

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5190361号
(P5190361)

(45) 発行日 平成25年4月24日(2013.4.24)

(24) 登録日 平成25年2月1日(2013.2.1)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 6 1 K 31/47 (2006.01)	A 6 1 K 31/47	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 5/18 (2006.01)	A 6 1 P 5/18	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 1 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-516724 (P2008-516724)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月17日(2007.5.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/060560
 (87) 国際公開番号 W02007/136103
 (87) 国際公開日 平成19年11月29日(2007.11.29)
 審査請求日 平成22年5月14日(2010.5.14)
 (31) 優先権主張番号 60/747,570
 (32) 優先日 平成18年5月18日(2006.5.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506137147
 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
 ジメント株式会社
 東京都文京区小石川四丁目6番10号
 (74) 代理人 100088155
 弁理士 長谷川 芳樹
 (74) 代理人 100128381
 弁理士 清水 義憲
 (74) 代理人 100126653
 弁理士 木元 克輔
 (72) 発明者 松井 順二
 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エ
 ーザイ株式会社 筑波研究所内

審査官 関 景輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 甲状腺癌に対する抗腫瘍剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

RETキナーゼ阻害物質を含有する、甲状腺癌、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤であって、

前記RETキナーゼ阻害物質が、

(a) 4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物である；または

(b) 4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドのメタンスルホン酸塩である、

治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、RETキナーゼ活性を阻害する物質(以下、「RETキナーゼ阻害物質」と称する場合がある)を含有する多発性内分泌腫瘍症IIA型(multiple endocrine neoplasia, type IIA)、多発性内分泌腫瘍症IIB型(multiple endocrine neoplasia, type IIB)、

家族性甲状腺髄様癌 (familial medullary thyroid carcinoma)、甲状腺乳頭癌 (papillary thyroid carcinoma)、散発性甲状腺髄様癌 (sporadic medullary thyroid carcinoma)、ヒルシュスプルング病 (Hirschsprung disease)、褐色細胞腫 (Pheochromocytoma)、副甲状腺過形成症 (parathyroid hyperplasia) および消化管の粘膜神経腫 (mucosal neuromas of the gastrointestinal tract) からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤、治療方法、前記治療剤の製造のための RET キナーゼ阻害物質の使用および前記治療剤のための RET キナーゼ阻害物質に関するものである。

10

また、本発明は、RET キナーゼ阻害物質を含有する甲状腺癌 (thyroid carcinoma) に対する治療剤、治療方法、前記治療剤の製造のための RET キナーゼ阻害物質の使用および前記治療剤のための RET キナーゼ阻害物質に関するものである。

さらに、本発明は、変異型 RET を発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RET キナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物、変異型 RET を発現している細胞を含む生体に対して投与することを特徴とする疾患の治療方法、前記医薬組成物の製造のための RET キナーゼ阻害物質の使用および前記医薬組成物のための RET キナーゼ阻害物質に関するものである。

また、本発明は、RET キナーゼ阻害剤に関するものである。

さらに、本発明は、細胞中の RET の変異の有無を指標として、患者に対する RET キナーゼ阻害物質の効果を予測する方法に関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

RET は、レセプターチロシンキナーゼの一つであり、細胞増殖や分化のシグナルを伝達する細胞表面分子である。

RET の変異は、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、散発性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、ヒルシュスプルング病などの疾患に関連することが知られている^(1、2)。そして、RET キナーゼ阻害物質は、前記疾患に対する有用な治療剤となりうることが示唆されている^(1、2)。

多発性内分泌腫瘍症 I I A 型の患者の 93% から 98% において、RET のコドン 609, 611, 618, 620, 634 の 5 つのシステイン残基のうちの一つの変異が認められる。そして、RET のコドン 634 の変異が、最も多く認められる^(3、4)。

30

一方、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型の患者の 95% において、RET のコドン M918T の変異 (コドン 918 のメチオニンからチロシンへの変異) が認められる⁽⁴⁾。

また、家族性甲状腺髄様癌の多くの患者において、RET のコドン 609, 611, 618, 620, 634, 768, 790, 791, 804, 891 のうちの一つの変異が認められる⁽⁴⁾。

これらの点変異は、いずれもリガンド非依存的な RET の恒常的活性化を引き起こすことが知られている^(3、4)。

ここで、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型は、甲状腺髄様癌、褐色細胞腫および副甲状腺過形成症が特徴の症候群である。一方、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型は、甲状腺髄様癌、褐色細胞腫、消化管の粘膜神経腫の症状を伴う症候群である。また、家族性甲状腺髄様癌は、甲状腺髄様癌を主な症状とする症候群である⁽⁵⁾。

40

また、散発性甲状腺髄様癌の患者の約 40% において、RET の体細胞の点変異が認められ、これらの変異のほとんどは、コドン 918 において認められる⁽⁶⁾。

さらに、甲状腺乳頭癌において、染色体逆位 (chromosomal inversions) または染色体転座 (chromosomal translocation) により、RET 遺伝子と他の遺伝子との融合遺伝子、すなわち、RET 遺伝子の再構築 (rearrangement) が認められる。そして、RET 遺伝子の再構築により生成された融合タンパク質は、リガンド非依存的なダイメリゼーションと RET の恒常的活性

50

化を引き起こすことが知られている(7)。

ヒルシュスプルング病(Hirschsprung disease)は、大腸神経叢の異常に起因する新生児の腸管拡張と頑固な便秘を特徴とする疾患である。ヒルシュスプルング病の原因の一つは、RETの変異が原因であることが知られている(8)。

RETの変異は、NIH3T3細胞において足場非依存性増殖および造腫瘍性を引き起こしたことが報告されている(2)。

また、RETキナーゼ阻害物質であるZD6474は、変異型RETにより形質転換させたNIH3T3細胞における足場非依存性増殖を抑制し、ヌードマウスへの当該細胞の注入後の腫瘍の形成を阻害したことが報告されている(2)。

さらに、ヒト甲状腺髄様癌細胞株(TT)皮下移植モデルにおいて、RETキナーゼ阻害物質であるBAY 43-9006は、腫瘍を縮小させたことが報告されている(9)

10

このように、RETキナーゼ阻害物質は、変異型RETを発現している細胞に対して細胞増殖抑制を引き起こし、前記細胞を含む腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆されている。また、RETキナーゼ阻害物質は、RETの変異を原因とする疾患に対して有効であると考えられる。

すなわち、RETキナーゼ阻害物質は、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫ならびに甲状腺癌に有効であると考えられる。

20

ここで、血管新生阻害物質として、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよびその類似化合物が知られている(10-12)。しかしながら、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよびその類似化合物がRETキナーゼ阻害活性を有することについては一切報告されていない。

参考文献

- (1) Oncogene, 19, 5590-5597, 2000.
- (2) Cancer Research, 15, 7284-7290, 2002.
- (3) Cancer Research, 66, 1177-1180, 2006.
- (4) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 88, 5438-5443, 2003.
- (5) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 4142-4145, 2004.
- (6) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 5823-5827, 2004.
- (7) Endocrinology, 145, 5448-5451, 2004.
- (8) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 8949-8954, 2005.
- (9) Journal of the National Cancer Institute, 98, 326-334, 2006.
- (10) 国際公開第02/32872号パンフレット
- (11) 国際公開第2004/080462号パンフレット
- (12) 国際公開第2005/063713号パンフレット

30

40

【発明の開示】

【0003】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする課題は、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成

50

症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患ならびに甲状腺癌に対する治療剤および治療方法を提供すること、ならびに、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して、より有効に効果を発揮する医薬組成物および治療方法を提供することにある。さらに、本発明の解決しようとする別の課題は、RETキナーゼ阻害剤を提供することにある。また、本発明の解決しようとする別の課題は、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよびその類似化合物の効果を予測する方法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドがRETキナーゼ阻害活性を有することを見出した。そして、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよびその類似化合物は、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患ならびに甲状腺癌に対して、より有効に効果を発揮することを見出した。また、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよびその類似化合物は、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して、より有効に効果を発揮することを見出した。さらに、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよびその類似化合物の効果は、細胞中のRETの変異の有無を指標とすることにより予測することができることを見出した。

すなわち本発明は、以下に関する。

(1) RETキナーゼ阻害物質を含有する、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤。

(2) RETキナーゼ阻害物質を含有する甲状腺癌に対する治療剤。

(3) 変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RETキナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物。

(4) RETキナーゼ阻害物質を患者に有効量投与することを特徴とする、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患の治療方法。

(5) RETキナーゼ阻害物質を患者に有効量投与することを特徴とする甲状腺癌の治療方法。

(6) 変異型RETを発現している細胞を含む生体に対してRETキナーゼ阻害物質を有効量投与することを特徴とする、疾患の治療方法。

(7) 多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用。

(8) 甲状腺癌に対する治療剤の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用。

(9) 変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RETキナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用。

(10) 多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤のためのRETキナーゼ阻害物質。

10

20

30

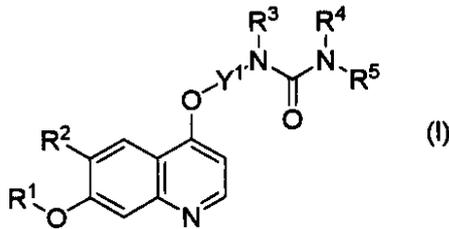
40

50

- (11) 甲状腺癌に対する治療剤のためのRETキナーゼ阻害物質。
 (12) 変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RETキナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物のためのRETキナーゼ阻害物質。
 (13) 細胞中のRETの変異の有無を指標として、患者がRETキナーゼ阻害物質に対して高感受性であるか否かを予測する方法。
 (14) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、RETキナーゼ阻害物質に対する細胞の感受性を分析する方法。
 (15) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、RETキナーゼ阻害物質に対して高感受性を示す細胞を選択する方法。
 (16) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、RETキナーゼ阻害物質に対して高感受性を示す患者を選択する方法。 10
 (17) 細胞中のRETの変異の有無を測定することにより、RETキナーゼ阻害物質に対する感受性を分析し、得られる結果により患者を分類する方法。
 (18) 細胞中のRETの変異の有無を測定し、得られる測定結果から、変異型RETを発現している細胞を有する患者を選択することを含む、RETキナーゼ阻害物質の投与対象となる患者を選択する方法。
 (19) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、患者に対するRETキナーゼ阻害物質の治療効果を予測する方法。
 (20) 患者のRETキナーゼ阻害物質に対する感受性の程度を予測するために、当該患者由来の細胞中のRETの変異の有無を測定する方法。 20

前記RETキナーゼ阻害物質は、

一般式(I)



[式(I)中、 R^1 は、式 $-V^1-V^2-V^3$ (式中、 V^1 は、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキレン基を意味する； V^2 は、単結合、酸素原子、硫黄原子、カルボニル基、スルフィニル基、スルホニル基、式 $-CONR^6-$ で表される基、式 $-SO_2NR^6-$ で表される基、式 $-NR^6SO_2-$ で表される基、式 $-NR^6CO-$ で表される基または式 $-NR^6-$ で表される基を意味する(式中、 R^6 は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基または置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基を意味する。))； V^3 は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルケニル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルキニル基、置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C_{6-10} アリール基、置換基を有していてもよい5~10員ヘテロアリール基または置換基を有していてもよい3~10員非芳香族ヘテロ環式基を意味する。)で表される基を意味する；

R^2 は、シアノ基、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルコキシ基、カルボキシ基、置換基を有していてもよい C_{2-7} アルコキシカルボニル基または式 $-CONV^{a11}V^{a12}$ (式中、 V^{a11} は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルケニル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルキニル基、置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C_{6-10} アリール基、置換基を有していてもよい5~10員ヘテロアリール基または置換基を有していてもよい3~10員非芳香族ヘテロ環式基を意味する； V^{a12} は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有していてもよい

10

20

30

40

50

C₂ - 6 アルケニル基、置換基を有していてもよい C₂ - 6 アルキニル基、置換基を有していてもよい C₃ - 8 シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C₆ - 10 アリール基、置換基を有していてもよい 5 ~ 10 員ヘテロアリール基、置換基を有していてもよい 3 ~ 10 員非芳香族ヘテロ環式基、水酸基、置換基を有していてもよい C₁ - 6 アルコキシ基または置換基を有していてもよい C₃ - 8 シクロアルコキシ基を意味する。) で表される基を意味する;

Y¹ は、式



10

(式中、R⁷ および R⁸ は、それぞれ独立して水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、置換基を有していてもよい C₁ - 6 アルキル基、置換基を有していてもよい C₃ - 8 シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C₁ - 6 アルコキシ基、置換基を有していてもよい C₁ - 6 アルキルチオ基、ホルミル基、置換基を有していてもよい C₂ - 7 アシル基、置換基を有していてもよい C₂ - 7 アルコキシカルボニル基または式 - CONV^{d1}V^{d2} (式中、V^{d1} および V^{d2} は、それぞれ独立して水素原子または置換基を有していてもよい C₁ - 6 アルキル基を意味する。) で表される基を意味する; W¹ および W² は、それぞれ独立して置換基を有していてもよい炭素原子または窒素原子を意味する。) で表される基を意味する;

20

R³ および R⁴ は、それぞれ独立して水素原子、置換基を有していてもよい C₁ - 6 アルキル基、置換基を有していてもよい C₂ - 6 アルケニル基、置換基を有していてもよい C₂ - 6 アルキニル基、置換基を有していてもよい C₃ - 8 シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C₂ - 7 アシル基または置換基を有していてもよい C₂ - 7 アルコキシカルボニル基を意味する;

R⁵ は、水素原子、置換基を有していてもよい C₁ - 6 アルキル基、置換基を有していてもよい C₂ - 6 アルケニル基、置換基を有していてもよい C₂ - 6 アルキニル基、置換基を有していてもよい C₃ - 8 シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C₆ - 10 アリール基、置換基を有していてもよい 5 ~ 10 員ヘテロアリール基、置換基を有していてもよい 3 ~ 10 員非芳香族ヘテロ環式基を意味する。] で表される化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を挙げるができる。

30

また、前記 RETキナーゼ阻害物質は、5 - (5 - フルオロ - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロインドール - 3 - イリデンメチル) - 2, 4 - ジメチル - 1H - ピロール - 3 - カルボキシリック アシッド (2 - ジエチルアミノエチル) アミド、N - {2 - クロロ - 4 - [(6, 7 - ジメトキシ - 4 - キノリル) オキシ] フェニル} - N' - (5 - メチル - 3 - イソキサゾリル) ウレア

および

40

4 - [(4 - フルオロ - 2 - メチルインドール - 5 - イル) オキシ] - 6 - メトキシ - 7 - [3 - (ピロリジン - 1 - イル) プロポキシ] キナゾリン

からなる群から選択される少なくとも一つの化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を挙げるができる。

また、本発明は、以下に関する。

(21) 前記の一般式 (I) で示される化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有する RETキナーゼ阻害剤。

(22) 5 - (5 - フルオロ - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロインドール - 3 - イリデンメチル) - 2, 4 - ジメチル - 1H - ピロール - 3 - カルボキシリック アシッド (2 - ジエチルアミノエチル) アミド、

50

N - { 2 - クロロ - 4 - [(6 , 7 - ジメトキシ - 4 - キノリル) オキシ] フェニル }
 - N ' - (5 - メチル - 3 - イソキサゾリル) ウレア

および

4 - [(4 - フルオロ - 2 - メチルインドール - 5 - イル) オキシ] - 6 - メトキシ -
 7 - [3 - (ピロリジン - 1 - イル) プロボキシ] キナゾリン

からなる群から選択される少なくとも一つの化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有する R E T キナーゼ阻害剤。

また、本発明は、好ましくは以下に関する。

(2 3) 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有する多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスブルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤。

10

(2 4) 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有する甲状腺癌に対する治療剤。

(2 5) 変異型 R E T を発現している細胞を含む生体に対して投与するための、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有する医薬組成物。

20

(2 6) 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を患者に有効量投与することを特徴とする、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスブルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患の治療方法。

(2 7) 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を患者に有効量投与することを特徴とする甲状腺癌の治療方法。

30

(2 8) 変異型 R E T を発現している細胞を含む生体に対して 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を有効量投与することを特徴とする、疾患の治療方法。

(2 9) 多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスブルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤の製造のための 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物の使用。

40

(3 0) 甲状腺癌に対する治療剤の製造のための 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物の使用。

(3 1) 変異型 R E T を発現している細胞を含む生体に対して投与するための、R E T キナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物の製造のための 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物の使用。

(3 2) 多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスブルング病、褐色細胞腫、副甲状腺

50

過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤のための4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物。

(33) 甲状腺癌に対する治療剤のための4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物。

(34) 変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RETキナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物のための4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、

10

もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物に対して高感受性であるか否かを予測する方法。

(35) 細胞中のRETの変異の有無を指標として、患者が4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドもしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物に対して高感受性を示す細胞を選択する方法。

(36) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物に対する

20

細胞の感受性を分析する方法。

(37) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物に対して高感受性を示す細胞を選択する方法。

30

(38) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物に対して高感受性を示す患者を選択する方法。

(39) 細胞中のRETの変異の有無を測定することにより、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物に対する感受性を分析し、得られる結果により患者を分類する方法。

40

(40) 細胞中のRETの変異の有無を測定し、得られる測定結果から、変異型RETを発現している細胞を有する患者を選択することを含む、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物の投与対象となる患者を選択する方法。

(41) 細胞中のRETの変異の有無を測定することを含む、患者に対する4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物の治療効果を予測する方法。

(42) 患者の4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物に対する感受性の程度を予測するために、当該患者由来の細胞中のRETの変異の有無を測定する方法。

(43) 4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有するRETキナーゼ阻害剤。

本発明により、RETキナーゼ阻害物質を含有する、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスブルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からな

