に則している。

【0242】

【表2】

表2. 等温滴定カロリメトリー

	(R)-クリゾチニブ	クリゾチニブの(S)-エナンチオマー	SCH51344
モル比(n)	0.72	0.76	0.99
ΔH(cal/mol) #	-7306±66	-7328±38	-6479±45
TΔS(cal/mol)	+710	2330	3170
K <sub>d</sub> (nM) #	781±39	48±3.9	49±5.6

#データは50mM Tris-HCl(pH7.8)、150mM NaCl中、15℃で測定した。

表に示す誤差は、実験的データの非線形最小二乗適合の誤差である。

【0243】

【表3】

表3. MTH1複合体の結晶化

	MTH1:(R)-クリゾチニブ	MTH1:クリゾチニブの(S)-エナンチオマー
リザーバ溶液	30%PEG4000、 0.2M(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24%PEG4000、 0.2M(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
タンパク質の容量:リザーバの容量(nL)	50:100	50:100
温度(℃)	4	20

【0244】

10

20

30

40

【表 4】

表 4. データ収集及び精密化の統計値

データセット	MTH1 : (R) -クリゾチニブ	MTH1 : クリゾチニブの (S) -エナンチオマー
単位格子 (a、b、c (Å))	36.2、60.0、66.9	36.2、60.0、67.0
空間群	P 2 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P 2 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
分子数/非対称単位	1	1
データ収集		
ビームライン	D i a m o n d I 0 4	D i a m o n d I 0 2
分解能範囲 <sup>a</sup> (Å)	44.64~1.65 (1.68~1.65)	36.20~1.20 (1.22~1.20)
完全性 <sup>a</sup> (%)	99.8 (97.4)	99.6 (99.8)
多重度 <sup>a</sup>	4.2 (3.2)	3.9 (4.0)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (%)	0.077 (0.369)	0.054 (0.566)
< I / σ (I) (Å) > <sup>a</sup>	8.2 (2.6)	10.4 (2.2)
精密化		
R 因子 (%)	16.7	15.6
R <sub>free</sub> (%)	22.7	19.2
Rmsd 結合長 (Å) (角度 (度))	0.009 (1.34)	0.008 (1.30)

<sup>a</sup> 括弧内の値は最外郭のものである。

## 【0245】

## 実施例 5 : マウス異種移植研究

腫瘍成長を無効にするクリゾチニブの (S) - エナンチオマーの *in vivo* 潜在性を調査するために、SW480 細胞を使用するマウス異種移植研究を行ったところ、50% を超える腫瘍体積の低減によって示されるようにクリゾチニブの (S) - エナンチオマーが腫瘍進行を損なうことが可能であることが示された (図 18E)。動物が正常に挙動し、血液学的パラメーター (表 5) 又は体重の顕著な変化が観察されなかったため、(S) - エナンチオマーは良好な耐容性を示した (18.8 mg ± 1.2 の (S) - クリゾチニブ対 19.1 mg ± 2.0 のピヒクル群)。

## 【0246】

要約すると、データから MTH1 が薬物様小分子阻害剤によって容易に標的化され得る Ras 形質転換細胞の重要な成分であることが示唆される。癌細胞が増殖の増大のために高レベルの酸化ストレスを受け、ミトコンドリア呼吸の結果として ROS の産生をもたらすことが確立されている。ヌクレオチドプールは ROS の主要な標的であり、DNA 塩基の酸化は突然変異及び DNA 損傷に顕著に寄与する。その結果として、相当量の遺伝子異常及び同時の DNA 修復機構の欠陥を有する腫瘍細胞は、ROS 誘導 DNA 損傷に対して特に感受性が高い。酸化ヌクレオチドを除去してヌクレオチドプールの恒常性を維持することにより、MTH1 は、癌細胞の増殖ストレスを軽減するため、抗癌化合物の潜在的標的である。実際に、MTH1 レベルは肺癌 (Speina (2005) Journal of the National Cancer Institute 97, 384-395、Kennedy (1998) FEBS Letters 429, 17-20) から腎臓癌 (Okamoto (1996) Int J Cancer 65, 437-441) に及び Ras 発現癌において増大しており (図 24)、発癌形質転換と酸化ストレスとの間に関連性があることが示される。このことは、SCH51344 が v - a b l 等の様々な異なる癌遺伝子を感染させた線維芽細胞の成長も妨げることが示されていることによっても支持され、MTH1 の潜在的な包括的役割の更なる調査が促される。注目すべきことに、ノックアウトマウスの MTH1 欠損は軽度の表現型をもたらし、MTH1 阻害剤の潜在的治療濃度域が存在することが示唆される (Tsuzuki (2001) Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 11456-114

61)。MTH1の直接的かつ機能的な阻害剤としてのSCH51344の同定により、新たな薬物の開発につながるような標的群としてのゲノム完全性関連タンパク質が明らかになる。さらに、ALK異常の患者に適用される臨床的に承認されたキナーゼ阻害剤であるクリゾチニブの(S)-エナンチオマーが、K-Ras陽性結腸癌異種移植モデルにおいて利益をもたらすファーストインクラスの低ナノモルMTH1阻害剤であるという本発明者らの発見は、癌の治療における新たな治療選択を広げる。

【0247】

【表5】

表5. SCIDマウス血液学及び肝臓/心臓/腎臓パラメーター

試験 名称 (試験単位)	クリゾチニブの(S)-エナンチオマー (平均±SD)	クリゾチニブの(S)-エナンチオマー 対照の倍数	p値 (t検定)
WBC (10 <sup>9</sup> /l)	1.90±0.64	1.08±0.35	0.33
RBC (10 <sup>12</sup> /l)	9.51±0.37	1.00±0.04	0.48
好中球 (10 <sup>9</sup> /l)	1.50±0.51	1.24±0.43	0.15
リンパ球 (10 <sup>9</sup> /l)	0.23±0.06	0.67±0.19	0.11
単球 (10 <sup>9</sup> /l)	0.16±0.11	0.95±0.51	0.42
MCV (fl)	43.02±1.07	1.01±0.02	0.26
MCH (pg)	14.07±0.30	1.0±0.02	0.38
MCHC (g/l)	327±4.90	0.98±0.02	0.019
血小板 (10 <sup>9</sup> /l)	828±160	0.84±0.16	0.21
HBG (g/l)	134±6.25	0.99±0.046	0.4
p-クレアチニン (uM)	18.6±4.24	0.93±0.21	0.15
p-ASAT (mCat/l)	1.10±0.32	0.72±0.21	0.068
P-ALAT (mCat/l)	0.26±0.07	0.81±0.21	0.15

処理対照を比較するマウス血液学及び肝臓/心臓/腎臓パラメーター。SCIDマウスにビヒクル又はクリゾチニブの(S)-エナンチオマー(25mg/kg)を35日間皮下投与した。血液サンプルを眼窩採血によって得て(麻酔下)、全血及びASATを用いて血液パラメーターを分析し、EDTA採取血漿におけるALAT及びクレアチニンはKarolinska Universitetslaboratoriet, Clinical Chemistryによって分析された。異なる群の白血球(WBC)、赤血球(RBC)、好中球、リンパ球、単球の平均値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン(MCHC)を表に示す。結果は、血液学パラメーター又は肝臓/心臓/腎臓パラメーターにおいて対照と処理群との間でMCHCの僅かな変化を除いて有意差を示さなかった。

【0248】

実施例6: MTH1の安定なノックダウンはSW480細胞のコロニー形成を損なう

抗MTH1 siRNAによるMTH1遺伝子サイレンシングが、突然変異体KRASの発現するSW480結腸癌細胞の生存率を損なうという本発明者らの発見を実証するために、eGFP(対照)又はMTH1を標的とするshRNAを発現する安定な細胞株も作製した(Rai (2009) Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 169-174)。先の結果と一致して、MTH1の安定なノックダウンはSW480細胞のコロニー形成を顕著に低減した(図26)。

【0249】

実施例7: (S)-クリゾチニブの包括的な細胞内標的プロファイル

細胞中のMTH1タンパク質を標的とするクリゾチニブの(S)-エナンチオマーの特異性を決定するために、上記のショットガン質量分析を用いた化学プロテオミクス薬物ブルダウを行った。(S)-クリゾチニブの固体化のために、(S)-3-(1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ)-5-(1-(ピペリジン-4-イル

) - 1H - ピラゾール - 3 - イル) ピリジン - 2 - アミンの誘導体化を CeMM - 146 について記載されるように行い、(S) - 5 - (1 - (1 - (3 - アミノプロピル) ピペリジン - 4 - イル) - 1H - ピラゾール - 3 - イル) - 3 - (1 - (2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エトキシ) ピリジン - 2 - アミンを得た(図27)。

【0250】

ケモプロテオミクス分析を、発癌KRAS突然変異体を発現するSW480結腸癌細胞を用いて示されるように行った。結果を表6に示す。

【0251】

【表 6】

表 6 : (S) - クリゾチニブの包括的な細胞内標的プロファイル

Prey 遺伝子	Avg P	SC. E xp. 1 -1	SC. E xp. 1 -2	SC. E xp. 1 -1	SC. E xp. 2 -1	SC. E xp. 2 -2	Sum	SC. N e g C t r l. 1 -1	SC. N e g C t r l. 1 -2	SC. N e g C t r l. 1 -1	SC. N e g C t r l. 2 -1	SC. N e g C t r l. 2 -2	Sum
NUDT1	0. 9997	32	32	23	30	117	4	2	2	2	2	2	10
PLIN3	0. 8429	4	3	3	3	13	0	0	0	1	0	0	1
DDX3X	0. 7764	2	2	1	2	7	0	0	0	0	0	0	0
ANP32A	0. 5951	1	1	1	3	6	0	0	0	0	0	0	0
KPNB1	0. 5773	7	6	1	0	14	0	0	0	2	0	0	2
ANP32B	0. 5116	0	1	4	4	9	0	0	0	0	0	0	0
UBA1	0. 4997	15	15	0	0	30	0	0	0	2	2	4	4
PDIA3	0. 4952	8	7	0	0	15	0	0	0	1	0	0	1
TLN1	0. 4939	7	7	0	0	14	0	0	0	0	0	1	1
GARS	0. 4818	6	7	0	0	13	0	0	0	2	0	0	2
PGAM1	0. 4721	6	6	0	0	12	0	0	0	2	0	0	2
AHCY	0. 4716	4	4	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
HSPH1	0. 4697	7	5	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0
SET	0. 4696	3	3	4	3	13	0	0	0	2	3	5	5
SARS	0. 4649	4	4	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
MDH1	0. 4615	5	6	0	0	11	0	0	0	0	0	2	2
TARS	0. 4614	5	4	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0
ADK	0. 4613	4	3	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
ANXA3	0. 461	4	4	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
TXN	0. 4587	4	5	2	1	12	0	0	0	1	3	4	4
IQGAP2	0. 4584	9	9	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0
PARK7	0. 4547	6	7	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0
PAICS	0. 4488	7	5	0	0	12	0	0	0	2	1	3	3
NME1	0. 4442	6	4	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
MDH2	0. 4441	5	5	0	0	10	0	0	0	0	2	2	2
PDIA6	0. 4427	3	4	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
COTL1	0. 4372	5	4	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0
ATIC	0. 4369	3	4	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
PSMD2	0. 4359	6	5	0	0	11	0	2	0	2	0	4	4
CDC37	0. 4343	3	3	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
ANXA5	0. 4332	9	6	0	0	15	0	0	0	2	2	4	4
PSMC3	0. 4297	3	3	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
RUVBL2	0. 4297	3	3	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40



ARF4	0.352	3	3	0	0	0	6	0	0	2	0	2	0	2
TMSB10	0.3518	2	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
PSMD12	0.35	2	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
CAD	0.3483	2	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1	1
FARSB	0.3413	3	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
MIF	0.3362	0	1	2	2	0	5	0	1	1	1	1	3	3
CIQBP	0.33	3	3	0	0	0	6	0	0	1	1	1	2	2
PEBP1	0.3266	3	3	0	0	0	6	0	0	1	1	1	2	2
PGD	0.3262	4	2	0	0	0	6	0	0	1	1	1	2	2
PRDX2	0.3255	4	4	0	0	0	8	0	0	2	1	3	3	3
09-Sep	0.323	1	2	0	2	0	5	1	0	1	0	2	2	2
MANF	0.3221	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
CTSZ	0.3217	2	2	0	0	0	4	0	0	0	1	1	1	1
HSD17B4	0.3179	2	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
PCNA	0.3137	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
NQO1	0.3104	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
CAP1	0.3081	3	2	0	0	0	5	0	0	0	2	2	2	2
RAN	0.3036	5	6	0	0	0	11	0	0	3	2	5	5	5
LIN28A	0.3021	2	2	2	0	0	6	2	0	1	0	3	3	3
DCTN2	0.2964	2	3	0	0	0	5	0	1	0	1	2	2	2
07-Sep	0.2962	3	3	0	0	0	6	0	0	1	2	3	3	3
HNRNPA2B1	0.2944	2	2	0	2	0	6	1	1	0	1	3	3	3
ACTN4	0.2923	4	4	0	0	0	8	0	0	3	2	5	5	5
ACOT7	0.2785	1	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
MTHFD1	0.2666	2	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
SRP9	0.2561	2	1	0	2	0	5	2	0	1	0	3	3	3
CRABP2	0.2533	4	1	0	0	0	5	0	0	0	2	2	2	2
YARS	0.2511	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
PGK1	0.2466	14	12	0	0	0	26	0	0	9	6	15	15	15
DYNC1H1	0.2458	13	13	2	2	0	30	1	2	3	2	8	8	8
TGM2	0.2455	6	5	0	0	0	11	0	0	3	3	6	6	6
CAPRIN1	0.2355	2	2	0	0	0	4	0	0	0	1	1	1	1
HIST1H1E	0.2298	0	2	0	2	0	4	0	3	0	0	3	3	3
MSN	0.2291	11	11	0	0	0	22	0	0	7	6	13	13	13
ALDOA	0.2283	12	12	2	0	0	26	0	0	8	6	14	14	14
HSP90B1	0.228	13	8	0	0	0	21	0	0	8	5	13	13	13
SLCIA5	0.227	1	0	3	2	0	6	2	2	0	1	5	5	5
NAP1L1	0.2244	1	2	0	0	0	3	0	0	1	0	1	1	1
ENO1	0.2209	29	28	7	7	0	71	3	3	17	18	41	41	41

10

20

30

40



GEMIN4	0. 1509	0	1	2	0	3	2	1	0	0	3
PSMA4	0. 1477	1	1	2	1	5	2	0	1	1	4
WDR1	0. 1469	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
PFN1	0. 1469	9	9	1	3	22	0	2	6	6	14
ABCE1	0. 1467	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
PDIA4	0. 1432	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
EIF5A	0. 1427	6	7	0	0	13	0	0	6	3	9
XRCC5	0. 1426	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
DYNLRB1	0. 1409	2	2	2	2	8	2	1	1	1	5
CARS	0. 1394	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
FKBP4	0. 1375	3	2	0	0	5	0	0	2	2	4
FABP3	0. 1374	4	3	0	0	7	0	0	2	3	5
PKM	0. 1356	23	22	6	6	57	0	2	13	14	29
RARS	0. 1343	5	6	3	0	14	2	3	1	2	8
PSMB6	0. 1336	0	2	0	0	2	0	0	0	2	2
CAST	0. 1312	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
PRKCSH	0. 1291	2	0	0	0	2	0	0	1	0	1
GSN	0. 1286	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
DSTN	0. 1269	0	2	0	0	2	0	0	2	0	2
YWHAH	0. 1244	1	2	0	0	3	0	0	3	0	3
CNN2	0. 1239	2	0	0	0	2	0	0	1	1	2
TKT	0. 1231	5	7	0	0	12	0	0	4	5	9
YWHAE	0. 1176	10	10	0	0	20	0	2	6	6	14
EZR	0. 1136	4	6	0	0	10	0	0	5	3	8
PSMD1	0. 1117	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
PDCD6IP	0. 1109	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
AIMP1	0. 1089	0	0	2	0	2	0	1	1	2	4
ACLY	0. 1061	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
EIF4A1	0. 1044	4	5	0	0	9	0	1	4	2	7
ATP2A2	0. 1039	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
COPA	0. 1038	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
HNRNPAB	0. 1024	1	2	0	0	3	2	1	0	0	3
CLTA	0. 1023	2	0	4	2	8	2	3	2	1	8
PLOD3	0. 1017	2	0	0	0	2	0	0	1	0	1
IQGAP1	0. 1001	6	4	0	0	10	0	2	2	5	9
GART	0. 0981	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
HINT1	0. 0956	0	2	0	3	5	1	0	2	3	6
HSPD1	0. 0865	8	8	0	0	16	0	0	7	5	12
PFAS	0. 0861	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0

10

20

30

40

PSMA6	0. 0839	3	3	0	1	7	2	1	1	1	1	5
NACA	0. 0792	2	2	1	0	5	0	0	2	2	2	4
PSMA1	0. 0751	0	2	0	0	2	0	1	1	1	3	3
EEF2	0. 0725	15	15	0	0	30	0	0	11	11	22	22
RPS28	0. 0702	2	3	1	3	9	3	2	1	1	7	7
PRDX1	0. 0697	6	6	0	2	14	0	0	4	6	10	10
PDCD5	0. 0686	2	2	0	0	4	0	0	2	2	4	4
CALM2, CALM1, CALM3	0. 063	2	2	0	0	4	0	2	0	2	4	4
RPS20	0. 0628	0	2	2	3	7	2	3	2	0	7	7
RANBP1	0. 0579	2	2	0	0	4	0	0	2	2	4	4
CCT6A	0. 053	9	8	0	2	19	3	3	4	3	13	13
ARFGEF2	0. 051	0	2	2	3	7	4	3	0	0	7	7
STRAP	0. 0503	4	4	0	3	11	3	3	2	0	8	8
XPO7	0. 0419	5	4	6	4	19	3	6	2	2	13	13
GAPDH	0. 0389	17	14	4	4	39	2	4	10	8	24	24
IPO5	0. 0381	4	4	4	6	18	4	4	2	3	13	13
PSMA7	0. 0354	2	2	1	2	7	2	2	1	1	6	6
CALR	0. 0304	0	2	0	0	2	0	0	2	2	4	4
RPL21	0. 0299	2	2	2	1	7	1	2	2	1	6	6
HIST1H4J, HIST1H4D, HIST1H4K, HIST1H4C, HIST2H4A, HIST4H4, HIST1H4E, HIST1H4A, HIST1H4B, HIST1H4I, HIST2H4B, HIST1H4H, HIST1H4L, HIST1H4F	0. 0286	2	3	0	0	5	2	2	2	0	6	6
ACTB	0. 0283	19	18	6	3	46	3	3	12	12	30	30
EIF5B	0. 0275	3	2	0	2	7	2	0	2	2	6	6
RPL38	0. 0262	4	2	2	3	11	2	4	1	2	9	9
RBP1	0. 0261	3	2	0	0	5	0	0	3	3	6	6
STAU1	0. 0255	2	2	0	3	7	3	3	0	2	8	8
EIF3G	0. 0243	2	2	0	2	6	2	2	0	2	6	6

