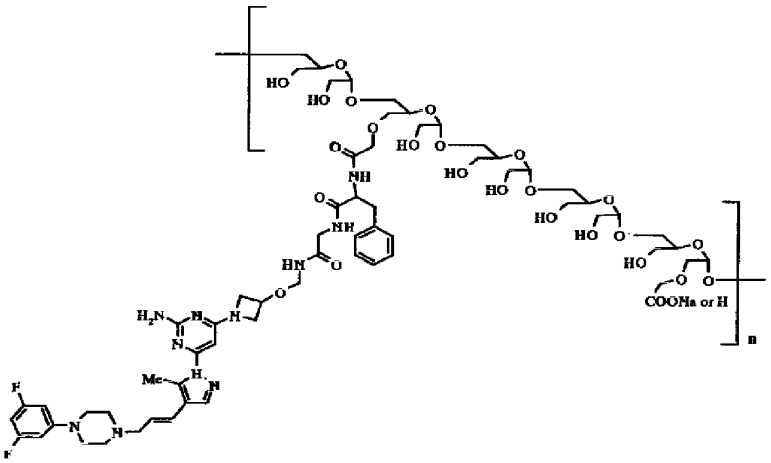


（式中、スペーサーを介して医薬化合物が結合した薬物担体の部分を繰り返し単位として記載したが、この標記は便宜上かつ模式的なものであり、例６で得られる化合物がこの構成単位の単なる繰り返しからなる化合物であると解釈してはならない。他の化合物の類似の標記についても同様である。）

【００６０】CM-デキストランポリアルコール水溶液（平均分子量300K、CM化度0.40、濃度 27.8 mg/ml）33 mlに、例５で得た化合物120 mgおよび1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBtと略）25 mgのメタノール溶液（５０ ml）を加え、次いで1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩（EDC）35 mgを加えた後、反応液を1 N水酸化ナトリウム水溶液でpH 7.4付近に調整した。室温で2時間撹拌した後、EDC 35 mgを追加し、室温で更に20時間撹拌した。GPC分析｛カラム：東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶離液：20％アセトニトリル－0.1M酢酸ナトリウム水溶液（pH 5）｝で反応の終了を確認した後、反応液に1 N水酸化ナトリウムを加え、pH 11付近に調整し、1時間撹拌した後、バイオマックス－５０膜を用いて脱塩、および低分子有機化合物を除去した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター（0.22（m）で沪過した後、凍結乾燥して標記化合物802 mgを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を水：アセトニトリル＝１：１中での308 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ5.5%であった。

【００６１】例７

9H-フルオレン-9-イルメチル 13-({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)-7-ベンジル-2,5,8,11-テトラオキソ-3,6,9,12-テトラアザトリデク-1-イルカルバメート｛Fmoc-Gly-Gly-Phe-Gly-AM-薬物(1)｝

例1－2で得た化合物65 mgおよびFmoc-Gly-Gly-Phe-OH 93 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物123 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 2.5-2.6 (m, 4 H), 2.61 (s, 3 H), 3.0-3.1 (m, 1 H), 3.18 (d, 2 H, J = 7.8 Hz), 3.2-3.3 (m, 5 H), 3.8-3.9 (m, 3 H), 3.9-4.0 (m,5 H), 4.2-4.3 (m, 2 H), 4.4-4.5 (m, 3 H), 4.5-4.6 (m, 1 H), 4.7-4.9 (m,3 H), 6.02 (dt, 1 H, J = 15.9, 6.6 Hz), 6.05 (s, 1 H), 6.25 (t, 1 H, J= 8.3 Hz), 6.3-6.4 (m, 3 H), 7.1-7.3 (m, 7 H), 7.38 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 7.5-7.6 (m, 2 H), 7.69 (s, 1 H), 7.73 (d, 2 H, J = 7.3 Hz).

【００６２】例8

2-({2-[(2-アミノアセチル)アミノ]アセチル]アミノ)-N-(2-[[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]-2-オキソエチル)-3-フェニルプロパナミド｛H-Gly-Gly-Phe-Gly-AM-薬物(1)｝

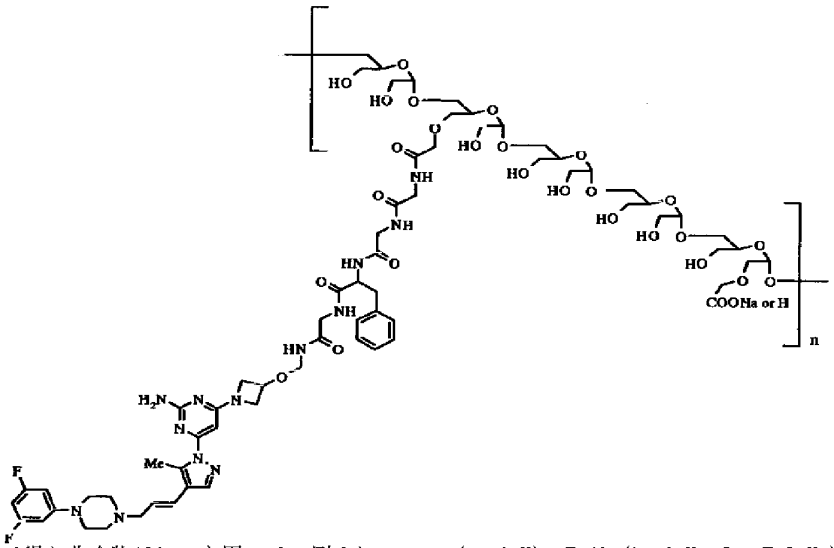
例７で得た化合物 123 mgを用いて、例5と同様の反応、および後処理を行うことにより、標記化合物 71 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 2.5-2.6 (m, 4 H), 2.62 (s, 3 H), 3.17 (d, 2 H, J = 7.8 Hz), 3.2-3.3 (m, 7 H), 3.3-3.4 (m, 1 H), 3.8-3.9 (m, 2 H), 3.9-4.0 (m,4 H), 4.2-4.3 (m, 2 H), 4.4-4.5 (m, 1 H), 4.5-4.6 (m, 1 H), 4.7-4.9 (m,3 H), 6.02 (dt, 1 H, J = 15.9, 6.6 Hz), 6.09 (s, 1 H), 6.24 (t, 1 H, J= 8.3 Hz), 6.3-6.4 (m, 3 H), 7.1-7.3 (m, 5 H), 8.01 (s, 1 H).

【００６３】例9

CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-AM-薬物(1)

【化６】



【００６４】例8で得た化合物130 mgを用いて、例６と同様の方法でCM-デキストランポリアルコール862 mgと縮合させた後、例６と同様の方法で後処理、精製および凍結乾燥を行うことにより、標記化合物834 mgを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を例６と同様の方法で定量したところ5.8%であった。

【００６５】例10

9H-フルオレン-9-イルメチル 13-({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)-7-(sec-ブチル)-2,5,8,11-テトラオキソ-3,6,9,12-テトラアザトリデク-1-イルカルバメート {Fmoc-Gly-Gly-Ile-Gly-AM-薬物(1)}

例1－2で得た化合物110 mgおよびFmoc-Gly-Gly-Ile-OH 140 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物92 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.90 (t, 3 H, J = 7.4 Hz), 0.94 (d, 3 H, J = 6.9 Hz),1.1-1.3 (m, 1 H), 1.5-1.6 (m, 1 H), 1.8-1.9 (m, 1 H), 2.64 (s, 3 H), 2.7-2.8 (m, 4 H), 3.19 (d, 2 H, J = 7.8 Hz), 3.2-3.3 (m, 4 H), 3.8-3.9 (m,3 H), 3.9-4.0 (m, 3 H), 4.0-4.1 (m, 3 H), 4.2-4.3 (m, 3 H), 4.44 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 4.5-4.6 (m, 1 H), 4.7-4.8 (m, 2 H), 4.7-4.9 (m, 3 H), 6.02 (dt, 1 H, J = 15.9, 6.6 Hz), 6.04 (s, 1 H), 6.26 (t, 1 H, J = 8.3 Hz), 6.36 (d, 2 H, J = 8.3 Hz), 6.37 (d, 1 H, J = 15.9 Hz), 7.2-7.3 (m, 2 H), 7.40 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 7.5-7.6 (m, 2 H), 7.73 (s, 1 H), 7.75 (d,2 H, J = 7.3 Hz).

【００６６】例11

2-({2-[(2-アミノアセチル)アミノ]アセチル]アミノ)-N-(2-[[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]-2-オキソエチル)-3-メチルペンタナミド {H-Gly-Gly-Ile-Gly-AM-薬物(1)}

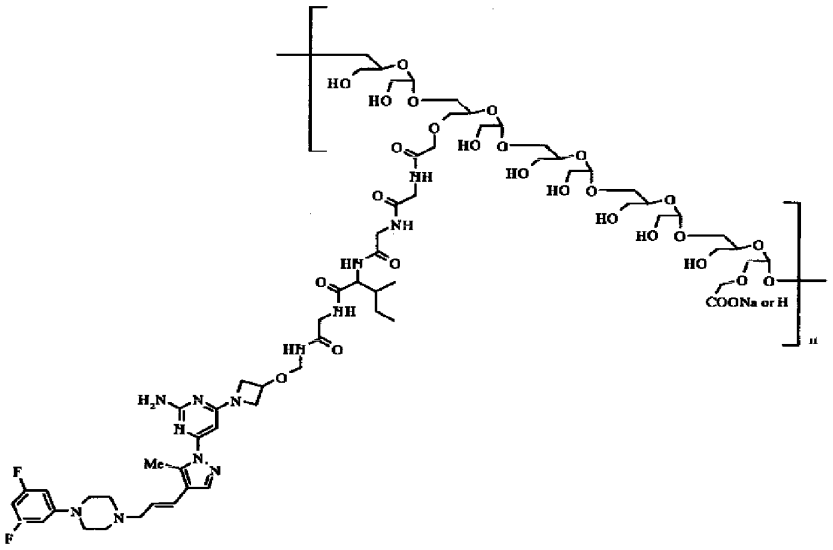
例10で得た化合物240 mgを用いて、例5と同様の反応、および後処理を行うことにより、標記化合物138 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.92 (t, 3 H, J = 7.4 Hz), 0.93 (d, 3 H, J = 6.9 Hz),1.1-1.3 (m, 1 H), 1.5-1.6 (m, 1 H), 1.8-1.9 (m, 1 H), 2.62 (s, 3 H), 2.7-2.8 (m, 4 H), 3.19 (d, 2 H, J = 7.8 Hz), 3.2-3.3 (m, 4 H), 3.39 (d, 2H, J = 1.0 Hz), 3.8-4.0 (m, 6 H), 4.13 (d, 1 H, J = 7.3 Hz), 4.2-4.3 (m,2 H), 4.5-4.6 (m, 1 H), 4.76 (d, 2 H, J = 2.7 Hz), 6.00 (dt, 1 H, J = 15.9, 6.6 Hz), 6.01 (s, 1 H), 6.26 (t, 1 H, J = 8.3 Hz), 6.37 (d, 2 H, J= 8.3 Hz), 6.38 (d, 1 H, J = 15.9 Hz), 7.1-7.2 (m, 1 H), 7.75 (s, 1 H).

【００６７】例12

CM-Dex-PA-Gly-Gly-Ile-Gly-AM-薬物(1)

【化７】



【００６８】例11で得た化合物138 mgを用いて、例６と同様の方法でCM-デキストランポリアルコール987 mgと縮合させた後、例６と同様の方法で後処理、精製および凍結乾燥を行うことにより、標記化合物1.14 gを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を例６と同様の方法で定量したところ6.1%であった。

【００６９】例13

9H-フルオレン-9-イルメチル 13-({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)-7-イソプロピル-2,5,8,11-テトラオキソ-3,6,9,12-テトラアザトリデク-1-イルカルバメート｛Fmoc-Gly-Gly-Val-Gly-AM-薬物(1)｝

例1－2で得た化合物190 mgおよびFmoc-Gly-Gly-Val-OH 250 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物233 mgを得た。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ：0.98 (d, 6 H, J = 5.6 Hz), 2.1-2.2 (m, 1 H), 2.61 (s,3 H), 2.7-2.8 (m, 4 H), 3.19 (d, 2 H, J = 7.8 Hz), 3.2-3.3 (m, 4 H), 3.8-3.9 (m, 4 H), 3.9-4.0 (m, 2 H), 4.0-4.1 (m, 3 H), 4.2-4.3 (m, 3 H), 4.43 (d, 2 H, J = 6.6 Hz), 4.5-4.6 (m, 1 H), 4.7-4.8 (m, 2 H), 6.03 (dt, 1H, J = 15.9, 6.6 Hz), 6.04 (s, 1 H), 6.26 (t, 1 H, J = 8.3 Hz), 6.38 (d, 2 H, J = 8.3 Hz), 6.39 (d, 1 H, J = 15.9 Hz), 7.27 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 7.39 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 7.58 (d, 2 H, J = 7.3 Hz), 7.73 (s, 1 H), 7.75 (d, 2 H, J = 7.3 Hz).

【００７０】例14

2-({2-[(2-アミノアセチル)アミノ]アセチル]アミノ)-N-(2-[[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]-2-オキソエチル)-3-メチルブタナミド｛H-Gly-Gly-Val-Gly-AM-薬物(1)｝

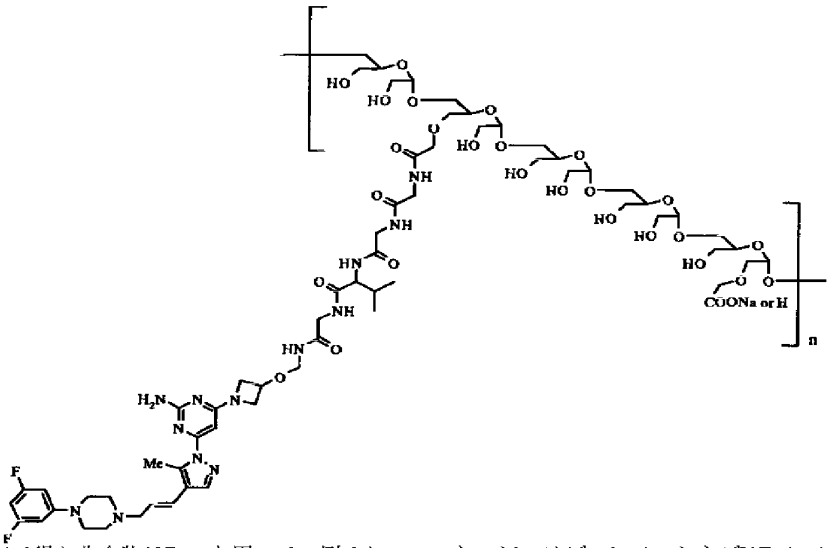
例13で得た化合物311 mgを用いて、例5と同様の反応、および後処理を行うことにより、標記化合物237 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ：0.96 (d, 6 H, J = 5.6 Hz), 2.2-2.3 (m, 1 H), 2.62 (s,3 H), 2.7-2.8 (m, 4 H), 3.17 (d, 2 H, J = 7.8 Hz), 3.2-3.3 (m, 4 H), 3.8-3.9 (m, 4 H), 3.9-4.0 (m, 2 H), 4.0-4.1 (m, 3 H), 4.2-4.3 (m, 2 H), 4.5-4.6 (m, 1 H), 4.7-4.8 (m, 1 H), 4.8-4.9 (m, 1 H), 5.0-5.1 (m, 1 H), 6.02 (dt, 1 H, J = 15.9, 6.6 Hz), 6.06 (s, 1 H), 6.24 (t, 1 H, J = 8.3 Hz), 6.3-6.4 (m, 3 H), 7.72 (s, 1 H).

【００７１】例15

CM-Dex-PA-Gly-Gly-Val-Gly-AM-薬物(1)

【化８】



【００７２】例14で得た化合物237 mgを用いて、例６と同様の方法でCM-デキストランポリアルコール1.724 gと縮合させた後、例６と同様の方法で後処理、精製および凍結乾燥を行うことにより、標記化合物1.88 gを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を例６と同様の方法で定量したところ6.0%であった。

【００７３】例16

9H-フルオレン-9-イルメチル (1S)-1-[(2-[[([1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]-2-オキソエチル)アミノ]カルボニル]-3-(メチルスルファニル)プロピルカルバメート {Fmoc-Met-Gly-AM-薬物(1)}

例1－2で得た化合物100 mgおよびFmoc-Met-OH 131 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物196 mgを得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ: 1.92-2.22 (m, 5 H), 2.52-2.58 (m, 2 H), 2.61 (s, 3 H),2.73-2.75 (m, 4 H), 3.21-3.28 (m, 6 H), 3.74-5.08 (m, 13 H), 6.01-6.07 (m, 3 H), 6.24 (tt, 1 H, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 6.36 (dd, 2 H, J = 8.8 Hz,2.2 Hz), 6.40 (d, 1 H, J = 16.1 Hz), 7.27-7.29 (m, 2H), 7.37 (t, 2 H, J= 7.6 Hz), 7.54 (d, 2 H, J = 7.6 Hz), 7.70 (d, 2 H, J = 7.6 Hz), 7.75 (s, 1 H).

【００７４】例17

(2S)-2-アミノ-N-(2-[[([1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ) メチル] アミノ]-2-オキソエチル)-4-(メチルスルファニル)ブタナミド {H-Met-Gly-AM-薬物(1)}

例16で得た化合物196 mgを1,4-ジオキサン20 mlに溶解し、ピペリジン2 ml, およびDMF 1 mlを加え、室温で30分間撹拌した。溶媒を留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール:水＝７：3: 1の下層にて展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物117 mgを得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ: 1.80-1.89 (m, 1 H), 2.10 (s, 3 H), 2.17-2.21 (m, 1 H),2.63-2.64 (m, 9 H), 3.18-3.24 (m, 6 H), 3.61-3.64 (m, 1H), 3.93-3.97 (m,4 H), 4.23-4.27 (m, 2 H), 4.55-4.58 (m, 1 H), 4.76-4.78 (m, 2 H), 6.05(dt, 1 H, J = 15.9 Hz, 6.9 Hz), 6.10 (s, 1 H), 6.24 (dt, 1 H, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 6.36 (dd, 2 H, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 6.40 (d, 1 H, J = 16.9 Hz), 7.73 (s, 1 H).

【００７５】例18

9H-フルオレン-9-イルメチル (7S)-13-([1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)-7-[2-(メチルスルファニル)エチル]-2,5,8,11-テトラオキソ-3,6,9,12-テトラアザトリデク-1-イルカルバメート {Fmoc-Gly-Gly-Met-Gly-AM-薬物(1)}

例17で得た化合物117 mgおよびFmoc-Gly-Gly-OH 118 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物182 mgを得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ: 1.92-2.22 (m, 5 H), 2.48-2.52 (m, 2 H), 2.55-2.68 (m, 7H), 3.21-3.28 (m, 6 H), 3.82-4.81 (m, 17 H), 5.98-6.05 (m, 3 H), 6.25 (dt, 1 H, J = 8.8 Hz, 1.9 Hz), 6.36 (dd, 2 H, J = 8.6 Hz, 1.9 Hz), 6.39 (d, 1 H, J = 17.1 Hz), 7.24-7.29 (m, 2H), 7.36 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 7.53(d, 2 H, J = 9.3 Hz), 7.70-7.73 (m, 3 H).

【００７６】例19

(2S)-2-([2-[(2-アミノアセチル)アミノ]アセチル]アミ

OnCusp
Ex. 1002

ノ)-N-(2-[[([1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]-2-オキソエチル)-4-(メチルスルファニル)ブタナミド｛H-Gly-Gly-Met-Gly-AM-薬物(1)｝

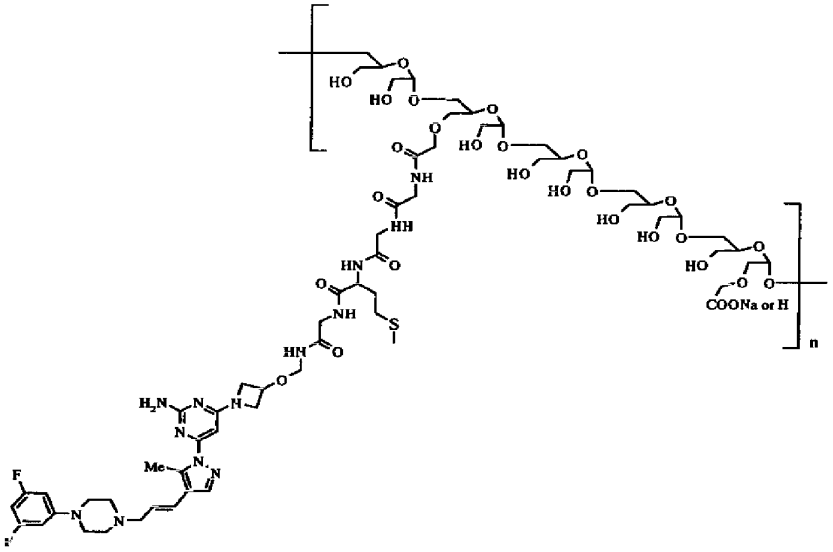
例18で得た化合物182 mgを用いて、例17と同様の反応、および後処理を行うことにより、標記化合物135 mgを得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ：1.92-2.20 (m, 5 H), 2.45-2.70 (m, 9 H), 3.11-3.27 (m, 6H), 3.58-4.78 (m, 14 H), 5.94-6.07 (m, 3 H), 6.23 (t, 1 H, J = 8.8 Hz),6.33-6.36 (m, 3 H), 7.71 (s, 1 H).

【００７７】例20

CM-Dex-PA-Gly-Gly-Met-Gly-AM-薬物(1)

【化９】



【００７８】例19で得た化合物135 mgを用いて、例６と同様の方法でCM-デキストランポリアルコール870 mgと縮合させた後、例６と同様の方法で後処理、精製および凍結乾燥を行うことにより、標記化合物956 mgを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を例６と同様の方法で定量したところ4.7%であった。

【００７９】例21

tert-ブチル2-[[([1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル)オキシ]メチル]アミノ])-2-オキソエチル(メチル)カルバメート　｛Boc-Sar-AM-薬物(1)｝

例21－1

([2-[(tert-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ]アセチル]アミノ)メチル　アセテート

Boc-ザルコシルシルグリシン4.11gおよび四酢酸鉛｛Pb(OAc)$_4$｝9.20 gを用いて、例１－１と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物3.20 gを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ：1.47 (s, 9 H), 2.07 (s, 3 H), 2.93 (s, 3 H), 3.88 (brs, 2 H), 5.26 (d, 2 H, J = 7 Hz).

【００８０】例21－2

tert-ブチル2-([[(1-ベンズヒドリル-3-アゼチジニル)オキシ]メチル]アミノ)-2-オキシエチル(メチル)カルバメート

1-ベンズヒドリル-3-アゼチジノール479 mgおよび例21－1で得た化合物520 mgを用いて、例１－３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物223 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ:1.43 (s, 9 H), 2.86 (brs, 3 H), 2.91 (dd, 2 H, J = 6 Hz, 9 Hz), 3.48 (dd, 2 H, J = 7 Hz, 9 Hz), 3.82 (s, 2 H), 4.26 (m, 1 H),4.33 (s, 1 H), 4.70 (d, 2 H, J = 7 Hz), 7.15-7.40 (m, 10 H).

【００８１】例21－3

tert-ブチル2-[[([1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル)オキシ]メチル]アミノ])-2-オキソエチル(メチル)カルバメート　｛Boc-Sar-AM-薬物(1)｝

例21－2で得た化合物 223 mg (0.51 mmol))をエタノール50 mlに溶解させた後、10% パラジウム－炭素(50%含水)200 mgを加え、加圧下（５ kg/cm^2）で16 時間接触水素添加を行った。不溶物を沪過により除き、沪液を濃縮乾固した後、残渣をジメチルホルムアミド20 mlに溶解させ、4-クロロ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピ

ラゾール-1-イル)-2-ピリミジニルアミン183 mgおよびトリエチルアミン0.057 mlを加えた後、80℃で48時間撹拌した。反応液を減圧下で濃縮した後、得られた残渣をプレパラティブ薄層クロマトグラフィーに付し10% メタノール-クロロホルムの混合溶媒で展開することにより、標記化合物137 mgを得た。

^{1}H NMR($CDCl_3$) δ: 1.47 (s, 9 H), 2.61-2.64 (m, 7 H), 2.96 (s, 3 H), 3.18(d, 2 H, J = 6.1 Hz), 3.21-3.24 (m, 4 H), 3.88 (s, 2 H), 3.95 (dd, 2 H,J = 9.8 Hz, 3.8 Hz), 4.24-4.28 (m, 2 H), 4.56-4.61 (m, 1 H), 4.74-4.79 (m, 4 H), 6.03 (dt, 1H, J = 15.9 Hz, 7.8 Hz), 6.11 (s, 1 H), 6.24 (dt, 1H, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 6.35-6.39 (m, 3 H), 7.73 (s, 1 H).

【００８２】例22

2-アミノ-N-[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]-2-(メチルアミノ)アセトアミド {H-Sar-AM-薬物(1)}

例21－3で得た化合物137 mgに氷冷下、5% トリフルオロ酢酸-塩化メチレン溶液10 ml を加え、室温で1時間撹拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで抽出した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下で溶媒を留去した後、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール:水＝20 : 3: 1の下層で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物58 mgを得た。

^{1}H NMR($CDCl_3$) δ: 2.46 (s, 3 H), 2.48 (s, 3 H), 2.68-2.72 (m, 4 H), 3.18(d, 2 H, J = 6.1 Hz), 3.25-3.28 (m, 4 H), 3.34 (s, 2 H), 3.95-3.97 (m, 2H, J = 9.8 Hz, 3.8 Hz), 4.25-4.29 (m, 2 H), 4.58-4.72 (m, 1 H), 4.78 (d, 2 H, J = 8.3 Hz), 4.80-4.85 (m, 2 H), 6.05 (dt, 1H, J = 17.1 Hz, 7.5 Hz), 6.11 (s, 1 H), 6.26 (t, 1 H, J = 8.3 Hz), 6.35-6.42 (m, 3 H), 7.74 (s, 1 H).

【００８３】例23

9H-フルオレン-9-イルメチル (7S)-13-({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)- 7-ベンジル-9-メチル-8-メチレン-2,5,11-トリオキソ-3,6,9,12-テトラアザトリデク-1-イルカルバメート {Fmoc-Gly-Gly-Phe-Sar-AM-薬物(1)}

例22で得た化合物58 mgおよびFmoc-Gly-Gly-Phe-OH 100 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物43 mgを得た。

^{1}H NMR($CDCl_3$) δ: 2.58-2.69 (m, 10 H), 3.08-3.25 (m, 8 H), 3.69-4.74 (m,16 H), 5.97-6.07 (m, 2 H, CH=CHCH$_2$), 6.24 (t, 1 H, J = 8.6 Hz), 6.31-6.36 (m, 3 H), 7.16-7.73 (m, 9 H).

【００８４】例24

2-アミノ-N-[2-({[(1S)-2-[(2-[[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]-2-オキソエチル)(メチル)アミノ]-1-ベンジル-2-プロペニル]アミノ)-2-オキソエチル]アセタミド {H-Gly-Gly-Phe-Sar-AM-薬物(1)}

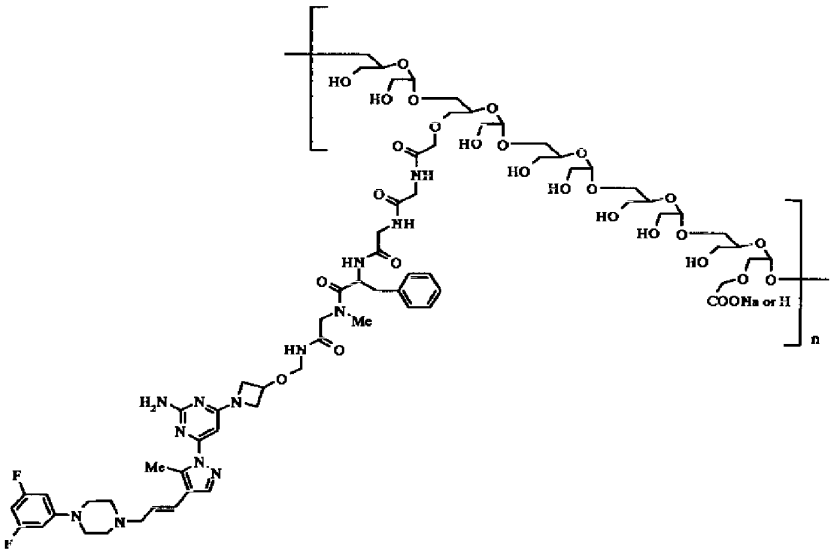
例23で得た化合物43 mgをDMF 6 mlに溶解させ、ピペリジン４mlを加え、室温で2日間撹拌した。減圧下で溶媒を留去した後、HPLC {カラム： CAPCELL PAK C18、溶離液：40 %(1/2=MeOH/CH$_3$CN)/ 0.1% TFA水溶液、流速：8 ml / min} を用いて精製することにより、標記化合物16 mgを得た。

^{1}H NMR($CDCl_3$) δ: 2.61-2.64 (m, 7 H, Me), 2.79 (s, 3 H), 2.79-3.10 (m, 2H), 3.16-3.22 (m, 6 H), 3.40 (s, 2 H), 3.84-4.69 (m, 10 H), 4.78-4.80 (m, 2 H), 5.99-6.09 (m, 2 H), 6.24 (dt, 1 H, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 6.34-6.37 (m, 3 H), 7.71 (s, 1 H).

【００８５】例25

CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Sar-AM-薬物(1)

【化１０】



【００８６】例24で得た化合物16 mgを用いて、例６と同様の方法でCM-デキストランポリアルコール92 mgと縮合させた後、例６と同様の方法で後処理、精製および凍結乾燥を行うことにより、標記化合物103 mgを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を例６と同様の方法で定量したところ4.4%であった。

【００８７】例26

tert-ブチル1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]カルボニル)-2-メチルブチルカルバメート　{Boc-Ile-AM-薬物(1)}

例26－1

([2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-メチルペンタノイル]アミノ)メチルアセテート

Boc-イソロイシルグリシン4.26 g および四酢酸鉛｛$Pb(OAc)_4$｝8.14 gを用いて、例１－１と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物3.64 gを得た。

^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.91 (t, 3 H, J = 7.3 Hz), 0.93 (d, 3 H, J = 6.8 Hz),1.05-1.20 (m, 1 H), 1.35-1.55 (m, 1 H), 1.44 (s, 9 H), 1.85-2.00 (m, 1H), 2.06 (s, 3 H), 3.95-4.05 (m, 1 H), 4.95-5.05 (m, 1 H), 5.20-5.30 (m,2 H), 7.00-7.10 (m, 1 H).

【００８８】例26－2

tert-ブチル1-({[(1-ベンズヒドリル-3-アゼチジニルオキシ)メチル]アミノ]カルボニル)-2-メチルブチルカルバメート

1-ベンズヒドリル-3-アゼチジノール1.08gおよび例26－1で得た化合物1.36gを用いて、例１－３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物690 mgを得た。

^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.86 (t, 3 H, J = 7.3 Hz), 0.91 (d, 3 H, J = 6.8 Hz),1.00-1.15 (m, 1 H), 1.30-1.50 (m, 1 H), 1.40 (s, 9 H), 1.80-1.95 (m, 1H), 2.91 (dd, 2 H, J = 9 Hz, 6 Hz), 3.47 (dd, 2 H, J = 9 Hz, 6 Hz), 3.91(dd, 1 H, J = 9 Hz, 6 Hz), 4.24-4.30 (m, 1 H), 4.33 (s, 1 H), 4.66 (d,2 H, J = 7 Hz), 4.90-5.00 (m, 1 H), 6.70-6.80 (m, 1 H), 7.10-7.40 (m, 10H).

【００８９】例26－3

tert-ブチル1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]カルボニル)-2-メチルブチルカルバメート　{Boc-Ile-AM-薬物(1)}

例26－2で得た化合物335 gをエタノール20 mlに溶解させた後、10%パラジウム－炭素（50%含水）300 mgを加え、加圧下（5kg/cm^2）で20時間接触水素添加を行った。不溶物を沪過により除き、沪液を濃縮した後、残渣に酢酸エチルを加え1時間撹拌した。析出物を沪取した後、メタノール：クロロホルム（１：９）混合溶媒に溶解させ、飽和食塩水－飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の混合溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下で留去することにより、白色固体141 mgを得た。得られた固体141 mgおよび4-クロロ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-2-ピリミジニルアミン 199 mgをジメチルホルムアミド 10mlに溶解させ、トリエチルアミン0.063 mlを加えた後、80℃で36時間撹拌した。反応液を減圧下で濃縮した後、残渣をクロロホルムに溶解させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した後、残渣を

シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、メタノール：クロロホルム（２：98）混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物205 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.93 (t, 3 H, J = 7.6 Hz), 0.95 (d, 3 H, J = 6.8 Hz),1.05-1.25 (m, 1 H), 1.40-1.60 (m, 1 H), 1.45 (s, 9 H), 1.90-2.00 (m, 1H), 2.63 (t, 4 H, J = 5 Hz), 2.65 (s, 3 H), 3.18 (d, 2 H, J = 7 Hz), 3.23 (t, 4 H, J = 5 Hz), 3.90-4.00 (m, 3 H), 4.20-4.30 (m, 2 H), 4.55-4.65(m, 1 H), 4.70-4.85 (m, 4 H), 4.90-5.00 (m, 1 H), 6.03 (dt, 1 H, J = 16Hz, 7 Hz), 6.12 (s, 1 H), 6.25 (tt, 1 H, J = 9 Hz, 2 Hz), 6.30-6.45 (m,3 H), 6.75-6.85 (m, 1 H), 7.73 (s, 1 H).

【００９０】例27

2-アミノ-N-[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]-3-メチルペンタナミド {H-11e-AM-薬物(1)}

例26－3で得た化合物481 mgを用いて例２と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより標記化合物307 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.92 (t, 3 H, J = 7.3 Hz), 0.99 (d, 3 H, J = 6.8 Hz),1.05-1.20 (m, 1 H), 1.25-1.45 (m, 1 H), 2.00-2.15 (m, 1 H), 2.63 (t, 4H, J = 5 Hz), 2.65 (s, 3 H), 3.18 (d, 2 H, J = 7 Hz), 3.23 (t, 4 H, J =5 Hz), 3.90-4.00 (m, 2 H), 4.20-4.40 (m, 3 H), 4.55-4.65 (m, 1 H), 4.70-4.90 (m, 4 H), 6.03 (dt, 1 H, J = 16 Hz, 7 Hz), 6.11 (s, 1 H), 6.24 (tt,1 H, J = 9 Hz, 2 Hz), 6.30-6.45 (m, 3 H), 7.74 (s, 1 H), 8.15-8.25 (m,1 H).

【００９１】例28

9H-フルオレン-9-イルメチル2-({2-[(2S)-2-({[(1R,2R)-1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]カルボニル)-2-メチルブチル]アミノ]カルボニル)ピロリジニル]-2-オキソエチル]アミノ)-2-オキソエチルカルバメート {Fmoc-Gly-Gly-Pro-Ile-AM-薬物(1)}

例27で得た化合物303 mgおよびFmoc-Gly-Gly-Pro-OH 219 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物368 mgを得た。^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ: 0.86-0.92 (m, 6 H), 1.10-2.18 (m, 7 H), 2.61-2.64 (m, 7H), 3.16-3.22 (m, 6 H), 3.48-3.53 (m, 1 H), 3.67-3.71 (m, 1 H), 3.82-4.31 (m, 10 H), 4.40 (t, 1 H, J = 7.3 Hz), 4.52-4.61 (m, 3 H), 4.80-4.89 (m, 4 H), 6.02 (dt, 1H, J = 15.9 Hz, 5.6 Hz), 6.12 (s, 1 H), 6.24 (t, 1 H, J = 8.8 Hz), 6.34-6.37 (m, 3 H), 7.28 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 7.37 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 7.52-7.57 (m, 2 H), 7.71-7.75 (m, 3 H).

【００９２】例29

(2S)-1-[2-[(2-アミノアセチル) アミノ] アセチル]-N-[(1R,2R)-1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)- 4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ) メチル] アミノ]カルボニル)-2-メチルブチル]-2-ピロリジンカルボキサミド {H-Gly-Gly-Pro-Ile-AM-薬物(1)}

例28で得た化合物368 mgを用いて、例17と同様の反応、および後処理を行うことにより、標記化合物178 mgを得た。

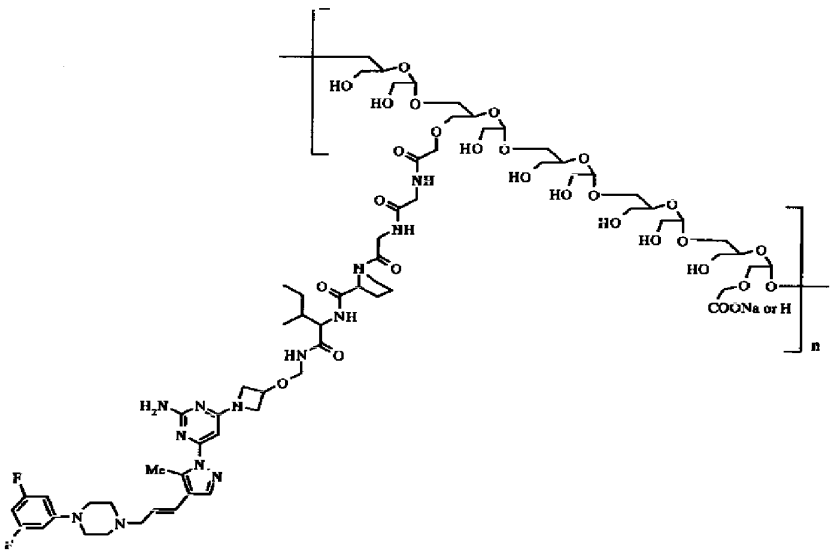
^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ: 0.86-0.92 (m, 6 H), 1.09-1.52 (m, 2 H), 1.98-2.21 (m, 5H), 2.61-2.64 (m, 7 H), 3.16-3.22 (m, 6 H), 3. 38 (s, 2 H), 3.48-3.81 (m, 2 H), 3.78-3.94 (m, 4 H), 4.08-4.15 (m, 1 H), 4.17-4.25 (m, 2 H), 4.31 (t, 1 H, J = 6.8 Hz), 4.52-4.58 (m, 2 H), 4.68-4.88 (m, 2 H), 5.08-5.12 (m, 2 H), 6.02 (dt, 1H, J = 15.9 Hz, 5.8 Hz), 6.08 (s, 1 H), 6.24 (t,1 H, J = 8.8 Hz), 6.34-6.37 (m, 3 H), 7.72 (s, 1 H).

【００９３】例30

CM-Dex-PA-Gly-Gly-Pro-Ile-AM-薬物(1)

【化１１】

OnCusp
Ex. 1002



【００９４】例29で得た化合物178 mgを用いて、例６と同様の方法でCM-デキストランポリアルコール1.18 gと縮合させた後、例６と同様の方法で後処理、精製および凍結乾燥を行うことにより、標記化合物1.34 gを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を例６と同様の方法で定量したところ7.3%であった。

【００９５】例31

tert-ブチル1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ}カルボニル)-3-メチルブチルカルバメート　{Boc-Leu-AM-薬物(1)}

例31－1

([2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-4-メチルペンタノイル]アミノ)メチルアセテート

Boc-ロイシルグリシン10.95 g および四酢酸鉛｛$Pb(OAc)_4$｝20.9 gを用いて、例１－１と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物6.58 gを得た。

^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.93 (d, 3 H, J = 6 Hz), 0.94 (d, 3 H, J = 6 Hz), 1.44 (s, 9 H), 1.40-1.75 (m, 3 H), 2.06 (s, 3 H), 4.05-4.15 (m, 1 H), 4.75-4.85 (m, 1 H), 5.20-5.30 (m, 2 H), 7.15-7.25 (m, 1 H).

【００９６】例31－2

tert-ブチル1-({[(1-ベンズヒドリル-3-アゼチジニルオキシ)メチル]アミノ}カルボニル)-3-メチルブチルカルバメート

1-ベンズヒドリル-3-アゼチジノール3.38 gおよび例31－1で得た化合物2.68 gを用いて、例１－３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物1.20 gを得た。

^1H NMR ($CDCl_3$) δ:0.89 (d, 3 H, J = 6 Hz), 0.90 (d, 3 H, J = 6 Hz), 1.35-1.50 (m, 1 H), 1.40 (s, 9 H), 2.90-2.95 (m, 2 H), 3.45-3.55 (m, 2 H), 4.00-4.10 (m, 1 H), 4.20-4.30 (m, 1 H), 4.33 (s, 1 H), 4.65-4.70 (m, 2 H), 4.70-4.80 (br, 1 H), 6.75-6.85 (m, 1 H), 7.10-7.50 (m, 10 H).

【００９７】例31－3

tert-ブチル1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ}カルボニル)-3-メチルブチルカルバメート｛Boc-Leu-AM-薬物(1)｝

例31－2で得た化合物1.20 gをエタノール50 mlに溶解させた後、10%パラジウム－炭素（50%含水）600 mgを加え、加圧下（5kg/cm²）で20時間接触水素添加を行った。不溶物を沪過により除き、沪液を濃縮した後、残渣に酢酸エチルを加え、1時間撹拌した後、析出物を沪取することにより、白色固体490 mgを得た。得られた固体288 mgおよび4-クロロ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-2-ピリミジニルアミン326 mgをジメチルホルムアミド9 mlに溶解させ、トリエチルアミン0.153 mlを加えた後、80℃で36時間撹拌した。反応液を減圧下で濃縮した後、残渣をクロロホルムに溶解させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、メタノール：クロロホルム（２：９８）混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物327 mgを得た。

^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.94 (d, 3 H, J = 6 Hz), 0.96 (d, 3 H, J = 6 Hz), 1.40-1.60 (m, 1 H), 1.49 (s, 9 H), 1.60-1.80 (m, 2 H), 2.60-2.70 (m, 4 H),2.65

(s, 3 H), 3.19 (d, 2 H, J = 7 Hz), 3.24 (t, 4 H, J = 5 Hz, 3.90-4.00 (m, 2 H), 4.05-4.15 (m, 1 H), 4.20-4.30 (m, 2 H), 4.55-4.60 (m, 1 H),4.70-4.90 (m, 5 H), 6.03 (dt, 1 H, J = 16 Hz, 7 Hz), 6.12 (s, 1 H), 6.25(tt, 1 H, J = 9 Hz, 2 Hz), 6.35-6.40 (m, 2 H), 6.38 (d, 1 H, J = 16 Hz), 6.90-7.00 (m, 1 H), 7.73 (s, 1 H).

【００９８】例32

2-アミノ-N-[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]-4-メチルペンタナミド　{H-Leu-AM-薬物(1)}

例31－3で得た化合物327 mgを用いて例２と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより標記化合物153 mgを得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 0.95 (d, 3 H, J = 6 Hz), 0.99 (d, 3 H, J = 6 Hz), 1.30-1.50 (m, 1 H), 1.70-1.85 (m, 2 H), 2.60-2.70 (m, 4 H), 2.65 (s, 3 H),3.19 (d, 2 H, J = 7 Hz), 3.20-3.30 (m, 4 H), 3.43 (dd, 1 H, J = 10 Hz, 3Hz), 3.90-4.00 (m, 2 H), 4.20-4.30 (m, 2 H), 4.55-4.65 (m, 1 H), 4.70-4.90 (m, 4 H), 6.04 (dt, 1 H, J = 16 Hz, 7 Hz), 6.12 (s, 1 H), 6.24 (t, 1H, J = 9 Hz), 6.30-6.45 (m, 3 H), 7.74 (s, 1 H), 8.10-8.25 (m, 1 H).

【００９９】例33

9H-フルオレン-9-イルメチル2-({2-[(2S)-2-({[(1S)-1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル]アミノ]カルボニル)-2-メチルブチル]アミノ]カルボニル)ピロリジニル]-2-オキソエチル]アミノ)-2-オキソエチルカルバメート　{Fmoc-Gly-Gly-Pro-Leu-AM-薬物(1)}

例32で得た化合物208 mgおよびFmoc-Gly-Gly-Pro-OH 150 mgを用いて、例３と同様の反応、後処理、および精製を行うことにより、標記化合物228 mgを得た。

^{1}H NMR($CDCl_3$)δ: 0.88 (d, 3 H, J = 6.4 Hz), 0.93 (d, 3 H, J = 6.4 Hz), 1.58-1.85 (m, 3 H), 1.93-2.22 (m, 4 H), 2.58-2.67 (m, 7 H), 3.16-3.21 (m,6 H), 3.53-3.68 (m, 2 H), 3.82-5.02 (m, 16 H), 5.99-6.08 (m, 3 H), 6.24(t, 1 H, J = 8.8 Hz), 6.34-6.37 (m, 3 H), 7.24-7.28 (m, 2H), 7.36 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 7.54 (d, 2 H, J = 7.6 Hz), 7.71 (s, 1 H)7.72 (d, 2 H, J= 7.6 Hz).

【０１００】例34

(2S)-1-[2-[(2-アミノアセチル) アミノ] アセチル]-N-[(1S)-1-({[({1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-5-メチル-1H-ピラゾール-1-イル)- 4-ピリミジニル]-3-アゼチジニル]オキシ)メチル] アミノ]カルボニル)-2-メチルブチル]-2-ピロリジンカルボキサミド　{H-Gly-Gly-Pro-Leu-AM-薬物(1)}

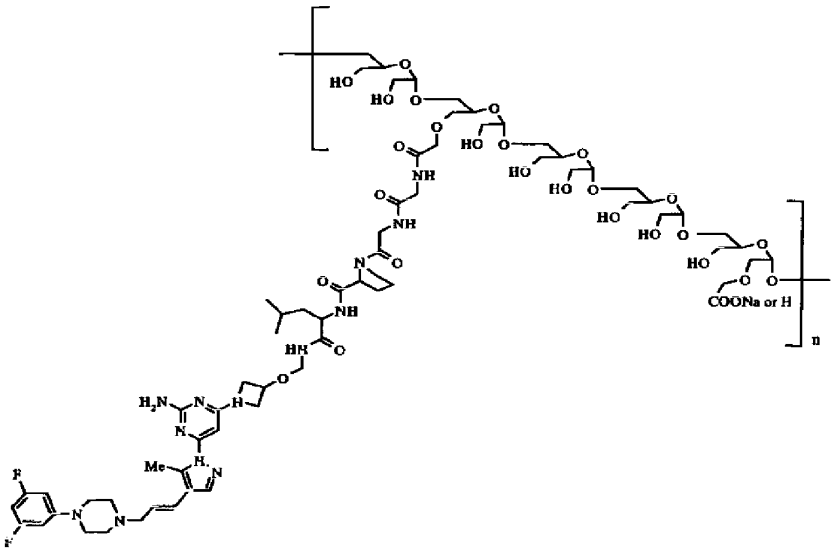
例33で得た化合物228 mgを用いて、例17と同様の反応、および後処理を行うことにより、標記化合物140 mgを得た。

^{1}H NMR($CDCl_3$)δ: 0.90 (d, 3 H, J = 6.6 Hz), 0.95 (d, 3 H, J = 6.5 Hz), 1.58-1.85 (m, 3 H), 1.93-2.38 (m, 4 H), 2.61-2.63 (m, 7 H), 3.17-3.23 (m,6 H), 3.30 (s, 2 H), 3.58 (dd, 1 H, J = 17.1 Hz, 7.5 Hz), 3.76 (dd, 1 H, J = 15.6 Hz, 5.6 Hz), 3.86-4.95 (m, 13 H), 6.03 (dt, 1 H, J = 15.9 Hz,6.8 Hz), 6.09 (s, 1 H), 6.24 (tt, 1 H, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 6.35-6.39 (m, 3 H), 7.72 (s, 1 H).

【０１０１】例35

CM-Dex-PA-Gly-Gly-Pro-Leu-AM-薬物(1)

【化１２】



【０１０２】例34で得た化合物140 mgを用いて、例６と同様の方法でCM-デキストランポリアルコール929 mgと縮合させた後、例６と同様の方法で後処理、精製および凍結乾燥を行うことにより、標記化合物986 mgを得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を例６と同様の方法で定量したところ3.6%であった。

【０１０３】試験例１：ＤＤＳ化合物からの医薬化合物の遊離

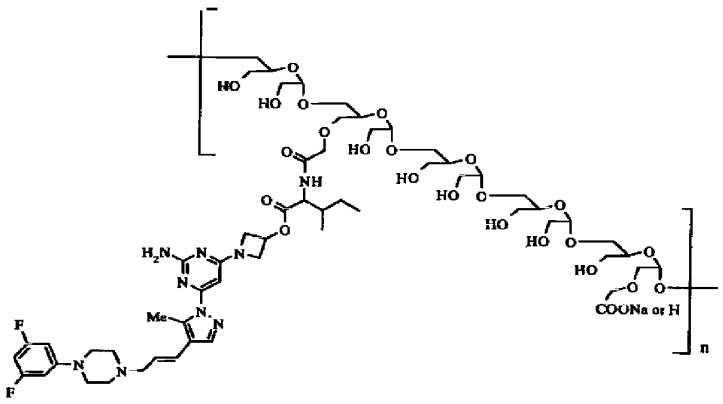
40℃のMeth Aホモジネート中、緩衝液中、または37℃のマウス血清中に被検化合物を溶解させ（500μｇ/ml）、20時間後に遊離された1-[2-アミノ-6-(4-[(E)-3-[4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-ピペラジニル]-1-プロペニル]-1H-ピラゾール-1-イル)-4-ピリミジニル]-3-アゼチジノール（薬物(1)）を定量した。試験結果を表２に示す。試験を行った化合物は弱酸性のMeth Aホモジネート中でペプチド配列に依存した薬物遊離率を示し、弱酸性緩衝液中およびマウス血清中ではほとんど薬物を遊離しなかった。これに対して、比較化合物A：CM-Dex-PA-Ile-薬物(1)及び比較化合物B：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-PABC-薬物(1)（PABCはパラアミノベンジルオキシカルボニルリンカーを示す：Dubowchik, G.M., et al., J.Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, 3347, 1998）は弱酸性緩衝液中およびマウス血清中で高い遊離率を示した。

【０１０４】

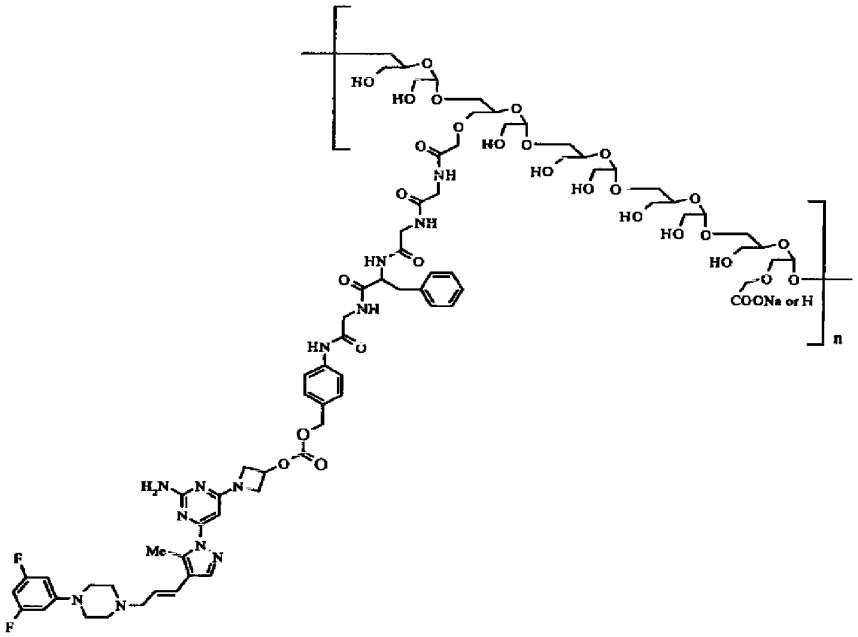
【化１３】

OnCusp
Ex. 1002

比較化合物Ａ



比較化合物Ｂ



【０１０５】

【表２】

化合物	Meth Aホモジネート（pH 4.5）	緩衝液（pH 4.5）	マウス血清
例3の化合物	89 %	＜１ %	NT
例6の化合物	69 %	＜１ %	＜１ %
例9の化合物	77 %	＜１ %	＜１ %
例12の化合物	29 %	＜１ %	NT
例15の化合物	41 %	＜１ %	NT
例20の化合物	7 %	＜１ %	NT
例35の化合物	3 %	＜１ %	NT
比較化合物A	NT	4 % (pH 7.0)	23 %
比較化合物B	NT	25 % (pH 7.0)	57 %

NT：試験を実施しなかった。

【０１０６】試験例２：ＤＤＳ化合物の抗腫瘍活性

Meth A細胞（Murine fibrosarcoma Meth A）をBALB/c系マウスに移植してMeth A担癌マウスを作成し、移植後7日目に薬物を単回尾静脈内投与した。腫瘍の重量を21日目に測定して、腫瘍増殖抑制効果と毒性を評価した。結果を表３に示す。表中＊はダネット検定で有意差有り

と判定された群を示し（*** P<0.001，** P0.01）、投与量は薬物(1)の無水遊離塩基の重量に換算して示した。また、IRは腫瘍の縮小率を示す。本発明のＤＤＳ化合物は用量依存的に腫瘍の縮小効果を発揮し、薬物(1)自体を用いた場合に比べて副作用である下痢の発現が回避されていることが明らかである。

【０１０７】

【表３】

化合物	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 平均値 (g)	IR (%)	BWLmax[a] (%) [day]	下痢 [day]	N[b]
5% グルコース	0	1.390±0.201		< 0	-	0/7
例9の化合物	14.3	0.128±0.026***	88.8	17.9 [11]	-	0/7
	10	0.308±0.068***	73.2	7.3 [8]	-	0/7
	7	0.650±0.100	43.5	2.4 [8]	-	0/7
例35の化合物	12	0.095±0.020***	92.0	7.3 [11]	-	1/7
	8.4	0.103±0.023***	91.4	< 0 [8]	-	0/7
	5.9	0.230±0.065***	80.7	< 0 [8]	-	0/7
薬物(1)	12.2	0.094±0.021***	93.3	20.8 [10]	+ [8, 9]	4/7
	8.55	0.191±0.062***	86.3	10.6 [9]	+ [8, 9]	0/7
	5.99	0.610±0.167**	53.9	6.7 [8]	+ [8, 9]	0/7

[a]: 最大体重減少率（括弧内は最大減少が観察された日）

[b]: 死亡したマウス/使用したマウス

【０１０８】

【発明の効果】本発明のＤＤＳ化合物は血清中での安定性に優れ、有効成分である医薬化合物を腫瘍部位などに対して部位選択的に移行させることができ、その結果、副作用を低減できる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]　識別記号　ＦＩ　（参考）
Ａ６１Ｐ　35/00　Ａ６１Ｐ　35/00
Ｃ０７Ｋ　5/103　ＺＮＡ　Ｃ０７Ｋ　5/103　ＺＮＡ

(72)発明者　内藤　博之
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内
(72)発明者　廣谷　賢志
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

Ｆターム(参考)　4C076 AA95 CC04 CC27 EE30 EE41 EE59 FF36
4C086 AA01 AA02 AA03 BC42 GA07 MA03 MA05 MA07 MA08 NA05 NA06 NA13 ZB11 ZB26
4H045 AA30 BA13 EA22 EA28

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2005-511627

(P2005-511627A)

(43)公表日　平成17年4月28日(2005.4.28)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
A61K 39/395	A61K	39/395	D	4C084
A61K 31/7088	A61K	39/395	C	4C085
A61K 38/00	A61K	39/395	L	4C086
A61K 48/00	A61K	39/395	N	
A61P 1/16	A61K	31/7088		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 128 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-545264 (P2003-545264)
(86)(22)出願日　平成14年11月20日 (2002.11.20)
(85)翻訳文提出日　平成16年5月18日 (2004.5.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/037223
(87)国際公開番号　WO2003/043583
(87)国際公開日　平成15年5月30日 (2003.5.30)
(31)優先権主張番号　60/331,750
(32)優先日　平成13年11月20日 (2001.11.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　503188759
シアトル　ジェネティクス，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　９８０２１　ワシントン州，ボセル，エス．イー．，３０ティーエイチ　ドライブ　２１８２３
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＣＤ３０抗体を使用する免疫学的疾患の治療

(57)【要約】
本発明は、癌以外の免疫学的疾患の治療方法であって、ＣＤ３０に結合し活性化リンパ球に対し細胞静止作用もしくは細胞傷害作用を及ぼす能力で特徴付けられたタンパク質を投与することを含む方法に関する。こうしたタンパク質には、モノクローナル抗体ＡＣ１０およびＨｅＦｉ１、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１の誘導体、およびＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１とＣＤ３０への結合を競合する抗体が含まれる。他のこうしたタンパク質には、多価の抗ＣＤ３０抗体および細胞傷害性薬剤とコンジュゲートした抗ＣＤ３０抗体が含まれる。本発明の抗体による治療方法も提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）活性化リンパ球に対し細胞静止作用もしくは細胞傷害作用を及ぼす第１の抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を、治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。
【請求項２】
第１の抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である請求項１に記載の方法。
【請求項３】
第１の抗体が、多価である請求項１に記載の方法。
【請求項４】
第１の抗体が、ＣＤ３０への結合についてモノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１と競合する請求項１に記載の方法。
【請求項５】
第１の抗体が、細胞傷害性薬剤と結合せずに細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼすことができる請求項１に記載の方法。
【請求項６】
第１の抗体が、活性化リンパ球以外の細胞の不在下で細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼすことができる請求項１に記載の方法。
【請求項７】
第１の抗体が、単一特異性抗体として細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼすことができる請求項１に記載の方法。
【請求項８】
第１の抗体の細胞静止作用または細胞傷害作用を増強する薬剤の投与をさらに含む請求項１に記載の方法。
【請求項９】
第２の抗体の投与をさらに含む請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
第２の抗体が、活性化リンパ球上で発現した第２の受容体または受容体複合体を認識する請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
第２の抗体が、第１の抗体の細胞静止作用または細胞傷害作用を増強する請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
第２の抗体が、活性化リンパ球にシグナルを送達することにより第１の抗体の細胞静止作用または細胞傷害作用を増強する請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
受容体または受容体複合体が、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含む請求項１０または１１に記載の方法。
【請求項１４】
免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１またはＩＣＯＳである請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４、またはＡＰＯ－３である請求項１

３に記載の方法。
【請求項１６】
インテグリンが、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３またはＣＤ１０４である請求項１３に記載の方法。
【請求項１７】
レクチンが、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプのレクチンである請求項１３に記載の方法。
【請求項１８】
第１の抗体が、二重特異性抗体である請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
二重特異性抗体が、ＣＤ３０、および活性化リンパ球上で発現した第２の受容体または受容体複合体、に結合する請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
第２の受容体または受容体複合体に結合する二重特異性抗体の部分が、ＣＤ３０に結合する二重特異性抗体の部分の細胞静止作用または細胞傷害作用を増強する請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
二重特異性抗体の第２の受容体または受容体複合体への結合が、活性化リンパ球にシグナルを送達することにより、ＣＤ３０に結合する二重特異性抗体の部分の細胞静止作用または細胞傷害作用を増強する請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
受容体または受容体複合体が、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含む請求項１９または２０に記載の方法。
【請求項２３】
免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、またはＩＣＯＳである請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４またはＡＰＯ－３である請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
インテグリンが、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３、またはＣＤ１０４である請求項２２に記載の方法。
【請求項２６】
レクチンが、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプのレクチンである請求項２２に記載の方法。
【請求項２７】
活性化リンパ球上で発現した受容体または受容体複合体に結合するリガンドを投与することをさらに含む請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
リガンドが、第１の抗体の細胞静止作用または細胞傷害作用を増強する請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】

リガンドが、活性化リンパ球にシグナルを送達することにより、第１の抗体の細胞静止作用または細胞傷害作用を増強する請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
受容体または受容体複合体が、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含む請求項２７または２８に記載の方法。
【請求項３１】
免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１またはＩＣＯＳである請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４またはＡＰＯ－３である請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
インテグリンが、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３、またはＣＤ１０４である請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
レクチンが、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプのレクチンである請求項３０に記載の方法。
【請求項３５】
第１の抗体が、抗体ではない第２のタンパク質のアミノ酸配列を含む融合タンパク質である請求項１に記載の方法。
【請求項３６】
第２のタンパク質が、第１の抗体に多価結合性を付与する請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
さらに免疫抑制剤の投与を含む請求項１、９、１０、１８または２７に記載の方法。
【請求項３８】
免疫抑制剤が、ガンシクロビル、エタナセプト、シクロスポリン、タクロリムスまたはラパマイシンである請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
免疫抑制剤が、アルキル化剤である請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
アルキル化剤が、シクロホスファミドである請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
免疫抑制剤が、代謝拮抗剤である請求項３７に記載の方法。
【請求項４２】
代謝拮抗剤が、プリンアンタゴニストである請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
プリンアンタゴニストが、アザチオプリンまたはミコフェノレートモフェチルである請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
代謝拮抗剤が、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤である請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤が、メトトレキサートである請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】

免疫抑制剤が、グルココルチコイドである請求項３７に記載の方法。
【請求項４７】
グルココルチコイドが、コルチゾールまたはアルドステロンである請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
免疫抑制剤が、グルココルチコイド類似体である請求項３７に記載の方法。
【請求項４９】
グルココルチコイド類似体が、プレドニゾンまたはデキサメタゾンである請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
免疫抑制剤が、抗炎症剤である請求項３７に記載の方法。
【請求項５１】
抗炎症剤が、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、５－リポキシゲナーゼ阻害剤またはロイコトリエン受容体アンタゴニストである請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
第１の抗体が、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１に記載の方法。
【請求項５３】
細胞傷害性薬剤が、エネジイン、レキシトロプシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、ＤＮＡ副溝結合剤、ＤＮＡ副溝アルキル化剤およびビンカアルカロイドからなる群から選択される請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
細胞傷害性薬剤が、パクリタキセル、ドセタキセル、ＣＣ－１０６５、ＳＮ－３８、トポテカン、モルホリノ－ドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、ドラスタチン－１０、エキノマイシン、コンブレタスタチン、カリケアマイシン、メイタンシン、ＤＭ－１、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰ、ＭＭＡＥまたはネトロプシンである請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
細胞傷害性薬剤が、抗チューブリン剤である請求項５２に記載の方法。
【請求項５６】
細胞傷害性薬剤が、ビンカアルカロイド、ポドフィロトキシン、タキサン、バッカチン誘導体、クリプトフィシン、メイタンシノイド、コンブレタスタチンまたはドラスタチンである請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
細胞傷害性薬剤が、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビンオレルビン、ＶＰ－１６、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、エピチロンＡ、エピチロンＢ、ノコダゾール、コルヒチン、コルチミド、エストラムスチン、セマドチン、ディスコデルモリド、メイタンシン、ＤＭ－１、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰ、ＭＭＡＥまたはエロイテロビンである請求項５５に記載の方法。
【請求項５８】
細胞傷害性薬剤が、ＭＭＡＥである請求項５２に記載の方法。
【請求項５９】
細胞傷害性薬剤が、ＡＥＦＰである請求項５２に記載の方法。
【請求項６０】
第１の抗体が、ペプチドリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項５２に記載の方法。
【請求項６１】
第１の抗体が、ｖａｌ－ｃｉｔリンカーまたはｐｈｅ－ｌｙｓリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項５２に記載の方法。
【請求項６２】

第１の抗体が、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項５２に記載の方法。
【請求項６３】
コンジュゲートがｃＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＭＭＡＥである請求項５２に記載の方法。
【請求項６４】
コンジュゲートがｃＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＡＥＦＰである請求項５２に記載の方法。
【請求項６５】
第１の抗体が、５．５未満のｐＨで加水分解可能なリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項５２に記載の方法。
【請求項６６】
リンカーが５．０未満のｐＨで加水分解可能である請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
リンカーが、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーである請求項６５に記載の方法。
【請求項６８】
第１の抗体が、プロテアーゼによって切断可能なリンカーによって細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項５２に記載の方法。
【請求項６９】
第１の抗体が、プロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーによって細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項５２に記載の方法。
【請求項７０】
プロテアーゼが、膜結合プロテアーゼである請求項６８に記載の方法。
【請求項７１】
プロテアーゼが、細胞内プロテアーゼである請求項６８に記載の方法。
【請求項７２】
プロテアーゼが、エンドソームのプロテアーゼである請求項６８に記載の方法。
【請求項７３】
プロテアーゼが、リソソームのプロテアーゼである請求項６８に記載の方法。
【請求項７４】
第１の抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、グリコシル化抗体、多重特異性抗体、１本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、$F(ab')_2$断片、Ｆｄ、１本鎖Ｆｖ、ジスルフィド連結Ｆｖ、V_Lドメインを含む断片、ＣＤ３０に特異的に結合するポリペプチド、またはV_Hドメインを含む断片である請求項５２に記載の方法。
【請求項７５】
第１の抗体が、免疫抑制剤にコンジュゲートされる請求項１に記載の方法。
【請求項７６】
免疫抑制剤が、ガンシクロビル、エタナセプト、シクロスポリン、タクロリムスまたはラパマイシンである請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
免疫抑制剤が、アルキル化剤である請求項７５に記載の方法。
【請求項７８】
アルキル化剤が、シクロホスファミドである請求項７７に記載の方法。
【請求項７９】
免疫抑制剤が、代謝拮抗剤である請求項７５に記載の方法。
【請求項８０】
代謝拮抗剤が、プリンアンタゴニストである請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】

プリンアンタゴニストが、アザチオプリンまたはミコフェノレートモフェチルである請求項８０に記載の方法。
【請求項８２】
代謝拮抗剤が、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤である請求項７９に記載の方法。
【請求項８３】
ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤が、メトトレキサートである請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
免疫抑制剤が、グルココルチコイドである請求項７５に記載の方法。
【請求項８５】
グルココルチコイドが、コルチゾールまたはアルドステロンである請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】
免疫抑制剤が、グルココルチコイド類似体である請求項７５に記載の方法。
【請求項８７】
グルココルチコイド類似体が、プレドニゾンまたはデキサメタゾンである請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
免疫抑制剤が、抗炎症剤である請求項７５に記載の方法。
【請求項８９】
抗炎症剤が、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、５－リポキシゲナーゼ阻害剤またはロイコトリエン受容体アンタゴニストである請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
免疫学的疾患が、Th_2－リンパ球関連疾患である請求項１に記載の方法。
【請求項９１】
免疫学的疾患が、アトピー性皮膚炎、全身紅斑性狼瘡、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎、オーメン症候群、全身性硬化症または慢性の移植片対宿主病である請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
免疫学的疾患が、Th_1－リンパ球関連疾患である請求項１に記載の方法。
【請求項９３】
免疫学的疾患が、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、ショーグレン症候群、橋本甲状腺炎、グレイブ病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナーの肉芽腫症、結核または急性移植片対宿主病である請求項９２に記載の方法。
【請求項９４】
免疫学的疾患が、ウイルス感染に起因するものである請求項１に記載の方法。
【請求項９５】
ウイルス感染が、エプスタイン-バーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトＴ白血病ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスまたは麻疹ウイルスを含む請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
免疫学的疾患が、活性化Ｂリンパ球に関連する疾患である請求項１に記載の方法。
【請求項９７】
被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）リンパ球においてＣＤ３０シグナル伝達を誘導する第１の抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。
【請求項９８】
第１の抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
第１の抗体が、多価である請求項９７に記載の方法。

【請求項１００】
第１の抗体が、ＣＤ３０への結合についてモノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１と競合する請求項９７に記載の方法。
【請求項１０１】
第１の抗体は、リンパ球以外の細胞の不在下でＣＤ３０シグナル伝達を誘導することができる請求項９７に記載の方法。
【請求項１０２】
第１の抗体が、単一特異性抗体としてＣＤ３０シグナル伝達を誘導することができる請求項９７に記載の方法。
【請求項１０３】
第２の抗体の投与をさらに含む請求項９７に記載の方法。
【請求項１０４】
第２の抗体が、活性化リンパ球上で発現した第２の受容体または受容体複合体を認識する請求項９７に記載の方法。
【請求項１０５】
受容体または受容体複合体が、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含む請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１またはＩＣＯＳである請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４、またはＡＰＯ－３である請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０８】
インテグリンが、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３またはＣＤ１０４である請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０９】
レクチンが、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプのレクチンである請求項１０５に記載の方法。
【請求項１１０】
第１の抗体が、二重特異性抗体である請求項９７に記載の方法。
【請求項１１１】
二重特異性抗体が、ＣＤ３０および活性化リンパ球上で発現した第２の受容体または受容体複合体に結合する請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
受容体または受容体複合体が、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含む請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、またはＩＣＯＳである請求項１１２に記載の方法。

【請求項１１４】
ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４またはＡＰＯ－３である請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１５】
インテグリンが、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３、またはＣＤ１０４である請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１６】
レクチンが、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプのレクチンである請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１７】
活性化リンパ球上で発現した受容体または受容体複合体に結合するリガンドを投与することをさらに含む請求項９７に記載の方法。
【請求項１１８】
受容体または受容体複合体が、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含む請求項１１７に記載の方法。
【請求項１１９】
免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１またはＩＣＯＳである請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２０】
ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーが、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４またはＡＰＯ－３である請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２１】
インテグリンが、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３、またはＣＤ１０４である請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２２】
レクチンが、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプのレクチンである請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２３】
第１の抗体が、抗体ではない第２のタンパク質のアミノ酸配列を含む融合タンパク質である請求項９７に記載の方法。
【請求項１２４】
第２のタンパク質が、第１の抗体に多価結合性を付与する請求項１２３に記載の方法。
【請求項１２５】
さらに免疫抑制剤の投与を含む請求項９７、１０３、１０４、１１０または１１１に記載の方法。
【請求項１２６】
免疫抑制剤が、ガンシクロビル、エタナセプト、シクロスポリン、タクロリムスまたはラパマイシンである請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２７】

免疫抑制剤が、アルキル化剤である請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２８】
アルキル化剤が、シクロホスファミドである請求項１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
免疫抑制剤が、代謝拮抗剤である請求項１２５に記載の方法。
【請求項１３０】
代謝拮抗剤が、プリンアンタゴニストである請求項１２９に記載の方法。
【請求項１３１】
プリンアンタゴニストが、アザチオプリンまたはミコフェノレートモフェチルである請求項１３０に記載の方法。
【請求項１３２】
代謝拮抗剤が、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤である請求項１２９に記載の方法。
【請求項１３３】
ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤が、メトトレキサートである請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３４】
免疫抑制剤が、グルココルチコイドである請求項１２５に記載の方法。
【請求項１３５】
グルココルチコイドが、コルチゾールまたはアルドステロンである請求項１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
免疫抑制剤が、グルココルチコイド類似体である請求項１２５に記載の方法。
【請求項１３７】
グルココルチコイド類似体が、プレドニゾンまたはデキサメタゾンである請求項１３６に記載の方法。
【請求項１３８】
免疫抑制剤が、抗炎症剤である請求項１２５に記載の方法。
【請求項１３９】
抗炎症剤が、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、５－リポキシゲナーゼ阻害剤またはロイコトリエン受容体アンタゴニストである請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４０】
第１の抗体が、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項９７に記載の方法。
【請求項１４１】
細胞傷害性薬剤が、エネジイン、レキシトロプシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、ＤＮＡ副溝結合剤、ＤＮＡ副溝アルキル化剤およびビンカアルカロイドからなる群から選択される請求項１４０に記載の方法。
【請求項１４２】
細胞傷害性薬剤が、パクリタキセル、ドセタキセル、ＣＣ－１０６５、ＳＮ－３８、トポテカン、モルホリノ－ドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、ドラスタチン－１０、エキノマイシン、コンブレタスタチン、カリケアマイシン、メイタンシン、ＤＭ－１、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰ、ＭＭＡＥまたはネトロプシンである請求項１４０に記載の方法。
【請求項１４３】
細胞傷害性薬剤が、抗チューブリン剤である請求項１４０に記載の方法。
【請求項１４４】
細胞傷害性薬剤が、ビンカアルカロイド、ポドフィロトキシン、タキサン、バッカチン誘導体、クリプトフィシン、メイタンシノイド、コンブレタスタチンまたはドラスタチンである請求項１４３に記載の方法。
【請求項１４５】
細胞傷害性薬剤が、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビンオレルビン、

ＶＰ－１６、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、エピチロンＡ、エピチロンＢ、ノコダゾール、コルヒチン、コルチミド、エストラムスチン、セマドチン、ディスコデルモリド、メイタンシン、ＤＭ－１、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰ、ＭＭＡＥまたはエロイテロビンである請求項１４３に記載の方法。

【請求項１４６】

細胞傷害性薬剤が、ＭＭＡＥである請求項１４０に記載の方法。

【請求項１４７】

細胞傷害性薬剤が、ＡＥＦＰである請求項１４０に記載の方法。

【請求項１４８】

第１の抗体が、ペプチドリンカーによって細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１４０に記載の方法。

【請求項１４９】

第１の抗体が、ｖａｌ－ｃｉｔリンカーまたはｐｈｅ－ｌｙｓリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１４０に記載の方法。

【請求項１５０】

第１の抗体が、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１４０に記載の方法。

【請求項１５１】

第１の抗体が、５．５未満のｐＨで加水分解可能なリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１４０に記載の方法。

【請求項１５２】

リンカーが５．０未満のｐＨで加水分解可能である請求項１５１に記載の方法。

【請求項１５３】

リンカーが、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーである請求項１５１に記載の方法。

【請求項１５４】

第１の抗体が、プロテアーゼによって切断可能なリンカーによって細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１４０に記載の方法。

【請求項１５５】

第１の抗体が、プロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーによって細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１４０に記載の方法。

【請求項１５６】

プロテアーゼが、膜結合プロテアーゼである請求項１５４に記載の方法。

【請求項１５７】

プロテアーゼが、細胞内プロテアーゼである請求項１５４に記載の方法。

【請求項１５８】

プロテアーゼが、エンドソームのプロテアーゼである請求項１５４に記載の方法。

【請求項１５９】

プロテアーゼが、リソソームのプロテアーゼである請求項１５４に記載の方法。

【請求項１６０】

第１の抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、グリコシル化抗体、多重特異性抗体、１本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆｄ、１本鎖Ｆｖ、ジスルフィド連結Ｆｖ、V_Lドメインを含む断片、ＣＤ３０に特異的に結合するポリペプチド、またはV_Hドメインを含む断片である請求項１４０に記載の方法。

【請求項１６１】

第１の抗体が、免疫抑制剤にコンジュゲートされる請求項９７に記載の方法。

【請求項１６２】

免疫抑制剤が、ガンシクロビル、エタナセプト、シクロスポリン、タクロリムスまたはラパマイシンである請求項１６１に記載の方法。

【請求項１６３】
免疫抑制剤が、アルキル化剤である請求項１６１に記載の方法。
【請求項１６４】
アルキル化剤が、シクロホスファミドである請求項１６３に記載の方法。
【請求項１６５】
免疫抑制剤が、代謝拮抗剤である請求項１６１に記載の方法。
【請求項１６６】
代謝拮抗剤が、プリンアンタゴニストである請求項１６５に記載の方法。
【請求項１６７】
プリンアンタゴニストが、アザチオプリンまたはミコフェノレートモフェチルである請求項１６６に記載の方法。
【請求項１６８】
代謝拮抗剤が、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤である請求項１６５に記載の方法。
【請求項１６９】
ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤が、メトトレキサートである請求項１６８に記載の方法。
【請求項１７０】
免疫抑制剤が、グルココルチコイドである請求項１６１に記載の方法。
【請求項１７１】
グルココルチコイドが、コルチゾールまたはアルドステロンである請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７２】
免疫抑制剤が、グルココルチコイド類似体である請求項１６１に記載の方法。
【請求項１７３】
グルココルチコイド類似体が、プレドニゾンまたはデキサメタゾンである請求項１７２に記載の方法。
【請求項１７４】
免疫抑制剤が、抗炎症剤である請求項１６１に記載の方法。
【請求項１７５】
抗炎症剤が、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、５－リポキシゲナーゼ阻害剤またはロイコトリエン受容体アンタゴニストである請求項１７４に記載の方法。
【請求項１７６】
免疫学的疾患が、Th_2－リンパ球関連疾患である請求項９７に記載の方法。
【請求項１７７】
免疫学的疾患が、アトピー性皮膚炎、全身紅斑性狼瘡、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎、オーメン症候群、全身性硬化症または慢性の移植片対宿主病である請求項１７６に記載の方法。
【請求項１７８】
免疫学的疾患が、Th_1－リンパ球関連疾患である請求項９７に記載の方法。
【請求項１７９】
免疫学的疾患が、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、ショーグレン症候群、橋本甲状腺炎、グレイブ病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナーの肉芽腫症、結核または急性移植片対宿主病である請求項１７８に記載の方法。
【請求項１８０】
免疫学的疾患が、ウイルス感染に起因するものである請求項９７に記載の方法。
【請求項１８１】
ウイルス感染が、エプスタイン-バーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトＴ白血病ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスまたは麻疹ウイルスを含む請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８２】
免疫学的疾患が、活性化Ｂリンパ球に関連する疾患である請求項９７に記載の方法。
【請求項１８３】

被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）ＣＤ３０への結合についてモノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１と競合する第１の抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。

【請求項１８４】

被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号２を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。

【請求項１８５】

被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号４、配列番号６および配列番号８の１つ、２つまたは全部を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。

【請求項１８６】

被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号１８を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。

【請求項１８７】

被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号２０、配列番号２２および配列番号２４の１つ、２つまたは全部を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。

【請求項１８８】

被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）モノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１とＣＤ３０との結合に関して競合し、細胞傷害性薬剤とコンジュゲートしている抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。

【請求項１８９】

細胞傷害性薬剤が、エネジイン、レキシトロプシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、ＤＮＡ副溝結合剤、ＤＮＡ副溝アルキル化剤およびビンカアルカロイドからなる群から選択される請求項１８８に記載の方法。

【請求項１９０】

細胞傷害性薬剤が、パクリタキセル、ドセタキセル、ＣＣ－１０６５、ＳＮ－３８、トポテカン、モルホリノ－ドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、ドラスタチン－１０、エキノマイシン、コンブレタスタチン、カリケアマイシン、メイタンシン、ＤＭ－１、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰ、ＭＭＡＥまたはネトロプシンである請求項１８８に記載の方法。

【請求項１９１】

細胞傷害性薬剤が、抗チューブリン剤である請求項１８８に記載の方法。

【請求項１９２】

細胞傷害性薬剤が、ビンカアルカロイド、ポドフィロトキシン、タキサン、バッカチン誘導体、クリプトフィシン、メイタンシノイド、コンブレタスタチンまたはドラスタチンである請求項１９１に記載の方法。

【請求項１９３】

細胞傷害性薬剤が、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビンオレルビン、ＶＰ－１６、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、エピチロンＡ、エピチロンＢ、ノコダゾール、コルヒチン、コルチミド、エストラムスチン、セマドチン、ディスコデルモリド、メイタンシン、ＤＭ－１、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦ

Ｐ、ＭＭＡＥまたはエロイテロビンである請求項１９１に記載の方法。
【請求項１９４】
細胞傷害性薬剤が、ＭＭＡＥである請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９５】
細胞傷害性薬剤が、ＡＥＦＰである請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９６】
第１の抗体が、ペプチドリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９７】
第１の抗体が、ｖａｌ－ｃｉｔリンカーまたはｐｈｅ－ｌｙｓリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９８】
第１の抗体が、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９９】
第１の抗体が、５．５未満のｐＨで加水分解可能なリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１８８に記載の方法。
【請求項２００】
リンカーが５．０未満のｐＨで加水分解可能である請求項１９９に記載の方法。
【請求項２０１】
リンカーが、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーである請求項１９９に記載の方法。
【請求項２０２】
第１の抗体が、プロテアーゼによって切断可能なリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１８８に記載の方法。
【請求項２０３】
第１の抗体が、プロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる請求項１８８に記載の方法。
【請求項２０４】
プロテアーゼが、膜結合プロテアーゼである請求項２０２に記載の方法。
【請求項２０５】
プロテアーゼが、細胞内プロテアーゼである請求項２０２に記載の方法。
【請求項２０６】
プロテアーゼが、エンドソームのプロテアーゼである請求項２０２に記載の方法。
【請求項２０７】
プロテアーゼが、リソソームのプロテアーゼである請求項２０２に記載の方法。
【請求項２０８】
第１の抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、グリコシル化抗体、多重特異性抗体、１本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、$F(ab')_2$断片、Ｆｄ、１本鎖Ｆｖ、ジスルフィド連結Ｆｖ、ＶＬドメインを含む断片、ＣＤ３０に特異的に結合するポリペプチド、またはＶＨドメインを含む断片である請求項１８８に記載の方法。
【請求項２０９】
被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）ｃＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＭＭＡＥと、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。
【請求項２１０】
被験体における癌ではない免疫学的疾患の治療方法であって、（ａ）ｃＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＡＥＦＰと、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で該被験体に投与することを含む上記方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み入まれる２００１年１１月２０日出願の米国仮出願第６０／３３１，７５０号の米国特許法第１１９条（ｅ）に基づく利益を主張する。
【０００２】
１．発明の分野
本発明は、ＣＤ３０結合タンパク質を使用する、活性化リンパ球における細胞死または静止状態を誘導する方法および組成物、ならびにこれらの方法および組成物の自己免疫、アレルギー、慢性炎症反応および移植対宿主片病（ＧＶＨＤ）などの免疫学的疾患の治療への適用に関する。さらに、本発明は、ＣＤ３０結合タンパク質と細胞傷害性薬剤のコンジュゲートを使用してＣＤ３０発現リンパ球を除去することによる免疫学的疾患の治療方法および組成物に関する。本発明の方法および組成物における有用な典型的なＣＤ３０結合タンパク質の例としては、抗ＣＤ３０抗体であるＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１、ならびにＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１と細胞傷害性薬剤とのコンジュゲートが含まれる。
【背景技術】
【０００３】
２．発明の背景
２．１　リンパ球
抗原刺激および細胞増殖（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｅｘｐａｎｓｉｏｎ）の後、ナイーブＴ細胞は表現型が異なるエフェクター細胞へと発達可能である。ＩＦＮγやリンホトキシンなどの前炎症性サイトカインを分泌するエフェクターＴ細胞（ヘルパーＴ細胞または細胞傷害性Ｔ細胞）は、総称してTh_1またはTc_1細胞と呼ばれ、また、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０およびＩＬ－１３を分泌するエフェクターＴ細胞は、Th_2またはTc_2として知られている。Th_1／Tc_1サイトカインは、ＣＴＬおよび単球／マクロファージの活性化を含む細胞媒介性応答を誘導し、Th_2／Tc_2サイトカインはＢ細胞によって抗体産生を増強することにより体液性免疫反応を誘導する。結果として、無制御のTh_1／Tc_1応答は、通常、関節リウマチや糖尿病などの器官特異的自己免疫応答として顕れる。一方、無制御のTh_2／Tc_2応答は、通常、全身性紅斑性狼瘡などの、アレルギー反応および全身性の自己免疫疾患と関連する。これらの２極化されたＴ細胞サブセットは、互いに相手の各活性を相反的に調節することが可能であり、Th_2／Tc_2サイトカインが存在すると、細胞媒介性の自己免疫に起因する症状をある程度緩和することが可能であり、その逆も同様である（ＳｅｄｅｒとＭｏｓｍａｎｎ、１９９９、「Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｇｙ」、４版、８７９～９０８頁；Ｏ’ＧａｒａとＡｒａｉ、２０００、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１０：５４２～５５０頁）。
【０００４】
２．２　ＣＤ３０
白血球活性化マーカーＣＤ３０は、１０５～１２０ｋＤａの膜内在性糖タンパク質であり、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦ－Ｒ）スーパーファミリーのメンバーである。この重要な免疫調節分子ファミリーは、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５、ＯＸ４０、ＴＮＦ－Ｒ１およびＴＮＦ－Ｒ２を含む。もともとＣＤ３０は、Ｋｉ－１モノクローナル抗体（ｍＡｂ）（Ｓｔｅｉｎら、１９８５、Ｂｌｏｏｄ、６６、８４８～８５８頁；Ｌａｕｄｅｗｉｔｚら、１９８６、Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．８６：３５０～３５４頁）を使用して、ホジキン病（ＨＤ）のリード－シュテルンベルク（Ｒｅｅｄ－Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ）細胞上で同定されたものであるが、その後、非ホジキン性リンパ腫（ＮＨＬ）のサブセットである未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ：ａｎａｐｌａｓｔｉｃ　ｌａｒｇｅ　ｃｅｌｌ　ｌｙｍｐｈｏｍａ）上ならびに胚性癌腫および精巣悪性腫瘍などの希少な固形癌中でも見出されている（Ｃｈｉａｒｌｅら、１９９９、Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９０

：１５７～１６４頁）。正常な条件下では、ＣＤ３０の発現は活性化ＴおよびＢ細胞に限定され、休止期のリンパ球、休止期の単球、および免疫系外の正常な細胞には見られない。ＣＤ３０は自己免疫疾患において活性化細胞によって高レベルで発現し、これらの細胞から流出したＣＤ３０は、関節リウマチ（Ｇｅｒｌｉら、２０００、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４、４３９９～４４０７頁）、多発性硬化症（ＭｃＭｉｌｌａｎｓら、２０００、Ａｃｔａ Ｎｅｕｒｏｌ．Ｓｃａｎｄ．１０１：２３９～２４３頁）および全身性硬化症（Ｉｈｎら、Ｊ．Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．２７：６９８～７０２頁）を含む疾患に罹患している患者の循環系において検出できる。ＣＤ３０発現についての組織学的検査によって、リンパ節、扁桃腺、胸腺、および胎盤境界面で脱落した子宮内膜細胞、の切片中に見られる希少な大リンパ系細胞が同定される（Ｄｕｒｋｏｐら、２０００、Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１９０：６１３～６１８頁）。ＣＤ３０は、有系分裂促進物質活性化または抗原受容体架橋（ＨｏｒｉｅとＷａｔａｎａｂｅ、１９９８、Ｓｅｍ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：４５７～４７０頁）後の培養物中のＴ細胞上で一過的に発現され、ある種のウイルス感染（例えば、ＨＩＶ）（Ｒｏｍａｇｎａｎｉら、１９９６、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．５１：８３～８８頁）後では構成的に発現される。

【０００５】

ＣＤ３０に対するリガンド（ＣＤ３０Ｌ）が同定されている。ＣＤ３０ＬはＩＩ型の膜貫通タンパク質であり、これはＴＮＦスーパーファミリーのメンバーと配列および構造の相同性がある（Ｓｍｉｔｈら．、１９９３、Ｃｅｌｌ、７３、１３４９～１３６０頁）。ＣＤ３０Ｌは、ＴＮＦαのように３量体としても存在すると考えられており、ＣＤ３０Ｌ－ＣＤ３０相互作用は、ＣＤ３０の３量体化を誘導してＣＤ３０$^{+}$細胞へのシグナル伝達を開始させる。ＣＤ３０Ｌの発現は、活性化Ｔ細胞、好中球、好酸球、休止Ｂ細胞、上皮細胞および胸腺髄質のハッサル（Ｈａｓｓａｌ）小体、ならびにある種の白血病細胞中で確認されている（Ｙｏｕｎｅｓら、Ｂｒ．Ｊ．Ｈａｅｍａｔｏｌ．、９３：５６９～５７１頁；Ｐｉｎｔｏら、１９９６、Ｂｌｏｏｄ、８８：３２９９～３３０５頁；Ｇｒｕｓｓら、１９９６、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１４９、４６９～４８１頁；Ｇａｔｔｅｉら．、１９９７、Ｂｌｏｏｄ、８９、２０４８～２０５９頁；Ｒｏｍａｇｎａｎｉら、１９９８、Ｂｌｏｏｄ ９１：３３２３～３３３２頁；Ｗｉｌｅｙら、１９９６、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５７：３６３５～３６３９頁）。

【０００６】

リンパ球表面抗原ＣＤ３０は、活性化Ｂ細胞およびＴ細胞に一過的に提示される活性化マーカーであり、また、ある種の悪性な血液細胞および、いくつかの自己免疫疾患で慢性的に活性化された細胞上で構成的に発現される。リンパ球調節におけるその役割は、減衰的なものの一種であると考えられている。ノックアウト動物におけるＣＤ３０の欠損は免疫刺激への過剰応答をもたらし、胸腺中のトランスジーンの過剰発現は胸腺細胞消耗の増大をもたらすからである。したがって、ＣＤ３０を標的とする療法によって活性化リンパ球を除去または減衰させることにより、自己免疫および慢性炎症性疾患の制御に効果を有し得る。

【０００７】

ＣＤ３０のリンパ球生存の調節は複雑なため、モデルシステムにおけるその作用についてはまったく異なる説明がなされている。ＤｕｃｋｅｔｔとＴｈｏｍｐｓｏｎ（１９９７、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１１：２８１０～２１頁）は、ＣＤ３０シグナル伝達の初期の作用はＴＲＡＦ１およびＴＲＡＦ２の補給（ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ）によって生存を促進することであることを示した。このシグナル伝達複合体はＮＦ－κＢを介して成長および生存遺伝子の発現を促進する。この活性化に続いて、ＣＤ３０と複合体を形成したＴＲＡＦは、その後分解し、細胞がさらにＮＦ－κＢを活性化する能力を弱める。この結果、細胞は、ＴＮＦ－Ｒ１の結合によって誘導されたアポトーシスに感受性を持つようになる（ＤｕｃｋｅｔｔとＴｈｏｍｐｓｏｎ、１９９７、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１１：２８１０～２１頁；Ａｒｃｈら、２０００、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２７２：９３６～９４５頁）。感作は、ＣＤ３０の細胞質ドメイン内のＴＲＡＦ２結

合部位に依存し、ＴＲＡＦ２の細胞分解はアポトーシスの開始と一致する。

【０００８】

２．３　免疫系中のＣＤ３０の役割

２．３．１　正常免疫系

ＣＤ３０のｉｎ　ｖｉｖｏでの機能は明らかにはわかっていない。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＣＤ３０の結合は細胞の増殖または増殖抑制のいずれかを引き起こすことが示されている（Ｇｒｕｓｓら、１９９４、Ｂｌｏｏｄ、８３、２０４５～２０５６頁）。Ｔ細胞上のＣＤ３０の結合は様々なｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＴ細胞機能を調節することが実証されている。抗ＣＤ３０　ｍＡｂは、Ｔ細胞抗原受容体結合を共同刺激して、抗原（Ｄｅｌ　Ｐｒｅｔｅら、１９９５、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８２：１６５５～１６６１頁）または抗ＣＤ３抗体（Ｇｉｌｆｉｌｌａｎら、１９９８、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６０：２１８０～２１８７頁）のいずれかによって開始されたＴ細胞の細胞増殖を増大させる。ＣＤ３０シグナル伝達はまた、Ｔ細胞中のサイトカイン産生を促進する。インターロイキン（ＩＬ）－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＦＮγおよびＴＮＦαの発現は、ＰＨＡ活性化末梢Ｔ細胞（ＧｒｕｓｓとＨｅｒｍａｎｎ、１９９６、Ｌｅｕｋｅｍｉａ　Ｌｙｍｐｈｏｍａ、２０：３９７～４０９頁）、Ｔヘルパー（Ｔｈ）クローン（Ｄｅｌ　Ｐｒｅｔｅと、１９９５、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８２：１６５５～１６６１頁；Ｂｅｎｇｔｓｓｏｎら、２０００、Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５２、５９５～６０１頁）、細胞傷害性Ｔ細胞（Ｔｃ／ＣＴＬ）系（Ｂｏｗｅｎら、１９９６、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５６：４４２～４４９頁）およびγδＴ細胞（Ｂｉｓｗａｓら、２０００、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０：２１７２～２１８０頁）におけるＣＤ３０シグナルによって増強される。ＣＤ３０は、さらにＨＩＶ複製を刺激する上で重要な役割を果たしている可能性がある。ｍＡｂによるＣＤ３０の架橋は、ＨＩＶに慢性的に感染したＴ細胞系統によるＮＦ－κＢ活性化およびＨＩＶ産生を誘導する（Ｂｉｓｗａｓら、１９９５、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、２、５８７～５９６頁）。患者由来のＣＤ４$^{+}$、ＨＩＶ－感染Ｔ細胞も、抗ＣＤ３０　ｍＡｂまたはＣＤ３０Ｌ刺激に応答してＨＩＶを産生する（Ｍａｇｇｉら、１９９５、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　３：２５１～２５５頁）。

【０００９】

ＣＤ３０は、Ｔ細胞の活性化誘導細胞死に関与している。Ｔ細胞ハイブリドーマ中で発現されたＣＤ８－ＣＤ３０キメラの結合は、Ｔ細胞抗原受容体によって媒介されるアポトーシスを増強した（Ｌｅｅら、１９９６、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８３：６６９～６７４頁）。マウスのＣＤ８　Ｔ細胞におけるアゴニスト撤退誘導アポトーシスの第２モデルでは、ＣＤ３０－Ｉｇ融合タンパク質を用いてＣＤ３０シグナル伝達を阻止することにより、ＣＤ８　Ｔ細胞のアポトーシスが部分的ながら防止されている（Ｔｅｌｆｏｒｄら、１９９７、Ｃｅｌｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８２：１２５～１３６頁）。動物モデルから得られた結果からも、胸腺細胞におけるアポトーシス誘導、自動反応性Ｔ細胞の除去のネガティブ選別過程におけるＣＤ３０の役割が示唆される（Ａｍａｋａｗａら、１９９６、Ｃｅｌｌ　８４：５５１～５６２頁）。ＣＤ３０$^{-/-}$ヌルマウスでは、ネガティブ選別が大幅に低減し胸腺細胞数の増加をもたらしており（Ａｍａｋａｗａら、１９９６、Ｃｅｌｌ　８４：５５１～５６２頁）、証明された１つの結果は、ＣＤ３０欠損ＣＤ８陽性Ｔ細胞は、自己免疫性糖尿病を惹起するその能力において桁違いに高い自己反応性であるという点である（Ｋｕｒｔｓら、１９９９、Ｎａｔｕｒｅ　３９８：３４１～３４４頁）。反対に、ＣＤ３０の過剰発現が胸腺細胞におけるプログラム化された細胞死を促進することが示されており、従って、胸腺における自動反応性Ｔ細胞のネガティブ選別を増強し（Ｃｈｉａｒｌｅら、１９９９、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６３：１９４～２０５頁）、末梢において非リンパ組織に対するＴ細胞自動応答を妨げる（Ｈｅａｔｈら、１９９９、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．１６９：２３～２９頁）。

【００１０】

２．３．２　疾患状態

ＣＤ３０がＴｈ$_{2}$サイトカインを分泌するヒトＴ細胞クローン上で好ましく発現され（

Ｄｅｌ Ｐｒｅｔｅら、１９９５、ＦＡＳＥＢ Ｊ．９、８１～８６頁）、Ｔ細胞上のＣＤ３０の架橋がTh_2様Ｔ細胞の発達を促す（Ｄｅｌ Ｐｒｅｔｅら、１９９５、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８２、１６５５～１６６１頁）ことが実証されたため、Th_2サイトカインがかかわる免疫学的疾患が$CD30^+$Ｔ細胞の調節障害に起因するかもしれないという仮説が立てられた。

【００１１】

ＣＤ３０の発現は、アトピー性アレルギー（アトピー性皮膚炎、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎）、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症（強皮症）、宿主対移植片病（ＧＶＨＤ）、ＨＩＶおよびＥＢＶ伝染、麻疹、オーメン（Ｏｍｅｎｎ）症候群、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、橋本甲状腺炎、原発性胆汁性肝硬変、ショーグレン（Ｓｊｏｇｒｅｎ）症候群、ウェゲナー（Ｗｅｇｅｎｅｒ）肉芽腫症および結核を含む多様な自己免疫学的疾患および炎症性疾患において増大または変化することが示されている（Ｇｒｕｓｓら、１９９７、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １８：１５６～１６３頁；ＨｏｒｉｅとＷａｔａｂａｂｅ、１９９８、Ｓｅｍ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：４５７～４７０頁；Ｂｅｎｇｔｓｓｏｎ、２００１、Ａｌｌｅｒｇｙ ５６：５９３～６０３頁；Ｇｅｒｌｉら、２００１、Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２：７２～７７頁）。

【００１２】

$CD30^+$の浸潤Ｔ細胞は、アトピー性皮膚炎（Ｃａｐｒｏｎｉら、１９９７、Ａｌｌｅｒｇｙ ５２：１０６３～１０７０頁；Ｃａｖａｇｎｉら、２０００、Ａｌｌｅｒｇｙ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２１：２２４～２２８頁）、アトピー性喘息（Ｂｌａｎｃｏ Ｑｕｉｒｏｓら、１９９９、Ｐｅｄｉａｔｒ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：２３５～２４０頁）、ＧＶＨＤ（Ｄ’Ｅｌｉｏｓら、１９９７、Ｊ．Ｌｅｗｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．６１：５３９～５４４頁）、結核（Ｍｕｎｋら、１９９７、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：７１３～７２０頁）、原発性胆汁性肝硬変（Ｈａｒａｄａら、１９９９、Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．Ｈｅｐａｔｏｌ．１４：１１９７～１２０２頁）、麻疹（Ｖｉｎａｎｔｅら、１９９９、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａ ８４：６８３～６８９頁）、関節リウマチ（Ｇｅｒｌｉら、２０００、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：４３９９～４４０７頁；Ｇｅｒｌｉら、１９９５、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０２：５４７～５５０頁）および乾癬（Ｆｅｒｅｎｃｚｉら、２０００、Ｊ．Ａｕｔｏｉｍｍｕｎ．１４：６３～７８頁）の病巣および炎症部位で見つかっている。ＣＤ３０発現は、正常な状況では活性化リンパ球のわずかな割合に厳密に限られているが、アトピー性喘息およびアレルギー性鼻炎でＣＤ３０ ｍＲＮＡ発現の増加が報告されている（Ｅｓｎａｕｌｔら、１９９６、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０６：６７～７２頁）。ＣＤ３０の変化した発現と免疫疾患の間の相関性は、前述の疾患のうちの多くで見られる可溶性ＣＤ３０（ｓＣＤ３０：ｓｏｌｕｂｌｅ ＣＤ３０）の血漿中レベルが高いという点によりさらに強調される（Ｇｒｕｓｓら、１９９７、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １８：１５６～１６３頁；ＨｏｒｉｅとＷａｔａｂａｂｅ、１９９８、Ｓｅｍ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：４５７～４７０頁；Ｂｅｎｇｔｓｓｏｎ、２００１、Ａｌｌｅｒｇｙ ５６：５９３～６０３頁；Ｇｅｒｌｉら、２００１、Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２：７２～７７頁）。これらの疾患のうちのいくつかでは、ｓＣＤ３０の高血漿中レベルは循環系中の$CD30^+$Ｔ細胞を伴わないが、罹患組織中の$CD30^+$Ｔ細胞の増殖はｓＣＤ３０の潜在的な源であると考えられている（Ｍａｖｉｌｉａ、１９９７、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５１：１７５１～１７５８頁）。

【００１３】

いくつかの疾患には、Th_2サイトカインおよび$CD30^+$Ｔ細胞の両者が関与していることが実証されている（Ｄ’Ｅｌｉｏｓら、１９９７、Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．６１：５３９～５４４頁）。アトピー性皮膚炎患者のほとんどはTh_2サイトカインの産生増加と並行して血清ＩｇＥレベルの増大および循環系中の好酸球数の増加を示す（Ｌｅｕｎｇ、１９９５、Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９６：３０２～３

１９頁）。ＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１３を産生するアレルゲン特異的Th_2細胞の出現率の増加も、アトピー性皮膚炎患者の末梢血中で検出できる（Ｋｉｍｕｒａら、１９９８、Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１０１、８４～８９頁）。ＣＤ３０発現とTh_2サイトカイン産生との間の相関性は、アトピー性皮膚炎患者で認められており、これは循環系中のＴ細胞におけるＣＤ３０の発現が、Th_2が支配する症状に対するｉｎ ｖｉｖｏマーカーとして役立つかもしれないという示唆をもたらした（Ｙａｍａｍｏｔｏら、２０００、Ａｌｌｅｒｇｙ、５５、１０１１～１０１８頁）。アトピー性喘息におけるアレルゲン誘導性のＩＬ－４産生は、アトピー性喘息被験体から単離されたＰＢＭＣ中のＣＤ３０発現と関連する（Ｌｅｏｎａｒｄら、１９９７、Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１７、３６８～３７５頁）。これは、喘息患者由来の気管支肺胞の損傷γδＴ細胞中でも示されている（Ｓｐｉｎｏｚｚｉら、１９９５、Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．１：８２１～８２６頁）。同様に、全身性硬化症（これはｓＣＤ３０の高い血清レベルおよび皮膚損傷中のＣＤ３０発現によって特徴づけられた疾患である）では、ＩＬ－４ ｍＲＮＡが皮膚損傷部に浸潤したリンパ球中のｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションによって検出可能である一方、皮膚浸潤部から生成したほとんどのＣＤ４$^+$Ｔ細胞クローンがTh_2サイトカインのプロファイルを示す（Ｍａｖａｌｉａら、１９９７、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５、１７５１～１７５８頁）。ＨＩＶに感染した患者では、健康なドナーと比較した時、末梢血中でTh_2サイトカイン産生ＣＤ８$^+$／ＣＤ３０$^+$細胞の不釣り合いに高い出現率が検出されることがある（Ｍａｎｅｔｔｉら、１９９４、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８０：２４０７～２４１１頁）。ＨＩＶに感染した患者では、Th_2型免疫の緊急出現も、疾患の進行に伴う免疫病理と関連しているように思われる（Ｒｉｚｚａｒｄｉら、１９９８、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１４：６１～６５頁）。

【００１４】

Th_2に関連する疾患とは対照的に、Th_1に関連する疾患におけるＣＤ３０$^+$の役割もわかっていない。多発性硬化症患者のＣＳＦおよび関節リウマチ患者の循環系中には高レベルのｓＣＤ３０が見出されている（ＭｃＭｉｌｌａｎら、２０００、Ａｃｔａ Ｎｅｕｒｏｌ．Ｓｃａｎｄ．１０１：２３９～２４３頁；Ｇｅｒｌｉら、２０００、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：４３９９～４４０７頁）。これらの疾患では、Th_1サイトカインで駆動される応答および循環系中の高レベルのＣＤ３０は、両者とも、疾患寛解を伴っており、ＣＤ３０$^+$Ｔ細胞によるTh_2サイトカインが、Th_1サイトカイン病原性活性に対抗し得ることを示唆する（ＭｃＭｉｌｌａｎら、２０００、Ａｃｔａ Ｎｅｕｒｏｌ．Ｓｃａｎｄ．１０１：２３９～２４３頁；Ｇｅｒｌｉら、２０００、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：４３９９～４４０７頁）。Ｔ細胞サブセット上でのＣＤ３０発現を調べたより最近の実験では、細胞の活性化に際して、Th_1細胞もＣＤ３０を発現することが確認されている（Ｈａｍｍａｎら、１９９６、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５６：１３８７～１３９１頁；Ｂｅｎｇｔｓｓｏｎら、１９９５、Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．５８：６８３～６８９頁）。アゴニスト性抗ＣＤ３０ ｍＡｂは、ＣＤ３０$^+$$Th_1$細胞中で$Th_1$サイトカインＩＦＮγの産生を刺激することができる（Ｂｅｎｇｔｓｓｏｎら、２０００、Ｓｃａｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５２：５９５～６０１頁）。アトピー性皮膚炎では、疾患の進行に伴って、Ｔ細胞浸潤皮膚損傷部によるTh_2サイトカイン産生が優勢な状態からTh_2とTh_1サイトカインの同時発現への移行を決定付ける証拠が得られる（Ｇｒｅｗｅら、１９９８、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １９：３５９）。したがって、ＣＤ３０Ｔ細胞もまた、Th_1関連疾患においてTh_1サイトカインの産生に役割を果たし得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１５】

２．４ 免疫療法

自己抗原またはアレルゲンに対しリンパ球が活性化状態を持続したり、進行中の免疫応

答が抗原の除去後に終了しないことが、自己免疫疾患、アレルギー反応および慢性炎症反応で見られた病理の根本原因である。自己免疫性の疾患、アレルギー性疾患および炎症性疾患の治療には、代謝拮抗剤、ステロイドおよび抗炎症剤を含む様々な治療レジメが利用可能である。これらの薬剤は症状の緩和に効果があるが、それらのいずれもそれらの病原性細胞を特異的になくすようには働かないし、その大半は患者に対し重い副作用をもたらす。

【００１６】

ＣＤ３０を有する活性化リンパ球の除去または減衰は、自己免疫性の疾患および慢性の炎症性疾患の調節に効果があり得る。しかし、免疫疾患におけるＣＤ３０の役割についての上記の証拠にもかかわらず、ｍＡｂによりＣＤ３０を標的とすることは、そのような疾患を治療するのに有効であるとは実証されていない。ＣＤ３０を有する活性化したリンパ球を除去または減退できる薬剤は、免疫学的疾患の治療において非常に望ましいであろう。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

３．発明の概要

本発明は、驚くべきことに抗ＣＤ３０抗体のあるクラスに関わる新規な活性を見い出したことに基づく。この新規な活性は、ある例では、ＣＤ３０受容体経路を介してシグナル伝達することにより、活性化リンパ球を死滅させるかその生育を阻害する抗ＣＤ３０抗体の能力である。ある好ましい実施形態では、本発明の抗体は、細胞傷害性試薬への結合がない状態で、および／またはＣＤ３０－発現リンパ球以外の細胞がない状態（例えば、エフェクター細胞がない状態）で、単一特異性抗体として活性化リンパ球のアポトーシスまたは生育停止を誘導することができる。

【００１８】

したがって、本発明は、被験体における免疫学的疾患（好ましくは免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）リンパ球においてＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または、活性化リンパ球に対し細胞静止作用もしくは細胞傷害作用を及ぼす第１の抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。抗体はヒトのものでもよいし、ヒト化されたものでもよいし、キメラでもよい。１つの実施形態では、抗体は多価である。好ましい実施形態では、抗体はモノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１とＣＤ３０との結合に関して競合する。

【００１９】

本発明はさらに、被験体における免疫学的疾患（好ましくは免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）リンパ球においてＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または、活性化リンパ球に対し細胞静止作用もしくは細胞傷害作用を及ぼす第１の抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法であって、第１の抗体の細胞静止作用または細胞傷害作用を強めあるいは増す薬剤の投与をさらに含む方法を提供する。ある実施形態では、第１の抗体の細胞静止作用または細胞傷害作用を強める薬剤は、第２の抗体、活性化リンパ球上で発現される受容体または受容体複合体に結合するリガンドまたは免疫抑制剤である。そのような試薬およびそれらの使用方法の例についてはさらに以下に記載する。

【００２０】

したがって、本発明は、被験体における免疫学的疾患（好ましくは免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）リンパ球においてＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または、活性化リンパ球に対し細胞静止作用もしくは細胞傷害作用を及ぼす第１の抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法であって、前記被験体への第２の抗体の投与をさらに含む方法を提供する。好ましい実施形態では、

第２の抗体は、活性化リンパ球上で発現された非ＣＤ３０受容体または受容体複合体を認識する。

【００２１】

ある特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）モノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１とＣＤ３０との結合に関して競合する抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。

【００２２】

別の特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号２（抗ＣＤ３０抗体ＡＣ１０の重鎖可変領域）を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。

【００２３】

別の特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号４、配列番号６および配列番号８（抗ＣＤ３０抗体ＡＣ１０の重鎖ＣＤＲ）または配列番号４、配列番号６および配列番号８と１個、２個または３個のアミノ酸が異なる配列番号４、配列番号６および配列番号８の改変体の１つ、２つまたは全部を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。

【００２４】

別の特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号１８（抗ＣＤ３０抗体ＨｅＦｉ－１の重鎖可変領域）を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。

【００２５】

別の特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）配列番号２０、配列番号２２および配列番号２４（抗ＣＤ３０抗体ＨｅＦｉ－１の重鎖ＣＤＲ）または配列番号２０、配列番号２２および配列番号２４と１個、２個または３個のアミノ酸が異なる配列番号２０、配列番号２２および配列番号２４の改変体の１つ、２つまたは全部を含む抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。

【００２６】

さらに別の特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）（ｉ）免疫特異的にＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）モノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１とＣＤ３０との結合に関して競合し、細胞傷害性薬剤とコンジュゲートしている抗体と、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。

【００２７】

本発明のある特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体はアゴニスト抗体である。本発明の別の特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体は非アゴニスト抗体である。さらに別の特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体は、ＣＤ３０へのＣＤ３０リガンドの結合を妨げない。

【００２８】

好ましい実施形態では、非ＣＤ３０受容体または受容体複合体を認識する第２の抗体を被験体に投与する場合、そのような抗体は、ＣＤ３０抗体の細胞傷害作用または細胞静止

作用を増強することができる。何らかの理論に拘束されるものではないが、そのような第２の抗体は、活性化リンパ球に細胞静止性または細胞傷害シグナルを送達することにより、ＣＤ３０抗体の細胞傷害作用または細胞静止作用を増強する。例示的な受容体または受容体複合体には、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質が含まれる。適当な免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１およびＩＣＯＳである。適当なＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーの例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ）、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４およびＡＰＯ－３である。適当なインテグリン類の例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３およびＣＤ　１０４である。適当なレクチンの例（ただし、これらに限定されない）は、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプおよびＩ－タイプのレクチンである。

【００２９】

ある好ましい実施形態では、本発明の方法において有用な抗体、つまり、ＣＤ３０に結合し、活性化リンパ球に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼす抗体は、二重特異性（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ）抗体である。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、ＣＤ３０、および活性化リンパ球上で発現された非ＣＤ３０受容体または受容体複合体の両方に結合する。好ましくは、非ＣＤ３０受容体または受容体複合体に結合する、二重特異性抗体部分は、ＣＤ３０抗体の細胞傷害作用または細胞静止作用を増強することができる。二重特異性抗体の非ＣＤ３０結合部分は、好ましくは、活性化リンパ球に細胞静止性または細胞傷害シグナルを送達することによりＣＤ３０抗体の細胞傷害作用または細胞静止作用を増強する。受容体または受容体複合体は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含むことができる。適当な免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１およびＩＣＯＳである。適当なＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーの例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４およびＡＰＯ－３である。適当なインテグリン類の例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３およびＣＤ１０４である。適当なレクチンの例（ただし、これらに限定されない）は、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプおよびＩ－タイプのレクチンである。

【００３０】

他の実施形態では、本発明の治療方法は、非ＣＤ３０抗体と同時にまたは連続的に、活性化リンパ球上で発現する受容体または受容体の複合体に結合するリガンドを被験体に投与することをさらに含む。好ましくは、リガンドは、例えば、活性化リンパ球に細胞静止または細胞傷害シグナルを送達することにより、ＣＤ３０抗体の細胞傷害作用または細胞静止作用を増強することができる。受容体または受容体複合体は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは

補体制御タンパク質を含むことができる。適当な免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１およびＩＣＯＳである。適当なＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーの例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４およびＡＰＯ－３である。適当なインテグリン類の例（ただし、これらに限定されない）は、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３およびＣＤ１０４である。適当なレクチンの例（ただし、これらに限定されない）は、Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプおよびＩ－タイプのレクチンである。前述の受容体に結合するリガンドは当業者に知られている。

【００３１】

本発明の治療方法のある特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体は抗体でない第２のタンパク質のアミノ酸配列を含む融合タンパク質である。好ましい実施形態では、第２のタンパク質が、ＣＤ３０抗体に多価結合特性を付与する。

【００３２】

他の実施形態では、本発明の治療方法はさらに、被験体への細胞静止剤、細胞傷害性薬剤および／または免疫抑制剤の投与を含む。１つの実施形態では、免疫抑制剤は、ガンシクロビル、アシクロビル、エタナセプト、ラパマイシン、シクロスポリンまたはタクロリムスである。別の実施形態では、免疫抑制剤は、代謝拮抗剤、プリンアンタゴニスト（例えば、アザチオプリンまたはミコフェノレートモフェチル（ｍｙｃｏｐｈｅｎｏｌａｔｅ　ｍｏｆｅｔｉｌ））、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤（例えば、メトトレキサート）、グルココルチコイド（例えば、コルチゾールまたはアルドステロン）、またはグルココルチコイド類似体（例えば、プレドニゾンまたはデキサメタゾン）である。さらに他の実施形態で、免疫抑制剤はアルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）である。さらに他の実施形態で、免疫抑制剤は抗炎症剤であり、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、５－リポキシゲナーゼ阻害剤およびロイコトリエン受容体アンタゴニストを含むが、これらに限定されない。

【００３３】

ある好ましい実施形態では、本発明の方法において有用な抗体、つまり、ＣＤ３０に結合し、リンパ球においてＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対する細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼす抗体は、細胞静止剤、細胞傷害性薬剤または免疫抑制剤にコンジュゲートする。このようなコンジュゲートした抗体は、本明細書においては、抗ＣＤ３０抗体－薬剤コンジュゲート（「ＡＤＣ」または「ＡＤＣ類」）、抗ＣＤ３０抗体細胞傷害性薬剤／免疫抑制剤コンジュゲートと呼ぶこともある。

【００３４】

ある好ましい実施形態では、細胞傷害性薬剤は、エネジイン（ｅｎｅｄｉｙｎｅ）、レキシトロプシン（ｌｅｘｉｔｒｏｐｓｉｎ）、デュオカルマイシン（ｄｕｏｃａｒｍｙｃｉｎ）、タキサン（ｔａｘａｎｅ）、ピューロマイシン（ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ）、ドラスタチン（ｄｏｌａｓｔａｔｉｎ）、メイタンシノイド（ｍａｙｔａｎｓｉｎｏｉｄ）およびビンカアルカロイドからなる群から選択される。あるより具体的な実施形態では、細胞傷害性薬剤は、パクリタキセル、ドセタキセル、ＣＣ－１０６５、ＳＮ－３８、トポテカン、モルホリノドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、ドラスタチン－１０、エキノマイシン（ｅｃｈｉｎｏｍｙｃｉｎ）、コンブレタスタチン（ｃｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎ）、カリケアマイシン（ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎ）、メイタンシン（ｍａｙｔａｎｓｉｎｅ）、ＤＭ－１、オーリスタチン（ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）Ｅ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰ、ＭＭＡＥまたはネトロプシン（ｎｅｔｒｏｐｓｉｎ）である。ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰおよびＭＭＡＥの構造は下記の３．１節で示す

。

【００３５】

他の好ましい実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの細胞傷害性薬剤は、抗チューブリン剤である。より特定の実施形態では、細胞傷害性薬剤は、ビンカアルカロイド、ポドフィロトキシン（ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｏｔｏｘｉｎ）、タキサン、バッカチン（ｂａｃｃａｔｉｎ）誘導体、クリプトフィシン（ｃｒｙｐｔｏｐｈｙｓｉｎ）、メイタンシノイド、コンブレタスタチンおよびドラスタチンからなる群から選択される。より具体的な実施形態では、細胞傷害性薬剤は、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビンオレルビン（ｖｉｎｏｒｅｌｂｉｎｅ）、ＶＰ－１６、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、エピチロン（ｅｐｉｔｈｉｌｏｎｅ）Ａ、エピチロンＢ、ノコダゾール（ｎｏｃｏｄａｚｏｌｅ）、コルヒチン、コルチミド（ｃｏｌｃｉｍｉｄ）、エストラムスチン（ｅｓｔｒａｍｕｓｔｉｎｅ）、セマドチン（ｃｅｍａｄｏｔｉｎ）、ディスコデルモリド（ｄｉｓｃｏｄｅｒｍｏｌｉｄｅ）、メイタンシン、ＤＭ－１、ＡＥＦＰ、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＡＥＦＰ、ＭＭＡＥまたはエロイテロビン（ｅｌｅｕｔｈｅｒｏｂｉｎ）からなる群から選択される。

【００３６】

より具体的な実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの細胞傷害性薬剤は、ＭＭＡＥである。別の具体的な実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの細胞傷害性薬剤は、ＡＥＦＰである。

【００３７】

特定の実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの抗ＣＤ３０抗体は、リンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートし、ここでリンカーはペプチド・リンカーである。特定の実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの抗ＣＤ３０抗体は、リンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートし、ここでリンカーはｖａｌ－ｃｉｔリンカー、ｐｈｅ－ｌｙｓリンカー、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーである。ある実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの抗ＣＤ３０抗体は、ペプチド・リンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートする。

【００３８】

ある実施形態では、本発明のコンジュゲートは、抗ＣＤ３０－バリン－シトルリン－ＭＭＡＥ（抗ＣＤ３０－ｖａｌ－ｃｉｔＭＭＡＥまたは抗ＣＤ３０－ｖｃＭＭＡＥ）または抗ＣＤ３０－バリン－シトルリン－ＡＥＦＰ（抗ＣＤ３０－ｖａｌ－ｃｉｔＡＥＦＰまたは抗ＣＤ３０－ｖｃＡＥＦＰ）である。特定の実施形態では、本発明のコンジュゲートはＡＣ１０－バリン－シトルリン－ＭＭＡＥ（ＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔＭＭＡＥまたはＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥ）またはＡＣ１０－バリン－シトルリン－ＡＥＦＰ（ＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔＡＥＦＰまたはＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰ）である。

【００３９】

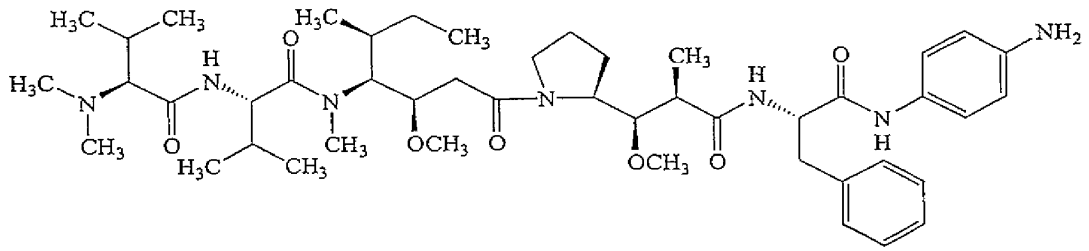
別の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、抗ＣＤ３０－フェニルアラニン－リジン－ＭＭＡＥ（抗ＣＤ３０－ｐｈｅ－ｌｙｓＭＭＡＥまたは抗ＣＤ３０－ｆｋＭＭＡＥ）または抗ＣＤ３０－フェニルアラニン－リジン－ＡＥＦＰ（抗ＣＤ３０－ｐｈｅ－ｌｙｓＡＥＦＰまたは抗ＣＤ３０－ｆｋＡＥＦＰ）である。特定の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、ＡＣ１０－フェニルアラニン－リジンＭＭＡＥ（ＡＣ１０－ｐｈｅ－ｌｙｓＭＭＡＥまたはＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥ）またはＡＣ１０－フェニルアラニン－リジン－ＡＥＦＰ（ＡＣ１０－ｐｈｅ－ｌｙｓＡＥＦＰまたはＡＣ１０－ｆｋＡＥＦＰ）である。

【００４０】

したがって、特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）ｃＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＭＭＡＥと、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。

【００４１】
別の特定の実施形態では、本発明は、被験体における免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患は癌ではない）の治療方法であって、（ａ）ｃＡＣ１０－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＡＥＦＰと、（ｂ）薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を治療上有効な量で前記被験体に投与することを含む方法を提供する。
【００４２】
ある実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの抗ＣＤ３０抗体は、リンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートし、ここでリンカーは５．５未満のｐＨで加水分解され得る。特定の実施形態では、リンカーは５．０未満のｐＨで加水分解され得る。
【００４３】
ある実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの抗ＣＤ３０抗体は、リンカーを介して細胞傷害性薬剤にコンジュゲートし、ここでリンカーはプロテアーゼによって切断され得る。特定の実施形態では、プロテアーゼはリソソームのプロテアーゼである。他の特定の実施形態では、プロテアーゼは、とりわけ、膜結合プロテアーゼ、細胞内プロテアーゼまたはエンドソームの（ｅｎｄｏｓｏｍａｌ）プロテアーゼである。
【００４４】
ある実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化されたキメラ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、グリコシル化抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、１本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、$F(ab')_2$断片、Ｆｄ、１本鎖Ｆｖ、ジスルフィド連結Ｆｖ、V_Lドメインを含む断片、またはV_Hドメインを含む断片である。ある実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの抗ＣＤ３０抗体は、特にＣＤ３０に特異的に結合するポリペプチドである。ある実施形態では、抗体が二重特異性抗体である。他の実施形態では、抗体は二重特異性抗体ではない。
【００４５】
ある実施形態では、抗ＣＤ３０抗体は放射標識される。ある実施形態では、抗ＣＤ３０抗体－細胞傷害性薬剤コンジュゲートの抗ＣＤ３０抗体は放射標識される。特定の実施形態では、放射性標識は、^{90}Y、^{111}In、^{211}At、^{131}I、^{212}Bi、^{213}Bi、^{225}Ac、^{186}Re、^{188}Re、^{109}Pd、^{67}Cu、^{77}Br、^{105}Rh、^{198}Au、^{199}Auまたは^{212}Pbである。
【００４６】
本発明の方法によって包含される免疫学的疾患は、Th_2リンパ球関連疾患（例えば、アトピー性皮膚炎、全身紅斑性狼瘡（「ＳＬＥ」）、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎、オーメン症候群、全身性硬化症および慢性の移植片対宿主病）；Th_1リンパ球関連疾患（例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、ショーグレン症候群、橋本甲状腺炎、グレイブ病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナー肉芽腫症、結核および急性移植片対宿主病）；ウイルス感染に関連する疾患（例えば、エプスタイン－バーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトＴ白血病ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよび麻疹ウイルス感染症）；および活性化Ｂリンパ球に関連する疾患（例えば、全身紅斑性狼瘡、グッドパスチャー（Ｇｏｏｄｐａｓｔｕｒｅ）症候群、関節リウマチ、およびＩ型糖尿病）である。
【００４７】
３．１　略語
「ＡＥＦＰ」という略語は、ジメチルバリン－バリン－ドライソロイン－ドラプロイン－フェニルアラニン－ｐ－フェニレンジアミン、すなわち、以下に示すオーリスタチンＥ誘導体を指す：

【化１】

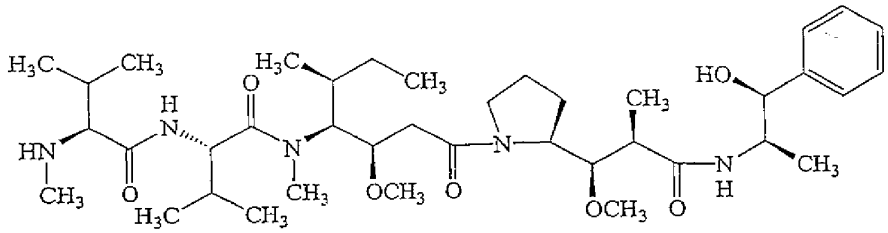


AEFP

【００４８】

「ＭＭＡＥ」という略語は、モノメチル・オーリスタチンＥ、すなわち、以下に示すオーリスタチンＥ誘導体を指す：

【化２】

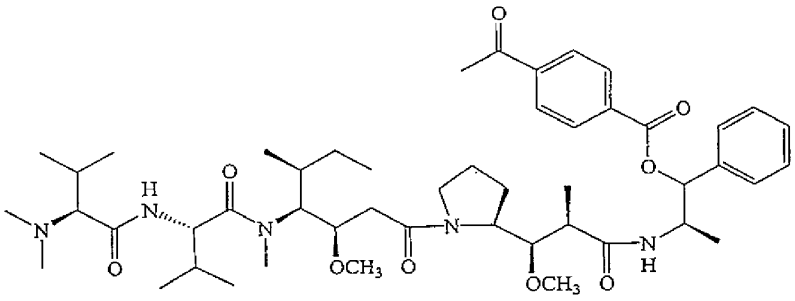


MMAE

【００４９】

「ＡＥＢ」という略語は、オーリスタチンＥをパラアセチル安息香酸と反応させることにより生産されるエステルを指し、その構造は以下に示す通りである：

【化３】

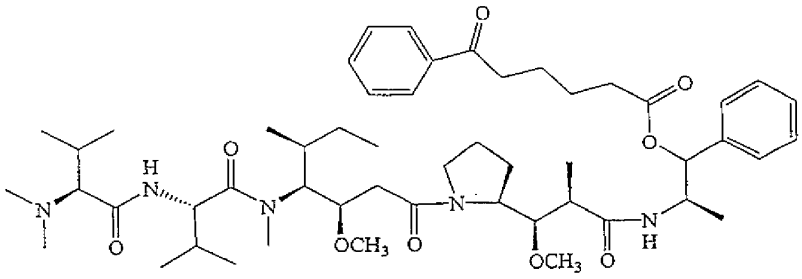


AEB

【００５０】

「ＡＥＶＢ」という略語は、オーリスタチンＥをベンゾイル吉草酸と反応させることにより生産されるエステルを指し、その構造は以下に示す通りである：

【化４】



AEVB

【００５１】
「ｆｋ」および「ｐｈｅ－ｌｙｓ」という略語は、リンカーであるフェニルアラニン－リジンを指す。
【００５２】
「ｖｃ」および「ｖａｌ－ｃｉｔ」という略語は、リンカーであるバリン－シトルリンを指す。
【発明を実施するための最良の形態】
【００５３】
４．図面の簡単な説明
（後記の図面の簡単な説明の欄参照のこと）
５．発明の詳細な説明
本発明は、ＣＤ３０に結合し、リンパ球においてＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または、活性化リンパ球に対し細胞静止作用もしくは細胞傷害作用を及ぼすタンパク質の免疫学的疾患の治療または予防のための使用に関する。本発明はさらに、ＣＤ３０との結合についてＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１と競合し、リンパ球においてＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または、活性化リンパ球に対し細胞静止作用もしくは細胞傷害作用を及ぼすタンパク質に関する。１つの実施形態では、タンパク質は抗体である。実施形態の好ましい態様において、抗体はＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１であり、最も好ましくはＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１のヒト化形態またはキメラ形態である。
【００５４】
ある実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０抗体は、細胞傷害性薬（例えば、小さな分子、毒素、放射性同位体）とコンジュゲートしていない状態で、および／またはＣＤ３０－発現リンパ球以外の細胞がない状態（例えば、ナチュラル・キラー細胞のようなエフェクター細胞が欠如した状態）で、単一特異性抗体として活性化リンパ球のアポトーシスまたは成長停止を誘導することができる。何らかの理論に拘束されるものではないが、本発明者は、ＣＤ３０経路を介してシグナル伝達することにより、そのような抗体がアポトーシスまたは生育停止を誘導すると考える。
【００５５】
本発明はさらに、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の免疫学的疾患の治療または予防のための使用に関する。本発明はさらに、そのようなＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１タンパク質の断片、および他の誘導体および類似体に関する。そのような断片または誘導体をコードする核酸も本発明の範囲内である。前述のタンパク質の産生は、例えば、遺伝子組み換え法によって提供される。
【００５６】

本発明はまた、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１タンパク質、および機能的に活性な、すなわち、ＣＤ３０への結合を示し、かつ、活性化リンパ球に対する細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼし得る、融合／キメラなタンパク質を含む誘導体の免疫学的疾患の治療または予防のための使用に関する。

【００５７】

その使用が本発明によって包含されるＣＤ３０の抗体は、ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体、ならびに、化学療法剤などの細胞傷害性薬剤にコンジュゲートしたそのような抗体を含む。

【００５８】

本発明はさらに、本発明のタンパク質または核酸を単独でまたは細胞傷害性薬剤（化学療法剤を含むがこれに限定されない）と組み合わせて含む組成物を投与することを含む免疫学的疾患の治療または予防方法に関する。

【００５９】

開示を明瞭にするために、本発明の詳細な説明を以下のサブセクションに分けるが、これらは本発明を限定するものではない。

【００６０】

５．１　本発明のタンパク質

本発明は、ＣＤ３０に結合し、活性化リンパ球に対し細胞静止作用および／または細胞傷害作用を及ぼすタンパク質（抗体を含むが、これに限定されない）の免疫学的疾患の治療のための使用を包含する。本発明はさらに、ＣＤ３０への結合に関しＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１と競合し、活性化リンパ球に対し細胞静止作用および／または細胞傷害作用を及ぼすタンパク質の免疫学的疾患の治療のための使用に関する。

【００６１】

本発明はさらにＨｅＦｉ－１のＣＤＲ（配列番号２０、配列番号２２；配列番号２４；配列番号２８、配列番号３０または配列番号３２）またはＡＣ１０のＣＤＲ（配列番号４；配列番号６；配列番号８；配列番号１２；配列番号１４；または配列番号１６）を含むタンパク質の免疫学的疾患の治療のための使用を包含する。

【００６２】

本発明はさらに、ＨｅＦｉ－１の可変領域（配列番号１８または配列番号２６）またはＡＣ１０の可変領域（配列番号２または配列番号１０）を含むタンパク質の免疫学的疾患の治療のための使用を包含する。各配列番号が対応するＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の領域を次表に示す。

【表１】

表１

分子	ヌクレオチドまたはアミノ酸	配列番号
AC10重鎖可変領域	ヌクレオチド	1
AC10重鎖可変領域	アミノ酸	2
AC10重鎖-CDR1 (H1)	ヌクレオチド	3
AC10重鎖-CDR1 (H1)	アミノ酸	4
AC10重鎖-CDR2 (H2)	ヌクレオチド	5
AC10重鎖-CDR2 (H2)	アミノ酸	6
AC10重鎖-CDR3 (H3)	ヌクレオチド	7
AC10重鎖-CDR3 (H3)	アミノ酸	8
AC10軽鎖可変領域	ヌクレオチド	9
AC10軽鎖可変領域	アミノ酸	10
AC10軽鎖-CDR1 (L1)	ヌクレオチド	11
AC10軽鎖-CDR1 (L1)	アミノ酸	12
AC10軽鎖-CDR2 (L2)	ヌクレオチド	13
AC10軽鎖-CDR2 (L2)	アミノ酸	14
AC10軽鎖-CDR3 (L3)	ヌクレオチド	15
AC10軽鎖-CDR3 (L3)	アミノ酸	16
HeFi-1重鎖可変領域	ヌクレオチド	17
HeFi-1重鎖可変領域	アミノ酸	18
HeFi-1重鎖-CDR1 (H1)	ヌクレオチド	19
HeFi-1重鎖-CDR1 (H1)	アミノ酸	20
HeFi-1重鎖-CDR2 (H2)	ヌクレオチド	21
HeFi-1重鎖-CDR2 (H2)	アミノ酸	22
HeFi-1重鎖-CDR3 (H3)	ヌクレオチド	23
HeFi-1重鎖-CDR3 (H3)	アミノ酸	24
HeFi-1軽鎖可変領域	ヌクレオチド	25
HeFi-1軽鎖可変領域	アミノ酸	26
HeFi-1軽鎖-CDR1 (L1)	ヌクレオチド	27
HeFi-1軽鎖-CDR1 (L1)	アミノ酸	28
HeFi-1軽鎖-CDR2 (L2)	ヌクレオチド	29
HeFi-1軽鎖-CDR2 (L2)	アミノ酸	30
HeFi-1軽鎖-CDR3 (L3)	ヌクレオチド	31
HeFi-1軽鎖-CDR3 (L3)	アミノ酸	32

【００６３】

本発明はさらに、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１の機能的な誘導体または類似体の免疫学的疾患の治療のための使用を含む。本明細書で使用する場合、本発明のペプチドまたはタンパク質に関連して「機能的な」という用語は、ペプチドまたはタンパク質が１）ＣＤ３

０に結合することができ、２）リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導しかつ／または、活性化リンパ球に対し細胞静止作用および／または細胞傷害作用を及ぼし得ることを示す。

【００６４】

一般に、本発明の方法を実施するのに適する抗体は、免疫特異的にＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞静止作用と細胞傷害作用を及ぼす。本発明の方法を実施するのに適する抗体は、好ましくは、モノクローナルであり、多重特異的でもよく、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、１本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生される断片、および上記のいずれかのＣＤ３０結合断片である。本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、免疫特異的にＣＤ３０に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。本発明の免疫グロブリン分子は、いずれのタイプの免疫グロブリン分子（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、クラス（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはサブクラスでもよい。

【００６５】

本発明のある実施形態では、抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体断片であり、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、１本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、１本鎖抗体、ジスルフィド連結Ｆｖ（ｓｄＦｖ）および、V_LドメインまたはV_Hドメインのいずれかを含む断片を含む（ただし、これらに限定されない）。１本鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、可変領域（単数または複数）を単独でまたは次のもの、すなわちヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＬドメイン、の全体または一部と組み合わせて含み得る。また、可変領域（単数または複数）とヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＬドメインとの組合せを含む抗原結合断片も本発明に含まれる。好ましくは、抗体は、ヒト、ネズミ科動物（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ科の動物、ウマまたはニワトリである。本明細書で使用する場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリー、ヒトＢ細胞、または１種または複数のヒト免疫グロブリンに組み換えられたトランスジェニック動物から単離された抗体を含む（下記または例えば、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉらによる米国特許第５，９３９，５９８号に記載されているものなど）。

【００６６】

本発明の方法を実施するのに適する抗体は単一特異的でもよいし、二重特異的、三重特異的、またはより多重特異的でもよい。多重特異性抗体はＣＤ３０の異なるエピトープに対して特異的でもよいしまたはＣＤ３０と異種起源のタンパク質の両方に対して特異的でもよい。例えば国際公開ＷＯ９３／１７７１５；ＷＯ９２／０８８０２；ＷＯ９１／００３６０；ＷＯ９２／０５７９３；Ｔｕｔｔら、１９９１、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０～６９頁；米国特許第４，４７４，８９３号；米国特許第４，７１４，６８１号；米国特許第４，９２５，６４８号；米国特許第５，５７３，９２０号；米国特許第５，６０１，８１９号；Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７～１５５３頁参照のこと。本発明を実施するのに有用な二重特異的および三重特異的な抗体を含む多重特異性抗体は、ＣＤ３０（モノクローナル抗体Ｋｉ－２、Ｋｉ－４、Ｋｉ－５、Ｋｉ－７、Ｂｅｒ－Ｈ２、ＨＲＳ－１、ＨＲＳ－４、Ｋｉ－１、Ｋｉ－６、Ｍ６７、Ｋｉ－３、Ｍ４４、ＨｅＦｉ－１およびＡＣ１０のＣＤＲおよび／または重鎖を有する抗体を含むが、これらに限定されない）とリンパ球表面受容体または受容体複合体（例えば、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチン（Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプ）、または補体制御タンパク質など）の両者に免疫特異的に結合する抗体である。こうした分子の例および二重特異性抗体を誘導できるこのような分子に対する抗体の例は、下記の５．１２．２節で示す。好ましい実施形態では、リンパ球の細胞表面分子または分子複合体に対する多重特異性抗

体部分の結合は、活性化リンパ球に細胞静止シグナルまたは細胞傷害シグナルを送達することにより、抗ＣＤ３０抗体の細胞傷害作用または細胞静止作用を増強する。

【００６７】

本発明のある特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体はアゴニスト抗体である。本発明の別の特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体は非アゴニスト抗体ではない。別の特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体は、ＣＤ３０リガンドがＣＤ３０に結合することを妨げない。

【００６８】

本発明の方法において有用な抗体は、それらが含む特定のＣＤＲで記載または特定され得る。ある実施形態では、本発明の抗体は、ＡＣ１０および／またはＨｅＦｉ－１の１つまたは２以上のＣＤＲを含む。本発明は、重鎖または軽鎖可変ドメインを含む抗体またはその誘導体の使用を包含する。ここで、前記可変ドメインは、（ａ）モノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１に由来する３個のＣＤＲのセット、および（ｂ）モノクローナル抗体ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１のフレームワーク領域とはそれぞれ異なる４つのフレームワーク領域のセットを含み、前記抗体またはその誘導体は免疫特異的にＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼすものである。

【００６９】

特定の実施形態では、本発明は、重鎖可変ドメインを含む抗体またはその誘導体の免疫学的疾患を治療するための使用を包含する。ここで、前記可変ドメインは、（ａ）配列番号４、６または８を含む３個のＣＤＲのセット、および（ｂ）モノクローナル抗体ＡＣ１０のフレームワーク領域とはそれぞれ異なる４つのフレームワーク領域のセットを含み、前記抗体またはその誘導体は免疫特異的にＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼす。

【００７０】

特定の実施形態では、本発明は、重鎖可変ドメインを含む抗体またはその誘導体の免疫学的疾患を治療するための使用を包含する。ここで、前記可変ドメインは、（ａ）配列番号２０、２２または２４を含む３個のＣＤＲのセット、および（ｂ）モノクローナル抗体ＨｅＦｉ－１のフレームワーク領域とはそれぞれ異なる４つのフレームワーク領域のセットを含み、前記抗体またはその誘導体は免疫特異的にＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼす。

【００７１】

特定の実施形態では、本発明は、軽鎖可変ドメインを含む抗体またはその誘導体の免疫学的疾患を治療するための使用を包含する。ここで、前記可変ドメインは、（ａ）配列番号１２、１４または１６を含む３個のＣＤＲのセット、および（ｂ）モノクローナル抗体ＡＣ１０のフレームワーク領域とはそれぞれ異なる４つのフレームワーク領域のセットを含み、前記抗体またはその誘導体は免疫特異的にＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼす。

【００７２】

特定の実施形態では、本発明は、軽鎖可変ドメインを含む抗体またはその誘導体の免疫学的疾患を治療するための使用を包含する。ここで、前記可変ドメインは、（ａ）配列番号２８、３０または３２を含む３個のＣＤＲのセット、および（ｂ）モノクローナル抗体ＨｅＦｉ－１のフレームワーク領域とはそれぞれ異なる４つのフレームワーク領域のセットを含み、前記抗体またはその誘導体は免疫特異的にＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼす。

【００７３】

さらに、本発明の方法の中で使用され得る抗体は、それらの１次構造によって記載また

は特定され得る。可変領域およびＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１に少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、最も好ましくは少なくとも９８％の同一性（当技術分野で知られており本明細書に記載する方法を使用して計算される）を有する抗体も、免疫学的疾患を治療するための本発明の方法に含まれ得る。本発明の方法において有用な抗体は、ＣＤ３０へのそれらの結合親和性によって記載または特定され得る。好ましい結合親和性は、５×１０$^{-2}$Ｍ、１０$^{-2}$Ｍ、５×１０$^{-3}$Ｍ、１０$^{-3}$Ｍ、５×１０$^{-4}$Ｍ、１０$^{-4}$Ｍ、５×１０$^{-5}$Ｍ、１０$^{-5}$Ｍ、５×１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-6}$Ｍ、５×１０$^{-7}$Ｍ、１０$^{-7}$Ｍ、５×１０$^{-8}$Ｍ、１０$^{-8}$Ｍ、５×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、５×１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、５×１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、５×１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、５×１０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、５×１０$^{-14}$Ｍ、１０$^{-14}$Ｍ、５×１０$^{-15}$Ｍまたは１０$^{-15}$Ｍ未満の解離定数すなわちＫｄをもつものを含む。

【００７４】

本発明の抗体、すなわち、免疫学的疾患の治療に有用な抗体は、改変された誘導体、すなわち、任意のタイプの分子が抗体に共有結合により結合したもの（ただし、共有結合による結合は、抗体のＣＤ３０への結合を妨げず、または活性化リンパ球に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすことを妨げない）を含む。例えば、抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ＰＥＧ化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）、リン酸化、アミド化、公知の保護基またはブロッキング基、タンパク質分解性切断、細胞リガンドもしくは他のタンパク質への結合などによる誘導体化などによって修飾された抗体を含む（ただし、これらに限定されない）。多数の化学的修飾のうちのいずれも、知られている技術によって行うことができ、そうしたものとしては、化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシン（ｔｕｎｉｃａｍｙｃｉｎ）などの代謝合成が含まれるが、これらに限定されない。さらに、誘導体は１種または２種以上の非古典的アミノ酸を含んでもよい。

【００７５】

免疫学的疾患の治療に使用可能な抗体は、当技術分野で知られている任意の適当な方法によって作製できる。当技術分野でよく知られた様々な手順によって、ＣＤ３０に対するポリクローナル抗体を生産することができる。例えば、ＣＤ３０をウサギ、マウス、ラットなど（ただし、これらに限定されない）を含む様々な宿主動物に投与し、タンパク質に特異的のポリクローナル抗体を含む血清の生産を誘導する。宿主種に応じて様々なアジュバントを用いて免疫応答を増大させてもよく、フロイント（Ｆｒｅｕｎｄ）の（完全および不完全）アジュバント、水酸化アルミニウムなどの鉱物性ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）多価アルコール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびＢＣＧ（Ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）およびコリネ細菌パルブムなどの潜在的に有用なヒト・アジュバントが含まれる（ただし、これらに限定されない）。このようなアジュバントも、当技術分野でよく知られている。

【００７６】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換体およびファージディスプレイ技術の使用を含む、知られている種々様々の技術、またはその組合せを使用して作製できる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で知られており、例えば、Ｈａｒｌｏｗら、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、２版、１９８８）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら、ｉｎ：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ５６３～６８１頁（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎ．Ｙ．、１９８１）（これらは参照によってその全体が本願明細書に組み入れられる）によって教示されているものを含むハイブリドーマ技術を使用し生産することができる。本願明細書で用いる場合、「モノクローナル抗体」という用語はハイブリドーマ技術によって生産された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物、原核生物ま

たはファージクローンを含む、単一クローンに由来する抗体を指し、それが生産される方法ではない。

【００７７】

ハイブリドーマ技術を使用して特異的抗体を生産およびスクリーニングする方法は、当技術分野においてルーチンになされるものでよく知られている。限定的な例ではないが、マウスはＣＤ３０またはＣＤ３０を発現する細胞またはその断片もしくは誘導体によって免疫感作することができる。免疫応答が検出された後、例えば、ＣＤ３０に特異的な抗体がマウス血清中に検出された後、マウスの脾臓を採取して脾臓細胞を分離する。次いで、よく知られた技術によって、脾臓細胞を任意の適当なミエローマ細胞（例えば、ＡＴＣＣから入手可能な細胞系統ＳＰ２０由来の細胞）に融合する。ハイブリドーマを選択し、限界希釈によってクローン化する。次いで、ハイブリドーマクローンを、ＣＤ３０に結合可能な活性化リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼし得る抗体を分泌する細胞について当技術分野で知られている方法によってアッセイする。腹水（これは一般に高レベルの抗体を含む）は陽性ハイブリドーマクローンをマウスに注入することにより生成できる。

【００７８】

特定のエピトープを認識する抗体断片は知られた技術によって作製し得る。例えば、本発明のＦａｂと、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片は、パパイン（Ｆａｂ断片を生じる）またはペプシン（Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を生じる）などの酵素を使用した、免疫グロブリン分子のタンパク質分解的切断によって生成され得る。Ｆ（ａｂ’）$_2$断片は、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のＣＨ１ドメインを含む。

【００７９】

例えば、本発明の方法において有用な抗体は、当技術分野で知られている様々なファージディスプレイ法を使用して作製することができる。ファージディスプレイ法では、機能的な抗体領域が、それらをコードする核酸配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態では、そのようなファージは、レパートリーすなわちコンビナトリアルな抗体ライブラリー（例えばヒトまたはネズミ科）から発現する抗原結合ドメインを提示するために利用することができる。ファージディスプレイ法では、機能的な抗体ドメインは、それらをコードする核酸配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特に、V_HまたはV_LドメインをコードするＤＮＡ配列が、動物のｃＤＮＡライブラリー（例えば、ヒトまたはネズミ科のリンパ系組織のｃＤＮＡライブラリー）から増幅される。V_HまたはV_LドメインをコードするＤＮＡ配列は、ＰＣＲによってｓｃＦｖリンカーと共に組み換えによって得られ、ファージミド・ベクター（例えば、ｐＣＡＮＴＡＢ　６またはｐＣｏｍｂ　３　ＨＳＳ）中にクローン化される。ベクターは大腸菌中にエレクトロポレートされ、大腸菌にヘルパーファージを感染させる。これらの方法で使用されるファージは、典型的には線状ファージであり、Ｆａｂ、Ｆｖまたはジスルフィド安定化Ｆｖ抗体ドメイン（遺伝子組み換えによりファージ遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩタンパク質のいずれかに融合される）と共に、ファージから発現されるｆｄおよびＭ１３結合ドメインを含む。ＣＤ３０またはそのＡＣ１０もしくはＨｅＦｉ－１結合部分に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原、例えば、標識された抗原または固体の表面もしくはビーズに固定された抗原を使用して選択または識別できる。本発明の抗体の製造に使用することができるファージディスプレイ法の例は、Ｂｒｉｎｋｍａｎら、１９９５、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１８２：４１～５０頁；Ａｍｅｓら、１９９５、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１８４：１７７～１８６頁；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら、１９９４、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：９５２～９５８頁；Ｐｅｒｓｉｃら、１９９７、Ｇｅｎｅ　１８７：９～１８頁；Ｂｕｒｔｏｎら、１９９４、Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、１９１～２８０頁；国際特許出願ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４；国際公開ＷＯ９０／０２８０９；ＷＯ９１／１０７３７；ＷＯ９２／０１０４７；ＷＯ９２／１８６１９；ＷＯ９３／１１２３６；ＷＯ９５／１５９８２；ＷＯ９５／２０４０１；および米国特許第５，６９８，４２６号；米国特許第５，２２３，

４０９号；米国特許第５，４０３，４８４号；米国特許第５，５８０，７１７号；米国特許第５，４２７，９０８号；米国特許第５，７５０，７５３号；米国特許第５，８２１，０４７号；米国特許第５，５７１，６９８号；米国特許第５，４２７，９０８号；米国特許第５，５１６，６３７号；米国特許第５，７８０，２２５号；米国特許第５，６５８，７２７号；米国特許第５，７３３，７４３号および米国特許第５，９６９，１０８号に開示されているものなどである。これらはいずれも参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる。

【００８０】

上記の参照文献に記載されているように、ファージ由来の抗体コード領域は、ファージ選択後に分離し、ヒト抗体を含む全抗体または他の任意の所望の抗原結合断片を作製するのに使用することができ、例えば、下記に詳細に記載するように任意の所望の宿主（哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む）中で発現させることができる。例えば、国際公開ＷＯ９２／２２３２４；Ｍｕｌｌｉｎａｘら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９２、１２（６）：８６４～８６９頁；およびＳａｗａｉら、１９９５、ＡＪＲＩ ３４：２６～３４頁；およびＢｅｔｔｅｒら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０４１～１０４３頁に開示されるような当技術分野で知られた方法を用い、Ｆａｂ、Ｆａｂ’または$F(ab')_2$断片を組み換えにより作製する技術を使用することができる。（これらは参照によってその全体が本明細書に組み入れられる）。