50

る群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤、治療方法、前記治療剤の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用および前記治療剤のためのRETキナーゼ阻害物質が提供される。

また、本発明により、RETキナーゼ阻害物質を含有する甲状腺癌に対する治療剤、治療方法、前記治療剤の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用および前記治療剤のためのRETキナーゼ阻害物質が提供される。

さらに、本発明により、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RETキナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与することを特徴とする疾患の治療方法、前記医薬組成物の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用および前記医薬組成物のためのRETキナーゼ阻害物質が提供される。

10

また、本発明により、RETキナーゼ阻害剤が提供される。

さらに、本発明により、RETキナーゼ阻害物質の効果を予測する方法が提供される。

より詳細には、RETキナーゼ阻害物質の効果は、細胞中のRETの変異の有無を指標とすることにより予測することが可能となった。

本発明に係る方法により、患者に化合物を投与することなく、効果を予測することが可能となるため、当該化合物による効果をより期待できる患者を選択することができ、患者のQOLに貢献することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0004】

20

図1は、ヒト甲状腺髄様癌細胞株(TT)培養下におけるRETキナーゼおよびErk1/2の活性化(リン酸化を指標)に対する4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドの効果を示したものである。なお、一番左のレーンは、被検物質を加えずにRETキナーゼおよびErk1/2の活性化(リン酸化を指標)を測定したものである。

図2は、ヒト甲状腺髄様癌細胞株(TT)皮下移植モデルにおける4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドの抗腫瘍効果を示したものである。

図3は、ヒト甲状腺髄様癌細胞株(TT)皮下移植モデルにおける腫瘍組織内のRETキナーゼに対する4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドの効果を示したものである。(A)は、被検物質の各投与量(10, 30または100mg/kg)での経口投与2時間後のRETのリン酸化に対する効果、(B)は、被検物質の100mg/kg投与後の2、8、12または24時間後のRETのリン酸化に対する効果を示す。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる米国仮出願60/747,570号の開示内容を包含する。

40

1. 本発明の治療剤、医薬組成物、治療方法

(1) RET

本発明において、RETとは、ret proto-oncogeneによりコードされるタンパク質であり、例えば、配列番号: 2 (GenBankアクセッション番号: NM_020975) で表されるアミノ酸配列または配列番号: 4 (GenBankアクセッション番号: NM_020630) で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列は1114aaの長さを有し、配列番号: 4 で表されるアミノ酸配列は1072aaの長さを有する配列である。

50

また、ret proto-oncogeneは、例えば、配列番号：1 (GenBankアクセッション番号：NM_020975) で表される塩基配列のうち、181~3522番の塩基配列からなるポリヌクレオチド、または配列番号：3 (GenBankアクセッション番号：NM_020630) で表される塩基配列のうち、181~3396番の塩基配列からなるポリヌクレオチドなどを挙げるができる。

本発明において、これらのRETを、「野生型のRET」と称する場合もある。

(2) 変異型RET

本発明において、変異型RETは、野生型のRETのアミノ酸配列、例えば、配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、一もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加され、またはそれらの組み合わせにより変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、RETキナーゼ活性を有するポリペプチドを挙げるができる。また、変異型RETは、好ましくは、野生型のRETのアミノ酸配列、例えば、配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、一個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、RETキナーゼ活性を有するポリペプチドを挙げるができる。

ここで、「RETキナーゼ活性」は、RETが自己または他のタンパク質のチロシン残基をリン酸化する活性を意味する。

変異型RETは、例えば、下記(i)~(ix)で表される配列を含むポリペプチドを挙げるができる。

(i) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、321番目のグリシンが他のアミノ酸、好ましくはアルギニンに置換されたアミノ酸配列 (Journal of Endocrinology Investigation, 28, 905-909, 2005.)、

(ii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、533番目のグリシンが他のアミノ酸、好ましくはシステインに置換されたアミノ酸配列 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 88, 5438-5443, 2003.)、

(iii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、609番目のシステインが他のアミノ酸、好ましくはセリンに置換されたアミノ酸配列 (Clin Endocrinol, 63, 676-682, 2005.)、

(iv) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、611番目のシステインが他のアミノ酸、好ましくはセリン、チロシンまたはフェニルアラニンに置換されたアミノ酸配列 (European Journal of Human Genetics, 11, 364-368, 2003.; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.)、

(v) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、618番目のシステインが他のアミノ酸、好ましくはアルギニン、セリン、グリシンまたはフェニルアラニンに置換されたアミノ酸配列 (American Journal of Pathology, 168, 1262-1275, 2006.; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.)、

(vi) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、620番目のシステインが他のアミノ酸、好ましくはアルギニンまたはセリンに置換されたアミノ酸配列 (American Journal of Pathology, 168, 1262-1275, 2006.; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.)、

(vii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、630番目のシステインが他のアミノ酸、好ましくはアルギニンまたはチロシンに置換されたアミノ酸配列 (Thyroid, 15, 668-671, 2005.; Biochemical and

10

20

30

40

50

Biophysical Research Communications, 255, 587-590, 1999.)、

(viii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、631番目のアスパラギン酸が他のアミノ酸、好ましくはチロシン、グリシン、アスパラギンまたはアラニンに置換されたアミノ酸配列 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 255, 587-590, 1999.)、

(ix) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、634番目のシステインが他のアミノ酸、好ましくはアルギニン、グリシン、チロシン、フェニルアラニン、セリンまたはトリプトファンに置換されたアミノ酸配列 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 255, 587-590, 1999.、Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.、Biochemical and Biophysical Research Communications, 207, 1022-1028, 1995.)、

(x) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、691番目のグリシンが他のアミノ酸、好ましくはセリンに置換されたアミノ酸配列 (Cancer Research, 66, 1177-1180, 2006.)、

(xi) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、768番目のグルタミン酸が他のアミノ酸、好ましくはアスパラギン酸に置換されたアミノ酸配列 (Clinical Chemistry, 50, 522-529, 2004.、Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.)、

(xii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、790番目のロイシンが他のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニンに置換されたアミノ酸配列 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83, 770-774, 1998.、Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.)、

(xiii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、791番目のチロシンが他のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニンに置換されたアミノ酸配列 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83, 770-774, 1998.)、

(xiv) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、804番目のバリンが他のアミノ酸、好ましくはメチオニンに置換されたアミノ酸配列 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.)、

(xv) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、806番目のチロシンが他のアミノ酸、好ましくはシステインに置換されたアミノ酸配列 (Japanese Journal of Cancer Research, 90, 1-5, 1999.)、

(xvi) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、844番目のアルギニンが他のアミノ酸、好ましくはロイシンに置換されたアミノ酸配列 (Exp Clin Endocrinol Diabetes, 108, 128-132, 2000.)、

(xvii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、883番目のアラニンが他のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニンまたはチロシンに置換されたアミノ酸配列 (European Journal of Endocrinology, 142, 573-575, 2000.、Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 5823-5827, 2004.)、

(xviii) 配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列のうち、891番目のセリ

10

20

30

40

50

ンが他のアミノ酸、好ましくはアラニンに置換されたアミノ酸配列 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 4142 - 4145, 2004.)、

(xix) 配列番号：2 または 4 で表されるアミノ酸配列のうち、918 番目のメチオニンが他のアミノ酸、好ましくはスレオニンに置換されたアミノ酸配列 (Clinical Cancer Research, 8, 457 - 463, 2002.)。

また、変異型 RET は、配列番号：2 または 4 に記載されたアミノ酸配列において、上記の (i) ~ (xix) に示す置換を少なくとも一つ含むもの、すなわち、コドン 321、533、609、611、618、620、630、631、634、691、768、790、791、804、806、844、883、891 および 918 のアミノ酸からなる群から選択される少なくとも一つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異部位を含むものを挙げるができる。例えば、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列のうち、804 番目のバリンが他のアミノ酸に置換された変異部位、および 806 番目のチロシンが他のアミノ酸に置換された変異部位を含有するアミノ酸配列を含むポリペプチドは、変異型 RET に含まれる。ここで、変異型 RET に含まれる、上記の (i) ~ (xix) に示す置換の個数および組み合わせは、特に限定されるものではない。

10

本発明において、変異型 RET は、好ましくは上記の (iii)、(iv)、(v)、(vi)、(ix)、(xi)、(xii)、(xiii)、(xiv)、(xviii) または (xix) で表される配列を含むポリペプチドであり、より好ましくは (ix) または (xix) で表される配列を含むポリペプチドである。

20

なお、本明細書中、アミノ酸のアルファベット表記は通常の 3 文字または 1 文字で表すことがある。また、数字の前に表示したアルファベットは、置換前のアミノ酸の 1 文字表記を示し、数字の後に表示したアルファベットは、置換後のアミノ酸の 1 文字表記を示し、数字はアミノ酸配列における当該アミノ酸の存在位置を示すことがある。例えば、上記の (xix) に示すように、918 番目のメチオニンがスレオニンに置換された場合は「M918T」と表示することがある。

また、コドンに続く数字は、アミノ酸配列におけるアミノ酸の存在位置を示すことがある。例えば、「コドン 918 のアミノ酸」は、アミノ酸配列において 918 番目のアミノ酸を意味する。

また、本発明において、変異型 RET は、野生型の RET をコードする遺伝子 (以下、「RET 遺伝子」と称する場合がある) が他の遺伝子と再構築された遺伝子によってコードされるポリペプチドであって、RET キナーゼ活性を有するポリペプチドを挙げるができる。また、本発明において、変異型 RET は、例えば、配列番号：1 または 3 に記載された塩基配列からなるポリヌクレオチドのうち、一部のポリヌクレオチドが他の遺伝子と再構築されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、RET キナーゼ活性を有するポリペプチドを挙げることができる。さらに、本発明において、変異型 RET は、例えば、配列番号：1 の 181 ~ 3522 番の塩基配列からなるポリヌクレオチド、または配列番号：3 の 181 ~ 3396 番の塩基配列からなるポリヌクレオチドが他の遺伝子と再構築されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、RET キナーゼ活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

30

40

ここで、「遺伝子の再構築」とは、遺伝子間で組み換えが起こり、その結果、新しい遺伝子ができることをいう。

変異型 RET は、例えば、下記 (i) ~ (xi) のポリペプチドを挙げることができる。下記の (i) ~ (xi) のポリペプチドにおける遺伝子の再構築の態様は、括弧内に示した各文献に記載されている。

(i) RET 遺伝子が H4 (CCDC6, coiled-coil domain containing 6 または D10S170 ともいう。GenBank アクセッション番号：NM_005436) の遺伝子と再構築された遺伝子 (「RET/PTC1」ともいう。) によってコードされるポリペプチド (European Journal of Cancer, 41, 816 - 821, 2005.; Cell, 60, 557 - 563,

50

1990.)、
(ii) RET遺伝子がRI (PRKAR1A、cAMP-dependent regulatory type I alphaともいう。GenBankアクセッション番号：NM_212471)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PTC2」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Eur J Endocrinology, 147, 741-745, 2002.)、
(iii) RET遺伝子がELE1(NCOA4、nuclear receptor coactivator 4またはRFGともいう。GenBankアクセッション番号：NM_005437)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PTC3」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(European Journal of Cancer, 41, 816-821, 2005.)、
(iv) RET遺伝子がELE1(NCOA4、nuclear receptor coactivator 4またはRFGともいう。GenBankアクセッション番号：NM_005437)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PTC4」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Oncogene, 13, 1093-1097, 1996.)、
(v) RET遺伝子がRFG5(GOLGA5、golgin-84ともいう。GenBankアクセッション番号：NM_005113)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PTC5」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Cancer Research, 58, 198-203, 1998.)、
(vi) RET遺伝子がHTIF(TRIM24、tripartite motif-containing 24またはPTC6ともいう。GenBankアクセッション番号：NM_003852)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PTC6」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Oncogene, 18, 4388-4393, 1999.)、
(vii) RET遺伝子がRFG7(TRIM33、tripartite motif-containing 33、PTC7ともいう。GenBankアクセッション番号：NM_033020)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PTC7」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Cancer Research, 60, 2786-2789, 2000.)、
(viii) RET遺伝子がkinectin(KTN1、kinectin 1ともいう。GenBankアクセッション番号：NM_182926)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PTC8」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Cancer Research, 60, 7028-7032, 2000.、Cancer Research, 60, 2786-2789, 2000.)、
(ix) RET遺伝子がELKS(RAB6IP2またはRAB6 interacting protein 2ともいう。GenBankアクセッション番号：NM_178037)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/ELKS」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Genes Chromosomes Cancer, 25, 97-103, 1999.)、
(x) RET遺伝子がPCM-1(PCM1またはpericentriolar material 1ともいう。GenBankアクセッション番号：NM_006197)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RET/PCM-1」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Oncogene, 19, 4236-4242, 2000.)。
(xi) RET遺伝子がRFP(ret finger proteinともいう。GenBankアクセッション番号：NM_006510)の遺伝子と再構築された遺伝子(「RFP-RET」ともいう。)によってコードされるポリペプチド(Endocrinology, 145, 5448-5451, 2004.)。

RETの変異の有無は、RETの遺伝子配列またはRET遺伝子の転写産物であるmRNAの配列を解析することにより調べることができる。配列の解析方法は、例えば、ジデ

10

20

30

40

50

オキシヌクレオチドチェーンターミネーション法 (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) などを挙げる
ことができる。適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

また、RETの変異の有無は、例えば、in situハイブリダイゼーション、ノーザンブロット解析、DNAマイクロアレイ、RT-PCR、SSCP-PCR (Single-Strand Conformation Polymorphism-PCR) などの方法により解析することもできる。これらの方法は、常法に従い行うことができる (Clinical Cancer Research, 8, 457-463, 2002)。

さらに、RETの変異の有無は、例えば、免疫化学的方法 (例えば、免疫組織化学的方法、免疫沈降法、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー、ELISA、RIAなど) により解析することもできる。これらの方法は、常法に従い行うことができる。

変異型RETの有無をPCRで解析するために、プライマーの配列は、常法に従い設計することができる。プライマーの配列は、例えば、Primer Expression (Perkin-Elmer Applied Biosystems) を用いて設計することができる。

また、変異型RETの有無をPCRで解析するために、例えば、表1に記載のプライマーを用いることができる。例えば、RET/PTC1を解析するためには、配列番号：5および6に記載の配列からなるポリヌクレオチドをプライマーとすることができる。

【表1】

表1

解析対象となる変異型	プライマー1	プライマー2
RET		
RET/PTC1	配列番号：5	配列番号：6
RET/PTC2	配列番号：7	配列番号：6
RET/PTC3	配列番号：8	配列番号：9
RET/PTC4	配列番号：10	配列番号：11
RET/PTC5	配列番号：12	配列番号：13
RET/PTC6	配列番号：12	配列番号：14
RET/PTC7	配列番号：12	配列番号：15
RET/PTC8	配列番号：12	配列番号：16
RET/ELKS	配列番号：17	配列番号：18
RET/PCM-1	配列番号：19	配列番号：20

表1は、解析対象となる変異型RETに対するプライマーの一例を示したものである。

以下に、配列番号：5～20に記載の塩基配列を示す。

配列番号：5 A T T G T C A T C T C G C C G T T C

配列番号：6 T G C T T C A G G A C G T T G A A C

配列番号：7 T A T C G C A G G A G A G A C T G T G A T

配列番号：8 T G G A G A A G A G A G G C T G T A T C

配列番号：9 C G T T G C C T T G A C T T T T C

配列番号：10 T G C C C C T T C A G T G T T C C T A C T

10

20

30

40

50

配列番号：11 C T T G A T A A C A C T G G C A G G T T
 配列番号：12 G A G G C G T T C T C T T T C A G C A T
 配列番号：13 T G G A A G A A C T T C G G C A T G A G
 配列番号：14 G A A T T C A C A G C C A C C A A G T G
 配列番号：15 C T A C T T A G C T T T C C A A G T G G
 配列番号：16 G G G A C A G A C A C C T T T G G A A A T A
 配列番号：17 G T T G A A G G A G T C C T T G A C T G
 配列番号：18 C T T T C A G C A T C T T C A C G G
 配列番号：19 A G T G A A G T T T C T A C C A T C C
 配列番号：20 G G C G T T C T C T T T C A G C A T C T

10

(3) 変異型RETを発現している細胞

本発明において、変異型RETを発現している細胞は、好ましくは多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫の細胞である。また、本発明において、変異型RETを発現している細胞は、好ましくは甲状腺癌の細胞である。

(4) 本発明のRETキナーゼ阻害物質

本明細書において、「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を意味する。

「ハロゲン原子」の好適な例としては、フッ素原子、塩素原子をあげることができる。

20

本明細書において、「 C_{1-6} アルキル基」とは、炭素数が1~6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル基を意味し、具体例としては、メチル基、エチル基、1-プロピル基(n-プロピル基)、2-プロピル基(i-プロピル基)、2-メチル-1-プロピル基(i-ブチル基)、2-メチル-2-プロピル基(t-ブチル基)、1-ブチル基(n-ブチル基)、2-ブチル基(s-ブチル基)、1-ペンチル基、2-ペンチル基、3-ペンチル基、2-メチル-1-ブチル基、3-メチル-1-ブチル基、2-メチル-2-ブチル基、3-メチル-2-ブチル基、2,2-ジメチル-1-プロピル基、1-ヘキシル基、2-ヘキシル基、3-ヘキシル基、2-メチル-1-ペンチル基、3-メチル-1-ペンチル基、4-メチル-1-ペンチル基、2-メチル-2-ペンチル基、3-メチル-2-ペンチル基、4-メチル-2-ペンチル基、2-メチル-3-ペンチル基、3-メチル-3-ペンチル基、2,3-ジメチル-1-ブチル基、3,3-ジメチル-1-ブチル基、2,2-ジメチル-1-ブチル基、2-エチル-1-ブチル基、3,3-ジメチル-2-ブチル基、2,3-ジメチル-2-ブチル基などがあげられる。

