maceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として２０００年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686；米国特許第４９７０１９８号；同第５０７９２３３号；同第５５８５０８９号；同第５６０６０４０号；同第５６９３７６２号；同第５７３９１１６号；同第５７６７２８５号；同第５７７３００１号)。ジスルフィドリンカーＳＰＰを介してメイタンシノイド薬剤成分ＤＭ１と連結しているｈｕＣ２４２抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、ＣａｎＡｇ抗原を発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に開発されている。メイタンシノイド薬剤成分ＤＭ１と連結している抗前立腺特異的膜抗原(ＰＳＭＡ)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるＭＬＮ－２７０４(Millennium Pharm, BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。同じメイタンシノイド薬剤成分であるＤＭ１は非ジスルフィドリンカーであるＳＭＣＣを介してマウスモノクローナル抗体であるＴＡ.１に連結した(Chari等 (1992) Cancer Research 52:127-131)。このコンジュゲートは、対応するジスルフィドリンカーコンジュゲートの２００分の１の強度であることが報告された。ＳＭＣＣリンカーは本明細書中で「切断可能でない」と考えた。

【０００８】

いくつかの短いペプチド化合物は海洋軟体類であるタツナミガイ(Dolabella auricularia)から単離され、生物学的な活性があることが明らかとされている(Pettit等 (1993) Tetrahedron 49:9151；Nakamura等 (1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062；Sone等 (1995) Journal Org Chem 60:4474)。これらの化合物のアナログも調製されており、いくつかは生物学的な活性を有することが明らかとされた(概要については、Pettit等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277を参照のこと)。例えば、アウリスタチンＥ(米国特許第５６３５４８３号)は、海洋天然生成物ドラスタチン１０(抗癌薬ビンクリスチンと同じチューブリン上の部位に結合してチューブリン重合を阻害する薬剤)の合成類似体である(G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem Org. Nat. Prod. 70:1-79)。ドラスタチン１０、アウリスタチンＰＥおよびアウリスタチンＥは４つのアミノ酸を有する直鎖状ペプチドであり、これらのうちの３つは化合物のドラスタチン類およびＣ末端アミドに特有である。

【０００９】

アウリスタチンペプチドである、アウリスタチンＥ(ＡＥ)とドラスタチンの合成類似体であるモノメチルアウリスタチン(ＭＭＡＥ)は、(i) キメラモノクローナル抗体ｃＢＲ96(カルチノーマ上のルイスＹに特異的)、(ii) 血液の悪性腫瘍上のＣＤ３０に特異的であるｃＡＣ１０(Klussman,等 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773；Doronina等 (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784；"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco等 (2003) Blood 102(4): 1458-1465；米国公開特許２００４／００１８１９４)、(iii) ＣＤ２０発現癌および免疫不全の治療のためのリツキサン(登録商標)(リツキシマブ)(国際公開第０４／０３２８２８号)などの抗ＣＤ２０抗体、(iv) 結腸直腸癌の治療のための抗ＥｐｈＢ２抗体２Ｈ９及び抗ＩＬ-８(Mao,等 (2004) Cancer Research 64(3): 781-788)、(v) Ｅセレクチン抗体(Bhaskar等 (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394)、及び(vi) 他の抗ＣＤ３０抗体(国際公開第03/043583号)にコンジュゲートした。モノメチルアウリスタチン(ＭＭＡＥ)もまた、マウスとヒトの間で近い相同性を有するタイプ１ＴＭチロシンキナーゼレセプターであり、結腸直腸癌細胞で過剰発現されるＥｐｈＢ２Ｒに対する抗体である２Ｈ９にコンジュゲートされた(Mao等 (2004) Cancer Res. 64: 781-788)。

Ｃ末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチンＥ(ＭＭＡＥ)の変異体であるモノメチルアウリスタチンＭＭＡＦ(米国特許第５７６７２３７号；米国特許第６１２４４３１号)は、ＭＭＡＥより弱いが、モノクローナル抗体にコンジュゲートした場合により強いことが報告されている(Senter等, Proceedings fo the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004)。アウリスタチンＦフェニレンジアミン(ＡＦＰ)；ＭＭＡＥのフェニルアラニン変異体は、フェニレ

ンジアミンスペーサーにより１Ｆ６のＣ末端を介して抗ＣＤ７０ｍＡｂである１Ｆ６に連結した(Law等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 625, presented March 28, 2004)。

【００１０】

また、抗ＣＤ２２抗体-毒素コンジュゲートも可能性のある治療用化合物として研究されている。例えば、初期の報告では、潜在的な抗癌剤としての抗ＣＤ２２に対するリシンＡ鎖を含有するイムノトキシンが記載された(May, R.D.等, Chemical Abstracts 106(21): 168656x pages 35-36 (1987) ; Ghetie, M A.等, Cancer Research 48: 2610-2617 (1988) ; 及びAmlot, P.L.等, Blood 82(9): 2624-2633 (1993))。毒素が放射性同位体である場合、ＬＬ２のヒト化(ＣＤＲを移植した) ＩｇＧ１型であるエピラツズマブは、ラジオイムノコンジュゲートのための治療的活性の所見が認められた(Juweid, M E.等, Clin. Cancer Res. 5 (Suppl 10): 3292s-3303s (1999) ; Griffiths, G.L.等, J. Nucl. Med. 44: 77-84 (2003) ; Linden, O.等, Clin. Cancer Res. 5(suppl 10): 3287s-3291s (1999))。

【００１１】

非ホジキンリンパ腫などのリンパ腫及び他のＢ細胞増殖性疾患などのＢ細胞関連の癌を治療するための更なる薬剤に対して当分野では需要がある。この目的のために特に有用な薬剤には、有意に毒性が低いが、有益な治療的有効性がある、Ｂ細胞を標的とした抗ＣＤ２２抗体-薬剤コンジュゲートが含まれる。これら及び他の制限ないしは過去の問題点は本発明によって解決される。

本出願中のすべての文献の引用は、この文献が本出願の先行技術であることを認めるものではない。特許、特許出願および刊行物を含む本明細書中で引用したすべての文献は、出典明記によってこれらの全体を援用する。

【発明の概要】

【００１２】

本発明は抗ＣＤ２２抗体およびその使用方法を提供する。

一態様では、ＣＤ２２に結合する抗体であって、

(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：１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、
(5) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び、
(6) 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、５つ又は６つのＨＶＲを含んでなる抗体が提供される。

他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：１０の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、及び、
(6) 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。

【００１３】

他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：９の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、及び、

(6) 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。
他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３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：９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、
(4) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び、
(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。
他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３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：１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、
(4) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び、
(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。

【００１４】

一実施態様では、抗体は、配列番号：１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１を含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、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とを含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２と、配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ３とを含んでなる。

ある実施態様では、前記の抗体のいずれかはさらに、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。

一態様では、ＣＤ２２に結合する抗体であって、配列番号：１６のアミノ酸配列に、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる抗体が提供される。一実施態様では、抗体は配列番号：１６の重鎖可変ドメインを含んでなる。

一態様では、抗体はさらに、配列番号：１７のアミノ酸配列に、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は配列番号：１７の軽鎖可変ドメインを含んでなる。

一態様では、抗体はさらに、配列番号：１８のアミノ酸配列に、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は配列番号：１８の軽鎖可変ドメインを含んでなる。

一実施態様では、抗体は、配列番号：１６のアミノ酸配列に、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：１７のアミノ酸配列に、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は、配列番号：１６のアミノ酸配列に、少なくとも９０％、少なく

とも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：１８のアミノ酸配列に、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、重鎖可変ドメインは配列番号：１６のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号：１７のアミノ酸配列を含む。一実施態様では、重鎖可変ドメインは配列番号：１６のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号：１８のアミノ酸配列を含む。

【００１５】

ある実施態様では、前記の抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドが提供される。一実施態様では、ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。一実施態様では、ベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施態様では、宿主細胞は真核細胞である。一実施態様では、宿主細胞はチャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞である。一実施態様では、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宿主細胞を培養し、抗体を単離することを含んでなる、抗ＣＤ２２抗体の作製方法が提供される。

一態様では、細胞の表面に発現されるＣＤ２２に結合する抗体が提供される。一実施態様では、抗体は、ドメイン１又はドメイン２又はドメイン１と２を含むヒト又はマウスのＣＤ２２の領域内のエピトープに結合する。一実施態様では、細胞は哺乳類の細胞である。一実施態様では、細胞はヒト細胞である。一実施態様では、細胞は癌細胞である。一実施態様では、細胞はＢ細胞である。一実施態様では、癌細胞はＢ細胞である。

ある実施態様では、前記いずれかの抗体はモノクローナル抗体である。一実施態様では、抗体は、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。一実施態様では、抗体はヒト化される。一実施態様では、抗体はヒトである。

【００１６】

一態様では、ＣＤ２２への抗体の結合に許容される条件下で前記いずれか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が提供される。一実施態様では、生体試料はＢ細胞を含む。一実施態様では、生体試料は、Ｂ細胞障害及び/又はＢ細胞増殖性疾患、例えば限定するものではないが、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に罹っている哺乳動物又は罹っていると疑われる哺乳動物のものである。

一態様では、ＣＤ２２の発現増加と関係している細胞増殖性疾患を診断する方法であって、前記いずれかの抗体に試験細胞を接触させ、ＣＤ２２への抗体の結合を検出することによってＣＤ２２の発現レベルを決定し、そして、試験細胞によるＣＤ２２の発現のレベルをコントロール細胞によるＣＤ２２の発現のレベルと比較することを含み、コントロール細胞と比較して試験細胞によるＣＤ２２の発現レベルが高い場合に、ＣＤ２２の発現増加と関係する細胞増殖性疾患の存在が示される方法が提供される。一実施態様では、試験細胞は、Ｂ細胞増殖性疾患などの細胞増殖性疾患があると疑われる患者のものである。一実施態様では、細胞増殖性疾患は、限定するものではないが、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などの、Ｂ細胞障害から選択される。一実施態様では、前記方法は、試験細胞の表面上のＣＤ２２の発現レベルを決定して、試験細胞の表面上のＣＤ２２の発現レベルをコントロール細胞の表面上のＣＤ２２の発現レベルと比較することを含んでなる。

【００１７】
一態様では、ＣＤ２２を発現するＢ細胞などの細胞の増加に関連する細胞増殖性疾患を診断する方法であって、生体試料中の試験細胞を前記いずれかの抗体と接触させて、ＣＤ２２への抗体の結合を検出することによって、試料中の試験細胞に結合した抗体のレベルを決定し、そして、コントロール試料中の細胞に結合した抗体のレベルを比較することを含み、結合した抗体のレベルを、試験試料とコントロール試料中のＣＤ２２発現細胞の数に正規化し、コントロール試料と比較して試験試料中で結合した抗体のレベルが高い場合に、ＣＤ２２を発現する細胞と関連する細胞増殖性疾患の存在が示される方法が提供される。
一態様では、血液又は血清中の可溶性ＣＤ２２を検出する方法であって、Ｂ細胞増殖性疾患に罹っていることが疑われる哺乳動物の血液又は血清の試験試料を本発明の抗ＣＤ２２抗体と接触させ、そして、正常哺乳動物の血液又は血清のコントロール試料と比べて試験試料中の可溶性ＣＤ２２が増加していることを検出することを含む方法が提供される。ある実施態様では、検出する方法は、哺乳動物の血液又は血清中の可溶性ＣＤ２２の増加と関連するＢ細胞増殖性疾患を診断する方法として有用である。
【００１８】
一態様では、本発明の抗体は、国際公開第２００６／０３４４８８(本明細書において出典明記によって全体が援用される)に開示されるように、親抗体の一又は複数のアミノ酸が遊離したシステインアミノ酸に置換されるシステイン改変抗体を包含する。したがって、抗ＣＤ２２抗体のいずれかの形態が改変、すなわち変異されてもよい。例えば、親Ｆａｂ抗体断片を改変して、本明細書中で「ＴｈｉｏＦａｂ」と称するシステイン改変Ｆａｂを形成してもよい。同様に、親のモノクローナル抗体を改変して、「ＴｈｉｏＭａｂ」を形成してもよい。単一の部位突然変異によりＴｈｉｏＦａｂの単一の改変したシステイン残基が生じるのに対して、ＩｇＧ抗体の二量体の性質のためにＴｈｉｏＭａｂでは、単一の部位突然変異により２つの改変したシステイン残基が生じる。本発明のシステイン改変抗ＣＤ２２抗体には、主に細胞関連のＣＤ２２ポリペプチドを結合するモノクローナル抗体、ヒト化ないしはキメラのモノクローナル抗体、および抗体の抗原結合断片、融合ポリペプチドおよびアナログが含まれる。あるいは、システイン改変抗体は、必ずしも親抗体を変える必要はなく、例えばファージディスプレイ抗体の設定や選別によって、又は軽鎖及び／又は重鎖フレームワーク配列と定常領域のデノボ設定によって、抗体の配列設定及び／又は選別により生じる、抗体又はＦａｂの本明細書において開示される位置にシステインを含む抗体を包含する。システイン改変抗体は、０．６～１．０、０．７～１．０又は０．８～１．０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。遊離したシステインアミノ酸は、親抗体内で改変されているシステイン残基であり、ジスルフィド架橋の一部でない。システイン改変抗体は、例えばマレイミド又はハロアセチルによる改変されたシステインの部位での、細胞障害性化合物および／または造影(イメージング)化合物の接着に有用である。Ｃｙｓ残基のチオール官能基のマレイミド基に対する求核反応性は、リジン残基のアミノ基又はＮ末端アミノ基などのタンパク質の任意の他のアミノ酸官能基の、およそ１０００倍である。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬のチオール特異的官能基はアミン基と反応するが、より高いｐＨ(＞９．０)およびより長い反応時間が必要とされるであろう必要かもしれない(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。
【００１９】
ある実施態様では、本発明のシステイン改変抗ＣＤ２２抗体は以下のいずれか一の位置に改変したシステインを含み、この位置は、軽鎖ではカバット等(Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照)に従った、重鎖(Ｆｃ領域を含む)ではＥＵ番号付け(上掲のKabat等 (1991)を参照)に従った数であり、図１７Ａの下線で示す軽鎖定常領域は位置１０８(カバット番号付け)で始まり、図１７Ｂおよび１７Ｃの下線で示す重鎖定常領域は位置１１８(ＥＵ番号付け)で始まる。また、位置は、図１７Ａ～１７Ｃに

示す完全長軽鎖ないしは重鎖のアミノ酸を順次番号付けする際にその位置で表されてもよい。本発明の一実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、ＬＣ-Ｖ２０５Ｃに改変されたシステインを含む(カバット番号：Ｖａ１２０５、図１７Ａの順次番号２１０はその位置でＣｙｓになるように改変される)。軽鎖の改変されたシステインを図１７Ａにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、ＨＣ-Ａ１１８Ｃに改変されたシステインを含む(ＥＵ番号：Ａｌａ１１８、図１７Ｂの順次番号１２１はその位置でＣｙｓになるように改変される)。重鎖の改変されたシステインを図１７Ｂにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、Ｆｃ-Ｓ４００Ｃに改変されたシステインを含む(ＥＵ番号：Ｓｅｒ４００、図１７Ｃの順次番号４０３はその位置でＣｙｓになるように改変される)。重鎖のＦｃ領域の改変されたシステインを図１７Ｃにおいて太字の二重下線で示す。他の実施態様では、重鎖(Ｆｃ領域を含む)の改変したシステインは、(ＥＵ番号付けによる)４１、８８、１１６、１１８、１２０、１７１、２８２、３７５又は４００のうちのいずれか一の位置にある。ゆえに、本発明の親の抗ＣＤ２２抗体のこれらの位置のアミノ酸の変化は、Ａ４１Ｃ、Ａ８８Ｃ、Ｓ１１６Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ｔ１２０Ｃ、Ａ１７１Ｃ、Ｖ２８２Ｃ、Ｓ３７５Ｃ又はＳ４００Ｃである。他の実施態様では、軽鎖の改変されたシステインは、(カバット番号付けによる)１５，４３，１１０，１４４，１６８，２０５のいずれか一の位置にある。ゆえに、本発明の親の抗ＣＤ２２抗体のこれらの位置のアミノ酸の変化は、Ｖ１５Ｃ、Ａ４３Ｃ、Ｖ１１０Ｃ、Ａ１４４Ｃ、Ｓ１６８Ｃ又はＶ２０５Ｃである。

【００２０】

システイン改変抗ＣＤ２２抗体は一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含み、該システイン改変抗ＣＤ２２抗体がＣＤ２２ポリペプチドに結合するものであり、親の抗ＣＤ２２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、このとき該親抗体が以下から選択される少なくとも一つのＨＶＲ配列を含むものである。

(a) ＨＶＲ-Ｌ１配列 ＲＳＳＱＳＩＶＨＳＮＧＮＴＦＬＥ(配列番号：９)又は配列 ＲＳＳＱＳＩＶＨＳＶＧＮＴＦＬＥ(配列番号：１０)(図２Ｂ)、
(b) ＨＶＲ-Ｌ２配列 ＫＶＳＮＲＦＳ配列番号：１２(図２Ｂ)、
(c) ＨＶＲ-Ｌ３配列 ＦＱＧＳＱＦＰＹＴ(配列番号：１４)(図２Ｂ)、
(d) ＨＶＲ-Ｈ１配列 ＧＹＥＦＳＲＳＷＭＮ(配列番号：２)(図２Ａ)、
(e) ＨＶＲ-Ｈ２配列 ＧＲＩＹＰＧＤＧＤＴＮＹＳＧＫＦＫＧ(配列番号：４(図２Ａ)、及び(f) ＨＶＲ-Ｈ３配列 ＤＧＳＳＷＤＷＹＦＤＶ(配列番号：６)(図２Ａ)。

ある態様では、本発明は、本明細書において開示した完全長アミノ酸配列を有するシステイン改変抗体、又は本明細書において開示したシグナルペプチドを欠くシステイン改変抗体アミノ酸配列に対して、少なくともおよそ８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくともおよそ８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、システイン改変抗ＣＤ２２抗体に関する。

【００２１】

より更なる態様では、本発明は、(a) 本明細書に開示した完全長アミノ酸配列を有するシステイン改変抗体、(b) 本明細書に開示したシグナルペプチドを欠くシステイン改変抗体アミノ酸配列、(c) 本明細書に開示した、シグナルペプチドを持つ又は持たない、膜貫通型システイン改変抗体タンパク質の細胞外ドメイン、(d) 本明細書に開示したいずれかの核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、又は(e) 本明細書に開示した完全長システイン改変抗体アミノ酸配列の任意の他の特異的に定義される断片、をコードするＤＮＡ分子の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離されたシステイン改変抗ＣＤ２２抗体に関する。

特定の態様では、本発明は、Ｎ末端シグナル配列を持たないおよび／または開始メチオニンを持たない単離されたシステイン改変抗ＣＤ２２抗体を提供し、この抗体は本明細書

中に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる。本明細書中ではまた、前記抗体を産生する方法を記載しており、これらの方法は、システイン改変抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からシステイン改変抗体を回収することを含んでなる。

本発明の他の態様では、膜貫通ドメインを削除するか膜貫通ドメインを不活性化してある単離されたシステイン改変抗ＣＤ２２抗体を提供する。本明細書中ではまた、前記抗体を産生する方法を記載しており、これらの方法は、システイン改変抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からシステイン改変抗体を回収することを含んでなる。

【００２２】

他の実施態様では、本発明は、異種性(非ＣＤ２２)のポリペプチドに融合させた、本明細書中に記載したいずれかのシステイン改変抗体を含む、単離された抗ＣＤ２２キメラシステイン改変抗体を提供する。このようなキメラ分子の例は、例えばエピトープタグ配列又はイムノグロブリンのＦｃ領域などの異種性のポリペプチドに融合させた、本明細書中に記載したいずれかのシステイン改変抗体を含む。

システイン改変抗ＣＤ２２抗体は、それぞれの抗原エピトープへの抗ＣＤ２２ポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害するモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又は抗体であってもよい。本発明の抗体は場合によって、例えばアウリスタチン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解性の酵素などを含む毒素などの増殖阻害性剤ないしは細胞障害性剤にコンジュゲートさせてもよい。本発明の抗体は場合によって、ＣＨＯ細胞又は細菌内で産生され、結合する細胞の成長ないし増殖を阻害するか、又は死を誘導することが好ましい。診断目的のために、本発明の抗体は、固体担体などに付着して検出可能に標識されてもよい。

本発明の他の実施態様では、本発明は、本明細書中に記載したいずれかの抗ＣＤ２２抗体及び抗ＣＤ２２システイン改変抗体をコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。また、このいずれかのベクターを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞又は酵母であってもよい。さらに、本明細書中に記載のいずれかのポリペプチドを産生するための方法が提供され、所望のポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含んでなる。

【００２３】

システイン改変抗体は癌の治療において有用であり、細胞表面および膜貫通型レセプター、および腫瘍関連抗原(ＴＡＡ)に特異的な抗体が含まれる。このような抗体は、ネイキッド抗体(薬剤又は標識成分にコンジュゲートしていない)として、あるいは抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)として用いられてもよい。本発明のシステイン改変抗体は、チオール反応性の試薬と、部位特異的かつ効率的にカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能リンカー試薬、キャプチャー標識試薬、蛍光体試薬又は薬剤-リンカー中間生成物であってもよい。システイン改変抗体は、検出可能な標識により標識され、固相担体に固定され、および／または、薬剤成分とコンジュゲートされもよい。Ｌ-１０からＬ-２０、Ｌ-３８からＬ-４８、Ｌ-１０５からＬ-１１５、Ｌ-１３９からＬ-１４９、Ｌ-１６３からＬ-１７３のアミノ酸範囲から選択される軽鎖の範囲内、及びＨ-３５からＨ-４５、Ｈ-８３からＨ-９３、Ｈ-１１４からＨ-１２７、及びＨ-１７０からＨ-１８４のアミノ酸範囲から選択される重鎖の範囲内、及びＨ-２６８からＨ-２９１、Ｈ-３１９からＨ-３４４、Ｈ-３７０からＨ-３８０、及びＨ-３９５からＨ-４０５から選択される範囲内のＦｃ領域において、反応性のシステインアミノ酸によるアミノ酸の置換を持つ抗体に対してチオール反応が生じうる。このとき、アミノ酸位の番号付けはカバット番号付けシステム(Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)の位置１から始め、その後は国際公開第2006034488号に開示されるように、順次続ける。また、チオール反応は、抗体の特定のドメイン、例えば軽鎖定常ドメイン(ＣＬ)および重鎖定常ドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３に対して生じうる。０．６以上のチオール反応値となるシステイ

ン置換は、インタクト抗体、つまりＩｇＧサブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡおよびＩｇＡ２を含むＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭの重鎖定常ドメインα、δ、ε、γおよびμにあってもよい。このような抗体およびそれらの使用は、国際公開第２００６／０３４４８８号に開示される。

【００２４】

本発明のシステイン改変抗体は、それらの野生型、親抗体相当物の抗原結合能を保持するのが好ましい。ゆえに、システイン改変抗体は、抗原へ結合することができる、好ましくは抗原に特異性がある。このような抗原には、例えば、腫瘍関連抗原(ＴＡＡ)、細胞表面レセプタータンパク質および他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達又は分化に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に伴う分子、脈管形成に伴う分子、および血管新生に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子が含まれる。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子(すなわち、ＣＤ２２を含むがこれに限定しないＣＤタンパク質)であってもよい。本発明のシステイン改変抗ＣＤ２２抗体は、それらの親抗ＣＤ２２抗体相当物の抗原結合能を保持する。ゆえに、本発明のシステイン改変抗ＣＤ２２抗体は、Ｂ細胞などの細胞の表面上に抗原が発現される場合を含め、ヒトの抗ＣＤ２２アイソフォームβおよび／またはαを含むＣＤ２２抗原に結合することができ、好ましくはそれに対して特異性を有する。

本発明の抗体は、反応基が例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性のコンジュゲートパートナーである場合に、他のチオール反応性剤にコンジュゲートされもよい(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。パートナーは、細胞障害性剤(例えばドキソルビシン又は百日咳毒素などの毒素)、蛍光体、例としてフルオレセイン又はローダミンのような蛍光色素、造影又は放射線治療用金属のためのキレート剤、ペプチジル又は非ペプチジル標識又は検出用タグ、又は様々なアイソフォームのポリエチレングリコールなどのクリアランス-改善剤、第三成分に結合するペプチド、又は他の炭水化物又は親油性剤であってもよい。

【００２５】

一態様では、本発明の抗体は、反応性成分、活性化成分、又は反応性システインチオール基によって抗体に共有結合して付着されうる標識成分とコンジュゲートされてもよい(Singh等 (2002) Anal. Biochem 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL)。付着された標識は、(i) 検出可能なシグナルを提供する、(ii) 第二標識と反応して、例えばＦＲＥＴ(蛍光共鳴エネルギー転移)が生じるように第一又は第二標識によって生じる検出可能なシグナルを改変する、(iii) 抗原又はリガンドとの相互作用を安定させるかまたは結合の親和性を増加する、(iv) 電荷、疎水性、形状又は他の物理学的なパラメータによって可動性、例えば電気泳動易動度又は細胞透過性に作用する、又は(v) キャプチャー成分を与えて、リガンド親和性、抗体／抗原結合又はイオン錯体形成を調節する、ように機能しうる。

【００２６】

標識したシステイン改変抗体は、例えば、特定の細胞、組織又は血清における対象の抗原の発現を検出するための診断的検査法に有用となりうる。診断用適用のために、抗体は一般的に検出可能な成分ににより標識されるであろう。多くの標識が利用可能であり、通常、以下のカテゴリに分類することができる：

ラジオアイソトープ(放射性核種)、例えば^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{3}

^{5}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、又は^{213}Ｂｉ。放射性同位体標識抗体は、レセプター標的撮像実験において有用である。抗体は、Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen等, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)のCurrent Protocolsに記載される技術を用いて、リガンド試薬が抗体の改変システインチオールと反応性がある場合に、キレートを結合するか、あるいはラジオアイソトープ金属と複合化する該リガンド試薬により標識することができる。金属イオンを複合化しうるキレートリガンドには、ＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡおよびＴＥＴＡ(Macrocyclics, Dallas, TX)が含まれる。放射性核種は、本発明の抗体-薬剤コンジュゲートとの複合体化によりターゲティングされうる(Wu等 (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-1146)。

【００２７】

ＤＯＴＡ-マレイミド(４-マレイミドブチルアミドベンジル-ＤＯＴＡ)などのリンカー試薬は、イソプロピルクロロフォルメート(Aldrich)によって活性化される４-マレイミド酪酸(Fluka)とアミノベンジル-ＤＯＴＡを反応させて、その後Axworthy等 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1802-1807の手順によって調製されうる。ＤＯＴＡ-マレイミド試薬は、システイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸と反応して、抗体上の金属錯体形成リガンドを提供する(Lewis等 (1998) Bioconj. Chem 9:72-86)。ＤＯＴＡ-ＮＨＳ(１，４，７，１０-テトラアザシクロドデカン-１，４，７，１０-四酢酸モノ(Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドエステル)などのキレート化リンカー標識試薬は市販されている(Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核種標識抗体によるレセプター標的造影は、腫瘍組織の抗体の進行性蓄積の検出および定量化によって経路活性化のマーカーとなりうる(Albert等 (1998) Bioorg. Med. Chem Lett. 8:1207-1210)。コンジュゲートした放射性金属はリソソーム分解後に細胞内に残りうる。

造影実験のための抗体標識として好適な金属-キレート複合体は以下に開示される。米国特許第５３４２６０６号、米国特許第５４２８１５５号、米国特許第５３１６７５７号、米国特許第５４８０９９０号、米国特許第５４６２７２５号、米国特許第５４２８１３９号、米国特許第５３８５８９３号、米国特許第５７３９２９４号、米国特許第５７５０６６０号、米国特許第５８３４４５６号、Hnatowich等 (1983) J. Immunol. Methods 65: 147-157; Meares等 (1984) Anal. Biochem 142:68-78; Mirzadeh等 (1990) Bioconjugate Chem 1:59-65; Meares等 (1990) J. Cancer1990, Suppl. 10:21-26; Izard等 (1992) Bioconjugate Chem 3:346-350; Nikula等 (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 2105-2110; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Camera等 (1994) J. Nucl. Med. 21: 640-646; Ruegg等 (1990) Cancer Res. 50: 4221-4226; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Lee等 (2001) Cancer Res. 61: 4474-4482; Mitchell,等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1105-1112; Kobayashi等 (1999) Bioconjugate Chem 10:103-111; Miederer等 (2004) J. Nucl. Med. 45: 129-137; DeNardo等 (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend等 (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula等 (1999) J. Nucl. Med. 40: 166-76; Kobayashi等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 829-36; Mardirossian等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli等 (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

【００２８】

(b) 蛍光標識、例えば希有土類キレート(ユウロピウムキレート)、ＦＩＴＣ、５-カルボキシフルオレセイン、６カルボキシフルオレセインを含むフルオレセイン種；ＴＡＭＲＡを含むローダミン種；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；及びこれらの類似体。蛍光標識は、例えば、上記のImmunologyのCurrent Protocolsに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光色素および蛍光標識試薬には、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR)およびPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)から市販されているものが含まれる。

【００２９】
(c) 様々な酵素基質標識は利用可能であり、開示されてもいる(米国特許第４２７５１４９号)。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定することができる色素生産性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定することができる基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変えうる。蛍光の変化を定量化する技術は上記の通りである。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、測定することができる(例えば化学ルミノメーターを用いて)か、またはエネルギーを蛍光受容基に与える光を発しうる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第４７３７４５６号)、ルシフェリン、２，３-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、リンゴ酸酵素、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(ＡＰ)、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-６-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環のオキシダーゼ(例えばウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivan等, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

【００３０】
酵素基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる：
(i) 基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)、ここで水素ペルオキシダーゼが染料前駆(例えば、オルソフェニレン(orthophenylene)ジアミン(ＯＰＤ)又は３，３'，５，５'テトラメチルのベンジジン塩酸塩(ＴＭＢ))を酸化する；
(ii) 色素生産性基質としてリン酸パラグラフ-ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ(ＡＰ)；及び
(iii) 色素生産性基質(例えばｐ-ニトロフェニル-β-Ｄ-ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質４-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)-β-Ｄ-ガラクトシダーゼを有するβ-Ｄ-ガラクトシダーゼ(β-Ｄ-Ｇａｌ)。
多数の他の酵素基質の組合せは当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第４２７５１４９号および同第４３１８９８０号を参照。

【００３１】
標識は、アミノ酸側鎖、活性化されたアミノ酸側鎖、システイン改変抗体などと間接的にコンジュゲートされてもよい。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した大きな３つの分類のうちの何れかはアビジン又はストレプトアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にストレプトアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、ポリペプチド変異体と標識とを間接的にコンジュゲートさせるために、ポリペプチド変異体は小ハプテン(例えばジゴキシン)とコンジュゲートさせ、前述した標識の異なるタイプのうちの１つは抗ハプテンポリペプチド変異体(例えば抗ジゴキシン抗体)とコンジュゲートさせる。したがって、ポリペプチド変異体と標識は間接的にコンジュゲートすることができる(Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego)。

【００３２】
本発明の抗体は、任意の公知のアッセイ方法、例えばＥＬＩＳＡ、競合結合アッセイ、直接的および間接的なサンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイに用いられてもよい(Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.)。
検出標識は、結合又は認識事象を局所化し、視覚化して、数量化するために有用となり

うる。本発明の標識抗体は細胞表面レセプターを検出しうる。検出可能に標識した抗体についての他の使用は、蛍光標識抗体とビーズをコンジュゲートさせ、リガンド結合時の蛍光シグナルを検出することを含む、ビーズに基づく免疫キャプチャの方法である。同様の結合検出方法論は、表面プラスモン共鳴(ＳＰＲ)効果を利用して抗体-抗原相互作用を測定して検出するものである。

蛍光色素および化学発光色素などの検出標識(Briggs等 (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem Soc., Perkin-Trans. 1: 1051-1058)は検出可能なシグナルを提供し、通常、好ましくは以下のような特性により標識化抗体に応用することができる。(i) 標識抗体は、少量の抗体が無細胞アッセイおよび細胞に基づくアッセイにおいて敏感に検出されるように低いバックグランドで非常に高いシグナルを産生するものである、さらに、(ii) 標識抗体は、有意に写真を退色させることなく蛍光シグナルが観察され、モニターされ、記録されるように、光安定性を有するものである。膜又は細胞表面、特に生きている細胞への標識抗体の細胞表面結合を伴う用途では、標識は、(iii) 有効なコンジュゲート濃度と検出感度が達成されるように良好な水溶性であり、(iv) 細胞の正常な代謝過程が破壊されないか、又は早期に細胞死を引き起こさないように生きている細胞に対して毒性がないことが好ましい。

【００３３】

細胞性蛍光強度の直接の定量化と蛍光標識事象、例えば、ペプチド-色素コンジュゲートの細胞表面結合の算出は、生きている細胞又はビーズによる非放射性アッセイである、混合と読み取り(mix-and-read)を自動化するシステム(ＦＭＡＴ(登録商標) ８１００ ＨＴＳシステム、Applied Biosystems, Foster City, Calif.)で実施してもよい(Mraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4: 193-204)。また、標識抗体の使用には、細胞表面レセプター結合アッセイ、イムノキャプチャアッセイ、蛍光結合免疫吸着アッセイ(ＦＬＩＳＡ)、カスパーゼ切断(Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 618-23；米国特許第６３７２９０７号)、アポトーシス(Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184: 39-51)および細胞障害性アッセイが含まれる。蛍光定量的マイクロ体積アッセイ技術を用いて、細胞表面を標識とする分子によって上方制御または下方制御を同定することができる(Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem 271: 143-51)。

【００３４】

本発明の標識抗体は、様々な方法及び以下のような生医学的かつ分子的撮像法の技術によってバイオマーカーやプローブを造影する際に有用である。(i) ＭＲＩ(磁気共鳴画像法)、(ii) ＭｉｃｒｏＣＴ(コンピューター断層撮影法)、(iii) ＳＰＥＣＴ(単一光子放射型コンピュータ断層撮影法)、(iv) ＰＥＴ(ポジトロン放出断層撮影) Chen等 (2004) Bioconjugate Chem 15: 41-49、(v) バイオルミネセンス、(vi) 蛍光、及び(vii) 超音波。イムノシンチグラフィは、放射性物質にによって標識された抗体が動物又はヒト患者に投与される造影手順であり、画像は抗体が局在する身体の部位のものである(米国特許第６５２８６２４号)。造影バイオマーカーは、客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、又は治療的介入に対する薬理学的応答の指標として評価されてもよい。バイオマーカーはいくつかの種類がある。タイプ０は、疾患の自然な成長マーカーであって、公知の臨床指標、例えば関節リウマチの滑液炎症のＭＲＩ評価と縦方向に相関する。タイプＩマーカーは、例えばメカニズムが臨床転帰と関係していなくても、作用のメカニズム(mechanism-of-action)の関係として介入の効果を捕らえる。タイプＩＩマーカーは代理のエンドポイントとして機能するものであり、該バイオマーカーの変化又は該バ

イオマーカーのシグナルから、関節リウマチの骨浸食をＣＴで測定するなどの目的の応答を「有効と認める」ために臨床的な利点を予測する。したがって、造影バイオマーカーは、(i) 標的タンパク質の発現、(ii) 標的タンパク質に対する治療用の結合、すなわち選択性、および(iii) クリアランスおよび半減期の薬物動態学的データについての薬物動態学的(ＰＤ)治療的情報を提供しうる。研究室ベースのバイオマーカーと比較したときのインビボ造影バイオマーカーの利点には、非侵襲性処置、定量化できる、全身評価、反復性投与及び評価、すなわち複数の時点の投与と評価、及び臨床前(小動物)の結果を臨床(ヒト)の結果に潜在的に置き換えることができる結果が含まれる。用途によっては、バイオイメージングは、前臨床研究の多くの動物実験の代替となるかまたは最小化する。

【００３５】

ペプチド標識方法は周知である。Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem 1:2; Glazer等 (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York; 及びWong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez等 (2004) Chem Eur. J. 10:1149-1155; Lewis等 (2001) Bioconjugate Chem 12:320-324; Li等 (2002) Bioconjugate Chem 13:110-115; Mier等 (2005) Bioconjugate Chem 16:240-237を参照。

十分近接した蛍光レポーターとクエンチャーの２つの成分にて標識されたペプチドとタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー転移(ＦＲＥＴ)を受ける。レポーター基は、一般的に、特定の波長で光に励起され、エネルギーをアクセプター又はクエンチャーに転移して、その結果、最大の明るさで発光するための適切なストークスシフトが生じる蛍光色素である。蛍光色素には、広範な芳香族性を有する分子、例としてフルオレセインおよびローダミン、ないしこれらの誘導体が含まれる。蛍光レポーターは、完全なペプチドのクエンチャー成分によって部分的あるいは有意に失活されうる。ペプチダーゼ又はプロテアーゼによるペプチドの切断時に、蛍光の検出可能な増加が測定されうる(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

【００３６】

また、本発明の標識抗体は親和性精製剤として用いられてもよい。この方法では、標識抗体は、当分野で公知の方法を用いて、セファデックス樹脂又は濾紙などの固相に固定される。固定された抗体は、精製される抗原を含む試料と接触させ、その後、支持体を、精製される抗原以外の試料中の実質的にすべての物質を取り除く適切な溶媒にて洗浄し、固定されたポリペプチド変異体に結合させる。最後に、抗原をポリペプチド変異体から放すように、支持体を他の適切な溶媒、例えばグリシンバッファ、ｐＨ５．０にて洗浄する。