【００８１】

１本鎖Ｆｖおよび抗体を生産するために使用することができる技術の例としては、米国特許第４，９４６，７７８号および米国特許第５，２５８，４９８号；Ｈｕｓｔｏｎら、１９９１、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ２０３：４６～８８頁；Ｓｈｕら、１９９３、ＰＮＡＳ ９０：７９９５～７９９９頁；およびＳｋｅｒｒａら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０３８～１０４０頁が挙げられる。ヒトでのｉｎ ｖｉｖｏでの抗体の使用およびｉｎ ｖｉｔｒｏでの増殖または細胞傷害性アッセイを含むいくつかの用途については、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体を使用することが好ましい。キメラ抗体は、例えば、ネズミ科のモノクローナル抗体およびヒト免疫グロブリン定常領域に由来する可変領域を有する抗体など、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体を生産する方法は、当技術分野で知られている。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９８５、２２９：１２０２；Ｏｉら、１９８６、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４；Ｇｉｌｌｉｅｓら、１９８９、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １２５：１９１～２０２頁；米国特許第５，８０７，７１５号；米国特許第４，８１６，５６７号；および米国特許第４，８１６，３９７号参照のこと（これらは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）。ヒト化抗体は、非ヒト種抗体由来の抗体分子であり、非ヒト種由来の１つまたは複数のＣＤＲおよびヒト免疫グロブリン分子のフレームワークおよび定常領域を有する所望の抗原を結合するものである。しばしば、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、変更するべきＣＤＲドナー抗体由来の対応する残基で置換され、好ましくは抗原結合性を改善する。これらのフレームワーク置換は当技術分野においてよく知られた方法によって同定され、例えば、ＣＤＲとフレームワーク残基の相互作用をモデル化することによって、抗原結合にとって重要なフレームワーク残基が同定され、配列比較によって特定位置での非一般的なフレームワーク残基が同定される（例えば、Ｑｕｅｅｎら、米国特許第５，５８５，０８９号；Ｒｉｅｃｈｍａｎら、１９８８、Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３参照のこと。これらは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）。抗体は、例えば、ＣＤＲグラフティング（欧州特許第２３９，４００号；国際公開ＷＯ９１／０９９６７；米国特許第５，２２５，５３９号；米国特許第５，５３０，１０１号；および米国特許第５，５８５，０８９号）、ベニアリング（ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ）、リサーフェイシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）（欧州特許第５９２，１０６号；欧州特許第５１９，５９６号；Ｐａｄｌａｎ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、１９９１、２８（４／５）：４８９～４９８頁；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら、１９９４、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７

（６）：８０５～８１４頁；Ｒｏｇｕｓｋａ．ら、１９９４、ＰＮＡＳ ９１：９６９～９７３頁）およびチェイン・シャフリング（米国特許第５，５６５，３３２号）を含む当技術分野で知られた様々な技術を用いてヒト化することができる。

【００８２】

ヒト患者の治療には完全なヒト抗体が特に望ましい。ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いて上記のファージディスプレイ法を含む、知られた様々な方法によってヒト抗体を作製できる。さらに米国特許第４，４４４，８８７号および米国特許第４，７１６，１１１号；また国際公開ＷＯ９８／４６６４５、ＷＯ９８／５０４３３、ＷＯ９８／２４８９３、ＷＯ９８／１６６５４、ＷＯ９６／３４０９６、ＷＯ９６／３３７３５およびＷＯ９１／１０７４１参照のこと。これらのいずれもが参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる。

【００８３】

ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを使用して産生することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子複合体を、マウスの胚性幹細胞中にランダムにまたは相同的組み換えによって導入することができる。マウスの重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同的組み換えによってヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別にまたは同時に非機能化することができる。特に、ＪＨ領域の同型接合体欠失は内生的な抗体産生を妨げる。キメラなマウスを生産するためには、改変した胚性幹細胞を増殖させて胚盤胞中に顕微注入する。次いで、キメラマウスを交配させて、ヒト抗体を発現する同型接合体の子孫を生じさせる。選択された抗原（例えば、ＣＤ３０のすべてまたは一部）によってトランスジェニックマウスを通常の方法で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、慣用のハイブリドーマ技術を使用して、免疫化したトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスが保有するヒト免疫グロブリントランスジーンは、Ｂ細胞分化の間に再構成され、続いてクラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。したがって、このような技術を使用して、治療上有用なＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭおよびＩｇＥ抗体を生産することが可能である。ヒト抗体を生産するためのこの技術の概説については、ＬｏｎｂｅｒｇとＨｕｓｚａｒ、１９９５、Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５～９３頁参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのこの技術の詳細な議論およびそのような抗体を生産するためのプロトコルについては、例えば、国際公開ＷＯ９８／２４８９３；ＷＯ９２／０１０４７；ＷＯ９６／３４０９６；ＷＯ９６／３３７３５；欧州特許第０，５９８，８７７号；米国特許第５，４１３，９２３号；米国特許第５，６２５，１２６号；米国特許第５，６３３，４２５号；米国特許第５，５６９，８２５号；米国特許第５，６６１，０１６号；米国特許第５，５４５，８０６号；米国特許第５，８１４，３１８号；米国特許第５，８８５，７９３号；米国特許第５，９１６，７７１号；および米国特許第５，９３９，５９８号（これらは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）を参照のこと。さらに、アブジェニックス（Ａｂｇｅｎｉｘ）社（カリフォルニア州フリーモント所在（Ｆｒｅｅｍｏｎｔ、ＣＡ）およびメダレックス（Ｍｅｄａｒｅｘ）（ニュージャージー州プリンストン所在（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、ＮＪ）などの会社は、上に記載したのと同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体の提供を行っている。

【００８４】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体は「ガイドされた選択」と呼ばれる技術を使用して作製することができる。このアプローチでは、選択された非ヒト・モノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）を用いて、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択をガイドする（Ｊｅｓｐｅｒｓら、１９９４、Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １２：８９９～９０３頁）。

【００８５】

さらに、ＣＤ３０に対する抗体はその後、当業者によく知られた技術（例えば、ＧｒｅｎｓｐａｎとＢｏｎａ、１９８９、ＦＡＳＥＢ Ｊ．７（５）：４３７～４４４頁；およびＮｉｓｓｉｎｏｆｆ、１９９１、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７（８）：２４２９～２

４３８頁参照）を使用して、本発明のタンパク質を「模倣する」抗イディオタイプ抗体を作製するのに利用できる。このような抗イディオタイプのＦａｂ断片は、活性化リンパ球上に存在するＣＤ３０に対する個体自身の免疫反応を誘発する治療レジメに使用することができる。

【００８６】

上に示唆されるように、活性化リンパ球に対して治療または予防に有用なタンパク質は抗体である必要はない。したがって、本発明のタンパク質は、ＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対して細胞傷害作用および／または細胞静止作用を及ぼす抗体に由来する１つまたは２つ以上のＣＤＲを含むことができる。好ましくは、本発明のタンパク質は多量体であり、最も好ましくは二量体である。本明細書で使用する場合、「本発明のタンパク質」は、ＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対して細胞傷害作用および／または細胞静止作用を及ぼす抗体を含むが、これに限定されない。

【００８７】

本発明はまた、タンパク質を使用して免疫学的疾患を治療する方法であって、このタンパク質としては抗体を含み（ただし、これに限定されない）、当技術分野で知られている競合的結合の決定のための任意の方法（例えば、本明細書に記載された免疫測定法）によって決定されるＣＤ３０に対するＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の結合を競合的に阻害するものである。好ましい実施形態では、タンパク質は、ＣＤ３０へのＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の結合を少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも６０％、さらに好ましくは少なくとも７０％、最も好ましくは少なくとも７５％、競合的に阻害する。他の実施形態では、タンパク質は、ＣＤ３０へのＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の結合を少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％または少なくとも９５％、競合的に阻害する。

【００８８】

以下により詳細に論じるように、本発明は、活性化リンパ球に結合しリンパ球に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼす抗体を含むタンパク質を使用して、免疫学的疾患を治療する方法を提供する。タンパク質は、免疫学的疾患の予防または治療において、単独でまたは他の組成物と組み合わせて投与することができる。タンパク質は、Ｎ末端またはＣ末端で異種起源のタンパク質に組み換えにより融合してもよいし、細胞傷害性薬剤、タンパク質または他の組成物に化学的に（共有結合的および非共有結合的コンジュゲーションを含む）コンジュゲートする。例えば、本発明の抗体は、化学療法または毒素として有用な分子に組み換えにより融合してもよいし、またはコンジュゲートしてもよいし、放射線療法として使用するための放射性核種を含む。例えば国際公開ＷＯ９２／０８４９５；ＷＯ９１／１４４３８；ＷＯ８９／１２６２４；米国特許第５，３１４，９９５号；および欧州特許ＥＰ３９６，３８７号を参照のこと。

【００８９】

本発明の方法において有用なタンパク質は、異種のタンパク質をコードする配列と共に本発明の抗体のＣＤＲの１つまたは複数のコード領域を同一枠内で組み換えにより融合させることにより生産できる。異種のタンパク質は、次の１つまたは複数の特徴、すなわち治療上の利点の追加；安定した発現の促進；高収率での組み換え体発現を促進する手段の提供；または、多量体化ドメインの提供を提供し得る。

【００９０】

ＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／またはリンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼす抗体の１つまたは複数のＣＤＲを含むタンパク質に加えて、本発明の治療方法において有用なタンパク質は、タンパク質－タンパク質相互作用についてスクリーニングするのに適する任意の方法を用いて同定することができる。まず、ＣＤ３０に結合するタンパク質が同定され、次いで、活性化リンパ球に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすそれらの能力を決定することができる。使用することができる慣用法の中には、上記λｇｔ１１ライブラリーの抗体プロービング技術と同様のやり方で標識されたＣＤ３０を用いて発現ライブラリーのプロービングを行

う「相互作用クローニング」技術がある。例としては、これは以下のように達成することができる（ただし、これに限定されない）。すなわち、ＣＤ３０（またはそのＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１結合ドメイン）をコードするｃＤＮＡクローンを、心筋キナーゼ（ＨＭＫ）（Ｂｌａｎａｒ　＆　Ｒｕｔｔｅｒ、１９９２、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５６：１０１４～１０１８頁）用のリン酸化部位の挿入により末端で改変することである。組み換えタンパク質を大腸菌中で発現させ、ＧＤＰ親和性カラムで均質になるまで精製し（Ｅｄｅｒｙら、１９８８、Ｇｅｎｅ　７４：５１７～５２５頁）、γ^{32}Ｐ－ＡＴＰおよびウシ心筋キナーゼ（シグマ（Ｓｉｇｍａ））を比活性１×１０^{8}ｃｐｍ／μｇまで用いて標識し、「ファー－ウエスタンアッセイ」（ＢｌａｎａｒとＲｕｔｔｅｒ、１９９２、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５６：１０１４～１０１８頁）においてヒト胎盤λｇｔ１１　ｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングに用いる。ＣＤ３０プローブと相互作用するプラークを単離する。陽性λプラークのｃＤＮＡインサートを放出させ、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＫＳ（ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ））などの配列決定に適するベクター中にサブクローニングする。

【００９１】

タンパク質相互作用をｉｎ　ｖｉｖｏで検出する１つの方法、２－ハイブリッドシステムについて、詳細に説明するが、これは単に例示のためにすぎず、本発明を限定するものではない。このシステムの１つのバージョンは文献に記載されており（Ｃｈｉｅｎら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８：９５７８～９５８２頁）、クローンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）（（カリフォルニア州パロアルト所在）（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）から市販されている。

【００９２】

ＣＤ３０－結合タンパク質が同定した後、活性化リンパ球に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を誘発するその能力（単独で、または二量化または多量化ドメインに多量化されるか融合されたとき）を、下記５．７節に記載された方法によって決定する。

【００９３】

作用メカニズムに関して限定するものではないが、ＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすタンパク質は、好ましくは２以上のＣＤ３０－結合部位を有し、したがって活性化リンパ球表面上のＣＤ３０分子と架橋する能力を有する。ＣＤ３０と結合するか、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１とＣＤ３０との結合に対して競合するタンパク質は、二量体化または多量体化すれば、活性化リンパ球に対する細胞静止作用または細胞傷害作用を誘導する能力を獲得し得る。ＣＤ３０－結合タンパク質がモノマーのタンパク質である場合、それは連なって（ｉｎ　ｔａｎｄｅｍ）発現することができ、それにより、多重のＣＤ３０結合部位を有するタンパク質が得られる。ＣＤ３０結合部位は柔軟なリンカー領域により分離することができる。別の実施形態では、ＣＤ３０結合タンパク質は、投与する前に、例えば、グルタルアルデヒドを使用して化学的に架橋することもできる。好ましい実施形態では、ＣＤ３０結合領域を異種起源のタンパク質（ここで、異種起源のタンパク質は二量体化ドメインと多量体化ドメインを含む）と融合される。免疫学的疾患を治療または予防するために被験体に本発明のタンパク質を投与する前に、そのようなタンパク質をホモ二量体またはヘテロ二量体を形成する条件に曝露する。本明細書で使用する場合、ヘテロ二量体は、同一の二量化領域だが異なるＣＤ３０結合領域、同一のＣＤ３０結合領域だが異なる二量体化領域、または異なるＣＤ３０結合領域と異なる二量体化領域、を含み得る。

【００９４】

特に好ましい二量体化領域は転写因子に由来するものである。

【００９５】

１つの実施形態では、二量体化領域は塩基性領域ロイシンジッパー（「ｂＺＩＰ」）のそれである。ｂＺＩＰタンパク質は特徴的には２つのドメインを有する。ロイシンジッパーの構造ドメインおよび塩基性アミノ酸に富んだ塩基性ドメインであり、これらは「フォ

ーク」ドメインによって隔てられている（Ｃ．Ｖｉｎｓｏｎら、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４６：９１１～９１６頁）。２つのｂＺＩＰタンパク質は、コイルド・コイル領域（そこではロイシンジッパードメインが二量体化している）の形成により二量体化する。したがって、これらのコイルド・コイル領域は、本明細書に記載する治療方法において有用なタンパク質に対する融合パートナーとして使用してもよい。

【００９６】

特に有用なロイシンジッパードメインは、酵母転写因子ＧＣＮ４、哺乳類の転写因子ＣＣＡＡＴ／エンハンサー結合タンパク質Ｃ／ＥＢＰ、および、癌遺伝子における核形質転換、ＦｏｓおよびＪｕｎ（Ｌａｎｄｓｃｈｕｌｔｚら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１７５９～１７６４頁；ＢａｘｅｖａｎｉｓとＶｉｎｓｏｎ、１９９３、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｇｅｎ．Ｄｅｖｅｌ．、３：２７８～２８５頁；およびＯ’ Ｓｈｅａら、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４３：５３８～５４２頁参照）のものである。

【００９７】

別の実施形態では、二量体化ドメインは、塩基性－領域ヘリックス－ループ－ヘリックス（「ｂＨＬＨ」）タンパク質（Ｍｕｒｒｅら、１９８９、Ｃｅｌｌ、５６：７７７～７８３頁）である。ｂＨＬＨタンパク質も個別のドメインからなり、それらはこの構造を採ることにより、特定のＤＮＡの配列を認識し相互作用することが可能になる。ヘリックス－ループ－ヘリックス領域はｂＺＩＰタンパク質のロイシンジッパー領域の場合と同様にして、その両親媒性の螺旋を通して二量化を促進する（Ｄａｖｉｓら、１９９０ Ｃｅｌｌ、６０：７３３～７４６頁；ＶｏｒｏｎｏｖａとＢａｌｔｉｍｏｒｅ、１９９０ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８７：４７２２～４７２６頁）。特に有用なｈＨＬＨタンパク質はｍｙｃ、ｍａｘおよびｍａｃである。

【００９８】

ヘテロ二量体は、ＦｏｓとＪｕｎの間で（Ｂｏｈｍａｎｎら、１９８７、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３８：１３８６～１３９２頁）、ＡＴＦ／ＣＲＥＢファミリーのメンバー間で（Ｈａｌら、１９８９、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、３：２０８３～２０９０頁）、Ｃ／ＥＢＰファミリーのメンバー間で（Ｃａｏら、１９９１、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、５：１５３８～１５５２頁；Ｗｉｌｌｉａｍｓら、１９９１、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、５：１５５３～１５６７頁；およびＲｏｍａｎら、１９９０、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、４：１４０４～１４１５頁）およびＡＴＦ／ＣＲＥＢファミリーとＦｏｓ／Ｊｕｎファミリーのメンバー間で（ＨａｉとＣｕｒｒａｎ、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８：３７２０～３７２４頁）で形成されることが知られている。したがって、本発明のタンパク質を異なる二量体化ドメインを含むヘテロ二量体として被験体に投与する場合、上記の任意の組合せが使用できる。

【００９９】

好ましい態様では、本発明のタンパク質は、本発明の抗体－薬剤コンジュゲートを含み（ただし、これに限定されない）、実質的に純粋である（例えば、その効果を制限するか、望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。ある特定の実施形態では、本発明のタンパク質は純度４０％、より好ましくは、純度約５０％、最も好ましくは純度約６０％である。ある特定の実施形態では、本発明のタンパク質はおよそ６０～６５％、６５～７０％、７０～７５％、７５～８０％、８０～８５％、８５～９０％、９０～９５％または９５～９８％の純度である。別の特定の実施形態では、本発明のタンパク質はおよそ９９％の純度である。

【０１００】

５．１．１ ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子の単離

本発明はＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１核酸の、例えば、免疫学的疾患の遺伝子治療のための、または抗体分子の組み換え発現（これは免疫学的疾患の治療のための使用となり得る）のための使用に関する。したがって、本発明は、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子配列の少なくとも８個のヌクレオチド（すなわち、ハイブリダイズさせることができる部分）からなる、精製された核酸を提供する。他の実施形態では、核酸は、ＡＣ１０または

ＨｅＦｉ－１配列の少なくとも２５個の（連続する）ヌクレオチド、５０個のヌクレオチド、１００個または２００個のヌクレオチドまたはＡＣ１０もしくはＨｅＦｉ－１可変領域をコードする配列の全長からなる。同一または他の実施形態では、核酸は５０個、７５個、１００個、または２００個、または５０００個未満の長さのヌクレオチドである。核酸は１本鎖でもよいし２本鎖でもよい。本発明はまた、前述の配列またはそれらの逆相補鎖にハイブリダイズさせることができるか相補的な核酸、特に、ＣＤ３０に結合するか、ＣＤ３０への結合についてＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１と競合し、かつ／または、ＣＤ３０へのＣＤ３０リガンドの結合を少なくとも４５％、５０％、６０％または６５％増加させるタンパク質をコードするそうした核酸に関する。具体的態様では、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１可変領域遺伝子の少なくとも１０、２５、５０、１００または２００個ヌクレオチドまたはコード領域全体に相補的な配列を含む核酸が提供される。

【０１０１】

ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１タンパク質の誘導体および類似体をコードする核酸も、さらに提供される。

【０１０２】

５．１．２　クローニング操作

ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１核酸のクローニングのための特定の実施形態は以下の通りである。特定の実施形態では、全ＲＮＡを、ｍＡｂ　ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１産生ハイブリドーマから単離し、ポリメラーゼ連鎖反応を用い、本明細書に示す配列に基づいたプライマーを使用して、所望の可変領域配列を増幅する。別の例としては、ｍＲＮＡをｍＡｂ　ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１産生ハイブリドーマから単離し、ｃＤＮＡを調製し、それを導入した宿主細胞によって発現され得るように、発現ベクター（例えば、バクテリオファージ誘導体）にライゲートする。次いで、発現産物について選択するために様々なスクリーニング・アッセイを使用することができる。１つの実施形態では、選択は、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子の一部、またはそのＲＮＡまたはそれらの断片を表わす標識されたプローブへのハイブリダイゼーションに基づく（ＢｅｎｔｏｎとＤａｖｉｓ、１９７７、Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９６：１８０、ＧｒｕｎｓｔｅｉｎとＨｏｇｎｅｓｓ、１９７５、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７２：３９６１）。プローブと実質的な相同性をもつそのようなＤＮＡ断片はハイブリダイズするであろう。制限酵素消化および（公知の制限地図が利用できる場合は）断片サイズをそうした制限地図によって予想したものと比較することによって、適当な断片を同定することも可能である。遺伝子の特性に基づいてさらに選択を行うこともできる。

【０１０３】

あるいは、所望の遺伝子の存在は、その発現産物の物理的特性、化学的特性、または免疫学的特性に基づくアッセイによって検出し得る。例えば、ｃＤＮＡクローン、すなわち適当なｍＲＮＡをハイブリッド選択するＤＮＡクローンは、例えば、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１タンパク質について知られているのと同様もしくは同一の電気泳動移動度、等電点電気泳動での挙動、タンパク質分解消化地図、および機能的な活性を有するタンパク質を生産するように選択し発現させることができる。例えば、ＣＤ３０結合能力はＥＬＩＳＡ（酵素免疫測定吸着法）タイプの操作において検出することができる。

【０１０４】

核酸のハイブリダイゼーション後、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの翻訳を用いてｍＲＮＡ選択により、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子を同定することもできる。この操作では、断片を用いてハイブリダイゼーションによって相補的ｍＲＮＡを単離する。単離したｍＲＮＡの分離産物のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの翻訳産物の機能的な分析（例えば、ＣＤ３０への結合など）により、ｍＲＮＡ、したがって所望の配列を含む相補的なＤＮＡ断片が同定される。

【０１０５】

別の実施形態では、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１核酸、最も好ましくは重鎖もしくは軽鎖の可変領域または重鎖もしくは軽鎖のＣＤＲをコードするＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１

核酸を本明細書に開示する配列から化学的に合成することができる。例えば、当技術分野で知られている標準的方法、例えば、自動ＤＮＡシンセサイザー（それらはバイオサーチ（Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ）、アプライド・バイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）などから市販されている）を使用することによってＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１配列を合成することができる。あるいは、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１核酸は、例えば、ブルー・ヘロン・バイオテクノロジー（Ｂｌｕｅ　Ｈｅｒｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）（ワシントン州ボッセル所在（Ｂｏｔｈｅｌｌ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ））またはキアゲン（ＱＩＡＧＥＮ）社（カリフォルニア州バレンシア所在（Ｖａｌｅｎｃｉａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ））による商業的に利用可能なサービスによって合成することもできる。当業者に知られている、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子を単離する他の方法を使用することもできる。

【０１０６】

単離されたＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１核酸（例えば、ＡＣ１０もしくはＨｅＦｉ－１または１種または複数のそれらのＣＤＲもしくは可変領域をコードする核酸）は、次いで、適当なクローニングベクター中に挿入することができる。当技術分野で知られている多数のベクター－宿主システムを使用することができる。可能なベクターは、プラスミドや改変ウイルスを含むが、これらに限定されない。ただし、ベクター・システムは使用されている宿主細胞と適合性を有しなければならない。そのようなベクターは、ラムダ誘導体などのバクテリオファージ、ＰＢＲ３２２またはｐＵＣのプラスミド誘導体またはＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター（ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ））などのプラスミドを含む（ただし、これらに限定されない）。クローニングベクター中への挿入は、例えば、相補的な付着末端を有するクローニングベクター中へＤＮＡ断片を結合することにより実施できる。しかし、ＤＮＡを断片とするために用いられる相補的な制限部位がクローニングベクター中に存在しない場合、ＤＮＡ分子の末端を酵素で修飾してもよい。あるいは、ＤＮＡ末端にヌクレオチド配列（リンカー）を結合することにより、所望の任意の部位を作製することもできる。これらの結合されるリンカーには、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする、特定の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含めてもよい。別の方法では、切断されたベクターおよびＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子を、ホモポリマー尾付加または適当な配列を含むプライマーによるＰＣＲによって改変してもよい。組み換え分子は、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションなどによって宿主細胞へ導入できる。その結果、遺伝子配列の多くのコピーを生成する。ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１に由来する１個または複数のＣＤＲならびに異なる免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を含む抗体は、例えば、ＣＤＲグラフティング（欧州特許第２３９，４００号；国際公開ＷＯ９１／０９９６７；米国特許第５，２２５，５３９号；米国特許第５，５３０，１０１号；および米国特許第５，５８５，０８９号）、ベニアリング（ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ）またはリサーフェイシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）（欧州特許第５９２，１０６号；欧州特許第５１９，５９６号；Ｐａｄｌａｎ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、１９９１、２８（４／５）：４８９～４９８頁；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら、１９９４、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　７（６）：８０５～８１４頁；Ｒｏｇｕｓｋａら、１９９４、ＰＮＡＳ　９１：９６９～９７３頁）およびチェイン・シャフリング（米国特許第５，５６５，３３２号）を含む当技術分野で知られた様々な技術を用いて製造することができる。

【０１０７】

本発明の好ましい実施形態では、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１核酸、例えばＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の重鎖または軽鎖の可変領域をコードする核酸を、免疫グロブリン発現ベクター中にクローン化することができる。簡単に言えば、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１核酸は、本願明細書に記載する方法のうちの任意の方法によって合成あるいは取得され、好ましくは、側部に適当な制限部位を有し、次いで、免疫グロブリン分子の発現に適するベクター中にクローン化される。例えば、同一枠内に、プロモーターに作動可能に連結される抗体可変領域をクローニングするのに適した免疫グロブリン定常領域および制限部位

をコードする配列、および場合によっては所望の宿主細胞中での発現に有用なシグナル配列を含む多数のベクターが文献に記載されている。この目的のために設計されるベクターの例（ただし、限定的なものではない）は、ＭｃＬｅａｎら、２０００、Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．３７（１４）：８３７～４５頁；Ｌｉａｎｇら、２００１、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４７（１－２）：１１９～３０頁；Ｐｅｒｓｉｃら、１９９７、Ｇｅｎｅ １８７（１）：９～１８頁；Ｓｋｅｒｒａ、１９９４、Ｇｅｎｅ １４１（１）：７９～８４頁；Ｗａｌｌｓら、１９９３、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２１（１２）：２９２１～２９頁；Ｃｏｌｏｍａら、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １５２（１）：８９～１０４頁に記載されている。これらのベクターまたは同様に設計されるベクターは、発現目的用のＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１配列のクローン化に使用することができる。

【０１０８】

別の方法では、所望の遺伝子を、「ショットガン」法において適当なクローニングベクター中に挿入した後に同定し単離してもよい。例えば、クローニングベクターへ挿入前にサイズ分画によって所望の遺伝子の富化を行うことができる。

【０１０９】

特定の実施形態では、単離されたＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子を組み込んだ組み換えＤＮＡ分子、ｃＤＮＡ、または合成ＤＮＡ配列を有する宿主細胞の形質転換体が、遺伝子の複数のコピーの生成を可能にする。したがって、形質転換体を増殖させ、形質転換体から組み換えＤＮＡ分子を分離し、また必要な場合には、単離された組み換えＤＮＡから挿入された遺伝子を回収することにより遺伝子が多量に得られ得る。

【０１１０】

本発明によって提供されるＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１配列は、天然のＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１可変領域に見出されるのと実質的に同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、機能的に等価なアミノ酸をもつアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、ならびに、以下に、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１誘導体または類似体について記載するような他のＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１誘導体または類似体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【０１１１】

５．２ 結合アッセイ

上に記載するように、本発明の方法による免疫学的疾患の治療に有用な抗体を含むタンパク質は、ＣＤ３０に結合し、活性化リンパ球に対し細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼす。タンパク質のＣＤ３０への結合能力を実証する方法は本願明細書に記載する。

【０１１２】

抗体は、当技術分野で知られている任意の方法によってＣＤ３０への免疫特異的な結合についてアッセイを行うことができる。使用することができる免疫アッセイをいくつか挙げると、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集反応アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定法、蛍光免疫測定法、プロテインＡ免疫測定法などを含む競合的および非競合的アッセイシステムが含まれるが、これらに限定されるものではない。これらのアッセイは、当技術分野では日常的に行われるものでよく知られている（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編、１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１、Ｊｏｈｎ ＷｉｌｅｙとＳｏｎｓ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ参照のこと。これは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）。典型的な免疫測定法を以下に簡単に説明するが、これらは発明を限定しようとするものではない。

【０１１３】

免疫沈殿プロトコルは、一般に、タンパク質ホスファターゼおよび／またはプロテアーゼ阻害剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン（ａｐｒｏｔｉｎｉｎ）、バナジン酸ナトリウム）を添加したＲＩＰＡ緩衝液（１％ＮＰ－４０またはトライトンＸ－１０

０、１％デオキシコール酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、０．１５ＭＮａＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）、１％トラシロール（Ｔｒａｓｙｌｏｌ））などの溶解緩衝液で細胞集団を溶解させ、細胞溶解物に抗体を加えて、一定時間（例えば、約１～４時間）４℃でインキュベートし、プロテインＡおよび／またはプロテインＧセファロースビーズを細胞溶解物に加え、約１時間以上４℃でインキュベートし、ビーズを溶解緩衝液で洗浄し、ビーズをＳＤＳ／試料緩衝液中に再懸濁することを含む。抗体がＣＤ３０を免疫沈殿させる能力は、例えば、ウェスタンブロット分析によって評価することができる。当業者は、ＣＤ３０への抗体の結合を増加させ、バックグラウンド（例えば、セファロースビーズを用いる細胞溶解物の予備清浄化）を低減させるために変更できるパラメーターに関してよく知っているであろう。免疫沈殿プロトコルに関するさらなる議論については、例えばＡｕｓｕｂｅｌら編、１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）の１０．１６．１を参照のこと。

【０１１４】

ウェスタンブロット分析は、タンパク質試料を調製し、タンパク質試料をポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じて８％～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥ）中で電気泳動し、タンパク質試料をポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、ＰＶＤＦまたはナイロンなどの薄膜に移し、薄膜をブロッキング溶液（例えば、３％ＢＳＡまたは無脂肪乳を含むＰＢＳ）中でインキュベートし、薄膜を洗浄緩衝液（例えば、ＰＢＳトゥイーン－２０）で洗浄し、薄膜をブロッキング緩衝液で希釈した第１の抗体（つまり、推定される抗ＣＤ３０抗体）でブロットし、薄膜を洗浄緩衝液で洗浄し、ブロッキング緩衝液で希釈した酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼ）または放射性分子（例えば、^{32}Ｐまたは^{125}Ｉ）とコンジュゲートした第２の抗体（これは第１の抗体を認識する。例えば、抗ヒト抗体）と共に薄膜をインキュベートし、薄膜を洗浄緩衝液で洗浄し、第２の抗体の存在を検出することを一般に含む。当業者であれば、検出されるシグナルを増大させ、かつバックグラウンド・ノイズを低減させるために変更できるパラメーターに関してよく知っているであろう。ウェスタンブロットに関するさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編、１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１、（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）の１０．８．１を参照のこと。

【０１１５】

ＥＬＩＳＡは、抗原（すなわち、ＣＤ３０）を調製し、９６穴マイクロタイタープレートのウェルをＣＤ３０でコーティングし、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼ）などの検出可能な化合物にコンジュゲートした抗体をウェルに加えて一定期間インキュベートし、抗体の存在を検出することを含む。ＥＬＩＳＡでは、検出可能な化合物に抗体をコンジュゲートさせなくてもよく、代わりに、検出可能な化合物にコンジュゲートした第２の抗体（それは目的の抗体を認識する）をウェルに加えてもよい。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体をウェルにコーティングしてもよい。この場合、検出可能な化合物にコンジュゲートした第２の抗体を、コーティングを施したウェルへのＣＤ３０タンパク質の添加に続いて加えてもよい。当業者は、検出されるシグナルを増大させるために変更できるパラメーターや当技術分野中で知られているＥＬＩＳＡの他の変法に関してよく知っているであろう。ＥＬＩＳＡに関するさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編、１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１、（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）の１１．２．１を参照のこと。

【０１１６】

ＣＤ３０への抗体の結合親和性および抗体ＣＤ３０相互作用のオフ率(off-rate)は、競合結合アッセイによって決定することができる。競合結合アッセイの１つの例は、標識さ

れていないＣＤ３０の量を増加させて存在させつつ、標識されたＣＤ３０（例えば、^{3}Ｈまたは^{125}Ｉ）を目的の抗体と共にインキュベートし、標識されたＣＤ３０に結合した抗体を検出することを含むラジオイムノアッセイである。次いで、ＣＤ３０に対する抗体の親和性および結合オフ率を、スキャッチャード（Ｓｃａｔｃｈａｒｄ）プロット分析によるデータから求めることができる。第２の抗体（ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１など）との競合もラジオイムノアッセイを使用して決定することができる。この場合、標識されていない第２の抗体の量を増加させて存在させつつ、ＣＤ３０を、標識された化合物（例えば、^{3}Ｈまたは^{125}Ｉ））にコンジュゲートした目的の抗体と共にインキュベートする。あるいはまた、その抗体のＣＤ３０に対する結合親和性ならびに抗体－ＣＤ３０相互作用のオン率(on-rate)およびオフ率は、表面プラズモン共鳴により測定できる。

【０１１７】

本発明の方法において有用なタンパク質は、当技術分野で知られた標準的アッセイによってＣＤ３０へのその結合能力についてアッセイしてもよい。そのようなアッセイには、ファーウェスタンおよび酵母の２ハイブリッドシステムが含まれる。これらのアッセイは、上記５．２節に記載されている。上に記載したファーウェスタン法の別の変法は、ウェスタンブロットにおいて標識された候補タンパク質のＣＤ３０への結合能力の測定を伴う。ファーウェスタンブロットの１つの例（ただし、これに限定されない）では、ＣＤ３０または目的のその断片を、さらにグルタチオン－Ｓ転移酵素（ＧＳＴ）およびプロテインセリン／トレオニンキナーゼ認識部位（ｃＡＭＰ依存性キナーゼ認識部位など）を含む融合タンパク質として発現させる。融合タンパク質はグルタチオン－セファロースビーズ（ファルマシア・バイオテック（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ））で精製し、ウシ心臓キナーゼ（シグマ（Ｓｉｇｍａ））および１００μＣｉの^{32}Ｐ－ＡＴＰ（アマシャム（Ａｍｅｒｓｈａｍ））で標識する。試験対象のタンパク質（複数可）をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、ニトロセルロース薄膜にブロットし、次いで、標識されたＣＤ３０と共にインキュベートする。しかる後、薄膜を洗浄し、放射能量を定量する。反対に、同じ方法で目的タンパク質を標識し、ＣＤ３０をブロットしたニトロセルロース薄膜をプローブするのにこのタンパク質を使用することもできる。

【０１１８】

５．３　ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１に関連する配列

本発明はさらに、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１のＣＤＲに相同な領域、またはそのコード領域をそれぞれ含むタンパク質および核酸の、免疫学的疾患の治療または予防のための使用を包含する。様々な実施形態において、相同性領域は、対応するＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の領域と、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９８％の同一性によって特徴づけられる。

【０１１９】

１つの実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＨｅＦｉ－１のＣＤＲに相同な領域（配列番号２０、配列番号２２；配列番号２４；配列番号２８、配列番号３０または配列番号３２）を有し、但しリンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすタンパク質を投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＡＣ１０のＣＤＲに相同な領域（配列番号４；配列番号６；配列番号８；配列番号１２；配列番号１４；または配列番号１６）を有し、但しリンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすタンパク質を投与することを含む方法を提供する。

【０１２０】

別の実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＨｅＦｉ－１のＣＤＲコード領域に相同な領域（配列番号１９、配

列番号２１、配列番号２３、配列番号２７、配列番号２９または配列番号３１）を有する核酸(但し、この核酸によりコードされるタンパク質がリンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼす。)を投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＡＣ１０のＣＤＲコード領域に相同な領域（配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５）を有する核酸(但し、この核酸によりコードされるタンパク質がリンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼす。)を投与することを含む方法を提供する。

【０１２１】

本発明はさらに、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１の可変領域に相同な領域、またはそのコード領域をそれぞれ含むタンパク質または核酸を、それを必要とする患者に投与することを含む免疫学的疾患の治療または予防方法を包含する。様々な実施形態において、相同性領域は、対応するＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の領域と、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９８％の同一性によって特徴づけられる。

【０１２２】

１つの実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＨｅＦｉ－１の可変領域に相同な領域（配列番号１８または配列番号２６）を有するタンパク質を投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＡＣ１０の可変領域に相同な領域（配列番号２または配列番号１０）を有するタンパク質を投与することを含む方法を提供する。

【０１２３】

１つの実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＨｅＦｉ－１の可変領域コード領域に相同な領域（配列番号１７または配列番号２５）を有する核酸を投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、免疫学的疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする患者に、ＡＣ１０の可変領域コード領域に相同な領域（配列番号１または配列番号９）を有する核酸を投与することを含む方法を提供する。

【０１２４】

例えば、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１可変領域の配列と、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１可変領域と相同な領域をもつ他のタンパク質由来の配列との間で、２つのアミノ酸配列または２つの核酸の％同一性を決定するために、配列を最適比較のためにアライメントをとる（例えば、第２のアミノ酸または核酸配列との最適アライメントのためにギャップを第１のアミノ酸または核酸配列の配列中に導入することができる）。次いで、アミノ酸残基またはヌクレオチドを対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置で比較する。第１の配列中での位置が第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合、分子はその位置で同一であるとする。２つの配列間の％同一性は、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、％同一性＝同一の位置の数／位置の合計数（例えば、オーバーラップする位置）×１００）。１つの実施形態では、２つの配列は同じ長さである。

【０１２５】

２つの配列間の％同一性の決定は数学的なアルゴリズムを使用して行うことができる。２つの配列の比較のために利用される数学的なアルゴリズムの好ましい例（ただし、これに限定されない）は、ＫａｒｌｉｎとＡｌｔｓｃｈｕｌ、１９９０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：２２６４～２２６８頁のアルゴリズム、ＫａｒｌｉｎとＡｌｔｓｃｈｕｌ、１９９３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：５８７３～５８７７頁において修正されたものである。このようなアルゴリズムは、

Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０のＮＢＬＡＳＴとＸＢＬＡＳＴプログラムに組み入れられている。ＳＣＡ－１改変タンパク質をコードする核酸に相同なヌクレオチド配列を得るためには、ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索は、ＮＢＬＡＳＴプログラムで、スコア＝１００、ワード長＝１２で実施できる。ＳＣＡ－１改変タンパク質に相同なアミノ酸配列を得るためには、ＢＬＡＳＴタンパク質検索はＸＢＬＡＳＴプログラムで、スコア＝５０、ワード長＝３で実施できる。比較目的のためギャップ付きアライメントを得るためには、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９～３４０２頁に記載されるようにギャップ付きＢＬＡＳＴを利用することができる。あるいは、ＰＳＩ－Ｂｌａｓｔを使用して、分子間の遠位関係を検出する繰り返し検索を実施することもできる（前掲）。ＢＬＡＳＴ、ギャップ付きＢＬＡＳＴおよびＰＳＩ－ＢＬＡＳＴプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えばＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメーターを使用することができる。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖを参照のこと。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい例（ただし、これに限定されない）は、マイヤーズとミラー（Ｍｙｅｒｓ ＆ Ｍｉｌｌｅｒ）（ＣＡＢＩＯＳ（１９８９））のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、ＧＣＧ配列アライメント用ソフトウエアパッケージの一部であるＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み入れられている。アミノ酸配列の比較をするためにＡＬＩＧＮプログラムを利用する場合、ＰＡＭ１２０重量残基表、ギャップ長ペナルティとして１２およびギャップペナルティとして４を使用できる。配列分析のための追加的アルゴリズムは当技術分野で知られており、ＴｏｒｅｌｌｉｓとＲｏｂｏｔｔｉ、１９９４、Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．、１０：３～５頁に記載されているＡＤＶＡＮＣＥとＡＤＡＭ、およびＰｅａｒｓｏｎとＬｉｐｍａｎ、１９８８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８５：２４４４～８頁に記載されているＦＡＳＴＡが含まれる。ＦＡＳＴＡの内では、ｋｔｕｐは、検索の感度および速度を設定するコントロールオプションである。ｋｔｕｐ＝２の場合、比較されている２つの配列の同様の領域は、アライメントをとった残基の対を見ることにより見つかる。また、ｋｔｕｐ＝１の場合は、単一のアライメントをとったアミノ酸を調べる。ｋｔｕｐはタンパク質配列に対しては２または１に、ＤＮＡ配列に対しては１～６までセットできる。ｋｔｕｐが指定されない場合のデフォルトは、タンパク質に対しては２、ＤＮＡに対しては６である。ＦＡＳＴＡパラメーターのさらなる記載については、ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｗｅｂ．ｐａｓｔｅｕｒ．ｆｒ／ｄｏｃｓ／ｍａｎ／ｍａｎ／ｆａｓｔａ．１．ｈｔｍｌ＃ｓｅｃｔ２を参照のこと（その内容は参照によって本願明細書に組み込まれる）。

【０１２６】

あるいは、タンパク質配列アライメントは、Ｈｉｇｇｉｎｓら．、１９９６、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：３８３～４０２頁に記載されるＣＬＵＳＴＡＬ Ｗアルゴリズムを使用して行ってもよい。

【０１２７】

２つの配列間の％同一性は、ギャップを許容するかまたは許容しないで、上に記載したのと同様な技術を使用して決定することができる。％同一性の計算では、正確な一致だけをカウントする。

【０１２８】

５．４ 本発明のタンパク質生産方法

本発明の方法において有用な抗体を含むタンパク質は、タンパク質合成の技術分野で知られている任意の方法によって、特に化学合成法、または好ましくは組み換え発現技術によって生産することができる。

【０１２９】

ＣＤ３０に結合し、リンパ球中のＣＤ３０シグナル伝達を誘導し、かつ／または活性化リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼすタンパク質の組み換え発現には、そうしたタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターの構築が必要である。そのよ

うなタンパク質をコードする核酸を得た後、タンパク質分子の産生のためのベクターは、当技術分野においてよく知られている組み換えＤＮＡ技術によって産生され得る。したがって、前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を発現させることによりタンパク質を製造する方法が本願明細書に記載される。当業者によく知られている方法を用いて、コード配列ならびに適当な転写および翻訳の制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの組み換えＤＮＡ技術、合成技術およびｉｎ　ｖｉｖｏでの遺伝子組換えが含まれる。

【０１３０】

したがって、本発明は、作動可能にプロモーターに連結された本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。ここで、タンパク質は抗体であり、そのヌクレオチド配列は、その重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、を作動可能にプロモーターに連結しコードすることができる。そのようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含み（例えば、国際公開ＷＯ８６／０５８０７；国際公開ＷＯ８９／０１０３６；および米国特許第５，１２２，４６４号参照）、重鎖または軽鎖全体の発現のため、抗体の可変領域をそのようなベクター中にクローン化してもよい。

【０１３１】

発現ベクターは慣用の技術によって宿主細胞に移入され、次いで、形質導入細胞は慣用の技術によって培養されて、本発明のタンパク質を生産する。したがって、本発明は、異種のプロモーターに作動可能に連結された、本発明のタンパク質をコードする核酸を含む宿主細胞を包含する。２本鎖抗体の発現のための好ましい実施形態では、下に詳述するように、重・軽鎖の両方をコードするベクターを免疫グロブリン分子全体の発現のための宿主細胞中で同時発現させてもよい。

【０１３２】

本発明のタンパク質分子を発現するためには様々な宿主-発現ベクター系が利用できる。そのような宿主-発現系は、目的のコード配列を生産し、続いて精製し得るようなベヒクル（ｖｅｈｉｃｌｅｓ）を表わすが、また、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされた時、ｉｎ　ｓｉｔｕで本発明のタンパク質を発現することができる細胞を表わす。これらは、抗体をコードする配列を含む、組み換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ））；抗体をコードする配列を含む組み換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えばサッカロミセス、ピチア（Ｐｉｃｈｉａ））などの微生物；抗体をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染された昆虫細胞系；抗体をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）に感染されたか、または組み換えプラスミド発現ベクター（例えばＴｉプラスミド）で形質転換された植物細胞系；または哺乳類細胞ゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルスの後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）を含む組み換え発現構築物を有する哺乳類細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、３Ｔ３細胞）を含む（ただし、これらに限定されない）。好ましくは、大腸菌などの細菌細胞、また特に全組み換え抗体分子の発現のためにより好ましくは、真核細胞を本発明の組み換えタンパク質の発現のために使用する。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）のような哺乳類細胞を、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間期初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと共に用いるのがタンパク質についての有効な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇら、１９８６、Ｇｅｎｅ　４５：１０１；Ｃｏｃｋｅｔｔら、１９９０、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：２）。

【０１３３】

細菌の系では、目的とする用途に応じて、タンパク質が発現するために必要なフォール

ディングおよび翻訳後修飾の必要条件に応じて多数の発現ベクターを有利に選択できる。可能であれば、そのようなタンパク質を本発明のタンパク質を含む医薬組成物の製造のために大量に生産しようとする場合は、容易に精製し得る融合タンパク質産物を高レベルで発現させるベクターが望ましいであろう。そのようなベクターには、大腸菌発現ベクターｐＵＲ２７８（Ｒｕｓｈｅｒら、１９８３、ＥＭＢＯ １．２：１７９１）（この場合、融合タンパク質が生産されるように、同一枠内にｌａｃ Ｚコード領域をもつベクター中に抗体コード配列を個別に結合してもよい）；ｐＩＮベクター（Ｉｎｏｕｙｅ ＆ Ｉｎｏｕｙｅ、１９８５、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：３１０１～３１０９頁；Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ ＆ Ｓｃｈｕｓｔｅｒ、１９８９、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４：５５０３～５５０９頁）などが含まれるが、これらに限定されない。ｐＧＥＸベクターも、グルタチオンＳ－転移酵素（ＧＳＴ）を有する融合タンパク質を発現するのに使用できる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、溶解した細胞から吸着およびマトリックスグルタチオンアガロースビーズへの結合後、遊離グルタチオンの存在下で溶離することにより容易に精製することができる。ｐＧＥＸベクターは、ＧＳＴ部分からクローン化標的遺伝子産物が放出され得るようにトロンビンまたは因子Ｘａプロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【０１３４】

昆虫系では、オートグラファ・カリフォルニカ（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）を、外来遺伝子を発現するベクターとして使用する。ウイルスはスポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞中で増殖する。抗体をコードする配列は、ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）中に個別にクローン化し、ＡｃＮＰＶプロモーター（例えば、ポリヘドリン・プロモーター）の制御下に置くことができる。

【０１３５】

哺乳類宿主細胞では、多数のウイルス系発現系が利用できる。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、本発明のタンパク質のコード配列をアデノウイルス転写／翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーターおよび三分（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ）リーダー配列）に結合することができる。次いで、このキメラ遺伝子をｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏの組み換えによってアデノウイルスゲノムに挿入すればよい。ウイルスのゲノムの非必須領域（例えば、領域Ｅ１またはＥ３）中への挿入により、生存可能で、感染した宿主中で本発明のタンパク質の発現を可能にする組み換えウイルスが得られる（例えば、Ｌｏｇａｎ ＆ Ｓｈｅｎｋ、１９８４、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３５５～３５９頁参照）。挿入されたコード配列の有効な翻訳のためには特異的な開始シグナルも必要になる場合がある。これらのシグナルはＡＴＧ開始コドンおよび隣接した配列を含む。さらに、インサート全体の翻訳を確実にするために所望のコード配列のリーディングフレームと読み枠が合っていなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然物および合成物を含む様々な起源のものでよい。発現効率は、適当な転写エンハンサー・エレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって増強できる（Ｂｉｔｔｎｅｒら、１９８７、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１～５４４頁参照）。

【０１３６】

さらに、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調整するか、または、望ましい具体的態様で遺伝子産物を修飾し処理するものを選択することができる。そのような修飾（例えば、グリコシル化）およびタンパク質産物のプロセシング（例えば、切断）は、本発明のタンパク質の機能にとって重要な場合もある。様々な宿主細胞が、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾といった特性および特定のメカニズムを有する。発現された外来タンパク質の正確な修飾およびプロセシングを確実にするために適当な細胞系統または宿主系を選ぶことができる。この目的のために、遺伝子産物の１次転写体の適切なプロセシング、グリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用できる。そのような哺乳類の宿主細胞には、ＣＨＯ、ＶＥＲＯ、ＢＨＫ、ＨｅＬ

ａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、２９３、３Ｔ３およびＷ１３８が含まれるがこれらに限定されない。

【０１３７】

ＣＤ３０に結合し、また活性化リンパ球に対する細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼす組み換えタンパク質の長期的な高収率生産のためには、安定した発現が好ましい。例えば、安定してタンパク質を発現する細胞系統を遺伝子操作で作製し得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するのではなく、宿主細胞は、適当な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化サイトなど）によって調節されるＤＮＡおよび選択可能なマーカーで形質転換できる。組み換え操作された細胞は、外来ＤＮＡの導入に続いて、富栄養培地中で１～２日間増殖させ、次いで、選択培地に切り替える。組み換えプラスミド中の選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がその染色体にプラスミドを安定的に組み込み、増殖巣を形成する。次いで、これをクローニングし、細胞系統に増殖することができる。この方法は、本発明のタンパク質を発現する細胞系統を作製するのに有利に用いることができる。

【０１３８】

以下のものを含む（ただし、これに限定されない）多くの選択系が使用できるが、単純疱疹ウイルス・チミジン・キナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒら、１９７７、Ｃｅｌｌ １１：２２３）、ハイポキサンチングアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ ＆ Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ４８：２０２）およびアデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙら、１９８０、Ｃｅｌｌ ２２：８～１７頁）遺伝子は、ｔｋ－、ｈｇｐｒｔ－またはａｐｒｔ－細胞中でそれぞれ使用できる。また、以下の遺伝子の選択の基準として代謝拮抗剤耐性を使用することができる。遺伝子は、次のものである。ｄｈｆｒ、これはメトトレキサート耐性を付与する（Ｗｉｇｌｅｒら、１９８０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：３５７；Ｏ’Ｈａｒｅら、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：１５２７）；ｇｐｔ、これはミコフェノール酸耐性を付与する（Ｍｕｌｌｉｇａｎ ＆ Ｂｅｒｇ、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：２０７２）；ｎｅｏ、これはアミノグリコシドＧ－４１８耐性を付与する（Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｙ １２：４８８～５０５頁；ＷｕとＷｕ、１９９１、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７～９５頁；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ、１９９３、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３～５９６頁；Ｍｕｌｌｉｇａｎ、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：９２６～９３２頁；およびＭｏｒｇａｎとＡｎｄｅｒｓｏｎ、１９９３、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１～２１７頁；Ｍａｙ、１９９３、ＴＩＢ ＴＥＣＨ１１（５）：１５５～２１５頁）；およびｈｙｇｒｏ、これはハイグロマイシン耐性を付与する（Ｓａｎｔｅｒｒｅら、１９８４、Ｇｅｎｅ ３０：１４７）。組み換えＤＮＡ技術の技術分野において一般に知られている方法を、所望の組み換えクローンを選択するために慣用されているように適用してもよい。そのような方法は、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ、Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ（１９９０）；およびＣｈａｐｔｅｒｓ １２ ａｎｄ １３、Ｄｒａｃｏｐｏｌｉら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎら、１９８１、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１に記載されており、これらの全体は参照によって本願明細書に組み込まれる。

【０１３９】

本発明のタンパク質の発現レベルはベクター増幅（総説として、ＢｅｂｂｉｎｇｔｏｎとＨｅｎｔｓｃｈｅｌ、「Ｔｈｅ Ｕｓｅ ｏｆ Ｖｅｃｔｏｒｓ Ｂａｓｅｄ ｏｎ Ｇｅｎｅ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ

Ｃｌｏｎｅｄ Ｇｅｎｅｓ ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ ｉｎ ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ」、Ｖｏｌ．３．（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９８７）参照）により増大させることができる。抗体を発現するベクター系中でマーカーが増幅可能な場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤レベルの増大は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加させるであろう。増幅された領域は抗体遺伝子を結合いているので、本発明のタンパク質の生産はさらに増加するであろう（Ｃｒｏｕｓｅら、１９８３、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２５７）。

【０１４０】

本発明のタンパク質が抗体である場合、宿主細胞は本発明の２つの発現ベクター、すなわち、重鎖由来のタンパク質をコードする第１のベクター、および軽鎖由来のタンパク質をコードする第２のベクターで同時にトランスフェクトしてもよい。２つのベクターは同一の選択可能なマーカーを含むことができ、これにより、重鎖タンパク質および軽鎖タンパク質の等しい発現が可能になる。あるいは、重鎖タンパク質および軽鎖タンパク質の両方をコードし、発現することができる単一のベクターを使用してもよい。こうした場合、有害な遊離重鎖が過剰にならないように、軽鎖は、重鎖の前に配置すべきである（Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ、１９８６、Ｎａｔｕｒｅ ３２２：５２、Ｋｏｈｌｅｒ、１９８０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：２１９７）。重・軽鎖のためのコード配列はｃＤＮＡまたはゲノムのＤＮＡを含んでもよい。

【０１４１】

本発明のタンパク質分子は、動物によって産生されるか、化学的に合成され、または組み換えにより発現される場合は、それは、タンパク質の精製用の当技術分野で既知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特に特定の抗原への親和性、プロテインＡ（抗体分子に対し、またはタンパク質が融合タンパク質である異種の融合パートナーへの親和性および分子ふるいカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製のための他の標準的技術によって精製することができる。

【０１４２】

本発明は、融合タンパク質（すなわち、（好ましくは、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０または少なくとも１００個のアミノ酸の）異種タンパク質に組み換えにより融合させたか化学的にコンジュゲート（共有結合によるコンジュゲーションも共有結合でない結合によるコンジュゲーションも含む）したタンパク質）である本発明のタンパク質の使用を包含する。その融合は必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して起こるものでもよい。

【０１４３】

本発明は、可変領域以外の抗体ドメインを融合またはコンジュゲートさせた本発明のタンパク質を含む組成物をさらに含む。例えば、本発明のタンパク質は、抗体Ｆｃ領域またはその部分に融合またはコンジュゲートすることができる。本発明のタンパク質に融合する抗体部分は、定常領域、ヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＲ２ドメインおよびＣＨ３ドメインまたはこれらの全ドメインもしくはその部分の任意の組合せとすることができる。前記抗体部分にタンパク質をさらに融合またはコンジュゲートして多量体としてもよい。例えば、本発明のタンパク質に融合したＦｃ部分は、Ｆｃ部分間のジスルフィド結合によって二量体を形成することができる。より多量化した形態は、ＩｇＡとＩｇＭの部分にタンパク質を融合させることにより作ることができる。本発明のタンパク質を抗体部分に融合させるかコンジュゲートさせる方法は、当技術分野で知られている。例えば米国特許第５，３３６，６０３号；米国特許第５，６２２，９２９号；米国特許第５，３５９，０４６号；米国特許第５，３４９，０５３号；米国特許第５，４４７，８５１号；米国特許第５，１１２，９４６号；ＥＰ３０７，４３４；ＥＰ３６７，１６６；国際公開ＷＯ９６／０４３８８；ＷＯ９１／０６５７０；Ａｓｈｋｅｎａｚｉら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１０５３５～１０５３９頁；Ｚｈｅｎｇら、１９９５、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４：５５９０～５６００頁；およびＶｉｌら、１９９２

、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１１３３７～１１３４１頁参照（参照によって本明細書にこれらの全体が組み込まれる）。

【０１４４】

５．５　コンジュゲートおよび融合タンパク質

上記で述べたように、本発明の免疫学的疾患の治療および予防方法は、ＣＤ３０に結合し活性化リンパ球に対し細胞静止作用および／または細胞傷害作用を及ぼし、さらに異種起源のタンパク質または細胞傷害性薬剤に融合またはコンジュゲートしたタンパク質の使用を包含する。

【０１４５】

したがって、本発明は、本発明のタンパク質または核酸の投与による免疫学的疾患の治療または予防方法を提供する。発明のある実施形態では、本発明のタンパク質または核酸は、その細胞傷害性および／または細胞静止性を改善するために化学的に改変されていてもよい。例えば、本発明のタンパク質はコンジュゲートとして投与することができる。本発明のタンパク質への結合のために特に適するものは、化学療法剤、プロドラッグ変換酵素、放射性同位体もしくは化合物または毒素である。

【０１４６】

１つの実施形態では、精製を容易にするために、本発明のタンパク質をペプチドなどのマーカー配列に融合させる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、ｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．、９２５９　Ｅｔｏｎ　Ａｖｅｎｕｅ、Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、ＣＡ、９１３１１）中で提供されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドであり、それらの多くは市販されている。例えば、Ｇｅｎｔｚら、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８２１～８２４頁に記載されているように、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の精製に都合がよい。精製に有用な他のペプチドタグは、「ＨＡ」タグ（それはインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに相当する）（Ｗｉｌｓｏｎら、１９８４、Ｃｅｌｌ　３７：７６７）および「フラグ」タグを含むがこれに限定されない。このような融合タンパク質は当業者に知られた標準的組み換え方法によって作製することができる。

【０１４７】

別の実施形態では、本発明のタンパク質が治療剤に融合またはコンジュゲートされる。例えば、本発明のタンパク質は化学療法剤（５．６節を参照）、毒素（例えば、細胞静止剤または殺細胞剤）または放射性核種（例えば、^{212}Ｂｉ、^{211}Ａｔなどのα エミッター、^{131}Ｉ、^{90}Ｙまたは^{67}Ｃｕなどのβ エミッター）などの細胞傷害性薬剤にコンジュゲートしてもよい。本発明の抗ＣＤ３０分子をコンジュゲートするのに有用な追加剤の例を５．１２．１節に示す。

【０１４８】

本発明の方法において有用な、抗ＣＤ３０抗体の治療効果の増強のために使用される本発明のコンジュゲートは、毒素などの非古典治療剤を含む。そのような毒素には、アブリン（ａｂｒｉｎ）、リシンＡ、シュードモナス菌体外毒素またはジフテリア毒素が含まれるが、これらに限定されない。

【０１４９】

あるいは、本発明の抗体は、シーガル（Ｓｅｇａｌ）によって米国特許第４，６７６，９８０号（それは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）に記載されているように、抗体ヘテロコンジュゲートを形成する第２の抗体にコンジュゲートすることができる。本発明を実施するのに有用なヘテロコンジュゲート類は、ＣＤ３０に結合する抗体または抗体の一部（モノクローナル抗体Ｋｉ－２、Ｋｉ－４、Ｋｉ－５、Ｋｉ－７、Ｂｅｒ－Ｈ２、ＨＲＳ－１、ＨＲＳ－４、Ｋｉ－１、Ｋｉ－６、Ｍ６７、Ｋｉ－３、Ｍ４４、ＨｅＦｉ－１およびＡＣ１０のＣＤＲおよび／または重鎖を有する抗体を含むが、これらに限定されない）および、リンパ球表面受容体または受容体複合体（免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチン（Ｃ

－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプ）または補体制御タンパク質など）に結合する抗体または抗体の一部である。こうした分子の例およびヘテロコンジュゲートを作るのに使用できるこのような分子に対する抗体は、下記の５．１２．２節で示す。

【０１５０】

上記で述べたように、本発明のある実施形態では、本発明のタンパク質をプロドラッグ変換酵素と同時投与することができる。プロドラッグ変換酵素は、本発明のタンパク質に融合またはコンジュゲートした融合タンパク質として発現することができる。プロドラッグ変換酵素の例はカルボキシペプチダーゼＧ２、ベータグルクロニダーゼ、ペニシリン－Ｖ－アミダーゼ、ペニシリン－Ｇ－アミダーゼ、β－ラクタマーゼ、β－グルコシダーゼ、ニトロレダクターゼおよびカルボキシペプチダーゼＡである。

【０１５１】

５．６　抗体－薬剤コンジュゲート

本発明は、免疫学的疾患の治療または予防のための抗ＣＤ３０抗体－薬剤コンジュゲート（抗ＣＤ３０ＡＤＣ）の使用を包含する。本発明のＡＤＣは、ＣＤ３０発現細胞がかかわる免疫疾患に罹患した患者に投与したとき（好ましくは単独投与であるが他の治療剤との組合せてもよい）、ＣＤ３０発現細胞に対する臨床的に有益な細胞傷害作用または細胞静止作用を生じるように製造される。

【０１５２】

タンパク質、特に抗体に、そのような薬剤をコンジュゲートするための技術はよく知られている。例えば、Ａｒｎｏｎら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」、ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｒｅｉｓｆｅｌｄら（編）、２４３～５６頁（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．、１９８５）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」、ｉｎ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（２版）、Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（編）、６２３～５３頁（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．、１９８７）；Ｔｈｏｒｐｅ、「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ」、ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編）、４７５～５０６頁（１９８５）；「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」、ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｂａｌｄｗｉｎら（編）、３０３～１６頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）およびＴｈｏｒｐｅら、１９８２、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．６２：１１９～５８頁を参照のこと。

【０１５３】

本発明の治療方法が対象として包含する疾患状態の多くでは、相当量の可溶性ＣＤ３０が活性化リンパ球から流出しているので、薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤または免疫抑制剤）またはプロドラッグ変換酵素にコンジュゲートする抗ＣＤ３０抗体を使用する際には、薬剤またはプロドラッグ変換酵素は、可溶性ＣＤ３０が見出される身体中の任意の場所ではなく、活性化リンパ球の近傍において活性であることが好ましい。

【０１５４】

本発明の抗ＣＤ３０抗体によって標的とされる、活性化リンパ球の外部での薬剤活性を最小限にするために、２つのアプローチを取ることができる。第１は、細胞膜に結合するが可溶性ＣＤ３０には結合しない抗体を使用し、その結果、薬剤（プロドラッグ変換酵素の作用によって生産された薬剤を含む）は、活性化リンパ球の細胞表面に集中する。本発明の抗体に結合する薬剤の活性を最小限にするためのより好ましいアプローチは、それらが抗体から加水分解されたり切断されたりしない限り、それらの活性が低減されるように

薬剤をコンジュゲートさせることである。そのような方法は、活性化リンパ球の細胞表面の環境（例えば、活性化リンパ球の細胞表面に存在するプロテアーゼの活性）またはそれが活性化リンパ球に取り込まれた場合、コンジュゲートが遭遇する活性化リンパ球の内部の環境（例えば、エンドソーム内または、例えば、リソソーム環境内のｐＨ感度もしくはプロテアーゼ感度によって）に敏感なリンカーを用いて抗体に薬剤を結合する方法を用いることであろう。

【０１５５】

１つの実施形態では、リンカーは、酸に不安定でリソソーム内で加水分解されるヒドラゾンまたはヒドラジド基である（例えば米国特許第５，６２２，９２９号参照）。別の実施形態では、薬剤はシス－アコニチン酸アミド類、オルトエーテル類、アセタール類およびケタール類などの、酸に不安定な他のリンカーを介して抗ＣＤ３０抗体に結合される（ＤｕｂｏｗｃｈｉｋとＷａｌｋｅｒ、１９９９、Ｐｈａｒｍ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ８３：６７～１２３頁；Ｎｅｖｉｌｌｅら、１９８９、Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：１４６５３～１４６６１頁）。そのようなリンカーは、血液中のもののような中性ｐＨ条件下で比較的安定しているが、ｐＨ５（リソソームのｐＨ近く）以下で不安定である。

【０１５６】

他の実施形態では、薬剤は細胞内のプロテアーゼによって切断されるペプチドスペーサーを使用して、本発明の抗ＣＤ３０抗体に結合させる。標的酵素には、カテプシンＢおよびＤおよびプラスミンが含まれ、それらのすべてはジペプチド薬剤誘導体を加水分解することが知られており、標的細胞の内部の活性な薬剤の放出をもたらす（ＤｕｂｏｗｃｈｉｋとＷａｌｋｅｒ、１９９９、Ｐｈａｒｍ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ８３：６７～１２３頁）。細胞内でのタンパク質分解的薬剤放出を使用する利点は、コンジュゲートした時、薬剤が大幅に弱減され、コンジュゲートの血清安定性が非常に高くなり得るという点である。

【０１５７】

さらに他の実施形態では、リンカーはマロン酸リンカー（Ｊｏｈｎｓｏｎら、１９９５、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１５：１３８７～９３頁）、マレイミドベンゾイルリンカー（Ｌａｕら、１９９５、Ｂｉｏｏｒｇ－Ｍｅｄ－Ｃｈｅｍ．３（１０）：１２９９～１３０４頁）または３’－Ｎ－アミド類似体（Ｌａｕら、１９９５、Ｂｉｏｏｒｇ－Ｍｅｄ－Ｃｈｅｍ．３（１０）：１３０５～１２頁）である。

【０１５８】

本発明の抗ＣＤ３０抗体へのコンジュゲーションに使用される薬剤は、ドキソルビシン、パクリタキセル、メルファラン、ビンカアルカロイド、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、エトポシドなどの慣用の化学療法剤を含むことができる。さらに、ＣＣ－１０６５類似体、カリチアミシン（ｃａｌｉｃｈｉａｍｉｃｉｎ）、メイタンシン、ドラスタチン１０の類似体、リゾキシン（ｒｈｉｚｏｘｉｎ）およびパリトキシンなどの有効な薬剤を、条件によっては安定したリンカーを使用して、抗ＣＤ３０抗体に連結させて有効なイムノコンジュゲートを形成することができる。本発明の抗ＣＤ３０抗体へのコンジュゲーション用の他の適当な薬剤の例は、下記５．１２．１節に示す。

【０１５９】

５．６．１ リンカー

上記５．６節で述べたように、一般に、ＡＤＣは、リンカーを介して抗体に薬剤をコンジュゲートさせることにより作られる。したがって、本発明のＡＤＣの大多数（それは抗ＣＤ３０抗体および高効力薬剤および／またはインターナリゼーション促進薬を含む）は、さらにリンカーを含む。当技術分野で知られているどのようなリンカーも本発明のＡＤＣで用いることができる（例えば、二官能性剤（ジアルデヒド類またはイミドエステル類など）または分岐ヒドラゾンリンカー（例えば、米国特許第５，８２４，８０５号参照。これは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる））。

【０１６０】

本発明のある実施形態（ただし、これに限定されない）では、薬剤部分と抗ＣＤ３０

ＡＤＣの抗体部分との間のリンカー領域はある条件下で切断可能かまたは加水分解可能であり、リンカーの切断または加水分解によって抗体部分から薬剤部分が放出される。好ましくは、リンカーは細胞内条件下で切断または加水分解を受けやすい。

【０１６１】

好ましい実施形態では、抗ＣＤ３０　ＡＤＣの薬剤部分と抗体部分の間のリンカー領域は、ｐＨがある値だけ変化するか、またはある値を超えると加水分解し得る。本発明の特に好ましい実施形態では、リンカーはリソソーム環境、例えば、酸性条件（すなわち、約５～５．５以下のｐＨ）の下において加水分解され得る。他の実施形態では、リンカーは、ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素（リソソームのプロテアーゼ酵素、膜結合プロテアーゼ、細胞内プロテアーゼまたはエンドソームのプロテアーゼを含むが、これらに限定されない）によって切断されるペプチジルリンカーである。好ましくは、リンカーは少なくとも２アミノ酸長であり、より好ましくは少なくとも３アミノ酸長である。ＣＤ３０発現癌中に存在する酵素によって切断され得るペプチジルリンカーが好ましい。例えば、カテプシン－Ｂ（例えばＧｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙリンカー）（癌の組織で高度に発現されるチオール依存性プロテアーゼ）によって切断され得るペプチジルリンカーを使用することができる。他のそのようなリンカーは、例えば、米国特許第６，２１４，３４５号（それは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）中に記載されている。

【０１６２】

他の相互に非排他的な本発明の実施形態において、本発明のＡＤＣの抗ＣＤ３０抗体および薬剤をコンジュゲートするリンカーは、細胞インターナリゼーションを促進する。ある実施形態では、ＡＤＣのリンカー－薬剤部分が細胞インターナリゼーションを促進する。ある実施形態では、リンカーは、全ＡＤＣの構造が細胞インターナリゼーションを促進するように選択される。

【０１６３】

本発明の特定の実施形態では、バリン－シトルリンの誘導体をリンカー（ｖａｌ－ｃｉｔリンカー）として使用する。ｖａｌ－ｃｉｔリンカーを有するドキソルビシンの合成は、以前に記載されている（ＤｕｂｏｗｃｈｉｋとＦｉｒｅｓｔｏｎｅの米国特許第６，２１４，３４５号（それは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる））。

【０１６４】

別の特定の実施形態では、リンカーはｐｈｅ－ｌｙｓリンカーである。

【０１６５】

別の特定の実施形態では、リンカーはチオエーテル・リンカーである（例えば、Ｗｉｌｎｅｒらに対する米国特許第５，６２２，９２９号参照（それは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）。

【０１６６】

さらに別の特定の実施形態では、リンカーはヒドラゾンリンカー（例えば、Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄらに対する米国特許第５，１２２，３６８号、およびＫｉｎｇらに対する米国特許第５，８２４，８０５号参照（それらは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）。

【０１６７】

さらに他の特定の実施形態では、リンカーはジスルフィドリンカーである。多様なジスルフィドリンカーが当技術分野で知られており、その中には、ＳＡＴＡ（Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－アセチルチオアセテート）、ＳＰＤＰ（Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート）、ＳＰＤＢ（Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）ブチレートおよびＳＭＰＴ（Ｎ－スクシンイミジル－オキシカルボニル－アルファ－メチル－アルファ－（２－ピリジルジチオ）トルエン）を使用して形成することができるものが含まれる（ただし、これらに限定されない）。ＳＰＤＢおよびＳＭＰＴ（例えば、Ｔｈｏｒｐｅら、１９８７、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、４７：５９２４～５９３１頁；Ｗａｗｒｚｙｎｃｚａｋら、１９８７、Ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ　ｉｎ　Ｒａｄｉｏｉｍａｇｅｒｙ　ａｎｄ

Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ、Ｃ．Ｗ．Ｖｏｇｅｌ編、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕ．Ｐｒｅｓｓ、２８～５５頁を参照のこと。また、Ｔｈｏｒｐｅらに対する米国特許第４，８８０，９３５号を参照のこと。それらは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる。）

本発明の組成物および方法と共に使用することができる様々なリンカーは、「Ｄｒｕｇ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｕｓｅ ｆｏｒ ｔｒｅａｔｉｎｇ ｃａｎｃｅｒ，ａｎ ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ ｄｉｓｅａｓｅ ｏｒ ａｎ ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ ｄｉｓｅａｓｅ」と題する米国仮出願第６０／４００，４０３号（発明者：Ｐｅｔｅｒ Ｄ．Ｓｅｎｔｅｒ，Ｓｖｅｔｌａｎａ ＤｏｒｏｎｉｎａおよびＢｒｉａｎ Ｅ．Ｔｏｋｉ、出願日：２００２年７月３１日）に記載されており、これは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる。

【０１６８】

さらに別の本発明の実施形態においては、抗ＣＤ３０抗体－リンカー薬剤コンジュゲート（抗ＣＤ３０ＡＤＣ）のリンカーユニットが、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤（薬剤ユニット；－Ｄ）と抗ＣＤ３０抗体ユニット（－Ａ）を連結する。本明細書で使用する場合、抗ＣＤ３０ ＡＤＣという用語は、リンカーユニットの有無を問わず抗ＣＤ３０抗体薬剤コンジュゲートを包含する。リンカーユニットは以下の一般式を有する：

$$-T_a-W_w-Y_y-$$

（ここで、

－Ｔ－はストレッチャーユニットであり；

ａは０または１であり；

各－Ｗ－は独立してアミノ酸ユニットであり；

ｗは独立して２～１２の範囲の整数であり；

－Ｙ－はスペーサーユニットであり；

ｙは０、１または２である。）

【０１６９】

５．６．１．１ ストレッチャーユニット

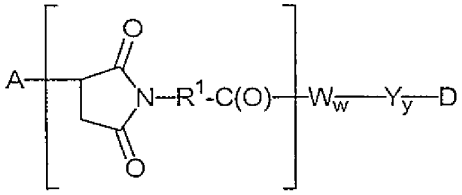
ストレッチャーユニット（－Ｔ－）は、存在する場合、アミノ酸ユニット（－Ｗ－）に対して抗ＣＤ３０抗体ユニットを連結する。抗ＣＤ３０抗体上に存在することができる有用な官能基は、天然または化学的操作によるものを含み、スルフヒドリル、アミノ、水酸基、炭水化物のアノマー性水酸基およびカルボキシルを含む（ただし、これらに限定されない）。好ましい官能基はスルフヒドリルおよびアミノである。抗ＣＤ３０抗体の分子内ジスルフィド結合の還元により、スルフヒドリル基を生成することができる。あるいは、スルフヒドリル基は、抗ＣＤ３０抗体のリジン部分のアミノ基と２－イミノチオラン（Ｔｒａｕｔ試薬）または他のスルフヒドリル生成試薬との反応によって生成することができる。特定の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体は組み換え型の抗体であり、１つまたは複数のリジンを有するように組み換え操作される。他の実施形態では、抗ＣＤ３０抗体はさらにスルフヒドリル基、例えば追加のシステインを有するように組み換え操作される。

【０１７０】

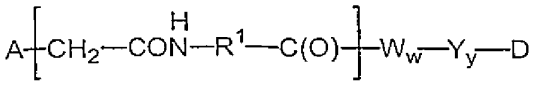
ある特定の実施形態では、ストレッチャーユニットは、抗ＣＤ３０抗体ユニットの硫黄原子との結合を形成する。硫黄原子は、還元された抗ＣＤ３０抗体（Ａ）のスルフヒドリル（ＳＨ）基に由来し得る。これらの実施形態の代表的なストレッチャーユニットは、式（Ｉａ）および（Ｉｂ；下記）の角括弧内に示され、ここで、Ａ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは、上に定義した通りであり、R^1は－C_1－C_{10}アルキレン－、－C_3－C_8カルボシクロ－、－Ｏ－（C_1－C_8アルキル）－、－アリーレン－、－C_1－C_{10}アルキレン－アリーレン－、－アリーレン－C_1－C_{10}アルキレン－、－C_1－C_{10}アルキレン－（C_3－C_8カルボシクロ）－、－（C_3－C_8カルボシクロ）－C_1－C_{10}アルキレン－、－C_3－C_8ヘテロシクロ－、－C_1－C_{10}アルキレン－（C_3－C_8ヘテロシクロ）－、－（C_3－C_8ヘテロシクロ）－C_1－C_{10}アルキレン－、－（CH_2CH_2O）$_r$－、および－（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－から選択され

；また、ｒは１～１０の範囲の整数である。

【化５】



(Ia)

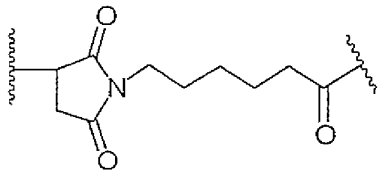


(Ib)

【０１７１】

例示的なストレッチャーユニットは式（Ｉａ）においてＲ^{1}が－（ＣＨ$_{2}$）$_{5}$－の次式である。

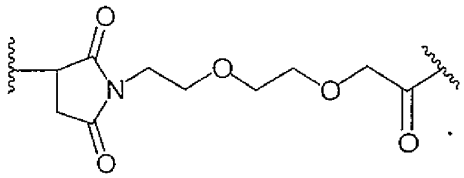
【化６】



【０１７２】

別の例示的なストレッチャーユニットは式（Ｉａ）においてＲ^{1}が－（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｏ）$_{r}$－ＣＨ$_{2}$－であり、ｒが２の次式である。

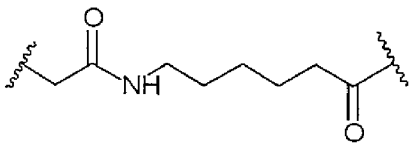
【化７】



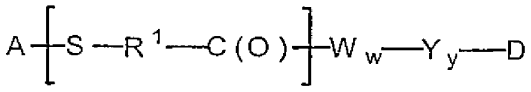
【０１７３】

さらに別の例示的なストレッチャーユニットは式（Ｉｂ）においてＲ^{1}が－（ＣＨ$_{2}$）$_{5}$－の次式である。

【化８】

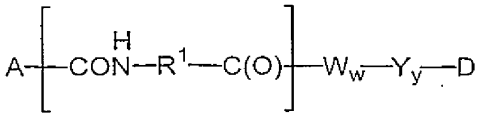


【０１７４】
ある他の特定の実施形態では、ストレッチャーユニットは、抗ＣＤ３０の抗体ユニットの硫黄原子とストレッチャーユニットの硫黄原子との間のジスルフィド結合によって抗ＣＤ３０抗体ユニット（Ａ）に連結される。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは式（ＩＩ）の角括弧内に示され、ここで、R^1、Ａ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは、上に定義した通りである。
【化９】

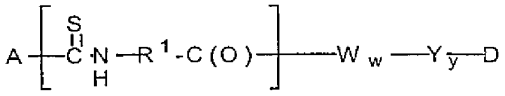


(II)

【０１７５】
さらに別の特定の実施形態では、ストレッチャーの反応性基は、抗ＣＤ３０抗体のアミノ基に反応し得る反応性部位を含む。アミノ基はアルギニンまたはリジンのそれであり得る。反応性部位が含む適当なアミンには、スクシンイミドエステル、４－ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、スルフォニルクロリド、イソシアネートおよびイソチオシアネートのような活性化エステルが含まれる（ただし、これらに限定されない）。これらの実施形態の代表的なストレッチャーユニットは式（ＩＩＩａ）および（ＩＩＩｂ）の角括弧内に示され、ここで、R^1、Ａ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは、上に定義した通りである。
【化１０】



(IIIa)

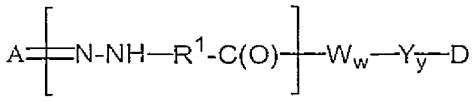


(IIIb)

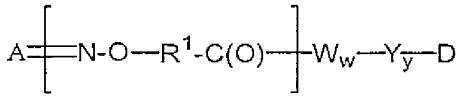
【０１７６】
さらに別の本発明の態様では、ストレッチャーの反応性官能基は、抗ＣＤ３０抗体上に存在し得る改変された炭水化物基に反応的な反応性部位を含む。特定の実施形態において、抗ＣＤ３０抗体は酵素によってグリコシル化されて炭水化物部分を生じる。炭水化物は過ヨウ素酸ナトリウムなどの試薬で穏やかに酸化され、酸化された炭水化物に生じたカルボニルユニットは、ヒドラジド、オキシム、反応性アミン、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびＫａｎｅｋｏ，Ｔ．ら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ　１９９１、２、１３３－４１に記載されるようなアリールヒドラジド

などの官能性を含むストレッチャーと縮合され得る。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは式（ＩＶａ）～（ＩＶｃ）の角括弧内に示され、ここで、Ｒ^{1}、Ａ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは、上に定義した通りである。

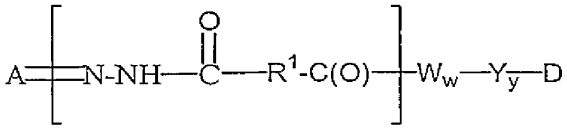
【化１１】



(IVa)



(IVb)



(IVc)

【０１７７】

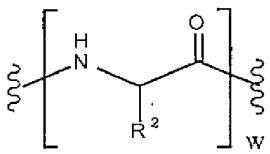
５．６．１．２　アミノ酸ユニット

スペーサーユニットが存在する場合、アミノ酸ユニット（－Ｗ－）はストレッチャーユニット（－Ｔ－）をスペーサーユニット（－Ｙ－）に結合し、スペーサーユニットが存在しない場合は、ストレッチャーユニットを細胞毒素素または細胞静止剤（薬剤ユニット；Ｄ）に連結する。

【０１７８】

－Ｗ$_{w}$－ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチドユニットである。各－Ｗ－ユニットは、独立して角括弧中の下記式を有する。また、ｗは２～１２の範囲の整数である。

【化１２】

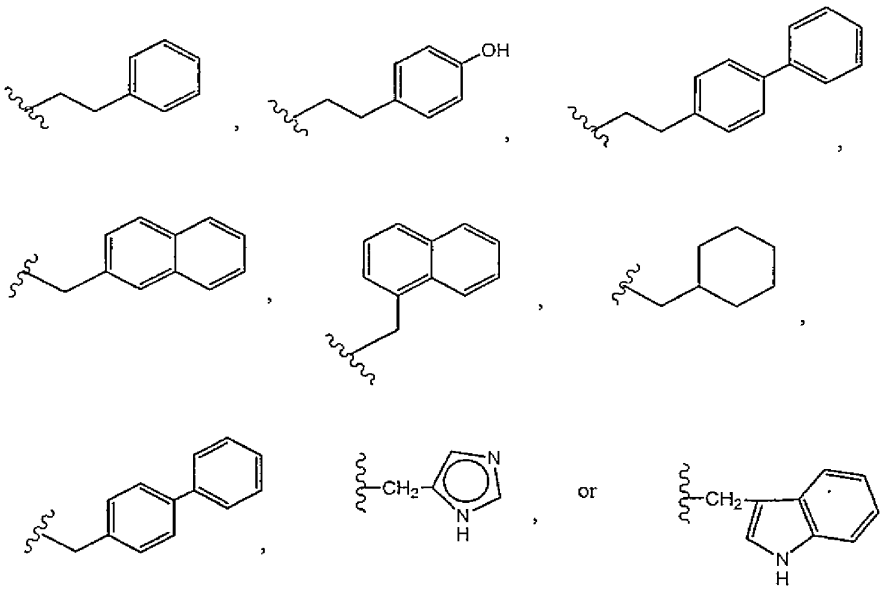


【０１７９】

ここで、Ｒ^{2}は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ベンジル、ｐ－ヒドロキシベンジル、－ＣＨ$_{2}$ＯＨ、－ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ$_{3}$、－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＳＣ

H_3、$-CH_2CONH_2$、$-CH_2COOH$、$-CH_2CH_2CONH_2$、$-CH_2CH_2COOH$、$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、$-(CH_2)_3NH_2$、$-(CH_2)_3NHCOCH_3$、$-(CH_2)NHCHO$、$-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$-(CH_2)_4NH_2$、$-(CH_2)_4NHCOCH_3$、$-(CH_2)_4NHCHO$、$-(CH_2)_3NHCONH_2$、$-(CH_2)_4NHCONH_2$、$-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-ピリジルメチル-、3-ピリジルメチル-、4-ピリジルメチル-、フェニル、シクロヘキシル、

【化１３】



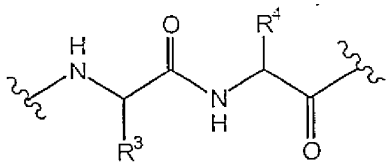
【０１８０】

リンカーユニットのアミノ酸ユニットは酵素（腫瘍関連プロテアーゼが含まれるが、これに限定されない）によって酵素的に切断され、薬剤ユニット（-Ｄ）が解放され、これはｉｎ　ｖｉｖｏでは解放時にプロトン化され細胞傷害性薬剤（Ｄ）を与える。

【０１８１】

W_wユニットの例は式（Ｖ）~（ＶＩＩ）によって表わされる。

【化１４】



(V)

【０１８２】

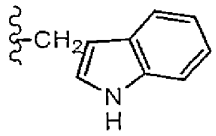
ここで、R^3とR^4は以下の通りである。

【０１８３】

R^3	R^4
ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$；
メチル	$(CH_2)_4NH_2$；
イソプロピル	$(CH_2)_4NH_2$；
イソプロピル	$(CH_2)_3NHCONH_2$；

ベンジル　　（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$；
イソブチル　　（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$；
ｓｅｃ－ブチル　　（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$；

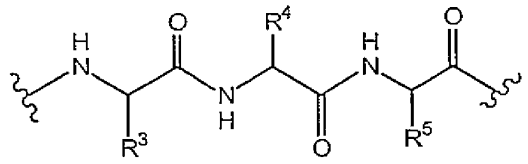
【化１５】



【０１８４】

（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$；
ベンジル　　メチル；および
ベンジル　　（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$；

【化１６】



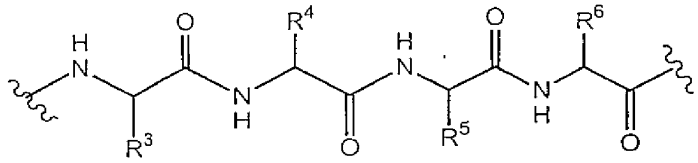
(VI)

【０１８５】

ここでＲ^3、Ｒ^{4}およびＲ^{5}は以下の通りである

Ｒ^3	Ｒ^4	Ｒ^5	
ベンジル	ベンジル	（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨ$_2$	；
イソプロピル	ベンジル	（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨ$_2$	；および
Ｈ	ベンジル	（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨ$_2$	；

【化１７】



(VII)

【０１８６】

ここでＲ^3、Ｒ^4、Ｒ^{5}およびＲ^{6}は以下の通りである

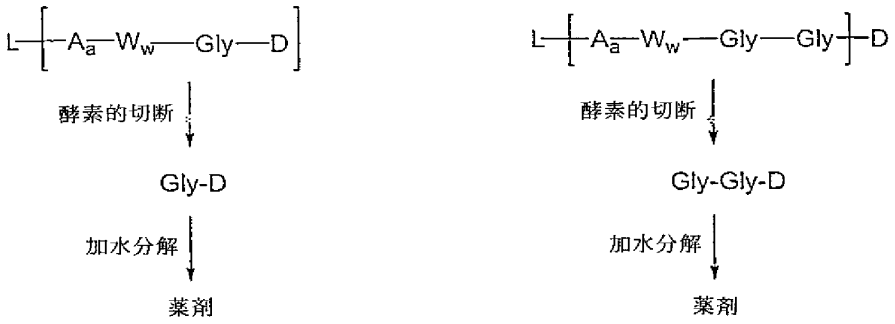
Ｒ^3	Ｒ^4	Ｒ^5	Ｒ^6	
Ｈ	ベンジル	イソブチル	Ｈ	；および
メチル	イソブチル	メチル	イソブチル	

好ましいアミノ酸ユニットとしては、式（Ｖ）のユニットにおいて、Ｒ^{3}がベンジルであり、Ｒ^{4}が－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨ$_2$であるもの；Ｒ^{3}がイソプロピルであり、Ｒ^{4}が－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨ$_2$であるもの；Ｒ^{3}がイソプロピルであり、Ｒ^{4}が－（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$であるものが含まれる（ただし、これらに限定されない）。別の好ましいアミノ酸ユニットは、式（ＶＩ）のユニットにおいて、Ｒ^{3}がベンジルであり、Ｒ^{4}がベンジルであり、Ｒ^{5}が－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨ$_2$である。

【０１８７】
本発明において有用な－Ｗ$_w$－ユニットは、特定の腫瘍関連プロテアーゼによる酵素切断についてその選択性を基準として設計し最適化することができる。好ましい－Ｗ$_w$－ユニットはその切断がプロテアーゼ、カテプシンＢ、ＣおよびＤおよびプラスミンによって触媒されるものである。
【０１８８】
１つの実施形態では、－Ｗ$_w$－はジペプチド、トリペプチドまたはテトラペプチドユニットである。
【０１８９】
Ｒ^2、Ｒ^3、Ｒ^4、Ｒ^{5}またはＲ^{6}が水素以外である場合、Ｒ^2、Ｒ^3、Ｒ^4、Ｒ^{5}またはＲ^{6}が結合する炭素原子はキラルである。
【０１９０】
Ｒ^2、Ｒ^3、Ｒ^4、Ｒ^{5}またはＲ^{6}が結合する各炭素原子は、独立して（Ｓ）配置か（Ｒ）配置である。
【０１９１】
好ましい実施形態では、アミノ酸ユニットはフェニルアラニン－リジンジペプチド（ｐｈｅ－ｌｙｓまたはＦＫリンカー）である。別の好ましい実施形態では、アミノ酸ユニットは、バリン－シトルリン・ジペプチド（ｖａｌ－ｃｉｔまたはＶＣリンカー）である。
【０１９２】
５．６．１．３　スペーサーユニット
スペーサーユニット（Ｙ）は、存在する場合、アミノ酸ユニットを薬剤ユニットに連結する。スペーサーユニットには２つの一般的なタイプ、すなわち、自己犠牲的タイプと非自己犠牲的タイプがある。非自己犠牲的スペーサーユニットは、抗ＣＤ３０抗体－リンカー－薬剤コンジュゲートまたは薬剤－リンカー化合物からアミノ酸ユニットが酵素により切断した後もスペーサーユニットの一部またはすべてが薬剤ユニットに結合したままであるものである。非自己犠牲的スペーサーユニットの例は、（グリシン－グリシン）スペーサーユニットおよびグリシンスペーサーユニット（両者ともスキーム１に示す）である（ただし、これらに限定されない）。本発明のグリシン－グリシンスペーサーユニットまたはグリシンスペーサーユニットを含む抗ＣＤ３０抗体リンカー－薬剤コンジュゲートが、腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼまたはリンパ球関連プロテアーゼにより酵素的に切断する場合、グリシン－グリシン薬剤部分またはグリシン－薬剤部分はＡ－Ｔ－Ｗ$_W$－から切断される。薬剤を解放するためには、グリシン－薬剤ユニット結合を切断させる独立した加水分解反応が標的細胞内に起こらなければならない。
【０１９３】
好ましい実施形態では、－Ｙ$_y$－はｐ－アミノベンジルエーテルであり、これはＱ$_m$（ここで、Ｑは－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルコキシ、－ハロゲン、－ニトロまたは－シアノであり、ｍは０～４の範囲の整数である）で置換されていてもよい。

【化１８】

スキーム１



【０１９４】

１つの実施形態では、非自己犠牲的スペーサーユニット（－Ｙ－）は、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－である。

【０１９５】

別の実施形態では、非自己犠牲的スペーサーユニット（－Ｙ－）は、－Ｇｌｙ－である。

【０１９６】

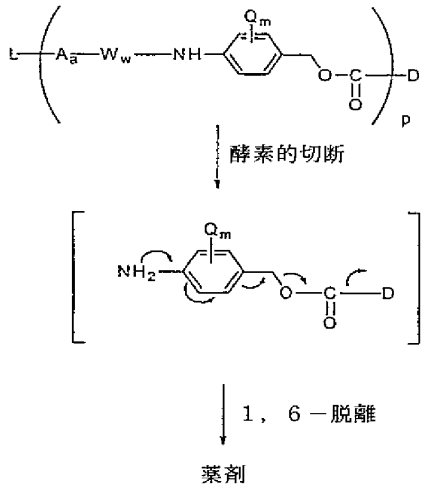
１つの実施形態では、薬剤－リンカー化合物または抗ＣＤ３０抗体－リンカー－薬剤コンジュゲートはスペーサーユニットを欠いている（ｙ＝０）。

【０１９７】

あるいは、自己犠牲的なスペーサーユニットを含む本発明の抗ＣＤ３０抗体－リンカー－薬剤コンジュゲートは、個別の加水分解ステップの必要なしで薬剤（Ｄ）を放出することができる。これらの実施形態では、－Ｙ－はｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）ユニットであり、ＰＡＢ基の窒素原子を介して－W_w－に連結され、カーボネート、カルバメートまたはエーテル基によって－Ｄに直接接続される（スキーム２およびスキーム３）。

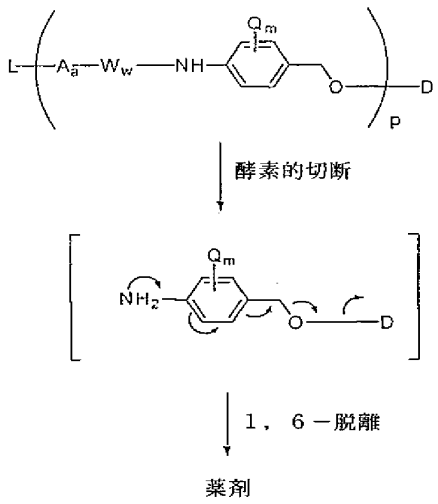
【化１９】

スキーム２



【０１９８】
ここで、Ｑは－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルコキシル、－ハロゲン、－ニトロ、－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり；また、ｐは１～２０の範囲の整数である。
【化２０】

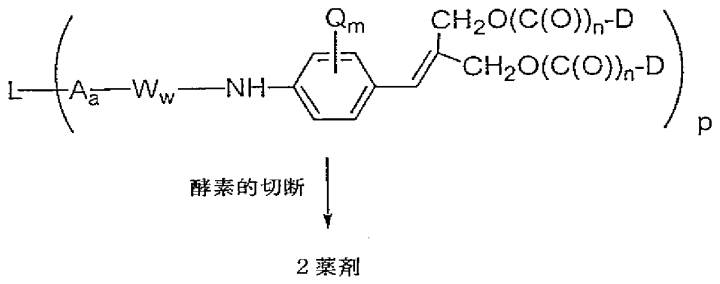
スキーム３



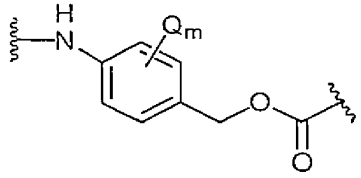
【０１９９】
ここで、Ｑは－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルコキシ、－ハロゲン、－ニトロ、－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり；また、ｐは１～２０の範囲の整数である。
【０２００】
自己犠牲的スペーサーの他の例には、ＰＡＢ基と電子的に等価な芳香族化合物、例えば２－アミノイミダゾール－５－メタノール誘導体（例えば、Ｈａｙら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．、１９９９、９、２２３７参照）およびオルト－またはパラ－アミノベンジルアセタールが含まれる（ただし、これらに限定されない）。置換または未置換の４－アミノ酪酸アミド（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓら、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、１９９５、２、２２３）、適切に置換されたビシクロ［２．２．１］およびビシクロ［２．２．２］環系（Ｓｔｏｒｍら、Ｊ：Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１９７２、９４、５８１５）および２－アミノフェニルプロピオン酸アミド（Ａｍｓｂｅｒｒｙら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、１９９０、５５、５８６７）などのような、アミド結合の加水分解により容易に環化するスペーサーを使用することができる。また、グリシンのα位が置換されたアミン含有薬剤の脱離（Ｋｉｎｇｓｂｕｒｙら、Ｊ；Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９８４、２７、１４４７）も本発明の抗ＣＤ３０抗体－リンカー－薬剤コンジュゲートに適用することができる自己犠牲的なスペーサー戦略の例である。
【０２０１】
別の実施形態では、スペーサーユニットは、分岐したビス（ヒドロキシメチル）スチレン（ＢＨＭＳ）ユニット（スキーム４）であり、これは追加の薬剤を組込むために使用することができる。

【化２１】

スキーム４

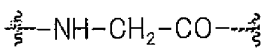


【０２０２】
ここで、Ｑは－Ｃ１－Ｃ８アルキル、－Ｃ１－Ｃ８アルコキシル、－ハロゲン、－ニトロ、－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり；ｎは０または１であり；また、ｐは１～２０の範囲の整数である。
【０２０３】
１つの実施形態では、２つの－Ｄ部分は同一である。
【０２０４】
別の実施形態では、２つの－Ｄ部分は異なる。
【０２０５】
好ましいスペーサーユニット（－Ｙｙ－）は式（ＶＩＩＩ）～（Ｘ）によって表わされる。
【化２２】

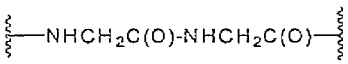


(VIII)

【０２０６】
ここで、ＱはＣ１－Ｃ８アルキル、Ｃ１－Ｃ８アルコキシル、ハロゲン、ニトロ、シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数である。
【化２３】



(IX); および



(X).

【０２０７】
５．６．２　薬剤
本発明は、免疫学的疾患の治療または予防のための抗ＣＤ３０　ＡＤＣの使用を包含する。本明細書で使用する場合、「薬剤」または「細胞傷害性薬剤」という用語は、本発明の抗ＣＤ３０　ＡＤＣとの関連で使用された場合、放射性同位体を含まない。これ以外の点では、当業者に知られているどのような薬剤も、本発明のＡＤＣに関して使用することができる。
【０２０８】
本発明の抗ＣＤ３０抗体へのコンジュゲーションのために使用される薬剤は、ドキソルビシン、パクリタキセル、メルファラン、ビンカアルカロイド、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、エトポシドなどの従来の化学療法剤を含むことができる。さらに、ＣＣ－１０６５類似体、カリチアミシン、メイタンシン、ドラスタチン１０の類似体、リゾキシンおよびパリトキシンなどの有効な薬剤を、条件によっては安定したリンカーを使用して、抗ＣＤ３０抗体に結合して有効なイムノコンジュゲートを形成することができる。本発明の抗ＣＤ３０抗体へのコンジュゲーションのための他の適当な薬剤の例は、下記５．１２．１節に示す。
【０２０９】
ある実施形態では、本発明のＡＤＣは、ＣＤ３０発現細胞上でドキソルビシンより少なくとも４０倍より強力である薬剤を含む。そのような薬剤には、ＤＮＡ副溝結合剤、例えば、エネジイン（ｅｎｅｄｉｙｎｅ）、レキシトロプシン、デュオカルマイシン、タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセルを含む）、ピューロマイシン、ビンカアルカロイド、ＣＣ－１０６５、ＳＮ－３８、トポテカン、モルホリノ－ドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、エキノマイシン、コンブレタスタチン、ネトロプシン、エピチロンＡおよびＢ、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン、メイタンシノイド類、ドラスタチン類、例えば、オーリスタチンＥ、ドラスタチン－１０、ＭＭＡＥ、ディスコデルモリド、エロイテロビンおよびミトキサントロン（ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ）が含まれる（ただし、これらに限定されない）。
【０２１０】
ある特定の実施形態では、本発明の抗ＣＤ３０　ＡＤＣはエネジイン部分を含む。特定の実施形態では、エネジイン部分は、カリケアマイシンである。エネジイン化合物はベルグマン環化を介してジラジカルを生成することにより２本鎖ＤＮＡを切断する。
【０２１１】
本発明の組成物および方法と共に使用することができる、様々な細胞傷害性薬剤と細胞静止剤は、「Ｄｒｕｇ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ　ａｎｄ　ｔｈｅｉｒ　ｕｓｅ　ｆｏｒ　ｔｒｅａｔｉｎｇ　ｃａｎｃｅｒ，ａｎ　ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ　ｄｉｓｅａｓｅ　ｏｒ　ａｎ　ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　ｄｉｓｅａｓｅ」と題する米国仮出願第６０／４００，４０３号（発明者：Ｐｅｔｅｒ　Ｄ．Ｓｅｎｔｅｒ、Ｓｖｅｔｌａｎａ　Ｄｏｒｏｎｉｎａおよび Ｂｒｉａｎ　Ｅ．Ｔｏｋｉ、提出日：２００２年７月３１日）に記載されており、これは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる。
【０２１２】
他の特定の実施形態では、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤はオーリスタチンＥまたはそれの誘導体である。
【０２１３】
好ましい実施形態では、オーリスタチンＥ誘導体はオーリスタチンＥとケト酸の間で形

成されたエステルである。例えば、オーリスタチンＥはＡＥＢとＡＥＶＢを生産するためにパラアセチル安息香酸かベンゾイル吉草酸とそれぞれ反応させることができる。他の好ましいオーリスタチン誘導体はＭＭＡＥとＡＥＦＰを含む。

【０２１４】

当技術分野でドラスタチン－１０としても知られているオーリスタチンＥおよびその誘導体の合成および構造は、米国特許出願第０９／８４５，７８６号および米国特許出願第１０／００１，１９１号；国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ０２／１３４３５；米国特許第６，３２３，３１５号；米国特許第６，２３９，１０４号；米国特許第６，０３４，０６５号；米国特許第５，７８０，５８８号；米国特許第５，６６５，８６０号；米国特許第５，６６３，１４９号；米国特許第５，６３５，４８３号；米国特許第５，５９９，９０２号；米国特許第５，５５４，７２５号；米国特許第５，５３０，０９７号；米国特許第５，５２１，２８４号；米国特許第５，５０４，１９１号；米国特許第５，４１０，０２４号；米国特許第５，１３８，０３６号；米国特許第５，０７６，９７３号；米国特許第４，９８６，９８８号；米国特許第４，９７８，７４４号；米国特許第４，８７９，２７８号；米国特許第４，８１６，４４４号；および米国特許第４，４８６，４１４号（それらのすべては参照によってそれらの全体に本願明細書に組み込まれる）。

【０２１５】

特定の実施形態では、薬剤はＤＮＡ副溝結合剤である。そのような化合物およびそれらの合成例は、米国特許第６，１３０，２３７号（それは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）に開示されている。ある実施形態では、薬剤はＣＢＩ化合物である。

【０２１６】

本発明のある実施形態では、本発明のＡＤＣは抗チューブリン剤を含む。抗チューブリン剤は癌治療用化合物として十分に確立している種類である。抗チューブリン剤の例には、タキサン類（例えばＴａｘｏｌ（登録商標）（パクリタキセル）、ドセタキセル）、Ｔ６７（Ｔｕｌａｒｉｋ）、ビンカ類およびオーリスタチン類（例えば、オーリスタチンＥ、ＡＥＢ、ＡＥＶＢ、ＭＭＡＥ、ＡＥＦＰ）（ただし、これらに限定されない）。このクラスに含まれる抗チューブリン剤はさらに次のとおりである：ビンクリスチンとビンブラスチンを含むビンカアルカロイド、ビンデシンおよびビンオレルビン；パクリタキセルおよびドセタキセルとバッカチン誘導体などのようなタキサン類、エピチロンＡおよびＢ、ノコダゾール、コルヒチンおよびコルチミド、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン、メイタンシノイド類、コンブレタスタチン類、ドラスタチン類、ディスコデルモリドおよびエロイテロビン。

【０２１７】

特定の実施形態では、薬剤はメイタンシノイド（抗チューブリン剤のグループ）である。より具体的な実施形態では、薬剤はメイタンシンである。さらに、特定の実施形態では、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤はＤＭ－１（イムノジェン（ＩｍｍｕｎｏＧｅｎ）社；また、Ｃｈａｒｉｓ、１９９２、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　５２：１２７～１３１頁参照）である。メイタンシン（天然物）は、チューブリン重合を阻害し有系分裂の阻止および細胞死をもたらす。したがって、メイタンシンの作用メカニズムはビンクリスチンとビンブラスチンのそれに似ているように思われる。しかし、メイタンシンは、これらのビンカアルカロイドよりｉｎ　ｖｉｔｒｏでの細胞傷害性が約２００～１，０００倍大きい。

【０２１８】

別の特定の実施形態では、薬剤はＡＥＦＰである。

【０２１９】

本発明のある特定の実施形態では、薬剤は５０、１００または２００個以上のアミノ酸のポリペプチド（例えば、毒素）ではない。本発明の特定の実施形態では、薬剤はリシンではない。

【０２２０】

本発明の他の特定の実施形態では、本発明のＡＤＣは、１種または複数の細胞傷害性薬剤または細胞静止剤（相互に排他的でない以下の薬剤種）を含まない：アルキル化剤、ア

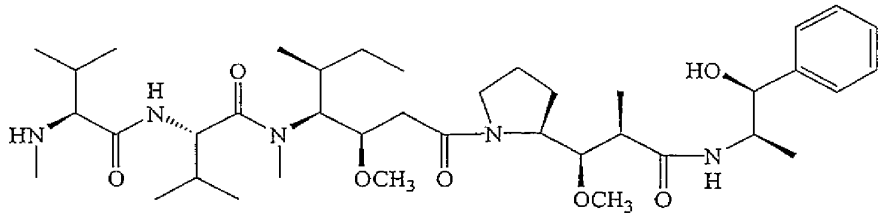
ントラサイクリン類、抗生物質、抗葉酸類、代謝拮抗剤、抗チューブリン剤、オーリスタチン類、化学療法増感剤、ＤＮＡ副溝結合剤、ＤＮＡ複製阻害剤、デュオカルマイシン類、エトポシド類、フッ素化ピリミジン類、レキシトロプシン類、ニトロソ尿素類、プラチノール類、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド類、タキサン類、トポイソメラーゼ阻害剤、ビンカアルカロイド、プリンアンタゴニストおよびジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤。より具体的な実施形態では、高効力薬剤は、男性ホルモン、アントラマイシン（ＡＭＣ）、アスパラギナーゼ、５－アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ブスルファン、ブチオニン（ｂｕｔｈｉｏｎｉｎｅ）、スルホキシミン（ｓｕｌｆｏｘｉｍｉｎｅ）、カンプトテシン、カルボプラチン（ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ）、カルムスチン（ｃａｒｍｕｓｔｉｎｅ）（ＢＳＮＵ）、ＣＣ－１０６５、クロラムブチル、シスプラチン、コルヒチン、シクロホスファミド、シタラビン、シチジンアラビノシド、サイトカラシンＢ、デカルバジン（ｄａｃａｒｂａｚｉｎｅ）、ダクチノマイシン（ｄａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）（以前はアクチノマイシン）、ダウノルビシン、デカルバジン（ｄｅｃａｒｂａｚｉｎｅ）、ドセタキセル、ドキソルビシン、エストロゲン、５－フルオロデオキシウリジン、５－フルオロウラシル、グラミシジンＤ、ヒドロキシ尿素、イダルビシン（ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎ）、イホスファミド（ｉｆｏｓｆａｍｉｄｅ）、イリノテカン（ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ）、ロムスチン（ｌｏｍｕｓｔｉｎｅ）（ＣＣＮＵ）、メクロレタミン（ｍｅｃｈｌｏｒｅｔｈａｍｉｎｅ）、メルファラン、６－メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシンＣ、ミトキサトロン（ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ）、ニトロイミダゾール、パクリタキセル、プリカマイシン、プロカルビジン、ストレプトゾトシン、テポノシド、６－チオグアニン、チオＴＥＰＡ、トポテカン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンオレルビン、ＶＰ－１６、ＶＭ－２６、アゾチオプリン、ミコフェノレートモフェチル、メトトレキサート、アシクロビル、ガンシクロビル、ジドブジン（ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ）、ビダラビン（ｖｉｄａｒａｂｉｎｅ）、リババリン（ｖｉｄａｒａｂｉｎｅ）、アジドチミジン、シチジン・アラビノシッド、アマンタジン、ジデオキシウリジン、ヨードデオキシウリジン、ポスカルネット（ｐｏｓｃａｒｎｅｔ）およびトリフルウリジン（ｔｒｉｆｌｕｒｉｄｉｎｅ）の１種または複数ではない。

【０２２１】

５．６．２．１　ドラスタチン薬剤

ある実施形態では、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤はドラスタチンである。より具体的な実施形態では、ドラスタチンはオーリスタチンのクラスである。本発明の特定の実施形態では、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤はＭＭＡＥ（ＭＭＡＥ：式ＸＩ）である。本発明の別の特定の実施形態では、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤はＡＥＦＰ（式ＸＶＩ）である。

【化２４】

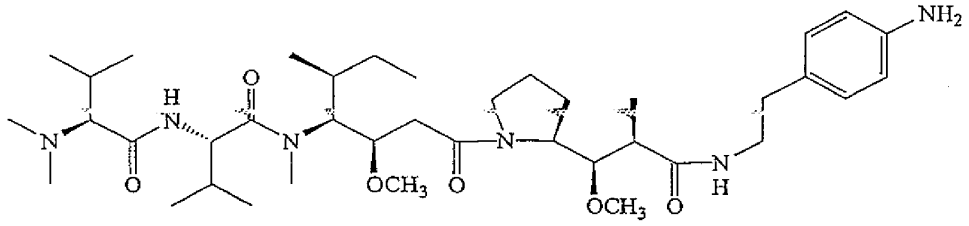


(XI)

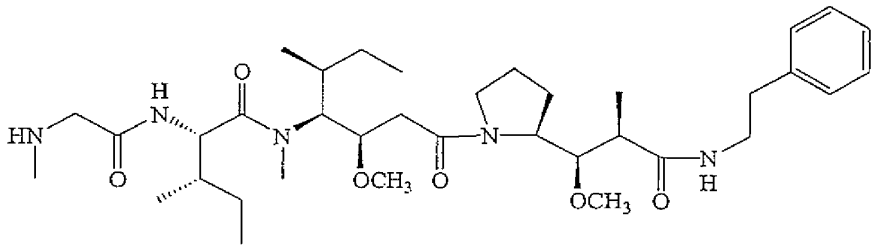
【０２２２】

本発明のある実施形態では、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤は式ＸＩＩ～ＸＶＩＩＩのドラスタチンである。

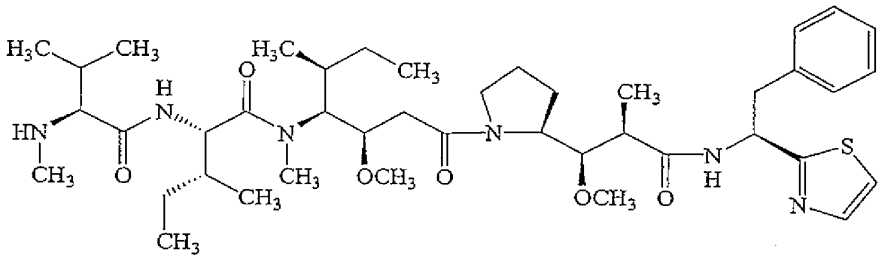
【化２５】



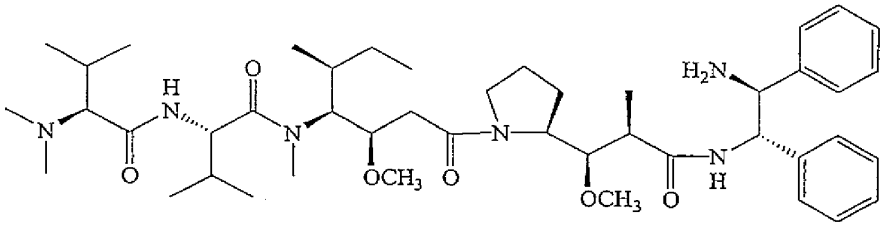
(XII)



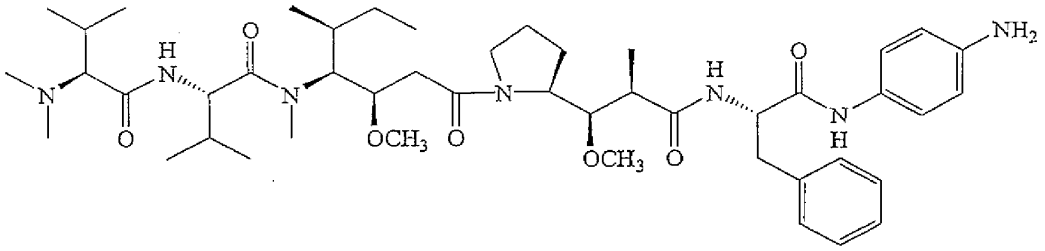
(XIII)



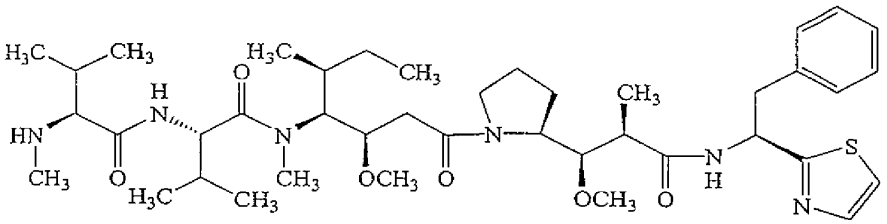
(XIV)



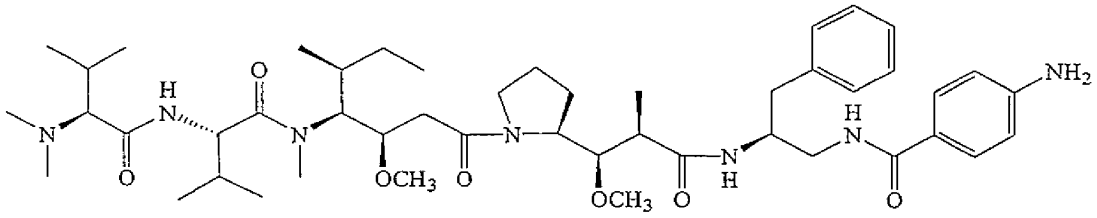
(XV)



(XVI)



(XVII)



(XVIII)

【０２２３】

５．６．３　抗ＣＤ３０抗体－薬剤コンジュゲートの形成

抗ＣＤ３０抗体薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）の作製は当業者に知られている任意の技術によって遂行することができる。簡単に言えば、抗ＣＤ３０ＡＤＣは抗ＣＤ３０抗体、薬剤、および薬剤と抗体を連結するリンカーを含む。多数の様々な反応が薬剤の抗体への共有結合的結合に利用可能である。これはしばしば、リジンのアミン基、グルタミン酸やアスパラギン酸の遊離カルボキシル基、システインのスルフヒドリル基および様々な芳香

族アミノ酸基を含む抗体分子のアミノ酸残基の反応によって遂行される。共有結合的結合で最も一般に用いられている非特異的方法のうちの１つは、化合物のカルボキシル基（またはアミノ）基を、抗体のアミノ（またはカルボキシル）基に連結するカルボジイミド反応である。さらに、ジアルデヒド類またはイミドエステル類などの二官能性剤は、化合物のアミノ基を抗体分子のアミノ基に連結するために使用されてきた。また、シッフ塩基反応も薬剤の抗体への結合に利用可能である。この方法は、グリコールまたは水酸基を含む薬剤の過ヨウ素酸塩酸化を含んでおり、それによりアルデヒドを形成する（これは、次いで、抗体分子と反応する）。結合は、抗体分子のアミノ基とのシッフ塩基形成を通して生じる。イソチオシアネートも、抗体に共有結合的に薬剤を結合するためにカップリング剤として使用することができる。他の技術も当業者に知られており、本発明の範囲内である。そのような技術の例は、例えば、米国特許第５，６６５，３５８号、米国特許第５，６４３，５７３号および米国特許第５，５５６，６２３号（これらは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる）に記載されている（ただし、これらに限定されない）。

【０２２４】

ある実施形態では、リンカーの前駆体である中間体を、適当な条件下に薬剤と反応させる。ある実施形態では、薬剤および／または中間体上で反応性基が用いられる。薬剤と中間体の間の反応の生成物（すなわち誘導された薬剤）を、続いて、適当な条件下に抗ＣＤ３０抗体と反応させる。誘導体化された薬剤と抗体との間の反応のために選択された条件下での抗体の安定性を維持するように注意するべきである。

【０２２５】

５．７　細胞傷害性および細胞静止活性の分析

定義によって、本発明のタンパク質は、活性化リンパ球に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすものでなければならない。ＣＤ３０結合タンパク質の細胞静止作用または細胞傷害作用についてのアッセイを行い得る活性化リンパ球は、培養された細胞系統（例えば、ジャーカット（Ｊｕｒｋａｔ）およびＣＥＳＳ（これらの両方ともＡＴＣＣから入手可能である）；またはＫａｒｐａｓ　２９９およびＬ５４０（これらの両方ともドイツのＳａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨから入手可能である）でもよいし、または新鮮な血液試料から調製したリンパ球由来でもよい。当業者には認識されるように、抗体とサイトカインの適当な混合物でリンパ球を活性化できる。例えば、下記１１節に記載するようにＴリンパ球は抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体およびＩＬ－２の組合せを使用して活性化できる。

【０２２６】

タンパク質が細胞に対して細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすかどうか決める多くの方法が、当業者に知られており、特定のタンパク質が本発明のタンパク質であるか否かを明らかにするのに用いることができる。そのような方法を説明する例を下に記載する。

【０２２７】

ＣＤ３０に結合するタンパク質が、活性化リンパ球に対し細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼさない場合、そのタンパク質を上記５．１節に記載した方法によって多量化し、この多量体が活性化リンパ球に対する細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼす能力を分析することができる。

【０２２８】

好ましい実施形態では、活性化リンパ球に対する細胞静止作用または細胞傷害作用を評価する前に、本発明のタンパク質を架橋する。例示的な実施形態（この場合、本発明のタンパク質は抗ＣＤ３０抗体である）では、抗体は溶液中で架橋され得るし、１種または複数の抗ＣＤ３０抗体の希釈液は、第２の抗体の存在下または不在下に９６穴平底組織培養プレートに滴下することができる。次いで、活性化リンパ球をおよそ５，０００個の細胞／ウェルでプレートに加える。次いで、本願明細書に記載するようにして、例えば、活性化リンパ球への放射性標識チミジンの取り込みの阻害として、細胞静止作用または細胞傷害作用を評価することができる。

【０２２９】
タンパク質が（ｉ）ＣＤ３０に結合し、（ｉｉ）活性化リンパ球に対し細胞静止作用または細胞傷害作用を及ぼすことが確認されたならば、その動物モデルでの治療可能性が確認される。免疫学的疾患の典型的な動物モデルは下記５．７．１節に記載する。
【０２３０】
抗ＣＤ３０抗体が活性化リンパ球に対する細胞静止作用を及ぼすか否かを判定する好ましい実施形態では、チミジン取り込みアッセイを用いることができる。例えば、９６穴プレートに約５，０００細胞／ウェルの密度で載せた活性化リンパ球を７２時間の間培養し、７２時間の期間の最後の８時間、０．５μＣｉの^{3}Ｈ－チミジンにさらし、抗体の存在下または不在下に培養細胞への^{3}Ｈ－チミジンの取り込みを測定する。
【０２３１】
当業者に知られている多数の細胞傷害性アッセイが存在する。これらのアッセイには壊死を測定するものもあるし、アポトーシス（プログラムされた細胞死）を測定するものもある。壊死には形質膜の浸透性増加が伴い細胞は膨張して、形質膜は数分内に破裂する。他方、アポトーシスは、細胞膜の泡状突起の増加、細胞質の凝縮および内生的なエンドヌクレアーゼの活性化により特徴づけられる。上に記載した細胞静止作用または細胞傷害作用を測定するアッセイの代わりとして、ＣＤ３０－結合タンパク質が活性化リンパ球の処理または予防において有用なことを示すのには、活性化リンパ球に対するこれらの効果のうちの１つだけで十分である。
【０２３２】
１つの実施形態では、壊死はまたはニュートラルレッド、トリパンブルーまたはＡＬＡＭＡＲ（商標）ブルーなどの染料を取り込む細胞の能力の有無によって測定される（Ｐａｇｅら、１９９３、Ｉｎｔｌ．Ｊ．ｏｆ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　３：４７３～４７６頁）。このようなアッセイでは、細胞を、染料を含む培地中でインキュベートし、細胞を洗浄し、染料を取り込む細胞の能力を反映する残留染料を分光分析によって測定する。
【０２３３】
別の実施形態では、染料がスルホローダミンＢ（ＳＲＢ）であり、そのタンパク質への結合が細胞傷害性の尺度として使用できる（Ｓｋｅｈａｎら、１９９０、Ｊ．Ｎａｔ’ｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．８２：１１０７～１２頁）。
【０２３４】
さらに別の実施形態では、ＭＴＴなどのテトラゾリウム塩を定量的熱量分析に使用し、生細胞（死細胞ではない）の検出により哺乳類細胞の生存および増殖を調べる（例えば、Ｍｏｓｍａｎｎ、１９８３、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　６５：５５～６３頁参照）。
【０２３５】
さらに別の実施形態では、培養物中の結合部分と「浮遊」部分の両方によってアポトーシス細胞を測定する。上清を取り、結合細胞をトリプシン分解し、遠心分離洗浄ステップ（１０分、２０００ｒｐｍ）後に両方の調製物を組み合わせることによって両方のコンパートメントを回収する。スリンダック（ｓｕｌｉｎｄａｃ）および関連化合物で腫瘍細胞培養を処理して顕著な量のアポトーシスを得るプロトコルが、文献（例えば、Ｐｉａｚｚａら、１９９５、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５５：３１　１０～１６頁参照）に記載されている。この方法の特徴は、浮遊細胞および結合細胞の両者を回収し、ＤＮＡの断片化によって検出されるアポトーシスの観察のために最適な処理時間および投与量範囲を同定し、さらにまた最適な細胞培養条件を同定することを含む。
【０２３６】
さらに別の実施形態では、ＤＮＡ断片化の測定によりアポトーシスを定量する。ＤＮＡ断片化はｉｎ　ｖｉｔｒｏでの光定量法が利用可能である。ＴＵＮＥＬ（これは断片化されたＤＮＡ中に組み込まれた標識されたヌクレオチドを検出する）を含む、そのようなアッセイおよびＥＬＩＳＡに基づくアッセイの例が、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａ、１９９９、ｎｏ．２、３４～３７頁（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）

に開示されている。

【０２３７】

別の実施形態では、アポトーシスを形態学的に観察することができる。

【０２３８】

試験タンパク質または核酸で処理した後、アクリジンオレンジおよび臭化エチジウムで標識してから蛍光顕微鏡を使用して培養物についてアポトーシスと壊死をアッセイする。アポトーシス細胞数を測定する方法は、Ｄｕｋｅ　＆　Ｃｏｈｅｎ、１９９２、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｃｏｌｉｇａｎら、ｅｄｓ．、３．１７．１－３．１７．１６によって以前に記載された。別の実施形態では、細胞をＤＮＡ染料であるヨウ化プロピジウムで標識し、クロマチンの凝縮、核内膜に沿った呈色、細胞質の凝縮、細胞膜の泡状突起の増加および細胞の収縮などの形態変化について細胞を観察する。

【０２３９】

５．７．１　免疫学的疾患の動物モデル

臨床試験を行う前に、本発明の分子は免疫学的疾患の動物モデルにおいて試験または効果確認できる。免疫学的疾患について確立した多くの動物モデルが、当業者に知られており、本発明の分子の有効性を分析するためには、そのいずれを使用することもできる。そのようなモデルの例を以下に記載する（ただし、これらに限定されない）。

【０２４０】

糖尿病、狼瘡、全身性硬化症、ショーグレン症候群、実験的な自己免疫脳脊髄炎（多発性硬化症）、甲状腺炎、重症筋無力症、関節炎、葡萄膜炎、炎症性腸疾患を含む全身的および器官特異的自己免疫疾患の動物モデル用のいくつかの例が、Ｂｉｇａｚｚｉ，Ｐ．、「Ａｎｉｍａｌ　Ｍｏｄｅｌｓ　ｏｆ　Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ：Ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓ　ａｎｄ　Ｉｎｄｕｃｅｄ」、ｉｎ　Ｔｈｅ　Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ、ＲｏｓｅとＭａｃｋａｙ（編）、２１１～２４４頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、１９９８）および「Ａｎｉｍａｌ　Ｍｏｄｅｌｓ　ｆｏｒ　Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ　ａｎｄ　Ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　Ｄｉｓｅａｓｅ」、ｉｎ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｃｏｌｉｇａｎら（編．）、Ｃｈａｐｔｅｒ　１５（Ｗｉｌｅｙ、１９９７）に記載されている。

【０２４１】

アレルギー症状（例えば喘息、皮膚炎）もげっ歯動物でモデル化することができる。航空機過敏症（ａｉｒｗａｙ　ｈｙｐｅｒｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ）は、オブアルブミン（Ｔｏｍｋｉｎｓｏｎら、２００１、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６６：５７９２～５８００頁）またはシストソーマ・マンソー二（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ　ｍａｎｓｏｎｉ）卵抗原（Ｔｅｓｃｉｕｂａら、２００１年、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ。　１６７：１９９６～２００３頁）で誘導できる。マウスのＮｃ／Ｎｇａ株は、血清ＩｇＥの顕著な増加を示し、アトピー性皮膚炎状の損傷を自然に示す（Ｖｅｓｔｅｒｇａａｒｄら、２０００、Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．Ｔｏｄａｙ　６：２０９～２１０頁；Ｗａｔａｎａｂｅら、１９９７、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４６１～４６６頁；Ｓａｓｋａｗａら、２００１、Ｉｎｔ．Ａｒｃｈ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２６：２３９～２４７頁）。

【０２４２】

致死量の照射を行った組織不適合性宿主への免疫力のあるドナーからリンパ球の注入は、マウスにおいて急性ＧＶＨＤを誘導する古典的アプローチである。あるいは、親Ｂ６Ｄ２Ｆ１マウスモデルは、急性、慢性両方のＧＶＨＤを誘導する系を提供する。このモデルでは、Ｂ６Ｄ２Ｆ１マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６およびＤＢＡ／２マウスの親株の交配により得られるＦ１子孫である。ＤＢＡ／２リンパ球を非照射Ｂ６Ｄ２Ｆ１マウス中に導入すると、慢性ＧＶＨＤを引き起こすが、Ｃ５７ＢＬ／６、Ｃ５７ＢＬ／１０またはＢ１０．Ｄ２リンパ球を導入すると、急性ＧＶＨＤが引き起こされる（Ｓｌａｙｂａｃｋら、２０００、Ｂｏｎｅ　Ｍａｒｒｏｗ　Ｔｒａｎｓｐｌ．２６：９３１～９３８頁；Ｋａｔａｏｋａら、２００１、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１０３：３１０～３１８頁）。

【０２４３】
さらに、ヒト造血幹細胞および成熟末梢血リンパ球は両者とも、ＳＣＩＤマウスに移植可能であり、これらのヒト・リンパ－造血幹細胞はＳＣＩＤマウス中において機能を保つ（ＭｃＣｕｎｅら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：１６３２～１６３９頁；Ｋａｍｅｌ－ＲｅｉｄとＤｉｃｋ、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：１７０６～１７０９頁、Ｍｏｓｉｅｒら、１９８８、Ｎａｔｕｒｅ ３３５：２５６～２５９頁）。これは、可能性のある治療剤をヒトリンパ球上に直接に試験する小動物モデル系をもたらした。例えば、ヒト－マウスキメラモデルは抗ＩＬ－４、抗ＩＬ－１３、抗ＩＬ－５および二重ムテイン（ｄｏｕｂｌｅ－ｍｕｔｅｉｎ）ＩＬ－４の治療可能性を検討するために用いられた（Ｔｏｕｒｎｏｙら、２００１、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６６：６９８２－６９９１）。

【０２４４】
５．８ シグナル伝達活性のアッセイ
ある好ましい実施形態では、本発明のタンパク質は、ＣＤ３０を発現するリンパ球に結合することで、ＣＤ３０を介した１つまたは複数のシグナル伝達特性を誘導することができる。ＣＤ３０結合タンパク質のシグナル伝達作用についてアッセイすることができるＣＤ３０－発現リンパ球は、培養された細胞系統（例えば、ジャーカット（Ｊｕｒｋａｔ）およびＣＥＳＳ（これらの両方ともＡＴＣＣから入手可能である）；またはＫａｒｐａｓ２９９およびＬ５４０（これらの両方ともドイツのＳａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨから入手可能である）でもよいし、または新鮮な血液試料から調製したリンパ球由来でもよい。

【０２４５】
好ましい実施形態では活性化リンパ球に対するその活性を評価するのに先立って、本発明のタンパク質を架橋する。例示的な実施形態（この場合、本発明のタンパク質は抗ＣＤ３０抗体である）では、抗ＣＤ３０抗体は溶液中で架橋され得る。簡単に言えば、１種または複数の抗ＣＤ３０抗体の希釈液は、第２の抗体の存在下または不在下に９６穴平底組織培養プレートに滴下することができる。次いで、活性化リンパ球をおよそ５，０００個の細胞／ウェルでプレートに加える。次いで、本願明細書に記載するようにして、抗体のシグナル伝達活性を評価することができる。

【０２４６】
タンパク質がＣＤ３０を介した１つまたは複数のシグナル伝達特性を誘導することができるかどうかを決める多数の方法が、当業者に知られている。そのような方法を説明する例を下に記載する。

【０２４７】
５．８．１ カルシウム放出
１つの実施形態では、本発明のタンパク質は、例えば、第２の抗体と架橋した際に、ジャーカット細胞において細胞内の遊離Ca^{2+}の放出を誘導できる。細胞内の遊離Ca^{2+}の放出はＥｌｌｉｓら（１９９３、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５１、２３８０～２３８９頁）またはＭｏｎｄとＢｒｕｎｓｗｉｃｋ（１９９８、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｕｎｉｔ ３．９、Ｗｉｌｅｙ）が記載したようにして測定することができる。

【０２４８】
５．８．２ ＴＲＡＦ局在
ＴＲＡＦ１、ＴＲＡＦ２、ＴＲＡＦ３およびＴＲＡＦ５を含む４つのＴＮＦ受容体関連因子（ＴＲＡＦ）がＣＤ３０の細胞質側尾部（ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ｔａｉｌ）と相互作用することが実証されている（Ｇｅｄｒｉｃｈら、１９９６、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７１、１２８５２～１２８５８頁；Ｌｅｅら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．、９３、９６９９～９７０３頁；Ａｎｓｉｅａｕら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．、９３、１４０５３～１４０５８頁；Ａｉｚａｗａら、１９９７、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７２、２０４２～２０４５頁；Ｔｓｉｔｓｉｋｏｖら、１９９７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳ

Ａ．、９４、１３９０～１３９５頁；Ｌｅｅら、１９９７、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８５、１２７５～１２８５頁；Ｄｕｃｋｅｔｔ ａｎｄ Ｔｈｏｍｐｓｏｎ、１９９７、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、１１、２８１０～２８２１頁）。同時トランスフェクション研究、酵母２ハイブリッドスクリーニングおよびＧＳＴ融合タンパク質を使用し、ＴＲＡＦ相互作用サイトをＣＤ３０の細胞質側尾部のカルボキシル末端にマッピングし、細胞質ゾル相中でのＣＤ３０とのＴＲＡＦの間の会合がＣＤ３０を媒介としたシグナル・カスケードのキー・イベントであるとの仮説が立てられた。ＣＤ３０とＴＲＡＦの間の相互作用は、ＣＤ３０結合は必要としないようである（Ａｎｓｉｅａｕら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．、９３、１４０５３～１４０５８頁；Ａｉｚａｗａら、１９９７、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７２、２０４２～２０４５頁）。しかし、ＣＤ３０の架橋があると、細胞溶解物の界面活性剤可溶画分からＴＲＡＦ１およびＴＲＡＦ２が消失する（ＤｕｃｋｅｔｔとＴｈｏｍｐｓｏｎ、１９９７、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、１１、２８１０～２８２１頁；Ａｒｃｈら、２０００、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、２７２、９３６～９４５頁）。ＴＲＡＦ２が消失すると、それに対応して核を含む界面活性剤不溶な画分における検出可能なＴＲＡＦ２の量が増大する（Ａｒｃｈら、２０００、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、２７２、９３６～９４５頁）。さらに、細胞下の局在研究によって、ＣＤ３０の架橋は、ＴＲＡＦ２の細胞質ゾルから細胞中の核周辺領域への転位（ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ）を誘導することが確認された（Ａｒｃｈら、２０００、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、２７２、９３６～９４５頁）。このようなＴＲＡＦ２のＣＤ３０媒介転移は、細胞感度を調節することにより、細胞生存をモジュレートし、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの他のＴＲＡＦ結合メンバーによって誘導されたアポトーシスを進行させるとの仮説が立てられている（ＤｕｃｋｅｔｔとＴｈｏｍｐｓｏｎ、１９９７、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、１１、２８１０～２８２１頁；Ａｒｃｈら、２０００、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、２７２、９３６～９４５頁）。

【０２４９】

本発明の抗体がＴＲＡＦ２の核転位を誘導するかどうか判定するために、本発明の抗体をＣＤ３０$^{+}$細胞および第２の抗体のような架橋剤と接触させる。次いで、共焦点顕微鏡を使用して、ＴＲＡＦ２の局在を、本発明の抗体（プラス架橋試薬）と共にインキュベートした細胞と本発明の抗体と共にインキュベートしなかった細胞とで比較することができる。

【０２５０】

別の実施形態では、本発明の抗体がＴＲＡＦ２の核局在を誘導するかどうかを、例えば、ウェスタンブロットで様々な細胞画分中でＴＲＡＦ２の量を測定してアッセイすることができる。例えば、本発明の抗体２μｇ／ｍｌを０．５×１０^{6}／ｍｌのＣＤ３０$^{+}$細胞と共にインキュベートすることができる。抗体を３７℃、５％CO_2で、第２の抗体（例えば、本発明の抗体がマウスモノクローナル抗体である場合、ヤギ抗マウスＩｇＧ Ｆｃ特異抗体（ジャクソン・イムノリサーチ（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｃｈ）、ペンシルヴェニア州ウェスト・グローブ所在（Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ））を第２の抗体として使用することができる）２０μｇ／ｍｌで架橋する。指定された時点（例えば、２～２４時間）で、５×１０^{6}個の細胞を取り出し遠沈させる。氷冷したＰＢＳで２回洗浄した後、細胞を、プロテアーゼ阻害剤カクテル（ロシュ・ダイアグノスティックＧｍＢＨ（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｉｔｃ ＧｍＢＨ）、ドイツ、マンハイム所在（Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ））を添加した溶解緩衝液（０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５Ｍトリス－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、０．００５Ｍ ＥＤＴＡおよび０．５％ＮＰ－４０またはトライトンＸ－１００）中、１００×１０^{6}／ｍｌで溶解させる。溶解は４℃で２時間一定の混合を行いつつ行う。溶解後に、界面活性剤可溶画分および界面活性剤不溶な画分を１４，０００×ｇで２０分間遠心分離によって分離する。次いで、界面活性剤可溶画分を個別の試験管に移し、等量の２×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料還元緩衝液をそれに加える。界面活性剤不溶画分（すなわち、遠心分離の後の沈殿）にも等量の１×ＳＤＳ－Ｐ

ＡＧＥ試料還元緩衝液を加える。両方の画分を１００℃で２分間加熱する。次いで、各時点で約１０μずつの画分を１２％トリス－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥ（インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、カリフォルニア州カールスバード所在（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ））に溶解する。溶解したタンパク質は、ＰＶＤＦ薄膜（インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））にウェスタン転写（Ｗｅｓｔｅｒｎ－ｔｒａｎｓｆｅｒ）し、０．０５％トゥイーン２０と５％ＢＳＡを添加したトリス緩衝塩水（０．０５Ｍトリス－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、０．１３８ＭＮａＣｌ、０．００２７ＭＫＣｌ）でブロックする。ブロットは、抗ＴＲＡＦ２抗体（サンタクルーズ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ）、カリフォルニア州サンディエゴ所在（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ））でイムノブロットする。様々な画分中のＴＲＡＦ２タンパク質の存在は西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）をコンジュゲートした$F(ab')_2$ヤギ抗ウサギＩｇＧ Ｆｃ（ジャクソン・イムノリサーチ（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）およびペルオキシダーゼ基質キットＤＡＢ（ベクター研究所（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、カリフォルニア州バーリンゲーム所在（Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ、ＣＡ））によって検出する。あるいは、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ ｋｉｔ（ピアス（Ｐｉｅｒｃｅ）、イリノイ州ロックフォード所在（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ））を検出のために使用することもできる。

【０２５１】

５．８．３ ＮＦ－κＢの活性化

本発明のある抗体によって誘導され得ることがはっきりわかっている別のシグナル伝達事象は、ＮＦ－κＢの活性化である。Ｍ４４、Ｍ６７およびＢｅｒ－Ｈ２を含む抗ＣＤ３０ ｍＡｂは、ＮＦ－κＢの活性化が可能であり、これは標準的な移動度シフトＤＮＡ結合アッセイによって検出される（ＭｃＤｏｎａｌｄら、１９９５、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２５、２８７０～２８７６頁；Ａｎｓｉｅａｕら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．、９３、１４０５３～１４０５８頁；Ｈｏｒｉｅら、１９９８、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１０、２０３～２１０頁）。このような作用は、ホジキン細胞、Ｔ細胞およびＣＤ３０発現トランスフェクタント中で観察することができる（ＭｃＤｏｎａｌｄら、１９９５、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２５、２８７０～２８７６頁；Ｂｉｓｗａｓら、１９９５、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、２、５８７～５９６頁；Ａｎｓｉｅａｕら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．、９３、１４０５３～１４０５８頁；Ｈｏｒｉｅら、１９９８、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１０、２０３～２１０頁）。初期のマッピング研究は、ＣＤ３０を媒介としたＮＦ－κＢの活性化のためには、ＴＲＡＦ１、ＴＲＡＦ２、およびＴＲＡＦ５とＣＤ３０の細胞質側尾部との間の相互作用が必要になることを明らかにした（Ｌｅｅら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．、９３、９６９９～９７０３頁；Ａｎｓｉｅａｕら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．、９３、１４０５３～１４０５８頁；Ａｉｚａｗａら、１９９７、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７２、２０４２～２０４５頁；Ｄｕｃｋｅｔｔら、１９９７、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．、１７、１５３５～１５４２頁）。最近になって、アゴニスト性ｍＡｂによるＣＤ３０の結合も、ＴＲＡＦ２／５に依存しない経路でＮＦ－κＢを活性化し得るという証拠が得られている（Ｈｏｒｉｅら、１９９８、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１０、２０３～２１０頁）。ＣＤ３０媒介ＮＦ－κＢ活性化の生物学的作用のうちのいくつかは、遺伝子転写（Ｂｉｓｗａｓら、１９９５、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、２、５８７～５９６頁；Ｍａｇｇｉら、１９９５、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、３、２５１～２５５頁）および細胞生存の調節（Ｍｉｒら、２０００、Ｂｌｏｏｄ、９６、４３０７～４３１２頁；Ｈｏｒｉｅら、２００２、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ、２１、２４３９～２５０３頁）を含む。ＮＦ－κＢ活性化の特徴のいずれかをアッセイすることにより、本発明の抗体がＣＤ３０シグナル伝達の１つまたは複数の特性を誘導するかどうか判定することができる。

【０２５２】

本発明の抗体によって$CD30^+$細胞にＮＦ－κＢ活性化が誘導されるかどうかは、例

えば、２μｇ／ｍｌの抗体と共に３×１０^{6}／ｍｌのＣＤ３０$^{+}$細胞をインキュベートし、次いで、抗体を架橋し（例えば、本発明の抗体がマウスモノクローナル抗体である場合、ヤギ抗ＩｇＧ　Ｆｃ特異抗体（ジャクソン・イムノリサーチ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｃｈ）、ペンシルヴェニア州ウェスト・グローブ所在（Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ））２０μｇ／ｍｌによって架橋することができる）、次いで、培養物を３７℃、５％CO_2下で１時間、一定の振盪を行いながらインキュベートすることにより測定できる。細胞密度を１．２×１０^{6}／ｍｌに調節し、振盪を行いながらさらに１時間インキュベーションする。次いで細胞密度をさらに０．６×１０^{6}／ｍｌに低減し、細胞を３７℃、５％CO_2下でさらに４６時間、振盪は行わずにインキュベートした。インキュベーション終了時に、刺激した細胞から核抽出物を調製しＮＦ－κＢ活性化について分析した。

【０２５３】

ＮＦ－κＢ活性化は、１８５０×ｇで２０分間遠心分離を行うことによって細胞を回収し、次いで、細胞沈層容積の５倍のＰＢＳで１度洗浄することにより分析する。細胞ペレットを、細胞沈層容積の５倍の低張性緩衝液（０．０１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．９、０．００１５Ｍ　$MgCl_2$、０．０１Ｍ　ＫＣｌ、０．０００２Ｍフェニルメチルスルホニルフルオリド、０．０００５Ｍジチオスレイトール）で再懸濁する。１８５０×ｇ、５分間の遠心分離によって細胞を回収する。次いで、ペレットを細胞沈層容積の３倍の低張性緩衝液に再懸濁し、氷上で１０分間膨潤させる。次いで、膨潤した細胞を、ダウンス式のホモジナイザー中、隙間の狭いＢ内筒を使用して、ゆっくりした上下動で均質化する。細胞溶解はトリパンブルー排除法によってモニターするが、８０％を超える細胞溶解を達成するためには十分なストロークを用いるべきである。核は１５分間、３３００×ｇの遠心分離によってペレット化する。上清（細胞質抽出液）を除去する。次いで、核ペレットを、１／２核沈層容積の低塩緩衝液（０．０２Ｍ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．９、２５％容積／容積グリセリン、０．００１５Ｍ　$MgCl_2$、０．０２Ｍ　ＫＣｌ、０．０００２Ｍ　ＥＤＴＡ、０．０００２Ｍフェニルメチルスルホニルフルオリド、０．０００５Ｍジチオスレイトール）中に再懸濁する。次いで、等容積の高塩緩衝液（０．０２Ｍ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．９、２５％容積／容積グリセリン、０．００１５Ｍ　$MgCl_2$、１．２Ｍ　ＫＣｌ、０．０００２Ｍ　ＥＤＴＡ、０．０００２Ｍフェニルメチルスルホニルフルオリド、０．０００５Ｍジチオスレイトール）を穏やかに撹拌させた核懸濁液にゆっくり加え、ＫＣｌの最終濃度をおよそ０．３Ｍとする。抽出液を、３０分間穏やかに撹拌し続ける。抽出後、２５，０００×ｇで３０分間核を遠心分離によって取り除く。次いで、核抽出液の伝導性が透析緩衝液と同じになるまで、核抽出液を、透析緩衝液（０．０２Ｍ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．９、２０％容積／容積グリセリン、０．１Ｍ　ＫＣｌ、０．０００２Ｍ　ＥＤＴＡ、０．０００２Ｍフェニルメチルスルホニルフルオリド、０．０００５Ｍジチオスレイトール）５０容積に対して透析する。残存する破砕物を除去するため、核抽出液を、２５，０００×ｇで２０分間もう一度遠心分離する。また、上清のタンパク質濃度はマイクロＢＣＡアッセイ（ピアス）（Ｐｉｅｒｃｅ）により測定する。

【０２５４】

抗ＣＤ３０刺激細胞の核抽出液中のＮＦ－κＢの存在は、ゲルシフトアッセイシステム（プロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、ウィスコンシン州マディソン所在（Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ））を使用する標準的な移動度シフトＤＮＡ結合アッセイによって検出することができる。配列5’－ＡＧＴ　ＴＧＡ　ＧＧＧ　ＧＡＣ　ＴＴＴ　ＣＣＣ　ＡＧＧ　Ｃ－3’（配列番号３３）を有するコンセンサスＮＦ－κＢ結合モチーフ（ＬｅｎａｒｄｏとＢａｌｔｉｍｏｒｅ、１９８９、Ｃｅｌｌ、５８、２２７～２２９頁）を含む２本鎖オリゴヌクレオチドプローブを核抽出液中のＮＦ－κＢを検出プローブとして使用する。このプローブは、Ｔ４ポリヌクレオチド・キナーゼおよび［α－^{32}Ｐ］ＡＴＰによってリン酸化される。リン酸化されたプローブは、ＴＥ緩衝液（０．０１ＭトリスーＨＣｌ、ｐＨ８．０、０．００１Ｍ　ＥＤＴＡ）で平衡に保たれたセファロースＧ２５スピン・カラムによって精製する。次いで、精製されたプローブを酢酸アンモニアおよびエタノールで沈殿させ

、次いで、ＴＥ緩衝液１００μｌ中に再懸濁させる。抗ＣＤ３０処理した細胞および対照処理した細胞からの核抽出液を含む反応混合物を、Ｇｅｌ　Ｓｈｉｆｔ結合緩衝液、水およびメーカー指示による標識されていない競合プローブと別々に組み合わせる。ＮＦ－κＢコンセンサスを含む標識されていないオリゴヌクレオチドおよび標識されていない無関係のオリゴヌクレオチドを、配列特異的および配列非特異的競合物質として反応混合物に含有させる。室温で１０分間インキュベーションした後、^{32}Ｐ－標識したＮＦ－κＢコンセンサスオリゴヌクレオチド１μｌを各反応液に加える。この反応を室温でさらに２０分間継続する。インキュベーション終了時に、１μｌの１０×ローディング緩衝液（０．２５Ｍトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、４０％容積／容積グリセリン、０．２％のブロモフェノールブルー）を反応液に加える。次いで、この反応液を、６％のＤＮＡ遅延ゲル（インビトロジェン）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の個のウェルにロードし、０．５×ＴＢＥ（０．０４５Ｍトリス－ＨＣｌ、０．０４５Ｍホウ酸、０．００１Ｍ　ＥＤＴＡ）に、１００ボルトで９０分間分離させる。電気泳動後に、ゲルをプラスチックラップで覆い、これを－７０℃でＸ線フィルムに露光し、ＮＦ－κＢとＮＦ－κＢ結合配列を含むオリゴヌクレオチドの間の特異的相互作用を検出する。

【０２５５】

５．９　免疫疾患

本発明の方法は免疫学的疾患（ここで、免疫学的疾患はリンパ球の不適切な活性化によって特徴づけられる）の治療または予防に有用である。本明細書で使用する場合、「免疫学的疾患」という用語は、ホジキン病および未分化大細胞リンパ腫のような免疫性の癌は包含しない。免疫学的疾患の治療または予防は本発明の方法によれば、そのような治療または予防を必要とする患者に、疾患状態に関係している活性化リンパ球に結合し、リンパ球に対し細胞傷害作用または細胞静止作用を及ぼすタンパク質、好ましくは抗体を投与することにより達成される。

【０２５６】

本発明の方法によって治療または予防することができる疾患の例としては、関節リウマチ、多発性硬化症、内分泌腺性眼障害、ブドウ膜炎（ｕｖｅｏｒｅｔｉｎｉｔｉｓ）、全身紅斑性狼瘡、重症筋無力症、グレイブ病、糸球体腎炎、自己免疫性肝疾患、自己免疫性炎症性腸疾患、アナフィラキシー、アレルギー反応、シェーグレン症候群、若年性（タイプＩ）糖尿病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナー肉芽腫症、結合組織炎、炎症性腸疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、複合的内分泌腺不全、シュミット症候群、自己免疫性ブドウ膜炎、アジソン病、副腎炎、甲状腺炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性甲状腺疾患、悪性貧血、胃の萎縮症、慢性肝炎、ルポイド肝炎、アテローム性動脈硬化症、初老期痴呆、脱髄疾患、亜急性皮膚紅斑性狼瘡、上皮小体機能減退症、ドレスラー症候群、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、尋常性天疱瘡、天疱瘡、疱疹状皮膚炎、円形脱毛症、類天疱瘡、強皮症、進行性全身性硬化症、ＣＲＥＳＴ症候群（石灰沈着症、レイノー現象、食道運動障害、手指硬化および毛細管拡張症）、成人糖尿病（タイプＩＩ糖尿病）、男性および女性の自己免疫性不妊、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、混合性結合組織疾患、結節性多発性動脈炎、全身性壊死脈管炎、若年性関節リウマチ、アトピー性皮膚炎、アトピー性鼻炎、グッドパスチャー症候群、シャーガス病、サーコイドーシス、リウマチ熱および喘息、反復流産、抗リン脂質症候群、農夫肺、多形性紅斑、心臓切開術後症候群、クッシング症候群、自己免疫性慢性活性肝炎、鳥飼育者肺、アレルギー性脳脊髄炎、中毒性表皮壊死症、アルポート症候群、歯槽骨炎、アレルギー性肺胞炎、線維化性肺胞炎、間質性肺疾患、結節性紅斑、壊疽性膿皮症、輸液反応、ハンセン病、マラリア、皮膚リーシュマニア症、トリパノソーマ症、高安動脈炎、リウマチ性多発性筋痛、側頭動脈炎、住血吸虫症、巨大細胞動脈炎、回虫症、アスペルギルス症、サンプター（Ｓａｍｐｔｅｒ）症候群、湿疹、リンパ腫様肉芽腫症、ベーチェット病、キャプラン症候群、川崎病、デング熱、脳脊髄炎、心内膜炎、心内膜心筋線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、乾癬、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シャルマン（Ｓｈｕｌｍａｎ）症候群、フェルティ（Ｆｅｌｔｙ）症候群、フィラリア症、毛様体炎、慢性毛様体炎、不整脈毛様体