30

「 C_{1-6} アルキル基」の好適な例としては、メチル基、エチル基、1-プロピル基、2-プロピル基、2-メチル-1-プロピル基、2-メチル-2-プロピル基、1-ブチル基、2-ブチル基をあげることができる。

本明細書において、「 C_{1-6} アルキレン基」とは、上記定義「 C_{1-6} アルキル基」からさらに任意の水素原子を1個除いて誘導される二価の基を意味し、具体例としては、メチレン基、1,2-エチレン基、1,1-エチレン基、1,3-プロピレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基などがあげられる。

40

本明細書において、「 C_{2-6} アルケニル基」とは、二重結合を1個有する、炭素数が2~6個の直鎖状または分枝鎖状のアルケニル基を意味し、具体例としては、エテニル基(ビニル基)、1-プロベニル基、2-プロベニル基(アリル基)、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基などがあげられる。

本明細書において、「 C_{2-6} アルキニル基」とは、三重結合を1個有する、炭素数が2~6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキニル基を意味し、具体例としては、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、1-ブチニル基、2-ブチニル基、3-ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基などがあげられる。

本明細書において、「 C_{3-8} シクロアルキル基」とは、炭素数が3~8個の単環または二環の飽和脂肪族炭化水素基を意味し、具体例としては、シクロプロピル基、シクロブ

50

チル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基、ピシクロ[2.1.0]ペンチル基、ピシクロ[3.1.0]ヘキシル基、ピシクロ[2.1.1]ヘキシル基、ピシクロ[4.1.0]ヘプチル基、ピシクロ[2.2.1]ヘプチル基(ノルボルニル基)、ピシクロ[3.3.0]オクチル基、ピシクロ[3.2.1]オクチル基、ピシクロ[2.2.2]オクチル基などがあげられる。

「C₃₋₈シクロアルキル基」の好適な例としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基をあげることができる。

本明細書において、「C₆₋₁₀アリール基」とは、炭素数が6~10個の芳香族性の炭化水素環式基を意味し、具体例としては、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、インデニル基、アズレニル基などがあげられる。

10

「C₆₋₁₀アリール基」の好適な例としては、フェニル基をあげることができる。

本明細書において、「ヘテロ原子」とは、窒素原子、酸素原子または硫黄原子を意味する。

本明細書において、「5~10員ヘテロアリール基」とは、環を構成する原子の数が5~10個であり、環を構成する原子中に1~5個のヘテロ原子を含有する芳香族性の環式基を意味し、具体例としては、フリル基、チエニル基、ピロリル基、イミダゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、チアゾリル基、ピラゾリル基、オキサゾリル基、イソオキサゾリル基、イソチアゾリル基、フラザニル基、チアジアゾリル基、オキサジアゾリル基、ピリジル基、ピラジニル基、ピリダジニル基、ピリミジニル基、トリアジニル基、プリニル基、プテリジニル基、キノリル基、イソキノリル基、ナフチリジニル基、キノキサリニル基、シンノリニル基、キナゾリニル基、フタラジニル基、イミダゾピリジル基、イミダゾチアゾリル基、イミダゾオキサゾリル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンズイミダゾリル基、インドリル基、イソインドリル基、インダゾリル基、ピロピリジル基、チエノピリジル基、フロピリジル基、ベンゾチアジアゾリル基、ベンゾオキサジアゾリル基、ピリドピリミジニル基、ベンゾフリル基、ベンゾチエニル基、チエノフリル基などがあげられる。

20

「5~10員ヘテロアリール基」の好適な例としては、フリル基、チエニル基、ピロリル基、イミダゾリル基、チアゾリル基、ピラゾリル基、オキサゾリル基、イソオキサゾリル基、イソチアゾリル基、ピリジル基、ピリミジニル基をあげることができる。

本明細書において、「3~10員非芳香族ヘテロ環式基」とは、

30

- (a) 環を構成する原子の数が3~10個であり、
- (b) 環を構成する原子中に1~2個のヘテロ原子を含有し、
- (c) 環中に二重結合を1~2個含んでいてもよく、
- (d) 環中にカルボニル基、スルフィニル基またはスルホニル基を1~3個含んでいてもよい、
- (e) 単環式または二環式である非芳香族性の環式基を意味し、環を構成する原子中に窒素原子を含有する場合、窒素原子から結合手が出ていてもよい。

具体例としては、アジリジニル基、アゼチジニル基、ピロリジニル基、ピペリジニル基、アゼパニル基、アゾカニル基、ピペラジニル基、ジアゼパニル基、ジアゾカニル基、ジアザピシクロ[2.2.1]ヘプチル基、モルホリニル基、チオモルホリニル基、1,1-ジオキソチオモルホリニル基、オキシラニル基、オキセタニル基、テトラヒドロフリル基、ジオキソラニル基、テトラヒドロピラニル基、ジオキサニル基、テトラヒドロチエニル基、テトラヒドロチオピラニル基、オキサゾリジニル基、チアゾリジニル基などがあげられる。

40

「3~10員非芳香族ヘテロ環式基」の好適な例としては、アジリジニル基、アゼチジニル基、ピロリジニル基、ピペリジニル基、アゼパニル基、ピペラジニル基、ジアゼパニル基、モルホリニル基、チオモルホリニル基、1,1-ジオキソチオモルホリニル基、テトラヒドロフリル基、テトラヒドロピラニル基をあげることができる。

本明細書において、「C₁₋₆アルコキシ基」とは、上記定義「C₁₋₆アルキル基」の末端に酸素原子が結合した基であることを意味し、具体例としては、メトキシ基、エト

50

キシ基、1 - プロポキシ基 (n - プロポキシ基)、2 - プロポキシ基 (i - プロポキシ基)、2 - メチル - 1 - プロポキシ基 (i - ブトキシ基)、2 - メチル - 2 - プロポキシ基 (t - ブトキシ基)、1 - ブトキシ基 (n - ブトキシ基)、2 - ブトキシ基 (s - ブトキシ基)、1 - ペンチルオキシ基、2 - ペンチルオキシ基、3 - ペンチルオキシ基、2 - メチル - 1 - ブトキシ基、3 - メチル - 1 - ブトキシ基、2 - メチル - 2 - ブトキシ基、3 - メチル - 2 - ブトキシ基、2, 2 - ジメチル - 1 - プロポキシ基、1 - ヘキシルオキシ基、2 - ヘキシルオキシ基、3 - ヘキシルオキシ基、2 - メチル - 1 - ペンチルオキシ基、3 - メチル - 1 - ペンチルオキシ基、4 - メチル - 1 - ペンチルオキシ基、2 - メチル - 2 - ペンチルオキシ基、3 - メチル - 2 - ペンチルオキシ基、4 - メチル - 2 - ペンチルオキシ基、2 - メチル - 3 - ペンチルオキシ基、3 - メチル - 3 - ペンチルオキシ基、2, 3 - ジメチル - 1 - ブトキシ基、3, 3 - ジメチル - 1 - ブトキシ基、2, 2 - ジメチル - 1 - ブトキシ基、2 - エチル - 1 - ブトキシ基、3, 3 - ジメチル - 2 - ブトキシ基、2, 3 - ジメチル - 2 - ブトキシ基などがあげられる。

10

「C₁₋₆ アルコキシ基」の好適な例としては、メトキシ基、エトキシ基、1 - プロポキシ基、2 - プロポキシ基、2 - メチル - 1 - プロポキシ基、2 - メチル - 2 - プロポキシ基、1 - ブトキシ基、2 - ブトキシ基をあげることができる。

本明細書において、「C₁₋₆ アルキルチオ基」とは、上記定義「C₁₋₆ アルキル基」の末端に硫黄原子が結合した基であることを意味し、具体例としては、メチルチオ基、エチルチオ基、1 - プロピルチオ基 (n - プロピルチオ基)、2 - プロピルチオ基 (i - プロピルチオ基)、2 - メチル - 1 - プロピルチオ基 (i - ブチルチオ基)、2 - メチル - 2 - プロピルチオ基 (t - ブチルチオ基)、1 - ブチルチオ基 (n - ブチルチオ基)、2 - ブチルチオ基 (s - ブチルチオ基)、1 - ペンチルチオ基、2 - ペンチルチオ基、3 - ペンチルチオ基、2 - メチル - 1 - ブチルチオ基、3 - メチル - 1 - ブチルチオ基、2 - メチル - 2 - ブチルチオ基、3 - メチル - 2 - ブチルチオ基、2, 2 - ジメチル - 1 - プロピルチオ基、1 - ヘキシルチオ基、2 - ヘキシルチオ基、3 - ヘキシルチオ基、2 - メチル - 1 - ペンチルチオ基、3 - メチル - 1 - ペンチルチオ基、4 - メチル - 1 - ペンチルチオ基、2 - メチル - 2 - ペンチルチオ基、3 - メチル - 2 - ペンチルチオ基、4 - メチル - 2 - ペンチルチオ基、2 - メチル - 3 - ペンチルチオ基、3 - メチル - 3 - ペンチルチオ基、2, 3 - ジメチル - 1 - ブチルチオ基、3, 3 - ジメチル - 1 - ブチルチオ基、2, 2 - ジメチル - 1 - ブチルチオ基、2 - エチル - 1 - ブチルチオ基、3, 3 - ジメチル - 2 - ブチルチオ基、2, 3 - ジメチル - 2 - ブチルチオ基などがあげられる。

20

30

「C₁₋₆ アルキルチオ基」の好適な例としては、メチルチオ基、エチルチオ基、1 - プロピルチオ基 (n - プロピルチオ基)、2 - プロピルチオ基 (i - プロピルチオ基)、2 - メチル - 1 - プロピルチオ基 (i - ブチルチオ基)、2 - メチル - 2 - プロピルチオ基 (t - ブチルチオ基)、1 - ブチルチオ基 (n - ブチルチオ基)、2 - ブチルチオ基 (s - ブチルチオ基) をあげることができる。

本明細書において、「C₃₋₈ シクロアルコキシ基」とは、上記定義「C₃₋₈ シクロアルキル基」の末端に酸素原子が結合した基であることを意味し、具体例としては、シクロプロポキシ基、シクロブトキシ基、シクロペンチルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基、シクロヘプチルオキシ基、シクロオクチルオキシ基、ピシクロ [2.1.0] ペンチルオキシ基、ピシクロ [3.1.0] ヘキシルオキシ基、ピシクロ [2.1.1] ヘキシルオキシ基、ピシクロ [4.1.0] ヘプチルオキシ基、ピシクロ [2.2.1] ヘプチルオキシ基 (ノルボルニルオキシ基)、ピシクロ [3.3.0] オクチルオキシ基、ピシクロ [3.2.1] オクチルオキシ基、ピシクロ [2.2.2] オクチルオキシ基などがあげられる。

40

「C₃₋₈ シクロアルコキシ基」の好適な例としては、シクロプロポキシ基、シクロブトキシ基、シクロペンチルオキシ基をあげることができる。

本明細書において、「モノ - C₁₋₆ アルキルアミノ基」とは、アミノ基中の1個の水素原子を、上記定義「C₁₋₆ アルキル基」で置換した基を意味し、具体例としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基、1 - プロピルアミノ基 (n - プロピルアミノ基)、2 -

50

プロピルアミノ基 (i - プロピルアミノ基)、2 - メチル - 1 - プロピルアミノ基 (i - ブチルアミノ基)、2 - メチル - 2 - プロピルアミノ基 (t - ブチルアミノ基)、1 - ブチルアミノ基 (n - ブチルアミノ基)、2 - ブチルアミノ基 (s - ブチルアミノ基)、1 - ペンチルアミノ基、2 - ペンチルアミノ基、3 - ペンチルアミノ基、2 - メチル - 1 - ブチルアミノ基、3 - メチル - 1 - ブチルアミノ基、2 - メチル - 2 - ブチルアミノ基、3 - メチル - 2 - ブチルアミノ基、2, 2 - ジメチル - 1 - プロピルアミノ基、1 - ヘキシルアミノ基、2 - ヘキシルアミノ基、3 - ヘキシルアミノ基、2 - メチル - 1 - ペンチルアミノ基、3 - メチル - 1 - ペンチルアミノ基、4 - メチル - 1 - ペンチルアミノ基、2 - メチル - 2 - ペンチルアミノ基、3 - メチル - 2 - ペンチルアミノ基、4 - メチル - 2 - ペンチルアミノ基、2 - メチル - 3 - ペンチルアミノ基、3 - メチル - 3 - ペンチルアミノ基、2, 3 - ジメチル - 1 - ブチルアミノ基、3, 3 - ジメチル - 1 - ブチルアミノ基、2, 2 - ジメチル - 1 - ブチルアミノ基、2 - エチル - 1 - ブチルアミノ基、3, 3 - ジメチル - 2 - ブチルアミノ基、2, 3 - ジメチル - 2 - ブチルアミノ基などがあげられる。

10

本明細書において、「ジ - C₁₋₆ アルキルアミノ基」とは、アミノ基中の 2 個の水素原子を、それぞれ同一のまたは異なる、上記定義「C₁₋₆ アルキル基」で置換した基を意味し、具体例としては、N, N - ジメチルアミノ基、N, N - ジエチルアミノ基、N, N - ジ - n - プロピルアミノ基、N, N - ジ - i - プロピルアミノ基、N, N - ジ - n - ブチルアミノ基、N, N - ジ - i - ブチルアミノ基、N, N - ジ - s - ブチルアミノ基、N, N - ジ - t - ブチルアミノ基、N - エチル - N - メチルアミノ基、N - n - プロピル - N - メチルアミノ基、N - i - プロピル - N - メチルアミノ基、N - n - ブチル - N - メチルアミノ基、N - i - ブチル - N - メチルアミノ基、N - s - ブチル - N - メチルアミノ基、N - t - ブチル - N - メチルアミノ基などがあげられる。

20

本明細書において、「C₂₋₇ アシル基」とは、上記定義の「C₁₋₆ アルキル基」が結合したカルボニル基であることを意味し、具体例としては、例えば、アセチル基、プロピオニル基、イソプロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基などがあげられる。

本明細書において、「C₂₋₇ アルコキシカルボニル基」とは、上記定義の「C₁₋₆ アルコキシ基」が結合したカルボニル基であることを意味し、具体例としては、例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、1 - プロピルオキシカルボニル基、2 - プロピルオキシカルボニル基、2 - メチル - 2 - プロポキシカルボニル基などがあげられる。

30

本明細書において、「置換基を有していてもよい」とは、「置換可能な部位に、任意に組み合わせて 1 または複数個の置換基を有していてもよい」ことを意味し、置換基の具体例としては、例えば、ハロゲン原子、水酸基、チオール基、ニトロ基、シアノ基、ホルミル基、カルボキシル基、アミノ基、シリル基、メタンスルホニル基、C₁₋₆ アルキル基、C₂₋₆ アルケニル基、C₂₋₆ アルキニル基、C₃₋₈ シクロアルキル基、C₆₋₁₀ アリール基、5 ~ 10 員ヘテロアリール基、3 ~ 10 員非芳香族ヘテロ環式基、C₁₋₆ アルコキシ基、C₁₋₆ アルキルチオ基、C₃₋₈ シクロアルコキシ基、モノ - C₁₋₆ アルキルアミノ基、ジ - C₁₋₆ アルキルアミノ基、C₂₋₇ アシル基または C₂₋₇ アルコキシカルボニル基などをあげることができる。ただし、C₁₋₆ アルキル基、C₂₋₆ アルケニル基、C₂₋₆ アルキニル基、C₃₋₈ シクロアルキル基、C₆₋₁₀ アリール基、5 ~ 10 員ヘテロアリール基、3 ~ 10 員非芳香族ヘテロ環式基、C₁₋₆ アルコキシ基、C₁₋₆ アルキルチオ基、C₃₋₈ シクロアルコキシ基、モノ - C₁₋₆ アルキルアミノ基、ジ - C₁₋₆ アルキルアミノ基、C₂₋₇ アシル基および C₂₋₇ アルコキシカルボニル基はそれぞれ独立して下記置換基群からなる群から選ばれる 1 ~ 3 個の基を有していてもよい。

40

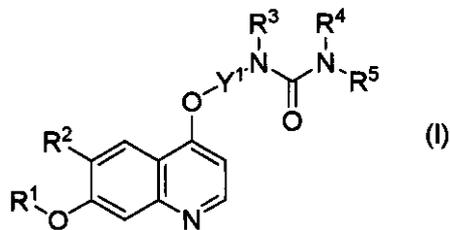
< 置換基群 >

ハロゲン原子、水酸基、チオール基、ニトロ基、シアノ基、C₁₋₆ アルキル基、C₃₋₈ シクロアルキル基、C₂₋₆ アルケニル基、C₂₋₆ アルキニル基、C₆₋₁₀ アリー

50

ル基、5～10員ヘテロアリール基、3～10員非芳香族ヘテロ環式基、 C_{1-6} アルコキシ基および C_{1-6} アルキルチオ基。

本発明において、RETキナーゼ阻害物質は、例えば、一般式(I)



10

で表される化合物を挙げることができる。

(i) R^1

R^1 は、式 $-V^1-V^2-V^3$ (式中、 V^1 は、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキレン基を意味する； V^2 は、単結合、酸素原子、硫黄原子、カルボニル基、スルフィニル基、スルホニル基、式 $-CONR^6-$ で表される基、式 $-SO_2NR^6-$ で表される基、式 $-NR^6SO_2-$ で表される基、式 $-NR^6CO-$ で表される基または式 $-NR^6-$ で表される基を意味する(式中、 R^6 は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基または置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基を意味する。))