SLC7A5	0. 0. 239	3	2	2	2	9	3	2	0	2	7
PSMB3	0. 0. 232	4	4	0	0	8	2	2	2	2	8
YWHAZ	0. 0. 192	4	6	1	1	12	0	0	6	5	11
EIF3J	0. 0. 189	3	2	0	2	7	2	3	2	0	7
LDHB	0. 0. 184	9	8	2	3	22	0	0	7	9	16
YWHAB	0. 0. 173	4	4	0	0	8	0	0	5	4	9
RPL36AL	0. 0. 168	3	0	2	0	5	2	3	0	2	7
HNRNPK	0. 0. 165	6	5	3	0	14	2	1	4	4	11
VCP	0. 0. 163	15	14	3	4	36	4	5	6	9	24
CLIC1	0. 0. 151	8	8	0	1	17	0	0	7	8	15
HDAC6	0. 0. 145	2	2	0	1	5	2	1	1	1	5
RPL35A	0. 0. 138	1	2	0	0	3	1	2	1	1	5
YWHAG	0. 0. 136	3	3	1	2	9	0	0	4	4	8
SYNE1	0. 0. 134	3	4	0	0	7	0	0	0	0	0
XPO1	0. 0. 132	4	2	2	0	8	5	3	1	0	9
RPL27A	0. 0. 111	7	2	3	2	14	3	3	4	3	13
PRKDC	0. 0. 073	10	8	4	9	31	15	7	0	0	22
MAP4	0. 0. 072	6	5	4	6	21	4	4	3	4	15
HNRNPU	0. 0. 071	2	3	2	3	10	2	2	2	3	9
SSB	0. 0. 068	2	2	0	0	4	2	1	2	1	6
KARS	0. 0. 068	1	1	0	2	4	3	2	2	0	7
CCT3	0. 0. 066	7	7	4	5	23	3	4	4	3	14
RPL35	0. 0. 065	2	0	2	2	6	2	2	2	2	8
EIF3F	0. 0. 064	3	2	0	0	5	3	2	2	0	7
RPL34	0. 0. 057	0	2	0	0	2	2	0	2	2	6
RPS26	0. 0. 053	3	3	3	4	13	3	3	3	3	12
02-Sep	0. 0. 051	6	2	1	2	11	2	4	3	3	12
RPL29	0. 0. 05	0	0	2	2	4	2	2	2	2	8
YWHAQ	0. 0. 042	6	6	0	0	12	0	0	7	7	14
MARS	0. 0. 042	3	2	3	1	9	3	3	1	3	10
CCT4	0. 0. 041	10	10	2	2	24	4	2	7	6	19
SYNE2	0. 0. 039	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
HSPA5	0. 0. 033	18	14	4	4	40	4	5	11	10	30
VDAC1	0. 0. 033	5	3	7	5	20	6	7	3	2	18
THADA	0. 0. 025	2	0	3	2	7	4	7	0	0	11
EIF2S1	0. 0. 022	2	2	1	4	9	3	3	3	3	12
RPL27	0. 0. 02	4	5	0	3	12	3	3	4	3	13
RPLP1	0. 0. 019	3	2	0	0	5	2	2	2	3	9
EIF3M	0. 0. 019	2	2	0	0	4	2	1	2	2	7

EPDR1	0. 0018	4	4	3	5	4	16	5	4	3	3	15
RPS23	0. 0016	1	1	2	2	6	2	2	3	2	2	9
RPS13	0. 0016	4	4	4	3	14	2	4	4	2	4	12
HIST1H2AB, HIST1H2AE	0. 0014	2	2	3	2	9	3	3	3	2	2	10
SLC2A1	0. 0014	2	2	2	2	8	3	3	3	3	1	10
RPL14	0. 0013	3	3	2	3	10	3	4	4	2	2	11
MYL6	0. 0012	5	5	4	2	15	4	4	4	3	3	14
RPL19	0. 0012	4	4	2	2	10	2	2	5	0	4	11
RPL9、RPL9P 8、RPL9P7、R PL9P9	0. 0011	2	2	2	1	7	3	3	4	2	1	10
RPL22	0. 0011	3	3	3	1	8	4	4	2	2	2	10
E1F3D	0. 0009	5	5	4	3	15	5	5	2	2	4	13
RPL31	0. 0008	3	3	3	4	13	3	3	3	4	4	14
E1F3I	0. 0008	3	3	2	0	5	3	3	3	2	1	9
MLST8	0. 0008	7	7	7	6	28	8	8	7	3	3	21
EEF1D	0. 0007	3	3	4	3	12	4	4	3	3	2	12
RPS9	0. 0007	5	5	4	2	13	2	2	4	3	4	13
PA2G4	0. 0005	10	10	11	4	29	5	5	5	6	7	23
KRT5	0. 0004	5	5	5	1	11	6	6	3	3	2	14
RPL5	0. 0004	3	3	3	4	13	5	5	5	2	2	14
RPL18	0. 0004	4	4	4	5	19	6	6	4	3	6	19
PSMB2	0. 0003	0	0	3	0	3	2	2	3	2	3	10
LARS	0. 0003	5	5	6	3	17	7	7	3	2	3	15
HSPB1	0. 0002	6	6	7	2	19	4	4	4	5	5	18
PSMB1	0. 0002	2	2	2	0	4	3	3	3	1	2	9
RPL13A	0. 0002	4	4	4	2	13	4	4	2	3	4	13
RPS11	0. 0002	4	4	4	5	17	6	6	4	3	4	17
RPL30	0. 0002	3	3	2	2	10	2	2	4	3	4	13
RPL18A	0. 0002	3	3	3	4	12	4	4	3	4	4	15
KRT8	0. 0001	12	12	8	3	27	6	6	7	5	6	24
XRCC6	0. 0001	5	5	4	0	12	5	5	4	2	4	15
PSMB5	0. 0001	4	4	4	3	15	5	5	4	4	3	16
RPS19	0. 0001	8	8	7	3	24	5	5	6	5	4	20
CCT5	0. 0001	6	6	4	0	10	3	3	3	5	5	16
RPS25	0. 0001	6	6	6	5	22	4	4	5	4	6	19
PCBP2	0. 0001	3	3	3	0	6	4	4	3	2	3	12
CCT7	0. 0001	10	10	10	2	25	4	4	6	6	6	22



KRT10	0	16	14	0	0	30	12	7	7	38
DARS	0	6	6	0	1	13	2	5	6	18
RPS2	0	6	6	5	5	22	9	8	5	28
HISTH1B	0	1	0	0	0	1	1	1	1	4
CSDA	0	2	2	2	2	8	5	3	3	16
HSPA6	0	1	1	1	1	4	5	6	7	24
TCPI	0	11	8	4	4	27	8	4	6	25
RPL7	0	4	4	2	2	12	7	5	4	21
VCL	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
RPL17	0	3	4	3	3	13	4	4	3	16
NCL	0	13	14	8	9	44	12	14	15	55
HK1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
EIF2S2	0	4	6	2	4	16	4	5	6	20
PTMS	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0
FLNA	0	43	43	32	30	148	47	51	34	168
RPS3	0	9	9	7	8	33	8	8	5	28
EEF1B2	0	2	3	2	3	10	4	4	4	15
ACPI	0	5	5	4	3	17	5	6	5	22
RPS12	0	6	5	4	6	21	5	6	5	21
RPL13	0	6	6	4	6	22	7	7	6	27
PTBP1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
EEF1G	0	7	9	9	7	32	9	10	10	39
RPL12	0	7	12	8	7	34	9	11	9	37
HSPA4	0	13	16	2	4	35	7	8	9	35
PHB	0	8	9	5	4	26	12	10	5	35
MYH9	0	32	33	15	18	98	18	19	22	83
FUS	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
KRT2	0	8	8	0	0	16	9	8	6	27
RPL4	0	8	4	5	5	22	5	6	8	27
SRP14	0	1	1	1	1	4	1	1	1	4
RPL3	0	5	5	4	4	18	5	7	6	24
EIF2S3	0	5	4	3	4	16	3	3	7	17
IARS	0	4	4	2	3	13	4	4	4	15
MTOR	0	9	10	9	11	39	24	19	3	50
RPS27	0	0	0	0	1	1	2	2	0	4
VDAC2	0	1	0	0	0	1	1	1	0	2
RPL28	0	4	2	0	0	6	6	4	3	17
RPS5	0	5	4	3	2	14	5	6	5	20
RPS10	0	7	5	5	3	20	7	7	7	29

10

20

30

40

MAP1B	0	21	20	14	12	67	26	25	23	22	96
PPT1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CCT8	0	8	8	4	4	24	5	4	6	6	21
CSE1L	0	11	12	6	7	36	14	14	5	4	37
EIF3B	0	3	3	2	3	11	5	4	5	4	18
EIF6	0	2	2	1	0	5	3	4	3	3	13
MTPN	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
EIF3E	0	2	2	2	2	8	3	4	3	2	12
RAB10	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
UBE2N	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
RPS3A	0	9	6	6	6	27	5	7	5	8	25
RPL26	0	3	3	2	2	10	3	5	6	4	18
RPL15	0	4	4	4	3	15	5	6	4	4	19
RPL37A	0	3	4	3	4	14	4	5	4	4	17
HSPE1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
RPS7	0	5	7	2	2	16	7	5	7	5	24
PSMC5	0	1	1	0	1	3	1	1	0	0	2
RPS8	0	7	6	5	6	24	8	8	6	5	27
RPS16	0	6	4	6	5	21	6	7	5	4	22
RPS14	0	6	6	5	5	22	6	6	5	5	22
RPS18	0	8	7	4	8	27	6	6	7	9	28
TMSB4X	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
RPL7A	0	3	3	5	3	14	6	7	6	4	23
RPS4X	0	8	7	3	6	24	10	10	11	7	38
PPP2CB	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
ACTA2	0	2	1	0	0	3	3	2	7	10	22
RPL23A	0	3	3	2	3	11	5	3	5	4	17
RPS6	0	5	4	3	3	15	3	4	4	5	16
RAB1A	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
RPL23	0	5	5	4	4	18	5	5	5	6	21
RPL10A	0	5	4	3	4	16	4	4	3	5	16
RPL32	0	1	1	1	1	4	1	2	1	1	5
RPL11	0	3	4	3	4	14	5	5	5	4	19
RPL8	0	6	5	5	6	22	6	5	7	7	25
PPIA	0	13	13	4	3	33	8	6	10	10	34
FKBP1A	0	1	1	1	0	3	0	0	0	1	1
GNB2L1	0	12	13	9	11	45	13	14	12	14	53
YBX1	0	2	2	2	2	8	6	5	4	3	18
EEF1A1	0	23	21	8	8	60	12	11	16	16	55

10

20

30

40

TUBA1B	0	1	1	1	0	0	0	2	22	20	19	20	22	20	19	21	82
TUBA4A	0	22	20	14	12	68	18	16	16	16	16	16	16	16	16	17	67
TUBB4B	0	8	8	2	4	22	16	19	16	18	16	19	16	19	16	18	69
PAFAH1B2	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
CCT2	0	9	11	3	3	26	6	5	9	6	9	5	6	5	6	6	26
RPL24	0	4	4	3	4	15	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	16
CLTC	0	16	14	5	7	42	16	17	12	10	12	17	16	17	10	10	55
EWSR1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
RPL6	0	7	11	4	6	28	9	8	10	6	10	8	9	8	6	6	33
SSBP1	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
GFPT1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAX	0	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
AHNAK	0	5	6	6	6	23	4	7	6	5	6	7	4	7	6	5	22
MTAP	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G3BP1	0	2	2	3	2	9	4	4	4	2	4	4	4	4	2	2	14
PDAP1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TUBB2A	0	5	4	2	2	13	15	17	14	16	14	17	15	17	14	16	62
EIF3A	0	9	7	7	6	29	9	7	7	8	7	7	9	7	7	8	31
EIF4A2	0	1	1	0	1	3	2	2	4	3	4	2	2	2	4	3	11
FLNC	0	0	0	0	1	1	2	4	3	3	3	4	2	4	3	3	12
LASP1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2
PAFAH1B3	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PCBP1	0	0	1	0	0	1	1	1	3	3	3	1	1	1	3	3	8
ACTBL2	0	1	1	0	0	2	0	0	4	4	4	0	0	0	4	4	8
KRT79	0	0	1	0	0	1	2	1	1	3	1	1	2	1	1	3	7
TUBA1A	0	12	11	9	10	42	21	20	18	20	18	20	21	20	18	20	79
RPS27L	0	0	1	0	0	1	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	6
KRT74	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH14	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SERBP1	0	8	10	5	6	29	8	7	10	8	10	7	8	7	10	8	33
GCN1L1	0	37	34	37	37	145	60	61	17	12	17	61	60	61	12	12	150
TNPO1	0	9	7	6	6	28	14	8	5	6	5	8	14	8	5	6	33
S100A16	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
EIF3C、EIF3 CL	0	4	6	7	7	24	10	7	3	3	3	7	10	7	3	3	23
PHB2	0	9	8	3	5	25	14	11	8	7	8	11	14	11	7	7	40
TUBA1C	0	1	1	0	1	3	20	19	18	19	18	19	20	19	18	19	76
TUBB2B	0	4	3	1	2	10	16	18	15	17	15	18	16	18	15	17	66
TMEM109	0	1	1	0	1	3	2	1	0	1	0	1	2	1	0	1	4

10

20

30

40



結果から、MTH1（遺伝子名NUDT1）が突然変異体KRASを発現する結腸癌細胞株であるSW480細胞における（S）-クリゾチニブの主要な標的であることが明らかに示され、化合物の特異性が強調される。

【0253】

実施例8：抗癌特異性

クリゾチニブの（S）-エナンチオマーの抗癌特異性を*in vitro*で更に評価するために、様々な同系BJ線維芽細胞株を、コロニー形成アッセイにおいて幾つかの濃度のクリゾチニブの（S）-エナンチオマーで処理した。調査した細胞株パネルには、非形質転換（「野生型」）細胞、テロメラーゼで不死化した細胞（hTERT）、hTERT及びSV40ラージT抗原（SV40T）により形質転換した細胞、並びにhTERT、SV40T及びKRAS突然変異体V12により形質転換した細胞が含まれていた（図28）。

10

【0254】

データから、（S）-クリゾチニブが野生型細胞又はテロメラーゼによってのみ不死化された細胞よりも形質転換細胞に対する毒性が高いことが示唆され、癌特異的効果が強調される。

【0255】

実施例9：クリゾチニブの（S）-エナンチオマーによるMTH1触媒活性の阻害は基質依存性ではない

MTH1は8-オキソ-dGTPを加水分解するだけでなく、別の潜在的に変異原性のDNA前駆体である2-ヒドロキシ-デオキシアデノシン三リン酸（2-OH-dATP）を切断することも可能であることが知られている（Fujikawa (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 18201-18205）。したがって、クリゾチニブの（S）-エナンチオマーがMTH1による2-OH-dATPの加水分解に影響を及ぼすか否かを*in vitro*で先に記載されるルシフェラーゼベースのPPiLightアッセイを用いて調査した。図29に示されるように、クリゾチニブの（S）-エナンチオマーは、MTH1による2-OH-dATPの加水分解も用量依存的に阻害する。

20

【0256】

実施例10：クリゾチニブの（S）-エナンチオマーの活性に対するp53/p21状態及びミスマッチ修復経路の影響

腫瘍抑制因子遺伝子p53は多数の様々な癌型で突然変異又は欠損しており、治療転帰に影響を及ぼす可能性がある。したがって、p53機能及びその下流のメディエーターp21が、突然変異体KRAS HCT116結腸癌細胞においてクリゾチニブの（S）-エナンチオマーの抗癌活性にどのように影響を与えるかを調査した。さらに、MTH1の阻害がDNA複製中の塩基の誤対合を誘導するはずであるため、MLH1等のミスマッチ修復遺伝子の欠損がクリゾチニブの（S）-エナンチオマーに対する感度をどのように変化させるかを、樹立HCT116同系細胞株系を用いて評価しようとした（図30）。HCT116野生型細胞は機能的p53を有するがMLH1を欠いており、誘導體HCT116+chr3は染色体導入のために機能的MLH1遺伝子を有する。

30

【0257】

結果から、p53状態及び機能的MLH1の存在又は非存在がクリゾチニブの（S）-エナンチオマーの活性に影響を与えないことが示される。しかしながら、p21の喪失はクリゾチニブの（S）-エナンチオマーの処理に対するHCT116細胞の感度を増大するようである。

40

【0258】

実施例11：MTH1阻害の結果としてのDNA損傷の誘導

MTH1は8-オキソ-dGTPを含む酸化ヌクレオチドのヌクレオチドプールを除去することによりDNAへのその組込みを妨げると考えられているため、本発明者らはMTH1酵素機能の阻害がDNA中の8-オキソ-グアニン含量を増大すると推論した。実際に、（S）-クリゾチニブによるBJ線維芽細胞の処理は抗8-オキソ-グアニンマウス

50

モノクローナル抗体の染色を増大させたが、(R) - クリゾチニブは増大させなかった。同時に、抗 MTH1 siRNA で観察される効果と一致して、DNA 損傷の特異的マーカーである 53BP1 の染色が増大した (図 31)。

#### 【0259】

結果として DNA 修復機構が活性化され、活性化塩基除去修復 (BER) により一本鎖切断の形成が誘導される。このことを試験するために、アルカリコメットアッセイにおいてクリゾチニブの (S) - エナンチオマーを調査したところ、単一細胞電気泳動により DNA 一本鎖切断が明らかとなった。SW480 細胞を使用することにより、クリゾチニブの (S) - エナンチオマーがコメットアッセイにおいて顕著なテールモーメントを生じるが、(R) - クリゾチニブは生じないことが見出された。DNA 損傷経路活性化を示す ATM リン酸化の増大も観察され、同様に (S) - クリゾチニブ特異的効果を実証された (図 32)。

#### 【0260】

##### 概要

総合すると、データからクリゾチニブ、より好ましくはラセミ型クリゾチニブ、更により好ましくは純粋なクリゾチニブの (S) - エナンチオマーが、RAS 誘導性癌の発生、進行及び維持に関連付けられていた酵素である MTH1 の極めて強力な阻害剤であることが示される<sup>1,3</sup>。これは a) MTH1 の小分子阻害剤がこれまでに報告されていないため、b) クリゾチニブで治療される患者がその c - Met 発現状態又はより好ましくは ALK 発現状態により選択されるが、MTH1 が考慮されないため、及び c) クリゾチニブのピペリジン窒素でのアミノアルキル置換基の導入が ALK 及び MTH1 阻害の両方に関して良好な耐容性を示すために特に興味深い。このため、国際公開第 2008053157 号に記載の手順によって調製される化合物も、強力かつ生物が利用可能な MTH1 阻害剤である。

#### 【0261】

MTH1 抑制の生理的効果に基づくと、MTH1 阻害剤は DNA 損傷化合物、DNA 修復機構を妨げる化合物、又は ROS の産生を誘導するか若しくは ROS の除去を阻害する化合物と協同すると結論付けられる。さらに、MTH1 阻害剤は、DNA 修復経路遺伝子に病変を有する又は相当量の ROS を生じる腫瘍により合成致死性を示すと結論付けられる。例えば、8 - オキソ - G 病変の修復と関連付けられていた<sup>1,7</sup> 遺伝子 BRCA1 又は BRCA2 を欠いた乳癌細胞は酸化的 DNA 損傷に対して特に感受性が高い<sup>1,8</sup>。近年、MTH1 が老化等の腫瘍抑制効果を妨げるうえで RAS 誘導腫瘍を特異的に支持し、一方で腫瘍の維持及び進行を可能にすることが示されている。したがって、MTH1 阻害が細胞増殖シグナル伝達、上皮間葉移行 (EMT)、進行性及び浸潤性腫瘍の特徴、アノキス阻害及び PI3K / Akt 媒介生存促進性シグナル伝達を無効にすることにより腫瘍成長を損なう可能性がある<sup>1,9</sup>。最近のデータにより、EGFR 及び MTH1 の両方を抑制するマイクロ - RNA MiR 145 がこれらの腫瘍を下方調節することから、MTH1 が EGFR を発現する腺癌で有望な標的であり得ることも示唆される<sup>3,7</sup>。MiR 145 の再発現は EGFR 及び MTH1 の下方調節を mRNA 及びタンパク質レベルの両方でもたらし、EGFR 陽性細胞株の成長を損なった。要約すると、クリゾチニブ及びそのエナンチオマー、並びにその構造的誘導体を ALK / Met 誘導性肺癌を除く様々な異なる腫瘍型だけでなく、RAS 誘導性肺癌又は乳癌、結腸癌、膵臓癌、ユーイング肉腫等の治療にも適用することができる。