標識化試薬は、一般的に、(i) 標識抗体を形成するためにシステイン改変抗体のシステインチオールと直接、(ii) リンカー-標識中間生成物を形成するためにリンカー試薬と、又は(iii) 標識抗体を形成するためにリンカー抗体と、反応しうる反応官能基を保持する。標識試薬の反応性官能基には、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル(例えば、ＮＨＳ、N-ヒドロキシスクシンイミド)、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、２，６-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、およびホスホラミダイトが含まれるが、他の官能基も用いられてよい。

【００３７】

例示的な反応性官能基は、検出可能な標識、例えばビオチンや蛍光色素のカルボキシル

置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(ＮＨＳ)である。標識のＮＨＳエステルを予め造っても、単離しても、及び／又は特徴付けてもよく、あるいはインサイツで形成して、抗体の求核基と反応させてもよい。典型的には、標識のカルボキシル型を、カルボジイミド試薬、例としてジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、又はユーロニウム試薬、例としてＴＳＴＵ（Ｏ-(Ｎ-スクシンイミジル)-Ｎ,Ｎ,Ｎ',Ｎ'-テトラメチルユーロニウム テトラフルオロボレート)、ＨＢＴＵ（Ｏ-ベンゾトリアゾール-１-イル)-Ｎ,Ｎ,Ｎ',Ｎ'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、又はＨＡＴＵ（Ｏ-(７-アザベンゾトリアゾール-１-イル)-Ｎ,Ｎ,Ｎ',Ｎ'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、標識のＮＨＳエステルを与えるためのアクチベーター、例えば１-ヒドロキシベンゾトリアゾール(ＨＯＢｔ)、及びＮ-ヒドロキシスクシンイミドのいくつかの組み合わせと反応させることによって活性化する。場合によって、標識のインサイツ活性化と抗体との反応によって標識と抗体をカップリングさせて、一工程で標識-抗体複合体を形成させてもよい。他の活性化試薬及びカップリング試薬には、ＴＢＴＵ（２-(１Ｈ-ベンゾトリアゾ-１-イル)-１-１,３,３-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、ＴＦＦＨ（Ｎ,Ｎ',Ｎ'',Ｎ'''-テトラメチルユーロニウム ２-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート)、ＰｙＢＯＰ（ベンゾトリアゾール-１-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、ＥＥＤＱ（２-エトキシ-１-エトキシカルボニル-１,２-ジヒドロ-キノリン)、ＤＣＣ（ジシクロヘキシルカルボジイミド)；ＤＩＰＣＤＩ（ジイソプロピルカルボジイミド)、ＭＳＮＴ（１-(メシチレン-２-スルホニル)-３-ニトロ-１Ｈ-１,２,４-トリアゾール、及びアリール スルホニル ハロゲン化物、例えばトリイソプロピルベンゼンスルホニル クロライドが含まれる。

【００３８】

本発明のアルブミン結合ペプチド-Ｆａｂ化合物：

一態様では、本発明の抗体はアルブミン結合タンパク質に融合される。血漿タンパク質結合は、生存が短い分子の薬物動態学的性質を向上させる有効な手段となりうる。アルブミンは血漿中で最も多いタンパク質である。血清アルブミン結合ペプチド類(ＡＢＰ)は、組織取り込み、浸透および拡散の変更を含む、融合した活性なドメインタンパク質の薬物動態を変えうる。これらの薬物動態学的パラメータは、適切な血清アルブミン結合ペプチド配列を特異的に選別することによって調製されうる(米国特許公開２００４０００１８２７)。一連のアルブミン結合ペプチドは、ファージディスプレイスクリーニングによって同定された(Dennis等（2002）"Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem 277:35035-35043；国際公開第０１／４５７４６号)。本発明の化合物には、(ｉ) Dennis等（2002）J Biol Chem 277:35035-35043 at Tables III and IV, page 35038、(ｉｉ) 米国特許公開２００４０００１８２７の[００７６] 配列番号：９から２２、及び(iii) 国際公開第01/45746号の１２～１３頁に示されるＡＢＰ配列が含まれ、これらの文献はすべて出典明記によって本明細書中に援用される。アルブミン結合(ＡＢＰ)-Ｆａｂは、１：１の化学量比(１ＡＢＰ／１Ｆａｂ)で、Ｆａｂ重鎖のＣ末端にアルブミン結合ペプチドを融合させることによって作製した。アルブミンとのこれらＡＢＰ-Ｆａｂの会合により、抗体の半減期がウサギおよびマウスの２５倍以上に増加したことが示された。したがって、上記の反応性のＣｙｓ残基をこれらＡＢＰ-Ｆａｂに導入し、細胞障害性剤と部位特異的にコンジュゲートさせた後にインビボ動物実験に用いることができる。

例示的なアルブミン結合ペプチド配列には、以下に列挙する配列番号：４２から４６のアミノ酸配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ＣＤＫＴＨＴＧＧＧＳＱＲＬＭＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤＦ　配列番号：４２

ＱＲＬＭＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤＦ　配列番号：４３

ＱＲＬＩＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤＦ　配列番号：４４

ＲＬＩＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤ　配列番号：４５

ＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷ　配列番号：４６

【００３９】

抗体－薬剤コンジュゲート

他の態様では、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む、抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)を提供する。他の態様では、本発明はさらに、イムノコンジュゲートの使用方法を提供する。一態様では、イムノコンジュゲートは、細胞障害性剤又は検出可能な薬剤に共有結合して付着した前記いずれかの抗ＣＤ２２抗体を含む。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局部運搬に抗体－薬剤コンジュゲートを用いると(Syrigos及びEpenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172；米国特許第4,975,278号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(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ら. (ed.s), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている(Rowland等, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowland等, (1986)、上掲)。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、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581；Mandlerら(2000) Bioorganic & Med. Chem Letters 10:1025-1028；Mandlerら(2002) Bioconjugate Chem 13:786-791)、メイタンシノイド(EP 1391213；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)などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。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を含む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。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。

【００４０】

ゼバリン(登録商標)(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細胞非ホジキン性リンパ球(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で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)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として２０００年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686；米国特許第４９７０１９８号；同第５０７９２３３号；同第５５８５０８９号；同第５６０６０４０号；同第５６９３７６２号；同第５７３９１１６号；同第５７６７２８５号；同第５７７３００１号)。ジスルフィドリンカーＳＰＰを介してメイタンシノイド薬剤分子ＤＭ１と連結しているｈｕＣ２４２抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、ＣａｎＡｇを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第ＩＩ相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子ＤＭ１と連結している抗前立腺特異的

膜抗原(ＰＳＭＡ)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるＭＬＮ-２７０４(Millennium Pharm, BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンＥ(ＡＥ)及びモノメチルアウリスタチン(ＭＭＡＥ)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体ｃＢＲ９６(癌細胞上のルイスＹに特異的)及びｃＡＣ１０(血液系悪性腫瘍上のＣＤ３０に特異的)(Doronina等, (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。

【００４１】

イムノコンジュゲート(免疫複合体)の生成に有用な化学治療薬を本明細書中に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、及びＰＡＰ-Ｓ)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。例として１９９３年１０月２８日に公開の国際公開公報９３／２１２３２を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ及び^{186}Ｒｅが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、Ｎ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオール)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートＨＣＬ等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン２，６-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-１４-標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレントリアミン五酢酸(ＭＸ-ＤＴＰＡ)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である(国際公開９４／１１０２６)。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothene)及びＣＣ１０６５、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

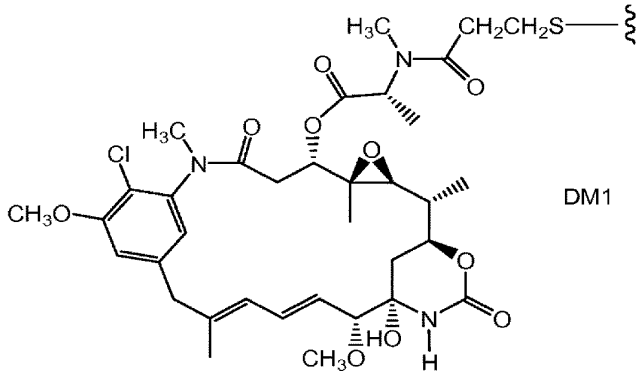
【００４２】

メイタンシン及びメイタンシノイド

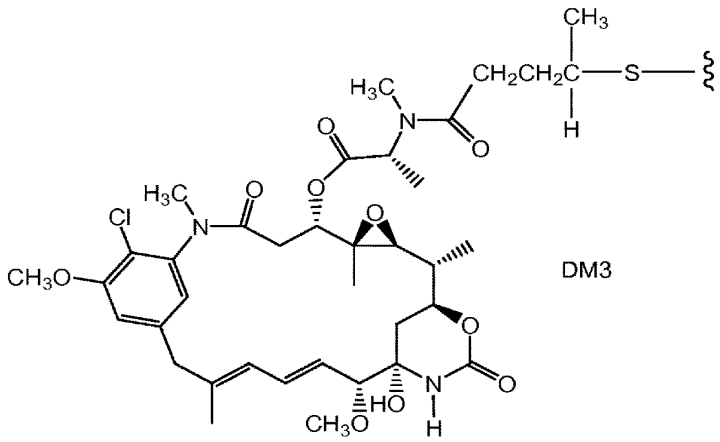
いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートしている本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第３８９６１１１号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びＣ-３メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第４１５１０４２号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第４１３７２３０号；同４２４８８７０号；同４２５６７４６号；同４２６０６０８号；同４２６５８１４号；同４２９４７５７号；同４３０７０１６号；同４３０８２６８号；同４３０８２６９号；同４３０９４２８号；同４３１３９４６号；同４３１５９２９号；同４３１７８２１号；同４３２２３４８号；同４３３１５９８号；同４３６１６５０号；同４３６４８６６号；同４４２４２１９号；同４４５０２５４号；同４３６２６

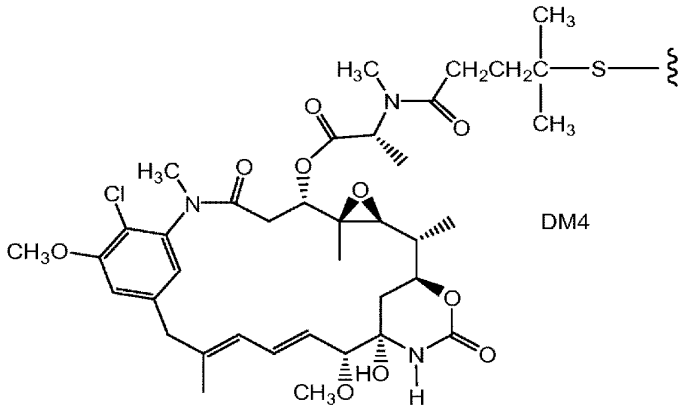
６３号；及び同４３７１５３３号に開示されている。
メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。
【００４３】
メイタンシノイド薬剤部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、又は遺伝子工学技術を用いて産生してもよい(Yu等 (2002) PNAS 99:7968-7973を参照)。また、マイタンシノール及びマイタンシノール類似体は、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。
例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾した芳香族環を有するもの、例えば、Ｃ-１９-デクロロ(米国特許第４２５６７４６号)(アンサマイトシンＰ２のリチウムアルミニウム水素化物の還元によって調製される)；Ｃ-２０-ヒドロキシ(又はＣ-２０-デメチル) +/-Ｃ-１９-デクロロ(米国特許第４３６１６５０号及び同第４３０７０１６号)(ストレプトミセス属ないしはアクチノミセス属を用いた脱メチル化又はＬＡＨを用いた脱塩素により調製される)；及びＣ-２０-デメトキシ、Ｃ-２０-アシロキシ(-ＯＣＯＲ)、+/-デクロロ(米国特許第４２９４７５７号)(アシル塩化物を用いたアシル化により調製される)、及び他の位置に修飾を有するものが含まれる。
また、例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾を有するもの、例えば、Ｃ-９-ＳＨ(米国特許第４４２４２１９号)(H_2S又はP_2S_5を有するメイタンシノールの反応により調製される)；Ｃ-１４-アルコキシメチル(デメトキシ/CH_2ＯＲ)(米国特許第４３３１５９８号)；Ｃ-１４-ヒドロキシメチル又はアシロキシメチル(CH_2OH又はCH_2OAc)(米国特許第４４５０２５４号)；Ｃ-１５-ヒドロキシ/アシロキシ(米国特許第４３６４８６６号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの変換によって調製される)；Ｃ-１５-メトキシ(米国特許第４３１３９４６号及び同第４３１５９２９号)(トレウィア ヌドロフローラ(Trewia nudlflora)より単離)；Ｃ-１８-Ｎ-デメチル(米国特許第４３６２６６３号及び第４３２２３４８号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの脱メチル化により調製される)；及び、４,５-デオキシ(米国特許第４３７１５３３号)(メイタンシノールの三塩化チタン/ＬＡＨ還元により調製される)が含まれる。
【００４４】
メイタンシノイド薬剤部分の例示的な実施態様には、以下の構造を有するＤＭ１；ＤＭ３；及びＤＭ４が含まれる。



DM1



DM3

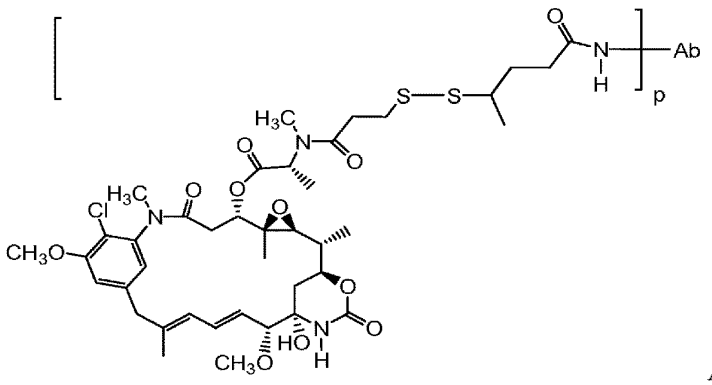


DM4

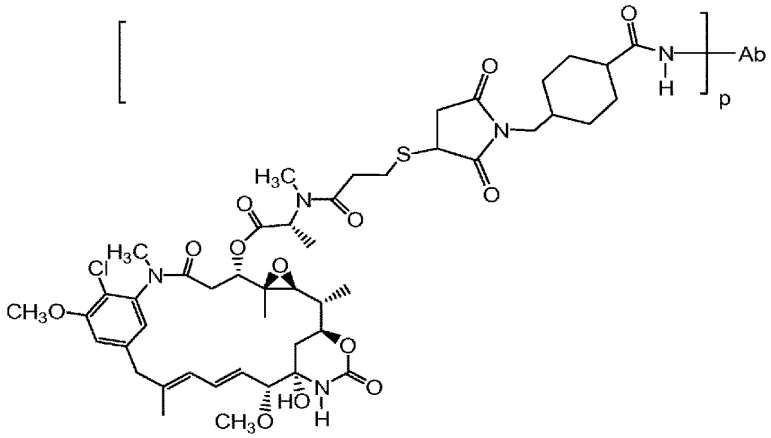
ここで、波線は、抗体 - 薬剤コンジュゲートのリンカー(Ｌ)への薬剤の硫黄原子の共有結合を示す。ＤＭ１に対してＳＭＣＣにより連結したハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ、抗ＨＥＲ２抗体)が報告されている(国際公開第２００５／０３７９９２号、これは出典明記によって本明細書中にその全体が特別に援用される)。本発明の抗体薬剤コンジュゲートは本明細書中に開示した手順に従って調製されうる。

【００４５】

他の例示的メイタンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲートは以下のような構造と略記号を有している。(ここでＡｂは抗体であり、ｐは１～およそ８である。)

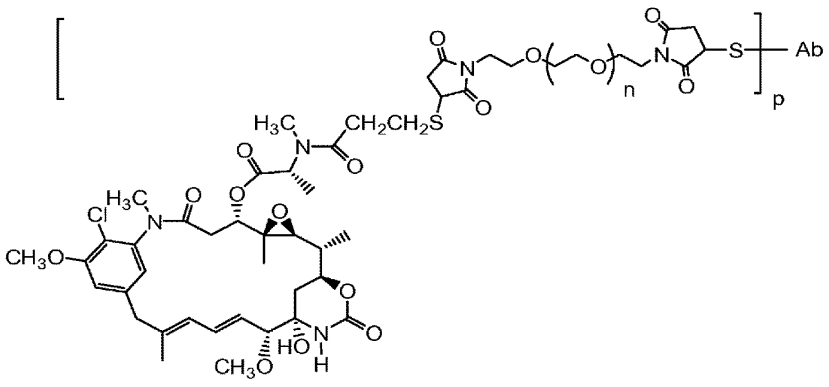


Ab -SPP-DM1



Ab-SMCC-DM1

ＤＭ１が抗体のチオール基にＢＭＰＥＯリンカーにより連結されている例示的な抗体－薬剤コンジュゲートは、以下のような構造及び略記号を有する。



ここで、Ａｂは抗体であり、ｎは０、１又は２であり、そして、ｐは１、２、３又は４である。

【００４６】
メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第５２０８０２０号、同５４１６０６４号、同第６４４１１６３号、及び欧州特許第０４２５２３５号Ｂ１に開示されており、その開示内容は出典を明示してここに援用する。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93：8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体Ｃ２４２に結合するＤＭ１と命名されたメイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52：127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体Ａ７、又はＨＥＲ-２／ｎｅｕオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体ＴＡ.１に結合しているイムノコンジュゲートが記載されている。ＴＡ.１-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞ＳＫ-ＢＲ-３におけるインビトロで試験され、細胞当たり３×１０^{5}ＨＥＲ-２表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。Ａ７-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

【００４７】
抗ＣＤ２２抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第５２０８０２０号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。１分子の毒素／抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均３-４のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第５２０８０２０号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

例えば、米国特許第５２０８０２０号、同第６４４１１６３号又は欧州特許第０４２５２３５号Ｂ１、Chari等, Cancer Research, 52：127-131(1992)、及び米国特許公開第２００５／０１６９９３３号Ａ１(これらの開示内容は出典明記により特別に援用される)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分ＳＭＣＣを含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、２００５年５月３１日に出願の米国特許第１１／１４１３４４号, "Antibody-drug conjugates and Methods."に開示されるように調製されうる。リンカーグループには、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれる。更なるリンカーグループを本願明細書中に記載し、例示する。

【００４８】
抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、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-カルボキシラート(ＳＭＣＣ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-２，６-ジイソシア

ネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好適なカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-４-(２-ピリジルチオ)ペンタノアート(ＳＰＰ)及びN-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)(Carlsson等, Biochem J. 173：723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するＣ-３位、ヒドロキシメチルで修飾されたＣ-１４位、ヒドロキシル基で修飾されたＣ-１５位、及びヒドロキシル基を有するＣ-２０位で生じる。好適な実施態様では、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のＣ-３位で形成される。

一実施態様では、本発明のいずれかの抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされる。イムノコンジュゲートの一実施態様では、細胞障害性剤Ｄはメイタンシノイドｄｍ１である。イムノコンジュゲートの一実施態様では、リンカーはＳＭＣＣである。一実施態様では、抗体-リンカー-薬剤コンジュゲートは、ＳＭＣＣリンカーを介してｄｍ１細胞障害性剤に共有結合している本明細書中に開示した抗ＣＤ２２抗体である。

【００４９】

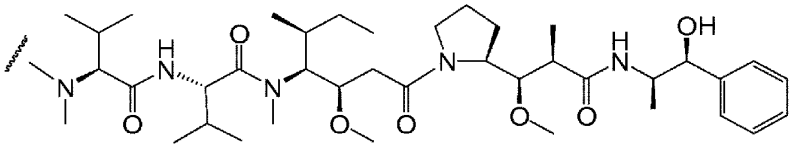
アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体及び誘導体、アウリスタチン(auristatin)（米国特許第５６３５４８３号；同第５７８０５８８号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、ＧＴＰ加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke 等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(米国特許第５６６３１４９号)及び抗真菌性活性(Pettit 等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第０２／０８８１７２号)。

例示的なアウリスタチンの実施態様には、Ｎ末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分ＤＥ及びＤＦを含み、２００４年３月２８日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される。

【００５０】

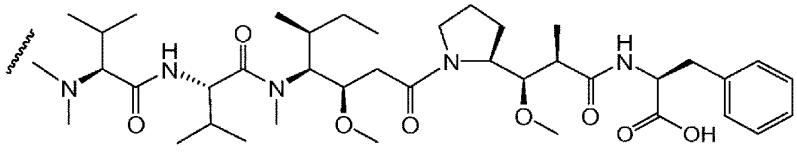
例示的なアウリスタチンの実施態様はＭＭＡＥである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(Ｌ)への共有結合を示す)。



MMAE

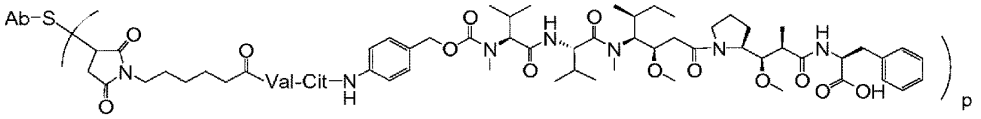
例示的なアウリスタチンの実施態様はＭＭＡＦである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(Ｌ)への共有結合を示す)。

OnCusp
Ex. 1002

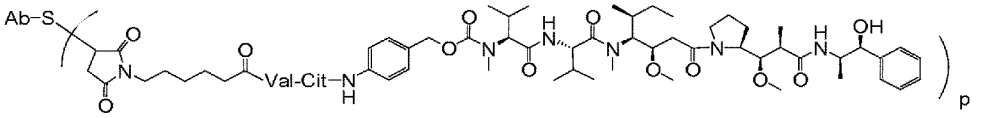


【００５１】

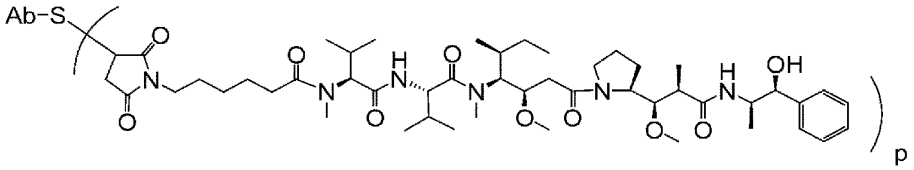
ＭＭＡＥ又はＭＭＡＦ及び様々なリンカー構成成分(本明細書においてさらに記述される)を含んでなる更なる例示的な実施態様は、以下の構造及び略号を有する(ここで、Ａｂは抗体を意味し、ｐは１～約８である)：



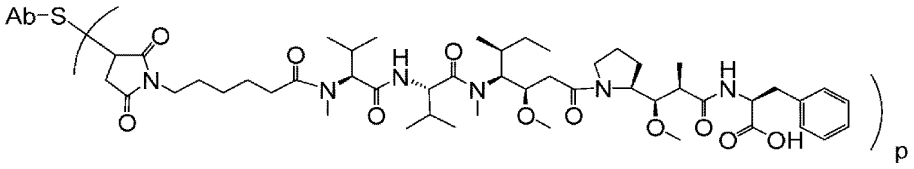
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

【００５２】
一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、２以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press を参照)。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤成分は、米国特許第５６３５４８３号；米国特許第５７８０５８８号；Pettit 等 (1989) J. Am Chem Soc. 111: 5463-5465；Pettit 等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725；Pettit 等 (1996) J. Chem Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及びDoronina (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784の方法に従って調製されうる。

【００５３】
カリケアマイシン
他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖ＤＮＡ破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第５７１２３７４号、同５７１４５８６号、同５７３９１１６号、同５７６７２８５号、同５７７０７０１号、同５７７０７１０号、同５７７３００１号、同５８７７２９６号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、N-アセチル-γ_1^I、ＰＳＡＧ及びθ^I_1(Hinman等, Cancer Research, 53：3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58：2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるＱＦＡである。カリケアマイシン及びＱＦＡは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【００５４】
他の細胞障害剤
本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、ＢＣＮＵ、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第５０５３３９４号、同５７７０７１０号に記載されており、集合的にＬＬ-Ｅ３３２８８複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第５８７７２９６号)が含まれる。
使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素Ａ鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)プロテイン(ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ及びＰＡＰ-Ｓ)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、１９９３年１０月２８日公開の国際公開第９３／２１２３２号を参照のこと。
本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はＤＮＡエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ；ＤＮアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【００５５】
腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及びＬｕの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えばtc^{99m}又は

Ｉ^{123}、又は核磁気共鳴(ＮＭＲ)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-１２３、ヨウ素-１３１、インジウム-１１１、フッ素-１９、炭素-１３、窒素-１５、酸素-１７、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-１９を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えばｔｃ^{99m}又はＩ^{123}、Ｒｅ^{186}、Ｒｅ^{188}及びＩｎ^{111}は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-９０はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem Biophys. Res. Commun. 80：49-57)は、ヨウ素-１２３の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【００５６】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、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-カルボキシラート(ＳＭＣＣ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-２，６-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-１４標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(ＭＸ-ＤＴＰＡ)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52：127-131(1992)；米国特許第５２０８０２０号)。

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ-ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ-ＥＭＣＳ、スルホ-ＧＭＢＳ、スルホ-ＫＭＵＳ、スルホ-ＭＢＳ、スルホ-ＳＩＡＢ、スルホ-ＳＭＣＣ、及びスルホ-ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ(スクシンイミジル-(４-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したＡＤＣが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

【００５７】

抗体薬剤コンジュゲートの調製：

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)において、抗体(Ａｂ)を、リンカー(Ｌ)を介して、一つ以上の薬剤部分(Ｄ)、例えば抗体につき約１～約２０の薬剤部分にコンジュゲートする。式ＩのＡＤＣはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態および試薬を用いて調製されうる：(1) 共有結合の後に薬剤部分Ｄと反応してＡｂ-Ｌを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応；及び(2) 共有結合の後に抗体の求核基と反応してＤ-Ｌを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。ＡＤＣを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。

$$Ab–(L–D)_p \qquad \text{式 I}$$

リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、６

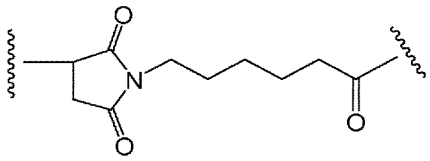
-マレイミドカプロイル(「ＭＣ」)、マレイミドプロパノイル(「ＭＰ」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、ｐ-アミノベンジルオキシカルボンイル(「ＰＡＢ」)、Ｎ-スクシンイミジル４(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(「ＳＰＰ」)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(「ＳＭＣＣ」)、及びＮ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「ＳＩＡＢ」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。

【００５８】

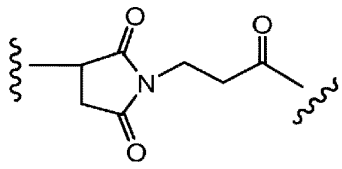
いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(ｖｃ又はｖａｌ-ｃｉｔ)、アラニン-フェニルアラニン(ａｆ又はａｌａ-ｐｈｅ)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(ｇｌｙ-ｖａｌ-ｃｉｔ)及びグリシン-グリシン-グリシン(ｇｌｙ-ｇｌｙ-ｇｌｙ)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、Ｃ及びＤ又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

【００５９】

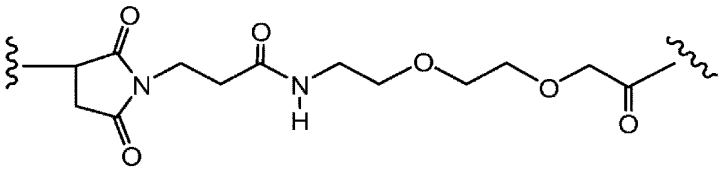
例示的なリンカー構成成分の構造を以下に示す(ここで、波形の線はＡＤＣの他の構成成分への共有結合の部位を示す)：



MC



MP

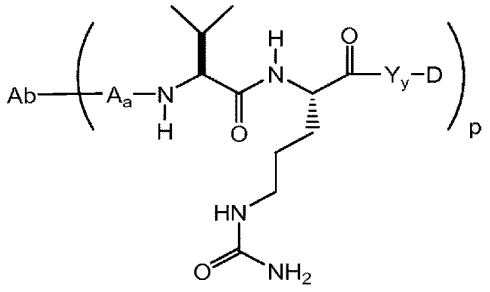


MPEG

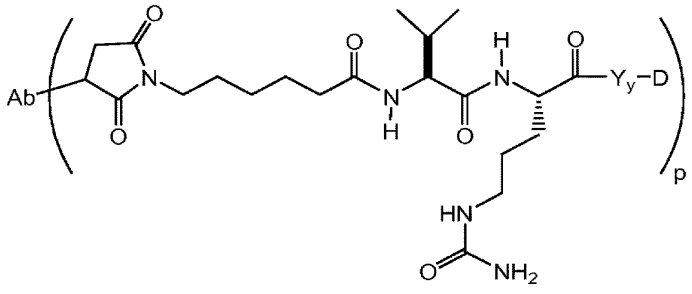
【００６０】

更なる例示的なリンカー構成成分及び略号は以下のものを含む(ここで、抗体(Ａｂ)及

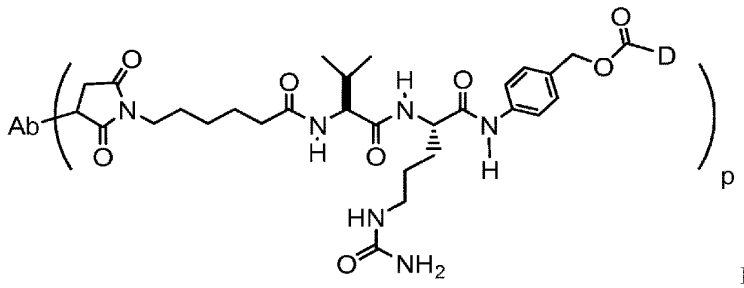
びリンカーが示されており、ｐは１～約８である）：



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

【００６１】

抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む：(ｉ) Ｎ末端アミン基、(ｉｉ) 側鎖アミン基、例えばリシン、(ｉｉｉ) 側鎖チオール基、例えばシステイン、および(ｉｖ) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオールおよび水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群およびリンカー試薬により共有結合を形成することができる：(ｉ) 活性エステル、例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物；(ｉｉ) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(ｉｉｉ) アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド群、が含

まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばＤＴＴ(ジチオトレイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、２の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる２-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、１、２、３、４又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。

【００６２】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基が生じうる。他の実施態様では、Ｎ末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem 3:138-146；米国特許第５３６２８５２号)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

【００６３】

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む：反応して、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリールヒドラジド基：(ｉ) 活性エステル(例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物)；(ｉｉ) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(ｉｉｉ) アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基、が含まれる。

更なる他の態様では、抗体は、一又は複数のスルフヒドリル基を導入する用に化学的に改変されうる一又は複数のリジン残基を有する。抗体ユニットは、スルフヒドリル基の硫黄原子を介してリンカーユニットに結合する。リジンを改変するために用いられうる試薬には、限定するものではないが、Ｎ-スクシンイミジル Ｓ-アセチルチオアセテート(ＳＡＴＡ)及び２-イミノチオラン ヒドロクロライド(トラウト試薬)が含まれる。

他の実施態様では、抗体は、一又は複数のスルフヒドリル基を持つように化学的に改変されうる一又は複数の糖質基を持っていてもよい。抗体ユニットは、リンカーユニット、例としてストレッチャーユニットに、本明細書において開示されるように、スルフヒドリル基の硫黄原子を介して結合する。

【００６４】

さらに他の実施態様では、抗体は、酸化されて、アルデヒド(-ＣＨＯ)基を提供しうる一又は複数の糖質基を持っていてもよい(例としてLaguzza,等, Ｊ. Med. Chem 1989, 32(3), 548-55を参照)。対応するアルデヒドはストレッチャー上の反応部位と結合しうる。抗体上のカルボニル基と反応しうるストレッチャー上の反応部位には、限定するものではないが、ヒドラジンおよびヒドロキシルアミンが含まれる。薬剤ユニットの接着又は会合のためにタンパク質を改変するための他のプロトコールは、Coligan等, Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002)に記載されており、該文献は出典明記によって本明細書中に援用される。

抗体、イムノグロブリン又はこれらの断片などの細胞を標的とするタンパク質へリンカ

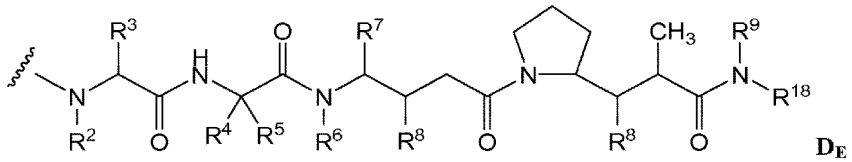
ー-薬剤成分をコンジュゲートするための方法は、例えば米国特許第５２０８０２０号、米国特許第６４４１１６３号、国際公開第２００５０３７９９２号、国際公開第２００５０８１７１１号、及び国際公開第２００６／０３４４８８号に見られ、これらのすべては出典明記によって本明細書中に援用される。

別法として、抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。ＤＮＡの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの２つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

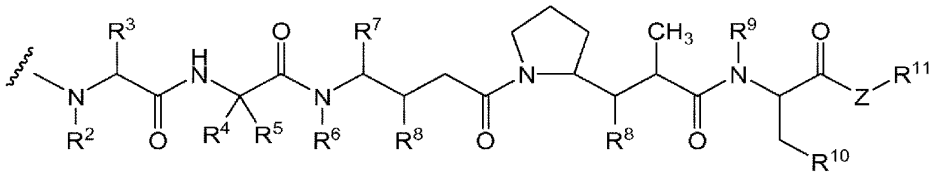
更なる他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用して循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートさせた「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【００６５】

イムノコンジュゲートの一実施態様では、細胞障害性剤Ｄは式D_E又はD_Fのアウリスタチンである。



D_E



D_F

このとき、R^2及びR^6それぞれがメチルであり、R^3及びR^4それぞれがイソプロピルであり、R^7がｓｅｃ-ブチルであり、それぞれのR^8がCH_3、Ｏ-CH_3、ＯＨ及びＨから別々に選択され、R^9がＨであり、R^{10}がアリールであり、Ｚが-Ｏ-又は-ＮＨ-であり、R^{11}が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}が-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-アリールであり、

(d) ｐがおよそ１から８の範囲である、

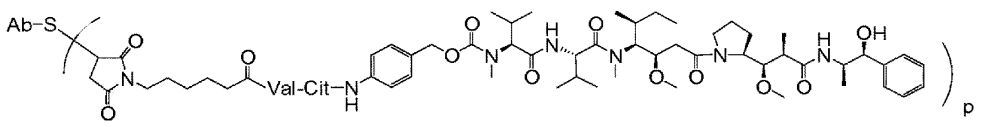
【００６６】

以下の実施態様は前記いずれかのイムノコンジュゲートをさらに提供する。ある実施態様では、イムノコンジュゲートはインビトロ又はインビボでの細胞殺傷活性を有する。ある実施態様では、リンカーは抗体のチオール基を介して抗体に付着している。ある実施態様では、リンカーはプロテアーゼによって切断可能である。ある実施態様では、リンカーはｖａｌ-ｃｉｔジペプチドを含む。ある実施態様では、リンカーはｐ-アミノベンジルユニットを含む。ある実施態様では、ｐ-アミノベンジルユニットは薬剤とリンカーのプロテアーゼ切断部位との間に配置する。ある実施態様では、ｐ-アミノベンジルユニット

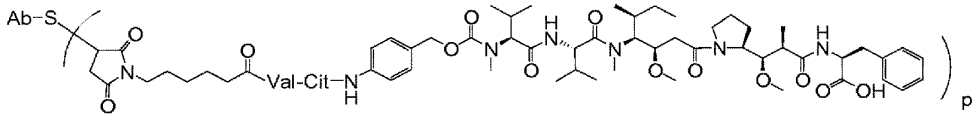
はｐ-アミノベンジルオキシカルボニル(ＰＡＢ)である。ある実施態様では、リンカーは６-マレイミドカプロイルを含む。ある実施態様では、６-マレイミドカプロイルは抗体とリンカーのプロテアーゼ切断部位との間に配置する。前記の実施態様は単独で行われても、他のいずれかと組み合わせて行われてもよい。

【００６７】

ある実施態様では、薬剤はＭＭＡＥ及びＭＭＡＦから選択される。ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、式



を有し、このときＡｂは前記いずれかの抗ＣＤ２２抗体であり、Ｓは硫黄原子であり、ｐは２から５の範囲である。ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、式



を有し、このときＡｂは前記いずれかの抗ＣＤ２２抗体であり、Ｓは硫黄原子であり、ｐはおよそ１からおよそ６、およそ２からおよそ５、およそ２からおよそ６、およそ２からおよそ４、およそ２からおよそ３、およそ３からおよそ４、およそ３からおよそ５、およそ３からおよそ６、およそ４からおよそ６の範囲である。

【００６８】

標識抗体造影方法：

本発明の他の実施態様では、システイン改変抗体は、放射性核種、蛍光色素、バイオルミネセンスを誘発する基質成分、化学発光を誘発する基質成分、酵素、および診断用、薬物動態用、治療用の適用の造影実験のための他の検出標識を有するシステインチオールによって標識されてもよい。一般に、標識されたシステイン改変抗体、すなわち「バイオマーカー」又は「プローブ」は、注入、灌流又は経口摂取によって生きている生物体、例えばヒト、げっ歯動物、又は他の小動物、灌流される臓器、又は組織試料に投与される。プローブの分布は経時的に検出され、画像に表される。