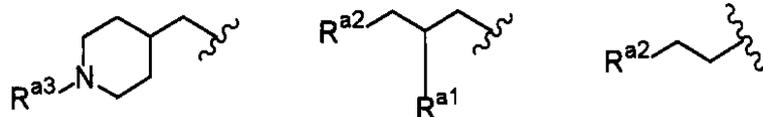
20

； V^3 は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルケニル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルキニル基、置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C_{6-10} アリール基、置換基を有していてもよい5～10員ヘテロアリール基または置換基を有していてもよい3～10員非芳香族ヘテロ環式基を意味する。)で表される基を意味する。

R^1 の好適な例としては、 C_{1-6} アルキル基があげられる。ただし、この場合、 R^1

30

は、 C_{1-6} アルキル基を有していてもよい3～10員非芳香族ヘテロ環式基、水酸基、 C_{1-6} アルコキシ基、アミノ基、モノ- C_{1-6} アルキルアミノ基およびジ- C_{1-6} アルキルアミノ基から選ばれる置換基を有していてもよい。



(式中、 R^{a3} はメチル基を意味する； R^{a1} は水素原子または水酸基を意味する； R^{a2} は、メトキシ基、エトキシ基、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、4-モルホリニル基、ジメチルアミノ基またはジエチルアミノ基を意味する。)のいずれかで表される基があげられる。

R^1 のさらに好適な例としては、メチル基または2-メトキシエチル基があげられる。

40

(ii) R^2

R^2 は、シアノ基、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルコキシ基、カルボキシル基、置換基を有していてもよい C_{2-7} アルコキシカルボニル基または式 $-CONV^{a11}V^{a12}$ (式中、 V^{a11} は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルケニル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルキニル基、置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C_{6-10} アリール基、置換基を有していてもよい5～10員ヘテロアリール基または置換基を有していてもよい3～10員非芳香族ヘテロ環式基を意味する； V^{a12} は、水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルケニル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルキニル基、置換基を有

50

していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C_{6-10} アリー
ル基、置換基を有していてもよい5～10員ヘテロアリール基、置換基を有していてもよ
い3～10員非芳香族ヘテロ環式基、水酸基、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルコ
キシ基または置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルコキシ基を意味する。)で表
される基を意味する。

R^2 の好適な例としては、シアノ基または式 $-CONV^{a11}V^{a12}$ (式中、 V^{a11}
 1 および V^{a12} は、前記定義と同じ意味である。)で表される基があげられる。

R^2 のより好適な例としては、シアノ基または式 $-CONHV^{a16}$ (式中、 V^{a16}
は、水素原子、 C_{1-6} アルキル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基
または C_{3-8} シクロアルコキシ基を意味する。ただし、 V^{a16} は、ハロゲン原子、シ
アノ基、水酸基および C_{1-6} アルコキシ基から選ばれる置換基を有していてもよい。) 10
で表される基があげられる。

R^2 のさらに好適な例としては、式 $-CONHV^{a17}$ (式中、 V^{a17} は、水素原子
、 C_{1-6} アルキル基または C_{1-6} アルコキシ基を意味する。)で表される基があげら
れる。

R^2 のもっとも好適な例としては、式 $-CONHV^{a18}$ (式中、 V^{a18} は、水素原
子、メチル基またはメトキシ基を意味する。)で表される基があげられる。

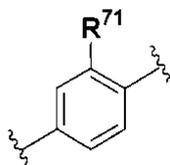
(iii) Y^1

Y^1 は、式



(式中、 R^7 および R^8 は、それぞれ独立して水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、ニト
ロ基、アミノ基、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有していても
よい C_{3-8} シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルコキシ基、置換
基を有していてもよい C_{1-6} アルキルチオ基、ホルミル基、置換基を有していてもよい 30
 C_{2-7} アシル基、置換基を有していてもよい C_{2-7} アルコキシカルボニル基または式
 $-CONV^{d1}V^{d2}$ (式中、 V^{d1} および V^{d2} は、それぞれ独立して水素原子または
置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する。)で表される基を意味する；
 W^1 および W^2 は、それぞれ独立して置換基を有していてもよい炭素原子または窒素原子
を意味する。)で表される基を意味する。

Y^1 の好適な例としては、式



(式中、 R^{71} は、水素原子またはハロゲン原子を意味する。)で表される基があげられ
る。

(iv) R^3 および R^4

R^3 および R^4 は、それぞれ独立して水素原子、置換基を有していてもよい C_{1-6} ア
ルキル基、置換基を有していてもよい C_{2-6} アルケニル基、置換基を有していてもよ
い C_{2-6} アルキニル基、置換基を有していてもよい C_{3-8} シクロアルキル基、置換基を
有していてもよい C_{2-7} アシル基または置換基を有していてもよい C_{2-7} アルコキシ 50

カルボニル基を意味する。

R³ および R⁴ の好適な例としては、水素原子があげられる。

(v) R⁵

R⁵ は、水素原子、置換基を有していてもよい C₁₋₆ アルキル基、置換基を有していてもよい C₂₋₆ アルケニル基、置換基を有していてもよい C₂₋₆ アルキニル基、置換基を有していてもよい C₃₋₈ シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C₆₋₁₀ アリール基、置換基を有していてもよい 5 ~ 10 員ヘテロアリール基、置換基を有していてもよい 3 ~ 10 員非芳香族ヘテロ環式基を意味する。

R⁵ の好適な例としては、水素原子、置換基を有していてもよい C₁₋₆ アルキル基、置換基を有していてもよい C₂₋₆ アルケニル基、置換基を有していてもよい C₂₋₆ アルキニル基、置換基を有していてもよい C₃₋₈ シクロアルキル基、置換基を有していてもよい C₆₋₁₀ アリール基、置換基を有していてもよい 3 ~ 10 員非芳香族ヘテロ環式基があげられる。

R⁵ のより好適な例としては、水素原子、C₁₋₆ アルキル基、C₃₋₈ シクロアルキル基または C₆₋₁₀ アリール基（ただし、R⁵ は、ハロゲン原子およびメタンスルホニル基からなる群から選ばれる少なくとも一つの置換基を有していてもよい）があげられる。

R⁵ のさらに好適な例としては、メチル基、エチル基またはシクロプロピル基があげられる。

また、一般式 (I) で表される化合物の好適な例としては、

N - (4 - (6 - シアノ - 7 - (2 - メトキシエトキシ) - 4 - キノリル) オキシ - 2 - フルオロフェニル) - N' - (4 - フルオロフェニル) ウレア、

N - (2 - クロロ - 4 - ((6 - シアノ - 7 - ((1 - メチル - 4 - ピペリジル) メトキシ) - 4 - キノリル) オキシ) フェニル) - N' - シクロプロピルウレア、

N - (4 - ((6 - シアノ - 7 - (((2 R) - 3 - (ジエチルアミノ) - 2 - ヒドロキシプロピル) オキシ) - 4 - キノリル) オキシ) フェニル) - N' - (4 - フルオロフェニル) ウレア、

N - (4 - ((6 - シアノ - 7 - (((2 R) - 2 - ヒドロキシ - 3 - (1 - ピロリジノ) プロピル) オキシ) - 4 - キノリル) オキシ) フェニル) - N' - (4 - フルオロフェニル) ウレア、

4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - (2 - メトキシエトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - シクロプロピル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - (2 - メトキシエチル) - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - (2 - フルオロエチル) - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - メトキシ - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - エチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

4 - (3 - フルオロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - (2 - メトキシエトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、

4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - (2 - ヒドロキシエトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、

10

20

30

40

50

- 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - ((2S) - 2, 3 - ジヒドロキシプロピル)オキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - (メチルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - (エチルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メトキシ - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((エチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - (2 - エトキシエトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (4 - ((シクロプロピルアミノ)カルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - (2 - メトキシエトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N - (2 - フルオロ - 4 - ((6 - カルバモイル - 7 - メトキシ - 4 - キノリル)オキシ)フェニル) - N' - シクロプロピルウレア、
- N6 - (2 - ヒドロキシエチル) - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - (1 - プロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - (cis - 2 - フルオロ - シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - (2 - メトキシエトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((エチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - (2 - (4 - モルホリノ)エトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - (2 - フルオロエチルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - ((2R) テトラヒドロ - 2 - フラニルメチル) - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((メチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - フルオロ - 4 - (エチルアミノカルボニル)アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - ((シクロプロピルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - ((2R) - 2 - ヒドロキシ - 3 - (1 - ピロリジノ)プロポキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((メチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - ((2R) - 3 - ジエチルアミノ - 2 - ヒドロキシプロポキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((エチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - ((2R) - 3 - ジエチルアミノ - 2 - ヒドロキシプロポキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((メチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - ((2R) - 2 - ヒドロキシ - 3 - (1 - ピロリジノ)プロポキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((エチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - ((2R) - 2 - ヒドロキシ - 3 - (1 - ピロリジノ)プロポキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、
- N6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((メチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ) - 7 - ((1 - メチル - 4 - ピペリジル)メトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、

サミド、

N 6 - メチル - 4 - (3 - クロロ - 4 - ((エチルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - ((1 - メチル - 4 - ピペリジル) メトキシ) - 6 - キノリンカルボキサミド、

N - (4 - (6 - シアノ - 7 - (2 - メトキシエトキシ) - 4 - キノリル) オキシ - 2 - フルオロフェニル) - N - シクロプロピルウレア、

N - (4 - (6 - シアノ - 7 - (3 - (4 - モルホリノ) プロポキシ) - 4 - キノリル) オキシフェニル) - N - (3 - (メチルスルホニル) フェニル) ウレア、

4 - (4 - ((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

4 - (3 - フルオロ - 4 - ((2 - フルオロエチルアミノ) カルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - (2 - エトキシエチル) - 4 - (3 - クロロ - 4 - (((メチルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

4 - (4 - (3 - エチルウレイド) - 3 - フルオロ - フェノキシ) - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシリック アシッド (2 - シアノエチル) アミドおよび

N - (4 - (6 - (2 - シアノエチル) カルバモイル - 7 - メトキシ - 4 - キノリル) オキシ - 2 - フルオロフェニル) - N ' - シクロプロピルウレア

を挙げることができる。

さらに、一般式 (I) で表される化合物のより好適な例としては、

4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

4 - (3 - クロロ - 4 - (エチルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

N 6 - メトキシ - 4 - (3 - クロロ - 4 - (((シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド、

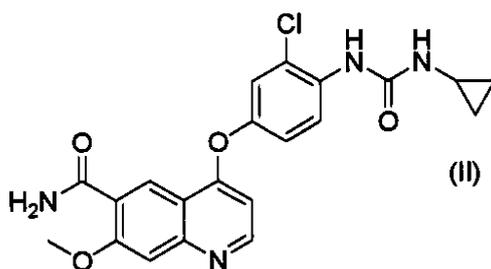
4 - (3 - クロロ - 4 - (メチルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド

および

N 6 - メトキシ - 4 - (3 - クロロ - 4 - (((エチルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドを挙げることができる。

また、一般式 (I) で表される化合物のさらに好適な例としては、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド (式 (II) 参照) を挙げることができる。

RETキナーゼ阻害物質の最も好適な例としては、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドのメタンサルホン酸塩を挙げることができる。



一般式 (I) で表される化合物は、公知の方法で製造でき、例えば、国際公開第 0 2 / 3 2 8 7 2 号パンフレット (W O 0 2 / 3 2 8 7 2) および国際公開第 2 0 0 5 / 0 6 3

10

20

30

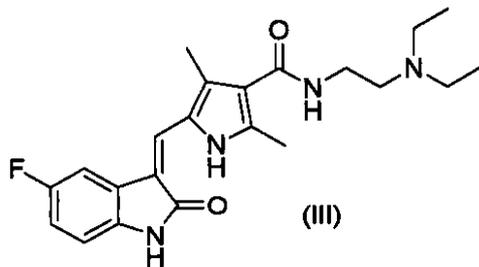
40

50

713号パンフレット(WO2005/063713)に記載された方法によって製造することができる。

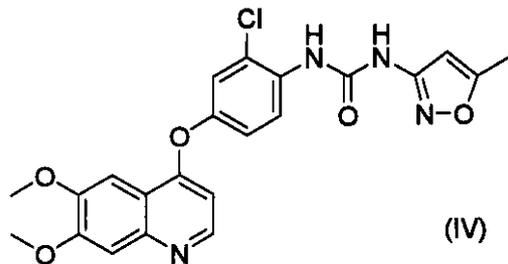
また、本発明において、RETキナーゼ阻害物質は、例えば、

5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロインドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキシリックアシッド(2-ジエチルアミノエチル)アミド(以下、「SU11248」ともいう。Clinical Cancer Research, 9, 327-337, 2003、Journal of Medicinal Chemistry, 46:1116-9, 2003、WO01/060814)(式(III)参照)、



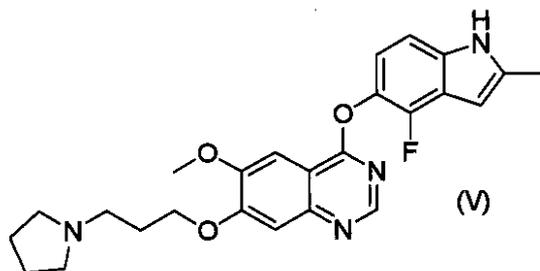
10

N-{2-クロロ-4-[(6,7-ジメトキシ-4-キノリル)オキシ]フェニル}-N'-(5-メチル-3-イソキサゾリル)ウレア(以下、「KRN951」ともいう。WO02/088110)(式(IV)参照)、



30

4-[(4-フルオロ-2-メチルインドール-5-イル)オキシ]-6-メトキシ-7-[3-(ピロリジン-1-イル)プロポキシ]キナゾリン(以下、「AZD2171」ともいう。Cancer Research, 65:4389-400, 2005、WO00/47212)(式(V)参照)、



40

などを挙げることができる。

SU11248、KRN951およびAZD2171は、公知の方法で製造することができる。例えば、それぞれの文献に記載された方法で製造することができる。

本発明において、RETキナーゼ阻害物質は、酸または塩基と薬理的に許容される塩

50

を形成する場合もある。本発明における上記RETキナーゼ阻害物質は、これらの薬理的に許容される塩をも包含する。酸との塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩などの無機酸塩およびギ酸、酢酸、乳酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、クエン酸、酒石酸、ステアリン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸などの有機酸塩などを挙げることができる。また、塩基との塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、アルギニン、リジンなどの有機塩基塩、アンモニウム塩などを挙げることができる。

10

また、本発明において、RETキナーゼ阻害物質は、これら化合物の溶媒和物および光学異性体が存在する場合には、それらの溶媒和物および光学異性体が含まれる。溶媒和物は、例えば、水和物、非水和物などを挙げることができ、好ましくは水和物を挙げることができる。溶媒は、例えば、水、アルコール（例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール）、ジメチルホルムアミドなどを挙げることができる。

さらに、本発明において、RETキナーゼ阻害物質は、結晶でも無結晶でもよく、また、結晶多形が存在する場合には、それらのいずれかの結晶形の単一物であっても混合物であってもよい。

また、本発明において、RETキナーゼ阻害物質は、生体内で酸化、還元、加水分解、抱合などの代謝を受けるRETキナーゼ阻害物質をも包含する。また、本発明において、RETキナーゼ阻害物質は、生体内で酸化、還元、加水分解などの代謝を受けてRETキナーゼ阻害物質を生成する化合物をも包含する。

20

なお、本発明のRETキナーゼ阻害物質は、RETキナーゼ活性を阻害する活性（「RETキナーゼ阻害活性」とも称する場合がある）を有するものである。本発明のRETキナーゼ阻害物質は、RETの有するキナーゼ活性を阻害する作用を有すればよく、その阻害の程度には限定されない。RETキナーゼ阻害物質の有するRETキナーゼ阻害活性の測定方法は、例えば、Cell freeキナーゼアッセイ、ウエスタンブロット、細胞増殖アッセイ、生存アッセイなどがあげられる。細胞増殖アッセイは、例えば、トリチウムチミジン取り込み法、MTT法、XTT法（cell counting kit-8（同仁化学株式会社））、アラマーブルー法、ニュートラルレッド法、BrdU法、Ki 67染色法、PCNA染色法などがあげられる。生存アッセイは、例えば、TUNNEL染色法、Caspase-3切断検出法、PARP切断検出法などがあげられる。これらの方法は、常法に従い行うことができる（Blood, 2005, 105, 2941-2948., Molecular Cancer Therapeutics, 2005, 4, 787-798.）。

30

以下、RETキナーゼ阻害活性の測定方法の一例について記載する。

RETキナーゼ阻害活性は、Cell freeキナーゼアッセイによって測定することができる。

RETは、常法に従い遺伝子工学的手法により作製することができる。例えば、Baculovirus Expression Systemの方法により、昆虫細胞（Spodoptera frugiperda 9 (Sf9)）にヒトリコンビナントGST融合タンパク質、ヒトリコンビナントヒスチンタグ融合タンパク質などとして発現させることができる。また、発現させたりコンビナントタンパク質は、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、GSH-agarose（シグマ社製）またはNi-NTH-agarose（キアゲン社製）など）により精製することができる。タンパク質の純度および同定は、SDS-PAGE、銀染色およびRETに対する特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより確認することができる。

40

Cell freeキナーゼアッセイは、以下の通りに行うことができる。

まず、プレート（例えば、96ウエル、384ウエルなど）の各ウエルに、標準反応液20 μl、ATP溶液5 μl、被検物質5 μl、RETリコンビナントタンパク質50 n