炎、フック（Ｆｕｃｈ）毛様体炎、ＩｇＡネフロパシー、ヘノッホ－ショーンライン（Ｈｅｎｏｃｈ－Ｓｃｈｏｎｌｅｉｎ）紫斑病、移植片対宿主病、移植拒絶、ヒト免疫不全ウイルス感染、エコーウイルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス病感染、風疹ウイルス感染、予防接種後症候群、先天性風疹感染、イートン－ランバート症候群、再発性多発性軟骨炎、クリオグロブリン血（症）、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症（Ｗａｌｄｅｎｓｔｒｏｍ’ｓ　ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｅｍｉａ）、エプスタイン・バー・ウイルス感染、耳下腺炎、エバン症候群および自己免疫性生殖腺不全が含まれる（ただし、これらに限定されない）。

【０２５７】

したがって、本発明の方法は、Ｂリンパ球疾患（例えば、全身紅斑性狼瘡、グッドパスチャー症候群、関節リウマチおよびＩ型糖尿病）、Th_1－リンパ球疾患（例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、ショーグレン症候群、橋本甲状腺炎、グレイブ病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナー肉芽腫症、結核または急性移植片対宿主病）およびTh_2－リンパ球疾患（例えば、アトピー性皮膚炎、全身性自己免疫疾患、エリテマトーデス、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎、オーメン症候群、全身性硬化症または慢性移植片対宿主病）の治療を包含する。

【０２５８】

免疫学的疾患状態を分類する別の方法は、基本となる生物学的機構による。本発明は、次のメカニズム（それらは４つのタイプに分類される）のうちのいずれかによって発症する免疫学的疾患についての治療および予防を対象とする。

【０２５９】

アナフィラキシー反応。これらの反応は、マスト細胞上の受容体に結合するＩｇＥ抗体によって媒介される。抗原との架橋が生じる場合、ＩｇＥ抗体は、マスト細胞を刺激してアナフィラキシーの徴候特性を引き起こし得る多くの薬理学的に活性な物質を放出させる。抗原のチャレンジに対するこれらの反応は即時的で、生命に危険を及ぼす場合もある。アナフィラキシー反応の例には、アレルギー性鼻炎、胃腸アレルギー、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、および馬の気道狭窄症（ｅｑｕｉｎｅ　ｈｅａｖｅｓ）および蹄葉炎が含まれる（ただし、これらに限定されない）。

【０２６０】

細胞傷害（細胞溶解）反応。これらの細胞表面反応はＩｇＭおよび／またはＩｇＧ（補体カスケードを活性化する）と抗原との相互作用に起因し、細胞の破壊をもたらす。細胞溶解反応の例には、白血球減少症、新生児溶血性疾患およびグッドパスチャー病の溶血性疾患が含まれる（ただし、これらに限定されない）。細胞傷害／細胞溶解の反応を含む自己免疫疾患は、溶血性貧血、血小板減少症および甲状腺炎である。

【０２６１】

免疫複合反応。抗原とＩｇＧまたはＩｇＭが、大きな複合体を循環系中で、または組織中で蓄積し、補体を固定する場合、免疫複合反応が生じる。補体結合サイトへは顆粒細胞が引きつけられ、それらの小粒から損傷性の細胞溶解性酵素を放出する。この種の反応の例は血清病である。免疫複合体反応を含む自己免疫疾患は全身性紅斑性狼瘡、慢性糸球体腎炎および関節リウマチを含む。

【０２６２】

細胞媒介免疫（ＣＭＩ）反応または遅延型過敏（ＤＴＨ）。最初の３タイプの免疫反応とは対照的に、この過敏反応は、Ｂリンパ球によって産生された抗体ではなくＴリンパ球によって媒介される。活性化Ｔリンパ球は、マクロファージ、Ｋ細胞およびＮＫ細胞（それらは局所の組織損傷を引き起こす）の蓄積および活性化をもたらすサイトカインを放出する。この反応は抗原チャレンジの１～２日後に生じ得る。

【０２６３】

５．１０　遺伝子治療

特定の実施形態では、本発明のタンパク質をコードする核酸は、免疫学的疾患を治療するか、抑制するか、予防するために投与される。遺伝子治療とは、発現したかまたは発現

し得る核酸を被験体に投与することによって行われる治療を指す。本発明のこの実施形態では、核酸は、それらがコードする治療効果をもたらすタンパク質を生産する。

【０２６４】

当技術分野において利用可能な遺伝子治療用の方法のうちのいずれも本発明によって使用することができる。典型的な方法を下に記載する。

【０２６５】

遺伝子治療方法の一般的な概説については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら、１９９３、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｙ １２：４８８～５０５頁；Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ、１９９１、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７～９５頁；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ、１９９３、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３～５９６頁；Ｍｕｌｌｉｇａｎ、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：９２６～９３２頁；ＭｏｒｇａｎとＡｎｄｅｒｓｏｎ、１９９３、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１～２１７頁；Ｍａｙ、１９９３、ＴＩＢＴＥＣＨ１１、１（５）：１５５～２１５頁参照。使用することができる組み換えＤＮＡ技術の技術中で一般によく知られた方法は、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９３）；およびＫｒｉｅｇｌｅｒ、Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ（１９９０）に記載されている。

【０２６６】

好ましい態様では、治療剤は抗体をコードする核酸配列を含み、この核酸配列は、適当な宿主中で、抗体またはその断片、またはキメラタンパク質、重鎖または軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。そのような核酸配列は、特に、抗体コード領域に動作可能に連結したプロモーターを有し、このプロモーターは誘導的または構成的であり、場合によっては組織特異的である。別の特定の実施形態では、核酸分子は、抗体コード配列および他の所望の配列の側部が、ゲノム中の所望の部位で相同組み換えを促進する領域が備わっているようにして使用され、これによって抗体をコードする核酸は染色体内で発現する（（ＫｏｌｌｅｒとＳｍｉｔｈｉｅｓ、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８９３２～８９３５頁；Ｚｉｊｌｓｔｒａら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４３５～４３８頁）。特定の実施形態では、発現された抗体分子は１本鎖抗体であるか、あるいは、核酸配列は、抗体の重・軽鎖の両方をコードする配列、またはその断片を含む。

【０２６７】

患者の体中への核酸の送達は、直接的（この場合は、被験体を直接に核酸または核酸保有ベクターにさらす）、間接的（この場合には、細胞は、核酸で最初にｉｎ ｖｉｔｒｏで形質転換され、次に、患者へ移植される）のいずれでもよい。これらの２つのアプローチは、ｉｎ ｖｉｖｏ遺伝子治療またはｅｘ ｖｉｖｏ遺伝子治療として、それぞれ知られている。

【０２６８】

特定の実施形態では、核酸配列はｉｎ ｖｉｖｏで直接投与され、ｉｎ ｖｉｖｏでそれは発現し、コードされた産物を産生する。これは、当技術分野で知られた多数の方法のうちのいずれによってでも、例えば、適当な核酸発現ベクターの一部としてそれらを構築し、核酸配列が細胞内に入るようにベクターを処理することにより行うことができる。遺伝子治療ベクターは、不完全なまたは減弱されたレトロウイルスその他のウイルスベクター（例えば、米国特許第４，９８０，２８６号参照）を使用するか、むき出しのＤＮＡの直接注入；微粒子打ち込み（例えば、遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ、デュポン（Ｄｕｐｏｎｔ））の使用；脂質または細胞表面受容体またはトランスフェクト剤によるコーティング；リポソーム、微粒子またはマイクロカプセル中のカプセル化；核内に入ることが知られているペプチドに連結しての投与；受容体を媒介としたエンドサイトーシスを受けるリガンドに連結しての投与（例えば、ＷｕとＷｕ、１９８７、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．

２６２：４４２９～４４３２頁参照）（これは特に受容体を発現する細胞タイプを標的とするのに使用できる）、などを使用して感染させ投与することができる。別の実施形態では、リガンドがエンドソームを破壊する融合誘導性（ｆｕｓｏｇｅｎｉｃ）ウイルスペプチドを含む核酸－リガンド複合体を形成することができ、これにより、核酸がリソソーム分解を受けるのを回避することができる。さらに別の実施形態では、特定の受容体を標的とすることにより、核酸はｉｎ　ｖｉｖｏで細胞特異的取り込みおよび発現の標的とすることができる（例えば、国際公開ＷＯ９２／０６１８０；ＷＯ９２／２２６３５；ＷＯ９２／２０３１６；Ｗ０９３／１４１８８およびＷＯ９３／２０２２１参照）。あるいは、核酸は細胞内で導入し、相同組み換えによって発現のため宿主細胞ＤＮＡ内に組み込むことができる（ＫｏｌｌｅｒとＳｍｉｔｈｉｅｓ、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８９３２～８９３５頁；Ｚｉｊｌｓｔｒａら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ　３４２：４３５～４３８頁）。

【０２６９】

特定の実施形態では、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターを使用する。例えば、レトロウイルスベクターを使用することができる（Ｍｉｌｌｅｒら、１９９３、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：５８１～５９９頁参照）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞ＤＮＡへの組み込みに必要な成分を含む。遺伝子治療で使用される抗体をコードする核酸配列は、１つまたは複数のベクターへクローニングし、これにより、患者への遺伝子の送達を促進する。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、Ｂｏｅｓｅｎら、１９９４、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　６：２９　１～３０２頁に見ることができ、これは、幹細胞に大きな化学療法耐性を与えるために造血幹細胞にｍｄｒ１遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用について記載したものである。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例証する他の参考文献は以下のとおりである：Ｃｌｏｗｅｓら、１９９４、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９３：６４４～６５１頁；Ｋｌｅｉｎら、１９９４、Ｂｌｏｏｄ　８３：１４６７～１４７３頁；ＳａｌｍｏｎｓとＧｕｎｚｂｅｒｇ、１９９３、Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　４：１２９～１４１頁；およびＧｒｏｓｓｍａｎとＷｉｌｓｏｎ、１９９３、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌ．３：１１０～１１４頁。

【０２７０】

遺伝子治療への別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを媒介としたトランスフェクションまたはウイルス感染などの方法によって組織培養中の細胞に遺伝子（例えば、ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１遺伝子）を輸送することを含む。通常、輸送の方法は、細胞への選択可能なマーカーの輸送を含む。次いで、輸送された遺伝子を発現している細胞を単離するために、細胞を選択下に置く。次いで、それらの細胞を被験体に送達する。

【０２７１】

この実施形態では、核酸は、生じた組み換え細胞をｉｎ　ｖｉｖｏで投与する前に細胞に導入する。このような導入は、当技術分野で知られた任意の方法によって行うことができ、トランスフェクション、エレクトロポレーション、顕微注入（マイクロインジェクション）、核酸配列を含むウイルスまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体を媒介とした遺伝子導入、ミクロセル媒介遺伝子トランスファー、スフェロプラスト融合などを含む（ただし、これらに限定されない）。細胞中への外来遺伝子の導入には、多数の技術が当技術分野で知られており（例えば、ＬｏｅｆｆｌｅｒとＢｅｈｒ、１９９３、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：５９９～６１８頁；Ｃｏｈｅｎら、１９９３、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：６１８～６４４頁；Ｃｌｉｎｅ、１９８５、Ｐｈａｒｍａｃ．Ｔｈｅｒ．２９：６９～９２頁参照）、レシピエント細胞の発達や生理学上の機能を妨げない限り、本発明において使用することができる。こうした技術は、核酸を細胞に安定的に輸送させなければならない（その結果、核酸は細胞によって発現できて、好ましくはその細胞の子孫によって遺伝および発現可能なものとなる）。

【０２７２】
得られた組み換え細胞は、当技術分野で知られた様々な方法によって患者に送達することができる。好ましくは組み換え血球（例えば、造血幹細胞または前駆細胞）を静脈内に投与する。使用のために考えられる細胞の量は、目的とする効果や患者の状態などによる。また、当業者はその細胞を決定することができる。
【０２７３】
核酸を遺伝子治療の目的のために導入することが可能な細胞は、利用可能ないずれの所望の細胞タイプも包含し、繊維芽細胞；Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血球；様々な幹細胞や前駆細胞、特に造血幹細胞や前駆細胞、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などから得られるもの等を含む（ただし、これらに限定されない）。
【０２７４】
好ましい実施形態では、遺伝子治療のために使用される細胞は患者自身に由来するものである。
【０２７５】
組み換え細胞が遺伝子治療で使用される実施形態では、抗体をコードする核酸配列は、細胞またはそれらの子孫によって発現できるように細胞に導入され、次いで、組み換え細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏで治療効果を示すように投与される。特定の実施形態では、幹細胞または前駆細胞が使用される。単離することができ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで維持することができるものであれば、どのような幹細胞および／または前駆細胞も本発明の実施形態に従って使用することができる可能性がある（例えば、国際公開ＷＯ９４／０８５９８；ＳｔｅｍｐｌｅとＡｎｄｅｒｓｏｎ、１９９２、Ｃｅｌｌ　７１：９７３～９８５頁；Ｒｈｅｉｎｗａｌｄ、１９８０、Ｍｅｔｈ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏ．２１Ａ：２２９；およびＰｉｔｔｅｌｋｏｗとＳｃｏｔｔ、１９８６、Ｍａｙｏ　Ｃｌｉｎｉｃ　Ｐｒｏｃ．６１：７７１参照）。
【０２７６】
特定の実施形態では、遺伝子治療の目的で導入する核酸は、コード領域に動作可能に連結された誘導可能なプロモーターを含んでおり、それにより、核酸の発現が、適当な転写誘導剤の有無を調節することにより制御可能であるようになっている。
【０２７７】
本発明の化合物または医薬組成物は好ましくはｉｎ　ｖｉｔｒｏで試験し、次いで、ヒトで使用する前に所望の治療または予防する活性についてｉｎ　ｖｉｖｏで試験する。例えば、タンパク質または医薬組成物の治療または予防剤としての有用性を実証するｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイは、活性化リンパ球に対するそのタンパク質または医薬組成物の判定を決定することを含む。活性化リンパ球に対するタンパク質または組成物の細胞傷害作用および／または細胞静止作用は当業者に知られた技術を利用して判定することができる。あるいは、具体的なタンパク質または医薬組成物についてその投与効果が示されるかどうか決めるために使用できるｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの細胞培養を含み、ここでは、被験体から得た活性化リンパ球を含むリンパ球を培地で培養し、タンパク質または医薬組成物にさらし（また、さらさずに）、活性化リンパ球に対するそのような化合物の影響を観察する。
【０２７８】
５．１１　組成物の治療／予防のための投与
本発明は、活性化リンパ球に細胞傷害作用または細胞静止作用がある有効量のＣＤ３０－結合タンパク質（すなわち、本発明のタンパク質）、前記ＣＤ３０－結合タンパク質をコードする核酸（すなわち、本発明の核酸）または本発明のタンパク質もしくは核酸を含む医薬組成物（以下、本発明の医薬剤）を被験体に投与することによる、治療および予防方法を提供する。
【０２７９】
本発明の治療および予防方法の結果は、患者において少なくとも健康上の利益（以下を

含むが、これらに限定されない：患者の延命、免疫障害症状の発症を遅らせること、および／または発症後に免疫障害の症状を緩和すること）を生じることである。そのような健康上の利益は、疾患の進行を抑制しかつ／または疾患の徴候を軽減することができる。

【０２８０】

本明細書で使用する場合、「予防」という用語は、問題とする免疫疾患の徴候または分子レベルでの前兆が出る前に、患者に（例えば、問題とする免疫疾患の素因をもった、または免疫疾患に罹患するリスクの高い個人に）本発明のタンパク質または核酸の投与することを指す。対照的に、「治療」という用語は、免疫疾患の症状または分子レベルでの前兆が出た後のどのような臨床段階であっても、本発明のタンパク質または核酸を患者に投与することを指す。

【０２８１】

好ましい実施形態では、本発明のタンパク質はモノクローナル抗体ＡＣ１０もしくはＨｅＦｉ－１、またはそれらの断片か誘導体である。好ましい態様では、本発明の医薬剤は実質的に精製された（例えば、その結果を制限するか、望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）本発明のタンパク質または核酸を含む。

【０２８２】

被験体は好ましくは動物であり、好ましくは哺乳動物であって、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどを含む（ただし、これらに限定されない）。最も好ましくは、被験体はヒトである。

【０２８３】

使用することができる処方(製剤)および投与方法は上に記載されている。これ以外の適当な処方および投与ルートは本明細書において下に記載するものの中から選択できる。

【０２８４】

様々な送達システムが知られており、本発明の核酸またはタンパク質を投与するために使用することができる（例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、化合物を発現することができる組み換え細胞、受容体を媒介としたエンドサイトーシス（例えば、ＷｕとＷｕ、１９８７、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９～４４３２頁参照）、レトロウイルスまたは他のベクターなどの一部としての核酸の構築など）。導入方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口での経路が含まれるが、これらに限定されない。本発明の核酸およびタンパク質は、任意の便利なルートによって、例えば、点滴やボーラス注射によって、上皮または粘膜裏面（例えば、口内粘膜、直腸や腸の粘膜など）による吸収によって投与してもよいし、化学療法剤などの他の生物学に活性な薬剤と共に投与してもよい（５．２．１節参照）。投与は全身的でもよいしまたは局所的でもよい。

【０２８５】

特定の実施形態では、注入により、カテーテルにより、坐薬により、またはインプラントにより核酸またはタンパク質を投与することが望ましいかもしれない。前記インプラントは、多孔性、非多孔性、ゼラチン状材料でもよいし、あるいは、弾性膜などの膜や繊維を含む。本発明のタンパク質（抗体を含む）を投与する場合、好ましくは、タンパク質を吸収しない材料を用いるように注意すべきである。

【０２８６】

別の実施形態では、化合物または組成物は小胞、特にリポソーム中に入れて送達することができる（例えば、Ｌａｎｇｅｒ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７～１５３３頁；Ｔｒｅａｔｓ、１９８９、ｉｎ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ、Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｆｉｄｌｅｒ（編）、Ｌｉｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、３５３～３６５頁；Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ、前掲、３１７～３２７頁参照；一般的には前掲書参照）。

【０２８７】

さらに別の実施形態では、化合物または組成物は徐放性システムで送達することができ

る。１つの実施形態では、ポンプを使用してもよい（前掲のＳｅｆｔｏｎ、１９８９、ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１；Ｂｕｃｈｗａｌｄら、１９８０、Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７；Ｓａｕｄｅｋら、１９８９、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４参照）。別の実施形態では、高分子材料を使用することができる（Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ、１９７４、Ｌａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｗｉｓｅ（編）、ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．、Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ、Ｆｌｏｒｉｄａ；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ、Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ、１９８４、ＳｍｏｌｅｎとＢａｌｌ（編）、Ｗｉｌｅｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｒａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｐｅｐｐａｓ、１９８３、Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３：６１；およびＬｅｖｙら、１９８５、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１９０；Ｄｕｒｉｎｇら、１９８９、Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．２５：３５１；Ｈｏｗａｒｄら、１９８９、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７１：１０５参照）。

【０２８８】

他の徐放性システムは、Ｌａｎｇｅｒ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７～１５３３頁による総説で議論される。

【０２８９】

本発明の核酸を投与する特定の実施形態では、核酸は適当な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築しそれが細胞内に入るようにｉｎ ｖｉｖｏで投与すること、例えば、レトロウイルスベクター（米国特許第４，９８０，２８６号参照）の使用によって、または直接の注入によって、または微粒子打ち込み（例えば遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ、デュポン（Ｄｕｐｏｎｔ））の使用によって、または脂質または細胞表面受容体またはトランスフェクト剤によるコーティング、またはホメオボックス様ペプチド（これは、核内に入ることが知られている（例えば、Ｊｏｌｉｏｔら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１８６４～１８６８頁）に連結してそれを投与することによって、それがコードするタンパク質の発現を促進することができる。あるいは、細胞内に核酸を導入し、相同組み換えによって発現のために宿主細胞ＤＮＡ内に組み込むことができる。

【０２９０】

上に示唆したように、本発明はさらに医薬組成物（本発明の医薬剤）を提供する。そのような組成物は、治療上有効な量の本発明の核酸またはタンパク質、および薬学的に許容できる担体を含む。特定の実施形態では、「薬学的に許容できる」という用語は、連邦政府の管轄機関または州政府によって承認されているか、米国薬局方その他一般に、動物での使用、特にヒトにおける使用のための調剤書と認識されているものにリストされていることを意味する。「担体」という用語は、それによって治療剤が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。このような製薬上の担体は、無菌の液体、例えば、水および油であり、石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、胡麻油その他を含む。医薬組成物を静脈内で投与する場合、水は好ましい担体である。食塩溶液およびデキストロース水溶液およびグリセリン溶液も特に注射可能な溶液のために液体の担体として使用することができる。適当な製薬上の賦形剤は、デンプン、グルコース、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセリンモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセリン、プロピレングリコール、水、エタノールなどを含む。組成物はまた、必要であれば、小量の湿潤剤、または乳化剤、ｐＨ緩衝剤を含むことができる。これらの組成物は、溶液、懸濁、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル、パウダー、徐放性製剤その他の形態をとることができる。組成物は、慣用の結合剤、およびトリグリセリドなどの担体と共に坐薬として製剤化することができる。経口製剤は、製薬等級のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。適当な製薬の担体の例はＥ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎ著「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎ

ｃｅｓ」に記載されている。そのような組成物は、被験体に投与するのに適当な形態とするために、適当量の担体と一緒に、治療上有効な量の本発明の核酸またはタンパク質（好ましくは精製した形で）を含むであろう。製剤は、投与形態に適したものとするべきである。

【０２９１】

好ましい実施形態では、本発明の医薬剤は、ヒトへの静脈内投与に適した医薬組成物として慣用の手順に従って製剤化する。典型的には、静脈内投与用の組成物は無菌の等張性水性緩衝液である。必要であれば、本発明の医薬剤は、可溶化剤および注入部位での痛みを緩和するためにリグノカインなどの局所麻酔薬を含んでもよい。一般に、成分は、別々に提供されるか、単位剤形で、例えば、無水の凍結乾燥パウダーまたは活性物質の量を表示したアンプルや小袋などの気密封止容器内に無水高濃度液としてまたは単位剤形で互いに混合状態で提供する。本発明の医薬剤を点滴によって投与する場合、それは無菌の製薬等級の水または食塩水を含む点滴瓶で小分けすることができる。本発明の医薬剤を注射で投与する場合、注射用の無菌水または生理食塩水アンプルを提供し、投与の前に成分を混合できるようにしてもよい。

【０２９２】

標準的な臨床技術によって、免疫学的疾患の治療または予防に有効な本発明の核酸またはタンパク質の量を決定できる。さらに、場合によっては、ｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイを用いて最適の投薬量範囲を同定する助けとしてもよい。製剤化で使用する正確な用量は、投与経路および免疫学的疾患の段階にも依存し、医師の判断および各被験体の状況に応じて決定すべきである。有効用量はｉｎ　ｖｉｔｒｏの動物モデル試験システムから得た投与応答曲線から外挿することができる。

【０２９３】

５．１２　免疫学的疾患の治療のための併用療法

本発明の核酸およびタンパク質は、免疫学的疾患の治療および予防のため、１種または複数の細胞静止剤、細胞傷害性薬剤および／または免疫抑制剤と一緒に投与することができる。さらに、併用治療は、活性化リンパ球表面上のＣＤ３０以外の受容体または受容体複合体を標的とする薬剤の投与を含んでもよい。そのような薬剤の例は、活性化リンパ球の表面で分子に結合する、第２の、つまり、非ＣＤ３０抗体である。別の例はそのような受容体または受容体複合体を標的とするリガンドである。好ましくは、このような抗体またはリガンドは、活性化リンパ球上の細胞表面受容体に結合し、活性化リンパ球に細胞静止性または細胞傷害シグナルを送達することにより、抗ＣＤ３０抗体の細胞傷害作用または細胞静止作用を増強する。

【０２９４】

このような併用投与は疾患パラメーターに対して付加的または相乗的な効果を有し得る。

【０２９５】

治療レジメに関して、特定の実施形態では、本発明の核酸またはタンパク質は、リンパ球の細胞表面受容体または受容体複合体を標的とする免疫抑制剤または分子と同時に投与する。別の特定の実施形態では、免疫抑制剤またはリンパ球の細胞表面受容体を標的とする薬剤を、本発明の核酸またはタンパク質の投与前または投与後、少なくとも１時間から数カ月（例えば、少なくとも１時間、５時間、１２時間、１日、１週、１カ月、３カ月）に投与する。

【０２９６】

５．１２．１　免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤および細胞静止剤

本発明の併用治療法を実施するための免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤の有用な種類は、以下の互いに排他的ではない薬剤種を含む：アルキル化剤、アントラサイクリン類、抗生物質、抗葉酸類、代謝拮抗剤、抗チューブリン剤、オーリスタチン類、化学療法増感剤、ＤＮＡ副溝結合剤、ＤＮＡ複製阻害剤、デュオカルマイシン類、エトポシド類、フッ素化ピリミジン類、レキシトロプシン類、ニトロソ尿素類、プラチノール類、

プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド類、タキサン類、トポイソメラーゼ阻害剤、ビンカアルカロイド（ただし、これらに限定されない）。

【０２９７】

本発明によって包含される個々の免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤は、男性ホルモン、アントラマイシン（ＡＭＣ）、アスパラギナーゼ、５－アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ブスルファン、ブチオニン、スルホキシミン、カンプトテシン、カルボプラチン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）、ＣＣ－１０６５、クロラムブチル、シスプラチン、コルヒチン、シクロホスファミド、シタラビン、シチジンアラビノシド、サイトカラシンＢ、デカルバジン、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ダウノルビシン、デカルバジン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エストロゲン、５－フルオロデオキシウリジン、５－フルオロウラシル、グラミシジンＤ、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、メクロレタミン、メルファラン、６－メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシンＣ、ミトキサトロン、ニトロイミダゾール、パクリタキセル、プリカマイシン、プロカルビジン、ストレプトゾトシン、テポノシド、６－チオグアニン、チオＴＥＰＡ、トポテカン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンオレルビン、ＶＰ－１６、ＶＭ－２６を含む（ただし、これらに限定されない）。

【０２９８】

好ましい実施形態では、免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤は代謝拮抗剤である。代謝拮抗剤は、プリンアンタゴニスト（例えばアゾチオプリン、ミコフェノレートモフェチル）、ジヒドロ葉酸還元酵素抑制剤（例えば、メトトレキサート）、アシクロビル、ガングシクロビル、ジドブジン、ビダラビン、リババリン、アジドチミジン、シチジン・アラビノシッド、アマンタジン、ジデオキシウリジン、ヨードデオキシウリジン、ポスカルネットおよびトリフルウリジンであり得る。

【０２９９】

別の好ましい実施形態では、免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤は、タクロリムス、シクロスポリンまたはラパマイシンである。

【０３００】

別の好ましい実施形態では、免疫抑制剤は、グルココルチコイドまたはグルココルチコイドの類似体である。本発明の方法において有用なグルココルチコイドの例は、コルチゾールとアルドステロンを含む。本発明の方法において有用なグルココルチコイド類似体の例はプレドニゾンとデキサメタゾンを含む。

【０３０１】

さらに別の好ましい実施形態では、免疫抑制剤は、アリールカルボン酸誘導体からなるもの、ピラゾール含有誘導体、オキシカム含有誘導体およびニコチン酸誘導体などの抗炎症剤である。本発明の方法において有用な抗炎症剤のクラスには、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、５－リポキシゲナーゼ阻害剤およびロイコトリエン受容体アンタゴニストを含む。

【０３０２】

適当なシクロオキシゲナーゼ阻害剤はメクロフェナム酸、メフェナム酸、カルプロフェン、ジクロフェナク（ｄｉｃｌｏｆｅｎａｃ）、ジフルニサル（ｄｉｆｌｕｎｉｓａｌ）、フェンブフェン（ｆｅｎｂｕｆｅｎ）、フェノプロフェン（ｆｅｎｏｐｒｏｆｅｎ）、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン（ｋｅｔｏｐｒｏｆｅｎ）、ナブメトン（ｎａｂｕｍｅｔｏｎｅ）、ナプロキセン、スリンダック、テノキシカム（ｔｅｎｏｘｉｃａｍ）、トルメチン（ｔｏｌｍｅｔｉｎ）およびアセチルサリチル酸が含まれる。

【０３０３】

適当なリポキシゲナーゼ阻害剤は、酸化還元反応阻害剤（例えばカテコール・ブタン誘導体、ノルジヒドログアヤレト（ｎｏｒｄｉｈｙｄｒｏｇｕａｉａｒｅｔｉｃ）酸（ＮＤＧＡ）、マソプロコール（ｍａｓｏｐｒｏｃｏｌ）、フェニドン（ｐｈｅｎｉｄｏｎｅ）、イアノパレン（Ｉａｎｏｐａｌｅｎ）、インダゾリノン類、ナファザトロム（ｎａｐｈ

ａｚａｔｒｏｍ）、ベンゾフラノール、アルキルヒドロキシルアミン）、および非酸化還元反応阻害剤（例えば、ヒドロキシチアゾール類、メトキシアルキルチアゾール類、ベンゾピラン類およびその誘導体、メトキシテトラヒドロピラン、ボスウェル（ｂｏｓｗｅｌｌｉｃ）酸、およびボスウェル酸のアセチル化誘導体、シクロアルキル残基で置換されたキノリンメトキシフェニル酢酸）ならびに酸化還元反応阻害剤の前駆体を含む。

【０３０４】

他の適当なリポキシゲナーゼ阻害剤は、酸化防止剤（例えば、フェノール、没食子酸プロピル、フラボノイド、および／またはフラボノイドを含む天然基質、フラボン類のヒドロキシル化された誘導体、フラボノール、ジヒドロケルセチン、ルテオリン、ガランギン、オロボール（ｏｒｏｂｏｌ）、チャルコーン（ｃｈａｌｃｏｎｅ）の誘導体、４，２’，４’－トリヒドロキシチャルコーン、オルト－アミノフェノール類、Ｎ－ヒドロキシ尿素、ベンゾフラノール類、エブセレン（ｅｂｓｅｌｅｎ）および還元性セレノ酵素の活性を増大させる種）、鉄キレート剤（例えば、ヒドロキサム酸およびその誘導体、Ｎ－ヒドロキシ尿素、２－ベンジル－１－ナフトール、カテコール類、ヒドロキシルアミン類、ｃａｒｎｏｓｏｌ ｔｒｏｌｏｘ Ｃ、カテコール、ナフトール、スルファサラジン（ｓｕｌｆａｓａｌａｚｉｎｅ）、ザイリュートン（ｚｙｌｅｕｔｏｎ）、５－ヒドロキシアントラニル酸および４－（オメガ－アリールアルキル）フェニルアルカン酸）、イミダゾール含有化合物（例えば、ケトコナゾールおよびイトラコナゾール）、フェノチアジンおよびベンゾピラン誘導体を含む。

【０３０５】

さらに他の適当なリポキシゲナーゼ阻害剤は、エイコサノイド類（例えば、オクタデカテトラエン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサヘキサエン酸、およびドコサヘキサエン酸およびそれらのエステル、ＰＧＥ１（プロスタグランジンＥ１）、ＰＧＡ２（プロスタグランジンＡ２）、ビプロストール（ｖｉｐｒｏｓｔｏｌ）、１５－モノヒドロキシエイコサテトラエン酸、１５－モノヒドロキシエイコサトリエン酸および１５－モノヒドロキシエイコサペンタエン酸、およびロイコトリエンＢ５、Ｃ５およびＤ５）の阻害剤、およびカルシウム流動の妨害剤、フェノチアジン、ジフェニルブチルアミン類、ベラパミル、フスコシド（ｆｕｓｃｏｓｉｄｅ）、クルクミン、クロロゲン酸、カフェー酸、５，８，１１，１４－エイコサテトライエン（ｅｉｃｏｓａｔｅｔｒａｙｅｎｏｉｃ）酸（ＥＴＹＡ）、ヒドロキシフェニルレチナミド（ｈｙｄｒｏｘｙｐｈｅｎｙｌｒｅｔｉｎａｍｉｄｅ）、イオナパレン（Ｉｏｎａｐａｌｅｎ）、エスクリン、ジエチルカルバマジン、フェナントロリン、バイカレイン（ｂａｉｃａｌｅｉｎ）、プロキシクロミル（ｐｒｏｘｉｃｒｏｍｉｌ）、チオエーテル類、ジアリル・スルフィドおよびジ（１－プロペニル）スルフィドを含む。

【０３０６】

ロイコトリエン受容体アンタゴニストは、カルシトリオールおよびオンタゾラスト（ｏｎｔａｚｏｌａｓｔ）、Ｂａｙｅｒ Ｂａｙ－ｘ－１００５、Ｃｉｂａ－Ｇｅｉｇｙ ＣＧＳ－２５０１９Ｃ、エブセレン、Ｌｅｏ Ｄｅｎｍａｒｋ ＥＴＨ－６１５、Ｌｉｌｌｙ ＬＹ－２９３１１１、Ｏｎｏ ＯＮＯ－４０５７、Ｔｅｒｕｍｏ ＴＭＫ－６８８、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｉｎｇｌｅｈｅｉｍ ＢＩ－ＲＭ－２７０、Ｌｉｌｌｙ ＬＹ ２１３０２４、Ｌｉｌｌｙ ＬＹ ２６４０８６、Ｌｉｌｌｙ ＬＹ ２９２７２８、Ｏｎｏ ＯＮＯ ＬＢ４５７、Ｐｆｉｚｅｒ １０５６９６、Ｐｅｒｄｕｅ Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ ＰＦ １００４２、Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ ＲＰ ６６１５３、ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ ＳＢ－２０１１４６、ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ ＳＢ－２０１９９３、ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ ＳＢ－２０９２４７、Ｓｅａｒｌｅ ＳＣ－５３２２８、Ｓｕｍｉｔａｍｏ ＳＭ １５１７８、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｈｏｍｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ ＷＡＹ １２１００６、Ｂａｙｅｒ Ｂａｙ－ｏ－８２７６、Ｗａｒｎｅｒ－Ｌａｍｂｅｒｔ ＣＩ－９８７、Ｗａｒｎｅｒ－Ｌａｍｂｅｒｔ ＣＩ－９８７ＢＰＣ－１５ＬＹ ２２３９８２、Ｌｉｌｌｙ ＬＹ ２３３５６９、Ｌｉｌｌｙ ＬＹ－２５５２８３、ＭａｃｒｏＮｅｘ ＭＮＸ－１６

０、Ｍｅｒｃｋ ａｎｄ Ｃｏ．ＭＫ－５９１、Ｍｅｒｃｋ ａｎｄ ＣＯ．ＭＫ－８８６、Ｏｎｏ ＯＮＯ－ＬＢ－４４８、Ｐｕｒｄｕｅ Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ ＰＦ－５９０１、Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ ＲＧ １４８９３、Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ ＲＰ ６６３６４、Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ ＲＰ ６９６９８、Ｓｈｉｏｎｏｏｇｉ Ｓ－２４７４、Ｓｅａｒｌｅ ＳＣ－４１９３０、Ｓｅａｒｌｅ ＳＣ－５０５０５、Ｓｅａｒｌｅ ＳＣ－５１１４６、Ｓｅａｒｌｅ ＳＣ－５２７９８、ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ ＳＫ＆Ｆ－１０４４９３、Ｌｅｏ Ｄｅｎｍａｒｋ ＳＲ－２５６６、Ｔａｎａｂｅ Ｔ－７５７ およびＴｅｉｊｉｎ ＴＥＩ－１３３８を含む。

【０３０７】

本発明のある好ましい実施形態では、免疫抑制性剤、細胞傷害性薬剤または細胞静止剤は、別々に投与されるのではなく本発明の抗体にコンジュゲートする。本発明の方法において有用な抗体－薬剤コンジュゲートは、上記５．６節に記載されている。

【０３０８】

５．１２．２ リンパ球受容体ターゲティング剤

本発明の併用方法において特に有用な薬剤は、リンパ球細胞表面へ結合する分子、好ましくはＣＤ３０とは異なる受容体または受容体複合体に対して結合する分子である。ＣＤ３０に加えて、リンパ球表面上で発現された種々様々の受容体または受容体複合体が、様々なリンパ球サブセットの増殖、分化および機能の調節に関与している。そのような分子は、例えば、活性化リンパ球に追加的な細胞増殖抑止シグナルまたは細胞傷害シグナルを与えるべく標的とすることができる。

【０３０９】

１つの実施形態では、ＣＤ３０を並んで標的とするための適当な受容体は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーである、これは、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１およびＩＣＯＳを含むが、これらに限定されない（Ｂａｒｃｌａｙら、１９９７、Ｔｈｅ Ｌｅｕｃｏｃｙｔｅ Ａｎｔｉｇｅｎ ＦａｃｔｓＢｏｏｋ、２ｎｄ ｅｄ、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；ＣｏｙｌｅとＧｕｒｔｉｅｒｒｅｚ－Ｒａｍｏｓ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：２０３～２０９頁）。別の実施形態では、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーを標的とすることができる。これは、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢ、ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４、またＡＰＯ－３を含むが、これらに限定されない（Ｌｏｃｋｓｌｅｙら、２００１、Ｃｅｌｌ、１０４、４８７～５０１頁）。さらに別の実施形態では、インテグリンを標的とすることができる。これは、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３およびＣＤ１０４を含むが、これらに限定されない（Ｂａｒｃｌａｙら、１９９７、Ｔｈｅ Ｌｅｕｃｏｃｙｔｅ Ａｎｔｉｇｅｎ ＦａｃｔｓＢｏｏｋ、２ｎｄ ｅｄ、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）。さらに別の実施形態では、ＣＤ３０に加えて標的とするための適当な受容体はサイトカイン受容体（Ｆｉｔｚｇｅｒａｌｄら、２００１、Ｔｈｅ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｆａｃｔｓｂｏｏｋ、２ｎｄ ｅｄ、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）、ケモカイン受容体（ＬｕｔｈｅｒとＣｙｓｔｅｒ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：１０２～１０７頁、ＧｅｒａｒｄとＲｏｌｌｉｎｓ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：１０８～１１５頁）、主要組織適合性タンパク質、レクチン（Ｃ－タイプ、Ｓ－タイプまたはＩ－タイプ）または補体制御タンパク質である。

【０３１０】

１つの実施形態では、これらの非ＣＤ３０受容体または受容体複合体に結合する薬剤は、活性化リンパ球に細胞静止シグナルまたは細胞傷害シグナルを送達することによりＣＤ

３０結合剤（例えば抗ＣＤ３０抗体）の細胞傷害作用または細胞静止作用を増強する。本発明の抗ＣＤ３０分子との組合せによれば、標的とされたリンパ球中では増殖阻害またはアポトーシスに対する追加的または相乗的な効果を達成することができる。

【０３１１】

別の実施形態では、これらの受容体または受容体の複合体に対する薬剤は、それ自体が増殖阻害剤またはアポトーシス剤である必要はなく、ＣＤ３０結合剤と組み合わさって、ＣＤ３０結合剤単独で引き起こされる以上の増殖阻害またはアポトーシスに対する増強効果を達成できる。ある特定の実施形態では、所与の量または濃度のＣＤ３０結合剤の細胞静止作用または細胞傷害活性に対して、増強効果はほぼ５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、７５％、または１００％以上の増強である。１つの実施形態では、増強効果は、ＣＤ３０結合剤のED_{50}のおよそ５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、７５％の減少として示され、すなわち、同じ細胞傷害作用または細胞静止作用を達成できるＣＤ３０結合剤の量は、ＣＤ３０以外の受容体または受容体の複合体に結合するそのような薬剤の投与がない状態で、同じ細胞傷害作用または細胞静止作用を達成するのに必要な量より少なくなる。

【０３１２】

１つの実施形態では、本発明の方法による非ＣＤ３０受容体または受容体複合体のターゲティングは、リガンドの投与により達成され得る。

【０３１３】

別の実施形態では、ターゲティングは、受容体または受容体複合体に対する抗体の投与により達成され得る。抗体は、上記５．１節および５．４節で記載したポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、エピトープ結合抗体断片または抗ＣＤ３０誘導体と等価な別のタイプの抗体誘導体であり得る。ある特定の実施形態では、５．１節および５．４節で記載したように、抗体は多価抗体またはＣＤ３０結合部分を含むヘテロコンジュゲートである。

【０３１４】

当業者には認識されるように、抗ＣＤ３０との同時投与に適した多数の抗体が、当技術分野で知られている。下にそのような抗体の典型的な例を挙げる（ただし、これらに限定されない）：抗ＣＤ２抗体はＢＴＩ－３２２（Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ）およびＵＭＣＤ２を含む；抗ＣＤ３抗体はＯＫＴ３、「ＳＭＡＲＴ」抗ＣＤ３（Ｎｕｖｉｏｎ（商標）；Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ＦＮ１８、ＵＣＨＴ１、１４５－２Ｃ１１およびＨＩＴ３ａを含む；抗ＣＤ５抗体はＨＩ２１１（６Ｔ－００３）、ＨＩＳＭ２（６Ｔ－００４）、ＭＥＭ－１２８（６Ｔ－０１４）、７．８（６Ｔ－０８０、ＯＫＴ１、ＵＣＨＴ２およびＢＬ１ａを含む；抗ＣＴＬＡ－４抗体は１１Ｄ４、１０Ａ８、７Ｆ８、４Ｆ１０、ＡＮＣ１５２．２／８Ｈ５およびＢＮＩ３．１を含む；また抗ＰＤ－１は抗体Ｊ４３を含む。

【０３１５】

多数の受容体または受容体の複合体に対して天然リガンドもわかってきている（Ｂａｒｃｌａｙら、１９９７、Ｔｈｅ Ｌｅｕｃｏｃｙｔｅ Ａｎｔｉｇｅｎ ＦａｃｔｓＢｏｏｋ、２版、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｏｙｌｅ ａｎｄ Ｇｕｒｔｉｅｒｒｅｚ－Ｒａｍｏｓ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：２０３～２０頁；Ｌｏｃｋｓｌｅｙら、２００１、Ｃｅｌｌ １０４：４８７～５０１頁）。下記にそのようなリガンドの例を挙げる（ただし、これらに限定されない）：ＬＦＡ－３（ＣＤ２に対するリガンド）；ＣＤ８０およびＣＤ８６（ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４に対するリガンド）；ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２（ＰＤ－１に対するリガンド）；Ｂ７ＲＰ－１（ＩＣＯＳに対するリガンド）；ＣＤ７０（ＣＤ２７に対するリガンド）；ＣＤ１５４（ＣＤ４０に対するリガンド）；ＦａｓＬ（ＣＤ９５／Ｆａｓに対するリガンド）；ＴＮＦα（ＴＮＦ－Ｒ１およびＴＮＦ－Ｒ２に対するリガンド）；ＴＲＡＮＣＥ（ＲＡＮＫに対するリガンド）、ＡＰＲＩＬ（ＴＡＣＩに対するリガンド）；ＢＬＹＳ（ＢＣＭＡに対するリガンド）、ＴＲＡＩＬ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、－Ｒ２、－Ｒ３およびＲ４に対するリガンド）；お

よびＴＷＥＡＫ（ＡＰＯ－３に対するリガンド）。

【０３１６】

５．１３　有効投与量

本発明のタンパク質および組成物の毒性および治療効果は、細胞培養または実験の動物での標準的な薬学的手順、例えば、LD_{50}（集団の５０％が致死する用量）、およびED_{50}（集団の５０％に治療上有効な効果がある用量）により決定することができる。毒性と治療効果の間の用量比が治療指数であり、比率LD_{50}/ED_{50}としてそれを表現することができる。より大きな治療指数を示すタンパク質が好ましい。有毒な副作用を示すタンパク質を使用してもよい場合は、感染の影響を受けた組織部位を標的としてそのようなタンパク質を送達するシステムを設計して感染していない細胞への潜在的な損害を最小限にし、副作用を低減するべきである。

【０３１７】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを使用して、ヒトで使用する投薬量範囲を配合することができる。そのようなタンパク質の投与量は、好ましくはED_{50}以下を含む血中濃度となる範囲である。投与量は、この範囲内で、使用した投薬形式および利用する投与経路に依存して変わり得る。本発明の方法で使用する任意の化合物について、治療上有効な投与量はまず、細胞培養アッセイから評価することができる。細胞培養において決定されたIC_{50}（すなわち、最大で症状の半数の阻害を達成する試験化合物濃度）を含む循環血中の血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルに投薬量を処方してもよい。そのような情報は、より正確にヒト中の有用な用量を決定するために使用することができる。血漿中濃度は例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定できる。

【０３１８】

一般に、免疫学的疾患患者に投与された本発明の医薬剤中の本発明のタンパク質の投与量は、典型的には患者の体重に対し０．１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇである。好ましくは、患者に投与される投与量は、患者の体重に対し０．１ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇの間、より好ましくは１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇまでである。一般に、外来タンパク質には免疫反応があるため、ヒト抗体は、他の種からの抗体より人体内で長い半減期を有する。したがって、多くの場合、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体の投与量は低くてもよいし投与回数も少なくてよい。

【０３１９】

５．１４　製剤

本発明に従って使用する医薬組成物は、１種または複数の生理学的に許容できる担体または賦形剤を使用して、慣用の方法で製剤化できる。本発明の抗ＣＤ３０抗体を含む医薬組成物はさらに、上記５．１２．２節に記載した抗体などの第２の抗体または上記５．１２．１節で挙げた免疫抑制剤などの免疫抑制剤を含む。

【０３２０】

したがって、タンパク質および生理学的に許容されるそれらの塩類および溶媒和物は、吸入すなわち通気（口または鼻のいずれかを通って）による投与または経口、バッカル、非経口、直腸の投与に対して処方してもよい。

【０３２１】

経口投与については、医薬組成物は、慣用の手段によって、結合剤（例えば、予めゲル化させてあるコーンスターチ、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピル・メチルセルロース）などの薬学的に許容できる賦形剤；充填剤（例えば、乳糖、微晶質セルロースまたはリン酸水素カルシウム）潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、滑石または珪酸）；崩壊剤（例えば、ポテト・スターチまたはナトリウムスターチグリコレート）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）と共に、例えば、錠剤またはカプセルの形を取ることができる。錠剤は、当技術分野においてよく知られている方法によってコーティングしてもよい。経口投与用の液体製剤は、例えば、溶液、シロップまたは懸濁液の形式をとることができ、または、その使用前に水または他の適当なビヒクルで構成する乾燥した製品として提供することもできる。そのような液体製剤は、懸濁剤（例えば、

ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または水素化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアラビアゴム）；非水性のビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコールまたは分留によって得られた植物油）；および保存剤（例えば、メチルまたはプロピル－ｐ－ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）などの薬学的に許容できる添加剤と共に慣用の手段によって調製することができる。適当であれば、製剤はさらに緩衝塩類、香味剤、着色料、および甘味剤を含んでもよい。

【０３２２】

経口投与製剤は活性な化合物に徐放性を与えるように製剤化するのが適している。

【０３２３】

バッカル投与のためには、組成物が、従来の方法で製剤化された錠剤またはトローチ剤の形を取ることができる。

【０３２４】

吸入による投与のためには、本発明により使用するタンパク質は、従来通り、適当な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素その他の適当なガスを使用した加圧充填物またはネビュライザーからのエアロゾル・スプレーの形で提供するのが便利である。加圧エアロゾルの場合、一定量を送達するためにバルブを設けることにより投与ユニットを決定してもよい。吸入器や通気器で使用する例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジは、化合物のパウダーミックス、および乳糖またはデンプンなどの適当なパウダーベースを含んで処方してもよい。

【０３２５】

タンパク質は、非経口投与のために、注入によって、例えば、ボーラス注入か連続点滴によって投与してもよい。注入のための製剤は、例えば、アンプルや多数回投与用容器に入れて単位剤形の形で提供してもよいし、保存剤を添加してもよい。組成物は、油性または水性ビヒクル中における懸濁液、溶液または乳剤などの形をとることができるし、懸濁剤、安定剤および／または分散剤などの製剤化剤を含んでもよい。あるいは、活性成分は、使用前に、適当なビヒクル（例えば、発熱素を含まない滅菌水）で構成するためのパウダー形式でもよい。

【０３２６】

タンパク質は、例えば、カカオ脂または他のグリセリドのような慣用の坐薬基剤を含む坐薬または保持浣腸剤のような直腸組成物として製剤化することもできる。

【０３２７】

これまでに記載した製剤に加え、タンパク質は、デポー製剤として製剤化することもできる。そのような長期処方は、埋込み（例えば、皮下にまたは筋肉内に）によって、または筋肉注射によって投与できる。したがって、例えば、タンパク質は、適当な重合体または疎水性材料（例えば、許容される油中乳剤としての）またはイオン交換樹脂と共に、または難溶性誘導体、例えば、難溶性塩として処方してもよい。

【０３２８】

組成物は、必要であれば、活性成分を含む１または複数のユニット剤形を含むパックまたはディスペンサー装置に入れて提供してもよい。パックは、例えばブリスターパックのような、金属またはプラスチック箔を含む。パックまたはディスペンサー装置には、好ましくはヒトへの投与のために説明書きを付けてもよい。

【０３２９】

本発明は、本願明細書に記載した特定の実施形態によってその範囲が制限されるものではない。実際に、当業者には、本願明細書で記載したものに加えて、上記記載および添付図面から本発明の様々な改変は明らかであろう。そのような改変は、添付する特許請求の範囲以内にあるものと意図される。

【０３３０】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、これらは、本発明の範囲を限定するように意図するものではない。

【実施例１】
【０３３１】
６．ジャーカット・ヒトＴリンパ球系統上でのＣＤ３０の発現
ジャーカット細胞系統は、ＣＤ３／Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）複合体およびＴ細胞機能にかかわる他の重要な付属分子を発現する急性Ｔ白血病細胞系統である。本来のジャーカット細胞系統に由来するサブラインは、多数の受容体系（例えばＣＤ３／Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ））によって媒介されるシグナル経路を解明するためのモデル系として広範囲に用いられてきた。表面受容体への結合で開始されるジャーカットＴ細胞における多数のシグナル経路は、抗原チャレンジにさらされた正常なＴリンパ球で起こることが証明されている。ジャーカットＴ細胞は、ＣＤ３０を検出可能なレベルに構成的に発現すること（図１）が見出されており、したがって、それらは活性化リンパ球の中でのＣＤ３０の機能を検討するモデルシステムとなり得る。
【実施例２】
【０３３２】
７．抗ＣＤ３０　ｍＡＢで阻害されたＤＮＡ合成によるジャーカットＴ細胞でのＣＤ３０の架橋
ジャーカットＴ細胞の増殖に対する抗ＣＤ３０によるＣＤ３０を介したシグナル伝達作用を、トリチウムを含むチミジン（^{3}Ｈ－ＴｄＲ）組み込みアッセイによって評価した。ジャーカット細胞を、可溶性の抗ＣＤ３０の投与量を段階的に変えながら処理するか、または第２架橋抗体（Ａｂ）により抗ＣＤ３０架橋した。ｃＡＣ１０の第２架橋のために、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）をヤギ抗ヒト（ＧＡＭ）ＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｏｖｅ、ＰＡ）のＦ（ａｂ’）$_{2}$断片と培地（ＲＰＭＩ－１６４０、１０％ＦＢＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１ｍＭピルビン酸ナトリウムおよび０．１ｍＭ非必須アミノ酸）中で混合した。ネズミ科の抗ＣＤ３０ｍＡｂ（ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１）の第２架橋のためには、ｍＡｂを培地中でヤギ抗マウス（ＧＡＭ）ＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）のＦ（ａｂ’）$_{2}$断片と混合した。１次ｍＡｂと第２架橋抗体との間で１：２．５、１：５および１：１０の最終比を用いた。抗体カクテルは、室温で１５分間インキュベートした。次いで、培地中のこれらの抗体カクテルを連続的に希釈した希釈液を調製し、所望の最終濃度を達成した。次いで、抗体カクテル１００μｌを５０００個の細胞を含む１００μｌジャーカット細胞懸濁液と９６穴組織培養（ＴＣ）プレート中で混合した。細胞を抗体カクテルと４４時間インキュベートした後、１μＣｉの^{3}Ｈ－ＴｄＲで４時間パルス処理した。次いで、細胞をフィルタ上に回収し、取り込まれたトリチウム化チミジンを、シンチレーション計数により測定した。処理した細胞からチミジン取り込み値を得て、次いで、これを未処理の対照培養物と比較した。
【０３３３】
第２架橋のないキメラなＡＣ１０（ｃＡＣ１０）は１μｇ／ｍｌ未満の濃度ではジャーカット細胞増殖を阻害しなかった。ｃＡＣ１０の第２のＡｂとの架橋は、ジャーカット細胞増殖を阻害するために必要とされるｃＡＣ１０の濃度を有意に低下させた。最大の阻害は、ｃＡＣ１０の濃度が０．１μｇ／ｍｌという低レベルで達成された（図２）。ＡＣ１０とＨｅＦｉ－１の両者とも、第２架橋抗体を使用した場合にはジャーカット細胞投与量に応じてチミジン取り込みを阻害した（図３）。ｉｎ　ｖｉｔｒｏの架橋抗体の使用は、単球、マクロファージ、Ｂリンパ球およびＮＫ細胞上でｉｎ　ｖｉｖｏで発現されるＦｃ受容体の抗体のＦｃ部分の結合を介して架橋をシミュレートするようである。第１と第２の架橋抗体間の１：１０の比率が増殖阻害に最も効果的なようであった。検出可能な阻害は、ＡＣ１０とＨｅＦｉ－１の両者について、０．００１μｇ／ｍｌより大きな１次抗体濃度で観察された。阻害の最大レベルは、０．１μｇ／ｍｌより大きな濃度で観察された。ＴＣウェル上に固定化したＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１も、ジャーカットＴ細胞増殖を阻害する点において活性であった（データは示していない）。
【実施例３】

【０３３４】
８．ジャーカット細胞における抗ＣＤ３０ｍＡｂにより誘導されるＤＮＡ断片化（アポトーシス）によるＣＤ３０の架橋
架橋抗ＣＤ３０　ｍＡｂによって処理したジャーカット細胞の細胞周期状態およびＤＮＡ応答の関係をさらに調べた。４μｇ／ｍｌの抗ＣＤ３０　ｍＡｂ　ＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１を（ＧＡＭ）ＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）のＦ（ａｂ’）$_2$断片と培養培地（ＲＰＭＩ－１６４０、１０％ＦＢＳ、２ｍＭＬ－グルタミン、１ｍＭピルビン酸ナトリウムおよび０．１ｍＭ非必須アミノ酸）中、最終比（重量：重量）１：４で混合した。抗体カクテルを室温で１５分間インキュベートした。次いで、培地中、これらの抗体カクテルの１：１０連続希釈液を調製した。次いで、抗体カクテル１ｍｌを、０．２５×１０^{6}細胞を含むジャーカット細胞懸濁液１ｍｌと１２穴ＴＣプレート中で混合した。
【０３３５】
２４時間または４８時間のインキュベーション後に、細胞を遠心分離によって回収し、３７℃で平衡に保った新鮮な培地２ｍｌに再懸濁した。活発にＤＮＡを合成している細胞をターゲティングするためにブロモデオキシウリジン（ＢｒｄＵ）（シグマ（Ｓｉｇｍａ）、ミズーリ州セントルイス所在（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ））を用いた。１ｍＭのＢｒｄＵ水溶液２０μｌを、細胞懸濁液に添加し、３７℃で１５分間インキュベーションを継続した。次いで、細胞を遠沈し、ＰＢＳで１回洗浄し、氷冷ＰＢＳ０．５ｍｌ中に再懸濁した。細胞固定のため－２０℃の１００％エタノール１ｍｌを細胞懸濁液に滴下した。４℃３０分間の定着後、固定された細胞を遠沈した。細胞ペレットを０．５％のトライトンＸ－１００（シグマ）と２Ｍ　ＨＣｌ　１ｍｌに再懸濁し、室温で３０分間インキュベートした後、細胞を遠沈した。ｐＨ８．５の０．１ＭＮａ$_2$Ｂ$_4$Ｏ$_7$１ｍｌを用いて細胞ペレットを再懸濁し、室温で１０分間酸を中和した。次いで、細胞を遠心分離によってペレット化し、０．５％トゥイーン２０（シグマ）および１％ＢＳＡを含むＰＢＳで１回洗浄した。ＰＢＳ５０μｌ、０．５％トゥイーン２０、１％ＢＳＡを用いて各細胞ペレットを再懸濁させ、これに、２５μｌのＦＩＴＣ標識した抗ＢｒｄＵ（ＢＤ　Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＣＡ）を添加し、細胞懸濁液を室温で、３０分間インキュベートした。次いで、細胞をＰＢＳ、０．５％トゥイーン２０、１％ＢＳＡで２回洗浄し、次いで、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）（シグマ）５μｇ／ｍｌを含むＰＢＳ０．５ｍｌ中に再懸濁させ、細胞中のＤＮＡ含有量を定量した。次いで、ＤＮＡ合成および細胞周期状態をフローサイトメトリーによって検討した。
【０３３６】
図４は、ヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ抗体で架橋したＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１のいずれかで処理した培養物中のＤＮＡ断片化を有するジャーカット細胞の外観を示す。ＤＮＡ断片化を伴う細胞は、Ｇ$_0$／Ｇ$_1$期のＤＮＡ含有量よりも少なく（図４の中の第１枠）、ＢｒｄＵを組み込まなかったＧ$_2$／Ｍ期のＤＮＡ（つまり、活発にＤＮＡを合成していない細胞）含有量よりも少ないという事実によって表される（図４の中の第４枠）。ＤＮＡ断片化は２４および４８時間のインキュベーション後に検出できた。ジャーカット細胞のこのようなＤＮＡ断片化はアポトーシスの特性である。これらのデータは、図５中で示されるジャーカット細胞の増殖阻害には、ＣＤ３０シグナル伝達に応答してアポトーシスを行う細胞が伴っていたことを示唆する。ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１を段階的な投与量で投与した培養物からの細胞周期の異なる部分中の細胞のパーセンテージを集計すると、＞０．００２μｇ／ｍｌの濃度のＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１は、ジャーカット細胞において実質的にアポトーシスを誘導することができたこと（特に処理後４８時間（図５））が明らかであった。アポトーシス細胞の出現は、細胞周期のＧ$_0$／Ｇ$_1$、ＳおよびＧ$_2$／Ｍ期における細胞のパーセンテージに対応してまったく同様に減少した（図５）。
【実施例４】
【０３３７】
９．ＣＤ３のＣＤ３０との同時架橋が、ジャーカットＴ細胞に誘導されるアポトーシス

を増強した

活性化誘導細胞死（ＡＣＩＤ）は、自動反応的なリンパ球およびエフェクターリンパ球を除去し、それによってそれぞれ自己抗原への寛容性の付与、自己免疫反応の終結を行うために免疫系が使用する重要なメカニズムである。Ｔリンパ球上のＣＤ３／ＴＣＲ複合体またはＢリンパ球上のｓＩｇ／Ｂ細胞抗原受容体複合体の結合は、Ｔリンパ球とリンパ球を活性化する。抗原受容体結合および付属受容体を介したシグナル伝達の情況によって、リンパ球は増殖しエフェクター細胞に分化することができる。または、それらはアポトーシスを経ることになる。多くの付属受容体、例えば、ＣＤ１９、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ４０、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４－１ＢＢおよびＩＣＯＳはＢまたはＴリンパ球上の抗原受容体と共同刺激して、細胞の増殖および／または分化を促進する。したがって、それらは免疫反応の促進にとって重要である。一方、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ４およびＰＤ－１を含む付属受容体によるシグナル伝達は、リンパ球増殖および様々なリンパ球機能を阻害する。したがって、これらの受容体は自動反応的なリンパ球の除去に重要な役割を果たすかもしれない。それらはまた、エフェクターリンパ球の活性を抑えることにより免疫反応の終了に関係する。付属受容体によって媒介されるシグナル伝達経路の調節の欠陥が、自己免疫、アレルギー性および炎症性疾患に寄与しているのかもしれない。

【０３３８】

本発明者らは、リンパ球中のアポトーシスを調節する上で、ＣＤ３０シグナル伝達経路がＣＤ３／ＴＣＲ複合体のそれと協働するかという疑問を抱いた。ジャーカットＴ細胞を抗ＣＤ３０　ｍＡｂ単独で、抗ＣＤ３　ｍＡｂで、または抗ＣＤ３０および抗ＣＤ３　ｍＡｂの組合せで処理した。図４および図５について述べたようにして、抗体をヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃによって架橋した。細胞周期の分布は、図４におけるようにＢｒｄＵおよびＰＩ染色によって決定した。抗ＣＤ３０（ＡＣ１０）は、単独でジャーカットＴ細胞にアポトーシスを引き起こした。しかし、抗ＣＤ３（ＯＫＴ３、ＡＴＣＣ（バージニア州マナッサス所在（Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ））は培地（対照）と比較してどのような効果ももたらさなかった。しかし、抗ＣＤ３は、２４および４８時間のインキュベーション後に、抗ＣＤ３０によって誘導されるアポトーシスを大きく増強した。両方のｍＡｂを０．２μｇ／ｍｌで使用した時に、ＡＣ１０とＯＫＴ３の間における最良の相乗効果が観察された（図６）。

【０３３９】

形質膜の細胞外側の面に対するアネクシン（Ａｎｎｅｘｉｎ）Ｖの結合とＰＩに対する膜透過性との結びつきを使用して、ジャーカット細胞における抗ＣＤ３０－誘導アポトーシスを別の面から検討した。ＧＡＭ抗体と架橋させた、ＡＣ１０、ＨｅＦｉ－１、ＯＫＴ３、ＡＣ１０＋ＯＫＴ３またはＨｅＦｉ－１＋ＯＫＴ３を含む抗体カクテルを、実施例２および３に記載したように調製した。１次ｍＡｂは、２μｇ／ｍｌの最終濃度で使用した。１０倍過剰のＧＡＭ抗体を使用して１次抗体を架橋した。室温で１５分間のインキュベーション後、抗体カクテルをジャーカット細胞に加えた。Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ－ＦＩＴＣアポトーシス検出キットＩ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）をメーカーの指示によって使用してＡｎｎｅｘｉｎ　Ｖの結合とＰＩへの浸透性によって、図７の中で指定した回数で、培養物中のアポトーシス性死細胞のパーセンテージを求めた。Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ$^{-}$／ＰＩ$^{-}$細胞は、生細胞であり（図７中の下左四分域）、Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ$^{+}$／ＰＩ$^{-}$細胞はアポトーシス細胞（図７中の下右四分域）、また、Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ$^{+}$／ＰＩ$^{+}$細胞は死細胞（図７中の上右四分域）であった。図６に示すＰＩ／ＢｒｄＵ染色から得られたデータと一致して、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１はインキュベーション後早くも４時間でジャーカット細胞に検出可能なアポトーシスを誘導した。抗ＣＤ３　ｍＡｂの存在は、ＡＣ１０およびＨｅＦｉ－１の影響を著しく増強した。アポトーシス細胞および死細胞のパーセンテージはインキュベーションを４８時間続ける間中、増加し続けた。これらのデータは、抗ＣＤ３ｍＡｂと抗ＣＤ３０　ｍＡｂの特定の組合せは、自己免疫、アレルギー反応および慢性炎症性疾患における免疫反応の抑制を制御す

るＣＤ３０陽性Ｔリンパ球を除去する顕著な能力をもちうる、ということを示す。

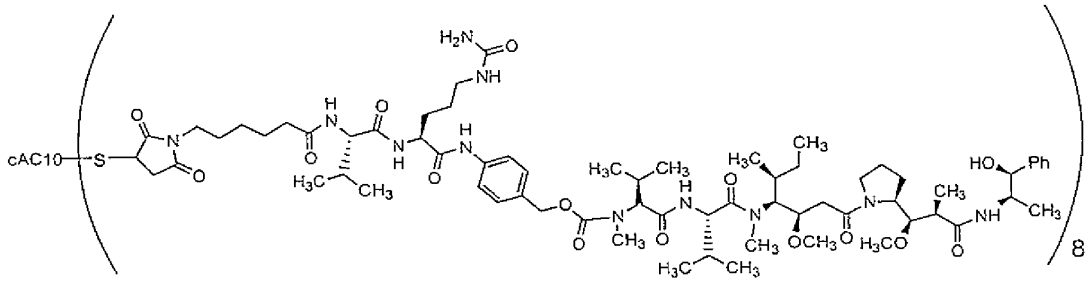
【実施例５】

【０３４０】

１０．ｃＡＣ１０－抗体－薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）

１０．１　ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥの合成

【化２６】



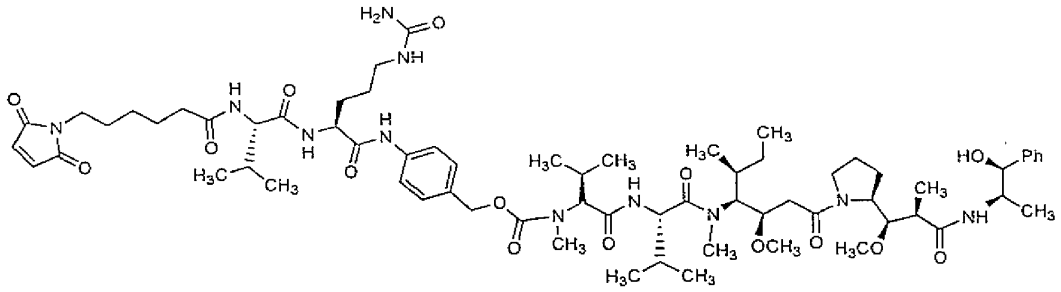
【０３４１】

ＡＤＣ　ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥ（その一般構造を上に示す）の合成を以下に記載する。

【０３４２】

１０．１．１　薬剤－リンカー化合物の合成

【化２７】



【０３４３】

オーリスタチンＥの合成は以前に文献に記載されている（Ｐｅｔｔｉｔ　ＧＲとＢａｒｋｏｃｚｙ，Ｊ．、１９９７、米国特許第５，６３５，４８３号、Ｐｅｔｔｉｔ，ＧＲ、Ｔｈｅ　Ｄｏｌａｓｔａｔｉｎｓ、Ｐｒｏｇ．Ｃｈｅｍ．Ｏｒｇ．Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．、７０、１－７９、１９９）。オーリスタチンＥのモノメチル誘導体（ＭＭＡＥ）を、オーリスタチンＥの合成においてＮ，Ｎ－ジメチルバリンをモノメチルバリン保護形に置き換えることにより調製した（Ｓｅｎｔｅｒら、米国仮出願第６０／４００，４０３号、２００２年７月３１日出願（それは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる））。

【０３４４】

薬剤－リンカー化合物、ＭＭＡＥ（１．６９ｇ、２．３５ｍｍｏｌ）を調製するために、マレイミドカプロイル－Ｌ－バリン－Ｌ－シトルリン－ｐ－アミノベンジルアルコールｐ－ニトロフェニルカーボネート（２．６ｇ、３．５２ｍｍｏｌ、１．５当量。Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋ，Ｇ．Ｍ．ら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．２００２、１３、８５５～８６９頁に記載されるようにして調製した）およびＨＯＢｔ（６４ｍｇ、０．４５ｍｍｏｌ、０．２当量）をＤＭＦ（２５ｍＬ）で希釈した。２分後、ピリジン（５ｍＬ）を加え、反応を逆相ＨＰＬＣを使用してモニターした。反応は、２４時間で完了したことが示された。反応混合物を濃縮すると暗色の油となり、これをＤＭＦ３ｍＬで希釈した。ＤＭＦ溶液を、フラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、溶離剤勾配：１００％

ジクロロメタンから４：１　ジクロロメタン－ＭｅＯＨ）を使用して精製した。関連する画分を合わせて濃縮すると油状物が得られ、これは高真空下で固化し、所望の薬剤－リンカー化合物および未反応ＭＭＡＥの混合物が汚い黄色の固体（９：１　ジクロロメタン－ＭｅＯＨ中のR_f　０．４０）として得られた。この汚い黄色の固体をＤＭＦで希釈し、分取逆相ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ　ＤｙｎａｍａｘＣ$_{18}$カラム４１．４ｍｍ×２５ｃｍ、８μ、１００Å、ＭｅＣＮと０．１％　ＴＦＡ水溶液を４５ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製したところ、所望の薬剤－リンカー化合物が非晶質の白いパウダー（９：１　ジクロロメタン－ＭｅＯＨ中のＲｆ　０．４０）として得られた。これはＨＰＬＣで９５％以上の純度であり、１％未満のＭＭＡＥを含んでいた。収量：１．７８ｇ（５７％）；ＥＳ－ＭＳ　ｍ／ｚ　１３１６．７［Ｍ＋Ｈ］$^+$；ＵＶλ_{max}　２１５、２４８ｎｍ。

【０３４５】

１０．１．２　コンジュゲートの調製

抗体還元。４．８ｍＬ　ｃＡＣ１０（１０ｍｇ／ｍＬ）に５００ｍＭホウ酸ナトリウム／５００ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）６００μＬを加え、次いで、１００ｍＭ　ＤＴＴ水溶液６００μＬを添加した。３７℃で３０分間インキュベートした後、１ｍＭ　ＤＴＰＡ（アルドリッチ）を含むＰＢＳで平衡に保たれ溶出されたＧ２５樹脂上での溶出により緩衝液を交換した。溶液の２８０ｎｍの吸光度から還元された抗体濃度を決定し、チオール濃度はＤＴＮＢ（アルドリッチ）との反応および４１２ｎｍでの吸光度を決定することによりチオール／Ａｂ値をチェックした。

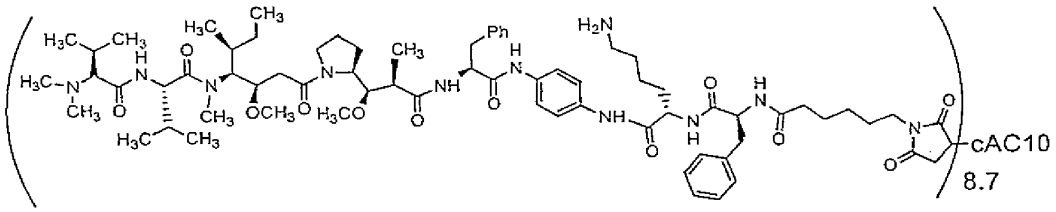
【０３４６】

還元抗体のコンジュゲーション。還元したｍＡｂを氷上で冷やした。薬剤－リンカー化合物は既知濃度のＤＭＳＯ溶液として使用し、反応混合物に加えた薬剤－リンカーの量は以下のように計算した。Ｌストック溶液＝Ｖ×［Ａｂ］×超過倍数／［薬剤－リンカー］。ここで、Ｖおよび［Ａｂ］はそれぞれ還元した抗体溶液の体積およびモル濃度である。２．３ｍＬの冷ＰＢＳ／ＤＴＰＡを還元抗体溶液に加えた。７．５ｍＭ薬剤－リンカー化合物ストック溶液１３３．６μＬを１．４７ｍＬアセトニトリル中に希釈した。アセトニトリル薬剤－リンカー溶液を氷上で冷やし、次に、還元した抗体溶液に加えた。その反応は、マレイミドに対して２０倍モル過剰のシステイン添加後１時間で終了した。反応混合物を遠心限外ろ過によって濃縮し、ＰＢＳ中脱塩Ｇ２５を通した溶出によって精製した。次いで、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥを無菌条件下に０．２ミクロンのフィルタで濾過し、－８０℃で直ちに冷凍した。ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥは、１）濃度（ＵＶ吸光度による）；２）凝集（サイズ排除クロマトグラフィーによる）；３）薬剤／Ａｂ（ＤＴＮＢによって未反応チオールを測定する）および４）残留する遊離薬剤（逆相ＨＰＬＣによる）について分析した。

【０３４７】

１０．２　ｃＡＣ１０－ｆｋＡＥＦＰの合成

【化２８】



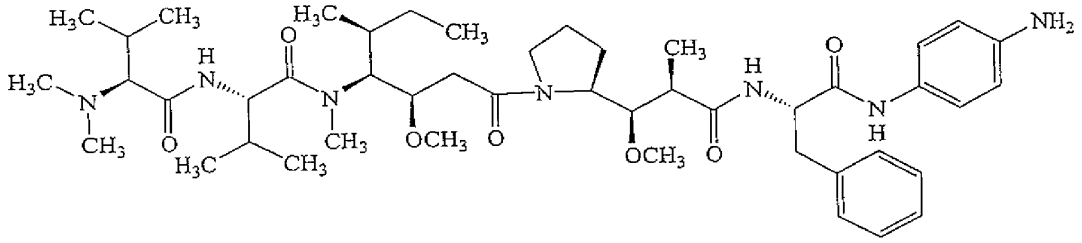
【０３４８】

ＡＤＣ　ｃＡＣ１０－ｆｋＡＥＦＰ（その一般的な構造を上に示す）の合成を下に記載する。

【０３４９】

１０．２．１　ＡＥＦＰ合成

【化２９】



【０３５０】

Ｂｏｃ－フェニルアラニン（１．０ｇ、３．８ｍｍｏｌ）を１，４－ジアミノベンゼンＨＣｌ（３．５ｇ、１９．０ｍｍｏｌ、５．０当量）のトリエチルアミン（１０．７ｍＬ、７６．０ｍｍｏｌ、２０当量）およびジクロロメタン（５０ｍＬ）中懸濁液に添加した。生じた溶液に、追加のＤＥＰＣ（３．２ｍＬ、１９．０ｍｍｏｌ、５．０当量）を注射器で添加した。ＨＰＬＣは２４時間後に残留Ｂｏｃ－ｐｈｅを示さなかった。反応混合物を濾過し、濾液を濃縮したところ、暗色の固体が得られた。この暗色の固体残渣を１：１ＥｔＯＡｃ水中で分配し、ＥｔＯＡｃ層を水と塩水で連続して洗浄した。ＥｔＯＡｃ層を、ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘカラム４１．４ｍｍ×２５ｃｍ、５μ、１００Å、ＭｅＣＮと水溶液を４５ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製した。関連する画分を合わせて濃縮すると、赤褐色の固体中間体が得られた。収量：１．４ｇ（１００％）；ＥＳ－ＭＳ　ｍ／ｚ　３５５．９［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$；ＵＶλ_{max}２１５、２６５ｎｍ；^{1}ＨＮＭＲ（$CDCl_3$）δ７．４８（１Ｈ，ｂｒ　ｓ）、７．２２～７．３７（５Ｈ，ｍ）、７．１２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．７Ｈｚ）、７．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．７Ｈｚ）、５．１９（１Ｈ，ｂｒ　ｓ）、４．３９～４．４８（１Ｈ，ｍ）、３．４９（２Ｈ，ｓ）、３．１３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ）、１．４３（９Ｈ，ｓ）。

【０３５１】

赤褐色固体（０．５ｇ、１．４１ｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルアミン（０．３７ｍＬ、２．１１ｍｍｏｌ、１．５当量）をジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、生じる溶液にＦｍｏｃ－Ｃｌ（０．３８ｇ、１．４１ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を撹拌したところ、数分後に白い固体沈殿を生じた。反応はＨＰＬＣによれば１時間で完了した。反応混合物を濾過し、濾液を濃縮すると油が得られた。油をＥｔＯＡｃで沈殿させると、赤みがかった白色の中間体製品が得られた。これを濾過によって回収し、真空下で乾燥した。収量：０．７５ｇ（９３％）；ＥＳ－ＭＳ　ｍ／ｚ　５７８．１［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$、５９５．６［Ｍ＋NH_4］$^{+}$）。

【０３５２】

この赤みがかった白色の中間体（０．４９ｇ、０．８５ｍｍｏｌ）をジクロロメタン１０ｍＬで希釈し、次に、トリフルオロ酢酸５ｍＬで処理した。反応は逆相ＨＰＬＣによれば３０分で完了した。反応混合物を濃縮し、生じた残渣にエーテルを加えたところ白っぽい固体が沈殿した。この白っぽい固体を濾過し乾燥させると非晶質の粉末が得られた。これをＢｏｃ－ドラプロイン（Ｄｏｌａｐｒｏｉｎｅ）（Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ、１９９３、４９（９）：１９１３－１９２４頁に記載されるようにして調製）（０．２４ｇ、０．８５ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（１０ｍＬ）溶液に添加した。この溶液に、さらにトリエチルアミン（０．３６ｍＬ、２．５ｍｍｏｌ、３．０当量）およびＰｙＢｒｏｐ（０．５９ｇ、１．３ｍｍｏｌ、１．５当量）を加えた。反応混合物は逆相ＨＰＬＣを使用してモニターした。反応終了後すぐに反応混合物を濃縮し、得られた残渣をＥｔＯＡｃで希釈し、１０％のクエン酸水溶液、水、飽和重炭酸ナトリウム水溶液、水および塩水で連続

して洗浄した。ＥｔＯＡｃ層を乾燥し（$MgSO_4$）、濾過し、濃縮した。生じた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカゲル）を使用して精製したところ、白っぽい粉末状中間体が得られた。収量：０．５７ｇ（８８％）；ＥＳ－ＭＳ　ｍ／ｚ　７６４．７［Ｍ＋NH_4］$^+$；ＵＶλ_{max}２１５、２６５ｎｍ；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_3）δ１０．０～１０．１５（１Ｈ，ｍ）、９．６３（１Ｈ，ｂｒ　ｓ）、８．４２（１／２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ）、８．２２（１／２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ）、７．８９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ）、７．７３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ）、７．１１～７．５５（１３Ｈ，ｍ）、４．６９～４．７５（１Ｈ，ｍ）、４．４６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．８Ｈｚ）、４．２９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ）、３．２９（３Ｈ，ｓ）、２．７７～３．４７（７Ｈ，ｍ）、２．４８～２．５０（３Ｈ，ｍ）、２．２５（２／３Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝９．６，７．２Ｈｚ）、１．４１～１．９６（４Ｈ，ｍ）、１．３６（９Ｈ，ｓ）、１．０７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ、回転異性体）、１．００（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ、回転異性体）。

【０３５３】

白色固体中間体（８５ｍｇ、０．１１ｍｍｏｌ）およびＭｅ－ｖａｌ－ｖａｌ－ｄｉｌ－Ｏ－ｔ－ブチル（５５ｍｇ、０．１１ｍｍｏｌ）をＰｅｔｔｉｔら、Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｐｅｒｋ．Ｉ、１９９６、８５９に記載されるように調製し、ジクロロメタン（５ｍＬ）で希釈し、次に、室温で２時間窒素大気下のトリフルオロ酢酸２．５ｍＬで処理した。反応完了はＲＰ－ＨＰＬＣによって確認した。減圧して溶媒を除去し、生じた残渣を、トルエンと２度共沸蒸留により乾燥し、次いで、真空下で１２時間乾燥した。

【０３５４】

残基をジクロロメタン（２ｍＬ）で希釈し、ジイソプロピルエチルアミン（３当量）を添加し、ＤＥＰＣ（１．２当量）を続けて加えた。反応が終わった後、反応混合物を減圧下で濃縮し、生じた残渣をＥｔＯＡｃで希釈し、１０％クエン酸水溶液、水、飽和重炭酸ナトリウム水溶液および塩水で連続して洗浄した。ＥｔＯＡｃ層を乾燥させて濾過し濃縮したところ、黄色の油が得られた。

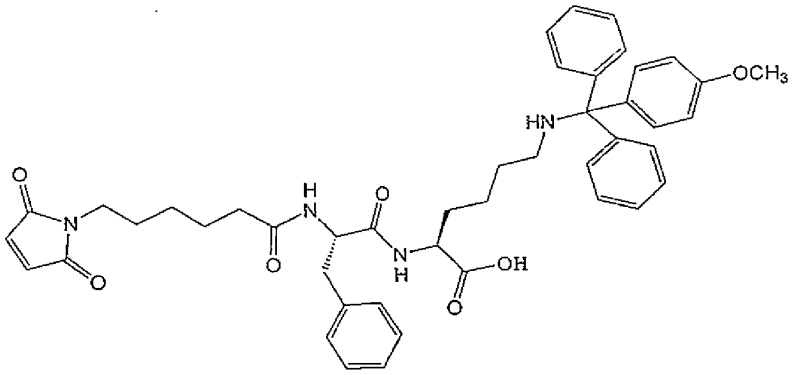
【０３５５】

この黄色の油をジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、生じた溶液にジエチルアミン（５ｍＬ）を加えた。ＨＰＬＣによれば、反応は２時間後に終った。反応混合物を濃縮すると油が得られた。この油をＤＭＳＯで希釈し、ＤＭＳＯ溶液は、分取逆相ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘカラム２１．４ｍｍ×２５ｃｍ、５μ、１００Å、ＭｅＣＮと０．１％ＴＦＡ水溶液を２０ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製した。関連する画分を合わせて濃縮すると、所望の薬剤が白っぽい固体として得られた。全収量：４２ｍｇ；（全体で４４％）；ＥＳ－ＭＳ　ｍ／ｚ　８３７．８［Ｍ＋Ｈ］$^+$、８５８．５［Ｍ＋Ｎａ］$^+$；ＵＶλ_{max}２１５、２４８ｎｍ。

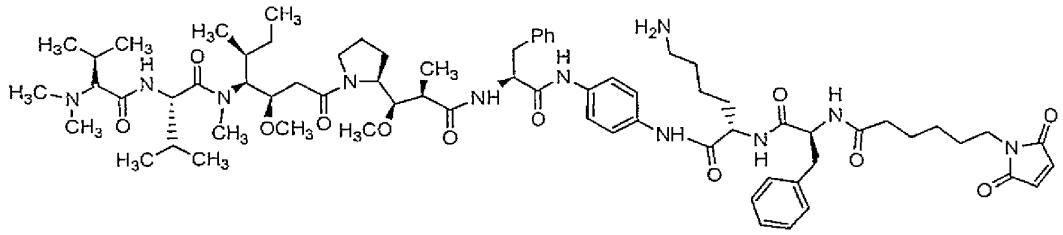
【０３５６】

１０．２．２　リンカー合成

【化３０】



【０３５７】
リンカー化合物、マレイミドカプロイル－Ｌ－フェニルアラニン－Ｌ－リジン（ＭＭＴ）をＤｕｂｏｗｃｈｉｋら、２００２、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１３：８５５－８９６頁に記載されるようにして調製した。
【０３５８】
１０．２．３ 薬剤－リンカー化合物の調製
【化３１】



【０３５９】
１０．２．１節の薬剤（９ｍｇ、１０．８μｍｏｌ）および１０．２．２節で得たリンカー（５．２ｍｇ、１０．８μｍｏｌ）をジクロロメタン（１ｍＬ）で希釈し、得られた溶液にＨＡＴＵ（６．３ｍｇ、１６．１μｍｏｌ、１．５当量）、次いでピリジン（１．３μＬ、１６．１μｍｏｌ、１．５当量）を添加した。反応混合物は、ＨＰＬＣを使用してモニターしながらアルゴン雰囲気下に撹拌した。反応は６時間後に完了した。反応混合物を濃縮し、生じた残渣をＤＭＳＯで希釈した。ＤＭＳＯ溶液を分取逆相ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘカラム２１．４ｍｍ×２５ｃｍ、５ｍ、１００Å、ＭｅＣＮとEt_3N－CO_2（ｐＨ７）２０ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製し、関連する画分を合わせて濃縮すると、白っぽい固体中間体が得られ、これはＨＰＬＣで９５％以上の純度であった。
【０３６０】
この白っぽい中間体をジクロロメタン（２ｍＬ）に希釈し、得られた溶液をＴＦＡ（０．５ｍＬ）で処理した。反応はＨＰＬＣを使用してモニターし２時間で完了した。反応混合物を濃縮し、生じた残渣をＤＭＳＯで希釈し、実施例１３に記載するのと同じ条件下で精製した。関連する画分を合わせて濃縮すると、所望の薬剤－リンカー化合物が白っぽい粉末として得られた。収量：１４．９ｍｇ（９０％）；ＥＳ－ＭＳ ｍ／ｚ １３０４．６$[M+H]^+$；$UV\lambda_{max}$２１５、２７５ｎｍ。
【０３６１】

１０．２．４　コンジュゲートの調製

抗体還元。３．０ｍＬ　ｃＡＣ１０（１０ｍｇ／ｍＬ）に５００ｍＭホウ酸ナトリウム／５００ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）３７５μＬを加え、次いで、１００ｍＭ　ＤＴＴ水溶液３７５μＬを添加した。３７℃で３０分間インキュベートした後、１ｍＭ　ＤＴＰＡ（アルドリッチ）を含むＰＢＳで平衡に保たれ溶出されたＧ２５樹脂上での溶出により緩衝液を交換した。溶液の２８０ｎｍの吸光度から還元された抗体濃度を求め、チオール濃度はＤＴＮＢ（アルドリッチ）との反応および４１２ｎｍでの吸光度を測定することによりチオール／Ａｂ値をチェックした。

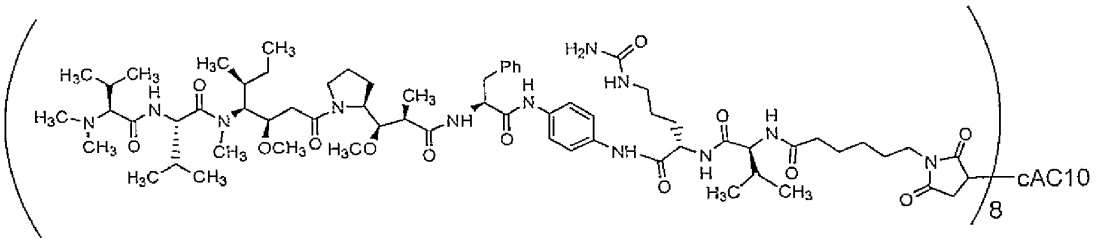
【０３６２】

還元抗体のコンジュゲーション。還元したｍＡｂを氷上で冷やした。薬剤－リンカー化合物は既知濃度のＤＭＳＯ溶液として使用し、反応混合物に加えた薬剤－リンカーの量は以下のように計算した。Ｌストック溶液＝Ｖ×［Ａｂ］×超過倍数／［薬剤－リンカー］。ここで、Ｖおよび［Ａｂ］はそれぞれ還元した抗体溶液の体積およびモル濃度である。２．２ｍＬの冷ＰＢＳ／ＤＴＰＡを還元抗体溶液に加え、次いで、１．４７ｍＬ　ＤＭＳＯを加え、混合物を氷上で冷やした。次いで、１４０．０μＬ　７．６ｍＭ薬剤－リンカー化合物ストック溶液を還元抗体／ＤＭＳＯ溶液に加えた。反応は、マレイミドに対して２０倍モル過剰のシステイン添加後１時間で終了した。反応混合物を遠心限外ろ過によって濃縮し、ＰＢＳ中脱塩Ｇ２５を通した溶出によって精製した。次いで、ｃＡＣ１０－ｆｋＡＥＦＰを無菌条件下に０．２ミクロンのフィルタを通して濾過し、－８０℃で直ちに冷凍した。ｃＡＣ１０－ｆｋＡＥＦＰは、１）濃度（ＵＶ吸光度による）；２）凝集（サイズ排除クロマトグラフィーによる）；３）薬剤／Ａｂ（ＤＴＴ、次いでＤＴＮＢによって未反応チオールを測定する）および４）残留する遊離薬剤（逆相ＨＰＬＣによる）について分析した。

【０３６３】

１０．３　ｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰの合成

【化３２】



【０３６４】

ＡＤＣ　ｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰ（その一般的な構造を上に示す）の合成を下に記載する。

【０３６５】

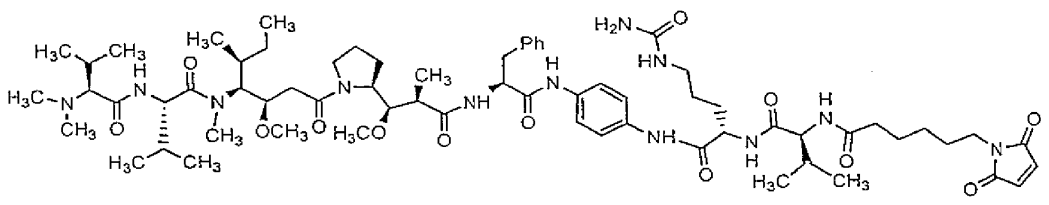
１０．３．１　薬剤合成

薬剤は、上記セクション１０．２．１に例示したようにして合成した。

【０３６６】

１０．３．２　薬剤－リンカー化合物の調製

【化３３】



【０３６７】
１０．２．１節の薬剤のトリフルオロ酢酸塩（０．３７ｇ、０．３９ｍｍｏｌ、１．０当量）およびＦｍｏｃ－ｖａｌ－ｃｉｔ（０．３０ｇ、０．５８ｍｍｏｌ、１．５当量。Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．２００２、１３、８５５～８９６頁に従って調製）をＤＭＦ（５ｍＬ、０．１Ｍ）で希釈し、得られた溶液にピリジン（９５μＬ、１．２ｍｍｏｌ、３．０当量）を添加した。次いで、ＨＡＴＵ（０．２３ｍｇ、０．５８ｍｍｏｌ、１．５当量）を固体として加え、反応混合物は、ＨＰＬＣを使用してモニターしながらアルゴン雰囲気下に撹拌した。反応は緩慢であり、４時間後にジイソプロピルエチルアミン１．０当量を加えた。反応は１時間後に完了した。反応混合物を真空化に濃縮し、生じた残渣を分取逆相ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ ＤｙｎａｍａｘＣ１８カラム４１．４ｍｍ×２５ｃｍ、５μ、１００Å、ＭｅＣＮと０．１％ＴＦＡ水溶液４５ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製すると、淡いピンク色の固体中間体が得られた。

【０３６８】
ピンク色の固体中間体をＤＭＦ（３０ｍＬ）で希釈し、生じた溶液にジエチルアミン（１５ｍＬ）を添加した。ＨＰＬＣによれば反応は２時間で完了していた。反応混合物を濃縮し、生じた残渣をエーテルで２度洗浄した。固体中間体を高真空下で乾燥し、次いで、そのまま次のステップで使用した。

【０３６９】
固体中間体をＤＭＦ（２０ｍＬ）で希釈し、生じた溶液に６－（２，５－ジオキシ－２，５－ジヒドロ－ピロール－１－イル）－ヘキサン酸２，５－ジオキシ－ピロリジン－１－１－イルエステル（０．１２ｇ、０．３９ｍｍｏｌ、１．０当量）（ＥＭＣＳ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｃ．、Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）を添加した。４日後に、反応混合物を濃縮すると油状物が得られ、これを分取逆相ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ ＤｙｎａｍａｘＣ１８カラム４１．４ｍｍ×２５ｃｍ、５μ、１００Å、ＭｅＣＮと０．１％ＴＦＡ水溶液４５ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製すると、所望の薬剤－リンカー化合物が白色鱗片状の固体として得られた。収量：０．２１ｇ（全体で３８％）；ＥＳ－ＭＳ ｍ／ｚ １２８５．９［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$、１３．０７．８［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$；ＵＶ λ_{max} ２１５、２６６ｎｍ。

【０３７０】
１０．３．３ コンジュゲートの調製
抗体還元。３．０ｍＬ ｃＡＣ１０（１０ｍｇ／ｍＬ）に５００ｍＭホウ酸ナトリウム／５００ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）３７５μＬを加え、次いで、１００ｍＭ ＤＴＴ水溶液３７５μＬを添加した。３７℃で３０分間インキュベートした後、１ｍＭ ＤＴＰＡ（アルドリッチ）を含むＰＢＳで平衡に保たれ溶出されたＧ２５樹脂上での溶出により緩衝液を交換した。溶液の２８０ｎｍの吸光度から還元された抗体濃度を求め、チオール濃度はＤＴＮＢ（アルドリッチ）との反応および４１２ｎｍでの吸光度を測定することによりチオール／Ａｂ値をチェックした。

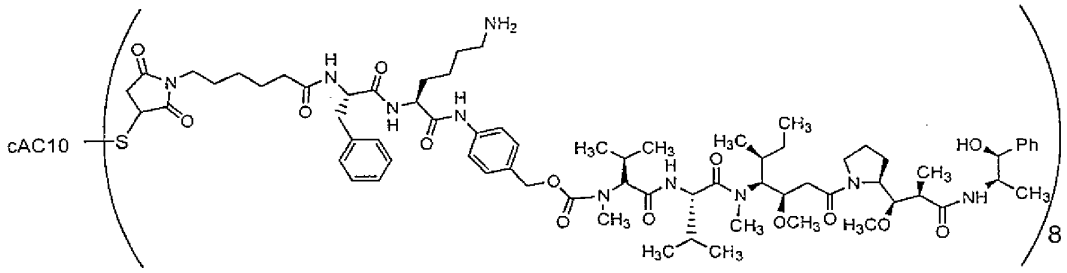
【０３７１】
還元抗体のコンジュゲーション。還元したｍＡｂを氷上で冷やした。薬剤－リンカー化合物は既知濃度のＤＭＳＯ溶液として使用し、反応混合物に加えた薬剤－リンカーの量は以下のように計算した：Ｌストック溶液＝Ｖ×［Ａｂ］×超過倍数／［薬剤－リンカー］。ここで、Ｖおよび［Ａｂ］はそれぞれ還元した抗体溶液の体積およびモル濃度である。２．２ｍＬの冷ＰＢＳ／ＤＴＰＡを還元抗体溶液に加え、次いで、１．４７ｍＬ ＤＭＳＯを加え、混合物を氷上で冷やした。次いで、１４０．０μＬ ７．６ｍＭ薬剤－リンカー化合物ストック溶液を還元抗体／ＤＭＳＯ溶液に加えた。反応は、マレイミドに対して２０倍モル過剰のシステインを添加した後１時間で終了した。反応混合物を遠心限外ろ過によって濃縮し、ＰＢＳ中脱塩Ｇ２５を通した溶出によって精製した。次いで、ｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰを無菌条件下で０．２ミクロンのフィルタで濾過し、－８０℃で直ちに

冷凍した。ｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰは、１）濃度（ＵＶ吸光度による）；２）凝集（サイズ排除クロマトグラフィーによる）；３）薬剤／Ａｂ（ＤＴＴ、次いでＤＴＮＢによって未反応チオールを測定する）および４）残留する遊離薬剤（逆相ＨＰＬＣによる）について分析した。

【０３７２】

１０．４　ｃＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥの合成

【化３４】



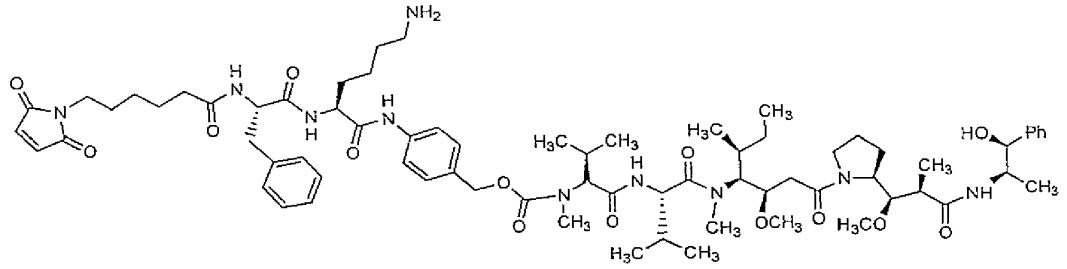
【０３７３】

ＡＤＣ　ｃＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥ（その一般的な構造を上に示す）の合成を下に記載する。

【０３７４】

１０．４．１　薬剤－リンカー化合物の調製

【化３５】



【０３７５】

オーリスタチンＥの合成は以前に文献に記載されている（Ｐｅｔｔｉｔ　ＧＲとＢａｒｋｏｃｚｙ，Ｊ．、１９９７、米国特許第５，６３５，４８３号、Ｐｅｔｔｉｔ，Ｇ．Ｒ．、Ｐｒｏｇ．Ｃｈｅｍ．Ｏｒｇ．Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．、７０、１－７９、１９９）。オーリスタチンＥのモノメチル誘導体（ＭＭＡＥ）を、オーリスタチンＥの合成においてＮ，Ｎ－ジメチルバリンをモノメチルバリン保護形に置き換えることにより調製した（Ｓｅｎｔｅｒら、米国仮出願第６０／４００，４０３号、２００２年７月３１日出願（それは参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる））。

【０３７６】

ＭＭＡＥ（１００ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）、リンカーであるマレイミドカプロイル－Ｌ－フェニルアラニン－Ｌ－リジン（ＭＭＴ）－ｐ－アミノベンジルアルコールｐ－ニトロフェニルカーボネート（１６０ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ、１．１当量。Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．２００２、１３、８５５～８６９頁に記載されるようにして調製した）、およびＨＯＢｔ（１９ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ、１．０当量）をＤＭＦ（２ｍＬ）で希釈した。２分後、ピリジン（０．５ｍＬ）を加え、反応混合物を逆相ＨＰＬＣを使用してモニターした。２４時間後にはＭＭＡＥもリンカーも検出されなくなった。反応混合物を濃縮し、得られた残渣を分取逆相ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ

Ｄｙｎａｍａｘカラム２１．４ｍｍ×２５ｃｍ、５μ、１００Å、ＭｅＣＮとＥｔ$_3$Ｎ－ＣＯ$_2$（ｐＨ７）２０ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製した。関連する画分をプールし、濃縮すると、白っぽい固体中間体が得られた。ＥＳ－ＭＳ　ｍ／ｚ　１６０８．７［Ｍ＋Ｈ］$^+$

この白っぽい中間体をＭｅＣＮ／水／ＴＦＡ（それぞれの比は８５：５：１０）に希釈した。得られた反応溶液をＨＰＬＣを使用してモニターし３時間で完了した。反応混合物を直接濃縮し、得られた残渣を分取逆相ＨＰＬＣ（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘカラム２１．４ｍｍ×２５ｃｍ、５μ、１００Å、ＭｅＣＮと０．１％ＴＦＡ水溶液２０ｍＬ／分で４０分かけて１０％から１００％まで勾配をかけて流し、その後、１００％ＭｅＣＮで２０分間）を用いて精製した。関連する画分を合わせて濃縮すると、所望の薬剤－リンカー化合物が白っぽい粉末として得られた。収量：４６ｍｇ（全体で３２％）；ＥＳ－ＭＳ　ｍ／ｚ　１３３４．８［Ｍ＋Ｈ］$^+$；ＵＶλ$_{max}$２１５、２５６ｎｍ。

【０３７７】

１０．４．２　コンジュゲートの調製

抗体還元。４．８ｍＬ　ｃＡＣ１０（１０ｍｇ／ｍＬ）に５００ｍＭホウ酸ナトリウム／５００ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）６００μＬを加え、次いで、１００ｍＭ　ＤＴＴ水溶液６００μＬを添加した。３７℃で３０分間インキュベートした後、１ｍＭ　ＤＴＰＡ（アルドリッチ）を含むＰＢＳで平衡化し溶出させるＧ２５樹脂上での溶出により緩衝液を交換した。溶液の２８０ｎｍの吸光度から還元された抗体濃度を求め、チオール濃度はＤＴＮＢ（アルドリッチ）との反応および４１２ｎｍでの吸光度を測定することによりチオール／Ａｂ値をチェックした。

【０３７８】

還元抗体のコンジュゲーション。還元したｍＡｂを氷上で冷やした。薬剤－リンカー化合物は既知濃度のＤＭＳＯ溶液として使用し、反応混合物に加えた薬剤－リンカーの量は以下のように計算した：Ｌストック溶液＝Ｖ×［Ａｂ］×超過倍数／［薬剤－リンカー］。ここで、Ｖおよび［Ａｂ］はそれぞれ還元した抗体溶液の体積およびモル濃度である。２．３ｍＬの冷ＰＢＳ／ＤＴＰＡを還元抗体溶液に加えた。７．５薬剤－リンカー化合物ストック溶液１３３．６μＬを１．４７ｍＬアセトニトリル中に希釈した。アセトニトリル薬剤－リンカー溶液を氷上で冷やし、次に、還元した抗体溶液に加えた。その反応は、マレイミドに対して２０倍モル過剰のシステインを添加した後１時間で終了した。反応混合物を遠心限外ろ過によって濃縮し、ＰＢＳ中脱塩Ｇ２５を通す溶出によって精製した。次いで、ｃＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥを無菌条件下に０．２ミクロンのフィルタで濾過し、－８０℃で直ちに冷凍した。ｃＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥは１）濃度（ＵＶ吸光度による）；２）凝集（サイズ排除クロマトグラフィーによる）；３）薬剤／Ａｂ（ＤＴＮＢによって未反応チオールを測定する）および４）残留する遊離薬剤（逆相ＨＰＬＣによる）について分析した。

【０３７９】

１０．５　結果

ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥがジャーカットＴ細胞増殖を抑制する能力を検討した。９６穴ＴＣプレートに、培地１００μｌ中に５０００個含まれるジャーカットＴ細胞を播種した。培地１００μｌ中ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥ濃度を段階的としたもの、または対照の非結合ＩｇＧ（ｃＩｇＧ）－ｖｃＭＭＡＥを図９に示す最終濃度を達成するようにジャーカット細胞へ加えた。８０時間のインキュベーションの後に、細胞のＤＮＡ合成を１６時間の^{3}Ｈ－ＴｄＲパルスによって評価した。０．００１μｇ／ｍｌを超える濃度のキメラＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥは、ＤＮＡ合成を有意に阻害した。ＩＣ$_{50}$はおよそ０．１μｇ／ｍｌであった。対照ｃＩｇＧ－ｖｃＭＭＡＥは、０．１μｇ／ｍｌ未満の濃度で有意な増殖抑制作用を示さなかった。図２は、可溶性のコンジュゲートされていないｃＡＣ１０が、１μｇ／ｍｌを超える濃度でジャーカット細胞に対する増殖抑制効果を有したことを示す。まとめると、これらのデータは、ｃＡＣ１０がＣＤ３０$^+$標的細胞に細胞傷害性薬

剤を送達することにおいて有効であり、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥ　ＡＤＣは標的とする細胞に結合すると効率的にインターナリゼーションすることを示唆している。

【実施例６】

【０３８０】

１１．正常なヒト末梢血の単核細胞（ＰＢＭＣ）の活性化によってＴリンパ球上のＣＤ３０発現が誘導された

正常なドナーから成分採血によって得たヒトＰＢＭＣを、ヒトＴリンパ球の供給源とした。固定化した抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８　ｍＡｂを、Ｔリンパ球を活性化し、その増殖を誘導するために使用した。ｍＡｂを固定化するために、ＰＢＳ中、抗ＣＤ３　ｍＡｂ（ＯＫＴ３）および抗ＣＤ２８　ｍＡｂ（Ｂ－Ｔ３、ＤｉａＣｌｏｎｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｂｅｓａｎｃｏｎ，Ｆｒａｎｃｅ、または９．３、Ｈａｒａ　ら．、１９８５、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１６１、１５１３～１５２４頁）のそれぞれを１μｇ／ｍｌで、ＴＣまたはフラスコ中、３７℃で２時間インキュベートした。ＰＢＳで２回洗浄することによって非結合ｍＡｂを除去した。培地（ＲＰＭＩ－１６４０、１０％ＦＢＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１ｍＭピルビン酸ナトリウムおよび０．１ｍＭ非必須アミノ酸）中０．５×１０^{6}細胞／ｍｌの濃度で、ｍＡｂコーティングを施したＴＣウェルまたはフラスコへにＰＢＭＣを播種することによりＴ細胞活性化を開始した。いくつかの実験では、１００ＩＵ／ｍｌの最終濃度の組み換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）（Ｃｈｉｒｏｎ、Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ、ＣＡ）も含有させた。

【０３８１】

Ｔ細胞活性化およびＣＤ３０発現は多色フローサイトメトリー分析によってモニターした。ＣＤ３０発現の検出のために、精製した抗ＣＤ３０（ＡＣ１０）をメーカーの指示によって蛍光プローブＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（ＡＦ）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）で標識した。抗体を染色する前に、活性化したＰＢＭＣを、染色用培地（ＰＢＳ、１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、０．０２％アジ化ナトリウム）で１回洗浄し、ペレット化した。ＡＦ標識した抗ＣＤ３＋５フィコエリトリン（ＰＥ）標識した抗ＣＤ４（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）＋Ｃｙ－Ｃｈｒｏｍｅ（Ｃｙ）標識した抗ＣＤ８（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）またはフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）抗ＣＤ２５（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）＋ＰＥ標識した抗ＣＤ４（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）＋Ｃｙ標識した抗ＣＤ８（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）のいずれかの染色培地中カクテル２５μｌを使用して０．２×１０^{6}細胞ペレットを再懸濁した。細胞を氷上で２０分間インキュベートし、染色培地で２度洗浄し、ＰＢＳ中１％パラホルムアルデヒドで固定し、ＦＡＣｓｃａｎ（ＢＤバイオサイエンス（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、カリフォルニア州サンホセ所在（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＣＡ））上で分析した。

【０３８２】

図１０に示したように、刺激されていないＰＢＭＣではＴリンパ球はほとんどＣＤ３０を発現しなかった。抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８または抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８＋ＩＬ－２のいずれかによるＰＢＭＣの活性化は、Ｔリンパ球上で時間依存的なＣＤ３０の発現を誘導した。対照的に、培地だけで維持したＰＢＭＣはＣＤ３０発現の誘導を示さなかった。ＣＤ３０の発現増加は、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ４$^{-}$（ＣＤ８$^{+}$細胞を含むが、データは示していない）細胞の両方で検出された。ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球の両者についての発現ピークは、刺激後４日目頃であった。その後は、レベルは低減していき培養約８日後には基線レベルまで落ちた。

【実施例７】

【０３８３】

１２．ｃＡＣ１０　ＡＤＣが活性化正常Ｔリンパ球の増殖を抑制した

ｃＡＣ１０　ＡＤＣが、活性化正常Ｔリンパ球の増殖を抑制する能力を調べた。実施例６に記載するように、正常なＰＢＭＣは、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８　ｍＡｂによって活性化された。培養３日目（それはＣＤ３０誘導のピークに接近していた（図１０））に、

活性化したＰＢＭＣを回収した。細胞の一部は、ＣＤ４およびＣＤ８細胞の両者におけるＣＤ３０発現を確認するため、フローサイトメトリー分析に用いた。細胞の残りはペレット化し、５０，０００細胞／ｍｌで２００ＩＵ／ｍｌのｒｈＩＬ－２を含む新鮮な培地に再懸濁させた。この細胞懸濁液１００μｌ（５，０００個の細胞）を９６穴ＴＣプレートの各ウェルに移した。２００ＩＵ／ｍｌのｒｈＩＬ－２を添加した培地中、ｃＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥ、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥ濃度を段階的にしたものまたは対応する非結合ｃＩｇＧ　ＡＤＣを１００μｌ、図１１中に示した濃度を達成するように培養ウェルに加えた。細胞をさらに４８または７２時間培養し、最後の１６時間は、^{3}Ｈ－ＴｄＲのパルス処理をして細胞のＤＮＡ合成を評価した。ジャーカットＴ細胞上のその活性と同様に、ｃＡＣ１０　ＡＤＣは、活性化したＰＢＭＣの増殖を抑制した（図１１）。ｃＡＣ１０　ＡＤＣが、０．０１μｇ／ｍｌを超える濃度で存在した時に抑制効果が検出できた。一方のＡＤＣと共に７２時間インキュベーションした場合は、４８時間のインキュベーションより大きい増殖抑制をもたらした。キメラＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥはｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥより活性であるようにみえた。

【実施例８】

【０３８４】

１３．記憶Ｔリンパ球はナイーブＴリンパ球よりｃＡｃ１０ＡＤＣに対して感受性が高かった

ＰＢＭＣは、リンパ球の様々なサブセットから構成されるため、ｃＡＣ１０　ＡＤＣに対する１つの細胞サブセットの応答は、他のサブセットによって簡単にマスクされてしまうおそれがある。この可能性を検討するために、Ｔリンパ球の全体、ナイーブＴリンパ球と記憶Ｔリンパ球をネガティブ免疫選択によってＰＢＭＣから富化した。簡単に言えば、ＰＢＭＣを、２０×１０^{6}細胞／ｍｌの最終濃度で、飽和量の抗体を含む以下の抗体カクテルのうちの１つと共に氷上において２０分間、インキュベートした。全Ｔリンパ球を富化するために、抗体カクテルは、抗ＣＤ１４（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）、抗ＣＤ１６（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）および抗ＣＤ２０（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を含有した。ナイーブＴリンパ球（ＣＤ４５ＲＯ$^{-}$）を富化するために、抗体カクテルは、抗ＣＤ１４、抗ＣＤ１６、抗ＣＤ２０、および抗ＣＤ４５ＲＯ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を含有した。記憶Ｔリンパ球（ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）を富化するために、抗体カクテルは、抗ＣＤ１４、抗ＣＤ１６、抗ＣＤ２０および抗ＣＤ４５ＲＡ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を含有した。抗体カクテルはすべて１０％ＦＢＳを添加した培地中で調製した。抗体結合後、細胞を氷冷した培地で２度洗浄し、培地中２０×１０^{6}細胞／ｍｌの濃度になるように再懸濁した。抗体結合した細胞を、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　Ｍ４５０ヤギ抗マウスＩｇＧ常磁性ビーズ（ダイナル（Ｄｙｎａｌ）、ノルウェー、オスロ所在（Ｏｓｌｏ、Ｎｏｒｗａｙ））によって細胞懸濁液から取り除いた。細胞懸濁液に添加する前に、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　Ｍ４５０ヤギ抗マウスＩｇＧは、培地によって２度洗洗浄し、培地中６０×１０^{6}細胞／ｍｌの濃度になるように再懸濁した。同容量の細胞および常磁性ビーズを４℃で混合し、２時間遠心した。細胞／常磁性ビーズ懸濁液を培地で２倍希釈した。非結合常磁性ビーズおよび常磁性ビーズ－細胞コンジュゲートは、磁石の印加によって培養物の側に引きつけた。非結合細胞は、上に記載したサブセットが富化しており、これを取り出した。フローサイトメトリー分析を行って、図１２の左欄に示すような富化を確認した。

【０３８５】

次いで、様々なＴ細胞サブセット上での活性化誘導によるＣＤ３０発現を検討した。簡単に言えば、免疫選択から得られた全Ｔリンパ球、ナイーブＴリンパ球、および記憶Ｔリンパ球は、実施例６に記載するように２００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２の存在下、固定化した抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体によって刺激した。７２時間のインキュベーションの後、（これも実施例６で概説したように）、様々な培養物中でのＣＤ４およびＣＤ８細胞の両方におけるＣＤ３０の発現を、フローサイトメトリーによって判定した。開始集団が全Ｔリンパ球、ナイーブＴリンパ球または記憶Ｔリンパ球であるか否かにかかわらず、ＣＤ４

およびＣＤ８細胞の両方でＣＤ３０の発現が検出された（図１２）。記憶ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$細胞上でのＣＤ３０のレベルは、一貫して他のサブセットよりもわずかに高かった。

【０３８６】

次いで、活性化したナイーブ（ＣＤ４５ＲＯ$^{-}$）Ｔリンパ球および記憶Ｔリンパ球（ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）のｃＡＣ１０　ＡＤＣに対する応答を調べた。３日活性化したナイーブＴリンパ球および記憶Ｔリンパ球を、９６穴ＴＣプレート上に培地（２００ＩＵ／ｍｌのｒｈＩＬ－２およびｃＡＣ１０　ＡＤＣまたはｃＩｇＧ　ＡＤＣを図１３に示した最終濃度で含む）の最終容量２００μｌで、５，０００細胞／ウェルとなるように播種した。細胞をさらに７２時間インキュベートし、細胞のＤＮＡ合成を評価するために最後の１６時間は^{3}Ｈ－ＴｄＲでパルス処理した。ｃＩｇＧ　ＡＤＣは2μｇ／ｍｌ未満の濃度では、Ｔ細胞増殖に有意な効果がなかったが、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥまたはｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰのいずれも、０．００７μｇ／ｍｌ以上の濃度で活性化した記憶Ｔリンパ球の増殖を有意に抑制した。対照的に、活性化したナイーブＴリンパ球は、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥに対し比較的耐性であった。ｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰコンジュゲートは両方のＴ細胞サブセット上でｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥコンジュゲートより有効であることが判明した。それにもかかわらず、ナイーブＴリンパ球は、記憶Ｔリンパ球よりもｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰに対する感受性がさらに低い（図１３）。ｃＡＣ１０　ＡＤＣ　に対するナイーブＴリンパ球と記憶Ｔリンパ球との間の感受性の差は、恐らく抗原密度によるものではないであろう。活性化ナイーブＴリンパ球と記憶Ｔリンパ球は、両方とも、ＣＤ３０を相当なレベルで発現することが見出されたからである（図１２）。図１１で報告した、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥの増殖抑制活性は、恐らくナイーブＴリンパ球と記憶Ｔリンパ球の応答の組合せを反映している。より重要なことに、これらの結果は、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥは、ＣＤ３０$^{+}$ナイーブＴリンパ球への影響を最小限にとどめつつ、ＣＤ３０$^{+}$記憶Ｔリンパ球の増殖を選択的に抑制し得ることを示唆している。自己免疫疾患、炎症性疾患およびアレルギー性疾患の病因にかかわるエフェクターＴリンパ球は通常、抗原によって刺激され、これらは記憶Ｔリンパ球サブセットに属する。したがって、治療的な介在過程にｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥを適用することには、抗原によって刺激されたＴリンパ球のみを標的とするという利点がある。他方、ｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰの適用は、活性化したナイーブＴリンパ球と記憶Ｔリンパ球両方の増殖を抑えることが望まれる状況（例えば、移植拒絶における）で好ましいであろう。

【実施例９】

【０３８７】

１４．正常なヒトＴリンパ球の同系異種的刺激がＣＤ３０発現を誘導した

自己免疫、アレルギー性疾患および炎症性応答の病因にかかわるエフェクターＴリンパ球は、通常、多数回の抗原刺激と増殖を経ている。この慢性の活性化プロセスで、それらは、サイトカイン分泌および細胞溶解応答を含むエフェクター機能を実行し続けて組織の損傷を誘導する。したがって、活性化と増殖の繰り返しを複数回経験したＴリンパ球が依然としてＣＤ３０を発現し得るか、また、抗ＣＤ３０　ｍＡｂおよびそれらのＡＤＣが、慢性的に活性化した、そうしたＣＤ３０$^{+}$Ｔリンパ球の増殖を抑制するためにはどのように適用し得るかを調べることが重要である。そのようなＴ細胞系統のうちの１つを同系異種の刺激細胞に対して生成した。実施例９において詳述するＣＤ８$^{+}$細胞の枯渇によってＰＢＭＣからＣＤ４$^{+}$リンパ球を富化した。簡単に言えば、ＰＢＭＣを、氷上で２０分間、飽和濃度の抗ＣＤ８　ｍＡｂ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を含む培地中でインキュベートした。次いで、細胞を、氷冷培地で２度洗浄した。抗ＣＤ８結合細胞をＤｙｎａｂｅａｄｓ　Ｍ４５０ヤギ抗マウスＩｇＧ常磁性ビーズによって細胞懸濁液から取り除いた。非結合細胞は、ＣＤ４$^{+}$細胞が富化しており、そのＣＤ４発現をフローサイトメトリーによって分析した。

【０３８８】

ＰＢＭＣ（５×１０^{6}）は、ＣＤ４$^{+}$細胞が富化しているが、これを、等しい数のガン

マ線照射（２７００～５０００ｒａｄｓ）同系異種Ｄａｕｄｉ細胞（ＡＴＣＣ）と共培養した。４日目にＩＬ－２を４００ＩＵ／ｍｌの最終濃度で加え、培養を１４日目まで継続した。次いで、生存細胞を２００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２存在下、Ｔ細胞：Ｄａｕｄｉ比を１：３として照射Ｄａｕｄｉ細胞で再刺激し増殖させた。これが第２周期の初めである（図１４）。７～９日の培養後に、Ｔリンパ球を照射Ｄａｕｄｉ細胞で再刺激し、続く増殖ラウンドを開始させた。同系異種刺激細胞添加後３～４日目および７～９日目にＣＤ３０の発現を調べた。図７に示すように、ＣＤ３０は、$CD4^+$および$CD4^-$細胞の両者について各ラウンドで同系異種刺激で誘導された。ＣＤ３０の発現レベルは各刺激サイクルの終わりに向けて漸減する。これらの結果は、抗原刺激Ｔリンパ球が、それらが抗原刺激でチャレンジされたときにＣＤ３０を発現する能力を保持していることを確認するものである。

【実施例１０】

【０３８９】

１５．Ｔリンパ球クローンの生成

エフェクターリンパ球をｉｎ ｖｉｔｒｏでシミュレートする別の方法は、Ｔリンパ球クローンを作製することである。図１６は、抗原非特異性のヘルパー（Ｔｈ）および細胞傷害性（Ｔｃ）Ｔリンパ球クローンを作製するためのプロトコルを示す。ＰＢＭＣを出発原料として用いた。実施例８および９に記載した免疫選択方法を使用して$CD4^+$または$CD8^+$細胞を富化した。Ｔリンパ球を刺激し増殖するために２つのアプローチを適用した。第１のアプローチでは、９６穴ＴＣプレート中の限界希釈において、固定した抗ＣＤ３プラス可溶性抗ＣＤ２８およびｒｈＩＬ－２（２００ＩＵ／ｍｌ）とで細胞を刺激した。実施例６に記載するようにして抗ＣＤ３を１μｇ／ｍｌでＴＣウェルに固定した。あるいは、細胞は、フィトヘムアグルチニン（シグマ（Ｓｉｇｍａ）、（１～２μｇ／ｍｌ））、１０，０００個の照射されたＣＥＳＳ細胞（ＡＴＣＣ、照射量：２７００ｒａｄ））およびｒｈＩＬ－２（２００ＩＵ／ｍｌ）で刺激した（９６穴プレート中の限界希釈）。サイトカインおよび／またはサイトカインに対する抗体を異なる組合せで含むものを添加してＴリンパ球クローンのTh_1エフェクター細胞またはTh_2エフェクター細胞への発達をそらすこともできる。

【０３９０】

限界希釈アッセイで同定されたクローンを多数回の再刺激によってさらに増殖した。各ラウンドは１０～１２日間続けた。第２ラウンドの増殖では、ＰＨＡ（１～２μｇ／ｍｌ）、1×10^6被照射フィーダー細胞（ＣＥＳＳ）およびｒｈＩＬ－２（２００ＩＵ／ｍｌ）でクローンを刺激した。いくつかの実験では、抗ＩＬ－１２（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、５μｇ／ｍｌ））および抗ＩＬ－４（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、１０ｎｇ／ｍｌ）を添加して、Ｔリンパ球クローンのTh_2またはTc_2サブセットへの発達を促した。続く再刺激ラウンドでは、Ｔリンパ球：フィーダー細胞比を１：２として使用し、ＩＬ－２を２００ＩＵ／ｍｌで添加した。Ｔ細胞クローンのいくつかのパネルはこれらの刺激プロトコルを使用して作製したもので、それらについてはさらに表現型と機能分析を行った。

【実施例１１】

【０３９１】

１６．Ｔリンパ球クローンの表現型

フローサイトメトリーによって決定した１０個のＴリンパ球クローンの表面表現型を、図１６に示す。１０のクローンはすべて、ＣＤ３を高レベルで、ＣＤ２８を検出できるレベルで発現した。１０のクローンのうちの６つはＣＤ４を発現したが、それらはＴヘルパークローン（Ｔｈ）と考えることができる。残りの４つのうちの３つはＣＤ８を発現したため、細胞傷害性Ｔリンパ球クローン（Ｔｃ）と考えることができる。最後のクローンは$CD4^+$／$CD8^+$であった。ＣＤ３０の発現は１０のクローンすべてで検出できた。分析は休止クローンについて行ったので、シグナル強度は比較的低かった。

【０３９２】

Ｔリンパ球クローンについてはサイトカイン発現も分析した（図１７）。休止クローン

を白血球活性化カクテル（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を用い３７℃で４時間刺激した。タンパク質分泌のブロッキングにより細胞内のサイトカインの蓄積を可能にするために、ゴルジプラグ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を添加した。次いで、細胞を洗浄し、メーカーの指示によってＣｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍキット（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）で固定した。細胞内サイトカインは、様々な抗サイトカイン抗体（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を使用して検出し、染色した細胞をフローサイトメトリー分析によって分析した。Ｔｈクローンのうちの２つはＩＬ－４、ＩＬ－１３およびＩＦＮγを発現したが、これはTh_0のプロフィールと一致している。４つのＴｈクローンはTh_2プロフィールを示した。すなわち、それらはＩＬ－４、ＩＬ－５またはＩＬ－１３を発現したが、ＩＦＮγは発現しなかった。２つのＴｃクローンはTc_0サイトカイン・プロフィールを、また、１つのＴｃクローンはTc_2プロフィールを示した。$CD4^+$／$CD8^+$クローンはＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１３を発現したが、ＩＦＮγは発現しなかった。

【実施例１２】

【０３９３】

１７．Ｔリンパ球クローンの再刺激がＣＤ３０の発現を誘導した

Ｔリンパ球クローン再活性化の間のＣＤ３０発現について調べた。休止Ｔリンパ球クローンを、１または２μｇ／ｍｌのＰＨＡ、被照射ＣＥＳＳフィーダー細胞（Ｔ：ＣＥＳＳ細胞比１：２～１：１０、２００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２）で再刺激した。２０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－４もTh_2およびTc_2クローンに添加した。フローサイトメトリー分析によってＣＤ２５およびＣＤ３０の発現をモニターした。図１８は、代表的なＴｈクローンと代表的なＴｃクローンから得られた結果を示す。すべてのクローンの中でＣＤ２５の広範囲なアップレギュレーションが観察され、これは、２日目にピークに達した。これはＴリンパ球の活性化を示す。ＣＤ２５の発現はその日以後は漸減した。ＣＤ３０発現の誘導は、ＣＤ２５のそれと平行していた。ピーク誘導も刺激の後２日目に観察された。発現は、４日目にもまだ検出できたが、それは漸減して７日目にはほとんど基線レベルに落ちた。検討した他の８つのクローンも、ＣＤ２５およびＣＤ３０発現について同様の動力学および大きさを示した（データは示していない）。ＣＤ２５およびＣＤ３０の両者についての活性化－誘導発現はこれらのＴリンパ球クローンの一貫した特徴であった。

【実施例１３】

【０３９４】

１８．ｃＡＣ１０　ＡＤＣが活性化Ｔリンパ球クローンの増殖を阻害した

次に、ｃＡＣ１０　ＡＤＣに対するＴリンパ球クローンの応答を調べた。実施例１２に記載するようにして休止Ｔリンパ球クローンを活性化してＣＤ３０を発現させた。活性化後２日目に、細胞の一部についてフローサイトメトリーによってＣＤ３０発現を分析し、細胞の活性化とＣＤ３０誘導を確認した。残りの細胞はペレット化し、２００ＩＵ／ｍｌのｒＩＬ－２または２００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２、およびTh_2とTc_2クローンについては１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－４を含む新しい培地中に再懸濁した。次いで、細胞を、図１９および図２０に示すようにして、ｃＡＣ１０　ＡＤＣまたは非結合ＩｇＧ　ＡＤＣを段階的濃度で含む培地（最終容積２００μｌ）中に、１０，０００細胞／ウェルで播種した。細胞をさらに４８時間または７２時間インキュベートし、細胞のＤＮＡ合成を評価するために最後の１６時間は^{3}Ｈ－ＴｄＲでパルス処理した。ＡＤＣ処理に対する２つのTh_2クローンの応答結果を図１９および図２０に示した。０．０１μｇ／ｍｌを超える濃度のキメラＡＣ１０　ＡＤＣは、いずれのクローンについても有意に増殖を阻害した。対照ＡＤＣ　ｃＩｇＧ－ｆｋＭＭＡＥは０．１μｇ／ｍｌ未満の濃度では、有意に増殖を抑制しなかったが、ｃＩｇＧ－ｖｃＭＭＡＥでは、２μｇ／ｍｌの高濃度でも増殖抑制活性をまったく示さず、ｃＡＣ１０　ＡＤＣの抗原特異性が確認された。また、合計７２時間のインキュベーションでは、４８時間のインキュベーションより顕著な増殖阻害をもたらした。

【０３９５】

次いで、実施例４に記載したアネクシン（Ａｎｎｅｘｉｎ）Ｖの結合およびＰＩへの細

胞膜透過性を用いて、ｃＡＣ１０　ＡＤＣによって達成された増殖阻害が細胞死によるものかどうかを評価した（図２１）。１μｇ／ｍｌのＡＤＣと共に４８時間のインキュベーションの後、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥで処理した細胞の２７％はアポトーシスであったかまたは死滅していた。これに対してｃＩｇＧ－ｖｃＭＭＡＥで処理した細胞は７～１４％であった。ｃＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥ処理した細胞では、ｃＩｇＧ－ｆｋＭＭＡＥで処理した細胞の１３％および３１％と比較して、４４～４８％がアポトーシスであるかまたは死滅していた。これらのデータから、試験したｃＡＣ１０　ＡＤＣがＣＤ３０$^{+}$Ｔ細胞クローンに対して細胞傷害性を有することが確認された。

【０３９６】

活性化したＴリンパ球クローンの増殖に対するｃＡＣ１０　ＡＤＣの影響を分析する過程で、いくつかのクローンはｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥ処理に比較的強いことがわかった（例えば、図２２のうちのクローン３．２７．２および４．０１．１）。記憶およびナイーブＴ細胞（図１３）の中で観察されたものと同様に、ｃＡＣ１０のＡＥＦＰコンジュゲートは、Ｔリンパ球クローンに対して強い阻害活性を示した。この結果、ｃＡＣ１０－ｆｋＡＥＦＰコンジュゲートおよびｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰコンジュゲートは両方とも、０．０１～０．１μｇ／ｍｌのＩＣ$_{50}$を与えた（これに対し、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥでは＞１μｇ／ｍｌ）。これらのデータは、Ｔリンパ球増殖の標的阻害において様々なｃＡＣ１０　ＡＤＣが有用性を有することをさらに確認するものである。

【実施例１４】

【０３９７】

１９．抗原刺激されたＴリンパ球はｃＡＣ１０　ＡＤＣに対してより感受性が高い

図２３は、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥおよびｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰが様々なタイプのＴリンパ球の増殖を阻害する効果をまとめて示したものである。以下の傾向が観察された。第１に、ナイーブＴ細胞は、記憶Ｔリンパ球またはＴリンパ球クローンと比較した場合、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥおよびｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰの両方に対し最も強いようである。第２に、Ｔリンパ球クローンと記憶Ｔ細胞の間では、１０のＴリンパ球クローンのうち8は記憶Ｔリンパ球と比較して、ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥより感受性が高いことがわかった。これらのクローンは、炎症性および自己免疫性応答にかかわる慢性的に刺激されたエフェクターＴ細胞と同様に、Ｔ細胞受容体およびサイトカインによる多数回の刺激によって増殖していた。第３に、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球クローンのいずれの増殖も、ｃＡＣ１０　ＡＤＣに影響を受けやすかった。第４に、ｃＡＣ１０　ＡＤＣへの感受性は、それらのサイトカイン分泌プロフィールによって定義されるような何らかの特定のＴリンパ球サブセットに相互に関連するようにも見えなかった。したがって、Ｔｈ$_{0}$、Ｔｈ$_{2}$、およびＴｃ$_{0}$クローンおよびＴｃ$_{2}$の各１個とＣＤ４$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$クローンは、ｃＡＣ１０　ＡＤＣに感受性を有することがわかった。これらの結果は、ｃＡＣ１０　ＡＤＣは、複合的なＴリンパ球サブセット（ナイーブＴリンパ球または記憶Ｔリンパ球、ヘルパー（ＣＤ４$^{+}$）または細胞傷害性（ＣＤ８$^{+}$）リンパ球を含む）および様々な組合せでサイトカインを分泌するエフェクターリンパ球を標的とするために使用され得ることを示唆する。さらに、免疫疾患の病因に参加するエフェクターＴリンパ球は、ナイーブＴ細胞より慢性的に活性化したＴリンパ球クローンに生物学上より似ているので、ｃＡＣ１０　ＡＤＣは、自己免疫応答、炎症性応答およびアレルギー性応答の病因に含まれるＣＤ３０$^{+}$エフェクターＴリンパ球の目的とする枯渇に特に適しているかもしれない。

【０３９８】

２０．特定の実施形態および参考文献の引用

本発明は本願明細書に記載した特定の実施形態によってその範囲が限定されるものではない。実際、本願明細書に記載したものに加えての本発明の様々な改変は、これまでの記載および添付図面から当業者には明らかであろう。そのような改変は、添付する特許請求の範囲内に含まれる。

【０３９９】

本願明細書に引用した、特許出願、特許および学術的な刊行物を含む様々な参考文献の

各開示は、参照によってその全体が本願明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【０４００】

【図１】ジャーカット（Ｊｕｒｋａｔ）Ｔ細胞の上でのＣＤ３０の発現を示す図である。ジャーカットＴ細胞系統について、フローサイトメトリー分析により、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ２８およびＣＤ３０の発現を調べた。

【図２】ジャーカットＴ細胞の増殖に対する抗ＣＤ３０の影響を示す図である。ジャーカットＴ細胞を、２次架橋性ヤギ抗ヒト（ＧＡＨ）Ｆｃγ特異的Ａｂの存在と共に（ＸＬ ｃＡＣ１０）または存在させずに（ｃＡＣ１０）、段階的投与量のキメラＡＣ１０（ｃＡＣ１０）抗ＣＤ３０ ｍＡｂと共にインキュベートした。７２時間のインキュベーションの最後の４時間において、トリチウムを含むチミジン（^{3}Ｈ－ＴｄＲ）のパルスによって増殖を評価した。

【図３】抗ＣＤ３０ ｍＡｂの２次架橋によるジャーカットＴ細胞の増殖阻害を示す図である。ジャーカットＴ細胞を、２次架橋性ヤギ抗マウス（ＧＡＭ）Ｆｃγ特異的Ａｂの存在下、段階的投与量のＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１ ｍＡｂと共にインキュベートした。１次Ａｂと２次Ａｂの比は図中に示すように変えた。４８時間のインキュベーションの最後の４時間において、^{3}Ｈ－ＴｄＲのパルスにより増殖を評価した。

【図４】抗ＣＤ３０ ｍＡｂの２次架橋によるジャーカットＴ細胞のアポトーシス誘導を示す図である。ジャーカットＴ細胞を、０．８μｇ／ｍｌのＧＡＭ２次Ａｂで架橋したＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１ ０．２μｇ／ｍｌで処理した。処理後２４時間および４８時間の時点で、細胞周期の状態およびＤＮＡ合成を、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）および抗ブロモデオキシウリジン（ＢｒｄＵ）染色によって検出した。

【図５】抗ＣＤ３０ ｍＡｂの２次架橋によるジャーカットＴ細胞のアポトーシス誘導を示す図である。ジャーカットＴ細胞を、ＧＡＭ２次Ａｂで架橋したＡＣ１０またはＨｅＦｉ－１の段階的投与量で処理した。１次Ａｂと２次Ａｂの濃度比は１：４とした。処理後２４時間および４８時間の時点で細胞周期の状態およびＤＮＡ合成をＰＩおよび抗ＢｒｄＵ染色によって検出した。

【図６】抗ＣＤ３ ｍＡｂによるジャーカットＴ細胞の抗ＣＤ３０誘導アポトーシスの増強効果を示す図である。図中に示す段階的投与量のＡＣ１０、抗ＣＤ３ ｍＡｂ ＯＫＴ３または両方のｍＡｂの組合せでジャーカットＴ細胞を処理した。４倍過剰のＧＡＭ２次Ａｂを用いて１次ｍＡｂを架橋した。処理後２４時間および４８時間の時点で細胞周期の状態およびＤＮＡ合成をＰＩおよび抗ＢｒｄＵ染色によって検出した。

【図７】アネクシン（Ａｎｎｅｘｉｎ）Ｖ結合によるジャーカットＴ細胞の中の抗ＣＤ３０誘導アポトーシスの検出。ジャーカットＴ細胞は、ＡＣ１０、ＨｅＦｉ－１、抗ＣＤ３ ｍＡｂ ＯＫＴ３、またはＡＣ１０もしくはＨｅＦｉ－１およびＯＫＴ３の組合せで処理した。抗ＣＤ３０および抗ＣＤ３ ｍＡｂは２μｇ／ｍｌで使用した。ＧＡＭ２次Ａｂは１次ｍＡｂを架橋するために１０倍過剰で使用した。ＦＩＴＣをコンジュゲートしたアネクシンＶの結合は、アポトーシス進行中の細胞の検出を可能にした。ＰＩへの細胞膜透過性を用いて細胞膜の完全性を失った死細胞を検出した。図中で、アネクシン$Ｖ^{-}$／$ＰＩ^{-}$事象は生存細胞（左下四分域）を、アネクシン$Ｖ^{+}$／$ＰＩ^{-}$事象はアポトーシス細胞（右下四分域）を、アネクシン$Ｖ^{+}$／$ＰＩ^{+}$事象は死細胞（右上四分域）を表す。密度プロットの外の数は、各四分域中に存在する細胞のパーセンテージを表す。

【図８】抗体－薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）であるｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥ、ｃＡＣ１０－ｆｋＭＭＡＥ、ｃＡＣ１０－ｖｃＡＥＦＰおよびｃＡＣ１０－ｆｋＡＥＦＰの化学構造を示す図である。

【図９】ジャーカットＴ細胞の増殖に対するｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥコンジュゲートの増殖抑制効果を示す図である。ｃＡＣ１０－ｖｃＭＭＡＥコンジュゲートまたは非結合対照ＩｇＧ（ｃＩｇＧ）－ｖｃＭＭＡＥコンジュゲートを段階的投与量で培養開始時にジャーカットＴ細胞に加えた。細胞は、合計９６時間、ＡＤＣに連続的に暴露した。インキュベーションの最後の１６時間に^{3}Ｈ－ＴｄＲのパルスによって増殖を評価した。

【図１０】活性化された正常な末梢血上単核細胞（ＰＢＭＣ）でのＣＤ３０誘導を示す図である。正常なドナーから得たＰＢＭＣを、抗ＣＤ３、抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８、または培地のみ（ネガティブ・コントロール）で刺激した。０、２、４、６および８日目において細胞を回収した。また、ＣＤ３０の発現はＣＤ４細胞（図示）とＣＤ８細胞（図示していない）の両方について多色フローサイトメトリー分析によって決定した。

【図１１】活性化された正常なヒトＰＢＭＣに対するｃＡＣ１０　ＡＤＣの成長抑制効果を示す図である。正常なドナーから得たＰＢＭＣを、図１０に記載するように抗ＣＤ３＋抗ＣＤ８　ｍＡｂで活性化した。図中に示す様々なＡＤＣの段階的投与量を、培養開始時に細胞に加えた。細胞は、合計４８時間または７２時間、ＡＤＣに連続的に暴露した。インキュベーションの最後の１６時間に^{3}Ｈ－ＴｄＲの取り込みによって増殖を評価した。

【図１２】記憶およびナイーブＴ細胞におけるＣＤ３０の誘導を示す図である。末梢血Ｔリンパ球、記憶Ｔリンパ球およびナイーブＴリンパ球を、免疫選択を使用してＰＢＭＣから富化した。次いで、Ｔ細胞を、組み換えヒトインターロイキン（ｒｈＩＬ）－２およびｒｈＩＬ－４の両者の存在下、抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８　ｍＡｂによって７２時間活性化した。次いで、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$細胞上のＣＤ３０発現をフローサイトメトリー分析によって決定した。

【図１３】活性化した記憶およびナイーブＴリンパ球に対するｃＡＣ１０　ＡＤＣの成長抑制効果を示す図である。ＰＢＭＣから富化した記憶およびナイーブＴ細胞を誘導して、図１２に記載するようにＣＤ３０を発現させた。誘導の７２時間後にＴ細胞を回収し、ｒｈＩＬ－２存在下、図中に示す様々なＡＤＣの段階的投与量で処理した。細胞は、さらに４８時間または７２時間、ＡＤＣに連続的に暴露した。インキュベーションの最後の１６時間に^{3}Ｈ－ＴｄＲの取り込みによって増殖を評価した。

【図１４】同種異系細胞によって刺激されたＴ細胞におけるＣＤ３０誘導を示す図である。ＣＤ４富化したＰＢＭＣを、照射された同種異系バーキット（Ｂｕｒｋｉｔｔ）リンパ腫Ｄａｕｄｉ細胞の連続サイクルで刺激した。ＣＤ４細胞上のＣＤ３０の発現は、同種異系刺激細胞の添加後３～５日目および７～９日目に、フローサイトメトリー分析によって決定した。

【図１５】Ｔリンパ球クローンの作製を示す図である。ＰＢＭＣからのＴ細胞クローンの生成を模式的に要約した。

【図１６】Ｔリンパ球クローンの表現型を示す図である。図１５の中のスキームによる３人の異なる正常なドナーから単離した１０種の独立したＴリンパ球クローンについて、フローサイトメトリー分析によって、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２８およびＣＤ３０の表面発現を調べた。２つの代表的なクローンから得たヒストグラムを示す。また、フローサイトメトリー分析から得られた平均蛍光強度によって示される１０クローンすべてにおける受容体発現レベルを表にして示す。

【図１７】Ｔリンパ球クローンによるサイトカイン発現を示す図である。図１６に示したＴリンパ球クローンを、フローサイトメトリー分析によって、ＩＬ－２、４、５、１３、ＩＦＮγおよびＴＮＦα発現能力について調べた。２つの代表的なクローンから得たヒストグラムを示す。また、フローサイトメトリー分析から得られた平均蛍光強度によって示される１０クローンすべてにおけるサイトカイン発現のレベルを表にして示す。表の最下列では、サイトカイン発現に基づいてＴリンパ球クローンを様々なサブセットに割り当てた。

【図１８】Ｔリンパ球クローンの刺激によるＣＤ３０のアップレギュレーションを示す図である。図１６および１７に示したパネル中の休止Ｔｈ$_{2}$クローンおよび休止Ｔｃ$_{2}$クローンを、フィトヘムアグチニン（ＰＨＡ）、照射されたフィーダー細胞、ＩＬ－２およびＩＬ－４で刺激した。０、２、４および７日目におけるＣＤ２５およびＣＤ３０発現を、フローサイトメトリー分析によって決定した。

【図１９】Ｔリンパ球クローン４０Ｅ１０に対するｃＡＣ１０　ＡＤＣの成長抑制効果を示す図である。４０Ｅ１０細胞は、図１８に記載するようにしてＣＤ３０発現を誘導した。活性化２日目のＣＤ３０発現のピーク時に細胞を回収し、ｒｈＩＬ－２およびｒｈＩＬ

－４存在下、図中に示す様々な段階的濃度のＡＤＣで処理した。細胞は、さらに４８時間または７２時間、ＡＤＣに連続的に暴露した。インキュベーションの最後の１６時間に^{3}Ｈ－ＴｄＲの取り込みによって増殖を評価した。

【図２０】Ｔリンパ球クローン４０Ｈ７に対するｃＡＣ１０　ＡＤＣの成長抑制効果を示す図である。４０Ｈ７細胞は、図１８に記載するようにしてＣＤ３０発現を誘導した。活性化２日目のＣＤ３０発現のピーク時に細胞を回収し、ｒｈＩＬ－２およびｒｈＩＬ－４存在下、図中に示す様々な段階的濃度のＡＤＣで処理した。細胞は、さらに４８時間または７２時間、ＡＤＣに連続的に暴露した。インキュベーションの最後の１６時間に^{3}Ｈ－ＴｄＲのパルスによって増殖を評価した。

【図２１】ｃＡＣ１０　ＡＤＣによって誘導されたＴ細胞クローン中の増殖抑制には、アポトーシス誘導が伴うことを示す図である。クローン４０Ｅ１０および４０Ｈ７を、図中に示す様々なＡＤＣ　１μｇ／ｍｌと共にインキュベートした。インキュベーション４８時間後に、アネクシンＶ結合およびＰＩの透過性を用いてアポトーシス誘導の程度を評価した。

【図２２】Ｔリンパ球クローン３．２７．２と４．０１．１に対するｃＡＣ１０　ＡＤＣの成長抑制効果を示す図である。３．２７．２および４．０１．１細胞では、図１８に記載するようにしてＣＤ３０発現が誘導された。活性化２日目のＣＤ３０発現のピーク時に細胞を回収し、ｒｈＩＬ－２存在下、図中に示す様々な段階的濃度のＡＤＣで処理した。細胞は、さらに７２時間、ＡＤＣに連続的に暴露した。インキュベーションの最後の４時間に^{3}Ｈ－ＴｄＲのパルスによって増殖を評価した。

【図２３】ＣＤ３０$^{+}$Ｔリンパ球クローンおよび活性化された正常なＴリンパ球の増殖を抑制するｃＡＣ１０　ＡＤＣの効果を要約して示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

110> SEATTLE GENETICS, INC.
Law, Che-Leung
Klussman, Kerry
Wahl, Alan
Senter, Peter
Doronina, Svetlana
Toki, Brian

<120> TREATMENT OF IMMUNOLOGICAL DISORDERS USING
ANTI-CD30 ANTIBODIES

<130> 9632-077-228

<140>
<141>

<150> 60/331,750
<151> 2001-11-20

<160> 33

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 351
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(351)

<400> 1

```
cag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag gtg gtg aag cct ggg gct       48
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

tat ata acc tgg gtg aag cag aag cct gga cag gga ctt gag tgg att      144
Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc      192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aca tcc tcc agc aca gcc ttc      240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65                  70                  75                  80

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt      288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

gcg aac tat ggt aac tac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act cag      336
Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
            100                 105                 110
```

```
gtc act gtc tct gca                                                    351
Val Thr Val Ser Ala
        115


      <210> 2
      <211> 117
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 2
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30
Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65                  70                  75                  80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ala
        115

      <210> 3
      <211> 15
      <212> DNA
      <213> Mus musculus

      <400> 3
gactactata taacc                                                       15

      <210> 4
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 4
Asp Tyr Tyr Ile Thr
 1               5

      <210> 5
      <211> 51
      <212> DNA
      <213> Mus musculus

      <400> 5
tggatttatc ctggaagcgg taatactaag tacaatgaga agttcaaggg c               51

      <210> 6
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 6
```

```
Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1               5                  10                  15
Gly
```

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 7
tatggtaact actggtttgc ttac 24

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
```
Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr
 1               5
```

<210> 9
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(333)

<400> 9

```
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg       48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1               5                  10                  15

cag agg gcc acc atc tcc tgc aag gcc agc caa agt gtt gat ttt gat       96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

ggt gat agt tat atg aac tgg tac caa cag aaa cca gga cag cca ccc      144
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

aaa gtc ctc atc tat gct gca tcc aat cta gaa tct ggg atc cca gcc      192
Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat      240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65                  70                  75                  80

cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag caa agt aat      288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

gag gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa          333
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 10

<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1               5                  10                  15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45
Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65                  70                  75                  80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 11

```
aaggccagcc aaagtgttga ttttgatggt gatagttata tgaac                    45
```

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

```
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1               5                  10                  15
```

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 13

```
gctgcatcca atctagaatc t                                              21
```

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14

```
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1               5
```

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 15

```
cagcaaagta atgaggatcc gtggacg                                        27
```

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 16
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 17
<211> 375
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(375)

<400> 17
gag gtg aag ctg gtg gag tct gga gga ggc ttg gta cag cct ggg ggt 48
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca act tct ggg ttc acc ttc agt gat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

tat atg aac tgg gtc cgc cag cct cca gga aag gct ctt gag tgg ttg 144
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

ggt ttt att aga aac aaa gct aat ggt tac aca aca gag ttc agt gca 192
Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ala
50 55 60

tct gtg atg ggt cgg ttc acc atc tcc aga gat gat tcc caa agc atc 240
Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

ctc tat ctt cag atg aac acc ctg aga gct gag gac agt gcc act tat 288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

tac tgt gca aga gat ccc ccc tat ggt aac ccc cat tat tat gct atg 336
Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Pro Tyr Gly Asn Pro His Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 375
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 18
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

```
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
        35                  40                  45
Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ala
    50                  55                  60
Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65                  70                  75                  80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Pro Tyr Gly Asn Pro His Tyr Tyr Ala Met
            100                 105                 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 19
<211> 15
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 19
gattactata tgaac 15

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20
Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 21
<211> 57
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 21
tttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagagttca gtgcatctgt gatgggt 57

<210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Met Gly

<210> 23
<211> 42
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 23
gatccccccc atggtaaccc ccattattat gctatggact ac 42

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24
Asp Pro Pro Tyr Gly Asn Pro His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(333)

<400> 25
gac att gtg ctg acc cag tct cct gct tcc tta gct gtt tct ctg ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

cag agg gcc acc atc tca tgc agg gcc agc aaa agt gtc agt gca tct 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
20 25 30

ggc tat aat tat atg cac tgg tac caa cag aaa gca ggg cag cca ccc 144
Gly Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aaa ctc ctc atc cat ctt gca tcc aac cta gaa tct ggg gtc cct gcc 192
Lys Leu Leu Ile His Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

cct gtg gag gag gag gat gct tca acc tat tac tgt cag cac agt ggg 288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
85 90 95

gag ctt cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 333
Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
20 25 30
Gly Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile His Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
85 90 95
Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 27
<211> 45
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 27
agggccagca aaagtgtcag tgcatctggc tataattata tgcac 45

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Asn Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 29
cttgcatcca acctagaatc t 21

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 31
cagcacagtg gggagcttcc attcacg 27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32
Gln His Ser Gly Glu Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

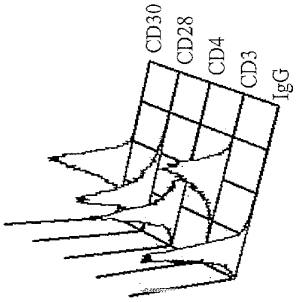
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 33
agttgagggg actttcccag gc 22