【００６９】

製造品：

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療に有用な物質を具備する製造品又は「キット」が提供される。該製造品は容器と該容器上又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、ブリスター包装などが含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、症状を治療するために有効な抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。組成物中の少なくとも一つの活性薬剤はＡＤＣである。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌などの選択された症状の治療に使用されることを示す。あるいは、もしくは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水(ＢＷＦＩ)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の(又は第三の)容器を更に具備してもよい。

さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【００７０】

製薬的組成物：

ある態様では、前記いずれかのイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含有する製薬的組成物が提供される。ある態様では、製薬的組成物を個体に投与することを含む、Ｂ細胞増殖性疾患の治療方法が提供される。一実施態様では、Ｂ細胞増殖性疾患は、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。一実施態様では、細胞増殖性疾患は、細胞の表面上のＣＤ２２の発現増加と関係している。

一態様では、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、前記いずれかのイムノコンジュゲートに細胞を曝すことを含む、細胞増殖の阻害方法が提供される。一実施態様では、Ｂ細胞は腫瘍細胞である。一実施態様では、腫瘍細胞は、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Ｂ細胞増殖性疾患に罹っているか、又は罹っていることが疑われる哺乳動物のＢ細胞である。一実施態様では、インビトロで曝す。一実施態様では、インビボで曝す。

一態様では、白血病又はリンパ腫に罹っている哺乳動物の血清可溶性ＣＤ２２をアッセイしてＢ細胞白血病又はＢ細胞リンパ腫と診断し、該疾患の臨床進行又は退行を測定するため、又は、腫瘍の負荷や再燃を評価するための本発明の抗ＣＤ２２抗体の使用方法が提供される。このような方法は、抗ＣＤ２２　ＲＦＢ４抗体ＰＥ３８(シュードモナス属エキソトキシンＡ断片３８)毒素コンジュゲート(Kreitman, R.J.等, NEJM 345: 241-247 (2001)を参照)を用いた、米国特許公開２００５０２４４８２８(Kreitman, R.J.等、この全体の内容は出典明記によって本明細書中に援用される)に開示される。

【図面の簡単な説明】

【００７１】

【図１Ａ】βアイソフォームの細胞外ドメインの７つのイムノグロブリン様ドメインを示すＣＤ２２の線図である。αアイソフォームはドメイン３および４を欠いている。「ＴＭ」は膜貫通領域を指す。

【図１Ｂ】ＣＤ２２のβ型のアミノ酸配列(配列番号：２７)を示す。ＣＤ２２のα型は、イタリック体で示すアミノ酸(細胞外ドメインのドメイン３および４をコードする)を欠いている。タンパク質の成熟形態の細胞外ドメインを下線で示す(配列番号：２８)。アミノ酸１-２１は成熟形態から切断されるシグナル配列を示す。

【図１Ｃ】ＣＤ２２αのアミノ酸配列(配列番号：２９)である。ＣＤ２２αのＥＣＤを下線で示す(配列番号：３０)。

【図１Ｄ】カニクイザル(ｃｙｎｏ)のＣＤ２２のアミノ酸配列(配列番号：３１)である。ｃｙｎｏ　ＣＤ２２の初めの１９個のアミノ酸はシグナル配列である。

【図２Ａ】ヒト化１０Ｆ４バージョン１抗体(ｈ１０Ｆ４ｖ１)と整列配置し、さらにヒトのサブグループＩＩＩ配列と整列配置した、本発明のマウス１０Ｆ４抗ＣＤ２２抗体(ｍ１０Ｆ４)の重鎖可変領域のアミノ酸配列を表す。ＨＶＲを囲って表す(ＨＶＲ-Ｈ１、ＨＶＲ-Ｈ２、ＨＶＲ-Ｈ３)。ＨＶＲを囲っている配列はフレームワーク配列(ＦＲ-Ｈ１からＦＲ-Ｈ４)である。配列はカバット番号付けに従って番号をつける。囲ったＨＶＲの近くのＫａｂａｔ、ＣｈｏｔｈｉａおよびｃｏｎｔａｃｔＣＤＲを示す。

【図２Ｂ】ヒト化１０Ｆ４バージョン１抗体(ｈ１０Ｆ４ｖ１)と整列配置し、さらにヒトκＩＩ配列と整列配置した、本発明のマウス１０Ｆ４抗ＣＤ２２抗体(ｍ１０Ｆ４)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を表す。ヒト化１０Ｆ４抗体のバージョン２および３(ｈ１０Ｆ

４ｖ２およびｈ１０Ｆ４ｖ３)は、分泌された成熟形態と同じアミノ酸配列を有する。抗体ｈ１０Ｆ４ｖ２およびｈ１０Ｆ４ｖ３は、ＨＶＲ-Ｌ１のアミノ酸２８でｈ１０Ｆ４ｖ１と異なる(Ｎ２８Ｖ)。ＨＶＲを囲って表す。ＦＲ-Ｌ１、ＦＲ-Ｌ２、ＦＲ-Ｌ３及びＦＲ-Ｌ４配列はＨＶＲ(ＨＶＲ-Ｌ１、ＨＶＲ-Ｌ２、ＨＶＲ-Ｌ３)を囲む。配列はカバット番号付けに従って番号をつける。囲ったＨＶＲの近くのＫａｂａｔ、ＣｈｏｔｈｉａおよびｃｏｎｔａｃｔＣＤＲを示す。

【図３Ａ-３Ｂ】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒト可変重鎖(ＶＨ)コンセンサスフレームワーク配列を示す。ここで、ＦＲの配列番号はＦＲ-Ｈ１、ＦＲ-Ｈ２、ＦＲ-Ｈ３、ＦＲ-Ｈ４の順に列挙する。-ヒトＶＨサブグループIコンセンサスフレームワーク「Ａ」からカバットＣＤＲを除いたもの(配列番号：２６、４７、４８、７)。-ヒトＶＨサブグループIコンセンサスフレームワーク「Ｂ」、「Ｃ」及び「Ｄ」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号：５０、５１、５２、７；配列番号：５０、５１、５２、７；及び配列番号：５０、５１、５３、７)。-ヒトＶＨサブグループIIコンセンサスフレームワーク「Ａ」からカバットＣＤＲを除いたもの(配列番号：５４、５５、５６、７)。-ヒトＶＨサブグループIIコンセンサスフレームワーク「Ｂ」、「Ｃ」及び「Ｄ」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号：５７、５８、５６、７；配列番号：５７、５８、５９、７；及び配列番号：５７、５８、６０、７)。-ヒトＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワーク「Ａ」からカバットＣＤＲを除いたもの(配列番号：６１、６２、６３、７)。-ヒトＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワーク「Ｂ」、「Ｃ」及び「Ｄ」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号：６４、６５、６３、７；配列番号：６４、６５、６６、７；及び配列番号：６４、６５、６７、７)。-ヒトＶＨアクセプター１フレームワーク「Ａ」からカバットＣＤＲを除いたもの(配列番号：６８、６２、６９、７)。-ヒトＶＨアクセプターフレームワーク「Ｂ」及び「Ｃ」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号：６４、６５、６９、７；及び配列番号：６４、６５、７０、７)。-ヒトＶＨアクセプター２フレームワーク「Ａ」からカバットＣＤＲを除いたもの(配列番号：６８、６２、７１、７)。-ヒトＶＨアクセプター２フレームワーク「Ｂ」、「Ｃ」及び「Ｄ」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号：６４、６５、７１、７；配列番号：６４、６５、７２、７；及び配列番号：６４、６５、７３、７)。

【図４Ａ-４Ｂ】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒト可変軽鎖(ＶＬ)コンセンサスフレームワーク配列を示す。-ヒトＶＬκサブグループI-１コンセンサスフレームワーク(κｖ１-１)：配列番号：７４、７５、７６、７７。-ヒトＶＬκサブグループIコンセンサスフレームワーク(κｖ１)：配列番号：７４、７８、７６、７７。-ヒトＶＬκサブグループIIコンセンサスフレームワーク(κｖ２)：配列番号：４９、７９、８０、７７。-ヒトＶＬκサブグループIIIコンセンサスフレームワーク(κｖ３)：配列番号：８１、８２、８３、７７。-ヒトＶＬκサブグループIVコンセンサスフレームワーク(κｖ４)：配列番号：８４、８５、８６、７７。

【図５Ａ】天然配列ヒトＩｇＧ Ｆｃ領域配列、ｈｕｍＩｇＧ１(非Ａアロタイプ、配列番号：３８及び配列番号：３８内のアミノ酸配列ＳＲＥＥＭがＳＲＤＥＬに変化しているＡアロタイプ)、ｈｕｍＩｇＧ２(配列番号：３９)、ｈｕｍＩｇＧ３(配列番号：４０)およびｈｕｍＩｇＧ４(配列番号：４１)のアラインメントを示す。配列間で異なる部分にアステリスクを付した。配列の上の数はＥＵ番号付けシステムを表す。例示的なκ定常領域も示す。

【図５Ｂ】アイソタイプＩｇＧ１であるヒト化抗ＣＤ２２抗体１０Ｆ４ｖ２の軽鎖及び重鎖の完全長アミノ酸配列(可変領域および定常領域)を表す。下線部は定常ドメインを表す。

【図６Ａ】リンパ腫細胞株のＣＤ２２ ＡＤＣ有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。細胞表面ＣＤ２２レベルの高さが抗ＣＤ２２-ＭＣＣ-ＤＭ１のＩＣ５０の低さに相関している(より高い有効性)ことを示す。

【図６Ｂ】リンパ腫細胞株のＣＤ２２　ＡＤＣ有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。抗ＣＤ２２-ＭＣＣ-ＤＭ１の取り込みの増加が抗ＣＤ２２-ＭＣＣ-ＤＭ１のＩＣ５０の低さに相関していることを示す。
【図６Ｃ】リンパ腫細胞株のＣＤ２２　ＡＤＣ有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。遊離薬剤に対する細胞の固有の感受性の増加が抗ＣＤ２２-ＭＣＣ-ＤＭ１のＩＣ５０の低さに相関していることを示す。
【図６Ｄ】リンパ腫細胞株のＣＤ２２　ＡＤＣ有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。細胞表面上のＣＤ２２への結合の後の蛍光標識した抗ＣＤ２２抗体の取り込みを示す顕微写真である。
【図７Ａ】ヒトのＢ細胞腫瘍を有するＳＣＩＤマウスへの抗ＣＤ２２抗体ｍｕ１０Ｆ４-ｓｍｃｃ-ＤＭ１およびｈｕ１０Ｆ４ｖ１-ｓｍｃｃ-ＤＭ１の投与により腫瘍体積が有意に減少したことを示す異種移植片モデルにおけるインビボ腫瘍体積減少のグラフである。薬剤負荷はおよそ４および４．６であった。表４を参照。
【図７Ｂ】薬剤負荷がおよそ２．９と３．０の有意に低い場合の同様な実験のグラフである(表５を参照)。ｍｕ１０Ｆ４-ｓｍｃｃ-ＤＭ１及びｈｕ１０Ｆ４ｖ２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１の有効性をコントロール抗体およびコンジュゲートしていないｍｕ１０Ｆ４と比較した。
【図７Ｃ】表６に示されるように、抗ＣＤ２２-ｓｐｐ-ＤＭ１が投与された異種移植片モデルにおけるインビボ腫瘍減少のグラフである。
【図８Ａ】ラモス細胞異種移植片に投与される抗ＣＤ２２抗体５Ｅ８．１．８-ｓｍｃｃ-ＤＭ１およびＲＦＢ４-ｓｍｃｃ-ＤＭ１のグラフである。
【図８Ｂ】ＢＪＡＢ-ｌｕｃ異種移植片に投与される抗ＣＤ２２抗体５Ｅ８．１．８-ｓｍｃｃ-ＤＭ１およびＲＦＢ４-ｓｍｃｃ-ＤＭ１のグラフである。
【図９】低い、中間、及び高い薬剤負荷での抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ｓｍｃｃ-ＤＭ１の投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。
【図１０】ラモス異種移植片における抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ＭＣ-ｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＦ又は抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ＭＣ-ＭＭＡＦの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。
【図１１】抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ｓｍｃｃ-ＤＭ１又は-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。
【図１２】表１２に開示するように、ＭＭＡＦ又はＤＭ１イムノコンジュゲートとしてのヒト化抗ＣＤ２２　１０Ｆ４変異体の投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。
【図１３Ａ】Ｂ細胞リンパ腫異種移植片モデル：ＳｕＤＨＬ-４における抗ＣＤ２２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１又は抗ＣＤ２２-ＭＣ-ＭＭＡＦの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。
【図１３Ｂ】Ｂ細胞リンパ腫異種移植片モデル：ＤｏＨＨ２における抗ＣＤ２２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１又は抗ＣＤ２２-ＭＣ-ＭＭＡＦの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。
【図１３Ｃ】Ｂ細胞リンパ腫異種移植片モデル：Ｇｒａｎｔａ-５１９における抗ＣＤ２２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１又は抗ＣＤ２２-ＭＣ-ＭＭＡＦの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。
【図１４】実施例に記載の、エピトープマッピングのために欠失させたＣＤ２２ドメインの線図を示す。ドメインに１から７の番号を付ける。「ＴＭ」は膜貫通領域を指す。
【図１５】薬剤成分が、軽鎖(ＬＣ-ＡＤＣ)、重鎖(ＨＣ-ＡＤＣ)及びＦｃ領域(Ｆｃ-ＡＤＣ)内の改変したシステイン基に付着しているシステイン改変抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)を図示する。
【図１６】(ｉ) 還元剤ＴＣＥＰ(トリス(２-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩)によって、システイン改変抗ＣＤ２２抗体(ＴｈｉｏＭａｂ)内のシステインジスルフィド付加物および鎖内ないし鎖間のジスルフィドを還元する、(ｉｉ) ｄｈＡＡ(デヒドロアスコルビン酸)にて部分的に酸化させる、すなわち再酸化させて鎖内及び鎖間のジスルフィド再形成

させる、そして、(iii) 薬剤-リンカー中間物と再酸化した抗体をコンジュゲートさせて、システイン改変抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)を形成させる、という工程を示す。

【図１７Ａ】軽鎖又は重鎖又はＦｃ領域が変化して選択したアミノ酸位のシステインが改変されている、本発明の抗ＣＤ２２システイン改変抗体のアミノ酸配列を表す。カバット位置２０５(後の位置バリン２１０)のバリンがシステインに変えられている抗ＣＤ２２１０Ｆ４変異体軽鎖のアミノ酸配列を表す。各々の図において、変更したアミノ酸を二重下線を付した太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域には下線を付さない。

【図１７Ｂ】軽鎖又は重鎖又はＦｃ領域が変化して選択したアミノ酸位のシステインが改変されている、本発明の抗ＣＤ２２システイン改変抗体のアミノ酸配列を表す。ＥＵ位置１１８(後の位置アラニン１２１)のアラニンがシステインに変えられている抗ＣＤ２２１０Ｆ４変異体重鎖のアミノ酸配列を表す。各々の図において、変更したアミノ酸を二重下線を付した太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域には下線を付さない。

【図１７Ｃ】軽鎖又は重鎖又はＦｃ領域が変化して選択したアミノ酸位のシステインが改変されている、本発明の抗ＣＤ２２システイン改変抗体のアミノ酸配列を表す。ＥＵ位置４００(後の位置セリン４０３)のセリンがシステインに変えられている抗ＣＤ２２　１０Ｆ４変異体Ｆｃ領域のアミノ酸配列を表す。各々の図において、変更したアミノ酸を二重下線を付した太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域には下線を付さない。

【図１８】ＢＪＡＢ-ｌｕｃｓ細胞の表面に発現されるＣＤ２２に対する、本発明の抗ＣＤ２２　ｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲート(ＴＤＣ)の結合が、示した異なる薬剤コンジュゲートに関してだけでなく、ＬＣ、ＨＣおよびＦｃ　ｔｈｉｏｍａｂ変異体についても類似していることを示すＦＡＣＳプロット線である。

【図１９】異なる抗ＣＤ２２　ＴＤＣにて処置した異種移植片モデルにおける経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしたグラフである。これは改変したシステイン(ＬＣ、ＨＣ又はＦｃ)の位置によっておよび/または薬剤コンジュゲート(ＭＭＡＦ又はＭＭＡＥ)によって変化した。抗ＣＤ２２　ＴＤＣ　１０Ｆ４-ＬＣ-Ｖ２１０Ｃ-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥおよび抗ＣＤ２２　１０Ｆ４-ＨＣ-Ａ１２１Ｃ-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥにて処置した異種移植片モデルは、研究の間に腫瘍体積の減少を示した。

【図２０Ａ】異なるリンカー薬剤成分にコンジュゲートした重鎖Ａ１１８Ｃ抗ＣＤ２２ＴＤＣにて処置した、及び/又は示すように異なる用量で投与したＣＢ１７　ＳＣＩＤマウスにおけるヒトのマントル細胞リンパ腫Ｇｒａｎｔａ-５１９異種移植片の経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしたグラフである。抗ＣＤ２２　１０Ｆ４-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ　ＴＤＣは、この実験の試験薬剤に対して最も効果があったようである。

【図２０Ｂ】同じ重鎖Ａ１１８Ｃ抗ＣＤ２２　ＴＤＣであるが高用量で処置したＣＢ１７ＳＣＩＤマウスの濾胞性リンパ腫ＤＯＨＨ２異種移植片の経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしたグラフである。抗ＣＤ２２　１０Ｆ４-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ　ＴＤＣは、この実験の試験薬剤に対して最も効果があったようである。

【図２０Ｃ】研究開始の１４日間で体重の有意な変化がなかったことを示す、ＤＯＨＨ２異種移植片実験のマウスにおける体重変化の割合のプロットである。

【図２１Ａ】切断可能なリンカー及び切断可能でないリンカーを含むＡＤＣが投与された場合の0日目と5日目の血清ＡＳＴ(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)の変化を示す棒グラフである。

【図２１Ｂ】切断可能なリンカー及び切断可能でないリンカーを含むＡＤＣが投与された場合の0日目と5日目の血清好中球の変化を示す棒グラフである。

【図２２Ａ】１０、２０および３０ｍｇ/ｋｇの抗ＣＤ２２　ＭＭＡＦを投与したカニクイザルの周辺Ｂ細胞(ＣＤ２０＋細胞)の枯渇を示すグラフである。

【図２２Ｂ】１０、２０および３０ｍｇ/ｋｇの抗ＣＤ２２　ＤＭ１を投与したカニクイザルの周辺Ｂ細胞(ＣＤ２０＋細胞)の枯渇を示すグラフである。

【図２３Ａ】１０、２０および３０ｍｇ/ｋｇの抗ＣＤ２２　ＭＭＡＦにおいてＣＤ４＋

リンパ球の有意な変化を示さないグラフである。
【図２３Ｂ】１０、２０および３０ｍｇ／ｋｇの抗ＣＤ２２　ＤＭ１においてＣＤ４＋リンパ球の有意な変化を示さないグラフである。
【図２４】ビヒクルコントロール(図２４Ａ)において胚中心Ｂ細胞の枯渇が見られるカニクイザル扁桃腺組織の組織学的試料が１０ｍｇ／ｋｇのｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１を投与した動物の扁桃腺試料において減少することを示す。
【図２５】研究のために採取した組織試料の脾臓濾胞の領域を示す線図であり、ここでは、抗ＣＤ２２　ＡＤＣがカニクイザルの静止組織のＢ細胞を残すことが示された(図２５Ａ)。ｃｙｎｏ脾臓濾胞胚中心の分化する細胞は、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦを投与した動物のｃｙｎｏ脾臓の胚細胞を分化させる際に減少した(図２５Ｂおよび２５Ｃ)。分化しないナイーブＢ細胞は同じ条件下で枯渇しなかった(図２５Ｄ及び２５Ｅ)。
【発明を実施するための形態】
【００７２】
(本発明の実施態様の詳細な説明)
ＣＤ２２に結合する単離された抗体が提供される。さらに、抗ＣＤ２２抗体を含んでなるイムノコンジュゲートが提供される。さらに、システイン改変抗ＣＤ２２抗体及びそのイムノコンジュゲートが提供される。本発明の抗体及びイムノコンジュゲートは、例えば、ＣＤ２２の発現の変更、例えば発現の増加と関係している疾患の診断又は治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、腫瘍又は癌などの細胞増殖性疾患の診断又は治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、ＣＤ２２、例えば細胞表面上に発現されるＣＤ２２の検出に有用である。
抗ＣＤ２２抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。抗ＣＤ２２抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供され、さらに該ベクターを含む宿主細胞が提供される。また、本発明のポリヌクレオチド、抗ＣＤ２２抗体又はイムノコンジュゲートのいずれか一又は複数を含有する製剤を含む組成物が提供される。
【００７３】
一般的技術
本願明細書中に記載又は引用される技術及び手順は、一般に十分に理解されるものであり、当業者によって従来の方法論を用いて共通して実施されるものである。その例として、以下の文献に記載される方法論が広く利用されている。Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M Ausubel, 等 編集, (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor 編集 (1995))、Harlow and Lane, 編集 (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, 編集. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M J. Gait, 編集, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, 編集, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), 編集, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, 及び D. G. Newell, 編集, 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M Weir 及び C. C. Blackwell, 編集); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M Miller 及び M P. Calos, 編集, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等, 編集, 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan 等, 編集, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley 及び Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway 及び P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., 編集, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approa

ch (P. Shepherd 及び C. Dean, 編集, Oxford University Press, 2000) ; Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow 及び D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M Zanetti 及び J. D. Capra, 編集, Harwood Academic Publishers, 1995) ; 及び Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita 等, 編集, J.B. Lippincott Company, 1993)。

【００７４】

定義と省略記号

定義

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の研究、診断又は治療的な使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。ある実施態様では、タンパク質は、(１)例えばローリー法で測定した場合９５％を超える抗体、ある実施態様では９９重量％を超えるまで、(２)例えばスピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５のＮ末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分なほど、あるいは、(３)例えばクーマシーブルーあるいは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥにより均一になるまで十分なほど精製される。抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツでの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。

【００７５】

「単離された」核酸分子は、例えば天然の環境に通常付随している少なくとも一の他の核酸分子から分離された核酸分子である。さらに、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子を通常発現するが、その核酸分子がその天然の染色体位置と異なる染色体位置にあるか又は染色体外に存在する、細胞に含まれる核酸分子を含む。

「精製」とは、分子が、含まれる試料中の重量にして少なくとも９５％、又は重量にして少なくとも９８％の濃度で試料中に存在することを意味する。

【００７６】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」なる用語は、当業者が２つの数値(例えば、本発明の抗体に関連するもの、及び参照／比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばＫｄ値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び／又は統計学的有意差がないと認められるほど、２つの数値が有意に類似していることを意味する。前記２つの値間の差異は、参照／比較値の例えば約５０％以下、約４０％以下、約３０％以下、約２０％以下、及び／又は約１０％以下である。

ここで用いる「実質的に減少」、又は「実質的に異なる」という句は、当業者が２つの数値(一般に、分子に関連するもの、及び参照／比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばＫｄ値)によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほど、２つの数値が有意に異なっていることを意味する。前記２つの値間の差異は、参照／比較分子の値の、例えば約１０％より大きく、約２０％より大きく、約３０％より大きく、約４０％より大きく、及び／又は約５０％より大きい。

【００７７】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的なＤＮＡセグメントが結合されうる円形の二本鎖ＤＮＡを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なＤＮＡセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」

(又は単に「発現ベクター」)と呼ぶ。一般に、組換えＤＮＡ技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【００７８】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、ＤＮＡ及びＲＮＡが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体(アナログ)、又はＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後になされる修飾(一又は複数)、例えば標識との結合を含みうる。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結(例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、例えばタンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ｐｌｙ-Ｌ-リジン等)を含むもの、インターカレータ(intercalators)を有するもの(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート剤(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えばアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。更に、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体担体に結合していてもよい。５'及び３'末端のＯＨはホスホリル化可能であり、又は１～２０の炭素原子を有する有機キャップ基部分又はアミンで置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。またポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み得、これらには例えば２'-Ｏ-メチル-、２'-Ｏ-アリル、２'-フルオロ又は２'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがＰ(Ｏ)Ｓ(「チオアート」)、Ｐ(Ｓ)Ｓ(「ジチオアート」)、「(Ｏ)NR_2(「アミダート」)、Ｐ(Ｏ)Ｒ、Ｐ(Ｏ)ＯＲ'、ＣＯ又はCH_2(「ホルムアセタール」)と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのＲ及びＲ'は独立して、Ｈ又は、エーテル(-Ｏ-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(１-２０Ｃ)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジル(aralkyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、ＲＮＡ及びＤＮＡを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

ここで使用される「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約２００未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

【００７９】

ここで同定した参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(％)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入

し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を測定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ(ＤＮＡＳＴＡＲ)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁，ワシントンD.C.，20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ，カリフォルニアから公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ(登録商標)Ｖ４．０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

【００８０】

アミノ酸配列比較にＡＬＩＧＮ-２が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂとの、又はそれに対する％アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Ｂと、又はそれに対して或る程度の％アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる)は次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＡ及びＢのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限りは、ここでの全ての％アミノ酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにＡＬＩＧＮ-２コンピュータプログラムを用いて得られる。

【００８１】

ここで「Ｂ細胞表面上マーカー」又は「Ｂ細胞表面上抗原」とは、Ｂ細胞の表面上に発現する抗原であり、それを結合するアンタゴニスト、例えば限定するものではないが、天然に生じるＢ細胞抗原へのリガンドの結合をアンタゴナイズすることができるＢ細胞表面抗原ないしＢ細胞表面抗原の可溶型に対する抗体の標的となることができるものである。例示的Ｂ細胞表面上マーカーには、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ５３、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤｗ７８、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８０、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤｗ８４、ＣＤ８５及びＣＤ８６白血球表面上マーカーが含まれる。(詳しくは、The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, Barclay等編集，Academic Press，Harcourt Brace & Co.，New Yorkを参照)。他のＢ細胞表面上マーカーには、ＲＰ１０５、ＦｃＲＨ２、Ｂ細胞ＣＲ２、ＣＣＲ６、Ｐ２Ｘ５、ＨＬＡ-ＤＯＢ、ＣＸＣＲ５、ＦＣＥＲ２、ＢＲ３、ＢＡＦＦ、ＢＬｙＳ、Ｂｔｉｇ、ＮＡＧ１４、ＳＬＧＣ１６２７０、ＦｃＲＨ１、ＩＲＴＡ２、ＡＴＷＤ５７８、ＦｃＲＨ３、ＩＲＴＡ１、ＦｃＲＨ６、ＢＣＭＡ、及び２３９２８７などがある。特に対象とするＢ細胞表面上マーカーは、哺乳動物の他の非Ｂ細胞組織と比較してＢ細胞上に主にに発現しており、Ｂ細胞前駆細胞及び成熟Ｂ細胞の両方の細胞上に発現していてもよい。

【００８２】

特に明記しない限り、本明細書で用いられる「ＣＤ２２」なる用語は、霊長類(例えばヒト、カニクイザル(ｃｙｎｏ))および齧歯動物(例えばマウスおよびラット)のような哺

乳動物を含む任意の脊椎動物の供与源からの任意の天然のＣＤ２２を指す。この用語は、細胞内のプロセシングから生じる任意の形態のＣＤ２２だけでなく、「完全長の」プロセシングされていないＣＤ２２を包含する。また、この用語は、天然に生じるＣＤ２２の変異体、例えばスプライス変異体、対立遺伝子変異体及びアイソフォームも包含する。ＣＤ２２(ＣＤ２２β)の主なアイソフォームは、８４７のアミノ酸と細胞外ドメインに７つのイムノグロブリン様領域を含む(Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)を参照)。微量なアイソフォームであるＣＤ２２αは６４７のアミノ酸を含み、細胞外ドメインのイムノグロブリン様ドメイン３および４を欠いている(Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345: 74-77 (1990)) and Wilson等 (1991), supraを参照)。ＣＤ２２βのアミノ酸配列を図１Ｂに示す。ここでは、下線部が細胞外ドメイン(ＥＣＤ)であり、イタリック体の部分がＣＤ２２α細胞外ドメイン配列から欠いているアミノ酸を示す。図１ＣはＣＤ２２αのアミノ酸配列を示し、ここではＥＣＤを下線で示す。アミノ酸１からアミノ酸２１のアミノ酸配列は、成熟型のタンパク質から切断されるシグナル配列を表す。一実施態様では、ＣＤ２２は、正常Ｂ細胞又は腫瘍Ｂ細胞の表面上などの細胞表面上に発現される。図１Ｄは、カニクイザルのＣＤ２２のアミノ酸配列を表す。

【００８３】

「抗体」(Ａｂ)及び「免疫グロブリン」(Ｉｇ)は、類似の構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は、特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体と、一般に抗原特異性を欠く抗体様分子の双方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では低レベルで、骨髄腫では高レベルで産出される。

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は、最も広義で相互に交換可能に使用され、モノクローナル抗体(例えば、全長又は無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、所望の生物活性を示す限り二重特異性抗体)が含まれ、さらにある種の抗体断片(ここに詳細に記載されるもの)も含まれ得る。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化及び／又は親和成熟したものであってよい。

【００８４】

「抗ＣＤ２２抗体」又は「ＣＤ２２に結合する抗体」は、抗体がＣＤ２２をターゲッティングする際に診断用及び／又は治療用の薬剤として有用である程度に十分な親和性を有してＣＤ２２を結合することが可能である抗体を指す。好ましくは、関係がなくＣＤ２２でないタンパク質への抗ＣＤ２２抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)によって測定するところの、ＣＤ２２への抗体の結合のおよそ１０％未満である。ある実施態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、又は≦０．１ｎＭの解離定数(Ｋｄ)を有する。ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、異なる種のＣＤ２２間で保存されるＣＤ２２のエピトープに結合する。

【００８５】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。重鎖の可変ドメインは「ＶＨ」と称されうる。軽鎖の可変ドメインは「ＶＬ」と称されうる。これらのドメインは一般に抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含む。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の相補性決定領域(ＣＤＲ)又は高頻度可変領域(ＨＶＲ)と呼ばれる３つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(ＦＲ)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、βシート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、３つのＣＤＲにより連結されたβシート配置を主にとる４つのＦＲ領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のＣＤＲは、ＦＲによって近接して結合され、他の鎖のＣＤＲと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins ofImmunological Interest, 5th Ed. National Institutes of Health, BEthesda, MD. (1991))。定常ドメ

インは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

【００８６】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる２つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには５つの主なクラスがある：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭ、更にそれらは、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、及びIgA_2等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれα、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、例えば、Abbas等．Cellular and Mbl．Immunology，第４版(2000)に概説されている。抗体は、抗体と１以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合性又は非共有結合性の会合により形成された融合大分子の一部であり得る。

【００８７】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ほぼインタクトな形態の抗体を指し、以下に定義するような抗体断片は意味しない。この用語は、特にＦｃ領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、及び多ければその殆ど又は全てを保持する。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばＦｃ領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のＦｃ領域に通常関連する生物学的な機能、例えばＦｃＲｎ結合、抗体半減期の調節、ＡＤＣＣ機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるＦｃ配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

【００８８】

抗体のパパイン消化は、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Ｆｃ」断片と命名される。ペプシン処理は$F(ab')_2$断片を生じ、それは２つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Ｆｖ」は、完全な抗原結合部位を含む最小抗体断片である。ある実施態様では、二本鎖Ｆｖ種は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Ｆｖ(ｓｃＦｖ)種では、柔軟なペプチドリンカーによって１の重鎖及び１の軽鎖可変ドメインは共有結合性に連鎖することができ、よって軽鎖及び重鎖は、二本鎖Ｆｖ種におけるものと類似の「二量体」構造に連結することができる。この配置において、各可変ドメインの３つのＣＤＲは相互に作用してＶＨ-ＶＬ二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、６つのＣＤＲが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な３つのＣＤＲのみを含むＦｖの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【００８９】

またＦａｂ断片は、重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含み、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(ＣＨ１)を有する。Ｆａｂ'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖ＣＨ１領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ'-ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が一つの遊離チオール基を担持しているＦａｂ'に対するここでの命名である。$F(ab')_2$抗体断片は、間にヒンジシステインを有するＦａｂ'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

「一本鎖Ｆｖ」又は「ｓｃＦｖ」抗体断片は、抗体のＶＨ及びＶＬドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、ｓｃＦｖポリペプチドはＶＨ及びＶＬドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはｓｃＦｖが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。ｓｃＦｖの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【００９０】

「ダイアボディ」なる用語は、２つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(ＶＨ－ＶＬ)内で軽鎖可変ドメイン(ＶＬ)に重鎖可変ドメイン(ＶＨ)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で２つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、２つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは二価でも二特異性であってもよい。ダイアボディは、例えば、欧州特許第４０４０９７号；国際公開第９３／１１１６１号；Hudson等 (2003) Nat. Med. 9:129-134；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。トリアボディ及びテトラボディもまたHudson等 (2003) Nat. Med. 9:129-134に記載されている。

【００９１】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる可能性がある突然変異、例えば自然に生じる突然変異を除いて同一である。従って、「モノクローナル」との形容は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。ある実施態様では、このようなモノクローナル抗体は、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、この場合、標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスにより得られる。例えば、この選択プロセスは、雑種細胞クローン、ファージクローン又は組換えＤＮＡクローンのプールのような複数のクローンからの、唯一のクローンの選択とすることができる。重要なのは、選択された標的結合配列を更に変化させることにより、例えば標的への親和性の向上、標的結合配列のヒト化、細胞培養液中におけるその産生の向上、インビボでの免疫原性の低減、多選択性抗体の生成等が可能になること、並びに、変化させた標的結合配列を含む抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることである。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは異なり、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体の調製物は、それらが他の免疫グロブリンで通常汚染されていないという点で有利である。

「モノクローナル」との形容は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)；Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)；Hammerling等: Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えＤＮＡ法(例えば、米国特許第４８１６５６７号参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)；Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)；Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)；Lee等, J. Mol. Biol. 340(5);1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)；及びLee等, J. Immounol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004))、並びに、ヒト免疫グロブリン座位の一部又は全部、或るいはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物にヒト又はヒト様抗体を生成する技術(例えば、国際公開第９８／２４８９３号；国際公開第９６／３４０９６号；国際公開第９６／３３７３５号；国際公開第９１／１０７４１号；Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)；Jakobovits等, Nature 362

: 255-258 (1993) ; Bruggemann等, Year in Immunol. 7:33 (1993) ; 米国特許第５５４５８０７号 ; 同第５５４５８０６号 ; 同第５５６９８２５号 ; 同第５６２５１２６号 ; 同第５６３３４２５号 ; 同第５６６１０１６号; Marks等, Bio.Technology 10: 779-783 (1992) ; Lonberg等, Nature 368: 856-859 (1994) ; Morrison, Nature 368: 812-813 (1994) ; Fishwild等, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996) ; Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)及びLonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)参照)が含まれる。

【００９２】

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び／又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致するか又は類似するものである(米国特許第４８１６５６７号 ; 及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

【００９３】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び／又は能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(ＦＲ)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのＦＲが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones等, Nature 321:522-525(1986) ; Riechmann等, Nature 332:323-329(1988) ; 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照のこと。また次の文献とそこに引用されている文献を参考のこと : Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998) ; Harris, Biochem Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995) ; Hurle及びGross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

【００９４】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有するもの、及び／又はここに開示されたヒト抗体を作製する任意の技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。

ここで使用される「高頻度可変領域」、「ＨＶＲ」又は「ＨＶ」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び／又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は６つの高頻度可変領域を含み ; ＶＨに３つ(Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３)、ＶＬに３つ(Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３)である。天然の抗体では、Ｈ３及びＬ３は６つの高頻度可変領域のうちで最も高い多様性を示す、特にＨ３は抗体に良好な特異性を与える際に特有の役割を果たすように思われる。Xu等 (2000) Immunity 13:37-45 ; Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ)のJohnson and Wu (2003)。実際、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ科の抗体は機能的であり、軽鎖が無い状態で安定である。Hamers-Casterman等 (1993) Nature 363:446-448 ; Sheriff等 (1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736。

【００９５】

多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(

ＣＤＲ)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。ＡｂＭ高頻度可変領域は、カバットＣＤＲとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MbleculaのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

ループ	カバット	ＡｂＭ	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(カバット番号付け)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia番号付け)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【００９６】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、ＶＬの２４－３６又は２４－３４(Ｌ１)、４６－５６又は５０－５６(Ｌ２)及び８９－９７又は８９－９６(Ｌ３)と、ＶＨの２６－３５(Ｈ１)、５０－６５又は４９－６５(Ｈ２)及び９３－１０２、９４－１０２、又は９５－１０２(Ｈ３)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、上掲のKabat等に従って番号を付した。本発明の抗ＣＤ２２　１０Ｆ４抗体のＨＶＲ-Ｈ１及びＨＶＲ-Ｈ２の高頻度可変領域はカバット番号付けを用いるとＨ２６－Ｈ３５及びＨ４９－Ｈ６５である。

「フレームワーク」又は「ＦＲ」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【００９７】

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲ又はＨＶＲ内の短縮又は挿入に相当する２、３のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖ＦＲ残基８２の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基８２ａ、８２ｂ及び８２ｃなど)と、Ｈ２の残基５２の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基５２ａ)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

【００９８】

「遊離したシステインアミノ酸」は、親抗体内に改変されているシステインアミノ酸残基を指し、チオール官能基(-ＳＨ)を有し、対形成もしないし、分子内ないし分子間ジスルフィド架橋の一部にもならない。