50

gを含む溶液10 μ lおよびビオチン化修飾Poly(Glu, Tyr)₄:1125ngを含む溶液10 μ lの混合溶液を順次加えることができる。

このキナーゼ反応液50 μ lには、60mM HEPES-NaOH(pH7.5)、3mM MgCl₂、3mM MnCl₂、3 μ M Na-orthovanadate、1.2mM DTT、50 μ g/ml PEG₂₀₀₀₀、1 μ M ATPなどを含ませることができる。このとき、ATPは、[⁻³²P]-ATP、[⁻³³P]-ATPなどの放射性同位体で標識したATPを用いることができる。

反応液を、所定の時間インキュベーションした後、2%(v/v)H₃PO₄溶液50 μ lを添加することにより反応を停止させることができる。

各ウエルは、適宜洗浄操作を行うことができる。

10

ATPの取り込み量を測定することによりRETキナーゼ阻害活性を評価することができる。上記の放射性同位体標識ATPを用いた場合は、ATPの取り込み量は、プレート上に捕捉された放射活性をシンチレーションカウンターで測定することで評価することができる。

上記の方法により、化合物のRETキナーゼ阻害活性を評価することができる。

(5) 治療剤、医薬組成物、治療方法

本発明の治療剤は、RETキナーゼ阻害物質を含有するものであり、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスブルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤である。また、本発明の治療剤は、RETキナーゼ阻害物質を含有するものであり、甲状腺癌に対する治療剤である。本発明の治療剤は、好ましくは変異型RETを発現している細胞を含む疾患に対して使用される。

20

本発明の治療剤は、上記疾患の治療の必要のある生体、すなわち、哺乳動物(例、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して、投与することができる。

また、本発明の医薬組成物は、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RETキナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物である。

本発明の医薬組成物は、変異型RETを発現していることを特徴とする疾患に対する治療剤として使用することができる。変異型RETを発現していることを特徴とする疾患としては、例えば、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスブルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症、消化管の粘膜神経腫などを挙げることができる。

30

本発明の医薬組成物は、生体、すなわち、哺乳動物(例、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して、投与することができる。本発明において、当該生体は、変異型RETを発現している細胞を含む生体である。

本発明において、治療剤には、予後改善剤および再発予防剤なども含まれる。癌または腫瘍の治療剤の場合は、治療剤には、抗腫瘍剤および癌転移抑制剤なども含まれる。

治療の効果は、レントゲン写真、CT等の所見や生検の病理組織診断により、または疾患マーカーの値により確認することができる。

40

本発明の治療剤または医薬組成物を使用する場合、RETキナーゼ阻害物質の投与量は、症状の程度、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与時期、投与間隔、医薬製剤の性質、調剤、種類、有効成分の種類等によって異なり、特に限定されないが、通常成人(体重60Kg)1日あたり0.1~1000mg、好ましくは0.5~100mg、さらに好ましくは1~30mgであり、これを通常1日1~3回に分けて投与することができる。

本発明のRETキナーゼ阻害物質を有効成分として含む治療剤または医薬組成物は、そのまま用いることもできるが、通常、適当な添加剤を混和し製剤化したものを使用することもできる。

上記添加剤としては、一般に医薬に使用される、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、着

50

色剤、矯味矯臭剤、乳化剤、界面活性剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤、安定化剤、吸収促進剤等を挙げることができ、所望により、これらを適宜組み合わせ使用することもできる。以下に上記添加剤の例を挙げる。

賦形剤：乳糖、白糖、ブドウ糖、コーンスターチ、マンニトール、ソルビトール、デンプン、化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸カルシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム

結合剤：例えばポリビニルアルコール、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、マクロゴール

滑沢剤：ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、フマル酸ステアリルナトリウム、タルク、ポリエチレングリコール、コロイドシリカ

崩壊剤：結晶セルロース、寒天、ゼラチン、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、ペクチン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム

着色剤：三二酸化鉄、黄色三二酸化鉄、カルミン、カラメル、β-カロチン、酸化チタン、タルク、リン酸リボフラビンナトリウム、黄色アルミニウムレーキ等、医薬品に添加することが許可されているもの

矯味矯臭剤：ココア末、ハッカ脳、芳香散、ハッカ油、竜脳、桂皮末

乳化剤または界面活性剤：ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、モノステアリン酸グリセリン、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル

溶解補助剤：ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、安息香酸ベンジル、エタノール、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド

懸濁化剤：前記界面活性剤のほか、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子

等張化剤：ブドウ糖、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール

緩衝剤：リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液

防腐剤：メチルパラベン、プロピルパラベン、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸

抗酸化剤：硫酸塩、アスコルビン酸、α-トコフェロール

安定化剤：一般に医薬に使用されるもの

吸収促進剤：一般に医薬に使用されるもの

また、必要に応じて、ビタミン類、アミノ酸等の成分を配合してもよい。

また、上記製剤としては、錠剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤等の経口剤；坐剤、軟膏剤、眼軟膏剤、テープ剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤、ローション剤等の外用剤または注射剤を挙げることができる。

上記経口剤は、上記添加剤を適宜組み合わせ製剤化することができる。なお、必要に応じてこれらの表面をコーティングしてもよい。

上記外用剤は、上記添加剤のうち、特に賦形剤、結合剤、矯味矯臭剤、乳化剤、界面活性剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、防腐剤、抗酸化剤、安定化剤または吸収促進剤を適宜組み合わせ製剤化することができる。

上記注射剤は、上記添加剤のうち、特に乳化剤、界面活性剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤、安定化剤または吸収促進剤を適宜組み合わせ製剤化することができる。注射剤は、点滴、筋注、皮下注、皮内注、静注などの方法で使用することができる。

本発明は、RETキナーゼ阻害物質を患者に有効量投与することを特徴とする、多発性

10

20

30

40

50

内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療方法を含むものである。また、本発明は、R E T キナーゼ阻害物質を患者に有効量投与することを特徴とする甲状腺癌に対する治療方法を含むものである。

さらに、本発明は、変異型 R E T を発現している細胞を含む生体に対して R E T キナーゼ阻害物質を有効量投与することを特徴とする疾患の治療方法をも含むものである。本発明において、上記疾患は、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患であることが好ましい。

10

本発明の治療方法において、R E T キナーゼ阻害物質の投与経路および投与方法は特に限定されないが、上記本発明の治療剤または医薬組成物の記載を参照することができる。

本発明は、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤の製造のための R E T キナーゼ阻害物質の使用を含むものである。また、本発明は、甲状腺癌に対する治療剤の製造のための R E T キナーゼ阻害物質の使用を含むものである。

さらに、変異型 R E T を発現している細胞を含む生体に対して投与するための、R E T キナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物の製造のための R E T キナーゼ阻害物質の使用をも含むものである。本発明の使用において、上記医薬組成物は、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤として有用である。

20

本発明は、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤のための R E T キナーゼ阻害物質を含むものである。また、本発明は、甲状腺癌に対する治療剤のための R E T キナーゼ阻害物質を含むものである。

30

さらに、変異型 R E T を発現している細胞を含む生体に対して投与するための、R E T キナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物のための R E T キナーゼ阻害物質をも含むものである。本発明において、上記医薬組成物は、多発性内分泌腫瘍症 I I A 型、多発性内分泌腫瘍症 I I B 型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤として有用である。

また、本発明により、一般式 (I) で示される化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有する R E T キナーゼ阻害剤が提供される。

一般式 (I) で示される化合物は、上記のとおりであるが、好ましくは 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドである。

40

さらに、本発明により、5 - (5 - フルオロ - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロインドール - 3 - イリデンメチル) - 2 , 4 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - カルボキシリックアシッド (2 - ジエチルアミノエチル) アミド (S U 1 1 2 4 8)、N - { 2 - クロロ - 4 - [(6 , 7 - ジメトキシ - 4 - キノリル) オキシ] フェニル } - N ' - (5 - メチル - 3 - イソキサゾリル) ウレア (K R N 9 5 1)

および

4 - [(4 - フルオロ - 2 - メチルインドール - 5 - イル) オキシ] - 6 - メトキシ - 7 - [3 - (ピロリジン - 1 - イル) プロポキシ] キナゾリン (A Z D 2 1 7 1) からなる

50

群から選択される少なくとも一つの化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物を含有するRETキナーゼ阻害剤が提供される。

本発明のRETキナーゼ阻害剤の有するRETキナーゼ阻害活性は、前述のように測定することができる。

本発明のRETキナーゼ阻害剤は、化合物をそのまま用いることもできるし、前記の適当な添加剤を混和し、製剤化したものを使用することもできる。

本発明RETキナーゼ阻害剤の用法、用量は、上記の治療剤または医薬組成物の記載を参照することができる。

また、本発明には、RETキナーゼ阻害剤の製造のための一般式(I)で示される化合物、SU11248、KRN951およびAZD2171からなる群から選択される少なくとも一つの化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物の使用も含まれる。

さらに、本発明は、一般式(I)で示される化合物、SU11248、KRN951およびAZD2171からなる群から選択される少なくとも一つの化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物による、RETキナーゼの阻害方法も含まれる。本発明の方法において、当該化合物等の用法、用量は特に限定されないが、上記の治療剤または医薬組成物の記載を参照することができる。

2. 感受性を予測する方法

本発明は、細胞中のRETの変異の有無を指標として、患者が本発明のRETキナーゼ阻害物質に対して高感受性であるか否かを予測する方法を提供する。RETキナーゼ阻害物質に対して感受性の高い患者は、当該物質による治療効果をより期待できる患者である。

本発明の方法において、患者は、好ましくは多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患の患者である。

(1) 細胞中のRETの変異の有無を測定する工程

本工程において、細胞は、患者より取り出された細胞が好ましい。そして、細胞は、例えば、患者より外科的処置(例えば、バイオプシーなど)にて摘出することにより得ることができる。また、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺癌、甲状腺乳頭癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫などの遺伝的な変異に起因する疾患では、細胞は、血液細胞を使用することが好ましい。

RETの変異の有無は、前述の方法により測定することができる。

(2) 患者がRETキナーゼ阻害物質に対して高感受性であるか否かを予測する工程

本工程では、好ましくは(1)で測定した細胞中のRETの変異の有無を指標として、患者がRETキナーゼ阻害物質に対して高感受性であるか否かを予測することができる。すなわち、測定した細胞において、変異型RETを発現している場合には、患者がRETキナーゼ阻害物質に対して高感受性であると判断することができる。

本発明の別の態様として、(1)の測定結果を指標に用いて、RETキナーゼ阻害物質に対する細胞の感受性を分析する方法をあげることができる。すなわち、(1)の測定結果から、細胞が変異型RETを発現しているときは、当該細胞は、変異型RETを発現していない細胞に比べてRETキナーゼ阻害物質に対する高い感受性を示すと判断することができる。

また、本発明の別の態様として、(1)の測定結果を指標に用いて、RETキナーゼ阻害物質に対して高感受性を示す細胞または患者を選択する方法をあげることができる。すなわち、(1)の測定結果から、細胞が変異型RETを発現しているときは、当該細胞または当該細胞を有する患者はRETキナーゼ阻害物質に対する高感受性を示すと判断できる。したがって、このような細胞または患者を、RETキナーゼ阻害物質に対する高感受性を示す細胞または患者として選択することができる。

10

20

30

40

50

また、本発明の別の態様として、(1)の測定結果を指標に用いて、RETキナーゼ阻害物質に対する感受性を分析し、分析結果によって患者を分類する方法をあげることができる。すなわち、本発明の方法において、(1)の測定結果から、上記のようにRETキナーゼ阻害物質に対する感受性を分析し、この分析結果に基づいて、所定の細胞を含む患者を分類することができる。例えば、患者を、変異型RETを発現している細胞を含むグループと、発現していない細胞を含むグループとに分類することができる。あるいは、患者を、RETキナーゼ阻害物質に対して高感受性を示すグループと、それ以外のグループとに分類することができる。

また、本発明の別の態様として、(1)の測定結果から、変異型RETを発現している細胞を有する患者を選択することを含む、RETキナーゼ阻害物質の投与対象となる患者を選択する方法をあげることができる。変異型RETを発現している細胞を有する患者は、RETキナーゼ阻害物質の投与対象となる。

10

また、本発明の別の態様として、(1)の測定結果から、患者に対するRETキナーゼ阻害物質の治療効果を予測する方法をあげることができる。本発明の方法において、(1)の測定の結果、細胞が、変異型RETを発現しているときは、RETキナーゼ阻害物質に対して高い感受性を示すと判断できるため、当該細胞または当該細胞を有する患者における当該物質の治療効果は高いと予測することができる。

また、本発明には、患者のRETキナーゼ阻害物質に対する感受性の程度を予測するために、当該患者由来の細胞中のRETの変異の有無を測定する方法が含まれる。当該測定方法は、上記(1)に示すとおりである。

20

RETの変異の有無を測定することにより、患者のRETキナーゼ阻害物質に対する感受性の程度を予測することが可能となる。

本工程において、RETキナーゼ阻害物質は、前述のとおりであるが、好ましくは4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの溶媒和物である。

本発明に係る方法は、RETキナーゼ阻害物質を患者に投与する前に、当該患者におけるRETキナーゼ阻害物質の有効性の程度を予測するのに用いることができる。そして、RETキナーゼ阻害物質の有する効果をより期待できる患者を選択して、疾患の治療を行うことができる。したがって、本発明は、臨床上非常に有用である。

30

本発明は、本発明の方法に用いるための、RETの変異の有無を測定するための検査用キットを提供する。本発明の検査用キットは、測定において使用される上記試薬を含むものである。本発明の検査用キットにより、患者がRETキナーゼ阻害物質に対して高感受性であるか否かを予測することができる。

また、本発明は、上記予測のための当該検査用キットの使用も含む。

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

【実施例1】

【0006】

RETキナーゼ阻害物質のRETキナーゼ阻害活性の測定

被検物質のRETキナーゼ阻害活性は、ProQinase社(Freiburg, ドイツ, GmbH)への委託試験として実施された。RETキナーゼ阻害活性は、具体的には、下記のように測定した。

40

1. RETの発現および精製

RETは、Baculovirus Expression Systemの方法により、昆虫細胞(Spondoptea frugiperda 9 (Sf9))にヒトリコンピナントGST融合タンパク質として発現させた(以下、「RETリコンビナントタンパク質」と称する場合がある)。発現させたRETリコンビナントタンパク質は、GSH-agarose(シグマ社製)またはNi-NTH-agarose(キアゲン社製)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。タンパク質の純度および同定は、SDS-PAGE銀染色ならびにRETに対する特異的抗体を用いたウエスタン

50

プロット法により確認した。

2. RETキナーゼ活性に対する阻害活性の測定

まず、ストレプトアビジンコートされた96ウェルFlash Plate (Perkin Elmer/NEM社製)の各ウェルに、標準反応液20 μ L、ATP溶液(H₂Oで希釈)5 μ L、被検物質5 μ L(10%ジメチルスルホキシド水溶液)、及びRETリコンビナントタンパク質50ngを含む溶液10 μ Lとビオチン化修飾Poly(Glu, Tyr)_{4:1}125ngを含む溶液10 μ Lの混合溶液を順次加えた。このキナーゼ反応液50 μ Lには、60mM HEPES-NaOH(pH7.5)、3mM MgCl₂、3mM MnCl₂、3 μ M Na-orthovanadate、1.2mM DTT、50 μ g/ml PEG₂₀₀₀、1 μ M [³³P]-ATPが含まれて

10

いた。被検物質には、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド(メタンスルホン酸塩)、6-[2-(メチルカルバモイル)フェニルスルファニル]-3-E-[2-(ピリジン-2-イル)エテニル]インダゾール(以下、「AG013736」と称する場合がある)、SU11248、KRN951またはAZD2171を用いた。

なお、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドは、国際公開第02/32872号パンフレット(WO02/32872)および国際公開第2005/063713号パンフレット(WO2005/063713)の記載に基づいて製造した。

20

また、AG013736は、国際公開第01/002369号パンフレット(WO01/002369)の記載に基づいて製造した。さらに、SU11248は、国際公開第01/060814号パンフレット(WO01/060814)の記載に基づいて製造した。また、KRN951は、国際公開第02/088110号パンフレット(WO02/088110)の記載に基づいて製造した。AZD2171は、国際公開第00/47212号パンフレット(WO00/47212)の記載に基づいて製造した。

次に、反応液を、30℃で80分間インキュベーションした後、2%(v/v)H₃PO₄溶液50 μ Lを添加することにより反応を停止させた。

96ウェルプレートの各ウェルを、0.9%(w/v)のNaCl溶液200 μ Lにより2回洗浄および吸引を行った。

30

³³P_iの取り込み量は、プレート上に捕捉された放射活性をmicroplates cintillation counter(Microbeta, Wallac製)により測定することで評価した。

操作は、BeckmanCoulter/Sagian robotic systemにより行った。

RETキナーゼ活性を50%阻害するのに必要な被検物質の濃度(IC₅₀)は、各濃度(10 μ Mから0.0003 μ Mまで10ポイント)における³³P比放射活性を用いて、Prism 3.03(Windows, Graphpad, San Diego, California, USA)を用いて算出した。

その際、RETリコンビナントタンパク質を含まず基質Poly(Glu, Tyr)_{4:1}のみを入れた場合の値を0%値とし、被検物質を入れないでRETリコンビナントタンパク質と基質Poly(Glu, Tyr)_{4:1}を入れた場合の値を100%値とした。

40

各濃度の被検物質存在下におけるキナーゼ活性は、それぞれの放射活性の値から0%値を差し引いた値が、100%値から0%値を引いた値に対して何パーセントに相当するかを算出し、この比率(%)によりRETキナーゼ活性を50%阻害するのに必要な被検物質の濃度(IC₅₀)を算出した。