#### 【0262】

本発明は以下のヌクレオチド及びアミノ酸配列を指す。

#### 【0263】

1. NUDT1 / MTH1 に関する配列

1.1 NM\_\_002452.3 NP\_\_002443.3 7, 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニントリホスファターゼアイソフォーム p18:

説明

10

20

30

40

50

転写産物変異体：この変異体（１）は優性アイソフォーム（p 1 8、MTH 1 dとしても知られる）をコードする。変異体 1、2 A、3 A 及び 4 A は同じアイソフォームをコードする。

配列番号 1：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体（１）のヌクレオチド配列（4 7 1 n t）

配列番号 2：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体（１）のアミノ酸配列（1 5 6 a a）

【0 2 6 4】

1 . 2 NM\_\_1 9 8 9 4 8 . 1 NP\_\_9 4 5 1 8 6 . 1 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニントリホスファターゼアイソフォーム p 1 8 :

説明

転写産物変異体：この変異体（2 A）は変異体 1 と比較して 5' UTR が異なる。変異体 1、2 A、3 A 及び 4 A は同じアイソフォームをコードする（p 1 8、MTH 1 dとしても知られる）。

配列番号 3：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体（2 A）のヌクレオチド配列（4 7 1 n t）

配列番号 4：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体（2 A）のアミノ酸配列（1 5 6 a a）

【0 2 6 5】

1 . 3 NM\_\_1 9 8 9 4 9 . 1 NP\_\_9 4 5 1 8 7 . 1 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニントリホスファターゼアイソフォーム p 2 2 :

説明

転写産物変異体：この変異体（2 B）は変異体 1 と比較して 5' UTR 及び 5' コーディング領域が異なり、上流の A T G で翻訳開始を生じ、アイソフォーム p 1 8 と比較してより長い N 末端を有するアイソフォーム（p 2 2、MTH 1 b としても知られる）を生じる。変異体 2 B、3 B 及び 4 B は同じアイソフォームをコードする。

配列番号 5：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 2 2、転写産物変異体（2 B）のヌクレオチド配列（5 4 0 n t）

配列番号 6：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 2 2、転写産物変異体（2 B）のアミノ酸配列（1 7 9 a a）

【0 2 6 6】

1 . 4 NM\_\_1 9 8 9 5 0 . 1 NP\_\_9 4 5 1 8 8 . 1 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニントリホスファターゼアイソフォーム p 1 8 :

説明

転写産物変異体：この変異体（3 A）は変異体 1 と比較して 5' UTR が異なる。変異体 1、2 A、3 A 及び 4 A は同じアイソフォームをコードする（p 1 8、MTH 1 d としても知られる）。

配列番号 7：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体（3 A）のヌクレオチド配列（4 7 1 n t）

配列番号 8：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体（3 A）のアミノ酸配列（1 5 6 a a）

【0 2 6 7】

1 . 5 NM\_\_1 9 8 9 5 2 . 1 NP\_\_9 4 5 1 9 0 . 1 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニントリホスファターゼアイソフォーム p 2 2 :

説明

転写産物変異体：この変異体（3 B）は変異体 1 と比較して 5' UTR 及び 5' コーディング領域が異なり、上流の A T G で翻訳開始を生じ、アイソフォーム p 1 8 と比較してより長い N 末端を有するアイソフォーム（p 2 2、MTH 1 b としても知られる）を生じる。変異体 2 B、3 B 及び 4 B は同じアイソフォームをコードする。

配列番号 9：NUDT 1 / MTH 1、アイソフォーム p 2 2、転写産物変異体（3 B）の

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列 ( 5 4 0 n t )

配列番号 1 0 : N U D T 1 / M T H 1、アイソフォーム p 2 2、転写産物変異体 ( 3 B )  
のアミノ酸配列 ( 1 7 9 a a )

【 0 2 6 8 】

1 . 6 N M \_ 1 9 8 9 5 3 . 1 N P \_ 9 4 5 1 9 1 . 1 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オ  
キソグアニントリホスファターゼアイソフォーム p 1 8 :

説明

転写産物変異体 : この変異体 ( 4 A ) は変異体 1 と比較して 5 ' U T R が異なる。変異体  
1、2 A、3 A 及び 4 A は同じアイソフォームをコードする ( p 1 8、M T H 1 d とし  
ても知られる )。

配列番号 1 1 : N U D T 1 / M T H 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体 ( 4 A )  
のヌクレオチド配列 ( 4 7 1 n t )

配列番号 1 2 : N U D T 1 / M T H 1、アイソフォーム p 1 8、転写産物変異体 ( 4 A )  
のアミノ酸配列 ( 1 5 6 a a )

【 0 2 6 9 】

1 . 7 N M \_ 1 9 8 9 5 4 . 1 N P \_ 9 4 5 1 9 2 . 1 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オ  
キソグアニントリホスファターゼアイソフォーム p 2 2 :

説明

転写産物変異体 : この変異体 ( 4 B ) は変異体 1 と比較して 5 ' U T R 及び 5 ' コーディ  
ング領域が異なり、上流の A T G で翻訳開始を生じ、アイソフォーム p 1 8 と比較してよ  
り長い N 末端を有するアイソフォーム ( p 2 2、M T H 1 b とし  
ても知られる ) を生じる。  
変異体 2 B、3 B 及び 4 B は同じアイソフォームをコードする。

配列番号 1 3 : N U D T 1 / M T H 1、アイソフォーム p 2 2、転写産物変異体 ( 4 B )  
のヌクレオチド配列 ( 5 4 0 n t )

配列番号 1 4 : N U D T 1 / M T H 1、アイソフォーム p 2 2、転写産物変異体 ( 4 B )  
のアミノ酸配列 ( 1 7 9 a a )

配列番号 1 5 : N U D T 1 / M T H 1、p 2 6 アイソフォームのアミノ酸配列

> s p | P 3 6 6 3 9 | 8 O D P \_ H U M A N 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグアニン  
トリホスファターゼ O S = ホモサピエンス G N = N U D T 1 P E = 1 S V = 3

配列番号 1 6 : N U D T 1 / M T H 1、p 2 1 アイソフォームのアミノ酸配列

> s p | P 3 6 6 3 9 - 3 | 8 O D P \_ H U M A N 7 , 8 - ジヒドロ - 8 - オキソグア  
ニントリホスファターゼのアイソフォーム p 2 1 O S = ホモサピエンス G N = N U D  
T 1

【 0 2 7 0 】

プライマー配列 :

配列番号 1 7 : N U D T 1 / M T H 1 の検出のためのプライマー配列

( Sakumi (1993) Journal of Biological Chemistry 268: 23524-30 に公表されるヒト M  
T H 1 配列の塩基 9 7 ~ 1 1 6 に対応する )

5 P - A G C C T C A G C G A G T T C T C C T G - 3 P

配列番号 1 8 : N U D T 1 / M T H 1 の検出のためのプライマー配列

( Sakumi (1993) Journal of Biological Chemistry 268: 23524-30 に公表されるヒト M  
T H 1 配列の塩基 2 4 8 ~ 2 6 6 に対応する )

5 P - G A T C T G G C C C A C C T T G T G C - 3 P

【 0 2 7 1 】

2 . K R A S に関する配列

2 . 1 N M \_ 0 0 4 9 8 5 . 3 N P \_ 0 0 4 9 7 6 . 2 G T P アーゼ K R a s アイ  
ソフォーム b 前駆体 :

説明

転写産物変異体 : この変異体 ( b ) は 5 つのエクソンから構成され、より長い転写産物変  
異体 ( a ) に含まれるエクソン 4 a を欠いている。この優性変異体 ( b ) はエクソン 4 b

10

20

30

40

50

で終了し、アイソフォーム b をコードする c d s を有する。

配列番号 19 : K R A S、アイソフォーム b 前駆体、転写産物変異体 ( b ) のヌクレオチド配列 ( 5 6 7 n t )

配列番号 20 : K R A S、アイソフォーム b 前駆体、転写産物変異体 ( b ) のアミノ酸配列 ( 1 8 8 a a )

【 0 2 7 2 】

2 . 2 N M \_ 0 3 3 3 6 0 . 2 N P \_ 2 0 3 5 2 4 . 1 G T P アーゼ K R a s アイソフォーム a 前駆体 :

説明

転写産物変異体 : この変異体 ( a ) は、より短い転写産物変異体 ( b ) が欠いているエクソン 4 a を含む 6 つのエクソンから構成される。この希少変異体 ( a ) は、アイソフォーム a と比較してエクソン 4 a で終了し、独特な C 末端をコードする c d s を有する。

配列番号 21 : K R A S、アイソフォーム a 前駆体、転写産物変異体 ( a ) のヌクレオチド配列 ( 5 7 0 n t )

配列番号 22 : K R A S、アイソフォーム a 前駆体、転写産物変異体 ( a ) のアミノ酸配列 ( 1 8 9 a a )

【 0 2 7 3 】

K R A S 配列注釈

この配列注釈では、K R A S の共通突然変異は「変異体」という用語によって示される。

【 0 2 7 4 】

10

20



FT	VARIANT	1 2	1 2	G→A (結腸直腸癌サンプル中；体細胞突然変異)。
FT				
FT	VARIANT	1 2	1 2	/FTId=VAR_036305。 G→C (肺癌中；体細胞突然変異)。
FT				
FT	VARIANT	1 2	1 2	/FTId=VAR_006839。 G→D (膵臓癌、GASC及び肺癌中；体細胞突然変異)。
FT				
FT	VARIANT	1 2	1 2	/FTId=VAR_016026。 G→R (肺癌及び膀胱癌中；体細胞突然変異)。
FT				
FT	VARIANT	1 2	1 2	/FTId=VAR_016027。 G→S (肺癌及びGASC中；体細胞突然変異)。
FT				
FT	VARIANT	1 2	1 2	/FTId=VAR_016028。 G→V (肺癌、膵臓癌、結腸癌及びGASC中；体細胞突然変異)。
FT				
FT	VARIANT	1 3	1 3	/FTId=VAR_006840。 G→D (乳癌細胞株及びGASC中；体細胞突然変異)。
FT				
FT	VARIANT	1 3	1 3	/FTId=VAR_016029。 G→R (毛様細胞性(正：pilocytic)星状細胞腫中；体細胞突然変異；Ras経路活性化を増大する)。
FT				
FT	VARIANT	1 4	1 4	/FTId=VAR_065145。 V→I (NS3中；活性に影響を与え、GTPアーゼ活性化タンパク質に対する応答性を損なう；活性化状態のレベルの増大をもたらす内因性及びグアニンスクレオチド交換因子触媒スクレオチド交換の両方の強い増大を特徴とする)。
FT				
FT	VARIANT	2 2	2 2	/FTId=VAR_026109。 Q→E (CFC症候群中；GTPアーゼ活性化タンパク質刺激GTP加水分解の障害とともに、内因性及びグアニンスクレオチド交換因子触媒スクレオチド交換の強い増大を示すが、エフェクターとの相互作用では機能的である)。
FT				
FT				
FT				
FT				
FT				
FT				

10

20

30

40





## 説明

転写産物変異体：この変異体（１）はより長いアイソフォーム（１）をコードする。変異体１及び３は同じタンパク質をコードする。

配列番号２６：H R A S、アイソフォーム１、転写産物変異体（１）のヌクレオチド配列（５７０nt）

配列番号２７：H R A S、アイソフォーム１、転写産物変異体（１）のアミノ酸配列（１８９aa）

【０２７８】

３．３ NM\_\_176795.3 NP\_\_789765.1 GTPアーゼH R a s アイソフォーム２：

10

## 説明

転写産物変異体：この変異体（２）は３' UTRが異なり、変異体１と比較してその３' コーディング領域に別のエクソンを含む。得られるアイソフォーム（２）は異なるＣ末端を含有し、アイソフォーム１よりも短い。

配列番号２８：H R A S、アイソフォーム２、転写産物変異体（２）のヌクレオチド配列（５１３nt）

配列番号２９：H R A S、アイソフォーム２、転写産物変異体（２）のアミノ酸配列（１７０aa）

【０２７９】

H R A S 配列注釈

この配列注釈では、H R A S の共通突然変異は「変異体」という用語によって示される。

【０２８０】

20

【表 8】

FT	CHAIN	1	186	GTPアーゼHRas。
FT				/FTId=PRO_0000042996。
FT	INIT_MET	1		除去；交互。
FT	CHAIN	2	186	GTPアーゼHRas, N末端プロセシング。
FT				/FTId=PRO_0000326476。
FT	PROPEP	187	189	成熟形態で除去される。
FT				/FTId=PRO_0000042997。
FT	NP_BIND	10	17	GTP。
FT	NP_BIND	57	61	GTP。
FT	NP_BIND	116	119	GTP。
FT	REGION	166	185	超可変領域。
FT	MOTIF	32	40	エフェクター領域。
FT	MOD_RES	1	1	N-アセチルメチオニン；GTPアーゼHRas中；
FT				交互。
FT	MOD_RES	2	2	N-アセチルトレオニン；GTPアーゼHRas中, N末端プロセシング。
FT				
FT	MOD_RES	118	118	S-ニトロソシステイン。
FT	MOD_RES	186	186	システインメチルエステル。
FT	LIPID	181	181	S-パルミトイルシステイン。
FT	LIPID	184	184	S- (15-デオキシ-Δ12, 14-プロスタグランジンJ2-9-イル) システイン；交互。
FT				
FT	LIPID	184	184	S-パルミトイルシステイン；交互
FT	LIPID	186	186	S-アラルネシルシステイン。
FT	VAR_SEQ	152	189	VEDAFYTLVREIRQHKLRKLNPPDESGPGCMSCKCVLS→
FT				SRSGSSSSGTLWDPPGPM (アイソフォーム2中)。
FT				/FTId=VSP_041597。
FT	VARIANT	12	12	G→A (FCSS中)。
FT				/FTId=VAR_026106。
FT	VARIANT	12	12	G→C (FCSS中)。
FT				/FTId=VAR_045975。
FT	VARIANT	12	12	G→E (FCSS中)。
FT				/FTId=VAR_045976。
FT	VARIANT	12	12	G→S (FCSS、OSCC及びCMEMS中)。
FT				/FTId=VAR_006837。
FT	VARIANT	12	12	G→V (FCSS、膀胱癌及びCMEMS中；構成的活性化；PLCE1と相互作用し、細胞膜に動員する；F
FT				-32と結合した場合にPLCE1との相互作用及び細胞膜への動員の喪失；G-26、F-32及びS-35
FT				と結合した場合にPLCE1との相互作用の喪失；A-29、G-34、G-37、N-38及びC-39と結
FT				合した場合にPLCE1との相互作用に対する影響なし；アイソフォーム2の細胞内部位に対する影響なし)

10

20

30

40





14  
25  
31  
46  
57  
63  
74  
83  
86  
104  
107  
116  
122  
136  
144  
148  
164

12  
16  
27  
38  
49  
60  
66  
76  
84  
87  
105  
111  
120  
127  
141  
146  
152

STRAND  
HELIX  
STRAND  
STRAND  
STRAND  
STRAND  
HELIX  
STRAND  
TURN  
HELIX  
STRAND  
STRAND  
STRAND  
HELIX  
STRAND  
TURN  
HELIX

FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT  
FT

10

20

【0281】

N R A S に関する配列

3 . 4 N M \_ 0 0 2 5 2 4 . 4 N P \_ 0 0 2 5 1 5 . 1 G T P アーゼ N R a s :

配列番号 3 0 : N R A S のヌクレオチド配列 ( 5 7 0 n t )

配列番号 3 1 : N R A S のアミノ酸配列 ( 1 8 9 a a )

【0282】

N R A S 配列注釈

この配列注釈では、N R A S の共通突然変異は「変異体」という用語によって示される。

【0283】

【表 9】

FT	CHAIN	1	186	GTPア-ゼNR <sup>a</sup> 。
FT				/FTId=PRO_0000043006。
FT	PROPEP	187	189	成熟形態で除去される (類似性による)。
FT				/FTId=PRO_0000043007。
FT	NP_BIND	10	17	GTP。
FT	NP_BIND	57	61	GTP。
FT	NP_BIND	116	119	GTP。
FT	REGION	166	185	超可変領域。
FT	MOTIF	32	40	エフエクター領域。
FT	MOD_RES	2	2	ホスホトレオニン。
FT	MOD_RES	4	4	ホスホチロシン。
FT	MOD_RES	186	186	システインメチルエステル (類似性による)。
FT	LIPID	181	181	S-パルミトイルシステイン。
FT	LIPID	186	186	S-アラニルシスチン。
FT	VARIANT	12	12	G→C (白血病中)。
FT				/FTId=VAR_021194。
FT	VARIANT	13	13	G→D (ALPS4中)。
FT				/FTId=VAR_063084。
FT	VARIANT	13	13	G→R (結腸直腸癌中)。
FT				/FTId=VAR_006845。
FT	VARIANT	50	50	T→I (NS6中; ハイパーモルフ突然変異)。
FT				/FTId=VAR_063085。
FT	VARIANT	60	60	G→E (NS6中; ハイパーモルフ突然変異)。
FT				/FTId=VAR_063086。
FT	VARIANT	61	61	Q→K (神経芽細胞腫細胞中)。
FT				/FTId=VAR_006846。
FT	VARIANT	61	61	Q→R (肺癌細胞及び
FT				黒色腫中; dbSNP: rs11554290)。
FT				/FTId=VAR_006847。
FT				R→A: GTP結合活性の喪失。
FT	MUTAGEN	164	164	
FT	STRAND	2	9	
FT	HELIX	16	25	
FT	STRAND	38	46	
FT	STRAND	49	57	
FT	STRAND	76	83	
FT	HELIX	87	104	
FT	STRAND	111	116	
FT	HELIX	127	137	
FT	STRAND	141	143	

10

20

30

148  
166

146  
152

TURN  
HELIX

FT  
FT

10

【0284】

20

4. ALKに関する配列

4.1 NM\_004304.4 NP\_004295.2 ALKチロシンキナーゼ受容体前駆体:

配列番号32: \_ALKチロシンキナーゼ受容体前駆体のヌクレオチド配列(4863 nt)

配列番号33: ALKチロシンキナーゼ受容体前駆体のアミノ酸配列(1620 aa)

【0285】

ALKの異常

【0286】

【表10】

30

CC -!- DISEASE: 注記=ALKに関する染色体異常は非ホジキンリンパ腫の形態で見られる。NPM1による転座t(2;5)(p23;q35)。得られるキメラNPM1-ALKタンパク質はホモ二量体化し、キナーゼは構成的に活性となる。構成的活性融合タンパク質は非ホジキンリンパ腫の5%~10%を占める。

CC -!- DISEASE: 注記=ALKに関する染色体異常は炎症性筋線維芽細胞性腫瘍(IMT)を伴う。CARSによる転座t(2;11)(p23;p15); SEC31Aによる転座t(2;4)(p23;q21)。

CC -!- DISEASE: 注記=ALKに関する染色体異常は未分化大細胞リンパ腫(ALCL)を伴う。AL017による転座t(2;17)(p23;q25)。

40

CC -!- DISEASE: ALKの欠陥はタイプ3神経芽細胞腫(NBLST3)への感受性の原因となる[MIM:613014]。神経芽細胞腫は、未分化神経堤を形成し、副腎髄質及び交感神経系を生じる胚細胞から生じる幼児期早期によく見られる新生物である。

CC -!- DISEASE: 注記=ALKシグナル伝達経路は、成人の最も一般的な悪性脳腫瘍であり、最も致死的な癌の1つである膠芽腫において重要な役割を果たす。ALKシグナル伝達経路は膠芽腫の移動及び成長の両方を調節する。