「チオール反応値」なる用語は、遊離したシステインアミノ酸の反応性の定量的特徴づけである。チオール反応値は、チオール反応試薬と反応するシステイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸の割合であって、１の最大値に変換される。例えば、ビオチン-マレイミド試薬などのチオール反応試薬と１００％の収率で反応してビオチン標識抗体を形成するシステイン改変抗体の遊離システインアミノ酸はチオール反応値が１．０となる。チオール反応試薬と８０％の収率で反応する同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシ

ステインアミノ酸はチオール反応値が０．８となる。チオール反応試薬と完全に反応しない同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が０となる。特定のシステインのチオール反応値の測定は、ＥＬＩＳＡアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィ、オートラジオグラフィ、又は他の定量的な分析試験によって行ってもよい。システイン改変抗体のキャプチャやシステイン反応性の比較及び定量化を可能にするチオール反応試薬には、ビオチン-ＰＥＯ-マレイミド((＋)-ビオチニル-３-マレイミドプロピオナミジル-３，６-dioxaoctainediamine、Oda等（2001）Nature Biotechnology 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.）ビオチン-ＢＭＣＣ、ＰＥＯ-ヨードアセチルビオチン、ヨードアセチル-ＬＣ-ビオチン、およびビオチン-ＨＰＤＰ（Pierce Biotechnology, Inc.））およびＮα-(３-マレイミドイルプロピオンイル)ビオシチン(MPB, Molecular Probes, Eugene, OR)が含まれる。ビオチン化、二官能性及び多官能性リンカー試薬の他の商業的な供与源には、Molecular Probes, Eugene, OR、及びSigma, St. Louis, MOが含まれる。

「親抗体」は、一又は複数のアミノ酸残基が一又は複数のシステイン残基に置き換わっているアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然の又は野生型の配列を含んでいてもよい。親抗体は、他の天然、野生型又は修飾した形態の抗体と比較して既存のアミノ酸配列修飾(例えば付加、欠失および／または置換)を有してもよい。親抗体は、対象の標的抗原、例えば生物学上重要なポリペプチドに対するものであってもよい。また、非ポリペプチド抗原(例えば腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第５０９１１７８号を参照)に対する抗体も考慮される。

【００９９】

本明細書中では以下の略語を用い、言及した定義を有する。ＢＭＥはβ-メルカプトエタノールであり、ＢｏｃはＮ-(ｔ-ブトキシカルボニル)であり、ｃｉｔはシトルリン(２-アミノ-５-ウレイドペンタン酸)であり、ｄａｐはドラプロイン(dolaproine)であり、ＤＣＣは１，３-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、ＤＣＭはジクロロメタンであり、ＤＥＡはジエチルアミンであり、ＤＥＡＤはジエチルアゾジカルボキシレートであり、ＤＥＰＣはジエチルホスホリルシアニダートであり、ＤＩＡＤはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、ＤＩＥＡはＮ，Ｎ-ジイソプロピルエチルアミンであり、ｄｉｌはドライソロイシンであり、ＤＭＡはジメチルアセトアミドであり、ＤＭＡＰは４-ジメチルアミノピリジンであり、ＤＭＥはエチレングリコールジメチルエーテル(又は１，２-ジメトキシエタン)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、ｄｏｅはドラフェニン(dolapheneine)であり、ｄｏｖはＮ，Ｎ-ジメチルバリンであり、ＤＴＮＢは５，５'-ジチオビス(２-ニトロ安息香酸)であり、ＤＴＰＡはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、ＤＴＴはジチオトレイトールであり、ＥＤＣＩは１-(３-ジメチルアミノプロピル)-３-エチルカルボジイミド塩酸塩であり、ＥＥＤＱは、２-エトキシ-１-エトキシカルボニル-１，２-ジヒドロキノリンであり、ＥＳ-ＭＳはエレクトロスプレー質量分析であり、ＥｔＯＡｃは酢酸エチルであり、ＦｍｏｃはＮ-(９-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、ｇｌｙはグリシンであり、ＨＡＴＵは、Ｏ-(７-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-Ｎ，Ｎ，Ｎ'，Ｎ'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、ＨＯＢｔは１-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、ＨＰＬＣは高速液体クロマトグラフィであり、ｉｌｅはイソロイシンであり、ｌｙｓはリジンであり、ＭｅＣＮ(CH_3CN)はアセトニトリルであり、ＭｅＯＨはメタノールであり、Ｍｔｒは４-アニシルジフェニルメチル(又は４-メトキシトリチル)であり、(１Ｓ，２Ｒ)-(＋)-ノルエフェドリンではなく、ＰＡＢはｐ-アミノベンジルカルバモイルであり、ＰＢＳはリン酸塩緩衝生理食塩水(ｐＨ７)であり、ＰＥＧはポリエチレングリコールであり、Ｐｈはフェニルであり、Ｐｎｐはｐ-ニトロフェニルであり、ＭＣは６-マレイミドカプロイルであり、ｐｈｅはＬ-フェニルアラニンであり、ＰｙＢｒｏｐは、ブロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、ＳＥＣはサイズ排除クロマトグラフィであり、Ｓｕはスクシンイミドであり、ＴＦＡはトリフルオロ酢酸であり、ＴＬＣは薄層クロマトグラフィであり、ＵＶは紫外線であり、ｖａｌはバリンである。

【０１００】
「親和成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数のＨＶＲにおいて一又は複数の改変を持つものである。一実施態様では、親和成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当該分野において知られている手順によって生産される。Marks等, Bio/Technology, 10：779-783(1992)は、ＶＨ及びＶＬドメインシャッフリングによる親和成熟について記載している。ＨＶＲ及び／又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘導は、Barbas等, Proc Nat Acad. Sci, USA 91：3809-3813(1994)；Schier等, Gene, 169：147-155(1995)；Yelton等, J. Immunol.155：1994-2004(1995)；Jackson等, J. Immunol.154(7)：3310-9(1995)；及びHawkins等, J. Mol. Biol.226：889-896(1992)に記載されている。
「阻止(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体とは、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低下させる抗体である。特定の阻止抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を、ほぼ又は完全に阻害する。
本明細書において使用する「アゴニスト」抗体は、対象とするポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。
抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域(天然配列Ｆｃ領域又はアミノ酸配列変異体Ｆｃ領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞障害；Ｆｃレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ＡＤＣＣ)；貪食作用；細胞表面レセプター(例えば、Ｂ細胞レセプター)のダウンレギュレーション；及びＢ細胞活性化が含まれる。
【０１０１】
「Ｆｃレセプター」又は「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合するレセプターを記載するものである。ある実施態様では、ＦｃＲは天然のヒトＦｃＲである。ある実施態様では、ＦｃＲはＩｇＧ抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ及びＦｃγＲＩＩＩサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。ＦｃγＲＩＩレセプターには、ＦｃγＲＩＩＡ(「活性型レセプター」)及びＦｃγＲＩＩＢ(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターＦｃγＲＩＩＡは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif；ＩＴＡＭ)を含んでいる。阻害型レセプターＦｃγＲＩＩＢは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif；ＩＴＩＭ)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。ＦｃＲに関しては、Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994)；及びde Haas等, J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のＦｃＲはここでの「ＦｃＲ」という言葉によって包含される。
また、「Ｆｃレセプター」又は「ＦｃＲ」なる用語には、母性ＩｇＧの胎児への移送と(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol.24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスの調節を担う新生児性レセプターＦｃＲｎも含まれる。ＦｃＲｎへの結合の測定方法は公知である(例としてGhetie 1997, Hinton 2004を参照)。インビボでのヒトＦｃＲｎへの結合とヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトＦｃＲｎを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又はＦｃ変異形ポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。
国際公開公報００／４２０７２(Presta) にＦｃＲへの結合を向上又は減弱させた抗体変異型が述べられている。この特許公開の内容はここに出典明記により具体的に組み込まれる。Shields等, J. Biol. Chem 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。
【０１０２】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のＦｃＲｓを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。ある実施態様では、その細胞が少なくともＦｃγＲIIIを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を実行することが望ましい。ＡＤＣＣを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(ＰＢＭＣ)、ナチュラルキラー(ＮＫ)細胞、単球、細胞障害性Ｔ細胞及び好中球が含まれる。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

【０１０３】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ＡＤＣＣ」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(ＮＫ)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在するＦｃレセプター(ＦｃＲ)と結合した分泌Ｉｇにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。ＡＤＣＣを媒介する主要な細胞ＮＫ細胞はＦｃγＲＩＩＩのみを発現するのに対し、単球はＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ及びＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞でのＦｃＲの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991) の４６４頁の表３に要約されている。対象の分子のＡＤＣＣ活性をアッセイするために、米国特許第５５００３６２号又は同第５８２１３３７号に記載されているようなインビトロＡＤＣＣアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(ＰＢＭＣ)及びナチュラルキラー細胞(ＮＫ細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のＡＤＣＣ活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

【０１０４】

「補体依存性細胞障害」もしくは「ＣＤＣ」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(Ｃ１ｑ)の第１補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, Ｊ. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

Ｆｃ領域アミノ酸配列を変更してＣ１ｑ結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体は、米特許第６１９４５５１号Ｂ１及び国際公開公報９９／５１６４２に記述される。それらの特許文献の内容は、出典明記によって、特別に本願明細書に組み込まれるものとする。またIdusogie 等 Ｊ. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【０１０５】

「Ｆｃ領域含有ポリペプチド」なる用語は、Ｆｃ領域を含む抗体もしくはイムノアドヘンシンのようなポリペプチドを指す。Ｆｃ領域のＣ末端リジン(ＥＵ番号付けシステムに従うと残基４４７)は、例えば、ポリペプチドの精製中又はポリペプチドをコードする核酸を組み換え操作することによって除去してもよい。したがって、本発明のＦｃ領域を有するポリペプチドを含んでなる組成物は、Ｋ４４７を有するポリペプチド集団、すべてのＫ４４７が除去されたポリペプチド集団、又はＫ４４７残基を有するポリペプチドとＫ４４７残基を有さないポリペプチドの混合集団を包含しうる。

本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られるＶＬ又はＶＨフレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含有するか、又は既存のアミノ酸配列変化を含有してもよい。ある実施態様では、既存のアミノ酸変化の数は、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下又は２以下である。既存のアミノ酸変化がＶＨ中に存在する場合、好ましくは、それらの変化は位置７１Ｈ、７３Ｈ及び７８Ｈの内の３つ、２つ又は１つのみ起こり、例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、７１Ａ、７３Ｔ及び／又は７８Ａであってよい。一実施態様では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワー

ク配列と配列が同一である。

【０１０６】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨ配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、ＶＬについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループκＩである。一実施態様では、ＶＨについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループIIIである。

【０１０７】

「ＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワーク」は、上掲のKabat等の可変重鎖サブグループIIIのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含有する。一実施態様では、ＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, 配列番号:1)-HVR-H1-WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, 配列番号:3)-HVR-H2-RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (FR-H3, 配列番号:5)-HVR-H3-WGQGTLVTVSS (FR-H4, 配列番号:7)

「ＶＬサブグループIコンセンサスフレームワーク」は、Kabat等の可変軽鎖κサブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含んでなる。一実施態様では、ＶＨサブグループIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, 配列番号:8)-HVR-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, 配列番号:11)-HVR-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (FR-L3, 配列番号:13)-HVR-L3-FGQGTKVEIK (FR-L4, 配列番号:15)

【０１０８】

「分泌シグナル配列」又は「シグナル配列」とは、細胞膜、通常は原核生物の内側の膜又は内側と外側の両方の膜を通して、対象となる新しく合成されたタンパク質の方向付けに使用することのできる短いシグナルペプチドをコードする核酸配列を意図する。このようにして、対象となるタンパク質、例えば免疫グロブリン軽鎖又は重鎖ポリペプチドは、原核宿主細胞の周辺に、あるいは培地中に分泌される。分泌シグナル配列によってコードされるシグナルペプチドは、宿主細胞に内在しても、あるいはそれらは外因性でもよく、発現されるポリペプチドに本来あるシグナルペプチドを含む。分泌シグナル配列は、典型的には発現されるポリペプチドのアミノ末端に存在し、典型的にはポリペプチドの生合成と分泌の間に細胞質から酵素的に取り除かれる。従って、シグナルペプチドは、通常、成熟タンパク質産物には存在しない。

【０１０９】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の１：１相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、解離定数(Ｋｄ)として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示的実施態様を記載する。

【０１１０】

一実施態様では、本発明の「Ｋｄ」又は「Ｋｄ値」は、以下のアッセイで示されるような、所望の抗体のＦａｂ型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(ＲＩＡ)で測定される。段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度

の(^{125}I)-標識抗原にてＦａｂを均衡化して、抗Ｆａｂ抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性を測定する。アッセイの条件を決めるために、ミクロタイタープレート(Dynex)を５μｇ／ｍｌの捕獲抗Ｆａｂ抗体(Cappel Labs)を含む５０ｍＭ炭酸ナトリウム(ｐＨ９．６)にて一晩コートして、その後２％(w/v)のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳにて室温(およそ２３℃)で２～５時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、１００ｐＭ又は２６ｐＭの[^{125}Ｉ]抗原を段階希釈した所望のＦａｂと混合する(例えば、Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ-１２の評価と一致する)。ついで所望のＦａｂを一晩インキュベートする；しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間(例えばおよそ６５時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば１時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳにて８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcounty 計測器(Packard)にて１０分間計測する。最大結合の２０％か又はそれ以下濃度のＦａｂを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。

他の実施態様によると、～１０反応単位(ＲＵ)の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のBIAcore^{TM}-2000又はBIAcore^{TM}-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってＫｄ又はＫｄ値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってＮ-エチル-Ｎ'-(３-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(ＥＤＣ)及びＮ-ヒドロキシスクシニミド(ＮＨＳ)で活性化した。抗原を１０ｍＭ 酢酸ナトリウム(ｐＨ４．８)で５μｇ／ｍｌ(～０．２μＭ)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(ＲＵ)がおよそ１０になるように５μｌ／分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、２倍の段階希釈したＦａｂ(０．７８ｎＭから５００ｎＭ)を２５℃、およそ２５μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０(ＰＢＳＴ)を含むＰＢＳに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)（BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})を算出した。平衡解離定数(Ｋｄ)をk_{off}/k_{on}比として算出した。例として、Chen, Y.,等, (1999) Ｊ. Mol Biol 293: 865-881を参照。上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が10^{6}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophometer)(Aviv Instruments)又は撹拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、ＰＢＳ(ｐＨ７．２)、２５℃の、２０ｎＭの抗抗原抗体(Ｆａｂ型)の蛍光放出強度(励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過＝１６ｎｍ)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「k_{on}」は、～１０反応単位(ＲＵ)の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のBIAcore^{TM}-2000又はBIAcore^{TM}-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。

【０１１１】

「疾病」は、本発明の物質／分子又は方法を用いた治療によって利益を得る任意の症状又は疾患である。これには、問題とする疾患に哺乳動物がかかりやすくなる病理学的症状を含む慢性及び急性の疾病を含む。本明細書中で治療される疾患の非限定的な例には、Ｂ細胞増殖性疾患及び／又はＢ細胞腫瘍などの癌性症状、例えばリンパ腫、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が含まれる。

「細胞増殖性疾患(障害)」及び「増殖性疾患(障害)」なる用語は、異常な細胞増殖にある程度関連している疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

本明細書中の「腫瘍」とは、悪性か良性かにかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖と、すべての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」」「癌性」「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」なる用語は、本明細書に参照されるように相互に限定的なものでない。

【０１１２】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に調節不可能な細胞成長／増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は表す。癌の例には癌性Ｂ細胞増殖性疾患が含まれるが、これに限定されるものではない。Ｂ細胞増殖性疾患は、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。他の癌症状には、例として上皮癌、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫及び白血病が含まれる。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌、膵癌、グリオーマ、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、白血病及び他のリンパ系増殖性疾患、及び様々なタイプの頭頸部癌が含まれる。

【０１１３】

本明細書中の「Ｂ細胞悪性腫瘍」には、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、例として軽度／濾胞性ＮＨＬ、小リンパ球(ＳＬ)ＮＨＬ、中程度／濾胞性ＮＨＬ、中程度のびまん性ＮＨＬ、高度免疫芽細胞ＮＨＬ、高度リンパ芽球ＮＨＬ、高度小型非切れ込み核細胞性ＮＨＬ、バルキー(bulky)疾患ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連のリンパ腫、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、リンパ球優性ホジキン病(ＬＰＨＤ)、小リンパ球性リンパ腫(ＳＬ)、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、再発性低悪性度ＮＨＬ及びリツキシマブ抵抗性の低悪性度ＮＨＬを含む低悪性度ＮＨＬ；白血病、例として急性リンパ芽球性白血病(ＡＬＬ)、慢性リンパ球性白血病(ＣＬＬ)、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病；マントル細胞リンパ腫；及び他の血液学的な悪性腫瘍が含まれる。このような悪性腫瘍は、ＣＤ２２などのＢ細胞表面マーカーに対する抗体によって治療されてもよい。このような疾患は、ＣＤ２２などのＢ細胞表面マーカーに対する抗体の投与によって治療されることが本明細書において意図されるものであり、本明細書中で開示したようなコンジュゲートしていない(「ネイキッド」)抗体又は細胞障害性剤にコンジュゲートされた抗体の投与を含む。また、このような疾患は、他の抗体ないし抗体薬剤コンジュゲート、他の細胞障害性剤、放射線又は他の同時ないしは連続して施される治療と組み合わせて、本発明の抗ＣＤ２２抗体ないし抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートを含む併用療法によって治療されることが、本願明細書において意図される。本発明の例示的な治療方法では、本発明の抗ＣＤ２２抗体は、抗ＣＤ２０抗体、イムノグロブリン又はこれらのＣＤ２０結合断片と組み合わされて、ともにないしは連続して投与される。抗ＣＤ２０抗体はネイキッド抗体又は抗体薬剤コンジュゲートであってもよい。併用療法の実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は本発明の抗体であり、抗ＣＤ２０抗体はリツキサン(登録商標)(リツキシマブ)である。

【０１１４】

本明細書で使用する「非ホジキンリンパ腫」又は「ＮＨＬ」という用語は、ホジキンリンパ腫以外のリンパ系の癌を意味する。通常、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫とは、ホジキンリンパ腫にはリードシュテルンベルク細胞が存在し、非ホジキンリンパ腫には前記細胞が不在であることにより区別することができる。本明細書で使用する用語に含まれる非ホジキンリンパ腫の例は、従来技術に既知の分類方式、例えばColor Atlas of Clinical Hematology第３版；A. Victor Hoffbrand及びJohn E. Pettit(編)(Harcourt Pub

lishers Limited 2000)(特に図11.57、11.58及び11.59参照)に記載の改訂版European-American Lymphoma (REAL)方式に従って当業者(腫瘍学者または病理学者)によって認識されるあらゆるものを含む。より具体的な例としては、限定するものではないが、再発性又は抵抗性ＮＨＬ、前線低悪性度ＮＨＬ、第III／IV期ＮＨＬ、化学療法に抵抗性のＮＨＬ、前駆体Ｂリンパ芽球性白血病及び／又はリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病及び／又は前リンパ球性白血病及び／又は小リンパ球リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、immunocytomaおよび／又はリンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ系質細胞性リンパ腫周辺帯Ｂ細胞リンパ腫、脾周辺帯リンパ腫、結節外周辺帯-ＭＡＬＴリンパ腫、結節周辺帯リンパ腫、有毛細胞白血病、プラズマ細胞腫及び／又は形質細胞骨髄腫、低悪性度／濾胞性リンパ腫、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、濾胞性中心リンパ腫(濾胞性)、中悪性度拡散性ＮＨＬ、広汎性大Ｂ細胞リンパ腫、高悪性度ＮＨＬ(高悪性度前線ＮＨＬ及び高悪性度再発性ＮＨＬを含む)、自己幹細胞移植後の又は自己肝細胞移植に抵抗性のＮＨＬ再発、原発性縦隔大Ｂ細胞リンパ腫、原発性浸出リンパ腫、高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度非切断小細胞性ＮＨＬ、巨大(bulky)病変ＮＨＬ、バーキットリンパ腫、前駆体(周辺性)大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び／又はセザリー症候群、皮膚(皮膚性)リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管動原体リンパ腫が挙げられる。

【０１１５】

本明細書中の「自己免疫性疾患」は、個体の自己組織ないしは臓器又は同時分離したものに対する及びそれらから生じる疾患又は症状、又はその徴候又は結果として生じるその症状である。これら多くの自己免疫性及び炎症性疾患において、多くの臨床用及び研究用のマーカーが存在してもよく、限定するものではないが、高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中の抗原抗体複合体蓄積、副腎皮質ステロイド又は免疫抑制性治療の利点、及び、影響を受けた組織中のリンパ系細胞の凝集塊が含まれうる。Ｂ細胞が媒介する自己免疫性疾患に関して何か一つの理論に限定されるものではないが、Ｂ細胞は、自己抗体産生、免疫複合体形成、樹状及びＴ細胞活性化、サイトカイン合成、ケモカインの直接放出、及び病巣への異所性新リンパ形成を含む、多くの機構的な経路によりヒト自己免疫性疾患において病原性効果を示すことが考えられる。各々のこれらの経路は、自己免疫性疾患の病状の程度の違いに寄与しうる。

【０１１６】

「自己免疫性疾患」は、臓器特異的疾患(すなわち、免疫応答が、内分泌系、造血系、皮膚、循環器系、胃腸及び肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系などといった臓器系に対して特異的である)又は、複数の臓器系に影響しうる全身性疾患(例えば全身性エリテマトーデス(ＳＬＥ)、関節リウマチ、多発性筋炎など)でありうる。好ましい前記疾患には、自己免疫性リウマチ学疾患(例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、ＳＬＥ及びループス腎炎などの狼瘡、多発性筋炎／皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、及び乾癬の関節炎など)、自己免疫性胃腸及び肝臓疾患(例えば、炎症性腸疾患(例えば潰瘍性大腸炎及びクローン病)、自己免疫性胃炎及び悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎、及び小児脂肪便病など)、血管炎(例えば、チャング-シュトラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症及び顕微鏡的多発血管炎を含むＡＮＣＡ-ネガティブ血管炎及びＡＮＣＡ-関連血管炎)、自己免疫性神経学的疾患(例えば、多発性硬化症、眼球クローヌスミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、及び自己免疫性多発性神経炎など)、腎臓疾患(例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、及びベルガー病など)、自己免疫性皮膚科疾患(例えば、乾癬、蕁麻疹、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、及び皮膚紅斑性狼瘡など)、血液系疾患(例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後の紫斑病、及び自己免疫溶血性貧血など)、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患(例えば、内耳疾患及び聴力障害など)、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植及び自己免疫性内分泌系疾患(例えば、インスリン依存型糖尿病(ＩＤＤＭ)などの糖尿病関連の自己免疫性疾患、アジソン病及び自己免疫性甲状腺疾患(例えばグ

レーブス病及び甲状腺炎)など)が含まれる。より好ましい前記疾患には、例えば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、ＩＤＤＭ、悪性貧血、甲状腺炎及び糸球体腎炎が含まれる。

【０１１７】

場合によって上記のものを包含する、本明細書中で定義されるような他の自己免疫性疾患の具体的な例には、限定されるものではないが、関節炎(急性及び慢性の関節リウマチ、例として、若年発症関節リウマチ及び段階、例として、関節リウマチ関節滑膜炎、痛風又は痛風性関節炎、急性の免疫学的な関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、II型コラーゲン誘導性の関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、スティル病、椎骨関節炎、骨関節炎、慢性関節炎プログレディエンテ、変形性関節炎、慢性多発性関節炎プリマリア、反応性関節炎、閉経期の関節炎、エストロゲン-枯渇関節炎、及び強直性脊椎炎／リウマチ様脊椎炎)、自己免疫性リンパ系増殖性疾患、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例としてプラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪乾癬、アトピー、例としてアトピー性疾患、例えば花粉症及びジョブ症候群、皮膚炎、例として接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、剥脱性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、原発性刺激物接触皮膚炎、及びアトピー性皮膚炎、Ｘ連鎖過剰ＩｇＭ症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例として慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性特発性蕁麻疹、例として慢性自己免疫性蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症(全身強皮症を含む)、全身性硬化症などの硬化症、多発性硬化症(ＭＳ)、例として脊髄-視神経ＭＳ、原発性進行性ＭＳ(ＰＰＭＳ)、及び再発性寛解型ＭＳ(ＲＲＭＳ)、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、皮膚硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎(ＮＭＯ)、炎症性腸疾患(ＩＢＤ)(例えば、クローン病、自己免疫媒介性胃腸疾患、胃腸炎症、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸炎潰瘍、顕微鏡的大腸炎、膠原性大腸炎、多発性大腸炎、壊死性全腸炎、及び経壁性大腸炎、及び自己免疫性炎症性腸疾患)、腸炎症、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例として、成人又は急性の呼吸窮迫症候群(ＡＲＤＳ)、髄膜炎、葡萄膜の全部又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液疾患、移植片対宿主病、遺伝性血管性浮腫などの血管性浮腫、髄膜炎の脳神経損傷、妊娠ヘルペス、妊娠性類天疱瘡、陰嚢掻痒、自己免疫性早期卵巣機能不全、自己免疫性症状による急性聴力損失、ＩｇＥ媒介性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性鼻炎及びアトピー性鼻炎、脳炎、例えばラスマッセンの脳炎及び辺縁及び／又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例として、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有する又は有さない糸球体腎炎（ＧＮ）、例として、慢性又は急性の糸球体腎炎、例として原発性ＧＮ、免疫性ＧＮ、膜性ＧＮ（膜性ネフロパシ）、特発性膜性ＧＮ又は特発性膜性ネフロパシ、膜又は膜性増殖性ＧＮ（ＭＰＧＮ）（タイプＩ及びタイプＩＩを含む）、急速進行性ＧＮ（ＲＰＧＮ）、増殖性腎炎、自己免疫性多腺性内分泌不全、亀頭炎、例として形質細胞限局性亀頭炎、亀頭包皮炎、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形性紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純性苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、薄板状魚鱗癬、表皮剥離性角質増殖症、妊娠前角化症、膿皮症壊疽、アレルギー性状態および応答、食物アレルギー、薬剤アレルギー、昆虫アレルギー、まれなアレルギー性疾患、例として肥満細胞症、アレルギー性応答、湿疹、例としてアレルギー性又はアトピー性湿疹、乾皮性湿疹、異常発汗剤湿疹および小胞の掌蹠湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息及び自己免疫喘息、Ｔ細胞の浸潤を伴う症状及び慢性炎症反応、妊娠中の胎児のＡＢＯ式血液型など外来性抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、ループス、例としてループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、ジスコイドループス、円板状エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、脱毛症ループス、ＳＬＥ、例えば皮膚ＳＬＥ又は亜急性の皮膚ＳＬＥ、新生児期ループス症候群（ＮＬＥ）及び紅斑性狼瘡汎発、若年性開始型（Ｉ型）真正糖尿病、例として小児ＩＤＤＭ

、成人発症型真正糖尿病（ＩＩ型糖尿病）、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシ、糖尿病性大腸炎、糖尿病性大動脈疾患、サイトカイン及びＴリンパ球によって媒介される急性及び遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎(例として、リウマチ性多発性筋痛及び巨細胞（高安）動脈炎などの大脈管脈管炎、川崎病及び結節性多発動脈炎／結節性動脈周囲炎などの中脈管脈管炎、免疫血管炎、ＣＮＳ血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、フィブリノイドを壊死させる血管炎及び全身性壊死性血管炎などの壊死性血管炎、ＡＮＣＡネガティブ血管炎、およびチャーグ-ストラウス症候群(ＣＳＳ)などのＡＮＣＡ関連の血管炎、ヴェゲナー肉芽腫、および顕微鏡的多発性血管炎)、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイアモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血又は免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血（ＡＩＨＡ）、悪性貧血（貧血症悪性熱）、アジソン病、純粋な赤血球貧血症又は形成不全（ＰＲＣＡ）、第VIII因子欠損症、血友病Ａ、自己免疫好中球減少症、例として汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、ＣＮＳ炎症性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、多器官損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血の二次症状、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、単神経炎、アレルギー性神経炎、ベーチェット病／症候群、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、天疱瘡又は類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡、瘢痕性(粘液膜)類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常性天疱瘡、新生物関連天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡粘液-膜天疱瘡、および紅斑性天疱瘡、後天性表皮水疱症、眼炎症、好ましくはアレルギー性眼性炎症、例えばアレルギー性結膜、直鎖状ＩｇＡ水疱性疾患、自己免疫誘導性結膜炎、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病又は症候群、自己免疫性状態による熱性損傷、子癇前症、免疫複合体疾患、例として、免疫複合体腎炎、抗体が媒介する腎炎、神経炎症性疾患、多発性神経炎、慢性神経障害、例えばＩｇＭ多発性神経炎又はＩｇＭ媒介性神経障害、血小板減少（例えば心筋梗塞患者によるもの）、例えば血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、輸血後紫斑病（ＰＴＰ）、ヘパリン誘発性血小板減少及び自己免疫性又は免疫媒介性血小板減少、例えば慢性及び急性のＩＴＰを含む特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、強膜炎、例えば特発性のセラト強膜炎、上強膜炎、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）又は亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、グレーブス眼疾患(眼障害又は甲状腺関連の眼障害)、自己免疫多腺性症候群などの多腺性症候群、例えばタイプI（又は、多腺性内分泌障害症候群）、腫瘍随伴症候群、例として神経系新生物関連症候群、例えばランバート-イートン筋無力症症候群又はイートン―ランバート症候群、スティッフマン又はスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例として、アレルギー性脳脊髄炎又は脳脊髄炎性アレルギー及び実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌス又は眼球クローヌス筋硬直症候群（ＯＭＳ）及び感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、間質性肺炎、例えばリンパ系間隙間質性肺炎（ＬＩＰ）、閉塞性細気管支炎（非移植）対ＮＳＩＰ、ギラン- バレー症候群、ベルガー病（ＩｇＡネフロパシ）、特発性ＩｇＡネフロパシ、線状ＩｇＡ皮膚病、急性発熱性好中性皮膚病、角層下膿疱症、一過性棘融解皮膚病、肝硬変、例として原発性胆管萎縮症及び肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアックないしはコエリアック病、脂肪便症（グルテン腸疾患）、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、例として混合性クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症（ＡＬＳ；筋萎縮性側索硬化症(Lou Gehrig's disease)）、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例として、自己免疫内耳疾患（ＡＩＥＤ）、自己免疫聴力障害、多発性軟骨炎、例として、抵抗性又は再発性ないしは再発する多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、コーガン症候群／非梅毒性間質性角膜炎などの角膜炎、ベル麻痺、

スウィート病／症候群、自己免疫性酒さ、帯状ヘルペス関連疼痛、アミロイドーシス、非癌性リンパ球増多症、一次リンパ球増多症、これにはモノクローナルＢ細胞リンパ球増多症（例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症及び未同定の有意なモノクローナルガーモパチィ(monoclonal garnmopathy of undetermined significance)、ＭＧＵＳ）が含まれる、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺及びＣＮＳのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性又は分節性又は限局性分節性糸球体硬化症（ＦＳＧＳ）、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例として、自己免疫脱髄性病及び慢性炎症性脱髄性多発性神経炎、ドレスラー症候群、円形脱毛症、完全脱毛症、ＣＲＥＳＴ症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症及び毛細管拡張症）、雌雄自己免疫性不妊性、例えば、抗精子抗体によるもの、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎及び繊維化肺胞炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、寄生虫病、例としてリーシュマニア症、キパノソミアシス(kypanosomiasis)、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間隙肺線維形成、間質性肺線維形成、繊維化縦隔炎、肺線維形成、特発性の肺線維形成、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎(eosinophilic faciitis)、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア(flariasis)、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎（急性又は慢性）又はＦｕｃｈの毛様体炎）、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染、ＳＣＩＤ、後天性免疫不全症候群(ＡＩＤＳ)、エコーウィルス感染、敗血症(全身性炎症反応症候群(ＳＩＲＳ))、内毒血症、膵炎、thyroxicosis、パルボウィルス感染、風疹ウィルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウイルス感染、耳下腺炎、エヴァンの症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis ubiterans)、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、慢性過敏性肺炎、結膜炎、例として、春季カタル、乾性角結膜炎及び流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性及び乏血-再灌流障害、移植臓器再灌流、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道／肺性疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患、(大脳血管性不足)、例として動脈硬化脳症及び動脈硬化症網膜症、アスペルミオジェネース(aspermiogenese)、自己
免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、結節性紅斑、leprosum 特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感覚器性(sensoneural)聴力障害、血色素尿症発作(haemoglobinuria paroxysmatica)、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、一次特発性の粘液水腫、ネフローゼ、眼炎symphatica(交感性眼炎)、新生児眼炎、視神経炎、精巣炎肉芽腫症、膵炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壊疽、Ｑｕｅｒｖａｉｎ甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、非悪性胸腺腫、リンパ濾胞性胸腺炎、白斑、毒性ショック症候群、食中毒、Ｔ細胞の浸潤を伴う症状、白血球-粘着力欠損、サイトカイン及びＴリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊出を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、膵島炎、多内分泌性不全、自己免疫多腺性症候群、例えば多腺性症候群Ｉ型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症（ＡＯＩＨ）、拡張型心筋症、例えば後天性表皮水疱症（ＥＢＡ）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨又は蝶形骨副鼻腔炎、アレルギー性副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋肉痛症候群、レフラー症候群、

慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギローム又は好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、脊椎関節症、血清陰性脊椎関節炎疹、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブラットン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット- アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、例えば慢性関節リウマチ、リンパ節炎、血圧応答の減退、血管機能不全、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、及び脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、虚血性再灌流障害、心筋又は他の組織の再灌流損傷、リンパ腫気管気管支炎、炎症性皮膚病、急性炎症性成分を有する皮膚病、多臓器不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性疾患、眼性及び眼窩の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、ナルコレプシ、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、及び子宮内膜症などがある。このような疾患は、ＣＤ２２などのＢ細胞表面マーカーに結合する抗体の投与によって治療されることが本明細書において意図されるものであり、本明細書中で開示したようなコンジュゲートしていない(「ネイキッド」)抗体又は細胞障害性剤にコンジュゲートされた抗体の投与を含む。また、このような疾患は、他の抗体ないし抗体薬剤コンジュゲート、他の細胞障害性剤、放射線又は他の同時ないしは連続して施される治療と組み合わせて、本発明の抗ＣＤ２２抗体ないし抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートを含む併用療法によって治療されることが、本願明細書において意図される。

【０１１８】

ここで使用されるところの「治療」(及び「処置」又は「治療する」などの変形句)は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病の発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病の任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病の進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病の進行を遅らせるため又は疾患又は疾病の進行をゆっくりにするために用いられる。

「個体」は脊椎動物である。ある実施態様では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物(ウシなど)、スポーツ用動物、愛玩動物(ネコ、イヌ及びウマ)、霊長類、マウス及びラットが含まれる。ある実施態様では、哺乳動物はヒトである。

【０１１９】

「有効量」とは所望の治療又は予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。

本発明の物質／分子の「治療的有効量」は、例えば個体の疾病ステージ、年齢、性別、及び体重、並びに個体に所望の応答を誘発する物質／分子の能力などの因子に従って変わりうる。また、治療的有効量は物質／分子の任意の毒性又は有害な効果よりも治療的に恩恵のある効果が上回る量を包含する。「予防的有効量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。典型的には必ずではないが、予防的用量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有効量は治療的有効量よりも少ないであろう。

【０１２０】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞死ないしは破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及びＬｕの放射性同位体)、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロランブシル、ダウノルビシン又はその他インターカレート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植

物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、毒素、増殖阻害剤、薬剤成分、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

「毒素」は、細胞の成長又は増殖に対して有害な作用を有することができる任意の物質である。

【０１２１】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphaoramide)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にブラタシン及びブラタシノン)；デルタ-９-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標)；β ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン(scopolectin)及び９-アミノカンプトテシンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ-１０６５(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン１及びクリプトフィシン８)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、ＫＷ-２１８９及びＣＢ１-ＴＭ１を含む)；エロイテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシンγ １Ｉ及びカリケアマイシンω Ｉ１(例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Ａを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabicin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、６-ジアゾ-５-オキソ-Ｌ-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、２-ピロリノ-ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンＣのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び５-フルオロウラシル(５-ＦＵ)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、６-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、６-アザウリジン(azauridine)、カルモ

フール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポシロン；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシン；ロソキサントロン；２-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；２，２'，２''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にＴ-２毒素、ベラクリン(verracurin)Ａ、ロリジン(roridine)Ａ及びアングイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカーバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ａｒａ-Ｃ」)；チオテパ；タキソイド類、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE^{TM}パクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)、及びTAXOTERE(登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲムシタビン(GEMZAR(登録商標))；６-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン；ビンブラスチン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(ＶＰ-１６)；イホスファミド；マイトキサントロン；ビンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボビン(leucovovin)；ビノレルビン(NAVELBINE(登録商標))；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチロールニチン(ＤＭＦＯ)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン(XELODA(登録商標))；上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体：並びに上記のうち２以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニソロン併用療法の略称であるＣＨＯＰ、及び5-FU及びロイコボビン(leucovovin)とオキサリプラチン(ELOXATIN^{TM})を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

【０１２２】

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレータ(ＳＥＲＭ)を含み、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)(EVISTA(登録商標))、ドロロキシフェン、４-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、ＬＹ１１７０１８、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(FARESTON(登録商標))；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方調節剤(ERD)；卵巣を抑止又は停止させる機能がある作用剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えば酢酸リュープロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン(triptерelin)；その他抗アンド

ロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ビカルタミド；並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば４(５)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール(MEGASE(登録商標))、エキセメスタン(AROMASIN(登録商標))、フォルメスタニー(formestanie)、ファドロゾール、ボロゾール(RIVISOR(登録商標))、レトロゾール(FEMARA(登録商標))、及びアナストロゾール(ARIMIDEX(登録商標))である。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチドロン酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロン酸／ゾレドロネート(ZOMETA(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロン酸(AREDIA(登録商標))、チルドロン酸(SKELID(登録商標))、又はリセドロン酸(ACTONEL(登録商標))、並びにトロキサシタビン(troxacitabine)(１,３-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばＰＫＣ-α、Ｒａｆ、及びＨ-Ｒａｓ、及び上皮成長因子レセプター(EGF-R)；THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワクチン；トポイソメラーゼ１阻害剤(LURTOTECAN(登録商標))；ｒｍＲＨ(ABARELIX(登録商標))；ラパチニブ(lapatinib ditosylate)(GW572016としても知られるErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)；及び上記のもののいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【０１２３】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞(例えばＣＤ２２を発現する細胞)の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、Ｓ期で細胞(例えばＣＤ２２を発現する細胞)の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(Ｓ期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばＧ１停止又はＭ期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なＭ期ブロッカーは、ビンカス(ビンクリスチン及びビンブラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またＧ１停止させるこれらの薬剤は、Ｓ期停止にも波及し、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５-フルオロウラシル、及びアラ-Ｃである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に１３頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・プーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、ブリストル-マイヤー スクウィブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【０１２４】

「細胞内代謝物」なる用語は、抗体-抗原コンジュゲート(ＡＤＣ)上の細胞内部で代謝プロセス又は反応から生じている化合物に関する。代謝プロセス又は反応はＡＤＣのペプチドリンカーのタンパク質切断や、ヒドラゾン、エステル又はアミドなどの官能基の加水分解といった酵素的な過程であってもよい。細胞内代謝物には、限定するものではないが、細胞内への移行、拡散、取り込み又は輸送後に細胞内切断が行われた遊離薬剤及び抗体が含まれる。

「細胞内に切断される」及び「細胞内切断」なる用語は、抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)に対する細胞内の代謝プロセス又は反応であって、これによって薬剤成分(Ｄ)と抗体(Ａｂ)間の共有結合、すなわちリンカーが壊れ、その結果、細胞内の抗体から遊離した薬剤が分離される。ゆえに、ＡＤＣの切断された成分は細胞内代謝物である。

【０１２５】

「生物学的利用能」なる用語は、患者に投与される薬剤の所定の量の全身有効性(すなわち、血液／血しょう濃度)を指す。生物学的利用能は、投与された用量形態から体循環に達する薬剤の時間(速度)と総量(程度)の測定値を示す絶対的な用語である。

「細胞障害活性」なる用語は、抗体-薬剤コンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲートの細胞内代謝物の細胞殺傷効果、細胞増殖抑制効果又は増殖阻害効果を指す。細胞障害活性は、細胞の半分が生存する単位容量当たりの濃度(モル又は質量)であるＩＣ５０値として表されてもよい。

【０１２６】

「アルキル」は、ノルマル、第２級、第３級、又は環式の炭素原子を含むＣ１-Ｃ１８炭化水素である。例として、メチル（Ｍｅ、-ＣＨ３)、エチル（Ｅｔ、-ＣＨ２ＣＨ３)、１-プロピル（ｎ-Ｐｒ、ｎ-プロピル、-ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３)、２-プロピル（ｉ-Ｐｒ、ｉ-プロピル、-ＣＨ(ＣＨ３)２)、１-ブチル（ｎ-Ｂｕ、ｎ-ブチル、-ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３)、２-メチル-１-プロピル（ｉ-Ｂｕ、ｉ-ブチル、-ＣＨ２ＣＨ(ＣＨ３)２)、２-ブチル（ｓ-Ｂｕ、ｓ-ブチル、-ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ２ＣＨ３)、２-メチル-２-プロピル（ｔ-Ｂｕ、ｔ-ブチル、-Ｃ(ＣＨ３)３)、１-ペンチル(ｎ-ペンチル、-ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３)、２-ペンチル（-ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３)、３-ペンチル（-ＣＨ(ＣＨ２ＣＨ３)２)、２-メチル-２-ブチル（-Ｃ(ＣＨ３)２ＣＨ２ＣＨ３)、３-メチル-２-ブチル（-ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ(ＣＨ３)２)、３-メチル-１-ブチル（-ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ(ＣＨ３)２)、２-メチル-１-ブチル（-ＣＨ２ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ２ＣＨ３)、１-ヘキシル（-ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３)、２-ヘキシル（-ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３)、３-ヘキシル（-ＣＨ(ＣＨ２ＣＨ３)(ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３))、２-メチル-２-ペンチル（-Ｃ(ＣＨ３)２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ３)、３-メチル-２-ペンチル（-ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ２ＣＨ３)、４-メチル-２-ペンチル（-ＣＨ(ＣＨ３)ＣＨ２ＣＨ(ＣＨ３)２)、３-メチル-３-ペンチル（-Ｃ(ＣＨ３)(ＣＨ２ＣＨ３)２)、２-メチル-３-ペンチル（-ＣＨ(ＣＨ２ＣＨ３)ＣＨ(ＣＨ３)２)、２,３-ジメチル-２-ブチル（-Ｃ(ＣＨ３)２ＣＨ(ＣＨ３)２)、３,３-ジメチル-２-ブチル（-ＣＨ(ＣＨ３)Ｃ(ＣＨ３)３がある。

【０１２７】

本明細書中で用いる「C_1-C_8アルキル」なる用語は、１から８の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖の、飽和ないしは不飽和炭化水素を指す。典型的な「C_1-C_8アルキル」基には、限定するものではないが、-メチル、-エチル、-ｎ プロピル、-ｎ ブチル、-ｎ ペンチル、-ｎ ヘキシル、-ｎ-ヘプチル、-ｎ-オクチル、-ｎ-ノニル、及び-ｎ-デシルが含まれ、一方、分岐したC_1-C_8アルキルには、限定するものではないが、-イソプロピル、-ｓｅｃブチル、-イソブチル、-ｔｅｒｔブチル、-イソペンチル、２-メチルブチルが含まれ、不飽和のC_1-C_8アルキルには、限定するものではないが、-ビニル、-アリル、-１-ブテニル、-２-ブテニル、-イソブチレニル、-１-ペンテニル、-２-ペンテニル、-３-メチル-１-ブテニル、-２-メチル-２-ブテニル、-２,３-ジメチル-２-ブテニル、１-ヘキシル、２-ヘキシル、３-ヘキシル,-アセチレニル、-プロピニル、-１-ブチニル、-２-ブチニル、-１-ペンチニル、-２-ペンチニル、-３-メチル-１-ブチニル、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ｎ-ブチル、イソブチル、ｓｅｃ-ブチル、ｔｅｒｔ-ブチル、ｎ-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ｎ-ヘキシル、イソヘキシル、２-メチルペンチル、３-メチルペンチル、２,２-ジメチルブチル、２,３-ジメチルブチル、２,２-ジメチルペンチル、２,３-ジメチルペンチル、３,３-ジメチルペンチル、２,３,４-トリメチルペンチル、３-メチルヘキシル、２,２-ジメチルヘキシル、２,４-ジメチルヘキシル、２,５-ジメチルヘキシル、３,５-ジメチルヘキシル、２,４-ジメチルペンチル、２-メチルヘプチル、３-メチルヘプチル、ｎ-ヘプチル、イソヘプチル、ｎ-オクチル、及びイソオクチルが含まれる。C_1-C_8アルキル基は、限定するものではないが、置換されていなくてもよいし、-C_1-C_8 アルキル、-Ｏ-(C_1-C_8 アルキル)、-ア

リール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH$_2$、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R'、-SO$_3$R'、-S(O)$_2$R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N$_3$、-NH$_2$、-NH(R')、-N(R')$_2$、及び-CNを含め、一又は複数の基によって置換されていてもよく、各々のR'は、H、-C$_1$-C$_8$アルキル及びアリールから別々に選択される。

【0128】

「アルケニル」は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素-炭素、sp^{2}二重結合を有するノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含むC$_2$-C$_{18}$炭化水素である。例には、限定するものではないが、エチレン又はビニル(-CH=CH$_2$)、アリル(-CH$_2$CH=CH$_2$)、シクロペンテニル(-C$_5$H$_7$)及び5-ヘキセニル(-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH=CH$_2$)などがある。

「アルキニル」は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素-炭素、sp三重結合を有するノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含むC$_2$-C$_{18}$炭化水素である。例には、限定するものではないが、アセチレン(-C≡CH)及びプロパルギル(-CH$_2$C≡CH)などがある。

「アルキレン」は、1~18の炭素原子であって、親のアルカンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する飽和した、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキレン基には、限定するものではないが、メチレン(-CH$_2$-) 1,2-エチル(-CH$_2$CH$_2$-)、1,3-プロピル(-CH$_2$CH$_2$CH$_2$-)、1,4-ブチル(-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-)などが含まれる。

【0129】

「C$_1$-C$_{10}$アルキレン」は、式 -(CH$_2$)$_{1-10}$-の直鎖の飽和した炭化水素基である。C$_1$-C$_{10}$アルキレンの例には、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、及びデカレンが含まれる。

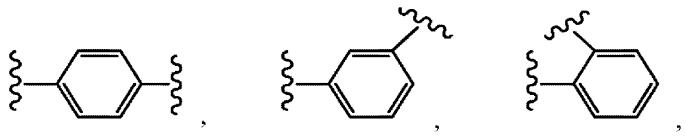
「アルケニレン」は、2~18の炭素原子であって、親のアルケンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルケニレン基には、限定するものではないが、1,2-エチレン(-CH=CH-)が含まれる。

「アルキニレン」は、2~18の炭素原子であって、親のアルキンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキニレン基には、限定するものではないが、アセチレン(-C≡C-)、プロパルギル(-CH$_2$C≡C-)、及び 4-ペンチニル(-CH$_2$CH$_2$CH$_2$C≡C-)が含まれる。

「アリール」は炭素環の芳香基を指す。アリール基の例には、限定するものではないが、フェニール、ナフチル及びアントラセニルが含まれる。炭素環の芳香基又はヘテロサイクリック芳香基は、置換されていなくてもよいし、限定するものではないが、-C$_1$-C$_8$アルキル、-O-(C$_1$-C$_8$アルキル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH$_2$、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R'、-S(O)$_2$R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N$_3$、-NH$_2$、-NH(R')、-N(R')$_2$、及び-CNを含む、一又は複数の基によって置換されていてもよく、各々のR'は、H、-C$_1$-C$_8$アルキル及びアリールから別々に選択される。

【0130】

「アリレン(arylene)」は2つの共有結合を有するアリール基であり、以下の構造で示すようなオルト、メタ又はパラの立体配置でありうる。



ここで、フェニル基は置換されていなくても、限定するものではないが、-C_1-C_8アルキル、-O-(C_1-C_8アルキル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH_2、-C(O)NHR'、-C(O)$N(R')_2$、-NHC(O)R'、-S(O)$_2$R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$、及び-CNを含む最大４つの基にて置換されてもよく、それぞれのR'は、H、-C_1-C_8アルキル及びアリールから個々に選択される。

【０１３１】

「アリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又はsp^3炭素原子に結合した水素原子のうちの１つがアリール基に置換している非環式アルキル基を指す。代表的なアリールアルキル基には、限定するものではないが、ベンジル、２-フェニルエタン-１-イル、２-phenylethen-１-イル、ナフチルメチル、２-ナフチルエタン-１-イル、２-naphthylethen-１-イル、ナフトベンジル、２-ナフトフェニルエタン-１-イルなどが含まれる。アリールアルキル基は６～２０の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、アリールアルキル基のアルキル部分は１～６の炭素原子であり、アリール部分は５～１４の炭素原子である。

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又はsp^3炭素原子に結合した水素原子のうちの１つがヘテロアリール基に置換している非環式アルキル基を指す。典型的なヘテロアリールアルキル基には、限定するものではないが、２-ベンズイミダゾリルメチル、２-フリルエチルなどが含まれる。ヘテロアリールアルキル基は６～２０の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、ヘテロアリールアルキル基のアルキル部分は１～６の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は５～１４の炭素原子であり、１～３のヘテロ原子はN、O、P及びSから選択される。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は３～７員環を有するモノシクロ(２～６の炭素原子)又は７～１０員環を有するビシクロ(４～９の炭素原子とN、O、P及びSから選択される１～３のヘテロ原子)、例えばビシクロ[４，５]、[５，５]、[５，６]、又は[６，６]システムであってもよい。

【０１３２】

「置換されたアルキル」、「置換されたアリール」、「置換されたアリールアルキル」とは、アルキル、アリール及びアリールアルキルをそれぞれ意味し、一又は複数の水素原子がそれぞれ別々に置換基に置換している。典型的な置換基には、限定するものではないが、-X、-R、-O^-、-OR、-SR、-S-、-NR_2、-NR_3、=NR、-CX_3、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、-NO_2、=N_2、-N_3、-NC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR_2、-SO_3^-、-SO_3H、-S(=O)$_2$R、-OS(=O)$_2$OR、-S(=O)$_2$NR、-S(=O)R、-OP(=O)(OR)$_2$、-P(=O)(OR)$_2$、-PO^-_3、-PO_3H_2、-C(=O)R、-C(=O)X、-C(=S)R、-CO_2R、-CO_2^-、-C(=S)OR、-C(=O)SR、-C(=S)SR、-C(=O)NR_2、-C(=S)NR_2、-C(=NR)NR_2が含まれ、それぞれのXは個々にハロゲン：F、Cl、Br又はIであり、それぞれのRは個々に-H、C_2-C_{18}アルキル、C_6-C_{20}アリール、C_3-C_{14}複素環、保護基又はプロドラッグ部分である。上記のアルキレン、アルケニレン及びアルキニレン基もまた、同じように置換されてもよい。

【０１３３】

「ヘテロアリール」及び「複素環」は、一又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素及び硫黄である環式システムを指す。複素環基は、１～２０の炭素原子とＮ、Ｏ、Ｐ及びＳから選択される１～３のヘテロ原子を含む。複素環は、３～７員環を有するモノシクロ(２～６の炭素原子とＮ、Ｏ、Ｐ及びＳから選択される１～３のヘテロ原子)又は７～１０員環を有するビシクロ(４～９の炭素原子とＮ、Ｏ、Ｐ及びＳから選択される１～３のヘテロ原子)、例えばビシクロ[４，５]、[５，５]、[５，６]、又は[６，６]システムであってもよい。

複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1, 3, 4, 6, 7及び9章；"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に13, 14, 16, 19及び28号；及び、J. Am Chem Soc. (1960) 82:5566に記載される。

複素環の例には、例示のためであって限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル（ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、４－ピペリドニル、ピロリジニル、２－ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス－テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス－テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、６Ｈ－１，２，５－チアジアジニル、２Ｈ，６Ｈ－１，５，２－ジチアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、２Ｈ－ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、３Ｈ－インドリル、１Ｈ－インダゾリル、プリニル、４Ｈ－キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、プテリジニル、４ａＨ－カルバゾリル、カルバゾリル、β－カルボリニル、フェナンスリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれる。

【０１３４】

例示的なものであって限定するものではなく、炭素結合複素環は、ピリジンの２、３、４、５、又は６位、ピリダジンの３、４、５、又は６位、ピリミジンの２、４、５、又は６位、ピラジンの２、３、５、又は６位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールないしはテトラヒドロピロールの２、３、４、又は５位、オキサゾール、イミダゾールないしはチアゾールの２、４、又は５位、イソキサゾール、ピラゾールないしはイソチアゾールの３、４、又は５位、アジリジンの２又は３位、アゼチジンの２、３、又は４位、キノリンの２、３、４、５、６、７、又は８位、又はイソキノリンの１、３、４、５、６、７、又は８位に結合する。さらにより典型的には、炭素結合複素環には、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、５－ピリジル、６－ピリジル、３－ピリダジニル、４－ピリダジニル、５－ピリダジニル、６－ピリダジニル、２－ピリミジニル、４－ピリミジニル、５－ピリミジニル、６－ピリミジニル、２－ピラジニル、３－ピラジニル、５－ピラジニル、６－ピラジニル、２－チアゾリル、４－チアゾリル、又は５－チアゾリルが含まれる。

例示的なものであって限定するものではなく、窒素結合複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、２－ピロリン、３－ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、２－イミダゾリン、３－イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、２－ピラゾリン、３－ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、１Ｈ－インダゾ

ールの１位、イソインドールないしはイソインドリンの２位、モルフォリンの４位、カルバゾールないしはβ－カルボリンの９位に結合する。さらにより典型的には、窒素結合複素環には、１－アジリジル、１－アゼテジル、１－ピロリル、１－イミダゾリル、１－ピラゾリル、及び１－ピペリジニルが含まれる。

【０１３５】

「C_3－C_8複素環」は、１～４の環状炭素原子が個々にＯ、Ｓ及びＮからなる群のヘテロ原子に置換されている芳香族ないしは非芳香族のC_3－C_8複素環を指す。C_3－C_8複素環の代表的な例には、限定するものではないが、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェン、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフェニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル及びテトラゾリルが含まれる。C_3－C_8複素環は置換されていなくても、限定するものではないが、－C_1－C_8アルキル、－Ｏ－(C_1－C_8アルキル)、－アリール、－Ｃ(Ｏ)Ｒ'、－ＯＣ(Ｏ)Ｒ'、－Ｃ(Ｏ)ＯＲ'、－Ｃ(Ｏ)ＮＨ$_2$、－Ｃ(Ｏ)ＮＨＲ'、－Ｃ(Ｏ)Ｎ(Ｒ')$_2$、－ＮＨＣ(Ｏ)Ｒ'、－Ｓ(Ｏ)$_2$Ｒ'、－Ｓ(Ｏ)Ｒ'、－ＯＨ、－ハロゲン、－N_3、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ(Ｒ')、－Ｎ(Ｒ')$_2$、及び－ＣＮを含む最大７基に置換されていてもよく、各々のＲ'は、Ｈ、－C_1－C_8アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。

「C_3－C_8ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子のうちの１つが結合に置換されている上記のＣ３－Ｃ８複素環基を指す。C_3－C_8ヘテロシクロは置換されていなくても、限定するものではないが、－C_1－C_8アルキル、－Ｏ－(C_1－C_8アルキル)、－アリール、－Ｃ(Ｏ)Ｒ'、－ＯＣ(Ｏ)Ｒ'、－Ｃ(Ｏ)ＯＲ'、－Ｃ(Ｏ)ＮＨ$_2$、－Ｃ(Ｏ)ＮＨＲ'、－Ｃ(Ｏ)Ｎ(Ｒ')$_2$、－ＮＨＣ(Ｏ)Ｒ'、－Ｓ(Ｏ)$_2$Ｒ'、－Ｓ(Ｏ)Ｒ'、－ＯＨ、－ハロゲン、－N_3、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ(Ｒ')、－Ｎ(Ｒ')$_2$、及び－ＣＮを含む最大６基に置換されていてもよく、各々のＲ'は、Ｈ、－C_1－C_8アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。

【０１３６】

「炭素環」は、単環として３～７の炭素原子又は二環として７～１２の炭素原子を有する飽和ないしは不飽和の環を意味する。単環の炭素環は３～６の環状原子、より一般的には５又は６の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばビシクロ[４，５]、[５，５]、[５，６]又は[６，６]システムとして配置した７～１２の環状原子、又はビシクロ[５，６]又は[６，６]システムとして配置した９又は１０の環状原子を有する。単環の炭素環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペント－１－エニル、１－シクロペント－２－エニル、１－シクロペント－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキス－１－エニル、１－シクロヘキス－２－エニル、１－シクロヘキス－３－エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。

「C_3－C_8炭素環」は、３－、４－、５－、６－、７－又は８－員の飽和ないしは不飽和非芳香族炭素環である。代表的なC_3－C_8炭素環には、限定するものではないが、－シクロプロピル、－シクロブチル、－シクロペンチル、－シクロペンタジエニル、－シクロヘキシル、－シクロヘキセニル、－１，３－シクロヘキサジエニル、－１，４－シクロヘキサジエニル、－シクロヘプチル、－１，３－シクロヘプタジエニル、－１，３，５－シクロヘプタトリエニル、－シクロオクチル、及び－シクロオクタジエニルが含まれる。C_3－C_8炭素環基は置換されていなくても、限定するものではないが、－C_1－C_8アルキル、－Ｏ－(C_1－C_8アルキル)、－アリール、－Ｃ(Ｏ)Ｒ'、－ＯＣ(Ｏ)Ｒ'、－Ｃ(Ｏ)ＯＲ'、－Ｃ(Ｏ)ＮＨ$_2$、－Ｃ(Ｏ)ＮＨＲ'、－Ｃ(Ｏ)Ｎ(Ｒ')$_2$、－ＮＨＣ(Ｏ)Ｒ'、－Ｓ(Ｏ)$_2$Ｒ'、－Ｓ(Ｏ)Ｒ'、－ＯＨ、－ハロゲン、－N_3、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ(Ｒ')、－Ｎ(Ｒ')$_2$、及び－ＣＮを含む一又は複数の基に置換されていてもよく、各々のＲ'は、Ｈ、－C_1－C_8アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。

「C_3－C_8カルボシクロ」は、炭素環基の水素原子のうちの１つが結合に置換されている上記のC_3－C_8炭素環基を指す。

【０１３７】
「リンカー」は、共有結合を含む化学的な部分又は薬剤部分に抗体を共有結合させる原子の鎖を指す。様々な実施態様では、リンカーには、二価の基、例としてalkyldiyl、aryldiyl、heteroaryldiyl、アルキロキシ(例としてポリエチレンオキシ、ＰＥＧ、ポリメチレンオキシ)及びアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、JeffamineTM)の繰り返しユニットである-(CR_2)$_n$O(CR_2)$_n$-などの部分、及び、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。
「キラル」なる用語は、鏡像パートナーの重ね合わすことができない特性を有する分子を指し、一方、「アキラル」なる用語は、鏡像パートナーの重ね合わすことができる分子を指す。
「立体異性体」なる用語は、同一の化学構造を有するが、空間の原子又は基の配列に関しては異なる化合物を指す。
「ジアステレオマー」はキラリティの２以上の中心を有し、その分子が互いの鏡像でない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的性質、例えば融点、沸点、分光特性及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動及びクロマトグラフィなどの高分解能解析手順により分離されうる。
「鏡像異性体」は、互いに重ね合わせることができない鏡像である化合物の２つの立体異性体を指す。
【０１３８】
本明細書中で用いる立体化学的定義及び慣例は、一般にS. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；及び、Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに従う。多くの有機化合物は光学的に活性な形態で存在する。すなわち直線偏光の平面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物を記載する場合、接頭語ＤとＬ又はＲとＳを用いて、キラル中心(一又は複数)の周りの分子の絶対配置を示す。接頭後ｄとｌ又は(＋)と(－)は、化合物による直線偏光の回転のサインを示すために用いるものであって、(－)又はｌは化合物が左旋性であることを意味する。(＋)又はｄを接頭に付した化合物は右旋性である。所定の化学構造では、互いの鏡像であることを除いて、これらの立体異性体は同一である。また、特定の立体異性体は鏡像異性体とも称され、この異性体の混合物は鏡像異性体混合物と称されることが多い。鏡像異性体の５０：５０混合物は、化学的反応又は過程において立体選別でも立体特異性でもなくなった場合に生じうるラセミ混合物又はラセミ化合物を指す。「ラセミ混合物」及び「ラセミ化合物」なる用語は、光学的活性を欠く、２つの鏡像異性種を指す。
「脱離基」は、他の官能基によって置換されうる官能基を指す。特定の脱離基は当分野で公知であり、例として、限定するものではないが、ハロゲン化物(例えば、クロライド、ブロマイド、イオジド)、メタンスルホニル（メシル)、p-トルエンスルホニル（トシル)、トリフルオロメチルスルホニル（トリフレート)、及びトリフルオロメチルスルホネートなどがある。
【０１３９】
省略記号
リンカー成分：
ＭＣ＝６-マレイミドカプロイル
Ｖａｌ-Ｃｉｔ又は「ｖｃ」＝バリン-シトルリン(プロテアーゼにより切断可能なリンカーの例示的なジペプチド)
シトルリン＝２-アミノ-５ウレイドペンタン酸
ＰＡＢ＝ｐ-アミノベンジルオキシカルボニル(「自己犠牲(self immolative)」リンカー成分の例)
Ｍｅ-Ｖａｌ-Ｃｉｔ＝Ｎ-メチル-バリン-シトルリン(リンカーペプチド結合が、カテプシンＢによる切断を阻害するように修飾されているもの)

ＭＣ(ＰＥＧ)６－ＯＨ＝マレイミドカプロイル－ポリエチレングリコール(抗体システインに結合しうる)
ＳＰＰ＝Ｎ-スクシンイミジル-４-(２-ピリジルチオ)ペンタノエート
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
ＳＭＣＣ＝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
ＩＴ＝イミノチオラン
細胞障害性剤：
ＭＭＡＥ＝モノメチルアウリスタチンＥ(ＭＷ７１８)
ＭＭＡＦ＝薬剤のＣ末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチンＥ(ＭＭＡＥ)の変異体(ＭＷ７３１．５)
ＭＭＡＦ－ＤＭＡＥＡ＝Ｃ末端のフェニルアラニンに対するアミド連結にＤＭＡＥＡ(ジメチルアミノエチルアミン)を有するＭＭＡＦ(ＭＷ８０１．５)
ＭＭＡＦ－ＴＥＧ＝フェニルアラニンにエステル化したテトラエチレングリコールを有するＭＭＡＦ
ＭＭＡＦ－ＮｔＢｕ＝ＭＭＡＦのＣ末端にアミドとして結合した、Ｎ-ｔ-ブチル
ＤＭ１＝Ｎ(２')-デアセチル-Ｎ(２')-(３-メルカプト-１-オキソプロピル)-メイタンシン
ＤＭ３＝Ｎ(２')-デアセチル-Ｎ２-(４-メルカプト-１-オキソペンチル)-メイタンシン
ＤＭ４＝Ｎ(２')-デアセチル-Ｎ２-(４-メルカプト-４-メチル-１-オキソペンチル)-メイタンシン

【０１４０】

さらに、略語は以下の通りである：ＡＥはアウリスタチンＥであり、ＢｏｃはＮ(ｔブトキシカルボニル)であり、ｃｉｔはシトルリンであり、ｄａｐはドラプロイン(dolaproine)であり、ＤＣＣは１，３-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、ＤＣＭはジクロロメタンであり、ＤＥＡはジエチルアミンであり、ＤＥＡＤはジエチルアゾジカルボキシレートであり、ＤＥＰＣはジエチルホスホリルシアニダートであり、ＤＩＡＤはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、ＤＩＥＡはＮ,Ｎ-ジイソプロピルエチルアミンであり、ｄｉｌはドライソロイシンであり、ＤＭＡはジメチルアセトアミドであり、ＤＭＡＰは４-ジメチルアミノピリジンであり、ＤＭＥはエチレングリコールジメチルエーテル(又は１，２-ジメトキシエタン)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、ｄｏｅはドラフェニン(dolapheni ne)であり、ｄｏｖはＮ,Ｎ-ジメチルバリンであり、ＤＴＮＢは５，５'-ジチオビス(２-ニトロ安息香酸)であり、ＤＴＰＡはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、ＤＴＴはジチオトレイトールであり、ＥＤＣＩは１-(３-ジメチルアミノプロピル)-３-エチルカルボジイミド塩酸塩であり、ＥＥＤＱは、２-エトキシ-１-エトキシカルボニル-１，２-ジヒドロキノリンであり、ＥＳ-ＭＳはエレクトロスプレー質量分析であり、ＥｔＯＡｃは酢酸エチルであり、ＦｍｏｃはＮ-(９-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、ｇｌｙはグリシンであり、ＨＡＴＵは、Ｏ-(７-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-Ｎ,Ｎ,Ｎ',Ｎ'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、ＨＯＢｔは１-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、ＨＰＬＣは高速液体クロマトグラフィであり、ｉｌｅはイソロイシンであり、ｌｙｓはリジンであり、ＭｅＣＮ(CH_3CN)はアセトニトリルであり、ＭｅＯＨはメタノールであり、Ｍｔｒは４-アニシルジフェニルメチル(又は４-メトキシトリチル)であり、(１Ｓ，２Ｒ)-(＋)-ノルエフェドリンではなく、ＰＢＳはリン酸塩緩衝生理食塩水(ｐＨ７．４)であり、ＰＥＧはポリエチレングリコールであり、Ｐｈはフェニルであり、Ｐｎｐはｐ-ニトロフェニルであり、ＭＣは６-マレイミドカプロイルであり、ｐｈｅはＬ-フェニルアラニンであり、ＰｙＢｒｏｐは、ブロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、ＳＥＣはサイズ排除クロマトグラフィであり、Ｓｕはスクシンイミドであり、ＴＦＡはトリフルオロ酢酸であり、ＴＬＣは薄層クロマトグラフィであり、ＵＶは紫外線であり、ｖａｌはバリンである。

【０１４１】
組成物及びその作製方法
ＣＤ２２に結合する抗体が提供される。抗ＣＤ２２抗体を含んでなるイムノコンジュゲートが提供される。本発明の抗体及びイムノコンジュゲートは、例えば、ＣＤ２２の発現の増加などの発現の変更と関係する疾患の診断や治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、癌などの細胞増殖性疾患の診断や治療に有用である。
【０１４２】
抗ＣＤ２２抗体
一態様では、本発明はＣＤ２２に結合する抗体を提供する。いくつかの実施態様では、ヒトおよびカニクイザル(ｃｙｎｏ)のＣＤ２２の成熟形態に結合する抗体が提供される。そのような実施態様では、ヒトのＣＤ２２の成熟形態は配列番号：２７のアミノ酸配列を有する。成熟した、主なヒトのアイソフォームは、７つのＩｇ様ドメインと配列番号：２８のアミノ酸配列を含む細胞外ドメインを有する。他の実施態様では、細胞外ドメイン３および４を欠いているヒトのＣＤ２２の微量のアイソフォームは配列番号：２９のアミノ酸配列を有する。微量のアイソフォームの細胞外ドメインのアミノ酸配列は配列番号：３０である。ｃｙｎｏ ＣＤ２２は配列番号：３１のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、ＣＤ２２に対する抗体は、細胞表面に発現されるＣＤ２２の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、細胞表面に発現されるＣＤ２２の成熟形態に結合する抗体は、細胞の成長を阻害する。いくつかの実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、細胞表面に発現されるＣＤ２２の成熟形態に結合して、細胞増殖を阻害する。ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、細胞表面に発現されるＣＤ２２の成熟形態と結合して、細胞死を誘導する。いくつかの実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、癌細胞の表面に発現されるＣＤ２２の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、同じ組織起源の正常細胞と比較して癌細胞の表面に過剰に発現されるＣＤ２２の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、細胞毒素又は検出可能な標識にコンジュゲートされ、細胞表面上のＣＤ２２に結合する。いくつかの実施態様では、抗体-毒素コンジュゲートは細胞の成長を阻害する。いくつかの実施態様では、抗体-検出可能な標識コンジュゲートは、その表面上にＣＤ２２を発現する細胞をインビトロ又はインビボで検出可能にする。
【０１４３】
一態様では、抗ＣＤ２２抗体はモノクローナル抗体である。一態様では、抗ＣＤ２２抗体は抗体断片、例えばＦａｂ、Ｆａｂ'-ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ又は$(Fab')_2$断片である。一態様では、抗ＣＤ２２抗体はキメラ、ヒト化、又はヒトの抗体である。一態様では、本発明書中に記載のいずれかの抗ＣＤ２２抗体は精製される。
ファージライブラリから得られる例示的なモノクローナル抗体は、本願明細書において提供される。ライブラリをスクリーニングするために用いられる抗原は、ＣＤ２２βおよびαの細胞外ドメイン(ＥＣＤ)に対応する、配列番号２８又は配列番号：３０のアミノ酸配列の配列を有するポリペプチドとした。ライブラリスクリーニングから生じる抗体は親和性成熟される。
一態様では、マウス１０Ｆ４．４．１、ヒト化１０Ｆ４ｖ１およびｖ３、およびマウス５Ｅ８．１．８とＣＤ２２への結合について競合するモノクローナル抗体が提供される。また、マウス１０Ｆ４．４．１、ヒト化１０Ｆ４ｖ１およびｖ３、およびマウス５Ｅ８．１．８と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体が提供される。
本発明の一態様では、抗ＣＤ２２抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。ある実施態様では、前記のベクターを含む宿主細胞が提供される。本発明の他の態様では、抗ＣＤ２２抗体をコードする抗ＣＤ２２抗体又はポリヌクレオチドを含有する組成物が提供される。ある実施態様では、本発明の組成物は、本明細書中で列挙したものなどの細胞増殖性疾患の治療のための製薬的製剤である。

【０１４４】
抗体の投与および製剤
一実施態様では、本発明の抗ＣＤ２２抗体又は抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート(限定するものではないが、本発明の抗ＣＤ２２ ｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートを含む)は、Ｂ細胞表面抗原のアンタゴニストと組み合わせて投与される。更なる治療的薬剤「との組合せ」投与には同時(併用)及びいずれかの順序での連続投与が含まれる。一実施態様では、投与は連続的であるか、経時的である。他の実施態様では、投与は、同時、同時期、または同じ製剤に一緒にある。一実施態様では、Ｂ細胞表面抗原アンタゴニストは抗体ないしはその抗原結合断片である。一実施態様では、Ｂ細胞表面アンタゴニストは抗体薬剤コンジュゲートである。
本明細書中の製剤は、治療される特定の徴候の必要に応じて１より多い活性な化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的な活性を有する化合物を含有してもよい。例えば、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はＣＤ２２結合オリゴペプチドに加えて、一つの製剤中に、更なる抗体、例えばＣＤ２２ポリペプチド上の異なるエピトープを結合する第二の抗ＣＤ２２抗体、又は異なるＢ細胞表面抗原を結合する第二の抗体、又は特定の癌の成長に影響する増殖因子などのいくつかの他の標的に対する抗体を含有することを意図してもよい。あるいは又はさらに、組成物は、化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、増殖阻害性剤、抗ホルモン剤および／または心臓保護剤を更に含んでもよい。このような分子は、意図する目的のために有効である量で適切に組み合わされる。

【０１４５】
現在、癌の段階に応じて、癌治療は、癌性の組織を取り除くための外科手術、放射線療法および化学療法、の治療法の一つ又は組合せを伴う。抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチド療法は、放射線療法の有用性に限界がある転移性疾患や化学療法の副作用や毒性に対して耐性がない高齢の患者に特に望ましい。本発明の腫瘍を標的とする抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、疾患の初回診断時や再発の際のＣＤ２２発現癌を軽減するために有用である。治療のために、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、単独で用いることができるし、例えばホルモン剤、血管新生抑制剤、又は外科手術、寒冷療法及び／又は放射線療法との組み合わせ療法で用いてもよい。抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチド治療は、従来の療法の他の形態とともに、従来の治療の前又は後のいずれか連続して施されてもよい。癌を治療するかまたは緩和するための本発明の方法では、癌患者は、一又は複数の先の化学療法剤による治療とともに、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドを投与されてもよい。抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、化学療法剤の治療的に有効な量で投与される。他の実施態様では、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、化学療法剤の活性および有効性を上げるために、化学療法とともに投与される。米医薬品便覧(ＰＤＲ)には、様々な癌の治療に用いられている薬剤の用量が開示されている。治療的に有効である前記の化学療法剤の投薬計画および用量は、治療される特定の癌、疾患の程度および当分野の医師に知られる他の因子によって決まり、医師によって測定されることも可能である。

【０１４６】
ある特定の実施態様では、細胞障害性剤とコンジュゲートされた抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドを含むコンジュゲートが患者に投与される。好ましくは、ＣＤ２２タンパク質に結合したイムノコンジュゲートは細胞に取り込まれ、結果として、結合する癌細胞を殺す際のイムノコンジュゲートの治療有効性が増加する。一実施態様では、細胞障害性剤は癌細胞内の核酸を標的とするか、又は干渉する。細胞障害性剤の例は前記されるものであり、アウリスタチン、メイタンシノイド、カリケアマイシン、ＲＮＡ分解酵素およびＤＮＡエンドヌクレアーゼ又は生物学的に活性なこれらの誘導体が含まれる。

抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチド又はこれらの毒素コンジュゲートは、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は一定期間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、くも膜下腔内、経口、局所、又は吸入経路などにより、ヒト患者に投与される。抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドの静脈内投与又は皮下投与が好ましい。

他の治療的投薬計画は、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドの投与と組み合わせてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の製薬的製剤を用いての同時投与や、いずれかの順序での連続投与が含まれ、このとき、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間があるのが好ましい。このような併用療法により相乗的な治療効果が生じるのが好ましい。

【０１４７】

また、抗ＣＤ２２抗体(一又は複数)、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドの投与と、他の腫瘍抗原又は特定の癌に関連するＢ細胞表面抗原に対する抗体の投与とを組み合わせることが望ましい。

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗ＣＤ２２抗体(一又は複数)、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート(一又は複数)又はオリゴペプチド(一又は複数)と一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニマスチン、シスプラチン、５-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素およびヒドロキシ尿素タキサン類(例えばパクリタキセルおよびドキセタキセル)および／またはアンスラサイクリン抗生物質、並びに、限定するものではないがＣＨＯＰやＦＯＬＦＯＸ等の薬剤の組合せが含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製および投与スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記述される。