その結果、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドは、RETキナーゼ阻害活性を有すること(IC₅₀=35nM)が明らかとなった。また、SU11248、KRN951

50

、AZD2171は、RETキナーゼ阻害活性を有すること（それぞれ $IC_{50} = 64, 92, 75 \text{ nM}$ ）が明らかになった。AG013736は、 $IC_{50} = 5600 \text{ nM}$ であった。さらに、各被検物質のRETキナーゼ阻害活性には、程度の差があることが明らかになった。

【実施例2】

【0007】

ヒト甲状腺髄様癌細胞株（TT）におけるリガンド非依存性RETリン酸化に対するRETキナーゼ阻害物質の効果

1. 細胞抽出液の調製

ヒト甲状腺髄様癌細胞株（TT、ATCCより購入）を、15% FBSを含むRPMI 1640培地（Sigma社より購入）に懸濁した。なお、TTは、野生型RETのアミノ酸配列において、コドン634のシステインがトリプトファンに変異したRETを発現している細胞である（Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 1022-1028, 1995.）。その細胞懸濁液（ 4×10^5 個/mL）2 mL/wellを細胞培養用6ウェルプレート（FALCON社より購入）に加え、5% CO_2 インキュベーター中（37℃）で一晩培養した。培養後、各ウェルから上清を取り除き、1.8 mLの15% FBSを含むRPMI 1640培地を加えた。そこに、ジメチルスルホキシドに溶解させた被検物質4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド（メタンスルホン酸塩）（15% FBSを含むRPMI 1640培地で希釈）を0.2 mL加えて、5% CO_2 インキュベーター中（37℃）で1時間培養した。各ウェルから上清を取り除き、各ウェルをPBS 400 μ Lで洗浄し、そこへ可溶性緩衝液（50 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10% (v/v) グリセロール、1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 μ g/mL Aprotinin, 50 μ g/mL Leupeptin, 1 μ g/mL Pepstatin A, 1 mM Na₃VO₄)を100 μ L加えた。この溶液を含む細胞をスクレイパーで回収し、4℃、15分、15,000 rpmにて処理し、上清にSDS bufferを加えた後に94℃、5分処理を行なうことで、タンパク質を可溶化させ、それを細胞抽出液として20 μ g / 10 μ Lに調製した。

2. 電気泳動およびウェスタンブロッティング

前記細胞抽出液20 μ g / 10 μ Lを4 - 20% gradient polyacrylamide gel（第一化学薬品株式会社より購入）で電気泳動を行なった。泳動後、常法に従い、PVDF膜（Amersham pharmacia biotech社より購入）にトランスファーした。そして、トランスファーしたメンブレンについて、一次抗体として抗RET抗体（anti-RET, Cell Signaling社より購入）、抗リン酸化RET抗体（anti-phospho RET (Tyr905), Cell Signaling社より購入）、抗Erk1/2抗体（anti-Erk1/2, Cell Signaling社より購入）または抗リン酸化Erk1/2抗体（anti-phospho-Erk1/2, Cell Signaling社より購入）を、二次抗体としてhorse radish peroxidase標識抗ウサギIgG抗体（anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling社より購入））を用いてイムノブロットを行なった。メンブレンを洗浄後、Super Signal (PIERCE社より購入)で発色させた。

被検物質を添加していない細胞抽出液を加えたウェルの吸光度を100%のRET自己リン酸化活性として、各レーンのRET自己リン酸化活性(%)を求めた。被検物質の濃度を数段階に変えて、それぞれの場合におけるRET自己リン酸化活性(%)を求め、被検物質のRET自己リン酸化活性を50%阻害するのに必要な被検物質の濃度(IC_{50})を算出した。

その結果、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノ

10

20

30

40

50

キシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドは、濃度依存的に R E T のリン酸化を阻害した ($I C_{50} = 27 \text{ nM}$) (図 1)。また、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドは、R E T の下流分子の一つであり細胞増殖シグナルに関連する E r k 1 / 2 のリン酸化に対しても R E T キナーゼと同等の濃度で阻害することが明らかとなった (図 1)。

【実施例 3】

【0008】

ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (T T) の細胞増殖に対する R E T キナーゼ阻害物質の効果

ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (T T、A T C C より購入) を、15% F B S を含む R P M I 1640 培地 (S i g m a 社より購入) に懸濁した。その細胞懸濁液 (3×10^4 個 / m L) 0.1 mL / w e l l を細胞培養用 96 ウェルプレート (N U N C 社より購入) に加え、5% C O₂ インキュベーター中 (37) で一晩培養した。培養後、各ウェルに 15% F B S を含む R P M I 1640 培地で希釈した被検物質 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド (メタンスルホン酸塩) 0.1 mL を加えて、更に 5% C O₂ インキュベーター中 (37) で 10 日間培養した。培養後、各ウェルに C e l l C o u n t i n g K i t - 1 (D O J I N D O 社より購入) を 10 μ L 加え、5% C O₂ インキュベーター中 (37) で発色後、測定波長を 415 nm、対照波長を 660 nm として、各ウェルの吸光度をプレートリーダー M T P - 500 (コロナ電気社製) を用いて測定した。被検物質を加えていないウェルの吸光度に対する被検物質を加えた各ウェルの吸光度の比率 (%) を求め、この比率から細胞増殖を 50% 阻害するのに必要な被検物質の濃度 ($I C_{50}$) を算出した。

その結果、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドは、ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (T T) の増殖に対して $I C_{50} = 78 \text{ nM}$ の阻害活性を有することが明らかとなった。

【実施例 4】

【0009】

ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (T T) 皮下移植モデルにおける R E T キナーゼ阻害物質の抗腫瘍効果

ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (T T、A T C C より購入) を 37 下、5% 炭酸ガスインキュベーター内において R P M I 1640 (15% F B S 含) で約 80% コンフルセントとなるまで培養し、常法に従いトリプシン - E D T A により、細胞を回収した。細胞をリン酸緩衝液で懸濁し、 1×10^8 c e l l s / m L 懸濁液を調製した。そして、得られた細胞懸濁液を 0.1 mL ずつヌードマウス (チャールズリバー社より購入) 体側皮下に移植した。

移植後、腫瘍体積が約 100 - 200 mm³ になった時点から、被検物質 4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド (メタンスルホン酸塩) を 10 mg / k g、30 mg / k g または 100 mg / k g、1日1回、4週間のスケジュールで経口投与した。腫瘍長径および短径をデジマチックキャリパ (M i t s u t o y o) で測定し、以下の式で腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (TV)} = \text{腫瘍長径 (mm)} \times \text{腫瘍短径}^2 (\text{mm}^2) / 2$$

その結果、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドは、ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (T T) 皮下移植モデルにおいて、用量依存的に抗腫瘍効果を有することが明らかとなった (図 2)。

【実施例 5】

【0010】

ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (T T) 皮下移植モデルにおける R E T のリン酸化に対する R E T キナーゼ阻害物質の効果

ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (TT、ATCCより購入) を37℃下、5%炭酸ガスインキュベーター内においてRPMI 1640 (15% FBS含) で約80%コンフルセントとなるまで培養し、常法に従いトリプシン - EDTAにより、細胞を回収した。細胞をリン酸緩衝液で懸濁し、 1×10^8 cells/mL懸濁液を調製した。そして、得られた細胞懸濁液を0.1 mLずつヌードマウス (チャールズリバー社より購入) 体側皮下に移植した。

移植後、腫瘍体積が約100 - 200 mm³ になった時点において、被検物質4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド (メタンスルホン酸塩) 10 mg/kg、30 mg/kg または100 mg/kg を経口投与した。投与後、2、8、12または24時間で腫瘍を摘出し、摘出した腫瘍へ可溶化緩衝液 (50 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10% (v/v) グリセロール、1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µg/mL Aprotinin, 50 µg/mL Leupeptin, 1 µg/mL Pepstatin A, 1 mM Na₃VO₄)、25 mM - glycerophosphate, phosphatase inhibitor cocktail II (SIGMA)) を加えてホモジナイズした。4℃、15分、15,000 rpmにて処理し、上清にSDS bufferを加えた後に94℃、5分処理を行なうことで、タンパク質を可溶化させ、それを細胞抽出液として20 µg/10 µLに調製した。実施例2と同様の方法により、前記細胞抽出液で電気泳動およびイムノブロットを行った。

その結果、4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドは、ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (TT) 皮下移植モデルにおいて、抗腫瘍効果の認められた投与量でRETの自己リン酸化の阻害活性を有することが明らかとなった (図3)。

これらの結果から、本発明のRETキナーゼ阻害物質は、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して、より有効な効果を期待できることが示された。そして、本発明のRETキナーゼ阻害物質は、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患ならびに甲状腺癌に対する治療剤として有用であることが示された。

[参考例]

RETキナーゼ阻害物質の一つである4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミドの製剤の製造法を以下に参考例として記載する。

(医薬組成物の製造)

(1) 1 mg錠

4 - (3 - クロロ - 4 - (シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ) - 7 - メトキシ - 6 - キノリンカルボキサミド メタンスルホン酸塩の結晶 (C) (以下、「結晶 (C)」と称する場合がある。なお、結晶 (C) は、WO 2005/063713の実施例7に記載の方法に従って製造したものである。) 24 gと無水軽質ケイ酸 (ゲル化防止剤、商品名AEROSIL (登録商標) 200、日本アエロジル株式会社) 192 gを20 Lスーパーミキサーで混合後、さらにD - マンニトール (賦形剤、東和化成工業株式会社) 1236 g、結晶セルロース (賦形剤、商品名アビセルPH101、旭化成工業株式会社) 720 g、ヒドロキシプロピルセルロース (結合剤、商品名HPC-L、日本曹達株式会社) 72 gを加えて混合した。その後、無水エタノールを適量添加し結晶 (C) を含有する造粒物を得た。この造粒物を棚式乾燥機 (60℃) で乾燥後、パウミルを用いて整粒し、顆粒を得た。この顆粒とともに、クロスカルメロースナトリウム (崩壊剤、商品名Ac-Di-Sol、FMC International Inc.) 120 g、フマル酸ステアリルナトリウム (滑沢剤、JRS Pharma LP) 36 gを2

10

20

30

40

50

0 Lタンブラーミキサーに入れて混合後、打錠機で製錠し、1錠あたり総質量100mgの錠剤を得た。さらに錠剤コーティング機で、コーティング液として10%オパドライエロー(OPADRY 03F42069 YELLOW、日本カラコン株式会社)水溶液を用いて、錠剤にコーティングし、1錠あたり総質量105mgのコーティング錠を得た。

(2) 10mg錠

結晶(C)60gと無水軽質ケイ酸(ゲル化防止剤、商品名AEROSIL(登録商標)200、日本アエロジル株式会社)192gを20Lスーパーミキサーで混合後、さらにD-マンニトール(賦形剤、東和化成工業株式会社)1200g、結晶セルロース(賦形剤、商品名アビセルPH101、旭化成工業株式会社)720g、ヒドロキシプロピルセルロース(結合剤、商品名HPC-L、日本曹達株式会社)72gを加えて混合した。その後、無水エタノールを適量添加し結晶(C)を含有する造粒物を得た。この造粒物を棚式乾燥機(60)で乾燥後、パワーミルを用いて整粒し、顆粒を得た。この顆粒とともに、クロスカルメロースナトリウム(崩壊剤、商品名Ac-Di-Sol、FMC International Inc.)120g、フマル酸ステアリルナトリウム(滑沢剤、JRS Pharma LP)36gを20Lタンブラーミキサーに入れて混合後、打錠機で製錠し、1錠あたり総質量400mgの錠剤を得た。さらに錠剤コーティング機で、コーティング液として10%オパドライエロー(OPADRY 03F42069 YELLOW、日本カラコン株式会社)水溶液を用いて、錠剤にコーティングし、1錠あたり総質量411mgのコーティング錠を得た。

(3) 100mg錠

結晶(C)31.4gと無水軽質ケイ酸(ゲル化防止剤、商品名AEROSIL(登録商標)200、日本アエロジル株式会社)4gを1Lスーパーミキサーで混合後、さらに、無水リン酸水素カルシウム(賦形剤、協和化学工業株式会社)40.1g、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース(結合剤、商品名L-HPC(LH-21)、信越化学工業株式会社)10g、ヒドロキシプロピルセルロース(結合剤、商品名HPC-L、日本曹達株式会社)3gを加えて混合した。その後、無水エタノールを適量添加し結晶(C)を含有する造粒物を得た。この造粒物を棚式乾燥機(60)で乾燥後、パワーミルを用いて整粒し、顆粒を得た。この顆粒とともに、クロスカルメロースナトリウム(崩壊剤、商品名Ac-Di-Sol、FMC International Inc.)10g、フマル酸ステアリルナトリウム(滑沢剤、JRS Pharma LP)1.5gを混合後、打錠機で製錠し、1錠あたり総質量400mgの錠剤を得た。

【産業上の利用可能性】

【0011】

本発明により、RETキナーゼ阻害物質を含有する、多発性内分泌腫瘍症IIA型、多発性内分泌腫瘍症IIB型、家族性甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、散発性甲状腺髄様癌、ヒルシュスプルング病、褐色細胞腫、副甲状腺過形成症および消化管の粘膜神経腫からなる群から選択される少なくとも一つの疾患に対する治療剤、治療方法、前記治療剤の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用および前記治療剤のためのRETキナーゼ阻害物質が提供される。

また、本発明により、RETキナーゼ阻害物質を含有する甲状腺癌に対する治療剤、治療方法、前記治療剤の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用および前記治療剤のためのRETキナーゼ阻害物質が提供される。

さらに、本発明により、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与するための、RETキナーゼ阻害物質を含有する医薬組成物、変異型RETを発現している細胞を含む生体に対して投与することを特徴とする疾患の治療方法、前記医薬組成物の製造のためのRETキナーゼ阻害物質の使用および前記医薬組成物のためのRETキナーゼ阻害物質が提供される。

また、本発明により、RETキナーゼ阻害剤が提供される。

さらに、本発明により、RETキナーゼ阻害物質の効果を予測する方法が提供される。

より詳細には、RETキナーゼ阻害物質の効果は、細胞中のRETの変異の有無を指標とすることにより予測することが可能となった。

本発明に係る方法により、患者に化合物を投与することなく、効果を予測することが可能となるため、当該化合物による効果をより期待できる患者を選択することができ、患者のQOLに貢献することが可能となった。

【配列表フリーテキスト】

【0012】

配列番号：5～20 プライマー

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai R&D Management Co., Ltd.
 <120> Anti-tumor agents for thyroid carcinomas
 <130> PCT06-0173
 <150> US 60/747,570
 <151> 2006-05-18
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 4757
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ccgaagcagg gcgcgcagca gcgctgagtg ccccgaacg tgcgtcgcgc cccagtgtc 60
 cgtcgcgtcc gccgcgcccc gggcggggat gggcgggcca gactgagcgc cgcacccgcc 120
 atccagaccc gccggcccta gccgcagtcc ctccagccgt ggccccagcg cgcacgggcg 180
 atggcgaagg cgacgtccgg tgccgcgggg ctgcgtctgc tgttctctct gctctctccg 240
 ctgctaggca aagtggcatt gggcctctac ttctcgaggg atgcttactg ggagaagctg 300
 tatgtggacc aggcggcccg cacgccttg ctgtacgtcc atgccctgcg ggacgccct 360
 gaggaggtgc ccagcttccg cctgggccag catctctacg gcacgtaccg cacacggctg 420
 catgagaaca actggatctg catccaggag gacaccggcc tcctctacct taaccggagc 480
 ctggaccata gctcctggga gaagctcagt gtcgcaacc gcggettcc cctgctcacc 540
 gtctacctca aggtcttct gtcaccaca tcctctctg agggcgagtg ccagtggcca 600
 ggctgtgccc ggtatactt ctctctctc aacacctct ttccagcctg cagctccctc 660
 aagccccggg agctctgctt cccagagaca aggcctctct tccgattcg ggagaaccga 720
 cccccaggca cttccacca gttccgctg ctgcctgtgc agttctgtg cccaacatc 780
 agcgtggcct acaggctcct ggagggtgag ggtctgcct tccgctcgc cccggacagc 840
 ctggaggtga gcacgcgtg gccctggac cgcgagcagc gggagaagta cgagctggtg 900
 gccgtgtgca ccgtgcacgc cggcgcgcgc gaggaggtgg tgatggtgcc ctccccggtg 960
 accgtgtacg acgaggacga ctccggcccc accttcccc cgggcgtoga caccgccagc 1020
 gccgtggtgg agttcaagcg gaaggaggac accgtggtgg ccacgctgcg tctcttcgat 1080