【0287】

ALK配列注釈

50

この配列注釈では、A L Kの共通突然変異は「変異体」という用語によって示される。  
【 0 2 8 8 】

【表 1 1】

FT	SIGNAL	1	1 8	潜在的。	
FT	CHAIN	1 9	1 6 2 0	ALKチロシンキナーゼ受容体。 /FTId=PRO_0000016740。	
FT	TOPO_DOM	1 9	1 0 3 8	細胞外 (潜在的)。	
FT	TRANSMEM	1 0 3 9	1 0 5 9	ヘリックス; (潜在的)。	
FT	TOPO_DOM	1 0 6 0	1 6 2 0	細胞質 (潜在的)。	
FT	DOMAIN	2 6 4	4 2 7	MAM1。	
FT	DOMAIN	4 3 7	4 7 3	LDL-受容体クラスA。	
FT	DOMAIN	4 7 8	6 3 6	MAM2。	
FT	DOMAIN	1 1 1 6	1 3 9 2	タンパク質キナーゼ。	10
FT	NP_BIND	1 1 9 7	1 1 9 9	ATP。	
FT	REGION	1 1 9 7	1 1 9 9	阻害剤結合。	
FT	COMPBIAS	8 1 6	9 4 0	Glyリッチ。	
FT	ACT_SITE	1 2 4 9	1 2 4 9	プロトンアクセプタ (類似性による)。	
FT	BINDING	1 1 2 4	1 1 2 4	ATP;カルボニル酸素による。	
FT	BINDING	1 1 5 0	1 1 5 0	ATP (類似性による)。	
FT	BINDING	1 1 5 0	1 1 5 0	阻害剤。	
FT	BINDING	1 1 9 9	1 1 9 9	阻害剤;アミド窒素による。	
FT	BINDING	1 2 0 3	1 2 0 3	阻害剤。	
FT	BINDING	1 2 1 0	1 2 1 0	阻害剤。	
FT	BINDING	1 2 7 0	1 2 7 0	ATP。	
FT	MOD_RES	2 1 1	2 1 1	ホスホセリン。	20
FT	MOD_RES	1 0 7 8	1 0 7 8	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 0 9 2	1 0 9 2	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 0 9 6	1 0 9 6	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 1 3 1	1 1 3 1	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 2 7 8	1 2 7 8	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 2 8 2	1 2 8 2	ホスホチロシン;自己触媒。	
FT	MOD_RES	1 2 8 3	1 2 8 3	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 3 5 9	1 3 5 9	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 5 0 7	1 5 0 7	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 5 8 4	1 5 8 4	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1 6 0 4	1 6 0 4	ホスホチロシン。	
FT	CARBOHYD	1 6 9	1 6 9	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	30
FT	CARBOHYD	2 4 4	2 4 4	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	2 8 5	2 8 5	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	3 2 4	3 2 4	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	4 1 1	4 1 1	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	4 2 4	4 2 4	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	4 4 5	4 4 5	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	5 6 3	5 6 3	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	40
FT	CARBOHYD	5 7 1	5 7 1	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	6 2 7	6 2 7	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	7 0 9	7 0 9	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	8 0 8	8 0 8	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	8 6 3	8 6 3	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	

FT	CARBOHYD	864	864	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	886	886	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	986	986	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	VARIANT	90	90	S→L (dbSNP中: rs34617074)。	
FT				/FTId=VAR__041477。	
FT	VARIANT	163	163	V→L (dbSNP中: rs55697431)。	
FT				/FTId=VAR__041478。	10
FT	VARIANT	296	296	E→Q (dbSNP中: rs56077855)。	
FT				/FTId=VAR__041479。	
FT	VARIANT	476	476	V→A (dbSNP中: rs35093491)。	
FT				/FTId=VAR__041480。	
FT	VARIANT	560	560	L→F (多形性乳小葉癌サンプル中; 体細胞突然変異)。	
FT				/FTId=VAR__041481。	
FT	VARIANT	680	680	T→I (dbSNP中: rs35228363)。	
FT				/FTId=VAR__041482。	
FT	VARIANT	704	704	A→T (dbSNP中: rs34829159)。	20
FT				/FTId=VAR__041483。	
FT	VARIANT	868	868	L→Q (dbSNP中: rs55941323)。	
FT				/FTId=VAR__061288。	
FT	VARIANT	877	877	A→S (漿液性卵巣癌サンプル中; 体細胞突然変異)。	
FT				/FTId=VAR__041484。	
FT	VARIANT	1012	1012	T→M (dbSNP中: rs35073634)。	
FT				/FTId=VAR__041485。	
FT	VARIANT	1091	1091	D→N (NBLS T3中; 体細胞突然変異)。	30
FT				/FTId=VAR__063850。	
FT	VARIANT	1121	1121	G→D (dbSNP中: rs55760835)。	
FT				/FTId=VAR__041486。	
FT	VARIANT	1128	1128	G→A (NBLS T3中)。	
FT				/FTId=VAR__063851。	
FT	VARIANT	1151	1151	T→M (NBLS T3中)。	
FT				/FTId=VAR__063852。	
FT	VARIANT	1166	1166	M→R (NBLS T3中; 体細胞突然変異)。	
FT				/FTId=VAR__063853。	
FT	VARIANT	1171	1171	I→N (NBLS T3中; 体細胞突然変異)。	40
FT				/FTId=VAR__063854。	
FT	VARIANT	1174	1174	F→C (NBLS T3中)。	
FT				/FTId=VAR__063855。	
FT	VARIANT	1174	1174	F→I (NBLS T3中; 体細胞突然変異)。	
FT				/FTId=VAR__063856。	
FT	VARIANT	1174	1174	F→L (NBLS T3中; 体細胞突然変異)。	
FT				/FTId=VAR__063857。	
FT	VARIANT	1174	1174	F→V (NBLS T3中; 体細胞突然変異)。	

FT				異)。	
FT	VAR I A N T	1 1 9 2	1 1 9 2	/FT I d = V A R__0 6 3 8 5 8。	
FT				R→P (N B L S T 3 中)。	
FT	VAR I A N T	1 2 3 4	1 2 3 4	/FT I d = V A R__0 6 3 8 5 9。	
FT				A→T (N B L S T 3 中; 体細胞突然変異)。	
FT	VAR I A N T	1 2 4 5	1 2 4 5	/FT I d = V A R__0 6 3 8 6 0。	
FT				F→C (N B L S T 3 中; 体細胞突然変異)。	
FT	VAR I A N T	1 2 4 5	1 2 4 5	/FT I d = V A R__0 6 3 8 6 1。	
FT				F→V (N B L S T 3 中; 体細胞突然変異)。	10
FT	VAR I A N T	1 2 5 0	1 2 5 0	/FT I d = V A R__0 6 3 8 6 2。	
FT				I→T (N B L S T 3 中; 体細胞突然変異)。	
FT	VAR I A N T	1 2 7 4	1 2 7 4	/FT I d = V A R__0 6 3 8 6 3。	
FT				A→T (d b S N P 中: r s 4 5 5 0 2 2 9 2)。	
FT	VAR I A N T	1 2 7 5	1 2 7 5	/FT I d = V A R__0 4 1 4 8 7。	
FT				R→L (神経芽細胞腫で観察される)。	
FT	VAR I A N T	1 2 7 5	1 2 7 5	/FT I d = V A R__0 6 3 8 6 4。	
FT				R→Q (N B L S T 3 中)。	
FT	VAR I A N T	1 2 7 8	1 2 7 8	/FT I d = V A R__0 6 3 8 6 5。	
FT				Y→S (N B L S T 3 中; 体細胞突然変異)。	20
FT	VAR I A N T	1 3 2 8	1 3 2 8	/FT I d = V A R__0 6 3 8 6 6。	
FT				M→L (d b S N P 中: r s 5 6 1 6 0 4 9 1)。	
FT	VAR I A N T	1 3 7 6	1 3 7 6	/FT I d = V A R__0 4 1 4 8 8。	
FT				F→S (d b S N P 中: r s 1 7 6 9 4 7 2 0)。	
FT	VAR I A N T	1 4 1 6	1 4 1 6	/FT I d = V A R__0 5 5 9 8 7。	
FT				K→N (d b S N P 中: r s 5 5 7 8 2 1 8 9)。	
FT	VAR I A N T	1 4 1 9	1 4 1 9	/FT I d = V A R__0 4 1 4 8 9。	
FT				E→K (d b S N P 中: r s 5 6 1 8 1 5 4 2)。	30
FT	VAR I A N T	1 4 2 9	1 4 2 9	/FT I d = V A R__0 4 1 4 9 0。	
FT				Q→R (d b S N P 中: r s 5 5 9 0 6 2 0 1)。	
FT	VAR I A N T	1 4 6 1	1 4 6 1	/FT I d = V A R__0 4 1 4 9 1。	
FT				I→V (d b S N P 中: r s 1 6 7 0 2 8 3)。	
FT	VAR I A N T	1 4 9 1	1 4 9 1	/FT I d = V A R__0 3 1 0 4 2。	
FT				K→R (d b S N P 中: r s 1 8 8 1 4 2 0)。	
FT	VAR I A N T	1 5 2 9	1 5 2 9	/FT I d = V A R__0 3 1 0 4 3。	
FT				D→E (d b S N P 中: r s 1 8 8 1 4 2 1)。	
FT	VAR I A N T	1 5 9 9	1 5 9 9	/FT I d = V A R__0 3 1 0 4 4。	
FT				P→H (d b S N P 中: r s 1 8 8 1 4 2 3)。	40
FT	M U T A G E N	1 5 0 7	1 5 0 7	/FT I d = V A R__0 5 5 9 8 8。	
FT				Y→F: S H C 1 との相互作用を損なう。	
FT	C O N F L I C T	3 6	3 6	P→S (参照 1 中; A A B 7 1 6 1 9)。	
FT	H E L I X	1 0 8 7	1 0 9 2		
FT	S T R A N D	1 0 9 6	1 0 9 8		
FT	S T R A N D	1 1 0 1	1 1 0 3		
FT	H E L I X	1 1 0 5	1 1 0 7		

FT	HELIX	1 1 1 3	1 1 1 5
FT	STRAND	1 1 1 7	1 1 2 1
FT	STRAND	1 1 2 6	1 1 2 8
FT	STRAND	1 1 3 0	1 1 3 4
FT	STRAND	1 1 3 7	1 1 4 0
FT	STRAND	1 1 4 6	1 1 5 1
FT	HELIX	1 1 5 8	1 1 7 3
FT	STRAND	1 1 8 2	1 1 8 6
FT	STRAND	1 1 8 8	1 1 9 1
FT	STRAND	1 1 9 3	1 1 9 7
FT	HELIX	1 2 0 4	1 2 1 0
FT	STRAND	1 2 1 5	1 2 1 7
FT	HELIX	1 2 2 3	1 2 4 2
FT	HELIX	1 2 5 2	1 2 5 4
FT	STRAND	1 2 5 5	1 2 5 8
FT	STRAND	1 2 6 0	1 2 6 3
FT	STRAND	1 2 6 6	1 2 6 8
FT	HELIX	1 2 7 2	1 2 7 8
FT	STRAND	1 2 8 0	1 2 8 2
FT	HELIX	1 2 8 8	1 2 9 0
FT	HELIX	1 2 9 3	1 2 9 5
FT	HELIX	1 2 9 8	1 3 0 3
FT	HELIX	1 3 0 8	1 3 2 3
FT	HELIX	1 3 3 5	1 3 4 3
FT	HELIX	1 3 5 6	1 3 6 5
FT	HELIX	1 3 7 0	1 3 7 2
FT	HELIX	1 3 7 6	1 3 8 8
FT	HELIX	1 3 9 0	1 3 9 3
FT	STRAND	1 5 7 4	1 5 7 6
FT	STRAND	1 5 8 2	1 5 8 4

10

20

30

40

50

## 【 0 2 8 9 】

配列番号 34 : EML4 - ALK のヌクレオチド配列

> ENA | EU 2 3 6 9 4 8 | EU 2 3 6 9 4 8 . 1 ホモサピエンス EML4 / ALK  
 融合タンパク質変異体 3 ( EML4 / ALK 融合 ) mRNA、完全な cds . : 位置 : 1  
 . . 2 3 9 1

配列番号 35 : EML4 - ALK のアミノ酸配列

配列番号 36 : EML4 - ALK 変異体 6 のヌクレオチド配列

> ENA | AB 4 6 2 4 1 1 | AB 4 6 2 4 1 1 . 1 融合タンパク質 EML4 - ALK  
 変異体 6 のホモサピエンス EML4 - ALK 変異体 6 mRNA、完全な cds . : 位置  
 : 1 . . 3 3 6 5

配列番号 37 : EML4 - ALK 変異体 6 のアミノ酸配列

配列番号 38 : EML4 - ALK 変異体 7 のヌクレオチド配列

> ENA | AB 4 6 2 4 1 2 | AB 4 6 2 4 1 2 . 1 融合タンパク質 EML4 - ALK  
 変異体 7 のホモサピエンス EML4 - ALK 変異体 7 mRNA、完全な cds . : 位置  
 : 1 . . 3 4 3 5

配列番号 39 : EML4 - ALK 変異体 7 のアミノ酸配列

配列番号 40 : EML4 - ALK 融合タンパク質変異体 8a のヌクレオチド配列

> ENA | GU 7 9 7 8 9 4 | GU 7 9 7 8 9 4 . 1 ホモサピエンス EML4 - ALK  
 融合タンパク質変異体 8a mRNA、部分的な cds . : 位置 : 1 . . 1 7 1

配列番号 41 : EML4 - ALK 融合タンパク質変異体 8a のアミノ酸配列

配列番号 42 : EML4 - ALK 融合タンパク質変異体 8b

> ENA | GU 7 9 7 8 9 5 | GU 7 9 7 8 9 5 . 1 ホモサピエンス EML4 - ALK  
 融合タンパク質変異体 8b mRNA、部分的な cds . : 位置 : 1 . . 2 3 6

配列番号 43 : EML4 - ALK 融合タンパク質変異体 8b のアミノ酸配列

## 【 0 2 9 0 】

## 5. MET (c-Metとしても知られる)に関する配列

5.1 NM\_000245.2 NP\_000236.2 肝細胞成長因子受容体アイソフォーム b 前駆体:

## 説明

転写産物変異体: この変異体(2)は、変異体1と比較してエクソンの最後に別のインフレームスプライス部位を用いる。得られるアイソフォーム(b)は同じN末端及びC末端を有するが、アイソフォームaと比較して短い。

配列番号44: MET、肝細胞成長因子受容体アイソフォーム b 前駆体、転写産物変異体(2)のヌクレオチド配列(4173nt)

配列番号45: MET、肝細胞成長因子受容体アイソフォーム b 前駆体、転写産物変異体(2)のアミノ酸配列(1390aa)

【0291】

5.2 NM\_001127500.1 NP\_001120972.1 肝細胞成長因子受容体アイソフォーム a 前駆体:

## 説明

転写産物変異体: この変異体(1)はより長い転写産物を表し、より長いアイソフォーム(a)をコードする。

配列番号46: MET、肝細胞成長因子受容体アイソフォーム a 前駆体、転写産物変異体(1)のヌクレオチド配列(4227nt)

配列番号47: MET、肝細胞成長因子受容体アイソフォーム a 前駆体、転写産物変異体(1)のアミノ酸配列(1408aa)

【0292】

METの異常

【0293】

10

20

## 【表 1 2】

CC	- ! -	D I S E A S E : 注記 = T P R 遺伝子による再構成後の M E T の活性化	
CC		は発癌タンパク質を生じる。	
CC	- ! -	D I S E A S E : 注記 = M E T の欠陥は胃癌を伴い得る。	
CC			
CC	- ! -	D I S E A S E : M E T の欠陥は肝細胞癌 ( H C C ) の原因となる [ M	
CC		I M : 1 1 4 5 5 0 ] 。	
CC	- ! -	D I S E A S E : M E T の欠陥は乳頭状腎細胞癌 ( R C C P ) の原因と	
CC		なる [ M I M : 6 0 5 0 7 4 ] 。	
CC		乳頭状腎細胞癌は、結合組織の多数の	
CC		不規則な指状突起によって形成される管乳頭状構造を示す傾向がある腎	
CC		細胞癌のサブタイプである。腎細胞癌は、腎近位尿管上皮の細胞に由	
CC		来する散発性又は遺伝性癌の混成群である。腎細胞癌は一般的な腎細胞	10
CC		癌 ( 明細胞非乳頭型癌 ) 、乳頭状腎細胞癌、嫌色素細胞性腎細胞癌、腎	
CC		臓の髓様癌を伴う集合管癌及び分類不能腎細胞癌に亜分類される。	
CC			
CC			
CC	- ! -	D I S E A S E : 注記 = M E T のプロモーター領域の共通対立遺伝子は	
CC		、一部の家族において自閉症に対する感受性との遺伝的関連を示す。機	
CC		能アッセイにより、M E T プロモーター活性の低減及び特異的転写因子	
CC		複合体の結合の変化が示される。	
CC			
CC	- ! -	D I S E A S E : 注記 = M E T 活性化突然変異は、原発不明癌 ( C U P	
CC		) 又は原発不明悪性腫瘍として知られる極めて悪性の転移性症候群の発	20
CC		生を伴い得る。全身性新生物散布は概して癌進行の後期の事象である。	
CC		しかしながら、場合によっては遠隔播種がごく初期に生じ、それにより	
CC		転移が原発巣の前に臨床的関連に達する。悪性腫瘍診断の進歩にも関わ	
CC		らず原発巣を特定することができない場合がある。	
CC			
CC			
CC			

## 【 0 2 9 4 】

## M E T 配列注釈

この配列注釈では、M E T の共通突然変異は「変異体」という用語によって示される。 30

## 【 0 2 9 5 】

【表 1 3】

FT	SIGNAL	1	24	潜在的。	
FT	CHAIN	25	1390	肝細胞成長因子受容体。	
FT				／FTI d = PRO_0000024440。	
FT	TOPO_DOM	25	932	細胞外 (潜在的)。	
FT	TRANSMEM	933	955	ヘリックス; (潜在的)。	
FT	TOPO_DOM	956	1390	細胞質 (潜在的)。	
FT	DOMAIN	27	515	Sema。	
FT	DOMAIN	563	655	IPT/TIG1。	
FT	DOMAIN	657	739	IPT/TIG2。	
FT	DOMAIN	742	836	IPT/TIG3。	
FT	DOMAIN	1078	1345	タンパク質キナーゼ。	10
FT	NP_BIND	1084	1092	ATP (類似性による)。	
FT	REGION	1212	1390	RANBP9との相互作用。	
FT	REGION	1320	1359	MUC20との相互作用。	
FT	ACT_SITE	1204	1204	プロトンアクセプタ (類似性による)。	
FT	BINDING	1110	1110	ATP。	
FT	SITE	307	308	切断 (潜在的)。	
FT	SITE	1009	1010	TPR-MET癌遺伝子を形成する転座の切断点	
FT					
FT	MOD_RES	966	966	ホスホセリン。	
FT	MOD_RES	977	977	ホスホトレオニン。	
FT	MOD_RES	988	988	ホスホセリン。	20
FT	MOD_RES	990	990	ホスホセリン。	
FT	MOD_RES	997	997	ホスホセリン。	
FT	MOD_RES	1000	1000	ホスホセリン。	
FT	MOD_RES	1003	1003	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1230	1230	ホスホチロシン。	
FT	MOD_RES	1234	1234	ホスホチロシン; 自己触媒。	
FT	MOD_RES	1235	1235	ホスホチロシン; 自己触媒。	
FT	MOD_RES	1289	1289	ホスホトレオニン。	
FT	MOD_RES	1349	1349	ホスホチロシン; 自己触媒。	
FT	MOD_RES	1356	1356	ホスホチロシン; 自己触媒。	
FT	MOD_RES	1365	1365	ホスホチロシン。	
FT	CARBOHYD	45	45	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	106	106	N結合型 (GlcNAc...)。	30
FT	CARBOHYD	149	149	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	202	202	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	399	399	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	405	405	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	607	607	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	635	635	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	785	785	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	879	879	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	CARBOHYD	930	930	N結合型 (GlcNAc...) (潜在的)。	
FT	DISULFID	95	101		
FT	DISULFID	98	160		
FT	DISULFID	133	141		
FT	DISULFID	172	175		40
FT	DISULFID	298	363		
FT	DISULFID	385	397		
FT	DISULFID	520	538		
FT	DISULFID	526	561		
FT	DISULFID	529	545		
FT	DISULFID	541	551		
FT	VAR_SEQ	755	764	SGGSTITGVG→RHVNIALIQR (アイソフォーム3中)。	
FT				／FTI d = VSP_042447。	
FT	VAR_SEQ	755	755	S→STWWKEPLNIVSFLFCFAS (アイソフォーム2中)。	