抗体は、非経口、局所、皮下、腹膜内、肺内、鼻腔内、および／または病巣内投与を含む任意の適切な手段によって投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下投与が含まれる。くも膜下腔内投与も考慮される(例として、ＣＤ２２抗体のくも膜下腔内移送に関する、Grillo-Lopez, Aの米国特許公開2002/0009444を参照)。好ましくは、静脈内又は皮下に投与される。

第二の医薬は、治療用抗体ないしイムノアドヘシンの初回曝露及び／又は後の曝露によって投与されてもよく、前記の組合せ投与には、別々の製剤又は単一の製薬的製剤を用いた投与や、いずれかの順序での連続投与が含まれ、このとき、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間があるのが好ましい。

【０１４８】

治療用抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート、イムノアドヘシン又は他の生物学的物質が、自己免疫性疾患を治療するために単一の薬剤として投与されうるのに対して、一般に、治療用抗体ないしイムノアドヘシンは一又は複数の第二医薬と組み合わされるであろう。例えば、ＲＡおよび他の自己免疫性疾患のために、抗体、イムノアドヘシン又は他の生物学的薬剤は、前記の定義の項目に列挙した、任意の一又は複数の免疫抑制剤、化学療法剤、ＢＡＦＦアンタゴニスト、インテグリンアンタゴニストないしは抗体、および／またはサイトカイン；任意の一又は複数の疾患変更抗リウマチ剤(ＤＭＡＲＤ)、例えばヒドロキシクロロキン、サルファサラジン、メトトレキセート、レフルノミド、アザチオプリン、Ｄ-ペニシルアミン、ゴールド(経口)、ゴールド(筋肉内)、ミノサイクリン、シクロスポリン；ブドウ球菌プロテインＡ免疫吸着；静脈免疫グロブリン(ＩＶＩＧ)；非ステロイド系抗炎症薬(ＮＳＡＩＤ)；糖質コルチコイド(例えば関節注射による)；副腎皮質ステロイド(例えばメチルプレドニゾロンおよび／またはプレドニゾン)；葉酸塩；抗腫瘍壊死因子(ＴＮＦ)アンタゴニスト、例えばエタネルセプト／ＥＮＢＲＥＬ™、インフリキシマブ／ＲＥＭＩＣＡＤＥ™、Ｄ２Ｅ７(Knoll)又はＣＤＰ-８７０(Celltech)；ＩＬ-１Ｒアンタゴニスト(例えばKineret)；ＩＬ-１０アンタゴニスト(例えばIlod

ecakin)；血液凝固モジュレーター(例えばWinRho)；ＩＬ-６アンタゴニスト／抗ＴＮＦ(ＣＢＰ１０１１)；ＣＤ４０アンタゴニスト(例えばＩＤＥＣ１３１)；Ｉｇ-Ｆｃレセプターアンタゴニスト(ＭＤＸ３３)；免疫修飾物質(例えばthalidomide又はImmuDyn)；抗ＣＤ５抗体(例えばＨ５ｇ１．１)；マクロファージインヒビター(例えばＭＤＸ３３)；共刺激ブロッカー(例えばＢＭＳ１８８６６７又はトレリマブ(Tolerimab))；補体インヒビター(例えばｈ５Ｇ１．１、３Ｅ１０又は抗崩壊促進因子(ＤＡＦ)抗体)；ＩＬ-２アンタゴニスト(ｚｘＳＭＡＲＴ)；ＥＧＦＲインヒビター(上記の定義を参照)；チロシンキナーゼインヒビター(上記の定義を参照)；抗血管新生剤(例えばベバシズマブなどのＶＥＧＦ抗体)；ＬＬ２又はエピラツズマブ(ＬＹＭＰＨＯＣＩＤＥ(登録商標)；Immunomedics)などのＣＤ２２抗体、例として、エピラツズマブＹ-９０(Juweid等 Cancer Res 55(23 Suppl): 5899 s-5907s (1995))、アビオジェンのＣＤ２２抗体(Abiogen, Italy)、ＣＭＣ５４４(Wyeth/Celltech)、ｃｏｍｂｏｔｏｘ(UT Soutwestern)、ＢＬ２２(NIH)、及びＬｙｍｐｏＳｃａｎ　Ｔｃ９９(Immunomedics)；ＥｐＣＡＭ抗体、例えば１７-１Ａ(PANOREX(登録商標))；αｖβ３抗体(例えばＶＩＴＡＸＩＮ(登録商標)；Medimmune)；ＣＤ３７抗体、例えばＴＲＵ０１６(Trubion)；ＩＬ-２１抗体(Zymogenetics/Novo Nordisk)；抗Ｂ細胞抗体(Impheron)；Ｂ細胞を標的とするＭＡｂ(Immunogen/Aventis)；１Ｄ０９Ｃ３ (Morphosys/GPC)；ＬｙｍｐｈｏＲａｄ１３１(HGS)；Ｌｙｍ-１抗体Ｙ-９０(USC)；ＬＩＦ２２６(Enhanced Lifesci.)；ＢＡＦＦ抗体(例えば国際公開第０３／３３６５８号)；ＢＡＦＦレセプター抗体(例えば国際公開第０２／２４９０９号)；ＢＲ３抗体；Ｂｌｙｓ抗体、例えばベリムマブ(belimumab)；ＬＹＭＰＨＯＳＣＤ２２-Ｂ™；抗Ｌｙｍ-１ Oncolym(USC/Peregrine)；ＩＳＦ１５４(UCSD/Roche/Tragen)；ｇｏｍｉｌｉｘｉｍａ(Ｉｄｅｃ　１５２；Biogen Idec)；ＩＬ-６レセプター抗体、例えばアトリズマブ(atlizumab)(ＡＣＴＥＭＲＡ™；Chugai/Roche)；ＩＬ-１５抗体、例えばＨｕＭａｘ-Ｉｌ-１５(Genmab/Amgen)；ケモカインレセプター抗体、例えばＣＣＲ２抗体(例えばＭＬＮ１２０２；Millieneum)；抗補体抗体、例えばＣ５抗体(例えばエクリズマブ、５Ｇ１．１；Alexion)；ヒトイムノグロブリンの経口製剤(例えばＩｇＰＯ；Protein Therapeutics)；ＩＬ-１２抗体、例えばＡＢＴ-８７４(CAT/Abbott)；テネリキシマブ(Tenelixim ab)(ＢＭＳ-２２４８１８)；Ｂ細胞ワクチン；ＤＮ-ＢＡＦＦ(Xencor)；ＣＲｘ-１１９(CombinatoRx)；アムジェンのＢＡＦＦアンタゴニスト；ペントスタチン(Pfizer)；ＩＣ-４８５(ICOS)；ケモカインアンタゴニスト、例えばＴ-４８７(Tularik)又はＲｅｔｉｃｕｌｏｓｅ(AVR-118)；ＳＣＯ-３２３(SCIOS)；インテグリンアンタゴニスト６８３６９９、Tanabe, NGD-2001-1 (Neurogen)；ＳＣＩＯ-４６９(SCIOS)；ＢＩＲＢ-７９６(Boehringer Ingelheim)；ＶＸ７０２、ＶＸ８５０(Vertex)；ロイコトリエンＢ-４アンタゴニスト(例として、ａｍｅｌｕｂｕｎｔ、ＢＩＩＬ-２８４；BI)；微小管モジュレーター(Ｐａｘｃｅｅｄ；Angiotech)；プロテアーゼインヒビター(ＭＢＳ５６１３９２；BMS)；ＡＧＩＸ-４２０７(Atherogenics)；ＩＳＩＳ-１０４８３８ (ISIS/Elan)；ＭＦＧ-ＩＲＡＰ (Univ. Pitt.)；ＩＬ-１ Ｔｒａｐ(ＲＧＮ-３０３；Regeneron/Novartis)；オプレルベキン(Wyeth)；エベロリムス(Ｃｅｒｔｉｃａｎ；Novartis)；Ａｍｅｖｉｖｅ(Biogen Idec)；ＯＲＧ-３９１４１(Organon)；ＦＫ-５０６(Fujisawa)；及びＩＬ-２アンタゴニスト(タクロリムス；Fujisawa)と組み合わせるのが好ましい。

【０１４９】

例示的な抗ＣＤ２２抗体の詳細な解説は、以下の通りである：

１．抗ＣＤ２２抗体の具体的な実施態様

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１、(b) 配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２、(c) 配列番号：６から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３、(d) 配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２、２３のいずれか一のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、(e) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び(f) 配列番号：１４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ３、から選択される少なくとも１、２、３、４、５又は６のＨＶＲを含んでなる抗体を提供する。

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１、(b) 配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２、(c) 配列番号：６から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３、から選択される少なくとも１、少なくとも２、又は３つすべてのＶＨ ＨＶＲを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：６から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

【０１５０】

一態様では、本発明は、配列番号：６から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３と配列番号：２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

一態様では、本発明は、配列番号：６から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３と配列番号：４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

一態様では、本発明は、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とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

一態様では、本発明は、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とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

【０１５１】

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：９又は配列番号：１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、(b) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び(c) 配列番号：１４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ３、から選択される少なくとも１、少なくとも２、又は３つすべてのＶＬ ＨＶＲを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：９から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：１０から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：１９から２３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は配列番号：９のアミノ酸配列を含んでおり、このときＮ２８がＶに置換されている(Ｎ２８Ｖアミノ酸変化、これによって配列番号：１０が生成される)。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は配列番号：９のアミノ酸配列を含んでおり、このときＮ２８がＡに置換されている(Ｎ２８Ａアミノ酸変化、これによって配列番号：１９が生成される)。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は配列番号：９のアミノ酸配列を含んでおり、このときＮ２８がＱに置換されている(Ｎ２８Ｑアミノ酸変化、これによって配列番号：２０が生成される)。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は配列番号：９のアミノ酸配列を含んでおり、このときＮ２８がＳに置換されている(Ｎ２８Ｓアミノ酸変化、これによって配列番号：２１が生成される)。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は配列番号：９のアミノ酸配列を含んでおり、このときＮ２８がＤに置換されている(Ｎ２８Ｄアミノ酸変化、これによって配列番号：２２が生成される)。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は配列番号：９のアミノ酸配列を含んでおり、このときＮ２８がＩに置換されている(Ｎ２８Ｉアミノ酸変化、これによって配列番号：２３が生成される)。一態様では、本発明は、配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２、２３のいずれか一のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は、配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２又は２３のいずれか一であり、位置Ｎ３０のアミノ酸(位置３０のアスパラギン)がＡに置換されている(Ｎ３０Ａアミノ酸変化)。一態様では、ＨＶＲ-Ｌ１は、配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２又は２３のいずれか一であり、位置Ｎ３０のアミノ酸(位置３０のアスパラギン)がＱに置換されている(Ｎ３０Ｑアミノ酸変化)。

【０１５２】

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３と、(b) 配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ３とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。いくつかの実施態様では、ＣＤ２２抗体はさらに、(a) 配列番号：２を含むＨＶＲ-Ｈ１と配列番号：４を含むＨＶＲ-Ｈ２とを含んでなる。

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３と、(b) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。いくつかの実施態様では、ＣＤ２２抗体はさらに、(a) 配列番号：２を含むＨＶＲ-Ｈ１と配列番号：４を含むＨＶＲ-Ｈ２とを含んでなる。

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３と、(b) 配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２および２３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。いくつかの実施態様では、ＣＤ２２抗体はさらに、(a) 配列番号：２を含むＨＶＲ-Ｈ１と配列番号：４を含むＨＶＲ-Ｈ２とを含んでなる。いくつかの実施態様では、配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２又は２３のアミノ酸配列は、Ｎ３０Ａ又はＮ３０Ｑアミノ酸変化を含む。いくつかの実施態様では、ＣＤ２２抗体はさらに、配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２を含む。いくつかの実施態様では、ＣＤ２２抗体はさらに、配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ３を含む。

【０１５３】

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ１と、(b) 配列番号：４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ２と、(c) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３と、(d) 配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２、２３から選択したアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１と、(e) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２と、配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ３とを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。いくつかの実施態様では、本発明はさらに、ＨＶＲ-Ｌ１として選択されるアミノ酸配列配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２又は２３がＮ３０Ａ又はＮ３０Ｑアミノ酸変化によって修飾されているものを提供する。

一態様では、本発明は、配列番号：１６を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する(図２Ａ、ｈ１０Ｆ４ｖ１を参照)。一態様では、本発明は、配列番号：１７を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する(図２Ｂ、ｈ１０Ｆ４ｖ１を参照)。一態様では、本発明は、配列番号：１８を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する(図２Ｂ、ｈ１０Ｆ４ｖ３を参照)。

一態様では、本発明は、配列番号：３４を含む重鎖を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する(図２Ａ、ｍ１０Ｆ４を参照)。一態様では、本発明は、配列番号：３５を含む軽鎖を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する(図２Ｂ、ｍ１０Ｆ４を参照)。

【０１５４】

一態様では、本発明は、ＡＴＣＣに寄託され、寄託番号ＰＴＡ-７６２１を有するハイブリドーマによって産生される抗体１０Ｆ４.４.１の１、２、３、４、５又は６のＨＶＲ配列を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

一態様では、本発明は、ＡＴＣＣに寄託され、寄託番号ＰＴＡ-７６２０を有するハイブリドーマによって産生される抗体５Ｅ８.１.８の１、２、３、４、５又は６のＨＶＲ配列を含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

抗ＣＤ２２抗体は、ＣＤ２２を結合する能力を保持する限り、任意の適切なフレームワーク可変ドメイン配列を含んでもよい。例えば、いくつかの実施態様では、本発明の抗ＣＤ２２抗体は、ヒトのサブグループIII重鎖フレームワークコンセンサス配列を含んでなる。これらの抗体の一実施態様では、重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置７１、７３および／または７８に置換を含む。これらの抗体の一実施態様では、位置７１はＡであり、位置７３はＴであり、および／または、位置７８はＡである。一実施態様では、これらの抗体は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-８の重鎖可変ドメインフレームワーク配列、例えば配列番号：１、３、５、７(それぞれＦＲ-Ｈ１、ＦＲ-Ｈ２、ＦＲ-Ｈ３、ＦＲ-Ｈ４)を含む。ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-８はハーセプチン(登録商標)抗ＨＥＲ２抗体(Genentech, Inc., S

outh San Francisco, CA, USA)として商業的に公知であり、米国特許第６４０７２１３号及び同第５８２１３３７号、及びLee等，Ｊ．Mol．Biol．(2004)，340(5)：1073-93においても言及される。このような実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトのκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。このような実施態様では、これらの抗体は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５-８の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列、例えば配列番号：８、１、１３、１５(それぞれＦＲ-Ｌ１、ＦＲ-Ｌ２、ＦＲ-Ｌ３、ＦＲ-Ｌ４)を含む。

【０１５５】

一実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む重鎖可変ドメインを含んでなり、このときフレームワーク配列はＦＲ-Ｈ１-ＦＲ-Ｈ４配列、それぞれ配列番号：１、３、５および７を含み、ＨＶＲ　Ｈ１は配列番号：２のアミノ酸配列を含み、ＨＶＲ-Ｈ２は配列番号：４のアミノ酸配列を含み、そしてＨＶＲ-Ｈ３は配列番号：６から選択されるアミノ酸配列を含んでいる。一実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含んでなり、このときフレームワーク配列はＦＲ-Ｌ１-ＦＲ-Ｌ４配列、それぞれ配列番号：８、１１、１３および１５を含み、ＨＶＲ-Ｌ１は配列番号：９、１０、１９、２０、２１、２２及び２３から選択されるアミノ酸配列を含み、このとき配列番号：９から１０又は１９から２３のいずれか一はＮ３０Ａ又はＮ３０Ｑのアミノ酸変化を含んでもよく、ＨＶＲ-Ｌ２は配列番号：１２のアミノ酸配列を含み、そしてＨＶＲ-Ｌ３は配列番号：１４から選択されるアミノ酸配列を含んでいる。これらの抗体の一実施態様では、重鎖可変ドメインは配列番号：１６を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号：１７又は１８を含む。

いくつかの実施態様では、本発明は、アミノ酸配列配列番号：１６に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比較して置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体はＣＤ２２に結合する能力を保持する。いくつかの実施態様では、合計１～１０のアミノ酸が、配列番号：１６の配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失はＨＶＲ以外の領域(すなわちＦＲ)で起こる。いくつかの実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：１６から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる。

【０１５６】

いくつかの実施態様では、本発明は、以下に図示する重鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ２２抗体を提供する。

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro
Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (配列番号 :16)

(ＨＶＲ残基を下線で示す)。

いくつかの実施態様では、重鎖ＨＶＲおよびＦＲ配列は以下を含む。

ＨＶＲ-Ｈ１(Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn、配列番号：２)
ＨＶＲ-Ｈ２(Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly、配列番号：４)
ＨＶＲ-Ｈ３(Asp Gly Ser Ser Trp Asp Try Tyr Phe Asp Tyr、配列番号：６)
ＦＲ-Ｈ１(Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser、配列番号：１)
ＦＲ-Ｈ２(Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val、配列番号：３)
ＦＲ-Ｈ３(Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg、配列番号：５)
ＦＲ-Ｈ４(Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser、配列番号：７)

【０１５７】

いくつかの実施態様では、本発明は、以下に示す軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ２２抗体を提供する。

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
108 (配列番号 :17)

(ＨＶＲ残基を下線で示し、位置Ｎ２８を太字で示す)
又は

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
108 (配列番号 :18)

(ＨＶＲ残基を下線で示し、位置Ｎ２８Ｖを太字で示す)。

【０１５８】

いくつかの実施態様では、軽鎖ＨＶＲ配列は以下を含む。
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号：９)
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配

列番号：１０）
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号：１９）
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号：２０）
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号：２１）
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号：２２）
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号：２３）
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu、配列番号：３２）
ＨＶＲ-Ｌ１(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu、配列番号：３３）
ＨＶＲ-Ｌ２(Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser、配列番号：１２）
ＨＶＲ-Ｌ３(Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr、配列番号：１４）。
いくつかの実施態様では、軽鎖ＦＲ配列は以下を含む。
ＦＲ-Ｌ１(Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys、配列番号：８）；
ＦＲ-Ｌ２(Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr、配列番号：１１）；
ＦＲ-Ｌ３(Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, SEQ ID NO: 13) FR-L4(Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg、配列番号：１３）
ＦＲ-Ｌ４(Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg、配列番号：１５）
【０１５９】
一態様では、本発明は、配列番号：１７又は１８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比べて置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体はＣＤ２２への結合能を保持する。いくつかの実施態様では、合計１～１０のアミノ酸が、配列番号：１７又は１８から選択される配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失はＨＶＲ以外の領域(すなわちＦＲ)で起こる。いくつかの実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：１７又は１８から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる。
一態様では、本発明は、(a) 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％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、(b) 配列番号：１７又は１８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比べて置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体はＣＤ２２への結合能を保持する。いくつかの実施態様では、合計１～１０のアミノ酸が、参照配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失はＨＶＲ以外の領域(すなわちＦＲ)で起こる。いくつかの実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、

配列番号：１６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号：１８から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。

【０１６０】

一態様では、本発明は、(a) 図２Ａに示すものから選択される１、２又は３のＶＨ ＨＶＲ、及び／又は(b) 図２Ｂに示すものから選択される１、２又は３のＶＬ ＨＶＲを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。一態様では、本発明は、図２Ａに示すものから選択される重鎖可変ドメインと、図２Ｂに示すものから選択される軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗ＣＤ２２抗体を提供する。

一態様では、本発明の抗ＣＤ２２抗体は、ＡＴＣＣに寄託され、寄託番号ＰＴＡ-７６２０を有するハイブリドーマによって産生される５Ｅ８．１．８抗体の１、２、３、４、５又は６の高頻度可変領域を含んでなる。

【０１６１】

２．抗体断片

本発明は抗体断片を包含する。抗体断片は、酵素消化などの古典的な手段や組み換え技術によって生成されうる。特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固形腫瘍へのアクセスが改善されうる。ある抗体断片の概説については、Hudson等 (2003) Nat. Med. 9:129-134を参照。

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、Ｆａｂ、Ｆｖ及びＳｃＦｖ抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模産生が容易となる。抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、Ｆａｂ'-ＳＨ断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合して$F(ab')_2$断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、$F(ab')_2$断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含有する、インビボ半減期が増加したＦａｂ及び$F(ab')_2$断片は米国特許第５８６９０４６号に記載される。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。ある実施態様では、抗体は単鎖Ｆｖ断片(ｓｃＦｖ)である。国際公開第９３／１６１８５号；米国特許第５５７１８９４号；及び米国特許第５５８７４５８号を参照のこと。Ｆｖ及びｓｃＦｖは、定常領域が欠けている完全な結合部を有する唯一の種である；したがって、それらは、インビボでの使用の間の非特異的結合を減らすために適する。ｓｃＦｖ融合タンパク質は、ｓｃＦｖのアミノ末端又はカルボキシ末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合物を得るために構築されうる。上掲のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照。また、抗体断片は、例えば米国特許第５６４１８７０号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直線状の抗体は単特異的又は二重特異的であってもよい。

【０１６２】

３．ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する様々な方法は従来からよく知られている。例えば、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jonesほか, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmannほか, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyenほか, Science, 239:1534-1536(1988))を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第４８１６５６７号)である。実際には、ヒト化抗体

は、典型的にはいくつかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかのＦＲ残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要となりうる。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク領域として受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993) ; Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992) ; Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

【０１６３】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが一般的に望ましい。この目標を達成するべく、ある方法によって、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グログリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、ＦＲ残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【０１６４】

４．ヒト抗体

本発明のヒト抗ＣＤ２２抗体は、上記のように、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択したＦｖクローン可変ドメイン配列を公知のヒト定常ドメイン配列と結合することによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗ＣＤ２２抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol. 133, 3001(1984) ; Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ; 及びBoerner 等, J. Immunol., 147: 86 (1991)によって記載されている。

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現在は可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系変異体マウスでの抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスでのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列の転移は、抗原の挑戦によってヒト抗体の生産を引き起こす。例えば、Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551(1993) ; Jakobovits等, Nature 362, 255(1993) ; Bruggermann等, Year in Immunol., 7: 33 (1993)を参照のこと。

【０１６５】

また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が開始非ヒト、例えば齧歯類の抗体と類似した親和性及び特性を有している場合、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法により、本明細書中に記載のファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域遺伝子又は軽鎖可変領域遺伝子の何れかをヒトＶドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、非ヒト鎖／ヒト鎖ｓｃＦｖないしＦａｂキメラの集団を作成する。抗原を選択することにより、ヒト鎖が初めのファージディスプレイクローンにおいて一致した非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を回復する、非ヒト鎖／ヒト鎖キメラｓｃＦｖな

いしＦａｂが単離される、つまり、エピトープがヒト鎖のパートナーの選択をつかさどる(インプリントする)。残りの非ヒト鎖を置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる(１９９３年４月１日公開のＰＣＴ特許出願ＷＯ９３／０６２１３を参照)。伝統的なＣＤＲ移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源のＦＲ又はＣＤＲ残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

【０１６６】

５．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様では、二重特異性抗体はヒト又はヒト化の抗体である。ある実施態様では、結合特異性の一つはＣＤ２２に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。ある実施態様では、二重特異性抗体は、ＣＤ２２の２つの異なるエピトープに結合しうる。また、二重特異性抗体はＣＤ２２を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はＣＤ２２結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン-α、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばＦ(ａｂ')$_2$二重特異性抗体)として調製することができる。

二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組み換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は１０個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が１９９３年５月１３日に公開の国際公報第９３／０８８２９号及びTraunecker等、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【０１６７】

異なるアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原 - 抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は例えば、少なくともヒンジの一部、ＣＨ２及びＣＨ３領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。ある実施態様では、軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(ＣＨ１)は、融合の少なくとも一つに存在する。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているＤＮＡを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、２又は３個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

このアプローチ法の一実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報第９４／０４６９０号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

他のアプローチ法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。界面は抗体定常ドメインのC_H３ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１抗体分子の界面からの

一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第２の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【０１６８】

二特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第４６７６９８０号)及びＨＩＶ感染の治療(国際公報第９１／００３６０号、国際公報第９２／００３７３号及び欧州特許第０３０８９号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第４６７６９８０号などに記されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229:81 (1985) は完全な抗体をタンパク分解性に切断してＦ(ａｂ')$_2$ 断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜砒酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたＦａｂ'断片はついでチオニトロベンゾアート(ＴＮＢ)誘導体に転換される。Ｆａｂ'-ＴＮＢ誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりＦａｂ'-チオールに再転換し、他のＦａｂ'-ＴＮＢ誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【０１６９】

最近の進歩により大腸菌からＦａｂ'-ＳＨ断片を直接回収することが容易となっており、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体にを形成する。Shalaby 等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全なヒト化二重特異性抗体Ｆ(ａｂ')$_2$ 分子の産生について記述している。各々のＦａｂ'断片は大腸菌から別々に分泌されて、インビトロで化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。したがって、形成された二重特異性抗体は、ＨＥＲ２を過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト胸部腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことができた。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelny等, J.Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。Ｆｏｓ及びＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のＦａｂ'部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の２つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、２つの抗原結合部位を形成する。単鎖Ｆｖ(ｓＦｖ)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruber等, J.Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等, J.Immunol. 147:60(1991)。

【０１７０】

６．多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインター

ナリゼーション(及び／又は異化)されうる。本発明の抗体は、３又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(ＩｇＭクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと３又はそれ以上の抗原結合部位を有する。ある実施態様では、二量化ドメインはＦｃ領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はＦｃ領域と、Ｆｃ領域のアミノ末端に３又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ある実施態様では、多価抗体は３からおよそ８の抗原結合部位を有する。このような一実施態様では、多価抗体は４つの抗原結合部位を含む(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも１つのポリペプチド鎖(例えば２つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は２又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はＶＤ１-(Ｘ１)ｎ-ＶＤ２-(Ｘ２)ｎ-Ｆｃを有し、ここでＶＤ１は第１の可変ドメインであり、ＶＤ２は第２の可変ドメインであり、ＦｃはＦｃ領域のポリペプチド鎖の一つであり、Ｘ１及びＸ２はアミノ酸又はポリペプチドを表し、ｎは０又は１である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：ＶＨ-ＣＨ１-柔軟なリンカー-ＶＨ-ＣＨ１-Ｆｃ領域鎖；又はＶＨ-ＣＨ１-ＶＨ-ＣＨ１-Ｆｃ領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、少なくとも２つ(例えば４つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有してもよい。ここで多価抗体は、例えば約２～約８の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはＣＬドメインを更に有する。

【０１７１】

７．単一のドメイン抗体

いくつかの実施態様では、本発明の抗体は単一のドメイン抗体である。単一のドメイン抗体は、抗体のすべてないしは一部の重鎖可変ドメイン又はすべてないしは一部の軽鎖可変ドメインを含んでなる単一ポリペプチドである。ある実施態様では、単一のドメイン抗体は、ヒトの単一のドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA；例として米国特許第６２４８５１６号Ｂ１を参照)。一実施態様では、単一のドメイン抗体は、抗体のすべてないしは一部の重鎖可変ドメインからなる。

【０１７２】

８．抗体変異体

いくつかの実施態様では、ここに開示する抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び／又は生物学的特性を向上することができれば望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードする核酸に適切な変化を導入して、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失型、又は挿入或いは置換を含む。最終構成物が所望する特徴を有していれば、欠失、挿入又は置換をどのように組合せてもよい。アミノ酸変化は、配列ができるときに被検体の抗体アミノ酸配列に導入されうる。

突然変異誘発に好ましい位置である抗体の特定の残基又は領域の同定に有益な方法は、CunninghamおよびWellsによりScience, 244:1081-1085 (1989年)に開示されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的となる残基又は残基の組が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電した残基)、中性の、又は負に荷電したアミノ酸(例えばアラニン又はポリアラニン)で置換され、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を与える。次いで、置換に対する機能的感受性を示しているそれらアミノ酸位置を、置換の部位において、又は置換の部位のために、さらなる、又は他の変異体を導入することにより精製する。このように、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定する必要は無い。例えば、任意の部位における突然変異の機能を分析するために、標的コドン又は領域においてａｌａスキャンニング又はランダム突然変異誘発を実行し、発現した免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

【０１７３】

アミノ酸配列挿入には、１残基から１００以上の残基を有するポリペプチドまでの長さに亘るアミノ-末端融合及び／又はカルボキシ-末端融合、ならびに、単一又は多重アミ

ノ酸残基の配列内挿入を含む。端末挿入の例には、Ｎ－末端メチオニル残基を持つ抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチド又は(例えばＡＤＥＰＴのための)酵素の抗体のＮ－末端又はＣ－末端への融合が含まれる。

ある実施態様では、本発明の抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は低減するために変更する。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、Ｎ結合又はＯ結合の何れかである。Ｎ結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-Ｘ-セリン及びアスパラギン-Ｘ-スレオニン(ここでＸはプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。Ｏ結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類Ｎ-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、５-ヒドロキシプロリン又は５-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

【０１７４】

抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を、一又は複数の上述したトリペプチド配列(Ｎ結合グリコシル化部位のもの)が作られるか又は除かれるように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(Ｏ-結合グリコシル化部位の場合)。

抗体がＦｃ領域を含有する場合、それに接着する炭水化物を変更してもよい。例えば、抗体のＦｃ領域に接着するフコースを欠損する成熟炭水化物構造の抗体は、米国公開特許第２００３／０１５７１０８号(Presta, L.)に記載される。米国公開特許第２００４／００９３６２１号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)も参照のこと。抗体のＦｃ領域に接着した炭水化物内のＮ-アセチルグルコサミン(ＧｌｃＮＡｃ)を二分する抗体は、国際公報第０３／０１１８７８号、Jean-Mairet 等、及び米国特許第６６０２６８４号、Umana 等に参照されている。抗体のＦｃ領域に接着するオリゴサッカライド内の少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体は、国際公報第９７／３００８７号、Patel 等に報告される。また、抗体のＦｃ領域に接着する変更された炭水化物を有する抗体については、国際公報第９８／５８９６４号(Raju, S.)及び国際公報第９９／２２７６４号(Raju, S.)も参照のこと。また、修飾されたグリコシル化を有する抗原結合分子については、米国公開特許第２００５／０１２３５４６号(Umana 等)を参照。

【０１７５】

ある実施態様では、グリコシル化変異体はＦｃ領域を含有し、Ｆｃ領域に接着される炭水化物構造はフコースを欠いている。このような変異形は改善されたＡＤＣＣ機能を有する。場合によって、Ｆｃ領域は、更にＡＤＣＣを改善する一つ以上のアミノ酸置換、例えばＦｃ領域の位置２９８、３３３及び／又は３３４の置換(Ｅｕ残基番号付け)を更に含む。「脱フコース化」又は「フコース欠失」抗体に関する文献の例には以下のものを含む：米国公開番号２００３／０１５７１０８；国際公報２０００／６１７３９；国際公報２００１／２９２４６；米国公開番号２００３／０１１５６１４；米国公開番号２００２／０１６４３２８；米国公開番号２００４／００９３６２１；米国公開番号２００４／０１３２１４０；米国公開番号２００４／０１１０７０４；米国公開番号２００４／０１１０２８２；米国公開番号２００４／０１０９８６５；国際公報２００３／０８５１１９；国際公報２００３／０８４５７０；国際公報２００５／０３５５８６；国際公報２００５／０３５７７８；；国際公報２００５／０５３７４２；Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；及びYamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。脱フコース化抗体を産生する細胞株の例として、タンパク質フコース化欠失Ｌｅｃ１３ ＣＨＯ細胞 (Ripka 等 Arch. Biochem Biophys. 249:533-545 (1986)；米国公開番号２００３／０１５７１０８, Presta, L；及び国際公報２００４／０５６３１２, Adams 等, 特に実施例１１)、及びノックアウト細胞株、例としてα-１,６-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、Ｆ

ＵＴ８，-ノックアウトＣＨＯ細胞（Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)）などがある。

【０１７６】

一実施態様では、抗体が変更されてその血清半減期が改善される。抗体の血清半減期を増やすために、例えば米国特許第５７３９２７７号に記載のように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体(特に抗体断片)に組み込んでもよい。本明細書中で用いる「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、ＩｇＧ分子のインビボ血清半減期を増やす役割を担うＩｇＧ分子(例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４)のＦｃ領域のエピトープを指す(米国特許公開２００３／０１９０３１１、米国特許第６８２１５０５号；米国特許第６１６５７４５号；米国特許第５６２４８２１号；米国特許第５６４８２６０号；米国特許第６１６５７４５号；米国特許第５８３４５９７号)。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基に異なる残基が挿入されている。置換突然変異について関心ある部位は高度可変領域を含むが、ＦＲ交互変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表１に示す。これらの置換が生物学的活性の望ましい変化をもたらす場合、表１に「例示的置換」と名前を付けた又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入して、生成物をスクリーニングしてよい。

【０１７７】

表１

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【０１７８】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(ａ)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(ｂ)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(ｃ)側鎖の嵩を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) 無極性：Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) 無電荷極性：Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 酸性：Asp (D), Glu (E)

(4) 塩基性：Lys (K), Arg (R), His(H)

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けてもよい：

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性の親水性：cys、ser、thr、asn、gln；

(3) 酸性：asp、glu；

(4) 塩基性：his、lys、arg；

(5) 鎖配向に影響する残基：gly、pro；及び

(6) 芳香族：trp、tyr、phe。
非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。このような置換された残基も、保存的置換部位か、残存する(非保存的)部位に、導入することができる。

【０１７９】
ある型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して変更した(例えば向上した)生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば６－７部位)を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたファージコートタンパク質の少なくとも一部(例えば、Ｍ１３の遺伝子ＩＩＩ産物)への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、それらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、スキャニング突然変異誘発(例えばアラニンスキャニング)を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術を含む当分野で公知の技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載する技術を含む当分野で公知の技術を用いてスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

【０１８０】
抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗体の変異体又は非変異体のオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。
本発明の抗体のＦｃ領域内に一以上のアミノ酸修飾を導入してＦｃ領域変異型を生成することが望ましい。Ｆｃ領域変異体は、ヒンジシステイン修飾を含む、一以上のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾(例えば、置換)を有するヒトＦｃ領域配列(例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４ Ｆｃ領域)を含みうる。

【０１８１】
当分野での記載や教示に従って、ある実施態様では、本発明の抗体が野生型の対応抗体と比較して例えばＦｃ領域内に一以上の変異を有することを考慮する。にもかかわらず、この抗体はその野生型対応物と比較して治療的有用性を示す実質的に同じ特徴を維持している。例えば、国際公開第９９／５１６４２号などに記載のようにＣ１ｑ結合及び／又は補体依存性細胞障害(ＣＤＣ)を変更する(すなわち改良又は減少する)結果となるＦｃ領域内に特定の変異を生じさせることが考えられる。また、Ｆｃ領域変異型の他の例に関するDuncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988)；米国特許第５６４８２６０号；米国特許第５６２４８２１号；及び国際公開公報９４／２９３５１を参照。国際公開公報００／４２０７２(Presta)及び国際公開公報２００４／０５６３１２(Lowman)は、ＦｃＲへの結合が改善したか、減退した抗体変異体を開示している。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Shields 等 J. Biol. Chem 9(2): 6591-6604 (2001)を参照のこと。半減期が増加して、胎児への母性ＩｇＧの移送を担う(Guyer 等, J. Immunol. 117: 587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24: 249 (1994))新生児Ｆｃレセプター(ＦｃＲｎ)への結合が改善している抗体は、米国特許公開２００５／００１４９３４Ａ１ (Hinton 等)に開示されている。これらの抗体は、ＦｃＲｎへのＦｃ領域の結合を向上させる一又は複数の置換を有するＦｃ領域を含んでなる。Ｆｃ領域アミノ酸配列

が変更されてＣ１ｑ結合能力が増加したか減少したポリペプチド変異体は、米国特許第６１９４５５１号Ｂ１、国際公開公報９９／５１６４２に開示される。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Idusogie 等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【０１８２】

一態様では、本発明は、Ｆｃ領域を含むＦｃポリペプチドの境界面に修飾を含む抗体を提供する。この修飾はヘテロ二量体化を容易にする及び／又は促進する。これらの修飾は第一Ｆｃポリペプチドに隆起(protuberance)、そして第二Ｆｃポリペプチドに腔(cavity)の導入を含み、この隆起は第１及び第２のＦｃポリペプチドの複合体形成を促進するように腔に配置することができる。これらの修飾を有する抗体の生成方法は、例えば米国特許第５７３１１６８号に記載のように、当分野で公知である。

【０１８３】

９．抗体誘導体

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(ＰＥＧ)、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-１，３-ジオキソラン、ポリ-１，３，６-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(ｎ-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

【０１８４】

他の実施態様では、放射線に曝すことによって選択的に熱すことができる非タンパク質性部分と抗体のコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質性部分は炭素ナノチューブである(Kam等, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005))。放射線はいずれの波長のものでもよく、限定するものではないが、通常の細胞に害を及ぼさないが、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅する温度にまで非タンパク質性部分を加熱する波長が含まれる。

【０１８５】

抗体の作製方法

１．ハイブリドーマベースの方法

本発明の抗ＣＤ２２モノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えＤＮＡ法(米国特許第４８１６５６７号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを免疫化し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を誘導する。一般的に、ＣＤ２２への抗体は、ＣＤ２２とアジュバントを複数回皮下(ｓｃ)又は腹腔内(ｉｐ)に注射することにより動物内に生じる。ＣＤ２２は当分野で公知の方法を用いて調製されうる。その方法のいくつかは本明細書中でさらに記載される。例えば、ＣＤ２２は組み換えて産生されてもよい。一実施態様では、動物を、免疫グロブリン重鎖のＦｃ部位に融合したＣＤ２２の細胞外ドメイン(ＥＣＤ)