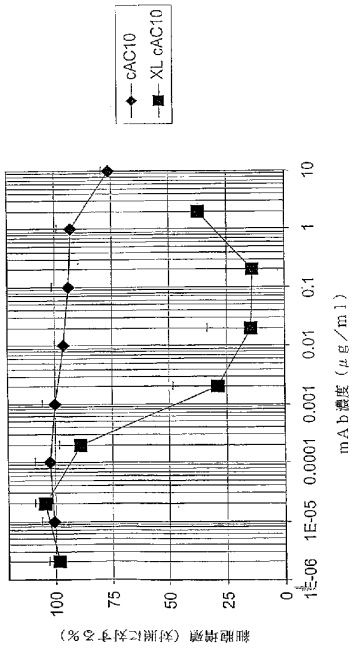
OnCusp
Ex. 1002

【図１】

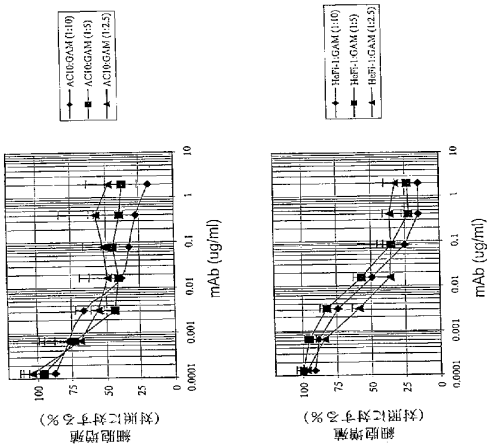
	平均蛍光強度
IgG	6
CD3	152
CD4	16
CD28	21
CD30	30



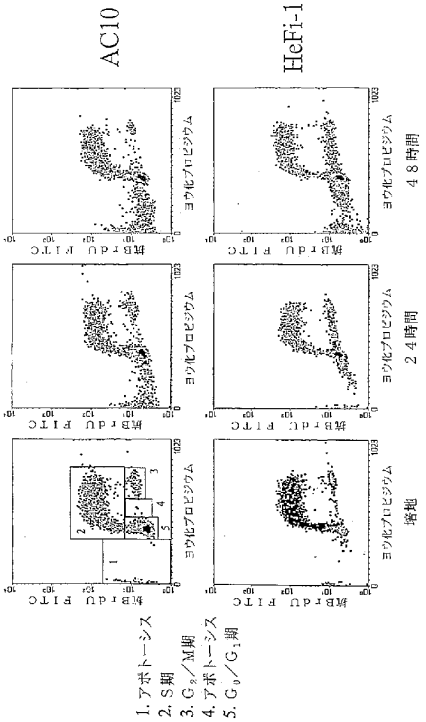
【図２】



【図３】

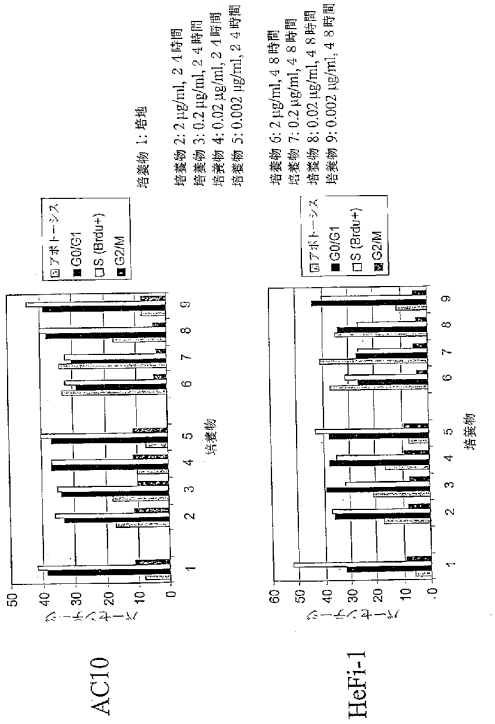


【図４】

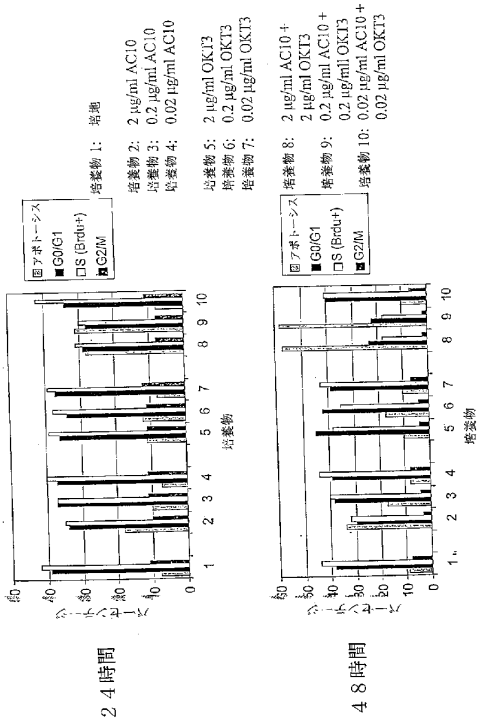


OnCusp
Ex. 1002

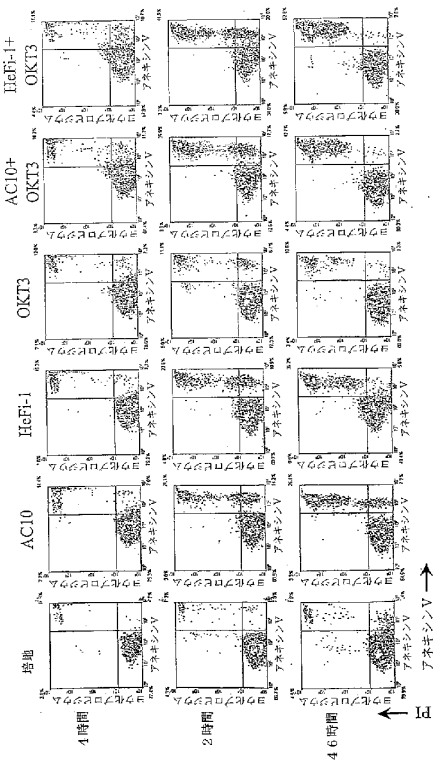
【図５】



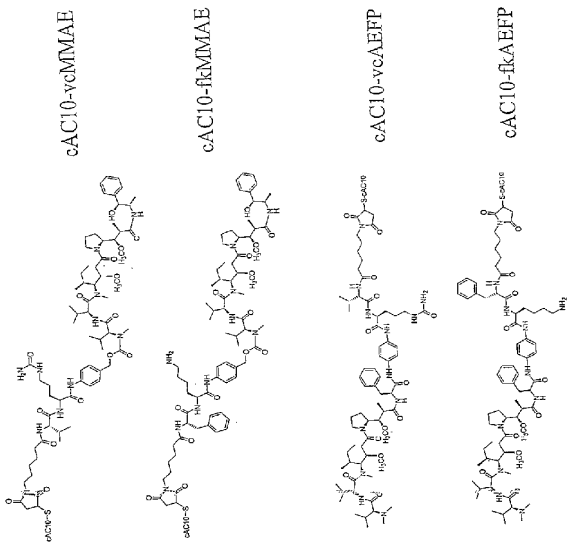
【図６】



【図７】

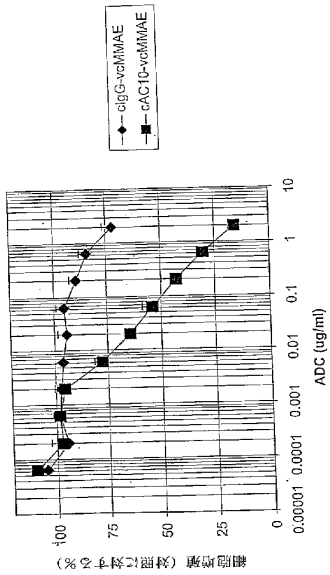


【図８】

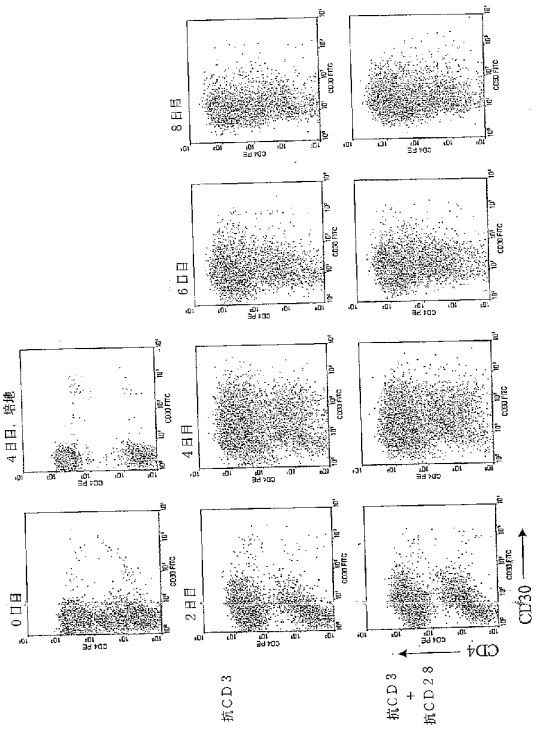


OnCusp
Ex. 1002

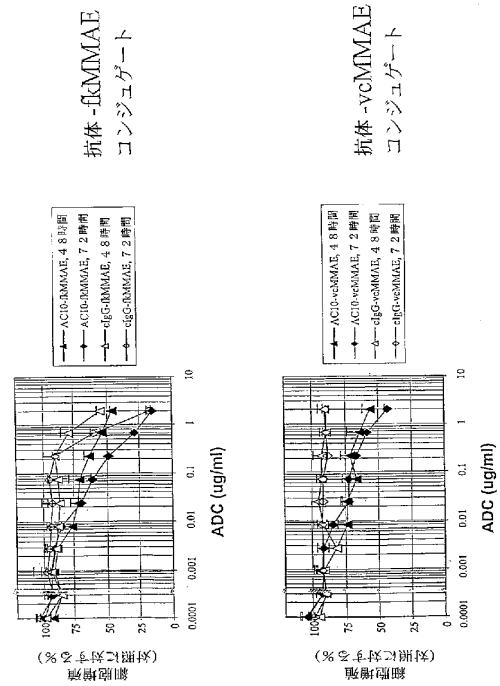
【図９】



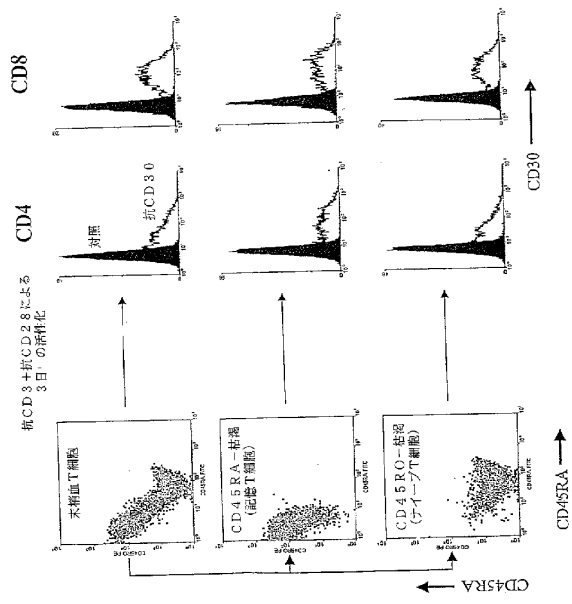
【図１０】



【図１１】

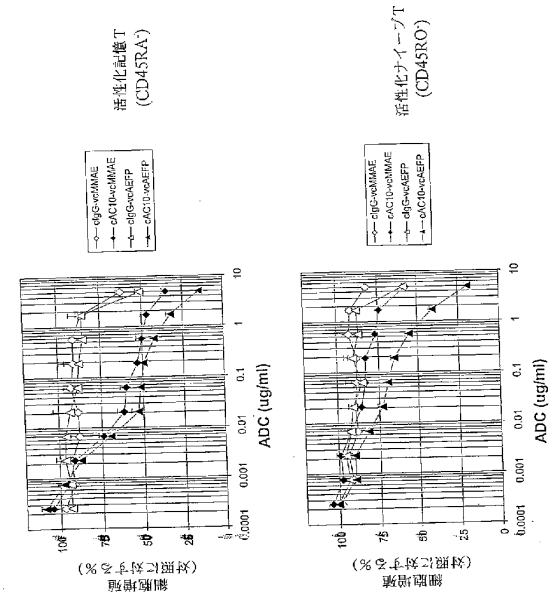


【図１２】

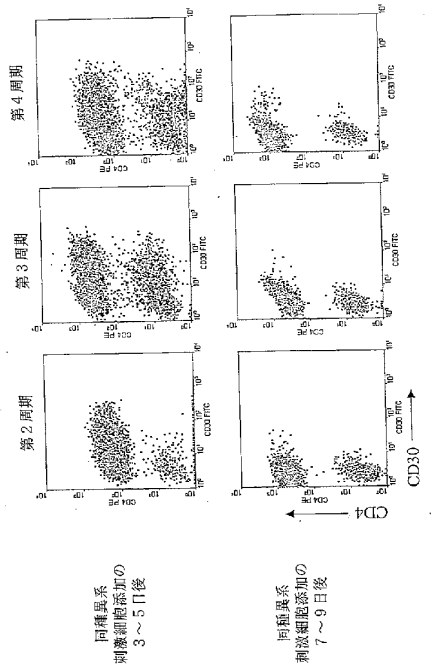


OnCusp
Ex. 1002

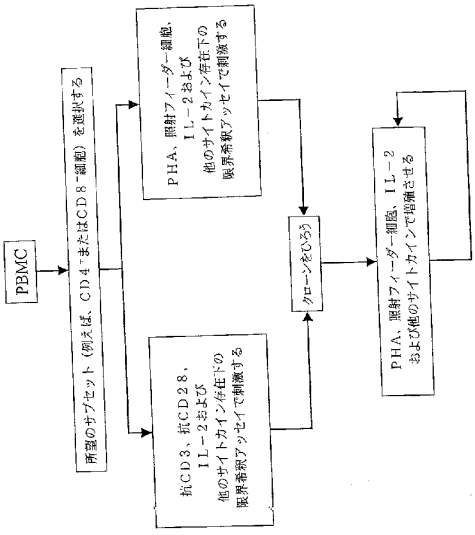
【図１３】



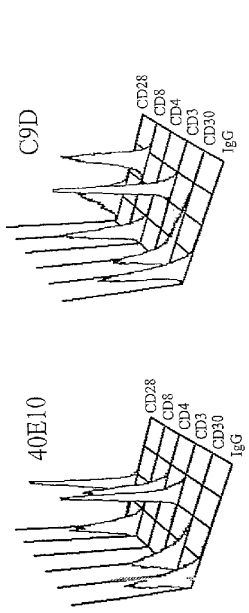
【図１４】



【図１５】



【図１６】

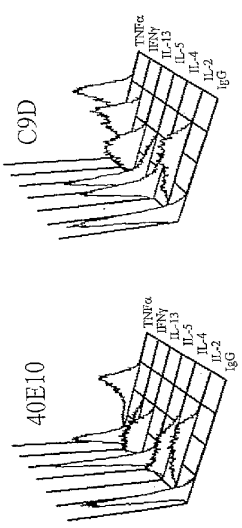


平均蛍光強度

	3.27.2	4.01.1	20G5	40D8	40E10	40H7	C2A	C9D	C5H	C7A
IgG	5	4	6	4	4	4	4	3	3	3
CD30	6	6	10	10	8	8	8	8	6	4
CD3	281	203	209	206	223	224	121	137	135	164
CD4	187	202	168	137	142	150	4	3	4	17
CD8	5	4	5	4	3	4	192	422	98	64
CD28	24	38	37	35	44	46	20	16	10	15

OnCusp
Ex. 1002

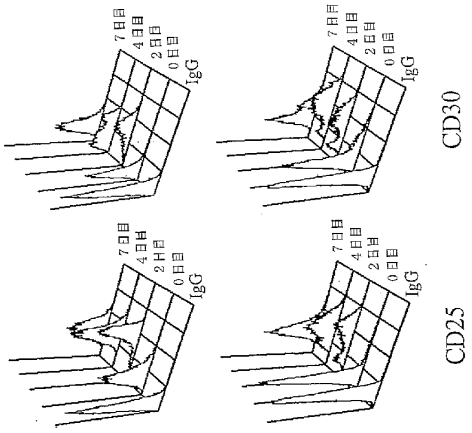
【図１７】



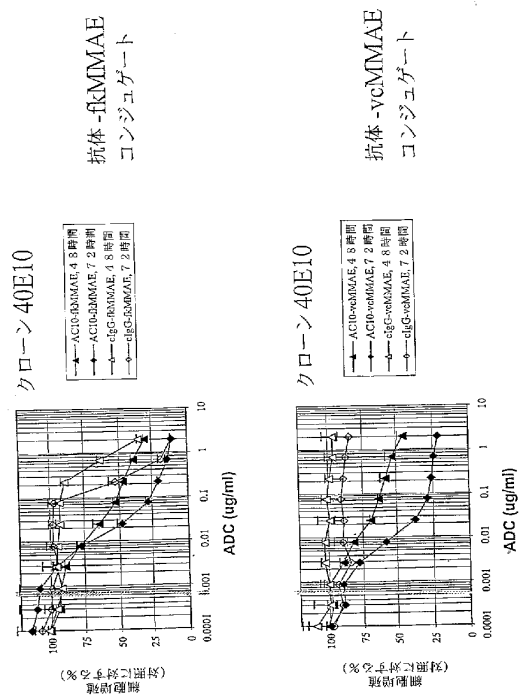
平均蛍光強度

	3.27.2	4.01.1	20G5	40D8	40E10	40H7	C1A	C9D	C5H	C7A
IgG	7	4	4	4	3	3	3	3	3	4
IL-2	451	556	91	127	88	86	95	170	236	346
IL-4	24	40	33	23	27	34	27	16	9	13
IL-5	7	5	10	5	4	6	6	8	26	29
IL-13	61	64	21	16	14	17	11	25	32	32
IFNγ	134	165	4	4	7	5	166	138	5	9
TNFα	998	879	244	253	199	151	425	471	264	239
	Th0		Th2				Tc0		Tc2	

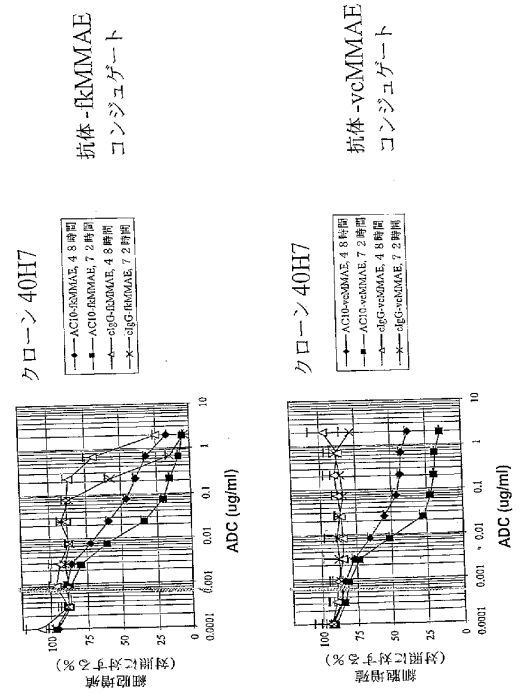
【図１８】



【図１９】

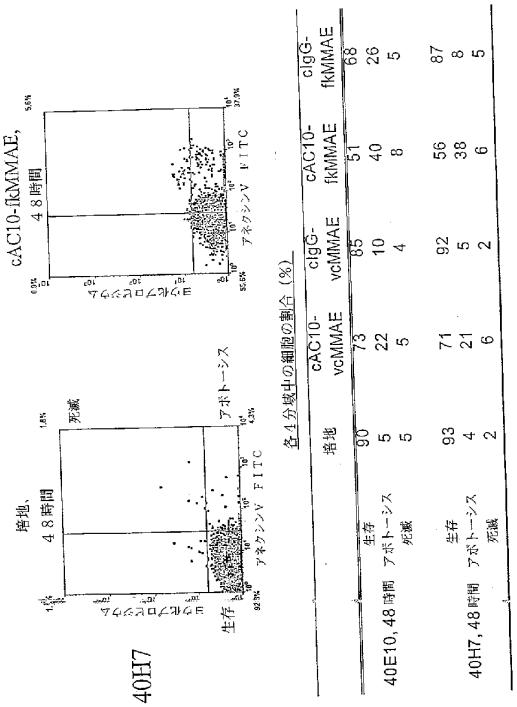


【図２０】



OnCusp
Ex. 1002

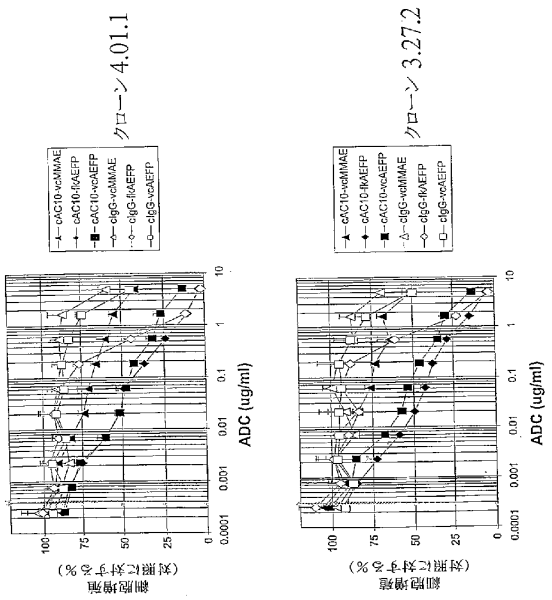
【図２１】



各細胞集団の割合（%）

		cAC10-vcMMAE	cIgG-vcMMAE	cAC10-fkMMAE	cIgG-fkMMAE
40E10, 48時間	増殖	90	73	85	68
	生存	5	22	10	26
	アポトーシス	5	5	4	5
	死滅				
40H7, 48時間	増殖	93	71	92	87
	生存	4	21	5	8
	アポトーシス	2	6	2	5
	死滅				

【図２２】



【図２３】

下線細胞クローン または注釈下線細胞	表現型	サイトカイン・プロファイル	IC50 (ug/ml) cAC10-vcMMAE	cAC10-vcAEFP
3.27.2	CD3, CD4, CD30	IL4, IL-5, IL-13, IFNγ	3.8	0.07
4.01.1	CD3, CD4, CD30	IL4, IL-5, IL-13, IFNγ	2.5	0.01
20G5	CD3, CD4, CD30	IL-4, IL-13	0.006	0.003
40D8	CD3, CD4, CD30	IL-4, IL-13	0.005	0.003
40E10	CD3, CD4, CD30	IL-4, IL-13	0.01	n.d.
40H7	CD3, CD4, CD30	IL-4, IL-13	0.009	n.d.
C1A	CD3, CD8, CD30	IL-4, IL-13, IFNγ	0.83	0.2
C9D	CD3, CD8, CD30	IL-13, IFNγ	0.005	n.d.
C5H	CD3, CD8, CD30	IL-5, IL13	0.037	n.d.
C7A	CD3, CD4/CD8, CD30	IL-5, IL13	0.32	n.d.
ナイーブT細胞	CD3, CD4, CD8, CD30		>2	1.3
記憶T細胞	CD3, CD4, CD8, CD30		1	0.09

n.d. = 測定せず

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/37223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 39/395
US CL : 424/143.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 424/143.1

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)
WEST, STN and MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HANEKOM et al .Plasma-soluble CD30 in childhood tuberculosis: effects of disease severity, nutritional status, and vitamin A therapy. Clin. Diagn. Lab. Immunol. March 1999, Vol. 6, No. 2, pages 204-208.	1-210
A	OKUMURA et al. Increased Serum Concentration of Soluble CD30 in Patients with Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis. J. Clin. Endocrinol. Metab. June 1997, Vol. 82, No. 6, pages 1757-1760.	1-210
A	KRAMS et al. Elevations in IFN-gamma, IL-5, and IL-10 in patients with the autoimmune disease primary biliary cirrhosis: association with autoantibodies and soluble CD30. Clin. Immunol. Immunopathol. September 1996, Vol. 80, No. 3, pages 311-320.	1-210
A	GERLI et al. Soluble CD30 in early rheumatoid arthritis as a predictor of good response to second-line therapy. Rheumatology (Oxford). December 1999, Vol. 38, No. 12, pages 1282-1284.	1-210

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent 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
16 July 2004 (16.07.2004)

Date of mailing of the international search report
11 AUG 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 872-9306

Authorized officer
Maher M. Haddad
Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

PCT/US02/37223

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ICHIKAWA et al Circulating soluble CD30 levels in primary Sjogren's syndrome, SLE and rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 1998, Vol. 16, No. 6, pages 759-760.	1-210
A	WANG et al. High plasma levels of the soluble form of CD30 activation molecule reflect disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. Am J Med. June 1997, Vol. 102, No. 6, pages 517-523.	1-210
A	PIZZOLO et al. High serum level of the soluble form of CD30 molecule in the early phase of HIV-1 infection as an independent predictor of progression to AIDS. AIDS. 1994, Vol. 8, No. 6, pages741-745.	1-210
A	WO 03/059282 A2 (MEDAREX, INC.) 24 July 2003 (24.07.2003), entire document.	1-210

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード(参考)
A61P 5/14	A61K 48/00	
A61P 11/06	A61P 1/16	
A61P 17/00	A61P 5/14	
A61P 17/06	A61P 11/06	
A61P 19/02	A61P 17/00	
A61P 25/00	A61P 17/06	
A61P 27/14	A61P 19/02	
A61P 27/16	A61P 25/00	
A61P 29/00	A61P 27/14	
A61P 31/12	A61P 27/16	
A61P 35/00	A61P 29/00	
A61P 37/02	A61P 29/00 101	
	A61P 31/12	
	A61P 35/00	
	A61P 37/02	
	A61K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ロー,チェ-リュン
アメリカ合衆国 98133 ワシントン州,ノース ショアーライン,フレモント アベニュー 18834
(72)発明者 クルスマン,ケリー
アメリカ合衆国 98103 ワシントン州,シアトル,ナンバー208,インターレイク アベニュー ノース 4814
(72)発明者 ウォール,アラン,エフ.
アメリカ合衆国 98020 ワシントン州,マーサー アイランド,イースト マーサー ウェイ 6150
(72)発明者 センター,ピーター
アメリカ合衆国 98115 ワシントン州,シアトル,40ティーエイチ アベニュー エヌイー 9000
(72)発明者 ドロニナ,スヴェトラナ
アメリカ合衆国 98296 ワシントン州,シアトル,エス.イー.,198ティーエイチ プレイス 10910
(72)発明者 トキ,ブライアン
アメリカ合衆国 98208 ワシントン州,エヴェレット,エス.イー.,1エスティー アベニュー 9807

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA18 BA19 BA21 BA23 CA23 CA25 DA01 MA01 NA14 ZA012 ZA332 ZA342 ZA592 ZA752 ZA892 ZA942 ZA962 ZB022 ZB052 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZB212 ZB262 ZB332
4C085 AA13 AA14 AA21 AA23 AA25 BB01 BB41 BB42 BB43 BB44 CC32 DD88 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA33
ZA34 ZA59 ZA75 ZA89 ZA94 ZA96 ZB02 ZB05 ZB07 ZB11
ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZB33

(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2006-511526
(P2006-511526A)
(43)公表日　平成18年4月6日(2006.4.6)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48	4C076
A61K 47/20	(2006.01)	A61K	47/20	4C085
A61K 47/42	(2006.01)	A61K	47/42	4C086
A61K 47/22	(2006.01)	A61K	47/22	
A61K 31/4745	(2006.01)	A61K	31/4745	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-559895 (P2004-559895)
(86)(22)出願日　平成15年12月15日 (2003.12.15)
(85)翻訳文提出日　平成17年8月15日 (2005.8.15)
(86)国際出願番号　PCT/GB2003/005454
(87)国際公開番号　WO2004/054622
(87)国際公開日　平成16年7月1日 (2004.7.1)
(31)優先権主張番号　60/433,017
(32)優先日　平成14年12月13日 (2002.12.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504149971
イミューノメディクス、インコーポレイテッド
ＩＭＭＵＮＯＭＥＤＩＣＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、プレインズ、アメリカン、ロード、３００
(74)代理人　100075812
弁理士　吉武　賢次
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝
(74)代理人　100094640
弁理士　紺野　昭男
(74)代理人　100107342
弁理士　横田　修孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞内で開裂可能な結合を有する免疫接合体

(57)【要約】
本発明は、ターゲッティング残基と治療残基を含む様々な癌細胞をターゲットするための改善された能力を有する治療接合体に関する。ターゲッティングと治療残基とは、免疫接合体の治療効力を増強する酸開裂可能な結合を介して結合している。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a) ターゲッティング残基、
(b) 化学療法薬残基、および
(c) チオール基を介してターゲッティング残基へ結合し、かつヒドラゾン以外の細胞内で開裂可能な残基を介して化学療法薬残基へ結合するリンカー
を含んでなる、免疫接合体。
【請求項２】
前記細胞内で開裂可能な残基が、細胞内エステラーゼによって開裂可能なものである、請求項１に記載の免疫接合体。
【請求項３】
前記細胞内で開裂可能な残基がエステル残基である、請求項１または２に記載の免疫接合体。
【請求項４】
前記エステル残基が、アミノ酸のα-カルボン酸から形成されるエステルである、請求項３に記載の免疫接合体。
【請求項５】
前記細胞内で開裂可能な残基が、細胞内酵素によって開裂可能なペプチド結合を含んでなるものである、請求項１に記載の免疫接合体。
【請求項６】
前記細胞内で開裂可能な残基が、酸性ｐＨにて細胞内コンパートメントの開裂を受けやすいエーテル結合を含んでなるものである、請求項１に記載の免疫接合体。
【請求項７】
前記エーテル結合が、化学療法薬と前記細胞内で開裂可能な残基との間で形成されるエーテル結合である、請求項６に記載の免疫接合体。
【請求項８】
前記細胞内で開裂可能な残基が、テトラヒドロピラン残基、テトラヒドロフラン残基、またはオルソエステル残基を含んでなるものである、請求項７に記載の免疫接合体。
【請求項９】
前記リンカーが、前記ターゲッティング残基のチオール基に結合するチオール反応性基を含んでなるものである、請求項１に記載の免疫接合体。
【請求項１０】
前記チオール反応性基が、ターゲッティング残基のチオール基に結合するマレイミドまたはビニルスルホンである、請求項９に記載の免疫接合体。
【請求項１１】
前記リンカーが、前記ターゲッティング残基のリシン側鎖のマレイミド残基と反応するチオール基を含んでなるものである、請求項１に記載の免疫接合体。
【請求項１２】
前記化学療法薬残基とターゲッティング残基との間に、水可溶化残基をさらに含んでなる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫接合体。
【請求項１３】
前記水可溶化残基がアミノポリカルボキシレートである、請求項１２に記載の免疫接合体。
【請求項１４】
前記アミノポリカルボキシレートが、DTPA、EDTA、TTHA、ベンジル-DTPA、DOTA、ベンジル-DOTA、NOTA、ベンジル-NOTA、TETA、およびN,N'-ジアルキル置換ピペラジンからなる群から選択される、請求項13に記載の免疫接合体。
【請求項１５】
前記化学療法薬残基が、ドキソルビシン(DOX)、エピルビシン、モルホリノドキソルビシン(モルホリノ-DOX)、シアノモルホリノ-ドキソルビシン(シアノモルホリノ-DOX)、2-

ピロリノ-ドキソルビシン(2-PDOX)、CPT、CPT-11、SN-38、トポテカン、タキサン、ゲルダナマイシン、アンサマイシン、およびエポチロンからなる群から選択されるものである、請求項１～１４のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項１６】

前記ターゲッティング残基が、抗体、またはその断片と結合する抗原である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項１７】

前記抗体がモノクローナル抗体(mAb)である、請求項１６に記載の免疫接合体。

【請求項１８】

前記抗体が、多価および/または多重特異性であるモノクローナル抗体である、請求項１７に記載の免疫接合体。

【請求項１９】

前記ターゲッティング残基がネズミ、キメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体であり、前記抗体が完全な、断片(Fab、Fab'、$F(ab)_2$、$F(ab')_2$)または小断片(一本鎖構築物)形態である、請求項１～１８のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項２０】

前記ターゲッティング残基が、癌または悪性細胞上で発現した、抗原または抗原のエピトープと反応性のモノクローナル抗体である、請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項２１】

前記癌細胞が、造血腫瘍、癌、肉腫、黒色腫、またはグリア腫瘍由来の細胞である、請求項２０に記載の免疫接合体。

【請求項２２】

前記ターゲッティング残基が、B細胞系抗原、T細胞系抗原、骨髄系抗原、およびHLA-DR抗原に結合するモノクローナル抗体である、請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項２３】

前記ターゲッティング残基が、CD74、CD22、上皮糖タンパク質-1、MUC1、癌胎児性抗原(CEAまたはCD66e)、結腸特異性抗原-p、α-フェトプロテイン、CC49、前立腺特異性膜抗原、カルボニックアンヒドラーゼIX、HER-2/neu、BrE3、CD19、CD20、CD21、CD23、CD33、CD45、CD74、CD80、VEGF、EGF受容体、P1GF、MUC2、MUC3、MUC4、ガングリオシド、HCG、EGP-2、CD37、HLA-DR、CD30、Ia、A3、A33、Ep-CAM、KS-1、Le(y)、S100、PSA、テネイシン、葉酸受容体、Thomas-Friedreich抗原、腫瘍壊死抗原、腫瘍血管新生抗原、Ga 733、IL-2、IL-6、T101、MAGE、L243に結合する抗原、CD66a-d(それぞれ、BGP、CGM6、NCAおよびCGM1)、抗TAC、およびそれらの組合せからなる群から選択される抗原に結合するモノクローナル抗体である、請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項２４】

前記ターゲッティング残基が、LL1、LL2、hA20、1F5、L243、RS7、PAM-4、MN-14、Mu-9、AFP-31、G250、J591、CC49、およびImmu 31からなる群から選択されるものである、請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項２５】

前記ターゲッティング残基が、LL1、LL2、hA20、1F5、L243、RS7、PAM-4、MN-14、Mu-9、AFP-31、G250、J591、CC49、およびImmu 31からなる群から選択される1種類以上の抗体を含んでなる二重特異性および/または二価抗体構築物である、請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫接合体。

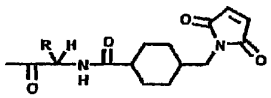
【請求項２６】

前記ターゲッティング残基が少なくとも１つの化学療法薬残基に結合するものである、請求項１～２５のいずれか一項に記載の免疫接合体。

【請求項２７】

前記ターゲッティング残基が約７～１２個の前記化学療法薬残基に結合するものである

、請求項２６に記載の免疫接合体。
【請求項２８】
前記リンカーが、ターゲッティング残基に結合するためのそのN末端におけるチオール反応性残基と、少なくとも１つの化学療法薬残基に結合するための１以上の側鎖アミノ基とを含むペプチドを含んでなる、請求項１～２７のいずれか一項に記載の免疫接合体。
【請求項２９】
前記リンカーが、N末端における官能基と、C末端における水可溶化残基と、前記化学療法薬残基に結合するのに利用可能な側鎖を有する１以上の内部塩基性アミノ酸とを含んでなる、請求項１～２８のいずれか一項に記載の免疫接合体。
【請求項３０】
前記水可溶化残基が、DTPA、EDTA、TTHA、ベンジル-DTPA、DOTA、ベンジル-DOTA、NOTA、ベンジル-NOTA、またはN,N'-ジアルキル置換ピペラジンである、請求項29に記載の免疫接合体。
【請求項３１】
前記リンカーが、下式に示されるものである、請求項１～３０のいずれか一項に記載の免疫接合体。
【化１】



【請求項３２】
前記免疫接合体が非経口投与に適した形態とされた、請求項１～３１のいずれか一項に記載の免疫接合体。
【請求項３３】
前記化学療法薬残基が、ドキソルビシン(DOX)、エピルビシン、モルホリノドキソルビシン(モルホリノ-DOX)、シアノモルホリノ-ドキソルビシン(シアノモルホリノ-DOX)、2-ピロリノ-ドキソルビシン(2-PDOX)、CPT、CPT-11、SN-38、トポテカン、タキサン、ゲルダナマイシン、アンサマイシン、およびエポチロンからなる群から選択される、請求項１～３２のいずれか一項に記載の免疫接合体。
【請求項３４】
患者の悪性腫瘍、自己免疫疾患、感染症、または感染性病変の治療のための、請求項１～３３のいずれか一項に記載の免疫接合体の治療上有効量の使用。
【請求項３５】
前記悪性腫瘍が悪性固形腫瘍または造血新生物である、請求項34に記載の使用。
【請求項３６】
前記免疫接合体が、前記感染症または感染性病変と関連した病原体上の抗原またはエピトープまたは鉄－シデロフォアキレート受容体をターゲットとする、請求項３４に記載の使用。
【請求項３７】
前記病原体が、細菌、真菌、ウイルス、リケッチア、マイコプラズマ、および原生動物からなる群から選択される、請求項３６に記載の使用。
【請求項３８】
前記病原体が、Streptococcus agalactiae、Legionella pneumophilia、Streptococcus pyogenes、Escherichia coli、Neisseria gonorrhosae、Neisseria meningitidis、Pneunaococcus、Hemophilis irfluenzae B、Treponema pallidum、ライム病スピロヘータ、Pseudomonas aeruginosa、Mycobacterium leprae、Brucella abortus、Mycobacterium tuberculosis、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器シンシチウムウイルス、帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、

ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、ネズミ白血病ウイルス、耳下腺炎ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、疣ウイルス、ブルータングウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、シミアンウイルス40、マウス乳癌ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax、Toxoplasma gondii、Trypanosoma rangeli、Trypanosoma cruzi、Trypanosoma rhodesiensei、Trypanosoma brucei、Schistosoma mansoni、Schistosoma japanicum, Babesia bovis、Elmeria tenella、Onchocerca volvulus、Leishmania tropica、Trichinella spiralis、Theileria parva、Taenia hydatigena、Taenia ovis、Taenia saginata、Echinococcus granulosus、Mesocestoides corti、Mycoplasma arthritidis、M. hyorhinis、M. orale、M. arginini、Acholeplasma laidlawii、M. salivarium, およびM. pneumoniaeからなる群から選択される、請求項３６に記載の使用。

【請求項３９】

前記自己免疫疾患がクラスIIIの自己免疫疾患である、請求項34に記載の使用。

【請求項４０】

前記クラスIIIの自己免疫疾患が、免疫依存性血小板減少症、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、多発性硬化症、シデナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎(pose-streptococcal nephlitis)、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グットパスチャー症候群、血栓性血管炎（thromboangitis ubiterans）、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄ロウ、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸状体腎炎および繊維化肺胞炎からなる群から選択される、請求項３９に記載の使用。

【請求項４１】

非経口投与のための、請求項３４～４０のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【０００１】

発明の分野

本発明は、様々な癌細胞、感染性疾患生物をターゲットし、自己免疫疾患を治療するための改善された能力を有する治療接合体であって、ターゲッティング残基および治療残基を含む接合体に関する。ターゲッティングと治療残基とは、治療効力を増強する、細胞内で開裂可能な結合を介して結合している。

【０００２】

背景技術

長年にわたり、ヒト癌に毒性因子を特異的に送達するためのモノクローナル抗体(mAb)の使用は、特異的にターゲッティングした薬物療法の分野における科学者の目標となっている。腫瘍関連mAbと適当な毒性因子との接合体が開発され、癌の治療において複合的に成功しているが、他の疾患には実質的に応用されていない。毒性因子は、最も一般的には化学療法薬であるが、粒子放射放射性核種や、細菌性または植物性毒素もmAbに接合されている。

【０００３】

mAb-化学療法薬接合体の使用の利点は、(a) 化学療法薬自体が構造的に明確に規定され、(b) 化学療法薬が、明確に規定された接合化学を用いて結合され、多くの場合にはmAb抗原結合領域とは離れた特異的部位によりmAbタンパク質に結合され、(c) mAb-化学療法薬接合体は、mAbおよび細菌性または植物性毒素を含む化学的接合体よりも再現性よく作製することができ、かつそれ自体商業的開発および規制認可を得やすく、(d) mAb-化学療

法薬接合体は放射性核種mAb接合体より毒性が遙かに小さい。

【０００４】

mAb-化学療法薬接合体に関連する初期の研究では、イン・ビトロおよびイン・ビボでの前臨床試験中、用いた化学結合が薬剤の失効をしばしば招くことがが見いだされた。これらの結果は、mAb-化学療法薬接合体を有用な治療薬とするためには、薬剤をターゲット細胞中に一担置いたならば、薬剤は理想的には元の形態で放出される必要があることを示していた。従って、1980年代および1990年代初期の研究は、主として化学療法薬とmAbとの間の化学的リンカーの性質に集中した。特に、穏和な酸で開裂可能なリンカーを用いて調製したmAb-化学療法薬接合体は、腫瘍内部のpHが正常な生理学的pHより低いことが多いという観察に基づいて開発された(米国特許第4,542,225号明細書、第4,569,789号明細書、第4,618,492号明細書および第4,952,394号明細書)。この方法は、適当なリンカーを用いて調製したmAb-ドキソルビシン(DOX)接合体を用い、前臨床研究における様々なヒト腫瘍異種移植片を担持するマウスを治療することができることを示したTrail et al.(Science 261: 212-215 (1993))の画期的論文において、一つの頂点に達した。この有望な結果は、ターゲッティングを行う腫瘍細胞上の非常に多数の受容体に結合した抗体にて達成され、そのmAb-化学療法薬接合体はmAbの単位当たり6-8個のDOX残基で置換された。さらに、mAb-化学療法薬接合体は、反復的投薬スケジュールにおいて大用量にて投与された。

【０００５】

上記のmAb-化学療法薬接合体の開発にあっては、化学療法薬とmAbの間のリンカーは、イン・ビトロおよびイン・ビボのいずれにおいても良好な抗腫瘍活性を保持する上で重要であると考えられた。幾つかの場合には、mAb-化学療法薬接合体は、化学療法薬とmAbとの間を酸に不安定な結合(例えば、ヒドラゾン)および還元的に不安定な(例えば、ジスルフィド)結合として作製された。ヒドラゾン結合はイン・ビボでの血清条件に対しては明らかに安定であるが、通常のジスルフィド結合は実用に十分なほど安定ではないことが分かった。従って、標準的ジスルフィド結合の代わりに、ヒンダードジェミナルジメチルジスルフィド結合またはメチルジスルフィド結合を用いるmAb-化学療法薬接合体が開発された。

【０００６】

当該技術分野における他の研究が、開裂可能な残基としてのヒドラゾン、およびジスルフィド結合の代わりのチオエーテル基の使用に集中して行われた。Willner et al.は、開裂可能な単位としてヒドラゾンを組込み、ジスルフィドの代わりにチオエーテル基を介し、DOXをmAbに結合することによって優れた結果が得られることを見出した(米国特許第5,708,146号明細書)。このような手法でかつmAb置換部位当たりのDOX単位の数を二倍にしうる分岐リンカーを用いて結合すると、新たなDOX-mAb接合体の効力はほぼ10倍に増加した(King et al., Bioconjugate Chem 10: 279-288 (1999))。

【０００７】

検討されたもう一つの開裂可能な残基は、抗体と化学療法薬との間のリンカーに組込まれたエステル結合である。Gillimard and Saragoviは、パクリタキセルのエステルを抗ラットp75mAb、MC192または抗ヒトTrkAmAbである5C3に接合すると、接合体はターゲット特異的毒性を示すことを見出した(Gillimard and Saragovi, Cancer Res. 61 : 694-699(2001))。

【０００８】

mAb-化学療法薬接合体の構築におけるリンカーの重要性に鑑み、本発明者らは様々な化学療法薬および他の毒性物質とともに一般的に使用可能な新規リンカーを開発した。

【発明の概要】

【０００９】

一つの態様によれば、本発明は、

(a) ターゲッティング残基、

(b) 化学療法薬残基、および

(c) チオール基を介してターゲッティング残基へ結合し、かつヒドラゾン以外の細胞内

で開裂可能な残基を介して化学療法薬残基へ結合するリンカー
を含んでなる、免疫接合体に関する。他の態様によれば、本発明は、
(a) ターゲッティング残基、
(b) 化学療法薬残基、および
(c) チオール基を介してターゲッティング残基へ結合し、かつヒドラゾン以外の細胞内で開裂可能な残基を介して化学療法薬残基へ結合するリンカー
を含んでなる、免疫接合体であって、上記リンカーがアミノ酸残基とチオール反応性残基とを含んでなり、アミノ酸残基を介して化学療法薬残基におよびチオール反応性残基を介してターゲッティング残基に結合している免疫接合体に関する。

【００１０】

本発明の他の態様は、本明細書に記載の免疫接合体を用いる、癌、悪性腫瘍、自己免疫疾患、感染症、または感染性病変の治療方法である。

【発明の具体的説明】

【００１１】

特に断らない限り、単数の単語への言及は「その1個以上」を意味する。

【００１２】

以下の説明では、本発明を理解しやすくする目的で多数の用語が用いられておりかつ以下の定義が提供される。

【００１３】

本明細書に記載の抗体は、完全長の(すなわち、天然に存在するまたは通常の免疫グロブリン遺伝子断片組換え法によって形成された)免疫グロブリン分子(例えば、IgG抗体)、または抗体断片のような免疫グロブリン分子の免疫活性(すなわち、特異結合性)部分を表す。

【００１４】

抗体断片は、$F(ab')_2$、$F(ab)_2$、Fab'、Fab、Fv、scFv(一本鎖Fv)のような抗体の部分などである。構造には関係なく、抗体断片は完全な抗体によって認識される同一抗原と結合する。

【００１５】

また、「抗体断片」という用語は、特異抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のような作用を行う任意の合成または遺伝子工学処理を施したタンパク質を包含する。例えば、抗体断片は重鎖および軽鎖の様々な利用域からなる「Fv」断片のような可変領域からなる単離断片、軽および重可変領域がペプチドリンカー(「scFvタンパク質」)によって結合されている組換え一本鎖ポリペプチド分子、および超可変領域に類似しているアミノ酸残基からなる最小認識単位を包含する。Fv断片は、多価および/または多重特異的結合形態の生成に関する様々な方法で構築することができる。前者の多価の場合には、それらは特異的エピトープに対する2個以上の結合部位と反応し、多重特異的形態では、(抗原の、または特異抗原および異なる抗原に対する)2個以上のエピトープが結合する。

【００１６】

本明細書で用いられる抗体成分という用語は、完全な抗体、融合タンパク質およびそれらの断片のいずれをも包含する。

【００１７】

裸の抗体は、一般的には治療薬に接合していない完全な抗体である。そう呼ばれるのは、抗体分子のFc部分が、補体固定およびADCC(抗体依存性細胞傷害)のようなエフェクターまたは免疫学的機能を提供して、機構を作動させて細胞リーシスを生じることができるからである。しかしながら、Fc部分は抗体の治療機能には必要とせず、むしろ、アポトーシス、抗血管新生、抗転移活性、異型または同型接着の阻害のような抗接着活性、およびシグナリング経路における干渉のようなむしろ他の機構が効果を示し、疾患の進行を干渉することがある。裸の抗体は、ポリクローナルおよびモノクローナルの両抗体およびそれらの断片であって、ネズミ抗体、並びにキメラ、ヒト化またはヒト抗体およびそれらの断片のようなある種の組換え抗体を包含するものを包含する。本発明において定義されるよう

に、「裸の」は「接合していない」と同義であり、一緒に投与する治療薬には結合または接合していないことを意味する。

【００１８】

キメラ抗体は、一種、好ましくは齧歯類抗体由来の抗体の相補性決定領域(CDR)などの重および軽抗体鎖の可変ドメインを含む組換えタンパク質であり、一方抗体分子の定常ドメインはヒト抗体に由来する。動物への応用には、キメラ抗体の定常ドメインはネコまたはイヌのような他の種のものから誘導することができる。

【００１９】

ヒト化抗体は、一種からの抗体、例えば、齧歯類抗体からのCDRが、齧歯類抗体の重および軽可変鎖からヒト重および軽可変ドメインに導入されている組換えタンパク質である。抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体の定常ドメインから誘導される。

【００２０】

ヒト抗体は、抗原投与に応答して特異的ヒト抗体を産生するように「人工的に処理された」トランスジェニックマウスから得られた抗体である。この手法では、ヒト重および軽鎖座の要素が、内在性重鎖および軽鎖座のターゲッティングされた崩壊を含む、胚幹細胞系由来のマウスの系統に導入される。トランスジェニックマウスはヒト抗原に特異的なヒト抗体を合成することができ、このマウスを用いてヒト抗体-抗原ハイブリドーマを産生することができる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994)、Lonberg et al., Nature 368:856 (1994)、およびTaylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994)に記載されている。また、完全なヒト抗体は、遺伝子または染色体トランスフェクション法、並びにファージディスプレー法、当該技術分野で知られているいずれもによって構築することができる。例えば、免疫していないドナーからの免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリー由来の、ヒト抗体およびその断片のイン・ビトロでの産生については、McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)を参照されたい。この手法では、抗体可変ドメイン遺伝子を、糸状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子のインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として表示する。糸状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づく選択により、その特性を示す抗体をコードする遺伝子もまた選択される。この方法において、ファージは、B細胞の特性に幾分類似している。ファージディスプレーは様々なフォーマットで行うことができ、それらの総説については、例えば、Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993)を参照されたい。

【００２１】

ヒト抗体は、イン・ビトロで活性化されたB細胞によって生成することもできる。米国特許第5,567,610号明細書および第5,229,275号明細書を参照されたい。上記特許明細書の内容は、引用することによって本明細書の開示の一部とされている。

【００２２】

治療薬は、抗体成分、すなわち、抗体または抗体断片、またはそれらの小断片とは別個に、同時にまたは逐次的に投与される分子または原子であり、疾患の治療に有用なものである。治療薬の例としては、抗体、抗体断片、免疫接合体、薬剤、細胞傷害性物質、毒素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、キレート化剤、ホウ素化合物、光活性剤または色素、放射性同位体または放射性核種、免疫接合体、またはそれらの組合せが挙げられる。

【００２３】

免疫接合体は、治療薬に接合した抗体成分である。適当な治療薬は、上記に記載されている。

【００２４】

本明細書で用いられる抗体融合タンパク質という用語は、組換えによって産生した抗原結合分子であって、2個以上の同一または異なる特異性を有する同一または異なる天然抗体、一本鎖抗体または抗体断片セグメントが結合しているものである。融合タンパク質は

、少なくとも1個の特異結合部位を含んでなる。

【００２５】

融合タンパク質の原子価は、融合タンパク質が(複数の)抗原または(複数の)エピトープに対して有する結合アームまたは部位の総数、すなわち、一価、二価、三価または多価を示している。抗体融合タンパク質が多価であることは、抗原への結合における複合相互作用を利用し、抗原または異なる抗原への結合のアビディティーを増加させることができることを意味する。特異性は、抗体融合タンパク質がいくつの異なる種類の抗原またはエピトープに結合することができるか、すなわち、単一特異性、二重特異性、三重特異性、多重特異性を示す。これらの定義を用いれば、天然抗体、例えばIgGは、2本の結合アームを有するので二価であるが、1種類の抗原またはエピトープに結合するので単一特異性である。単一特異性の多価融合タンパク質は、同一抗原またはエピトープに2個以上の結合部位を有する。例えば、単一特異性ジアボディーは、同一抗原と反応する2個の結合部位を有する融合タンパク質である。融合タンパク質は、異なる抗体成分の多価または多重特異性を組み合わせたもの、または同一抗体成分の複数のコピーを含んでなることができる。融合タンパク質は、さらに治療薬を含んでなることもできる。

【００２６】

免疫調節剤は、本発明で定義されている通りの治療薬であり、存在するときには身体の免疫系を変更し、抑制しまたは刺激する。典型的には、本発明で有用な免疫調節剤は、免疫細胞を刺激し、マクロファージ、B細胞、および/またはT細胞のような免疫応答カスケードにおいて増殖させまたは活性化させる。本明細書に記載の免疫調節剤の一例は、サイトカインであり、サイトカインは特異抗原と接触した際に1個の細胞個体群(例えば、感作Tリンパ球)によって放出される約5-20kDの可溶性の小タンパク質でありかつ細胞間において細胞間メディエーターとして作用する。熟練技術者であれば理解し得るように、サイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子(TNF)およびインターフェロンのような幾つかの関連シグナリング分子が挙げられる。ケモカインは、サイトカインのサブセットである。ある種のインターロイキンおよびインターフェロンは、T細胞または他の免疫細胞増殖を刺激するサイトカインの例である。

【００２７】

好ましい態様によれば、細胞内で開裂可能な残基は、場合によっては、細胞内エステラーゼによって開裂可能なものである。好ましい態様によれば、細胞内で開裂可能な残基はエステル残基である。好ましい態様によれば、エステル残基は、アミノ酸のα-カルボン酸から形成されたエステルである。好ましい態様によれば、細胞内で開裂可能な残基は、細胞内酵素によって開裂可能なペプチド結合を含んでなる。好ましい態様によれば、リンカーは、上記ターゲッティング残基のチオール基に結合する、チオール反応性基を含んでなる。チオール反応性基は、場合によっては、上記ターゲッティング残基のチオール基に結合する、マレイミドまたはビニルスルホンである。好ましい態様によれば、リンカーは、上記ターゲッティング残基のリシン側鎖においてマレイミド残基と反応するチオール基を含んでなる。また、免疫接合体は、好ましくは化学療法薬残基とターゲッティング残基との間にアミノポリカルボキシレート残基を含んでなる。アミノポリカルボキシレートは、好ましくはDTPA(ジエチレントリアミン五酢酸)、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)、TTHA(トリエチレンテトラミン六酢酸)、ベンジル-DTPA、DOTA(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸)、ベンジル-DOTA、NOTA(1,4,7-トリアザシクロノナン-N,N',N''-三酢酸)、ベンジル-NOTAおよびTETA(1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,8,11-四酢酸)からなる群から選択される。

【００２８】

化学療法薬残基は、好ましくはドキソルビシン(DOX)、エピルビシン、モルホリノドキソルビシン(モルホリノ-DOX)、シアノモルホリノ-ドキソルビシン(シアノモルホリノ-DOX)、2-ピロリノ-ドキソルビシン(2-PDOX)、カンプトテシン(CPT)、イリノテカン(CPT-11)、SN-38(イン・ビボではプロドラッグCPT-11から代謝的に産生される活性薬剤)、トポテカン、タキサン、ゲルダナマイシン、アンサマイシン、およびエポチロンからなる群から

選択される。ターゲッティング残基は、モノクローナル抗体(mAb)である。

【００２９】

一つの態様によれば、ターゲッティング残基は、モノクローナル抗体(mAb)である。もう一つの態様によれば、ターゲッティング残基は多価および/または多重特異性mAbであってもよい。ターゲッティング残基は、ネズミ、キメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体であり、かつ上記抗体は、完全な断片(Fab、Fab'、$F(ab)_2$、$F(ab')_2$)、または小断片(一本鎖構築物)の形態である。

【００３０】

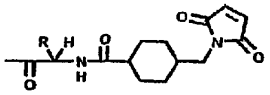
好ましい態様によれば、ターゲッティング残基は、癌または悪性細胞上で発現した抗原または抗原のエピトープと反応性のモノクローナル抗体である。

癌細胞は、好ましくは造血腫瘍(hematopoietic tumor)、癌、肉腫、黒色腫、またはグリア腫瘍由来の細胞である。

【００３１】

ターゲッティング残基は、好ましくは少なくとも1つの化学療法薬残基に結合し、さらに好ましくは約7-12個の上記化学療法薬残基に結合する。好ましいリンカーは、下式を有する。

【化１】



【００３２】

リンカーは、場合によってはN末端における官能基と、C末端における水可溶化残基と、上記化学療法薬残基に結合するのに利用可能な側鎖を有する1以上の内部塩基性アミノ酸とを含んでなる。水可溶化残基は、場合によってはDTPA、EDTA、TTHA、ベンジル-DTPA、DOTA、ベンジル-DOTA、NOTA、ベンジル-NOTA、またはN,N'-ジアルキル置換ピペラジンである。官能基は、場合によってはチオール反応性またはアミン反応性基である。

【００３３】

好ましい化学療法薬残基は、ドキソルビシン(DOX)、エピルビシン、モルホリノドキソルビシン(モルホリノ-DOX)、シアノモルホリノ-ドキソルビシン(シアノモルホリノ-DOX)、2-ピロリノ-ドキソルビシン(2-PDOX)、CPT、CPT-11、SN-38、トポテカン、タキサン、ゲルダナマイシン、アンサマイシン、およびエポチロンからなる群から選択される。

【００３４】

免疫接合体を用いて、癌、悪性腫瘍および感染性病変など様々な疾患および疾病を治療することができる。本発明によって治療される好ましい悪性腫瘍は、悪性固形腫瘍または造血新生物(hematopoietic neoplasm)である。この方法を感染性病変の治療に向ける場合に、免疫接合体の好ましいターゲットは、抗原またはエピトープ、または病原体上の鉄-シデロフォアキレート受容体(ion-siderophore chelate receptor)とされる。病原体は、好ましくは細菌、真菌、ウイルス、リケッチア、マイコプラズマ、および原生動物からなる群から選択される。特に、病原体は、Streptococcus agalactiae、Legionella pneumophilia、Streptococcus pyogenes、Escherichia coli、Neisseria gonorrhosae、Neisseria meningitidis、Pneunaococcus、Hemophilis irfluenzae B、Treponema pallidum、ライム(Lyme)病スピロヘータ、Pseudomonas aeruginosa、Mycobacterium leprae、Brucella abortus、Mycobacterium tuberculosis、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器シンシチウムウイルス、帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バー(Epstein-Barr)ウイルス、ネズミ白血病ウイルス、耳下腺炎ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、疣ウイルス、ブルータング(bluetongoe)ウイルス、センダイ(Sendai)ウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイ

ルス、シミアンウイルス40、マウス乳癌ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、Plasmodium falciparum、Plasmodium vivax、Toxoplasma gondii、Trypanosoma rangeli、Trypanosoma cruzi、Trypanosoma rhodesiensei、Trypanosoma brucei、Schistosoma mansoni、Schistosoma japanicum、Babesia bovis、Elmeria tenella、Onchocerca volvulus、Leishmania tropica、Trichinella spiralis、Theileria parva、Taenia hydatigena、Taenia ovis、Taenia saginata、Echinococcus granulosus、Mesocestoides corti、Mycoplasma arthritidis、M hyorhinis、M orale、M arginini、Acholeplasma laidlawii、M salivarium、およびM pneumoniaeからなる群から選択することができる。

【００３５】

免疫接合体を用いて、クラスIIIの自己免疫疾患などの自己免疫疾患を治療することも可能である。本発明による治療に好ましいクラスIIIの自己免疫疾患は、免疫依存性血小板減少症、皮膚筋炎、シェーグレン(Sjogren)症候群、多発性硬化症、シデナム(Sydenham)舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス(systemic lvpus erythematosus)、ループス腎炎、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、糖尿病、ヘノッホ-シェーンライン(Henoch-Schonlein)紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎(post-streptococcal nephritis)、結節性紅斑、高安(Takayasu)動脈炎、アジソン(Addison)病、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グットパスチャー(Goodpasture)症候群、血栓性血管炎(thromboangitis ubiterans)、原発性胆汁性肝硬変、橋本(Hashimoto)甲状腺炎、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェゲナー(Wegener)肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄ロウ、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸状体腎炎、および繊維化肺胞炎からなる群から選択される。

【００３６】

免疫接合体は、好ましくは非経口投与される。

本発明の好ましい態様の一側面によれば、本発明は、ターゲッティング残基、化学療法薬残基、およびチオール基を介してターゲッティング残基へ、およびヒドラゾン以外の細胞内で開裂可能な残基を介して化学療法薬残基へ結合するリンカーを含んでなる、免疫接合体に関する。

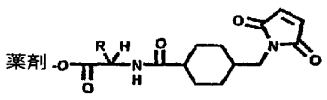
【００３７】

好ましい態様によれば、ヒドラゾン以外の細胞内で開裂可能な残基は、mAbが認識しかつ受容体に結合する細胞にインターナリゼーションしたならば、開裂することができ、特にエステラーゼおよびアミダーゼによって開裂することができる残基である。

【００３８】

好ましい態様によれば、化学療法薬残基を中性pHで別個に活性化し、チオール反応性基を含むようにする。チオール反応性基を任意の化学療法薬残基に組込みうる化学的方法の開発は、通常の熟練技術者の技術の範囲内にある。しかしながら、好ましい態様によれば、化学療法薬残基を活性化し、チオール反応性基を有する基がアミノ酸基によって化学療法薬残基から、間隔を空けるようにすることができる。好ましい態様によれば、アミノ酸のα-アミノ基を、マレイミド、クロロアセタミド、ブロモアセタミド、ヨードアセタミド、およびビニルスルホンのようなチオール反応性基を有する試薬と反応させることができる。好ましくは、上記のチオール反応性基を有する試薬は、スクシンイミジル[4-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)である。SMCCの場合には、チオール反応性基はマレイミド基である。SMCCとアミノ酸基を含んでなる化学療法薬残基との反応から生じる生成物は、下記に示される一般的化合物である。

【化２】



(式中、Rは任意のアミノ酸の側鎖である)

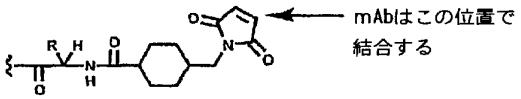
【００３９】

この理論によって本発明を束縛しようとするものではないが、マレイミドシクロヘキシルカルボキシレート基は、二つの理由により、本発明の好ましい態様に関して特に有用であると思われる。第一には、リンカーのシクロヘキシル基が、SMCCとアミノ酸のα-アミノ基との反応から形成されるアミド官能基を安定化すると思われる。第二には、薬剤とアミノ酸カルボキシレートとの間に形成されたエステルは、免疫接合体が細胞中にインターナリゼーションされると、開裂する。細胞内開裂したエステル結合の一例は、パクリタキセル-MC192免疫接合体である(Gillimard and Saragovi, 上記引用)。

【００４０】

本発明の好ましい態様によれば、上記に示したアミノ酸基を含んでなる化学療法薬残基はリンカー、すなわちチオール基を介してターゲッティング残基に結合するリンカーを含む。リンカーは、下記の分子の一部である。

【化３】



しかしながら、本発明の好ましい態様の範囲は、それだけに限定されない。リンカーは、単にアミノ酸基とチオール反応性基とを含んでなる残基であってもよい。アミノ酸基とチオール反応性基は、上記に示した4-メチレンシクロヘキサン-1-カルボニル残基など熟練技術者に知られている任意の残基によって、その間隔を空けることができる。

【００４１】

本発明の好ましい態様の免疫接合体は、当該技術分野で周知の方法を用いて活性化した化学療法薬残基と抗体との反応から得られる。化学療法薬残基は、mAb鎖間ジスルフィド結合の還元後にチオール反応性基を介してmAbに結合させることができる。この方法は、抗体1分子当たり平均して8個の遊離チオール基を生成し、そして還元反応に用いられる範囲内のチオールの再現的にその通りとなる。

【００４２】

抗体のリシン基への接合のために、抗体を最初に誘導化し、チオール反応性基を含むようにして、チオール基を含む化学療法薬残基を用いる。mAbのリシン基の修飾によって抗体にチオール基を導入する方法は、当該技術分野で周知である(Govindan et al. Bioconjugate Chemistry, 7:290-297, 1996; Wong 「タンパク質接合および架橋の化学(Chemistry of protein conjugation and cross-linking)」, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991), pp 20-22)。この方法では、二官能価化学療法薬残基を抗体断片および一本鎖構築物などの小断片に接合させる。逆に、化学療法薬残基は、還元したmAbの(複数の)チオールと反応するチオール反応性基を含む。

【００４３】

ターゲッティング残基は、好ましくは抗体(完全なヒト、非ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体など)または抗体断片(酵素的にまたは組換えによって産生した断片など)、および抗体または抗体断片からの配列を組込む結合性タンパク質である。抗体、断片、および結合性タンパク質は、上記で定義したように多価および多重特異性、または多価および単一特異性であることができる。

【００４４】

本発明の好ましい態様によれば、ターゲット細胞上で高水準で発現しかつ正常組織と対比して主として疾患細胞にて発言するかまたは疾患細胞でのみ発現するマーカーまたは腫瘍関連抗原を認識しまたはに結合するmAbのような抗体、および速やかにインターナリゼーションする抗体を用いる。本発明の範囲内で有用な抗体としては、上記のような特性を有する(および細胞および微生物中への様々なレベルのインターナリゼーションの顕著な特性を示す)mAbが挙げられ、癌においては以下のmAb、すなわちLL1(抗CD74)、LL2(抗CD22

)、RS7(抗上皮糖タンパク質-1(EGP-1))、PAM-4およびKC4(いずれも抗MUC1)、MN-14(抗癌胎児性抗原(CEA、CD66eとしても知られる)、Mu-9(抗結腸特異性抗原-p)、Immu 31(抗α-フェトプロテイン)、TAG-72(例えば、CC49)、Tn、J591(抗PSMA(前立腺特異性膜抗原))、G250(抗カルボニックアンヒドラーゼIX mAb)、およびL243(抗HLA-DR)の使用が意図されるが、これらに限定されない。これらの接合体を用いてターゲッティングすることができる他の有用な抗原としては、HER-2/neu、BrE3、CD19、CD20(例えば、C2B8、hA20、1F5 Mab)、CD21、CD23、CD80、α-フェトプロテイン(AFP)、VEGF、EGF受容体、P1GF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4, PSMA、ガングリオシド、HCG、EGP-2(例えば、17-1A)、CD37、HLA-DR、CD30、Ia、A3、A33、Ep-CAM, KS-1、Le(y)、S100、PSA(前立腺特異性抗原)、テネイシン、葉酸受容体、Thomas-Friedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、腫瘍血管新生抗原、Ga 733、IL-2、IL-6、T101、MAGE、L243が結合する抗原、CD66抗原、すなわち、CD66a-d、またはそれらの組合せが挙げられる。CD66抗原は、類似構造を有する5つの異なる糖タンパク質CD66a-eからなり、これらは、それぞれ癌胎児性抗原(CEA)遺伝子ファミリーBCG、CGM6、NCA、CGM1およびCEAによってコードされるこれらのCD66抗原は、主として顆粒球、消化管の正常な上皮細胞、および様々な組織の腫瘍細胞で発現する。多数の上記抗原は、2002年11月15日出願の「治療薬の標的設定送達のための多重特異性の非共有複合体の使用」という標題の米国仮出願連続番号第60/426,379号明細書に開示されている。

【００４５】

本発明の他の好ましい態様によれば、速やかにインターナリゼーションした後に細胞表面上で再発現し、加工され、提供される抗体を用いて、循環する免疫接合体の細胞による連続的摂取および癒着を可能とする。最も好ましい抗体/抗原対の一例は、抗CD74 mAb(不変鎖のクラスII特異性シャペロン、Ii)であるLL1である。CD74抗原は、B細胞リンパ腫、ある種のT細胞リンパ腫、黒色腫、およびある種の他の癌(Ong et al., Immunology 98:296-302 (1999))、並びにある種の自己免疫疾患にて高度に発現する。

【００４６】

抗CD74抗体で好ましく治療される疾患としては、非Hodgkinリンパ腫、黒色腫、および多発性骨髄腫が挙げられるが、これらに限定されない。CD74抗原をターゲット細胞の表面上で短時間連続発現した後、その抗原をインターナリゼーションし、その抗原を再発現することによって、ターゲッティングされたLL1抗体を、「ペイロード」として含む任意の化学療法薬残基と共にインターナリゼーションすることができる。これにより、高治療濃度のLL1-化学療法薬免疫接合体をこれらの細胞内に蓄積させることができる。インターナリゼーションしたLL1-化学療法薬免疫接合体はリソソームおよびエンドソーム中循環し、化学療法薬残基をターゲット細胞中において活性形態で放出する。

【００４７】

他の態様によれば、本発明は、本発明の好ましい態様の治療薬接合体の治療上有効量を患者に投与することを含んでなる、患者の治療方法に関する。本発明の好ましい態様の治療薬接合体で治療することができる疾患としては、B細胞悪性腫瘍(例えば、LL2 mAbを用いる非Hodgkinリンパ腫および慢性リンパ性白血病、米国特許第6,183,744号明細書参照)、内胚葉由来の消化管上皮の腺癌、乳癌および非小細胞肺癌のような癌、および他の癌、肉腫、グリア腫瘍、骨髄性白血病などが挙げられるが、これらに限定されない。特に、抗原、例えば、消化器、肺、乳、前立腺、卵巣、精巣、脳またはリンパ腫瘍のような悪性固形腫瘍または造血新生物によって産生されるまたはと関連した腫瘍胎児性抗原)、に対する抗体が有利に用いられる。

【００４８】

本明細書で用いられる「患者」という用語は、哺乳類などこれらに限定されない任意の動物(すなわち、脊椎動物および無脊椎動物)を表す。患者という用語は、齧歯類(例えば、マウス、ラットおよびモルモット)も包含する。この用語は特定の年齢または性別に限定されることを意味しない。従って、成熟したおよび新生患者、並びに胎児は、雄または雌に関わらずこの用語によって包含される。

【００４９】

他の好ましい態様によれば、本発明の好ましい態様のMu-9 mAbを含んでなる治療薬接合体を用いて、2002年4月5日出願の米国特許出願連続番号第10/116,116号明細書およびGold et al.(Cancer Res. 50:6405 (1990)、およびそこに引用されている文献)に開示されている結直腸並びに膵臓および卵巣の癌を治療することができる。さらに、2002年6月14日出願の米国仮出願連続番号第60/388,314号明細書に開示されているように、本発明の好ましい態様のPAM-4mAbを含んでなる治療薬接合体を用いて、膵臓癌を治療することができる。

【００５０】

他の好ましい態様によれば、2002年3月1日出願の米国仮出願連続番号第60/360,229号明細書およびStein et l. (Cancer Res. 50:1330 (1990)、およびAntibody Immunoconj. Radiopharm 4:703 (1991))に開示されているように、好ましい態様のRS-7 mAbを含んでなる治療薬接合体を用いて、肺、胃、膀胱、乳、卵巣、子宮、および前立腺の癌などの癌を治療することができる。

【００５１】

他の好ましい態様によれば、2002年8月1日出願の米国仮出願連続番号第60/399,707号明細書に開示されているように、好ましい態様の抗AFP mAbを含んでなる治療薬接合体を用い、ヒト化、キメラおよびヒト抗体形態を用いて、肝細胞癌、生殖細胞腫瘍、および他のAFP産生腫瘍を治療することができる。

【００５２】

他の好ましい態様によれば、抗テネイシン抗体を含んでなる治療薬接合体を用いて造血および固形腫瘍を治療することができ、Le(y)に対する抗体を含んでなる接合体を用いて、固形腫瘍を治療することができる。

【００５３】

他の好ましい態様によれば、本発明の好ましい態様の治療薬接合体を用いて治療することができる疾患としては、2002年3月1日出願の米国仮出願連続番号第60/360,259号明細書に開示されているように、急性の特発性血小板減少性紫斑病および慢性の特発性血小板減少性紫斑病のような免疫依存性血小板減少症、皮膚筋炎、シェーグレン(Sjogren)症候群、多発性硬化症、シデナム(Sydenham)舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、糖尿病、ヘノッホ-シェーンライン(Henoch-Schonlein)紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎(post-streptococcal nephritis)、結節性紅斑、高安(Takayasu)動脈炎、アジソン(Addison)病、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グットパスチャー(Goodpasture)症候群、血栓性血管炎(thromboangitis ubiterans)、シェーグレン(Sjogren)症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本(Hashimoto)甲状腺炎、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活性肝炎、慢性関節リウマチ、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェグゲナー(Wegener)肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄ロウ、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸状体腎炎、および繊維化肺胞炎のようなクラスIII自己免疫疾患などの免疫調節不全疾患および関連自己免疫疾患が挙げられるが、これらに限定されない。これらの疾患に有用な典型的抗体としては、HLA-DR抗原B細胞抗原(例えば、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、B7、MUC1、Ia、HM1.24、およびHLA-DR)と反応性であるものが挙げられるが、これらに限定されない。これらの自己免疫疾患の多くは異常型B細胞個体群によって作製された自己抗体によって影響を受ける。本発明で用いられる薬剤と結合した抗体
を伴う治療薬接合体によってこれらB細胞を涸渇させることは、特にB細胞抗体をある情況においてHLA-DR抗体および/またはT細胞抗体(抗TAC抗体のようなIL-2を抗原としてターゲットとするものなど)と結合させるときには、自己免疫疾患治療において好ましい方法である。

【００５４】

他の好ましい態様によれば、病原体に対する抗体が知られているので、好ましい態様の治療薬接合体を病原体に対して用いることができる。感染性病変(例えば、細菌、リケッチア、マイコプラズマ、原生動物、真菌およびウイルスのような病原体によって引き起こされるウイルス、細菌、真菌および寄生生物の感染症など)によって産生されるかまたは感染性病変と、関連したマーカーを、特異的に結合する抗体および抗体断片、および上記のような微生物と関連した抗原および産物は、とりわけHansen et al.の米国特許第3,927,193号明細書およびGoldenbergの米国特許第4,331,647号明細書、第4,348,376号明細書、第4,361,544号明細書、第4,468,457号明細書、第4,444,744号明細書、第4,818,709号明細書、および第4,624,846号明細書に開示されている。好ましい態様によれば、病原体は、米国特許第6,440,416号明細書に開示されているように、Streptococcus agalactiae、Legionella pneumophilia、Streptococcus pyogenes、Escherichia coli、Neisseria gonorrhosae、Neisseria meningitidis、Pneumococcus、Hemophilis influenzae B、Treponema pallidum、ライム(Lyme)病スピロヘータ、Pseudomonas aeruginosa、Mycobacteriuna leprae、Brucella abortus、Mycobacterium tuberculosis、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器シンシチウムウイルス、帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バー(Epstein-Barr)ウイルス、ネズミ白血病ウイルス、耳下腺炎ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、疣ウイルス、ブルータングウイルス、センダイ(Sendai)ウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、シミアンウイルス40、マウス乳癌ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、Plasmodium falciparum、Plasmodium vivax、Toxoplasma gondii、Trypanosoma rangeli、Trypanosoma cruzi、Trypanosoma rhodesiensei、Trypanosoma brucei、Schistosoma mansoni、Schistosoma japanicum、Babesia bovis、Elmeria tenella、Onchocerca volvulus、Leishmania tropica、Trichinella spiralis、Theileria parva、Taenia hydatigena、Taenia ovis、Taenia saginata、Echinococcus granulosus、Mesocestoides corti、Mycoplasma arthritidis、M. hyorhinis、M. orale、M. arginini、Acholeplasma laidlawii、M. salivarium、およびM. pneumoniaeからなる群から選択される。

【００５５】

一つの態様によれば、抗体はグラム陰性菌病原体による感染に対して用いるためのシデロフォア(shiderophore)成分を組込む化学接合体として送達される。シデロフォアは鉄とキレート形成する、ジまたはトリアミンのビスカテコレートであり、送達ビヒクルとして用いられる。シデロフォアの鉄キレートは細菌膜状の特異的受容体によって認識され、細菌細胞内部の活性輸送をもたらす(Heinisch et al., J. Medicinal Chemistry, 45:3032-3040, 2002)。本発明に関しては、ペプチドは、N末端として保護されたリシンを有するものが構成される。次に、樹脂支持体から遊離するペプチドのカルボキシル末端を活性化して、ペニシリンNのようなアミンを含む抗生物質にカップリングさせる。N末端の保護基を開裂した後、N末端リシンのアミノ基を2,3-ジアセトキシベンゾイルクロリドに接合させて、必要なビスカテコレートを付加したペニシリン接合体を最終的に生じる。カテコール残基のジアセチル誘導体は、シデロフォア成分としても有効である(Heinisch et al., 上記引用)。

【００５６】

好ましい態様によれば、ヒトの疾患の治療に用いられる抗体は、抗体のヒトまたはヒト化(CDRを移植した)誘導体であるが、抗体のネズミおよびキメラ誘導体を用いることができる。家畜での使用には、同一種のIgGが最も効果的なベクターであると思われるが、交差種IgGも有用である。送達剤と同じ種のIgG分子は、免疫応答を最小限にするのに一般に好ましい。これは、反復治療を考えるときには特に重要である。ヒトにおいては、ヒトまたはヒト化IgG抗体は患者から抗IgG免疫応答を余り生成しない。インターナリゼーション抗原をターゲッティングすると、hLL1およびhLL2のような抗体はターゲット細胞に結合した後に速やかにインターナリゼーションするが、これは、運ばれる化学療法薬が細胞に速

やかにインターナライズされることを意味している。しかしながら、インターナリゼーションの速度が遅い抗体を用いて、本発明による選択的療法を行うこともできる。

【００５７】

本発明の好ましい態様によれば、細胞および病原体への一層効果的な組込みを多価で多重特異性または多価で単一特異性の抗体を用いることによって行うことができる。多価とは、細胞上で発現した同一または異なる抗原またはエピトープに対して数本の結合アームを用いることを意味し、一方、多重特異性抗体はターゲッティングした細胞または病原体に含まれる少なくとも2個の異なる抗原またはエピトープをターゲッティングするのに複数の結合アームを用いること含む。このような二価で二重特異性の抗体の例は、2002年8月1日出願の米国特許出願第60/399,707号明細書、2002年3月1日出願の第60/360,229号明細書、2002年6月14日出願の第60/388,314号明細書、および2002年4月5日出願の第10/116,116号明細書に見出され、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

【００５８】

本発明の好ましい態様によれば、カンプトテシン(CPT)およびその誘導体は好ましくは化学療法薬残基であるが、本発明はそれに限定されない。本発明の範囲内にある他の化学療法薬残基は、タキサン(例えば、バカチンIII、タキソール)、エポチロン、アントラサイクリン薬(ドキソルビシン(DOX)、エピルビシン、モルホリノドキソルビシン(モルホリノ-DOX)、シアノモルホリノ-ドキソルビシン(シアノモルホリノ-DOX)、および2-ピロリノドキソルビシン(2-PDOX); Priebe W(監修), ACSシンポジウムシリーズ574, American Chemical Society刊, Washington D.C., 1995. (332pp)、およびNagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2464-2469, 1996参照)、ゲルダナマイシンのようなベンゾキノイドアンサマイシン(DeBoer et al., Journal of Antibiotics 23:442-447, 1970; Neckers et al., Invest. New Drugs 17:361-373, 1999)などである。好ましくは、本発明の好ましい態様の免疫接合体において、ターゲッティング残基は少なくとも1つの化学療法薬残基、好ましくは1-約5個の化学療法薬残基、最も好ましくは、約7-約12個の化学療法薬残基に結合する。

【００５９】

CPT誘導体は、1つのクラスの強力な抗腫瘍薬である。イリノテカン(CPT-11とも表される)およびトポテカンは、認可された癌治療薬であるCPT類似体である(Iyer and Ratain, Cancer Chemother. Pharmcol. 42:S31-S43 (1998))。CPTは、トポイソメラーゼI-DNA複合体を安定化することによりトポイソメラーゼI酵素を阻害することによって作用する(Liu, et al.「カンプトテシン: その抗癌力の解明(The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential)」, Liehr J.G., Giovanella, B.C. and Verschraegen (監修), NY Acad. Sci., NY (2000), pp 1-10)。

【００６０】

CPTについて、免疫接合体の調製において一組の補足説明を示す。一つの補足説明とは、水性緩衝液でほとんどのCPT誘導体が不溶性であることである。第二には、CPTは、高分子に接合するのに構造的変更の選択肢が極めて少ない。例えば、CPT自身は、環Eに第三ヒドロキシル基を1個しか含まない。CPTの場合のヒドロキシル官能基は、その後のタンパク質接合に適用されるリンカーにカップリングさせなければならない。第三には、それらの構造におけるE環のδ ラクトン残基が生理学的条件下では不安定であり、これら物質における抗腫瘍能が著しく減少する。従って、接合法は7以下のpHで行い、ラクトン環の開環を回避するように行われる。活性エステルのようなアミン反応性基を有する二官能価CPTの典型的な接合には、pHが8以上である必要がある。第四には、細胞内で開裂可能な残基は、CPTと抗体とを接続するリンカー/スペーサーに組込む必要がある。

【００６１】

生理学的条件下でのδ ラクトン開環の問題は、以前に説明した。一つの方法は、C-20ヒドロキシル基をアミノ酸でアシル化し、そのアミノ酸のα-アミノ基をポリ-L-グルタミン酸にカップリングすることであった。この方法は、ポリマー分子の腫瘍部位への受動拡散

に依存している。このグリシン接合は、CPTの水溶性誘導体の作製方法(米国特許第4,943,579号明細書)として、およびCPTのPEG-誘導体形成の調製(Greenwald, et al., J. Med. Chem 39:1938-1940 (1996))においても報告されている。後者の場合には、この方法は、水溶性で長期作用性形態のCPTの開発において発明され、これによってCPTのイン・ビボでの半減期が増し、薬剤がイン・ビボで循環している間にその接合体から徐々に放出される。

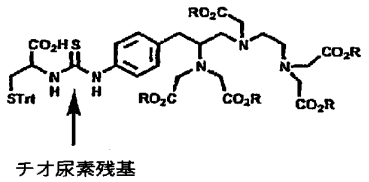
【００６２】

好ましい態様によれば、本発明は、上記の4つの補足説明を考慮した、CPTの免疫接合体の調製方法を提供する。本発明の好ましい態様は、下記の方法で補足説明を扱うものである。第一に、CPTの水溶性は、アミノポリカルボキシレートを化学療法薬残基(すなわち、CPT)と抗体の間に配置することによって増加する。好ましい態様によれば、アミノポリカルボキシレートは、DTPA(ジエチレントリアミン五酢酸)、NOTA(1,4,7-トリアザシクロノナン-N,N',N''-三酢酸)、DOTA(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸)、およびTETA(1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,8,11-四酢酸)からなる群から選択される。

【００６３】

好ましい態様によれば、アミノポリカルボキシレートはDTPAである。特に好ましい態様によれば、DTPAは、これを有する試薬を介して化学療法薬残基に結合している。好ましくは、アミノポリカルボキシレートを有する上記試薬は、

【化４】



(式中、「Trt」はトリチル基であり、カルボキシレート上のR基は水素またはアルキルであり、アルキルは直鎖状または分岐鎖状のC_1-C_6-アルキル基を意味する)である。通常の熟練技術者であれば、本発明の好ましい態様の実施に有用なアミノポリカルボキシレートを有する他の試薬を開発することができる。ハプテンを有する試薬は、当該技術分野で周知の方法により、チオ尿素残基のカルボン酸を介して化学療法薬残基に結合させることができる。当該技術分野で周知のこのような方法を、実施例8に記載する。Rがアルキルである場合には、エステルを脱保護して、最終的に相当するDTPA誘導体を得る。

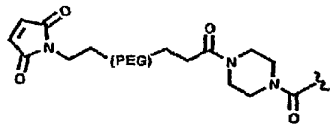
【００６４】

アミノポリカルボキシレートを有する試薬は、直接またはアミノ酸スペーサーを介して化学療法薬残基に結合させることができる。好ましい態様では、アミノポリカルボキシレートは、グリシンスペーサーを介して、さらに好ましくはバリンスペーサーを介して化学療法薬残基に結合される。さらに立体傷害の大きいバリネートを用いることによって、加水分解的に安定な残基が提供されることが示されている(Lerchen H-G et al., J. Med. Chem 44:4186-4195 (2001))。C-20ヒドロキシルのエステルとしての誘導体形成は、ジペプチドまたはポリペプチドを伴うこともできる。化学療法薬残基が10-ヒドロキシCPTであるときには、グリシルスペーサーを下記の実施例7に示されるようにA環のヒドロキシル基またはC-20ヒドロキシル基に結合させ、最も好ましくは、上記したグリシルまたは他のスペーサーはC-20ヒドロキシル基に結合している。

【００６５】

好ましい態様では、化学療法薬残基の水溶性は、化学療法薬残基上のヒドロキシル基に下記の残基(A)

【化５】



A

(式中、「PEG」はポリエチレングリコールを表す)を組込むことによって増加する。この残基は化学療法薬残基の水溶性を増加させるだけでなく、チオール反応性基も組込む。10-ヒドロキシCPTの場合には、上記残基をA環ヒドロキシル基またはC-20ヒドロキシル基で結合させることができる。

【００６６】

C-20ヒドロキシルに結合させるには、C-10ヒドロキシルを最初に保護する。次に、C-20ヒドロキシルを、例えば、グリシネートエステルに転換させる。この時点で、C-10ヒドロキシルは脱保護してよい。次いで、C-20グリシネートエステルの遊離アミノ基を適当に合成して、例えば、細胞内Cathepsin B酵素によって認識されかつ開裂する細胞内で開裂可能な「Phe-Lys」ジペプチド結合を含むようにすることができる。次に、上記で示されたPEG含有残基を、C-20グリシネート-Phe-Lysジペプチドの末端の遊離アミノ基に組込む。

【００６７】

第二に、δ-ラクトンを、アミノ酸基でC-20ヒドロキシル基を誘導体形成することによって安定させる。CPTのC-20ヒドロキシルにおけるアミノ酸リンカー/スペーサーの使用は、チオール反応性残基を有するアミンのさらなる合成に有利である。さらに、アミノ酸リンカー/スペーサーは、細胞内で開裂可能な残基として作用する。この時点で、免疫接合体は、細胞内で活性化されるプロドラッグに事実上なる。すなわち、免疫接合体からの化学療法薬残基の放出は、免疫接合体の腫瘍特異性抗原への結合、その後のインターナリゼーション、リソソームコンパートメントへのルーティング、およびリソソーム酵素による接合体の最終処理による薬剤の放出によって変化する。

【００６８】

最後に、この接合法は、中性または酸性pHで容易に起こるチオール-マレイミドまたはチオール-ビニルスルホン反応に基づいている。これにより、例えば、活性エステルを用いるときに必要とされるような接合のためにpH条件を一層高くする必要がなくなる。

【００６９】

他の態様によれば、本発明は、水可溶化残基とチオール反応性残基(例えば、マレイミド基)を本発明の好ましい態様の免疫接合体へ導入するためのモジュール法に関する。水可溶化残基とチオール反応性残基は、MCC-Gly-Lys-Lys(R')-NH_2(上記式中、MCCは4-マレイミドメチル-シクロヘキシル-1-カルボニル(SMCCから誘導された特別なマレイミド誘導体)であり、R'はアミノポリカルボキシレート(例えば、DTPA)またはピペラジンの誘導体のような水可溶化物質である)のような鋳型上に好適に導入される。上記態様で既に示されたようにアミノ酸またはジペプチドを用いることによるC-20ヒドロキシルでのエステルとしてのCPTまたはその類似体の誘導体形成によって、活性化に利用可能なアミノ基が生じる。このアミノ基を当該技術分野で周知の方法によってイソチオシアナート基に転換し、後者を上記のペプチド鋳型の内部リシン残基の側鎖アミノ基に結合させる。この方法で、水可溶化基と抗体反応性基が単一段階で付加される。さらに、ペプチド鋳型を変更して2個以上の中心リシンまたはアルギニンのような他の側鎖アミンを含むアミノ酸を含むようにすることによって、複数の化学療法薬残基を付加することができる。

【００７０】

上記方法を用いて、1-5個、さらに好ましくは1-2個の化学療法薬残基をリンカーに導入することができると考えられる。

【００７１】

さらに他の好ましい態様によれば、pHに感受性の細胞内で開裂可能な残基を、ターゲッ

ティング残基を化学療法薬残基に結合するリンカーとして用いる。この方法の利点は、化学療法薬残基の腫瘍内放出が、ターゲッティング残基を化学療法薬残基に結合させる細胞内で開裂可能な残基の結合を開裂させるための特異的酵素の発現の程度によらないことである。

【００７２】

例えば、CPTの20-ヒドロキシル基を、ジヒドロピラン残基、テトラヒドロフラン残基、またはチオール反応性残基(例えば、マレイミド)および水可溶化基(例えば、ピペラジン)をも含んでなるオルトエステルを含んでなるpH感受性の細胞内で開裂可能な残基に酸触媒下で結合させることができる。チャート1を参照されたい。ジヒドロピラン、テトラヒドロフラン、またはオルソエステル残基を含んでなるpH感受性の細胞内で開裂可能な残基は、総て細胞内コンパートメントの酸性pHで開裂されやすいエーテル結合を含んでなる。

【００７３】

下図の構造1のリンカーを用いる。この実施例では、中心のピペラジン部分は水溶性を考慮している。この分子の「左端」における置換ジヒドロピランはCPT誘導体における(複数の)ヒドロキシル基へカップリングするためのものであり、この分子の「右端」のマレイミドはジスルフィドで還元した抗体へ接合するためのプロトタイプのチオール反応性基である。本明細書において、「CPT」は一般的用語として用いられ、チャートに示されるように、CPT、10-ヒドロキシ-CPT、またはSN-38となることができる。10-ヒドロキシ-CPTおよびSN-38の場合には、誘導体形成は10-ヒドロキシおよび20-ヒドロキシ位の両方で予想することができる。CPTは、テトラヒドロピラン残基を介して架橋剤に結合する。この結合はpH 4-6で徐々に開裂するが、6を上回るpHでは安定である(Greene TW, Wuts PGM著「有機合成における保護基(Protective groups in organic synthesis)」, 第2版; John Wiley & Sons: New York, 1991; pp 413-416)。この方法は、細胞内コンパートメントが酸性であり、通常は約5であることを利用している(Poznansky MJ and Juliano RL, Pharmacol Rev 36:277-336, 1984)。細胞内コンパートメントにおけるこの酸性pHによって、抗体から薬剤を無傷で放出される。

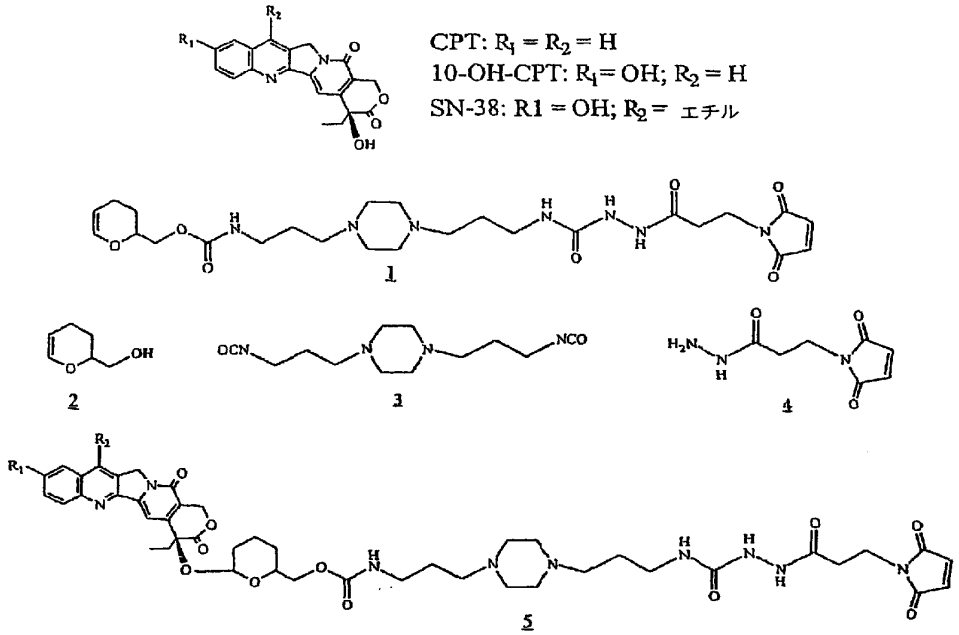
【００７４】

上記のように、テトラヒドロフラニル残基は、pH感受性の細胞内で開裂可能な残基の不可欠な部分と考えられる(Greene TW, Wuts PGM著「有機合成における保護基(Protective groups in organic synthesis)」, 第2版; John Wiley & Sons: New York, 1991; pp 267-269)。pH感受性の細胞内で開裂可能な残基がテトラヒドロフラニル残基を含んでなるときには、CPT C20-酸素-テトラヒドロフラン結合はテトラヒドロピラニル残基を用いるときより速やかに開裂する。

【００７５】

【化６】

チャート



本発明の好ましい態様の免疫接合体の投与の適当な経路としては、経口、非経口、直腸、経粘膜、腸投与、筋肉内、皮下、骨髄内、髄腔内、直接心室内、静脈内、ガラス体内、腹腔内、経鼻、または眼内投与が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい投与経路は非経口である。あるいは、化合物を例えば固形腫瘍に直接注射することによって、化合物を全身的よりは局所的に投与することができる。

【実施例】

【００７６】

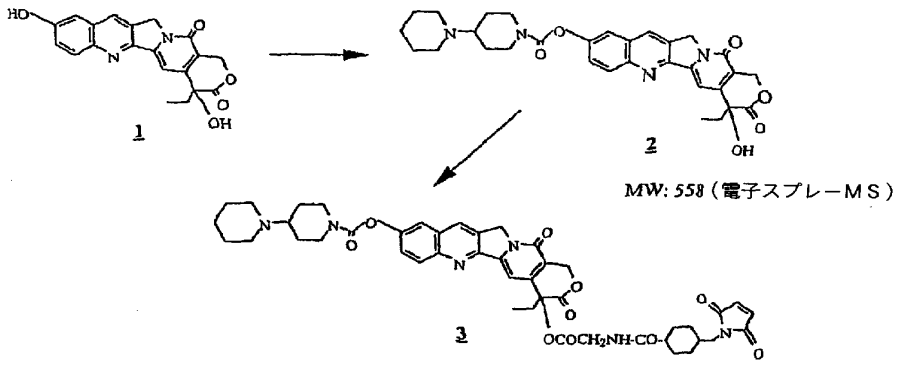
本発明を下記の実施例によって説明するが、発明の範囲を制限するものではない。

実施例

実施例１：10ヒドロキシカンプトテシンのC-20-O-(N-'MCC')グリシネート誘導体であって、MCCが4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボニル残基であるものの調製

【化７】

図１



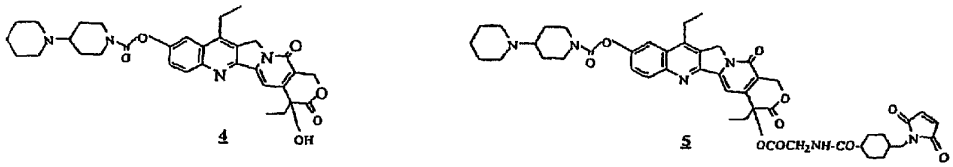
10-ヒドロキシカンプトテシン(0.2081g; 0.57ミリモル)を、無水ジメチルホルムアミド(DMF)20mlおよびジイソプロピルエチルアミン(DIEA)0.22mlに加えた。これに4-ニトロフェニルクロロホルメート0.1248g(0.619ミリモル)を加え、反応混合物をアルゴン下室温にて4時間撹拌した。4-ピペリジノピペリジン(0.2403g)をDMF 4mlに溶解したものを一度に加え、混合物をさらに2時間撹拌した。溶媒を留去すると粗生成物が得られ、これをシリカゲル(230-400メッシュ)上でフラッシュクロマトグラフィーによってメタノール-ジクロロメタングラディエント溶出を用いて精製し、中間体2 52.8mgを得た。電子スプレー質量スペクトルでは、ポジティブイオンモードでm/e 559に明確なピーク(M+H)を示し、ネガティブイオンモードでm/e 557に(M-H)および593に(M+Cl)のピークを示した。中間体2(25mg)を、ジクロロメタン(DCM)10ml中でBOC-グリシン(8.9mg)、N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(2mg)およびジシクロヘキシルカルボジイミド(DIC)(1Mジクロロメタン溶液0.058ml)と18時間(室温、アルゴン下で)反応させた。反応混合物を処理して、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、C-20-O-(BOC)グリシネートを約50%の収率で得た。この生成物をトリフルオロ酢酸(TFA)の10% DCM溶液と1-2時間反応させ、20-O-グリシネート誘導体を得た。これを、1.2モル当量のスクシンイミジルマレイミドメチルシクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)および1.5当量のDIEAを用いてDMF中で約3時間(室温、アルゴン下で)誘導体形成させた。溶媒を留去し、フラッシュクロマトグラフィーを行ったところ、7.8mgの純粋な3をゴム状固形物として回収した。分析用HPLC(C18カラム、3ml/分で10分間で溶液Aから溶液「B」に変化するグラディエント溶出の後、100%「B」に5分間保持;「A」:0.1% TFA水溶液;「B」:90% CH_3CN/0.1% TFA)は、単一ピーク9.48分(360nmの吸光度)を示した。電子スプレー質量スペクトルは、m/e 835に(M+H)の質量ピークを示した。

【0077】

実施例2:イリノテカン(CPT-11)のC-20-O-(N-'MCC')グリシネート誘導体であって、MCCが4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボニル残基であるものの調製

【化8】

図2



MW: 862 (電子スプレーMS)

CPT-11(4)から出発して、BOC-グリシンと反応させ(精製生成物は電子スプレー質量スペクトルにおいてm/e 744にM+Hを示した)、TFAで脱保護し(質量スペクトルにおいてm/e 644にM+Hピーク)、実施例1と同様にしてSMCCにカップリングすることによって、3段階処理法で生成物5を調製した。生成物は、実施例1と同様にして精製した。最終生成物5は、ポジティブイオンモード電子スプレー質量スペクトルにおいてm/e 863に強いピークを示し、分析用HPLCでは9.69分に明瞭なピークを示した。純粋な生成物5は白色固形物として得られ、25mgの量で生成した。

【0078】

実施例3:10-ピペラジノカルボニルオキシカンプトテシン(6)の調製およびヘテロ二官能価ポリ(エチレングリコール),マレイミド-PEG-NHSへのそのカップリング

【化９】

図３

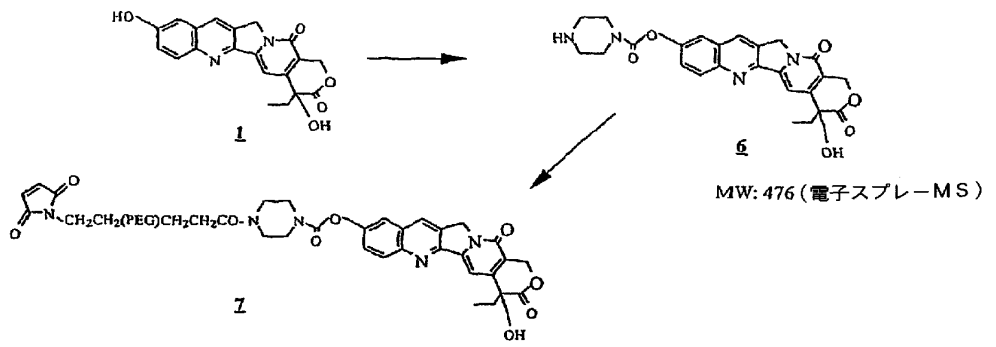


図3における中間体6の調製は、図1における2の調製の行程に沿ってピペリジノピペリジンの代わりにピペラジンを用いて行った。フラッシュクロマトグラフィー精製の後、6を43.3%の収率(橙色固形物)で得た。電子スプレー質量スペクトルは、m/e 477にM+Hを示し、m/e 475にM-H(ネガティブイオンモード)を示した。7を調製するため、前駆体6を0.5モル当量のポリ(エチレングリコール-α-N-ヒドロキシスクシンイミジルプロピオネート,(β-マレイミド, MW 3400 (Shearwater Polymers, Huntsville, ALから入手)とDMF中で混合し、30分間インキュベーションした。反応混合物は、そのまま精製せずに用いた。活性化したCPTのモル含量は、使用した限定的PEG試薬のモル含量と等しいと考えた。

【００７９】

実施例４：CPT誘導体3または5または7をモノクローナル抗体と接合させるための一般的手順

抗体を、20-40倍モル過剰量のジチオトレイトールおよびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)(約5mM最終濃度)でpH 7.4で処理し、アルゴンを流し、37℃で45分間インキュベーションした。冷却した内容物を、遠心分離溶出条件(遠心分離SEC)下にて50mM酢酸ナトリウム-150mM塩化ナトリウム, pH 5.3(「ABS緩衝液」)中Sephadex G50/80の2本の連続した3mlカラムで精製した。溶出液を280nmでの吸光度を用いてタンパク質濃度について分析し、チオール含量をEllman分析法によって分析した。還元抗体は7-9チオール基を含んでいた。還元抗体を20倍モル過剰量のCPT誘導体とDMF中で反応させ、接合混合物中のDMFの最終濃度が≦5%v/vとなるようにし、氷上(約4℃)で20-30分間インキュベーションした。Sephadex G50/80上ABS緩衝液で2回連続して遠心分離-SEC精製を行った後、溶出液を疎水性カラムを通過させて非共有結合CPT誘導体を除去し、最終的接合体を得た。7を用いる接合体の場合には、さらに30K MWCO遠心分離フィルター上での限外濾過による精製が必要であった。総ての調製物において、反応混合物並びに精製接合体は透明溶液であり、CPT誘導体の水溶性が用いられたことを示していた。SE-HPLCによる分析は、ガードカラムとイン・ライン吸光度検出器を備えた分析用SEC250カラム上で溶離剤として0.2Mリン酸ナトリウムpH 6.8および流速として1ml/分を用いて行った。生成物は、260-540nmの領域で分光光度法による吸光度掃引によっても分析した。360nmでの吸光度をCPT-11標準品で得られた吸光度で補正して、接合体におけるCPT濃度を決定した。CPT誘導体からのスピルオーバー(spillover)について補正した280nmでの吸光度を用いて、抗体濃度を計算した。この方法で、CPT誘導体対IgGのモル比を決定した。生成物を10 %(v/v)の1Mスクロースと混合し、1mgおよび0.1mgずつのロットに等分し、凍結乾燥した。凍結乾燥した調製物をアルゴン置換した後、冷凍庫に保管した。

【００８０】

実施例５：10-ヒドロキシCPT, 3の誘導体のMAb接合体

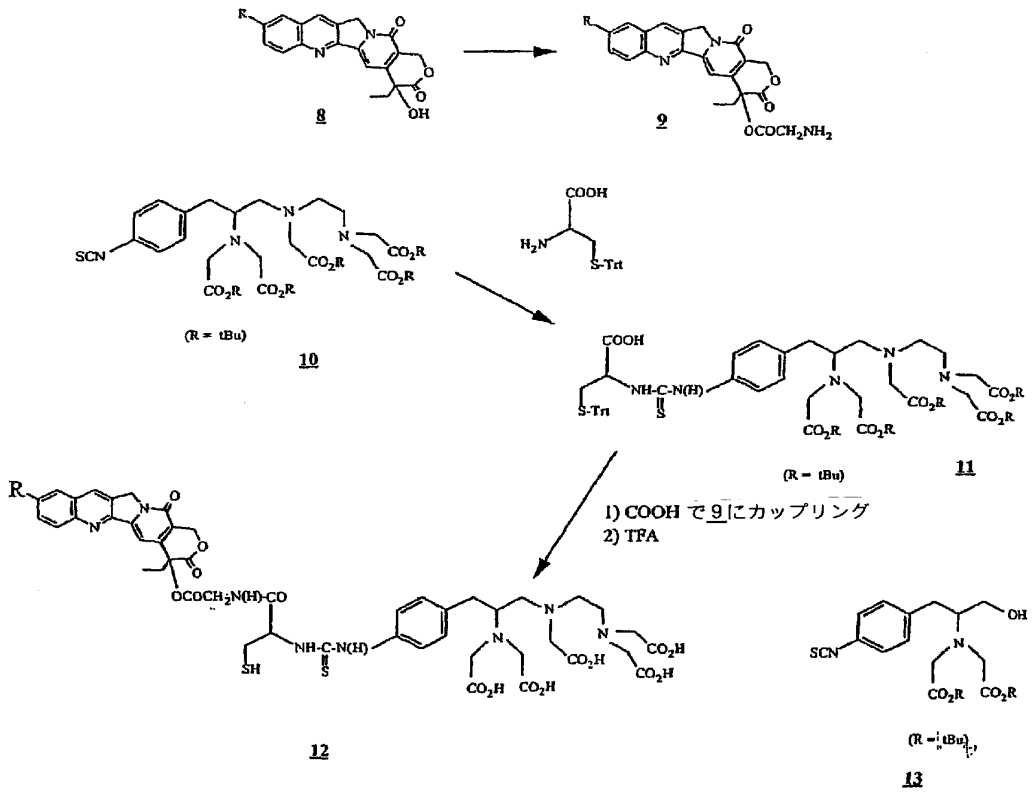
接合体は、実施例4に記載の方法で調製した。下記のものは、様々な接合体に関するデーターである。

【００８１】
3のネズミLL2（抗CD-22 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、主として未修飾LL2の保持時間に溶出する単一ピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：1.6%。接合体における3のモル置換（すなわち、3対IgG比）は、吸光度掃引により8.3であり、MALDI質量スペクトル分析により6であった。
【００８２】
3のネズミLL1（抗CD-74 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、主として未修飾LL1の保持時間に溶出する単一ピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：2.5%。接合体における3のモル置換（すなわち、3対IgG比）は、吸光度掃引により7.9であった。
【００８３】
3のネズミRS7（抗EGP-1 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、主として未修飾RS7の保持時間に溶出する単一ピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：1.4%。接合体における3のモル置換（すなわち、3対IgG比）は、吸光度掃引により6.9であった。
【００８４】
3のヒト化LL2（抗CD-22 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、主として未修飾hLL2の保持時間に溶出する単一ピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：0%。接合体における3のモル置換（すなわち、3対IgG比）は、吸光度掃引により7.1であった。
【００８５】
3のヒト化AFP31（抗AFP MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、主として未修飾hAFP31の保持時間に溶出する単一ピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：0%。接合体における3のモル置換（すなわち、3対IgG比）は、吸光度掃引により8.0であった。
【００８６】
実施例６：CPT-11，5の誘導体のMAb接合体
　接合体は、実施例4に記載の方法で調製した。下記のものは、様々な接合体に関するデーターである。
【００８７】
5のネズミLL2（抗CD-22 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、主として未修飾LL2の保持時間に溶出する単一ピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：2.2%。接合体における5のモル置換（すなわち、5対IgG比）は、吸光度掃引により9.7であった。
【００８８】
5のネズミLL1（抗CD-74 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、未修飾LL1の保持時間に溶出するピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：8.8%。接合体における5のモル置換（すなわち、5対IgG比）は、吸光度掃引により10.9であった。
【００８９】
5のネズミ　MN-14（抗CEA MAb）接合体：360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、未修飾MN-14の保持時間に溶出するピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：9.3%。接合体における5のモル置換（すなわち、5対IgG比）は、吸光度掃引により10.0であった。
【００９０】
5のヒト化LL2（抗CD-22 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、主として未修飾hLL2の保持時間に溶出するピークを示し、後者は280nmに設定した検出により同一条件下で分析した。総含量：0%。接合体における5のモル置換（すなわち、5対IgG比）は、吸光度掃引により8.4であった。

【００９１】
実施例７：10-ヒドロキシCPT，7のPEG-誘導体のMAb接合体
接合体は、実施例4に記載の方法で調製した。下記のものは、様々な接合体に関するデーターである。
【００９２】
7のネズミLL2（抗CD-22 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、未修飾LL2の保持時間附近に溶出するピーク（83%）を示し、総含量は16.3%であった。接合体における7のモル置換（すなわち、7対IgG比）は、吸光度掃引により8.0であった。
【００９３】
7のネズミLL1（抗CD-74 MAb）接合体：　360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、未修飾LL1の保持時間附近に溶出するピーク（94%）を示し、総含量は6.0%であった。接合体における7のモル置換（すなわち、7対IgG比）は、吸光度掃引により8.1であった。
【００９４】
7のネズミ　RS7（抗EGP-1 MAb）接合体：360nmのCPT最大吸光度に設定した吸光度検出によるSE-HPLC分析は、未修飾RS7の保持時間附近に溶出するピークを示し、総含量は9.3%であった。接合体における7のモル置換（すなわち、7対IgG比）は、吸光度掃引により8.0であった。
【００９５】
実施例８：抗体上のリシンまたはチオール基への接合に適するアミノポリカルボキシレートを付加した二官能価CPTの調製の一般的方法
一般的方法は、図4に示す。簡単に説明すれば、CPTおよび10-ヒドロキシ-CPTをSingerの方法（上記引用）によって相当するC-20-O-グリシネートに転換した。平行合成において、イソチオシアナトベンジルDTPAペンタ第三ブチルエステルを相当するアミン前駆体から生成させた後、S-トリチルシステインにカップリングした。フラッシュクロマトグラフィー精製により、中間体11（質量スペクトル：M+Na m/e 1207；M-H:1183）を得た。
【００９６】
次に、中間体11をCPT誘導体9にカップリングさせた。第三ブチルカチオンを捕捉するためのスカベンジャーを用いてカルボキシレートの第三ブチル基とS-トリチル基をTFAによる脱保護を行った後、IgGに付加したマレイミド基への接合に適するDTPAを付加した二官能価CPT誘導体（R = HまたはOH）を得た。
【００９７】
チオール基は、過剰のジビニルスルホンで誘導体形成して、ビニルスルホン基を有する中間体を生成させ、これはジスルフィド還元した抗体のチオール基への接合に適する。
【００９８】
中間体13は、これらの変換においてイソチオシアナトベンジルDTPAの代わりに用いることができるアミノポリカルボキシレートのもう一つの例である。

【化１０】

図４(R = H for CPT or OH for 10-OH-CPT)



【００９９】

実施例９：SN-38接合体の調製方法

SN-38は、プロドラッグCPT-11からイン・ビボで代謝により転換される活性薬剤である(Liehr, Giovanella, Verschraegen (監修)(上記引用))。SN-38は、トポイソメラーゼI活性の阻害においてCPT-11より3桁強力な活性化学療法薬である。抗体接合に適する二官能価SN-38は、下記の通りに簡単に調製される。すなわち、[CPT-11]-20-O-バリネートを、そのバリンN末端をBOCとして保護したものを、水酸化物のような塩基1当量を用いてそのC-10-カルバメートで選択的に開裂させる。カリウム第三ブトキ2当量と水1当量とから誘導されるような「無水水酸化物」(Gassman and Schenk, J. Org. Hem, 42:918-920 (1977))は、この目的に有利に用いられる。CPTのバリネートエステルは、1N水酸化ナトリウム水溶液の1当量に少なくとも1時間安定であることが示されている。この方法により、C-10-カルバメートを選択的に開裂する。次に、バリン残基のアミノ基をイソチオシアネートに転換し、ペプチド鋳型MCC-Gly-Lys-Lys(R')-NHにカップリングする。あるいは、SN-38自身を、最初にメトキシトリチル誘導体のような酸感受性誘導体としてC10-ヒドロキシル基を保護することによって誘導体形成する。次に、C20-ヒドロキシル基をバリネートエステルに転換する。この時点で、C-10位のメトキシトリチル基を除去する。別の方法は、最初に相当する「BOC」エステルとしてC-10ヒドロキシルを保護し、20-ヒドロキシル基を誘導体形成し、脱保護することによってすることによってSN-38の20-バリネートエステル(または任意の他のエステル)誘導体を調製する。次に、これに続いてトリメチルシリルクロリドで処理して、C-10ヒドロキシルとC-20のエステルのアミノ基を誘導体形成させ、マレイミド-PEG-NHSのようなアミン反応性のヘテロ二官能価架橋剤と反応させ、C-10位のトリメチルシリル基を脱保護する。

【０１００】
上記の方法はCPT誘導体に限定されず、パクリタキセル、ゲルダナマイシンなどのような他の疎水性薬剤にも応用することができる。
【０１０１】
上記の説明から、当業者であれば、本発明の本質的特徴を容易に突き止めることができ、発明の精神および範囲から離反することなく発明の様々な変化および変更を行い、過度の実験を行うことなく様々な用法および条件に適合させることができる。本明細書に引用した総ての特許明細書、特許出願明細書および公表文献の内容は、引用することに本明細書の開示の一部とされている。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/05454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 708 146 A (BRASLAWSKY GARY R ET AL) 13 January 1998 (1998-01-13) claims; examples ---	1-41
Y	KING H D ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODY CONJUGATES OF DOXORUBICIN PREPARED WITH BRANCHED LINKERS: A NOVEL METHOD FOR INCREASING THE POTENCY OF DOXORUBICIN IMMUNOCONJUGATES" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 10, no. 2, March 1999 (1999-03), pages 279-288, XP000804254 ISSN: 1043-1802 abstract --- -/--	1-41

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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	Date of mailing of the international search report
12 March 2004	05/04/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Didelon, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/05454

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 76551 A (KRATZ FELIX ;KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH (DE)) 21 December 2000 (2000-12-21)	1-11,15, 26,27, 32-35
Y	claims; example 1	1-41
X	CHARI R V J ET AL: "IMMUNOCONJUGATES CONTAINING NOVEL MAYTANSINOIDS: PROMISING ANTICANCER DRUGS" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 52, no. 1, 1992, pages 127-131, XP000453560 ISSN: 0008-5472	1-11, 16-23, 26-29, 31,32, 34,35
Y	the whole document	1-41
X	EP 0 253 202 A (ONCOGEN) 20 January 1988 (1988-01-20)	1-12, 16-21, 26-29, 31,32, 34,35,41
Y	examples V,VI	1-41
X	EP 0 306 943 A (NEORX CORP) 15 March 1989 (1989-03-15)	1-12, 16-21, 26-29, 31,32, 34,35,41
Y	claims; examples claim 6	1-41
X	US 4 359 457 A (YOULE RICHARD J ET AL) 16 November 1982 (1982-11-16)	1-11, 16-21, 26-29, 31,32, 34-41
Y	the whole document	1-41
Y	HEINDEL N D ET AL: "A NOVEL HETEROBIFUNCTIONAL LINKER FOR FORMYL TO THIOL COUPLING" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 2, November 1991 (1991-11), pages 427-430, XP000983437 ISSN: 1043-1802 abstract	1-41

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/05454

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROWLINSON-BUSZA G ET AL: "Targeted delivery of biologic and other antineoplastic agents." CURRENT OPINION IN ONCOLOGY. UNITED STATES DEC 1992, vol. 4, no. 6, December 1992 (1992-12), pages 1142-1148, XP009027478 ISSN: 1040-8746 the whole document	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/05454

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5708146	A	13-01-1998	US	5622929 A	22-04-1997
			AU	666903 B2	29-02-1996
			AU	3188193 A	29-07-1993
			BG	61899 B1	30-09-1998
			CA	2087286 A1	24-07-1993
			CN	1074684 A ,B	28-07-1993
			CN	1207946 A	17-02-1999
			CN	1180711 A	06-05-1998
			CZ	9300057 A3	19-01-1994
			EG	20406 A	28-02-1999
			EP	0554708 A1	11-08-1993
			FI	930240 A	24-07-1993
			HU	68345 A2	28-06-1995
			JP	6025012 A	01-02-1994
			MX	9300298 A1	01-12-1993
			NO	930189 A	26-07-1993
			NZ	245725 A	28-08-1995
			OA	9859 A	15-08-1994
			PL	297514 A1	23-08-1993
			PL	172718 B1	28-11-1997
			PL	172837 B1	31-12-1997
			PL	172827 B1	31-12-1997
			PL	172715 B1	28-11-1997
			PL	172824 B1	31-12-1997
			RO	112618 B1	28-11-1997
			US	5606017 A	25-02-1997
			ZA	9300444 A	21-07-1993
WO 0076551	A	21-12-2000	DE	19926154 A1	14-12-2000
			AU	5970900 A	02-01-2001
			CA	2374964 A1	21-12-2000
			WO	0076551 A2	21-12-2000
			EP	1183050 A2	06-03-2002
			JP	2003501486 T	14-01-2003
EP 0253202	A	20-01-1988	US	4997913 A	05-03-1991
			AU	7466387 A	07-01-1988
			AU	636493 B2	29-04-1993
			AU	7813191 A	29-08-1991
			CA	1304293 C	30-06-1992
			EP	0253202 A2	20-01-1988
			EP	0428188 A2	22-05-1991
			JP	1876502 C	07-10-1994
			JP	5088686 B	24-12-1993
			JP	63115827 A	20-05-1988
			US	5084560 A	28-01-1992
EP 0306943	A	15-03-1989	US	4981979 A	01-01-1991
			AT	114479 T	15-12-1994
			AU	2209588 A	16-03-1989
			CA	1336496 C	01-08-1995
			DE	3852250 D1	12-01-1995
			DE	3852250 T2	29-06-1995
			EP	0306943 A2	15-03-1989
			JP	1163132 A	27-06-1989
US 4359457	A	16-11-1982	US	4440747 A	03-04-1984

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
A61K 31/337	*(2006.01)*	A61K	31/337	
A61K 31/704	*(2006.01)*	A61K	31/704	
A61K 31/438	*(2006.01)*	A61K	31/438	
A61K 31/427	*(2006.01)*	A61K	31/427	
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395 L	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P	37/06	
A61P 31/04	*(2006.01)*	A61P	31/04	
A61P 31/10	*(2006.01)*	A61P	31/10	
A61P 31/12	*(2006.01)*	A61P	31/12	
A61P 33/02	*(2006.01)*	A61P	33/02	
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	25/00 101	
A61P 21/04	*(2006.01)*	A61P	21/04	
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P	29/00 101	
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P	3/10	
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61P	1/04	
A61P 1/16	*(2006.01)*	A61P	1/16	
A61P 13/12	*(2006.01)*	A61P	13/12	
A61P 7/06	*(2006.01)*	A61P	7/06	
A61P 11/00	*(2006.01)*	A61P	11/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100126099
弁理士 反町 洋
(72)発明者 ブイ．セレングラム、ゴビンダン
アメリカ合衆国ニュージャージー州、サミット、パサイク、アベニュ、１０６

Ｆターム(参考) 4C076 BB11 CC01 CC03 DD60 EE41 FF68
4C085 AA14 AA23 AA24 AA25 BB11 CC21
4C086 AA01 BA02 CA01 CB22 CB25 EA10 MA66 NA13 ZA02 ZA55
ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81 ZA94 ZB08 ZB15 ZB26 ZB32
ZB33 ZB35 ZB38 ZC35

(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2007-527872
(P2007-527872A)
(43)公表日　平成19年10月4日(2007.10.4)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/4355	(2006.01)	A61K	31/4355	4C034
A61K 31/5377	(2006.01)	A61K	31/5377	4C050
A61K 31/473	(2006.01)	A61K	31/473	4C063
A61K 31/496	(2006.01)	A61K	31/496	4C065
A61K 31/4365	(2006.01)	A61K	31/4365	4C071

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 217 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-501043 (P2007-501043)
(86)(22)出願日　平成17年2月25日 (2005.2.25)
(85)翻訳文提出日　平成18年10月16日 (2006.10.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/006243
(87)国際公開番号　WO2005/082368
(87)国際公開日　平成17年9月9日 (2005.9.9)
(31)優先権主張番号　60/547,899
(32)優先日　平成16年2月26日 (2004.2.26)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504080179
イノテック　ファーマシューティカルズ　コーポレイション
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０１９１５　ビヴァリー　クミンズ　センター　１００
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(72)発明者　ジャグタップ、プラカシュ
アメリカ合衆国　０１９１５　マサチューセッツ州　ビバリー　ブリッジ　ストリート　１９８

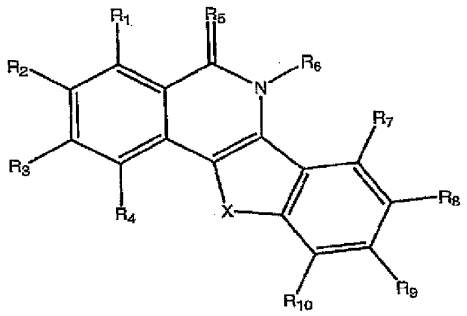
最終頁に続く

(54)【発明の名称】イソキノリン誘導体及びその使用方法

(57)【要約】
本発明は、イソキノリン誘導体、有効量のイソキノリン誘導体を含む組成物、及び必要に応じて有効量のイソキノリン誘導体を動物に投与することを含む、炎症性疾患、再潅流傷害、虚血性症状、腎不全、糖尿病、糖尿病合併症、循環器疾患以外の血管系疾患、循環器疾患、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害、パーキンソン病、又は癌を治療する又は予防する方法に関する。

OnCusp
Ex. 1002

【特許請求の範囲】
【請求項１】
有効量の式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。
【化１】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－$ＣＨ_2$－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（$ＣＨ_2$）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$ＮＲ_{11}Ｒ_{12}$）－、又は－Ｎ（$ＳＯ_2$Ｙ）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－$ＮＨ_2$又は－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－$Ｃ_1$～$Ｃ_{10}$のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－$Ｃ_1$～$Ｃ_{10}$のアルキル、－ハロ置換の$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－$Ｃ_2$～$Ｃ_{10}$のアルケニル、－$Ｃ_3$～$Ｃ_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－$ＮＨ_2$、－アミノ置換の$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$アルキル）、－$ＮＯ_2$又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－$ＳＯ_2$－、－$ＳＯ_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（$ＣＨ_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－$Ｃ_1$～$Ｃ_{10}$のアルキル、－$Ｃ_2$～$Ｃ_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－$Ｃ_3$～$Ｃ_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－$ＮＺ_1Ｚ_2$、－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキレン）－$ＮＺ_1$，$Ｚ_2$、－アミノ置換の$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－$Ｈ_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）$ＮＨ_2$であり、－$ＮＺ_1Ｚ_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）$ＮＨ_2$以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－$ＮＯ_2$、－ＣＮ、－$ＮＺ_1Ｚ_2$、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－$Ｃ_1$～$Ｃ_{10}$のアルキル、－$Ｃ_2$～$Ｃ_{10}$のアルケニル、－$Ｃ_2$～$Ｃ_{10}$のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル）又は－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル），－$Ｃ_1$～$Ｃ_{10}$のアルキル、－ハロ置換の$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－$Ｃ_2$～$Ｃ_{10}$のアルケニル、－$Ｃ_3$～$Ｃ_8$の単環式シクロアルキ

OnCusp
Ex. 1002

ル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

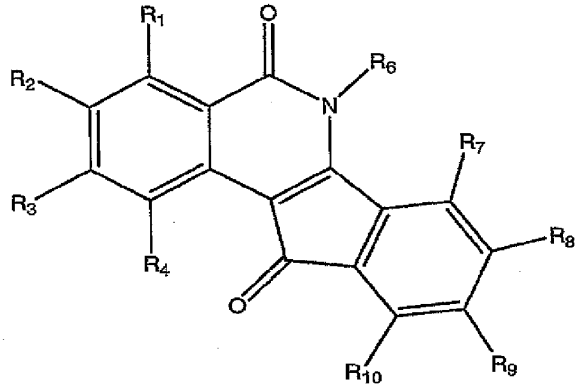
Ｚ$_1$及びＺ$_2$は独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２】

有効量の式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化２】



(II)

式中、

Ｒ$_6$は、－Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_1$は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり；

Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、－NHCO－、－NHCONH－、－O－、－CO－、－OC(O)－、－C(O)O－、－CONH－、－CON(C_1～C_5のアルキル)－、－NH－、－CH_2－、－S－又は－C(S)－であり；

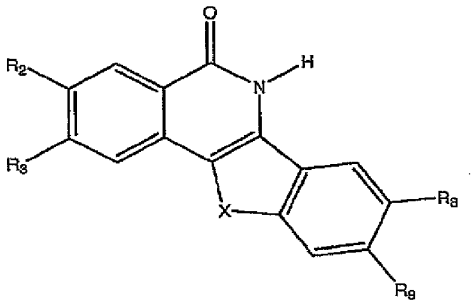
Bは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－3～7員環の単環式複素環、－7～10員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－(C_1～C_5のアルキル)－(－3～7員環の単環式複素環)、－$H_2NC(O)$－置換のアリール、－C(O)OH、－C(O)O－(C_1～C_5のアルキル)、－C(O)O－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N(Z_3)(Z_4)の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成する。

【請求項3】

有効量の式(III)を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化3】



(III)

式中、

Xは、－CH_2－又は－O－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－O－(C_1～C_5のアルキル)、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－$CONH_2$、－C(O)OH、－OC(O)－C_1～C_5のアルキル又は－C(O)O－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－A－Bであり、

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－NHCO－であり；

Bは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環の1以上で置換され；且つ

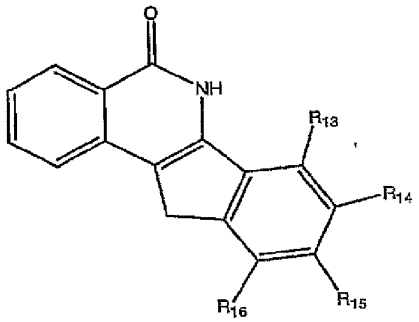
Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－N(Z_3)(Z_4)の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒にな

って窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４】

有効量の式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化４】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；

R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ

ｎは０～５の整数である。

【請求項５】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項１に記載の方法。

【請求項６】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項２に記載の方法。

【請求項７】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項３に記載の方法。

【請求項８】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項４に記載の方法。

【請求項９】

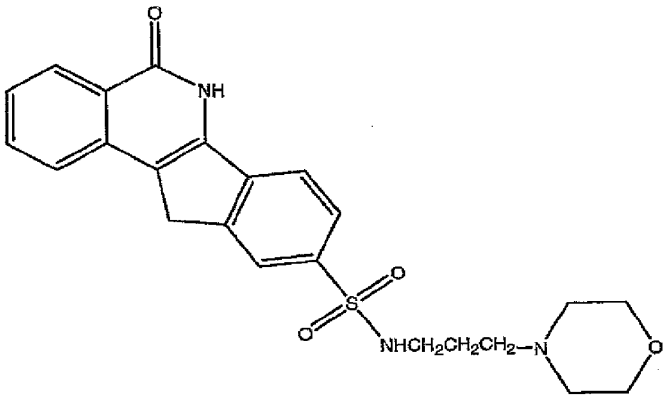
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項１に記載の方法。

【請求項１０】

癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項２に記載の方法。

【請求項１１】

癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項３に記載の方法。
【請求項１２】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項４に記載の方法。
【請求項１３】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項９に記載の方法。
【請求項１４】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１０に記載の方法。
【請求項１５】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
化合物が、
【化５】

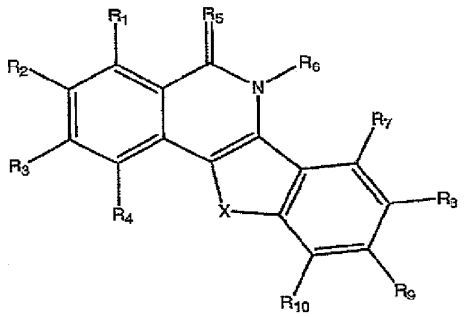


又は薬学上許容可能なその塩である請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
薬学上許容可能な塩がメシル酸塩である請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項２に記載の方法。
【請求項２１】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項３に記載の方法。
【請求項２２】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項４に記載の方法。
【請求項２３】
有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とからなる組成物、又はその薬学上許

OnCusp
Ex. 1002

容可能な塩。

【化６】



(I)

式中、

R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；

R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：

Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換され

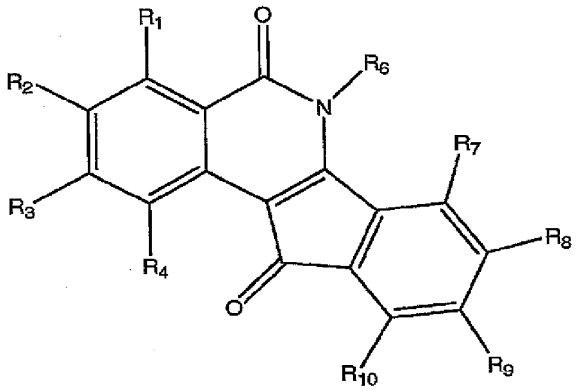
ないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２４】

有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化７】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり；

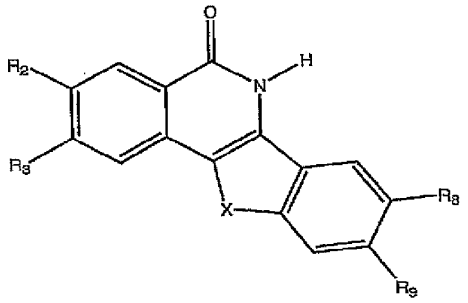
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキ

ル）－、－ＮＨ－、－ＣＨ$_2$－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり；
Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項２５】
有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

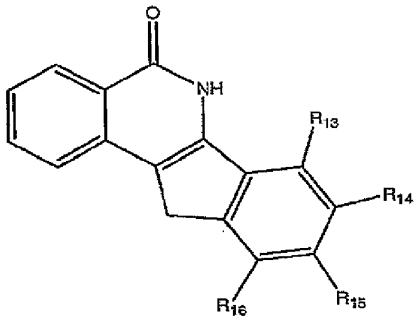
【化８】



(III)

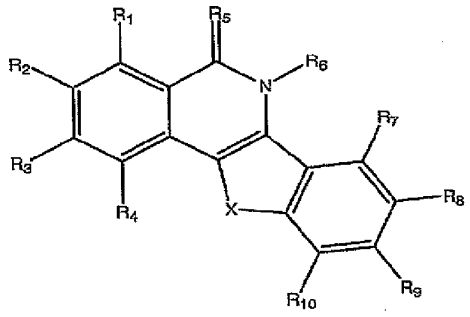
式中、
Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；
Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；
Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、
Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ
Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項２６】
有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。
【化９】



(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。
【請求項２７】
有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。
【化１０】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：

Xは、－Ｃ（Ｏ）－、－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（ＮＲ$_{11}$Ｒ$_{12}$）－、又は－Ｎ（ＳＯ$_2$Ｙ）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－ＮＨ$_2$又は－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

Ｒ$_{11}$及びＲ$_{12}$は、独立して水素、又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はＮであり、Ｒ$_{11}$及びＲ$_{12}$は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

Ｒ$_1$は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン）－ＮＺ$_1$，Ｚ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）ＮＨ$_2$であり、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）ＮＨ$_2$以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）の１以上で置換され；

Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

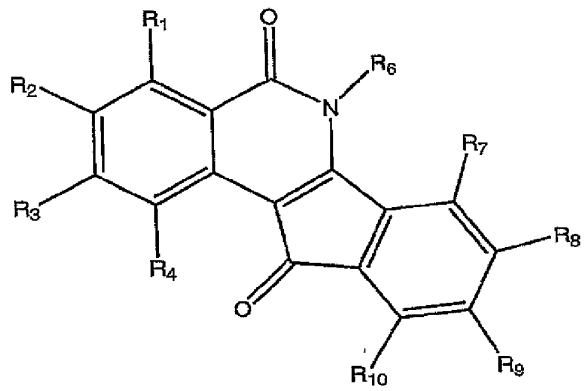
Ｚ$_1$及びＺ$_2$は独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２８】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１１】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

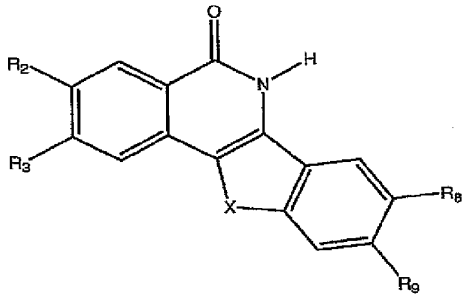
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項２９】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１２】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

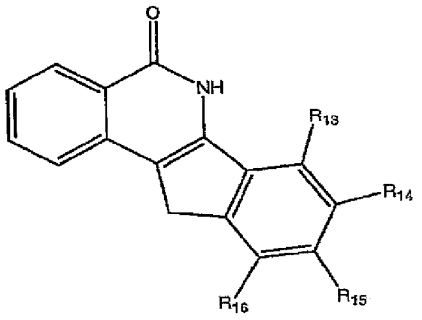
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３０】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１３】

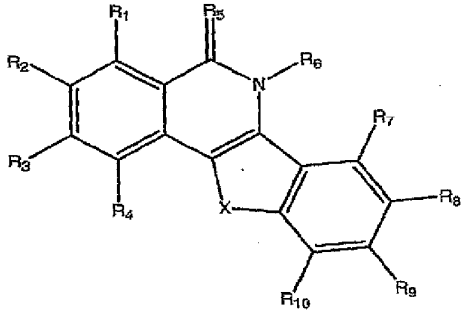


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３１】
有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、及び式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１４】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1,Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

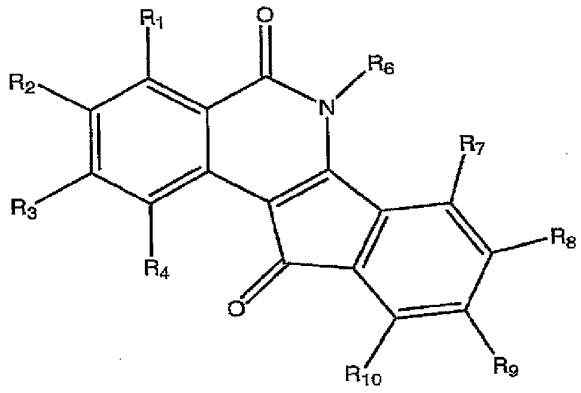
ｎは０～５の整数である。

【請求項３２】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

OnCusp
Ex. 1002

【化１５】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

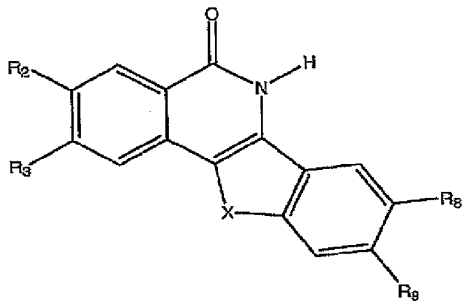
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３３】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１６】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

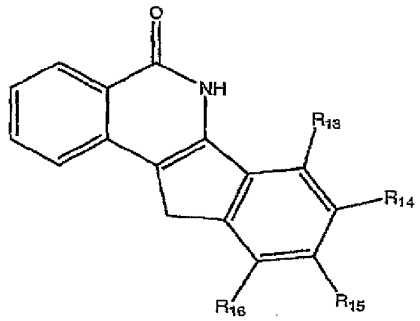
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３４】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１７】

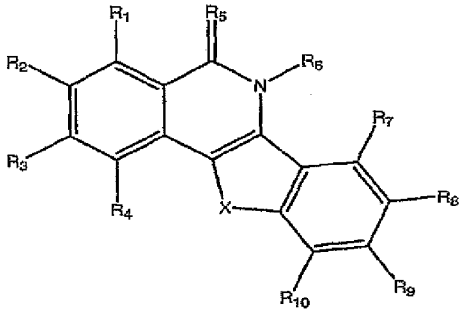


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３５】
有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は薬学上許容可能な化合物の塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１８】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

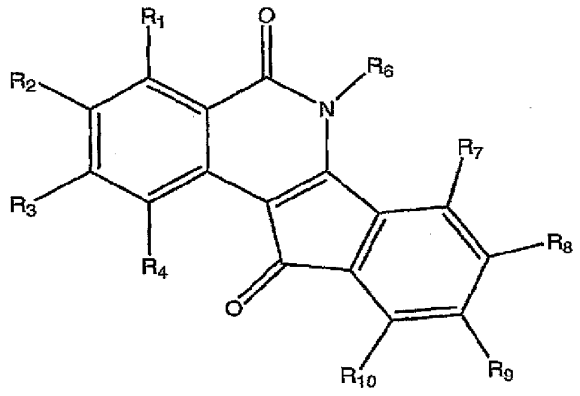
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項３６】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１９】



(II)

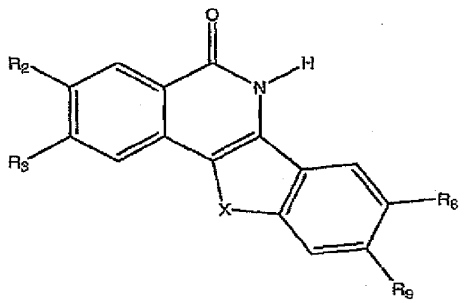
式中、
R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；
Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は

一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３７】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２０】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－C_1～C_5のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

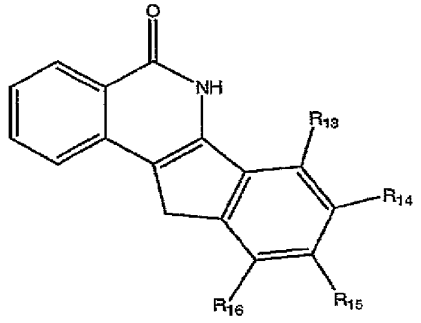
Ｂは、－C_1～C_5のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３８】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２１】

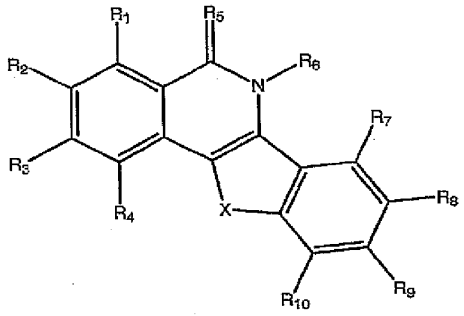


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３９】
有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２２】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

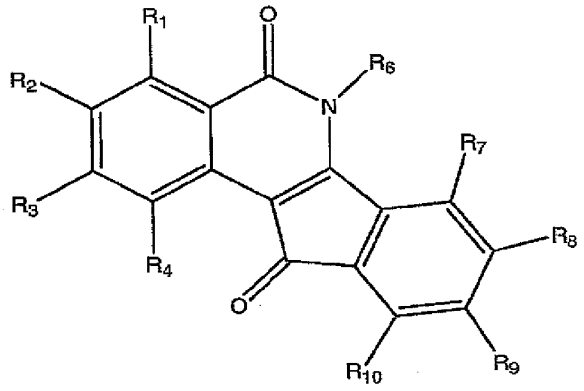
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項４０】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２３】



(III)

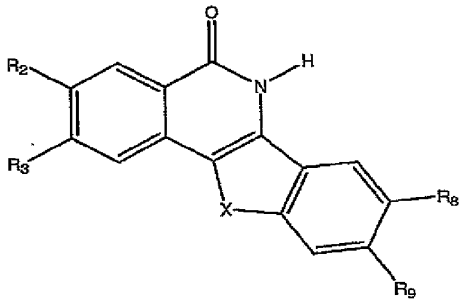
式中、
R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；
Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４１】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２４】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

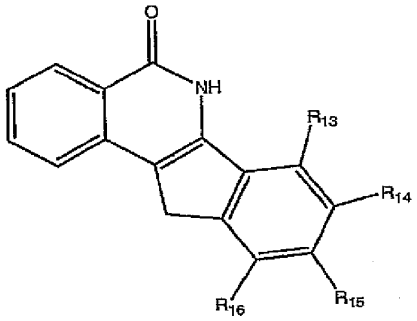
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４２】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２５】

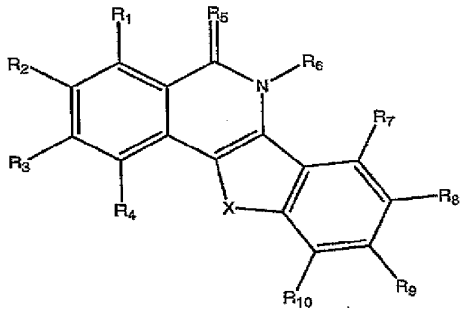


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項４３】
有効量の、式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２６】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、Ｒ

R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

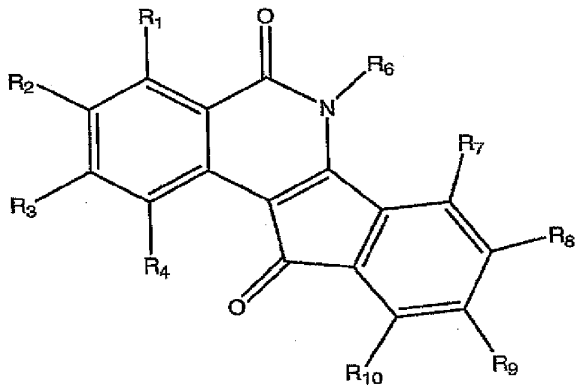
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項４４】

有効量の、式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２７】



(III)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

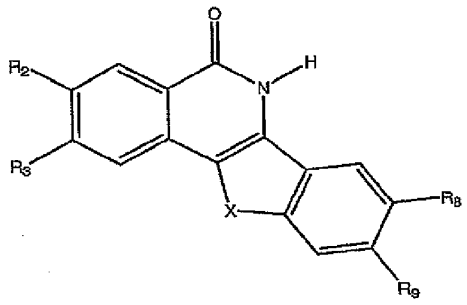
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４５】

有効量の、式（ＩＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２８】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

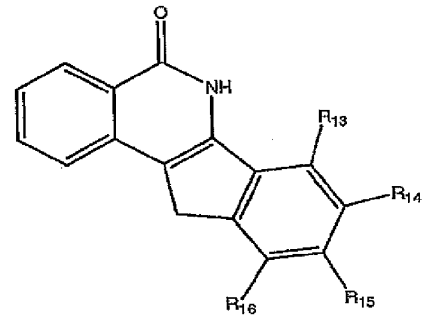
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４６】

有効量の、式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２９】



(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項４７】
血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４３に記載の方法。

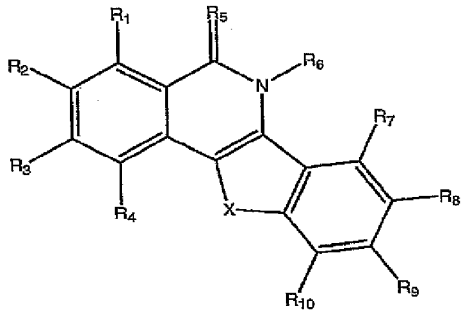
【請求項４８】
血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４４に記載の方法。

【請求項４９】
血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４５に記載の方法。

【請求項５０】
血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４６に記載の方法。

【請求項５１】
有効量の、式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３０】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Ｚ

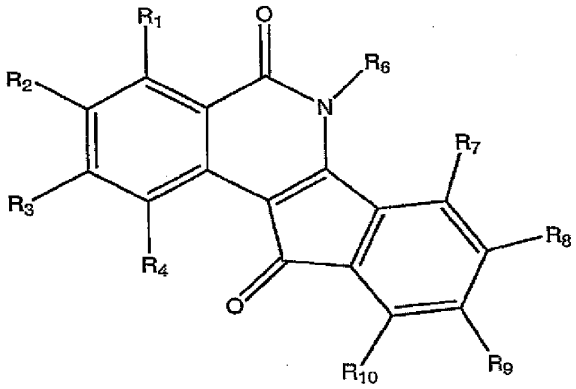
$_3$及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項５２】

有効量の、式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３１】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環

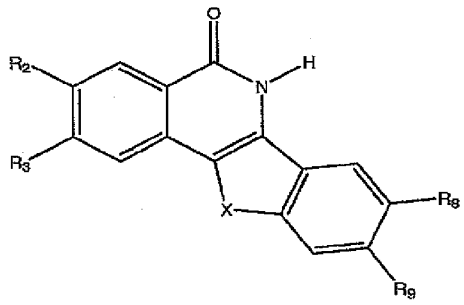
式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項５３】

有効量の、式（ＩＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３２】



(III)

式中、

Ｘは、－CH_2－又は－Ｏ－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－ＣＯＮH_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－C_1～C_5のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

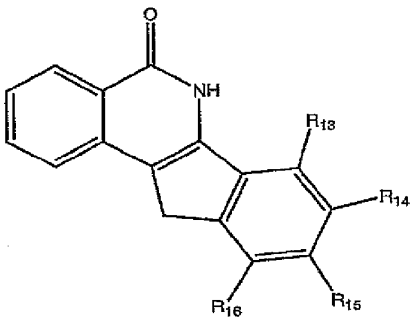
Ｂは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項５４】

有効量の、式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

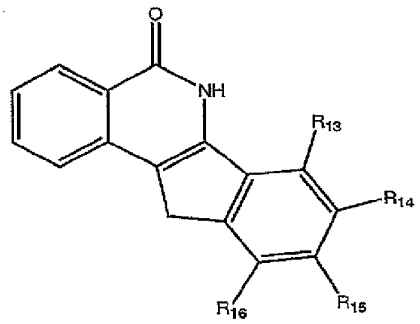
【化３３】



(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項５５】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５１に記載の方法。
【請求項５６】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５２に記載の方法。
【請求項５７】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５３に記載の方法。
【請求項５８】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５４に記載の方法。
【請求項５９】
式（ＩＶ）の化合物又は薬学上許容可能なその塩。
【化３４】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項６０】
R_{14}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、且つR_{13}、R_{15}及びR_{16}がそれぞれ水素である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６１】
R_{15}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、且つR_{13}、R_{14}及びR_{16}がそれぞれ水素である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６２】
ｎが１である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６３】
ｎが２である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６４】
ｎが３である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６５】
ｎが４である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６６】
ｎが５である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６７】
生理学的に許容可能なキャリア又はビヒクル及び有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を含む組成物。

【請求項６８】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、再潅流傷害を治療する方法。

【請求項６９】
再潅流傷害が、脳卒中又は心筋梗塞である請求項６８に記載の方法。

【請求項７０】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、炎症性疾患を治療する方法。

【請求項７１】
炎症性疾患が、関節の炎症性疾患、歯肉の慢性炎症性疾患、炎症性腸疾患、炎症性肺疾患、中枢神経系の炎症性疾患、目の炎症性疾患、グラム陽性のショック、グラム陰性のショック、出血性ショック、アナフィラキシー性ショック、外傷性ショック又は化学療法のショックである請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、糖尿病及び糖尿病合併症を治療する方法。

【請求項７３】
糖尿病が、Ｉ型糖尿病又はＩＩ型糖尿病である請求項７２に記載の方法。

【請求項７４】

有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、虚血性の症状を治療する方法。

【請求項７５】

虚血性の症状が、心筋虚血、安定狭心症、不安定狭心症、脳卒中、虚血性心疾患又は脳虚血である請求項７４に記載の方法。

【請求項７６】

有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害を治療する方法。

【請求項７７】

有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、パーキンソン病を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、イソキノリン誘導体、有効量のイソキノリン誘導体を含む組成物、及び必要に応じて有効量のイソキノリン誘導体を動物に投与することを含む、炎症性疾患、再潅流傷害、虚血性症状、腎不全、糖尿病、糖尿病合併症、循環器疾患以外の血管系疾患、循環器疾患、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害、パーキンソン病、又は癌を治療する又は予防する方法に関する。