gcagacgtgg tacctgcac aggggagctg gtgaggcgg acacaagcac gctgctcccc	1140	
ggggacacct gggcccagca gaccttccgg gtggaacact ggcccaacga gacctcggtc	1200	
caggccaacg gcagcttctg gcgggcgacc gtacatgact ataggctggt tctcaaccgg	1260	
aacctctcca tctcggagaa ccgcaccatg cagctggcgg tgctggtaaa tgactcagac	1320	
ttccagggcc caggagcggg cgtcctcttg ctccacttca acgtgtcggg gctgcgggtc	1380	
agcctgcacc tgcccagtac ctactcctc tccgtgagca ggagggtcg ccgatttgc	1440	10
cagatcggga aagtctgtgt ggaaaaactgc caggcattca gtggcatcaa cgtccagtac	1500	
aagctgcatt cctctggtgc caactgcagc acgctagggg tggtcacctc agccaggagc	1560	
acctcgggga tctgttttgt gaatgacacc aaggccctgc ggcgcccaa gtgtgccgaa	1620	
cttcaactaca tgggtggtgc caccgaccag cagaccteta ggcaggccca ggcccagctg	1680	
cttghtaacag tggaggggtc atatgtggcc gaggaggcgg gctgccccct gtctgtgca	1740	
gtcagcaaga gacggctgga gtgtgaggag tgtggcggcc tgggctcccc aacaggcagg	1800	20
tgtgagtgga ggcaaggaga tggcaaagg atcaccagga acttctccac ctgctctccc	1860	
agcaccaaga cctgccccga cggccactgc gatgttgg agaccaaga catcaacatt	1920	
tgccctcagg actgcctccg gggcagcatt gttgggggac acgagcctgg ggagccccgg	1980	
gggattaag ctggctatgg cacctgcaac tgcttccctg aggaggagaa gtgcttctgc	2040	
gagcccgaag acatccagga tccactgtgc gacgagctgt gccgcacggt gatcgcagcc	2100	
gctgtcctct tctcctcat cgtctcggtg ctgctgtctg ccttctgcat ccactgctac	2160	30
cacaagtttg cccacaagcc acctatctcc tcagctgaga tgacctccg gaggcccgcc	2220	
caggccttcc cggtcageta ctctcttcc ggtgcccgcc ggccctcgt ggactccatg	2280	
gagaaccagg tctccgtgga tgccctcaag atcctggagg atccaaagt ggaattcct	2340	
cggaagaact tggttcttgg aaaaacteta ggagaaggcg aatttgaaa agtggtaag	2400	
gcaacggcct tccatctgaa aggcagagca ggttacacca cggtgccgt gaagatgctg	2460	
aaagagaacg cctccccgag tgagctgca gacctgctg cagagttaa cgtcctgaag	2520	
caggtaace acccacaigt catcaaatg tatgggcct gcagccagga tgcccgcctc	2580	40
ctctcatcg tggagtacgc caaatacggc tccctgcggg gcttctccg cgagagcccgc	2640	
aaagtgggce ctggctacct gggcagtgga ggcagccgca actccagctc cctggaccac	2700	
ccgatgagc gggccctcac catggcgac ctcatctcat ttgctggca gatctcacag	2760	
gggatgcagt atctggccga gatgaagctc gttcatcggg acttggcagc cagaaacatc	2820	

ctggtagctg aggggcggaa gatgaagatt teggatttcg gcttgtcccg agatgtttat	2880	
gaagaggatt cctacgtgaa gaggagccag ggtcggattc cagttaaag gatggcaatt	2940	
gaatcccttt ttgatcatat ctacaccacg caaagtgatg tatggctttt tgggtcctg	3000	
ctgtgggaga tcgtgacct agggggaac ccctatcctg ggattcctcc tgagcggctc	3060	
ttcaaccttc tgaagaccgg ccaccggatg gagaggccag acaactgcag cgaggagatg	3120	
taccgcctga tgcctcaatg ctggaagcag gagccggaca aaaggccggg gtttgcggac	3180	10
atcagcaaag acctggagaa gatgatggtt aagaggagag actacttga ccttgcggcg	3240	
tccactccat ctgactcct gatttatgac gacggcctct cagaggagga gacaccctg	3300	
gtggactgta ataatgcccc cctccctga gccctcctt ccacatggat tgaanaaaaa	3360	
ctctatggca tgcagaccg gaactggcct ggagagagtc ctgtaccact cagagagct	3420	
gatggcacta acaactgggt tccaagatat ccaaatgata gtgtatatgc taactggatg	3480	
ctttaccct cagcggcaaa attaatggac acgtttgata gttaacattt ctttgtgaaa	3540	20
ggtaatggac tcacaagggg aagaacatg ctgagaatgg aaagtctacc ggccctttct	3600	
tttgaacgt cacattggcc gagccgtgtt cagttcccag gtggcagact cgtttttggt	3660	
agtttgtttt aactccaag gtggttttac ttctgatagc cggtgatttt cctcctagc	3720	
agacatgcca caccgggtaa gagctctgag tcttagtggg taagcattcc tttctctca	3780	
gtgcccagca gcaccagtg ttggtctgtg tccatcagtg accaccaaca ttctgtgttc	3840	
acatgtgtgg gtccaacact tactacctgg tgtatgaaat tggacctgaa ctgttgatt	3900	30
tttctagtgt cgcctcaaca agcnaaaaa atttaacat gaagcacaca cacaaaaaag	3960	
gcagtaggaa aaatgctggc cctgatgacc tgccttatt cagaatgaga gactgcgggg	4020	
ggggcctggg ggtagtgtca atgcccccc agggctggag gggaagagg gccccgagga	4080	
tgggcctggg ctcagcattc gagatcttga gaatgatttt ttttaataca tgcaacctt	4140	
ccttaggaag acatttggtt ttcacatga ttaagatgat tcttagattt agcacaatgg	4200	
agagattcca tgccatcttt actatgtgga tgggtgtatc agggaagagg gctcacaaga	4260	40
cacatttgc cccccggccc accacatcat cctcacgtgt tcggtactga gcagccacta	4320	
ccccgatga gaacagtatg aagaagggg gctgttgag tcccagaatt gctgacagca	4380	
gaggctttgc tgcctgtaat cccacctgcc accagcctgc agcaccccc acagccaagt	4440	
agaggcgaaa gcagtggctc atcctacctg ttaggagcag gtagggcttg tactcacttt	4500	

aatttgaatc ttatcaactt actcataaag ggacaggcta gctagctgtg ttagaagtag 4560
 caatgacaat gaccaaggac tgetacacct ctgattacaa ttctgatgtg aaaaagatgg 4620
 tgtttggctc ttatagagcc tgtgtgaaag gcccatggat cagctcttcc tgtgtttgta 4680
 atttaatget gctacaaggt gtttctgttt cttagattct gaccatgact cataagcttc 4740
 ttgtcattct tcattgc 4757

10

<210> 2
 <211> 1114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ala Ala Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Lys Val Ala Leu Gly Leu Tyr Phe Ser
 20 25 30

20

Arg Asp Ala Tyr Trp Glu Lys Leu Tyr Val Asp Gln Ala Ala Gly Thr
 35 40 45

Pro Leu Leu Tyr Val His Ala Leu Arg Asp Ala Pro Glu Glu Val Pro
 50 55 60

Ser Phe Arg Leu Gly Gln His Leu Tyr Gly Thr Tyr Arg Thr Arg Leu
 65 70 75 80

30

His Glu Asn Asn Trp Ile Cys Ile Gln Glu Asp Thr Gly Leu Leu Tyr
 85 90 95

Leu Asn Arg Ser Leu Asp His Ser Ser Trp Glu Lys Leu Ser Val Arg
 100 105 110

Asn Arg Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Tyr Leu Lys Val Phe Leu Ser
 115 120 125

40

Pro Thr Ser Leu Arg Glu Gly Glu Cys Gln Trp Pro Gly Cys Ala Arg
 130 135 140

Val Tyr Phe Ser Phe Phe Asn Thr Ser Phe Pro Ala Cys Ser Ser Leu
 145 150 155 160

Lys Pro Arg Glu Leu Cys Phe Pro Glu Thr Arg Pro Ser Phe Arg Ile
 165 170 175

Arg Glu Asn Arg Pro Pro Gly Thr Phe His Gln Phe Arg Leu Leu Pro
 180 185 190

Val Gln Phe Leu Cys Pro Asn Ile Ser Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu
 195 200 205

10

Gly Glu Gly Leu Pro Phe Arg Cys Ala Pro Asp Ser Leu Glu Val Ser
 210 215 220

Thr Arg Trp Ala Leu Asp Arg Glu Gln Arg Glu Lys Tyr Glu Leu Val
 225 230 235 240

Ala Val Cys Thr Val His Ala Gly Ala Arg Glu Glu Val Val Met Val
 245 250 255

20

Pro Phe Pro Val Thr Val Tyr Asp Glu Asp Asp Ser Ala Pro Thr Phe
 260 265 270

Pro Ala Gly Val Asp Thr Ala Ser Ala Val Val Glu Phe Lys Arg Lys
 275 280 285

Glu Asp Thr Val Val Ala Thr Leu Arg Val Phe Asp Ala Asp Val Val
 290 295 300

30

Pro Ala Ser Gly Glu Leu Val Arg Arg Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro
 305 310 315 320

Gly Asp Thr Trp Ala Gln Gln Thr Phe Arg Val Glu His Trp Pro Asn
 325 330 335

Glu Thr Ser Val Gln Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg Ala Thr Val His
 340 345 350

40

Asp Tyr Arg Leu Val Leu Asn Arg Asn Leu Ser Ile Ser Glu Asn Arg
 355 360 365

Thr Met Gln Leu Ala Val Leu Val Asn Asp Ser Asp Phe Gln Gly Pro
 370 375 380

Gly Ala Gly Val Leu Leu Leu His Phe Asn Val Ser Val Leu Pro Val
385 390 395 400

Ser Leu His Leu Pro Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Val Ser Arg Arg Ala
405 410 415

Arg Arg Phe Ala Gln Ile Gly Lys Val Cys Val Glu Asn Cys Gln Ala
420 425 430

10

Phe Ser Gly Ile Asn Val Gln Tyr Lys Leu His Ser Ser Gly Ala Asn
435 440 445

Cys Ser Thr Leu Gly Val Val Thr Ser Ala Glu Asp Thr Ser Gly Ile
450 455 460

Leu Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Leu Arg Arg Pro Lys Cys Ala Glu
465 470 475 480

20

Leu His Tyr Met Val Val Ala Thr Asp Gln Gln Thr Ser Arg Gln Ala
485 490 495

Gln Ala Gln Leu Leu Val Thr Val Glu Gly Ser Tyr Val Ala Glu Glu
500 505 510

Ala Gly Cys Pro Leu Ser Cys Ala Val Ser Lys Arg Arg Leu Glu Cys
515 520 525

30

Glu Glu Cys Gly Gly Leu Gly Ser Pro Thr Gly Arg Cys Glu Trp Arg
530 535 540

Gln Gly Asp Gly Lys Gly Ile Thr Arg Asn Phe Ser Thr Cys Ser Pro
545 550 555 560

Ser Thr Lys Thr Cys Pro Asp Gly His Cys Asp Val Val Glu Thr Gln
565 570 575

40

Asp Ile Asn Ile Cys Pro Gln Asp Cys Leu Arg Gly Ser Ile Val Gly
580 585 590

Gly His Glu Pro Gly Glu Pro Arg Gly Ile Lys Ala Gly Tyr Gly Thr
595 600 605

Cys Asn Cys Phe Pro Glu Glu Glu Lys Cys Phe Cys Glu Pro Glu Asp

Gly Asp Leu Ile Ser Phe Ala Trp Gln Ile Ser Gln Gly Met Gln Tyr 850	855	860	
Leu Ala Glu Met Lys Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile 865	870	875	880
Leu Val Ala Glu Gly Arg Lys Met Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser 885	890	895	10
Arg Asp Val Tyr Glu Glu Asp Ser Tyr Val Lys Arg Ser Gln Gly Arg 900	905	910	
Ile Pro Val Lys Trp Met Ala Ile Glu Ser Leu Phe Asp His Ile Tyr 915	920	925	
Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile 930	935	940	20
Val Thr Leu Gly Gly Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Pro Glu Arg Leu 945	950	955	960
Phe Asn Leu Leu Lys Thr Gly His Arg Met Glu Arg Pro Asp Asn Cys 965	970	975	
Ser Glu Glu Met Tyr Arg Leu Met Leu Gln Cys Trp Lys Gln Glu Pro 980	985	990	30
Asp Lys Arg Pro Val Phe Ala Asp Ile Ser Lys Asp Leu Glu Lys Met 995	1000	1005	
Met Val Lys Arg Arg Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Ala Ser Thr Pro 1010	1015	1020	
Ser Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Asp Gly Leu Ser Glu Glu Glu Thr 1025	1030	1035	40
Pro Leu Val Asp Cys Asn Asn Ala Pro Leu Pro Arg Ala Leu Pro 1040	1045	1050	
Ser Thr Trp Ile Glu Asn Lys Leu Tyr Gly Met Ser Asp Pro Asn 1055	1060	1065	

Trp Pro Gly Glu Ser Pro Val Pro Leu Thr Arg Ala Asp Gly Thr
 1070 1075 1080

Asn Thr Gly Phe Pro Arg Tyr Pro Asn Asp Ser Val Tyr Ala Asn
 1085 1090 1095

Trp Met Leu Ser Pro Ser Ala Ala Lys Leu Met Asp Thr Phe Asp
 1100 1105 1110

10

Ser

<210> 3
 <211> 4161
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ccgaagcagg ggcgcagca gcgctgagtg ccccggaacg tgcgtcgcgc cccagtgtc 60 20
 cgtcgcgtcc gccgcgcccc gggcggggat ggggcggcca gactgagcgc cgcacccgcc 120
 atccagacc gccggccta gccgcagtcc ctccagccgt ggccccagcg cgcacgggcg 180
 atggcgaagg cgacgtccgg tgccgcgggg ctgctctgc tgttctgct gctgctgcc 240
 ctgctaggca aagtggcatt gggcctctac tctcagagg atgcttactg ggagaagctg 300
 tatgtggacc aggcggccgg cacgcccttg ctgtacgtcc atgccctgcg ggacgccct 360
 gaggaggtgc ccagcttcg cctgggccag catctctacg gcacgtaccg cacacggctg 420 30
 catgagaaca actggatctg catccaggag gacaccggcc tctctacct taaccggagc 480
 ctggaccata gctcctggga gaagctcagt gtcgcaacc gcggetttcc cctgctcacc 540
 gtctacctca aggtcttct gtcaccaca tccttcgtg agggcgagtg ccagtggcca 600
 ggctgtgcc gcgtatactt ctctctctc aacacctct ttccagcctg cagctccctc 660
 aagccccggg agctctgctt ccagagaca aggcctctct tccgattcg ggagaaccga 720
 cccccaggca ccttccacca gttccgctg ctgcctgtgc agttcttgtg cccaacatc 780 40
 agcgtggcct acaggtcctt ggagggtgag ggtctgcct tccgctgcgc cccggacagc 840
 ctggaggtga gcacgcgtg gccctggac cgcgagcagc gggagaagta cgagctggtg 900
 gccgtgtgca ccgtgcaagc cggcgcgcgc gaggaggtgg tgatggtgcc cttcccgtg 960
 accgtgtaag acgaggacga ctggcgccc accttccccg cgggcgtcga caccgccagc 1020

gccgtggtgg agttcaagcg gaaggaggac accgtggtgg ccacgctgcg tgtcttcgat	1080	
gcagacgtgg tacctgcate aggggagctg gtgaggcgg acacaagcac gctgctcccc	1140	
ggggacacct gggcccagea gaccttcgg gtggaacact ggcccaacga gacctcggtc	1200	
caggccaacg gcagcttcgt gcgggcgacc gtacatgact ataggctggt tctcaaccgg	1260	
aacctctcca tctcggagaa ccgcaccatg cagctggcgg tgctggtcaa tgactcagac	1320	
ttccagggcc caggagcggg cgtcctcttg ctccacttca acgtgtcggg gctgcccgtc	1380	10
agcctgcacc tgcccagtac ctactccctc tccgtgagca ggaggcctcg ccgatttgcc	1440	
cagatcggga aagtctgtgt ggaaaactgc caggcattca gtggcatcaa cgtccagtac	1500	
aagctgcatt cctctggtgc caactgcagc acgctagggg tggtcacctc agccgaggac	1560	
acctcgggga tcctgtttgt gaatgacacc aaggccctgc ggcggcccaa gtgtgccgaa	1620	
cttcaactaa tgggtgtggt caccgaccag cagacctcta ggcaggccca ggcccagctg	1680	
cttctaacag tggaggggtc atatgtggcc gaggaggcgg gctgccccct gtcctgtgca	1740	20
gtcagcaaga gacggctgga gtgtgaggag tgtggcggcc tgggctcccc aacaggcagg	1800	
tgtgagtgga ggcaaggaga tggcaaaggg atcaccagga acttctccac ctgctctccc	1860	
agcaccaaga cctgccccga cggccactgc gatgtttgtg agaccaaga catcaacatt	1920	
tgcctcagg actgcctccg gggcagcatt gttgggggac acgagcctgg ggagccccgg	1980	
gggattaaag ctggctatgg cacctgcaac tgcttccctg aggaggagaa gtgcttctgc	2040	
gagcccgaag acatccagga tccactgtgc gacgagctgt gccgcaggt gatgcagcc	2100	30
gtgtctctct tctcctcat cgtctcgggt ctgctgtctg ccttctgcat cactgctac	2160	
cacaagtttg cccacaagcc acccatctcc tcagctgaga tgaccttcg gaggeccgcc	2220	
caggccttc cggtcagcta ctctcttcc ggtgcccgcc ggccctcgtt ggactccatg	2280	
gagaaccagg tctcctgga tccttcaag atcctggagg atccaaagtg ggaattccct	2340	
cgaagaact tggttcttgg aaaaactcta ggagaaggcg aatttgaaa agtggtaag	2400	
gcaacggcct tccatctgaa aggcagagca ggttacacca cgggtggcct gaagatgctg	2460	
aaagagaacg cctccccgag tgagctgca gacctgctgt cagagttcaa cgtcctgaag	2520	40
caggtaacc acccaatgt catcaaattg tatgggcct gcagccagga tggcccgtc	2580	
ctctcatcg tggagtacgc caaatacggc tcctgcggg gcttctccg cgagagccgc	2640	
aaagtggggc ctggctacct gggcagtgga ggcagccga actccagctc cctggaccac	2700	
ccgatgagc gggccctcac catgggcgac ctcatctcat ttgcctggca gatctcacag	2760	

gggatgcagt atctggccga gatgaagctc gttcatcggg acttggcagc cagaaacatc	2820	
ctggtagctg aggggcgga gatgaagatt tcggatttcg gcttgtccc agatgtttat	2880	
gaagaggatt cctacgtgaa gaggagccag ggtcggattc cagttaaag gatggcaatt	2940	
gaatcccttt ttgatcatat ctacaccacg caaagtgatg tatggctctt tgggtcctg	3000	
ctgtgggaga tcgtgacct agggggaaac cctatcctg ggattcctcc tgagcgctc	3060	
ttcaaccctc tgaagaccg ccaccggatg gagaggccag acaactgcag cgaggagatg	3120	10
taccgctga tgcctcaatg ctggaagcag gagccggaca aaaggccggt gtttgggac	3180	
atcagcaaag acctggagaa gatgatggtt aagaggagag actacttga ccttggcggc	3240	
tccactccat ctgactcct gatttatgac gacggcctct cagaggagga gacaccgctg	3300	
gtggactgta ataatgccc cctcctcga gccctcctt ccacatggat tgaacaacaa	3360	
ctctatgga gaatttcca tgcatttact agattctagc accgctgtcc cctctgcaat	3420	
atccttctc tctgtgatgc tttttaaaa tgtttctggt ctgaacaaaa ccaaagtctg	3480	20
ctctgaacct ttttatttgt aaatgtctga ctttgcctc agtttacatt taggcattat	3540	
tgcaactatg ttttctaaa aggaagtga aataagtga attaccacat tgcccagcaa	3600	
cttaggatgg tagaggaaaa aacagatcag ggcggaactc tcaggggaga ccaagaacag	3660	
gttgaataag gcgcttctgg ggtgggaatc aagtcatagt acttctactt taactaagt	3720	
gataaatata caaatctggg gaggtattca gttgagaaag gagccaccag caccactcag	3780	
cctgcaactg gagcacagcc aggttcccc agaccctcc tgggcaggca ggtgcctctc	3840	30
agaggccacc cggcaactgg gagcagccac tggccaagcc tcagccccag tcccagccac	3900	
atgtctcca tcaggggtag cgaggttga ggagctgget ggccctggga ggacgcacc	3960	
ccactgctgt tttcacatc tttcccttac ccacctcag gacggttgc acttatgaag	4020	
tcagtgctaa agctggagca gttgctttt gaaagaacat ggtctgtggt gctgtggtct	4080	
tacaatggac agtaaatatg gttcttgcca aaactcctc ttttgcctt gattaatac	4140	
tagaaattta aaaaaaaaa a	4161	40