FT				／FT I d = V S P _ 0 0 5 0 0 5。	
FT	V A R _ S E Q	7 6 5	1 3 9 0	欠損 (アイソフォーム3中)。	
FT				／FT I d = V S P _ 0 4 2 4 4 8。	
FT	V A R I A N T	1 4 3	1 4 3	R→Q (d b S N P中: r s 3 5 4 6 9 5 8 2)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 4 1 7 3 8。	
FT	V A R I A N T	1 5 0	1 5 0	H→Y (原発不明癌の場合に見られる; 突然変異受容体は依然として機能的であり、形質転換表現型を維持することができる; 体細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 6 4 8 5 5。	
FT	V A R I A N T	1 5 6	1 5 6	S→L (d b S N P中: r s 5 6 3 1 1 0 8 1)。	10
FT				／FT I d = V A R _ 0 4 1 7 3 9。	
FT	V A R I A N T	1 6 8	1 6 8	E→D (原発不明癌の場合に見られる; 突然変異受容体は依然として機能的であり、形質転換表現型を維持することができる; 体細胞突然変異; d b S N P: r s 5 5 9 8 5 5 6 9)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 4 1 7 4 0。	
FT	V A R I A N T	2 3 8	2 3 8	L→S (d b S N P中: r s 3 4 3 4 9 5 1 7)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 7 8。	
FT	V A R I A N T	3 1 6	3 1 6	I→M (d b S N P中: r s 3 5 2 2 5 8 9 6)。	20
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 7 9。	
FT	V A R I A N T	3 2 0	3 2 0	A→V (d b S N P中: r s 3 5 7 7 6 1 1 0)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 8 5。	
FT	V A R I A N T	3 7 5	3 7 5	N→S (d b S N P中: r s 3 3 9 1 7 9 5 7)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 0。	
FT	V A R I A N T	3 8 5	3 8 5	C→Y (原発不明癌の場合に見られる; 突然変異受容体は依然として機能的であり、形質転換表現型を維持することができる; 体細胞突然変異)。	30
FT				／FT I d = V A R _ 0 6 4 8 5 6。	
FT	V A R I A N T	7 7 3	7 7 3	P→L (胃癌中)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 1。	
FT	V A R I A N T	9 7 0	9 7 0	R→C (d b S N P中: r s 3 4 5 8 9 4 7 6)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 2。	
FT	V A R I A N T	9 9 1	9 9 1	P→S (胃癌中; H G F / S Fに応答した持続的チロシンリン酸化; 無胸腺ヌードマウスにおける形質転換活性)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 3。	
FT	V A R I A N T	9 9 2	9 9 2	T→I (原発不明癌の場合に見られる; 突然変異受容体は依然として機能的であり、形質転換表現型を維持することができる; 体細胞突然変異; d b S N P: r s 5 6 3 9 1 0 0 7)。	40
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 4。	
FT	V A R I A N T	1 0 9 2	1 0 9 2	V→I (R C C P中; 構成的自己リン酸化)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 5。	
FT	V A R I A N T	1 0 9 4	1 0 9 4	H→L (R C C P中; 構成的自己リン酸化; 細胞株において悪性形質転換を引き起こす)。	
FT					

FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 6。	
FT	V A R I A N T	1 0 9 4	1 0 9 4	H → R (R C C P 中；細胞株において悪性形質転換を引き起こす)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 7。	
FT	V A R I A N T	1 0 9 4	1 0 9 4	H → Y (R C C P 中；構成的自己リン酸化；細胞株において悪性形質転換を引き起こす)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 8。	
FT	V A R I A N T	1 1 0 6	1 1 0 6	H → D (R C C P 中；構成的自己リン酸化；細胞株において悪性形質転換を引き起こす)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 8 9。	10
FT	V A R I A N T	1 1 3 1	1 1 3 1	M → T (R C C P 中；生殖細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 8 6。	
FT	V A R I A N T	1 1 7 3	1 1 7 3	T → I (i n H C C)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 9 0。	
FT	V A R I A N T	1 1 8 8	1 1 8 8	V → L (R C C P 中；生殖細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 8 7。	
FT	V A R I A N T	1 1 9 5	1 1 9 5	L → V (i n R C C P；体細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 8 8。	
FT	V A R I A N T	1 2 2 0	1 2 2 0	V → I (R C C P 中；生殖細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 8 9。	
FT	V A R I A N T	1 2 2 8	1 2 2 8	D → H (R C C P 中；体細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 9 1。	20
FT	V A R I A N T	1 2 2 8	1 2 2 8	D → N (R C C P 中；生殖細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 9 0。	
FT	V A R I A N T	1 2 3 0	1 2 3 0	Y → C (R C C P 中；生殖細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 9 2。	
FT	V A R I A N T	1 2 3 0	1 2 3 0	Y → D (R C C P 中；構成的自己リン酸化；細胞株において悪性形質転換を引き起こす)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 9 1。	
FT	V A R I A N T	1 2 3 0	1 2 3 0	Y → H (R C C P 中；体細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 9 3。	
FT	V A R I A N T	1 2 4 4	1 2 4 4	K → R (H C C 中)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 9 2。	
FT	V A R I A N T	1 2 5 0	1 2 5 0	M → I (H C C 中)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 3 2 4 9 3。	30
FT	V A R I A N T	1 2 5 0	1 2 5 0	M → T (R C C P 中；体細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 0 6 2 9 4。	
FT	V A R I A N T	1 2 9 4	1 2 9 4	V → I (原発不明癌の場合に見られる；突然変異受容体は依然として機能的であり、形質転換表現型を維持することができる；体細胞突然変異)。	
FT				／FT I d = V A R _ 0 6 4 8 5 7。	
FT	C O N F L I C T	2 3 7	2 3 7	V → A (文献3中；A C F 4 7 6 0 6)。	
FT	C O N F L I C T	5 0 8	5 0 8	K → R (文献3中；A C F 4 7 6 0 6)。	
FT	C O N F L I C T	7 2 0	7 2 0	F → S (文献3中；A C F 4 7 6 0 6)。	
FT	C O N F L I C T	1 1 9 1	1 1 9 1	G → A (文献1中；A A A 5 9 5 9 1)。	40
FT	C O N F L I C T	1 2 7 2	1 2 7 2	L → V (文献1中；A A A 5 9 5 9 1、文献2；C A B 5 6 7 9 3及び文献6；A A A 5 9 5 9 0)。	
FT					
FT	S T R A N D	4 5	4 7		
FT	S T R A N D	5 2	5 8		
FT	S T R A N D	6 1	6 6		
FT	S T R A N D	6 9	7 4		
FT	T U R N	7 5	7 7		
FT	S T R A N D	8 0	8 4		
FT	S T R A N D	8 9	9 1		
FT	S T R A N D	9 3	9 5		

FT	STRAND	9 7	9 9	
FT	STRAND	1 0 2	1 0 4	
FT	STRAND	1 1 1	1 1 3	
FT	STRAND	1 1 9	1 2 3	
FT	STRAND	1 2 5	1 3 3	
FT	STRAND	1 3 5	1 3 9	
FT	STRAND	1 4 1	1 4 5	
FT	STRAND	1 5 4	1 6 0	
FT	STRAND	1 8 2	1 8 9	
FT	STRAND	1 9 2	1 9 9	
FT	STRAND	2 1 3	2 1 9	
FT	HELIX	2 3 1	2 3 3	10
FT	HELIX	2 3 9	2 4 1	
FT	TURN	2 4 2	2 4 4	
FT	STRAND	2 4 7	2 5 5	
FT	STRAND	2 5 8	2 6 8	
FT	STRAND	2 7 2	2 7 4	
FT	STRAND	2 7 7	2 8 1	
FT	STRAND	2 8 4	2 8 6	
FT	STRAND	2 9 2	3 0 0	
FT	STRAND	3 1 2	3 1 4	
FT	STRAND	3 1 6	3 2 3	
FT	HELIX	3 2 7	3 3 3	
FT	STRAND	3 4 1	3 4 9	20
FT	STRAND	3 5 6	3 6 6	
FT	HELIX	3 6 7	3 7 4	
FT	HELIX	3 8 7	3 9 0	
FT	STRAND	3 9 2	3 9 4	
FT	TURN	3 9 5	3 9 8	
FT	STRAND	4 1 8	4 2 2	
FT	STRAND	4 2 4	4 2 7	
FT	TURN	4 2 9	4 3 6	
FT	STRAND	4 3 9	4 4 7	
FT	STRAND	4 5 0	4 5 7	
FT	STRAND	4 6 2	4 6 6	
FT	STRAND	4 6 9	4 7 1	
FT	STRAND	4 9 0	4 9 3	
FT	TURN	4 9 6	4 9 8	30
FT	STRAND	5 0 1	5 0 6	
FT	STRAND	5 0 9	5 1 4	
FT	HELIX	5 1 7	5 2 0	
FT	HELIX	5 2 6	5 3 1	
FT	HELIX	5 3 4	5 3 6	
FT	STRAND	5 3 8	5 4 0	
FT	STRAND	5 4 5	5 4 8	
FT	STRAND	5 5 2	5 5 4	
FT	STRAND	5 5 7	5 5 9	
FT	STRAND	5 6 4	5 7 2	
FT	STRAND	5 8 0	5 8 6	
FT	STRAND	5 9 0	5 9 2	40
FT	STRAND	5 9 5	5 9 8	
FT	STRAND	6 0 2	6 0 5	
FT	HELIX	6 1 4	6 1 6	
FT	STRAND	6 1 9	6 2 5	
FT	STRAND	6 3 7	6 4 1	
FT	STRAND	6 4 6	6 5 0	
FT	TURN	1 0 4 8	1 0 5 2	
FT	HELIX	1 0 5 5	1 0 5 7	
FT	HELIX	1 0 6 0	1 0 6 6	
FT	HELIX	1 0 6 7	1 0 6 9	
FT	HELIX	1 0 7 3	1 0 7 5	

FT	STRAND	1 0 7 6	1 0 8 7
FT	STRAND	1 0 9 0	1 0 9 7
FT	STRAND	1 1 0 0	1 1 0 2
FT	STRAND	1 1 0 5	1 1 1 2
FT	HELIX	1 1 1 8	1 1 3 2
FT	STRAND	1 1 4 4	1 1 4 6
FT	STRAND	1 1 4 9	1 1 5 1
FT	STRAND	1 1 5 4	1 1 5 8
FT	HELIX	1 1 6 5	1 1 7 0
FT	TURN	1 1 7 2	1 1 7 4
FT	HELIX	1 1 7 8	1 1 9 7
FT	HELIX	1 2 0 7	1 2 0 9
FT	STRAND	1 2 1 0	1 2 1 2
FT	STRAND	1 2 1 8	1 2 2 0
FT	HELIX	1 2 2 4	1 2 2 6
FT	HELIX	1 2 3 2	1 2 3 4
FT	HELIX	1 2 3 7	1 2 3 9
FT	STRAND	1 2 4 1	1 2 4 5
FT	HELIX	1 2 4 7	1 2 4 9
FT	HELIX	1 2 5 2	1 2 5 7
FT	HELIX	1 2 6 2	1 2 7 7
FT	STRAND	1 2 8 5	1 2 8 7
FT	TURN	1 2 8 9	1 2 9 1
FT	HELIX	1 2 9 2	1 2 9 7
FT	HELIX	1 3 1 0	1 3 1 9
FT	HELIX	1 3 2 4	1 3 2 6
FT	HELIX	1 3 3 0	1 3 4 2
FT	TURN	1 3 5 4	1 3 5 8

10

20

## 【 0 2 9 6 】

配列番号 48 : 抗 MTH1 siRNA

C G A C G A C A G C U A C U G G U U U

配列番号 49 : p21の検出のためのqPCR - オリゴヌクレオチド

5' - C T G T G A T G C G C T A A T G G C G - 3'

配列番号 50 : p21の検出のためのpPCR - オリゴヌクレオチド

5' - A A G T C G A A G T T C C A T C G C T C A - 3'

30

## 【 0 2 9 7 】

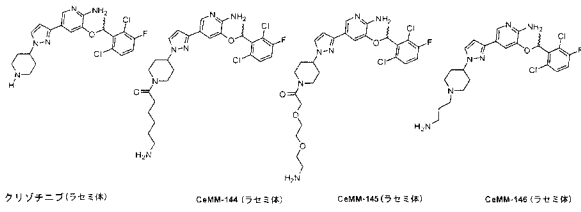
## 【表 1 4】

参考文献：

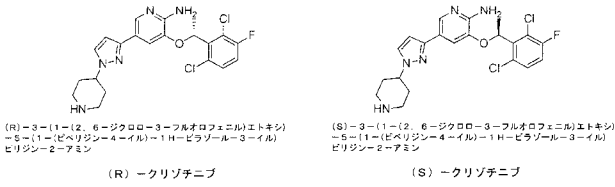
1. Rix, *Eur. J. Clin. Invest.* 2009, 39 (12), 1098-1109.
2. Knight, *Nat Rev Cancer* 2010, 10 (2), 130-137.
3. Zou, *Cancer Res.* 2007, 67 (9), 4408-4417.
4. Grande, *Mol. Cancer Ther.* 2011, 10 (4), 569-579. 10
5. Soda, *Nature* 2007, 448 (7153), 561-566.
6. Hallberg, *F1000 Med Rep* 2011, 3, 21.
7. Butrynski, *New Engl. J. Med.* 2011, 364 (8), 775-776.
8. Superti-Furga, *Royal Society of Chemistry: Cambridge*, 2012; p 256.
9. Cui, *J. Med. Chem.* 2011, 54 (18), 6342-6363.
10. Remsing Rix, *Leukemia* 2008, 23 (3), 477-485. 20
11. Nakabeppu, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2010, 703 (1), 51-58.
12. Rai, *Oncogene* 2011, 30 (12), 1489-1496.
13. Rai, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2010, 703 (1), 71-81.
14. Tsuzuki, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, 98 (20), 11456-11461. 30
15. Svensson, *FEBS Lett.* 2011, 585 (16), 2617-2621.
16. Galkin, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, 104 (1), 270-275.
17. Le Page, *Cancer Res.* 2000, 60 (19), 5548-5552.
18. Alli, *Cancer Res.* 2009, 69 (8), 3589-3596.
19. Rai, *Proteomics* 2003, 3 (8), 1454-1463. 40
21. Bennett, *Journal of Proteomics* 2011, 74 (2), 151-166.
22. Breitwieser, *Journal of Proteome Research* 2011, 10 (6), 2758-2766.
23. Christensen, *Mol Cancer Ther.* 2007, 6(12 Pt 1), 3314-3322.
24. Nagai, *Cancer Res* 2005; 65: 7276-7282.

25. Jänne, Clin Cancer Res 2006; 12: 751-758.
26. Nomoto, Am J Clin Pathol 2006; 126: 608-615.
27. Pao, PLoS Med 2005; 2 (3): e73.
28. Eberhard, J Clin Oncol 2008; 26 (6): 983-993.
29. Speicher, Nat Rev Genet 2005, 6 (10), 782-792.
30. Koivunen, 31. Lin, Mol. Cancer Res. 2009, 7 (9), 1466-1476. 10
32. Chen, Nature 2008, 455 (7215), 971-974.
33. Keohavong, Clin. Cancer. Res. 1996, 2 (2), 411-418.
34. Gerry, J. Mol. Biol. 1999, 292 (2), 251-262.
35. Kubo, Int. J. Cancer 2009, 124 (8), 1778-1784.
36. Kennedy, FEBS Lett. 1998, 429 (1), 17-20. 20
37. Cho, RNA Biology 2011, 8 (1), 125-131.
38. de Koning, Organic Process Research & Development 2011, 15 (5), 1018-1026.
39. Saha, Journal of Biological Chemistry 2010, 285 (25), 19092-19105.
40. World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization; 2008.
41. Jemal, CA Cancer J Clin. 2011, 61(2):69-90. 30