【０００２】

本出願は、２００４年２月２６日出願された米国特許仮出願第６０／５４７，８９９号の恩典を主張し、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。

【背景技術】

【０００３】

たとえば、関節炎、大腸炎及び自己免疫性糖尿病のような炎症性疾患は通常、たとえば、脳卒中や心臓発作のような再潅流傷害に関連するものとははっきり異なった障害として表れ、臨床的に異なった存在として表すことができる。しかしながら、これら２つの障害の間には共通する基礎を成すメカニズムが存在しうる。特に、炎症性疾患及び再潅流傷害は、炎症誘発性サイトカイン及びケモカインの合成を誘導し、それは、次には、たとえば、一酸化窒素及びスーパーオキシドのような細胞傷害性の遊離ラジカルを結果として生じる。ＮＯとスーパーオキシドが反応してペルオキシ亜硝酸（ＯＮＯＯ$^-$）を形成することがある（非特許文献１）。

【０００４】

炎症性疾患及び再潅流傷害で認められるＯＮＯＯ$^-$が誘導する細胞壊死には、核内酵素、ポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素（ＰＡＲＳ）の活性化が関与する。ＰＡＲＳの活性化は、炎症性疾患及び再潅流傷害で認められる細胞介在性の死における重要な工程であると考えられる（非特許文献２）。

【０００５】

多数のＰＡＲＳ阻害剤が当該技術で記載されている。たとえば、非特許文献３及び非特許文献４～９、特許文献１～１１を参照のこと。ＰＡＲＳ阻害剤の投与に関連する有害な影響は、非特許文献１０で議論されている。

【０００６】

イソキノリン化合物は当該技術で以前議論されている。たとえば、細胞傷害性の非カンプトセシントポイソメラーゼＩ阻害剤は、非特許文献１１，１２で報告されており、インデノ[１，２－ｃ]イソキノリン類は、抗癌剤として特許文献１２及び腫瘍阻害剤として特許文献１３に報告されている。

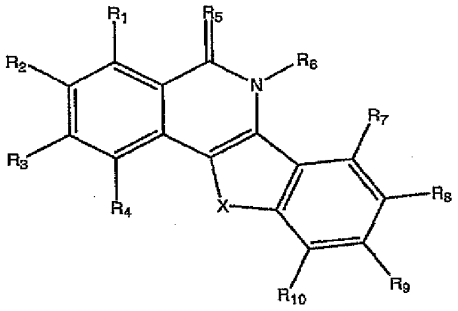
【０００７】

イソキノリン化合物の合成は報告されている（たとえば、非特許文献１３～１７を参照）。

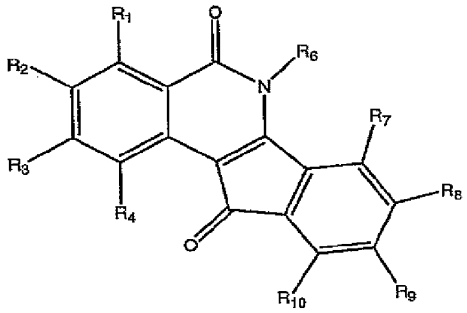
【特許文献１】国際公開第ＷＯ００／３９１０４号
【特許文献２】国際公開第ＷＯ００／３９０７０号
【特許文献３】国際公開第ＷＯ９９／５９９７５号
【特許文献４】国際公開第ＷＯ９９／５９９７３号
【特許文献５】国際公開第ＷＯ９９／１１６４９号
【特許文献６】国際公開第ＷＯ９９／１１６４５号
【特許文献７】国際公開第ＷＯ９９／１１６４４号
【特許文献８】国際公開第ＷＯ９９／１１６２８号
【特許文献９】国際公開第ＷＯ９９／１１６２３号
【特許文献１０】国際公開第ＷＯ９９／１１３１１号
【特許文献１１】国際公開第ＷＯ００／４２０４０号
【特許文献１２】国際公開第ＷＯ００／２１５３７号、クッシュマン（Ｃｕｓｈｍａｎ）等
【特許文献１３】国際公開第ＷＯ９３／０５０２３号、ハーバタ（Ｈｒｂａｔａ）等
【特許文献１４】米国特許第５，２６２，５６４号
【特許文献１５】米国特許第３，７１０，７９５号
【非特許文献１】ゼィボー（Ｓｚａｂｏ）等、Ｓｈｏｃｋ　第６巻、７９～８８ページ（１９９６年）
【非特許文献２】ゼィボー（Szabo）等、Trends Pharmacol. Sci.　第１９巻、２８７～２９８ページ（１９９８年）
【非特許文献３】バナジック（Banasik）等、J. Biol. Chem 第２６７巻、１５６９～１５７５ページ（１９９２年）
【非特許文献４】バナジック（Banasik）等、Mol Cell. Biochem 第１３８巻、１８５～１９７ページ（１９９４年）
【非特許文献５】ザング（Zhang）等、Biochem Biophys. Res. Commun. 第２７８巻、５９０～５９８ページ（２０００年）
【非特許文献６】ホワイト（White）等、J. Med. Chem 第４３巻、４０８４～４０９７ページ（２０００年）
【非特許文献７】グリフィン（Griffin）等、J. Med. Chem 第４１巻、５２４７～５２５６ページ（１９９８年）
【非特許文献８】シンクィン（Shinkwin）等、Bio org. Med. Chem 第７巻、２９７～３０８ページ（１９９９年）
【非特許文献９】ソリアーノ（Soriano）等、Nature Medicine 第７巻、１０８～１１３ページ（２００１年）
【非特許文献１０】ミラン（Milan）等、Science　第２２３巻、５８９～５９１ページ（１９８４年）
【非特許文献１１】クッシュマン（Cushman）等、J. Med. Chem 第４３巻、３６８８～３６９８ページ（２００３年）
【非特許文献１２】クッシュマン（Cushman）等、J. Med. Chem 第４２巻、４４６～４５７ページ（１９９９年）
【非特許文献１３】ワウゾネック（Wawzonek）等、Org. Prep. Proc. Int. 第１４巻、１６３～１６８ページ（１９８２年）
【非特許文献１４】ワウゾネック（Wawzonek）等、Can J. Chem 第５９巻、２８３３ページ（１９８１年）
【非特許文献１５】アンドイ（Andoi）等、Bull. Chem Soc. Japan，第４７巻、１０１４～１０１７ページ（１９７４年）
【非特許文献１６】ドゥーズマンド（Dusemund）等、Arch. Pharm （Weinheim Ger），第３巻１７、３８１～３８２ページ（１９８４年）
【非特許文献１７】ラル（Lal）等、Indian J. Chem, Sect. B, ３８Ｂ、３３～３９ページ（１９９９年）

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
しかしながら、炎症性疾患、再潅流傷害、虚血性症状、腎不全、糖尿病、糖尿病合併症、循環器疾患以外の血管系疾患、又は癌を治療する又は予防するのに有用な化合物に対する当該技術における二ーズは残されたままである。
【０００９】
本出願の背景技術の項目における参考文献の引用は、参考文献が従来技術であるという承認ではない。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
従って、一実施形態では、本発明は、以下で述べるような式Ｉ、式ＩＩ、式ＩＩＩ、式ＩＶの化合物又は薬学上許容可能なその塩（「イソキノリン誘導体」）に関する。イソキノリン誘導体は、炎症性疾患、再潅流傷害、虚血性症状、腎不全、糖尿病、糖尿病合併症、循環器疾患以外の血管系疾患、循環器疾患、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害、パーキンソン病、又は癌（それぞれ「症状」であること）を治療する又は予防するのに有用である。
【００１１】
また、有効量のイソキノリン誘導体及び薬学上許容可能なキャリア又はビヒクルを含む組成物が提供される。
また、本発明によって、そのような治療又は予防の必要に応じて動物に、有効量のイソキノリン誘導体を投与することを含む、症状を治療する又は予防する方法が提供される。
【００１２】

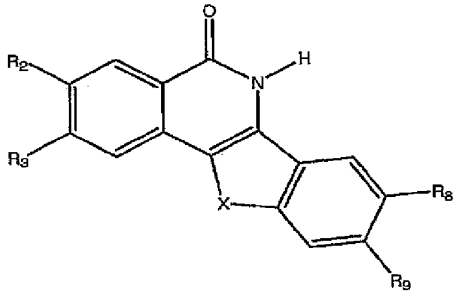
【化１】



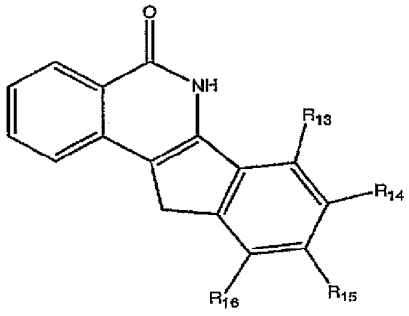
(I)



(II)



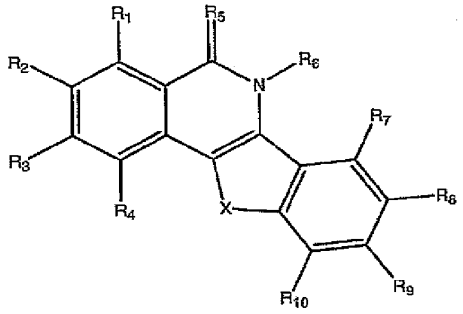
(III)



(IV)

【００１３】

本発明の詳細は、以下に続く説明で述べられる。
本明細書に記載されるものに類似した又はそれと同等のいかなる方法及び材料も本発明の実践又は試験において使用することができるが、今や、例示となる方法及び材料が記載される。本発明のそのほかの特徴、目的及び利点は、以下の説明及び請求項から明白になるであろう。本明細書で引用される参考文献はすべて参照によって組み入れられる。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１４】
本発明は、以下の式Ｉ、式ＩＩ、式ＩＩＩ及び式ＩＶに従ったイソキノリン誘導体及び薬学上許容可能なその塩を提供する。
【００１５】
【化２】



(I)

【００１６】
式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、

－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－C（O）OH、－C_1～C_5のアルキレン－C（O）O－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－OC（O）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－O－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C（O）OH、－C（O）O（C_1～C_5アルキル）、－OC（O）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－A－Bであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【００１７】

実施態様の１つでは、Xは－C（O）－、－CH_2－、－CH（ハロ）－、－CH（OH）－（CH_2）$_n$－、－CH（OH）、－CH（－アリール）－、－O－、－NH－、－S－、又は－CH（$NR_{11}R_{12}$）－であり、その際、ｎは０～５の整数である。

【００１８】

実施態様の１つでは、R^5はＯである。

別の実施態様では、R^5はＳである。

さらなる実施態様では、R^5はＮＨである。

【００１９】

別の実施態様では、Xは－N（SO_2Y）－である。

実施態様の１つでは、Aは－SO_2－又は－SO_2NH－である。

別の実施態様では、Bは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（O）－置換のアリール、－C（O）OH、－C（O）O－（C_1～C_5のアルキル）、又は－C（O）O－フェニルであり、－NZ_1Z_2、－C（O）OH又は－C（NH）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－O－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－C_1～C_5のアルキレン－C（O）O－C_1～C_5のアルキル、又は－C_1～C_5のアルキレン－OC（O）－C_1～C_5のアルキルの１以上で置換される。

【００２０】

別の実施態様では、R_1～R_4は水素である。

さらなる実施態様では、R_1、R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は水素以外である。

【００２１】

実施態様の１つでは、R_7～R_{10}は、－NHC（O）－（CH_2）$_n$－OAc又はNHC（O）－（CH_2）$_n$－OHである。

他の例示となる実施態様では、式Ｉの化合物中のR^5及びXは、以下に述べるとおりである。

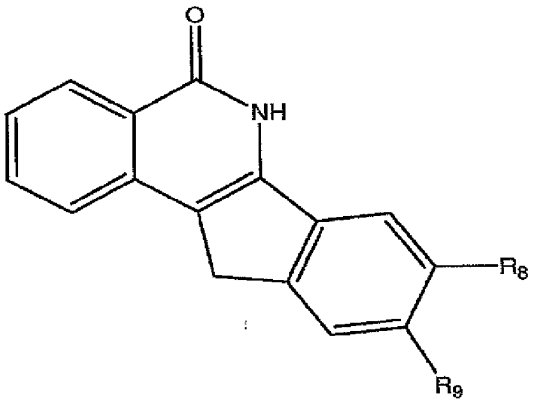
【００２２】

【表１】

R^5	X
NH	-C(O)-
NH	$-CH_2-$
NH	-CH(halo)-
NH	$-CH(OH)CH_2)_n-$
NH	-CH(OH)-
NH	-CH(-aryl)-
NH	-O-
NH	-NH-
NH	-S-
NH	$-CH(NR^{11}R^{12})-$
NH	$-N(SO_2Y)-$
S	-C(O)-
S	$-CH_2-$
S	-CH(halo)-
S	$-CH(OH)(CH_2)_n-$
S	-CH(OH)-
S	-CH(-aryl)-
S	-O-
S	-NH-
S	-S-
S	$-CH(NR^{11}R^{12})-$
O	$-N(SO_2Y)-$
O	-C(O)-

R^5	X
O	$-CH_2-$
O	-CH(halo)-
O	$-CH(OH)(CH_2)_n-$
O	-CH(OH)-
O	-CH(-aryl)-
O	-O-
O	-NH-
O	-S-
O	$-CH(NR^{11}R^{12})-$
O	$-N(SO_2Y)-$

【００２３】
別の実施態様では、式（Ｉ）の化合物は、式（Ｉａ）を有する
【００２４】
【化３】



(Ia)

【００２５】
式中、R_8及びR_9は、式Ｉと同義である。
実施態様の１つでは、式（Ｉａ）の化合物は、R_8が－Ｈ、R_9が－Ａ－Ｂであり、Ａが－SO_2－及びＢが－NZ_1Z_2又は－（C_1～C_5アルキレン）NZ_1Z_2であるようなものである。
【００２６】
式（Ｉａ）の化合物の例示となる例は、以下に述べられる：
【００２７】

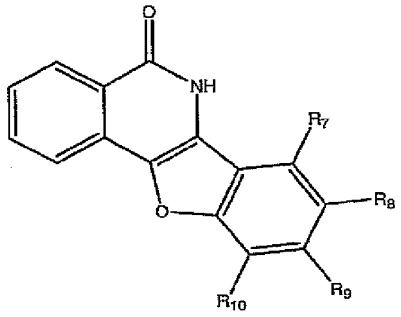
【表２】

化合物	R_8	R_9
43	-H	$-NHC(O)CH_2N(CH_3)_2$
44	-H	$-SO_2NH(CH_2)_3$-(morpholin-4-yl)
45	$-NHC(O)CH_2N(CH_3)_2$	-H
46	$-SO_2NH(CH_2)_3$-(morpholin-4-yl)	-H
97	$-NO_2$	-H
98	-H	$-NO_2$
99	-F	-H
100	-H	-F
101	$-NH_2$	-H
102	-H	$-NH_2$
103	-H	$-NHCOCH_2OAc$
104	-H	$-NHCOCH_2OH$
105	-H	-NHCONH-n-propyl
106	-H	$-SO_2NH(CH_2)_3$-phenyl
107	-F	$-SO_2NH(CH_2)_3$-morpholine
108	-F	$-SO_2NH$-morpholine
109	-F	$-SO_2$-imidazole
110	-H	$-SO_3Na$
111	$-SO_3Na$	-H

【００２８】
及び薬学上許容可能なその塩である。
別の実施態様では、式（Ｉ）の化合物は式（Ｉｂ）を有し
【００２９】

OnCusp
Ex. 1002

【化４】



(Ib)

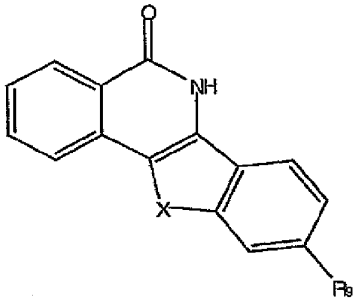
【００３０】
式中、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は式（Ｉ）と同義である。
式（Ｉｂ）の化合物の例示となる例は、以下に述べられる：
【００３１】

【表３】

化合物	R_7	R_8	R_9	R_{10}
22a	-H	-H	-H	-H
22b	-H	-OMe	-H	-H
22c	-H	-H	-OMe	-H
22d	-H	-H	-H	-OMe
22e	-H	-Me	-H	-H
22f	-H	-COOH	-H	-H
22g	-H	-H	-COOH	-H
23a	-H	-OH	-H	-H
23b	-H	-H	-OH	-H
23c	-H	-H	-H	-OH
25a	-H	-H	$-(CH_2)_4OH$	-H
25b	-H	-H	$-(CH_2)_5OH$	-H
25c	-H	-H	$-(CH_2)_6OH$	-H
25d	-H	-H	$-(CH_2)_4COOH$	-H
25e	-H	-H	$-(CH_2)_5COOH$	-H
26a	-H	$-C(O)NH(CH_2)_3$-(morpholin-1-yl)	-H	-H
26b	-H	$-C(O)NH(CH_2)_2-COOH$	-H	-H
26c	-H	$-C(O)NH(CH_2)_3$-*N*-(1,3-imidazole)	-H	-H
26d	-H	$-C(O)NH(CH_2)_2-NMe_2$	-H	-H
26e	-H	-H	$-SO_3Na$	-H
26f	-H	$-SO_3Na$	-H	-H

【００３２】
及び薬学上許容可能なその塩である。
別の実施態様では、式（Ｉ）の化合物は式（Ｉｃ）を有し
【００３３】

【化５】

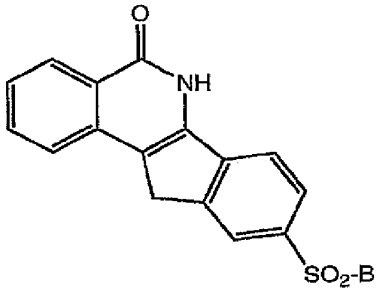


(Ic)

【００３４】
式中、Ｘ及びＲ９は式（Ｉ）と同義である。
式（Ｉｃ）の化合物の例示となる例は、以下に述べられる：
【００３５】
【表４】

化合物	X	R_9
34	-N(SO_3H)-	-SO_3H
35a	-N(SO_2NH_2)-	-SO_2NH_2
35b	-N[$SO_2NH(CH_2)_3$-(morpholin-4-yl)]-	-$SO_2NH(CH_2)_3$-(morpholin-4-yl)
40a	-S-	-H

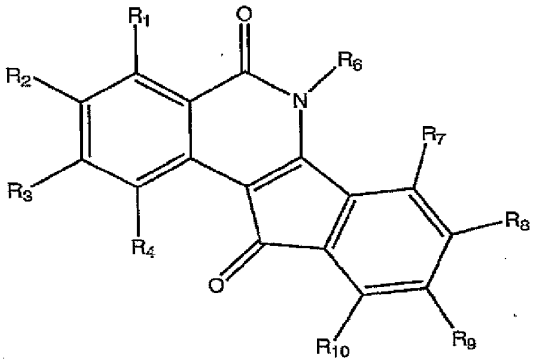
【００３６】
及び薬学上許容可能なその塩である。
別の実施態様では、式（Ｉ）の化合物は式（Ｉｄ）を有し
【００３７】
【化６】



(Id)

【００３８】

式中、Ｂは式（Ｉ）の化合物と同義である。
実施態様の１つでは、Ｂは、－ＮＨ$_2$又は－ＯＨで置換された－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキレン）－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$又は－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキレン）である。
【００３９】
本発明はまた、式ＩＩの化合物及び薬学上許容可能なその塩に関するものであり、
【００４０】
【化７】



(II)

【００４１】
式中、
Ｒ$_6$は、－Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；
Ｒ$_1$は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ’－Ｂ’であり；
Ａ’は、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂ’は、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり；
Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－ＣＨ$_2$－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（

Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－$ＮＺ_{1}Ｚ_{2}$であり；

$Ｚ_{1}$及び$Ｚ_{2}$は、独立して、－Ｈ又は－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（$Ｚ_{3}$）（$Ｚ_{4}$）の１以上で置換され、その際、$Ｚ_{3}$及び$Ｚ_{4}$は独立して－Ｈ又は－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－$ＮＨ_{2}$の１以上で置換され、或いは、$Ｚ_{3}$及び$Ｚ_{4}$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、$Ｚ_{1}$及び$Ｚ_{2}$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【００４２】

実施態様の１つでは、Ｂは、窒素含有の３～７員環の単環式複素環である。

さらに別の実施態様では、$Ｒ_{1}$は、－水素、－ハロ、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$のアルキル、－ハロ置換の$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{10}$のアルケニル、－$Ｃ_{3}$～$Ｃ_{8}$の単環式シクロアルキル、－アリール、－$ＮＨ_{2}$、－アミノ置換の$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$アルキル）、－$ＮＯ_{2}$又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－$ＳＯ_{2}$－、－$ＳＯ_{2}ＮＨ$－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル）－、－ＮＨ－、－$ＣＨ_{2}$－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$のアルキル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－$Ｃ_{3}$～$Ｃ_{8}$の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換の$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル－（－３～７員環の単環式複素環）、－$Ｈ_{2}$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は$ＮＺ_{1}Ｚ_{2}$である。

【００４３】

さらなる実施態様では、$Ｒ_{1}$、$Ｒ_{2}$、$Ｒ_{3}$、$Ｒ_{4}$、$Ｒ_{7}$、$Ｒ_{8}$、$Ｒ_{9}$及び$Ｒ_{10}$の少なくとも１つが水素ではない。

別の実施態様では、$Ｒ_{2}$、$Ｒ_{4}$及び$Ｒ_{10}$の少なくとも１つが水素ではない。

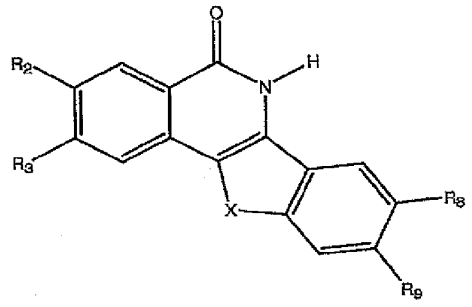
【００４４】

実施態様の１つでは、Ａは－ＣＯＮＨ－以外である。

本発明はまた、式ＩＩＩの化合物及び薬学上許容可能なその塩に関するものであり、

【００４５】

【化８】



(III)

【００４６】

式中、

Ｘは、－$ＣＨ_{2}$－又は－Ｏ－であり；

$Ｒ_{2}$及び$Ｒ_{3}$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換された$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル）、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル、－$ＮＯ_{2}$、－$ＮＨ_{2}$、－$ＣＯＮＨ_{2}$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$のアルキル又は－

Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキルであり；
Ｒ$_{8}$及びＲ$_{9}$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、
Ａは、－ＳＯ$_{2}$－、－ＳＯ$_{2}$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；
Ｂは、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキル、－ＮＺ$_{1}$Ｚ$_{2}$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ
Ｚ$_{1}$及びＺ$_{2}$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_{3}$）（Ｚ$_{4}$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_{3}$及びＺ$_{4}$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_{2}$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_{3}$及びＺ$_{4}$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_{1}$及びＺ$_{2}$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【００４７】

実施態様の１つでは、Ｘは－ＣＨ$_{2}$－である。
別の実施態様では、Ｘは－Ｏ－である。
実施態様の１つでは、Ｒ$_{8}$は水素であり、Ｒ$_{9}$は－Ａ－Ｂである。

【００４８】

別の実施態様では、Ｒ$_{8}$は－Ａ－Ｂであり、Ｒ$_{9}$は水素である。
実施態様の１つでは、Ｒ$_{8}$は水素であり、Ｒ$_{9}$は－Ａ－Ｂであるか、又はＲ$_{8}$は－Ａ－Ｂであり、Ｒ$_{9}$は水素であるのいずれかである。

【００４９】

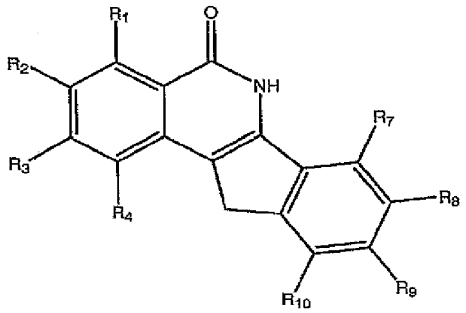
さらに別の実施態様では、Ｒ$_{2}$、Ｒ$_{3}$及びＲ$_{8}$は水素であり、Ｒ$_{9}$は、Ａが－ＳＯ$_{2}$－又は－ＳＯ$_{2}$－ＮＨ－である－Ａ－Ｂである。
さらなる実施態様では、Ｒ$_{2}$、Ｒ$_{3}$、Ｒ$_{8}$及びＲ$_{9}$の少なくとも１つは水素ではない。

【００５０】

本発明はさらに、式１３の化合物及び薬学上許容可能なその塩に関するものであり、

【００５１】

【化９】



13

【００５２】

式中、
Ｒ$_{1}$、Ｒ$_{2}$、Ｒ$_{3}$、Ｒ$_{4}$、Ｒ$_{7}$、Ｒ$_{8}$、Ｒ$_{9}$及びＲ$_{10}$は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキル），－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキル、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_{3}$～Ｃ$_{8}$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_{2}$、－アミノ置換のＣ$_{1}$～Ｃ$_{5}$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）

ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－ＣＨ$_2$－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン）－ＮＺ$_1$，Ｚ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）ＮＨ$_2$であり、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）ＮＨ$_2$以外のそれぞれが、置換されないか、又は－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【００５３】

実施態様の１つでは、Ｒ$_9$は－Ａ－Ｂであり、その際、Ａは－ＳＯ$_2$－又は－ＳＯ$_2$－ＮＨ－である。

別の実施態様では、Ｒ$_1$～Ｒ$_4$はそれぞれ水素である。

【００５４】

さらなる実施態様では、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$の少なくとも１つは水素以外である。

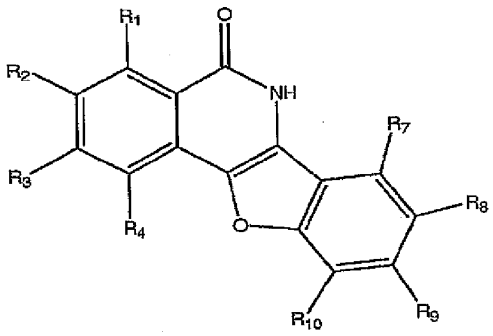
実施態様の１つでは、Ａは－ＣＯＮＨ－以外である。

【００５５】

本発明はさらにその上、式２２の化合物及び薬学上許容可能なその塩に関するものであり、

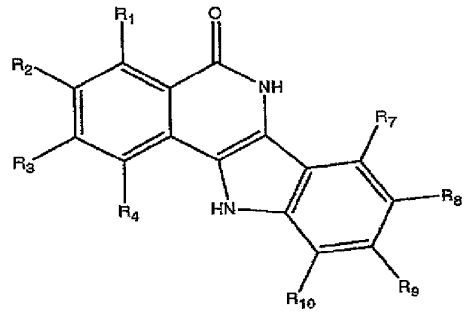
【００５６】

【化１０】



22

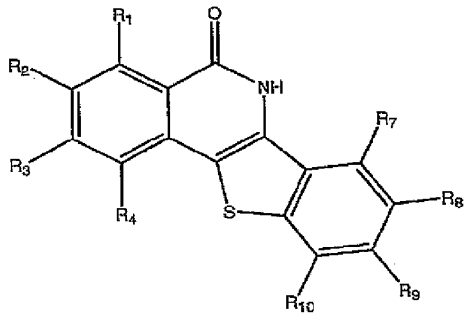
【００５７】
式中、
R_1～R_4及びR_7～R_{10}は式１３と同義である。
実施態様の１つでは、R_9は－Ａ－Ｂであり、その際、Ａは－SO_2－又は－SO_2－ＮＨ－である。
【００５８】
別の実施態様では、R_1～R_4はそれぞれ水素である。
さらなる実施態様では、R_1、R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つは水素以外である。
【００５９】
本発明はさらにその上、式３７の化合物及び薬学上許容可能なその塩に関するものであり、
【００６０】
【化１１】



37

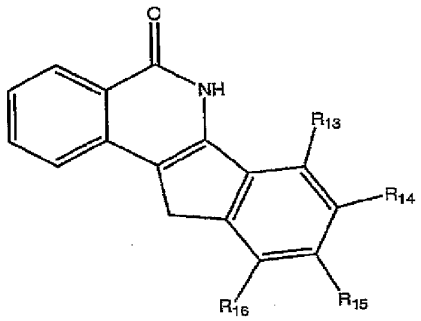
【００６１】
式中、
R_1～R_4及びR_7～R_{10}は式１３と同義である。
実施態様の１つでは、R_1～R_4はそれぞれ水素である。
【００６２】
別の実施態様では、R_9は－Ａ－Ｂであり、その際、Ａは－SO_2－又は－SO_2－ＮＨ－である。
さらなる実施態様では、R_1、R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つは水素以外である。
【００６３】
本発明はまた、式４０の化合物及び薬学上許容可能なその塩に関するものであり、
【００６４】

【化１２】



40

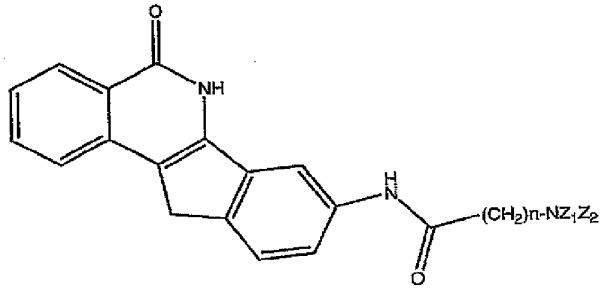
【００６５】
式中、
R_1～R_4及びR_7～R_{10}は式１３と同義である。
実施態様の１つでは、R_1～R_4はそれぞれ水素である。
【００６６】
実施態様の１つでは、R_9は－Ａ－Ｂであり、その際、Ａは－SO_2－又は－SO_2－ＮＨ－である。
さらなる実施態様では、R_1、R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つは水素以外である。
【００６７】
本発明はさらに、式ＩＶの化合物及び薬学上許容可能なその塩に関するものであり、
【００６８】
【化１３】



(IV)

【００６９】
式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

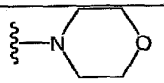
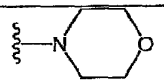
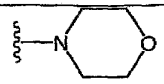
は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。
【００７０】
実施態様の１つでは、R_{14}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、R_{13}、R_{15}及びR_{16}がそれぞれ水素である。
実施態様の１つでは、R_{15}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、R_{13}、R_{14}及びR_{16}がそれぞれ水素である。
【００７１】
実施態様の１つでは、ｎは１である。
別の実施態様では、ｎは２である。
別の実施態様では、ｎは３である。
【００７２】
実施態様の１つでは、ｎは４である。
別の実施態様では、ｎは５である。
式（ＩＶ）の化合物の例示となる例には、式（ＩＶａ）の化合物
【００７３】
【化１４】



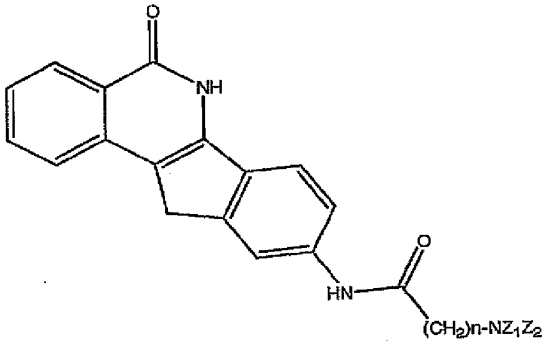
(IVa)

【００７４】
及び薬学上許容可能なその塩が挙げられる。
実施態様の１つでは、式（ＩＶａ）の化合物は、
【００７５】

【表５】

化合物	n	$-NZ_1Z_2$
57	2	$-N(CH_3)_2$
58	3	$-N(CH_3)_2$
59	4	$-N(CH_3)_2$
60	5	$-N(CH_3)_2$
61	1	
62	2	
63	3	
64	4	
65	5	

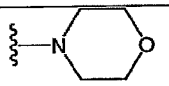
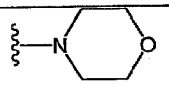
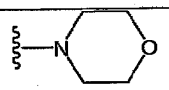
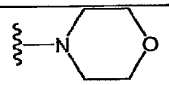
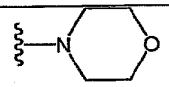
【００７６】
であり、又は薬学上許容可能なその塩である。
式（ＩＶ）の化合物の例示となる例には、式（ＩＶｂ）の化合物
【００７７】
【化１５】



(IVb)

【００７８】
及び薬学上許容可能なその塩が挙げられる。
実施態様の１つでは、式（ＩＶｂ）の化合物は、
【００７９】

【表６】

化合物	n	$-NZ_1Z_2$
67	2	$-N(CH_3)_2$
68	3	$-N(CH_3)_2$
69	4	$-N(CH_3)_2$
70	5	$-N(CH_3)_2$
71	1	
72	2	
73	3	
74	4	
75	5	

【００８０】
であり、又は薬学上許容可能なその塩である。
式（ＩＶ）の追加的例示となる化合物には、上記化合物４３、４５及び９７～１０９並び薬学上許容可能なその塩が挙げられる。
（定義）
イソキノリン誘導体と関連して以下の定義を使用する。
【００８１】
「C_1～C_5のアルキル」は、１～５の炭素原子を含有する直鎖又は分枝鎖の飽和炭化水素を言う。C_1～C_5のアルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル及びｔｅｒｔブチル、イソペンチル及びネオペンチルが挙げられるが、これらに限定されない。
【００８２】
「C_1～C_8のアルキル」は、１～８の炭素原子を含有する直鎖又は分枝鎖の飽和炭化水素を言う。C_1～C_8のアルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル及びｔｅｒｔブチル、イソペンチル、ネオペンチル、イソヘキシル、イソヘプチル及びイソオクチルが挙げられるが、これらに限定されない。
【００８３】
「C_1～C_{10}のアルキル」は、１～１０の炭素原子を含有する直鎖又は分枝鎖の飽和炭化水素を言う。C_1～C_{10}のアルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル及びｔｅｒｔ－ブチル、イソペンチル、ネオペンチル、イソヘキシル、イソヘプチル、イソオクチル、イソノニル及びイソデシルが挙げられるが、これらに限定されない。
【００８４】

「C_2～C_{10}のアルケニル」は、２～１０の炭素原子及び少なくとも１つの二重結合を含有する直鎖又は分枝鎖の不飽和炭化水素を言う。C_2～C_{10}のアルケニル基の例には、エチレン、プロピレン、１－ブチレン、２－ブチレン、イソブチレン、ｓｅｃ－ブチレン、１－ペンテン、２－ペンテン、イソペンテン、１－ヘキセン、２－ヘキセン、３－ヘキセン、イソヘキセン、１－ヘプテン、２－ヘプテン、３－ヘプテン、１－オクテン、２－オクテン、３－オクテン、４－オクテン、１－ノネン、２－ノネン、３－ノネン、４－ノネン、１－デセン、２－デセン、３－デセン、４－デセン及び５－デセンが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８５】

「C_2～C_{10}のアルキニル」は、２～１０の炭素原子及び少なくとも１つの三重結合を含有する直鎖又は分枝鎖の不飽和炭化水素を言う。C_2～C_{10}のアルキニル基の例には、アセチレン、プロピン、１－ブチン、２－ブチン、イソブチン、ｓｅｃ－ブチン、１－ペンチン、２－ペンチン、イソペンチン、１－ヘキシン、２－ヘキシン、３－ヘキシン、イソヘキシン、１－ヘプチン、２－ヘプチン、３－ヘプチン、１－オクチン、２－オクチン、３－オクチン、４－オクチン、１－ノニン、２－ノニン、３－ノニン、４－ノニン、１－デシン、２－デシン、３－デシン、４－デシン及び５－デシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８６】

「C_1～C_5のアルキレン」は、C_1～C_5のアルキル基の水素原子の１つが結合で置き換えられたC_1～C_5のアルキル基を言う。C_1～C_5のアルキレン基の例には、－CH_2－，－CH_2CH_2－，－$CH_2CH_2CH_2$－，－$CH_2CH_2CH_2CH_2$－、及び－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$－が挙げられる。

【００８７】

「ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル」は、C_1～C_5のアルキル基の水素原子の１以上が－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ又は－Ｉで置き換えられた上で定義したようなC_1～C_5のアルキル基を言う。アルキルハロ基の代表例には、－CH_2F、－CCl_3、－CF_3、－CH_2Cl、－CH_2CH_2Br、－CH_2CH_2I、－$CH_2CH_2CH_2F$、－$CH_2CH_2CH_2Cl$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2Br$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2I$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2Br$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2I$、－$CH_2CH(Br)CH_3$、－$CH_2CH(Cl)CH_2CH_3$、－$CH(F)CH_2CH_3$、及び-$C(CH_3)_2(CH_2Cl)$が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８８】

「アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル」は、C_1～C_5のアルキル基の水素原子の１以上が－NH_2で置き換えられた上で定義したようなC_1～C_5のアルキル基を言う。アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル基の代表例には、－CH_2NH_2、－$CH_2CH_2NH_2$、－$CH_2CH_2CH_2NH_2$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、－$CH_2CH(NH_2)CH_3$、－$CH_2CH(NH_2)CH_2CH_3$、－$CH(NH_2)CH_2CH_3$、及び－$C(CH_3)_2(CH_2NH_2)$が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８９】

「アリール」は、フェニル基又はピリジル基を言う。アリール基の例には、フェニル、Ｎ－ピリジル、２－ピリジル、３－ピリジル、及び４－ピリジルが挙げられるが、これらに限定されない。アリール基は置換することができないか、又は以下の基：－C_1～C_5のアルキル、ハロ、ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－Ｏ－C_1～C_5のアルキル、$N(R^a)_2$、－ＣＯＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）NH_2又は－NO_2の１以上で置換することができ、その際、R^aの各存在は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルである。

【００９０】

「NH_2C（Ｏ）置換されたアリール」は、アリール基の水素原子の１つが、１以上の－Ｃ（Ｏ）NH_2基で置き換えられた上で定義したようなアリール基を言う。NH_2C（

Ｏ）置換されたアリール基の代表例には、２－Ｃ（Ｏ）NH_2－フェニル、３－Ｃ（Ｏ）NH_2－フェニル、４－Ｃ（Ｏ）NH_2－フェニル、２－Ｃ（Ｏ）NH_2－ピリジル、３－Ｃ（Ｏ）NH_2－ピリジル及び４－Ｃ（Ｏ）NH_2－ピリジルが挙げられる。

【００９１】

「－（C_1～C_5のアルキル）－３～７員環の単環式複素環」は、C_1～C_5のアルキル基の水素原子の１つが、－３～７員環の単環式複素環で置き換えられた上で定義したようなC_1～C_5のアルキル基を言う。－（C_1～C_5のアルキル）－（３～７員環の単環式複素環）基の代表例には、－CH_2CH_2－モルフォリン、－CH_2CH_2－ピペリジン、－$CH_2CH_2CH_2$－モルフォリン及び－$CH_2CH_2CH_2$－イミダゾールが挙げられるが、これらに限定されない。

【００９２】

「ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル」は、C_1～C_5のアルキル基の水素原子の１つがヒドロキシル基で置き換えられた上で定義したようなC_1～C_5のアルキル基を言う。アルカノール基の代表例には、－CH_2OH、－CH_2CH_2OH、－$CH_2CH_2CH_2OH$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2OH$、－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$、－$CH_2CH(OH)CH_3$、－$CH_2CH(OH)CH_2CH_3$、－$CH(OH)CH_2CH_3$、及び－$C(CH_3)_2CH_2OH$が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９３】

「アリーレン」基は、フェニル基の水素原子の１つが結合で置き換えられたフェニル基である。アリーレン基は、オルソ、メタ又はパラの立体配置であることができ、置換することができないか、又は独立して以下の基：C_1～C_5のアルキル、ハロ、ヒドロキシ、Ｏ－C_1～C_5のアルキル、－$N(R^a)_2$、－ＣＯＯＨ、ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ＯＣ（Ｏ）－C_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）NH_2又は－NO_2の１以上で置換することができ、その際R^aの各存在は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルである。

【００９４】

「C_3～C_8の単環式シクロアルキル」は、３～８の炭素原子を含有する非芳香族の飽和炭化水素環である。C_3～C_8の単環式シクロアルキルの代表例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル及びシクロオクチルが挙げられるが、これらに限定されない。C_3～C_8の単環式シクロアルキルは、置換することができないか、又は独立して以下の基：C_1～C_5のアルキル、ハロ、ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、ヒドロキシ、Ｏ－C_1～C_5のアルキル、Ｎ（R^a）$_2$、－ＣＯＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）NH_2又は－NO_2の１以上で置換することができ、その際R^aの各存在は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルである。

【００９５】

「３～７員環の単環式複素環」は、１～４の環炭素原子がＮ、Ｏ又はＳ原子で独立して置き換えられている単環式３～７員環の芳香族又は非芳香族の単環式シクロアルキルを言う。窒素原子、イオウ原子又は炭素原子を介して３～７員環の単環式複素環を結合することができる。３～７員環の単環式複素環基の代表例には、ピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリル、オキサジニル、チアジニル、ジアジニル、トリアジニル、テトラジニル、イミダゾリル、テトラゾリル、ピロリジニル、イソキサゾリル、フラニル、フラザニル、ピリジニル、オキサゾリル、チアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、トリアゾリル及びピリミジニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００９６】

「７～１０員環の二環式複素環」は、１～４の環炭素原子がＮ、Ｏ又はＳ原子で独立して置き換えられている二環式７～１０員環の芳香族又は非芳香族の二環式シクロアルキルを言う。窒素原子、イオウ原子又は炭素原子を介し７～１０員環の二環式複素環を結合することができる。７～１０員環の二環式複素環基の代表例には、ベンジミダゾリル、イン

ドリル、イソキノリニル、インダゾリル、キノリニル、キナゾリニル、プリニル、ベンジソキサゾリル、ベンゾキサゾリル、ベンズチアゾリル、ベンゾジアゾリル、ベンゾトリアゾリル、イソインドリル及びインダゾリルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００９７】

「窒素含有の３～７員環の単環式複素環」は、少なくとも１つの環窒素原子を含有する上で定義した３～７員環の単環式複素環を言う。窒素原子、イオウ原子又は炭素原子を介して窒素含有の３～７員環の単環式複素環を結合することができる。窒素含有の３～７員環の単環式複素環の代表例には、ピペリジニル、ピペラジニル、ピロリル、オキサジニル、チアジニル、ジアジニル、トリアジニル、テトラジニル、イミダゾリル、テトラゾリル、ピロリジニル、イソキサゾリル、ピリジニル、オキサゾリル、チアゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピリミジニル及びモルフォリニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００９８】

「ハロ」は、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩである。

「動物」は、哺乳類であり、たとえば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、又は非ヒト霊長類、たとえば、サル、チンパンジー、ヒヒ又はアカゲザルである。実施態様の１つでは、動物はヒトである。

【００９９】

代表的な「薬学上許容可能な塩」には、たとえば、水溶性の塩及び水に不溶性の塩、たとえば、酢酸塩、アムソネート塩（４，４－ジアミノスチルベン－２，２－ジスルホネート）、ベンゼンスルホネート塩、ベンゾネート塩、ベシレート塩、重炭酸塩、重硫酸塩、重酒石酸塩、ホウ酸塩、臭化物、酪酸塩、エデト酸カルシウム、カンファースルホネート、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、クラブルアリエート、二塩酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセプテート、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート、ヘキサフルオロリン酸塩、ヘキシルレゾルシネート、ヒドラバミン、ヒドロ臭化物、ヒドロ塩化物、ヒドロキシナフト酸塩、ヨウ化物、イソチオネート、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、ラウリン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メチル臭化物、メチル硝酸塩、メチル硫酸塩、ムケート、ナプシル酸塩、硝酸塩、Ｎ－メチルグルカミンアンモニウム塩、３－ヒドロキシ－２－ナフトエ酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモエート（１，１－メタン－ビス－２－ヒドロキシ－３－ナフトエ酸塩、エインボネート）、パントテン酸塩、リン酸塩／二リン酸塩、ピクリン酸塩、ポリガラクツロネート、プロピオン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、スルホサリクレート、スラメート、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクレート、トシル酸塩、トリエチオダイト及び吉草酸塩が挙げられる。水和物は、薬学上許容可能な塩の別の例である。

【０１００】

イソキノリン誘導体に関連して使用される場合、「有効量」は、（ａ）症状を治療する又は予防するのに、又は（ｂ）インビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）若しくはインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の細胞においてＰＡＲＳを阻害するのに有効な量である。

【０１０１】

別の抗癌剤に関連して使用される場合、「有効量」は、単独で又はイソキノリン誘導体との併用で癌を治療する又は予防するのに有効である量である。「併用」には、同一組成物の範囲内で及び別々の組成物の範囲内で投与することが含まれる。後者の例では、イソキノリン誘導体がその予防効果又は治療効果を発揮している間に抗癌剤が投与され、逆もまた同様である。

【０１０２】

本明細書では以下の略記が使用され、示される定義を有する：ＡｃＯＨは酢酸であり；ＡＩＢＮはアジビスイソブチロニトリルであり；CCl_4は四塩化炭素であり；ＣＥＰは盲腸結紮及び穿刺であり；ＤＭＥＭはダルベッコの改変イーグル培地であり；ＤＭＦはＮ

，Ｎ－ジメチルホルムアミドであり；ＤＭＳＯはジメチルスルホキシドであり；ＥｔＯＡｃは酢酸エチルであり；ＥｔＯＨはエタノールであり；ＨＥＰＥＳは４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸であり；ＨＰＬＣは高圧液体クロマトグラフィであり；ＬＰＳはリポ多糖であり；Ｍｅはメチルであり；ＭｅＣＮはアセトニトリルであり；ＭｅＯＨはメタノールであり；ＭＳは質量分析であり；Ｍｓはメシル（メタンスルホニル）であり；ＮＢＳはＮ－ブロモスクシンイミドであり；NEt_3はトリエチルアミンであり；ＮＭＲは核磁気共鳴であり；ＰＢＳはリン酸緩衝化生理食塩水（ｐＨ７．４）であり；ＰＡＲＳはポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素であり；Ｐｙはピリジンであり；ＳＤＳはドデシル硫酸（ナトリウム塩）であり；ＳＴＺはストレプトゾトシンであり；ＴＣＡはトリクロロ酢酸であり；Ｔｆはトリフリル（トリフルオロメタンスルホニル）であり；ＴＦＡはトリフルオロ酢酸であり；ＴＨＦはテトラヒドロフランであり；ＴＬＣは薄層クロマトグラフィであり；ＴＭＺはテモゾロミドであり；ＴＮＦは腫瘍壊死因子であり；ＴＲＩＳはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンであり；Ｔｓはトシル（ｐ－トルエンスルホニル）である。

（５．２．イソキノリン誘導体の使用方法）

本発明はまた、細胞におけるＰＡＲＳを阻害する方法を包含する。ポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素、ＰＡＲＰ（ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ、ＰＡＲＰ－１、ＥＣ．２．４．９９）及びＡＤＰ－リボシルトランスフェラーゼ（ＡＤＰＲＴ、ＥＣ　２．４．２．３０）として知られるＰＡＲＳは、NAD^+のＡＤＰリボース部分の受容体タンパク質への転移を触媒する核内酵素である。

【０１０３】

実施態様の１つでは、方法は、細胞でＰＡＲＳを阻害するのに有効な量のイソキノリン誘導体と細胞を接触させることを含む。一般に、ＰＡＲＳ活性を有する又は有することが可能である又はＰＡＲＳを発現することが可能であるいかなる細胞も使用することができる。細胞はいかなる形態でも提供することができる。たとえば、インビトロで、エクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）で又はインビボで細胞を提供することができる。当該技術で既知の方法、たとえば、バナジック（Banasik）等、Ｊ．Biol．Chem.第２６７巻、１５６９～１５７５ページ（１９９１年）に記載されるような方法を用いてＰＡＲＳ活性を測定することができる。ＰＡＲＳを発現することが可能である細胞の例示となる例には、筋肉、骨、歯肉、神経、脳、肝臓、腎臓、膵臓、肺、心臓、膀胱、胃、結腸、直腸、小腸、皮膚、食道、目、咽頭、子宮、卵巣、前立腺、腱、骨髄、血液、リンパ、精巣、膣及び腫瘍の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０４】

本発明に従って、症状の治療又は予防の必要に応じて動物にイソキノリン誘導体が投与される。

（５．２．１．炎症性疾患の治療及び予防）

炎症性疾患を治療するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。生体組織の炎症があるところで炎症性疾患は生じうる。これらには、局所の炎症反応及び全身性の炎症が含まれる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な炎症性疾患には、臓器移植の拒絶；関節炎、関節リウマチ、変形性関節症を含む関節の慢性炎症性疾患及び骨の再吸収の増加に関連した骨疾患；回腸炎、潰瘍性大腸炎、バレット症候群及びクローン病のような炎症性腸疾患；喘息、成人呼吸窮迫症候群及び慢性閉塞性気道疾患のような炎症性肺疾患；角膜ジストロフィー、トラコーマ、回旋糸状虫症、ブドウ膜炎、交感性眼炎及び眼内炎を含む目の炎症性疾患；歯肉炎及び歯周炎を含む歯肉の慢性炎症性疾患；結核；ハンセン病；尿毒性合併症、糸球体腎炎及びネフローゼを含む腎臓の炎症性疾患；硬化性皮膚炎、乾癬及び湿疹を含む皮膚の炎症性疾患；神経系の慢性脱髄疾患、神経疾患、多発性硬化症、ＡＩＤＳ関連の神経変性及びアルツハイマー病、感染性脳膜炎、脳脊髄炎、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症及びウイルス性又は自己免疫性の脳炎を含む中枢神経系の炎症性疾患；免疫複合体血管炎、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）を含むが、これらに限定されない糖尿病合併症；心筋症、虚血性心疾患、高コレステロール

血症及びアテローム性動脈硬化症のような心臓の炎症性疾患；並びに、子癇前症、慢性肝不全及び脳と脊髄の外傷を含む重大な炎症部分を有しうるそのほかの種々の疾患が挙げられるが、これらに限定されない。炎症性疾患は、グラム陽性又はグラム陰性のショック、出血性又はアナフィラキシー性のショック、又は、炎症誘発性サイトカインに反応した癌化学療法により誘導されるショック、たとえば、炎症誘発性サイトカイン関連したショックによって例示される、生体の全身性の炎症でもありうる。そのようなショックは、たとえば、癌の治療として投与される化学療法剤によって誘発することができる。

【０１０５】

実施態様の１つでは、炎症性疾患は、関節の炎症性疾患、歯肉の慢性炎症性疾患、炎症性腸疾患、炎症性肺疾患、中枢神経系の炎症性疾患、目の炎症性疾患、グラム陽性ショック、グラム陰性ショック、出血性ショック、アナフィラキシー性ショック、外傷性ショック又は化学療法ショックである炎症性疾患である。

（５．２．２．再潅流傷害の治療及び予防）

再潅流傷害を治療するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。再潅流は、たとえば、血管の収縮又は閉塞に続いて起きるような虚血の後で、それによって血管の血流が再開される過程を言う。再潅流傷害は、たとえば、心筋梗塞、脳卒中のような自然に生じる発作に続いて、又は血管の血流が故意に若しくは無意識に阻止される外科的処置の間に生じうる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な再潅流傷害の例には、腸管の再潅流傷害、心筋の再潅流傷害、及び心肺バイパス手術、大動脈瘤修復手術、頸動脈血管内膜切除術又は出血性ショックの結果生じる再潅流傷害が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０６】

実施態様の１つでは、再潅流傷害は、心肺バイパス手術、大動脈瘤修復手術、頸動脈血管内膜切除術又は出血性ショックの結果生じる。

（５．２．３．臓器移植の結果生じる再酸素化傷害の治療及び予防）

別の実施態様では、再潅流傷害は、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害である。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な再酸素化傷害の例には、以下の臓器：心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、腸管及び角膜の移植が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０７】

実施態様の１つでは、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害は、臓器移植の最中に生じる。

（５．２．４．虚血性症状の治療及び予防）

虚血性症状を治療するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な虚血性症状の例には、安定狭心症、不安定狭心症、心筋虚血、肝臓虚血、腸間膜動脈虚血、腸管虚血、下肢虚血、慢性下肢虚血、脳虚血、急性心臓虚血、及び脳卒中や脳虚血のような中枢神経系の虚血性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０８】

実施態様の１つでは、虚血性症状は、心筋虚血、安定狭心症、不安定狭心症、脳卒中、虚血性心疾患又は脳虚血である。

（５．２．５．腎不全の治療及び予防）

腎不全を治療する又は予防するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。

【０１０９】

実施態様の１つでは、腎不全は慢性腎不全である。

別の実施態様では、腎不全は急性腎不全である。

（５．２．６．血管系疾患の治療及び予防）

循環器疾患以外の血管系疾患を治療する又は予防するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な血管系疾患の例には、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レーノー病及び現象、肢端チアノーゼ、肢端

紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫及び脂肪血が挙げられるが、これらに限定されない。

（５．２．７．循環器疾患の治療及び予防）

循環器疾患を治療する又は予防するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な循環器疾患の例には、慢性心不全、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、循環ショック、心筋症、心臓移植、心筋梗塞、及び心房細動、上室性頻拍、心房粗動、発作性心房頻拍のような心臓不整脈が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１０】

実施態様の１つでは、循環器疾患は慢性心不全である。

別の実施態様では、循環器疾患は心臓不整脈である。

さらに別の実施態様では、心臓不整脈は、心房細動、上室性頻拍、心房粗動、又は発作性心房頻拍である。

（５．２．８．糖尿病又は糖尿病合併症の治療及び予防）

糖尿病又はその合併症を治療する又は予防するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な糖尿病の例には、Ｉ型糖尿病（インスリン依存性糖尿病）、ＩＩ型糖尿病（インスリン非依存性糖尿病）、妊娠糖尿病、自己免疫性糖尿病、異常インスリン症、膵臓疾患による糖尿病、そのほかの内分泌疾患（クッシング症候群、末端肥大症、褐色細胞腫、グルカゴン産生腫瘍、原発性アルドステロン症又はソマトスタチン産生腫瘍）に関連する糖尿病、Ａ型インスリン耐性症候群、Ｂ型インスリン耐性症候群、脂肪栄養性の糖尿病、及びβ細胞毒素により誘発される糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。糖尿病合併症を治療する又は予防するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な糖尿病又はその合併症の例には、糖尿病性白内障、緑内障、網膜症、腎症（たとえば、ミクロアルミ尿症及び進行性糖尿病性腎症）、多発ニューロパシー、下肢の壊疽、アテローム性硬化症冠状動脈疾患、末梢動脈疾患、非ケトン性高血糖高浸透圧性昏睡、単発ニューロパシー、自律神経ニューロパシー、下肢潰瘍、関節障害、及び皮膚又は粘膜の合併症（たとえば、感染、膿の染み、カンジダ感染又は壊死症、脂肪性糖尿病性肥満）、高脂血症、高血圧、インスリン耐性の症候群、冠状動脈疾患、網膜症、糖尿病性ニューロパシー、多発ニューロパシー、単発ニューロパシー、自己免疫性ニューロパシー、下肢潰瘍、関節障害、真菌感染、細菌感染及び心筋症が挙げられるが、これらに限定されない。

（５．２．９．パーキンソン病の治療及び予防）

パーキンソン病を治療する又は予防するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。

（５．２．１０．癌の治療及び予防）

癌を治療する又は予防するのにイソキノリン誘導体を使用することができる。イソキノリン誘導体を用いて治療可能な又は予防可能な癌の例には、下記の表に記載した癌及びその転移が挙げられるが、これらに限定されない。

（表７）

固形腫瘍には：

線維肉腫
粘液肉腫
脂肪肉腫
軟骨肉腫
骨原性肉腫
脊索腫
血管肉腫
内皮肉腫
リンパ管肉腫

リンパ管内皮肉腫
滑膜腫
中皮腫
ユーイング肉腫
平滑筋肉腫
横紋筋肉腫
結腸癌
結腸直腸癌
腎臓癌
膵臓癌
骨癌
乳癌
卵巣癌
前立腺癌
食道癌
胃癌
口腔癌
鼻癌
咽喉癌
扁平上皮癌、
基底細胞癌
腺癌
汗腺癌
脂腺癌
乳頭状癌
乳頭腺癌
嚢胞腺癌
髄様癌
気管支原性癌
腎細胞癌
肝臓癌
胆管癌
絨毛癌
精上皮腫
胎児性癌
ウイルム肉腫
子宮頸癌
子宮癌
睾丸癌
小細胞肺癌
膀胱癌
肺癌
上皮癌
皮膚癌
黒色腫
神経芽細胞腫
網膜芽細胞腫
が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１１】

血液に由来する癌には：

急性リンパ芽球性白血病（「ＡＬＬ」）
急性リンパ芽球性Ｂ細胞白血病
急性リンパ芽球性Ｔ細胞白血病
急性骨髄芽球性白血病（「ＡＭＬ」）
急性前骨髄芽球性白血病（「ＡＰＬ」）
急性単芽球性白血病
急性赤白血病性白血病
急性巨核芽球性白血病
急性骨髄単球性白血病
急性非リンパ性白血病
急性未分化性白血病
慢性骨髄性白血病（「ＣＭＬ」）
慢性リンパ性白血病（「ＣＬＬ」）
ヘアリー細胞白血病
多発性骨髄腫

が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１２】

急性及び慢性の白血病：
リンパ芽球性
骨髄性
リンパ性
骨髄性白血病
リンパ腫
ホジキン病
非ホジキンリンパ腫
多発性骨髄腫
ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症
重鎖疾患
真性多血症
ＣＮＳ及び脳の癌腫
神経膠腫
毛様細胞性星状細胞腫
星状細胞腫
未分化星状細胞腫
多形性膠芽腫
髄芽細胞腫
頭蓋咽頭腫
上衣細胞腫
松果体腫
血管芽細胞腫
聴神経腫
乏突起膠腫
髄膜腫
前庭神経鞘腫
アデノーマ
転移性脳腫瘍
髄膜腫
脊髄腫瘍
髄芽細胞腫

実施態様の１つでは、癌は、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、

非ホジキンリンパ腫、皮膚癌、脳癌、中枢神経系の癌、卵巣癌、子宮癌、胃癌、膵臓癌、食道癌、腎臓癌、肝臓癌、又は頭頸部の癌である。

【０１１３】

別の実施態様では、癌は転移癌である。

さらに別の実施態様では、動物はあらかじめ又は現在、癌の治療を受けている。そのような以前の治療には、化学療法、放射線療法、外科手術、たとえば、癌ワクチンのような免疫療法が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１４】

イソキノリン誘導体は、ウイルスが原因で生じる癌の治療又は予防にも有用である。そのようなウイルスには、子宮頸癌のきっかけとなりうるヒトパピローマウイルス（たとえば、エルナンデス（Hernandez）－アビラ（Avila）等、Achieves of Medical Research 第２８巻、２６５～２７１ページ（１９９７年）を参照のこと）、リンパ腫のきっかけとなりうるエプステイン・バーウイルス（ＥＢＶ）（たとえば、ヘルマン（Herrmann）等、Ｊ．Pathol 第１９９巻（２）、１４０～１４５ページ（２００３年）を参照のこと）、肝癌のきっかけとなりうるＢ型又はＣ型の肝炎ウイルス（たとえば、エル－セラグ（El-Serag）、Ｊ．Clin．Gastroenterol 第３５巻 （５ Suppl ２）、Ｓ７２－８（２００２年）を参照のこと）、Ｔ細胞白血病のきっかけとなりうるヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）－１（たとえば、モルトロー（Mortreux）等、Leukemia 第１７巻（１）：２６～３８ページ（２００３年）を参照のこと）、カポジ肉腫のきっかけとなりうるヒトヘルペスウイルス－８の感染（たとえば、カドー（Kadow）等、Curr．Opin．Investig．Drugs 第３巻（１１）、１５７４～１５７９ページ（２００２年）を参照のこと）、及び免疫不全の結果としての癌のきっかけとなりうるヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染（たとえば、ダル マーソ（Dal Maso）等、Lancet Oncol． 第４巻（２）、１１０～１１９ページ（２００３年）を参照のこと）が挙げられる。

【０１１５】

イソキノリン誘導体を投与して、表７に列記される癌を含むが、これらに限定されない癌の進行を防ぐことができる。そのような予防的使用には、過形成、化生又は最も特には異形成から成る非新生細胞の増殖が起きているもの含まれる。

【０１１６】

或いは、又は過形成、化生又は異形成として特徴付けられる異常細胞の増殖に加えて、インビボで示される又は動物からの小試料によってインビトロで示される形質転換された表現型又は悪性の表現型の１以上の特徴の存在は、イソキノリン誘導体の予防的／治療的投与の望ましさを示すことができる。形質転換された表現型のそのような特徴には、形態的変化、ゆるい基層接着、接触阻害の喪失、足場依存性の喪失、プロテアーゼの放出、糖輸送の増加、血清要求性の低下、胎児性抗原の発現、２５０，０００ダルトンの細胞表面タンパク質の消失が挙げられる（形質転換された又は悪性の表現型に関連する特徴については、上記８４～９０ページを参照のこと）。

【０１１７】

特定の実施態様では、白板斑症、上皮の良性に見える過形成若しくは異形成の病変、又はボーエン病、上皮内癌腫は、本方法に従って治療可能又は予防可能である。

別の実施態様では、繊維嚢胞性の疾患（嚢胞性過形成、乳腺異形成、特に腺疾患（良性の上皮過形成）は、本方法に従って治療可能又は予防可能である。

【０１１８】

そのほかの実施態様では、悪性について以下の素因の１以上を呈する動物に、癌を治療する又は予防するのに有効である量のイソキノリン誘導体を投与することができる：悪性に関連した染色体の転座（たとえば、慢性骨髄性白血病についてのフィラデルフィア染色体、濾胞性リンパ腫についてのｔ（１４；１８））；家族性ポリープ症又はガードナー症候群；良性の単クローン性免疫グロブリン異常症；メンデル遺伝方式を示す癌又は前癌疾患を有するヒトとの第１度の近親関係（たとえば、結腸の家族性ポリープ症、ガードナー症候群、遺伝性外骨腫症、多発内分泌腺腫症、アミロイド産生を伴う甲状腺髄質癌及び褐

色細胞腫、ポイツ・ジェガース症候群、フォン・レックリングハウゼンの神経線維腫、網膜芽細胞腫、頸動脈球腫瘍、皮膚メラノカルシノーマ、眼内メラノカルシノーマ、色素性乾皮症、毛細血管拡張性運動失調症、セディアク・ヒガシ症候群、先天性白色症、ファンコニ再生不良性貧血、及びブルーム症候群、並びに発癌物質への暴露（たとえば、喫煙、副流煙への暴露、及び特定の化学物質の吸入又は接触）。

（５．２．１０．１．癌治療のための併用化学療法）

実施態様の１つでは、癌を治療する又は癌を予防する本方法はさらに別の抗癌剤を投与することを含む。

【０１１９】

実施態様の１つでは、本発明は、対象において癌を治療する又は予防する方法を提供し、該方法は、有効量の（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）別の抗癌剤の投与を含む。

実施態様の１つでは、そのような作用剤が癌の治療のために単独療法として使用される場合一般に採用される用量で、（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）別の抗癌剤が投与される。

【０１２０】

別の実施態様では、（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）別の抗癌剤は、相乗的に作用し、そのような作用剤が癌の治療のために単独療法として使用される場合一般に採用される用量よりも少ない用量で投与される。

【０１２１】

投与される（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）別の抗癌剤の投与量並びに投与計画は、治療される癌、患者の身体全体の健康、及び投与する内科医の決断を含むが、これらに限定されない種々のパラメータに依存することができる。

【０１２２】

他の抗癌剤の投与の前（たとえば、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間、又は１２週間前）、それと同時に、又はそれに続いて（たとえば、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間、又は１２週間後）、その必要性に応じて対象にイソキノリン誘導体を投与することができる。種々の実施態様では、（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）別の抗癌剤は、１分離して、１０分離して、３０分離して、１時間未満離して、１時間～２時間離して、２時間～３時間離して、３時間～４時間離して、４時間～５時間離して、５時間～６時間離して、６時間～７時間離して、７時間～８時間離して、８時間～９時間離して、９時間～１０時間離して、１０時間～１１時間離して、１１時間～１２時間離して、２４時間以下離して、又は４８時間以下離して投与される。実施態様の１つでは、（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）別の抗癌剤は、３時間で投与される。別の実施態様では、（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）別の抗癌剤は、１分～２４時間離して投与される。

【０１２３】

実施態様の１つでは、有効量のイソキノリン誘導体及び有効量の別の抗癌剤が同一の組成物中に存在する。実施態様の１つでは、この組成物は経口投与に有用である。別の実施態様では、この組成物は静脈内投与に有用である。

【０１２４】

イソキノリン誘導体及び別の抗癌剤を投与することによって治療する又は予防することができる癌には、表７で述べられた癌のリストが挙げられるが、これらに限定されない。

実施態様の１つでは、癌は脳腫瘍である。

【０１２５】

特定の実施態様では、脳腫瘍は、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形性膠芽腫又は転移性脳腫瘍である。

特定の実施態様では、癌は黒色腫である。

【０１２６】
実施態様の１つでは、癌は転移性黒色腫である。
イソキノリン誘導体及びそのほかの抗癌剤は相加的又は相乗的に作用することができる。イソキノリン誘導体と別の抗癌剤の相乗的併用によって、これら作用剤の一方又は双方の少ない投与量を使用することができ、及び／又はイソキノリン誘導体及びそのほかの抗癌剤の一方又は双方の少ない投与回数を使用することができ、及び／又は少ない回数で作用剤を投与するということは、癌の治療における作用剤の有効性を減らすことなく、対象への作用剤の投与に関連するいかなる毒性も軽減することができる可能性がある。さらに、相乗効果は、癌の治療におけるこれら作用剤の有効性の改善及び／又はいずれかの作用剤単独の使用に関連する有害な又は望ましくない影響の軽減を結果として生じる可能性がある。
【０１２７】
実施態様の１つでは、そのような作用剤が癌の治療に対して単独療法として使用される際通常採用される用量で投与される場合、イソキノリン誘導体と別の抗癌剤は相乗的に作用する。別の実施態様では、そのような作用剤が癌の治療に対して単独療法として使用される際通常採用される用量よりも少ない用量で投与される場合、イソキノリン誘導体と別の抗癌剤は相乗的に作用する。
【０１２８】
実施態様の１つでは、有効量のイソキノリン誘導体と有効量の別の抗癌剤の投与は、そのほかの抗癌剤への癌の耐性を阻害する。実施態様の１つでは、癌は腫瘍である。
本発明の方法及び組成物で有用な、好適なそのほかの抗癌剤には、テモゾロミド、トポイソメラーゼＩ阻害剤、プロカバジン、ダカルバジン、ゲムシタビン、カペシタビン、メソトレキセート、タキソール、タキソテレ、メルカプトプリン、チオグアニン、ヒドロキシウレア、シタラビン、シクロホスファミド、イフォスファミド、ニトロソウレア、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、ダカルバジン、プロカルビジン、エトポシド、テニポシド、カンパテシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、プリカマイシン、ミトキサトロン、Ｌ－アスパラギナーゼ、ドキソルビシン、エピルビシン、５－フルオロウラシル、ドセタキセル及びパクリタキセルのようなタキサン類、リューコボリン、レバミソール、イリノテカン、エストラムスチン、エトポシド、ナイトロジェンマスタード、ＢＣＮＵ、カルムスチン及びロムスチンのようなニトロソウレア類、ビンブラスチン、ビンクリスチン及びビノレルビンのようなビンカアルカロイド類、シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンのような白金錯体、イマチニブメシレート、ヘキサメチルメラミン、トポテカン、チロシンキナーゼ阻害剤、チルホスチンハービマイシンＡ、ゲニステイン、エルブスタチン及びラベンドスチンＡが挙げられるが、これらに限定されない。
【０１２９】
実施態様の１つでは、本発明の方法及び組成物で有用なそのほかの抗癌剤には、表８に列記される薬剤及び薬学上許容可能なその塩が挙げられるが、これらに限定されない。
（表８）
（アルキル化剤）

ナイトロジェンマスタード	シクロホスファミド
	イフォスファミド
	トロフォスファミド
	クロラムブシル
ニトロソウレア	カルムスチン（ＢＣＮＵ）
	ロムスチン（ＣＣＮＵ）
アルキルスルホネート	ブスルファン
	トレオスルファン
トリアゼン	デカルバジン
	プロカルバジン

	テモゾロミド
白金含有錯体	シスプラチン
	カルボプラチン
	アロプラチン
	オキサリプラチン
（植物アルカロイド）	
ビンカアルカロイド	ビンクリスチン
	ビンブラスチン
	ビンデシン
	ビノレルビン
タキソイド	パクリタキセル
	ドセタキセル
（ＤＮＡトポイソメラーゼ阻害剤）	
エピポドフィリン	エトポシド
	テニポシド
	トポテカン
	イリノテカン
	９－アミノカンプトテシン
	カンプトテシン
	クリスナトール
マイトマイシン	マイトマイシンＣ
	代謝拮抗剤
（抗葉酸剤）	
ＤＨＦＲ阻害剤	メソトレキセート
	トリメトレキセート
ＩＭＰ脱水素酵素阻害剤	ミコフェノール酸
	チアゾフリン
	リバビリン
	ＥＩＣＡＲ
リボヌクレアーゼ還元酵素阻害剤	ヒドロキシウレア
	デフェロキサミン
（ピリミジン類縁体）	
ウラシル類縁体	５－フルオロウラシル
	フルオクスウリジン
	ドキシフルウリジン
	ラリトレキセド
シトシン類縁体	シタラビン（アラＣ）
	シトシンアラビノシド
	フルダラビン
	ゲムシタビン
	カペシタビン
プリン類縁体	メルカプトプリン
	チオグアニン
	Ｏ－６－ベンジルグアニン
（ＤＮＡ代謝拮抗剤）	３－ＨＰ
	２’－デオキシ－５－フルオロウリジン
	５－ＨＰ
	アルファ－ＴＧＤＲ
	アフィジコリングリシネート
	アラ－Ｃ

	５－アザ－２′－デオキシシチジン
	ベータ－ＴＧＤＲ
	シクロシチジン
	グアナゾール
	イノシングリコジアルデヒド
	マセベシンＩＩ
	ピラゾロイミダゾール
（ホルモン療法）	
受容体拮抗剤	
抗エストロゲン	タモキシフェン
	ラロキシフェン
	メゲストロール
ＬＨＲＨ作動薬	ゴスクルクリン
	酢酸ロイプロリド
抗アンドロゲン	フルタミド
	ビカルタミド
（レチノイド類／デルトイド類）	
	シス－レチノイン酸
ビタミンＡ誘導体	全トランス－レチノイン酸（ＡＴＲＡ－ＩＶ）
ビタミンＤ類縁体	ＥＢ１０８９
	ＣＢ１０９３
	ＫＨ１０６０
（光線力学療法）	ベルトポルフィン（ＢＰＤ－ＭＡ）
	フタロシアニン
	光線感作物質Ｐｃ４
	デメトキシ－ヒポクレリンＡ
	（２ＢＡ－２－ＤＭＨＡ）
（サイトカイン類）	インターフェロン－α
	インターフェロン－β
	インターフェロン－γ
	腫瘍壊死因子
	インターロイキン－２
（血管形成阻害剤）	アンギオスタチン（プラスミノーゲン断片）
	血管形成性抗トロンビンＩＩＩ
	アンギオザイム
	ＡＢＴ－６２７
	ベイ１２－９５６６
	ベネフィン
	ベバシズマブ
	ＢＭＳ－２７５２９１
	軟骨由来阻害剤（ＣＤＩ）
	ＣＡＩ
	ＣＤ５９補体断片
	ＣＥＰ－７０５５
	Ｃｏｌ３
	コンブレタスタチンＡ－４
	エンドスタチン（コラーゲンＸＶＩＩＩ断片）
	フィブロネクチン断片
	Ｇｒｏ－ベータ
	ハロフギノン

ヘパリナーゼ
ヘパリン六糖断片
ＨＭＶ８３３
ヒト絨毛性ゴナドトロピン（ｈＣＧ）
ＩＭ－８６２
インターフェロン－α／β／γ
インターフェロン誘導性タンパク質（ＩＰ－１０）
インターロイキン－１２
クリングル５（プラスミノーゲン断片）
マリマスタット
メタロプロテイナーゼ阻害剤
（ＴＩＭＰｓ）
２－メトキシエストラジオール
ＭＭＩ２７０（ＣＧＳ２７０２３Ａ）
ＭｏＡｂＩＭＣ－１Ｃ１１
ネオバスタット
ＮＭ－３
パンゼム
ＰＩ－８８
胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤
プラスミノーゲンアクチベータ阻害剤
血小板因子－４（ＰＦ－４）
プリノマスタット
プロラクチン１６ｋＤ断片
プッロリフェシン関連タンパク質（ＰＲＰ）
ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５９４
レチノイド類
ソリマスタット
スクアルアミン
ＳＳ３３０４
ＳＵ５４１６
ＳＵ６６６８
ＳＵ１１２４８
テトラヒドロコルチゾール－Ｓ
テトラチオモリブデート
タリドミド
トロンボスポンジン－１（ＴＳＰ－１）
ＴＮＰ－４７０
形質転換成長因子－β（ＴＧＦ－β）
バスキュロスタチン
バゾスタチン（カルレチキュリン断片）
ＺＤ６１２６
ＺＤ６４７４
ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（ＦＴＩ）
ビスホスホネート

（細胞分裂阻害剤）

アロコルヒチン
ハリコンドリンＢ
コルヒチン
コルヒチン誘導体
ドルスタチン１０

	マイタンシン
	リゾキシン
	チオコルヒチン
	トリチルシステイン
（その他）	
イソプレニル化阻害剤	
ドーパミン作用性神経毒素	１－メチル－４－フェニルピリジニウムイオン
細胞周期阻害剤	スタウロスポリン
アクチノマイシン類	アクチノマイシンＤ
	ダクチノマイシン
ブレオマイシン類	ブレオマイシンＡ２
	ブレオマイシンＢ２
	ペプロマイシン
アントラサイクリン類	ダウノルビシン
	ドキソルブシン
	イダルビシン
	エピルビシン
	ピラルビシン
	ゾルビシン
	ミトキサントロン
ＭＤＲ阻害剤	ベラパミル
Ca^{2+}ＡＴＰアーゼ阻害剤	タプシガルギン

本発明の組成物及び方法で使用することができるそのほかの抗癌剤には、アシビシン、アクラルビシン、塩酸アコダゾール、アクロニン、アドゼレシン、アルデスリューキン、アルトレタミン、アンボマイシン、酢酸アメタントロン、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アントラマイシン、アスパラギナーゼ、アスペルリン、アザシチジン、アゼテパ、アゾトマイシン、バチマスタット、ベンゾデパ、ビカルタミド、塩酸ビサントレン、ビスナフィドジメシレート、ビゼレシン、硫酸ブレオマイシン、ブレクイナールナトリウム、ブロピリミン、ブスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド、カルベチマー、カルボプラチン、カルムスチン、塩酸カルビシン、カルゼレシン、セデフィンゴール、クロラムブシル、シロレマイシン、シスプラチン、クラデリビン、メシル酸クリスナトール、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸ダウノルビシン、デシタビン、デキソルマプラチン、デザグアニン、メシル酸デザグアニン、ジアジコン、ドセタキセル、ドキソルビシン、塩酸ドキソルビシン、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロピオン酸ドロモスタノロン、デュアゾマイシン、エダトレキセート、塩酸エフロルニチン、エルサミトルシン、エンロプラチン、エンプロメート、エピプロピジン、塩酸エピルビシン、エルプロゾール、塩酸エソルビシン、エストラムスチン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エタニダゾール、エトポシド、リン酸エトポシド、エトプリン、塩酸ファドロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フロクスリジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、フルオロシタビン、フォスキドン、フォストリエシンナトリウム、塩酸ゲンシタビン、ヒドロキシウレア、塩酸イダルビシン、イフォスファミド、イルモフォシン、インターロイキン－２（組換えインターロイキン－２又はｒＩＬ－２を含む）、インターフェロン－アルファ－２α、インターフェロン－アルファ－２β、インターフェロン－アルファ－ｎ１、インターフェロン－アルファ－ｎ３、インターフェロン－ベータ－Ｉα、インターフェロン－ガンマ－Ｉβ、イプロプラチン、塩酸イリノテカン、酢酸ランレオチド、レトロゾール、酢酸リュープロリド、塩酸リアロゾール、ロメトレキソールナトリウム、ロムスチン、塩酸ロソキサントロン、マソプロコール、マイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストール、メルファラン、メノガリル、メルカプトプリン、メソトレキセート、メソトレキセートナトリウム、メトプリン、メツレデパ、ミチンドミド、マイトカルシ

ン、マイトクロミン、マイトギリン、マイトマルシン、マイトマイシン、マイトスパー、マイトタン、塩酸マイトキサントロン、ミオフェノール酸、ノコダゾール、ノガラマイシン、オルマプラチン、オキシスラン、パクリタキセル、ペガスパルガーゼ、ペリオマイシン、ペンタムスチン、硫酸ペロマイシン、ペルホスファミド、ピポブロマン、ピポスルファン、塩酸ピポキサントロン、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン、塩酸プロカルバジン、プロマイシン、塩酸プロマイシン、ピラゾフリン、リボプリン、ログレチミド、サフィンゴール、塩酸サフィンゴール、セムスチン、シムトラゼン、スパルフォセートナトリウム、スパルソマイシン、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン、スピロプラチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スルホフェヌール、タリソマイシン、テコガランナトリウム、テガフール、塩酸テロキサントロン、テモポルフィン、テニポシド、テロキシロン、テストラクトン、チアミプリン、チオグアニン、チオテパ、チアゾフリン、チアパザミン、クエン酸トレミフェン、酢酸トレストロン、リン酸トリシリビン、トリメトレキセート、グルクロン酸トリメトレキセート、トリプトレリン、塩酸ツブロゾール、ウラシルマスタード、ウレデパ、バプレオチド、ベルテポルフィン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンピジン、硫酸ビングリシネート、硫酸ビンリューロシン、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンロシジン、硫酸ビンゾリジン、ボロゾール、ゼニプラチン、ジノスタチン、塩酸ゾルビシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３０】

本発明の方法及び組成物で使用することができるさらなる抗癌剤には、２０－エピ－１，２５－ジヒドロビタミンＤ３；５－エチニルウラシル；アビラテロン；アクラルビシン；アシルフルベン；アデシペノール；アドレゼレシン；アルデスロイキン；ＡＬＬ－ＴＫ拮抗剤；アルトレタミン；アンバムスチン；アミドックス；アミフォスチン；アミノレブリン酸；アムルビシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラフォリド；血管形成阻害剤；拮抗剤Ｄ；拮抗剤Ｇ；アンタレリックス；抗背面化形態形成タンパク質－１；抗アンドロゲン、前立腺癌；抗エストロゲン；抗ネオプラストン；アンチセンスオリゴヌクレオチド；グリシン酸アフィジコリン；アポトーシス遺伝子モジュレータ；アポトーシス調節因子；アプリン酸；アラ－ＣＤＰ－ＤＬ－ＰＴＢＡ；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン；アタメスタン；アトリムスチン；アキシナスタチン１；アキシナスタチン２；アキシナスタチン３；アザセトロン；アザトキシン；アザチロシン；バカチンＩＩＩ誘導体；バラノール；バチマスタット；ＢＣＲ／ＡＢＬ拮抗剤；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスポリン；ベータラクタム誘導体；ベータ－アレチン；ベタクラマイシンＢ；ベツリン酸；ｂＦＧＦ阻害剤；ビカルタミド；ビサントレン；ビスアジリジニルスペルミン；ビスナフィド；ビストラテンＡ；ビゼレシン；ブレフレート；ブロピリミン；ブドチタン；ブチオニン；スルホキシミン；カルシポトリオール；カルホスチンＣ；カンプトテシン誘導体；カナリア痘ＩＬ－２；カルボキシアミド－アミノ－トリアゾール；カルボキシアミドトリアゾール；ＣａＲｅｓｔＭ３；ＣＡＲＮ７００；軟骨由来の阻害剤；カルゼレシン；カゼインキナーゼ阻害剤（ＩＣＯＳ）；カスタロスペルミン；セロピンＢ；セトロレリックス；クロルン；クロロキノキサリンスルホアミド；シカプロスト；シス－ポルフィリン；クラドリビン；クロミフェン類縁体；クロトリマゾール；コリスマイシンＡ；コリスマイシンＢ；コンブレタスタチンＡ４；コンブレタスタチン類縁体；コナゲニン；クラムベスシジン８１６；クリスナトール；クリプトフィシン８；クリプトフィシンＡ誘導体；クラシンＡ；シクロペンタアントラキノン；シクロプラタム；シペミシン；シタラビンオクフォスフェート；細胞溶解因子；シトスタチン；ダクリキシマブ；デシタビン；デヒドロジデムニンＢ；デスロレリン；デキサメタゾン；デキシホスファミド；デクスラゾキサン；デクスベラパミル；ジアジコン；ジデムニンＢ；ジドックス；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ－５－アシチジン；ジヒドロタキソール；ジオキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ドセタキセル；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；ヂュオカルマイシンＳＡ；エブセレン；エコムスチン；エデルホシン；エドレコロマブ；エフロニチン；エレメン；エミテ

フール；エピルビシン；エプリステリド；エストラムスチン類縁体；エストロゲン作動薬；エストロゲン拮抗剤；エタニダゾール；リン酸エトポシド；エクセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；フェネチニド；フィルグラスチム；フィナステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラビン；塩酸フルオロダウノルニシン；フォルフェニメックス；フォルメスタン；フォストリエシン；フォテムスチン；ガドリニウムテキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタビン；ガニレリックス；ゼラチナーゼ阻害剤；ゲムシタビン；グルタチオン阻害剤；ヘプスルファン；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマントン；イルモフォシン；イロマスタット；イミダゾアクリドン；イミキモッド；免疫賦活剤ペプチド；インスリン様増殖因子－１受容体阻害剤；インターフェロン作動薬；インターフェロン類；インターロイキン類；イオベングアン；インドドキソルビシン；イポメアノール４；イロプラクト；イルソグラジン；イソベンガゾール；イソホモハリコンドリンＢ；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリドＦ；ラメラリン－Ｎ三酢酸；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；硫酸レンチナン；レプトルスタチン；レトロゾール；白血病阻害因子；白血球アルファインターフェロン；リュープロリド＋エストロゲン＋プロゲステロン；リュープロレリン；レバミソール；リアロゾール；直鎖ポリアミン類縁体；親油性二糖ペプチド；親油性白金錯体；リソクリンアミド７；ロバプラチン；ロムブリシン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキソリブリン；ルルトテカン；ルテチウムテキサフィリン；リソフィリン；溶解性ペプチド；マイタンシン；マンノスタチンＡ；マリマスタット；マソプロコール；マスピン；マトリリシン阻害剤；マトリクスメタロプロテイナーゼ阻害剤；メノガリル；メルバロン；メテレリン；メチオニナーゼ；メトクロプラミド；ＭＩＦ阻害剤；ミフェプリストン；ミルテフォシン；ミリモスチム；ミスマッチ二本鎖ＲＮＡ；マイトグアゾン；マイトラクトール；マイトマイシン類縁体；マイトナフィド；マイトトキシン線維芽細胞増殖因子－サポリン；マイトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；モノクローナル抗体；ヒト絨毛性ゴナドトロピン；モノホスホリル脂質Ａ＋ミオバクテリウム細胞壁ｓｋ；モピダモール；多剤耐性遺伝子阻害剤；多重腫瘍抑制因子１に基く療法；マスタード抗癌剤；ミカペルオキシドＢ；ミオバクテリウム細胞壁抽出物；ミリアポロン；Ｎ－アセチルジナリン；Ｎ－置換ベンザミド；ナファレリン；ナグレスチップ；ナロキソン＋ペンタゾシン；ナパビン；ナフテルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチン；ネモルビシン；ネリドロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；一酸化窒素モジュレータ；ニトロキシド抗酸化剤；ニツルリン；Ｏ６－ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オンダンセトロン；オラシン；経口サイトカイン誘導因子；オルマプラチン；オサテロン；オキサリプラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセル；パクリタキセル類縁体；パクリタキセル誘導体；パラウアミン；パルミトイルリゾキシン；パミドロン酸；パナキシトリオール；パノミフェン；パラバクチン；パゼリプチン；ペガスパルガーゼ；ペルデシン；ペントサンポリ硫酸ナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール；ペルフルブロン；ペルフォスファミド；ペリルアルコール；フェナジノマイシン；フェニルアセテート；ホスファターゼ阻害剤；ピシバニル；塩酸ピロカルピン；ピラルビシン；ピリトレキシム；プラセチンＡ；プラセチンＢ；プラスミノーゲンアクチベータ阻害剤；白金錯体；白金錯体類；白金トリアミン錯体；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニゾン；プロピルビスアクリドン；プロスタグランジンＪ２；プロテアソーム阻害剤；プロテインＡに基く免疫モジュレータ；タンパク質キナーゼＣ阻害剤；タンパク質キナーゼＣ阻害剤類、ミクロアルガル；タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤；プルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン抱合体；ｒａｆ拮抗剤；ラルチトレキセド；ラモセトロン；ｒａｓファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤；ｒａｓ阻害剤；ｒａｓ－ＧＡＰ阻害剤；脱メチル化レテリプチン；レニウムＲｅ１８６エチドロネート；リゾキシン；リボザイム；ＲＩＩレチンアミド；ログレチミド；ロヒツキン；ロムルチド；ロキニメックス；ルビギノンＢ１；ルボキシル；サ

フィンゴール；サイントピン；ＳａｒＣＮＵ；サクロフィトールＡ；サルガモスチム；Ｓｄｉ１模倣体；セムスチン；老化誘導阻害剤１；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達阻害剤；シグナル伝達モジュレータ；単鎖抗原結合タンパク質；シゾフィラン；ソブゾキサン；ボロカプテートナトリウム；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール；ソマトメジン結合タンパク質；ソネルミン；スパルホス酸；スピカマイシンＤ；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンギスタチン１；スクアラミン；幹細胞阻害剤；幹細胞分割阻害剤；スチピアミド；ストロメリシン阻害剤；スルフィノシン；超活性血管活性腸管ペプチド拮抗剤；スラジスタ；スラミン；スワインソニン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオジド；タウロムスチン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガファー；テルラピリリウム；テロメラーゼ阻害剤；テモポルフィン；テモゾロミド；テニポシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン；タリブラスチン；チオコラリン；トロンボポイエチン；ロンボポイエチン模倣体；サイマルファシン；サイモポイエチン受容体作動薬；サイモトリナン；甲状腺刺激ホルモン；スズエチルエチオプルプリン；チラパザミン；チタノセンビクロリド；トプセンチン；トレミフェン；トチポテント幹細胞因子；翻訳阻害剤；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリビン；トリメトレキセート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキナーゼ阻害剤；チルホスチン；ＵＢＣ阻害剤；ウベニメックス；尿生殖洞由来増殖阻害因子；ウロキナーゼ受容体拮抗剤；バプレオチド；バリオリンＢ；ベクター系、赤血球遺伝子治療；ベラレゾール；ベラミン；ベルジン；ベルテポルフィン；ビノレルビン；ビンキサルチン；ビタキシン；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；及びジノスタチンスチマラマーが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３１】

別の実施態様では、そのほかの抗癌剤はインターフェロンα である。

別の実施態様では、そのほかの抗癌剤はインターロイキン２である。

実施態様の１つでは、そのほかの抗癌剤はアルキル化剤、たとえば、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、アルキルスルホネート、トリアゼン、又は白金含有剤である。

【０１３２】

別の実施態様では、そのほかの抗癌剤はトリアゼンアルキル化剤である。

特定の実施態様では、そのほかの抗癌剤はテモゾロミドである。

テモゾロミドは、約６０ｍｇ／ｍ^2（対象の体表面積）～約２５０ｍｇ／ｍ^2、及び約１００ｍｇ／ｍ^2～約２００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある投与量で対象に投与することができる。特定の実施態様では、テモゾロミドの投与量は、約１０ｍｇ／ｍ^2、約１ｍｇ／ｍ^2、約５ｍｇ／ｍ^2、約１０ｍｇ／ｍ^2、約２０ｍｇ／ｍ^2、約３０ｍｇ／ｍ^2、約４０ｍｇ／ｍ^2、約５０ｍｇ／ｍ^2、約６０ｍｇ／ｍ^2、約７０ｍｇ／ｍ^2、約８０ｍｇ／ｍ^2、約９０ｍｇ／ｍ^2、約１００ｍｇ／ｍ^2、約１１０ｍｇ／ｍ^2、約１２０ｍｇ／ｍ^2、約１３０ｍｇ／ｍ^2、約１４０ｍｇ／ｍ^2、約１５０ｍｇ／ｍ^2、約１６０ｍｇ／ｍ^2、約１７０ｍｇ／ｍ^2、約１８０ｍｇ／ｍ^2、約１９０ｍｇ／ｍ^2、約２００ｍｇ／ｍ^2、約２１０ｍｇ／ｍ^2、約２２０ｍｇ／ｍ^2、約２３０ｍｇ／ｍ^2、約２４０ｍｇ／ｍ^2、又は約２５０ｍｇ／ｍ^{2}である。

【０１３３】

特別の実施態様では、テモゾロミドは経口で投与される。

実施態様の１つでは、テモゾロミドは約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で対象に経口で投与される。

【０１３４】

別の実施態様では、テモゾロミドは約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、対象に経口で投与される。

特定の実施態様では、テモゾロミドは約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、１～５日目まで、対象に経口で投与され、次いで、約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５

日間、２８～３２日目まで再び経口で投与され、次いで、約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、５５～５９日目まで再び経口で投与される。

【０１３５】

特定の実施態様では、そのほかの抗癌剤はプロカルバジンである。

プロカルバジンは、約５０ｍｇ／ｍ^2（対象の体表面積）～約１００ｍｇ／ｍ^2、及び約６０ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある投与量で対象に投与することができる。特定の実施態様では、プロカルバジンの投与量は、約１０ｍｇ／ｍ^2、約１ｍｇ／ｍ^2、約５ｍｇ／ｍ^2、約１０ｍｇ／ｍ^2、約２０ｍｇ／ｍ^2、約３０ｍｇ／ｍ^2、約４０ｍｇ／ｍ^2、約５０ｍｇ／ｍ^2、約６０ｍｇ／ｍ^2、約７０ｍｇ／ｍ^2、約８０ｍｇ／ｍ^2、約９０ｍｇ／ｍ^2、約１００ｍｇ／ｍ^2、約１１０ｍｇ／ｍ^2、約１２０ｍｇ／ｍ^2、約１３０ｍｇ／ｍ^2、約１４０ｍｇ／ｍ^2、約１５０ｍｇ／ｍ^2、約１６０ｍｇ／ｍ^2、約１７０ｍｇ／ｍ^2、約１８０ｍｇ／ｍ^2、約１９０ｍｇ／ｍ^2、約２００ｍｇ／ｍ^2、約２１０ｍｇ／ｍ^2、約２２０ｍｇ／ｍ^2、約２３０ｍｇ／ｍ^2、約２４０ｍｇ／ｍ^2、約２５０ｍｇ／ｍ^2、約２６０ｍｇ／ｍ^2、約２７０ｍｇ／ｍ^2、約２８０ｍｇ／ｍ^2、約２９０ｍｇ／ｍ^2、約３００ｍｇ／ｍ^2、約３１０ｍｇ／ｍ^2、約３２０ｍｇ／ｍ^2、約３３０ｍｇ／ｍ^2、約３４０ｍｇ／ｍ^2、約３５０ｍｇ／ｍ^2、約３６０ｍｇ／ｍ^2、約３７０ｍｇ／ｍ^2、約３８０ｍｇ／ｍ^2、約３９０ｍｇ／ｍ^2、約４００ｍｇ／ｍ^2、約４１０ｍｇ／ｍ^2、約４２０ｍｇ／ｍ^2、約４３０ｍｇ／ｍ^2、約４４０ｍｇ／ｍ^2、約４５０ｍｇ／ｍ^2、約４６０ｍｇ／ｍ^2、約４７０ｍｇ／ｍ^2、約４８０ｍｇ／ｍ^2、約４９０ｍｇ／ｍ^2、又は約５００ｍｇ／ｍ^{2}である。

【０１３６】

特別の実施態様では、プロカルバジンは静脈内に投与される。

実施態様の１つでは、プロカルバジンは約５０ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で対象に静脈内で投与される。

【０１３７】

別の実施態様では、プロカルバジンは１日１回連続して５日間、約５０ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で対象に静脈内で投与される。

特定の実施態様では、プロカルバジンは約５０ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、１～５日目まで、対象に静脈内で投与され、次いで、約５０ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、２８～３２日目まで再び静脈内に投与され、次いで、約５０ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、５５～５９日目まで再び静脈内に投与される。

【０１３８】

別の実施態様では、プロカルバジンは約５０ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１回、対象に静脈内で投与される。

特定の実施態様では、そのほかの抗癌剤はダカルバジンである。

【０１３９】

ダカルバジンは、約６０ｍｇ／ｍ^2（対象の体表面積）～約２５０ｍｇ／ｍ^2、及び約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある投与量で対象に投与することができる。特定の実施態様では、ダカルバジンの投与量は、約１０ｍｇ／ｍ^2、約１ｍｇ／ｍ^2、約５ｍｇ／ｍ^2、約１０ｍｇ／ｍ^2、約２０ｍｇ／ｍ^2、約３０ｍｇ／ｍ^2、約４０ｍｇ／ｍ^2、約５０ｍｇ／ｍ^2、約６０ｍｇ／ｍ^2、約７０ｍｇ／ｍ^2、約８０ｍｇ／ｍ^2、約９０ｍｇ／ｍ^2、約１００ｍｇ／ｍ^2、約１１０ｍｇ／ｍ^2、約１２０ｍｇ／ｍ^2、約１３０ｍｇ／ｍ^2、約１４０ｍｇ／ｍ^2、約１５０ｍｇ／ｍ^2、約１６０ｍｇ／ｍ^2、約１７０ｍｇ／ｍ^2、約１８０ｍｇ／ｍ^2、約１９０ｍｇ／ｍ^2、約２００ｍｇ／ｍ^2、約２１０ｍｇ／ｍ^2、約２２０ｍｇ／ｍ^2、約２３０ｍｇ／ｍ^2、約２４０ｍｇ／ｍ^2、約２５０ｍｇ／ｍ^2、約２６０ｍｇ／ｍ^2、約２７０ｍｇ／ｍ^2、約２８０ｍｇ／ｍ^2、約２９０ｍｇ／ｍ^2、約３００ｍｇ／ｍ^2、約３１０ｍｇ／ｍ^2、約３２０ｍｇ／ｍ^2、

約３３０ｍｇ／ｍ^2、約３４０ｍｇ／ｍ^2、約３５０ｍｇ／ｍ^2、約３６０ｍｇ／ｍ^2、約３７０ｍｇ／ｍ^2、約３８０ｍｇ／ｍ^2、約３９０ｍｇ／ｍ^2、約４００ｍｇ／ｍ^2、約４１０ｍｇ／ｍ^2、約４２０ｍｇ／ｍ^2、約４３０ｍｇ／ｍ^2、約４４０ｍｇ／ｍ^2、約４５０ｍｇ／ｍ^2、約４６０ｍｇ／ｍ^2、約４７０ｍｇ／ｍ^2、約４８０ｍｇ／ｍ^2、約４９０ｍｇ／ｍ^{2}又は約５００ｍｇ／ｍ^{2}である。

【０１４０】

特別の実施態様では、ダカルバジンは静脈内に投与される。

実施態様の１つでは、ダカルバジンは約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で対象に静脈内で投与される。

【０１４１】

別の実施態様では、ダカルバジンは１日１回連続して５日間、約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で対象に静脈内で投与される。

特定の実施態様では、ダカルバジンは約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、１～５日目まで、対象に静脈内で投与され、次いで、約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、２８～３２日目まで再び静脈内に投与され、次いで、約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、５５～５９日目まで再び静脈内に投与される。

【０１４２】

実施態様の１つでは、ダカルバジンは約１５０ｍｇ／ｍ^2～約２５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１回、対象に静脈内で投与される。

実施態様の１つでは、そのほかの抗癌剤は、トポイソメラーゼＩ阻害剤、たとえば、エトポシド、テニポシド、トポテカン、イリノテカン、９－アミノカンプトテシン、カンプトテシン又はクリスナトールである。

【０１４３】

特定の実施態様では、そのほかの抗癌剤はイリノテカンである。

イリノテカンは、約５０ｍｇ／ｍ^2（対象の体表面積）～約１５０ｍｇ／ｍ^2、及び約７５ｍｇ／ｍ^2～約１５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある投与量で対象に投与することができる。特定の実施態様では、イリノテカンの投与量は、約１０ｍｇ／ｍ^2、約１ｍｇ／ｍ^2、約５ｍｇ／ｍ^2、約１０ｍｇ／ｍ^2、約２０ｍｇ／ｍ^2、約３０ｍｇ／ｍ^2、約４０ｍｇ／ｍ^2、約５０ｍｇ／ｍ^2、約６０ｍｇ／ｍ^2、約７０ｍｇ／ｍ^2、約８０ｍｇ／ｍ^2、約９０ｍｇ／ｍ^2、約１００ｍｇ／ｍ^2、約１１０ｍｇ／ｍ^2、約１２０ｍｇ／ｍ^2、約１３０ｍｇ／ｍ^2、約１４０ｍｇ／ｍ^2、約１５０ｍｇ／ｍ^2、約１６０ｍｇ／ｍ^2、約１７０ｍｇ／ｍ^2、約１８０ｍｇ／ｍ^2、約１９０ｍｇ／ｍ^2、約２００ｍｇ／ｍ^2、約２１０ｍｇ／ｍ^2、約２２０ｍｇ／ｍ^2、約２３０ｍｇ／ｍ^2、約２４０ｍｇ／ｍ^2、約２５０ｍｇ／ｍ^2、約２６０ｍｇ／ｍ^2、約２７０ｍｇ／ｍ^2、約２８０ｍｇ／ｍ^2、約２９０ｍｇ／ｍ^2、約３００ｍｇ／ｍ^2、約３１０ｍｇ／ｍ^2、約３２０ｍｇ／ｍ^2、約３３０ｍｇ／ｍ^2、約３４０ｍｇ／ｍ^2、約３５０ｍｇ／ｍ^2、約３６０ｍｇ／ｍ^2、約３７０ｍｇ／ｍ^2、約３８０ｍｇ／ｍ^2、約３９０ｍｇ／ｍ^2、約４００ｍｇ／ｍ^2、約４１０ｍｇ／ｍ^2、約４２０ｍｇ／ｍ^2、約４３０ｍｇ／ｍ^2、約４４０ｍｇ／ｍ^2、約４５０ｍｇ／ｍ^2、約４６０ｍｇ／ｍ^2、約４７０ｍｇ／ｍ^2、約４８０ｍｇ／ｍ^2、約４９０ｍｇ／ｍ^{2}又は約５００ｍｇ／ｍ^{2}である。

【０１４４】

特別の実施態様では、イリノテカンは静脈内に投与される。

実施態様の１つでは、イリノテカンは約５０ｍｇ／ｍ^2～約１５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で対象に静脈内で投与される。

【０１４５】

別の実施態様では、イリノテカンは１日１回連続して５日間、約５０ｍｇ／ｍ^2～約１５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で対象に静脈内で投与される。

特定の実施態様では、イリノテカンは約５０ｍｇ／ｍ^2～約１５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲に

ある用量で１日１回、連続して５日間、１～５日目まで、対象に静脈内で投与され、次いで、約５０ｍｇ／ｍ^2～約１５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、２８～３２日目まで再び静脈内に投与され、次いで、約５０ｍｇ／ｍ^2～約１５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にある用量で１日１回、連続して５日間、５５～５９日目まで再び静脈内に投与される。

【０１４６】

実施態様の１つでは、本発明は、有効量の（ｉ）イソキノリン誘導体、（ｉｉ）１以上のそのほかの抗癌剤の投与を提供する。

実施態様の１つでは、そのような作用剤が癌の治療のために単独療法で使用される場合、一般に採用される用量で、（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）１以上のそのほかの抗癌剤が投与される。

【０１４７】

別の実施態様では、（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）１以上のそのほかの抗癌剤は相乗的に作用し、そのような作用剤が癌の治療のために単独療法で使用される場合、一般に採用される用量よりも少ない用量で投与される。

【０１４８】

投与される（ｉ）イソキノリン誘導体及び（ｉｉ）１以上のそのほかの抗癌剤の投与量及び投与計画は、治療される癌、患者の身体全体の健康、及び投与する内科医の決断を含むが、これらに限定されない種々のパラメータに依存することができる。

【０１４９】

実施態様の１つでは、そのほかの抗癌剤はＯ－６－ベンジルグアニンである。

別の実施態様では、そのほかの抗癌剤はＯ－６－ベンジルグアニン及びテモゾロミドである。

【０１５０】

別の実施態様では、そのほかの抗癌剤はＯ－６－ベンジルグアニン及びプロカルバジンである。

さらに別の実施態様では、そのほかの抗癌剤はＯ－６－ベンジルグアニン及びダカルバジンである。

（５．２．１０．２．癌の多重療法）

外科手術、放射線療法、癌ワクチンのような免疫療法を含むが、これらに限定されない１以上の追加的な抗癌療法を受けた又は現在受けている動物にイソキノリン誘導体を投与することができる。

【０１５１】

実施態様の１つでは、本発明は、癌を治療する又は予防するのに有効な量の（ａ）イソキノリン誘導体をその必要に応じて動物に投与すること及び外科手術、放射線療法、癌ワクチンのような免疫療法を含むが、これらに限定されない（ｂ）別の抗癌療法を含む、癌を治療する又は予防する方法を提供する。

【０１５２】

別の実施態様では、そのほかの抗癌療法は放射線療法である。

別の実施態様では、そのほかの抗癌療法は外科手術である。

さらに別の実施態様では、そのほかの抗癌療法は免疫療法である。

【０１５３】

特定の実施態様では、癌を治療する又は予防する本方法は、イソキノリン誘導体を投与すること及び放射線療法を含む。放射線療法は、イソキノリン誘導体の投与と同時に、又はその前に、又はそれに続いて施行することができ、実施態様の１つでは、イソキノリン誘導体投与の少なくとも１時間、５時間、１２時間、１週間、１ヵ月。別の実施態様では、数ヵ月（たとえば、３ヵ月まで）前、又は後で施行することができる。

【０１５４】

そのほかの抗癌療法が放射線療法である場合、治療されるべき癌の種類によって、いかなる放射線療法のプロトコールも用いることができる。たとえば、限定の目的ではなく、

Ｘ線照射を施行することができ；特に、深部腫瘍に対しては、高エネルギーメガボルト（１ＭｅＶより大きいエネルギーの照射）を使用することができ、皮膚癌には、電子ビーム及び常用電圧のＸ線照射を使用することができる。ラジウム、コバルト及びそのほかの元素の放射活性のある同位元素のようなガンマ線を放出する放射性同位元素も投与することができる。

【０１５５】

さらに、実施態様の１つでは、本発明は、化学療法又は放射線療法が、治療されている対象で結果として負の副作用を生じている場合、化学療法又は放射線療法の代替法としてイソキノリン誘導体を用いて癌を治療する方法を提供する。治療されている対象は適宜、たとえば、外科手術、放射線療法又は免疫療法のような別の抗癌療法で治療することができる。

【０１５６】

白血病及びリンパ腫を含むが、これらに限定されない特定の癌の治療のように、インビトロ又はエクスビボでイソキノリン誘導体を使用することができ、そのような治療には、自家幹細胞移植が関与する。これには、対象の自己造血幹細胞を回収し、癌細胞をすべてきれいに取り除き、次いで対象の残りの骨髄細胞集団をイソキノリン誘導体の投与及び／又は放射線照射を介して全滅させ、得られた幹細胞を対象に点滴で戻す過程が関与する。続いて、骨髄機能が回復し、対象が回復する間、支持療法を提供することができる。

（５．３．治療的な／予防的な投与）

本発明はまた、症状を治療する又は予防するのに有用な医薬組成物を提供する。組成物は内科的使用に好適であり、有効量のイソキノリン誘導体及び生理学的に許容可能なキャリア又はビヒクルを含む。

【０１５７】

動物における症状を治療する又は予防するのに有効である量でイソキノリン誘導体を投与することができる。

イソキノリン誘導体の投与は、治療剤のためのいかなる方式の投与によっても達成することができる。これらの方式には、全身性の投与、又は経口の、鼻内の、非経口の、経皮の、皮下の、膣内の、頬内の、直腸内の若しくは局所の投与方式のような局所投与が挙げられる。場合によっては、投与は結果としてイソキノリン誘導体の血流への放出を生じる。

【０１５８】

実施態様の１つでは、イソキノリン誘導体は経口で投与される。

投与の意図される方式によって、組成物は、固形の、半固形の又は液体の投与形態、たとえば、注射、錠剤、座薬、丸薬、徐放性カプセル、エリキシル剤、チンキ剤、エマルジョン、シロップ、粉末、液体、懸濁液などであることができ、好ましくは、単位投与形態であることができ、従来の薬務に矛盾しない。同様に、それらは、すべて薬剤技術の当業者に周知の形態を用いて、静脈内（ボーラス及び点滴の双方）の、腹腔内の、皮下の、又は筋肉内の形態で投与することもできる。

【０１５９】

例示となる医薬組成物は、イソキノリン誘導体及び生理学的に許容可能なキャリア又はビヒクルを含む錠剤及びゼラチンカプセルである。例示となるキャリア又はビヒクルには、（ａ）希釈剤、たとえば、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロース、ナトリウム、サッカリン、グルコース及び／又はグリシン、（ｂ）潤滑剤、たとえば、シリカ、滑石粉、ステアリン酸、そのマグネシウム塩又はカルシウム塩、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム及び／又はポリエチレングリコール；錠剤については、また（ｃ）結合剤、たとえば、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、炭酸マグネシウム、グルコース又はベータラクトースのような天然糖、コーン甘味料、アカシア、トラガカント又はアルギン酸ナトリウムのような天然の及

び合成のゴム、ワックス及び／又はポリビニルピロリドン、所望であれば、（ｄ）崩壊剤、たとえば、デンプン、寒天、メチルセルロース、ベントナイト、キサンタンゴム、アルギン酸若しくはそのナトリウム塩、又は発泡性の混合物及び／又は（ｅ）吸収剤、着色剤、風味剤及び甘味剤が挙げられる。

【０１６０】

液体組成物、特に注射用組成物は、たとえば、溶解、懸濁などによって調製することができる。たとえば、イソキノリン誘導体を、たとえば、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどのような薬学上許容可能な溶媒に溶解して、又はそれと混合して、それによって注射用の等張の溶液又は懸濁液を形成する。

【０１６１】

たとえば、プロピレングリコールのようなポリアルキレングリコールをキャリアとして用いて、脂質のエマルジョン又は懸濁液から調製することができる座薬として、イソキノリン誘導体を製剤化することもできる。

【０１６２】

たとえば、小型の単層の小胞、大型の単層の小胞及び多層の小胞としてのようなリポソーム送達システムの形態でイソキノリン誘導体を投与することもできる。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミン又はホスファチジルコリンを含有する種々のリン脂質から形成することができる。一部の実施態様では、特許文献１４に記載されるように、脂質成分の薄膜が薬剤の水性溶液によって水和され薬剤を内包する脂質層を形成する。

【０１６３】

イソキノリン誘導体分子がカップリングされる個々のキャリアとしてのモノクローナル抗体の使用によってイソキノリン誘導体を送達することもできる。標的可能な薬剤キャリアとしての可溶性ポリマーにイソキノリン誘導体をカップリングすることもできる。そのようなポリマーには、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド－フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパナミドフェノール、又はパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリジンを挙げることができる。さらに、薬剤の制御放出を達成するのに有用な生分解性ポリマー、たとえば、ポリ乳酸、ポリイプシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルソエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート及びヒドロゲルの架橋又は両親媒性のブロックコポリマーの部類にイソキノリン誘導体をカップリングすることもできる。

【０１６４】

非経口の注射可能物質の投与は、皮下注射、筋肉内注射又は静脈内注射及び点滴に使用することができる。注射可能物質は、従来の形態、液体溶液若しくは懸濁液、又は注射の前に液体に溶解するのに好適な固形形態のいずれかで調製することができる。

【０１６５】

実施態様の１つでは、非経口の投与は、参照によって本明細書に組み入れられる特許文献１５に係る徐放性又は持続放出のシステムの埋め込みを採用する。

組成物を滅菌することができ、又はそれは、非毒性量の、たとえば、保存剤、安定剤、湿潤剤又は乳化剤、溶解促進剤、浸透圧を調製するための塩、ｐＨ緩衝剤、及び酢酸ナトリウム又はオレイン酸トリエタノールアミンを含むが、これらに限定されないそのほかの物質のような補助剤を含有することができる。また、組成物は治療上有用な物質を含有することもできる。

【０１６６】

組成物は、従来の混合方法、顆粒化方法又は被覆方法のそれぞれに従って調製することができ、本医薬組成物は、重量で又は容量で、約０．１％～約９９％の、好ましくは約１％～約７０％のイソキノリン誘導体を含有することができる。

【０１６７】

イソキノリン誘導体を利用する投薬計画は、動物の種類、種、年齢、体重、性別及び医学症状を含む種々の因子；治療される症状の重症度；投与経路；動物の腎機能又は肝機能；並びに採用される特定のイソキノリン誘導体に従って選択することができる。当業者は

、症状を治療する又は予防するのに有用な薬剤の有効量を容易に決定し、処方することができる。

【０１６８】

動物に投与する場合、イソキノリン誘導体の有効投与量は、１日当たり約０．０５～約１０００ｍｇのイソキノリン誘導体の範囲である。インビボ又はインビトロでの使用のための組成物は、約０．５、１．０、２．５、５．０、１０．０、１５．０、２５．０、５０．０、１００．０、２５０．０、５００．０又は１０００．０ｍｇのイソキノリン誘導体を含有することができる。実施態様の１つでは、組成物は記録することができる錠剤の形態である。イソキノリン誘導体の有効な血漿レベルは、１日当たり体重ｋｇ当たり約０．００２ｍｇ～５０ｍｇの範囲でありうる。症状の治療又は予防に有効であるイソキノリン誘導体の量は、当業者に既知である臨床的技法によって決定することができる。さらに、インビトロ及びインビボのアッセイを適宜採用し、最適な投与量範囲を確認するのを助けることができる。採用されるべき正確な用量は、投与経路及び治療される症状の深刻さにも依存することができ、主治医の判断及び、たとえば、公表された臨床試験に鑑みた各患者の状況に従って決定することができる。しかしながら、好適な有効投与量は、通常、４時間毎に約５００ｍｇ以下であるが、約４時間毎に約１０マイクログラム～約５グラムの範囲であることができる。実施態様の１つでは、有効な投与量は、４時間毎に約０．０１ｍｇ、０．５ｍｇ、約１ｍｇ、約５０ｍｇ、約１００ｍｇ、約２００ｍｇ、約３００ｍｇ、約４００ｍｇ、約５００ｍｇ、約６００ｍｇ、約７００ｍｇ、約８００ｍｇ、約９００ｍｇ、約１ｇ、約１．２ｇ、約１．４ｇ、約１．６ｇ、約１．８ｇ、約２．０ｇ、約２．２ｇ、約２．４ｇ、約２．６ｇ、約２．８ｇ、約３．０ｇ、約３．２ｇ、約３．４ｇ、約３．６ｇ、約３．８ｇ、約４．０ｇ、約４．２ｇ、約４．４ｇ、約４．６ｇ、約４．８ｇ、及び約５．０ｇである。約２時間毎、約６時間毎、約８時間毎、約１２時間毎、約２４時間毎、約３６時間毎、約４８時間毎、約７２時間毎、約１週間毎、約２週間毎、約３週間毎、約毎月、及び約２ヵ月毎を含むが、これらに限定されない種々の時間にわたって同等の投与量を投与することができる。本明細書に記載される有効な投与量は、投与される全量を言い、すなわち、１を超えるイソキノリン誘導体を投与するならば、有効な投与量は投与される全量に相当する。

【０１６９】

イソキノリン誘導体を利用する投薬計画は、対象の種類、種、年齢、体重、性別及び医学症状を含む種々の因子；治療される症状の重症度；投与経路；対象の腎機能又は肝機能；並びに採用される特定のイソキノリン誘導体に従って選択することができる。当業者は、症状の進行を防ぐ、対抗する又は阻むのに必要とされる薬剤の有効量を容易に決定し、処方することができる。

【０１７０】

単一１日用量でイソキノリン誘導体を投与することができ、又は１日の全用量を１日当たり２回、３回又は４回に分けて投与することができる。さらに、イソキノリン誘導体は、好適な鼻内ビヒクルの局所使用を介した鼻内形態で、又は、当業者に周知の経皮皮膚貼付剤の形態を用いた経皮経路を介して投与することができる。経皮送達システムの形態で投与されるには、調剤投与は、調剤投薬計画を通して間欠的ではなく連続的であることができる。そのほかの例示となる局所製剤には、クリーム、軟膏、ローション、エアゾール噴霧及びジェルが挙げられ、その際、イソキノリン誘導体の濃度はｗ／ｗ又はｗ／ｖで約０．１％～約１５％の範囲である。

【０１７１】

実施態様の１つでは、組成物は、一緒になって癌を治療する又は予防するのに有効である各量のイソキノリン誘導体及び別の抗癌剤を含む。別の実施態様では、イソキノリン誘導体及び別の抗癌剤の量は、組成物の組み合わせた併用化学療剤の少なくとも約０．０１重量％である。経口投与が意図される場合、この量は、組成物の約０．１～約８０重量％で変化することができる。一部の経口組成物は、約４％～約５０％のイソキノリン誘導体及び別の抗癌剤を含むことができる。本発明のそのほかの組成物は、非経口の投与量単位

が組成物の約０．０１重量％～約２重量％を含有するように調製される。
【０１７２】
ヒトでの使用の前に、所望の治療活性又は予防活性についてインビトロ又はインビボでイソキノリン誘導体をアッセイすることができる。動物モデル系を用いて安全性及び有効性を実証することができる。
【０１７３】
その必要に応じて動物における症状を治療する又は予防する本方法は、さらに、イソキノリン誘導体を投与される対象に別の予防剤又は治療剤を投与することを含む。実施態様の１つでは、他の予防剤又は治療剤が有効量で投与される。他の予防剤又は治療剤には、抗炎症剤、腎不全防止剤、糖尿病防止剤及び循環器病防止剤、抗嘔吐剤、造血コロニー刺激因子、抗不安薬及び鎮痛剤が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１７４】
実施態様の１つでは、抗炎症剤の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、又は７２時間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１７５】
別の実施態様では、腎不全防止剤の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、又は７２時間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１７６】
さらに別の実施態様では、糖尿病防止剤の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、又は７２時間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１７７】
その上別の実施態様では、循環器病防止剤の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、又は７２時間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１７８】
さらなる実施態様では、抗嘔吐剤の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、又は７２時間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１７９】
別の実施態様では、造血コロニー刺激因子の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、７２時間以内、１週間以内、２週間以内、３週間以内、又は４週間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１８０】
さらに別の実施態様では、オピオイド系鎮痛剤又は非オピオイド系鎮痛剤の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、又は７２時間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１８１】
その上別の実施態様では、抗不安薬の前、同時に、又は後に、又は同一日、又は互いに、１時間以内、２時間以内、１２時間以内、２４時間以内、４８時間以内、又は７２時間以内にイソキノリン誘導体を投与することができる。
【０１８２】
そのほかの治療剤の有効量は当業者に周知である。しかしながら、そのほかの作用剤の最適な有効量の範囲を決定することは技量のある熟練者の権限の範囲内で十分である。本発明の実施態様の１つでは、別の治療剤が対象に投与される場合、イソキノリン誘導体の有効量は、別の治療剤が投与されない場合のその有効量よりも少ない。この場合、理論に

束縛されることなく、イソキノリン誘導体及び別の治療剤は、症状を治療する又は予防するのに相乗的に作用すると考えられる。

【０１８３】

本発明の方法で有用な抗炎症剤には、コルチゾール、コルチゾン、フルドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、６ａ－メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、ベタメタゾン、及びデキサメタゾンのような副腎皮質ステロイド、並びに、アスピリン、アセタミノフェン、インドメタシン、スリンダック、トルメチン、ジクロフェナック、ケトロラック、イブプロフェン、ナプロキセン、フルルビプロフェン、ケトプロフェン、フェノプロフェン、オキサプロジン、メフェナム酸、メクロフェナム酸、ピロキシカム、メロキシカム、ナブメトン、ロフェコキシブ、セレコキシブ、エトドラック及びニメスリドのような非ステロイド系抗炎症剤（ＮＳＡＩＤ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８４】

本発明の方法で有用な腎不全防止剤には、カプトプリル、エナラプリラット、リシノプリル、ベザゼプリル、フォシノプリル、トランドラプリル、キナプリル及びラミプリルのようなＡＣＥ（アンギオテンシン変換酵素）阻害剤、マンニトール、グリセリン、フルセミド、トレセミド、トリパミド、クロロチアジド、メチクロチアジド、インダパミド、アミロリド及びスピロノラクトンのような利尿剤、並びにクロフィブレート、ゲムフィブロジル、フェノフィブレート、シプロフィブレート及びベザフィブレートのようなフィブル酸剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８５】

本発明の方法で有用な糖尿病防止剤には、グルカゴン；ソマトスタチン；たとえば、トルブタミド、アセトヘキサミド、トラザミド、クロロプロパミド、グリベンクラミド、グリピジド、グリシアジド及びグリメピリドのようなスルホニルウレア類；レパグリニド及びナテグリニドのようなインスリン分泌促進薬；メトフォルミン及びフェンフォルミンのようなビグアニド類；ピオグリタゾン、ロシグリタゾン及びトログリタゾンのようなチアゾリジンジオン類、並びにアカルボース及びミグリトールのようなα－グルコシダーゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８６】

本発明の方法で有用な循環器病防止剤には、カルニチン；チアミン；並びに、たとえば、アトロピン、スコポラミン、ホマトリピン、トロピカミド、ピレンジピン、イプラトロピウム、チオトロピウム及びトルテロジンのようなムスカリン性受容体拮抗剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８７】

本発明の方法で有用な抗嘔吐剤には、メトクロプロミド、ドンペリドン、プロクロルペラジン、プロメタジン、クロルプロマジン、トリメトベンザミド、オンダンセトロン、グラニセトロン、ヒドロキシジン、アセチルロイシンモノエタノールアミン、アリザプリド、アザセトロン、ベンズキアナミド、ビエタナウチン、ブロモプリド、ブクリジン、クレボプリド、シクリジン、ジメンヒドリネート、ジフェニドール、ドラセトロン、メクリジン、メタラタール、メトピマジン、ナビロン、オキシペルンジル、ピパマジン、スコポラミン、スルピリド、テトラヒドロカンナビノール、チエチルペラジン、チオプロペラジン、トロピセトロン及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８８】

本発明の方法で有用な造血コロニー刺激因子には、フィルグラスチム、サルグラモスチム、モルグラモスチム及びエポエチンアルファが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の方法で有用なオピオイド系鎮痛剤には、モルフィン、ヘロイン、ヒドロモルフォン、オキシモルフォン、オキシコドン、メトポン、アポモルフィン、ノルモルフィン、エトルフィン、ブプレノルフィン、メペリジン、ロペルミド、アニレリジン、エトヘプタジン、ピミニジン、ベタプロジン、ジフェノキシレート、フェンタニル、スフェンタニル、アルフェンタニル、レミフェンタニル、レボルファノール、デキストロメトルファン、フェナゾシン、ペンタゾシン、シクラゾシン、メタドン、イソメタドン及びプロポキシフ

ェンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８９】

本発明の方法で有用な非オピオイド系鎮痛剤には、アスピリン、セレコキシブ、ロフェコキシブ、ジクロフィナック、ジフルシナル、エトドラック、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、ケトプロフェン、インドメタシン、ケトロラック、メクロフェナメート、メフェナム酸、ナブメトン、ナプロキセン、ピロキシカム及びスリンダックが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１９０】

本発明の方法で有用な抗不安薬には、ブスピロン、並びに、たとえば、ジアゼパム、ロラゼパム、オキサザパム、クロラゼペート、クロナゼパム、クロルジアゼポキシド及びアルプラゾラムのようなベンゾジアゼピン系薬が挙げられるが、これらに限定されない。

（５．４．キット）

本発明は、イソキノリン誘導体の対象への投与を簡略化することができるキットを包含する。

【０１９１】

本発明の典型的なキットは、単位投与量形態のイソキノリン誘導体を含む。実施態様の１つでは、単位投与量形態は、有効量のイソキノリン誘導体及び生理学的に許容可能なキャリア又はビヒクルを含有する、無菌であることができる容器である。キットはさらに、症状を治療する又は予防するためのイソキノリン誘導体の使用を指導するラベル又は印刷された指示書を含むことができる。キットはさらに、単位投与量形態の別の予防剤又は治療剤、たとえば、有効量のそのほかの予防剤又は治療剤を含有する容器を含むこともできる。実施態様の１つでは、キットは、有効量のイソキノリン誘導体及び有効量の予防剤又は治療剤を含有する容器を含む。そのほかの治療剤の例には上記で列記されたものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１９２】

本発明のキットはさらに、単位投与量形態を投与するのに有用である装置を含む。そのような装置の例には、注射筒、点滴バッグ、貼付剤、吸入器及び浣腸バッグが挙げられるが、これらに限定されない。

（５．５．イソキノリン誘導体の作製方法）

イソキノリン誘導体を作製するのに有用な合成経路の例を以下の実施形態で述べ、スキーム１～１０で一般化する。

【０１９３】

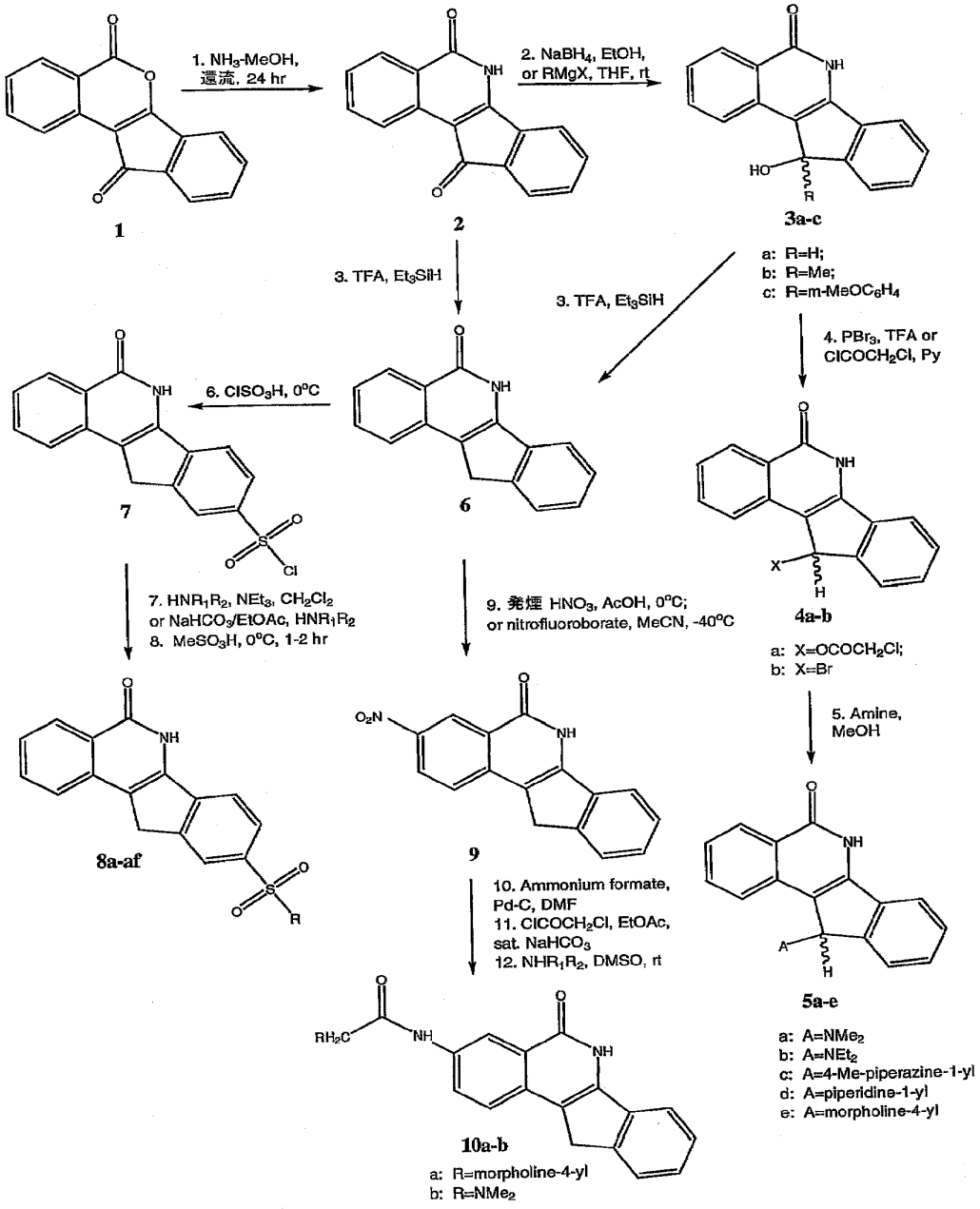
Ｘが－ＣＨ$_2$－及びＲ$_5$がＯである式（Ｉ）のイソキノリン誘導体を作製するのに有用な方法をスキーム１において以下で説明する

【０１９４】

OnCusp
Ex. 1002

【化１６】

スキーム1



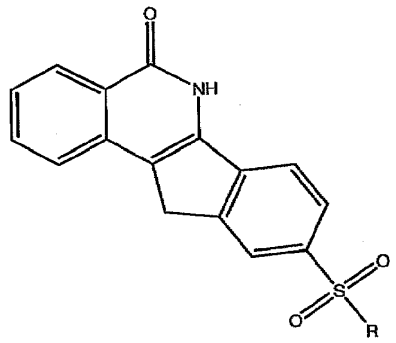
【０１９５】

スキーム中、化合物８ａ～８ａｆは以下の通りである：

【０１９６】

OnCusp
Ex. 1002

【化１７】



8a-af

a. R=4-Methyl-piperazine-1-yl
b. R=4-CH_2CO_2Me-piperazine-1-yl
c. R=4-(CH_2CH_2OH)-piperazine-1-yl
d. R=imidazole-1-yl
e. R=L-prolinol
f. R=morpholine-4-yl
g. R=$NHCH_2CH_2NMe_2$
h. R=$NHCH_2CH_2$-piperidine-1-yl
i. R=$NHCH_2CH_2N$-(pyridine-2-yl)
j. R=$NHCH_2CH_2$-morpholine-4-yl
k. R=$NHCH_2CH_2$-(2-N-Me-tetrahydropyrrolidine-1-yl)
l. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-morpholine-4-yl
m. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-(tetrahydropyrrolidine-1-yl)
n. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-imidazole-1-yi
o. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-(4-methylpiperazine-1-yl)
p. R=$N(CH_2CH_2NEt_2)_2$
q. R=$N(CH_2CH_2NMe_2)_2$
r. R=$N(CH_2CH_2OH)_2$
s. R=$NHCH_2CH_2CN$
t. R=$NHC(NH)NH_2$
u. R=NH[4-(1,2,4-triazole)]
v. R=NH[4-(*morpholin-4-yl*)phenyl]
w. R=$NHCH_2CH_2$(4-N-benzylpiperidine)
x. R=$NHCH_2CH_2$(2-thienyl)
y. R=NH[1-(4-azabenzimidazole)]
z. R=NH[1-(4-(2'-pyridyl)piperazine)]
aa. R=$NHCH_2CH_2N[CH_2CH_2OH]_2$
ab. R=NH[1-(4-benzlpiperazine)]
ac. R=NH_2
ad. R=$NHCH_2CH_2Ph$
ae. R=$NHCH_2CH_2$[4-OMe(phenyl)]
af. R=NHC(O)(*morpholin-4-yl*)

【０１９７】
５，６－ジヒドロ－５，１１－ジケト－１１Ｈ－イソキノリン（２）は、化合物１（ウィスコンシン州、ミルウォーキーのアルドリッチケミカル）をメタノール中でアンモニアと反応させることによって調製した。

【０１９８】
（±）１１－ヒドロキシ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ[１，２－ｃ]イソキノリン（３ａ）は、エタノール中で２を$NaBH_4$と反応させることによって調製した。

【０１９９】
（±）１１－ヒドロキシ－１１－メチル－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－イソキノリン（３ｂ）は、２をＭｅＭｇＩと反応させることによって調製した。

（±）１１－ヒドロキシ－１１－（ｍ－メトキシフェニル）－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ[１，２－ｃ]イソキノリン（３ｃ）は、ｍ－ＭｅＯ－C_6H_4ＭｇＩを用いて２から調製した。

【０２００】
（±）１１－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ[１，２－ｃ]イソキノリン（５ａ）は、クロロアセチルクロリドを用い、次いでジメチルアミンと反応させることによって３ａから調製した。同様に調製するのは、（±）１１－Ｎ，Ｎ－ジエチルアミノ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ[１，２－ｃ]イソキノリン（５ｂ）、（±）１１－Ｎ－（ピペリジノ－１－イル）－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ[１，２－ｃ]イソキノリン（５ｄ）、（±）１１－Ｎ－（４－メチルピペラジノ－１－イル）－５，６－ジヒドロ－５－オキソ１１

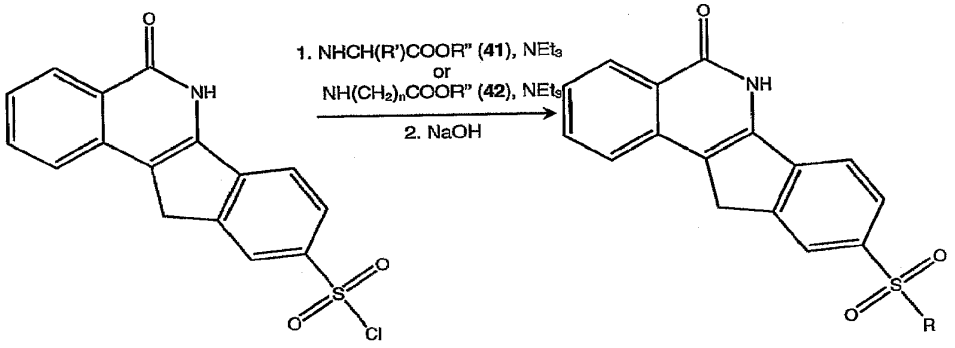
Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５ｃ）、（±）１１－Ｎ－（モルフォリノ－４－イル）－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－イソキノリン（５ｅ）である。（＋）１１－Ｎ－（モルフォリノ－４－イル）－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５ｅ）は、（±）１１－ブロモ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（４ｂ）からも調製した。

【０２０１】

５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（６）は、CF_3COOH／トリエチルシランを用いて、５，６－ジヒドロ－５，１１－ジケト－１１Ｈ－イソキノリン（２）又は（±）１１－ヒドロキシ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－イソキノリン（３ａ）を還元することによって調製される。９－クロロスルホニル－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（７）は、５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（６）のクロロスルホン化によって調製した。９－［Ｎ－（４－メチルピペラジン－イル）スルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（８ａ）は、９－クロロスルホニル－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（７）及びＮ－メチルピペラジンから調製した。同様に調製されるのは、９－［Ｎ－（４－カルボメトキシメチレンピペラジノ－イル）スルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｂ）、９－［Ｎ－４－（２－ヒドロキシエチルピペラジノ－１－イル）スルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｃ）、９－［Ｎ－（イミダゾロ－１－イル）スルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－イソキノリン（８ｄ）、９－［Ｎ－（２－ヒドロキシプロリニル）スルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｅ）、９－［Ｎ－モルフォリンスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｆ）、９－［Ｎ－（２［Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ］エチル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｇ）、９－［Ｎ－（２［ピペリジノ－１－イル］エチル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｈ）、９－［Ｎ－（２［ピペリジノ－２－イル］エチル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｉ）、９－［Ｎ－（２［モルフォリノ－４－イル］エチル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｊ）、９－［Ｎ－（２［Ｎ－メチルテトラヒドロピロイジノ－１－イル］エチル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｋ）、９－［Ｎ－（３［モルフォリノ－４－イル］プロピル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｌ），９－［Ｎ－（３－［テトラヒドロピロロジノ－１－イル］プロピル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｍ）、９－［Ｎ－（３［イミダゾロ－１－イル］プロピル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｎ）、９－［Ｎ－（３［４－メチルピペラジノ－１－イル］プロピル）－アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｏ），９－［Ｎ，Ｎ－ジ－（２－［Ｎ，Ｎ－ジエチルアミノ］エチル）－アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｐ）、９－［Ｎ，Ｎ－ジ－（２－［Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ］エチル）－アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｑ）及び９－［Ｎ，Ｎ－ジ（２－［Ｎ，Ｎ－ジヒドロキシエチルアミノ］エチル）アミノスルホニル］－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ－［１，２－ｃ］イソキノリン（８ｒ）である。

【０２０２】
化合物８ｓ～８ａｆは、適当なアミン中間体を用いて、化合物８ａ～８ｒを作製する上記方法を用いて調製することができる。
スキーム２は、式８ａｇ～８ａｏの末端カルボン酸化合物を作製するのに有用な方法を説明する。本方法は、トリエチルアミンのような塩基の存在下、塩化スルホニル７をアミノ酸のアルキルエステルと反応させて中間体、末端カルボン酸アルキルエステルを提供し、次いで、水酸化ナトリウムのような塩基を用いてそれを加水分解し、相当する末端カルボン酸を提供することを含む。
【０２０３】
【化１８】

スキーム2



7

8ag-ao

ag. R=-NHCH2COOH
ah. R=-NH(CH2)2COOH
ai. R=-NH(CH2)3COOH
aj. R=-NH(CH2)4COOH
ak. R=-NH(CH2)5COOH
al. R=-NHCH(CH2COOH)COOH
am. R=-NHCH((CH2)2COOH)COOH
an. R=-NHCH((CH2)4NH2)COOH
ao. R=-NHCH(CH2OH)COOH

【０２０４】
スキーム中、
Ｒ’は、アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_6$のアルキル又はヒドロキシ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、
Ｒ”は、Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、及び
ｎは、１～６の範囲の整数である。
９－スルホアミドカルボン酸誘導体を作製するための一般的方法
＜９－スルホアミドカルボン酸エステルの調製＞
０．５Ｍの式４１又は４２のエステルのＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$溶液に化合物７（１．０当量）を加え、得られた混合物を５分間撹拌する。次いで、トリエチルアミン（約５当量）加え、得られた反応物を室温で撹拌し、反応が完了するまでＴＬＣ又はＨＰＬＣを用いてモニターする。反応混合物をろ過し、ＭｅＯＨを用いて固形物を洗浄し、中間体、９－スルホアミドカルボン酸エステルを得るが、それはさらに精製することなく使用することができる。
＜エステルの加水分解＞
およそ０．５Ｍの９－スルホアミドカルボン酸エステルのエタノール溶液に、約３．０Ｎの水酸化ナトリウム水溶液（約５．０当量）を加え、得られた反応物を必要に応じて還流し、反応の完了までＴＬＣ又はＨＰＬＣを用いてモニターする。約１．０ＮのＨＣｌを

用いて反応混合物を約ｐＨ７．０に中和し、ＥｔＯＡｃを用いて中和した反応混合物を２回抽出する。合わせたＥｔＯＡｃ層を、水及び飽和塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄し、次いで硫酸ナトリウム上で乾燥し、減圧下で濃縮して、粗残渣を得、それをフラッシュカラムクロマトグラフィで精製して所望の９－スルホンアミドカルボン酸化合物を得る。

【０２０５】

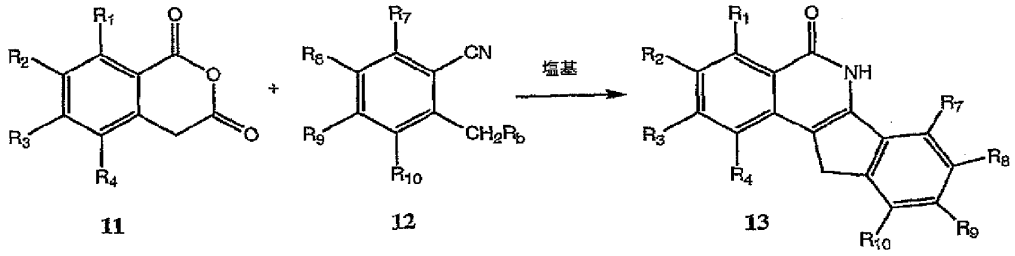
スルホンアミドがｔ－ブチルエステル基を有する場合、原液のＴＦＡによる酸加水分解が有用でありうる。

スキーム３で以下に説明する別の実施態様では、一般式１３のイソキノリン誘導体は、塩基の存在下、式１３の化合物を作製するのに十分な温度にて式１１の化合物と式１２の化合物をしばらく接触させることを含む方法によって作製することができる。

【０２０６】

【化１９】

スキーム3



11 12 13

【０２０７】

スキーム中、

R_1～R_4及びR_7～R_{10}は式（Ｉ）に関して上記と同義であり、

R_bは、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－ＯＭｓ、－ＯＴｓ又は－ＯＴｆである。

【０２０８】

実施態様の１つでは、R_bは－Ｂｒである。

別の実施態様では、R_b及びR_dは双方とも－Ｂｒである。

実施態様の１つでは、約１当量の式１１の化合物当たり、約０．１～約１０当量の式１２の化合物が使用される。

【０２０９】

別の実施態様では、約１当量の式１１の化合物当たり、約０．５～約５当量の式１２の化合物が使用される。

さらに別の実施態様では、約１当量の式１１の化合物当たり、約１～約２当量の式１２の化合物が使用される。

【０２１０】

実施態様の１つでは、約１当量の式１１の化合物当たり、約１～約１０当量の塩基が使用される。

別の実施態様では、約１当量の式１１の化合物当たり、約３～約７当量の塩基が使用される。

【０２１１】

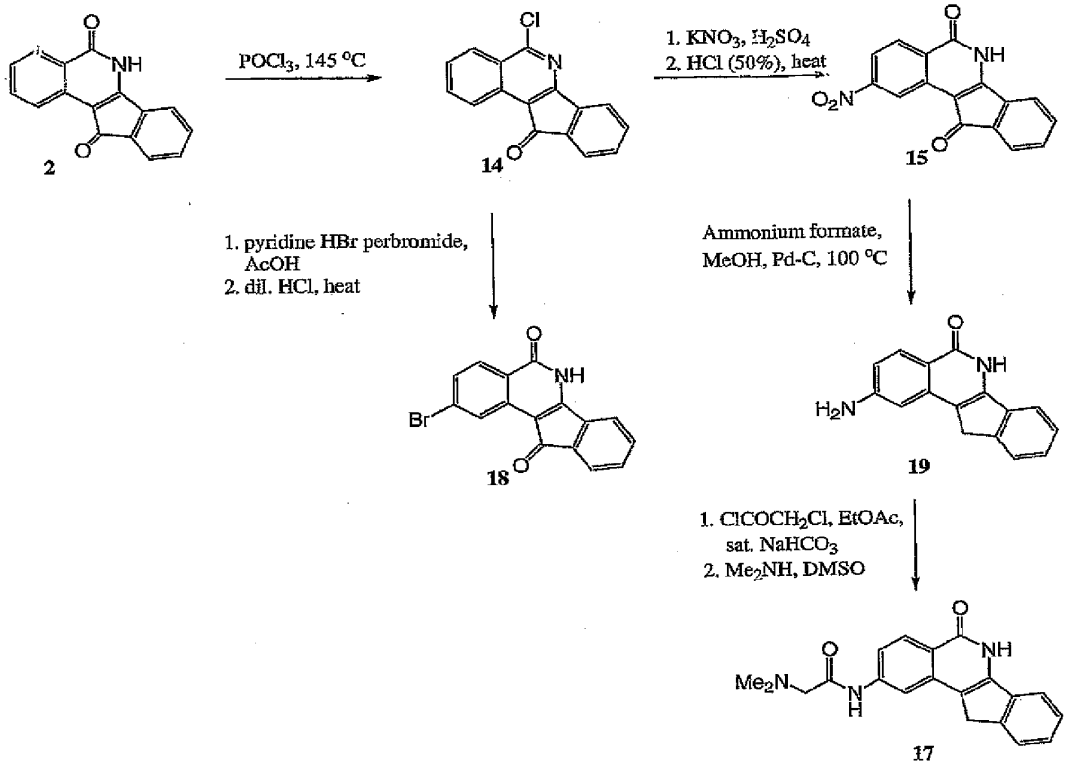
その上別の実施態様では、約１当量の式１１の化合物当たり、約５～約６当量の塩基が使用される。

スキーム３の方法の使用に好適な塩基は、たとえば、トリエチルアミン、リチウムＮ－ジイソプロピルアミド、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ルチジン及びイミダゾールのような有機塩基、並びに、たとえば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム及び炭酸セシウムを含むアルカリ金属炭酸塩のような無機塩基である。

【０２１２】
実施態様の１つでは、塩基はトリエチルアミンである。
別の実施態様では、塩基は炭酸カリウムである。
スキーム３の方法は、たとえば、アセトニトリル、塩化メチレン、クロロホルム、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、アセトン、ベンゼン、ジエチルエーテル、水又はこれらの混合物のような溶媒の存在下で行うことができる。
【０２１３】
実施態様の１つでは、溶媒はアセトニトリルである。
別の実施態様では、溶媒はＤＭＦである。
さらに別の実施態様では、溶媒が水でない場合、溶媒は実質的に無水であり、すなわち、約１％未満の水を含む。
【０２１４】
実施態様の１つでは、スキーム３の方法は約０．５時間～約４８時間の時間で実施される。
別の実施態様では、スキーム３の方法は約３時間～約３６時間の時間で実施される。
【０２１５】
さらに別の実施態様では、スキーム３の方法は約８時間～約２４時間の時間で実施される。
その上別の実施態様では、スキーム３の方法は約１５時間～約２０時間の時間で実施される。
【０２１６】
さらなる実施態様では、スキーム３の方法は約０℃～約２００℃の温度にて実施される。
別の実施態様では、スキーム３の方法は約２５℃～約１５０℃の温度にて実施される。
【０２１７】
さらに別の実施態様では、スキーム３の方法は約５０℃～約１００℃の温度にて実施される。
式１３の化合物を調製するための一般的手順
アセトニトリルのような好適な溶媒中の式１１（約１～約２当量）の無水ホモフタル酸の溶液に、式１２の化合物（約１～約２当量）を加え、続いてトリエチルアミンのような好適な塩基（約１～約５当量）を加える。得られた反応物を約１時間撹拌し、その時間に、着色された沈殿物が出現する。次いで、反応物を約２０時間、加熱還流し、室温に冷却してろ過する。アセトニトリルを用いて、着色した固形物を洗浄し、減圧下で乾燥して式１３の化合物を得る。
【０２１８】

【化２０】

スキーム4



【０２１９】

アミド誘導体、２－ジメチルアミノ－Ｎ－（５－オキソ－５，１１－ジヒドロ－６Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］－イソキノリン－２－イル）－アセトアミド（１７）は、５－クロロ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］－イソキノリン（１４）から調製した。化合物１４を二トロ化に供し、二トロ化合物１５を得、ギ酸アンモニウムを用いそれを還元してアミン１６を得、それをアセトアミド１７に誘導体化し、次いで、クロロアセトアミド中間体をアミノ化した。２－ブロモ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］－イソキノリン（１８）は、化合物１４のブロモ化によって調製した。

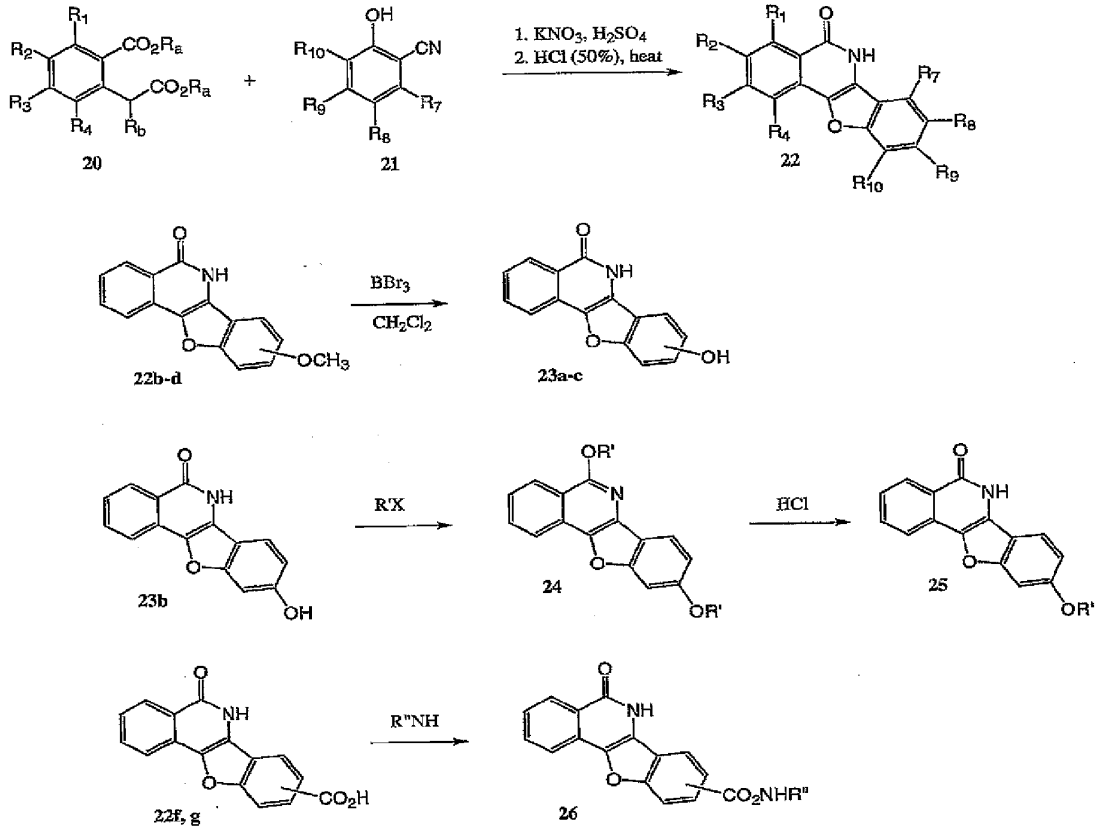
【０２２０】

スキーム５は、R_5及びＸが酸素である、式（Ｉ）の酸素置換イソキノリン誘導体を作製するのに有用な方法を説明する。

【０２２１】

【化２１】

スキーム5



【０２２２】

スキーム中、

R_1 ~ R_5 は、式（Ｉ）に関して上記と同義であり；

R_a の各存在は、独立してC_1 ~ C_5 のアルキルであり；

R_b は、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－ＯＭｓ、－ＯＴｓ又は－ＯＴｆであり；

Ｒ’は、C_1 ~ C_{10} のアルキル、アルカノール又はアルキルカルボキシであり；

Ｒ”は、C_1 ~ C_{10} のアルキル、アリール、複素環、アルカノール又はアルキルカルボキシである。

【０２２３】

実施態様の１つでは、R_a はメチルである。

別の実施態様では、R_b は－Ｂｒである。

スキーム５にて上で説明される別の実施態様では、式２２のイソキノリン化合物は、塩基の存在下、式２２の化合物を作製するのに十分な温度にて式２０の化合物と式２１の化合物をしばらく接触させることを含む方法によって作製することができる。