を含有するＣＤ２２の誘導体で免疫化する。一実施態様では、動物を、ＣＤ２２-ＩｇＧ１融合タンパク質で免疫化する。一実施態様では、動物は、一リン酸化リピドＡ(ＭＰＬ)／トレハロースジクリノミコレート(trehalose dicrynomycolate)(ＴＤＭ)(Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MT)により溶液中のＣＤ２２の免疫原性誘導体にて免疫化され、該溶液は複数の部位の皮下に注射される。２週後に、動物を追加免役する。７~１４日後、動物から採血して、血清を抗ＣＤ２２力価について検定する。力価がプラトーになるまで動物を追加免役する。

【０１８６】

別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、適当な培養培地、例えば融合していない親の骨髄腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を含む培地に播き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(ＨＧＰＲＴ又はＨＰＲＴ)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、ＨＧＰＲＴ欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含有するであろう(ＨＡＴ培地)。

【０１８７】

ある実施態様では、骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、ＨＡＴ培地のような培地に対して感受性である細胞である。例示的な骨髄腫株化細胞には、限定するものではないが、マウス骨髄腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、San Diego, California USAから入手し得るＭＯＰＣ-２１及びＭＰＣ-１１マウス腫瘍、及びアメリカ培養細胞系統保存機関、Rockville, Maryland USAから入手し得るＳＰ-２又はＸ６３-Ａｇ８-６５３細胞から誘導されたものが含まれる。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、ＣＤ２２に結合するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)又は酵素結合免疫吸着検定(ＥＬＩＳＡ)によって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonほか, Anal. Biochem, 107:220 (1980)のスキャッチャード分析法によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、Ｄ-ＭＥＭ又はＲＰＭＩ-１６４０培地が包含される。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-SEPHAROSE、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

【０１８８】

２．ある一つのライブラリスクリーニング法

本発明の抗ＣＤ２２抗体は、所望の活性(一又は複数)を有する抗体についてスクリーニングするためにコンビナトリアルライブラリを用いて作製することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成して、所望の結合特性を有する抗体についてこのライブラリをスクリーニングするためには当分野で様々な方法が公知である。このような方

法は、一般にMethods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等, ed., Human Press, Totowa, NJ)のHoogenboom等 (2001)に、ある実施態様では、Lee等 (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093に記載される。

原則として、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原へ吸収され、それによって、ライブラリの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンは、抗原から溶出させることが可能であり、抗原吸収/溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗CD22抗体は、興味の対象であるファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローンからのFv配列、及びKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いての全長抗CD22抗体クローンの構築によって得ることができる。

【0189】

ある実施態様では、抗体の抗原結合ドメインは、約110アミノ酸の2つの可変(V)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの高頻度可変ループ(HVR)又は相補鎖決定領域(CDR)が存在する。可変ドメインは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように、VH及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scFv)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているFab断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scFvコード化ファージクローン、及びFabコード化ファージクローンは、総称して「Fvファージクローン」又は「Fvクローン」と呼ぶ。

VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分離してクローンし、ファージライブラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライブラリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffiths等, EMBO J, 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブラリは、また、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

【0190】

ある実施態様では、繊維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することが可能であり、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboom等, Nucl. Acids. Res., 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるFabコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるFab断片のように、柔軟なポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗CD22クローンに有利になるように偏ったライブラリが望ましい場合に

は、検体をＣＤ２２で免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び／又は他の末梢血リンパ球(ＰＢＬ)である循環Ｂ細胞を、ライブラリ構築のために回収する。好ましい実施態様では、ＣＤ２２免疫化により、ＣＤ２２に対するヒト抗体を産生するＢ細胞が生じるように、抗ＣＤ２２クローンに好ましいヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗ＣＤ２２抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下に記載する。

【０１９１】

抗ＣＤ２２反応細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を利用してＣＤ２２特異的膜結合抗体を発現するＢ細胞を単離すること、例えば、ＣＤ２２アフィニティクロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識ＣＤ２２への細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器(ＦＡＣＳ)によって得ることができる。

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び／又はＢ細胞又は他のＰＢＬの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、ＣＤ２２が免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を被検体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

【０１９２】

抗体可変遺伝子セグメント(ＶＨ及びＶＬセグメントを含む)をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したＶＨ及びＶＬ遺伝子ライブラリの場合では、その所望するＤＮＡは、Orlandi等，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムＤＮＡ又はｍＲＮＡを単離し、再配列したＶＨ及びＶＬ遺伝子の5'及び3'末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応(ＰＣＲ)を行うことによって得ることが可能であり、よって発現のための多様なＶ遺伝子レパートリーを作製することができる。このＶ遺伝子は、Orlandi等, (1989)及びWard等，Nature, 341: 544-546(1989)に記載のように、成熟Ｖドメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマーとＪセグメントに基づいた前方向プライマーにより、ｃＤＮＡ及びゲノムＤＮＡから増幅することが可能である。しかしながら、ｃＤＮＡからの増幅のためには、バックプライマーは、また、Jones等，Biotechnol., 9:88-89(1991)に記載のようにリーダーエクソンに、前方向プライマーは、Sastry等，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:5728-5732(1989)に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Orlandi等(1989)又はSastry等(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り込むことが可能である。ある実施態様では、例えば、Marks等，J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)の方法に記載のように、又はOrum等，Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なＶＨ及びＶＬ配列を増幅するために、各Ｖ遺伝子ファミリーを標的にしたＰＣＲプライマーを用いて、そのライブラリの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅ＤＮＡのクローニングに関しては、希な制限部位を、Orlandi等(1989)に記載のように、又はClackson等，Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにタグ付加したプライマーによるさらなるＰＣＲ増幅によって、ＰＣＲプライマー内の１つの末端へタグとして導入することができる。

【０１９３】

合成的に再配列したＶ遺伝子のレパートリーは、Ｖ遺伝子セグメントからインビボで誘導することができる。殆どのヒトＶＨ遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinson等, J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsudaら，Nature Genet., 3: 88-94(1993))；これらクローニングされたセグメント(Ｈ１及びＨ２ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのＨ

３ループをコードするＰＣＲプライマーによる多様なＶＨ遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。ＶＨレパートリーは、また、Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長いＨ３ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトＶκ及びＶλセグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461(1993))、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。ＶＨ及びＶＬフォールドの範囲及びＬ３及びＨ３の長さに基づく合成的Ｖ遺伝子レパートリーは、相当に構造的多様性を有する抗体をコードする。ＤＮＡをコードするＶ遺伝子の増幅に続いて、生殖系のＶ遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)の方法に従ってインビトロで再配列することができる。

【０１９４】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でＶＨ及びＶＬ遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHogrefe等, Gene, 128: 119-126(1993)に記載のようにインビトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouse等, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266(1993)に記載のloxP系によってインビボで作製することが可能である。このインビボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライブラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種のＦａｂフラグメントが利用される。ナイーブのＶＨ及びＶＬレパートリーは、１つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この２つのライブラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約10^{12}クローン)によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、ＶＨ及びＶＬ遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージビリオンへ共にパッケージされるように、インビボの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約10^{-8}ＭのＫ$_d^{-1}$)の多くの多様な抗体を提供する。

別法として、このレパートリーは、例えばBarbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように同じベクターへ連続してクローニング、又は、Clakson等, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにＰＣＲ後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。ＰＣＲアセンブリは、また、柔軟なペプチドスペーサーをコードしているＤＮＡとＶＨ及びＶＬ ＤＮＡを連結させて、単鎖のＦｖ(ｓｃＦｖ)レパートリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内でのＰＣＲアセンブリ」は、Embleton等, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837(1992)に記載のように、ＰＣＲによってリンパ球内のＶＨ及びＶＬ遺伝子を組み合わせて、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに利用される。

【０１９５】

ナイーブのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和性(約10^{6}～10^{7} M^{-1}のＫ$_d^{-1}$)である可能性があるが、Winterら(1994), 上掲に記載のように第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をもインビトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkins等, J. Mol. Biol. 226: 889-896(1992)の方法、又はGram等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プローンポリメラーゼ(Leung等, Technique, 1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、１つ又はそれより多いＣＤＲをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のＦｖクローンにおいて、対象のＣＤＲまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるＰＣＲを利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第９６０７７５４号(１９９６年３月１４日に公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライブラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marks等, Biotechnol. 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた

天然で発生するＶドメイン変異体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたＶＨ又はＶＬドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、10^{-9}Ｍの範囲の親和性の抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

ライブラリのスクリーニングは当分野で公知の様々な技術によって達成されうる。例えば、ＣＤ２２は、吸収プレートのウェルをコーティングするために利用すること、吸収プレートへ付着させた宿主細胞上で発現させるか又はセルソーティングで利用すること、又はストレプトアビジンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートすること、又はファージディスプレイライブラリをパニングするためのあらゆる他の方法において利用することが可能である。

【０１９６】

吸着剤との少なくともファージ粒子の一部分の結合に適した条件下で、ファージライブラリの試料を固定化ＣＤ２２と接触させる。通常は、ｐＨ、イオン強度、温度等を含む条件を選択して、生理学的条件を模倣する。固相と結合したファージを洗浄し、その後、例えばBarbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982(1991)に記載されているように酸で、又は例えばMarks等, J. Mbl. Biol. 222: 581-597(1991)に記載にされているようにアルカリで、又は例えばClackson等, Nature, 352: 624-628(1991)の抗原競合法に類似の手法であるＣＤ２２抗原競合によって溶出する。ファージは、１回目の選択で２０～１０００倍に濃縮することが可能である。さらには、この濃縮したファージを細菌培養液で生育させ、さらなる回の選択に供することが可能である。

選択の効率は多くの要因に依存し、それには、洗浄の間の解離の動力学、そして単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原と関われるかどうかということが含まれる。一次解離定数(及び弱い結合親和性)を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相の抗原の高いコーティング密度の利用によって保持することが可能である。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学(及び良好な結合親和性)を有する抗体の選択は、Bass等, Proteins, 8: 309-314(1990)及び国際公開第92/09690号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そしてMarks等, Biotechnol., 10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

【０１９７】

親和性に僅かな違いがあったとしても、ＣＤ２２に対する異なる親和性のファージ抗体の中で選択することは可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異(例えば、幾つかの親和性成熟の技術で行われているような)は、多くの変異を生じやすく、その殆どが抗原と結合し、僅かがより高い親和性である。ＣＤ２２を限定すると、希な高い親和性のファージが競合して除かれることが可能である。すべてのより高い親和性の変異を保持するために、ファージは、過度のビオチン化ＣＤ２２とインキュベートすることが可能であるが、ＣＤ２２に対する標的モル濃度親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化ＣＤ２２とインキュベートできる。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビジンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」は、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、僅かに２倍高い親和性の変異体クローンの単離を可能にする感度で抗体を選択することを可能にする。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数を基礎として識別することも可能である。

抗ＣＤ２２クローンは活性を元に選択されうる。ある実施態様では、本発明は、ＣＤ２２を天然に発現する生細胞に結合する抗ＣＤ２２抗体を提供する。一実施態様では、本発明は、ＣＤ２２リガンドとＣＤ２２との結合をブロックするが、ＣＤ２２リガンドと第二タンパク質との結合をブロックしない抗ＣＤ２２抗体を提供する。このような抗ＣＤ２２抗体に対応するＦｖクローンは、(1) 上記のようなファージライブラリから抗ＣＤ２２クローンを単離して、場合によって、好適な宿主細胞で個体集団を成長させることによって

、ファージクローンの単離した母集団を増幅する、(2) 望ましいブロック活性及び非ブロック活性のそれぞれについてＣＤ２２と第二タンパク質を選択する、(3) 固定されたＣＤ２２に抗ＣＤ２２ファージクローンを吸着する、(4) 過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と共有するかオーバーラップするＣＤ２２-結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出する、そして、(5) 工程(4)の後に吸着されたまま残ったクローンを溶出する、ことによって選別できる。場合によって、所望のブロック／非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選別手順を一又は複数回繰り返すことによって、さらに濃縮できる。

【０１９８】

ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡ又は本発明のファージディスプレイＦｖクローンは、常法を用いて(例えば、ハイブリドーマの対象の領域をコードする重鎖及び軽鎖又はファージＤＮＡ鋳型を特異的に増幅するように設定したオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ひとたび分離されたならば、ＤＮＡを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするＤＮＡの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

本発明のＦｖクローンをコードするＤＮＡは、重鎖及び／又は軽鎖定常領域をコードする公知のＤＮＡ配列(例えば好適なＤＮＡ配列は上掲のカバット等から得ることができる)と組み合わせて、完全長ないし一部の重鎖及び／又は軽鎖をコードするクローンを形成できる。このために、何れかのアイソタイプの定常領域、例えばＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びＩｇＥ定常領域を用いることができることが理解されるであろう。このような定常領域は任意のヒト又は動物種から得ることができる。ある動物(例えばヒト)種の可変ドメインＤＮＡから得て、次いで「ハイブリッド」である完全長重鎖及び／又は軽鎖のコード配列を形成するために他の動物種の定常領域ＤＮＡに融合したＦｖクローンは、本明細書で用いられる「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。ある実施態様では、ヒト可変ＤＮＡから得たＦｖクローンをヒト定常領域ＤＮＡに融合して、完全長ないし一部のヒト重鎖及び／又は軽鎖のコード配列を形成する。

【０１９９】

また、本発明のハイブリドーマ由来の抗ＣＤ２２抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ハイブリドーマクローン由来の相同的マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を置換すること(例えばMorrison等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984)の方法)によって修飾することができる。ハイブリドーマ又はＦｖクローン由来の抗体ないし抗体断片をコードするＤＮＡは、免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全て又は一部を共有結合させることによってさらに修飾することができる。そのように、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体は、本発明のＦｖクローン又はハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有するように調製される。

【０２００】

３．ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(ＤＮＡの増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードするＤＮＡは従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。一般的に、宿主細胞は原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞である。ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びＩｇＥ定常領域を含め、任意のアイソタイプの定常領域がこの目的のために使われてもよく、このような定常領域はヒト又は動物種の何れかから得

られうることは理解されるであろう。

【０２０１】

原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成

ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はＰＣＲ法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモータ、リボゾーム結合部位(ＲＢＳ)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

【０２０２】

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるｐＢＲ３２２を用いて形質転換する。ｐＢＲ３２２はアンピシリン(Ａｍｐ)及びテトラサイクリン(Ｔｅｔ)耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。ｐＢＲ３２２、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモータを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるｐＢＲ３２２誘導体の例はCarter等の米国特許第５６４８２３７号に詳細に記載されている。

また、レプリコン及び宿主微生物と適合性のあるコントロール配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主との関連でトランスフォーミングベクターとして使用することができる。例えば、λＧＥＭ.ＴＭ.-１１のようなバクテリオファージを、大腸菌ＬＥ３９２のような感受性の宿主細胞を形質転換するために使用できる組換えベクターを作製する際に利用することができる。

【０２０３】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする２又はそれ以上のプロモータ-シストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流(５')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモータが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源ＤＮＡからプロモータを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモータを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロンＤＮＡに作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び／又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。

【０２０４】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、ＰｈｏＡプロモーター、βガラクタ

マーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(ｔｒｐ)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃ又はｔｒｃプロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等 (1980) Cell 20:269)。

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドＤＮＡの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｉｐｐあるいは熱安定性エンテロトキシンＩＩ(ＳＴＩＩ)リーダー、ＬａｍＢ、ＰｈｏＥ、ＰｅｌＢ、ＯｍｐＡ及びＭＢＰからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はＳＴＩＩシグナル配列又はその変異体である。

【０２０５】

他の態様では、本発明による免疫グロブリンは宿主細胞の細胞質内で産生されるので、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は必要でない。この点において、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は発現され、折り畳まれ、集合して細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ジスルフィド結合形成に好適な細胞質条件を示し、発現したタンパク質サブユニットを好適に折り畳み、集合することができる宿主系が存在する(例として大腸菌ｔｒｘＢ⁻系)。Proba及びPluckthun Gene, 159:203 (1995)。

また、本発明の抗体は、発現されるポリペプチド成分の量的な比を変更することにより、分泌されて適切に集合体化(アセンブル)される本発明の抗体の産出を最大化することができる発現系を用いても生成することができる。このような変更は、少なくとも部分的にはポリペプチド成分の翻訳強度を同時に変更することにより行われる。

【０２０６】

翻訳の強度を変更するための一つの技術は、Simmons等の米国特許第５８４０５２３号に開示されている。この方法は、シストロン内の翻訳開始領域(ＴＩＲ)の変異体を利用する。任意のＴＩＲについて、一連のアミノ酸又は核酸配列の変異体を一定の範囲の翻訳強度を有するように作製することができ、これにより特定の鎖に所望の発現レベルが得られるようにこの因子を調節する便利な手段が提供される。ＴＩＲ変異体は、アミノ酸配列を変更しうるコドンの変化を起こす常套的な変異原性技術により生成することができる。特定の実施態様では、ヌクレオチド配列における変化はサイレントである。ＴＩＲにおける変更は、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの変更、並びにシグナル配列の変更を含みうる。変異シグナル配列を生成するための一つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変更しない(つまり、変化がサイレントである)コード配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの３番目のヌクレオチド位置を変更することにより達成することができる。さらに、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンは、１番目及び２番目の位置を複数有しており、これによって前記バンクの作製が複雑になり得る。変異原性の方法は、Yansura等(1992)METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

一実施態様では、含有される各シストロンについて一定の範囲のＴＩＲ強度を有する一組のベクターを生成する。この限定された組により、各鎖の発現レベル、及び種々のＴＩＲ強度の組み合わせにおける所望の抗体産物の産出を比較することができる。ＴＩＲ強度は、Simmons等による米国特許第５８４０５２３号に詳細に記載されているレセプター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度の比較に基づ

いて、所望の個々のＴＩＲを選択し、本発明の発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。

【０２０７】

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(Serratia marcescans)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(Vitreoscilla)又はパラコッカス(Paracoccus)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompTΔ (nmpc-fepE) degP41 kanR を有する３３Ｄ３株(米国特許第5,639,635号)を含むW3110株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁 ; ATCC寄託番号27,325)及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌294 (ATCC 31,446), 大腸菌B, 大腸菌λ 1776 (ATCC 31,537)及び大腸菌RV308(ATCC 31,608) など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として, Bass等, Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７、又はｐＫＮ４１０のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

【０２０８】

抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、ＤＮＡを原核生物宿主中に導入し、そのＤＮＡを染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレングリコール／ＤＭＳＯを用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は当該分野で知られ、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖させられる。好適な培地の例には、ルリア培地(ＬＢ)プラス必須栄養分サプリメントが含まれる。ある実施態様では、培地は発現ベクターを含む原核生物細胞の増殖を選択的に可能にするために、発現ベクターの構成に基づいて選択される選択剤をまた含む。例えば、アンピシリンがアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用培地に加えられる。

【０２０９】

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサプリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサプリメント又は培地との混合物として導入される適切な濃度で含有させられうる。場合によっては、培養培地はグルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリトール及びジチオトレイトールからなる群から選択される一又は複数の還元剤を含みうる。

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。ある実施態様では、例えば、大腸菌の増殖に対しては、温度は約２０℃から約３９℃、約２５℃から約３７℃の範囲、又は約３０℃である。培地のｐＨは、主として宿主生物に応じて、約５から約９の範囲の任意のｐＨ

でありうる。ある実施態様では、大腸菌に対しては、ｐＨは好ましくは約６．８から約７．４、又は約７．０である。

【０２１０】

本発明の発現ベクターに誘導性プロモータが用いられる場合、プロモータの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにＰｈｏＡプロモータが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。ある実施態様では、リン酸限定培地はＣ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地である(例として、Simmons等，Ｊ．Immunol．Methods（2002），263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ＰＡＧＥ)及びウェスタンブロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。

【０２１１】

本発明の一側面では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも１０００リットルの容量、ある実施態様では約１０００から１００００００リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(好ましい炭素／エネルギー源)を分散させる撹拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ１００リットル以下の容積で、約１リットルから約１００リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約１８０-２２０のOD_{550}まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約１２-５０時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

【０２１２】

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばＤｓｂタンパク質(ＤｓｂＡ、ＤｓｂＢ、ＤｓｂＣ、ＤｓｂＤ及び／又はＤｓｂＧ)又はＦｋｐＡ(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等（1999）Ｊ Bio Chem 274:19601-19605；Georgiou等，米国特許第６０８３７１５号；Georgiou等，米国特許第６０２７８８８号；Bothmann及びPluckthun（2000）Ｊ．Biol．Chem 275:17100-17105；Ramm及びPluckthun（2000）Ｊ．Biol．Chem 275:17106-17113；Arie等（2001）Mbl．Microbiol．39:199-210。

発現された異種タンパク質(特にタンパク分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩ及び

その組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲のJoly等（1998）；Georgiou等，米国特許第５２６４３６５号；Georgiou等，米国特許第５５０８１９２号；Hara等（1996）Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

ある実施態様では、タンパク質溶解性酵素を欠損した、一以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。

【０２１３】

抗体精製

一実施態様では、本明細書中で産生した抗体タンパク質は、更なるアッセイや使用のために実質的に均一である調製物を得るためにさらに精製される。当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相ＨＰＬＣ、シリカ又はＤＥＡＥなどの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

一態様では、固形層に固定したプロテインＡを本発明の抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテインＡは抗体のＦｃ領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した４１ｋＤの細胞壁タンパク質である。Lindmark等（1983）Ｊ．Immunol．Meth. 62:1-13。プロテインＡを固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、又は孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムでありうる。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着を防ぐ可能性があるグリセロールなどの試薬でコートされている。

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテインＡ固定固形層に適応し、プロテインＡに対象とする抗体を特異的に結合させる。ついで、固形層を洗浄して、固形層に非特異的に結合した混入物を除去してもよい。最後に、対象とする抗体を溶出により固形層から除去する。

【０２１４】

真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

一般的に、真核生物宿主細胞で用いるためのベクターは、以下の非限定的な成分の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカ遺伝子、エンハンサー因子、プロモータ及び転写終末因子。

【０２１５】

シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドのＮ末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでいてもよい。選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであってもよい。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスｇＤシグナルが利用できる。このような前駆体領域のＤＮＡは、多価抗体をコードするＤＮＡに読み取り枠を一致させて結合される。

【０２１６】

複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、ＳＶ４０開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

【０２１７】

選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(ａ)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(ｂ)必要があれば栄養

要求性欠陥を補い、又は(ｃ)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

【０２１８】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばＤＨＦＲ、チミジンキナーゼ、メタロチオネインＩ及びＩＩ、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、ＤＨＦＲ選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、ＤＨＦＲの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Ｍｔｘ)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型ＤＨＦＲを用いた場合の好適な宿主細胞は、ＤＨＦＲ活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)株化細胞である(例として、ATCC CRL-9096)。

あるいは、抗体をコードするＤＮＡ配列、野生型ＤＨＦＲタンパク質、及びアミノグリコシド３'-ホスホトランスフェラーゼ(ＡＰＨ)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性ＤＨＦＲを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはＧ４１８のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第４９６５１９９号を参照のこと。

【０２１９】

プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識され対象のポリペプチド(例えば抗体)をコードする核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物のプロモーター配列が知られている。例えば、実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ２５ないし３０塩基上流に見出されるＡＴリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から７０ないし８０塩基上流に見出される他の配列は、Ｎが任意のヌクレオチドであるＣＮＣＡＡＴ領域である。大部分の真核生物遺伝子の３'末端には、コード配列の３'末端へのポリＡ尾部の付加に対するシグナルであるＡＡＴＡＡＡ配列がある。ある実施態様では、これらの配列のいずれか又は全ては真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

【０２２０】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス２)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス及びサルウィルス４０(ＳＶ４０)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

ＳＶ４０ウィルスの初期及び後期プロモーターは、ＳＶ４０ウイルスの複製起点を更に含むＳＶ４０制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、ＨｉｎｄＩＩＩＥ制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主中でＤＮＡを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒトβ-インターフェロンｃＤＮＡの発現を記載している、Reyes等, Nature 297: 598-601 (1982)を参照。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【０２２１】
エンハンサーエレメント成分
より高等の真核生物によるこの発明の抗体をコードしているＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー(１００-２７０塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。また、真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサー要素を記載している、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)も参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、一般にはプロモーターから5'位に位置している。
【０２２２】
転写終末成分
また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列を含みうる。このような配列は、真核生物又はウィルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第９４／１１０２６号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。
【０２２３】
宿主細胞の選択及び形質転換
ここに記載のベクター中のＤＮＡをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ-７，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５１);ヒト胚腎臓株(２９３又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された２９３細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977))；ハムスター乳児腎細胞(ＢＨＫ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ１０)；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-ＤＨＦＲ(ＣＨＯ，Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))；マウスのセルトリ細胞(ＴＭ４，Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980));サルの腎細胞（ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ７０);アフリカミドリザルの腎細胞(ＶＥＲＯ-７６，ＡＴＣＣ ＣＲＬ-１５８７)；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ２)；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ３４)；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ３Ａ，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１４４２)；ヒト肺細胞（Ｗ１３８，ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５)；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ Ｇ２，ＨＢ８０６５)；マウス乳房腫瘍細胞（ＭＭＴ０６０５６２，ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１)；ＴＲＩ細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982))；ＭＲＣ５細胞;ＦＳ４細胞；及びヒト肝癌株(ＨｅｐＧ２)である。
宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。
【０２２４】
宿主細胞の培養
本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ｈａｍ)のＦ１０(シグマ)、最小必須培地((ＭＥＭ),(シグマ)、ＲＰＭＩ-１６４０(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((ＤＭＥＭ),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Han等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem 102:255 (1980), 米国特許第４７６７７０４号；同４６５７８

６６号；同４９２７７６２号；同４５６０６５５号；又は同５１２２４６９号；国際公開第９０／０３４３０号；国際公開第８７／００１９５号；又は米国再発行特許第３０９８５号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び／又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばＨＥＰＥＳ)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN™薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、ｐＨ等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【０２２５】

抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第１の工程として、宿主細胞か溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去されうる。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばＡｍｉｃｏｎ又はＰｅｌｌｉｃｏｎの限外濾過装置を用いて濃縮してもよい。ＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが従来の技術である。アフィニティーリガンドとしてのプロテインＡの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンＦｃ領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２、又はγ４重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等，Ｊ．immunol．Meth．62：1-13（1983))。プロテインＧは、全てのマウスアイソタイプ及びヒトγ３に推奨されている(Guss等，EMBOＪ．5：16571575（1986))。アフィニティーリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであってもよく、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H３ドメインを含む場合、Bakerbond ABX™樹脂(J.T．Baker，Phillipsburg，Ｎｊ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのＳＥＰＨＡＲＯＳＥ™クロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合液を、例えばｐＨ約２．５-４．５、好ましくは低塩濃度(例として、約０-０．２５Ｍ塩)の溶出緩衝液を用いた低ｐＨ疎水性作用クロマトグラフィによってさらに精製してもよい。

一般に、研究、試験及び臨床において使用するための抗体を調製するために、上記の方法と一致しており、及び／又は当業者が対象の特定の抗体にふさわしいと思われる、様々な方法が当分野で確立されている。

【０２２６】

イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの一又は複数の細胞毒性剤にコンジュゲートした本発明の何れかの抗ＣＤ２２抗体を含む、イムノコンジュゲート(「抗体-薬剤コンジュゲート」又は「ＡＤＣ」と交換可能に称される)を提供する。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗ＣＤ２２抗体と化学療法剤又は他の毒素とを含む。イムノコンジュゲートの生成に有用な化学治療薬を本明細書中(例えば、上記)に記載した。酵素活性毒素及びその断片も用いられてもよく、本明細書中に記載する。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗ＣＤ２２抗体と一又は複数の小分子毒素、限定するものではないが、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothene)及びＣＣ１０６５、及び毒性活性を有するこれら薬剤の誘導体などの小分子薬剤とを含む。このようなイムノコンジュゲートの例は以降にさらに詳細に検討される。

【０２２７】

１．例示的なイムノコンジュゲート-抗体薬剤コンジュゲート

本発明のイムノコンジュゲート(又は「抗体-薬剤コンジュゲート」(「ＡＤＣ」))は、以下の式Ｉのものであり、任意のリンカー(Ｌ)を介して、一又は複数の薬剤部分(Ｄ)に抗ＣＤ２２抗体がコンジュゲート(すなわち共有結合)しているものである。

$$Ab-(L-D)_p \qquad \text{式 I}$$

したがって、抗ＣＤ２２抗体は直接又はリンカーを介して薬剤にコンジュゲートしうる。式Ｉでは、ｐは抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、例えば１抗体当たりおよそ１～およそ２０の薬剤部分、ある実施態様では、抗体当たり１～およそ８の薬剤部分の範囲でありうる。

【０２２８】

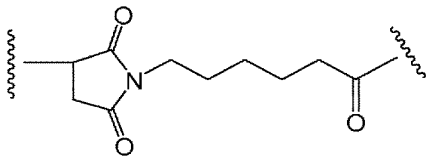
例示的なリンカー

例示的なリンカーと薬剤成分を本明細書中において開示する。リンカーは、一又は複数のリンカー成分を含みうる。例示的なリンカー成分には、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」又は「ｖｃ」)、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ニル(「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」)が含まれる。様々なリンカー成分が当分野で公知であり、そのいくつかを以下に記載する。

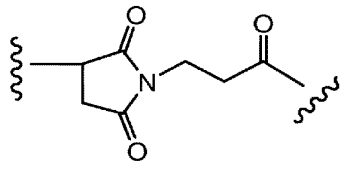
リンカーは、細胞内での薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」でもよい。例えば、酸に弱いリンカー(例えばヒドラゾン)、プロテアーゼ感受性(例えばペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chari等，Cancer Research 52:127-131[1992]；米国特許第５２０８０２０号)を使用してもよい。

【０２２９】

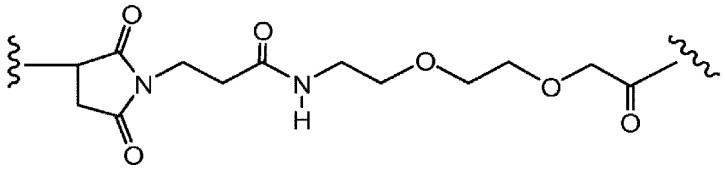
いくつかの実施態様では、リンカー成分は、抗体を他のリンカー成分又は薬剤部分に連結する「ストレッチャーユニット」を含んでもよい。例示的なストレッチャーユニットを以下に示す(波線は抗体への共有結合の部位を示す)。



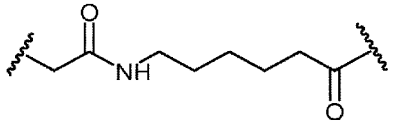
MC



MP



MPEG



【０２３０】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸ユニットを含みうる。そのような実施態様では、アミノ酸ユニットにより、プロテアーゼによるリンカーの切断が可能となり、それによってリソソーム酵素などの細胞内プロテアーゼへの曝露によってイムノコンジュゲートからの薬剤放出が促される。例としてDoronina等（2003）Nat. Biotechnol. 21:778-784を参照。例示的なアミノ酸ユニットには、限定するものではないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン（ｖｃ又はｖａｌ-ｃｉｔ）、アラニン-フェニルアラニン（ａｆ又はａｌａ-ｐｈｅ）；フェニルアラニン-リジン（ｆｋ又はｐｈｅ-ｌｙｓ）；又はN-メチル-バリン-シトルリン（Ｍｅ-ｖａｌ-ｃｉｔ）が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン（ｇｌｙ-ｖａｌ-ｃｉｔ）及びグリシン-グリシン-グリシン（ｇｌｙ-ｇｌｙ-ｇｌｙ）が含まれる。アミノ酸ユニットは、天然に生じるアミノ酸残基、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含みうる。アミノ酸ユニットは設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、Ｃ及びＤ又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

いくつかの実施態様では、リンカー成分は、直接又は、ストレッチャーユニット及び／又はアミノ酸ユニットにより、抗体を薬剤部分に連結する「スペーサー」ユニットを含みうる。スペーサーユニットは、「自己犠牲」又は「非自己犠牲」であってもよい。「非自己犠牲」のスペーサーユニットは、ＡＤＣの酵素的な（例えばタンパク質分解性の）切断によりスペーサーユニットの一部又はすべてが薬剤部分に結合したままとなるものである。非自己犠牲のスペーサーユニットの例には、限定するものではないが、グリシンスペーサーユニット及びグリシン-グリシンスペーサーユニットが含まれる。また、配列特異的な酵素的切断の影響を受けるペプチド性スペーサーの他の組合せも考慮される。例えば、グリシン-グリシンスペーサーユニットを含有するＡＤＣの腫瘍細胞関連のプロテアーゼによる酵素切断によって、残りのＡＤＣからグリシン-グリシン-薬剤部分が放出されるであ

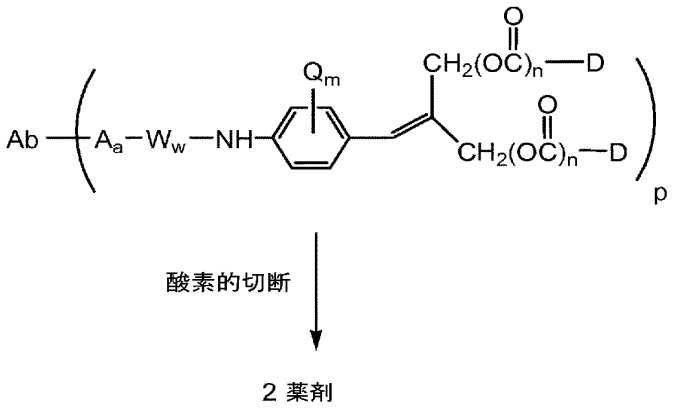
ろう。そのような実施態様では、グリシン-グリシン-薬剤部分は腫瘍細胞の異なる加水分解処理を受け、それによってグリシン-グリシンスペーサーユニットを薬剤部分から分離する。

【０２３１】

「自己犠牲」のスペーサーユニットは、異なる加水分解処置を経ずに薬剤部分を放出させる。ある実施態様では、リンカーのスペーサーユニットはｐ-アミノベンジルユニットが含まれる。このような実施態様では、ｐ-アミノベンジルアルコールはアミド結合によりアミノ酸ユニットに結合し、カルバメート、メチルカルバメート又はカルボネートがベンジルアルコールと細胞障害性剤との間に作られる。例としてHamann等（2005）Expert Opin. Ther. Patents（2005）15:1087-1103を参照。一実施態様では、スペーサーユニットはｐ-アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）である。ある実施態様では、ｐ-アミノベンジルユニットのフェニレン部分はＱｍに置き換えられ、このＱは-Ｃ１-Ｃ８アルキル、-Ｏ-（Ｃ１-Ｃ８アルキル）、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、そしてｍは０～４の範囲の整数である。さらに、自己犠牲のスペーサーユニットの例には、限定するものではないが、ｐ-アミノベンジルアルコールに電子工学的に類似している芳香族化合物（例として米国特許公開第２００５／０２５６０３０号Ａ１を参照）、例えば２-アミノイミダゾール-５-メタノール誘導体（Hay等（1999）Bioorg. Med. Chem Lett. 9:2237）及びオルソ-ないしはパラ-アミノベンジルアセタール類が含まれる。アミド結合加水分解により環化されるスペーサー、例として、置換されたないしは置換されていない４-アミノ酪酸アミド類（Rodrigues等，Chemistry Biology，1995，2，223）；適切に置換されたビシクロ[２．２．１]及びビシクロ[２．２．２]環システム（Storm等，Ｊ．Amer. Chem Soc.，1972，94，5815）；及び、２-アミノフェニルプロピオン酸アミド類（Amsberry，等，Ｊ．Org. Chem，1990，55，5867）が用いられうる。グリシンのａ-位置で置換されているアミン含有薬剤の除去（Kingsbury，等，Ｊ．Med. Chem，1984，27，1447）もまたＡＤＣに有用な自己犠牲のスペーサーの例である。

【０２３２】

一実施態様では、以下に示すように、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）ユニットであり、これを用いて複数の薬剤の取り込みと放出が行われうる。



ここで、Ｑは-Ｃ１-Ｃ８アルキル、-Ｏ-（Ｃ１-Ｃ８アルキル）、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、ｍは０～４の範囲の整数であり、ｎは０又は１であり、そして、ｐは１～およそ２０の範囲である。

【０２３３】

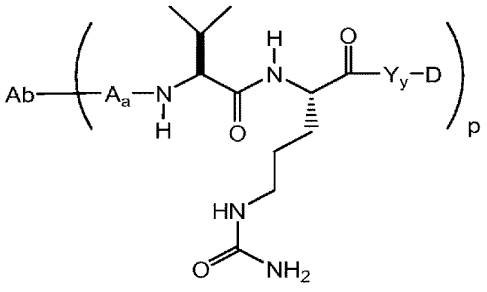
リンカーは、上記いずれかの一又は複数のリンカー成分を含んでもよい。ある実施態様では、リンカーは、以下のＡＤＣ　式ＩＩにおいて括弧で示す。

$$Ab-([Aa-Ww-Yy]-D)_p \qquad \text{式 II}$$

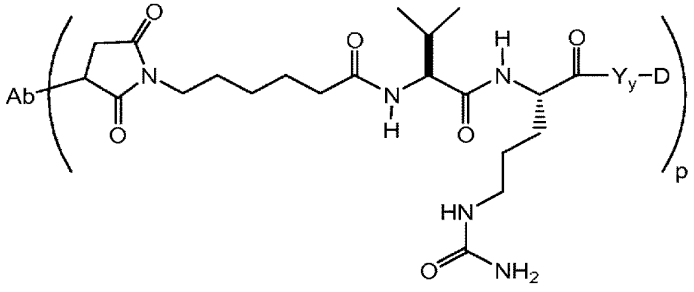
ここで、Ａはストレッチャーユニットであり、ａは０～１の整数であり、Ｗはアミノ酸ユニットであり、ｗは０から１２の整数であり、Ｙはスペーサーユニットであり、ｙは０、１又は２であり、そして、Ａｂ、Ｄ及びｐは、式Ｉに関して上記に定義した。このようなリンカーの例示的な実施態様は、米国特許公開第２００５-０２３８６４９号Ａ１に記載されており、出典明記によって本明細書中に明確に援用される。