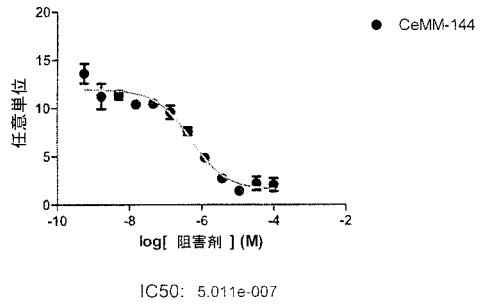
【 図 2 】



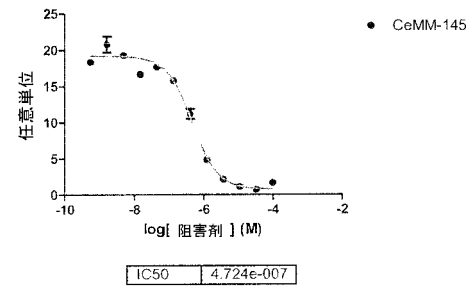
【 図 3 】



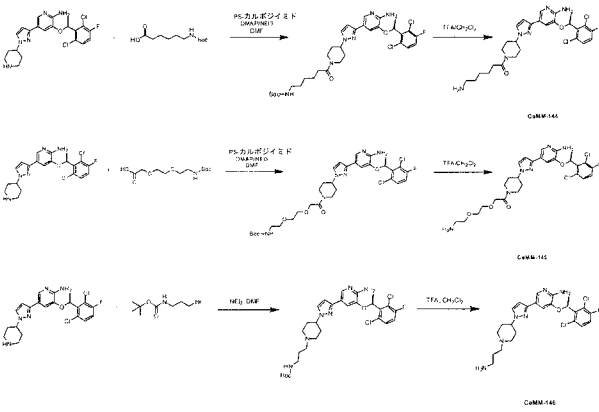
【 図 8 】



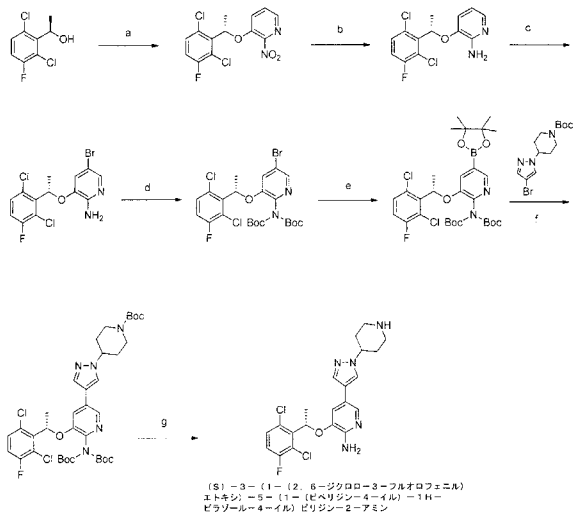
【 図 9 】



【 図 1 3 】

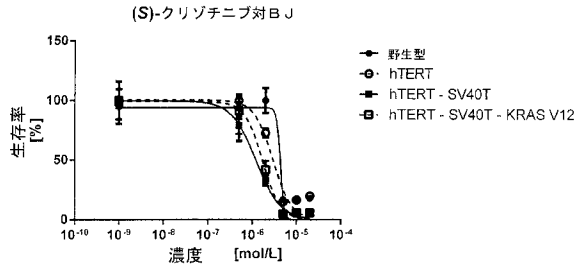


【 図 1 4 】

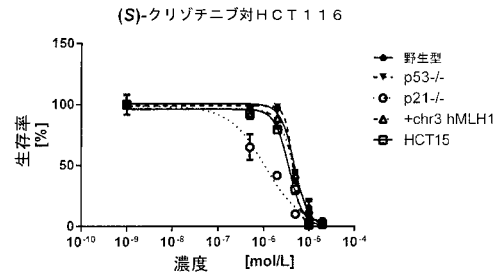




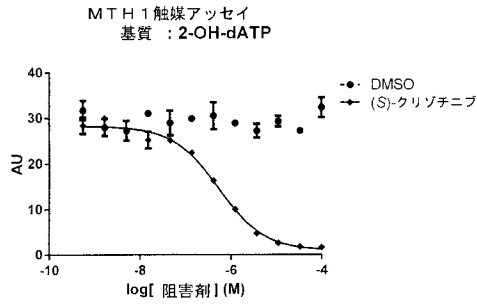
【 図 2 8 】



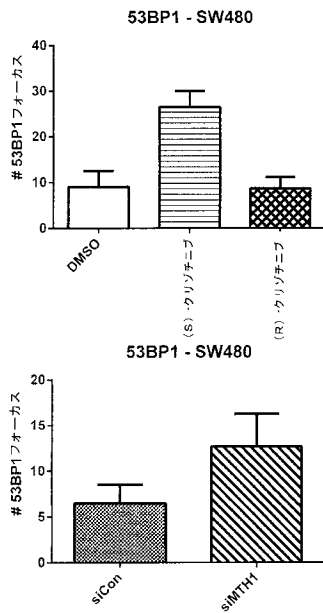
【 図 3 0 】



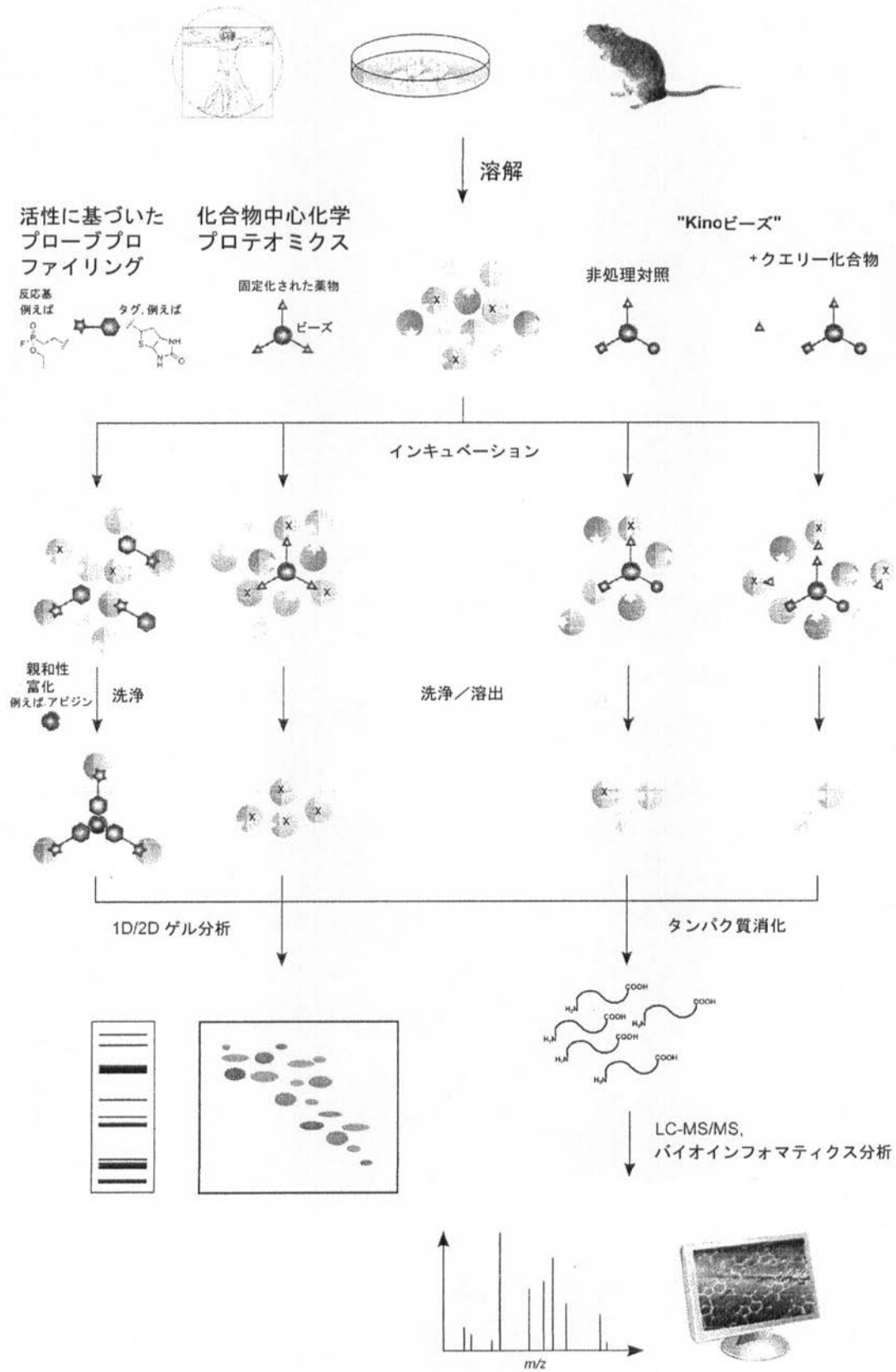
【 図 2 9 】



【 図 3 1 B 】

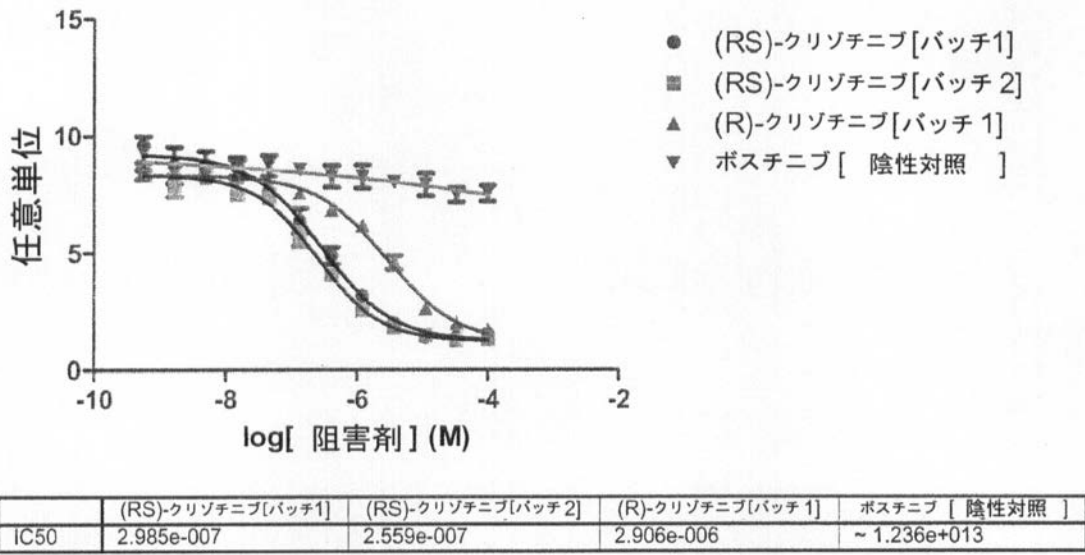


【 図 1 】

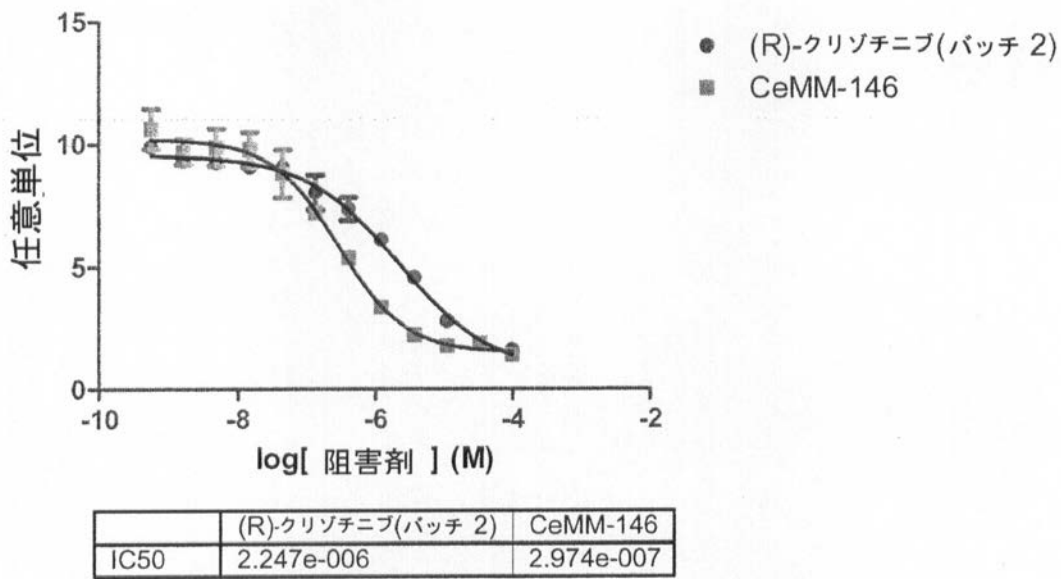




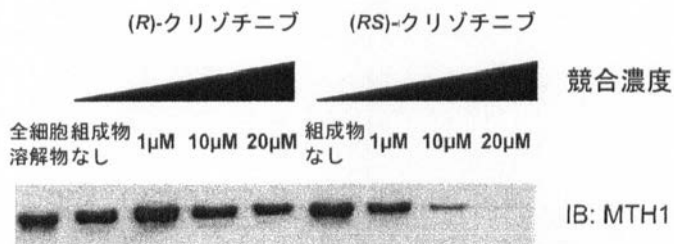
【 図 6 】



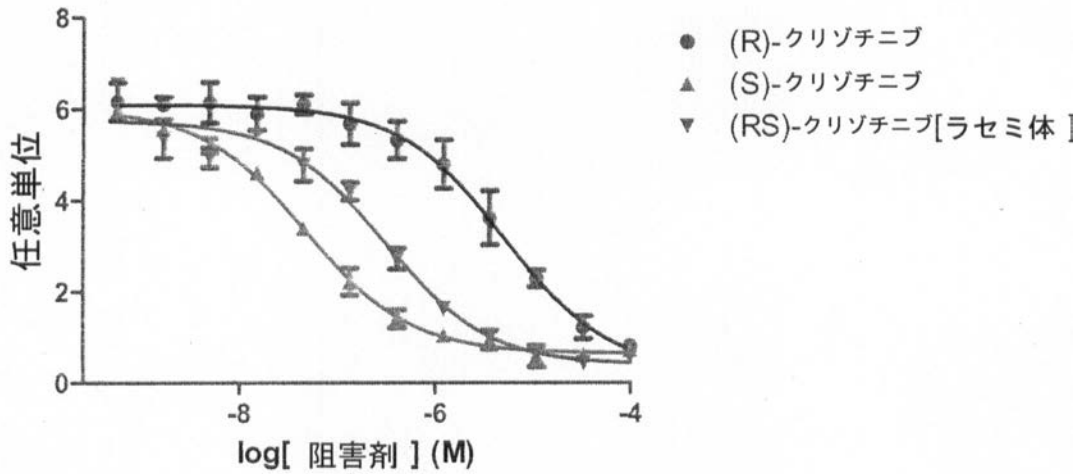
【 図 7 】



【 図 1 0 】

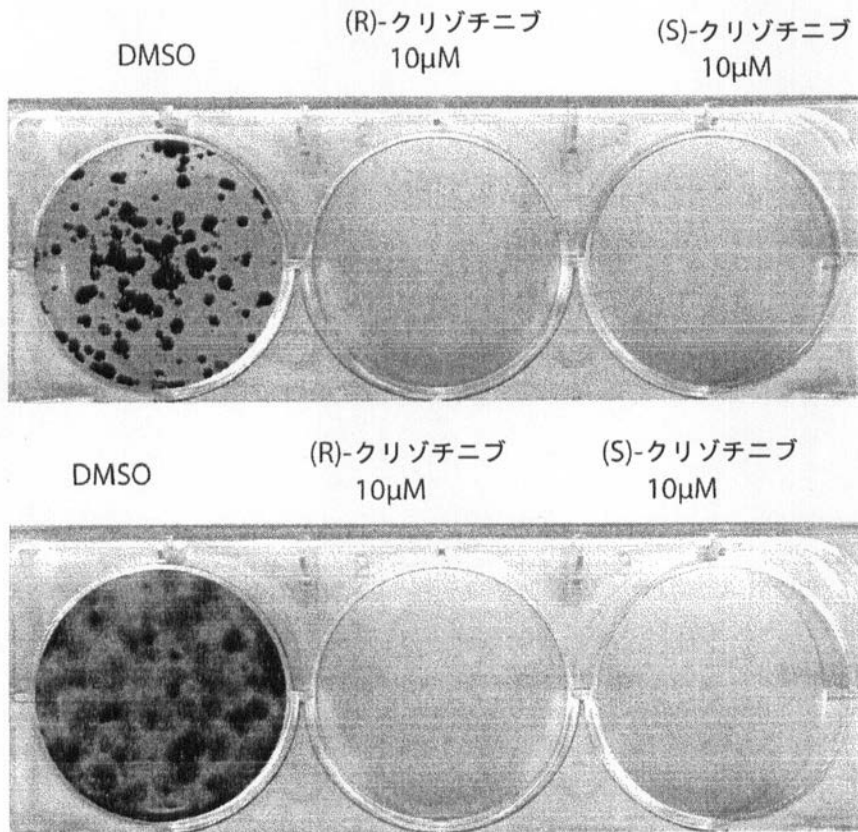


【 図 1 1 】