【０２２４】

実施態様の１つでは、約１当量の式２１の化合物当たり、約０．１～約１０当量の式２０の化合物が使用される。

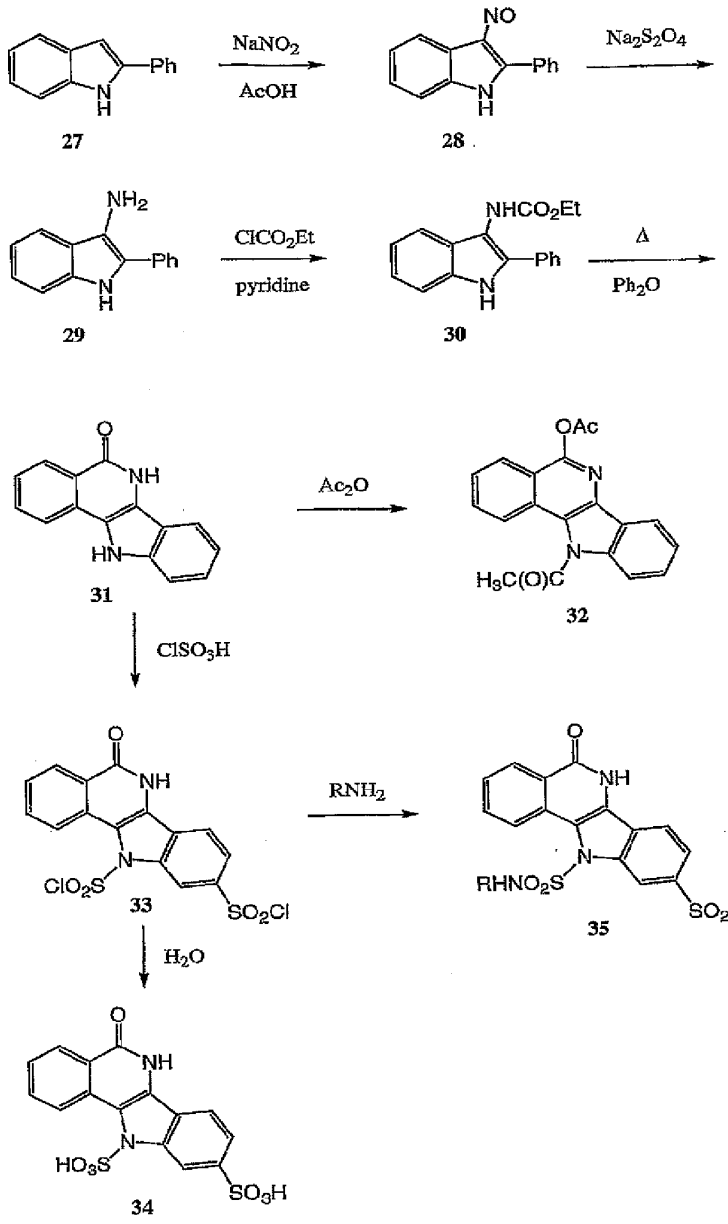
別の実施態様では、約１当量の式２１の化合物当たり、約０．５～約５当量の式２０の化合物が使用される。

【０２２５】

さらに別の実施態様では、約１当量の式２１の化合物当たり、約１～約２当量の式２０の化合物が使用される。
実施態様の１つでは、約１当量の式２１の化合物当たり、約１～約１０当量の塩基が使用される。
【０２２６】
別の実施態様では、約１当量の式２１の化合物当たり、約３～約７当量の塩基が使用される。
その上別の実施態様では、約１当量の式２１の化合物当たり、約５～約６当量の塩基が使用される。
【０２２７】
方法での使用に好適な塩基は、たとえば、トリエチルアミン、ジイソプロピルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ルチジン及びイミダゾールのような有機塩基、並びに、たとえば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム及び炭酸セシウムのようなアルカリ金属炭酸塩のような無機塩基である。
【０２２８】
実施態様の１つでは、塩基は炭酸カリウムである。
別の実施態様では、塩基はトリエチルアミンである。
方法は、たとえば、アセトニトリル、塩化メチレン、クロロホルム、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、アセトン、ベンゼン、ジエチルエーテル、水又はこれらの混合物のような溶媒の存在下で行うことができる。
【０２２９】
実施態様の１つでは、溶媒はＤＭＦである。
別の実施態様では、溶媒は、アセトニトリルである。
さらに別の実施態様では、溶媒は実質的に無水であり、すなわち、約１％未満の水を含む。
【０２３０】
実施態様の１つでは、方法は約１時間～約９６時間の時間で実施される。
別の実施態様では、方法は約１８時間～約７２時間の時間で実施される。
さらに別の実施態様では、方法は約２４時間～約４８時間の時間で実施される。
【０２３１】
実施態様の１つでは、方法は約２５℃～約２００℃の温度にて実施される。
別の実施態様では、方法は約５０℃～約１５０℃の温度にて実施される。
さらに別の実施態様では、方法は約７５℃～約１２５℃の温度にて実施される。
【０２３２】
スキーム６は、本発明の窒素置換のイソキノリン誘導体を作製するのに有用な方法を説明する。
【０２３３】

【化２２】

スキーム6



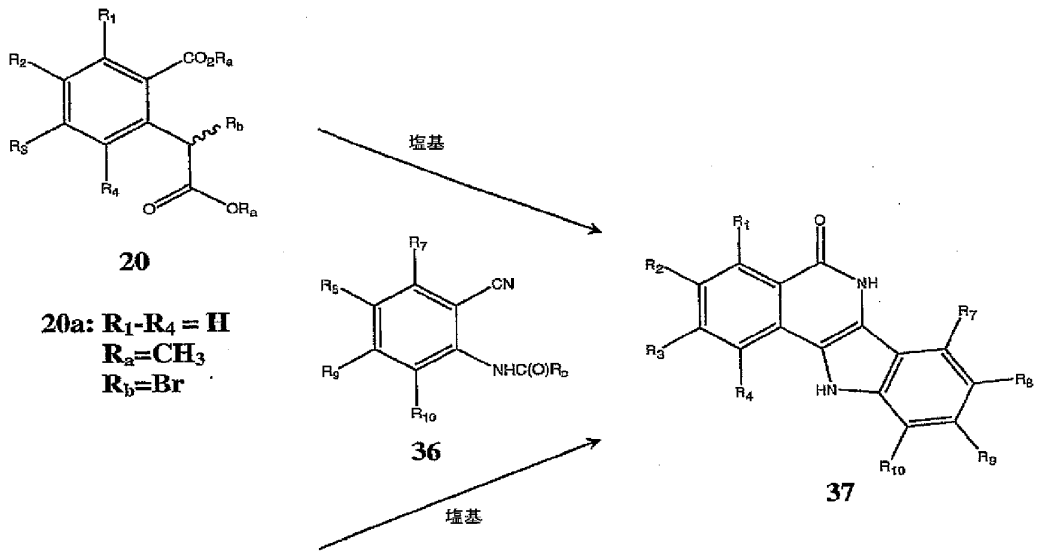
【０２３４】

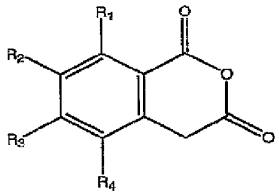
スキーム７にて以下で説明する代替の実施態様では、一般式３７の窒素置換イソキノリン誘導体は、塩基の存在下、式３７の化合物を作製するのに十分な温度にて式３６の化合物と式１１又は式２０の化合物をしばらく接触させることを含む方法によって作製することができる。

【０２３５】

【化２３】

スキーム7





11

【０２３６】
スキーム中、
R_1～R_4及びR_7～R_{10}は式（Ｉ）に関して上記と同義であり；
R_aの各存在は、独立してC_1～C_5のアルキルであり；
R_bは、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－ＯＭｓ、－ＯＴｓ又は－ＯＴｆであり；
R_cは、C_1～C_5のアルキルである。
【０２３７】
実施態様の１つでは、R_aはメチルである。
別の実施態様では、R_bは－Ｂｒである。
さらなる実施態様では、R_aはメチルであり、且つR_bは－Ｂｒである。
【０２３８】
さらに別の実施態様では、R_cはメチルである。
実施態様の１つでは、約１当量の式３６の化合物当たり、約０．１～約１０当量の式１１の化合物が使用される。
【０２３９】
別の実施態様では、約１当量の式３６の化合物当たり、約０．５～約５当量の式１１の化合物が使用される。

さらに別の実施態様では、約１当量の式３６の化合物当たり、約１～約２当量の式１１の化合物が使用される。

【０２４０】

実施態様の１つでは、約１当量の式３６の化合物当たり、約０．１～約１０当量の式２０の化合物が使用される。

別の実施態様では、約１当量の式３６の化合物当たり、約０．５～約５当量の式２０の化合物が使用される。

【０２４１】

さらに別の実施態様では、約１当量の式３６の化合物当たり、約１～約２当量の式２０の化合物が使用される。

実施態様の１つでは、約１当量の式３６の化合物当たり、約１～約１０当量の塩基が使用される。

【０２４２】

別の実施態様では、約１当量の式１１の化合物当たり、約３～約７当量の塩基が使用される。

その上別の実施態様では、約１当量の式１１の化合物当たり、約５～約６当量の塩基が使用される。

【０２４３】

スキーム７の方法の使用に好適な塩基は、たとえば、トリエチルアミン、ジイソプロピルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ルチジン及びイミダゾールのような有機塩基、並びに、たとえば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム及び炭酸セシウムのようなアルカリ金属炭酸塩のような無機塩基である。

【０２４４】

実施態様の１つでは、塩基は炭酸カリウムである。

別の実施態様では、塩基はトリエチルアミンである。

スキーム７の方法は、たとえば、アセトニトリル、塩化メチレン、クロロホルム、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、アセトン、ベンゼン、ジエチルエーテル、水又はこれらの混合物のような溶媒の存在下で行うことができる。

【０２４５】

実施態様の１つでは、溶媒はＤＭＦである。

別の実施態様では、溶媒は、アセトニトリルである。

さらに別の実施態様では、溶媒は実質的に無水であり、すなわち、約１％未満の水を含む。

【０２４６】

実施態様の１つでは、スキーム７の方法は約１時間～約９６時間の時間で実施される。

別の実施態様では、スキーム７の方法は約１８時間～約７２時間の時間で実施される。

さらに別の実施態様では、スキーム７の方法は約２４時間～約４８時間の時間で実施される。

【０２４７】

実施態様の１つでは、スキーム７の方法は約２５℃～約２００℃の温度にて実施される。

別の実施態様では、スキーム７の方法は約５０℃～約１５０℃の温度にて実施される。

【０２４８】

さらに別の実施態様では、スキーム７の方法は約７５℃～約１２５℃の温度にて実施される。

式３７の化合物を調製するための一般的手順

＜ホモフタレートから＞

不活性の雰囲気下、ＤＭＦのような溶媒中の式２０のホモフタレート（約１当量）と式３６のＮ－アシルアントラニロニトリル（約１～約２当量）の溶液に、炭酸カリウムのような塩基（約５当量）を加え、約１００℃にて約４８時間、反応物を撹拌し、次いで室温

に冷却する。次いで反応混合物を約１Ｎの水酸化ナトリウムに注ぎ、得られた溶液をＥｔＯＡｃで抽出する。ＥｔＯＡｃ層を１ＮのＨＣｌと飽和塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、ろ過し減圧下で濃縮する。トルエンで温めることを用いて、得られた残渣を溶解し、得られた溶液を室温に冷却し、ヘキサンを用いて沈殿させる。固形沈殿物をろ過し、ヘキサンを用いて洗浄し、５０℃の減圧オーブンで７２時間乾燥し、式３６の化合物を得る。

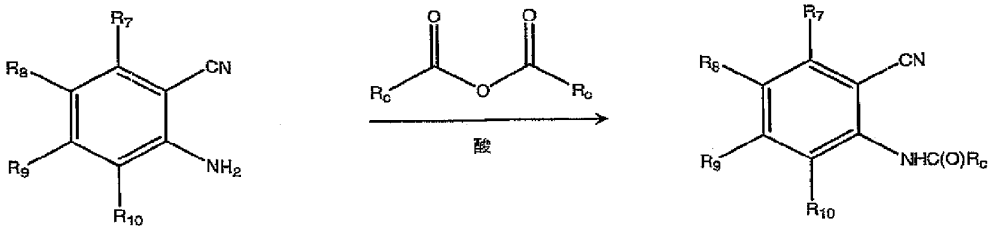
【０２４９】

スキーム７における有用な中間体であるフェニルアミド３６の合成は、スキーム８にて以下で記載される。この手順では、酸の存在下、塩化アシル又は無水物を用いて、式３８のシアノアニリン化合物のアミン基がアシル化される。

【０２５０】

【化２４】

スキーム8



38

36

36a: R_7-R_{10}=-H
Rc = CH_3

【０２５１】

スキーム中、

R_7～Ｒは、式（Ｉ）に関して上記と同義であり；

R_cは、C_1～C_5のアルキルである。

【０２５２】

スキーム８の方法での使用に好適な酸には、硫酸及びリン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

実施態様の１つでは、酸は硫酸である。

【０２５３】

別の実施態様では、R_cはメチルである。

スキーム８の方法は、アセトニトリル、塩化メチレン、クロロホルム、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、アセトン、ベンゼン、ジエチルエーテル又はこれらの混合物を含むが、これらに限定されない溶媒の存在下で行うことができる。

式３６の化合物を作製するための一般的手順

９０℃にて、無水酢酸（約６当量）中の式３８の化合物（約１当量）の溶液に、硫酸（触媒的）を一滴加え、得られた反応物を約９０℃にて約２時間撹拌し、次いで、室温にて約１２時間静置する。得られた反応混合物を氷上に注ぎ、得られた溶液を約２時間撹拌し、その後、１Ｎの水酸化ナトリウムを用いて、溶液を約ｐＨ７．０に中和する。得られた沈殿物をろ過し、水で洗浄し（約４回）減圧下で約７２時間乾燥して式３６の化合物を得る。

【０２５４】

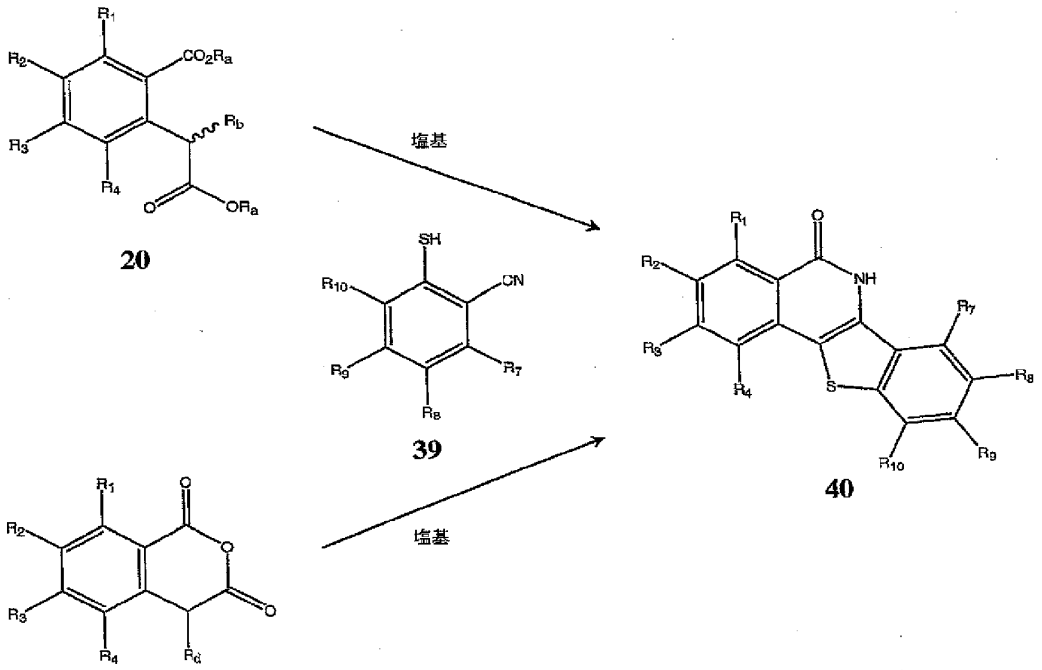
スキーム９にて以下で説明される別の実施態様では、式４０のイオウ置換のイソキノリ

ン誘導体は、塩基の存在下、式４０の化合物を作製するのに十分な温度にて式３９の化合物と式１１ａ又は式２０の化合物をしばらく接触させることを含む方法によって作製することができる。

【０２５５】

【化２５】

スキーム9



【０２５６】

R_1～R_4及びR_7～R_{10}は式（Ｉ）に関して上記と同義であり；

R_aの各存在は、独立してC_1～C_5のアルキルであり；

R_bは、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－ＯＭｓ、－ＯＴｓ又は－ＯＴｆであり；

R_dは、－Ｈ又は－Ｂｒである。

【０２５７】

実施態様の１つでは、R_aはメチルである。

別の実施態様では、R_bは－Ｂｒである。

さらに別の実施態様では、R_aはメチルであり、且つR_bは－Ｂｒである。

【０２５８】

その上別の実施態様では、R_dは－Ｈである。

さらなる実施態様では、R_dは－Ｂｒである。

実施態様の１つでは、約１当量の式３９の化合物当たり、約０．１～約１０当量の式１１ａの化合物が使用される。

【０２５９】

別の実施態様では、約１当量の式３９の化合物当たり、約０．５～約５当量の式１１ａの化合物が使用される。

さらに別の実施態様では、約１当量の式３９の化合物当たり、約１～約２当量の式１１

ａの化合物が使用される。
【０２６０】
実施態様の１つでは、約１当量の式３９の化合物当たり、約０．１～約１０当量の式２０の化合物が使用される。
別の実施態様では、約１当量の式３９の化合物当たり、約０．５～約５当量の式２０の化合物が使用される。
【０２６１】
さらに別の実施態様では、約１当量の式３９の化合物当たり、約１～約２当量の式２０の化合物が使用される。
実施態様の１つでは、約１当量の式３９の化合物当たり、約１～約１０当量の塩基が使用される。
【０２６２】
別の実施態様では、約１当量の式３９の化合物当たり、約３～約７当量の塩基が使用される。
その上別の実施態様では、約１当量の式３９の化合物当たり、約５～約６当量の塩基が使用される。
【０２６３】
スキーム９の方法での使用に好適な塩基は、たとえば、トリエチルアミン、リチウムＮ－ジイソプロピルアミド、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ルチジン及びイミダゾールのような有機塩基、並びに、たとえば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム及び炭酸セシウムを含むアルカリ金属炭酸塩のような無機塩基である。
【０２６４】
実施態様の１つでは、塩基は炭酸カリウムである。
別の実施態様では、塩基はトリエチルアミンである。
スキーム９の方法は、たとえば、アセトニトリル、塩化メチレン、クロロホルム、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、アセトン、ベンゼン、ジエチルエーテル、水又はこれらの混合物のような溶媒の存在下で行うことができる。
【０２６５】
実施態様の１つでは、溶媒はＤＭＦである。
別の実施態様では、溶媒はアセトニトリルである。
実施態様の１つでは、スキーム９の方法は約１時間～約１２０時間の時間で実施される。
【０２６６】
別の実施態様では、スキーム９の方法は約２４時間～約９６時間の時間で実施される。
さらに別の実施態様では、スキーム９の方法は約６０時間～約８０時間の時間で実施される。
【０２６７】
実施態様の１つでは、スキーム９の方法は約０℃～約２００℃の温度にて実施される。
別の実施態様では、スキーム９の方法は約２５℃～約１５０℃の温度にて実施される。
さらに別の実施態様では、スキーム９の方法は約５０℃～約１００℃の温度にて実施される。
式４０の化合物を調製するための一般的手順
＜無水ホモフタル酸から＞
不活性の雰囲気下で、アセトニトリルのような好適な溶媒中の式３９のメルカプトベンゾニトリル（約１．０当量）と式１１ａの無水ホモフタル酸（約２．０当量）の溶液を反応物質がすべて溶液になるまで撹拌しながら温める。トリエチルアミンのような好適な塩基（約１～約５当量）を加え、約９０℃にて約７２時間、反応物を撹拌し、次いで、室温に冷却する。反応混合物をろ過し、メタノールを用いて、回収した固形物を洗浄し、次いで約５０℃の減圧オーブンにて乾燥して式４０の化合物を得る。
＜ホモフタレートから＞

不活性の雰囲気下、アセトニトリルのような好適な溶媒中の式３９のメルカプトベンゾニトリル（約１．０当量）と式２０のホモフタレート（約２．０当量）の溶液を反応物質がすべて溶液になるまで撹拌しながら温める。トリエチルアミンのような好適な塩基（約１～約５当量）を加え、約９０℃にて約７２時間、反応物を撹拌し、次いで、室温に冷却する。反応混合物をろ過し、メタノールを用いて、回収した固形物を洗浄し、次いで約５０℃の減圧オーブンにて乾燥して式４０の化合物を得る。

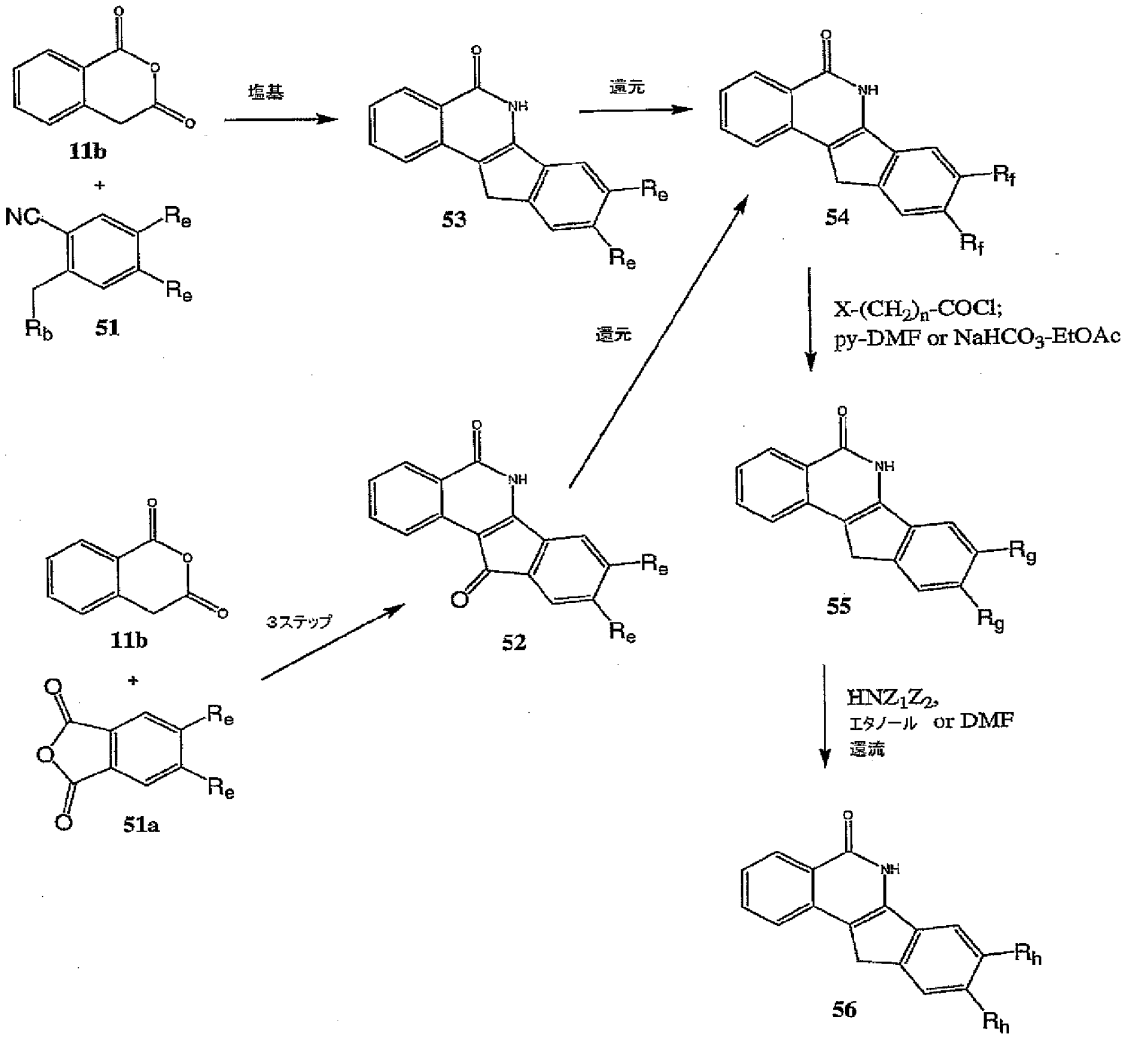
【０２６８】

式（ＩＶ）のイソキノリン誘導体を作製する方法をスキーム１０にて以下で説明する。

【０２６９】

【化２６】

スキーム10



【０２７０】

スキーム中、ｎ、Z_1及びZ_2は式（ＩＶ）に関して上記と同義であり；

Ｘは、臭化物又は塩化物のような脱離基であり；

R_bは、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－ＯＭｓ、－ＯＴｓ又は－ＯＴｆであり；

R_eの一方は－Ｈであり、R_eの他方は－NO_2であり；

R_fの一方は－Ｈであり、R_fの他方は－NH_2であり；
R_gの一方は－Ｈであり、R_gの他方は－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－Ｘであり；
R_hの一方は－Ｈであり、R_hの他方は－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2である。

【０２７１】

実施態様の１つでは、R_bは－Ｂｒである。

式５６の化合物を調製するための一般的手順

アセトニトリルのような好適な溶媒中の無水ホモフタル酸（１１ｂ）（約１．０当量）に、式５１の化合物（約１～約２当量）を加え、次いで、トリエチルアミン（約１～約５当量）のような好適な塩基を加える。得られた反応混合物を約１時間撹拌し、その時点で沈殿物が出現する。次いで、反応混合物を約２０時間加熱還流し、室温に冷却し、ろ過する。回収した固形物をアセトニトリルで洗浄し、減圧下で乾燥して式５３の化合物を得る。

【０２７２】

２段階で無水ホモフタル酸（１１ｂ）と無水安息香酸から化合物５２を調製する。ＨＣｌのような酸の存在下、ピリジンのような好適な溶媒中で無水ホモフタル酸と無水安息香酸を反応させ；続いて、ピリジン中で無水酢酸と反応させ、加熱還流し、次いでＭｅＯＨ中のNH_3のようなアミンの存在下、還流して式５２の化合物を得る。

【０２７３】

ＤＭＦのような好適な溶媒中の式５２又は５３の化合物の溶液に、炭素上のパラジウムの存在下、ギ酸アンモニウムのような還元剤を加える。反応混合物を９０～１００℃に加熱し、室温に冷却し、ろ過して式５４の化合物を得る。

【０２７４】

式５５のアミドを形成するのに有効な条件下で、式５４の化合物は、Ｘ－（CH_2）$_n$－ＣＯＣｌと反応することができる。

エタノール又はＤＭＦのような溶媒の存在下、式５５の化合物は、式HNZ_1Z_2のアミンと反応することができ、加熱還流によって式５６の化合物を形成する。

【０２７５】

本発明は、以下の実施形態においてさらに説明されるが、それらは請求項に記載される本発明の範囲を限定するものではない。以下の実施形態は例示的なイソキノリン誘導体の合成を説明し、症状を治療すること又は予防することに対する有用性を明らかにしている。

（実施例１）例示となるイソキノリン誘導体の調製

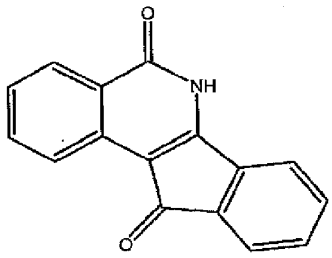
（ａ）一般的方法

Ｖａｒｉａｎ３００ＭＨｚ分光光度計を用いてプロトンＮＭＲのスペクトルを得たが、化学的シフト値（δ）を百万分の１（ｐｐｍ）単位で記録する。シリカゲル６０Ｆ－２５４で事前に被覆したＴＬＣ板を用いてＴＬＣを行い、事前に被覆したワットマン６０ＡＴＬＣ板を用いて調製用ＴＬＣを行った。中間体及び生成物の性状分析はすべて、^{1}Ｈ－ＮＭＲ及び／又はＭＳデータに基づいて行った。

（ｂ）５，６－ジヒドロ－５，１１－ジケト－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（２）の調製

【０２７６】

【化２７】



2

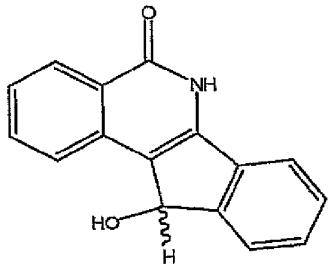
【０２７７】

NH_3／ＭｅＯＨ（７．０Ｎ、７００ｍＬ）中の１（５５ｇ、０．２２モル）（スキーム１）の撹拌された懸濁液を２４時間還流した。次いで、反応混合物を室温に冷却し、ろ過し、ＭｅＯＨで洗浄して、収率８４％にて４６ｇの橙色の前出標記の生成物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ ７．４８－７．６１（ｍ，４Ｈ），７．８０－７．８８（ｍ，１Ｈ），７．８６（ｄ，Ｊ＝８．７Ｈｚ，１Ｈ），８．２２（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），８．４４（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），１３．０５（ｓ，１Ｈ）；^{13}Ｃ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－D_6）：δ １０６．３３，１２１．６３，１２２．９４，１２３．２７，１２４．８０，１２８．４５，１３２．１７，１３３．６０，１３４．０３，１３４．６８，１３４．６８，１３４．８１，１３７．０９，１５６．４１，１６３．７６，１９０．５７；ＭＳ（ＥＳ$^-$）：ｍ／ｚ ２４６．２（Ｍ－１）；Ａｎａｌ．Ｃａｌｃｄ ｆｏｒ $C_{16}H_9NO_2$：Ｃ，７７．７２；Ｈ，３．６７；Ｎ，５．６７；Ｆｏｕｎｄ：Ｃ，７７．５４；Ｈ，３．６９，Ｎ，５．６９。

（ｃ）（±）１１－ヒドロキシ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（３ａ）の調製

【０２７８】

【化２８】



3a

【０２７９】

ＥｔＯＨ（２５ｍＬ）中の２（２．５ｇ、０．０１モル）の撹拌された懸濁液に、室温にて$NaBH_4$（３．７５ｇ、０．１モル）を少しずつ３０分かけて加えた。反応混合物をさらに２時間撹拌し、次いで０℃に冷却した。次いで１０％のＨＣｌ（１０％溶液）で粉砕した。沈殿して得られた固形物をろ過し、水及びＭｅＯＨで洗浄して３ａ（２．３２６ｇ、９２％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ ５．５８（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），５．７８（ｄ，Ｊ＝８．７Ｈｚ，１Ｈ），７．３３－７．８９（ｍ，６Ｈ），７．９５（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ，８．

22 (d, J=7.8Hz, 1H), 12.29 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO-d_6): S 77.44, 118.81, 120.15, 124.28, 125.04, 125.67, 126.34, 128.46, 128.64, 128.95, 133.27, 135.62, 136.12, 139.93, 148.55, 163.69; MS (ES^+): m/z 250.1 (M+1); Anal. Calcd for $C_{16}H_{11}NO_2$: C, 77.10; H, 4.45; N, 5.62. Found: C, 77.01; H, 4.57, N, 5.59。

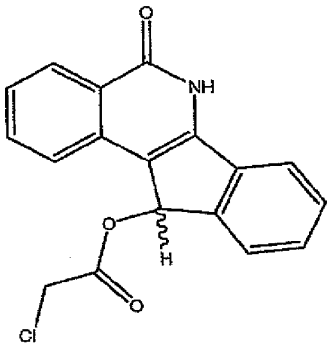
【0280】

同様に、2をそれぞれ、MeMgI及びm-MeO-C_6H_4MgBrと反応させることによって化合物、(±)11-ヒドロキシ-11-メチル-5,6-ジヒドロ-5-オキソ-11H-インデノ[1,2-c]イソキノリン(3b)及び(±)11-ヒドロキシ-11-(3-メトキシフェニル)-5,6-ジヒドロ-5-オキソ-11H-インデノ[1,2-c]イソキノリン(3c)を調製した。

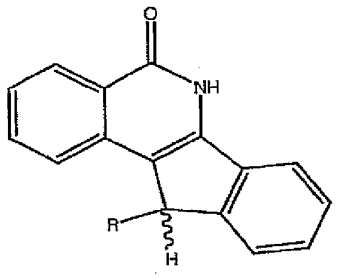
(d)(±)11-置換-5,6-ジヒドロ-5-オキソ-11H-インデノ[1,2-c]イソキノリン(5a~e)の調製

【0281】

【化29】



4a



5a-e

5a: R = NMe_2
5b: R = NEt_2
5c: R = -N-methyl-piperazin-4-yl
5d: R = -piperidine-1-yl
5e: R = -morpholin-1-yl

【0282】

ピリジン(10mL)中の3a(0.5g、2ミリモル)の撹拌された懸濁液に0℃にて塩化クロロアセチル(0.81g、0.006モル)を加えた。反応混合物を室温に温め、24時間撹拌した。次いで反応混合物を氷上に注ぎ、EtOAcで抽出した。有機層を分離し、乾燥し、濃縮して粗精製化合物4aを得、それをさらにジメチルアミンで処理し、室温にて24時間撹拌した。反応混合物を氷上に注ぎ、10%HClで処理した。次いで飽和$NaHCO_3$水溶液で反応混合物を塩基性化し、得られた固形物をろ過して所望の生成物5aを得た。^{1}H NMR (DMSO-D_6): δ 2.31 (s, 6H), 5.00 (s, 1H), 7.28-7.45 (m, 3H), 7.68-7.73 (m, 2H), 7.95 (d, J=6.9Hz, 1H), 8.10 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.21 (d, 7=8.1Hz, 1H), 12.26 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO-D_6): δ

６８．０９，１１６．２８，１２０．５２，１２４．５８，１２５．７４，１２６．２７，１２６．３４，１２７．６８，１２８．６４，１３３．０２，１３６．２７，１４４．４５，１６３．８０；ＭＳ（ＥＳ$^+$）：ｍ／ｚ２７７．２（Ｍ＋１）。

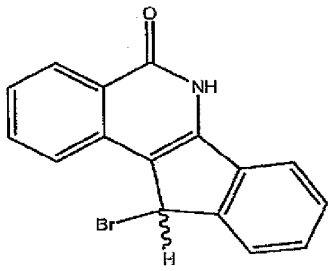
【０２８３】

上記のような４ａをそれぞれ、ジエチルアミン、ピペリジン、Ｎ－メチルピペラジン及びモルフォリンと反応させることによって、以下の化合物、（±）１１－ジエチルアミノ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５ｂ）、（±）１１－（Ｎ－メチルピペラジン）－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５ｃ）、（±）１１－（ピペリジン）－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５ｄ）及び（±）１１－モルフォリノ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５ｅ）も調製した。

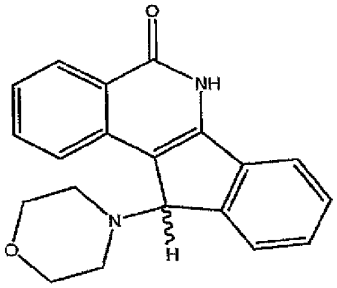
（ｅ）（±）１１－モルフォリノ－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５ｅ）の調製

【０２８４】

【化３０】



4b



5e

【０２８５】

トリフルオロ酢酸（５ｍＬ）中の３ａ（０．６ｇ、２．４ミリモル）の撹拌された懸濁液に、室温にて三臭化リン（CH_2Cl_2 ３ｍＬ中０．１Ｍ溶液）を加え、反応混合物を８時間撹拌した。反応混合物を氷上に注ぎ、得られた固形物をろ過してブロモ化合物４ｂ（０．６１ｇ、７６％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ７．３５－７．５０（ｍ，３Ｈ），７．６１（ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１Ｈ），７．７３－７．８２（ｍ，２Ｈ），７．９４（ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１Ｈ），８．２３（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ，１２．４１（ｓ，１Ｈ）；^{13}ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ５２．０６，７９．３５，１１４．４３，１２０．５６，１２３．５８，１２５．２７，１２５．５０，１２６．６８，１２８．５５，１２８．８６，１２９．６６，１３３．７３，１３５．９１，１３６．６１，１４１．３９，１４３．９５，１６３．７４。

【０２８６】

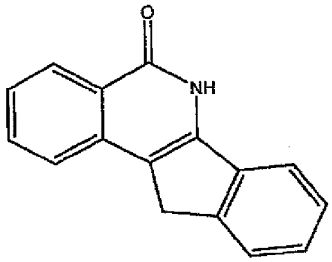
化合物４ｂ（０．５ｇ）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）に懸濁し、室温にて過剰のモルフォリン（約５．０当量）で処理し、６０℃にて３時間撹拌した。反応混合物を氷上に注ぎ、酢酸エチル（４０ｍＬ）で希釈した。有機層を分離し、希ＨＣｌ（１０％溶液）で抽出し、次いで水性層を飽和$NaHCO_3$水溶液で塩基性化し、沈殿して得られた固形物をろ過し、乾燥して化合物５ｅ（０．４６ｇ、９０％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ２．５６（ｍ，４Ｈ），３．４９（ｍ，４Ｈ），５．０４（ｓ

，１Ｈ），７．３１－７．４５（ｍ，３Ｈ），７．６５－７．７６（ｍ，２Ｈ），７．９６（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），８．２０－８．２４（ｍ，２Ｈ），１２．２９（ｓ，１Ｈ），^{13}ＣＮＭＲ（ＤＭＳＯ－$Ｄ_6$）：δ４９．３６，６７．６２，６８．１１，１１５．２０，１２０．６０，１２４．４７，１２５．８４，１２６．３４，１２６．４１，１２７．７６，１２８．３０，１２８．７２，１３３．０９，１３６．３０，１３８．９６，１４０．３５，１４４．４４，１６３．６７。

（ｆ）５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（６）の調製

【０２８７】

【化３１】



6

【０２８８】

方法Ｉ：トリフルオロ酢酸（１０ｍＬ）中のアルコール３ａ（０．３５ｇ、１．４ミリモル）の撹拌された溶液に、室温にてトリエチルシラン（０．８１２ｇ、７ミリモル）を加え、反応混合物を２４時間撹拌した。減圧下、トリフルオロ酢酸を蒸発させ、得られた粗生成物にＥｔＯＡｃを加えた。得られた固形物をろ過し、$Ｈ_2Ｏ$及びＥｔＯＡｃで洗浄して前出標記の化合物６（０．２８５ｇ、８７％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－$Ｄ_6$）：δ３．８９（ｓ，２Ｈ），７．３０－７．４７（ｍ，３Ｈ），７．５９（ｄ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１Ｈ），７．７２－７．７４（ｍ，２Ｈ），７．９８（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），８．２３（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），１２．３１（ｓ，１Ｈ）；^{13}ＣＮＭＲ（ＤＭＳＯ－$ｄ_6$）：δ３３．５１，１１６．５０，１２０．１９，１２４．０１，１２５．５１，１２５．５５，１２６．４２，１２７．５０，１２７．６８，１２８．５６，１３３．４５，１３６．３９，１３７．５３，１４０．１８，１４３．８０，１６３．４６；ＭＳ（ＥＳ）：ｍ／ｚ ２３２．１（Ｍ－１）；Ａｎａｌ．Ｃａｌｃｄ ｆｏｒ $Ｃ_{16}Ｈ_{11}ＮＯ$：Ｃ，８２．３８；Ｈ，４．７５；Ｎ，６．００．Ｆｏｕｎｄ：Ｃ，８１．７９；Ｈ，４．４５，Ｎ，５．９９。

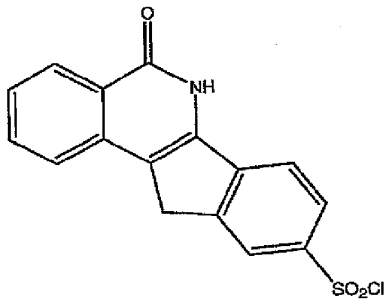
【０２８９】

方法ＩＩ：トリフルオロ酢酸（２．５Ｌ）中の２（４０ｇ、０．１６モル）の撹拌された懸濁液に、室温にてトリエチルシラン（９４ｇ、０．８モル）を少しずつ加え、反応混合物を９６時間撹拌し、その間、反応の進行をＴＬＣ（溶離剤－５％ＭｅＯＨ／$ＣＨ_2Ｃｌ_2$）を用いてモニターした。反応混合物をゆっくり氷上に注ぎ、ろ過し大量の$Ｈ_2Ｏ$とＭｅＯＨで洗浄し、減圧下で乾燥して、前出標記の化合物６（３３．１ｇ、８８％）を得たが、そのスペクトルデータは、方法Ｉを用いて得られた化合物６の試料と同一であった。

（ｇ）９－クロロスルホニル－５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（７）の調製

【０２９０】

【化３２】



7

【０２９１】

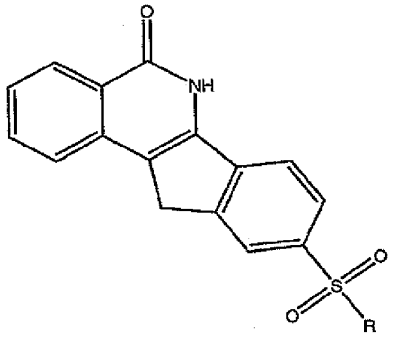
０℃にて、化合物６（４０ｇ、０．１７モル）を少しずつクロロスルホン酸（１１２ｍＬ、１．７１モル）に加え、反応混合物を室温に温め、２時間撹拌した。反応混合物をゆっくり氷上に注ぎ、得られた黄色の固形物をろ過し、水とＥｔＯＡｃで十分に洗浄し、減圧下で乾燥して、前出標記の生成物７（５２ｇ、９２％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ ３．９１（ｓ，２Ｈ），７．４３－７．４８（ｍ，１Ｈ），７．６０（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），７．７４－７．７６（ｍ，２Ｈ），７．７９（ｓ，１Ｈ），７．９０（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，ＩＨ），８．２３（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），Ａｎａｌ．Ｃａｌｃｄ．ｆｏｒ $C_{16}H_{12}ClNO_4S$：Ｃ，５４．９４；Ｈ，３．４６；Ｎ，４．００．Ｆｏｕｎｄ：Ｃ，５５．２８；Ｈ，３．４３，Ｎ，３．６８，Ｋａｒｌ－Ｆｉｓｈｅｒ，２．９５。

（ｈ）５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリンの９－スルホンアミド誘導体（８ａ～ａｆ）の調製

【０２９２】

OnCusp
Ex. 1002

【化３３】



8a-af

a. R=4-Methyl-piperazine-1-yl
b. R=4-CH_2CO_2Me-piperazine-1-yl
c. R=4-CH_2CH_2OH-piperazine-1-yl
d. R=imidazole-1-yl
e. R=L-prolinol
f. R=morpholine-4-yl
g. R=$NHCH_2CH_2NMe_2$
h. R=$NHCH_2CH_2$-piperidine-1-yl
i. R=$NHCH_2CH_2N$-(pyridine-2-yl)
j. R=$NHCH_2CH_2$-morpholine-4-yl
k. R=$NHCH_2CH_2$-(2-N-Me-tetrahydropyrrolidine-1-yl)
l. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-morpholine-4-yl
m. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-(tetrahydropyrrolidine-1-yl)
n. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-imidazole-1-yl
o. R=$NHCH_2CH_2CH_2$-(4-methylpiperazine-1-yl)
p. R=$N(CH_2CH_2NEt_2)_2$
q. R=$N(CH_2CH_2NMe_2)_2$
r. R=$N(CH_2CH_2OH)_2$
s. R=$NHCH_2CH_2CN$
t. R=$NHC(NH)NH_2$
u. R=-NH[4-(1,2,4-triazole)]
v. R=-NH[4-(*N*-morpholine)phenyl]
w. R=$-NHCH_2CH_2$(4-N-benzylpiperidine)
x. R=$-NHCH_2CH_2$(2-thienyl)
y. R=-NH[1-(4-azabenzimidazole)]
z. R=-NH[1-(4-(2'-pyridyl)piperazine)]
aa. R=$-NHCH_2CH_2N[CH_2CH_2OH]_2$
ab. R=-NH[1-(4-benzlpiperazine)]
ac. R=$-NH_2$
ad. R=$-NHCH_2CH_2Ph$
ae. R=$-NHCH_2CH_2$[4-OMe(phenyl)]
af. R=-NHC(O)(*N*-morpholine)

【０２９３】

方法Ｉ：ＥｔＯＡｃ中の３－（４－モルフォリノ）－１－プロピルアミン（１７．２８ｇ、０．１２モル）の撹拌された懸濁液に、飽和$NaHCO_3$水溶液（３００ｍＬ）を加え、混合物を１５分間撹拌した。次いで室温にて、化合物７（４．０ｇ、０．０１２モル）を少しずつ導入した。反応混合物を２４時間撹拌し、ろ過し、H_2O、ＥｔＯＡｃ及びＭｅＯＨで洗浄し、ＭｅＯＨ中で３０分間還流し、まだ温かい間にろ過し、ＭｅＯＨで洗浄して遊離の塩基として化合物８１（２．３３ｇ、４４％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ １．４７－１．５２（ｍ，２Ｈ），２．１６－２．２１（ｍ，４Ｈ），２．４７－２．４８（ｍ，２Ｈ），３．４４－３．４８（ｍ，２Ｈ），３．２３（ｍ，４Ｈ），４．０２（ｓ，２Ｈ），７．４９－７．５８（ｍ，１Ｈ），７．７８－７．８２（ｍ，３Ｈ），７．９７（ｓ，１Ｈ），８．１４（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），８．２６（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），９．５９（ｓ，１Ｈ），１２．４２（ｓ，１Ｈ）。

【０２９４】

方法Ｉによって、しかし、３－（４－モルフォリノ）－１－プロピルアミンをそれぞれ、イミダゾール、２－ジメチルアミノ－エチルアミン、２－（Ｎ－ピペリジニル）－エチルアミン、２－（Ｎ－モルフォリニル）－エチルアミン、３－（Ｎ－テトラヒドロピロリジニル）－プロピルアミン、３－（Ｎ－イミダゾリル）－プロピルアミン、３（Ｎ－（４－メチルピペラジニル）－プロピルアミン、ジ－（２－（ジエチルアミノ）－エチル）アミン、ジ－（２（ジメチルアミノ）－エチル）アミン及びジ－（２－ヒドロキシエチル）アミンで置換することによって８ｄ、８ｇ、８ｈ、８ｊ、８ｍ～８ｒの遊離の塩基も調製した。

【０２９５】
方法ＩＩ：CH_2Cl_2（１００ｍＬ）中の３－（４－モルフォリノ）－１－プロピルアミン（４．２５０ｇ）の撹拌された懸濁液に、７（１．９５０ｇ、５．８９ミリモル）を加え、得られた混合物を５分間撹拌した。続いて、トリエチルアミン（３ｍＬ）を加え、反応混合物を室温にて２４時間撹拌した。この後、沈殿物を回収し、ＭｅＯＨ（１００ｍＬで２回）で洗浄し、粗精製した固形生成物を丸底フラスコに移した。この物質をＭｅＯＨ（２００ｍＬ）で希釈し、３０分間加熱還流し、まだ温かい間ろ過した。得られたろ過物をＭｅＯＨ（２００ｍＬ）で洗浄して８１の遊離の塩基（１．４６０ｇ、５６％）として所望の生成物を得た。

【０２９６】
方法ＩＩを用いて、しかし、３－（４－モルフォリノ）－１－プロピルアミンをそれぞれ、ほぼ等量のイミダゾール、２－ジメチルアミノ－エチルアミン、２－（Ｎ－ピペリジニル）－エチルアミン、２－（Ｎ－モルフォリニル）－エチルアミン、３－（Ｎ－テトラヒドロピロリジニル）－プロピルアミン、３－（Ｎ－イミダゾリル）－プロピルアミン、３（Ｎ－（４－メチルピペラジニル）－プロピルアミン、ジ－（２－ジエチルアミノ）－エチルアミン、ジ－（２（ジメチルアミノ）－エチル）アミン及びジ－（２－ヒドロキシエチル）アミンで置換することによって８ｄ、８ｇ、８ｈ、８ｊ、８ｍ、８ｎ、８ｏ、８ｐ、８ｑ及び８ｒの遊離の塩基を調製した。

（ｋ）８１のメシル酸塩の調製

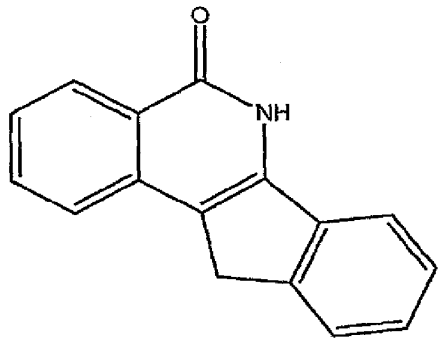
０℃にて、遊離の塩基８１（１．０ｇ）をメタンスルホン酸（１０ｍＬ）に加え、得られた混合物を室温に温め、２時間撹拌した。次いで、反応混合物を冷却ＭｅＯＨ（１００ｍＬ、－１０℃～０℃の間）に注ぎ、沈殿した固形物をろ過し、ＭｅＯＨ（１００ｍＬ）で洗浄し、減圧下で乾燥した。次いで、乾燥した固形物を水（１００ｍＬ）に溶解し、ろ過し、凍結乾燥してメタンスルホン酸一水和物塩８１（１．０２０ｇ、８４％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ １．７５－１．８５（ｍ，２Ｈ），２．３５（ｓ，３Ｈ），２．７８－２．８４（ｍ，２Ｈ），２．９６－３．１２（ｍ，４Ｈ），３．３６（ｄ，Ｊ＝１２．３Ｈｚ，２Ｈ），３．６１（ｔ，Ｊ＝１１．４Ｈｚ，２Ｈ），３．９４（ｄ，Ｊ＝１２．９Ｈｚ，２Ｈ），４．０３（ｓ，２Ｈ），７．４９－７．５５（ｍ，１Ｈ），７．７６－７．８４（ｍ，３Ｈ），７．９９（ｄ，Ｊ＝０．９Ｈｚ，１Ｈ），８．１５（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），８．２５（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），９．５９（ｓ，１Ｈ），１２．４２（ｓ，１Ｈ）；^{13}Ｃ ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ ２４．２７，３３．８６，５１．８９，５４．５１，６４．０２，１１９．７０，１２０．３９，１２３．５３，１２６．０９，１２６．４５，１２８．６３，１３３．６６，１３５．８０，１３８．７１，１４１．２１，１４４．５７，１６３．２９；Ａｎａｌ．Ｃａｌｃｄ ｆｏｒ $C_{24}H_{31}N_3O_4S_2$：Ｃ，５２．０６；Ｈ，５．４６；Ｎ，７．５９，Ｋａｒｌ－Ｆｉｓｈｅｒ，３．３６．Ｆｏｕｎｄ：Ｃ，５１．８５；Ｈ，５．３５，Ｎ，７．３０，Ｋａｒｌ－Ｆｉｓｈｅｒ，４．３２。

【０２９７】
同様に、メタンスルホン酸をそれぞれ、ほぼ等量のＨＣｌ、H_2SO_4及びCH_3COOHで置換することによって８１のＨＣｌ、H_2SO_4、CH_3COOH及びコハク酸の塩を調製した。

（ｌ）５，６－ジヒドロ－５－オキソ－１１Ｈ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（６）の調製

【０２９８】

【化３４】



6

【０２９９】

アセトニトリル（１５ｍＬ）中の無水ホモフタル酸（３２４ｍｇ、２．０ミリモル）の溶液に、２－シアノベンジルブロミド（４３１ｍｇ、２．０ミリモル、１．０当量）及びトリエチルアミン（５ｍＬ）を加えた。室温にて不活性の雰囲気下、反応物を３０分間撹拌し、その後、黄色の沈殿物が出現した。次いで、反応混合物を１８時間加熱還流し、得られた白色の沈殿物をろ過し、アセトニトリル（８ｍＬで３回）を用いて洗浄し、減圧下乾燥して白色結晶の固形物として化合物６を得た。収量＝１５０ｍｇ（３２％）

（ｍ）α－ブロモジメチルホモフタレート（２０ａ）の調製

ジメチルホモフタレート（８３．１ｇ）をジクロロメタン（２Ｌ）に溶解し、Ｎ－ブロモスクシンイミド（１２１ｇ、１．７当量）を加えた。５００ワットの石英ハロゲン灯によって、得られた懸濁液を１８時間照射し、反応混合物を還流した。次いで、重炭酸ナトリウムの飽和水溶液（４Ｌ）、重亜硫酸ナトリウムの飽和水溶液（２Ｌ）及び塩化ナトリウムの飽和水溶液（２Ｌ）で順次、反応混合物を洗浄した。硫酸ナトリウムを用いて有機層を乾燥し、少量のシリカを加えて極性の不純物を除いた。有機層をろ過し、減圧下で濃縮して暗橙色の油状物として化合物２０ａを得た。収量＝１２０．３ｇ（１００％）

（ｎ）８－メトキシ－６Ｈ－１１－オキサ－６－アザ－ベンゾ［α］フルオレン－５－オン（２２ａ）の調製

α－ブロモジメチルホモフタレート（２０ａ）（１．１６ｇ）及び２－ヒドロキシ－５－メトキシベンゾニトリル（０．６ｇ、４ミリモル、１当量）を温めることによって、アセトニトリル（６ｍＬ）に溶解した。次いで、トリエチルアミン（５．６ｍＬ、１０当量）を加え、不活性の雰囲気下、反応物を４８時間加熱還流し、次いで、室温に冷却した。反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム（４０ｍＬ）で希釈し、得られた懸濁液を２時間撹拌し、次いでろ過した。ろ過物を、１ＮのＨＣｌ（５０ｍＬで２回）、アセトニトリル（５０ｍＬで２回）及びジクロロメタン（５０ｍＬ）で順次洗浄し、次いで５０℃の減圧オーブンで３日間乾燥して白色固形物として化合物２２ａを得た。収量＝０．８１ｇ（７６％）

（ｏ）８－ヒドロキシ－６Ｈ－１１－オキサ－６－アザ－ベンゾ［α］フルオレン－５－オン（２３ａ）の調製

氷槽を用いて８－メトキシ－６Ｈ－１１－オキサ－６－アザ－ベンゾ［α］フルオレン－５－オン（２２ａ）（５．０ｇ）を冷却し、窒素のもと、一定の蒸気の中で三臭化ホウ素（塩化メチレン中１Ｍ、９５ｍＬ、９５ミリモル、５当量）を加えた。不活性の雰囲気下、反応物を２時間加熱還流し、次いで室温に冷却し、水（１５０ｍＬ）に注いだ。得られた懸濁液を１時間撹拌し、ろ過し、固形物を水（２００ｍＬ、２回）で洗浄した。次いで、加熱を用いて、固形物を５Ｎの水酸化ナトリウム（６００ｍＬ）で希釈した。氷槽を用いて得たれた溶液を０℃に冷却し、濃ＨＣｌを用いてｐＨ１に溶液を酸性化した。得ら

れた沈殿物を減圧濾過し、固形物を水（３００ｍＬ、３回）及びジエチルエーテル（３００ｍＬ）で順次洗浄し、５０℃の減圧オーブンで一晩乾燥して灰色固形物として化合物（２３ａ）を得た。収量＝４．７４ｇ（１００％）

（ｐ）３－ニトロソ－２－フェニインドール（２８）の調製

酢酸（２５０ｍＬ）中の２－フェニルインドール（２７）（２５ｇ、０．１２９モル）の溶液を１８℃に冷却し、反応の温度を約２０℃に保持しながら、亜硝酸ナトリウム（８ｇ、０．１１５モル）の水溶液（１０ｍＬ）を一滴ずつ加えた。得られた反応物を室温にて３０分間撹拌し、次いで氷水（２５０ｍＬ）で希釈した。反応混合物をろ過し、固形物を水で洗浄し、次いでメタノールを用いて再結晶して化合物２８を得た。収量＝２７．５ｇ（９６．４％）。ＥＳ－ＭＳ：２２３．２２（M^+＋１）；ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ ７．０（ｍ，１Ｈ），７．１（ｍ，１Ｈ），７．２２（ｍ，１Ｈ），７．３２（ｍ，２Ｈ），７．４０（ｍ，１Ｈ），７．４８（ｍ，２Ｈ），７．６０（ｍ，１Ｈ）。

（ｑ）３－アミノ－２－フェニルインドール（２９）の調製

エタノール（４５０ｍＬ）中の３－ニトロソ－２－フェニルインドール（２８）（２５ｇ、０．１２９モル）の溶液に、２Ｎの水酸化ナトリウム（３００ｍＬ、５．０当量）を加え、続いて亜ジチオン酸ナトリウム（３８ｇ）を加えた。反応物を５時間加熱還流し、次いでろ過した。固形物を水で洗浄し、減圧下で乾燥して黄色固形物として化合物２９を得た。収量＝１５ｇ（７２．１％）．ＥＳ－ＭＳ：２０９．２５（M^+＋１）；ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ ７．０（ｍ，１Ｈ），７．１（ｍ，１Ｈ），７．２２（ｍ，１Ｈ），７．３２（ｍ，２Ｈ），７．４０（ｍ，１Ｈ），７．４８（ｍ，２Ｈ），７．６０（ｍ，１Ｈ）。

（ｒ）２－フェニルインドール－３－エチルカルバメート（３０）の調製

ジクロロメタン（１５０ｍＬ）中の３－アミノ－２－フェニルインドール（２９）（１．７ｇ、８．１７ミリモル）の０℃の溶液に、トリエチルアミン（５ｍＬ、４．５当量）を加え、続いてクロロギ酸エチル（１ｍＬ）を加えた。反応物を１５時間撹拌し、その後、反応混合物を水で希釈し、分離用漏斗に移した。水（５０ｍＬで２回）、ブライン（５０ｍＬ）で洗浄し、ジクロロメタン（５０ｍＬ）を硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を除き、減圧下で乾燥して、黒色固形物（１．６ｇ、７２．７％）として化合物３０を得た。ＥＳ－ＭＳ：２８１．２５（M^+＋１）；ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ １．３０（ｔ，３Ｈ），４．１２（ｔ，２Ｈ），７．０（ｍ，１Ｈ），７．１（ｍ，１Ｈ），７．２２（ｍ，２Ｈ），７．３２（ｍ，２Ｈ），７．４０（ｍ，１Ｈ），７．４８（ｍ，２Ｈ），７．６０（ｍ，１Ｈ）。

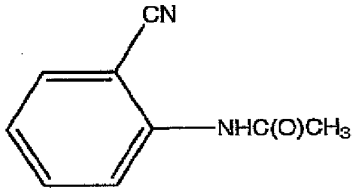
（ｓ）６Ｈ，１１Ｈ－インドロ［３，２－ｃ］イソキノリン－５－オン（３１）の調製

ジフェニルエーテル（１０ｍＬ）中の２－フェニルインドール－３－アミノエチルカルバメート（３０）（１．４ｇ、５ミリモル）の溶液を４時間加熱還流し、次いで室温に冷却した。反応混合物をろ過し、固形物を温めたヘキサン及び温めたジクロロメタンを用いて順次洗浄し、減圧下で乾燥して灰色固形物として化合物３１を得た。収量＝１．６ｇ（７２．７％）．ＥＳ－ＭＳ：２３５．２５（M^+＋１）。

（ｔ）６Ｈ，１１Ｈ－インドロ［３，２－ｃ］イソキノリン－５－オン－９，１１－ジアセテート（３２）の調製

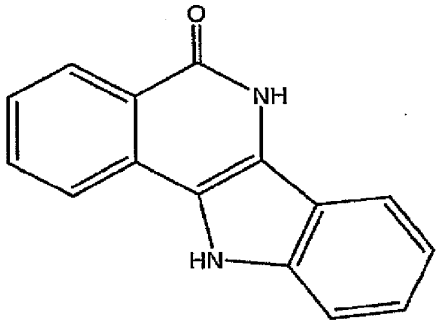
ジクロロメタン（１０ｍＬ）中の６Ｈ，１１Ｈ－インドロ［３，２－ｃ］イソキノリン－５－オン（３１）の０℃の溶液に、トリエチルアミン（２ｍＬ、３０当量）を加え、続いて無水酢酸（１．８ｍＬ、３５当量）を加えた。反応物を室温にて４８時間撹拌し、次いで、氷上に注ぎ、ジクロロメタン（１００ｍＬ）で抽出した。ジクロロメタン層を、水（２０ｍＬで２回）及びブライン（２５ｍＬ）で順次洗浄し、硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮した。得られた固形残留物を減圧下で乾燥して、褐色固形物として化合物３２を得た。収量＝１８０ｍｇ，８３．７％．ＥＳ－ＭＳ：４３０．５７（M^+＋１）。

（ｕ）６Ｈ，１１Ｈ－インドロ［３，２－ｃ］イソキノリン－５－オン－９，１１－ジスルホニルクロリド（３３）の調製
化合物３１（１１７ｍｇ、０．５ミリモル）をクロロスルホン酸（２ｍＬ、６０当量）に加え、得られた反応混合物を室温で４時間撹拌し、その後、反応混合物を氷上に注いだ。得られた沈殿物をろ過し、水及び酢酸エチルで順次洗浄し、減圧下乾燥して明黄色の固形物として化合物３３を得た。収量＝１８０ｍｇ（８３．７％）．ＥＳ－ＭＳ：４３０．５７（M^+＋１）。
（ｖ）６Ｈ，１１Ｈ－インドロ［３，２－ｃ］イソキノリン－５－オン－９，１１－ジスルホンアミド（３５ａ）の調製
０℃にて、メタノール中（１０ｍＬ）の３３（２１５ｍｇ、０．５ミリモル）の溶液に、メタノール中アンモニアの２０％溶液を加えた。室温にて反応混合物を１５時間撹拌し、次いでろ過した。得られた固形物をメタノールで洗浄し、減圧下で乾燥して黄色の固形物として化合物３５ａを得た。収量＝１４０ｍｇ（７１．４％）．ＥＳ－ＭＳ：３９２．８１（M^+＋１）。
（ｗ）Ｎ－アセチルアントラニロニトリル（３６ａ）の調製
【０３００】
【化３５】



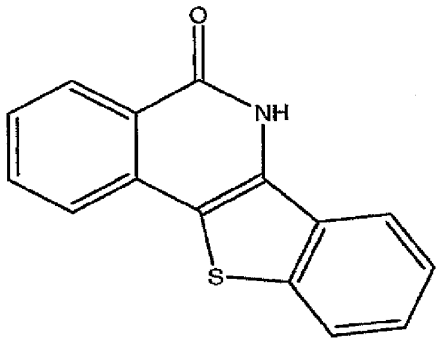
36a

【０３０１】
９０℃にて、無水酢酸（１８ｍＬ、５．５当量）中のアントラニロニトリル（４．０ｇ、３２ミリモル）の溶液に、硫酸を一滴加え、得られた反応物を９０℃にて２時間撹拌し、次いで室温で１２時間静置した。反応混合物を氷上（約２００ｍＬ）に注ぎ、得られた溶液を２時間撹拌し、その後、５Ｎの水酸化ナトリウムを用いて溶液をｐＨ７．０に中和した。得られた沈殿物をろ過し、水（５０ｍＬで４回）で洗浄し、減圧下で７２時間乾燥して、白色結晶の固形物として化合物３６ａを得た。収量＝１．０７ｇ（１６％）。
（ｘ）６Ｈ，１１Ｈ－インドロ［３，２－ｃ］イソキノリン－５－オン（３１）の調製
【０３０２】
【化３６】



31

【０３０３】
＜α－ブロモジメチルホモフタレートから＞
不活性の雰囲気下、α－ブロモジメチルホモフタレート（２０ａ）（６０３ｍｇ、２．１ミリモル）及びＮ－アセチルアントラニロニトリル（３６ａ）（３７０ｍｇ、１．１当量）をＤＭＦ（５ｍＬ）に溶解した。炭酸カリウム（１．４５ｇ、５．０当量）を加え、反応物を１００℃にて４８時間撹拌し、次いで室温に冷却した。反応混合物を１Ｎの水酸化ナトリウムに注ぎ、得られた混合物をＥｔＯＡｃ（５０ｍＬ）で抽出した。ＥｔＯＡｃ層を、１ＮのＨＣｌ（５０ｍＬ）、塩化ナトリウム飽和水溶液（５０ｍＬ）で順次洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、ろ過し、減圧下で濃縮した。得られた残留物を温めることによってトルエン（７０ｍＬ）に溶解し、溶液を室温に冷却し、ヘキサン（２００ｍＬ）の添加の際、固形沈殿物が出現した。固形沈殿物をろ過し、ヘキサン（５０ｍＬ）で洗浄し、５０℃の減圧オーブンで７２時間乾燥して黄色の粉末として化合物３１を得た。収量＝３３ｍｇ　（６．７％）。
（ｙ）６Ｈ，１１Ｈ－チア－６－アザ－ベンゾ［ａ］フルオレン－５－オン（４０ａ）の調製
【０３０４】
【化３７】



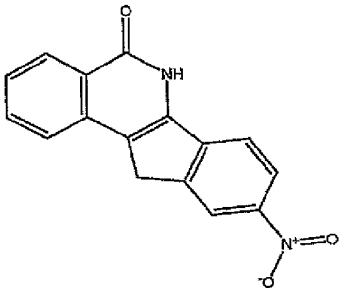
40a

【０３０５】
＜無水ホモフタル酸から＞
不活性の雰囲気下、アセトニトリル（１５０ｍＬ）中の２－メルカプトベンゾニトリル（３９ａ、すなわち、R_7～R_{10}が水素であるスキーム９の化合物３９）（１．３５ｇ、１０ミリモル）及び無水ホモフタル酸（１１ｂ）（１．６ｇ、１０．０ミリモル、１．０当量）を、反応物質がすべて溶液になるまで撹拌しながら温めた。トリエチルアミン（６．９ｍＬ、５０ミリモル、５．０当量）を加え、反応物を７２時間加熱還流し、次いで室温に冷却した。冷却後、反応混合物をろ過し、メタノール（５０ｍＬで３回）を用いて、回収した固形物を洗浄し、次いで５０℃の減圧オーブンで乾燥して、白色の固形物として化合物４０ａを得た。収量＝２２５ｍｇ　（９％）。
＜α－ブロモジメチルホモフタレートから＞
不活性の雰囲気下、アセトニトリル（１５０ｍＬ）中の２－メルカプトベンゾニトリル（３９ａ）（１．３５ｇ、１０ミリモル）及びα－ブロモジメチルホモフタレート（２０ａ）（２．８７ｇ、１０．０ミリモル、１．０当量）を、反応物質がすべて溶液になるまで撹拌しながら温めた。トリエチルアミン（６．９ｍＬ、５０ミリモル、５．０当量）を加え、反応物を７２時間加熱還流し、次いで室温に冷却した。冷却後、反応混合物をろ過し、メタノール（５０ｍＬで３回）を用いて、回収した固形物を洗浄し、次いで５０℃の減圧オーブンで乾燥して、白色の固形物として化合物４０ａを得た。収量＝２５０ｍｇ（１０％）。

（ｚ）５，６－ジヒドロ－５－オキソ－９－ニトロ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５３ａ）の調製

【０３０６】

【化３８】



53a

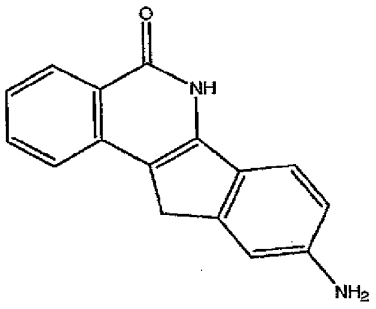
【０３０７】

ＣＣｌ$_4$（３００ｍＬ）中の２－メチル－４－ニトロ－ベンゾニトリル（３２．４ｇ、０．２モル）及びＮＢＳ（４４．４７０ｇ、０．２５モル）の還流混合物に、ＡＩＢＮ（０．３２５ｇ）を加え、得られた反応混合物を４時間還流した。反応混合物をＡＩＢＮ（０．３２５ｇ、３１ミリモル）で処理し、さらに４時間還流した。反応混合物をろ過し、ろ過したスクシンイミドをＣＣｌ$_4$で洗浄した。ろ液を減圧下、濃縮し、ブロモ化合物（４６ｇ）を得た。ブロモ化合物をＭｅＣＮ（２００ｍＬ）に溶解し、室温にて不活性の雰囲気下、反応混合物に無水ホモフタル酸（３０．７８０ｇ、０．１９モル）を加えた。次いで、アセトニトリル（１００ｍＬ）中のトリエチルアミン（８４ｍＬ、０．６モル）の溶液で反応混合物を処理した。反応混合物を８時間還流した。形成された沈殿物をろ過により取り出し、ＭｅＣＮ（１００ｍＬ）で洗浄した。洗浄した沈殿物をＤＭＦ（３００ｍＬ）に懸濁し、１３０℃に加熱し、次いで冷却し、ろ過した。得られた固形物をＤＭＦ（１００ｍＬ）で洗浄し、減圧下、乾燥して、淡黄色の固形物（１８．３１０ｇ、３３％）として化合物５３ａを得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）：δ，４．０９（ｓ，２Ｈ），７．５６（ｍ，１Ｈ），７．８１－７．８２（ｍ，２Ｈ），８．１７（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），８．２６－８．３４（ｍ，２Ｈ），８．４４（ｓ，１Ｈ），１２．４７（ｓ，１Ｈ）。

（ａａ）５，６－ジヒドロ－５－オキソ－９－アミノ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン（５４ａ）の調製

【０３０８】

【化３９】



54a

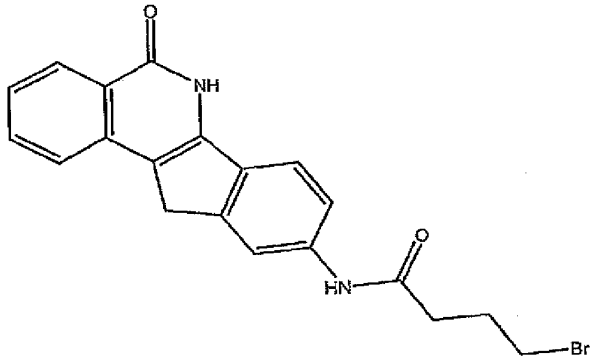
【０３０９】

８０℃にて、ＤＭＦ（１００ｍＬ）中の化合物５３ａ（５．３ｇ、０．０１９モル）及びギ酸アンモニウム（５．９８５ｇ、０．０９５モル）の懸濁液にＰｄ－Ｃ（５％、１００ｍｇ）を加えた。反応混合物を１００℃にて１時間撹拌した。反応混合物が透明になった後、セライトのパッドを介してそれをろ過した。セライトをＤＭＦで洗浄した。次いで、ろ液を氷で希釈し、得られた固形物をろ過し、水で洗浄し、減圧下、８０℃で乾燥して化合物５４ａ（３．２ｇ、６８％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）：δ，３．８９（ｓ，２Ｈ），７．１８（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），７．４０－７．４５（ｍ，２Ｈ），７．６６－７．７２（ｍ，２Ｈ），７．９４（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），８．２１（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），１２．２８（ｓ，１Ｈ）。

（ｂｂ）Ｎ－［５，６－ジヒドロ－５－オキソ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン－９－イル］－４－ブロモ－ブチルアミド（５５ａ）の調製

【０３１０】

【化４０】



55a

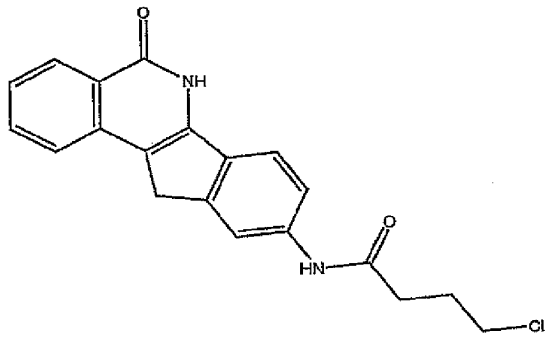
【０３１１】

飽和ＮａＨＣＯ$_{3}$（１５０ｍＬ）中の化合物５４ａ（１．５ｇ、０．００６モル）及び酢酸エチル（１００ｍＬ）の懸濁液に４－ブロモブチルクロリド（５当量）を加えた。室温にて１時間、反応混合物を撹拌した。ろ過により得られた固形物を単離し、水及び酢酸エチルで洗浄し、減圧下乾燥して化合物５５ａ（１．６２５ｇ、６８％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）：δ，２．０９－２．１３（ｍ，２Ｈ），２．４７－２．５２（ｍ，２Ｈ），３．５８（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），３．８５（ｓ，２Ｈ），７．４０（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ），７．５０（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），７．６６－７．７１（ｍ，２Ｈ），７．８６（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），７．９２（ｓ，１Ｈ），８．２０（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），１０．１０（ｓ，１Ｈ），１２．２４（ｓ，１Ｈ）。

（ｃｃ）Ｎ－［５，６－ジヒドロ－５－オキソ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン－９－イル］－４－クロロ－ブチルアミド（５５ｂ）の調製

【０３１２】

【化４１】



55b

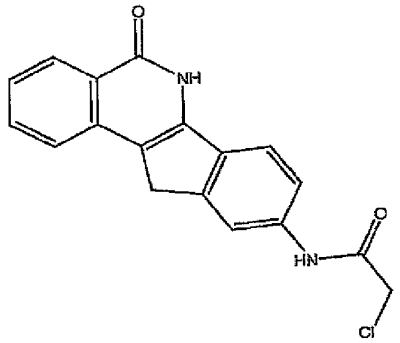
【０３１３】

化合物５５ａについて上記で述べたように、$NaHCO_3$の水溶液及び酢酸エチルの存在下、クロロブチリルクロリドを用いてアミノ化合物５４ａから化合物５５ｂ（Ｎ－［５，６－ジヒドロ－５－オキソ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン－９－イル］－４－クロロ－ブチルアミド）を調製した。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ，１．９９－２．０８（ｍ，２Ｈ），２．４７－２．５２（ｍ，２Ｈ），３．７０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｓ，２Ｈ），７．３８－７．４４（ｍ，１Ｈ），７．５０（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６６－７．７１（ｍ，２Ｈ），７．８６（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．９５（ｓ，１Ｈ），８．２１（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），１０．０９（ｓ，１Ｈ），１２．２４（ｓ，１Ｈ）。

（ｄｄ）Ｎ－［５，６－ジヒドロ－５－オキソ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン－９－イル］－２－クロロ－アセトアミド（５５ｃ）の調製

【０３１４】

【化４２】



55c

【０３１５】

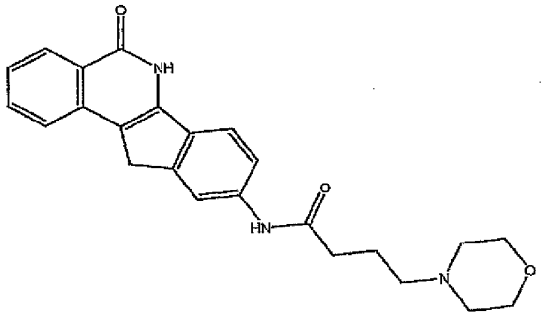
飽和$NaHCO_3$（２５０ｍＬ）中の化合物５４ａ（１．５ｇ、０．００６モル）及び酢酸エチル（２５０ｍＬ）の懸濁液にクロロアセチルクロリド（５当量）を加えた。室温にて１時間、反応混合物を撹拌した。ろ過により得られた固形物を単離し、酢酸エチル、水及びメタノールで順次洗浄し、減圧下乾燥して化合物５５ｃ（１．６ｇ、８２％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）：δ，３．８９（ｓ，２Ｈ），４．２

7（ｓ，２Ｈ），７．４０－７．４５（ｄｄ，Ｊ＝６．３及び８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．５２（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６７－７．７５（ｍ，２Ｈ），７．９０（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），８．２１（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），１０．４３９ｓ，１Ｈ），１２．２８（ｓ，１Ｈ）。

（ｅｅ）Ｎ－［５，６－ジヒドロ－５－オキソ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン－９－イル］－４－モルフォリノ－ブチルアミド（７３）の調製

【０３１６】

【化４３】



73

【０３１７】

ＤＭＦ（２５ｍＬ）中の化合物５５ａ（１．６２５ｇ、０．００４モル）の懸濁液に、トリエチルアミン（５ｍＬ）を加え、続いてモルフォリン（５ｍＬ）を加えた。反応混合物を１４０～１５５℃に１時間加熱し、室温に冷却して一晩撹拌した。得られた固形沈殿物をろ過し、ＤＭＦ、水及びメタノールで順次洗浄し、減圧下乾燥して化合物７３の遊離の塩（１．３８０ｇ、８５％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）：δ，１．７２－１．７６（ｄｄ，Ｊ＝６．９及び７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．２６－２．３７（ｍ，８Ｈ），３．５１－３．５４（ｔ，Ｊ＝４．２Ｈｚ，４Ｈ），３．８６（ｓ，２Ｈ），７．３９－７．４３（ｄｄ，Ｊ＝６．３及び６．６Ｈｚ，１Ｈ），７．５１（ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１Ｈ），７．６６－７．７４（ｍ，２Ｈ），７．８６（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），７．９６（ｓ，１Ｈ），８．２０（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），１０．０（ｓ，１Ｈ），１２．２５（ｓ，１Ｈ）。

（ｆｆ）７３のカンファースルホン酸塩の調製

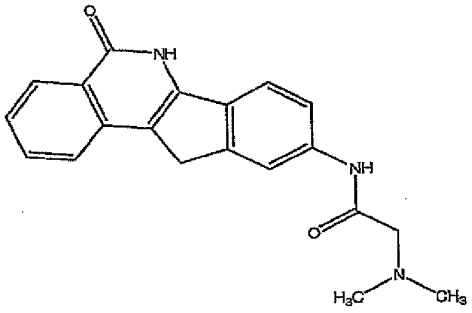
ＭｅＯＨ（２０ｍＬ）中の化合物７３（遊離の塩基）（０．４０３ｇ、０．００１モル）の懸濁液にカンファースルホン酸（２５５ｍｇ、０．００１１モル）を加えた。室温にて反応混合物を２時間撹拌した。次いで、反応混合物を減圧下濃縮し、得られた残留物を蒸留脱イオン水（４０ｍＬ）に溶解し、脱色チャコール（０．５ｇ）で処理し、９０～１００℃にて３０分間撹拌した。セライトのパッドを介して得られた溶液をろ過し、セライトを水で洗浄した。ろ液を凍結乾燥して７３のカンファースルホン酸塩（０．４５０ｇ、７１％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）：ｄ，０．７２（ｓ，３Ｈ），１．０２（ｓ，３Ｈ），１．２０－１．３０（ｍ，２Ｈ），１．７６（ｄ，Ｊ＝１８Ｈｚ，１Ｈ），１．８２－１．８６（ｍ，１Ｈ），１．８９－１．９７（ｍ，３Ｈ），１．９９－２．２５（ｍ，１Ｈ），２．３５（ｄ，Ｊ＝１４．７Ｈｚ，１Ｈ），２．４３－２．４８（ｍ，２Ｈ），２．６４－２．７１（ｄｄ，Ｊ＝１１．７及び１４．７Ｈｚ，１Ｈ），２．８５（ｄ，Ｊ＝１４．７Ｈｚ，１Ｈ），３．０５－３．１３（ｍ，４Ｈ），３．４６（ｄ，Ｊ＝１１．７Ｈｚ，２Ｈ），３．６４（ｔ，Ｊ＝１２Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｓ，２Ｈ），３．９７（ｄ，Ｊ＝１２．３Ｈｚ，２Ｈ）

，７．３９－７．４４（ｄｄ，Ｊ＝７．８及び８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．５２（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６７－７．７５（ｍ，２Ｈ），７．８７（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．９６（ｓ，１Ｈ），８．２１（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），９．５７（ｓ，１Ｈ），１０．１５（ｓ，１Ｈ），１２．２５（ｓ，１Ｈ）。

（ｇｇ）２－ジメチルアミノ－Ｎ－（５，６－ジヒドロ－５－オキソ－インデノ［１，２－ｃ］イソキノリン－９－イル）－アセトアミド（４３）の調製

【０３１８】

【化４４】



43

【０３１９】

エタノール（２Ｎ、２００ｍＬ）中の化合物５５ｃ（１．６ｇ、０．００４９モル）及びジメチルアミンの懸濁液を２４時間還流した。エタノール（２Ｎ、２００ｍＬ）中のジメチルアミンの追加の溶液を加えた。反応混合物をさらに２４時間還流し、室温に冷却した。得られた固形物をろ過し、エタノールで洗浄し、減圧下乾燥して化合物４３（１．５１０ｇ、９２％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）：δ，２．２７（ｓ，６Ｈ），３．０７（ｓ，２Ｈ），３．８５（ｓ，２Ｈ），７．３８－７．４３（ｍ，１Ｈ），７．５８（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６６－７．７３（ｍ，２Ｈ），７．８７（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），８．０２（ｓ，１Ｈ），８．２０（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），９．８２（ｓ，１Ｈ），１２．２１（ｓ，１Ｈ）；ＭＳ（ＥＳ$^{+}$）：ｍ／ｚ　３３４．０１（Ｍ＋１）。

（ｈｈ）４３のカンファースルホン酸塩の調製

ＭｅＯＨ（２００ｍＬ）中の化合物４３（遊離の塩基）（０．１２５０ｇ、０．００３７モル）の懸濁液にカンファースルホン酸（０．９１５ｇ、０．００３９モル）を加えた。室温にて反応混合物を１時間撹拌し、減圧下濃縮した。得られた残留物を蒸留脱イオン水（３００ｍＬ）に溶解し、ろ過し脱色チャコール（１ｇ）で処理し、１００～１０５℃にて３０分間撹拌した。セライトのパッドを介して得られた溶液をろ過し、セライトを水で洗浄した。ろ液を凍結乾燥して化合物４３のカンファースルホン酸塩（１．６６０ｇ、７５％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）：δ，０．７２（ｓ，３Ｈ），１．０２９ｓ，３Ｈ），１．２０－１．３０（ｍ，２Ｈ），１．７４－１．９２（ｍ，３Ｈ），２．１７－２．２５（ｍ，１Ｈ），２．３５（ｄ，Ｊ＝１４．７Ｈｚ，１Ｈ），２．６４（ｔ，Ｊ＝９．９Ｈｚ，１Ｈ，２．８０（ｄ，Ｊ＝１４．７Ｈｚ，１Ｈ），３．９０（ｓ，２Ｈ），４．１６（ｓ，２Ｈ），７．４１－７．４６（ｄｄ，Ｊ＝６．３及び８．１ｈｚ，１Ｈ），７．５３（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６８－７．７３（ｍ，２Ｈ），７．９２－７．９４（ｍ，２Ｈ），８．２２（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），９．７７（ｓ，１Ｈ），１０．６８（ｓ，１Ｈ），

１２．２９（ｓ，１Ｈ）。
（実施例２）全細胞に基づいたアッセイ及び精製酵素アッセイを用いた、培養マクロファージにおけるＰＡＲＳ活性に対する例示となるイソキノリン誘導体の影響
ＰＡＲＳを阻害し、ペルオキシ亜硝酸が誘発する細胞傷害性を防ぐ例示となるイソキノリン誘導体の能力の実証は、ヴィラーグ（Virag）等、Br．Ｊ．Pharmacol，第１２６巻（３）、７６９～７７７ページ（１９９９年）及びヴィラーグ（Virag）等、Immunology，第９４巻（３）；３４５～３５５ページ（１９９８年）に記載された方法を用いて示した。高グルコース入りで１０％のウシ胎児血清を補完したＤＭＥＭ培地を用いてマウスの未処理のマクロファージを培養した。１２穴プレートにて８０％の集密度で細胞を用いた。種々の濃度（１００ｎＭ～１ｇＭ）のイソキノリン誘導体で細胞を１０分間予備処理した。原型的な酸化剤である、ＤＮＡの一本鎖破壊を誘導するペルオキシ亜硝酸を用いてＰＡＲＳ活性を誘導した。リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）（ｐＨ１１．０）でペルオキシ亜硝酸を希釈し、５０μＬで一気に細胞に加えた。次いで細胞を２０分間インキュベートした。ｐＨ７．０で３０分間インキュベートすることによってペルオキシ亜硝酸を分解し、対照として用い、それは試験のパラメータに影響を与えることができなかった。２０分間のインキュベートの後、細胞を遠心し、培地を吸引し、細胞を０．５ｍＬのアッセイ緩衝液（５６ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、２８ｍＭのＫＣｌ、２８ｍＭのＮａＣｌ、２ｍＭの$MgCl_2$、０．０１％ｗ／ｖのジギトニン及び０．１２５μＭのNAD^+及び０．５μＣｉ／ｍＬの^3H－NAD^+）に再浮遊した。アッセイ緩衝液でのインキュベート（３７℃にて１０分間）に続いて、ＰＡＲＳ活性を以下のように測定した：２００μＬの氷冷５０％ｗ／ｖのＴＣＡを加え、４℃にて試料を４時間インキュベートした。次いで、試料を遠心（１０，０００ｇにて１０分間）し、氷冷５％ｗ／ｖのＴＣＡでペレットを２回洗浄し、２５０μＬの２％ｗ／ｖＳＤＳ／０．１ＮのＮａＯＨ中で３７℃にて一晩可溶化した。試験管の中身を６．５ｍＬのシンチセーフプラス（ScintiSafe Plus）シンチレーション液（フィッシャーサイエンティフィック社（Fisher Scientific））に加え、液体シンチレーションカウンタ（ワラック社（Wallac）［米国メリーランド州ゲーサーズバーグ（Gaithersburg）所在］）を用いて放射活性を測定した。表９（「マウス培養マクロファージにおけるＰＡＲＳ活性に対する種々の新規の置換イソキノリンの阻害効果」）に示す結果は、マクロファージアッセイにおいて例示となるイソキノリン誘導体が、ＰＡＲＳの活性化を有意に且つ用量依存性に阻害することを明らかにしている。
【０３２０】

【表９】

化合物No.	１μMでのPARS阻害効果(%)	300nMでのPARS阻害効果(%)	100nMでのPARS阻害効果(%)
2	60	NT	16
3a	67	NT	8
3b	25	0	NT
3c	21	9	NT
4b	88	NT	51
5a	55	NT	10
5b	33	NT	0
5c	24	NT	0
5d	48	NT	0
5e	21	NT	0

OnCusp
Ex. 1002

化合物No.	1μMでのPARS阻害効果(%)	300nMでのPARS阻害効果(%)	100nMでのPARS阻害効果(%)
6	65	NT	30
7	50	NT	0
8a	NT	47	NT
8c	NT	27	NT
8d	NT	82	77
8e	NT	68	NT
8g	NT	55	34
8h	NT	76	56
8j	NT	76	34
8k	NT	38	24
8l	NT	84	34
8m	NT	50	NT
8n	NT	82	74
8o	NT	55	48
8p	NT	45	27
8q	NT	28	20
8r	NT	28	20
8s	54	NT	30
8t	29	NT	17
8u	NT	NT	59
8w	NT	NT	69
8x	NT	NT	54
8y	NT	NT	59
8z	NT	NT	67

OnCusp
Ex. 1002

化合物No.	1μMでのPARS阻害効果(%)	300nMでのPARS阻害効果(%)	100nMでのPARS阻害効果(%)
8aa	NT	NT	64
8ab	NT	NT	49
8ag	59	NT	35
8ah	63	NT	67
8ai	90	NT	69
8ak	NT	22*	8*
8al	84	NT	49
8am	NT	NT	65*
8an	40*	NT	40*
8ao	60	NT	40
10a	NT	59	55
10b	NT	17	17
22a	81	NT	51
22b	NT	20*	12*
22c	83	66	62
22d	13*	NT	NT
22e	53	56	38
22f	27	23	NT
22g	27	23	NT
23a	84	79	34
23b	58	57	53
23c	63	66	63
25a	51	57	53
25b	40	29	25

化合物No.	1μMでのPARS阻害効果(%)	300nMでのPARS阻害効果(%)	100nMでのPARS阻害効果(%)
25c	58	34	23
25d	67	66	53
25e	58	63	40
26a	90	74	51
26b	51*	29*	21*
31	67	57	18
34	NT	33*	14*
35a	75	55	14
35b	42	51	25

【０３２１】
ＮＴ－試験せず
＊精製酵素アッセイにおける試験
続いて、選択したイソキノリン誘導体について、精製したＰＡＲＳ酵素における阻害の潜在力を測定し、その潜在力を原型的基準のＰＡＲＳ阻害剤である３－アミノベンザミドと比較した。市販のＰＡＲＳ阻害アッセイキット（トレビゲン社（Trevigen）［米国メリーランド州ゲーサーズバーグ（Gaithersburg）所在］）に提供された指示書に従って、９６穴ＥＬＩＳＡプレートでアッセイを行った。手短に言えば、４℃にて１ｍｇ／ｍＬのヒストン（５０μＬ／ウエル）で一晩、ウエルを被覆した。次いでプレートをＰＢＳで４回洗浄し、次いで、５０μＬのストレプト希釈剤（キットと共に供給される）を加えることによってブロックした。インキュベート（室温、１時間）の後、プレートをＰＢＳで４回洗浄した。適当に希釈したＰＡＲＳ阻害剤を、５０μＬの容量で、２×のＰＡＲＳカクテル（５０ｍＭのＴＲＩＳ、ｐＨ８．０、２５ｍＭの$MgCl_2$中の１．９５ｍＭのＮＡＤ$^+$、５０μＬのビオチン化ＮＡＤ$^+$）及び比活性の高いＰＡＲＳ酵素（双方ともキットと共に供給される）と混ぜ合わせた。室温にて反応を３０分間進行させた。ＰＢＳで４回洗浄した後、ペルオキシダーゼ結合のストレプトアビジン（１：５００希釈）及びＴＡＣＳサフィアー基質によって取り込まれたビオチンを検出した。アッセイによって、マクロファージに基くＰＡＲＳアッセイの結果が裏づけられた。たとえば、ＰＡＲＳ阻害剤８１（メシル酸塩）は、このアッセイで３ｎＭにて５０％のＰＡＲＳ活性の阻害を発揮したので、参照化合物、３－アミノベンザミドよりもおよそ５０，０００倍強力だった。
（実施例３）細胞保護アッセイを用いた、例示となるイソキノリン誘導体のＰＡＲＳ活性に対する効果
ジャグタップ（Jagtap）等、Bioorg. & Med. Chem Letters，第１４巻、８１～８５ページ、（２００４年）に記載された方法を用いた細胞保護アッセイにおいて、ＰＡＲＳを阻害し、ペルオキシ亜硝酸が誘発する細胞傷害性を防ぐ例示となるイソキノリン誘導体の能力を測定した。手短に言えば、マウスの未処理のマクロファージを培養し、次いで１０ｎＭ～１０μＭの範囲にある種々の濃度の例示となるイソキノリン誘導体で約１５分間処理した。次いで、処理したマクロファージにペルオキシ亜硝酸（７５０μＭ）を加え

、１５分間インキュベートして、ＰＡＲＳの活性化を誘導した。培地を除き、０．０１％のジギトニン及び^{3}Ｈ－ＮＡＤ（０．５μＣｉ／ｍＬ、緩衝液におけるＮＡＤ$^{+}$の最終濃度は２０ｎＭ／Ｌ）を含有する０．５ｍＬのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）と置き換え、得られた混合物を２０分間静置した。次いで、細胞をウェルから剥ぎ取り、５０％（ｗ／ｖ）の氷冷ＴＣＡ（２００μＬ）を含有するエッペンドルフチューブに入れた。チューブを４時間４℃で維持し、１８００ｇにて１０分間遠心分離し、上清を除いた。得られたペレットを５％（ｗ／ｖ）のＴＣＡ（２００μＬで２回）で洗浄し、次いで、２％ｗ／ｖＳＤＳ／０．１ＮのＮａＯＨ（２５０μＬ）中で３７℃にて一晩可溶化した。試験管の中身をシンチセーフプラスシンチレーション液（６．５ｍＬ、フィッシャーサイエンティフィック）に加え、液体シンチレーションカウンタ（ワラック社（Ｗａｌｌａｃ）［米国メリーランド州ゲーサーズバーグ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ）所在］）を用いて放射活性を測定した。表１０に示す結果は、例示となるイソキノリン誘導体が、ＰＡＲＳの活性化を用量依存性に阻害することを明らかにしている。

細胞保護に対する例示となるイソキノリン誘導体の阻害効果

【０３２２】

【表１０】

化合物No.	EC_{50} (μM)
43	0.020
73	0.010
99	0.225
100	0.180
102	0.095
104	0.065
105	0.080
107	0.010
108	0.3
109	0.4
110	0.625

【０３２３】

（実施例４）種々の疾患モデルにおける例示となるイソキノリン誘導体の影響

（ａ）インビトロの細胞疾患モデルに対する例示となるイソキノリン誘導体の影響

単離された胸腺細胞における追加のインビトロ試験では、細胞をペルオキシ亜硝酸又は過酸化水素（毒性酸化剤の種）に暴露して細胞傷害を誘導した。この系では、少なくとも部分的には、毒性は核内酵素ＰＡＲＳの活性化に関係している。この酸化剤刺激の胸腺細胞アッセイ（ヴィラーグ（Virag）等、Immunology，　第９４巻（３）；３４５～３５５ページ（１９９８年）に記載される）では、調べた化合物は、酸化剤が誘導する細胞の生存率の抑制を防ぎ、低いナノモルの濃度範囲でそのようにした。この反応の例（化合物８１、メシル酸塩）は表１０に示す。このアッセイは、虚血臓器の再潅流の間に起きるような酸化促進性の種への暴露により、死にゆく細胞のインビトロモデルを表す。

【０３２４】

イソキノリン誘導体８１（メシル酸塩）の３０ｎＭ～３μＭによるペルオキシ亜硝酸誘導の細胞傷害の軽減

【０３２５】
【表１１】

	Control	+8l 30 nM	+8l 100 nM	+8l 300 nM	+8l 1 μM	+8l 3 μM
Cytotoxicity	98 %	74 %	39 %	2 %	0 %	0 %

【０３２６】
（ｂ）炎症性疾患のインビボモデルに対する例示となるイソキノリン誘導体の影響
炎症性疾患における化合物の薬効を立証するために、動物において再還流傷害及び敗血症性ショックのような炎症性疾患及び全身性の炎症反応症候群に関与することが報告されている（パリロ（Ｐａｒｒｉｌｌｏ）、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．第３２８巻、１４７１－１４７８ページ（１９９３年）及びランピン（Ｌａｍｐｉｎｇ）、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．第１０１巻、２０６５－２０７１ページ（１９９８年）を参照のこと）細菌のリポ多糖類（ＬＰＳ）によって誘導される全身性の炎症モデルで、例示となるイソキノリン誘導体の効果を明らかにした。一連の実験において、０．１及び１ｍｇ／ｋｇの化合物８ｌ（メシル酸塩）、８ｐ及び８ｊの腹腔内注射によってマウスを事前処理し、１０ｍｇ／ｋｇのＬＰＳを腹腔内注射し、９０分で血漿中においてＴＮＦ－αを測定した。表１２に示すように、化合物がすべて実質的にＴＮＦの産生を減らしたということは、化合物の抗炎症活性を示している。
【０３２７】
マウスにおけるＰＡＲＳ阻害剤化合物、８ｌ（メシル酸塩）、８ｐ及び８ｊの０．１～１ｍｇ／ｋｇの腹腔内注射によるインビボでのＬＰＳ誘導のＴＮＦ産生の低減
【０３２８】
【表１２】

	8j (0.1 mg/kg)	8j (1.0 mg/kg)	8p (0.1 mg/kg)	8p (1.0 mg/kg)	8l (0.1 mg/kg)	8l (1.0 mg/kg)	Vehicle
TNF (ng/ml)	3831.6 ± 385.2	5038.8 ± 377.1	4470.0 ± 184.4	5090.8 ± 203.7	3714.6 ± 300.9	3509.8 ± 311.5	6994.0 ± 904.4

【０３２９】
対照と比較すると、化合物はすべて、ＬＰＳ誘導のＴＮＦ産生を顕著に抑制した。
高い用量では、ＬＰＳは敗血症性ショックに似た多臓器不全を起こし、最終的には死に至る（部分的には、ＴＮＦ－αの早期放出のため）。同様に、盲腸結紮穿刺（ＣＬＰ）によって引き起こされるモデルでは、腸内細菌叢に由来する生きた細菌が全身性の炎症やショックを誘導する。このモデルで炎症性メディエータの産生、ＰＡＲＳの活性化及び細胞死を阻害する作用剤は、ＬＰＳ又はＣＬＰによって誘導される死亡を予防する。Ｂａｌｂ／ｃマウスによる実験では、１００ｍｇ／ｋｇのＬＰＳの腹腔内注射は、２４時間で動物の５０％の死亡を誘導するが、３ｍｇ／ｋｇ／日の化合物８ｌ（メシル酸塩）による動物の処理は、同一実験条件下でエンドトキシン誘導の死亡率を１０％に低減した。ＣＬＰ誘導のショックに反応して、化合物８ｌ（メシル酸塩）（３ｍｇ／ｋｇ／日）は、死亡率において２４時間で１００％の死亡から６０％の死亡に低減した。
【０３３０】
炎症性モデルに供された動物において例示となるイソキノリン誘導体によるＴＮＦ産生の低減を実証するデータは、ＴＮＦ産生が種々の炎症性疾患（たとえば、大腸炎、関節炎

、神経性炎症及びショック）における炎症の重要な引き金であるという事実と併せて、イソキノリン誘導体が、炎症性疾患の成分と再還流傷害の成分の双方を必然的に伴う臓器移植の拒絶を含む、種々の全身性及び局所の炎症性疾患に治療効果を有し、従って炎症性疾患又は再還流傷害を治療する又は予防するのに有用であるということを示している。

（ｃ）再還流傷害のインビボモデルに対する例示となるイソキノリン誘導体の効果

虚血－再還流の状態におけるイソキノリン誘導体の薬効を立証するために、虚血及び再還流の腸のマウスモデルにおける例示となるイソキノリン誘導体の効果を調べた。上腸間膜動脈を４５分間閉塞させ、その後、１時間再還流させた。再還流の終了に続いて、平らにした腸管で、ＦＤ４法によって腸の透過性を測定した（リオーデット（Liaudet）等、Shock 第１４巻（２）、１３４～１４１ページ、（２０００年））。虚血－再還流は、腸の透過性を１１±４から２１６±２７ｍＬ／分／ｃｍ^{2}に高め、再潅流した腸の重度の損傷を示した。化合物８１（メシル酸塩）（３ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｖ．再潅流の開始１０分前に注射）による処理は、腸の透過性の上昇をおよそ７３％低減し、腸機能の顕著な維持を示した。腸における虚血－再潅流の試験は、１２時間で８０％の死亡率に関係していたが、８１（メシル酸塩）で処理した動物では１５％にすぎない死亡率が記録された。

【０３３１】

別の設定の実験では、アブデルカリーム（Abdelkarim）等、Int. J. Mol. Med. 第７巻（３）、２５５～２６０ページ（２００１年）に記載されているように、中大脳動脈の閉塞／再潅流のラットモデルにおける化合物８１（メシル酸塩）の効果をアッセイした。閉塞を２時間続け、続いて再潅流を２４時間行った。テトラゾリウム染色によって梗塞サイズを定量した。化合物８１（メシル酸塩）は、３つに分けた腹腔内注射用量で３ｍｇ／ｋｇ／日で投与し、最初の用量は再潅流開始の１０分前に投与した。ビヒクル処理の対照と比べると、８１（メシル酸塩）を投与された動物では、皮質壊死及び神経死の程度でおよそ８０％の低減があった。この保護はまた、ＰＡＲＳ阻害剤処理群における神経的改善のような機能的利益に形を変えた。

【０３３２】

これらのデータは、イソキノリン誘導体が、炎症性疾患の成分と再還流傷害の成分の双方を必然的に伴う臓器移植の拒絶を含む、種々の全身性及び局所の再還流傷害の症状に治療効果を有し、従って臓器移植の結果生じる炎症性疾患又は再還流傷害又は再酸素化障害を治療する又は予防するのに有用であるということを示している。

（ｄ）糖尿病モデルにおける例示となるイソキノリン誘導体の効果

ＰＡＲＳ阻害剤及びＰＡＲＳ欠損症は、糖尿病の進行及び糖尿病合併症の発生を減らすことが知られている（メイブリー（Ｍａｂｌｅｙ）等、Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．第１３３巻（６）：９０９～９ページ（２００１年）；ソリアーノ（Ｓｏｒｉａｎｏ）等、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．第７巻（１）、１０８－１１３ページ（２００１年））。糖尿病モデルにおけるイソキノリン誘導体の薬効を立証するために、以前記載されたように、糖尿病の単一高用量ストレプトゾトシンモデルを実施した。手短に言えば、ビヒクル又は例示となるイソキノリン誘導体（３ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内注射したマウスに１６０ｍｇ／ｋｇのストレプトゾトシンを注射し、３日後、血糖計を用いて、血糖レベルを測定した。表１３に示すデータは、例示となるイソキノリン誘導体が高血糖症を軽減しているので、ストレプトゾトシン誘導の糖尿病の発症を減じることを明らかにしている。

【０３３３】

マウスにおけるＰＡＲＳ阻害剤、化合物８１（メシル酸塩）、８ｐ及び８ｊの３ｍｇ／ｋｇ腹腔内注射によるインビボでのストレプトゾトシン（ＳＴＺ）誘導の高血糖症の軽減

【０３３４】

【表１３】

	Basal	STZ + Vehicle	STZ + 8j	STZ + 8p	8l
Glucose (mg/ml)	153 ± 21	320 ± 13	253 ± 24	264 ± 24	244 ± 21

【０３３５】
従って、イソキノリン誘導体は、糖尿病及び糖尿病合併症を治療する又は予防するのに有用である。
（ｅ）ミスマッチ修復を欠損する悪性神経膠腫の異種移植でのテモゾロミド耐性の克服における例示となるイソキノリン誘導体の効果
テモゾロミド（ＴＭＺ）は、悪性神経膠腫の治療に使用されるメチル化剤である。ＤＮＡは、グアニンのＯ６位及びＮ７位並びにアデニンのＮ３位でＴＭＺによって先ずメチル化される。ＴＭＺの細胞傷害性は、Ｏ６－メチルグアニンをプロセッシングしようとするミスマッチ修復系（ＭＭＲ）による無駄な試みに起因する。ＭＭＲを欠損する腫瘍細胞はＴＭＺに耐性である。Ｎ－メチルプリン付加体は、塩基除去修復（ＢＥＲ）によって効率的に除かれる。ＢＥＲを欠損する細胞は、メチル化剤に対する感受性を高めている。ＢＥＲの成分の１つは、酵素ＰＡＲＰである。
【０３３６】
それが、特にＭＭＲ欠損細胞においてＴＭＺの細胞傷害性を高めるかどうかを割り出すためにＰＡＲＰの阻害を調べた。ＴＭＺに交差耐性であるプロカルバジン耐性の異種移植腫瘍を持つ１０匹のマウス群を無作為に４つの処理群の１つに割り振った。４つの処理群は、（１）対照群（無菌の５％デキストロース水溶液）、（２）化合物８１（メシル酸塩）のみ、（３）ＴＭＺのみ、及び（４）化合物８１（メシル酸塩）とＴＭＺの併用であった。処理は、腫瘍容積が１００～５００ｍｍ^{3}に達した、１日目のみ、以下に述べるように腹腔内注射によって行った。続いて、１週間に２回、副尺付き手持ち式カリパスによって腫瘍を測定し、腫瘍容積を以下のように算出した：（幅^{2}ｘ長さ）／２。腫瘍容積が１０００ｍｍ^{3}を超えた場合及び腫瘍容積が最初の処理時の腫瘍容積の５倍を超えて大きくなった場合、動物は試験外とした。
【０３３７】
ＭＭＲが十分である（Ｄ－２４５－ＭＧ）又は欠損した（Ｄ－２４５－ＭＧ（ＰＲ））異種移植を持つ胸腺欠損マウスをＴＭＺと化合物８１（メシル酸塩）の組み合わせで処理した。ＭＭＲを欠損する腫瘍については、最も有効な化合物８１（メシル酸塩）の用量は、２６２．５ｍｇ／ｋｇのＴＭＺ（０．７５ＬＤ１０）と組み合わせた最初の注射との４時間間隔で３回の腹腔内で投与された１５０ｍｇ／ｋｇであることが分かった。ＴＭＺのこの用量は、２回の実験で部分的な退行を誘導せず、対照の腫瘍増殖のおよそ４日間の遅延を誘導した。併用療法は、２１．６日及び９．７日の増殖遅延を増やし（それぞれ、ｐ＝０．００１及びｐ＝０．００６）、部分退行は、８匹のうち４匹及び９匹のうち３匹で認められた。化合物８１（メシル酸塩）の添加はまた、ＭＭＲが十分な異種移植でも腫瘍増殖の遅延をもたらした。これらの実験では、８８ｍｇ／ｋｇのＴＭＺと組み合わせた２００ｍｇ／ｋｇの化合物８１（メシル酸塩）でマウスは処理された。これらのマウスにおけるＴＭＺのみの腫瘍増殖遅延は、２セットの実験で４３．１日及び３９．２日であった。併用療法は、４８．９日及び４５．７日の増殖遅延の控えめな延びを生じた（それぞれ、ｐ＝０．００１及びｐ＝０．００３）。これらの結果は、化合物８１（メシル酸塩）、例示となるイソキノリン誘導体によるＰＡＲＰの阻害が、悪性神経膠腫、特にＭＭＲ欠損の腫瘍でのＴＭＺの有効性を高めることを示している。
【０３３８】
図１に示すように、化合物８１（メシル酸塩）は、インビボでＴＭＺの抗腫瘍効果を顕

著に高める。

従って、化合物８１（メシル酸塩）、例示となるイソキノリン誘導体は、神経膠腫を含むＣＮＳ及び脳の腫瘍のような癌を治療する又は予防するのに有用である。

【０３３９】

本発明は、本発明の２～３の側面の説明として意図される実施形態で開示された特定の実施態様によって範囲を限定されるものではなく、機能的に同等であるいかなる実施態様も本発明の範囲内である。実際、本明細書で示され、記載されたものに加えて本発明の種々の改変が当業者に明らかになるであろうし、それらは、添付の請求項の範囲内に入ることが意図される。

【０３４０】

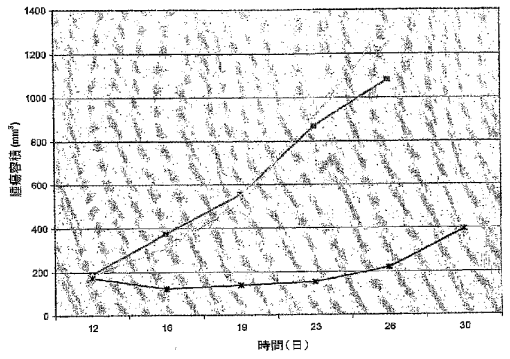
多数の参考文献を引用したが、その開示全体を全体として本明細書に組み入れた。

【図面の簡単な説明】

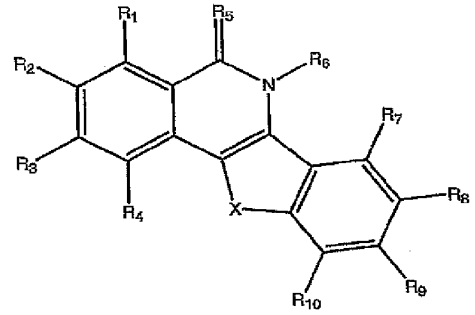
【０３４１】

【図１】腫瘍容積に対する化合物８１（メシル酸塩）及びテモゾロミドの効果を示すグラフ（図中、■：対照、▲：化合物８１（メシル酸塩）、×：テモゾロミド及び＊：化合物８１（メシル酸塩）とテモゾロミドである）。

【図１】



【手続補正書】
【提出日】平成17年9月27日(2005.9.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
有効量の式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。
【化１】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}の

アルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－C(O)OH、－C_1～C_5のアルキレン－C(O)O－(C_1～C_5のアルキル)又は－C_1～C_5のアルキレン－OC(O)－(C_1～C_5のアルキル)の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－O－(C_1～C_5のアルキル)，－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C(O)OH、－C(O)O(C_1～C_5アルキル)、－OC(O)(C_1～C_5アルキル)、－NO_2又は－A－Bであり；

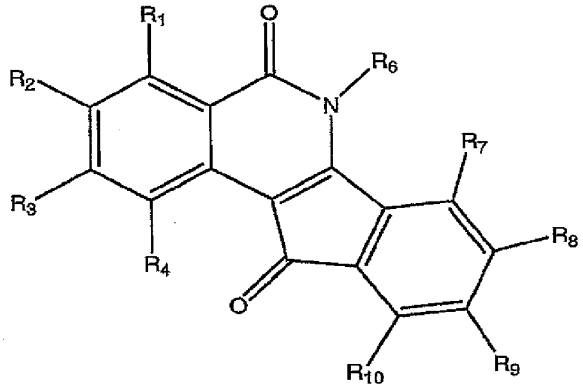
Z_1及びZ_2は独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N(Z_3)(Z_4)の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２】

有効量の式(ＩＩ)を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化２】



(II)

式中、

R_6は、－H又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C(O)OH、－C(O)O(C_1～C_5アルキル)、－NO_2又は－A'－B'であり；

A'は、－SO_2－、－SO_2NH－、－NHCO－、－NHCONH－、－CO－、－C(O)O－、－CONH－、－CON(C_1～C_5のアルキル)－、－NH－、－(CH_2)－、－S－又は－C(S)－であり；

B'は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－(C_1～C_5のアルキル)－(－３～７員環の単環式複素環)、－$H_2NC(O)$－置換のアリール、－C(O)OH、－C(O)O－(C_1～C_5のアルキル)、－C(O)O－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－O－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C（O）OH、－C（O）O（C_1～C_5アルキル）、－OC（O）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－A－Bであり；

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、－NHCO－、－NHCONH－、－O－、－CO－、－OC（O）－、－C（O）O－、－CONH－、－CON（C_1～C_5のアルキル）－、－NH－、－CH_2－、－S－又は－C（S）－であり；

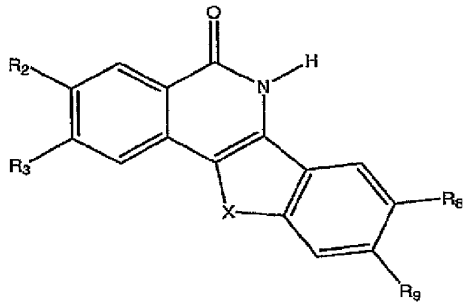
Bは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－3～7員環の単環式複素環、－7～10員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－3～7員環の単環式複素環）、－H_2NC（O）－置換のアリール、－C（O）OH、－C（O）O－（C_1～C_5のアルキル）、－C（O）O－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N（Z_3）（Z_4）の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成する。

【請求項3】

有効量の式（III）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化3】



(III)

式中、

Xは、－CH_2－又は－O－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－O－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－$CONH_2$、－C（O）OH、－OC（O）－C_1～C_5のアルキル又は－C（O）O－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－A－Bであり、

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－NHCO－であり；

Bは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素

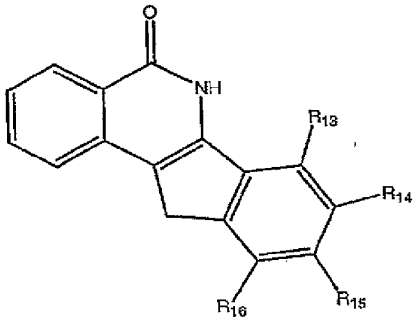
環の１以上で置換され；且つ

Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－$N(Z_3)(Z_4)$の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４】

有効量の式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化４】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；

R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－$NHC(O)-(CH_2)_n-NZ_1Z_2$であり、他の基が水素であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－$N(Z_3)(Z_4)$の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ

ｎは０～５の整数である。

【請求項５】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頸部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項１に記載の方法。

【請求項６】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頸部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項２に記載の方法。

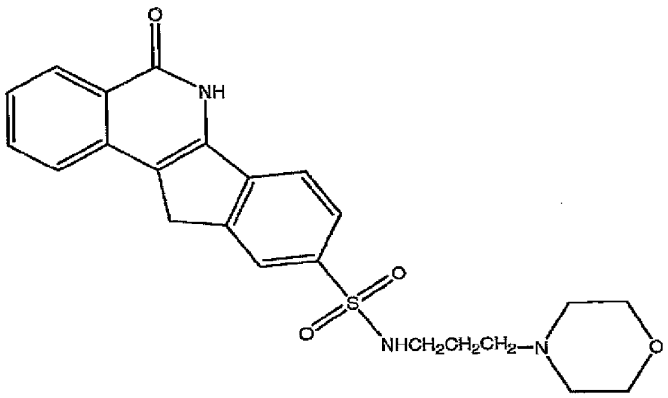
【請求項７】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頸部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項３に記載の方法。

【請求項８】

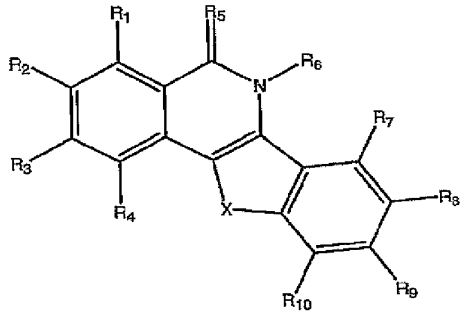
癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頸部の癌、脳腫瘍

、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項４に記載の方法。
【請求項９】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項２に記載の方法。
【請求項１１】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項３に記載の方法。
【請求項１２】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項４に記載の方法。
【請求項１３】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項９に記載の方法。
【請求項１４】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１０に記載の方法。
【請求項１５】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
化合物が、
【化５】



又は薬学上許容可能なその塩である請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
薬学上許容可能な塩がメシル酸塩である請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項２に記載の方法。
【請求項２１】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項３に記載の方法。

【請求項２２】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項４に記載の方法。
【請求項２３】
有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とからなる組成物、又はその薬学上許容可能な塩。
【化６】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒド

ロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

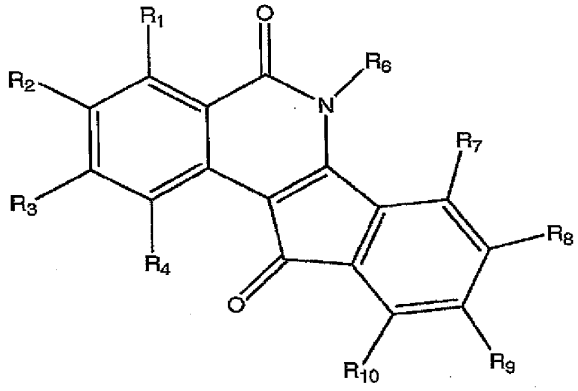
Ｚ$_1$及びＺ$_2$は独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２４】

有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化７】



(II)

式中、

Ｒ$_6$は、－Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_1$は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり；

Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換の

C_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C（O）OH、－C（O）O（C_1～C_5アルキル）、－OC（O）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－A－Bであり；

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、－NHCO－、－NHCONH－、－O－、－CO－、－OC（O）－、－C（O）O－、－CONH－、－CON（C_1～C_5のアルキル）－、－NH－、－CH_2－、－S－又は－C（S）－であり；

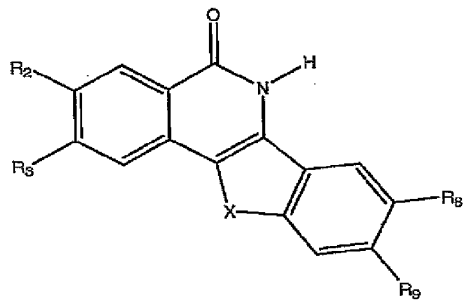
Bは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－3～7員環の単環式複素環、－7～10員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－3～7員環の単環式複素環）、－H_2NC（O）－置換のアリール、－C（O）OH、－C（O）O－（C_1～C_5のアルキル）、－C（O）O－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N（Z_3）（Z_4）の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成する。

【請求項25】

有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（III）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化8】



(III)

式中、

Xは、－CH_2－又は－O－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－O－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－$CONH_2$、－C（O）OH、－OC（O）－C_1～C_5のアルキル又は－C（O）O－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－A－Bであり、

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－NHCO－であり；

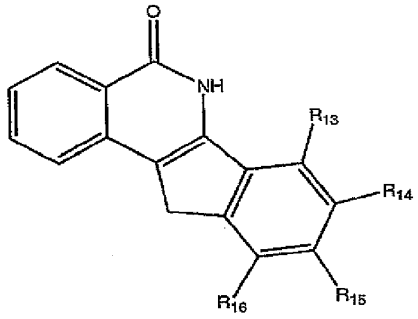
Bは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環の1以上で置換され；且つ

Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－$N(Z_3)(Z_4)$の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項２６】

有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化９】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；

R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－$NHC(O)-(CH_2)_n-NZ_1Z_2$であり、他の基が水素であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－$N(Z_3)(Z_4)$の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ

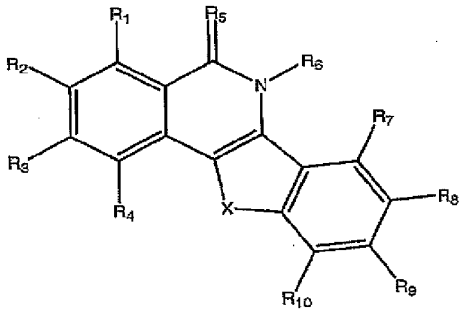
ｎは０～５の整数である。

【請求項２７】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

OnCusp
Ex. 1002

【化１０】



(I)

式中、

R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；

R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：

Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Ｚ

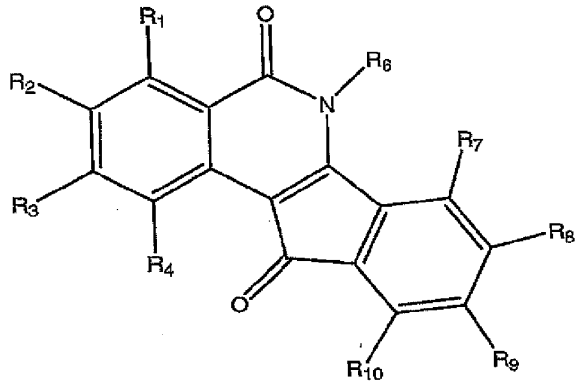
$_3$及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２８】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１１】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環

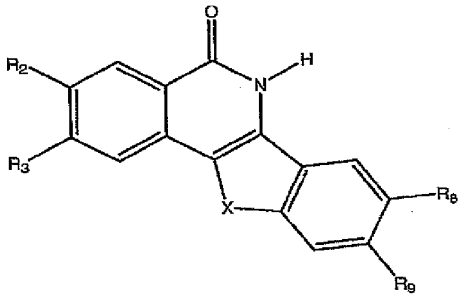
式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項２９】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１２】



(III)

式中、

Ｘは、－CH_2－又は－Ｏ－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－$CONH_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－C_1～C_5のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

Ｂは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

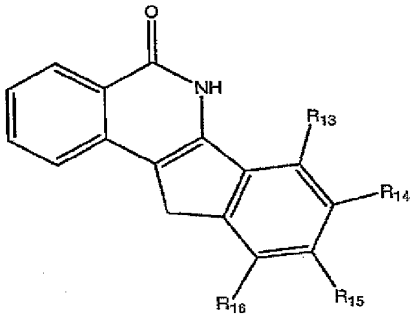
Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３０】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を

有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１３】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；

R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；

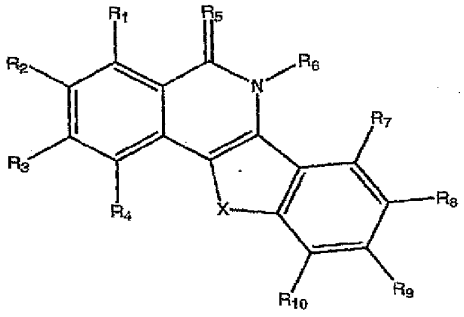
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ

ｎは０～５の整数である。

【請求項３１】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、及び式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１４】



(I)

式中、

R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；

R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：

Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（Ｎ

$R_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

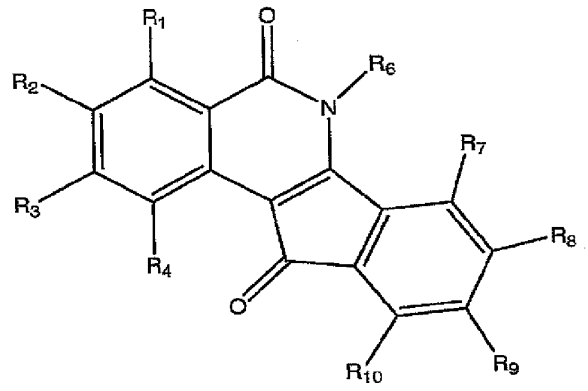
ｎは０～５の整数である。

【請求項３２】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

OnCusp
Ex. 1002

【化１５】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

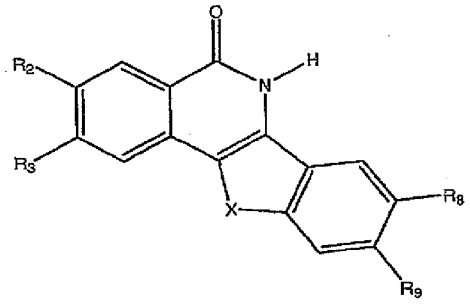
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は

一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、$Ｚ_1$及び$Ｚ_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３３】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１６】



(III)

式中、

Ｘは、－$ＣＨ_2$－又は－Ｏ－であり；

$Ｒ_2$及び$Ｒ_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換された$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル）、－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－$ＮＯ_2$、－$ＮＨ_2$、－$ＣＯＮＨ_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキルであり；

$Ｒ_8$及び$Ｒ_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－$ＳＯ_2$－、－$ＳＯ_2ＮＨ$－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

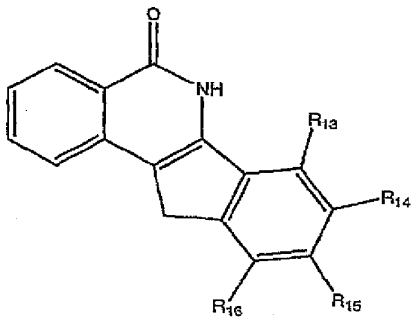
Ｂは、－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－$ＮＺ_1Ｚ_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、$Ｃ_1$～$Ｃ_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換された$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換された$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－アミノ置換された$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

$Ｚ_1$及び$Ｚ_2$は、独立して、－水素又は－$Ｃ_1$～$Ｃ_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（$Ｚ_3$）（$Ｚ_4$）の１以上で置換され、その際、$Ｚ_3$及び$Ｚ_4$は独立して－Ｈ又は－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－$ＮＨ_2$の１以上で置換され、或いは、$Ｚ_3$及び$Ｚ_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、$Ｚ_1$及び$Ｚ_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３４】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１７】

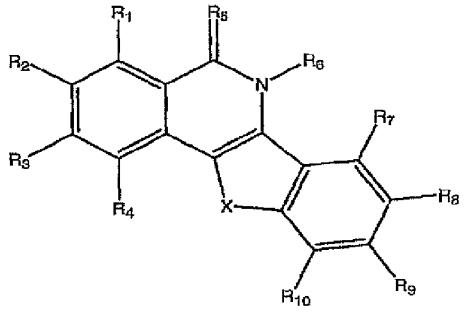


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３５】
有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は薬学上許容可能な化合物の塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１８】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（Ｎ

$R_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

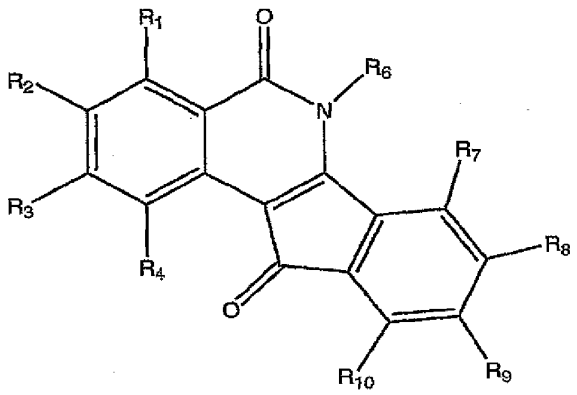
ｎは０～５の整数である。

【請求項３６】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

OnCusp
Ex. 1002

【化１９】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

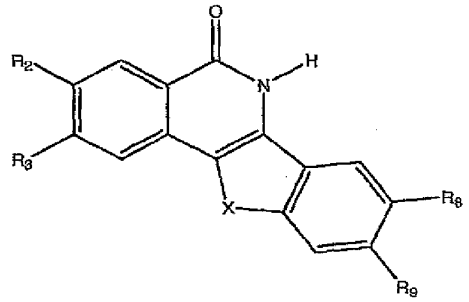
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３７】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２０】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

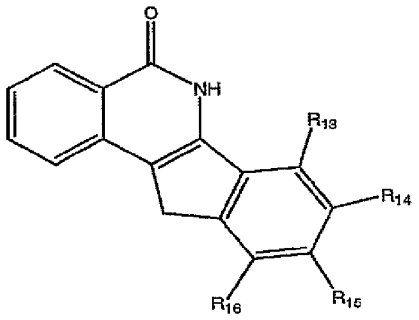
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３８】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２１】

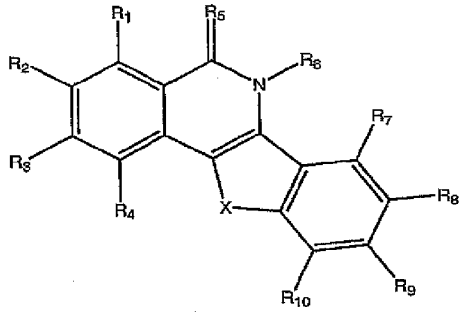


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３９】
有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２２】



(I)

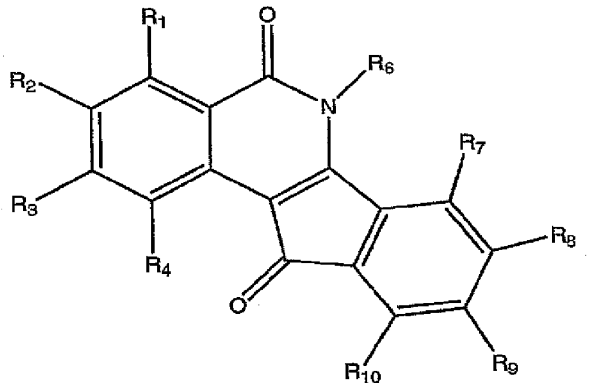
式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又

は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
ｎは０～５の整数である。

【請求項４０】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２３】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

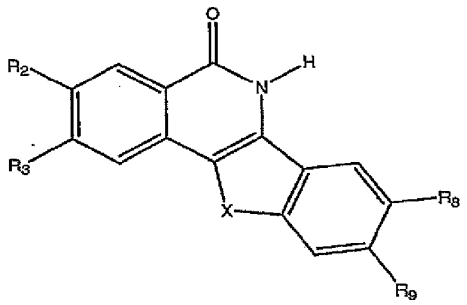
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４１】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２４】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

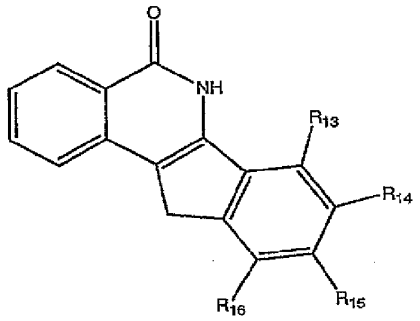
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４２】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２５】

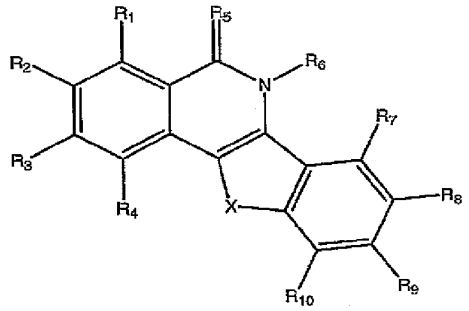


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項４３】
有効量の、式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２６】



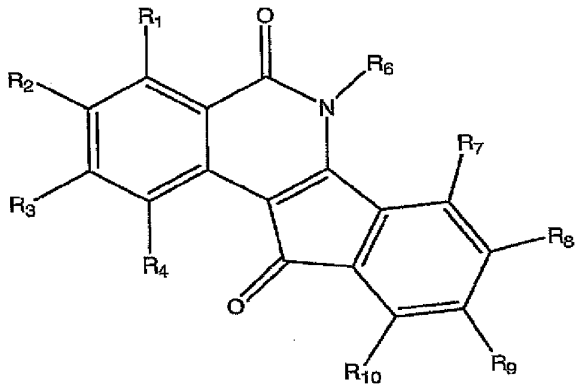
(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又

は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
ｎは０～５の整数である。
【請求項４４】
有効量の、式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

OnCusp
Ex. 1002

【化２７】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

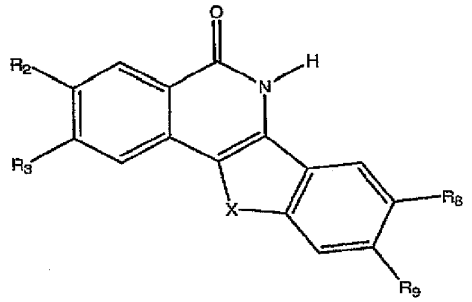
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は

一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４５】

有効量の、式（ＩＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２８】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－C_1～C_5のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

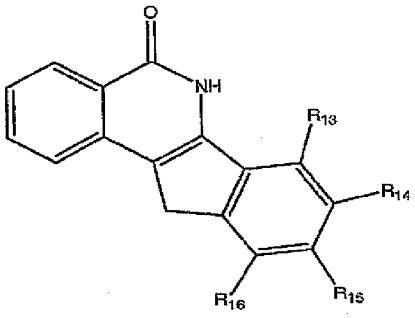
Ｂは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４６】

有効量の、式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２９】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；

R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ

ｎは０～５の整数である。

【請求項４７】

血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４３に記載の方法。

【請求項４８】

血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４４に記載の方法。

【請求項４９】

血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４５に記載の方法。

【請求項５０】

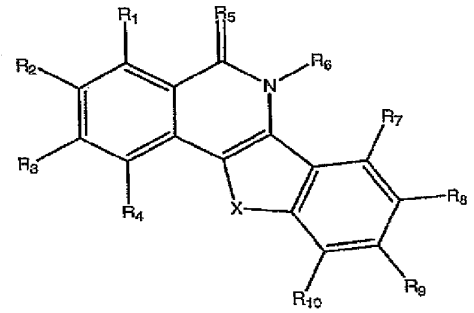
血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４６に記載の方法。

【請求項５１】

有効量の、式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

OnCusp
Ex. 1002

【化３０】



(I)

式中、

R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；

R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：

Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換され

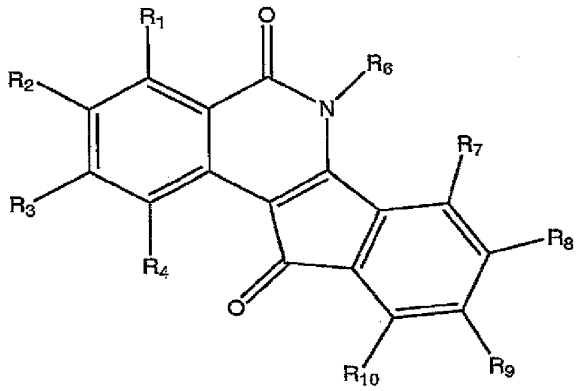
ないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項５２】

有効量の、式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３１】



(II)

式中、

Ｒ$_6$は、－Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_1$は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり；

Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－ＣＨ$_2$－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環

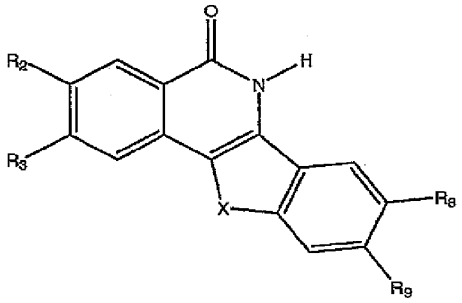
式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項５３】

有効量の、式（ＩＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３２】



(III)

式中、

Ｘは、－CH_2－又は－Ｏ－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－ＣＯＮH_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－C_1～C_5のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

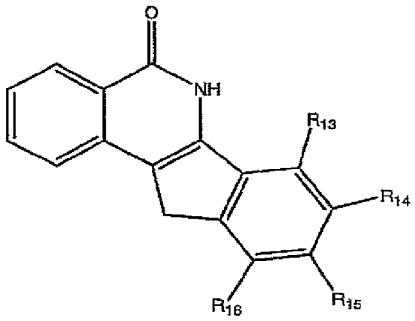
Ｂは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項５４】

有効量の、式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３３】



(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項５５】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５１に記載の方法。

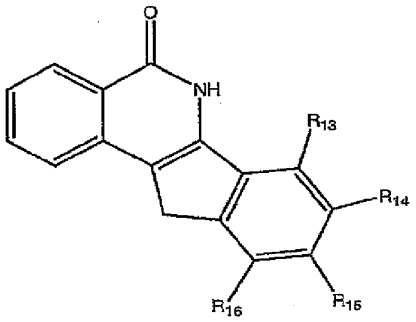
【請求項５６】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５２に記載の方法。

【請求項５７】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５３に記載の方法。

【請求項５８】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５４に記載の方法。

【請求項５９】
式（ＩＶ）の化合物又は薬学上許容可能なその塩。

【化３４】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項６０】
R_{14}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、且つR_{13}、R_{15}及びR_{16}がそれぞれ水素である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６１】
R_{15}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、且つR_{13}、R_{14}及びR_{16}がそれぞれ水素である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６２】
ｎが１である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６３】
ｎが２である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６４】
ｎが３である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６５】
ｎが４である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６６】
ｎが５である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。

【請求項６７】
生理学的に許容可能なキャリア又はビヒクル及び有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を含む組成物。

【請求項６８】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、再潅流傷害を治療する方法。

【請求項６９】
再潅流傷害が、脳卒中又は心筋梗塞である請求項６８に記載の方法。

【請求項７０】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、炎症性疾患を治療する方法。

【請求項７１】
炎症性疾患が、関節の炎症性疾患、歯肉の慢性炎症性疾患、炎症性腸疾患、炎症性肺疾患、中枢神経系の炎症性疾患、目の炎症性疾患、グラム陽性のショック、グラム陰性のショック、出血性ショック、アナフィラキシー性ショック、外傷性ショック又は化学療法のショックである請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、糖尿病及び糖尿病合併症を治療する方法。

【請求項７３】
糖尿病が、Ｉ型糖尿病又はＩＩ型糖尿病である請求項７２に記載の方法。

【請求項７４】

有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、虚血性の症状を治療する方法。

【請求項７５】

虚血性の症状が、心筋虚血、安定狭心症、不安定狭心症、脳卒中、虚血性心疾患又は脳虚血である請求項７４に記載の方法。

【請求項７６】

有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害を治療する方法。

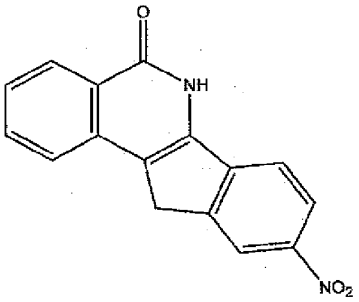
【請求項７７】

有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、パーキンソン病を治療する方法。

【請求項７８】

化学式５３ａ

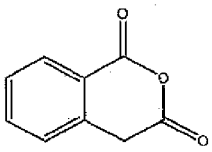
【化３５】



53a

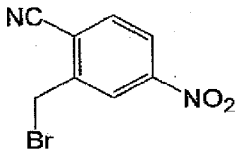
を有する化合物の製造方法において、化学式

【化３６】



を有する化合物を、化学式５３ａの化合物の製造に十分な条件でトリエチルアミンを存在させる下で、化学式

【化３７】

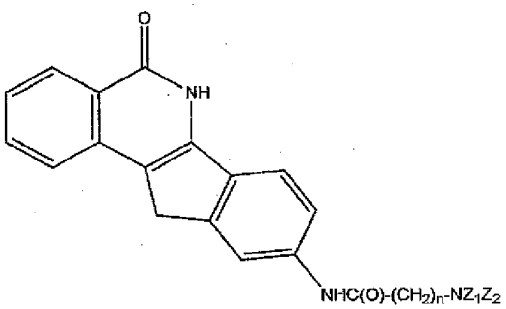


を有する化合物と反応させる工程を備える、製造方法。

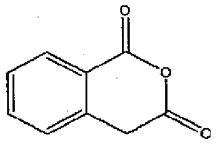
【請求項７９】

化学式

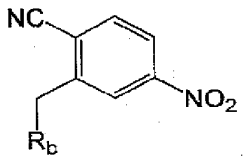
【化３８】



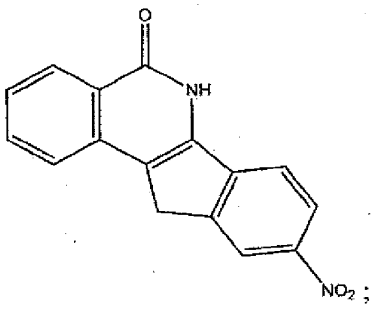
を有する化合物の製造方法において、
（ｉ）化学式
【化３９】



の化合物を、化学式
【化４０】



の化合物と反応させる工程であって、R_bは、－Ｃｌ，であり、化学式
【化４１】

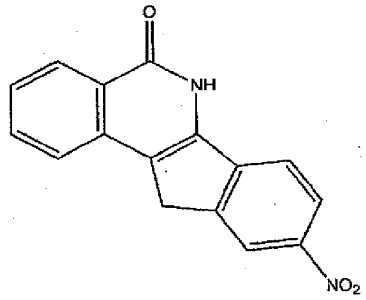


;

の化合物を生成するために十分な条件下で塩基を存在させる反応工程と、
（ｉｉ）化学式

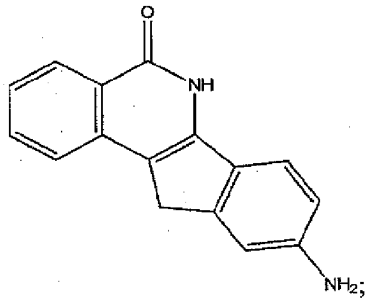
OnCusp
Ex. 1002

【化４２】



の化合物を、

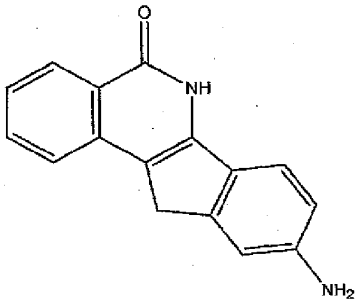
【化４３】



の化合物を生成するために十分な条件下で還元剤と反応させる工程と、

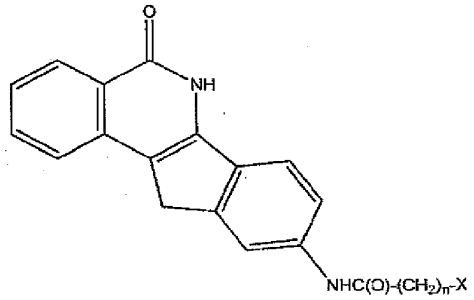
（ｉｉｉ）化学式

【化４４】

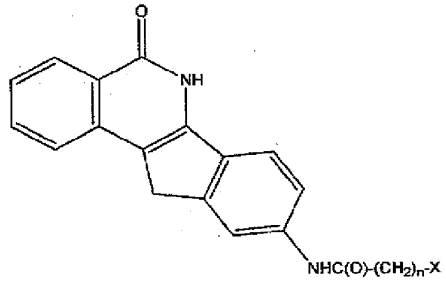


の化合物を、Ｘ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＯＣｌ（ＸはＢｒまたはＣｌであり、ｎは０～５の範囲の整数）の化学式を有する化合物と、化学式

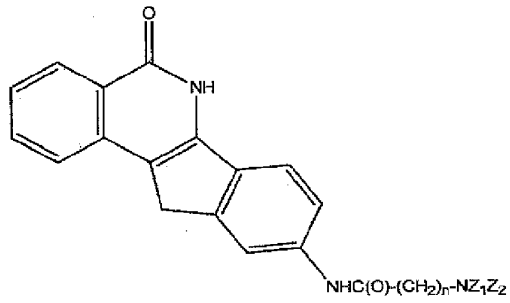
【化４５】



の化合物を生成するために十分な条件下で反応させる工程と、
（ｉｖ）化学式
【化４６】

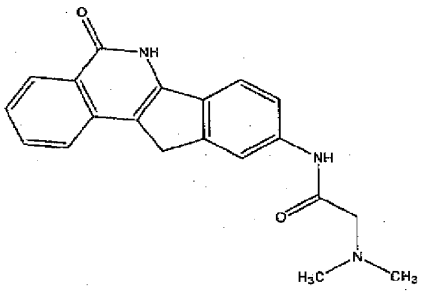


の化合物を化学式ＨＮＺ$_1$Ｚ$_2$の化合物と、化学式
【化４７】



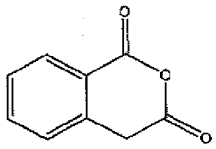
の化合物を生成するために十分な条件下で反応させる工程であって、工程（ｉｉｉ），（ｉｖ）のＸ，ｎは同一であり、
Ｚ$_1$，Ｚ$_2$は独立して、置換されていないか、－ハロ、－ＯＨ，－ＮＺ$_3$Ｚ$_4$のうちの１つ以上で置換された－Ｈまたは－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキルであり、ここで、Ｚ$_3$，Ｚ$_4$は独立して、置換されていないか、－ハロ、－ヒドロキシ，－ＮＨ$_2$のうちの１つ以上で置換された－Ｈまたは－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキルであり、または、Ｎ，Ｚ$_3$，Ｚ$_4$はＮを含む３～７員環の単環複素環を形成し、またはＮ，Ｚ$_1$，Ｚ$_2$はＮを含む３～７員環の単環複素環を形成する工程とを備える、製造方法。
【請求項８０】
化学式４３

【化４８】

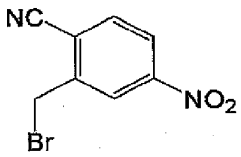


43

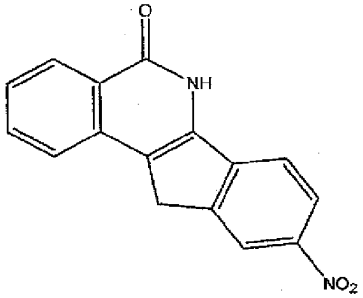
の化合物の製造方法であって、
（ｉ）化学式
【化４９】



の化合物を、化学式
【化５０】



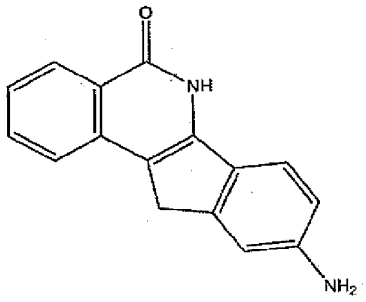
の化合物と反応させる工程であって、化学式５３ａ
【化５１】



53a

の化合物を生成するために十分な条件下でトリエチルアミンを存在させる反応工程と、
（ｉｉ）化学式５３ａの化合物を５％Ｐｄ／Ｃと、化学式５４

【化５２】

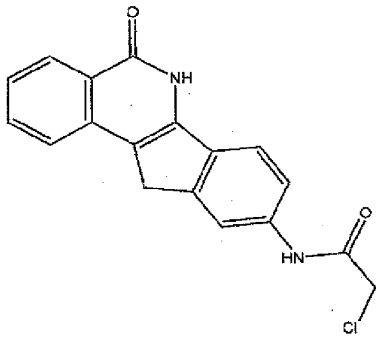


54

の化合物を生成するために十分な条件下でギ酸アンモニウムを存在させて反応させる工程と、

（ｉｉｉ）化学式５４の化合物を、化学式５５ｃ

【化５３】



55c

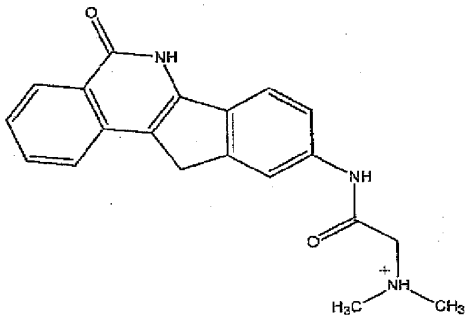
の化合物を生成するために十分な条件下で重炭酸ナトリウムを存在させて、クロロアセチルクロライドと反応させる工程と、