<210> 4

<211> 1072

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ala Ala Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Lys Val Ala Leu Gly Leu Tyr Phe Ser
 20 25 30

Arg Asp Ala Tyr Trp Glu Lys Leu Tyr Val Asp Gln Ala Ala Gly Thr
 35 40 45

10

Pro Leu Leu Tyr Val His Ala Leu Arg Asp Ala Pro Glu Glu Val Pro
 50 55 60

Ser Phe Arg Leu Gly Gln His Leu Tyr Gly Thr Tyr Arg Thr Arg Leu
 65 70 75 80

His Glu Asn Asn Trp Ile Cys Ile Gln Glu Asp Thr Gly Leu Leu Tyr
 85 90 95

20

Leu Asn Arg Ser Leu Asp His Ser Ser Trp Glu Lys Leu Ser Val Arg
 100 105 110

Asn Arg Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Tyr Leu Lys Val Phe Leu Ser
 115 120 125

Pro Thr Ser Leu Arg Glu Gly Glu Cys Gln Trp Pro Gly Cys Ala Arg
 130 135 140

30

Val Tyr Phe Ser Phe Phe Asn Thr Ser Phe Pro Ala Cys Ser Ser Leu
 145 150 155 160

Lys Pro Arg Glu Leu Cys Phe Pro Glu Thr Arg Pro Ser Phe Arg Ile
 165 170 175

Arg Glu Asn Arg Pro Pro Gly Thr Phe His Gln Phe Arg Leu Leu Pro
 180 185 190

Val Gln Phe Leu Cys Pro Asn Ile Ser Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu
 195 200 205

40

Gly Glu Gly Leu Pro Phe Arg Cys Ala Pro Asp Ser Leu Glu Val Ser
 210 215 220

Thr Arg Trp Ala Leu Asp Arg Glu Gln Arg Glu Lys Tyr Glu Leu Val

225		230		235		240													
Ala	Val	Cys	Thr	Val	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Glu	Glu	Val	Val	Met	Val				
				245					250					255					
Pro	Phe	Pro	Val	Thr	Val	Tyr	Asp	Glu	Asp	Asp	Ser	Ala	Pro	Thr	Phe				
			260					265					270						
Pro	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Ala	Ser	Ala	Val	Val	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys				10
		275					280					285							
Glu	Asp	Thr	Val	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Val	Phe	Asp	Ala	Asp	Val	Val				
	290					295					300								
Pro	Ala	Ser	Gly	Glu	Leu	Val	Arg	Arg	Tyr	Thr	Ser	Thr	Leu	Leu	Pro				
305					310					315									
Gly	Asp	Thr	Trp	Ala	Gln	Gln	Thr	Phe	Arg	Val	Glu	His	Trp	Pro	Asn				20
				325					330					335					
Glu	Thr	Ser	Val	Gln	Ala	Asn	Gly	Ser	Phe	Val	Arg	Ala	Thr	Val	His				
			340					345						350					
Asp	Tyr	Arg	Leu	Val	Leu	Asn	Arg	Asn	Leu	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Arg				
		355					360						365						
Thr	Met	Gln	Leu	Ala	Val	Leu	Val	Asn	Asp	Ser	Asp	Phe	Gln	Gly	Pro				30
	370					375					380								
Gly	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	His	Phe	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Val				
385					390					395				400					
Ser	Leu	His	Leu	Pro	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Arg	Arg	Ala				
				405					410					415					
Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ile	Gly	Lys	Val	Cys	Val	Glu	Asn	Cys	Gln	Ala				40
			420					425						430					
Phe	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Gln	Tyr	Lys	Leu	His	Ser	Ser	Gly	Ala	Asn				
		435					440						445						
Cys	Ser	Thr	Leu	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Ala	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Ile				
	450					455					460								

Leu Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Leu Arg Arg Pro Lys Cys Ala Glu
 465 470 475 480

Leu His Tyr Met Val Val Ala Thr Asp Gln Gln Thr Ser Arg Gln Ala
 485 490 495

Gln Ala Gln Leu Leu Val Thr Val Glu Gly Ser Tyr Val Ala Glu Glu
 500 505 510

10

Ala Gly Cys Pro Leu Ser Cys Ala Val Ser Lys Arg Arg Leu Glu Cys
 515 520 525

Glu Glu Cys Gly Gly Leu Gly Ser Pro Thr Gly Arg Cys Glu Trp Arg
 530 535 540

Gln Gly Asp Gly Lys Gly Ile Thr Arg Asn Phe Ser Thr Cys Ser Pro
 545 550 555 560

20

Ser Thr Lys Thr Cys Pro Asp Gly His Cys Asp Val Val Glu Thr Gln
 565 570 575

Asp Ile Asn Ile Cys Pro Gln Asp Cys Leu Arg Gly Ser Ile Val Gly
 580 585 590

Gly His Glu Pro Gly Glu Pro Arg Gly Ile Lys Ala Gly Tyr Gly Thr
 595 600 605

30

Cys Asn Cys Phe Pro Glu Glu Glu Lys Cys Phe Cys Glu Pro Glu Asp
 610 615 620

Ile Gln Asp Pro Leu Cys Asp Glu Leu Cys Arg Thr Val Ile Ala Ala
 625 630 635 640

Ala Val Leu Phe Ser Phe Ile Val Ser Val Leu Leu Ser Ala Phe Cys
 645 650 655

40

Ile His Cys Tyr His Lys Phe Ala His Lys Pro Pro Ile Ser Ser Ala
 660 665 670

Glu Met Thr Phe Arg Arg Pro Ala Gln Ala Phe Pro Val Ser Tyr Ser
 675 680 685

Ser Ser Gly Ala Arg Arg Pro Ser Leu Asp Ser Met Glu Asn Gln Val
690 695 700

Ser Val Asp Ala Phe Lys Ile Leu Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro
705 710 715 720

Arg Lys Asn Leu Val Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly
725 730 735

10

Lys Val Val Lys Ala Thr Ala Phe His Leu Lys Gly Arg Ala Gly Tyr
740 745 750

Thr Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Asn Ala Ser Pro Ser Glu
755 760 765

Leu Arg Asp Leu Leu Ser Glu Phe Asn Val Leu Lys Gln Val Asn His
770 775 780

20

Pro His Val Ile Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Ser Gln Asp Gly Pro Leu
785 790 795 800

Leu Leu Ile Val Glu Tyr Ala Lys Tyr Gly Ser Leu Arg Gly Phe Leu
805 810 815

Arg Glu Ser Arg Lys Val Gly Pro Gly Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Ser
820 825 830

30

Arg Asn Ser Ser Ser Leu Asp His Pro Asp Glu Arg Ala Leu Thr Met
835 840 845

Gly Asp Leu Ile Ser Phe Ala Trp Gln Ile Ser Gln Gly Met Gln Tyr
850 855 860

Leu Ala Glu Met Lys Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
865 870 875 880

40

Leu Val Ala Glu Gly Arg Lys Met Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser
885 890 895

Arg Asp Val Tyr Glu Glu Asp Ser Tyr Val Lys Arg Ser Gln Gly Arg
900 905 910

Ile Pro Val Lys Trp Met Ala Ile Glu Ser Leu Phe Asp His Ile Tyr
 915 920 925

Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
 930 935 940

Val Thr Leu Gly Gly Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Pro Glu Arg Leu
 945 950 955 960

10

Phe Asn Leu Leu Lys Thr Gly His Arg Met Glu Arg Pro Asp Asn Cys
 965 970 975

Ser Glu Glu Met Tyr Arg Leu Met Leu Gln Cys Trp Lys Gln Glu Pro
 980 985 990

Asp Lys Arg Pro Val Phe Ala Asp Ile Ser Lys Asp Leu Glu Lys Met
 995 1000 1005

20

Met Val Lys Arg Arg Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Ala Ser Thr Pro
 1010 1015 1020

Ser Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Asp Gly Leu Ser Glu Glu Glu Thr
 1025 1030 1035

Pro Leu Val Asp Cys Asn Asn Ala Pro Leu Pro Arg Ala Leu Pro
 1040 1045 1050

30

Ser Thr Trp Ile Glu Asn Lys Leu Tyr Gly Arg Ile Ser His Ala
 1055 1060 1065

Phe Thr Arg Phe
 1070

<210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> primer

<400> 5
 attgtcatct cgccgttc

18

<210> 6

<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 6		
tgcttcagga cgttgaac	18	
		10
<210> 7		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 7		
tatcgcagga gagactgtga t	21	
		20
<210> 8		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 8		
tggagaagag aggctgtatc	20	
		30
<210> 9		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 9		
cgttgcccttg acttttc	17	
		40
<210> 10		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 10		
tgccccttca gtgttctac t	21	

<210> 11		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 11		
cttgataaca ctggcaggtt	20	10
<210> 12		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 12		
gaggcgttct ctttcagcat	20	20
<210> 13		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 13		
tggaagaact tcggcatgag	20	30
<210> 14		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 14		
gaattcacag ccaccaagtg	20	40
<210> 15		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		

<400> 15 ctacttagct ttccaagtgg	20	
<210> 16 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> primer		10
<400> 16 gggacagaca cctttgaaa ta	22	
<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> primer		20
<400> 17 gttgaaggag tccttgactg	20	
<210> 18 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> primer		30
<400> 18 ctttcagcat cttcacgg	18	
<210> 19 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> primer		40
<400> 19 agtgaagttt ctaccatcc	19	
<210> 20 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial		

<220>

<223> primer

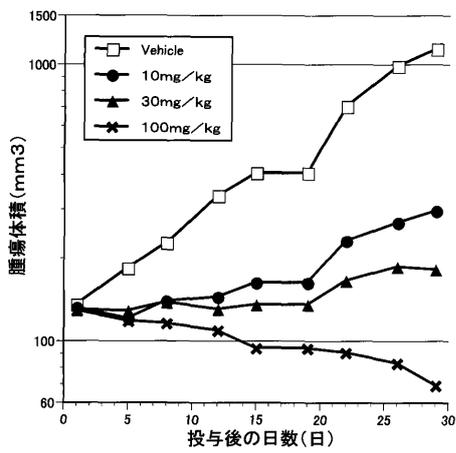
<400> 20

ggcgttctct ttcagcatct

20

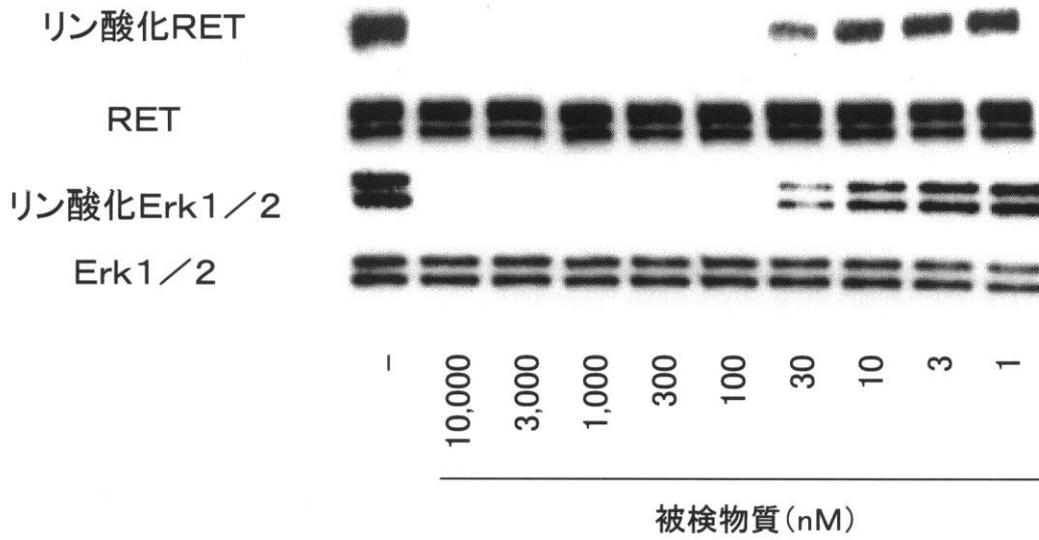
【 図 2 】

図 2



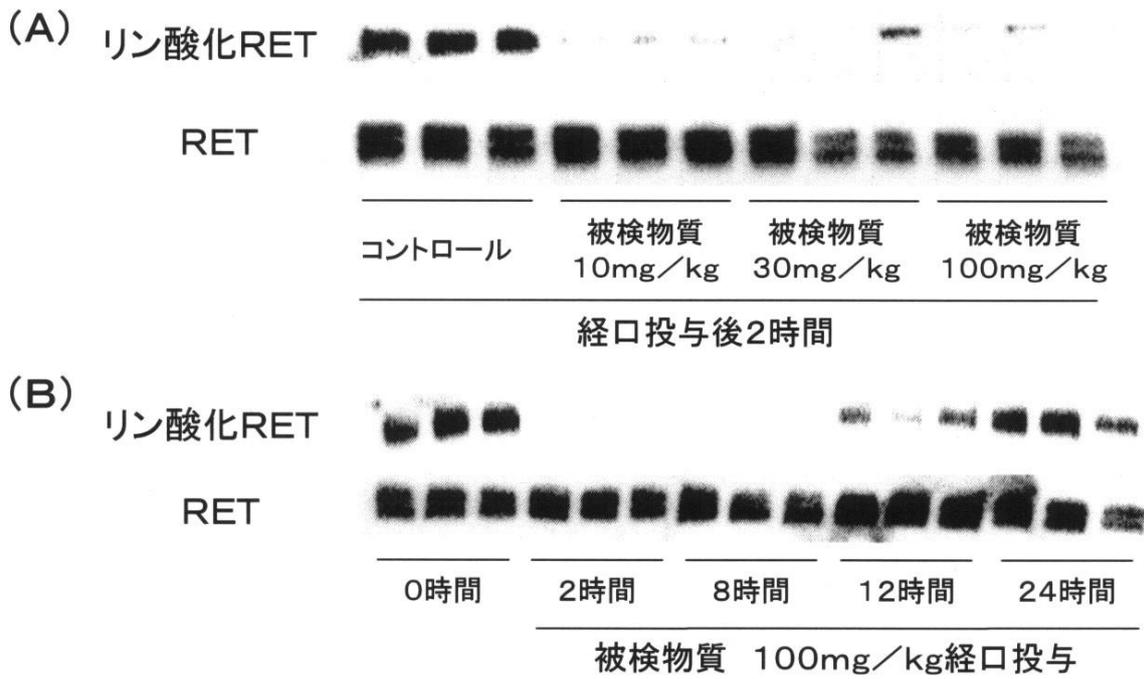
【図1】

図1



【図3】

図3



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 0 7 D 215/48 (2006.01) C 0 7 D 215/48

(56) 参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 0 8 9 8 1 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 2 / 0 3 2 8 7 2 (W O , A 1)
特表 2 0 0 2 - 5 3 6 4 1 4 (J P , A)
特開 2 0 0 3 - 0 1 2 6 6 8 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 8 1 4 4 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 5 / 0 5 6 7 6 4 (W O , A 1)
特表 2 0 0 3 - 5 2 5 5 9 5 (J P , A)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/47
A61P 1/00
A61P 5/18
A61P 35/00
A61P 43/00
C07D 215/48
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)