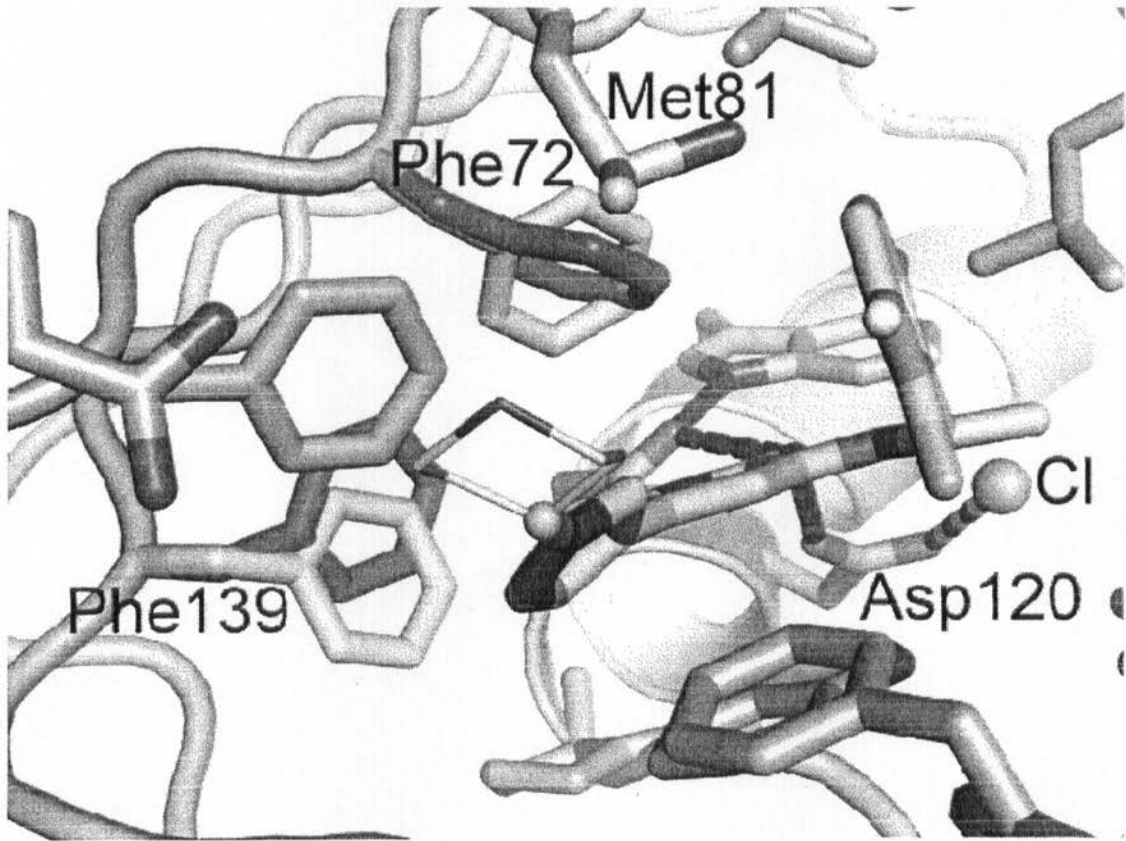


	(R)-クリゾチニブ	(S)-クリゾチニブ	(RS)-クリゾチニブ[ラセミ体]
IC50	5.236e-006	4.845e-008	3.150e-007

【 図 1 2 】

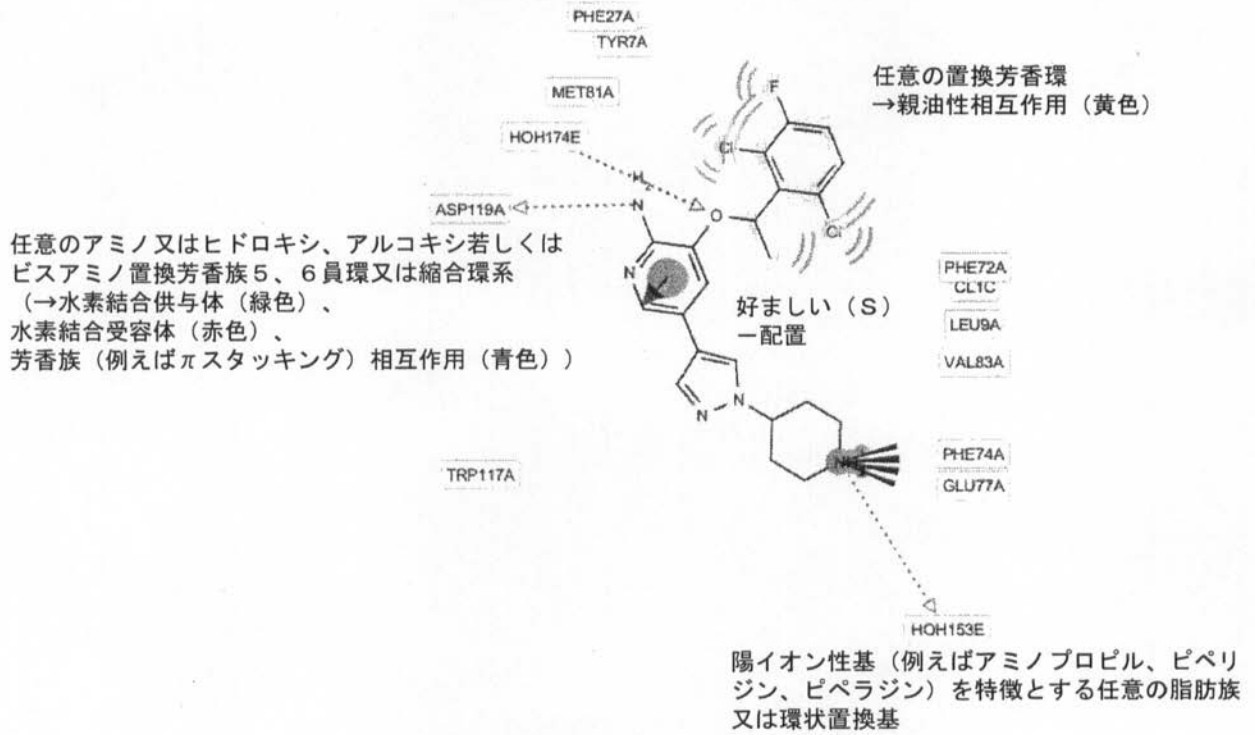


【 図 1 5 】



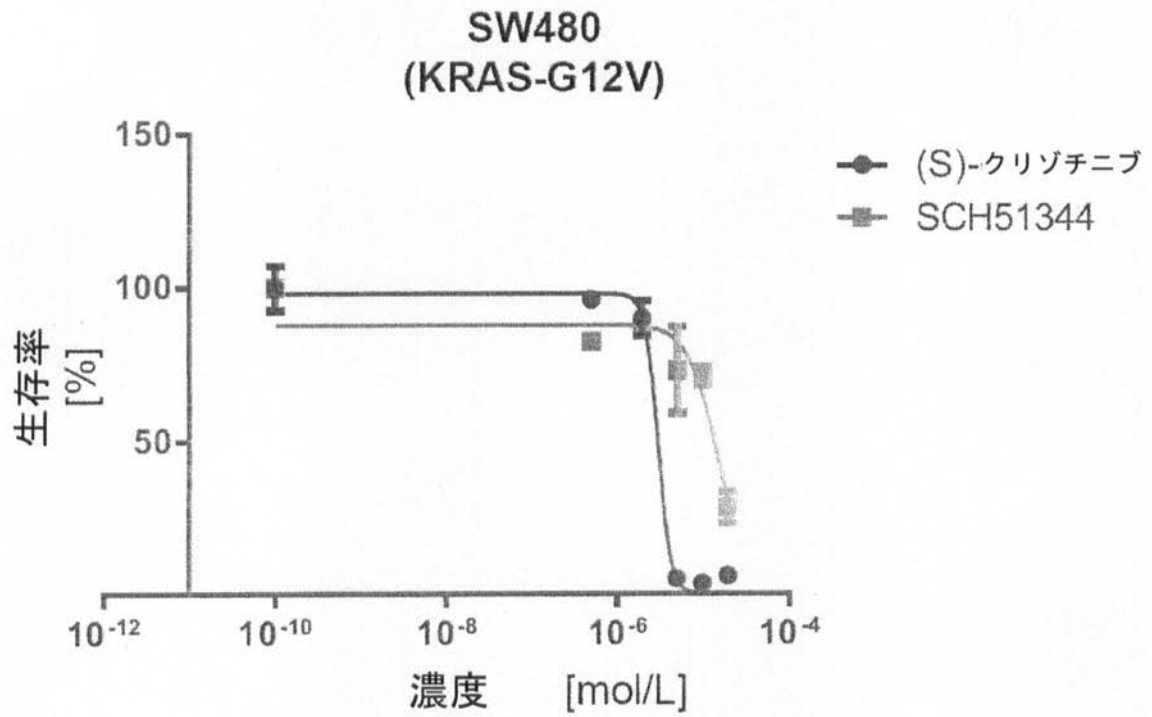
【 図 1 6 】

MTH1 阻害剤ファーマコフォア



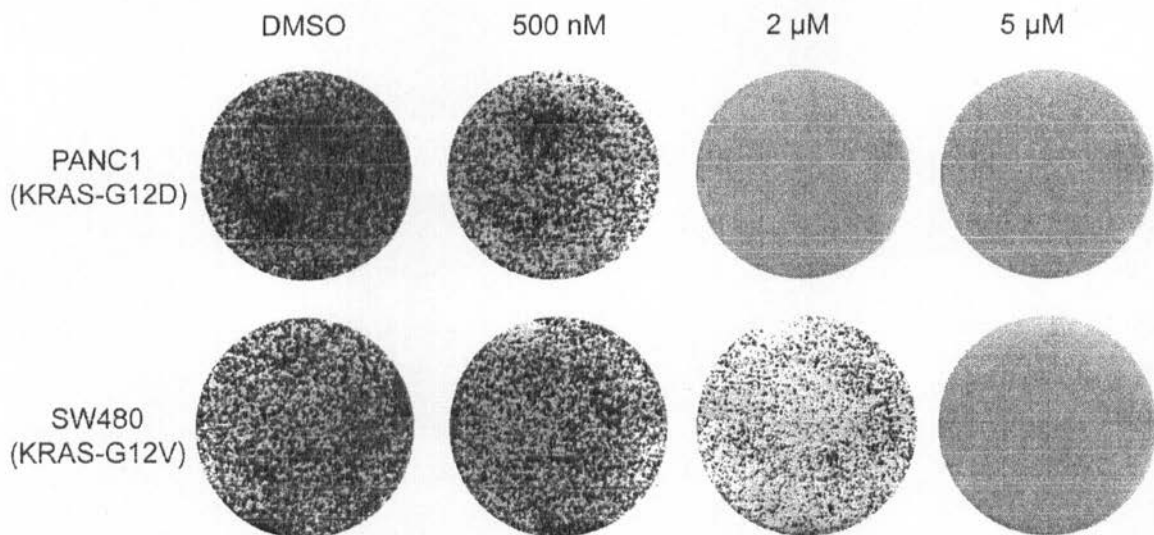
【 図 1 7 A 】

A



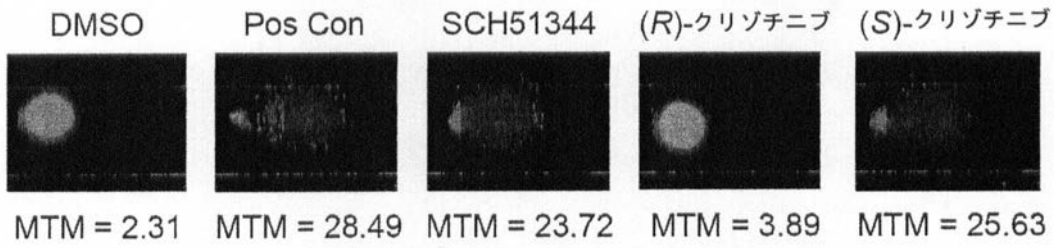
【 図 1 7 C 】

C



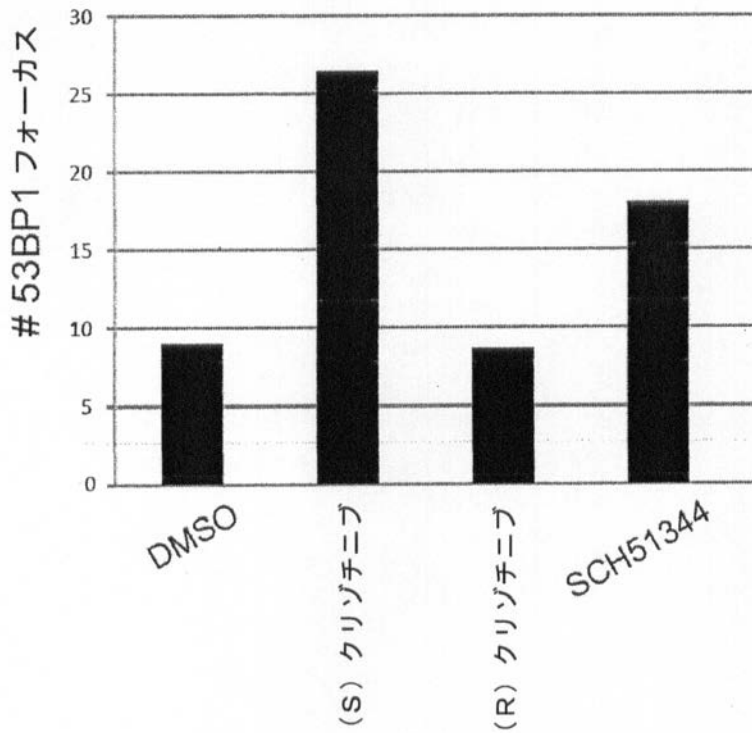
【 図 1 8 A 】

A



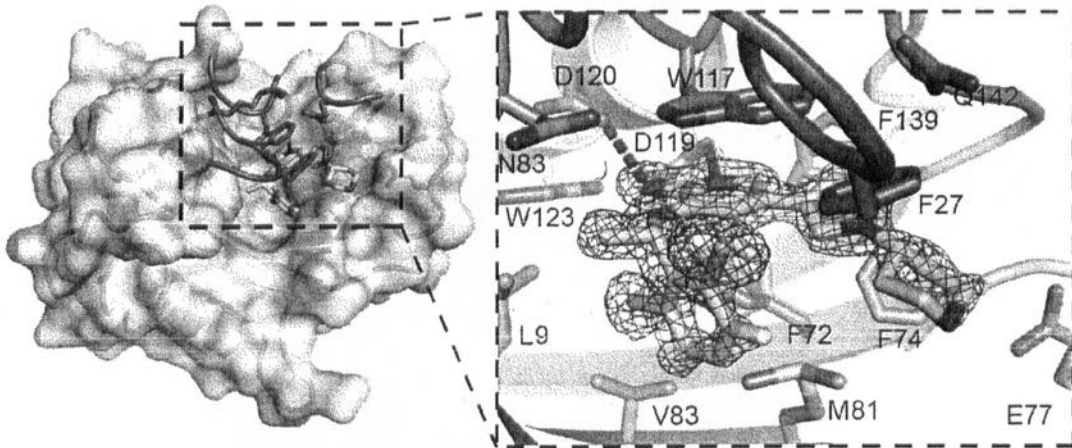
【 図 1 8 B 】

B



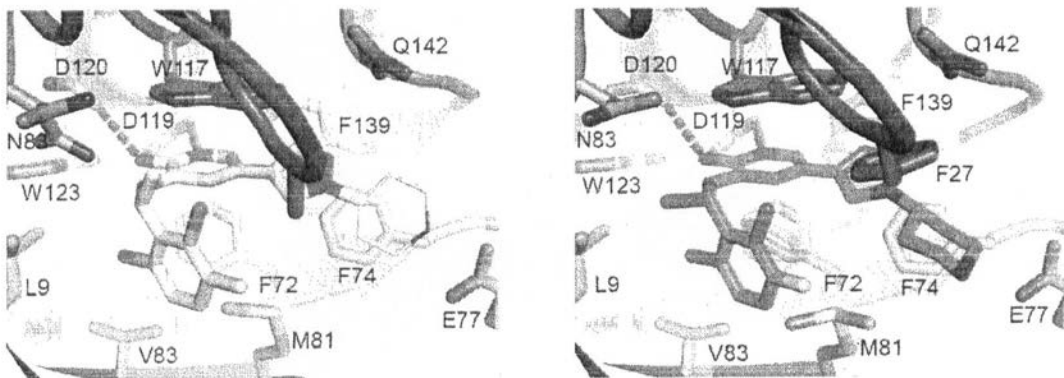
【 図 1 8 C 】

C

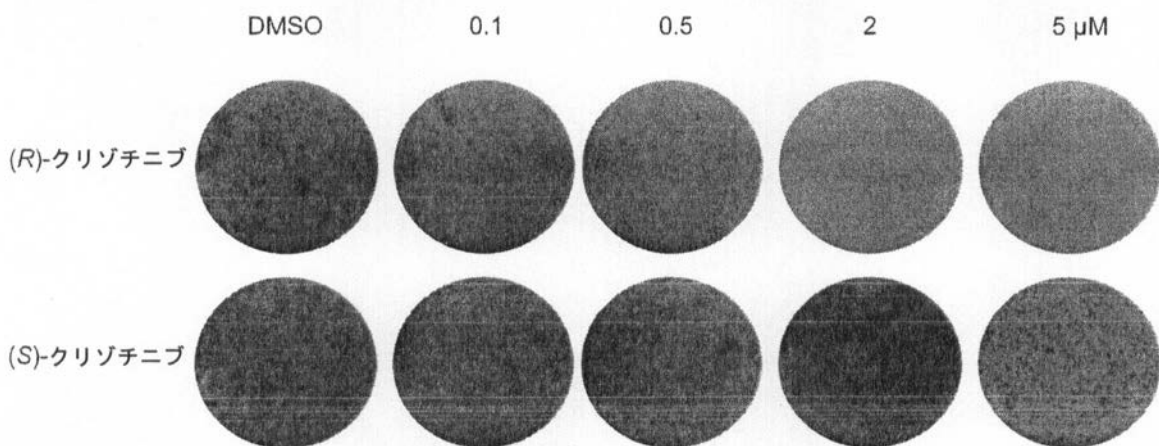


【 図 1 8 D 】

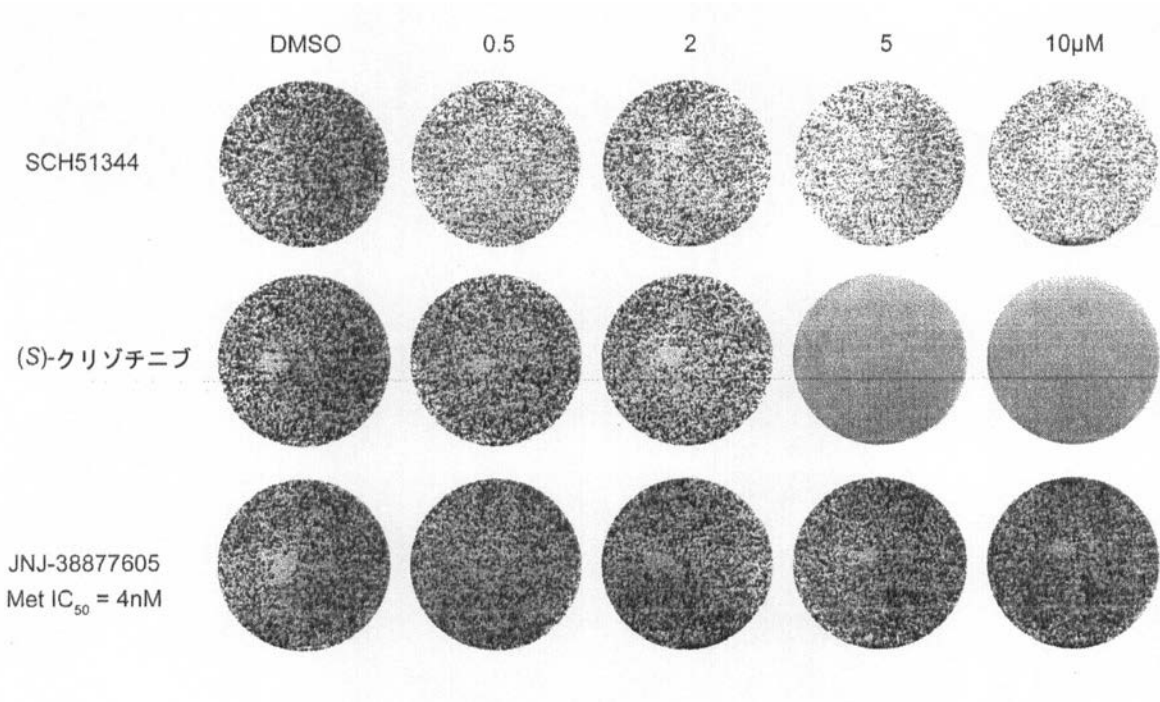
D



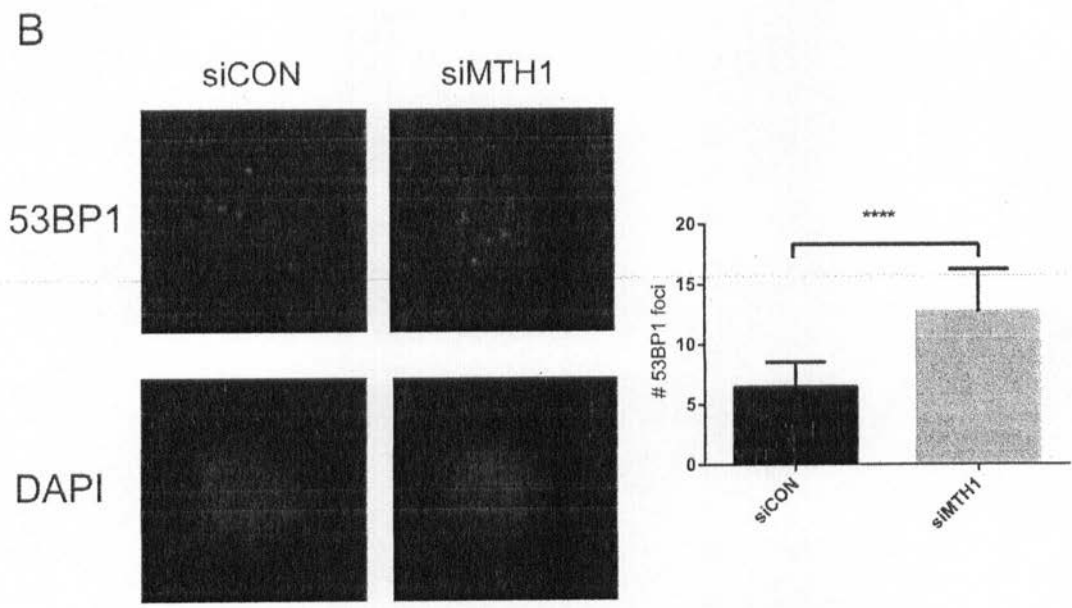
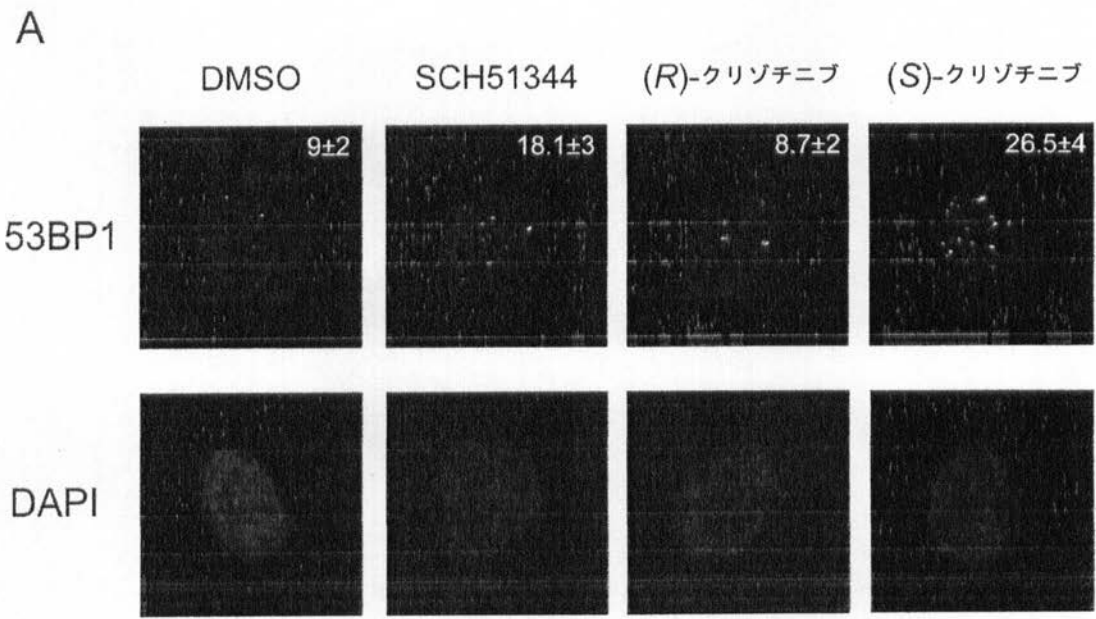
【 図 1 9 】