（ｉｖ）化学式５５ｃの化合物を、化合物４３の化合物を生成するために十分な条件下でジメチルアミンと反応させる工程とを備える、製造方法。

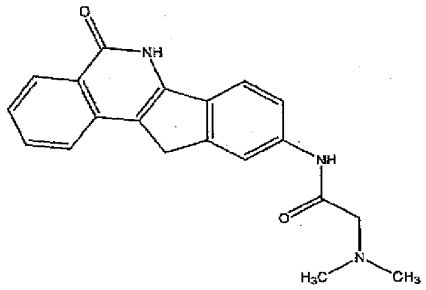
【請求項８１】

化学式

【化５４】

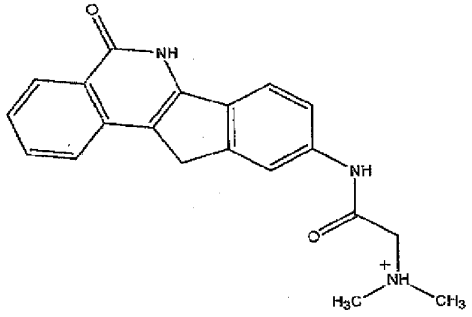


（カンファースルホン酸塩）
の化合物の製造方法であって、化合物４３
【化５５】



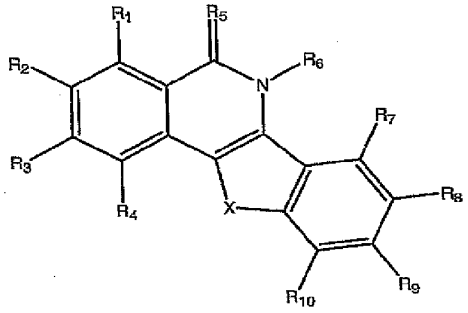
43

を、化学式
【化５６】



（カンファースルホン酸塩）
の化合物を生成するために十分な条件下でカンファースルホン酸と反応させる工程を備える、製造方法。
【手続補正書】
【提出日】平成18年11月8日(2006.11.8)

【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
有効量の式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。
【化１】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5の

アルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

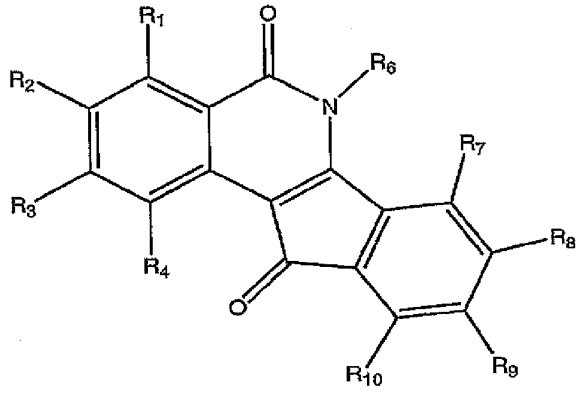
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２】

有効量の式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化２】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換の

C_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C（O）OH、－C（O）O（C_1～C_5アルキル）、－OC（O）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－A－Bであり；

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、－NHCO－、－NHCONH－、－O－、－CO－、－OC（O）－、－C（O）O－、－CONH－、－CON（C_1～C_5のアルキル）－、－NH－、－CH_2－、－S－又は－C（S）－であり；

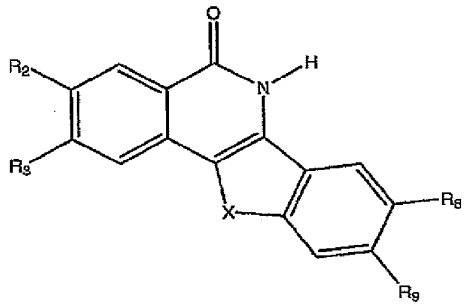
Bは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－3～7員環の単環式複素環、－7～10員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－3～7員環の単環式複素環）、－H_2NC（O）－置換のアリール、－C（O）OH、－C（O）O－（C_1～C_5のアルキル）、－C（O）O－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N（Z_3）（Z_4）の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成する。

【請求項3】

有効量の式（III）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化3】



(III)

式中、

Xは、－CH_2－又は－O－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－O－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－$CONH_2$、－C（O）OH、－OC（O）－C_1～C_5のアルキル又は－C（O）O－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－A－Bであり、

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－NHCO－であり；

Bは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環の1以上で置換され；且つ

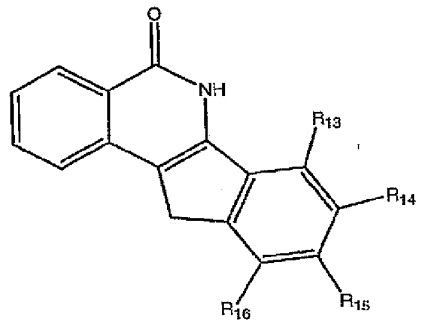
Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換さ

れないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４】

有効量の式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩をその必要に応じて動物に投与することを含む、癌を治療する方法。

【化４】



(IV)

式中、

Ｒ$_{13}$及びＲ$_{16}$は水素であり；

Ｒ$_{14}$基及びＲ$_{15}$基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり、他の基が水素であり；

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ

ｎは０～５の整数である。

【請求項５】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項１に記載の方法。

【請求項６】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項２に記載の方法。

【請求項７】

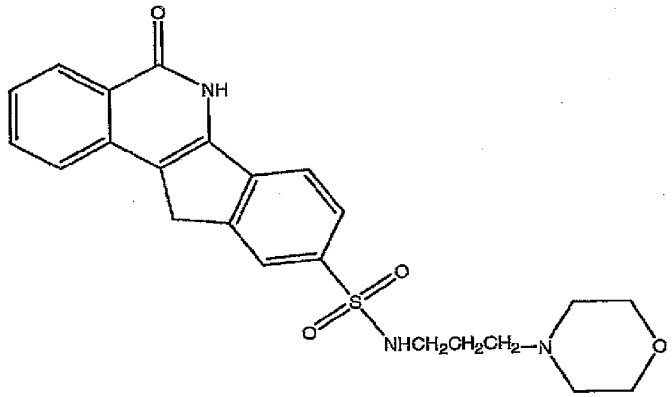
癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項３に記載の方法。

【請求項８】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、頭頚部の癌、脳腫瘍、中枢神経系の癌、子宮癌、子宮頸癌、又は卵巣癌である請求項４に記載の方法。

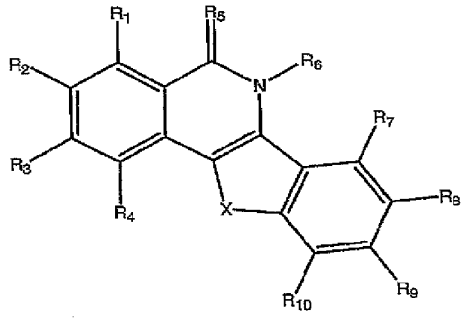
【請求項９】

癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項２に記載の方法。
【請求項１１】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項３に記載の方法。
【請求項１２】
癌が、黒色腫、転移性脳腫瘍又は神経膠腫である請求項４に記載の方法。
【請求項１３】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項９に記載の方法。
【請求項１４】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１０に記載の方法。
【請求項１５】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
神経膠腫が、毛様細胞性星状細胞腫、星状細胞腫、未分化の星状細胞腫又は多形性膠芽腫である請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
化合物が、
【化５】



又は薬学上許容可能なその塩である請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
薬学上許容可能な塩がメシル酸塩である請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項２に記載の方法。
【請求項２１】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項３に記載の方法。
【請求項２２】
テモゾロミド、プロカルバジン、デカルバジン、イリノテカン、インターロイキン－２又はこれらの組み合わせの有効量を投与することをさらに含む請求項４に記載の方法。

【請求項２３】
有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とからなる組成物、又はその薬学上許容可能な塩。
【化６】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－

Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

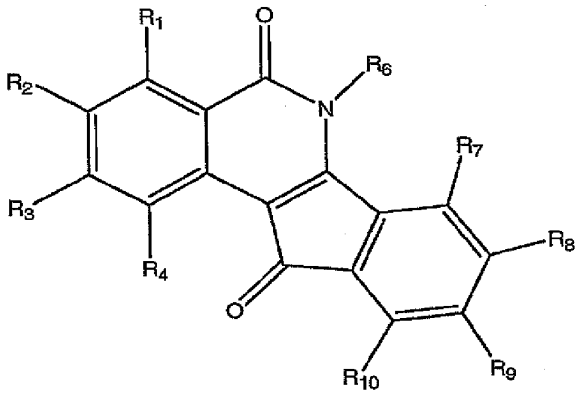
Ｚ$_1$及びＺ$_2$は独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項２４】

有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化７】



(II)

式中、

Ｒ$_6$は、－Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_1$は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$であり；

Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、－NHCO－、－NHCONH－、－O－、－CO－、－OC(O)－、－C(O)O－、－CONH－、－CON(C_1～C_5のアルキル)－、－NH－、－CH_2－、－S－又は－C(S)－であり；

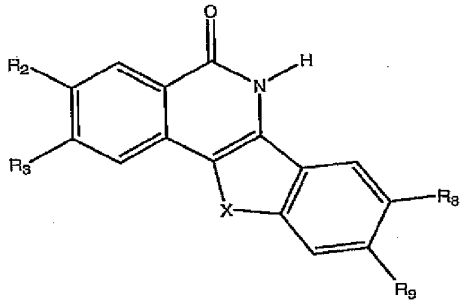
Bは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－3～7員環の単環式複素環、－7～10員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－(C_1～C_5のアルキル)－(－3～7員環の単環式複素環)、－$H_2NC(O)$－置換のアリール、－C(O)OH、－C(O)O－(C_1～C_5のアルキル)、－C(O)O－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N(Z_3)(Z_4)の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成する。

【請求項25】

有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式(III)を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化8】



(III)

式中、

Xは、－CH_2－又は－O－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－O－(C_1～C_5のアルキル)、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－$CONH_2$、－C(O)OH、－OC(O)－C_1～C_5のアルキル又は－C(O)O－C_1～C_5のアルキルであり；

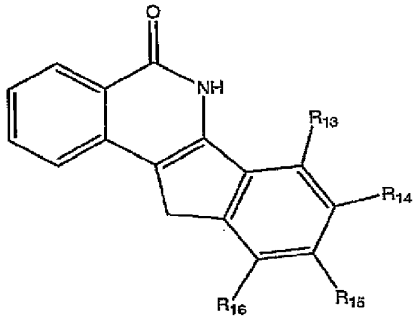
R_8及びR_9は独立して、－水素又は－A－Bであり、

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、又は－NHCO－であり；

Bは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－3～7員環の単環式複素環又は－7～10員環の二環式複素環の1以上で置換され；且つ

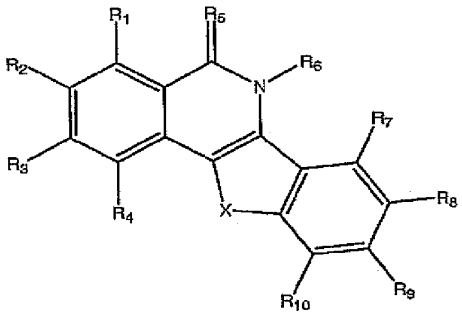
Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－N(Z_3)(Z_4)の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒にな

って窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。
【請求項２６】
有効量のテモゾロミドと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。
【化９】



(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。
【請求項２７】
有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。
【化１０】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$

－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（ＮＲ$_{11}$Ｒ$_{12}$）－、又は－Ｎ（ＳＯ$_2$Ｙ）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－ＮＨ$_2$又は－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

Ｒ$_{11}$及びＲ$_{12}$は、独立して水素、又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はＮであり、Ｒ$_{11}$及びＲ$_{12}$は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

Ｒ$_1$は、－水素、－ハロ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－、－ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン）－ＮＺ$_1$，Ｚ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－Ｈ$_2$ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）ＮＨ$_2$であり、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）ＮＨ$_2$以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）の１以上で置換され；

Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$及びＲ$_{10}$は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル），－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル、－ハロ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$のアルケニル、－Ｃ$_3$～Ｃ$_8$の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＨ$_2$、－アミノ置換のＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル）、－ＮＯ$_2$又は－Ａ－Ｂであり；

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は独立して、－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

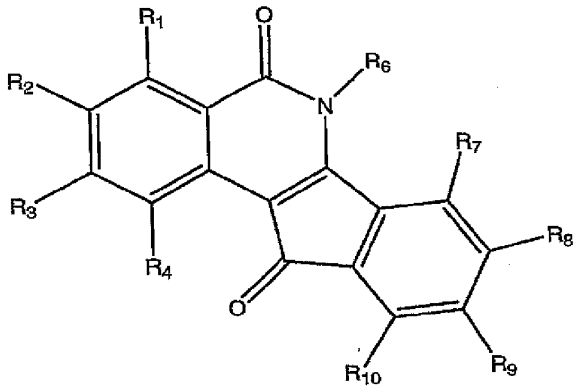
ｎは０～５の整数である。

【請求項２８】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

OnCusp
Ex. 1002

【化１１】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

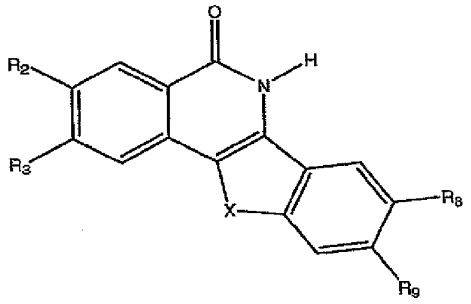
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項２９】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１２】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

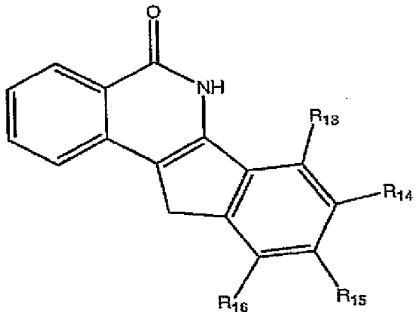
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３０】

有効量のプロカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１３】

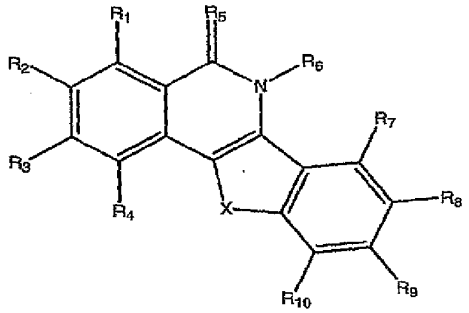


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３１】
有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、及び式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１４】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

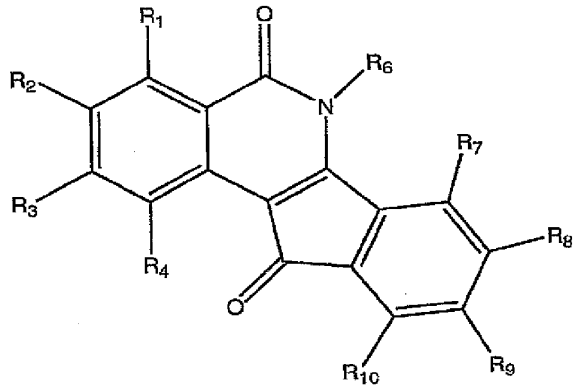
ｎは０～５の整数である。

【請求項３２】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

OnCusp
Ex. 1002

【化１５】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

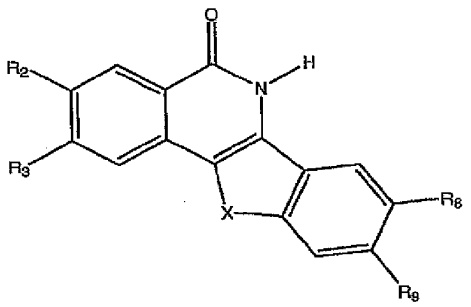
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３３】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１６】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

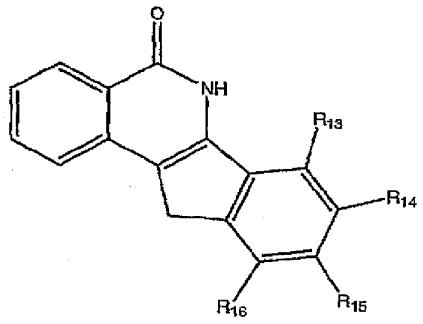
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３４】

有効量のダカルバジンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１７】

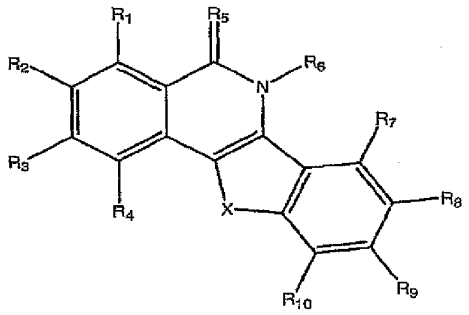


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３５】
有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は薬学上許容可能な化合物の塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１８】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C（O）OH、－C（O）O（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－A－Bであり；

Aは、－SO_2－、－SO_2NH－、－NHCO－、－NHCONH－、－CO－、－C（O）O－、－CONH－、－CON（C_1～C_5のアルキル）－、－NH－、－（CH_2）－、－S－又は－C（S）－であり；

Bは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－3～7員環の単環式複素環、－7～10員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－3～7員環の単環式複素環）、－H_2NC（O）－置換のアリール、－C（O）OH、－C（O）O－（C_1～C_5のアルキル）、－C（O）O－フェニル、又は－C（NH）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－C（O）OH又は－C（NH）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－O－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－CN、－NZ_1Z_2、－窒素含有の3～7員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－C（O）OH、－C_1～C_5のアルキレン－C（O）O－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－OC（O）－（C_1～C_5のアルキル）の1以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－O－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－C（O）OH、－C（O）O（C_1～C_5アルキル）、－OC（O）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－A－Bであり；

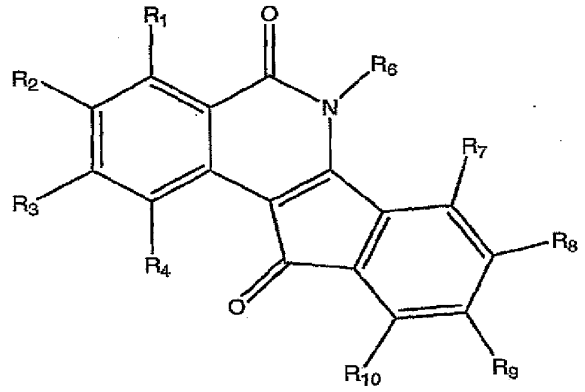
Z_1及びZ_2は独立して、－H又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－OH又は－N（Z_3）（Z_4）の1以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－H又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の1以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；或いは、N、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の3～7員環の単環式複素環を形成し；

nは0～5の整数である。

【請求項36】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（II）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化１９】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

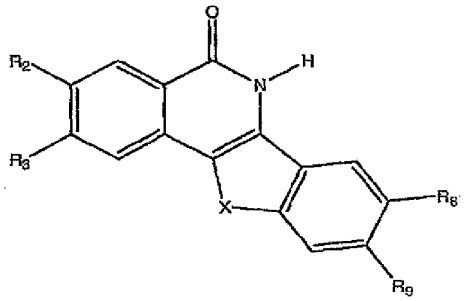
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３７】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２０】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

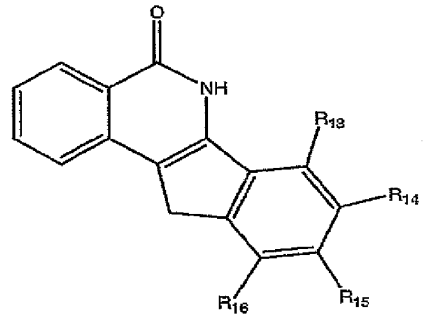
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項３８】

有効量のイリノテカンと、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２１】

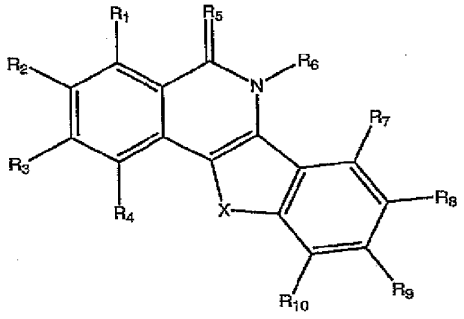


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項３９】
有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（Ｉ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２２】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；

R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

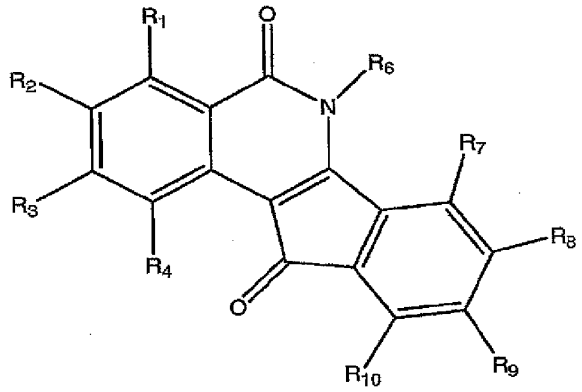
ｎは０～５の整数である。

【請求項４０】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

OnCusp
Ex. 1002

【化２３】



(III)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ′－Ｂ′であり；

Ａ′は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ′は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

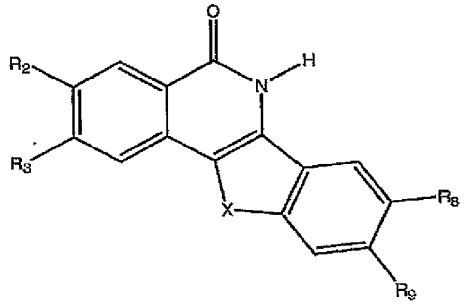
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４１】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＩ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２４】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

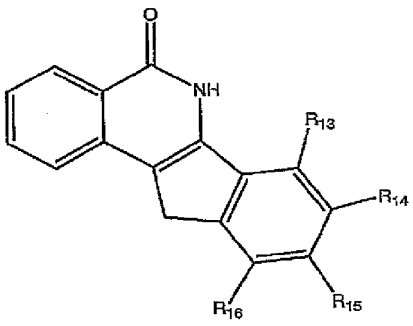
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４２】

有効量のインターロイキン－２と、薬学上許容可能なビヒクル又はキャリアと、式（ＩＶ）を有する有効量の化合物又は化合物の薬学上許容可能な塩とを含む組成物、又はその薬学上許容可能な塩。

【化２５】

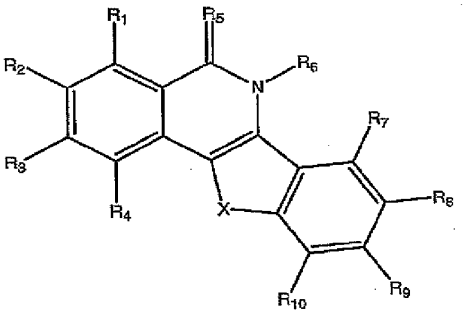


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項４３】
有効量の、式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２６】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、Ｒ

$_{11}$及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

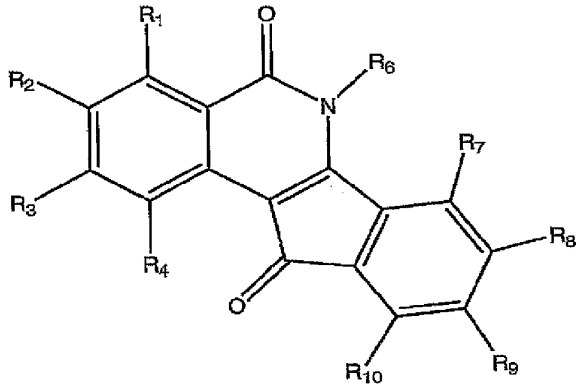
ｎは０～５の整数である。

【請求項４４】

有効量の、式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

OnCusp
Ex. 1002

【化２７】



(III)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

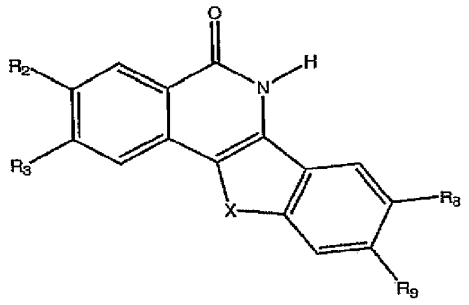
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2

は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４５】

有効量の、式（ＩＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２８】



(III)

式中、

Ｘは、－ＣＨ$_2$－又は－Ｏ－であり；

Ｒ$_2$及びＲ$_3$は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル）、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり；

Ｒ$_8$及びＲ$_9$は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

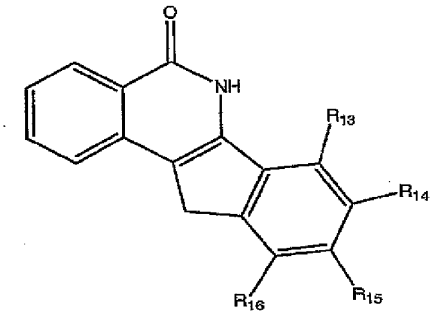
Ｂは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$のアルキル又はヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－アミノ置換されたＣ$_1$～Ｃ$_5$のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Ｚ$_1$及びＺ$_2$は、独立して、－水素又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は独立して－Ｈ又は－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－ＮＨ$_2$の１以上で置換され、或いは、Ｚ$_3$及びＺ$_4$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項４６】

有効量の、式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、循環器疾患以外の血管系疾患を治療する方法。

【化２９】



(IV)

式中、

R_{13}及びR_{16}は水素であり；

R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ

ｎは０～５の整数である。

【請求項４７】

血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４３に記載の方法。

【請求項４８】

血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４４に記載の方法。

【請求項４９】

血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４５に記載の方法。

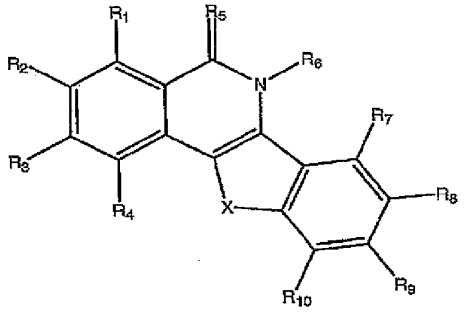
【請求項５０】

血管系疾患が、末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、レイノー病及びレイノー現象、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫又は脂肪性浮腫である請求項４６に記載の方法。

【請求項５１】

有効量の、式（Ｉ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３０】



(I)

式中、
R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（$NR_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Y）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NZ_1Z_2、－（C_1～C_5のアルキレン）－NZ_1，Z_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－NZ_1Z_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－NZ_1Z_2、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Z_1及びZ_2は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Ｚ

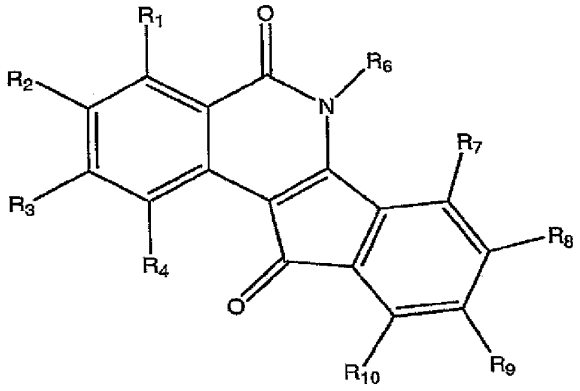
$_3$及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数である。

【請求項５２】

有効量の、式（ＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３１】



(II)

式中、

R_6は、－Ｈ又はC_1～C_5のアルキルであり；

R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ’－Ｂ’であり；

Ａ’は、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂ’は、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は、独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；

Ａは、－SO_2－、－SO_2NH－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＯ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－CH_2－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；

Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－ア

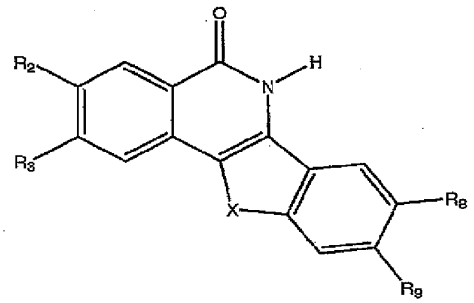
リール、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2NC（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－NZ_1Z_2であり；

Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項５３】

有効量の、式（ＩＩＩ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３２】



(III)

式中、

Ｘは、－CH_2－又は－Ｏ－であり；

R_2及びR_3は独立して、－水素、－ハロ、－ハロ置換されたC_1～C_5のアルキル、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－C_1～C_5のアルキル、－NO_2、－NH_2、－ＣＯＮH_2、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－ＯＣ（Ｏ）－C_1～C_5のアルキル又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－C_1～C_5のアルキルであり；

R_8及びR_9は独立して、－水素又は－Ａ－Ｂであり、

Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、又は－ＮＨＣＯ－であり；

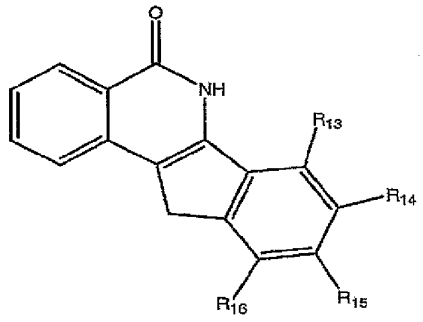
Ｂは、－C_1～C_5のアルキル、－NZ_1Z_2、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環であり、これらのそれぞれが、置換されないか、又はそれぞれ、C_1～C_{10}のアルキル又はヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキルで置換されないか、又は置換された－ヒドロキシ置換されたC_1～C_5のアルキル、－アミノ置換されたC_1～C_5のアルキル、－３～７員環の単環式複素環又は－７～１０員環の二環式複素環の１以上で置換され；且つ

Z_1及びZ_2は、独立して、－水素又は－C_1～C_8のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成する。

【請求項５４】

有効量の、式（ＩＶ）を有する化合物又は薬学上許容可能なその塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、腎不全を治療する方法。

【化３３】



(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。

【請求項５５】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５１に記載の方法。

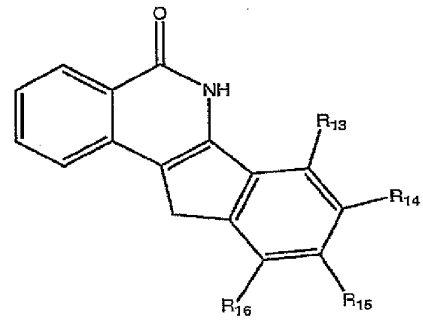
【請求項５６】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５２に記載の方法。

【請求項５７】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５３に記載の方法。

【請求項５８】
腎不全が、慢性腎不全又は急性腎不全である請求項５４に記載の方法。

【請求項５９】
式（ＩＶ）の化合物又は薬学上許容可能なその塩。

【化３４】

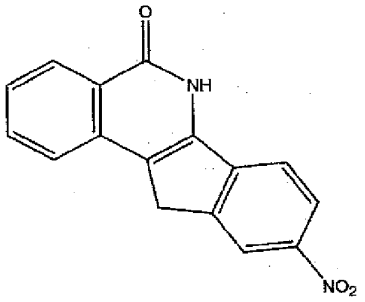


(IV)

式中、
R_{13}及びR_{16}は水素であり；
R_{14}基及びR_{15}基の一方が、－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－NZ_1Z_2であり、

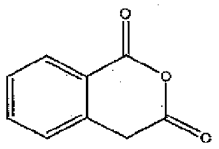
他の基が水素であり；
Z_1及びZ_2は、独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Z_3）（Z_4）の１以上で置換され、その際、Z_3及びZ_4は独立して－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－NH_2の１以上で置換され、或いは、Z_3及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、Z_1及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；且つ
ｎは０～５の整数である。
【請求項６０】
R_{14}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－Ｎ$Z_1$$Z_2$であり、且つ$R_{13}$、$R_{15}$及び$R_{16}$がそれぞれ水素である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。
【請求項６１】
R_{15}が－ＮＨＣ（Ｏ）－（CH_2）$_n$－Ｎ$Z_1$$Z_2$であり、且つ$R_{13}$、$R_{14}$及び$R_{16}$がそれぞれ水素である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。
【請求項６２】
ｎが１である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。
【請求項６３】
ｎが２である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。
【請求項６４】
ｎが３である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。
【請求項６５】
ｎが４である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。
【請求項６６】
ｎが５である請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩。
【請求項６７】
生理学的に許容可能なキャリア又はビヒクル及び有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を含む組成物。
【請求項６８】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、再潅流傷害を治療する方法。
【請求項６９】
再潅流傷害が、脳卒中又は心筋梗塞である請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、炎症性疾患を治療する方法。
【請求項７１】
炎症性疾患が、関節の炎症性疾患、歯肉の慢性炎症性疾患、炎症性腸疾患、炎症性肺疾患、中枢神経系の炎症性疾患、目の炎症性疾患、グラム陽性のショック、グラム陰性のショック、出血性ショック、アナフィラキシー性ショック、外傷性ショック又は化学療法のショックである請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、糖尿病及び糖尿病合併症を治療する方法。
【請求項７３】
糖尿病が、Ｉ型糖尿病又はＩＩ型糖尿病である請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、虚血性の症状を治療する方法。

【請求項７５】
虚血性の症状が、心筋虚血、安定狭心症、不安定狭心症、脳卒中、虚血性心疾患又は脳虚血である請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、臓器移植の結果生じる再酸素化傷害を治療する方法。
【請求項７７】
有効量の請求項５９に記載の化合物又は薬学上許容可能なその化合物の塩を、その必要に応じて動物に投与することを含む、パーキンソン病を治療する方法。
【請求項７８】
化学式５３ａ
【化３５】

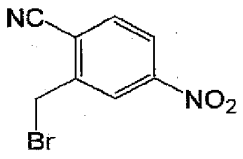


53a

を有する化合物の製造方法において、化学式
【化３６】

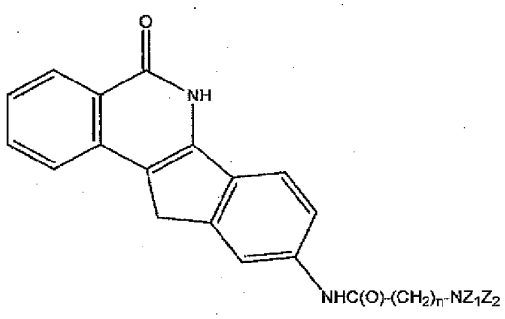


を有する化合物を、化学式５３ａの化合物の製造に十分な条件でトリエチルアミンを存在させる下で、化学式
【化３７】

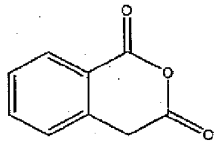


を有する化合物と反応させる工程を備える、製造方法。
【請求項７９】
化学式

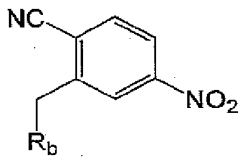
【化３８】



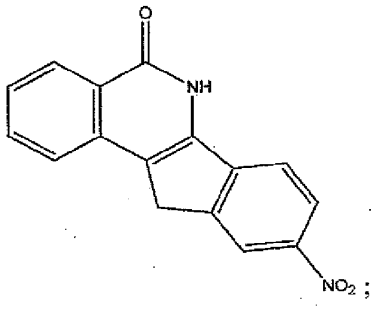
を有する化合物の製造方法において、
（ｉ）化学式
【化３９】



の化合物を、化学式
【化４０】

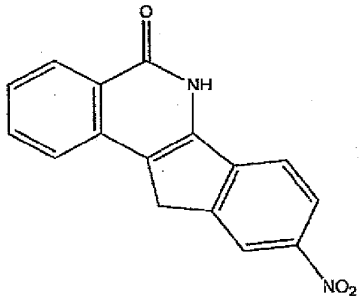


の化合物と反応させる工程であって、R_bは、－Ｃｌ，であり、化学式
【化４１】

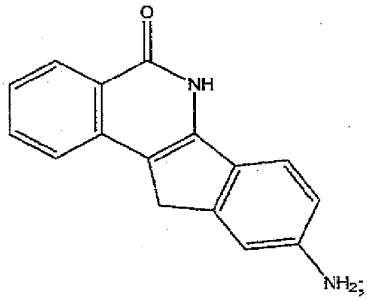


；
の化合物を生成するために十分な条件下で塩基を存在させる反応工程と、
（ｉｉ）化学式

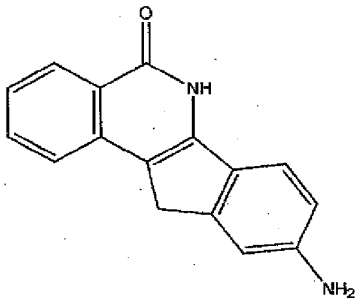
【化４２】



の化合物を、
【化４３】

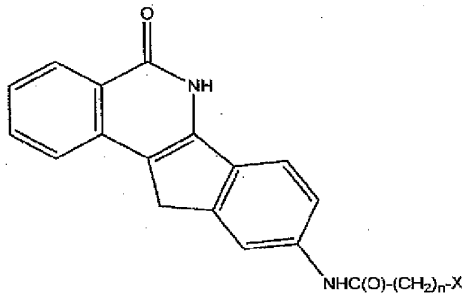


の化合物を生成するために十分な条件下で還元剤と反応させる工程と、
（ｉｉｉ）化学式
【化４４】

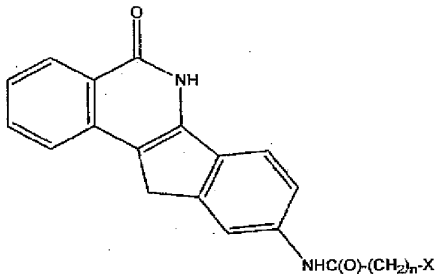


の化合物を、Ｘ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＯＣｌ（ＸはＢｒまたはＣｌであり、ｎは０～５の範囲の整数）の化学式を有する化合物と、化学式

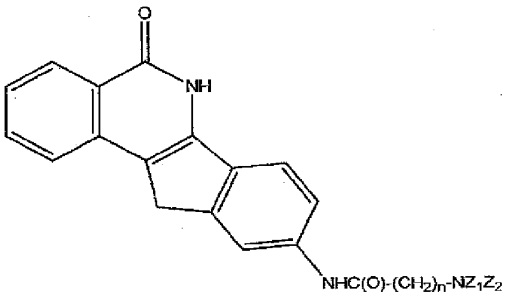
【化４５】



の化合物を生成するために十分な条件下で反応させる工程と、
（ｉｖ）化学式
【化４６】

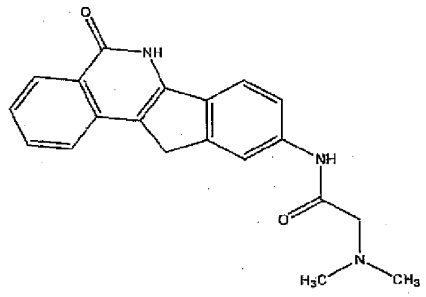


の化合物を化学式ＨＮＺ$_1$Ｚ$_2$の化合物と、化学式
【化４７】



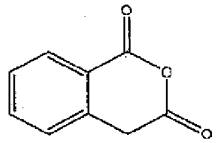
の化合物を生成するために十分な条件下で反応させる工程であって、工程（ｉｉｉ），（ｉｖ）のＸ，ｎは同一であり、
Ｚ$_1$，Ｚ$_2$は独立して、置換されていないか、－ハロ、－ＯＨ，－ＮＺ$_3$Ｚ$_4$のうちの１つ以上で置換された－Ｈまたは－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキルであり、ここで、Ｚ$_3$，Ｚ$_4$は独立して、置換されていないか、－ハロ、－ヒドロキシ，－ＮＨ$_2$のうちの１つ以上で置換された－Ｈまたは－Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキルであり、または、Ｎ，Ｚ$_3$，Ｚ$_4$はＮを含む３～７員環の単環複素環を形成し、またはＮ，Ｚ$_1$，Ｚ$_2$はＮを含む３～７員環の単環複素環を形成する工程とを備える、製造方法。
【請求項８０】
化学式４３

【化４８】

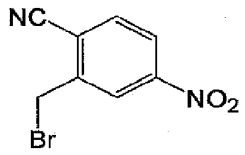


43

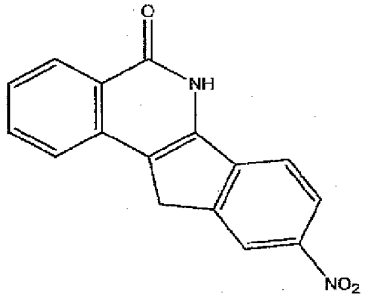
の化合物の製造方法であって、
（ｉ）化学式
【化４９】



の化合物を、化学式
【化５０】



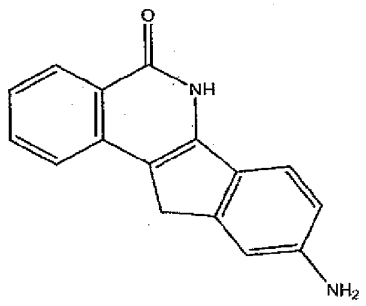
の化合物と反応させる工程であって、化学式５３ａ
【化５１】



53a

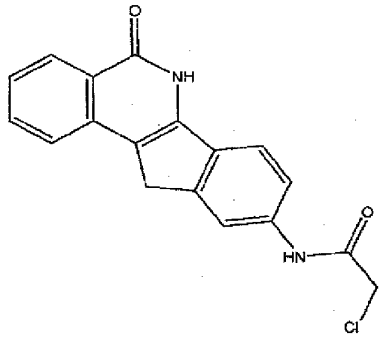
の化合物を生成するために十分な条件下でトリエチルアミンを存在させる反応工程と、
（ｉｉ）化学式５３ａの化合物を５％Ｐｄ／Ｃと、化学式５４

【化５２】



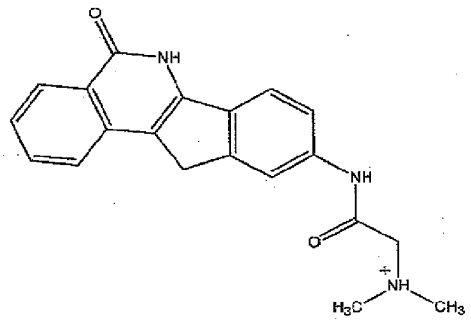
54

の化合物を生成するために十分な条件下でギ酸アンモニウムを存在させて反応させる工程と、
（ｉｉｉ）化学式５４の化合物を、化学式５５ｃ
【化５３】

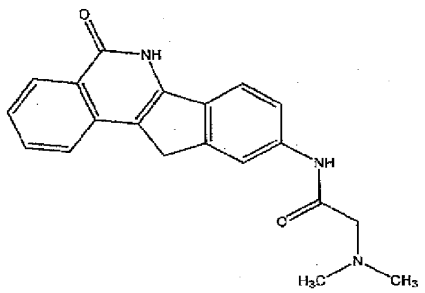


55c

の化合物を生成するために十分な条件下で重炭酸ナトリウムを存在させて、クロロアセチルクロライドと反応させる工程と、
（ｉｖ）化学式５５ｃの化合物を、化合物４３の化合物を生成するために十分な条件下でジメチルアミンと反応させる工程とを備える、製造方法。
【請求項８１】
化学式
【化５４】

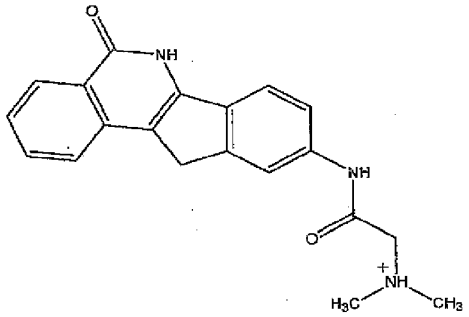


（カンファースルホン酸塩）
の化合物の製造方法であって、化合物４３
【化５５】



43

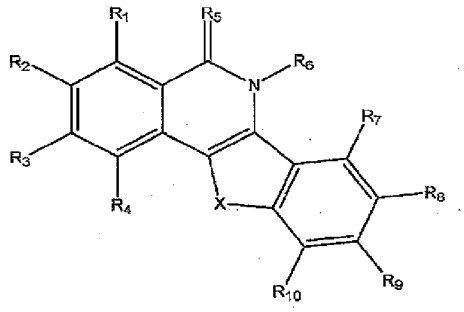
を、化学式
【化５６】



（カンファースルホン酸塩）
の化合物を生成するために十分な条件下でカンファースルホン酸と反応させる工程を備える、製造方法。
【請求項８２】
再潅流傷害を治療、または予防するための方法であって、必要に応じて有効量の化学式（Ｉ）

OnCusp
Ex. 1002

【化５７】



(I)

の化合物またはその医薬上許容可能な塩を動物に投与する工程を備え、
ここで、R_5は、Ｏ、ＮＨ又はＳであり；
R_6は、－Ｈ又は－C_1～C_5のアルキルであり：
Ｘは、－Ｃ（Ｏ）－、－CH_2－、－ＣＨ（ハロ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－（CH_2）$_n$－、－ＣＨ（ＯＨ）、－ＣＨ（－アリール）－、－Ｏ－、－ＮＨ－、－Ｓ－、－ＣＨ（Ｎ$R_{11}R_{12}$）－、又は－Ｎ（SO_2Ｙ）－であり、その際、Ｙは、－ＯＨ、－NH_2又は－（C_1～C_5アルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）であり；
R_{11}及びR_{12}は、独立して水素、又は－C_1～C_{10}のアルキル又はＮであり、R_{11}及びR_{12}は、一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；
R_1は、－水素、－ハロ、－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ａは、－SO_2－、－SO_2ＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＨＣＯＮＨ－、－ＣＯ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＣＯＮ（C_1～C_5のアルキル）－、－ＮＨ－、－（CH_2）－、－Ｓ－又は－Ｃ（Ｓ）－であり；
Ｂは、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－３～７員環の単環式複素環、－７～１０員環の二環式複素環、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－（C_1～C_5のアルキレン）－ＮＺ$_1$，Ｚ$_2$、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－（C_1～C_5のアルキル）－（－３～７員環の単環式複素環）、－H_2ＮＣ（Ｏ）－置換のアリール、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－フェニル、又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2であり、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ又は－Ｃ（ＮＨ）NH_2以外のそれぞれは、置換されないか、又は－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）、－ハロ、－ヒドロキシ、－NO_2、－ＣＮ、－ＮＺ$_1$Ｚ$_2$、－窒素含有の３～７員環の単環式複素環、－C_1～C_{10}のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_2～C_{10}のアルキニル、－アリール、－ベンジル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－C_1～C_5のアルキレン－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（C_1～C_5のアルキル）又は－C_1～C_5のアルキレン－ＯＣ（Ｏ）－（C_1～C_5のアルキル）の１以上で置換され；
R_2、R_3、R_4、R_7、R_8、R_9及びR_{10}は独立して、－水素、－ハロ、－ヒドロキシ、－Ｏ－（C_1～C_5のアルキル），－C_1～C_{10}のアルキル、－ハロ置換のC_1～C_5のアルキル、－C_2～C_{10}のアルケニル、－C_3～C_8の単環式シクロアルキル、－アリール、－NH_2、－アミノ置換のC_1～C_5のアルキル、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1～C_5アルキル）、－ＯＣ（Ｏ）（C_1～C_5アルキル）、－NO_2又は－Ａ－Ｂであり；
Ｚ$_1$及びＺ$_2$は独立して、－Ｈ又は－C_1～C_{10}のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ＯＨ又は－Ｎ（Ｚ$_3$）（Ｚ$_4$）の１以上で置換され、その際、Ｚ

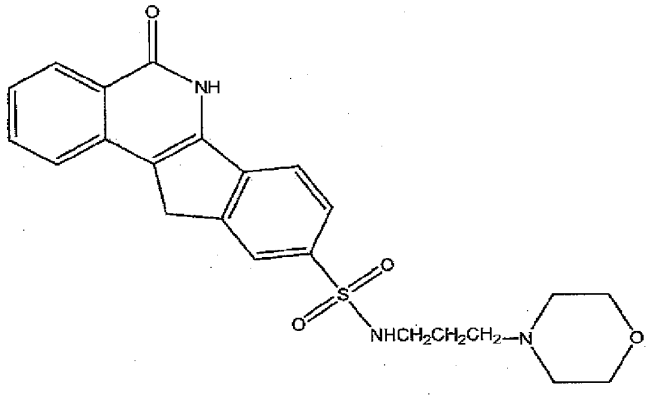
$_3$及びZ_4は独立して－Ｈ又は－$Ｃ_1$～$Ｃ_5$のアルキルであり、それは置換されないか、又は－ハロ、－ヒドロキシ又は－$ＮＨ_2$の１以上で置換され、或いは、Ｎ、$Ｚ_3$及びZ_4は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；或いは、Ｎ、$Ｚ_1$及びZ_2は一緒になって窒素含有の３～７員環の単環式複素環を形成し；

ｎは０～５の整数であって、再潅流傷害は心肺バイパス障害に起因している、方法。

【請求項８３】

前記化合物は、

【化５８】



またはその薬学上許容可能な塩である、請求項８２に記載の方法。

【請求項８４】

前記薬学上許容可能な塩はメシラートである、請求項８３に記載の方法。

【請求項８５】

前記再潅流傷害は心肺バイパス障害に起因している、請求項６８に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/06243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 31/473 ; C07D 221/18
US CL : 514/284 ; 546/61
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/284 ; 546/61

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)
STN STRUCTURE SEARCH, FILE CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/020700 A2 (JAGTAP et al) 13 March 2003 (13.03.2003), see compounds 8a-8r, 10a, 10b in scheme 1 on page 23 as well as claims 1-73.	1-16, 18, 19, 43-77
X	WO 00/21537 (CUSHMAN et al) 20 April 2000 (20.04.2000), see table 1 on pages 16-17 as well as claims 1, 3 and 4.	1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent 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
01 July 2005 (01.07.2005)

Date of mailing of the international search report
29 JUL 2005

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
CHARANJIT S. AULAKH

Telephone No. (571)272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/06243

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Please See Continuation Sheet

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(2)) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/06243

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING
This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

I. Compounds of formula (IV), pharmaceutical compositions containing compounds of formula (I) alone where x represents -C(O)- or -CH2- and methods of using compounds of formula (I) alone where x represents -C(O)- or -CH2-.

II. Methods of using compounds of formula (I) alone where x represents -CH(halo)-, -CH(OH)-(CH2)n-, -CH(OH)- ,-CH(aryl)- or -CH(NR11R12)- as well as pharmaceutical compositions containing these compounds alone.

III. Methods of using compounds of formula (I) alone where x represents -O- or -S- as well as pharmaceutical compositions containing these compounds alone.

IV. Methods of using compounds of formula (I) alone where x represents -NH- or -N(SO2Y)- as well as pharmaceutical compositions containing these compounds alone.

V. Methods of using compounds of formula (I) where x represents -C(O)- or -CH2- in combination with other drugs as well as pharmaceutical compositions containing these combinations.

VI. Methods of using compounds of formula (I) where x represents -CH(halo)-, -CH(OH)-(CH2)n-, -CH(OH)- ,-CH(aryl)- or -CH(NR11R12)- in combination with other drugs as well as pharmaceutical compositions containing these combinations.

VII. Methods of using compounds of formula (I) where x represents -O- or -S- in combination with other drugs as well as pharmaceutical compositions containing these combinations.

VIII. Methods of using compounds of formula (I) where x represents -NH- or -N(SO2Y)- in combination with other drugs as well as pharmaceutical compositions containing these combinations.

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

Species I : Claims 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 and 58-77.

Speices V : Claims 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 and 42.

The following claim(s) are generic: Claims 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 and 57.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/06243

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

There is no common core which in the Markush Practice, is a significant structural element shared by all of the alternatives; see PCT Administrative Instructions Annex B Part I (f) (i) (B) (1).

Continuation of Box III Item 4:
2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58-77 and in part for 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 and 57

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
A61K 31/437	*(2006.01)*	A61K 31/437		4C086
A61K 31/4188	*(2006.01)*	A61K 31/4188		4C206
C07D 221/18	*(2006.01)*	C07D 221/18	CSP	
C07D 401/12	*(2006.01)*	C07D 221/18		
C07D 471/04	*(2006.01)*	C07D 401/12		
C07D 409/12	*(2006.01)*	C07D 471/04	105C	
C07D 491/048	*(2006.01)*	C07D 409/12		
C07D 495/04	*(2006.01)*	C07D 471/04	104Z	
A61P 35/00	*(2006.01)*	C07D 491/048		
A61P 35/02	*(2006.01)*	C07D 495/04	105A	
A61P 13/08	*(2006.01)*	A61P 35/00		
A61P 13/10	*(2006.01)*	A61P 35/02		
A61P 35/04	*(2006.01)*	A61P 13/08		
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P 13/10		
A61P 9/00	*(2006.01)*	A61P 35/04		
A61P 7/02	*(2006.01)*	A61P 43/00	121	
A61P 9/08	*(2006.01)*	A61P 9/00		
A61P 13/12	*(2006.01)*	A61P 7/02		
A61P 9/10	*(2006.01)*	A61P 9/08		
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P 13/12		
A61P 19/02	*(2006.01)*	A61P 9/10	103	
A61P 1/02	*(2006.01)*	A61P 29/00		
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61P 19/02		
A61P 11/00	*(2006.01)*	A61P 1/02		
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P 1/04		
A61P 27/02	*(2006.01)*	A61P 11/00		
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P 25/00		
A61P 39/06	*(2006.01)*	A61P 27/02		
A61P 25/16	*(2006.01)*	A61P 3/10		
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P 9/10		
A61P 19/00	*(2006.01)*	A61P 39/06		
A61P 11/06	*(2006.01)*	A61P 25/16		
A61P 31/06	*(2006.01)*	A61P 37/06		
A61P 31/08	*(2006.01)*	A61P 29/00	101	
A61P 17/00	*(2006.01)*	A61P 19/00		
A61P 17/06	*(2006.01)*	A61P 11/06		
A61P 25/28	*(2006.01)*	A61P 31/06		
A61P 25/14	*(2006.01)*	A61P 31/08		
A61P 21/04	*(2006.01)*	A61P 17/00		
A61P 17/02	*(2006.01)*	A61P 17/06		
A61P 3/06	*(2006.01)*	A61P 43/00		
A61P 9/06	*(2006.01)*	A61P 25/28		
A61P 9/04	*(2006.01)*	A61P 25/14		
A61P 27/12	*(2006.01)*	A61P 21/04		
A61P 27/06	*(2006.01)*	A61P 17/02		
A61P 31/10	*(2006.01)*	A61P 3/06		
A61P 3/04	*(2006.01)*	A61P 9/06		

A61P 9/12 (2006.01)	A61P 9/04
A61K 31/166 (2006.01)	A61P 27/12
	A61P 27/06
	A61P 31/10
	A61P 3/04
	A61P 9/12
	A61K 31/166

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バログル、エルカン
アメリカ合衆国 02180 マサチューセッツ州 ストーンハム ベンジャミン テラス 8
(72)発明者 バン ドゥーザー、ジョン エイチ．
アメリカ合衆国 01833 マサチューセッツ州 ジョージタウン サーロウ ストリート 102
(72)発明者 サボー、シャバ
アメリカ合衆国 01930 マサチューセッツ州 グロスター スタークノート ハイツ 30
(72)発明者 ザルツマン、アンドリュー エル．
アメリカ合衆国 02478 マサチューセッツ州 ベルモント プレザント ストリート 483 ユニット 1
(72)発明者 ロイ、アロカ
アメリカ合衆国 01720 マサチューセッツ州 アクトン イーサン アレン ドライブ 34
(72)発明者 ウィリアムズ、ウィリアム
アメリカ合衆国 01938 マサチューセッツ州 イプスウィッチ ニューマーチ ストリート 14
(72)発明者 ニボロジキン、アレキサンダー
アメリカ合衆国 02132 マサチューセッツ州 ウエスト ロックスベリー デント ストリート 118

Fターム(参考) 4C034 CJ02
4C050 AA01 AA07 BB07 CC16 DD10 EE01 FF01 GG03 HH01 HH04
4C063 AA01 BB07 BB08 CC17 CC25 CC41 CC92 DD03 DD10 DD12 EE01
4C065 AA04 AA18 BB04 BB06 CC01 CC09 DD02 DD03 EE02 HH01 JJ01 JJ04 KK01 KK09 LL01 PP18 QQ04
4C071 AA01 AA07 CC01 CC21 DD15 EE13 FF06 HH08 LL01
4C086 AA01 AA02 AA03 BC27 BC38 BC50 BC60 BC73 CB05 CB22 GA04 GA07 GA08 GA09 GA12 GA13 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 NA14 ZA02 ZA16 ZA22 ZA33 ZA36 ZA38 ZA39 ZA40 ZA42 ZA45 ZA54 ZA59 ZA66 ZA67 ZA68 ZA70 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB08 ZB11 ZB26 ZB27 ZB35 ZC33 ZC35 ZC37 ZC75
4C206 AA01 AA02 AA03 AA04 HA03 KA01 MA01 MA02 MA03 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA15 ZA16 ZA22 ZA33 ZA36 ZA38 ZA39 ZA40 ZA42 ZA44 ZA54 ZA59 ZA66 ZA67 ZA68 ZA70 ZA81

ZA89 ZA94 ZA96 ZB08 ZB09 ZB11 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33
ZB35 ZC02 ZC33 ZC35 ZC75

(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2008-521828
(P2008-521828A)
(43)公表日　平成20年6月26日(2008.6.26)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 16/00	(2006.01)	C07K 16/00	ZNA	4B024
C07K 16/08	(2006.01)	C07K 16/08		4B064
C07K 16/12	(2006.01)	C07K 16/12		4C084
C07K 16/14	(2006.01)	C07K 16/14		4C085
C07K 16/18	(2006.01)	C07K 16/18		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 62 頁）　最終頁に続く

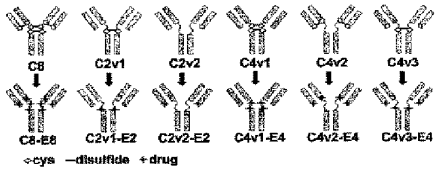
(21)出願番号　特願2007-543601 (P2007-543601)
(86)(22)出願日　平成17年11月29日 (2005.11.29)
(85)翻訳文提出日　平成19年7月10日 (2007.7.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/043257
(87)国際公開番号　WO2006/065533
(87)国際公開日　平成18年6月22日 (2006.6.22)
(31)優先権主張番号　60/631,757
(32)優先日　平成16年11月29日 (2004.11.29)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/673,146
(32)優先日　平成17年4月19日 (2005.4.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505314468
シアトル　ジェネティックス，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ワシントン　９８０２１，　ボセル，　エス．イー．，　３０ティーエイチ　ドライブ　－　２１８２３
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】操作された抗体およびイムノコンジュゲート

(57)【要約】
薬剤結合の所定部位および化学量論を有する抗体薬剤コンジュゲートを提供する。抗体薬剤コンジュゲートを使用する方法も提供する。特定の実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートは、操作された抗体を含む、イムノコンジュゲートであって、該操作された抗体は、（ａ）標的抗原のための機能的に活性な抗原結合領域、（ｂ）鎖間システイン残基少なくとも１つ、（ｃ）鎖間システイン残基のアミノ酸置換少なくとも１つ、および（ｄ）鎖間システイン残基少なくとも１つにコンジュゲートした診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤を有する。



OnCusp
Ex. 1002

【特許請求の範囲】
【請求項1】
操作された抗体を含む、イムノコンジュゲートであって、該操作された抗体は、（ａ）標的抗原のための機能的に活性な抗原結合領域、（ｂ）鎖間システイン残基少なくとも１つ、（ｃ）鎖間システイン残基のアミノ酸置換少なくとも１つ、および（ｄ）鎖間システイン残基少なくとも１つにコンジュゲートした診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤を有する、イムノコンジュゲート。
【請求項2】
鎖間システイン残基４つおよび鎖間システイン残基のアミノ酸置換４つを有する、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項3】
鎖間システイン残基２つおよび鎖間システイン残基のアミノ酸置換６つを含む、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項4】
ＩｇＧ１またはＩｇＧ４である、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項5】
各アミノ酸置換がシステインからセリンへの置換である、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項6】
前記診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤が治療薬剤である、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項7】
前記治療薬剤がオーリスタチンまたはオーリスタチン誘導体である、請求項６記載のイムノコンジュゲート。
【請求項8】
前記オーリスタチン誘導体がドバリン－バリン－ドライソロイシン－ドラプロリン－フェニルアラニン（ＭＭＡＦ）またはモノメチオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）である、請求項７記載のイムノコンジュゲート。
【請求項9】
前記診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤が診断薬剤である、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項10】
前記診断薬剤が放射性薬剤、酵素、蛍光化合物または電子移動剤である、請求項９記載のイムノコンジュゲート。
【請求項11】
前記抗体がＣＤ２０、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４０、ＣＤ７０またはＬｅｗｉｓ　Ｙに結合する、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項12】
前記抗体が免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質に結合する、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項13】
前記抗体が微生物抗原に結合する、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項14】
前記抗体がウイルス抗原に結合する、請求項１記載のイムノコンジュゲート。
【請求項15】
前記抗体が抗核抗体、抗ｄｓＤＮＡ抗体、抗ｓｓＤＮＡ抗体、抗カルジオリピン抗体ＩｇＭもしくはＩｇＧ、抗リン脂質抗体ＩｇＭもしくはＩｇＧ、抗ＳＭ抗体、抗ミトコンドリ

ア抗体、抗甲状腺抗体、抗ミクロソーム抗体、抗サイログロブリン抗体、抗ＳＣＬ７０抗体、抗Ｊｏ抗体、抗Ｕ１ＲＮＰ抗体、抗Ｌａ／ＳＳＢ抗体、抗ＳＳＡ抗体、抗ＳＳＢ抗体、抗壁細胞抗体、抗ヒストン抗体、抗ＲＮＰ抗体、抗Ｃ　ＡＮＣＡ抗体、抗Ｐ　ＡＮＣＡ抗体、抗中心体抗体、抗フィブリラリン抗体または抗ＧＢＭ抗体である、請求項１記載のイムノコンジュゲート。

【請求項16】

前記抗体が抗体フラグメントである、請求項１記載のイムノコンジュゲート。

【請求項17】

前記抗体フラグメントがＦａｂ、Ｆａｂ’およびｓｃＦｖＦｃから選択される、請求項１６記載のイムノコンジュゲート。

【請求項18】

前記フラグメントがＦａｂ’またはｓｃＦｖＦｃである、請求項１７記載のイムノコンジュゲート。

【請求項19】

請求項１記載のイムノコンジュゲートであって、下記の式：

【化1】

$$Ab_z\left(-A_a-W_w-Y_y-D\right)_p$$

を有するか、または薬学的に受容可能なその塩または溶媒和物であり、

ここで：

Ａｂは抗体であり、

Ａはストレッチャー単位であり、

ａは０または１であり、

各Ｗは独立してリンカー単位であり、

ｗは０～１２の範囲の整数であり、

Ｙはスペーサー単位であり、

ｙは０、１または２であり、

ｐは１～約２０の範囲であり、

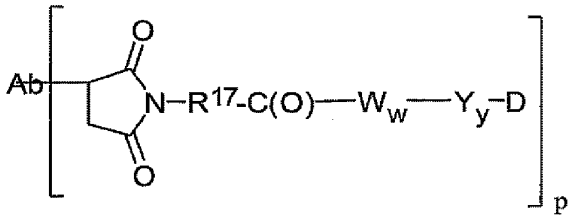
Ｄは診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤であり、そして、

ｚはタンパク質上の所定のコンジュゲーション部位の数である、イムノコンジュゲート。

【請求項20】

下記の式：

【化2】



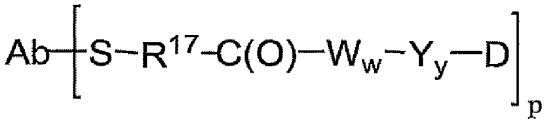
を有し、ここで、Ｒ１７は－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ－、－Ｏ－－（Ｃ１－Ｃ８アルキル）－、－アリーレン－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－アリーレン－、－アリーレン－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－（Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ）－、－（Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ）－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－（Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ）－、－（Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ）－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－（CH_2CH_2O）ｒ－および（CH_2CH_2O）ｒ－CH_2－から選択される、請求項１９記載のイムノコンジュゲート。

【請求項21】

下記の式：

OnCusp
Ex. 1002

【化3】

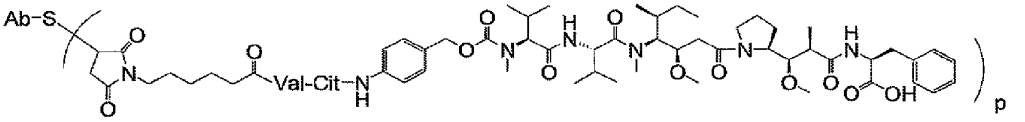


ここで、Ｒ１７は－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ－、－Ｏ（Ｃ１－Ｃ８アルキル）－、－アリーレン－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－アリーレン－、－アリーレン－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－（Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ）－、－（Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ）－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－（Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ）－、－（Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ）－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－および（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－ＣＨ２－から選択される］を有する、請求項１９記載のイムノコンジュゲート。

【請求項22】

下記の式：

【化4】



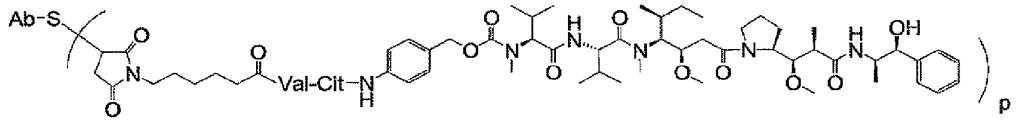
Ab-MC-vc-PAB-MMAF

を有する、請求項１９記載のイムノコンジュゲート。

【請求項23】

下記の式：

【化5】



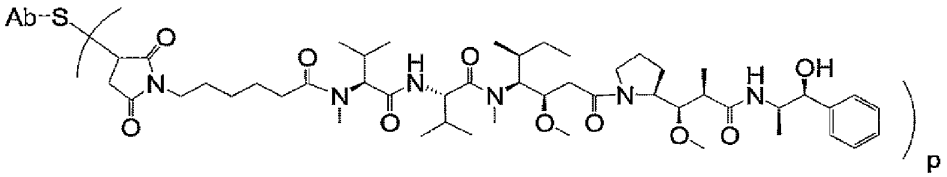
Ab-MC-vc-PAB-MMAE

を有する、請求項１９記載のイムノコンジュゲート。

【請求項24】

下記の式：

【化6】



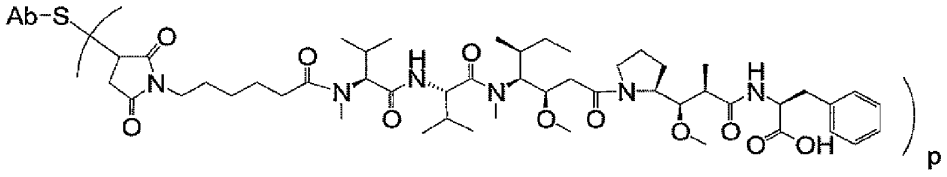
Ab-MC-MMAE

を有する、請求項１９記載のイムノコンジュゲート。

【請求項25】

下記の式：

【化7】



Ab-MC-MMAF

を有する、請求項１９記載のイムノコンジュゲート。

【請求項26】

請求項１記載のイムノコンジュゲートおよび薬学的に受容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項27】

前記イムノコンジュゲートが薬学的に受容可能な非経口ビヒクルを用いて製剤される、請求項２６記載の医薬組成物。

【請求項28】

前記イムノコンジュゲートが単位用量の注射可能形態に製剤される、請求項２６記載の医薬組成物。

【請求項29】

腫瘍細胞または癌細胞を殺傷または増殖抑制するための方法であって、該腫瘍細胞または癌細胞を殺傷または増殖抑制するために有効な量の請求項６記載のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物で該腫瘍細胞または癌細胞を処理する工程を包含する、方法。

【請求項30】

癌を処置するための方法であって、ある量の請求項６記載のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を患者に投与する工程を包含し、該量が、癌の処置に有効である、方法。

【請求項31】

自己免疫疾患を処置するための方法であって、ある量の請求項６記載のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を患者に投与する工程を包含し、該量が該自己免疫疾患の処置に有効である、方法。

【請求項32】

感染性疾患を処置するための方法であって、ある量の請求項６記載のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を患者に投与する工程を包含し、該量が該感染性疾患の処置に有効である、方法。

【請求項33】

請求項６記載の抗体薬剤コンジュゲート化合物；

容器；および

ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４０、ＣＤ７０およびＬｅｗｉｓ　Ｙのうちの少なくとも１つの過剰発現を特徴とする癌を処置するために該化合物を使用することができることを示す、パッケージインサートまたはラベル

を備える、製造品。

【請求項34】

癌を診断するための方法であって、患者に請求項９記載のイムノコンジュゲートの有効量を投与する工程であって、ここで該イムノコンジュゲートは該癌により過剰発現される抗原に結合する工程；および該患者における該イムノコンジュゲートを検出する工程を包含する、方法。

【請求項35】

感染性疾患を診断するための方法であって、患者に請求項９記載のイムノコンジュゲート

の有効量を投与する工程であって、ここで該イムノコンジュゲートは微生物抗原またはウイルス抗原に結合する、工程；および該患者における該イムノコンジュゲートを検出する工程を包含する、方法。
【請求項36】
自己免疫疾患を診断するための方法であって、患者に請求項９記載のイムノコンジュゲートの有効量を投与する工程であって、ここで該イムノコンジュゲートは該自己免疫疾患に関連する抗原に結合する、工程；および該患者における該イムノコンジュゲートを検出する工程を包含する、方法。
【請求項37】
イムノコンジュゲートを製造するための方法であって：
（ａ）操作された抗体を発現する宿主細胞を培養する工程であって、ここで、該操作された抗体は、（ｉ）標的抗原のための機能的に活性な抗原結合領域、（ｉｉ）鎖間システイン残基少なくとも１つ、および（ｉｉｉ）鎖間システイン残基のアミノ酸置換少なくとも１つを含み、該宿主細胞は、該操作された抗体をコードする単離された核酸で形質転換またはトランスフェクトされている、工程；
（ｂ）培養された宿主細胞または培養培地から該抗体を回収する工程；ならびに
（ｃ）該鎖間システイン残基少なくとも１つに診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤をコンジュゲートする工程
を包含する、方法。
【請求項38】
前記アミノ酸置換がシステインからセリンへの置換である、請求項３７記載の方法。
【請求項39】
前記抗体がインタクトな抗体または抗原結合フラグメントである、請求項３７記載の方法。
【請求項40】
前記抗原結合フラグメントがＦａｂ、Ｆａｂ’またはｓｃＦｖＦｃである、請求項３９記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【0001】
（関連出願の引用）
本出願は各々参照により全体が本明細書に援用される２００４年１１月２９日出願の米国仮特許出願第６０／６３１，７５７号および２００５年４月１９日出願の米国仮特許出願第６０／６７３，１４６号の利益を請求する。
【背景技術】
【0002】
（背景）
本発明は活性部分に対する結合の予め決められた点を有する操作された抗体に関する。特に本発明は抗体のアミノ酸残基の選択的置換により活性部分に対する結合の予め決められた点を有する抗体に関する。
【0003】
放射性核種または他の細胞傷害性剤にコンジュゲートしたターゲティングモノクローナル抗体の使用は、腫瘍部位に直接そのような薬剤を送達することにより薬剤の正常組織への曝露を制限するという可能性をもたらす（例えば非特許文献１参照）。近年、抗体系の治療の潜在性および腫瘍関連抗原の局在化におけるその正確さが、実験室および臨床の両方の研究において明らかにされている（例えば非特許文献２；非特許文献３；Ｂａｌｄｗｉｎ等の特許文献１および特許文献２；Ｙｏｕｎｇの特許文献３および特許文献４；Ｉｒｉｅ等の特許文献５；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ等の特許文献６および特許文献７参照）。一般的に、腫瘍関連マーカーに対する放射標識された抗体または抗体フラグメントの使用は、治療のためよりも腫瘍の位置特定のために良好に使用されているが、その理由は部分的に

は、腫瘍による抗体の取り込みが一般的に低値であり、注射した総量の僅か０．０１％～０．００１％の範囲に過ぎないためである（非特許文献４）。腫瘍への用量を増大させるために放射標識の濃度を増大させることは、一般的に、放射能への健康な組織の曝露も増大させるため、逆効果である。

【0004】

モノクローナル抗体は放射性核種以外の種々の薬剤にコンジュゲートして診断および治療において使用するためのイムノコンジュゲートを形成することができる。これらの薬剤は、イムノコンジュゲートが放射性同位体ならびに毒素および化学療法剤などの細胞傷害性剤と安定な結合を形成できるようにするキレートを包含する。例えば、通常は全身投与されれば患者にとって毒性が高すぎる細胞傷害性剤は、その毒性作用が標的抗原を担持する腫瘍細胞のみに対して指向されるような様式において抗癌抗体にコンジュゲートすることができる。イムノコンジュゲートの診断上または治療上の効果は数種の要因に依存している。これらの要因に包含されるものは、薬剤の抗体に対するモル比およびイムノコンジュゲートの結合活性である。

【0005】

研究者等は、抗体に直接連結できる薬剤の最大数が抗体分子上の修飾可能な部位の数および抗体の免疫反応性の潜在的損失により制限されることを見出している。例えば、非特許文献５は、抗原結合活性を大きく低減することなく抗体に取り込ませることのできる薬剤分子の数には限界があることを報告している。Ｋｕｌｋａｒｎｉ等によれば、メトトレキセートに関して得られた最大取り込みは抗体分子当たり約１０個のメトトレキセート分子であり、約１０を超えて薬剤－抗体のモル比を上昇させる試みはイムノコンジュゲートの収率を低下させ、抗体活性を損なうものであることが見出されている。非特許文献６は同様の結果を報告している。

【0006】

薬剤および放射性核種のための送達ビヒクルとしてモノクローナル抗体が機能するためには、その部位特異的コンジュゲーションのための方法を、最終的な免疫反応性の変動を最小限にしながら開発することが重要である。最も一般的には、薬剤と放射性核種とのコンジュゲーションはアミノ酸残基の側鎖への共有結合を介して行われる。これらの残基の非部位制限性の特徴のため、抗原結合部位（ＡＢＳ）の内部または近接部に存在する残基における望ましくないカップリングを回避することは困難であり、低減された親和性および非均質な抗原結合特性がもたらされてしまう。あるいは、コンジュゲーションはスルフィドリル基に指向させることもできる。しかしながら、直接の標識はジスルフィド（Ｓ－Ｓ）結合の還元に依存しており、タンパク質のフラグメント化の危険性を伴う可能性がある。このような結合の不完全な還元は結合の非均質なパターンをもたらす場合がある。

【0007】

例えば、ｃＡＣ１０抗体薬剤コンジュゲート（ＣＤ３０を指向）の早期前臨床型は、システイン残基を介した抗体への８ＭＭＡＥ（モノメチルオーリスタチンＥ）薬剤分子の連結を行っている。システイン残基は４つの鎖間ジスルフィド結合の還元により得られる（非特許文献７）。最近の報告はｃＡＣ１０ＡＤＣのインビボのパラメーターに対する薬剤の多重度の作用を説明している（非特許文献８）。抗体当たり４薬剤分子が結合したｃＡＣ　１０ＭＭＡＥ薬剤コンジュゲート（Ｃ８－Ｅ４と標記、ここでＣ＃はコンジュゲーションのために使用できる鎖内システイン残基の数を示し、Ｅ＃は抗体分子当たり結合した薬剤分子の平均数を示す）は、動物モデルにおいて、抗体当たり８薬剤が結合したｃＡＣ１０薬剤コンジュゲート（Ｃ８－Ｅ８と標記）よりも大きい治療ウインドウを有することが示されている。Ｃ８－Ｅ４はｃＡＣ１０単独と同様の薬物動態特性を示すのに対し、Ｃ８－Ｅ８はより急速に循環から消失する（非特許文献８）。これらの特性はＣ８－Ｅ４が臨床開発の候補であることを示唆している。

【0008】

ｃＡＣ１０からのＣ８－Ｅ４の製造は、コンジュゲーションの方法によっては低収量で薬剤結合が非均一となる。抗体当たり８薬剤未満が負荷されたＭＭＡＥコンジュゲートを

得るために使用される１つの方法は、システイン残基の部分還元を利用している（非特許文献８）。このコンジュゲーションプロセスは、抗体分子当たり０、２、４、６または８薬剤分子を有する物質種（それぞれＣ８－Ｅ０、Ｃ８－Ｅ２、Ｃ８－Ｅ４、Ｃ８－Ｅ６およびＣ８－Ｅ８と標記）の混合物をもたらし、そのうち約３０％がＣ８－Ｅ４である。このコンジュゲート混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィーにより分離することにより純粋なＣ８－Ｅ４を得ることができるが、このプロセスは、薬剤が８つの可能なコンジュゲーション部位に渡って分布するため、全体収量の更なる低下と比均質性の存続とをもたらす。さらにまた、重鎖から軽鎖へのジスルフィド結合の還元が重鎖から重鎖ジスルフィドへの頻度のほぼ２倍で起こり、該当するＣ８－Ｅ４異性体は２：１の比となってしまう（例えば非特許文献９参照）。

【特許文献1】米国特許第４，９２５，９２２号明細書
【特許文献2】米国特許第４，９１６，２１３号明細書
【特許文献3】米国特許第４，９１８，１６３号明細書
【特許文献4】米国特許第５，２０４，０９５号明細書
【特許文献5】米国特許第５，１９６，３３７号明細書
【特許文献6】米国特許第５，１３４，０７５号明細書
【特許文献7】米国特許第５，１７１，６６５号明細書
【非特許文献1】Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ，Ｓｅｍｉｎ，Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．１９：３３２（１９８９）
【非特許文献2】Ｔｈｏｒｐｅ，ＴＩＢＴＥＣＨ　１１；４２（１９９３）
【非特許文献3】Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ａｍｅｒｉｃａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　１：６４（１９９４）
【非特許文献4】Ｖａｕｇｈａｎら、Ｂｒｉｔ．Ｊ．Ｒａｄｉｏｌ．６０：５６７（１９８７）
【非特許文献5】Ｋｕｌｋａｒｎｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　４１：２７００－２７０６（１９８１）
【非特許文献6】Ｋａｎｅｌｌｏｓら、ＪＮＣＩ７５：３１９－３２９（１９８５）
【非特許文献7】Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１（７）：７７８－８４（２００３）
【非特許文献8】Ｈａｍｂｌｅｔｔら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１５：７０６３－７０７０（２００４）
【非特許文献9】Ｓｕｎら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ　Ｃｈｅｍ　１６：１２８２－１２９０（２００５）

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【0009】
従って、化学量論的な薬剤結合のために１つ以上の予め決められた部位を有する抗体が必要とされている。過去における上記および他の制約および問題は本発明により解決される。
【課題を解決するための手段】
【0010】
（発明の簡単な要旨）
本発明は操作された抗体およびイムノコンジュゲートに関する。本発明は操作された抗体およびイムノコンジュゲート、ならびに、このような操作された抗体およびイムノコンジュゲートを製造する方法を提供する。本発明はまた、イムノコンジュゲートの医薬組成物ならびに種々の状態および疾患を治療または診断するためにイムノコンジュゲートを使用する方法を提供する。
【0011】
１つの態様において、本発明は、標的抗原のための機能的に活性な抗原結合部位、鎖間システイン残基少なくとも１つ、鎖間システイン残基のアミノ酸置換少なくとも１つ、お

よび鎖間システイン残基少なくとも１つにコンジュゲートした診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤を有する操作された抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。１つの実施形態において、本発明は鎖間システイン残基４つおよび鎖間システイン残基のアミノ酸置換４つを有するイムノコンジュゲートを提供する。関連する実施形態において、本発明は鎖間システイン残基２つおよび鎖間システイン残基のアミノ酸置換６つを含むイムノコンジュゲートを提供する。別の実施形態において、本発明はＩｇＧ１またはＩｇＧ４アイソタイプであるイムノコンジュゲートを提供する。アミノ酸置換は例えば鎖間システイン残基のシステインからセリンへのアミノ酸置換であり得る。

【0012】

別の態様において、本発明は鎖間システイン残基少なくとも１つに治療薬剤がコンジュゲートしている上記したイムノコンジュゲートを提供する。１つの実施形態において、治療薬剤はオーリスタチンまたはオーリスタチン誘導体である。一部の実施形態においては、オーリスタチン誘導体はドバリン－バリン－ドライソロイシン－ドラプロリン－フェニルアラニン（ＭＭＡＦ）またはモノメチオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）である。

【0013】

別の態様において、本発明は鎖間システイン残基少なくとも１つに診断薬剤がコンジュゲートしている上記したイムノコンジュゲートを提供する。診断薬剤は例えば放射性薬剤、酵素、蛍光化合物または電子移動剤であり得る。

【0014】

別の態様において、本発明は抗体が標的抗原に対して機能的に活性な抗原結合部位を有する上記したイムノコンジュゲートを提供する。抗体は例えばＣＤ２０、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４０、ＣＤ７０またはＬｅｗｉｓ　Ｙに結合することができる。抗体はまた、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質に結合することもできる。他の例では、抗体はまた、微生物抗原またはウイルス抗原に結合する。抗体はまた、抗核抗体、抗ｄｓＤＮＡ抗体、抗ｓｓＤＮＡ抗体、抗カルジオリピン抗体ＩｇＭまたはＩｇＧ、抗リン脂質抗体ＩｇＭまたはＩｇＧ、抗ＳＭ抗体、抗ミトコンドリア抗体、抗甲状腺抗体、抗ミクロソーム抗体、抗サイログロブリン抗体、抗ＳＣＬ７０抗体、抗Ｊｏ抗体、抗Ｕ１ＲＮＰ抗体、抗Ｌａ／ＳＳＢ抗体、抗ＳＳＡ抗体、抗ＳＳＢ抗体、抗壁細胞抗体（ａｎｔｉ－ｐａｒｉｅｔａｌ　ｃｅｌｌ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）、抗ヒストン抗体、抗ＲＮＰ抗体、抗Ｃ　ＡＮＣＡ抗体、抗Ｐ　ＡＮＣＡ抗体、抗中心体抗体、抗フィブリラリン抗体または抗ＧＢＭ抗体であり得る。

【0015】

別の態様において、本発明は抗体が抗体フラグメントであるイムノコンジュゲートを提供する。１つの実施形態においては、抗体フラグメントはＦａｂ、Ｆａｂ’またはｓｃＦｖＦｃから選択される。

【0016】

１つの態様において、本発明は下記の式のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を提供する：

【0017】

【化8】

$$Ab_z-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$$

ここで、
Ａｂは抗体であり、
Ａはストレッチャー単位であり、
ａは０または１であり、
各Ｗは独立してリンカー単位であり、
ｗは０～１２の整数であり、
Ｙはスペーサー単位であり、

ｙは０、１または２であり、
ｐは１～約２０の範囲であり、そして、
Ｄは診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤であり、そして、
ｚはタンパク質上の所定のコンジュゲーション部位の数である。

【0018】

一部の実施形態においては、イムノコンジュゲートは以下の式を有する：Ａｂ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦ、Ａｂ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、Ａｂ－ＭＣ－ＭＭＡＥまたはＡｂ－ＭＣ－ＭＭＡＦ。

【0019】

別の態様において、本発明は上記したイムノコンジュゲートおよび薬学的に受容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。１つの実施形態において、イムノコンジュゲートは薬学的に受容可能な非経口ビヒクルを用いて製剤される。別の実施形態においては、イムノコンジュゲートは単位用量の注射可能形態に製剤される。関連する特徴において、本発明は治療薬剤にコンジュゲートしたイムノコンジュゲート、容器、ならびに、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４０、ＣＤ７０およびＬｅｗｉｓ　Ｙのうちの少なくとも１つの過剰発現を特徴とする癌を処置するためにこの化合物を使用することができることを示すパッケージインサートまたはラベルを含む製造品を提供する。

【0020】

別の態様において、本発明は治療薬剤にコンジュゲートした上記イムノコンジュゲートを用いて種々の状態または疾患を処置する方法を提供する。１つの実施形態において、方法は、腫瘍細胞または癌細胞を殺傷または増殖抑制するために有効な量のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を腫瘍細胞または癌細胞に投与することにより腫瘍細胞または癌細胞を殺傷または増殖抑制することを包含する。別の実施形態において、この方法は、癌を処置するために有効な量のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を患者に投与することにより癌を処置することを包含する。別の実施形態において、この方法は、自己免疫疾患を処置するために有効な量のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を患者に投与することによりこの自己免疫疾患を処置することを包含する。さらに別の実施形態において、この方法は感染性疾患を処置するために有効な量のイムノコンジュゲートまたは薬学的に受容可能なその塩もしくは溶媒和物を患者に投与することにより感染性疾患を処置することを包含する。

【0021】

別の態様において、本発明は診断薬剤にコンジュゲートした上記イムノコンジュゲートを用いて種々の状態または疾患を診断する方法を提供する。１つの実施形態において、方法は癌により過剰発現される抗原に結合するイムノコンジュゲートの有効量を患者に投与することおよび患者におけるイムノコンジュゲートを検出することにより癌を診断することを包含する。別の実施形態において、方法は微生物またはウイルス抗原に結合するイムノコンジュゲートの有効量を患者に投与することおよび患者におけるイムノコンジュゲートを検出することにより感染性疾患を診断することを包含する。さらに別の実施形態においては、方法は自己免疫疾患に関連する抗原に結合するイムノコンジュゲートの有効量を患者に投与することおよび患者におけるイムノコンジュゲートを検出することにより自己免疫疾患を診断することを包含する。

【0022】

別の態様において、本発明は標的抗原のための機能的に活性な抗原結合領域、鎖間システイン残基少なくとも１つ、および、鎖間システイン残基のアミノ酸置換少なくとも１つを有する操作された抗体を発現する宿主細胞を培養することを含むイムノコンジュゲートの製造方法を提供する。宿主細胞は操作された抗体をコードする単離された核酸で形質転換またはトランスフェクトされ得る。抗体は培養された宿主細胞または培養培地から回収され、そして鎖間システイン残基少なくとも１つを介して診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤にコンジュゲートされ得る。１つの実施形態において、抗体はインタクトな抗体また

は抗原結合フラグメントである。好ましい実施形態においては、抗原結合フラグメントはＦａｂ、Ｆａｂ’またはｓｃＦｖＦｃである。

【0023】

本発明は、以下に記載する好ましい実施形態の詳細な説明を、添付する図面と組み合わせて参照することにより最も良好に理解されよう。以下の考察は説明、解説および例示であり、添付する請求項により定義される範囲を限定するものとはみなされない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

（定義）

特段の記載が無い限り、本明細書において使用する全ての技術的および科学的な用語は、記載する方法および組成物に関する分野における通常の技術者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。本明細書においては、以下の用語および表現は特段の記載が無い限りそれらに帰属する意味を有する。

【0025】

抗体。本明細書においては、「抗体」とはモノクローナル抗体、例えばネズミ、キメラ、ヒトまたはヒト化抗体、抗体の混合物、ならびにその抗原結合フラグメントを指す。そのようなフラグメントにはＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆ（ａｂ’）$_2$が包含される。抗体フラグメントはまた、軽鎖可変領域よりなる単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域よりなる「Ｆｖ」フラグメント、ならびに、軽鎖および重鎖の可変領域がペプチドリンカーにより連結されている組み換え一本鎖ポリペプチド分子（例えばｓｃＦｖおよびｓｃＦｖＦｃ）も包含する。一部の実施形態においては、抗体は鎖間システイン残基少なくとも１つを含む。

【0026】

インタクトな抗体。「インタクトな」抗体はV_LおよびV_H抗原結合可変領域ならびに軽鎖定常ドメイン（C_L）および重鎖定常ドメインC_H1、C_H2、C_H3およびC_H4を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン（例えばヒト天然配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列変異体であってよい。

【0027】

鎖間システイン残基：本明細書においては、「鎖間システイン残基」または「鎖間システイン」とは未操作抗体の別の鎖のシステイン残基との鎖間ジスルフィド結合の形成に関与することができる抗体鎖のシステイン残基を指す。鎖間システイン残基は軽鎖のC_Lドメイン、重鎖のC_H1ドメインおよびヒンジ領域に位置する。抗体中の鎖間システイン残基の数は変動できる。例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４アイソタイプはそれぞれ４、６、１３および４つの鎖間システイン結合を有する。特定の例においては、抗体ｃＡＣ１０を参照すれば、鎖間システインチオールは、Ｋａｂａｔのナンバリング法に従って、軽鎖のアミノ酸２１４位ならびに重鎖のアミノ酸２２０、２２６および２２９位に位置する（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ ｅｄ．ＮＩＨ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））。

【0028】

鎖間ジスルフィド結合。「鎖間ジスルフィド結合」という用語は、抗体に関する場合、２つの重鎖または重鎖と軽鎖との間のジスルフィド結合を指す。

【0029】

操作された抗体。本明細書においては、「操作された抗体」とは別のアミノ酸残基との鎖間システイン残基のアミノ酸置換（例えばシステインからセリンへの置換）少なくとも１つを有し、そして、未置換の鎖間システイン残基少なくとも１つを保持している、天然に存在しないインタクトな抗体または抗原結合フラグメントを指す。

【0030】

異性体。「異性体」という用語は、抗体に関する場合、鎖間システイン残基のアミノ酸置換の特定のパターンまたは順序を有する抗体を指す。イムノコンジュゲートに関する場

合、「異性体」という用語は、鎖間システイン残基のアミノ酸置換の特定のパターン若しくは順序および／または活性部分のコンジュゲーション部位の特定のパターンを有する抗体を指す。抗体の異性体は命名法Ｃ＃ｖ＃により指し示すことができ、ここでＣ＃はコンジュゲーションのために使用可能な鎖間システイン残基の数を示し、そしてｖ＃は鎖間システイン残基の特定のパターンまたは順序を指す。イムノコンジュゲートの異性体は命名法Ｃ＃ｖ＃－Ｙにより指し示すことができ、ここでＣ＃およびｖ＃は上記と同様の意味を有し、そしてＹは抗体分子当たりに結合している診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤の平均数を指す。

【0031】

完全に負荷された。「完全に負荷された」という用語は、特定の型および／または同様の反応性のコンジュゲーションの予め決められた点が活性部分にコンジュゲートし、イムノコンジュゲートの均質な集団（Ｃ＃＝Ｙ）を与える抗体を指す。

【0032】

部分的に負荷された。「部分的に負荷された」という用語は、特定の型および／または同様の反応性のコンジュゲーションの予め決められた点の一部分のみが活性部分にコンジュゲートし、イムノコンジュゲートの特定の異性体（Ｃ＃＞Ｙ）の形成をもたらす抗体を指す。

【0033】

診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤。本明細書においては、「診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤」という用語は診断、予防および／または治療のために有用なイムノコンジュゲートを製造するために抗体にコンジュゲートされる巨大分子、分子または原子などの活性部分である。診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤の例は薬剤、毒素および検出可能な標識を包含する。

【0034】

イムノコンジュゲート。本明細書においては、「イムノコンジュゲート」とは少なくとも１つの診断薬剤、予防薬剤および／若しくは治療薬剤、または、診断薬剤、予防薬剤および／若しくは治療薬剤に結合するキレート形成剤に直接または間接的にコンジュゲートしている抗体を含む分子である。イムノコンジュゲートは抗体の免疫反応性を保持しており、例えば抗体はコンジュゲーション前とほぼ同じか僅かにのみ低減したコンジュゲーション後の抗原結合能を有する。本明細書においては、イムノコンジュゲートはまた抗体薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）とも称する。

【0035】

機能的に活性。「機能的に活性」という用語は、抗体に関する場合、抗体が標的抗原に免疫特異的に結合することを意味する。

【0036】

単離された。「単離された」という用語は、分子または巨大分子（例えば抗体または核酸）に関する場合、その天然の環境の成分から識別、分離および／または回収されているものである。その天然の環境の夾雑成分は分子の所望の用途（例えば診断または治療）を妨害する物質であり、そして酵素、ホルモンおよび他の蛋白性または非蛋白性の溶質を包含してよい。一部の実施形態においては、単離された分子または巨大分子は、（１）例えばＬｏｗｒｙまたはＢｒａｄｆｏｒｄ法により測定した場合に分子または巨大分子の９５％超、または９９％超まで、（２）スピニングカップシーケンサーを用いることによりＮ末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも１５残基が得られるのに十分な程度まで、あるいは（３）例えばクーマシーブルーまたは好ましくは銀染色法により測定した場合の還元または非還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥにより均質となるまで、精製することになる。単離された分子および巨大分子は組み換え細胞内のインサイチュの分子および巨大分子も包含するが、その理由は分子および巨大分子の天然の環境の成分少なくとも１つが存在しないためである。しかしながら通常は単離された分子および巨大分子は少なくとも１つの精製工程により製造される。

【0037】

構造遺伝子。本明細書においては、「構造遺伝子」とは、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）に転写され、次に特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸配列に翻訳される配列を有するＤＮＡ分子である。

【0038】

プロモーター。本明細書においては、「プロモーター」とは構造遺伝子の転写を指向してｍＲＮＡを生産する核酸の配列である。典型的には、プロモーターは構造遺伝子の開始コドンに近位の遺伝子の５’領域内に位置する。プロモーターが誘導プロモーターである場合は、転写率は誘導剤に応答して増大する。これとは対照的に、プロモーターが構成プロモーターである場合には、転写率は誘導剤により調節されない。

【0039】

エンハンサー。本明細書においては、「エンハンサー」とは、転写の開始部位と相対的なエンハンサーの距離または方向とは無関係に、特定の遺伝子がｍＲＮＡに転写される効率を増大できるプロモーターエレメントである。

【0040】

相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）。本明細書においては、「相補ＤＮＡ」とは、酵素である逆転写酵素によりｍＲＮＡ鋳型から形成される一本鎖ＤＮＡ分子である。典型的には、ｍＲＮＡの一部分に相補なプライマーを逆転写の開始に使用する。当業者はまた、そのような一本鎖ＤＮＡ分子およびその相補体よりなる２本鎖ＤＮＡ分子を指すために「ｃＤＮＡ」という用語も使用する。

【0041】

発現。本明細書においては、「発現」とは構造遺伝子またはｃＤＮＡ分子からポリペプチドが生成されるプロセスである。プロセスはコーディング領域のｍＲＮＡへの転写およびｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳を包含する。

【0042】

クローニングベクター。本明細書においては、「クローニングベクター」とは、宿主細胞内で自律複製する能力を有し、そして細胞を形質転換して遺伝子を調整するために使用されるプラスミド、コスミドまたはバクテリオファージなどのＤＮＡ分子である。クローニングベクターは典型的には、ベクターの本質的な生物学的機能を損失することなく測定可能なやり方において外来性ＤＮＡ配列を挿入してよい制限エンドヌクレアーゼ認識部位１つまたは少数、ならびに、クローニングベクターにより形質転換された細胞の識別および選択において使用するために適するマーカー遺伝子を含有する。マーカー遺伝子は典型的にはテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性をもたらす遺伝子を包含する。

【0043】

発現ベクター。本明細書においては、「発現ベクター」とは組み換え宿主中の外来タンパク質の発現を可能とする外来タンパク質をコードする異種の構造遺伝子またはｃＤＮＡを含むＤＮＡ分子である。典型的には、異種の遺伝子の発現はプロモーターおよび／またはエンハンサー配列などの特定の調節配列の制御下に（即ちこれらに作動可能に連結して）置かれる。プロモーター配列は構成または誘導の何れかであってよい。

【0044】

組み換え宿主。「組み換え宿主」とは、異種（外来）タンパク質の発現のための何れかの原核生物または真核生物の細胞であってよい。一部の実施形態においては、組み換え宿主はクローニングベクターまたは発現ベクターを含有する。この用語はまた、宿主細胞の染色体またはゲノム内の異種タンパク質をコードする核酸を含有するように遺伝子的に操作されている原核生物または真核生物の細胞を包含することも意味する。安定な宿主の例は、例えば、全て参照により本明細書に援用されるＳａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）；Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｕｂｌｉｓｈ，Ｃ

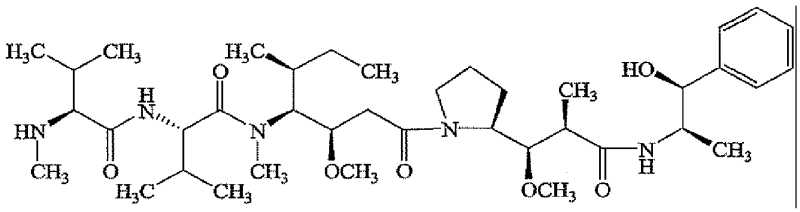
ｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（２００１）；およびＡｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４ｔｈ ｅｄ.，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９９）を参照のこと。

【0045】

ＭＭＡＥ。略語「ＭＭＡＥ」は下記：

【0046】

【化9】



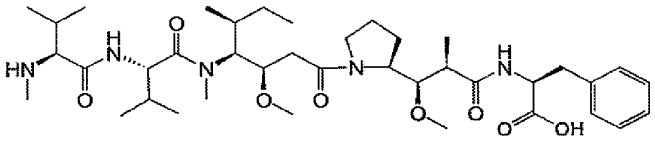
のモノメチルオーリスタチンＥを指す。

【0047】

ＭＭＡＦ。略語「ＭＭＡＦ」は下記：

【0048】

【化10】



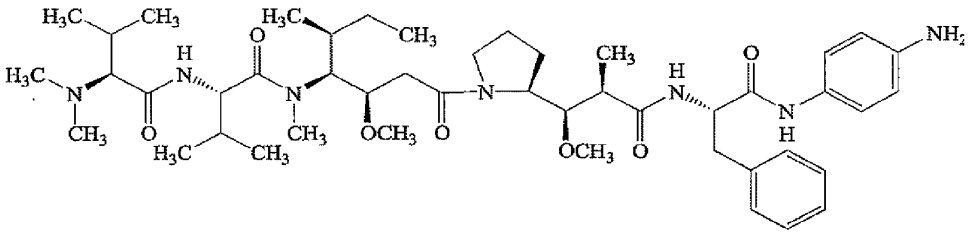
のドバリン－バリン－ドライソロイシン－ドラプロリン－フェニルアラニンを指す。

【0049】

ＡＦＰ。略語「ＡＦＰ」は下記：

【0050】

【化11】



のジメチルバリン－バリン－ドライソロイシン－ドラプロリン－フェニルアラニン－ｐ－フェニレンジアミンを指す。

【0051】

ＡＥＢ。略語「ＡＥＢ」はオーリスタチンＥをパラアセチル安息香酸と反応させることにより製造されるエステルを指す。

【0052】

ＡＥＶＢ。略語「ＡＥＶＢ」はオーリスタチンＥをベンゾイル吉草酸と反応させることにより製造されるエステルを指す。

【0053】

患者。「患者」とは限定しないがヒト、ラット、マウス、モルモット、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、トリおよび家禽類を包含する。

【0054】

有効量。「有効量」という用語は哺乳類における疾患または障害の診断、予防または治療のために十分な診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤の量を指す。

【0055】

治療有効量。「治療有効量」という用語は哺乳類における疾患または障害を予防または治療するために有効な薬剤、毒素または他の分子の量を指す。癌の場合は、治療有効量は、癌細胞の数を低減し；腫瘍の大きさを低減し；末梢臓器への癌細胞の浸潤を抑制（即ちある程度まで緩徐化および好ましくは停止）し；腫瘍の転移を抑制（即ちある程度まで緩徐化および好ましくは停止）し；腫瘍の増殖をある程度まで抑制し；および／または癌に関連する症状の１つ以上をある程度まで緩解してよい。薬剤、毒素または他の分子が既存の癌細胞を増殖抑制および／または殺傷する限り、それは細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性である。癌の治療の場合は、薬効は例えば疾患の進行までの時間（ＴＴＰ）の試験および／または応答率（ＲＲ）の測定により調べることができる。

【0056】

「薬学的に受容可能な塩」という語句は本明細書においては、分子または巨大分子の薬学的に受容可能な有機または無機の塩を指す。酸付加塩はアミノ基で形成することができる。例示される塩は、限定しないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、蟻酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩およびパモ酸塩（即ち１，１’－メチレンビス－（２－ヒドロキシ３－ナフトエート））の塩を包含する。薬学的に受容可能な塩はアセテートイオン、スクシネートイオンまたは他の対イオンなどの別の分子の封入を包含してよい。対イオンは親化合物上の電荷を安定化させる何れかの有機または無機の部分であってよい。さらにまた、薬学的に受容可能な塩はその構造中に１つより多い荷電した原子を有してよい。複数の荷電原子が薬学的に受容可能な塩の部分となる場合は、塩は複数の対イオンを有することができる。従って、薬学的に受容可能な塩は１つ以上の荷電原子および／または１つ以上の対イオンを有することができる。

【0057】

「薬学的に受容可能な溶媒和物」または「溶媒和物」は１つ以上の溶媒分子と分子または巨大分子との会合を指す。薬学的に受容可能な溶媒和物を形成する溶媒の例は、限定しないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、酢酸およびエタノールアミンを包含する。

【0058】

（詳細な説明）

本発明は、操作された抗体およびイムノコンジュゲート、ならびにこのような抗体およびイムノコンジュゲートを製造する方法を提供する。操作された抗体は診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤などの活性部分に対するコンジュゲーションのための予め決められた部位少なくとも１つを有する。一部の態様において、操作された抗体は診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤に化学量論的にコンジュゲートして薬剤の予め決められた平均負荷量とのイムノコンジュゲートを形成することができる。イムノコンジュゲートはインビボの画像化のため、および他の用途のために治療上、診断上（例えばインビトロまたはインビボで）使用できる。開示を明確化するためであって限定するものではないが、本発明の詳細な説明を以下のサブセクションに分割する。

【0059】

（操作された抗体）

１つの態様において、操作された抗体が提供される。操作された抗体は鎖間システイン残基少なくとも１つのアミノ酸置換を有しつつ、診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤へのコンジュゲーションのための鎖間システイン残基少なくとも１つを保持している。

【0060】
一部の実施形態においては、抗体はインタクトな抗体である。抗体は例えばＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤまたはＩｇＥクラスのもの、そしてこれらのクラス内に置いて、種々のサブクラス、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１またはＩｇＡ２のアイソタイプであり得る。例えば一部の実施形態においては、抗体はＩｇＧ、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４であり得る。
【0061】
一部の実施形態においては、操作された抗体は別のアミノ酸で鎖間システイン残基を置き換えるアミノ酸置換少なくとも１つを含む。鎖間システイン残基は、軽鎖と重鎖との間、および／または、重鎖間の鎖間ジスルフィド結合の形成に関与することができる。即ち、アミノ酸置換は軽鎖のC_Lドメイン、重鎖のC_H１度メインおよび／またはヒンジ領域内の鎖間システイン残基であり得る。例えば抗体ｃＡＣ１０を参照すれば、鎖間システイン残基はＫａｂａｔのナンバリング法に従って、軽鎖のアミノ酸２１４位ならびに重鎖のアミノ酸位２２０（C_H１）および２２６および２２９（ヒンジ領域）にある（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　ｅｄ．ＮＩＨ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））。ｃＡＣ１０のこれらの鎖間システイン残基の１つ以上が置換され得る。
【0062】
一部の実施形態においては、アミノ酸置換はシステイン残基に対するセリンである。一部の実施形態においては、アミノ酸置換導入はセリンまたはスレオニン残基である。一部の実施形態においては、アミノ酸置換導入はセリン、スレオニンまたはグリシン残基である。一部の実施形態においては、アミノ酸置換は中性（例えばセリン、スレオニンまたはグリシン）または親水性（例えばメチオニン、アラニン、バリン、ロイシンまたはイソロイシン）残基を導入する。一部の実施形態においては、アミノ酸置換はシステイン残基以外の天然アミノ酸を導入する。
【0063】
操作された抗体は活性部分へのコンジュゲーションのための未置換の鎖間システイン残基少なくとも１つを保持している。操作された抗体における保持されたシステイン間残基の数は０より大きいが、親（非操作）抗体の鎖間システイン残基の総数より小さい。即ち、一部の実施形態においては、操作された抗体は鎖間システイン残基少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つまたは少なくとも７つを有する。典型的な実施形態においては、操作された抗体は鎖間システイン残基偶数個（例えば少なくとも２、４、６または８反応性部位）を有する。一部の実施形態においては操作された抗体は鎖間システイン残基８つ未満を有する。
【0064】
典型的な実施形態においては、鎖間システイン残基は対状態で置換され、その場合、鎖間ジスルフィド結合の形成に関与するシステイン残基両方が置換される（このような鎖間システイン残基は「相補」鎖間システイン残基と称する）。例えば、C_L鎖間システイン残基が置換される場合、相補C_H１鎖間システイン残基もまた置換される。別の例においては、ヒンジ領域の鎖間システイン残基の各対が置換されるか、または対状態で未置換のままとなり得る。別の実施形態においては、鎖間システイン残基は置換され、相補残基は未置換のままとなり得る。
【0065】
一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有し、且つヒンジ領域の鎖間システイン残基を保持している重鎖を含む。関連する実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはヒンジ領域の鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。
【0066】
一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミ

ノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換およびヒンジ領域の鎖間システイン残基の少なくとも１つのアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連する実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはヒンジ領域の残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0067】

一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基を保持し、そしてヒンジ領域鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、このように操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基および重鎖C_H１鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0068】

一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基を保持し、そしてヒンジ領域鎖間システイン残基の少なくとも１つであるが全てよりは少ないアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、このように操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基に、重鎖C_H１鎖間システイン残基に、そして、残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0069】

一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換、および、ヒンジ領域鎖間システイン残基の少なくとも１つにおけるアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基に、そして、ヒンジ領域の残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0070】

一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換、および、ヒンジ領域鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0071】

一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基およびヒンジ領域鎖間システイン残基を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_H１鎖間システイン残基に、そして、ヒンジ領域の鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0072】

一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基を有し、そしてヒンジ領域鎖間システイン残基の少なくとも１つにおいてアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_H１鎖間システイン残基に、そして、ヒンジ領域の残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0073】

一部の実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基を有し、そしてヒンジ領域鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_H１鎖間システイン残基にコンジュゲートした活性部分を有する。

【0074】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換およびヒンジ領域の鎖間システイン残基を保持している重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはヒンジ領域の鎖間システイン残基にコンジュゲートした４つの活性部分を有する。

【００７５】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基を保持し、そして、両方のヒンジ領域の鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、そのように操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基および重鎖C_H１鎖間システイン残基にコンジュゲートした４つの活性部分を有する。

【００７６】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換、および、一方のヒンジ領域の鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基およびヒンジ領域の残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした４つの活性部分を有する。

【００７７】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換および一方のヒンジ領域鎖間システイン残基の置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態においては、操作された抗体のイムノコンジュゲートはヒンジ領域の残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした２つの活性部分を有する。

【００７８】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換、および、両方のヒンジ領域の鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはヒンジ領域の残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした２つの活性部分を有する。

【００７９】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基、および、一方のヒンジ領域の鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基に、そして、ヒンジ領域の残存する鎖間システイン残基にコンジュゲートした６つの活性部分を有する。

【００８０】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基を有する軽鎖、および、各々がC_H１鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有し、そして、両方のヒンジ領域の鎖間システイン残基を保持している重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_L鎖間システイン残基に、そして、ヒンジ領域の鎖間システイン残基にコンジュゲートした６つの活性部分を有する。

【００８１】

親抗体が８つの鎖間システイン残基を有する例示的な実施形態においては、操作された抗体は、各々がC_L鎖間システイン残基のアミノ酸置換を有する軽鎖、および、各々がC

$_H$１鎖間システイン残基および両方のヒンジ領域鎖間システイン残基を保持している重鎖を含む。関連の実施形態において、操作された抗体のイムノコンジュゲートはC_H１鎖間システイン残基に、そして、ヒンジ領域の鎖間システイン残基にコンジュゲートした６つの活性部分を有する。

【0082】

抗体はまた、抗原結合抗体フラグメント、例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ鎖、一本鎖Ｆｖ（例えばｓｃＦｖおよびｓｃＦｖＦｃ）、一本鎖抗体、ジスルフィド連結Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、V_LまたはV_Hドメインの何れかを含むフラグメント、ミニボディー、マキシボディー、Ｆ（ａｂ’）$_3$、またはＦａｂ発現ライブラリにより形成されるフラグメントであり得る。抗原結合抗体フラグメント、例えば一本鎖抗体は、可変領域を単独で、または以下、即ち、ヒンジ領域、C_H１、C_H２、C_H３、C_H４および／若しくはC_Lドメインの全体または一部分と組み合わせて含むことができる。さらにまた、抗原結合フラグメントはヒンジ領域、C_H１、C_H２、C_H３、C_H４および／またはC_Lドメインとの可変領域の何れかの組み合わせを含むことができる。参照により本明細書に援用されるＨｏｌｌｉｇｅｒおよびＨｕｄｓｏｎ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：１１２６－１１３６（２００５）を参照のこと。

【0083】

一部の実施形態においては、抗体フラグメントは鎖間システイン残基少なくとも１つを包含するドメインまたはドメインの部分少なくとも１つを含む。例えば、抗体フラグメントはヒンジ領域、C_LおよびC_H１ドメイン、C_LおよびC_H１ドメインならびにヒンジ領域等を包含することができる。

【0084】

抗体フラグメントは何れかの適切な抗体クラス（例えばＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤおよびＩｇＥ）およびサブクラス（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）のものであり得る。

【0085】

典型的には、抗体はヒト、げっ歯類（例えばマウス、ラットまたはハムスター）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリのものである。本明細書においては、「ヒト」抗体はヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を包含し、そしてヒト免疫グロブリンライブラリから、ヒトＢ細胞から、または、後述若しくは例えばＲｅｉｃｈｅｒｔ等（Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：１０７３－８（２００５））ならびに米国特許第５，９３９，５９８および第６，１１１，１６６号に記載されている通り、ヒト免疫グロブリン１つ以上に関してトランスジェニックである動物から単離された抗体を包含する。抗体は単一特異性、二重特異性、三重特異性またはそれより多重の特異性のものであってよい。

【0086】

抗体は典型的には、モノクローナル抗体であるが、モノクローナル抗体の混合物でもあり得る。対象がヒト対象である場合は、抗体は抗原に対する使用可能な免疫応答を搭載することができる何れかの動物を免疫化することにより得てよい。動物はマウス、ラット、ヤギ、イツジ、ウサギまたは他の適切な実験動物であってよい。抗原は天然に存在する免疫原またはハプテンと免疫原性担体との合成免疫原性コンジュゲートの形態で提示してよい。免疫化された動物の抗体生産細胞を「不死」若しくは「不死化」ヒトまたは動物細胞と融合させて、抗体を生産するハイブリドーマを得てよい。所望により、抗体が異なる宿主細胞において生産されるように免疫グロブリン鎖１つ以上をコードする遺伝子をクローニングしてよく、そして所望により、配列を、そしてそれゆえに生産される抗体の免疫学的特性を改変するように遺伝子を変異させてよい（Ｔｅｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８０：７３０８－７３１２（１９８３）；Ｋｏｚｂｏｒら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｔｏｄａｙ　４：７２－７９（１９８３）；およびＯｌｓｓｏｎら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．９２：３－１６（１９８２）参照）。ヒトモノクローナル抗体は当該分野で知られた多くの手法の何れか、例えばファージディスプレイ（例えばＨ

ｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：１１０５－１６（２００５）参照）；ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウス（例えばＬｏｎｂｅｒｇ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：１１１７－２５（２００５）参照）；リボソーム－、ｍＲＮＡ－およびコウボ－ディスプレイライブラリ（例えばＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，前出参照）および患者由来のヒトハイブリドーマ（Ｂｒａｅｎｄｌｅｉｎら、Ｈｉｓｔｏｌ．Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌ．１９：８９７－９０５（２００４）；およびＩｌｌｅｒｔら、Ｏｎｃｏｌ．Ｒｅｐ．１３：７６５－７０（２００５））並びびに／または単一抗原選択リンパ球（例えばＬａｇｅｒｋｖｉｓｔら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１８：８６２－９（１９９５）；およびＢａｂｃｏｏｋら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：７８４３－８（１９９６）参照）により作製してよい。

【0087】

抗体は例えば当該分野で良く知られている手法により生産されたネズミ、キメラ、ヒト化または完全ヒト型の抗体であり得る。標準的な組み換えＤＮＡ手法を用いて作成できるヒト型および非ヒト型の部分の両方を含む組み換え抗体、例えばキメラおよびヒト化モノクローナル抗体が有用な抗体である。キメラ抗体は異なる部分が異なる動物種から誘導された分子、例えばネズミモノクローナルから誘導した可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものである（例えば参照により全体が本明細書に援用されるＣａｂｉｌｙ等の米国特許第４，８１６，５６７号；およびＢｏｓｓ等の米国特許第４，８１６，３９７号を参照）。一部の実施形態においては、抗体軽鎖定常領域ドメインはキメラではない。一部の実施形態においては、抗体重鎖定常領域はキメラではない。これに関する場合、「キメラ」とは２つの異なる種に由来する部分よりなる定常領域または定常領域ドメインを指す。

【0088】

抗体はまた、二重特異性抗体でもあり得る。二重特異性抗体を作成するための方法は当該分野で知られている。完全長二重特異性抗体の伝統的な製造は２つの免疫グロブリンの重鎖－軽鎖の対の同時発現に基づいており、その場合、２つの鎖は異なる特異性を有する（Ｍｉｌｓｔｅｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ　３０５：５３７－５３９（１９８３））。二重特異性抗体を形成するための更なる詳細は、例えばＳｕｒｅｓｈら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１２１：２１０（１９８６）；Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１５１：６９５４－６９６１（１９９３）；Ｃａｒｔｅｒら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１６３－１６７（１９９２）；Ｃａｒｔｅｒら、Ｈｅｍａｔｏｔｈｅｒａｐｙ　４：４６３－４７０（１９９５）；Ｍｅｒｃｈａｎｔら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１６：６７７－６８１（１９９８）を参照のこと。このような手法を用いながら、疾患の治療または予防において使用するための二重特異性抗体を製造することができる。二官能性抗体はまた、欧州特許公開ＥＰＡ０１０５３６０号に記載されている。ハイブリッドまたは二官能性抗体は生物学的に、即ち細胞融合の手法により、あるいは、化学的に、特に架橋剤またはジスルフィド架橋試薬を用いながら誘導することができ、そして全抗体またはそのフラグメントを含んでよい。このようなハイブリッド抗体を得るための方法は例えばともに参照により本明細書に援用される国際公開ＷＯ８３／０３６７９号および欧州特許公開ＥＰＡ０２１７５７７号に開示されている。

【0089】

一部の実施形態においては、抗体の定常ドメインはエフェクター機能を有する。「抗体エフェクター機能」即ちＡＥＣという用語は本明細書においては、ＩｇのＦｃドメインにより寄与される機能を指す。このような機能は、例えば、貪食作用または溶解活性を有する免疫細胞上のＦｃ受容体にＦｃエフェクタードメインを結合させることにより、または、補体系の成分にＦｃエフェクタードメインを結合させることにより、発揮させることができる。エフェクター機能は例えば「抗体依存性細胞性細胞傷害性」即ちＡＤＣＣ、「抗体依存性細胞貪食作用」即ちＡＤＣＰ、「補体依存性細胞傷害性」即ちＣＤＣであり得る。別の実施形態においては、定常ドメインは１つ以上のエフェクター機能を欠失している

。
【0090】
抗体は診断、予防および／または治療目的等、目的の抗原に対して指向させてよい。例えば抗原は感染性の病原体（例えば、限定しないが、ウイルス、細菌、カビおよび原虫）、寄生虫、腫瘍細胞または特定の医学的状態に関連するものであり得る。腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）の場合は、癌は免疫系、肺、結腸、直腸、乳房、卵巣、前立腺、頭部、頸部、骨または何れかの他の解剖学的位置のものであってよい。一部の実施形態においては、抗原はＣＤ２、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ５２、ＣＤ７０、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＶＥＧＦ、ＣＥＡ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－Ｄｒ１０、ＣＡ１２５、ＣＡ１５－３、ＣＡ１９－９、Ｌ６、Ｌｅｗｉｓ Ｘ、Ｌｅｗｉｓ Ｙ、アルファフェトプロテイン、ＣＡ２４２、胎盤アルカリホスファターゼ、前立腺特異的膜抗原、前立腺特異的抗原、前立腺酸性ホスファターゼ、表皮成長因子、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ＭＡＧＥ－４、抗トランスフェリン受容体、ｐ９７、ＭＵＣ１、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ１、ＩＬ－２受容体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ムチン、Ｐ２１、ＭＰＧおよびＮｅｕ癌遺伝子産物である。
【0091】
一部の特定の有用な抗体は、例えば、限定しないが、ＢＲ９６ｍＡｂ（Ｔｒａｉｌら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：２１２－２１５（１９９３））、ＢＲ６４（Ｔｒａｉｌら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５７：１００－１０５（１９９７））、ＣＤ４０抗原に対するｍＡｂ、例えばＳ２Ｃ６ｍＡｂ（Ｆｒａｎｃｉｓｃｏら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６０：３２２５－３２３１（２０００））およびＣＤ３０抗原に対するｍＡｂ、例えばＡＣ１０（Ｂｏｗｅｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：５８９６－５９０６（１９９３））を包含する。腫瘍特異的抗原に結合する多くの他の内在化抗体を使用することができ、そして研究されている（例えばＦｒａｎｋｅら、Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｔｈｅｒ．Ｒａｄｉｏｐｈａｒｍ．１５：４５９－７６（２０００）；Ｍｕｒｒａｙ，Ｓｅｍｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２７：６４－７０（２０００）；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇら、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９８を参照のこと）。これらの参考文献の開示は参照により本明細書に援用される。
【0092】
一部の実施形態においては、抗原は「腫瘍特異的抗原」である。「腫瘍特異的抗原」とは本明細書においては、特定の腫瘍に特徴的な、または、そのような腫瘍に強力に相関する抗原を指す。しかしながら、腫瘍特異的抗原は必ずしも腫瘍組織に独特のものではなく、即ち腫瘍特異的抗原に対する抗体は正常組織の抗原とも交差反応する場合がある。腫瘍特異的抗原が腫瘍細胞に独特のものではない場合において、実際上は、腫瘍特異的抗原に対する抗体の結合は、交差反応に起因する保証されない危険や妨害を伴うことなく所望の手順を実施するためには十分に腫瘍細胞に特異的である場合が多い。多くの要因がこの実際上の特異性に寄与している。例えば、腫瘍細胞上の抗原の量は正常細胞上に見出される交差反応性抗原の量を遥かに超過しているか、または、腫瘍細胞上の抗原はより効果的に提示される場合がある。従って、「腫瘍特異的抗原」という用語は、本明細書においては、実際上利用される特異性に関し、そして、絶対的な特異性を指し示すことや、抗原が腫瘍に独特であること意味することは意図していない、
腫瘍関連または腫瘍特異的な抗原に対して免疫特異的な抗体をコードするヌクレオチド配列は、例えばＧｅｎＢａｎｋのデータベースまたは類似のデータベース、商業的な入手元、文献出版物から、または、通常のクローニングおよび配列決定により得ることができる。
【0093】
一部の実施形態においては、抗体は自己免疫疾患の診断、治療または予防のために、抗原に対して指向される。自己免疫抗体の製造を担っている細胞の抗原に対して免疫特異的な抗体は、ＧｅｎＢａｎｋのデータベースまたは類似のデータベース、商業的またはその

他の入手元から、または当該分野で知られた何れかの方法、例えば化学合成若しくは組み換え発現手法により得ることができる。

【0094】

一部の実施形態においては、抗体は抗核抗体；抗ｄｓＤＮＡ；抗ｓｓＤＮＡ；抗カルジオリピン抗体ＩｇＭ、ＩｇＧ；抗リン脂質抗体ＩｇＭ、ＩｇＧ；抗ＳＭ抗体；抗ミトコンドリア抗体；甲状腺抗体；ミクロソーム抗体；サイログロブリン抗体；抗ＳＣＬ７０；抗Ｊｏ；抗Ｕ１ＲＮＰ；抗Ｌａ／ＳＳＢ；抗ＳＳＡ；抗ＳＳＢ；抗壁細胞抗体；抗ヒストン；抗ＲＮＰ；抗ＣＡＮＣＡ；抗ＰＡＮＣＡ；抗中心体；抗フィブリラリンまたは抗ＧＢＭ抗体である。

【0095】

一部の実施形態においては、抗体は標的細胞（例えば活性化リンパ球）上に発現される受容体または受容体複合体に結合することができる。受容体または受容体複合体は免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチンまたは補体制御タンパク質を含むことができる。適切な免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの非限定的な例は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ７９、ＣＤ９０、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ４、ＰＤ１およびＩＣＯＳである。適切なＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバーの非限定的な例は、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＣＤ９５／Ｆａｓ、ＣＤ１３４／ＯＸ４０、ＣＤ１３７／４１ＢＢ、ＴＮＦＲ１、ＴＮＦＲ２、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＢＣＭＡ、オステオプロテゲリン、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬＲ１、ＴＲＡＩＬＲ２、ＴＲＡＩＬＲ３、ＴＲＡＩＬＲ４およびＡＰＯ３である。適切なインテグリンの非限定的な例は、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ１０３およびＣＤ１０４である。適切なレクチンの非限定的な例はＣ型、Ｓ型およびＩ型レクチンである。他の実施形態において、受容体はＣＤ７０である。

【0096】

一部の実施形態において、抗体はウイルスまたは微生物抗原に対して免疫特異的である。本明細書においては、「ウイルス抗原」という用語は、限定しないが、免疫応答を誘発することができる何れかのウイルスペプチド、ポリペプチドタンパク質（例えばＨＩＶｇｐ１２０、ＨＩＶｎｅｆ、ＲＳＶＦ糖タンパク質、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、インフルエンザウイルスヘマグルチニン、ＨＴＬＶｔａｘ、単純疱疹ウイルス糖タンパク質（例えばｇＢ、ｇＣ、ｇＤおよびｇＥ）およびＢ型肝炎表面抗原）を包含する。本明細書においては、「微生物抗原」という用語は、限定しないが、免疫応答を誘発することができる何れかの微生物ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖類、多糖類または脂質の分子（例えば、細菌、カビ、病原性原虫またはコウボのポリペプチド、例えばＬＰＳおよび莢膜多糖類５／８）を包含する。

【0097】

ウイルスまたは微生物抗原に免疫特異的な抗体は、市販品として、例えばＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ（Ｔｅｍｅｃｕｌａ，ＣＡ）またはＶｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）から得るか、または、または当該分野で知られた何れかの方法、例えば化学合成または組み換え発現手法により製造することができる。ウイルスまたは微生物抗原に対して免疫特異的である抗体をコードするヌクレオチド配列は、例えば、ＧｅｎＢａｎｋのデータベースまたは類似のデータベース、文献出版物から、または、通常のクローニングおよび配列決定により得ることができる。

【0098】

ウイルス感染症または微生物感染症の診断または治療のために有用な抗体の例は、限定しないが、ヒト化抗呼吸器シンシチウムウイルス（ＲＳＶ）感染症の患者の治療のために

有用なＲＳＶモノクローナル抗体であるＳＹＮＡＧＩＳ（ＭｅｄＩｍｍｕｎｅ，Ｉｎｃ．，ＭＤ）；ＨＩＶ感染の治療に有用なＣＤ４融合抗体であるＰＲＯ５４２（Ｐｒｏｇｅｎｉｃｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ）；Ｂ型肝炎ウイルスの治療に有用なヒト抗体であるＯＳＴＡＶＩＲ（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄｅｓｉｇｎ　Ｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，ＣＡ）；サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）の治療に有用なヒト化ＩｇＧ１抗体であるＰＲＯＴＯＶＩＲ（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄｅｓｉｇｎ　Ｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，ＣＡ）；および抗ＬＰＳ抗体を包含する。

【0099】

他の抗体は、限定しないが、例えば細菌の病原性菌株（ストレプトコッカス・ピオゲンス、ストレプトコッカス・ニューモニア、ナイセリア・ゴノレア、ナイセリア・メニンギチジス、コリネバクテリウム・ジフテリア、クロストリジウム・ボツリナム、クロストリジウム・パーフリンゲンス、クロストリジウム・テタニ、ヘモフィルス・インフルエンザ、クレブシエラ・ニューモニア、クレブシエラ・オザエナス、クレブシエラ・リノスクレロモチス、スタフィロコッカス・アウレウス、ビブリオ・コレラ、エシェリシア・コリ、シュードモナス・アエルギノーサ、カンピロバクター（ビブリオ）フェタス、エアロモナス・ヒドロフィリア、バチルス・セレウス、エドワルドシエラ・タルダ、エルシニア・エンテロコリチカ、エルシニア・ペスチス、エルシニア・シュードツベルクロシス、シゲラ・ジセンテリア、シゲラ・フレキシネリ、シゲラ・ソネイ、サルモネラ・チフムリウム、トレポネマ・パリダム、トレポネマ・ペルテヌ、トレポネマ・カラテネウム、ボレリア・ビンセンチ、ボレリア・ブルゴドルフェリ、レプトスピラ・イクテロヘモラジエ、マイコバクテリウム・ツベルクロシス、ニューモシスティス・カリニ、フランシセラ・ツラレンシス、ブルセラ・アボルタス、ブルセラ・スイス、ブルセラ・メリテンシス、マイコプラズマ種、リケッチア・プロワゼキ、リケッチア・ツツガムシ、クラミジア種）；病原性のカビ（例えばコクシジオイデス・イミティス、アスペルギルス・フミガタス、カンジダ・アルビカンス、ブラストミセス・デルマチチジス、クリプトコッカス・ネオホルマンス、ヒストプラズマ・カプスラタム）；原虫（エントモエバ・ヒストリチカ、トキソプラズマ・ゴンジ、トリコモナス・テナス、トリコモナス・ホミニス、トリコモナス・バギナリス、トリパノソマ・ガンビエンス、トリパノソマ・ロデシエンス、トリパノソマ・クルジ、レイシマニア・ドノヴァニ、レイシマニア・トロピカ、レイシマニア・ブラジリエンシス、ニューモシチス・ニューモニア、プラズモジウム・ビバックス、プラズモジウム・ファルシパラム、プラズモジウム・マラリア）；または蠕虫（エンテロビウス・ベルミクラリス、トリクリス・トリキウア、アスカリス・ルンブリコイデス、トリキネラ・スピラリス、ストロンギロイデス・ステルコラリス、スキストソマ・ジャポニカム、スキストソマ・マンソニ、スキストソマ・ヘマトビウムおよび十二指腸虫）由来の抗原に対する抗体を包含する。

【0100】

他の抗体としては、限定しないが、病原性ウイルス、例えばポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、単純疱疹ウイルス１型、単純疱疹ウイルス２型、アデノウイルス科、パポバウイルス科、エンテロウイルス科、ピコナウイルス科、パルボウイルス科、レオウイルス科、レトロウイルス科、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、おたふくかぜ、麻疹、呼吸器シンシチウムウイルス、風疹、アルボウイルス科、ラブドウイルス科、アレナウイルス科、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、非Ａ／非Ｂ型肝炎ウイルス、リノウイルス科、コロナウイルス科、ロトウイルス科およびヒト免疫不全ウイルスの抗原に対する抗体を包含する。

【0101】

（タンパク質をコードする核酸配列を改変することにより抗体にアミノ酸置換を導入するための方法）

アミノ酸置換は何れかの適切な方法により抗体をコードする核酸配列内に導入することができる。このような方法はポリメラーゼ連鎖反応系の変異誘発、部位特異的変異誘発、合成ＤＮＡオリゴマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応による遺伝子合成、および核酸合成

、ならびに、その後の適宜重鎖および／または軽鎖の他の部分を含む、発現ベクターへの合成ＤＮＡのライゲーションを包含する（前出のＳａｍｂｒｏｏｋ等およびＡｕｓｕｂｅｌ等を参照のこと）。

【0102】

抗体をコードするヌクレオチド配列は例えばＧｅｎＢａｎｋのデータベース若しくは類似のデータベース、文献出版物から、または、通常のクローニングおよび配列決定により得ることができる。指向された変異誘発のために使用できる一部の方法の例は、Ｍ１３ＤＮＡを用いたオリゴヌクレオチド指向変異誘発、プラスミドＤＮＡを用いたオリゴヌクレオチド指向変異誘発、および、ＰＣＲ増幅オリゴヌクレオチド指向変異誘発である（例えばＧｌｉｃｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ＤＮＡ、Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＡＳＭ　Ｐｒｅｓｓ，１７１－１８２頁（１９９８）参照。変異誘発およびクローニングの例は実施例１に記載する。

【0103】

オリゴヌクレオチド指向変異誘発の詳細なプロトコルおよびクローニングされたＤＮＡの変異誘発のための関連する手法は当該分野で良く知られている（例えばＺｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１０：６４８７－６５００（１９８２）参照；また前出のＳａｍｂｒｏｏｋ等およびＡｕｓｕｂｅｌ等を参照）。

【0104】

一部の実施形態においては、アミノ酸置換はシステイン残基に対するセリンである。一部の実施形態においては、アミノ酸置換導入はセリンまたはスレオニン残基である。一部の実施形態においては、アミノ酸置換は中性（例えばセリン、スレオニンまたはグリシン）または親水性（例えばメチオニン、アラニン、バリン、ロイシンまたはイソロイシン）残基を導入する。一部の実施形態においては、アミノ酸置換はシステイン残基以外の天然のアミノ酸を導入する。

【0105】

本発明は抗体または抗体フラグメント内に鎖間システイン残基のアミノ酸置換（例えばシステインからセリンへの置換）を導入するための方法を提供するが、本発明はそれに限定されない。当業者の知る通り、コンジュゲーションのために他のアミノ酸、例えばリジン残基を抗体または抗体フラグメントの別の位置において導入／除去することも可能である。さらにまた、スルフィドリル基を鎖間システイン残基以外のアミノ酸において抗体内に組み換え導入することもできる。コンジュゲーションのための別の代替変異誘発部位は当該分野で良く知られている分子モデリング手法を用いて識別することができる。例えばＬｅｓｋ等“Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎｓ　Ｕｓｅｆｕｌ　ｉｎ　Ｇｕｉｄｉｎｇ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ”，Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ，Ｃ．Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ（ｅｄ．），Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ，ｐｐ．１－３８（１９９２）；Ｃｈｅｅｔｈａｍ，“Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ａｆｆｉｎｉｔｙ”，Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ（前出），３９－６７頁を参照のこと。一般的には、部位指向性変異誘発のための方法に関しては、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ　ｅｄ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｕｂｌｉｓｈ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（２００１）；Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，４ｔｈ　ｅｄ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９９）（これら全ては参照により本明細書に援用される）を参照のこと。

【0106】

（操作された抗体のＤＮＡ配列のタンパク質産物を発現させ単離するための方法）

（Ａ．操作された抗体を発現させる方法）

ヌクレオチド配列を改変した後、核酸配列のコンホーメーション等をさらに分析するためにクローニングベクター内に核酸を挿入する。核酸によりコードされるポリペプチドを発現するためには、発現ベクター内の転写発現を制御する調節配列に核酸を作動可能に連結し、そして次に、原核生物または真核生物の宿主細胞に導入することができる。プロモーターおよびエンハンサーなどの転写調節配列のほかに、発現ベクターは翻訳調節配列および／または発現ベクターを含有する細胞の選択に適するマーカー遺伝子を包含してよい。

【0107】

原核生物宿主内での発現のためのプロモーターは抑制、構成または誘導のものであり得る。適切なプロモーターは当該分野で良く知られており、そして例えばＴ４、Ｔ３、Ｓｐ６およびＴ７ポリメラーゼに対するプロモーター、バクテリオファージラムダのP_RおよびP_Lプロモーター、大腸菌のｔｒｐ、ｒｅｃＡ、熱ショックおよびｌａｅＺプロモーター、Ｂ・サブチルスのアルファーアミラーゼおよびシグマ$_{28}$特異性プロモーター、バチルスのバクテリオファージのプロモーター、ストレプトマイセスプロモーター、バクテリオファージラムダのｉｎｔプロモーター、ｐＢＲ３２２のベータラクタマーゼ遺伝子のｂｌａプロモーター、ならびに、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のＣＡＴプロモーターを包含する。原核生物プロモーターはＧｌｉｃｋ，Ｊ．Ｉｎｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１：２２７－２８２（１９８７）；Ｗａｔｓｏｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｇｅｎｅ，Ｆｏｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｃｕｍｍｉｎｓ（１９８７）；Ａｕｓｕｂｅｌ等（前出）；およびＳａｍｂｒｏｏｋ等（前出）により検討されている。

【0108】

一部の実施形態においては、原核生物宿主は大腸菌である。大腸菌の適切な菌株は例えばＹ１０８８、Ｙ１０８９、ＣＳＨ１８、ＥＲ１４５１およびＥＲ１６４７を包含する（例えばＢｒｏｗｎ（Ｅｄ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｌａｂｆａｘ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）参照）。代替となる宿主はバチルス・サブチルス、例えばＢＲ１５１、ＹＢ８８６、ＭＩ１１９、ＭＩ１２０およびＢ１７０などの菌株である（例えばＨａｒｄｙ，“Ｂａｃｈｉｌｌｕｓ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｍｅｔｈｏｄｓ”，ｉｎ ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｇｌｏｖｅｒ （Ｅｄ．），ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９８５）参照）。

【0109】

大腸菌中で抗体フラグメントを生産するための方法は当該分野で良く知られている。例えば、Ｈｕｓｅ，“Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ ｉｎ Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ Ｐｈａｇｅ”，ｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ，Ｃ．Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ（ｅｄ．），Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，１０３－１２０頁（１９９２）；Ｗａｒｄ，”Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｕｓｉｎｇ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ａｓ ａ Ｈｏｓｔ”同上、１２１－１３８頁（１９９２）を参照のこと。Ｆｖフラグメントもまた当該分野で知られた方法により生産できる。例えば上記を参照のこと。またさらにＷｈｉｔｌｏｗら、“Ｓｉｎｇｌｅ－Ｃｈａｉｎ Ｆｖ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ Ｆｕｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ”，Ｎｅｗ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ２（２）（１９９１）も参照のこと。さらにまた、原核生物細胞において抗体をクローニングするための特定の発現系が市販されている。

【0110】

一部の実施形態においては、核酸配列は真核生物細胞、そして特に哺乳類、昆虫およびコウボ細胞内において発現させる。１つの実施形態において、真核生物宿主は哺乳類細胞である。哺乳類細胞は適切な折り畳みおよびグリコシル化を含む、クローニングされたポリペプチドへの翻訳後の修飾を提供する。例えばこのような哺乳類宿主細胞は、ＣＯＳ－

７細胞（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６５１）、非分泌型ミエローマ細胞（例えばＳＰ２／０－ＡＧ１４；ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５８１）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（例えばＣＨＯ－Ｋ１、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ６１；ＣＨＯ－ＤＧ４４、Ｕｒｌａｕｂら、Ｓｏｍａｔ　Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ．１２（６）：５５５－６６（１９８６））、ラット下垂体細胞（例えばGH_1；ＡＴＣＣ　ＣＣＬ８２）、ＨｅＬａＳ３細胞（例えばＡＴＣＣ　ＣＣＬ２．２）およびラット肝細胞癌細胞（例えばＨ－４－ＩＩ－Ｅ；ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５４８）を包含する。

【0111】

哺乳類宿主については、転写および翻訳の調節シグナルは種々の原料、例えばアデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルスおよびシミアンウイルスから誘導してよい。さらに、アクチン、コラーゲンまたはミオシンなどの哺乳類細胞由来のプロモーターも使用できる。あるいは、原核生物プロモーター（例えばバクテリオファージＴ３ＲＮＡポリメラーゼプロモーター）を使用することができ、その場合、原核生物プロモーターは真核細胞プロモーターにより調節される（例えば、Ｚｈｏｕら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０：４５２９－４５３７（１９９０）；Ｋａｕｆｍａｎら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９：４４８５－４４９０（１９９１）を参照のこと）。遺伝子の発現がモジュレートできるように抑制または活性化を可能にする転写開始調節シグナルを選択してよい。

【0112】

一般的に、真核生物調節領域はＲＮＡ合成の開始を指向するために十分なプロモーター領域を包含することになる。このような真核生物プロモーターは例えばマウスメタロチオネインＩ遺伝子のプロモーター（Ｈａｍｅｒら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎ．１：２７３－２８８（１９８２））；ヘルペスウイルスのＴＫプロモーター（ＭｃＫｎｉｇｈｔ，Ｃｅｌｌ　３１：３５５－３６５（１９８２））；ＳＶ４０早期プロモーター（Ｂｅｎｏｉｓｔら、Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ）２９０：３０４－３１０（１９８１））；ラウス肉腫ウイルスプロモーター（（Ｇｏｒｍａｎ，”Ｈｉｇｈ　Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ　Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ｉｎｔｏ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｃｅｌｌｓ”，ｉｎ　ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅ　ＩＩ，Ｇｌｏｖｅｒ（Ｅｄ．），ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，１４３－１９０頁（１９８５））；サイトメガロウイルスプロモーター（Ｆｏｅｃｋｉｎｇら、Ｇｅｎｅ　４５：１０１（１９８０））；コウボｇａｌ４遺伝子プロモーター（Ｊｏｈｎｓｔｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７９：６９７１－６９７５（１９８２）；Ｓｉｌｖｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：５９５１－５９５５（１９８４）；およびＩｇＧプロモーター（Ｏｒｌａｎｄｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：３８３３－３８３７（１９８９））であり得る。

【0113】

強力な調節配列を使用できる。そのような調節配列の例はＳＶ４０プロモーター－エンハンサー（Ｇｏｒｍａｎ，”Ｈｉｇｈ　Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ　Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ｉｎｔｏ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｃｅｌｌｓ”，ｉｎ　ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅ　ＩＩ，Ｇｌｏｖｅｒ（Ｅｄ．），ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，１４３－１９０頁（１９８５））；ｈＣＭＶ－ＭＩＥプロモーター－エンハンサー（Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１６９－１７５（１９９２））、チャイニーズハムスターＥＦ－１αプロモーター（例えば米国特許第５，８８８，８０９号参照）および抗体重鎖プロモーター（Ｏｒｌａｎｄｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：３８３３－３８３７（１９８９）を包含する。同様に包含されるものは、軽鎖の発現のためのカッパ鎖エンハンサーおよびＩｇＨエンハンサーである（Ｇｉｌｌｉｅｓ，“Ｄｅｓｉｇｎ　ｏｆ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒｓ　ａｎｄ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｓｕｉｔａｂｌｅ　ｆｏｒ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ”，ｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ，Ｃ．Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ（Ｅｄ．），Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ

，１３９－１５７頁（１９９２）；Ｏｒｌａｎｄｉら、前出）。

【0114】

操作された抗体コード核酸および作動可能に連結したプロモーターは直鎖分子または環状分子の何れかであってよい非複製ＤＮＡ分子として真核生物細胞内に導入してよい。そのような分子は自律的に複製できないため、タンパク質の発現は導入された配列の一過性の発現を介して起こってよい。１つの態様において、永久的な発現は宿主染色体内への導入された配列の組み込みを介して起こる。

【0115】

一部の実施形態においては、導入された核酸はレシピエント宿主内で自律複製が可能なプラスミドまたはウイルスベクターに取り込まれる。この目的のために多くの可能なベクター系が利用可能である。ベクターの１つのクラスはウシ乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルスまたはＳＶ４０ウイルスなどの動物ウイルスから誘導した自律複製染色体外プラスミドを与えるＤＮＡエレメントを利用する。ベクターの第２のクラスは宿主染色体内への所望のゲノムまたはｃＤＮＡ配列の組み込みに依存している。ｍＲＮＡの最適な合成のためには別のエレメントが必要となる場合もある。これらのエレメントにはスプライスシグナルならびに転写プロモーター、エンハンサーおよび終止シグナルが包含される。このようなエレメントを取り込んだｃＤＮＡ発現ベクターはＯｋａｙａｍａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２８０（１９８３），Ｓａｍｂｒｏｏｋら、前出、Ａｕｓｕｂｅｌら、前出、Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら、前出、Ｏｒｌａｎｄｉら、前出、Ｆｏｕｓｅｒら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１１２１－１１２７（１９９２）；およびＧｉｌｌｉｅｓ，前出により記載されているものを包含する。イントロン配列を含むゲノムＤＮＡ発現ベクターはＯｒｌａｎｄｉら、前出に記載されている。さらに一般的にＬｅｒｎｅｒ等（Ｅｄｓ．），Ｎｅｗ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　Ｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ２（２）（１９９１）も参照のこと。

【0116】

インタクトな抗体を発現する哺乳類細胞を得るためには、抗体軽鎖をコードする核酸を含む発現ベクターを抗体重鎖発現ベクターと共に哺乳類細胞内に同時トランスフェクトまたはトランスフェクトすることができる。あるいは、重鎖発現ベクターを含有する哺乳類細胞を抗体軽鎖発現ベクターでトランスフェクトすることができ、あるいは、抗体軽鎖発現ベクターを含有する哺乳類細胞を抗体重鎖発現ベクターでトランスフェクトすることができる。さらに、哺乳類細胞は抗体軽鎖をコードする核酸（例えばＤＮＡ）フラグメントならびに抗体重鎖をコードする核酸（例えばＤＮＡ）フラグメントを含む単一の発現ベクターでトランスフェクトすることができる。例えばＧｉｌｌｉｅｓ前出；Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら、前出を参照できる。これらの方策の何れも全体の操作された抗体分子を発現するトランスフェクトされた細胞を生成する。標準的なトランスフェクションおよび形質転換の手法は当該分野で良く知られている。例えばＳａｍｂｒｏｏｋら、前出、Ａｕｓｕｂｅｌら、前出を参照できる。

【0117】

細胞系統の開発およびタンパク質発現の例は実施例１に記載する。

【0118】

（Ｂ．トランスフェクトされた細胞から操作された抗体を単離するための方法）

発現ベクターを担持する形質転換またはトランスフェクトされた細胞は適切な薬剤を使用しながら選択される。例えば、Ｇ４１８はアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子を有する発現ベクターを担持するトランスフェクトされた細胞を選択するために使用できる（例えばＳｏｕｔｈｅｒｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎ．１：３２７－３４１（１９８２）参照）。あるいは、ハイグロマイシン－Ｂを用いて、ハイグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ遺伝子を有する発現ベクターを担持するトランスフェクトされた細胞を選択することができる（例えばＰａｌｍｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４：１０５５－１０５９（１９８７）参照）。アミノプテリンおよびマイコフェノール酸を用いて、キサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラー

ゼ遺伝子を有する発現ベクターを担持するトランスフェクトされた細胞を選択することができる（例えばＭｕｌｌｉｇａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７８：２０７２－２０７６（１９８１）参照）。メトトレキセートを用いてジヒドロフォレート還元酵素遺伝子を有する発現ベクターを担持するトランスフェクトされた細胞を選択することができる（例えばＷｉｇｌｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７（６）：３５６７－７０（１９８０）参照）。

【0119】

操作された抗体を生産する形質転換またはトランスフェクトされた細胞は種々の方法を用いて識別することができる。例えば、何れかの免疫検出試験を用いてこのような「トランスフェクトーマ」を識別することができる。

【0120】

形質転換体またはトランスフェクト体が識別された後、細胞を培養し、抗体を細胞および／または培養上澄みから単離する。単離の手法はプロテインＡセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィー、サイズエクスクルージョンクロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーを包含する。詳細なプロトコルについては例えばＣｏｌｉｇａｎ等（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ（１９９１）を参照のこと。

【0121】

（イムノコンジュゲートを製造するための方法）

（Ａ．抗体フラグメントの製造）

本発明はまた、操作された抗体または抗原結合抗体フラグメント由来のイムノコンジュゲートを提供する。抗体フラグメントは例えば組み換え宿主細胞（例えば形質転換体またはトランスフェクト体）から、および／または、インタクトな操作された抗体の蛋白分解切断により得ることができる。抗体フラグメントは変異されている重鎖構造遺伝子で細胞をトランスフェクトすることにより、形質転換体またはトランスフェクト体から直接得ることができる。例えば、C_H１ドメインの配列の後に停止コドンが挿入されれば、トランスフェクトーマはＦａｂフラグメントを生産できる。あるいは、重鎖のヒンジ領域をコードする配列の後に停止コドンが挿入されれば、トランスフェクトーマはＦａｂ’またはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを生産できる。

【0122】

あるいは、抗体フラグメントはよく知られた蛋白分解の手法を用いてインタクトな抗体から製造できる。例えばＣｏｌｉｇａｎら、前出を参照できる。さらに、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントはインタクトな抗体のペプシン消化を用いて得ることができる。２価のフラグメントは従来のジスルフィド結合還元剤、例えばジチオスレイトール（ＤＴＴ）等を用いて分解することにより１価のフラグメントにすることができる。

【0123】

（Ｂ．コンジュゲーション方法）

広範な種類の診断、予防および治療薬剤を本発明の抗体に好都合にコンジュゲートすることができる。一部の実施形態においては、抗体を化学量論的に、即ち完全に負荷することができる（即ちＣ＃＝Ｙ、ここでＹは各抗体分子に結合した活性部分の平均数を指す）。他の実施形態においては、抗体を部分的に負荷することができる（即ちＣ＃＞Ｙ）。

【0124】

イムノコンジュゲートは診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤をインタクトな抗体またはその抗原結合フラグメントにコンジュゲートすることにより製造できる。このような手法は、Ｓｈｉｈら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　４１：８３２－８３９（１９８８）；Ｓｈｉｈら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　４６：１１０１－１１０６（１９９０）；Ｓｈｉｈ等の米国特許第５，０５７，３１３号；Ｓｈｉｈ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５１：４１９２，国際公開ＷＯ０２／０８８１７２号；米国特許第６，８８４，８６９号；国際特許公開ＷＯ２００５／０８１７１１号；および米国特許出願２００３－０１３０１８９Ａ１に記載されており、これらは全て参照により本明細書に援用される。

【0125】
さらに、当業者の認知する通り、コンジュゲーション方法には種々の可能な変法があり得る。例えば「２価のイムノコンジュゲート」は診断または治療薬剤を炭水化物部分に、または、遊離のスルフィドリル基に結合することにより構築することができる。
【0126】
一部の実施形態においては、鎖間システイン残基はシステイン残基のチオール（－－ＳＨ）側鎖基の酸化の結果としてジスルフィド結合として存在する。ジスルフィド結合を還元剤で処理することによりジスルフィド結合の還元的開裂が起こり、遊離のチオール基が残存する。
【0127】
一部の実施形態においては、薬剤は鎖間システイン残基と反応性を有する基を有するか、それを含むように修飾される。例えば、薬剤はチオール基へのコンジュゲーションにより結合できる。コンジュゲーションのために使用できる化学物質の例は、例えばＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ）、Ｃａｐｔｅｒ １５（Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ）を参照のこと（この開示内容は参照により全体が本明細書に援用される）。
【0128】
例えば、抗体の化学的活性化が遊離のチオール基の形成をもたらす場合、タンパク質はスルフィドリル反応性の薬剤とコンジュゲートしてよい。一部の実施形態においては、薬剤は遊離のチオール基に対して実質的に特異的なものである。このような薬剤は例えばマレイミド、ハロアセトアミド（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ハロエステル（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ハロメチルケトン（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ベンジル性ハロゲン化物（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ビニルスルホンおよびピリジルチオを包含する。
【0129】
特定の実施形態においては、スルフィドリル反応性薬剤はアルファハロアセチル化合物、例えばヨードアセトアミド、マレイミド、例えばＮ－エチルマレイミド、水銀誘導体、例えばアセテート、クロリドまたはニトレートの対イオンを有する３，６－ビス－（水銀メチル）ジオキサン、および、ジスルフィド誘導体、例えばジスルフィドジオキサン誘導体、ポリメチレンビスメタンチオスルホネート試薬およびクラベセイン（還元された抗体の交差ジスルフィド結合を付加することがわかっている２つの遊離スルフィドリル基を含有するフルオレセインの蛍光誘導体）であり得る。
【0130】
アルファーハロアセチル化合物、例えばヨードアセテートは、スルフィドリル基と容易に反応してアミドを形成する。これらの化合物を用いて遊離チオールをカルボキシメチル化している。それらは厳密にはＳＨ特異的ではなく、アミンと反応する。反応にはチオレートの親核攻撃が含まれ、ハライドの置き換えが起こる。反応性のハロアセチル部分、Ｘ－－CH_2ＣＯ－－は種々の目的のために化合物に取り込まれている。例えば、ブロモトリフルオロアセトンはＦ－１９の取り込みのために使用されており、そしてＮ－クロロアセチルヨードトリアミンはタンパク質への放射性ヨウ素の導入のために使用されている。
【0131】
マレイミド、例えばＮ－エチルマレイミドは特に他の基がプロトン化される７未満のｐＨ値においてスルフィドリル基に顕著な特異性を示すと考えられる。チオールはマレイミドとマイケル反応を起こし、二重結合への付加物のみを与える。形成されるチオエーテル結合は極めて安定である。それらはまた、アミノおよびイミダゾリル基とも遥かに緩徐な速度において反応する。例えばｐＨ７においては、単純なチオールとの反応は相当するアミンに対するよりも約１０００倍高速に起こる。反応に伴う３００ｎｍ領域の特徴的な吸光度の変化は反応をモニタリングするための好都合な方法を与える。これらの化合物は低ｐＨにおいて安定であるが、高ｐＨでは加水分解を受けやすい。一般的には、Ｗｏｎｇ，

Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｉｎｇ；ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，１９９１：Ｃｈａｐｔｅｒｓ　２　ａｎｄ　４を参照のこと。

【0132】

スルフィドリルとは元来反応性ではない薬剤（例えば薬品）もなお、薬剤と反応性の基およびスルフィドリル反応性の基の両方を担持した二官能性の架橋剤を用いることにより、化学的に活性化された抗体にコンジュゲートしてよい。架橋剤は目的の分子と（例えばアミノ、カルボキシまたはヒドロキシ基を介して）、そして化学的に活性化されたタンパク質と同時に反応してよく、あるいは、それを用いて目的の分子を誘導体化することにより相手分子を形成し、次にこれが薬剤から誘導した部分によりスルフィドリル反応性となってよく、あるいは、それを用いることにより化学的に活性化されたタンパク質が目的分子と反応性となるように誘導体化してよい。

【0133】

薬剤はまたリンカーにより抗体に連結できる。適切なリンカーは例えば切断可能、または非切断可能なリンカーを包含する。切断可能なリンカーは典型的には細胞内条件下の切断を受けやすいものである。適切な切断可能なリンカーは例えばリソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼなどの細胞内プロテアーゼにより切断可能なペプチドリンカーを包含する。例示的な実施形態においては、リンカーはジペプチドリンカー、例えばバリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ）またはフェニルアラニン－リジン（ｐｈｅ－ｌｙｓ）リンカーであり得る。他の適切なリンカーは５．５未満のｐＨで加水分解可能なリンカー、例えばヒドラゾンリンカーを包含する。別の適切な切断可能なリンカーはジスルフィドリンカーを包含する。

【0134】

リンカーは抗体への連結のための基を包含できる。例えばリンカーはスルフィドリル反応性の基（例えばマレイミド、ハロアセトアミド（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ハロエステル（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ハロメチルケトン（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ベンジル性ハロゲン化物（例えばヨード、ブロモまたはクロロ）、ビニルスルホンおよびピリジルチオ）を包含できる。一般的には、Ｗｏｎｇ，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｉｎｇ；ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，１９９１を参照のこと。

【0135】

特定の実施形態においては、イムノコンジュゲートは下記の式：

【0136】

【化12】

$$Ab_z-\left(A_a-W_w-Y_y-D\right)_p$$

を有するか、または薬学的に受容可能なその塩または溶媒和物であり、ここで、
Ａｂは抗体であり、
Ａはストレッチャー単位であり、
ａは０または１であり、
各Ｗは独立してリンカー単位であり、
ｗは０～１２の整数であり、
Ｙはスペーサー単位であり、
ｙは０、１または２であり、
ｐは１～約２０の範囲であり、そして、
Ｄは診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤であり、そして、
ｚはタンパク質上の所定のコンジュゲーション部位の数である。

【0137】

抗体が完全に負荷されている場合、ｐ＝ｚである。抗体が部分的に負荷されている場合はｐ＜ｚである。一部の実施形態においては、ｐは偶数である。特定の実施形態においては、ｐ＝２、４、６または８である。特定の実施形態においては、ｐ＝ｚ＝４である。別の実施形態においては、０＜ｐ＜８である。

【0138】

ストレッチャー単位は抗体にリンカー単位を連結することができる。ストレッチャー単位は抗体の鎖間システイン残基と結合を形成できる官能基である。有用な官能基は限定しないが上記したスルフィドリル反応性基を包含する。

【0139】

リンカー単位は典型的にはアミノ酸単位、例えばジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチドである。リンカー単位は細胞内で切断可能または非切断可能である。

【0140】

１つの実施形態において、アミノ酸単位はバリン－シトルリンである。別の実施形態において、アミノ酸単位はフェニルアラニン－リジンである。さらに別の実施形態において、アミノ酸単位はＮ－メチルバリン－シトルリンである。さらに別の実施形態において、アミノ酸単位は５－アミノ吉草酸、ホモフェニルアラニンリジン、テトライソキノリンカルボキシレートリジン、シクロヘキシルアラニンリジン、イソネペコチック酸リジン、ベータアニリンリジン、グリシンセリンバリングルタミンおよびイソネペコチック酸である。特定の実施形態においては、アミノ酸単位は天然のアミノ酸を含み得る。別の実施形態においては、アミノ酸単位は非天然のアミノ酸を含む。

【0141】

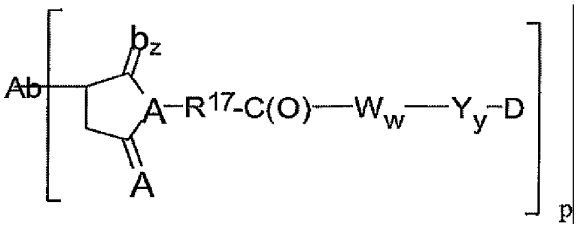
スペーサー単位は、存在する場合は、リンカー単位をＤに連結する。あるいは、スペーサー単位は、リンカー単位が存在しない場合に、ストレッチャー単位を薬剤部分に連結することができる。スペーサー単位はまた、リンカー単位とストレッチャー単位との両方が存在しない場合に、抗体に診断、予防および治療薬剤を連結することができる。１つの実施形態において、スペーサー単位はｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）単位、ｐ－アミノベンジルエーテル単位、またはｐ－アミノベンジルカルバモイル単位である（例えば米国特許公開第２００３－０１３０１８９号を参照のこと）。

【0142】

一部の実施形態においては、イムノコンジュゲートは下記の式を有する：

【0143】

【化13】



ここで、Ｒ１７は－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ－、－Ｏ（Ｃ１－Ｃ８アルキル）－、－アリーレン－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－アリーレン－、－アリーレン－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－（Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ）－、－（Ｃ３－Ｃ８カルボシクロ）－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ－、－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－（Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ）－、－（Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクロ）－Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－および（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－ＣＨ２－から選択される。一部の実施形態においては、Ｒ１７は－（ＣＨ２）５－または（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－ＣＨ２－であり、ｒは２である。

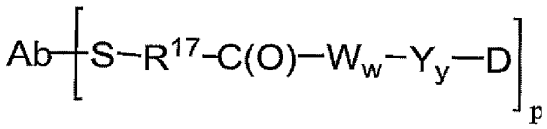
【0144】

OnCusp
Ex. 1002

別の実施形態において、イムノコンジュゲートは下記の式を有する：

【0145】

【化14】



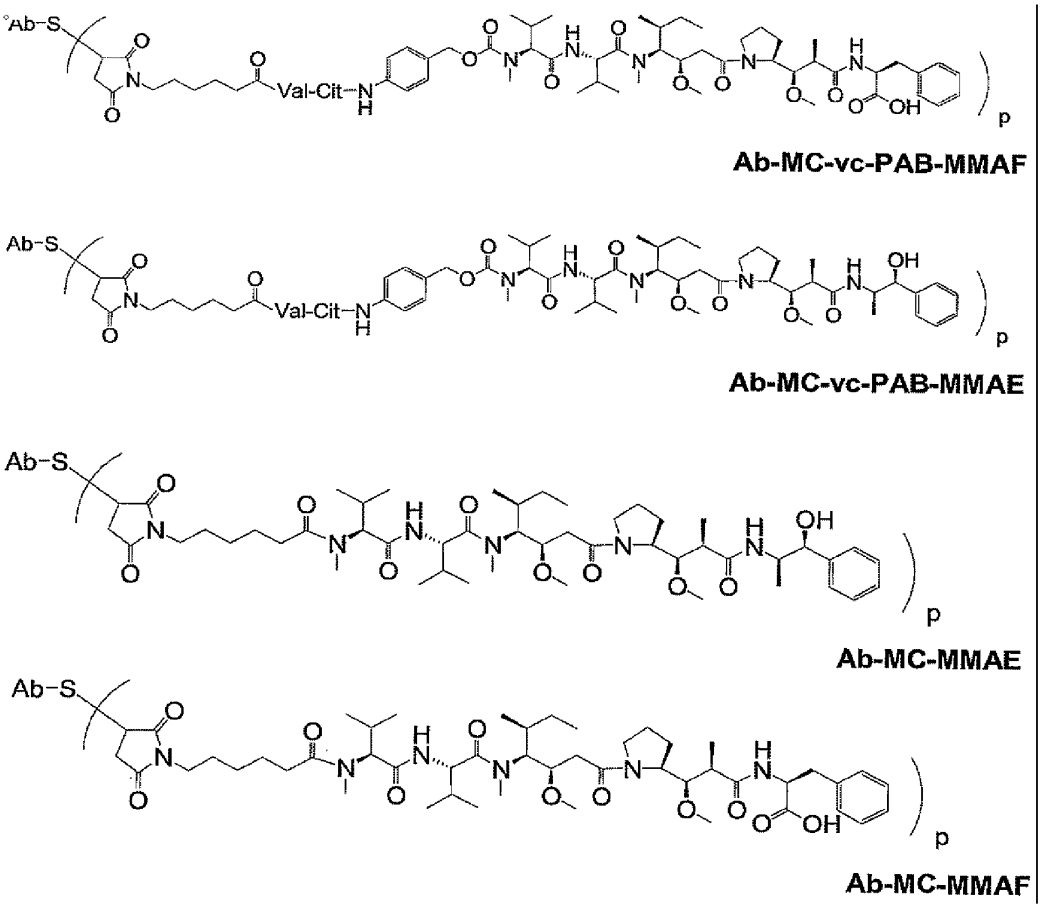
ここで、Ｒ１７は上記の通り定義される。

【0146】

別の実施形態において、イムノコンジュゲートは下記の式のうちの１つを有する：

【0147】

【化15】



【0148】

最終的なイムノコンジュゲートは従来の手法、例えばセファクリルＳ－３００上のサイジングクロマトグラフィー、プロテインＡまたはプロテインＧセファロースなどのアフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製してよい。

【0149】

タンパク質の精製およびコンジュゲーションの例を実施例１および２において記載する。

【0150】

（診断および治療のためのイムノコンジュゲートの使用）

（Ａ．診断のためのイムノコンジュゲートの使用）
イムノコンジュゲートは診断画像化のために使用できる。例えばイムノコンジュゲートは放射標識モノクローナル抗体であり得る。例えばＳｒｉｖａｓｔａｖａ（ｅｄ．）．Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍａｇｉｎｇ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ（１９８８）；Ｃｈａｓｅ，“Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｓｏｔｏｐｅｓ”，ｉｎ Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｇｅｎｎａｒｏ等（ｅｄｓ．），Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，６２４－６５２頁（１９９０）；Ｂｒｏｗｎ．“Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｕｓｅ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ”，ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｙ，Ｐｅｚｚｕｔｏ等（ｅｄｓ．），Ｃｈａｐｍａｎ ａｎｄ Ｈａｌｌ，２２７－２４９頁（１９９３）を参照できる。イムノシンチグラフィーとしても知られているこの手法は、モノクローナル抗体にコンジュゲートしたガンマ線発射放射性同位体の位置を検出するためにガンマカメラを使用している。診断画像化は癌、自己免疫疾患、感染症および／または心臓血管疾患を診断するために使用できる（例えばＢｒｏｗｎ，前出を参照）。

【0151】
一例において、イムノコンジュゲートは心臓血管疾患を診断するために使用できる。例えば、抗ミオシン抗体フラグメントを含むイムノコンジュゲートは、急性心筋梗塞に伴う心筋壊死を画像化するために使用できる。血小板またはフィブリンに結合する抗体フラグメントを含むイムノコンジュゲートは、深静脈血栓を画像化するために使用できる。さらに、活性化血小板に結合する抗体フラグメントを含むイムノコンジュゲートはアテローム性動脈硬化症のプラークを画像化するために使用できる。

【0152】
イムノコンジュゲートはまた、感染性疾患の診断において使用できる。例えば、特定の細菌抗原に結合する抗体フラグメントを含むイムノコンジュゲートは、膿瘍の位置特定のために使用できる。さらに、顆粒球および炎症性白血球に結合する抗体フラグメントを含むイムノコンジュゲートは、細菌感染症の部位を特定するために使用できる。

【0153】
多くの研究が癌のシンチグラフィー検出のためのモノクローナル抗体の使用を評価している。例えば前出Ｂｒｏｗｎを参照のこと。研究対象は黒色腫、結腸直腸癌、卵巣癌、乳癌、肉腫および肺癌などの固形腫瘍の主要な型を包含する。即ち、本発明はまた、癌を検出するための腫瘍マーカーに結合する抗体フラグメントを含むイムノコンジュゲートを用いる癌の検出を意図している。このような腫瘍マーカーの例は、癌胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、癌遺伝子産物、腫瘍関連細胞表面抗原、および、壊死関連細胞内抗原、ならびに後述する腫瘍関連抗原および腫瘍特異的抗原を包含する。

【0154】
診断のほかに、モノクローナル抗体画像化は治療応答をモニタリングし、疾患の再発を検出し、そして、後の臨床判断の指針とするために使用できる。

【0155】
診断およびモニタリング目的のためには、放射性同位体を直接、または中間的官能基を用いて間接的に、抗体フラグメントに結合してよい。このような中間的官能基には例えばＤＴＰＡ（ジエチレントリアミン５酢酸）およびＥＤＴＡ（エチレンジアミン４酢酸）が包含される。患者に送達される放射線の線量は典型的には可能な限り低水準に維持する。これは検出および正確な測定を可能にする最小限の半減期、最小限の体内保持時間、および、最小限の同位体量の最良の組み合わせとなるように同位体を選択することにより達成できる。抗体に結合することができ、そして診断画像化に適切な放射性同位体の例は、^{99}ｍＴｃおよび^{111}Ｉｎを包含する。

【0156】
研究によれば、抗体フラグメント、特にＦａｂおよびＦａｂ’が適切な腫瘍／バックグ

ラウンド比を与えるとされる（例えば前出Ｂｒｏｗｎ参照）。

【0157】

イムノコンジュゲートはまた、インビボの診断の目的のために常磁性イオンで標識できる。磁気共鳴画像化のために特に有用な元素はＧｄ、Ｍｎ、ＤｙおよびＦｅイオンである。

【0158】

イムノコンジュゲートはインビトロの特定の抗原の存在を検出することもできる。そのような免疫試験において、イムノコンジュゲートは液相中で使用するか、または、固相担体に結合させてよい。例えば、重合体コーティングビーズ、プレートまたはチューブなどの不溶性の支持体に抗体成分を連結するためには、アミノデキストランなどの重合体にインタクトな抗体、または、その抗原結合フラグメントを結合することができる。

【0159】

あるいは、イムノコンジュゲートは、組織学的標本から調製した組織切片における特定の抗原の存在を検出するために使用できる。このようなインサイチュの検出は例えば検出可能に標識されたイムノコンジュゲートを組織切片に適用することにより達成できる。インサイチュ検出は特定の抗原の存在を調べるため、および、検査組織における抗原の分布を調べるために使用できる。インサイチュ検出の一般的手法は当該分野で良く知られている（例えばＰｏｎｄｅｒ，“Ｃｅｌｌ Ｍａｒｋｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ”，ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｍｏｎｋ（ｅｄ．），ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，１１５－１３８頁（１９８７）；Ｃｏｌｉｇａｎら、前出参照）。

【0160】

酵素、蛍光化合物、電子転移剤等の検出可能な標識は、当該分野で良く知られている従来の方法により担体に連結できる。これらの標識された担体およびそれから製造されたイムノコンジュゲートは、抗体コンジュゲートが抗体への標識の直接の結合により製造できるが、インビトロ免疫試験およびインサイチュ検出のために使用できる。複数の標識によるイムノコンジュゲートの負荷は免疫試験または組織学的手順の感度を上昇させることができ、その場合、標的抗原への抗体または抗体フラグメントの結合を低値とすることができる。

【0161】

（Ｂ．治療のためのイムノコンジュゲートの使用）

イムノコンジュゲートを用いてウイルスおよび細菌の感染性疾患、心臓血管疾患、自己免疫疾患および癌を治療することができる。そのような治療の目的は非標的組織への曝露を最小限にしながら、標的細胞に活性剤（例えば放射線、毒素または薬剤）の細胞傷害性または細胞増殖抑制用量を送達することである。

【0162】

放射性同位体は直接、または、キレート形成剤を介して間接的に、インタクトな抗体またはその抗原結合フラグメントに結合できる。例えば^{67}Ｃｕは、キレート形成剤ｐ－ブロモ－アセトアミドベンジルテトラエチルアミン４酢酸（ＴＥＴＡ）を用いて抗体成分にコンジュゲートできる（例えば前出のＣｈａｓｅ参照）。

【0163】

さらに、イムノコンジュゲートは治療薬剤が毒素または薬剤であるように製造できる。そのようなイムノコンジュゲートの製造のための有用な毒素はリシン、アブリン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリン毒素およびシュードモナス内毒素を包含する。イムノコンジュゲートを製造するための有用な化学療法剤は、オーリスタチン、ドラスタチン、ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦ、ＡＦＰ、ＡＥＢ、ドキソルビシン、ダウノルビシン、メトトレキセート、メルファリン、クロラムブシル、ビンカアルカロイド、５－フルオロウリジン、マイトマイシン－Ｃ、タキソール、Ｌ－アスパラギナーゼ、メルカプトプリン、チオグアニン、ヒドロキシ尿素、シタラビン、シクロホスファミド、イフォスファミド、ニトロソ尿素、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、ダカルバ

ジン、プロカルバジン、トポテカン、ナイトロジェンマスタード、シトキサン、エトポシド、ＢＣＮＵ、イリノテカン、カンプトテシン、ブレオマイシン、イダルビシン、ダクチノマイシン、プリカマイシン、ミトキサントロン、アスパラギナーゼ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、パクリタキセルおよびドセタキセルならびにこれらの塩、溶媒和物および誘導体を包含する。他の適切な薬剤は、検出可能な標識、例えば蛍光分子、または、細胞傷害性剤、例えば重金属若しくは放射性核種を複合体化することができるキレート形成剤、例えばＤＴＰＡ；および毒素、例えばシュードモナス内毒素等を包含する。

【0164】

一部の実施形態においては、診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤はオーリスタチンＥ（ドラスタチン－１０としても知られている）またはその誘導体、ならびに、薬学的に受容可能なその塩または溶媒和物である。典型的には、オーリスタチンＥ誘導体は、例えばオーリスタチンＥとケト酸との間に形成したエステルである。例えばオーリスタチンＥをパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させることによりそれぞれＡＥＢおよびＡＥＶＢを生成することができる。他の典型的なオーリスタチンＥ誘導体はＡＦＰ、ＭＡＦおよびＭＭＡＥを包含する。オーリスタチンＥおよびその誘導体ならびにリンカーの合成および構造は米国特許第０９／８４５，７８６号（米国特許出願公開第２００３００８３２６３号）、米国特許出願公開第２００５－０２３８６２９号；国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ０３／２４２０９号；国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ０２／１３４３５号；国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ０２／１３４３５号；国際特許公開ＷＯ０４／０７３６５６号；および米国特許第６，８８４，８６９号；第６，３２３，３１５号；第６，２３９，１０４号；第６，２１４，３４５号；第６，０３４，０６５号；第５，７８０，５８８号；第５，６６５，８６０号；第５，６６３，１４９号；第５，６３５，４８３号；第５，５９９，９０２号；第５，５５４，７２５号；第５，５３０，０９７号；第５，５２１，２８４号；第５，５０４，１９１号；第５，４１０，０２４号；第５，１３８，０３６号；第５，０７６，９７３号；第４，９８６，９８８号；第４，９７８，７４４号；第４，８７９，２７８号；第４，８１６，４４４号；および第４，４８６，４１４号に記載されている（これらは全て参照により全体が本明細書に援用される）。

【0165】

一部の実施形態においては、抗癌剤は例えば以下の薬剤表に列挙する薬剤を包含するがこれらに限定されない。

【0166】

【表1A-1】

薬剤表

アルキル化剤	
ナイトロジェンマスタード：	シクロホスファミド
	イフォスファミド
	トロフォスファミド
	クロラムブシル
ニトロソ尿素：	カルムスシン（ＢＣＮＵ）
	ロムスチン（ＣＣＮＵ）
アルキルスルホネート	ブスルファン

【0167】

【表1A-2】

:

	トレオスルファン
トリアゼン；	ダカルバジン
白金含有化合物	シスプラチン
	カルボプラチン
植物アルカロイド	
ビンカアルカロイド；	ビンクリスチン
	ビンブラスチン
	ビンデシン
	ビノレルビン
タキソイド：	パクリタキセル
	ドセタキソール
ＤＮＡトポイソメラーゼ阻害剤	
エピポドフィリン：	エトポシド
	テニポシド
	トポテカン
	９－アミノカンプトテシン
	カンプトテシン
	クリスナトール
マイトマイシン；	マイトマイシンＣ
代謝拮抗物質	
葉酸拮抗物質：	
ＤＨＦＲ阻害剤：	メトトレキセート
	トリメトレキセート
ＩＭＰデヒドロゲナーゼ阻害剤：	ミコフェノール酸
	チアゾフリン
	リバビリン
	EICAR
リボヌクレオチド還元酵素阻害剤：	ヒドロキシ尿素
	デフェロキサミン
ピリミジンアナログ：	
ウラシルアナログ	５－フルオロウラシル
	フロクスウリジン
	ドキシフルリジン
	ラチトレキセド
シトシンアナログ	シタラビン (ara C)
	シトシンアラビノシド
	フルダラビン
プリンアナログ：	メルカプトプリン
	チオグアニン
ホルモン療法：	
受容体拮抗剤：	
抗エストロゲン	タモキシフェン
	ラロキシフェン
	メゲストロール
ＬＨＲＨアゴニスト：	ゴスクルクリン
	ロイプロリドアセテート
抗アンドロゲン：	フルタミド

【0168】

【表1A-3】

	ビカルタミド
レチノイド／デルトイド	
ビタミンＤ３アナログ：	EB 1089
	CB 1093
	KH 1060
光ダイナミック療法：	ベルトポルフィン (BPD-MA)
	フタロシアニン
	光増感剤Ｐｃ４
	デメトキシ－ヒポクレリンＡ
	(2BA-2-DMHA)
サイトカイン：	インターフェロン－α
	インターフェロン－γ
	腫瘍壊死因子
その他：	
イソプレニル化阻害剤：	ロバスタチン
ドーパミン作用性神経毒：	１－メチル－４－フェニルピリジニウムイオン
細胞周期阻害剤：	スタウロスポリン
アクチノマイシン：	アクチノマイシンＤ
	ダクチノマイシン
ブレオマイシン：	ブレオマイシンＡ２
	ブレオマイシンＢ２
	ペプロマイシン
アントラサイクリン：	ダウノルビシン
	ドキソルビシン（アドリアマイシン）
	イダルビシン
	エピルビシン
	ピラルビシン
	ゾルビシン
	ミトザントロン
ＭＤＲ阻害剤：	ベラパミル
Ｃａ２＋ＡＴＰａｓｅ阻害剤：	タプシガルギン

一部の実施形態においては、診断薬剤、予防薬剤または治療薬剤は放射性同位体ではない。

【0169】

一部の実施形態においては、イムノコンジュゲートは以下の特定の型の癌の１つを治療するために使用できる：

固形腫瘍、例えば、限定しないが、

肉腫
線維肉腫
粘液肉腫
脂肪肉腫
軟骨肉腫
骨原性肉腫
軟骨腫
血管肉腫
内皮肉腫
リンパ管肉腫
リンパ管内皮肉腫
骨膜腫
中皮腫

ユーイング腫
平滑筋肉腫
横紋筋肉腫
結腸癌
結腸直腸癌
腎臓癌
膵臓癌
骨癌
乳癌
卵巣癌
前立腺癌
食道癌
胃癌（例えば胃腸の癌）
口腔癌
鼻腔癌
咽喉癌
扁平細胞癌（例えば肺の）
基底細胞癌
腺癌（例えば肺の）
肝腺癌
皮脂腺癌
乳頭状癌
乳頭状腺癌
嚢胞腺腫
髄様癌
気管支原生癌
腎細胞癌
肝細胞癌
胆管癌
絨毛癌
精上皮腫
胎生期癌
ウイルムス腫
子宮頸癌
子宮癌
精巣癌
小細胞肺癌
膀胱癌
肺癌
非小細胞肺癌
上皮癌
神経膠腫
多形神経膠芽腫
星状細胞腫
髄芽細胞腫
頭蓋咽頭腫
脳室上衣細胞腫
松果体腫
血管芽腫
聴神経腫

乏突起神経膠腫
髄膜腫
皮膚癌
黒色腫
神経芽腫
網膜芽腫
血液骨癌、例えば、限定しないが、
急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）
急性リンパ芽球性Ｂ細胞白血病
急性リンパ芽球性Ｔ細胞白血病
急性骨芽球性白血病（ＡＭＬ）
急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）
急性単芽球性白血病
急性赤白血病
急性巨核芽球白血病
急性骨髄単球性白血病
急性非リンパ球性白血病
急性未分化型白血病
慢性骨髄球性白血病（ＣＭＬ）
慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）
ヘアリーセル白血病
多発性骨髄腫
急性および慢性白血病：
リンパ芽球性
骨髄原性
リンパ球性
骨髄球性白血病
リンパ腫：
ホジキン病
非ホジキンリンパ腫
多発性骨髄腫
ヴァルデンストレームマクログロブリン血症
重鎖疾患
真性赤血球増加症
他の癌：
腹腔癌
肝細胞癌
肝細胞腫
唾液腺癌
外陰部癌
甲状腺
陰茎癌
肛門癌
頭部頚部癌
腎細胞癌
急性未分化大細胞癌
皮膚未分化大細胞癌。

【0170】

一部の実施形態においては、イムノコンジュゲートは以下の特定の型の自己免疫疾患の１つを治療するために使用できる：

活動性慢性肝炎
アジソン病
アレルギー性肺胞炎
アレルギー反応
アレルギー性鼻炎
アルポート症候群
アナフィラキシー
強直性脊椎炎
抗リン脂質症候群
関節炎
回虫症
アスペルギルス症
アトピー性アレルギー
アトピー性皮膚炎
アトピー性鼻炎
ベーチェット病
鳥飼育者肺
気管支喘息
キャプラン症候群
心筋症
セリアック病
シャーガス病
慢性糸球体腎炎
コーガン症候群
寒冷凝集素病
先天性風疹感染
ＣＲＥＳＴ症候群
クローン病
クリオグロブリン血症
クッシング症候群
皮膚筋炎
円板状エリテマトーデス
ドレスラー症候群
イートン－ランバート症候群
エコーウイルス感染症
脳脊髄炎
内分泌性眼障害
エプスタインバーウイルス乾癬
ウマ慢性肺気腫
紅斑
エバンズ症候群
フェルティ症候群
線維筋肉痛
フックス毛様体炎
胃萎縮
胃腸アレルギー
巨細胞性動脈炎
糸球体腎炎
グッドパスチャー症候群
対宿主性移植片病

グレーブス病
ギヤン－バレー病
橋本甲状腺炎
溶血性貧血
ヘーノホーシェーンライン紫斑病
特発性副腎萎縮
特発性肺線維症
ＩｇＡ腎症
炎症性腸疾患
インスリン依存性真性糖尿病
若年性関節炎
若年性真性糖尿病（Ｉ型）
ランバート－イートン症候群
蹄葉炎
扁平苔癬
ルポイド肝炎
狼瘡
リンパ球減少症
メニエール病
混合結合組織病
多発性硬化症
重症筋無力症
悪性貧血
多腺症候群
初老期痴呆
原発性無ガンマグロブリン症
原発性胆汁性肝硬変
乾癬
乾癬性関節炎
レイノー兆候
再発性流産
ライター症候群
リューマチ熱
関節リューマチ
サンプター症候群
住血吸虫症
シュミット症候群
硬皮症
シャルマン症候群
シェーグレン症候群
スティッフマン症候群
交感性眼炎
全身エリテマトーデス
高安動脈炎
側頭動脈炎
甲状腺炎
血小板減少症
甲状腺中毒症
中毒性表皮壊死症
Ｂ型インスリン抵抗性

Ｉ型真性糖尿病
潰瘍性結腸炎
ブドウ膜炎
白斑
ヴァルデンストレームマクログロブリン血症
ヴェーゲナー肉芽腫症。

【0171】
他の癌または自己免疫疾患の治療のためのイムノコンジュゲートの使用も意図され、本発明の範囲に包含される。

【0172】
（Ｃ．イムノコンジュゲートの投与）
一般的に投与されるイムノコンジュゲートの用量は患者の年齢、体重、性別、全身状態およびそれまでの病歴のような要因に応じて変動する。典型的には、約１ｐｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ（薬剤量／患者体重）の範囲のイムノコンジュゲートの用量をレシピエントに与えることが望ましいが、より低用量または高用量を投与してもよい。例えば多くの研究は０．１～１．０ミリグラムの用量を用いた場合の良好な診断画像化を実証しているが、別の研究では１０ミリグラム超の用量で向上した位置特定が示されている（例えば前出Ｂｒｏｗｎ参照）。

【0173】
治療用途のためには、プロトコルに応じて一般的に約１０～２００ミリグラムのイムノコンジュゲートを投与する。一部の実施形態においては、用量は約０．５ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇ、または約１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇまたは約１５ｍｇ／ｋｇである。一部のプロトコルは数日間、数週間または数ヶ月の期間、毎日投与する。一部の実施形態においては、イムノコンジュゲートは週に１～３回、週１回、隔週または月１回投与する。患者の感受性を低減させるために、用量を低減、および／または、他の種由来の抗体を使用、および／または低アレルギー性の抗体、例えばハイブリッドヒト若しくは霊長類抗体を使用することが必要となる場合がある。

【0174】
イムノコンジュゲートの患者への投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄膜内とするか、局所用カテーテルを介した灌流によるか、または、直接の患部内注射により行うことができる。注射によりイムノコンジュゲートを投与する場合は、投与は連続注入によるか、または、単回または複数回の瞬時投与であってよい。

【0175】
イムノコンジュゲートは知られた方法に従って製剤することにより薬学的に有用な組成物、例えば医薬品を製造することができ、これによりイムノコンジュゲートを薬学的に受容可能な担体との混合物中で組み合わせる。組成物は、その投与がレシピエント患者により耐容され得る場合に、「薬学的に受容可能な担体」ということができる。滅菌されたリン酸塩緩衝食塩水は薬学的に受容可能な担体の一例である。他の適切な担体は当該分野で良く知られている（例えばＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ　Ｅｄ．（１９９０）を参照）。

【0176】
免疫療法の目的のためには、イムノコンジュゲートおよび薬学的に受容可能な担体は治療有効量で患者に投与する。「治療有効量」とは生理学的に意味のある投与量である。薬剤は、その存在がレシピエント患者の生理学的状態の検出可能な変化をもたらす場合に、生理学的に意味のあるものとなる。

【0177】
追加的な薬学的方法を用いることにより、治療用途においてイムノコンジュゲートの作用の持続時間を制御してよい。制御放出調製物はイムノコンジュゲートと複合体形成するかこれを吸着するための重合体の使用を介して調製できる。例えば、生体適合性重合体はポリ（エチレンコビニルアセテート）のマトリックス、および、ステアリン酸２量体とセ

バシン酸とのポリ無水物共重合体のマトリックスを包含する（例えばＳｈｅｒｗｏｏｄら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１４４６－１４４９（１９９２）参照）。そのようなマトリックスからのイムノコンジュゲートの放出速度は、イムノコンジュゲートの分子量、マトリックス内のイムノコンジュゲートの量、および、分散された粒子の大きさに依存する（例えばＳａｌｔｚｍａｎら、Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ．Ｊ．５５：１６３－１７１（１９８９）；および前出のＳｈｅｒｗｏｏｄら、参照）。他の固体剤型はＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ　Ｅｄ．（１９９０）に記載されている。

【0178】

本発明は本明細書に記載した特定の実施形態により範囲を限定されない。本明細書に記載したものに加えて本発明の種々の変形は上記説明および添付図面から当業者には自明となるものである。このような変形は添付する請求項の範囲内に包含されるものとする。

【0179】

本発明は以下の実施例においてさらに説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。以下の実施例において記載する細胞系統はＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）またはＤｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ，Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ（ＤＭＳＺ）により特定される条件に従って培養物中に維持した。細胞培養試薬はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡより入手した。

【実施例】

【0180】

（実施例１）

（ｃＡＣ１０システイン変異体の構築および発現）

（手順）

ＡＣ１０ハイブリドーマからのキメラＡＣ１０（ｃＡＣ１０）の構築、およびＣＨＯ細胞系統におけるｃＡＣ１０の発現が報告されている（Ｗａｈｌら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６２（１３）：３７３６－４２（２００２））。

【0181】

（ｉ）変異誘発およびクローニング

ｃＡＣ１０の変異体はｃＤＮＡをｃＡＣ１０重鎖について（配列番号６）（ｐＢＳＳＫ－ＡＣ１０Ｈ内）またはｃＡＣ１０軽鎖について（配列番号８）（ｐＢＳＳＫ－ＡＣ１０Ｌ内）含有し、そして、それぞれｃＡＣ１０重鎖（配列番号７）またはｃＡＣ１０軽鎖（配列番号９）をそれぞれコードするｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター内で作成した。変異誘発はＱｕｉｋｃｈａｎｇｅ（登録商標）部位指向性変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を用いながら製造元の説明書に従って実施した。ｃＡＣ１０重鎖ｃＤＮＡを含有するｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター、即ち図４に示すｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈを鋳型として使用することにより重鎖Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ二重変異体（システインからセリンへの置換は２２６位および２２９位にある）を作成した（残基の番号付けは、シグナル配列を除き、成熟ｃＡＣ１０重鎖および軽鎖によるものである）。プライマーＣ２２６Ｓ：Ｃ２２９Ｓ：

【0182】

【化16】

5’GACAAAACTCACACA**TCC**CCACCG**TCC**CCAGCACCTGAACTC

（配列番号１）およびそのリバース相補相手を用いてアミノ酸置換を導入した（変異したコドンに下線を付した）。得られたプラスミドはｃＡＣ１０Ｈ２２６／２２０に関するｃＤＮＡ（配列番号１４）を含有し、そしてｃＡＣ重鎖Ｃ２２６Ｓ，Ｃ２２９Ｓ二重変異体（配列番号１５）をコードするｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈ２２６，２２９と命名した。

【0183】

ｃＡＣ１０重鎖Ｃ２２０Ｓ変異体は鋳型としてのｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈおよびプライマーに２２０Ｓ：

【0184】

【化17】

5’GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCA-CACATGCCC

（配列番号２）およびそのリバース相補相手を用いて作成（変異したコドンに下線を付した）することにより、ｃＡＣ１０Ｈ２２０に関するｃＤＮＡ（配列番号１０）を含有し、そしてｃＡＣ１０Ｃ２２０Ｓ変異体（配列番号１１）をコードするコンストラクトｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈ２２０を作成した。ｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈ２２０を鋳型として使用することにより、プライマーＣ２２６Ｓ：

【0185】

【化18】

5’GACAAAACTCACACATCCCCACCG-TGCCCAGC

（配列番号３）およびそのリバース相補相手（第２の変異コドンに下線を付した）を用いながら重鎖Ｃ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ二重変異体を作成した。得られたプラスミドはｃＡＣ１０Ｈ２２０／２２６に関するｃＤＮＡ（配列番号１２）を含有し、そしてｃＡＣ重鎖Ｃ２２０Ｓ，Ｃ２２６Ｓ二重変異体（配列番号１３）をコードするｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈ２２０，２２６と命名した。ｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈ２２６，２２９を鋳型として使用することにより、プライマーＣ２２０Ｓ：

【0186】

【化19】

5’GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATCCCC

（配列番号４）およびそのリバース相補相手（変異コドンに下線を付した）を用いながら重鎖Ｃ２２０Ｓ，Ｃ２２６Ｓ，Ｃ２２９Ｓ変異体を作成した。得られたプラスミドはｃＡＣ１０Ｈ２２０／２２６／２２９に関するｃＤＮＡ（配列番号１６）を含有し、そしてｃＡＣ重鎖Ｃ２２０Ｓ，Ｃ２２６Ｓ，Ｃ２２９Ｓ変異体（配列番号１７）をコードするｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈ２２０，２２６，２２９と命名した。

【0187】

ｃＡＣ１０軽鎖ｃＤＮＡを含有するｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター、即ち図５に示すｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｌを鋳型として使用することにより、プライマーＣ２１８Ｓ：

【0188】

【化20】

5’CTTCAACAGGGGAGAGTCTTAGACGCG-TATTGG

（配列番号５）およびそのリバース相補相手（変異コドンに下線を付した）を用いて軽鎖Ｃ２１８Ｓ変異体ｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｌ２１８を作成した。得られたプラスミドはｃＡＣ１０Ｌ２１８に関するｃＤＮＡ（配列番号１８）を含有し、そしてｃＡＣ１０軽鎖Ｃ２１８Ｓ変異体（配列番号１９）をコードするｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｌ２１８と命名した。

【0189】

ｃＡＣ１０重鎖の親およびシステイン変異体のｃＤＮＡを制限酵素ＸｈｏＩおよびＸｂａＩで切断することによりｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔから遊離させ、ＣＨＥＦ　ＥＦ－１αプロモーターの下流においてｐＤＥＦ３８発現ベクター（Ｒｕｎｎｉｎｇ　Ｄｅｅｒ　ａｎｄ　Ａｌｌｉｓｏｎ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｐｒｏｇ．２０（３）：８８０－９（２００４））内にライゲーションした。ｃＡＣ１０軽鎖の親およびシステイン変異体のｃＤＮＡをＭｌｕＩでｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔから遊離させ、ＣＨＥＦ　ＥＦ－１αプロモーターの下流においてｐＤＥＦ３８のＭｌｕＩ部位にクローニングした。

【0190】
（ｉｉ）安定な細胞系統の開発およびタンパク質発現
ｃＡＣ１０変異体をｃＡＣ１０親抗体に関して前述の通りＣＨＯ－ＤＧ４４細胞系統内で安定に発現させた（Ｗａｈｌら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６２：３７３６－３７４２（２００２））。ｐＤＥＦ３８発現コンストラクトを制限酵素ＰｖｕＩで線状化した後に、トランスフェクションに付した。線状化ｐＤＥＦ３８　ｃＡＣ１０　Ｈ鎖の親またはシステイン変異体のコンストラクト５０マイクログラムを、エレクトロポレーションにより、ＣＨＯ－ＤＧ４４細胞内に線状化ｐＤＥＦ３８ｃＡＣ１０Ｌ鎖の親またはシステイン変異体のコンストラクト５０μｇと同時トランスフェクトした（Ｕｒｌａｕｂら、Ｓｏｍａｔ　Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ．１２（６）：５５５－６６（１９８６））。エレクトロポレーションの後、ヒポキサンチンおよびチミジン（ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌｅｎｅｘａ，ＫＳ）および４ｍＭのＬ－グルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を含有するＥＸ－ＣＥＬＬ　３２５　ＰＦ　ＣＨＯ培地中で２日間、細胞を回復させた。２日間の後、培地をヒポキサンチンおよびチミジンを含有しない選択培地と交換することによりｃＡＣ１０変異体を発現している安定な細胞系統を選択した。選択可能なマーカーを含有する、プラスミドＤＮＡを取り込んだ細胞のみがヒポキサンチンおよびチミジンの不在下で増殖することができた。細胞を回収し、安定なプールを３０ｍｌ容の振とうフラスコ培養にスケールアップした。細胞のクローニングは非トランスフェクトＣＨＯ－ＤＧ４４フィーダー細胞のバックグラウンド中の限界希釈法を用いて実施した。慨すれば、ヒポキサンチンおよびチミジンの不在下、ＥＸ－ＣＥＬＬ　３２５　ＰＦ　ＣＨＯ培地中、マイクロプレートのウェル当たり０．５トランスフェクト細胞および１０００非トランスフェクト細胞をプレーティングした。７～１０日間インキュベーションした後、個々のコロニーを採取し、増殖させた。高力価のクローンを選択し、スピナー中終容量２．５Ｌで、またはＷＡＶＥバイオリアクター（ＷＡＶＥ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＬＬＣ，Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ，ＮＪ）中終容量５～１０Ｌで培養した。
【0191】
（結果）
ｃＡＣ１０はヒトＣＤ３０に結合するキメラＩｇＧ$_1$である（Ｗａｈｌら、前出）。抗体ｃＡＣ１０は、容易に還元され且つほぼ定量的な収率でチオール反応性オーリスタチン薬剤であるｖｃＭＭＡＥにコンジュゲートされる溶媒接触可能な鎖間ジスルフィド結合４つを有している（Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１：７７８－７８４（２００３））。全てで８つの接触可能なシステイン有するｃＡＣ１０親抗体を含み、そしてｖｃＭＭＡＥを負荷されているこのＡＤＣを本明細書においてはＣ８－Ｅ８と標記する（図１Ａ）。ｃＡＣ１０内の接触可能なシステインを系統的に変異させて相同性残基であるセリンとすることにより４つ（Ｃ４ｖ１、Ｃ４ｖ２およびＣ４ｖ３）または２つ（Ｃ２ｖ１およびＣ２ｖ２）の残存する接触可能なシステインを有する抗体変異体を作成した（表１および図１Ａ）。さらに、重鎖システイン残基２２６がセリンに変化した抗体変異体Ｃ６ｖ１（図示せず）は６つの接触可能なシステインを有した。これらの操作された抗体変異体を薬剤結合の厳密に定められた化学量論および部位においてコンジュゲートを形成するための出発点とした。
【0192】
全抗体変異体を安定なＣＨＯ－ＤＧ４４細胞系統において２５～１２５ｍｇ／Ｌの力価で発現させた。抗体変異体をプロテインＡアフィニティーおよびイオン交換クロマトグラフィー（表１）により２．５～１０Ｌ培養物から精製し、次にサイズ排除クロマトグラフィーおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。Ｃ４ｖ３を除く全ての抗体変異体はサイズ排除クロマトグラフィーによれば＞９８％単量体であると推定された（表２）。還元条件下で電気泳動に付した全変異体が重鎖および軽鎖の存在と合致する２つの主要なバンドを示した（データ示さず）。非還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥに関しては、全ての抗体変異体（Ｃ４ｖ３を除く）が予想された鎖間ジスルフィド結合パターン（図１Ａ）と合致した電気泳動パターン（図１Ｂ）を示した。抗体変異体Ｃ４ｖ３は、その予想とは異なる電気

泳動パターンおよびサイズ排除クロマトグラフィーのプロファイルがかなりの凝集を示唆していたことに基づいて、これらの試験の残余からは除外した。

【0193】

【表1】

表１
抗体変異体の生成および特徴付け

cAC10変異体*	Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異の位置†	Ｋａｒｐａｓ－２９９への競合結合 (IC_{50}, nM) #
C8	無し（親）	2.8 ± 0.1
C2v1	L214, H220, H226	2.2 ± 0.4
C2v2	H220, H226, H229	2.6 ± 0.4
C4v1	L214, H220	3.2 ± 0.4
C4v2	H226, H229	2.4 ± 0.1
C4v3	H220, H226	nd

*ｃＡＣ１０変異体は溶媒接触可能なシステイン残基の数、および、必要な場合は変異体数により識別される。例えばＣ２ｖ１は溶媒接触可能なシステイン残基２つを含有するｃＡＣ１０変異体を示す（図１Ａ）。

†Ｌ、軽鎖；Ｈ、重鎖；Ｋａｂａｔら（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　ｅｄ．ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））のナンバリングスキーム。

#３以上の独立した実験に関する平均（±ＳＥＭ）。

‖ｎｄ、ピークのショルダーおよびブロード化が存在したので決定しなかった。

【0194】

【表2】

表２
プロテインＡ精製後の各ｃＡＣ１０システイン変異体に関するタンパク質回収およびサイズ排除クロマトグラフィー分析の結果

cAC10 cys変異体	培養物１Ｌあたりのタンパク質回収量ｍｇ（プロテインＡ精製）	%単量体
C2v1	120	98.8%
C2v2	92	99.1%
C4v1	33	99.5%
C4v2	36	94.6%
C4v3	37	*
C6v1	28	97.3%

＊ピークのショルダーおよびブロード化が存在したので決定しなかった。

精製したタンパク質は還元および非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。ｃＡＣ１０Ｃ４ｖ３を除く全変異体が表３および図１Ｂに示すとおり非還元条件下で予想されたバンド形成パターンを示した。

【0195】

【表3】

表３
ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより非還元条件下で分析した変異体に関する予想される
バンドパターンおよび分子量

cAC10 変異体	システイン変異	非還元 バンドパターン	MWs (kDa)
C2v1	L218, H220/226	HH＋L	98＋24
C2v2	H220/226/229	H＋L	49＋24
C4v1	L218, H220	HH＋L	98＋24
C4v2	H226/229	HL	73
C4v3	H220/226	HH＋L	98＋24
C6v1	H226	HHLL	146

凝集はサイズ排除高速液体クロマトグラフィーにより評価し、ｃＡＣ１０Ｃ４ｖ３を除く全ての変異体が＞９４％単量体であることが判明した。ｃＡＣ１０Ｃ４ｖ３は非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびサイズ排除分析の両方において不均質であることが分かった。非還元条件下のｃＡＣ１０Ｃ４ｖ３のバンド形成パターンは表３に示すとおり予想された重鎖－重鎖２量体および軽鎖のバンドを含んでいたが、重鎖－軽鎖２量体および重鎖単独も存在しており、遊離の軽鎖システインがＨ２２９位において重鎖システインとジスルフィド結合を形成できたことを示唆している。

【0196】

（抗体薬剤コンジュゲートの製造および分析）

（手順）

（ｉ）抗体薬剤コンジュゲートの製造

ｃＡＣ１０親株およびシステイン変異体の抗体を、プロテインＡクロマトグラフィーを用いて精製し、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。ｃＡＣ１０Ｃ６ｖ１を除く全てのｃＡＣ１０システイン変異体は、３７℃１時間で、０．０２５Ｍホウ酸ナトリウムｐＨ８、０．０２５Ｍ　ＮａＣｌおよび１ｍＭジエチレントリアミン４酢酸（ＤＴＰＡ；Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）中約１００Ｘの抗体より過剰量の１０ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ；Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を用いて還元した。還元された抗体を水で１５０ｍＬに希釈し、７０ｍＬ容のヒドロキシアパタイトカラム（Ｍａｃｒｏｐｒｅｐセラミック Ｉ型４０μｍ、ＢｉｏＲａｄ）に流量１０ｍＬ／分で適用した。カラムは、予め、５カラム容の０．５Ｍリン酸ナトリウムｐＨ７、１０ｍＭ　ＮａＣｌおよび５カラム容の１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７、１０ｍＭ　ＮａＣｌで平衡化させた。適用の後、カラムを５カラム容の１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７、１０ｍＭ　ＮａＣｌで洗浄し、次いで１００ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７、１０ｍＭ　ＮａＣｌで溶出した。還元された抗体を５，５’－ジチオ－ビス－（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ；Ｐｉｅｒｃｅ）で滴定することにより抗体－システインチオールの濃度を測定した。還元された抗体を０℃に冷却し、そしてＤＭＳＯ中マレイミドカプロイル－バリン－シトルリン－ｐ－アミノベンゾイル－ＭＭＡＥ（ｖｃＭＭＡＥ）２．７５等量で処理した。最終ＤＭＳＯ濃度は１０％とすることにより薬剤が完全に溶解するようにした。０℃で４０分の後、過剰なシステインを添加することにより未反応のｖｃＭＭＡＥがあればそれをクエンチングし、混合物を水で２５０ｍＬに希釈した。コンジュゲートは上記した通りヒドロキシアパタイトカラム上で精製した。抗体－薬剤コンジュゲートを濃縮し、１５ｍＬ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｆｒｅｅ３０Ｋカットオフスピン濃縮装置を用いながら緩衝液をＰＢＳに交換した。ｃＡＣ１０Ｃ６ｖ１を限定数の等量のＴＣＥＰ（２－カルボキシエチル）ホスフィン、Ａｃｒｏｓ）で還元し、過剰なＴＣＥＰを除去することなくｖｃＭＭＡＥに以下の通りコンジュゲートした；即ち、Ｃ６ｖ１（２．１ｍｇ／ｍｌまたは１４．３μＭ；７４ｍｇ）３５ｍｌを３７℃で２．５時間１ｍＭＤＴＰＡ含有ＰＢＳ中、ＴＣＥＰ（５７．１μＭ、１００ｍＭ保存溶液より）４．０等

量で処理した。

【0197】

還元の程度はＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を通しながら還元反応物少量を精製し、そしてＤＴＮＢで抗体－システインチオールの数を滴定することにより確認し、Ｃ６ｖ１当たり５．７であることがわかった。還元された抗体を０℃に冷却し、ＤＭＳＯ３．９ｍｌ中のｖｃＭＭＡＥ８．０等量で処理した（抗体チオールの濃度は７３．５μＭであり、ｖｃＭＭＡＥの濃度は１０３．２μＭであった）。０℃１３５分の後、１００ｍＭシステイン０．４ｍｌを添加することにより未反応のｖｃＭＭＡＥがあればそれをクエンチングし、混合物を水で２５０ｍｌに希釈した。コンジュゲートを上記した通りヒドロキシアパタイトカラム上で精製した。ｃＡＣ１０－Ｃ６ｖ１－ｖｃＭＭＡＥ（２．４ｍｇ／ｍｌを２０ｍｌ；４８ｍｇ）（Ｃ６ｖ１－Ｅ６）を濃縮し、１５ｍＬ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｆｒｅｅ３０Ｋカットオフスピン濃縮装置を用いながら緩衝液をＰＢＳに交換した。

【0198】

抗体当たり２つおよび４つのＭＭＡＥ分子を有する親ｃＡＣ１０抗体薬剤コンジュゲート（ＡＣＤ）、即ち、それぞれ、Ｃ８－Ｅ２およびＣ８－Ｅ４の作成は報告されている（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１５　７０６３－７０７０（２００４））。概すれば、方法では、ｍＡｂの部分的還元を行うことによりＡｂ当たり～４の還元Ｃｙｓを曝露させ、その後ｖｃ－ＭＭＡＥとの反応を行う。Ｃ８－Ｅ４－混合物（またはＣ８－Ｅ４Ｍ）と称される部分的に負荷したｃＡＣ１０－Ｖａ１－Ｃｉｔ－ＭＭＡＥを得た。

【0199】

Ｃ８－Ｅ２およびＣ８－Ｅ４は緩衝液Ａ（５０ｍＭリン酸ナトリウム、２Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）５カラム容よりも多くの量で平衡化させたＴｏｙｏｐｅｒａｌフェニル－６５０Ｍ　ＨＩＣ樹脂（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＰＡ）上の分取用ＨＩＣ（疎水性相互作用クロマトグラフィー）分画によりＣ８－Ｅ４Ｍから調製した。カラムに負荷する試料を調製するために、Ｃ８－Ｅ４混合物（１２．９ｍｇ／ｍｌ）３９ｍｌを等容量の緩衝液Ａ’（５０ｍＭリン酸ナトリウム、４Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）と混合した。試料を負荷した後、カラムをA_{280}ベースラインとなるまで緩衝液Ａで洗浄した。６５％緩衝液Ａ／３５％緩衝液Ｂ（８０％ｖ／ｖ５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０、２０％ｖ／ｖアセトニトリル）よりなる段階的勾配を用いながらＣ８－Ｅ２を溶出採取した。再度ベースラインとなった後に、３０％緩衝液Ａ／７０％緩衝液Ｂよりなる段階的勾配を用いてＣ８－Ｅ４を溶出採取した。Ｃ８－Ｅ２およびＣ８－Ｅ４のピークは共にそれぞれのピーク高さの～２０％となるまで採取した。３０ｋＤａの分子量カットオフのＵｌｔｒａｆｒｅｅ－１５遠心分離フィルター装置（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）を用いて、目的画分をＰＢＳに緩衝液交換した。

【0200】

（ｉｉ）薬剤負荷の分析

薬剤負荷は２５０および２８０ｍｍの吸光度の比（Ａ２５０／２８０）を測定することにより調べた。ｃＡＣ１０当たりのｖｃＭＭＡＥの数は実験的に（Ａ２５０／Ａ２８０－０．３６）／０．０６８６であることがわかっている。ＡＤＣは流量１ｍＬ／分およびカラム温度３０℃においてＴｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　エーテル－５ＰＷカラム（パート０８６４１）を用いながら疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）により分析した。溶媒Ａは５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７および２．５Ｍ　ＮａＣｌとした。溶媒Ｂは８０％５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７、１０％２－プロパノールおよび１０％アセトニトリルとした。１５分間０％Ｂ一定、５０分０～１００％Ｂの直線勾配、０．１分１００～０％Ｂの直線勾配、そして１４．９分０％Ｂ一定とした。注入（典型的には９０～１００μＬ）は１容のＡＤＣ（濃度は少なくとも３ｍｇ／ｍｌ）および１容の５Ｍ　ＮａＣｌとした。

【0201】
ＨＩＣクロマトグラフィーのＡＤＣをＡｇｉｌｅｎｔ　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを用いて分析した。タンパク質２００チップは製造元の説明に従って変性非還元条件下に使用した。概すれば１ｍｇ／ｍｌ　ＡＤＣ　４μＬを非還元ローディング緩衝液２μＬと混合し、５分間１００℃に加熱した。水（８４μＬ）を添加し、この混合物６μＬをチップの各ウェルに負荷した。
【0202】
ＡＤＣをＰＬＲＰ－Ｓカラム（Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　ｐａｒｔ　１９１２－１８０２：１０００Ａ，８ｕ，２．１×５０ｍｍ）上で分析した。流量は１ｍｌ／ｍｌとし、カラム温度は８０℃とした。溶媒Ａは水中０．０５％トリフルオロ酢酸、溶媒Ｂはアセトニトリル中０．０４％トリフルオロ酢酸とした。３分間２５％Ｂ一定、１５分５０％Ｂまで直線勾配、２分間９５％Ｂまで直線勾配、１分間２５％Ｂまで直線勾配、そして２分間２５％Ｂ一定とした。注入は残存鎖間ジスルフィドを切断するために１５分間３７℃において２０ｍＭ　ＤＴＴで予め還元しておいた１ｍｇ／ｍｌ　ＡＤＣ１０～２０μＬとした。
【0203】
（結果）
ｃＡＣ１０システイン変異体のＭＭＡＥコンジュゲートを抗体の還元およびその後のｖｃＭＭＡＥによるアルキル化により作成した。２８０ｎｍの吸光度におけるＵＶ－ＶＩＳ分析およびＰＬＲＰクロマトグラフィーの両方による各コンジュゲートｃＡＣ１０システイン変異体の分析によれば、表４に示す通り、予想された薬剤負荷に近似する水準が達成されていた。
【0204】
【表4】

表４
ｃＡＣ１０システイン変異体ｖｃＭＭＡＥコンジュゲートの分析のまとめ

cAC10 変異体	濃度 (mg/ml)	容量 (ml)	合計 (mg)	DTNB RSH/Ab	PLRP 薬剤_/ab	% 単量体	遊離薬剤
C2v1-E2	41	2.3	94.3	2.3	2.1	98.0%	<0.05%
C2v2-E2	5.6	0.6	3.4	2.3	2.0	99.4%	<0.05%
C4v1-E4	12.0	3.8	45.6	4.2	3.7	99.1%	<0.05%
C4v2-E4	12.4	4.0	49.6	4.0	3.5	98.7%	<0.05%
C4v3-E4	0.8	0.4	0.3	7.2	3.7	99%	<0.05%
C6v1-E6	12.5	3.3	40.6	5.7	5.7	98.7%	<0.05%

サイズ排除クロマトグラフィーによる分析によれば、表４に示すとおり全てのコンジュゲートが９８％単量体かそれ以上よりなるものであった。この試験において記載した対照分子は親ｃＡＣ１０がＭＭＡＥ２分子（Ｃ８－Ｅ２）またはＭＭＡＥ４分子（Ｃ８－Ｅ４）のいずれかとコンジュゲートしたものとした。これらの２剤および４剤負荷ＭＭＡＥコンジュゲートは親ｃＡＣ１０抗体の部分的還元により作成し、Ｈａｍｂｌｅｔｔら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１５：７０６３－７０７０（２００４）において前述の通り分析した。
【0205】
（ｃＡＣシステイン変異体コンジュゲートのインビトロの細胞傷害性）
（手順）
ｃＡＣ１０システイン変異体コンジュゲートを投与したＣＤ３０＋Ｋａｒｐａｓ２９９細胞の増殖阻害はＤＮＡ合成を測定することにより調べた。コンジュゲートを９２時間細胞と共にインキュベートし、その後３７℃で４時間、［３Ｈ］－チミジン、０．５μＣｉ／ウェルで標識した。細胞をフィルター上に採取し、シンチレーション液と混合し、Ｔｏｐｃｏｕｎｔシンチレーションカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，

Ｍｅｒｉｄｅｎ，ＣＴ）を用いて放射能を測定した。未投与の対照と相対比較した場合の取り込まれた放射能のパーセントをコンジュゲート濃度に対してプロットし、データをＰｒｉｓｍ４ソフトウエア（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｉｎｃ．Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いてシグモイド型の用量応答曲線にフィットさせた。あるいは、コンジュゲートとの９２時間インキュベーション時間の後に５０μＭレサズリンをＫａｒｐａｓ２９９細胞に添加した。４時間のインキュベーション期間の後、染料の還元をＦｕｓｉｏｎＨＴ蛍光プレートリーダー（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｃｍｅｎｔ，Ｍｅｒｉｄｅｎ，ＣＴ）を用いて測定した。

【0206】

（結果）

ＡＣ１０システイン変異体Ｃ２ｖ１、Ｃ４ｖ１、Ｃ４ｖ２およびＣ６ｖ１のＭＭＡＥコンジュゲート（それぞれＣ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４およびＣ６ｖ１－Ｅ６）の細胞傷害性をＣＤ３０＋Ｋａｒｐａｓ２９９細胞における［^{3}Ｈ］－チミジン取り込み試験を用いて調べた。使用した対照コンジュゲートは、完全負荷親ｃＡＣ１０ＭＭＡＥコンジュゲート（Ｃ８－Ｅ８）（最も強力）と２剤負荷コンジュゲート（Ｃ８－Ｅ２）との間に位置する力価を有することがわかっている４剤負荷親ｃＡＣ１０（Ｃ８－Ｅ４）とした。図２Ａに示す通り、Ｃ６ｖ１－Ｅ６は０．０１２ｎＭの最低IC_{50}値を有していたのに対し、４剤負荷システイン変異体Ｃ４ｖ１－Ｅ４およびＣ４ｖ２－Ｅ４および４剤負荷親ｃＡＣ１０コンジュゲートＣ８－Ｅ４はそれぞれ０．０２０ｎＭ、０．０２７ｎＭおよび０．０１８ｎＭの極めて同様のIC_{50}を有していた。図２Ｂに示す通り、Ｃ２ｖ１－Ｅ２ＭＭＡＥコンジュゲートは０．０２９ｎＭのIC_{50}を有していた。次に、Ｋａｒｐａｓ２９９細胞におけるＣ２ｖ１－Ｅ２およびＣ２ｖ２－Ｅ２ＭＭＡＥ薬剤コンジュゲートの両方のインビトロ細胞傷害性活性を評価した。細胞傷害性はコンジュゲートへの９２時間連続曝露の後の培養物に導入されたレサズリン染料の還元により評価した。抗体当たり２ＭＭＡＥ薬剤分子（Ｃ８－Ｅ２）にコンジュゲートしたｃＡＣ１０を対照として使用した。Ｃ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ２ｖ２－Ｅ２およびＣ８－Ｅ２でそれぞれ５２．４ｎｇ／ｍｌ、３９．８ｎｇ／ｍｌおよび３９．８ｎｇ／ｍｌと、３コンジュゲート全てが同様のIC_{50}値を有していた。これらのデータは、システイン変異体コンジュゲートが、部分還元により親ｃＡＣ１０抗体から作成した部分負荷ＭＭＡＥコンジュゲートに対して、活性において近似匹敵するものであることを示している。

【0207】

（ヒトＡＬＣＬの異種移植片モデルを用いたインビボのｃＡＣ１０システイン変異体コンジュゲートの抗腫瘍活性）

（手順）

皮下疾患モデルを樹立するために、ＡＬＣＬ　５×10^{6}Ｋａｒｐａｓ－２９９細胞をＣ．Ｂ－１７ＳＣＩＤマウス（Ｈａｒｌａｎ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）の右体側に移植した。ＡＤＣによる治療は６～１０匹の各群における腫瘍サイズが平均１００mm^{3}となった時点で開始した。投与は単回注射とした。腫瘍体積は式（長さ×幅^{2}）／２を用いて計算した。触診できない程度に縮小した腫瘍は完全な退行（ＣＲ）と定義した。腫瘍移植後１００日を越えて持続した完全な退行は治癒と定義した。腫瘍体積が約１０００mm^{3}に達した時、動物を安楽死させた。

【0208】

（結果）

ｃＡＣ１０システイン変異体薬剤コンジュゲートの薬効をＳＣＩＤマウスにおけるＡＬＣＬの皮下異種移植片モデルにおいて評価した。Ｋａｒｐａｓ２９９細胞をＳＣＩＤマウスの体側に移植し、１００mm^{3}の平均体積となるまで腫瘍を増殖させた。腫瘍担持マウスは無作為に８～１０匹の群に分割し、未投与のまま、または、ｃＡＣ１０システイン変異体ＭＭＡＥコンジュゲートＣ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ４ｖ１－Ｅ４またはＣ４ｖ２－Ｅ２または部分ＭＭＡＥ負荷親ｃＡＣ１０コンジュゲートＣ８－Ｅ２およびＣ８－Ｅ４を単回用量試験において投与した。ＡＤＣ用量は群当たり等しい濃度のＭＭＡＥが注射されるように

正規化し、Ｃ８－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４およびｃ４ｖ１－Ｅ４ではそれぞれ１ｍｇ／ｋｇ、１．１４ｍｇ／ｋｇおよび１．０５ｍｇ／ｋｇを注射し、そして、Ｃ８－Ｅ２およびＣ２ｖ１－Ｅ２ではそれぞれ２ｍｇ／ｋｇおよび１．９ｍｇ／ｋｇとした。図３Ａに示す通り、Ｃ２ｖ１－Ｅ２はＣ８－Ｅ２と同様の抗腫瘍活性を示し、Ｃ８－Ｅ２を投与した全動物およびＣ２ｖ１－Ｅ２を投与した８匹中６匹では完全な腫瘍退行が観察された。図３Ｂに示す通り、Ｃ４ｖ１－Ｅ４およびＣ４ｖ２－Ｅ４はＣ８－Ｅ４と同様の抗腫瘍活性を示した。完全な退行はＣ８－Ｅ４およびＣ４ｖ２－Ｅ４の１０匹中８匹およびＣ４ｖ１－Ｅ４の１０匹中６匹で観察された。

【0209】

総括すれば、システイン変異体から形成した２および４薬剤負荷ＡＤＣは、部分還元法により作成したＣ８－Ｅ４およびＣ８－Ｅ２コンジュゲートと同様のインビボ活性を有していた。

【0210】

（実施例２）

（抗体コンジュゲートの製造および分析）

（手順）

実施例１に記載の通り製造したｃＡＣ１０の親および変異体抗体を、プロテインＡ、次にＡＥＫＴＡｅｘｐｌｏｒｅｒ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いたアニオン交換クロマトグラフィーにより精製した。慨すれば、抗体を含有するコンディショニングされた培地を約１０倍に濃縮し、旋回流沪過（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）によりＰＢＳｐＨ７．４に緩衝液交換した。内毒素除去のために４℃で一夜穏やかに撹拌しながら０．５％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）で濃縮した試料を処理した後に、ＰＢＳｐＨ７．４で予備平衡化したプロテインＡ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上に負荷した。ＰＢＳ、ｐＨ７．４、２～３カラム容（ＣＶ）の０．５％ｖ／ｖＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、ＰＢＳ、ｐＨ７．４中１ＭＮａＣｌ、次にＰＢＳ　ｐＨ７．４で安定なベースラインに達するまでカラムを洗浄した。結合した抗体は３０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ３．６でプロテインＡから溶出させ、次に２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ　ｐＨ８．０（緩衝液Ａ）で透析した。合わせた抗体は次に緩衝液Ａで予備平衡化させたＱセファロース（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に負荷し、２～３ＣＶの緩衝液Ａ、インキュベートしながら５～１０ＣＶの０．５％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００含有緩衝液Ａ、そして、５ＣＶの緩衝液Ａで洗浄した。段階的または直線的なＮａＣｌ勾配（緩衝液Ａ中１０～５００ｍＭ　ＮａＣｌ）によりＱセファロースから抗体を溶出させ、ＰＢＳ、ｐＨ７．４で透析した。精製した抗体をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＴＳＫ－Ｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷ　ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｍｏｎｔｏｇｏｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＰＡ）により分析した。

【0211】

ｃＡＣ１０Ｃｙｓ→Ｓｅｒ抗体変異体のＭＭＡＥ分子２等量（Ｃ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ２ｖ２－Ｅ２）または４等量（Ｃ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４およびＣ４ｖ３－Ｅ４）とのコンジュゲーションでは、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（Ａｃｒｏｓ　Ｏｒｇａｎｉｃｓ，Ｇｅｅｌ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）の数（２．５～４）等量による還元、および過剰なトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンを除去することのないマレイミドカプロイル－バリン－シトルリン－ｐ－アミノベンゾイル－ＭＭＡＥ（ｖｃＭＭＡＥ）へのコンジュゲーション（Ｄｏｒｏｎｉｎａら、前出）を行った。薬剤添加の前に、ＰＤ－１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を通して還元反応物少量を精製し、そして５，５’－ジチオ－ビス－（２－ニトロ安息香酸）で抗体システインチオールの数を滴定することにより還元の程度を評価した（Ｅｌｌｍａｎ，Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．７４：４４３－４５０（１９５８））。還元した抗体を０℃で６０分間ｖｃＭＭＡＥと反応させ、次に過剰なＮ－アセチルシステイン（Ａｃｒｏｓ　Ｏｒｇａｎｉｃｓ）を添加することにより未反応のマレイミドカプロイル－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＭＭＡＥがある

場合はそれをクエンチングした。次に反応混合物を水で５倍希釈し、そして、１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．０、１０ｍＭ　ＮａＣｌで平衡化されているヒドロキシアパタイトカラム上に負荷した。カラムを５ＣＶの同緩衝液で洗浄し、コンジュゲートを１００ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．０、１０ｍＭ　ＮａＣｌで溶出した。コンジュゲートを濃縮し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｆｒｅｅ遠心分離フィルター装置（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いてＰＢＳに緩衝液交換した。

【0212】

抗体当たり４薬剤（範囲０～８薬剤）、即ちＣ８－Ｅ４混合物（Ｃ８－Ｅ４Ｍ）および抗体当たり２薬剤、即ちＣ８－Ｅ２Ｍの平均化学量論の親ｃＡＣ１０コンジュゲートの形成が報告されている（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、前出）（Ｓｕｎら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．１６：１２８２－１２９０（２００５））。Ｃ８－Ｅ２Ｍを疎水性相互作用クロマトグラフィーに付して抗体当たり４（Ｃ８－Ｅ４）および２（Ｃ８－Ｅ２）ＭＭＡＥ分子を負荷されているコンジュゲートを前述の通り単離した（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、前出）。

【0213】

２４８ｎｍおよび２８０ｎｍの波長におけるモル消衰係数を抗体（それぞれ９．４１×10^4および２．３４×10^5 $M^{-1}cm^{-1}$）および薬剤（それぞれ１．５０×10^3および１．５９×10^4 $M^{-1}cm^{-1}$）について使用しながら薬剤負荷の化学量論を調べるために前述の通り（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、前出）ＡＤＣを分析した。抗体重鎖および軽鎖への薬剤結合の位置は、ＰＬＲＰ－Ｓカラム（Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｍｈｅｒｓｔ，ＭＡ；＃１９１２－１８０２；１０００Å、８μｍ、２．１×１５０ｍｍ）および溶媒Ａ（水中０．０５％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸）および溶媒Ｂ（アセトニトリル中０．０４％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸）を用いた逆相ＨＰＬＣにより調べた。泳動条件（１ｍｌ／分、８０℃）は、２５％溶媒Ｂ一定（３分）、５０％溶媒Ｂまで直線勾配（２５分）、９５％溶媒Ｂまで直線勾配（２分）、２５％溶媒Ｂまで直線勾配（１分）および２５％溶媒Ｂ一定を２分間とした。クロマトグラフィーの前にＡＤＣ試料（１０～２０μｌ、１ｍｇ／ｍｌ）を１５分間３７℃で２０ｍＭ　ＤＴＴで還元し、残存する鎖間ジスルフィド結合を切断した。

【0214】

（結果）

ｃＡＣ１０親抗体（Ｃ８）を部分的に還元して抗体当たり平均２または４個のスルフィドリル基とし、次にｖｃＭＭＡＥと反応させた。相当するコンジュゲート産物Ｃ８－Ｅ２ＭおよびＣ８－Ｅ４Ｍはそれぞれ ＭＭＡＥの２および４等量の平均負荷を有している。Ｃ８－Ｅ２ＭおよびＣ８－Ｅ４Ｍは抗体当たり０、２、４、６または８等量のＭＭＡＥを負荷された物質種の混合物である（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、前出）。ＭＭＡＥの２等量（Ｃ８－Ｅ２）または４等量（Ｃ８－Ｅ４）の何れかの均一な化学量論を有するコンジュゲートを前述の通り疎水性相互作用クロマトグラフィーによりＣ８－Ｅ２Ｍ混合物から精製した（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、前出）。操作された抗体変異体のＭＭＡＥコンジュゲートは抗体の還元とその後のｖｃＭＭＡＥとの反応により作製した。

【0215】

各ＡＤＣにつき、スペクトル分析（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、前出）および逆相ＨＰＬＣ分析（Ｓｕｎら、前出）による観察された薬剤負荷化学量論は予想されたものと緊密に合致していた。サイズ排除クロマトグラフィー後のピーク面積分析によれば、全てのＡＤＣが≧９８％単量体であることが示唆された（Ｄｏｒｏｎｉｎａら、前出）。Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異体コンジュゲートの収率（８９～９６％）はＣ８－Ｅ２Ｍから精製したコンジュゲートＣ８－Ｅ４（１１％）およびＣ８－Ｅ２（２７％）と比較して大きく向上していた。還元条件下におけるＡＤＣのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によれば、他のＡＤＣにおける未コンジュゲートの軽鎖と比較した場合のＣ２ｖ２－Ｅ２、Ｃ８－Ｅ２、Ｃ４ｖ２－Ｅ４、Ｃ８－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４Ｍにおける ＭＭＡＥコンジュゲート軽鎖の予想された低下した運動性が示されていた。コンジュゲートした重鎖の低下した運動性は、顕著度は低値であった

が、Ｃ８－Ｅ２およびＣ８－Ｅ４Ｍにおけるコンジュゲートした重鎖の負均一性は顕著であった（図１Ｃ）。

【0216】

還元条件下における逆相ＨＰＬＣを用いてＡＤＣの負均一性を評価した。この方法はＭＭＡＥ０または１等量を負荷された軽鎖（それぞれＬ－Ｅ０およびＬ－Ｅ１）ならびにＭＭＡＥ０、１、２または３等量を負荷された重鎖（それぞれＨ－Ｅ０、Ｈ－Ｅ１、Ｈ－Ｅ２およびＨ－Ｅ３）を分解する。Ｃ８－Ｅ４Ｍ（図６Ａ）は全ての６つの可能な物質種を含有する最も不均質なコンジュゲートである。Ｃ８－Ｅ４を形成するためのＣ８－Ｅ４Ｍの精製は不均質性を以下の４物質種：Ｌ－Ｅ０、Ｌ－Ｅ１、Ｈ－Ｅ１およびＨ－Ｅ２まで低減する（図６Ｂ）。ｃＡＣ１０Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異体の均質性は、それぞれＣ４ｖ１－Ｅ４（図６Ｃ）およびＣ４ｖ２－Ｅ４（図６Ｄ）について予想された単一の軽鎖および重鎖のピーク、Ｌ－Ｅ０＋Ｈ－Ｅ２およびＬ－Ｅ１＋Ｈ－Ｅ１の存在により実証される。

【0217】

（ｃＡＣ１０変異体および薬剤のコンジュゲートのインビトロの特徴付け）

（手順）

ＣＤ３０陽性ＡＬＣＬ系統Ｋａｒｐａｓ－２９９およびＣＤ３０陰性ＷＳＵ－ＮＨＬをＤｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ（Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）より入手した。Ｌ５４０ｃｙ、即ち異種移植片増殖に適合されたＨＤ系統Ｌ５４０の誘導体はＤｒ．Ｈａｒａｌｄ Ｓｔｅｉｎ（Ｉｎｓｔｉｔｕｅｔ ｆｕｅｒ Ｐａｔｈｏｌｏｇｉｅ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｖｅｉｎｉｋｕｍ Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｆｒａｎｋｌｉｎ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）により開発された。細胞系統は１０％ウシ胎児血清を添加したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）中で増殖させた。

【0218】

ｃＡＣ１０変異体およびその相当するＡＤＣの競合結合を行うことにより抗原結合に対する変異および薬剤コンジュゲーションの影響を調べた。慨すれば、ＣＤ３０陽性Ｋａｒｐａｓ－２９９細胞を、氷上で３０分間、染色培地（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌｐＨ８．０、０．９％ＮａＣｌ（ｗ／ｖ）、０．５％ウシ血清アルブミン（ｗ／ｖ）、１０μＭ ＥＤＴＡ）中ユーロピウム（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）で標識した１μｇ／ｍｌ ｃＡＣ１０の存在下、ｃＡＣ１０の親抗体、変異体または相当するＡＤＣ（実施例１に記載の通り製造）の連続希釈物と混合し、次に氷冷染色培地で２回洗浄した。標識された細胞はＦｕｓｉｏｎ ＨＴマイクロプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）を用いて検出した。試料のデータはベースライン補正し、１μｇ／ｍｌ ｃＡＣ１０－ユーロピウム単独で染色した細胞の蛍光で割った試料蛍光により計算した最大蛍光のパーセントとして報告した。

【0219】

ｃＡＣ１０Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異体コンジュゲートを投与したＣＤ３０陽性Ｋａｒｐａｓ２９９またはＬ５４０ｃｙ細胞またはＣＤ３０陰性ＷＳＵ－ＮＨＬ細胞の増殖阻害は、コンジュゲートを細胞と共に９２時間インキュベートし、その後、３７℃４時間５０μＭレサズリンと共にインキュベートすることにより調べた。染料の還元はＦｕｓｉｏｎ ＨＴマイクロプレートリーダーを用いて測定した。データはＰｒｉｓｍ ｖ４．０１（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて非最小自乗４パラメーターフィットにより分析した。

【0220】

（結果）

競合結合実験によれば、Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異（表１）およびＭＭＡＥコンジュゲーション（表５）の何れも抗原結合を損なわなかった。次に、ｃＡＣ１０Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異体コンジュゲートの細胞傷害性をＣＤ３０陽性（Ｋａｒｐａｓ－２９９およびＬ５４０ｃｙ）および陰性（ＷＳＵ－ＮＨＬ）細胞系統において評価した。Ｃ２ｖ１－Ｅ２およびＣ２

ｖ２－Ｅ２コンジュゲートは両方のＣＤ３０陽性細胞系統に対してＣ２－Ｅ２と極めて同様の力価を有していた（表５）。同様に、Ｃ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４、Ｃ８－Ｅ４ＭおよびＣ８－Ｅ４は試験した両方のＣＤ３０陽性細胞系統に対して同様の活性を示した（表５）。即ち、薬剤結合の化学量論の部位を厳密に定義することはコンジュゲートの細胞傷害性活性に有意な影響を与えなかった。２から４ＭＭＡＥ／Ａｂに薬剤負荷量を増大させたところ、以前の観察（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、前出）と合致して力価が増大した（$ＩＣ_{５０}$の低下）。ＣＤ３０陰性ＷＳＵ－ＮＨＬ細胞は全てのｃＡＣ１０ＡＤＣに対して無反応であった。

【0221】

【表5】

表５
抗体薬剤コンジュゲートの生成および特徴付け

cAC10薬剤コンジュゲート*	コンジュゲート収率%†	IgG当たりの薬剤: 方法1‡ 方法2‡	単量体%§	Karpas-299への総合結合 (IC_{50}, nM)	Karpas-299細胞傷害性 (IC_{50}, nM)	L540cy細胞傷害性 (IC_{50}, nM)	単回用量 MTD (mg/kg)
C2v1-E2	92.7	2.0, 1.9	98.4	2.9 ± 0.3	0.26 ± 0.12	0.28 ± 0.03	40
C2v2-E2	88.9	2.1, 1.8	98.5	2.5 ± 0.1 #	0.46 ± 0.30	0.27 ± 0.02	60
C8-E2	27.4‖	2.0, 2.0	99.7	2.8 ± 0.2	0.32 ± 0.21	0.28 ± 0.02	40
C8-E2M	97.3	2.0, 2.0	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
C4v1-E4	90.6	4.0, 3.8	99.2	3.2 ± 0.1	0.07 ± 0.02	0.13 ± 0.01	20
C4v2-E4	96.0	4.1, 3.8	99.0	2.8 ± 0.2	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.01	＜20
C8-E4	10.8‖	4.0, 4.0	99.5	2.4 ± 0.3	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.04	20
C8-E4M	95	4.4, 4.4	98.8	3.0 ± 0.4	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.02	＜20

全ＡＤＣ調製物中の遊離の薬剤は検出限界未満であった（＜０．０５％）。
＊ＡＤＣはそのｃＡＣ１０変異体名（表１参照）薬剤ＭＭＡＥの負荷量、および薬剤の化学量論が可変（Ｍ）であるか固定されているかにより識別される。例えば、Ｃ８－Ｅ２Ｍはそれぞれ、ＩｇＧ当たり平均４（０～８の範囲）および２（０～８の範囲）等量のＭＭＡＥを負荷された親抗体ｃＡＣ１０を示す。固定された化学量論のＡＤＣであるＣ８－Ｅ４およびＣ８－Ｅ２は疎水性相互作用クロマトグラフィーによる可変化学量論のＡＤＣであるＣ８－Ｅ２Ｍの精製により得られた。
†精製された抗体のパーセントとして得られたコンジュゲートの収率。
‡方法１および方法２とは、波長２４８ｎｍおよび２８０ｎｍでの吸光度の比（Ｈａｍｂｌｅｔｔら、２００４）ならびに還元条件下の逆相ＨＰＬＣ分析（図６）を指す。
§サイズ排除クロマトグラフィーにおけるピーク面積から推定。
‖出発ｃＡＣ１０タンパク質を基準とした、疎水性相互作用クロマトグラフィー後の収率パーセント。
＃３以上の独立した実験の平均（±ＳＥＭ）。

（インビボのＣｙｓ→Ｓｅｒ変異体コンジュゲートの抗腫瘍活性）
（異種移植片モデル）
５×１０^{６}Ｋａｒｐａｓ－２９９またはＬ５４０ｃｙ細胞をＣ．Ｂ－１７ＳＣＩＤマウ

ス（Ｈａｒｌａｎ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）の右体側に移植することにより、それぞれ未分化大細胞型リンパ腫またはホジキン病の皮下疾患モデルを樹立した。腫瘍体積は式（Ａ×Ｂ^2）／２で計算し、ここでＡおよびＢはそれぞれ最も大きい、および次に大きい直行腫瘍寸法とした。平均腫瘍体積が１００ｍｍ^{3}となったとき、腫瘍担持マウスを無作為に８～１０匹の群に分割した。マウスの群は未投与のままとするか、ＡＤＣの単回静脈内投与を行った。Ｌ５４０ｃｙ異種移植片試験の場合は、使用した用量は２剤／Ａｂコンジュゲートの場合は６．０および１２．０ｍｇ／ｋｇ、そして４剤／Ａｂコンジュゲートの場合は３．０および６．０ｍｇ／ｋｇとした。Ｋａｒｐａｓ２９９異種移植片モデルの場合は、使用した用量は２剤／Ａｂコンジュゲートの場合は０．５、１．０および２．０ｍｇ／ｋｇ、そして４剤／Ａｂコンジュゲートの場合は０．５および１．０ｍｇ／ｋｇとした。触診できない程度に縮小した腫瘍は完全な退行と定義した。腫瘍移植後１００日を越えて持続した完全な退行は「治癒」と定義した。腫瘍体積が～１０００ｍｍ^{3}に達したとき、動物を安楽死させた。

【0222】

（結果）

ｃＡＣ１０Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異体薬剤コンジュゲート、Ｃ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ２ｖ２－Ｅ２、Ｃ４ｖ１－Ｅ４およびＣ４ｖ２－Ｅ４の薬効を、ＳＣＩＤマウスにおいて、未分化大細胞型リンパ腫（Ｋａｒｐａｓ－２９９）またはホジキン病（Ｌ５４０ｃｙ）の皮下異種移植片モデルにおいて親抗体Ｃ８－Ｅ２、Ｃ８－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４Ｍのコンジュゲートと比較した。慨すれば、１００ｍｍ^{3}のＬ５４０ｃｙ腫瘍（平均の大きさ）を担持したマウスには単回、２剤／Ａｂコンジュゲート（６．０または１２．０ｍｇ／ｋｇ）または４剤／Ａｂコンジュゲート（３．０または６．０ｍｇ／ｋｇ）または未投与のままとした。Ｃ２ｖ１－Ｅ２およびＣ２ｖ２－Ｅ２の投与への応答は同等であり、６．０および１２．０ｍｇ／ｋｇ用量の両方において完全な退行が誘導された（図７Ａ、７Ｂ）。Ｃ８－Ｅ２はＣ２ｖ１－Ｅ２およびＣ２ｖ２－Ｅ２よりも僅かに高力価であり、両方の用量水準で治癒が達成された（図３Ａ、Ｂ）。２剤負荷コンジュゲートの単回用量を投与されたＫａｒｐａｓ２９９異種移植片モデルは同様の応答の傾向を示し、Ｃ２ｖ１－Ｅ２およびＣ２ｖ２－Ｅ２で１０匹中３匹の完全な退行およびＣ８－Ｅ２で１０匹中８匹の完全な退行が１ｍｇ／ｋｇの用量で達成された（データ示さず）。Ｃ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４、Ｃ８－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４ＭのＬ５４０ｃｙ異種移植片モデルへの投与は同等の応答をもたらし、各ＡＤＣについて３および６ｍｇ／ｋｇの両方において治癒が達成された（図７Ｃ、Ｄ）。０．５および１ｍｇ／ｋｇにおける４剤負荷変異体のＫａｒｐａｓ２９９モデルへの投与もまた分子間の差を示さなかった（データを示さず）。

【0223】

（最大耐容用量の決定および分析）

各ＡＤＣの単回用量耐容性をＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおいて決定した（Ｈａｒｌａｎ，ＩＮ）。３匹のラットの群に４０～８０ｍｇ／ｋｇのＣ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ２ｖ２－Ｅ２およびＣ８－Ｅ２ならびに２０～４０ｍｇ／ｋｇのＣ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４、Ｃ８－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４Ｍを尾静脈を介して注射し、単回最大耐容用量（ＭＴＤ）を決定した。ラットは１４日間に渡り毎日モニタリングし、体重および臨床観察結果の両方を記録した。窮迫の顕著な兆候を発症したラットは安楽死させた。最大耐容用量は、＞２０％の体重減少または重度の窮迫兆候を何れの動物にも誘導しなかった最高用量として定義した。

【0224】

２剤負荷コンジュゲートについては、ラットには４０、６０および８０ｍｇ／ｋｇを投与した。４０ｍｇ／ｋｇ用量は十分耐容性を示したのに対し、６０ｍｇ／ｋｇ用量はＣ２ｖ２－Ｅ２を投与したラットによってのみ十分な耐容性が示された。Ｃ２ｖ１－Ｅ２の６０ｍｇ／ｋｇを注射した一匹は第７日に屠殺し、残余の２匹は第８日に最大体重減少６％を示したがその後は体重減少は回復した。Ｃ８－Ｅ２の６０ｍｇ／ｋｇを投与した一匹は１１％の体重減少を示し、第１１日に死亡していた。各２負荷ＡＤＣの８０ｍｇ／ｋｇ用

量には十分な耐容性が示されなかった。これらのデータに基づけば、Ｃ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ２ｖ２－Ｅ２およびＣ８－Ｅ２のＭＴＤはそれぞれ４０、６０および４０ｍｇ／ｋｇであることが分かった。４剤負荷ＡＤＣは各々２０、３０および４０ｍｇ／ｋｇで投与した。Ｃ４ｖ１－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４の２０ｍｇ／ｋｇを注射した動物は副作用を経験しなかったのに対し、Ｃ４ｖ２－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４Ｍの２０ｍｇ／ｋｇを投与された群の数匹は窮迫の兆候を示し、各群の一匹は第９日に屠殺した。各４剤負荷ＡＤＣの３０および４０ｍｇ／ｋｇの高用量は耐容性が示されなかった。Ｃ４ｖ１－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４のＭＴＤは２０ｍｇ／ｋｇであることがわかり、Ｃ４ｖ２－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４ＭのＭＴＤは＜２０ｍｇ／ｋｇであることがわかった。

【0225】

本明細書において言及または組み込んだ如何なる特許または特許出願も明確または絶対的に許可を付与されたわけではない。上記した考察は説明、解説および例示であり、添付の特許請求の範囲により定義される範囲を限定するものではない。

【0226】

特許出願、特許および学術文献を含む種々の参考文献を本明細書において引用したが、それらの各々の開示は参照により全体が本明細書に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0227】

【図1】図１は抗体Ｃｙｓ→Ｓｅｒ変異体および相当する抗体薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）の設計および分析を示す。（Ａ）接触可能なシステインの位置（ひし形）、鎖間ジスルフィド結合（－）および後にコンジュゲートされる薬剤（＋）を明示した抗体変異体ならびに薬剤のコンジュゲートの模式図。抗体およびＡＤＣはその変異体名称（表１参照）、および薬剤ＭＭＡＥの負荷の化学量論により識別される。例えばＣ８－Ｅ８はｃＡＣ１０親抗体（Ｃ８）中の全て８つの溶媒接触可能な鎖間システイン残基がＭＭＡＥ（Ｅ８）にコンジュゲートしているＡＤＣを示す。（Ｂ）非還元条件下の抗体変異体のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析。ＨＨＬＬ、ＨＨ、ＨＬ、ＨおよびＬはそれぞれ抗体重鎖－軽鎖４量体、重鎖２量体、重鎖軽鎖２量体、重鎖および軽鎖に関する移行パターンを示す。（ｃ）還元条件下のＭＭＡＥを有する抗体変異体コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析。

【図2】図２はＭＣ－ｖｃＭＭＡＥにコンジュゲートした抗体システイン変異体および親ｃＡＣ１０抗体を用いた成育増殖試験の滴定プロファイルを示す。（Ａ）ｃＡＣ１０ＡＤＣのＣ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４、Ｃ６ｖ１－Ｅ６およびＣ８－Ｅ４の連続する希釈物をＫａｒｐａｓ－２９９細胞と共に９６時間インキュベートした。次に［Ｈ^{3}］－ＴｄＲを添加し、その取り込みを測定した。（Ｂ）Ｋａｒｐａｓ－２９９細胞はｃＡＣ１０ＡＤＣのＣ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ２ｖ２－Ｅ２およびＣ８－Ｅ２と共に９６時間インキュベートした。次にレサズリンを添加して染料還元を測定した。

【図3】図３はＭＣ－ｖｃＭＭＡＥにコンジュゲートした抗体システイン変異体および親ｃＡＣ１０抗体を投与したＫａｒｐａｓ－２９９皮下異種移植片を担持するＳＣＩＤマウスにおける単回用量薬効試験を示す。マウスには２ｍｇ／ｋｇのＣ２ｖ１－Ｅ２およびＣ８－Ｅ２（Ａ）ならびに１ｍｇ／ｋｇのＣ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４（Ｂ）の単回用量を投与した。

【図4】図４はプラスミドマップｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｈである。

【図5】図５はプラスミドマップｐＢＳＳＫ　ＡＣ１０Ｌである。

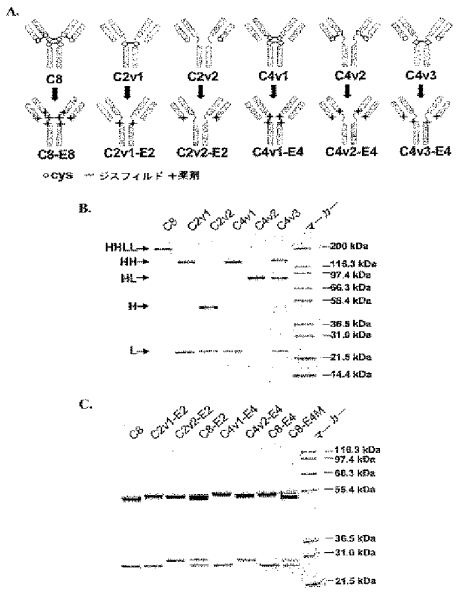
【図6】図６は還元条件下のＡＤＣの逆相ＨＰＬＣ分析を示す。（Ａ）Ｃ８－Ｅ４Ｍ。（Ｂ）Ｃ８－Ｅ４。（Ｃ）Ｃ４ｖ１－Ｅ４。（Ｄ）Ｃ４ｖ２－Ｅ４（表１参照）。ピークは２４８ｎｍおよび２８０ｎｍの波長におけるその吸収の比により識別した。Ｌ－Ｅ０およびＬ－Ｅ１はそれぞれＭＭＡＥの０または１等量を負荷した軽鎖を示すために使用し、Ｈ－Ｅ０、Ｈ－Ｅ１、Ｈ－Ｅ２およびＨ－Ｅ３はそれぞれＭＭＡＥの０、１、２または３等量を負荷した重鎖を示すために使用した。

【図7】図７はＬ５４０ｃｙ皮下異種移植片を担持するＳＣＩＤマウスにおける単回用量薬効試験を示す。マウスには腫瘍移植の１２日後に単回用量のＣ２ｖ１－Ｅ２、Ｃ２ｖ２

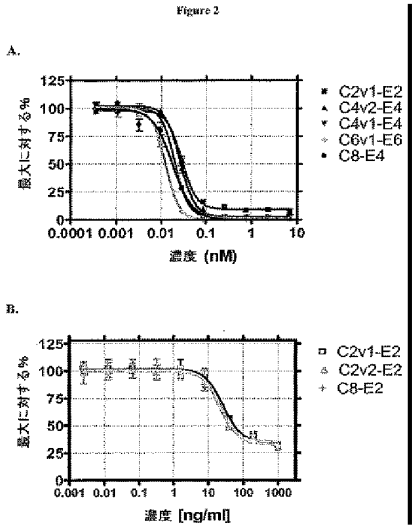
OnCusp
Ex. 1002

－Ｅ２およびＣ８－Ｅ２を６ｍｇ／ｋｇ（Ａ）または１２ｍｇ／ｋｇ（Ｂ）で投与した。マウスにはＣ４ｖ１－Ｅ４、Ｃ４ｖ２－Ｅ４、Ｃ８－Ｅ４およびＣ８－Ｅ４Ｍは３ｍｇ／ｋｇ（Ｃ）および６ｍｇ／ｋｇ（Ｄ）で投与した。

【図1】



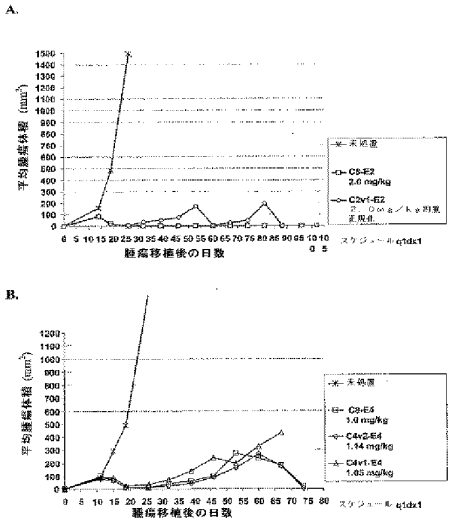
【図2】



OnCusp
Ex. 1002

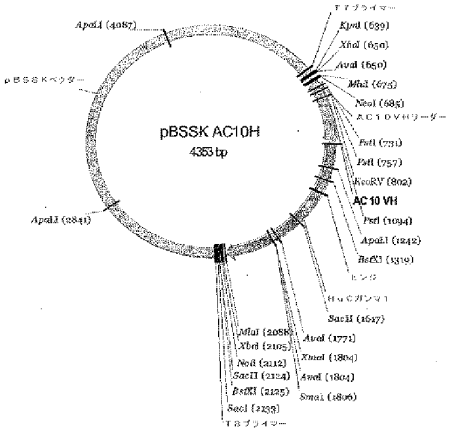
【図3】

Figure 3



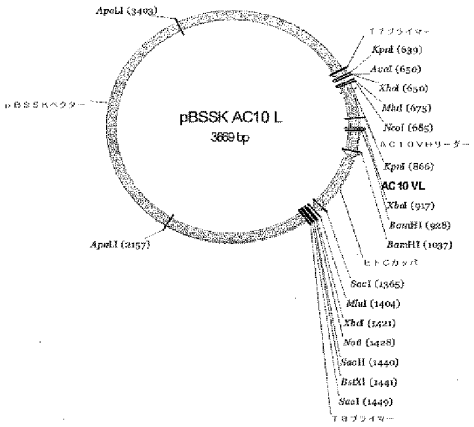
【図4】

Figure 4



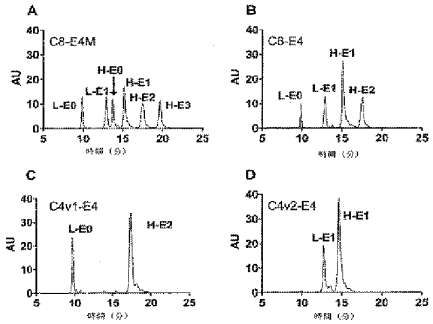
【図5】

Figure 5



【図6】

Figure 6

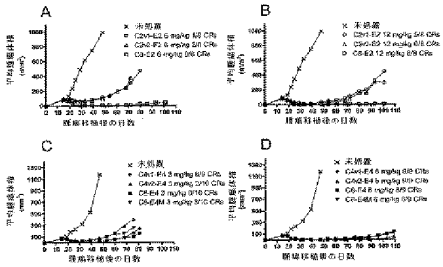


【図7】

【配列表】

Figure 7

2008521828000001.xml



【手続補正書】
【提出日】平成19年8月17日(2007.8.17)
【配列表】
2008521828000001.app
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/43257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: **C07K 16/00(2006.01),16/28(2006.01);A61K 39/395(2006.01);G01N 33/53(2006.01)**

USPC: 530/391.3,391.7;424/178.1,179.1,181.1;435/7.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/391.3,391.7; 424/178.1,179.1,181.1; 435/7.1

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)
MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS on STN; WEST, PGPub

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUN M.M. Reduction-Alkylation Strategies for the Modification of Specific Monoclonal Antibody Disulfies Bioconjugate Chem, Vol 16, pages 1281-1290, see entire document, especially page 1285, col. 2, Figure 4.	1-40
A	McDONAGH CF Engineered Antiobdy-drug Conjugates with Defined Sites and Stoichiometries of Drug Attachment Protein Eng Des Sel July 2006 Vol 19, No. 7, pages 299-307, see entire document, especially abstract.	1-40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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	Date of mailing of the international search report
02 January 2007 (02.01.2007)	23 MAR 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer Phuong Huynh Telephone No. (571) 272-1600

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

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	16/28	(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	16/28	
Ｃ０７Ｋ	19/00	(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	19/00	
Ｃ１２Ｐ	21/02	(2006.01)	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
Ａ６１Ｋ	39/395	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｃ
Ａ６１Ｋ	38/00	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｌ
Ａ６１Ｋ	51/00	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	37/02	
Ａ６１Ｋ	49/00	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	49/02	Ａ
Ａ６１Ｐ	31/04	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	49/00	Ａ
Ａ６１Ｐ	31/12	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ
Ａ６１Ｐ	31/00	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ
Ａ６１Ｐ	35/00	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ｇ０１Ｎ	33/574	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	31/12	
Ｇ０１Ｎ	33/569	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ｇ０１Ｎ	33/564	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ｃ１２Ｎ	15/09	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ
			Ａ６１Ｋ	39/395	Ｑ
			Ａ６１Ｋ	39/395	Ｒ
			Ａ６１Ｋ	39/395	Ｓ
			Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ
			Ａ６１Ｋ	39/395	Ｕ
			Ｇ０１Ｎ	33/574	
			Ｇ０１Ｎ	33/569	Ｂ
			Ｇ０１Ｎ	33/569	Ｇ
			Ｇ０１Ｎ	33/564	
			Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　マクドナグ，　シャーロット
アメリカ合衆国　ワシントン　９８０２１，　ボセル，　３０ティーエイチ　ドライブ　サウス　イースト　２１８２３
(72)発明者　カーター，　ポール
アメリカ合衆国　ワシントン　９８０２１，　ボセル，　３０ティーエイチ　ドライブ　サウス　イースト　２１８２３

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA11 BA42 BA43 BA48 BA51 CA04 CA05 CA06 CA07
CA09 CA10 DA02 EA04 FA02 FA10 GA05 GA11 GA13 GA18
GA27 HA03 HA08 HA14
4B064 AG26 CA10 CA19 CC24 CE11 CE12 DA01 DA13
4C084 AA02 BA01 BA08 BA14 BA23 BA31 BA42 CA59 DA41 DA42
MA05 NA05 NA06 NA13 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35
4C085 AA13 AA14 AA19 AA21 AA22 AA25 AA26 AA27 BA07 BA51

	BB01	BB11	BB16	BB17	BB18	BB21	BB23	BB36	BB37	BB41
	BB43	CC07	CC08	CC21	DD51	DD62	EE01	EE05		
4H045	AA10	AA20	AA30	BA10	BA41	CA01	CA10	CA40	DA75	EA20
	EA50	FA72	FA74	GA23	GA26					

(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2009-538629
(P2009-538629A)
(43)公表日　平成21年11月12日(2009.11.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G054
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4B065
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4C085

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 206 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-513419 (P2009-513419)
(86)(22)出願日　平成19年5月29日 (2007.5.29)
(85)翻訳文提出日　平成21年2月2日 (2009.2.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/069889
(87)国際公開番号　WO2007/140371
(87)国際公開日　平成19年12月6日 (2007.12.6)
(31)優先権主張番号　60/809,328
(32)優先日　平成18年5月30日 (2006.5.30)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/908,941
(32)優先日　平成19年3月29日 (2007.3.29)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/911,829
(32)優先日　平成19年4月13日 (2007.4.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフオルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　エベンス，　アレン，　ジェイ．，　ジュニア．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０７０，　サン　カルロス，　アロヨ　アベニュー　１９３２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体およびイムノコンジュゲートとこれらの使用方法

(57)【要約】
抗ＣＤ２２抗体およびそのイムノコンジュゲートが提供される。抗ＣＤ２２抗体およびそのイムノコンジュゲートの使用方法が提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a) 配列番号：９、１０、１９から２３、３２および３３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１と、(b)
(1) 配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１、
(2) 配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２、
(3) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３、
(4) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、および、
(5) 配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ３
から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ又は５つのＨＶＲとを含んでなる、ＣＤ２２に結合する抗体。
【請求項２】
配列番号：１０のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１を含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
さらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２、及び配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３を含んでなる、請求項２に記載の抗体。
【請求項４】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：９を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項５】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：１９を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項６】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：２０を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項７】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：２１を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項８】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：２２を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項９】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：２３を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１０】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：３２を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１１】
ＨＶＲ-Ｌ１が配列番号：３３を含み、抗体がさらに、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３とを含んでなる、請求項１に記載の抗体。

【請求項１２】
さらに、ＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワークおよびＶＬサブグループIコンセンサスフレームワークから選択される少なくとも１つのフレームワークを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１３】
抗体が、配列番号：１６から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１４】
抗体が、配列番号：１７から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１５】
抗体が、配列番号：１８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１６】
抗体が、配列番号：１、３、５及び７から選択される１つ、２つ、３つ又は４つのフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１７】
抗体が、配列番号：８、１１、１３及び１５から選択される１つ、２つ、３つ又は４つのフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１８】
さらに、配列番号：１７から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項１３に記載の抗体。
【請求項１９】
さらに、配列番号：１８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項１３に記載の抗体。
【請求項２０】
抗体が、配列番号：８８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖を含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項２１】
抗体が、配列番号：８７から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖を含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項２２】
抗体が、配列番号：８８のアミノ酸配列を有する重鎖と配列番号：８７のアミノ酸配列を有する軽鎖を含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項２３】
配列番号：１６のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる、ＣＤ２２に結合する抗体。
【請求項２４】
さらに、配列番号：１７のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項２３に記載の抗体。
【請求項２５】
さらに、配列番号：１８のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項２３に記載の抗体。
【請求項２６】
抗体が、ハイブリドーマＡＴＣＣ受託番号 ＰＴＡ－７６２１(１０Ｆ４．４．１)によって産生される抗体の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ又は６つのＨＶＲをを含んでなる、請求項１に記載の抗体。
【請求項２７】
抗体が、ハイブリドーマＡＴＣＣ受託番号 ＰＴＡ－７６２０(５Ｅ８．１．８)によって

産生される抗体の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ又は６つのＨＶＲを含んでなる抗体。
【請求項２８】
抗体がヒト化されている、請求項１に記載の抗体。
【請求項２９】
抗体がヒト化されている、請求項２３に記載の抗体。
【請求項３０】
ＣＤ２２が哺乳類のＣＤ２２である、請求項１に記載の抗体。
【請求項３１】
ＣＤ２２が齧歯目のＣＤ２２および霊長類のＣＤ２２から選択される、請求項３０に記載の抗体。
【請求項３２】
ＣＤ２２がヒトのＣＤ２２である、請求項３１に記載の抗体。
【請求項３３】
ＣＤ２２が哺乳類のＣＤ２２である、請求項２３に記載の抗体。
【請求項３４】
ＣＤ２２が齧歯目のＣＤ２２および霊長類ＣＤ２２から選択される、請求項３３に記載の抗体。
【請求項３５】
ＣＤ２２がヒトのＣＤ２２である、請求項３４に記載の抗体。
【請求項３６】
請求項１に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
【請求項３７】
請求項２３に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
【請求項３８】
請求項３６に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項３９】
請求項３７に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項４０】
請求項３８に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項４１】
請求項３９に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項４２】
宿主細胞が真核細胞である、請求項４０に記載の宿主細胞。
【請求項４３】
宿主細胞がＣＨＯ細胞である、請求項４２に記載の宿主細胞。
【請求項４４】
宿主細胞が真核細胞である、請求項４１に記載の宿主細胞。
【請求項４５】
宿主細胞がＣＨＯ細胞である、請求項４４に記載の宿主細胞。
【請求項４６】
a) 抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で請求項３８に記載の宿主細胞を培養し、b) 抗体を単離することを含んでなる、抗ＣＤ２２抗体の作製方法。
【請求項４７】
a) 抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で請求項３９に記載の宿主細胞を培養し、b) 抗体を単離することを含んでなる、抗ＣＤ２２抗体の作製方法。
【請求項４８】
ＣＤ２２が細胞の表面に発現される、請求項２８に記載の抗体。
【請求項４９】
細胞がＢ細胞である、請求項４８に記載の抗体。
【請求項５０】

ＣＤ２２が細胞の表面に発現される、請求項２９に記載の抗体。
【請求項５１】
ＣＤ２２がＢ細胞である、請求項５０に記載の抗体。
【請求項５２】
抗体が配列番号：２７のアミノ酸２２－２４０のＣＤ２２の領域内のエピトープに結合する、請求項１に記載の抗体。
【請求項５３】
抗体が配列番号：２７のアミノ酸２２－２４０のＣＤ２２の領域内のエピトープに結合する、請求項２３に記載の抗体。
【請求項５４】
Ｂ細胞がＢ細胞増殖性疾患と関係している、請求項４９に記載の抗体。
【請求項５５】
Ｂ細胞増殖性疾患が癌である、請求項５４に記載の抗体。
【請求項５６】
Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項５４に記載の抗体。
【請求項５７】
Ｂ細胞がＢ細胞増殖性疾患と関係している、請求項５１に記載の抗体。
【請求項５８】
Ｂ細胞増殖性疾患が癌である、請求項５７に記載の抗体。
【請求項５９】
Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項５７に記載の抗体。抗体がモノクローナル抗体である、請求項１から１４、１６から２３及び３０から３３のいずれか一に記載の抗体。
【請求項６０】
抗体がモノクローナル抗体である、請求項１に記載の抗体。
【請求項６１】
抗体がＦａｂ、Ｆａｂ'-ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ又は$(Ｆａｂ')_2$断片から選択される抗体断片である、請求項６０に記載の抗体。
【請求項６２】
抗体がヒト化されている、請求項６０に記載の抗体。
【請求項６３】
抗体がヒトである、請求項６０に記載の抗体。
【請求項６４】
抗体がモノクローナル抗体である、請求項２３に記載の抗体。
【請求項６５】
抗体がＦａｂ、Ｆａｂ'-ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ又は$(Ｆａｂ')_2$断片から選択される抗体断片である、請求項６４に記載の抗体。
【請求項６６】
抗体がヒト化されている、請求項６４に記載の抗体。
【請求項６７】
抗体がヒトである、請求項６４に記載の抗体。
【請求項６８】
抗体が、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ-７６２１(１０Ｆ４．４．１)；ＡＴＣＣ　ＰＴＡ-７６２０(

５Ｅ８．１．８）；及び、配列番号：８８の重鎖配列と配列番号：８７の軽鎖配列を含む抗体から選択した抗体と同じエピトープに結合する、請求項１に記載の抗体。

【請求項６９】

抗体が、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ-７６２１（１０Ｆ４．４．１）；ＡＴＣＣ　ＰＴＡ-７６２０（５Ｅ８．１．８）；及び、配列番号：８８の重鎖配列と配列番号：８７の軽鎖配列を含む抗体から選択した抗体と同じエピトープに結合する、請求項２３に記載の抗体。

【請求項７０】

ＣＤ２２への抗体の結合に許容される条件下で請求項１に記載の抗体に生体試料を接触させ、抗体とＣＤ２２との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、生体試料中のＣＤ２２の存在を検出する方法。

【請求項７１】

生体試料がＢ細胞増殖性疾患があると疑われる患者のものである、請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項７１に記載の抗体。

【請求項７３】

ＣＤ２２への抗体の結合に許容される条件下で請求項２３に記載の抗体に生体試料を接触させ、抗体とＣＤ２２との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、生体試料中のＣＤ２２の存在を検出する方法。

【請求項７４】

生体試料がＢ細胞増殖性疾患があると疑われる患者のものである、請求項７３に記載の方法。

【請求項７５】

Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項７４に記載の抗体。

【請求項７６】

細胞障害性剤に共有結合的に付着した請求項１に記載の抗体を含んでなるイムノコンジュゲート。

【請求項７７】

細胞障害性剤に共有結合的に付着した請求項２３に記載の抗体を含んでなるイムノコンジュゲート。

【請求項７８】

細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項７６に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項７９】

イムノコンジュゲートが、式Ａｂ-（Ｌ-Ｄ）ｐを有し、

(a) Ａｂが請求項１に記載の抗体であり、

(b) Ｌがリンカーであり、

(c) Ｄが薬剤成分である、請求項７８に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８０】

Ｌは、６-マレイミドカプロイル（ＭＣ）、マレイミドプロパノイル（ＭＰ）、バリン-シトルリン（ｖａｌ-ｃｉｔ）、アラニン-フェニルアラニン（ａｌａ-ｐｈｅ）、ｐ-アミノベンジルオキシカルボンイル（ＰＡＢ）、Ｎ-スクシンイミジル４（２-ピリジルチオ）ペンタ

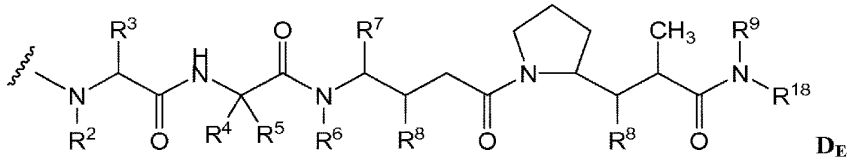
ノエート(ＳＰＰ)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(ＳＭＣＣ)、及びＮ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(ＳＩＡＢ)から選択される、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８１】

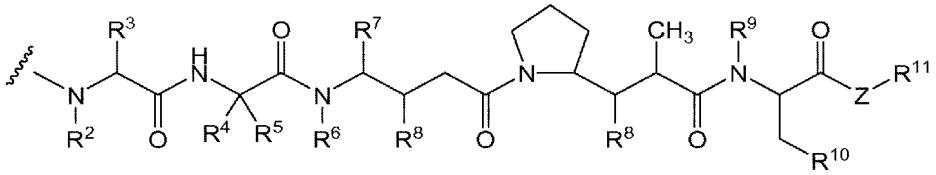
Ｄがアウリスタチン類およびドロスタチン類から選択される、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８２】

Ｄが以下の式D_E又はD_Fの薬剤成分であり、



D_E



D_F

ここにおいて、R^2およびR^6は各々メチルであり、R^3およびR^4は各々イソプロピルであり、R^7はｓｅｃ-ブチルであり、各々のR^8はCH_3、Ｏ-CH_3、ＯＨおよびＨから独立して選択され、R^9はＨであり、R^{10}はアリールであり、Ｚは-Ｏ-又は-ＮＨであり、R^{11}は、Ｈ、C_1-C_8アルキル、又は-$(CH_2)_2$-Ｏ-$(CH_2)_2$-Ｏ-$(CH_2)_2$-Ｏ-CH_3であり、そしてR^{18}は-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-アリールであり、そして、

(d) ｐはおよそ１から８まで変動する、

請求項８１に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８３】

インビトロ又はインビボの細胞殺傷活性を有する、請求項７６に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８４】

リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８５】

リンカーがプロテアーゼによって切断される、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８６】

リンカーがｖａｌ-ｃｉｔジペプチドを含む、請求項８０に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８７】

リンカーがｐ-アミノベンジルユニットを含む、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項８８】
リンカーが６-マレイミドカプロイルを含む、請求項８０に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項８９】
薬剤がＭＭＡＥおよびＭＭＡＦから選択される、請求項８２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９０】
薬剤がＭＭＡＥである、請求項８９に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９１】
薬剤がＭＭＡＦである、請求項８９に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９２】
細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項７７に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９３】
イムノコンジュゲートが、式Ａｂ-(Ｌ-Ｄ)ｐを有し、
(a) Ａｂが請求項２３に記載の抗体であり、
(b) Ｌがリンカーであり、
(c) Ｄが薬剤成分である、
請求項９２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９４】
Ｌは、６-マレイミドカプロイル(ＭＣ)、マレイミドプロパノイル(ＭＰ)、バリン-シトルリン(ｖａｌ-ｃｉｔ)、アラニン-フェニルアラニン(ａｌａ-ｐｈｅ)、ｐ-アミノベンジルオキシカルボンイル(ＰＡＢ)、Ｎ-スクシンイミジル４(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(ＳＰＰ)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(ＳＭＣＣ)、及びＮ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(ＳＩＡＢ)から選択される、請求項９３に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９５】
リンカー、Ｌがプロテアーゼによって切断される、請求項９３に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９６】
Ｌがｖａｌ-ｃｉｔジペプチドを含む、請求項９４に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９７】
Ｌがｐ-アミノベンジルユニットを含む、請求項９３に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９８】
ｐ-アミノベンジルユニットがｐ-アミノベンジルオキシカルボンイル(ＰＡＢ)を含む、請求項９７に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項９９】
Ｌが６-マレイミドカプロイル(ＭＣ)を含む、請求項９４に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１００】
リンカーが６-マレイミドカプロイルおよびｐ-アミノベンジルオキシカルボンイルを含む、請求項９４に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０１】
イムノコンジュゲートが式Ａｂ-(Ｌ-ＭＭＡＥ)ｐを有し、このときＬはリンカーであり、ｐは２から５まで変動する、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０２】
Ｌがｖａｌ-ｃｉｔを含む、請求項１０１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０３】
ＬがＭＣを含む、請求項１０１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０４】

Ｌがｐａｂを含む、請求項１０１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０５】
Ｌがｍｃ－ｐａｂを含む、請求項１０１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０６】
イムノコンジュゲートが式Ａｂ－（Ｌ－ＭＭＡＥ）ｐを有し、このときＬはリンカーであり、ｐは２から５まで変動する、請求項９３に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０７】
Ｌがｖａｌ－ｃｉｔを含む、請求項１０６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０８】
Ｌがｍｃを含む、請求項１０６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１０９】
Ｌがｐａｂを含む、請求項１０６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１０】
Ｌがｍｃ－ｐａｂを含む、請求項１０６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１１】
イムノコンジュゲートが式Ａｂ－（Ｌ－ＭＭＡＦ）ｐを有し、このときＬはリンカーであり、ｐは２から５まで変動する、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１２】
Ｌがｖａｌ－ｃｉｔを含む、請求項１１１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１３】
Ｌがｍｃを含む、請求項１１１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１４】
Ｌがｐａｂを含む、請求項１１１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１５】
Ｌがｍｃ－ｐａｂを含む、請求項１１１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１６】
イムノコンジュゲートが式Ａｂ－（Ｌ－ＭＭＡＦ）ｐを有し、このときＬはリンカーであり、ｐは２から５まで変動する、請求項９３に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１７】
Ｌがｖａｌ－ｃｉｔを含む、請求項１１６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１８】
Ｌがｍｃを含む、請求項１１６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１１９】
Ｌがｐａｂを含む、請求項１１６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２０】
Ｌがｍｃ－ｐａｂを含む、請求項１１６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２１】
Ｄがメイタンシノイドである、請求項７９に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２２】
ＤがＤＭ１、ＤＭ３およびＤＭ４から選択される、請求項１２１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２３】
インビトロ又はインビボの細胞殺傷活性を有する、請求項１２１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２４】
リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項１２１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２５】
リンカーＬは、Ｎ-スクシンイミジル４-（２-ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ-スクシンイミジル４-（Ｎ-マレイミドメチル）シクロヘキサン-１カルボキシレート（Ｓ

ＭＣＣ)、及びN-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(ＳＩＡＢ)から選択される、請求項１２１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２６】
薬剤がＤＭ１である、請求項１２２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２７】
ＬがＳ Ｐ Ｐを含む、請求項１２２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２８】
ＬがＳＭＣＣを含む、請求項１２２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１２９】
ｐが２から４である、請求項１２２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３０】
ｐが３から４である、請求項１２２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３１】
Ｄがメイタンシノイドである、請求項９３に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３２】
ＤがＤＭ１、ＤＭ３およびＤＭ４から選択される、請求項１３１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３３】
インビトロ又はインビボの細胞殺傷活性を有する、請求項１３１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３４】
リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項１３１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３５】
リンカーＬは、Ｎ-スクシンイミジル４(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(ＳＰＰ)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(ＳＭＣＣ)、及びN-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(ＳＩＡＢ)から選択される、請求項１３１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３６】
薬剤がＤＭ１である、請求項１３２に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３７】
ＬがＳ Ｐ Ｐを含む、請求項１３６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３８】
ＬがＳＭＣＣを含む、請求項１３６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３９】
ｐが２から４である、請求項１３６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１４０】
ｐが３から４である、請求項１３６に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１４１】
請求項７９に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体を含有してなる製薬的組成物。
【請求項１４２】
個体に請求項１４１に記載の製薬的組成物の有効量を投与することを含む、Ｂ細胞増殖性疾患を治療する方法。
【請求項１４３】
Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項１４２に記載の方法。

【請求項１４４】
請求項９３に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体を含有してなる製薬的組成物。
【請求項１４５】
個体に請求項１４４に記載の製薬的組成物の有効量を投与することを含む、Ｂ細胞増殖性疾患を治療する方法。
【請求項１４６】
Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項１４５に記載の方法。
【請求項１４７】
請求項７６、７７、７８又は９２に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体を含有してなる製薬的組成物。
【請求項１４８】
個体に請求項１４７に記載の製薬的組成物の有効量を投与することを含む、Ｂ細胞増殖性疾患を治療する方法。
【請求項１４９】
Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項１４８に記載の方法。
【請求項１５０】
ＣＤ２２へのイムノコンジュゲートの結合に許容される条件下で細胞を請求項７９に記載のイムノコンジュゲートに曝すことを含む、Ｂ細胞増殖を阻害する方法。
【請求項１５１】
Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５２】
Ｂ細胞が異種移植片である、請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５３】
インビトロで曝す、請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５４】
インビボで曝す、請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５５】
抗体が０．６から１．０の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含むシステイン改変抗体であり、該システイン改変抗体は、親抗体の一又は複数のアミノ酸残基をシステインに置換することを含む方法によって調製される、請求項１に記載の抗体。
【請求項１５６】
システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項１５５に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１５７】
前記方法が、チオール反応試薬とシステイン改変抗体を反応させることによってシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを更に含み、

該システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項１５５に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１５８】
一又は複数の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖に位置する、請求項１５５のシステイン改変抗体。
【請求項１５９】
抗体が共有結合で細胞障害性剤に付着したシステイン改変抗体を含むイムノコンジュゲートである、請求項１５５に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６０】
細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項１５９に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６１】
抗体が、キャプチャ標識、検出標識又は固体担体に共有結合して付着される、請求項１５５に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６２】
抗体がビオチンキャプチャ標識に共有結合して付着される、請求項１６１に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６３】
抗体が蛍光色素検出標識に共有結合して付着される、請求項１６１に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６４】
蛍光色素が、フルオレセインタイプ、ローダミンタイプ、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッドおよびこれらのアナログから選択される、請求項１６３に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６５】
抗体が^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{64}Ｃｕ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{177}Ｌｕ、^{211}Ａｔおよび^{213}Ｂｉから選択される放射性核種検出標識に共有結合して付着される、請求項１６１に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６６】
抗体がキレートリガンドによって検出標識に共有結合して付着される、請求項１６１に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６７】
キレートリガンドがＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡおよびＴＥＴＡから選択される、請求項１６６に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１６８】
抗体が０．６から１．０の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含むシステイン改変抗体であり、該システイン改変抗体は、親抗体の一又は複数のアミノ酸残基をシステインに置換することを含む方法によって調製される、請求項２３に記載の抗体。
【請求項１６９】
システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項１６８に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７０】
前記方法が、チオール反応試薬とシステイン改変抗体を反応させることによってシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを更に含み、
該システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項１６８に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７１】
一又は複数の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖に位置する、請求項１６８のシステイ

ン改変抗体。
【請求項１７２】
抗体が共有結合で細胞障害性剤に付着したシステイン改変抗体を含むイムノコンジュゲートである、請求項１６８に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７３】
細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項１７２に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７４】
抗体が、キャプチャ標識、検出標識又は固体担体に共有結合して付着される、請求項１６８に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７５】
抗体がビオチンキャプチャ標識に共有結合して付着される、請求項１７４に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７６】
抗体が蛍光色素検出標識に共有結合して付着される、請求項１７４に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７７】
蛍光色素が、フルオレセインタイプ、ローダミンタイプ、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッドおよびこれらのアナログから選択される、請求項１７６に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７８】
抗体が^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{64}Ｃｕ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{177}Ｌｕ、^{211}Ａｔおよび^{213}Ｂｉから選択される放射性核種検出標識に共有結合して付着される、請求項１７４に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１７９】
抗体がキレートリガンドによって検出標識に共有結合して付着される、請求項１７８に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１８０】
キレートリガンドがＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡおよびＴＥＴＡから選択される、請求項１７９に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１８１】
リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項９３に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１８２】
アルブミン結合ペプチドを含む請求項１に記載の抗体。
【請求項１８３】
アルブミン結合ペプチドが配列番号：４２から４６の中から選択される、請求項１８２に記載の抗体。
【請求項１８４】
アルブミン結合ペプチドを含む請求項２３に記載の抗体。
【請求項１８５】
アルブミン結合ペプチドが配列番号：４２から４６の中から選択される、請求項１８４に記載の抗体。
【請求項１８６】
抗体がさらに、カバット番号付け慣例法による軽鎖の１５、４３、１１０、１４４、１６８および２０５、及びＥＵ番号付け慣例法による重鎖の４１、８８、１１５、１１８、１２０、１７１、１７２、２８２、３７５および４００から選択される一又は複数の位置にシステインを含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項１８７】

システインが軽鎖の位置２０５にある、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１８８】
システインが重鎖の位置１１８にある、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１８９】
システインが重鎖の位置４００にある、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１９０】
抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体およびヒト化抗体から選択される、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１９１】
抗体断片である、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１９２】
抗体断片がＦａｂ断片である、請求項１９１に記載の抗体。
【請求項１９３】
キメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体から選択される、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１９４】
細菌内で産生される、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１９５】
ＣＨＯ細胞内で産生される、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項１９６】
ＣＤ２２タンパク質を含むことが予測される試料中のＣＤ２２タンパク質の存在を決定する方法であって、請求項１８６に記載の抗体に該試料を曝し、該試料中の該ＣＤ２２タンパク質への該抗体の結合を決定することを含み、このとき該タンパク質に抗体が結合した場合に該試料中の該タンパク質の存在が示される方法。
【請求項１９７】
前記試料が、前記ＣＤ２２タンパク質を発現することが予測される細胞を含む、請求項１９６に記載の方法。
【請求項１９８】
前記細胞がＢ細胞である、請求項１９６に記載の方法。
【請求項１９９】
抗体が、蛍光色素、放射性同位体、ビオチン又は金属-複合体形成リガンドから選択される標識に共有結合して付着される、請求項１９６に記載の方法。
【請求項２００】
請求項１８６に記載の抗ＣＤ２２抗体と薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤を含有してなる製薬的製剤。
【請求項２０１】
抗体が、アウリスタチンないしはメイタンシノイドの薬剤成分に共有結合して付着され、その結果抗体薬剤コンジュゲートが形成される、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項２０２】
抗体(Ａｂ)とアウリスタチン又はメイタンシノイドの薬剤成分(Ｄ)とを含んでなり、このとき該システイン改変抗体はリンカー成分(Ｌ)によって一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を介してＤに付着しており、該化合物は以下の式Ｉを有し、

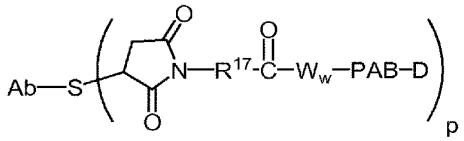
$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

ｐが１、２、３又は４である、
請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。
【請求項２０３】
ｐが２である、請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２０４】

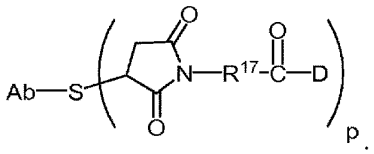
Ｌが、以下の式を有し、

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

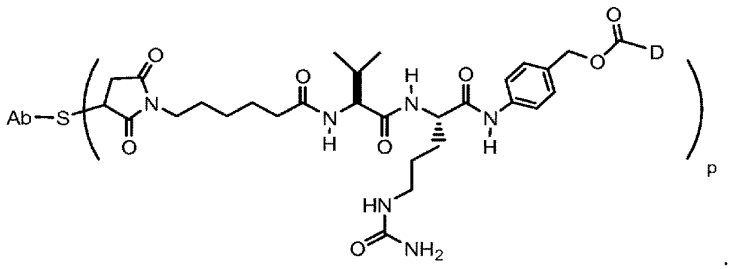
ここで、
Ａはシステイン改変抗体(Ａｂ)のシステインチオールに共有結合して付着されるストレッチャーユニットであり、
ａは０又は１であり、
各々のＷはそれぞれアミノ酸ユニットであり、
ｗは０から１２まで変動する整数であり、
Ｙは薬剤成分に共有結合して付着されるスペーサーユニットであり、そして、ｙは０、１又は２である、
請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２０５】
以下の式を有し、



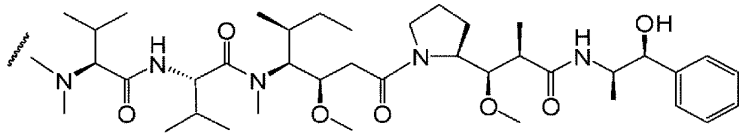
このときＰＡＢがパラ-アミノベンジルカルバモイルであり、R^{17}が、$(CH_2)_r$、C_3-C_8カルボサイクリル、O-$(CH_2)_r$、アリーレン、$(CH_2)_r$-アリーレン、-アリーレン-$(CH_2)_r$-、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8カルボサイクリル)、(C_3-C_8カルボサイクリル)-$(CH_2)_r$、C_3-C_8ヘテロサイクリル、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8ヘテロサイクリル)、-(C_3-C_8ヘテロサイクリル)-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_r$$C(O)NR^b(CH_2)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、-$(CH_2)_r$$C(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2)_r$$C(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、-$(CH_2CH_2O)_r$$C(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$$C(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、及び-$(CH_2CH_2O)_r$$C(O)NR^b(CH_2)_r$-から選択される二価のラジカルであり、$R^b$がＨ、$C_1$-$C_6$アルキル、フェニル又はベンジルであり、そして、ｒはそれぞれ１から１０まで変動する整数である、請求項２０４に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２０６】
W_Wがバリン-シトルリンである、請求項２０４に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２０７】
R^{17}が$(CH_2)_5$又は$(CH_2)_2$である、請求項２０４に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２０８】
以下の式を有する、請求項２０４に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。



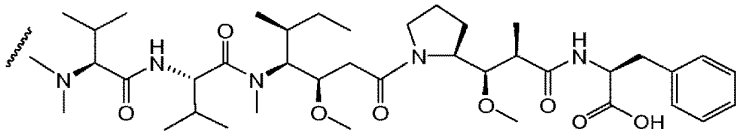
【請求項２０９】
Ｒ１７が(ＣＨ２)５又は(ＣＨ２)２である、請求項２０８に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２１０】
以下の式を有する、請求項２０４に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。



【請求項２１１】
ＬがＳＭＣＣ、ＳＰＰ又はＢＭＰＥＯである、請求項２０２に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２１２】
Ｄが以下の構造を有するＭＭＡＥであり、

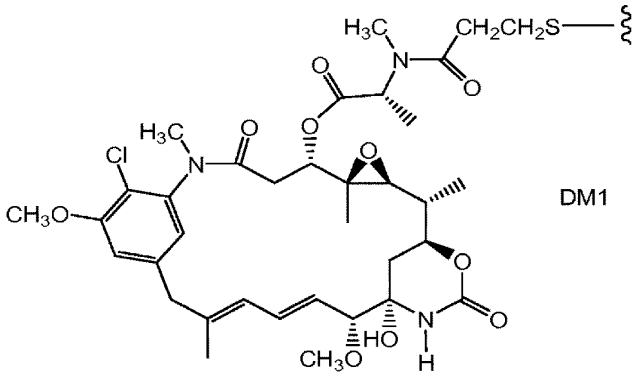


ここで波線はリンカーＬへの付着部位を示す、請求項２０２に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。
【請求項２１３】
Ｄが以下の構造を有するＭＭＡＦであり、



ここで波線はリンカーＬへの付着部位を示す、請求項２０２に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項２１４】
Ｄが以下の構造を有するＤＭ１であり、

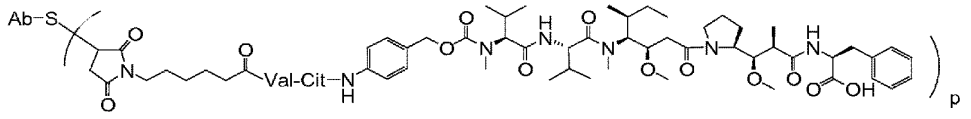


ここで波線はリンカーＬへの付着部位を示す、請求項２０２に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

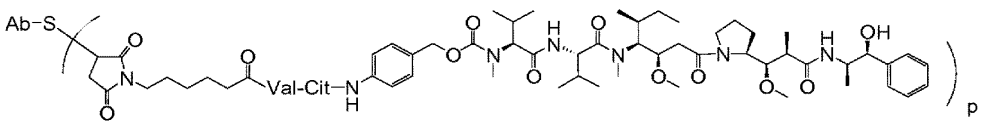
【請求項２１５】
親抗ＣＤ２２抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体および抗体断片から選択される、請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項２１６】
抗体断片がＦａｂ断片である、請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

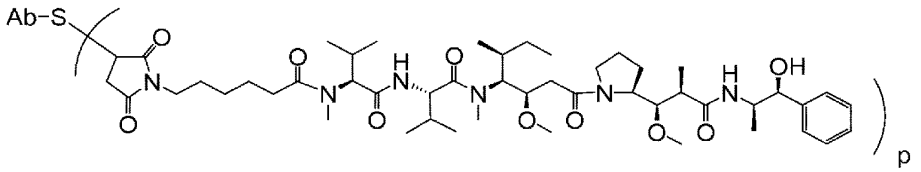
【請求項２１７】
以下の構造から選択される抗体-薬剤コンジュゲート化合物であって、



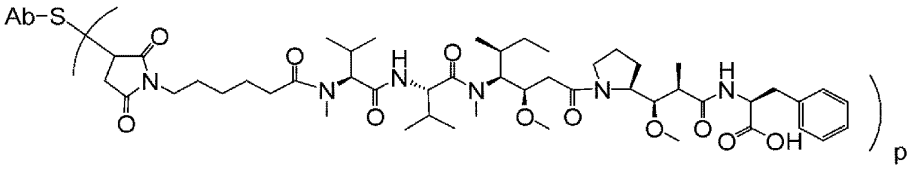
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



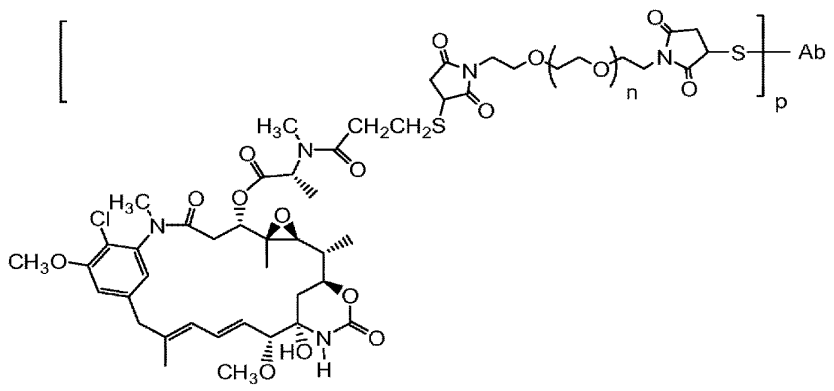
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

このときＶａｌはバリンであり、Ｃｉｔはシトルリンであり、ｐは１、２、３又は４であり、そしてＡｂは請求項１８６に記載の抗ＣＤ２２抗体である、抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項２１８】

アウリスタチンがＭＭＡＥ又はＭＭＡＦである、請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項２１９】

ＬがＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ又はＭＣである、請求項２０２に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項２２０】

Ｂ細胞を検出するためのアッセイであって、

(a) 細胞を請求項１９９に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物にさらし、そして、

(b) 細胞への抗体-薬剤コンジュゲート化合物の結合の程度を決定する

ことを含むアッセイ。
【請求項２２１】
細胞培養物培地中の哺乳類の癌性Ｂ細胞を請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物によって処置することを含み、それによって癌性Ｂ細胞の増殖が抑制される、細胞の増殖を抑制する方法。
【請求項２２２】
請求項２０１に記載の抗体-薬剤コンジュゲートと薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤を含有してなる製薬的製剤。
【請求項２２３】
患者に請求項２２２に記載の製薬的製剤を投与することを含む、癌の治療方法。
【請求項２２４】
癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項２２３に記載の方法。
【請求項２２５】
患者に、抗体-薬剤コンジュゲート化合物と組み合わせた細胞障害性剤が投与される、請求項２２３に記載の方法。
【請求項２２６】
請求項２２０に記載の製薬的製剤と、
容器と、
ＣＤ２２ポリペプチドの過剰発現に特徴がある癌を治療するために化合物が用いられうることを示しているパッケージ挿入物又はラベルとを具備する製造品。
【請求項２２７】
癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ球性白血病(ＡＬＬ)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項２２６に記載の製造品。
【請求項２２８】
抗体-薬剤コンジュゲート化合物の作製方法であって、請求項１８６に記載の抗ＣＤ２２抗体(Ａｂ)とアウリスタチン又はメイタンシノイドの薬剤成分(Ｄ)とを含んでなり、このとき抗体はリンカー成分(Ｌ)によって一又は複数の改変したシステインアミノ酸を介してＤに付着しており、該化合物は以下の式Ｉを有し、

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

このときｐは１、２、３又は４であり、
(a) 抗体の改変したシステイン基をリンカー試薬と反応させて、抗体-リンカー中間生成物Ａｂ-Ｌを形成させる工程と、
(b) Ａｂ-Ｌを活性化された薬剤成分Ｄと反応させ、それによって抗体-薬剤コンジュゲートが形成される工程
を含んでなるか、
または、
(c) 薬剤成分の求核基をリンカー試薬と反応させて、薬剤-リンカー中間生成物Ｄ-Ｌを形成する工程と、
(d) Ｄ-Ｌを抗体の改変されたシステイン基と反応させて、それによって抗体-薬剤コンジュゲートが形成される工程

を含んでなる方法。
【請求項２２９】
さらに、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞において抗体を発現させる工程を含んでなる、請求項２２８に記載の方法。
【請求項２３０】
さらに、発現された抗体を還元剤にて処理する工程を含んでなる、請求項２２９に記載の方法。
【請求項２３１】
還元剤がＴＣＥＰおよびＤＴＴから選択される、請求項２３０に記載の方法。
【請求項２３２】
さらに、還元剤にて処理した後に、発現された抗体を酸化剤で処理する工程を含んでなる、請求項２３０に記載の方法。
【請求項２３３】
酸化剤が、硫酸銅、デヒドロアスコルビン酸および空気から選択される、請求項２３２に記載の方法。
【請求項２３４】
抗体が、配列番号：８８、９２又は９３のいずれか一から選択される重鎖配列を含む、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項２３５】
抗体が配列番号：８７又は９１から選択される軽鎖配列を含む、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項２３６】
抗体が、配列番号：８７の軽鎖配列と配列番号：９２の重鎖配列を含む、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項２３７】
抗体が、配列番号：８７の軽鎖配列と配列番号：９３の重鎖配列を含む、請求項１８６に記載の抗体。
【請求項２３８】
抗体が、配列番号：９１の軽鎖配列と配列番号：８８の重鎖配列を含む、請求項１８６に記載の抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
これは、米国特許法規則１．５３(ｂ)(１)に基づき出願した非仮出願であり、米国特許法１１９条(ｅ)に基づき、２００６年５月３０日に出願の米国仮特許出願第６０／８０９３２８号、２００７年３月２９日出願の米国仮特許出願第６０／９０８９４１号、及び２００７年４月１３日出願の米国仮特許出願第６０／９１１８２９号の優先権を主張するものであり、その全体の開示内容が出典明記により本明細書に援用される。
本発明は抗ＣＤ２２抗体およびそのイムノコンジュゲートに関する。本発明はさらに、抗ＣＤ２２抗体およびそのイムノコンジュゲートを使用する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
リンパ球は、造血過程の間に骨髄において生産される多種ある白血球のうちの１つである。リンパ球の２つの主な分類は、Ｂリンパ球(Ｂ細胞)とＴリンパ球(Ｔ細胞)である。ここで特に対象とするリンパ球はＢ細胞である。
Ｂ細胞は骨髄内で成熟して、その細胞表面上に抗原結合抗体を発現する骨髄を放出する。ナイーブＢ細胞がその膜結合性抗体に特異的な抗原と初めて遭遇すると、細胞は速やかに分化し、その子孫はメモリーＢ細胞と「プラズマ細胞(形質細胞、plasma cell)」と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。メモリーＢ細胞は長い寿命を持ち、本来の親細胞と同じ特異性を有する膜結合性抗体を発現し続ける。プラズマ細胞は、膜結合性抗体を発現

する代わりに、分泌型抗体を産生する。分泌された抗体は、体液性免疫の主要なエフェクター分子である。

【０００３】

Ｂ細胞関連の疾患には、悪性のリンパ腫(非ホジキンリンパ腫、ＮＨＬ)、多発性骨髄腫、及び慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ、Ｂ細胞白血病(ＣＤ５＋Ｂリンパ球))が含まれるが、これらに限定されるものではない。主にＢリンパ球から生じる癌の異種のグループである非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)は、すべての新しく診断された癌のおよそ４％を占める(Jemal, A.等, CA-Cancer J Clin, 52: 23-47, (2002))。中悪性度ＮＨＬは、成人ＮＨＬのおよそ３０～４０％をしめており(Harris, N.L.等, Hematol. J. 1:53-66 (2001))、びまん性大Ｂ細胞リンパ腫(ＤＬＢＣＬ)、マントル細胞リンパ腫(ＭＣＬ)、末梢性Ｔ細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫が含まれる。最前線の組合せ化学療法により、中悪性度ＮＨＬ患者の半分未満が治癒し、ほとんどの患者は結局この疾患により死亡する(Fisher, R.I. Semin. Oncol. 27(suppl 12): 2-8 (2000))。

また、Ｂ細胞関連の疾患には自己免疫性疾患が含まれる。自己免疫性疾患は以前としてヒトの臨床的に重要な疾患である。その名の通り、自己免疫性疾患は身体自体の免疫系により作用する。病理学的メカニズムは自己免疫性疾患の個々の種類で異なるが、ある一般的なメカニズムは、身体の内在性タンパク質に対する特定の抗体(本明細書中では自己反応性抗体又は自己抗体と称する)の結合を伴う。医師および科学者は、関節リウマチ、多発性硬化症、血管炎、免疫媒介性の糖尿病、及び全身性エリテマトーデスなどの狼瘡を含む７０以上の臨床的に異なった自己免疫性疾患を同定している。多くの自己免疫性疾患は、全部で２０００００足らずの個体に罹患しているほど稀であるが、これらの疾患は何百万ものアメリカ人、つまり集団の約５パーセントを苦しめており、多くの疾患は女性に偏って発症している。これらの疾患は長引くため、社会的及び財政的に莫大な負担が生じる。

【０００４】

Ｂ細胞表面抗原を標的とする細胞障害性剤はＢ細胞関連の癌治療の重要な焦点である。あるＢ細胞表面抗原はＣＤ２０である。キメラ(マウス／ヒト)抗ＣＤ２０モノクローナル抗体であるリツキシマブ(リツキサン；Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)およびIDEC Pharmaceutical Corp. (San Diego, CA))は、再発性又は抵抗性の軽度又は濾胞性ＮＨＬ (Leonard, J.P.等, Clin. Canc. Res. 10: 5327-5334 (2004))の治療のために米国食品医薬品局の承認を得た第一治療抗体であった。

他のＢ細胞抗原、例としてＣＤ１９、ＣＤ２２およびＣＤ５２は、リンパ腫の治療となりうる治療の標的を表す(Grillo-Lopez A.J.等, Curr Pharm Biotechnol, 2:301-11, (2001))。ＣＤ２２は、分化の成熟した段階のみにＢ細胞表面に発現される１３５ｋＤａのＢ細胞に限定されるシアロ糖タンパク質である(Dorken, B.等, J. Immunol. 136:4470-4479 (1986))。ヒトのＣＤ２２の主な形態は、細胞外ドメインに７つのイムノグロブリンスーパーファミリドメインを含むＣＤ２２β である(図１) (Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991))。変異形態であるＣＤ２２αは、イムノグロブリンスーパーファミリドメイン３および４を欠いている(Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345:74-77 (1990))。ヒトのＣＤ２２に対するリガンド結合は、イムノグロブリンスーパーファミリドメイン１および２(エピトープ１および２とも称する)と関係していることが示されている(Engel, P.等, J. Exp. Med. 181: 1581-1586, 1995)。

【０００５】

Ｂ細胞ＮＨＬにおいて、ＣＤ２２発現は、中悪性度及び低悪性度の集団ではそれぞれ９１％から９９％まで変動する(Cesano, A.等, Blood 100:350a (2002))。ＣＤ２２は、Ｂ-細胞活性化複合体の構成成分として(Sato, S.等, Semin. Immunol. 10:287-296 (1998))、そして、接着分子として機能しうる(Engel, Pl 等, J. Immunol. 150:4719-4732 (1993))。ＣＤ２２欠損マウスのＢ細胞は寿命がより短く、アポトーシスを亢進することから、Ｂ細胞生存におけるこの抗原の重要な役割が示唆される(Otipoby, K.L.等, Nature (Lond) 384:634-637 (1996))。その天然のリガンド(一又は複数)又は抗体との結合の後、ＣＤ

２２は急速に内部移行され、原発性Ｂ細胞の強力な共刺激シグナルと腫瘍性Ｂ細胞のプロアポトーシスシグナルを生じさせる(Sato, S.等, Immunity 5:551-562 (1996))。

抗ＣＤ２２抗体は、Ｂ細胞癌や他のＢ細胞増殖性疾患のための可能性のある治療方法として研究されている。このような抗ＣＤ２２抗体には、ＲＦＢ４(Mansfield, E.等, Blood 90:2020-2026 (1997))、ＣＭＣ-５４４(DiJoseph, J.F., Blood 103:1807-1814 (2004))およびＬＬ２(Pawlak-Byczkowska, E.J.等, Cancer Res. 49: 4568-4577 (1989))が含まれる。ＬＬ２抗体(以前はＨＰＢ-２と呼ばれる)は、ＣＤ２２抗原に対するＩｇＧ２ａマウスモノクローナル抗体である(Pawlak-Byczkowska, E.J.等 (1989), supra)。インビトロ免疫組織学的な評価により、ＬＬ２抗体が５１の試験したＢ細胞ＮＨＬ試料のうちの５０と反応するが、他の悪性腫瘍又は正常な非リンパ腫組織とは反応しないことが示された。

【０００６】

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、つまり、癌の治療において腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬のために抗体-薬剤コンジュゲートを使う(Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614；Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26: 151-172；米国特許第４９７５２７８号)と、薬剤成分を腫瘍へ目的通りに運搬して、そこで細胞内蓄積させることが可能となる。コンジュゲートさせていない薬剤を全身投与すると、排除しようとする腫瘍細胞だけでなく正常な細胞に許容されないレベルの毒性が生じうる(Baldwin等, (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986): 603-05；Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera等 (ed.s), pp. 475-506)。したがって、毒性を最小限にした最大限の有効性が追求される。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はこれらの計画に有用であることが報告されている(Rowland等, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。これらの方法に用いる薬剤には、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキセートおよびビンデシンが含まれる(Rowland等, Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87 (1986))。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、リシンなどの植物毒、ゲルダナマイシン(Kerr等 (1997) Bioconjugate Chem 8(6): 781-784；Mandler等 (2000) Journal of the Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581；Mandler等 (2000) Bioorganic & Med. Chem Letters 10:1025-1028；Mandler等 (2002) Bioconjugate Chem 13:786-791)、メイタンシノイド(欧州特許第１３９１２１３号；Liu等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等, (1998) Cancer Res. 58:2928；Hinman等, (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)などの小分子毒素が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、ＤＮＡ結合又はトポイソメラーゼ阻害などの機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる(Meyer, D.L. and Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 38 (2003) Chapter 23, 229-237)。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

【０００７】

ゼバリン(ZEVALIN™)(イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のＢリンパ球の細胞表面上にみられるＣＤ２０抗原に対するマウスＩｇＧ１κモノクローナル抗体と^{111}Ｉｎ又は^{90}Ｙ放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等, (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77；Wiseman等, (2002) Blood 99(12):4336-42；Witzig等, (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63；Witzig等, (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ゼバリンはＢ細胞非ホジキンリンパ球(ＮＨＬ)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症かつ長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したｈｕＣＤ３３抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターグＴＭ(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Phar