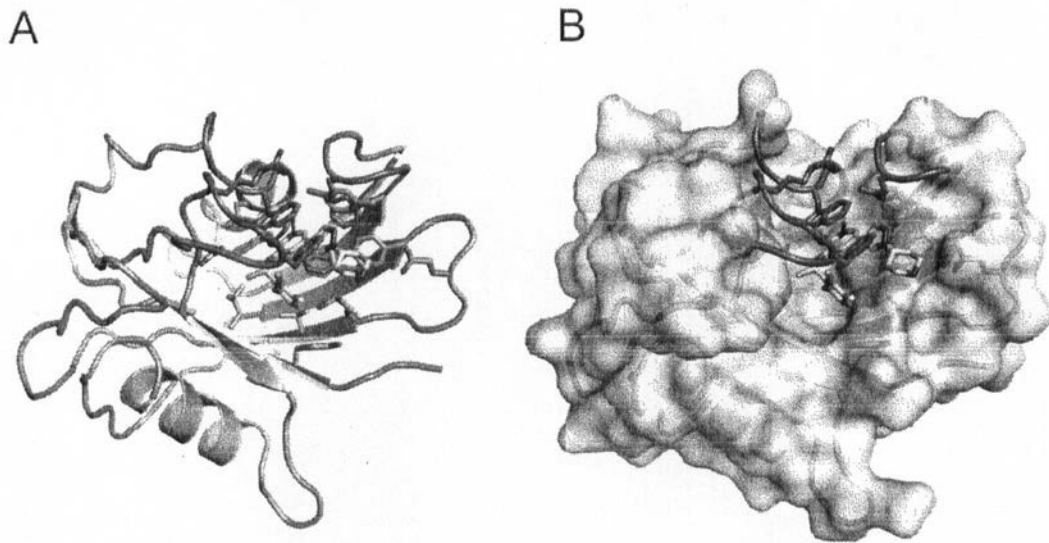
【 図 2 0 】



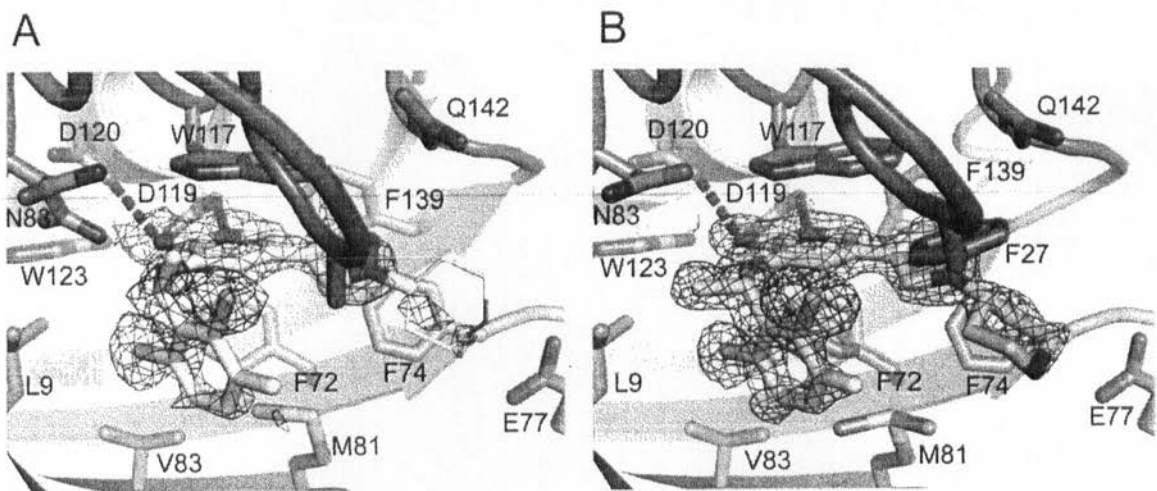
【 図 2 1 】



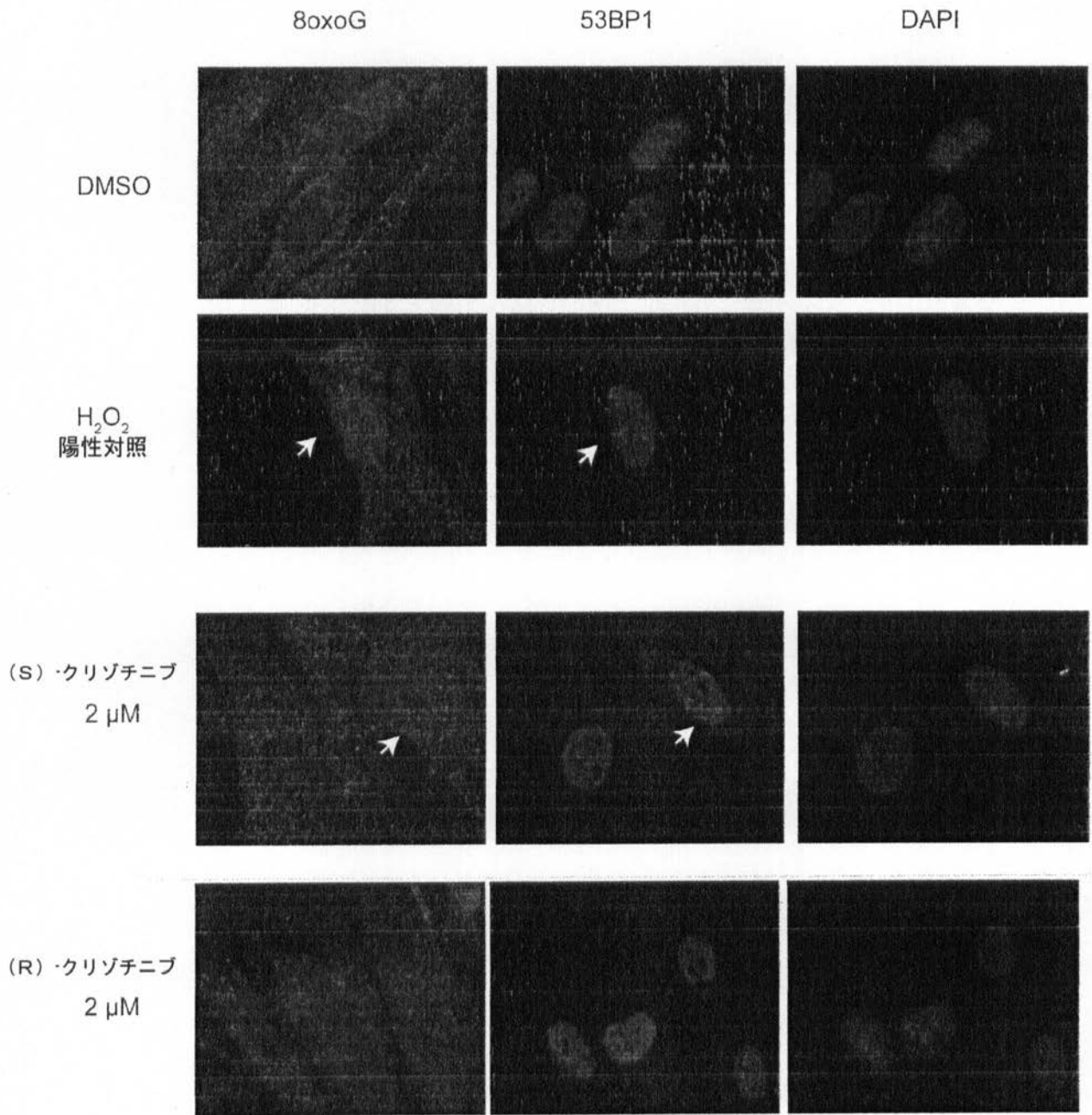
【 図 2 2 】



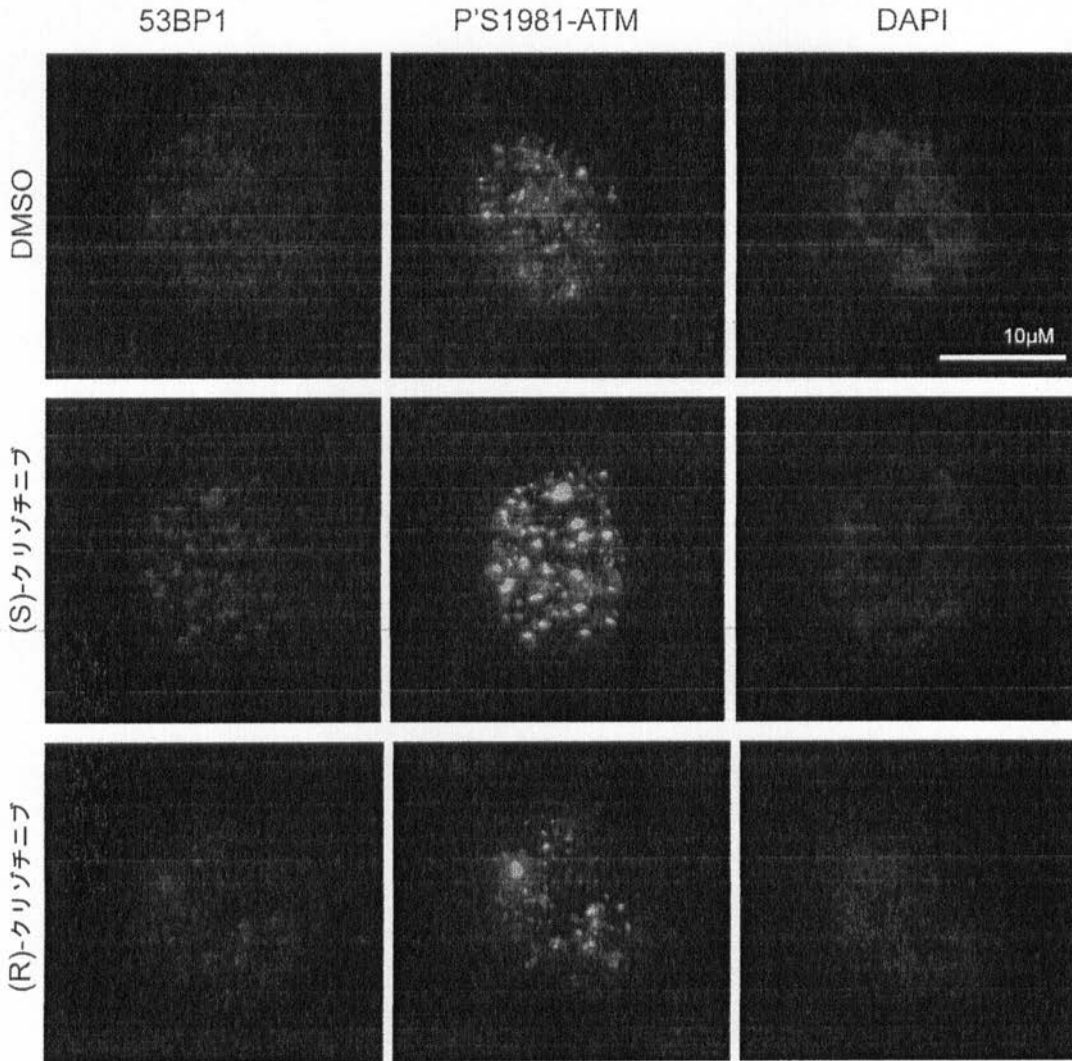
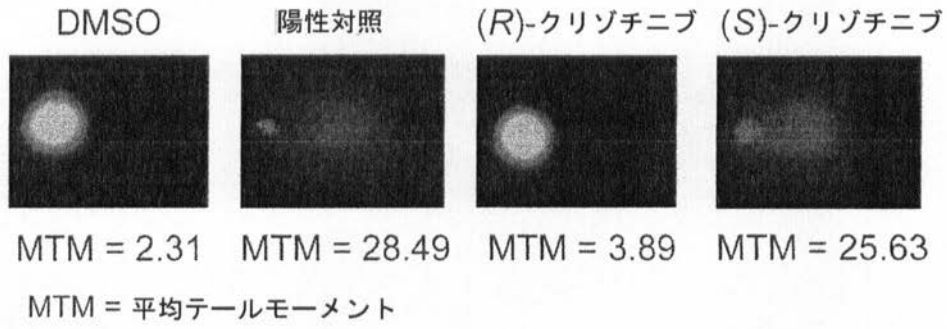
【 図 2 3 】



【 図 3 1 A 】



【 図 3 2 】



【 配列表 】

[2015529665000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/067744
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K31/4545 A61P35/00 ADD.		
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) A61K		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/021881 A2 (PFIZER [US]; CUI JINGRONG JEAN [US]; FUNK LEE ANDREW [US]; JIA LEI [US] 2 March 2006 (2006-03-02) cited in the application	1-25,43
Y	See the compounds defined in the claims and in the examples, in particular compounds N. 30, 53, 75, including the racemic form of "Crizotinib" and the racemic form of a compound falling among the Formula (I) of the present application (see example 75), and their use for the treatment of cancer, alone or in combination with other anticancer agents (see from page 32, line 15 to page 36, line 35)  ----- -/--	1-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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  13 November 2013		Date of mailing of the international search report  19/11/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Veronese, Andrea

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/067744

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CUI J JEAN ET AL: "Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK).",            JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 22 SEP 2011,            vol. 54, no. 18,            22 September 2011 (2011-09-22), pages 6342-6363, XP002688056,            ISSN: 1520-4804            Crizotinib as an effective tumor inhibitor, and its use for the treatment of human cancer (see abstract, page 6343, left hand column, page 6354, left hand column)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25,43
Y	<p>DATABASE REGISTRY [Online]            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US;            23 May 2012 (2012-05-23),            XP002688057,            Database accession no. 1374356-45-2            See the compound having the RN:            1374356-45-2 (S enantiomer of crizotinib)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-43
Y	<p>RAI PRIYAMVADA: "Human Mut T Homolog 1 (MTH1): a roadblock for the tumor-suppressive effects of oncogenic RAS-induced ROS.",            SMALL GTPASES 2012 APR-JUN,            vol. 3, no. 2, April 2012 (2012-04), pages 120-125, XP002688058,            ISSN: 2154-1256            MTH1 is a target for the development of drugs for the treatment of cancer, and its targeting can enhance cytotoxicity of other agents (see page 120, left hand column, page 123 right hand column last paragraph, page 124 left hand column)</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-43

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/067744

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHO WILLIAM C S ET AL: "MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1.", RNA BIOLOGY 2011 JAN-FEB, vol. 8, no. 1, January 2011 (2011-01), pages 125-131, XP002688059, ISSN: 1555-8584 NUDT1 as target for the treatment of lung carcinoma, and methods for determining whether Mir-145 targets and inhibits NUDT1: see abstract and page 127, left hand column, last paragraph. Antibodies against NUTDT1 (see page 130, first paragraph) and polynucleotides (see MiR-145) capable of detecting NUDT1 and MTH1</p>	1-43
Y	<p>TIAN RUIJUN ET AL: "Biological fingerprinting analysis of the interactome of a kinase inhibitor in human plasma by a chemiproteomic approach.", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. A 17 NOV 2006, vol. 1134, no. 1-2, 17 November 2006 (2006-11-17), pages 134-142, XP024967071, ISSN: 0021-9673 Interactome technologies for identifying the targets of known active molecules: see abstract, page 134, right hand column; page 135, left hand column; page 141, conclusions</p>	36-42
Y	<p>YANG LUN ET AL: "Chemical-protein interactome and its application in off-target identification.", INTERDISCIPLINARY SCIENCES, COMPUTATIONAL LIFE SCIENCES MAR 2011, vol. 3, no. 1, March 2011 (2011-03), pages 22-30, XP002688060, ISSN: 1867-1462 Identification of targets of known drugs using techniques in which a known drug is contacted with cell lysates containing the candidate targets and thereby new targets are identified (see abstract and see page 24).</p>	36-42

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/067744

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006021881 A2	02-03-2006	AP 2332 A	05-12-2011
		AR 050529 A1	01-11-2006
		AT 492544 T	15-01-2011
		AU 2005276132 A1	02-03-2006
		BR P10514537 A	17-06-2008
		CA 2577937 A1	02-03-2006
		CN 101018780 A	15-08-2007
		CR 8938 A	14-08-2007
		CR 20120421 A	14-09-2012
		DK 1784396 T3	14-02-2011
		EA 200700321 A1	31-08-2007
		EC SP077278 A	29-03-2007
		EP 1784396 A2	16-05-2007
		ES 2355923 T3	01-04-2011
		GT 200500226 A	10-04-2006
		HK 1105415 A1	20-07-2012
		HN 2005000477 A	09-06-2010
		HR P20110116 T1	31-03-2011
		JP 4167295 B2	15-10-2008
		JP 2008510788 A	10-04-2008
		KR 20070038569 A	10-04-2007
		MA 28827 B1	01-08-2007
		MY 139942 A	30-11-2009
		NI 200700058 A	07-03-2008
		NL 1029809 A1	28-02-2006
		NL 1029809 C2	17-10-2006
		NZ 552946 A	30-09-2010
		PA 8643201 A1	02-06-2006
		PE 06512006 A1	19-07-2006
		PT 1784396 E	27-01-2011
		RS 51601 B	31-08-2011
		SI 1784396 T1	31-03-2011
		SV 2006002208 A	04-10-2006
		TW I300411 B	01-09-2008
		US 2006128724 A1	15-06-2006
		UY 29080 A1	31-03-2006
		WO 2006021881 A2	02-03-2006
		ZA 200701281 A	31-12-2008

-----

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K 41/00	(2006.01)	A 6 1 K	41/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, H R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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

(72)発明者 フーバー キリアン

オーストリア国 エー - 1 0 9 0 ウィーン ラツアレットガッセ 1 4 アーカーハー ベーテ  
ー 2 5 . 3 , ツェーエムエム - リサーチ センター フォー モレキュラー メディシン オ  
ブ ジ オーストリアン アカデミー オブ サイエンシズ

(72)発明者 スペルティ - フルガ ジュリオ

オーストリア国 エー - 1 0 9 0 ウィーン ラツアレットガッセ 1 4 アーカーハー ベーテ  
ー 2 5 . 3 , ツェーエムエム - リサーチ センター フォー モレキュラー メディシン オ  
ブ ジ オーストリアン アカデミー オブ サイエンシズ

Fターム(参考) 2G045 AA26

4B024 AA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA06 EA04 GA11 HA12

4B063 QA18 QA20 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79

4C063 AA03 BB02 CC22 DD10 EE01

4C084 AA11 AA19 NA14 ZB261 ZB271 ZC751

4C086 AA01 AA02 AA03 BC36 GA07 GA08 MA02 MA05 NA14 ZB26

ZB27 ZC75

专利名称(译)	氨基杂芳基化合物作为mth1抑制剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015529665A</a>	公开(公告)日	2015-10-08
申请号	JP2015528990	申请日	2013-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	谢MM文件夹信集团曾托时间皮草泄漏等级补救双门EM为主硬		
申请(专利权)人(译)	谢MM - 文件夹顺控股曾托时间皮草Morekurare Meditsuin有限公司		
[标]发明人	フーバーキリアン スベルティフルガジュリオ		
发明人	フーバー キリアン スベルティ-フルガ ジュリオ		
IPC分类号	C07D401/14 C12Q1/68 C12Q1/02 A61K31/4545 A61P35/00 A61P35/02 A61K45/00 A61K41/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/09		
CPC分类号	A61K31/4545 A61K45/06 G01N33/5011 G01N33/573 G01N33/94 G01N2333/4704 G01N2333/914 G01N2430/00 G01N2500/04 G01N2800/52		
FI分类号	C07D401/14.CSP C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 A61K31/4545 A61P35/00 A61P35/02 A61K45/00 A61K41/00 A61P43/00.121 G01N33/53.M G01N33/574.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 4B024/AA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4C063/AA03 4C063/BB02 4C063/CC22 4C063/DD10 4C063/EE01 4C084 /AA11 4C084/AA19 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC751 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/AA03 4C086/BC36 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC75		
优先权	2012181920 2012-08-27 EP 2013162175 2013-04-03 EP		
其他公开文献	JP2015529665A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译) 本发明涉及氨基杂芳基化合物的(S)-对映体,其用于治疗和/或预防受试者的癌症。本发明还涉及包含所述化合物的药物组合物。本发明的另一方面涉及用于测定氨基杂芳基化合物或所述药物组合物的所述(S)-对映体的有效性的体外方法,该方法包括以下步骤:(a)从以下步骤获得细胞或组织样品课程;(b)确定受试者的NUDT1/MTH1-状态;其中NUDT1/MTH1阳性细胞或组织样品指示癌症的有效治疗和/或预防。另外,本文提供了用于鉴定氨基杂芳基化合物的(S)-对映体的靶的筛选方法。此外,在本发明的上下文中,本文描述的化合物抑制MTH1的生物活性。	(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2015-528990 (P2015-528990) 平成25年8月27日 (2013. 8. 27) 平成27年4月24日 (2015. 4. 24) PCT/JP2013/067744 W02014/033136 平成26年3月6日 (2014. 3. 6) 12181920.5 平成24年8月27日 (2012. 8. 27) 欧州特許庁 (EP) 13162175.7 平成25年4月3日 (2013. 4. 3) 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 ツェーエムエム-フォルシュングスツェン トルム フェア モレクラレ メディツィ ン ゲーエムベーハー オーストリア国 エー-1090 ウィー ン ラツァレットガッセ 14 アーカー ハー ベーテ- 25. 3 (74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
	最終頁に続く		