【０２３４】

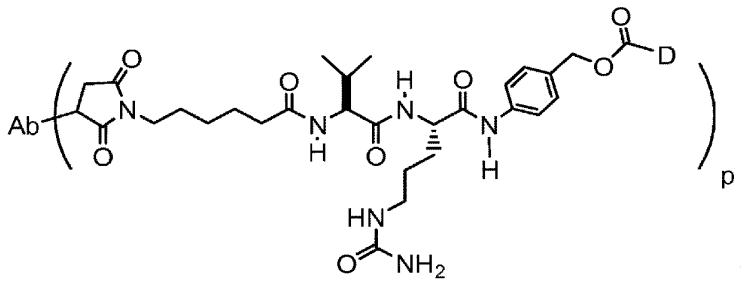
例示的なリンカー成分及びその組合せは、式ＩＩのＡＤＣについて以下に示す。



Val-Cit又はVC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

ストレッチャー、スペーサー及びアミノ酸ユニットを含むリンカー成分は、例えば米国特許公開第２００５-０２３８６４９号Ａ１に記載のものなど、当分野で公知の方法によって合成されうる。

【０２３５】

例示的な薬剤部分

メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第３８９６１１１号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びＣ-３メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第４１５１０４２号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第４１３７２３０号；同４２４８８７０号；同４２５６７４６号；同４２６０６０８号；同４２６５８１４号；同４２９４７５７号；同４３０７０１６号；同４３０８２６８号；同４３０８２６９号；同４３０９４２８号；同４３１３９４６号；同４３１５９２９号；同４３１７８２１号；同４３２２３４８号；同４３３１５９８号；同４３６１６５０号；同４３６４８６６号；同４４２４２１９号；同４４５０２５４号；同４３６２６６３号；及び同４３７１５３３号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(ｉ)発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ｉｉ)抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(ｉｉｉ)血漿中で安定、そして(ｉｖ)様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

メイタンシノイド薬剤部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、又は遺伝子工学技術を用いて産生してもよい(Yu等（2002）PNAS 99:7968-7973を参照)。また、マイタンシノール及びマイタンシノール類似体は、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。

メイタンシノイド薬剤部分の例示的な実施態様には、本明細書中において開示した構造を有するＤＭ１；ＤＭ３；及びＤＭ４が含まれる。

【０２３６】

アウリスタチン類及びドラスタチン類

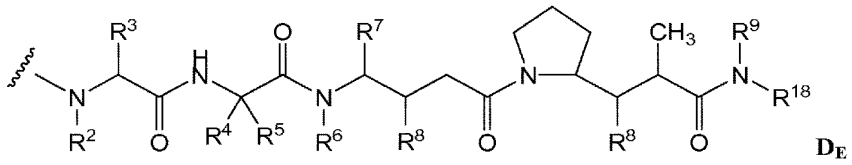
いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体ないしは誘導体、例えばアウリスタチン(auristatin)（米国特許第５６３５４８３号；同第５７８０５８８号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、ＧＴＰ加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等（2001）Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌

活性(米国特許第５６６３１４９号)及び抗真菌性活性(Pettit 等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第０２／０８８１７２号)。

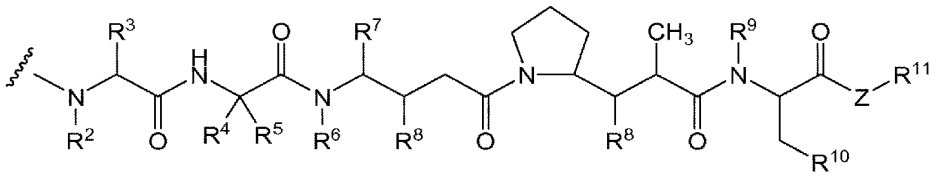
例示的なアウリスタチンの実施態様には、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分ＤＥ及びＤＦを含み、２００４年３月２８日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される。

【０２３７】

ペプチド性薬剤部分は以下の式D_E及びD_Fから選択されうる。



D_E



D_F

ここで、D_E及びD_Fの波線は、独立して各々の位置で、抗体又は抗体-リンカー成分への共有結合部位を示す。

R^2は、H及びC_1-C_8アルキルから選択され、

R^3は、H、C_1-C_8アルキル、C_3-C_8炭素環式化合物、アリール、C_1-C_8アルキル-アリール、C_1-C_8アルキル-(C_3-C_8炭素環式化合物)、C_3-C_8ヘテロ環及びC_1-C_8アルキル-(C_3-C_8ヘテロ環)から選択され、

R^4は、H、C_1-C_8アルキル、C_3-C_8炭素環式化合物、アリール、C_1-C_8アルキル-アリール、C_1-C_8アルキル-(C_3-C_8炭素環式化合物)、C_3-C_8ヘテロ環及びC_1-C_8アルキル-(C_3-C_8ヘテロ環)から選択され、

R^5は、H及びメチルから選択され、

又はR^4及びR^5は共同で環状炭素を形成し、R^a及びR^bがH、C_1-C_8アルキル及びC_3-C_8炭素環式化合物からそれぞれ選択される式-(CR^aR^b)$_n$-を有し、nは２、３、４、５及び６から選択され、

R^6は、H及びC_1-C_8アルキルから選択され、

R^7は、H、C_1-C_8アルキル、C_3-C_8炭素環式化合物、アリール、C_1-C_8アルキル-アリール、C_1-C_8アルキル-(C_3-C_8炭素環式化合物)、C_3-C_8ヘテロ環及びC_1-C_8アルキル-(C_3-C_8ヘテロ環)から選択され、

各々のR^8は、H、OH、C_1-C_8アルキル、C_3-C_8炭素環及びO-(C_1-C_8アルキル)からそれぞれ選択され、

R^9は、H及びC_1-C_8アルキルから選択され、

R^{10}は、アリール又はC_3-C_8ヘテロ環から選択され、

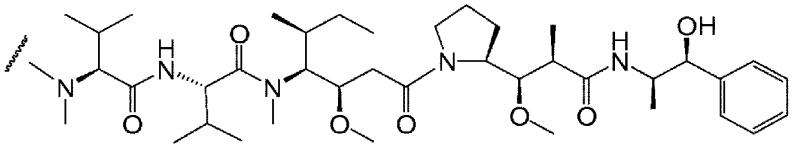
ZはO、S、NH、又はR^{12}がC_1-C_8アルキルであるNR^{12}であり、
R^{11}は、H、C_1-C_{20}アルキル、アリール、C_3-C_8ヘテロ環、-$(R^{13}O)_m$-R^{14}、又は-$(R^{13}O)_m$-$CH(R^{15})_2$から選択され、
mは、1~1000の範囲の整数であり、
R^{13}はC_2-C_8アルキルであり、
R^{14}は、H又はC_1-C_8アルキルであり、
各々のR^{15}の発生は、独立してH、COOH、-$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$、-$(CH_2)_n$-SO_3H、又は-$(CH_2)_n$-SO_3-C_1-C_8アルキルであり、
各々のR^{16}の発生は、独立してH、C_1-C_8アルキル、又は-$(CH_2)_n$-COOHであり、
R^{18}は、-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-アリール、-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$(C_3-C_8ヘテロ環)、及び-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$(C_3-C_8炭素環式化合物)から選択され、そして、nは0から6の範囲の整数である。

【0238】

一実施態様では、R^3、R^4及びR^7は、それぞれイソプロピル又はsec-ブチルであり、R^5は-H又はメチルである。ある例示的な実施態様では、R^3及びR^4は各々イソプロピルであり、R^5は-Hであり、そしてR^7はsec-ブチルである。
さらに他の実施態様では、R^2及びR^6はそれぞれメチルであり、R^9は-Hである。
さらに他の実施態様では、各々のR^8の発生は-OCH_3である。
例示的な実施態様では、R^3及びR^4は各々イソプロピルであり、R^2及びR^6はそれぞれメチルであり、R^5は-Hであり、R^7はsec-ブチルであり、各々のR^8の発生は-OCH_3であり、そしてR^9は-Hである。一実施態様では、Zは-O-又は-NH-である。
一実施態様では、R^{10}はアリールである。
ある例示的な実施態様では、R^{10}は-フェニールである。
ある例示的な実施態様では、Zが-O-の場合、R11は-H、メチル又はt-ブチルである。
一実施態様では、Zが-NHである場合に、R^{11}は-$CH(R^{15})_2$である。このR^{15}は-$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$であり、R^{16}は-C_1-C_8アルキル又は-$(CH_2)_n$-COOHである。
他の実施態様では、Zが-NHである場合に、R^{11}は-$CH(R^{15})_2$である。このR^{15}は-$(CH_2)_n$-SO_3Hである。

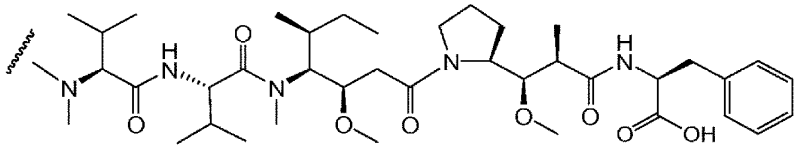
【0239】

式DEの例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAEである。ここで、波線は抗体-薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す。

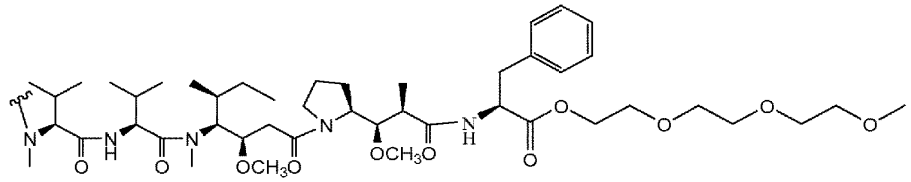


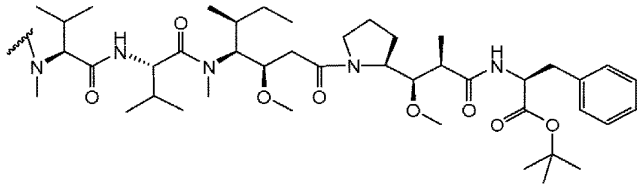
MMAE

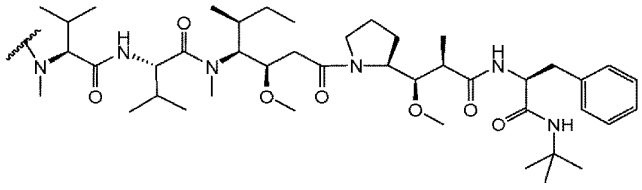
式DFの例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAFである。ここで、波線は抗体-薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す(米国特許公開第2005/0238649号及びDoronina等(2006) Bioconjugate Chem 17:114-124)を参照)。

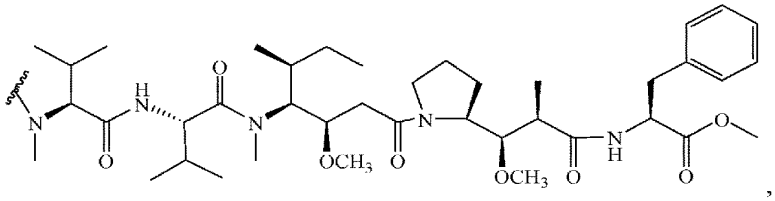

MMAF

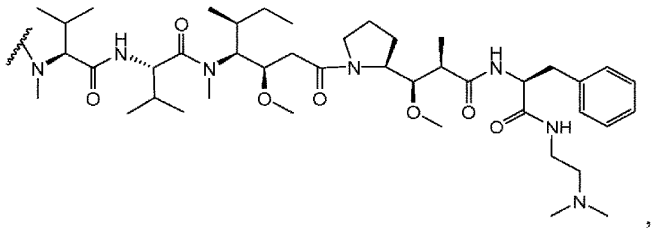
【０２４０】
他の薬剤部分には以下のＭＭＡＦ誘導体が含まれる。ここで、波線は抗体－薬剤コンジュゲートのリンカー(Ｌ)への共有結合を示す。

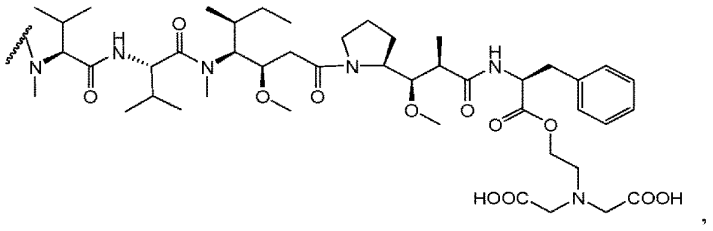

,

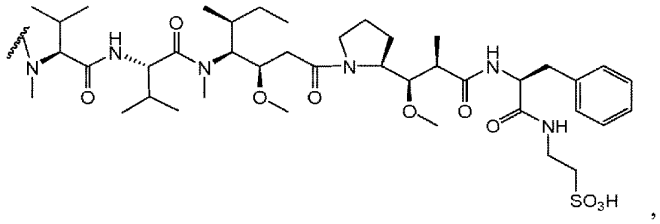

,

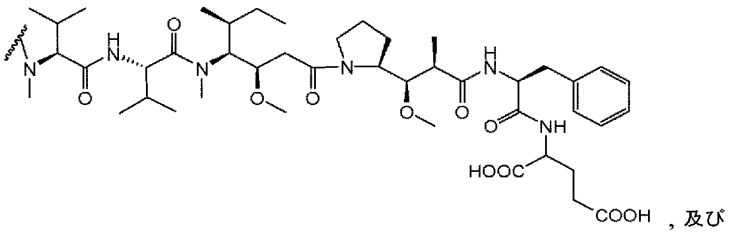

,

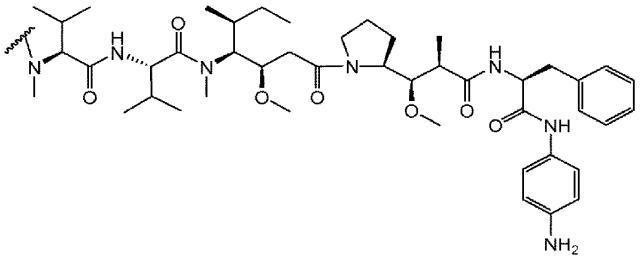

,


,

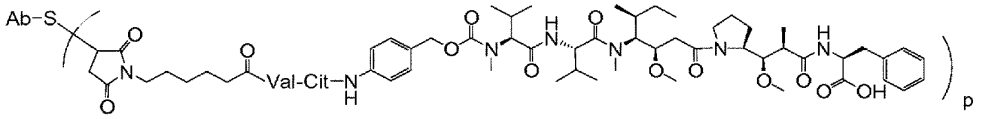

,


,

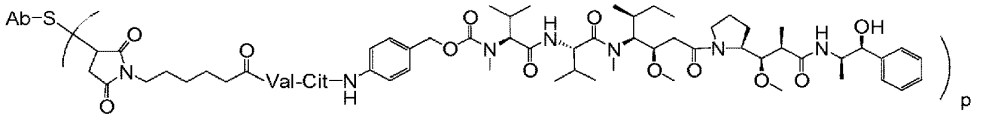

, 及び



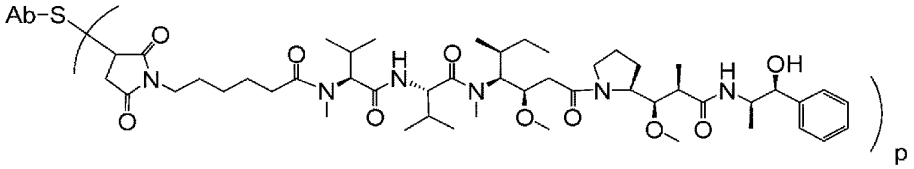
【０２４１】
一態様では、限定するものではないが、上記のようなトリエチレングリコールエステル(ＴＥＧ)を含む親水基はR^{11}で薬剤部分に結合することができる。ある特定の理論に縛られるものではないが、親水基は薬剤部分の内在化及び非凝集に存在する。
アウリスタチン／ドラスタチン又はその誘導体を含む式ＩのＡＤＣの例示的な実施態様は、米国特許公開第２００５-０２３８６４９号Ａ１及びDoronina等 (2006) Bioconjugate Chem 17: 114-124に記載されており、これは出典明記によってここに明確に援用される。ＭＭＡＥ又はＭＭＡＦと様々なリンカー成分を含む式ＩのＡＤＣの例示的な実施態様は、以下の構造及び略記号を有する(ここで、「Ａｂ」は抗体であり、ｐは１～およそ８であり、「Ｖａｌ-Ｃｉｔ」はバリン-シトルリンジペプチドであり、そして「Ｓ」は硫黄原子である。



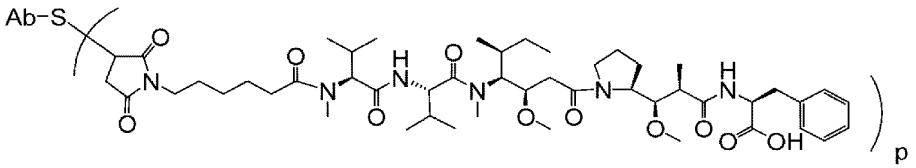
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

【０２４２】
さらに、ＭＭＡＦと様々なリンカー成分を含む式IのＡＤＣの例示的な実施態様には、Ａｂ-ＭＣ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦ及びＡｂ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦが含まれる。興味深いことに、タンパク質分解性の切断を受けないリンカーによって抗体に結合しているＭＭＡＦを含むイムノコンジュゲートは、タンパク質分解で切断可能なリンカーによって抗体に結合しているＭＭＡＦを含むイムノコンジュゲートに比べて活性を有することが示されている。Doronina等（2006）Bioconjugate Chem 17:114-124を参照。このような場合、薬剤放出は細胞内の抗体分解に影響を受けると思われる。同上。
一般的に、ペプチドベースの薬剤部分は、２以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press を参照)。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分は、米国特許公開第2005-0238649号A1；米国特許公開第5635483号；米国特許第5780588号；Pettit 等（1989）J. Am Chem Soc. 111: 5463-5465；Pettit 等（1998）Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725；及びPettit 等（1996）J. Chem Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及びDoronina（2003）Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784の方法に従って調製されうる。
特に、式ＤＦのアウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分、例えばＭＭＡＦ及びその誘導体は、米国特許公開第２００５-０２３８６４９号Ａ１及びDoronina等（2006）Bioconjugate Chem 17:114-124に記載の方法を用いて調製されうる。式ＤＥのアウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分、例えばＭＭＡＥ及びその誘導体は、Doronina等（2003）Nat. Biotech. 21:778-784に記載の方法を用いて調製されうる。薬剤-リンカー部分であるＭＣ-ＭＭＡＦ、ＭＣ-ＭＭＡＥ、ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦ、及びＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥは、例えばDoronina等（2003）Nat. Biotech. 21:778-784、及び米国特許公開第２００５／０２３８６４９号Ａ１に記載のような常套的な方法によって都合よく合成され、その後対象の抗体にコンジュゲートされてもよい。
【０２４３】
薬剤ローディング(Drug Loading)
薬剤ローディングは、式Iの分子において、抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、ｐによって表される。薬剤ローディングは抗体当たり１～２０の薬剤部分(Ｄ)の範囲であってもよい。式IのＡＤＣには、１から２０の薬剤部分の範囲でコンジュゲートされる抗体の集まりが含まれる。コンジュゲート反応からのＡＤＣの調製において抗体当たりの薬剤部分の平均数は、質量分析、ＥＬＩＳＡアッセイ及びＨＰＬＣなどの従来の方法によって特徴付けられうる。ｐに関するＡＤＣの定量的分布も決定されうる。いくつかの場合では、ｐが他の薬剤ローディングを有するＡＤＣの一定の値である場合の均質なＡＤＣの分離、精製及び特徴づけは、逆相ＨＰＬＣ又は電気泳動などの手段によって達成されうる。
ある抗体-薬剤コンジュゲートでは、ｐは抗体上の結合部位の数によって限定されうる。例えば、結合がシステインチオールである場合、上記の例示的な実施態様のように、抗体はたった１つ又は複数のシステインチオール基を有してもよいし、結合しうるリンカー

によってたった１つ又は複数の十分に活性なチオール基を有してもよい。ある実施態様では、薬剤ローディングが高いと、例えばｐ＞５であると、特定の抗体-薬剤コンジュゲートの凝集、難溶性、毒性又は細胞透過性の喪失が起こりうる。ある実施態様では、本発明のＡＤＣの薬剤ローディングは、１からおよそ８、およそ２からおよそ６、およそ３からおよそ５、およそ３からおよそ４、およそ３．１からおよそ３．９、およそ３．２からおよそ３．８、およそ３．２からおよそ３．７、およそ３．２からおよそ３．６、およそ３．３からおよそ３．８、またはおよそ３．３からおよそ３．７の範囲である。実際、あるＡＤＣでは、抗体当たりの薬剤部分の適切な比は、８未満であってもよいし、およそ２～およそ５であってもよい。米国特許公開第２００５-０２３８６４９号Ａ１(出典明記によってこの全体が本明細書中に援用される)を参照。

【０２４４】

ある実施態様では、理論的な最大よりも少ない薬剤部分がコンジュゲート反応の間に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、以下に検討するように、薬剤-リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しないリジン残基を含みうる。ほとんどの反応性リジングループのみがアミン-反応性リンカー試薬と反応しうる。一般に、抗体は薬剤部分に結合しうる多くの遊離した反応性のシステインチオール基を含まず、実際、抗体のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在する。ある実施態様では、抗体は、反応性のシステインチオール基を生成するために、部分的ないしは完全に還元な条件下で、ジチオトレイトール(ＤＴＴ)又はトリカルボニルエチルホスフィン(ＴＣＥＰ)などの還元剤により還元されうる。ある実施態様では、抗体は変性条件下に曝されるとリジンやシステインなどの反応性の求核基を現す。

ＡＤＣのローディング(薬剤／抗体比率)は、例えば、(i) 抗体に対して薬剤-リンカー中間体又はリンカー試薬のモル過剰量を限定する、(ii) コンジュゲートの反応時間又は温度を限定する、(iii) システインチオール修飾のための還元条件を限定する、(iv) システイン残基がリンカー-薬剤接着の数及び／又は位置の制御のために変更されるように、抗体のアミノ酸配列を組み換え技術によって改変する(例えば、本明細書及び国際公開第２００６／０３４４８８号(出典明記によって本明細書中に全体が援用される)において開示されるように調製したｔｈｉｏＭａｂ又はｔｈｉｏＦａｂ)ことによるなど、異なる方法で制御しうる。

【０２４５】

１以上の求核基が薬剤部分試薬が続くリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間体と反応する場合、その結果生じる生成物は、抗体に結合した一又は複数の薬剤部分を有するＡＤＣ化合物の混合物であると考えられる。抗体当たりの薬剤の平均数は、抗体特異的かつ薬剤特異的である二重ＥＬＩＳＡアッセイによって混合物から算出されうる。個々のＡＤＣ分子は、質量分析によって混合物中で識別され、ＨＰＬＣ、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィによって分離されうる(例としてHamblett, K.J.,等 "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C.,等 "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照)。ある実施態様では、単一のローディング値をもつ均質なＡＤＣは、電気泳動又はクロマトグラフィによってコンジュゲート混合物から単離してもよい。

【０２４６】

イムノコンジュゲートの調製方法

式ＩのＡＤＣは、当業者に公知の有機化学的反応、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) 共有結合によってＡｂ-Ｌを形成するための二価のリンカーと抗体の求核基との反応とその後の薬剤部分Ｄとの反応、及び(2) 共有結合によってＤ-Ｌを形成するための二価のリンカーと薬剤部分の求核基との反応とその後の抗体の求核基との反応などに

よって調製されてもよい。後者の手段による式IのＡＤＣを調製するための例示的な方法は米国特許公開第２００５-０２３８６４９号Ａ１に記載されており、出典明記によって本明細書中に明確に援用される。

抗体の求核基には、限定するものではないが、(i) Ｎ末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリジン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基が含まれる。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性基により共有結合を形成することができる。このリンカー部分及びリンカー試薬には、(i) 活性エステル類、例えばＮＨＳエステル類、ＨＯＢｔエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、抗体が完全ないしは部分的に還元されるように、還元剤、例えばＤＴＴ(ジチオトレイトール)又はトリカルボニルエチルホスフィン(ＴＣＥＰ)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、２つの反応性のチオール求核基を形成する。あるいは、リジン残基の修飾によって、例えば、チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリジンを反応させることによって、抗体にスルフヒドリル基を導入することができる。反応性のチオール基は、１、２、３、４又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体に導入されてもよい。

【０２４７】

また、本発明の抗体-薬剤コンジュゲートは、アルデヒドないしはケトンカルボニル基などの抗体上の求電子性基とリンカー試薬や薬剤上の求核基との間の反応によって生成してもよい。リンカー試薬上の有用な求核基には、限定するものではないが、ヒドラジド、おきしむ、アミノ、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、及びアリールヒドラジドが含まれる。一実施態様では、抗体を修飾して、リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる求電子性の部分を導入する。他の実施態様では、グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応しうるアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができる抗体のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、Ｎ末端セリン又はスレオニン残基を含む抗体はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem 3:138-146；US 5362852)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリールヒドラジド基が含まれる。このリンカー部分及びリンカー試薬には、(i) 活性エステル類、例えばＮＨＳエステル類、ＨＯＢｔエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

【０２４８】

本発明の化合物は、限定するものではないが、以下の架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ-ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、Ｓ

ＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ-ＥＭＣＳ、スルホ-ＧＭＢＳ、スルホ-ＫＭＵＳ、スルホ-ＭＢＳ、スルホ-ＳＩＡＢ、スルホ-ＳＭＣＣ、及びスルホ-ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ（スクシンイミジル-(４-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したＡＤＣが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

また、抗体と細胞障害性剤のイムノコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、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-カルボキシラート(ＳＭＣＣ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-２，６-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-１４標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(ＭＸ-ＤＴＰＡ)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。

【０２４９】

別法として、抗体と細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。組み換えＤＮＡ分子は、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの抗体と細胞障害性の部分をコードする領域を含みうる。

更なる他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用して循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与してもよい。

【０２５０】

２．例示的なイムノコンジュゲート-Ｔｈｉｏ-抗体薬剤コンジュゲート

システイン改変抗ＣＤ２２抗体の調製

本発明のシステイン改変抗ＣＤ２２抗体及び親抗ＣＤ２２抗体のアミノ酸配列変異体をコードするＤＮＡは、限定するものではないが、(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合には)天然源からの単離、予め調製したポリペプチドをコードするＤＮＡの、部位特異的(又はオリゴヌクレオチド媒介性）突然変異誘発(Carter（1985)等 Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443；Ho等（1989) Gene（Amst.）77:51-59；Kunkel等（1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488；Liu等（1998) Ｊ. Biol. Chem 273:20252-20260)、ＰＣＲ突然変異誘発(Higuchi,（1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito等（1991) Gene 102:67-70；Bernhard等（1994) Bioconjugate Chem 5:126-132；及びVallette等（1989) Nuc. Acids Res. 17: 723-733)、及びカセット突然変異誘発(Wells等（1985) Gene 34:315-323)を含む、様々な方法によって調製される。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ(登録商標) 多部位-特異的突然変異誘発キット(Stratagene, La Jolla, CA)などの、突然変異誘発プロトコール、キットおよび試薬は市販されている。また、ＰＣＲベースの突然変異誘発によって鋳型として二本鎖プラスミドＤＮＡを用いたオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって、単一突然変異が生成される(Sambrook and Russel,（2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition；Zoller等（1983) Methods Enzymol. 100:468-500；Zoller, MJ. and Smith, M（1982) Nucl. Acids Res. 10: 6487-6500)。組み換え抗体の変異体も、制限酵素断片操作又は合成オリゴヌクレオチドによるオーバーラップ伸展ＰＣＲによって構築してもよい。突然変異誘発プライマーはシステインコドン置換(一又は複数)をコードする。標準的な突然変異誘発技術を用いて、このような変異体シス

テイン改変抗体をコードするＤＮＡを生成することができる(Sambrook等 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；及びAusubel等 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

【０２５１】

ファージディスプレイ技術(McCafferty等 (1990) Nature 348:552-553)を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(Ｖ)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロで抗ＣＤ２２ヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子を、繊維状バクテリオファージ、例えばＭ１３又はｆｄの主要又は微量コートタンパク質遺伝子のどちらかをフレーム内にクローン化し、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含有するので、抗体の機能的特性に基づく選別を行ってもそれらの性質を表す抗体をコードする遺伝子が選別される。ゆえに、ファージはＢ細胞の性質のいくつかを模倣する(Johnson等 (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571；Clackson等 (1991) Nature, 352:624-628；Marks等 (1991) Ｊ. Mol. Biol. 222:581-597；Griffith等 (1993) EMBO Ｊ. 12:725-734；米国特許第５５６５３３２号；米国特許第５５７３９０５号；米国特許第５５６７６１０号；米国特許第５２２９２７５号)。

抗ＣＤ２２抗体は、公知のオリゴペプチド合成法を使用して化学的に合成されてもよいし、組み換え技術を用いて調製して精製されてもよい。適切なアミノ酸配列、又はその一部を、固相法技術を用いた直接的なペプチド合成によって生成してもよい(Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA；Merrifield, (1963) Ｊ. Am Chem Soc., 85:2149-2154)。インビトロタンパク質合成は、手動の技術又は自動化によって実行されてもよい。例えば、ｔ-ＢＯＣ又はＦｍｏｃ保護アミノ酸を使用して、そして製造業者の指示を用いたアプライドバイオシステムペプチド合成機(Foster City, CA)を用いて、自動固相合成法を行ってもよい。抗ＣＤ２２抗体又はＣＤ２２ポリペプチドの様々な部分は、別々に化学的に合成されて、化学的又は酵素的な方法を用いて組み合わせ、所望の抗ＣＤ２２抗体又はＣＤ２２ポリペプチドを生産させてもよい。

【０２５２】

抗体断片の産生のために様々な技術が開発されている。以前から、これらの断片はインタクトな抗体の蛋白分解によって生じるか(Morimoto等 (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117；及びBrennan等 (1985) Science, 229:81)、又は組換え宿主細胞によって直接生産された。Ｆａｂ、ＦｖおよびＳｃＦｖ抗ＣＤ２２抗体断片はすべて、大腸菌において発現され、大腸菌から分泌されるため、大量の断片を容易に生成することができる。抗体断片は、本明細書において述べられる抗体ファージライブラリから単離してもよい。あるいは、Ｆａｂ'-ＳＨ断片は、大腸菌から直接回収して、化学的にカップリングしてＦ(ａｂ')$_2$断片を形成させてるか(Carter等 (1992) Bio/Technology 10:163-167)、または組換え宿主細胞培養物から直接単離されうる。抗ＣＤ２２抗体は(ｓｃＦｖ)単鎖Ｆｖ断片であってもよい(国際公開第９３／１６１８５号；米国特許第５７１８９４号；米国特許第５８７４５８号)。また、抗ＣＤ２２抗体断片は「直鎖状抗体」であってもよい(米国特許第５６４１８７０号)。このような線形抗体断片は、単一特異性でも二重特異性でもよい。

以下の記載は主に、抗ＣＤ２２抗体をコードする核酸を含むベクターにて形質転換した又は該ベクターを形質移入した細胞を培養することによる、抗ＣＤ２２抗体の産生に関する。抗ＣＤ２２抗体をコードするＤＮＡは、抗ＣＤ２２抗体のｍＲＮＡを有し、検出可能なレベルに発現すると思われる組織から調製したｃＤＮＡライブラリから得てもよい。したがって、ヒト抗ＣＤ２２抗体ないしＣＤ２２ポリペプチドＤＮＡは、ヒト組織から調製したｃＤＮＡライブラリから従来通りに得ることができる。また、抗ＣＤ２２抗体コード遺伝子は、ゲノムライブラリから得るか、又は公知の合成手順(例えば自動核酸合成)によって得てもよい。

【０２５３】
本発明の設定、選別および調製方法により、求電子性の官能性と反応するシステイン改変抗ＣＤ２２抗体が可能である。これらの方法によりさらに、所定の設定した選択した部位に薬剤分子を有する抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)化合物などの抗体複合体化合物が可能である。抗体表面上の反応性のシステイン残基により、マレイミド又はハロアセチルなどのチオール反応基を介した薬剤成分の特異的なコンジュゲートが可能である。マレイミド基に対するＣｙｓ残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基又はＮ-末端アミノ基などのタンパク質内の任意の他のアミノ酸官能性の、およそ１０００倍である。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬のチオール特異的官能性はアミン基と反応するが、より高いｐＨ(＞９．０)とより長い反応時間が必要である(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。タンパク質内の遊離チオールの量は、標準的なエルマンのアッセイによって推定されてもよい。免疫グロブリンＭはジスルフィド結合五量体の例であるのに対し、免疫グロブリンＧは、サブユニットを一緒に結合している内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の例である。このタンパク質では、ジチオトレイトール(ＤＴＴ)又はｓｅｌｅｎｏｌ(Singh等 (2002) Anal. Biochem 304: 147-156)などの試薬によるジスルフィド結合の還元は、反応性の遊離チオールを生成するために必要である。この手法により、抗体立体構造および抗原結合特異性が失われうる。

【０２５４】
Ｐｈｅｓｅｌｅｃｔｏｒ(反応性チオールの選別のためのファージＥＬＩＳＡ)アッセイにより、ＥＬＩＳＡファージ様式での抗体の反応性システイン基の検出が可能であり、これによってシステイン改変抗体の設定の助けとなる(国際公開第２００６／０３４４８８号)。システイン改変抗体をウェルの表面にコートし、ファージ粒子とインキュベートして、ＨＲＰ標識した二次抗体を添加して、吸光度を検出する。ファージにディスプレイされる変異タンパク質は、迅速で、強力な、ハイ-スループット方法でスクリーニングされうる。システイン改変抗体のライブラリを生成して同じ手法を用いて結合選別を行い、抗体又は他のタンパク質のランダムなタンパク質-ファージライブラリから遊離Ｃｙｓ取込みの反応性の部位を適切に同定することができる。この技術は、ファージにディスプレイされるシステイン変異タンパク質を、チオール反応性でもあるレポーターグループ又は親和性試薬と反応させることを含む。

ＰＨＥＳＥＬＥＣＴＯＲアッセイにより、抗体の反応性のチオール基のスクリーニングが可能である。この方法によるＡ１２１Ｃ変異の同定は一例である。完全なＦａｂ分子は、反応性チオール基を有するＴｈｉｏＦａｂ変異体をより多く同定するために、効果的に検索されうる。パラメーターである断片的な表面のアクセス容易性を用いて、ポリペプチド内のアミノ酸残基に対する溶媒のアクセスしやすさを同定して、定量化した。表面のアクセス容易性は、溶媒分子、例えば水が接触することができる表面積(Å^2)として表されうる。水が占める面積は１．４Å半径球として概算される。アルゴリズムを用いて公知のＸ線結晶学由来の座標によりタンパク質の各アミノ酸の表面アクセス容易性を算出する結晶学プログラムのＣＣＰ４ Ｓｕｉｔｅとして("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50: 760-763)、ソフトウェアは入手自由であるか許可されている(Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, or by internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)。B. Lee and F. M Richards (1971) J. Mol. Biol. 55: 379-400のアルゴリズムに基づいて、表面アクセス容易性の算出を実行する２つの例示的なソフトウェアモジュールは、「ＡＲＥＡＩＭＯＬ」および「ＳＵＲＦＡＣＥ」である。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、タンパク質のヴァンデルワールス表面を転がるので、プローブ球(溶媒分子を表す)の中心の座標としてタンパク質の溶媒にアクセスする表面を定義する。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、各原子の周りの拡がった球上(原子とプローブの半径の合計に等しい原子中心からの距離)に表面ポイントを生成して、周囲の原子と関連する同等の球内にあるものを除くことによって溶媒にアクセス容易な表面を算出する。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、ＰＤＢ座標ファイルに原子

の溶媒にアクセス容易な領域を見つけ、残基、鎖、及び全分子がアクセス容易な領域をまとめる。個々の原子がアクセス容易な領域(または、領域の相違)は、偽ＰＤＢ出力ファイルに書き込まれる。ＡＲＥＡＩＭＯＬは各エレメントについて単一の半径を仮定し、限られた数の異なるエレメントを認識するのみである。

【０２５５】

ＡＲＥＡＩＭＯＬおよびＳＵＲＦＡＣＥは、絶対的なアクセス容易性、すなわち正方形のオングストローム(Å)の数を示す。部分的な表面アクセス容易性は、ポリペプチド内のアミノ酸に関する標準の状態を参照することで算出される。基準状態はトリペプチドＧｌｙ-Ｘ-Ｇｌｙであり、ここで、Ｘは対象のアミノ酸であり、基準状態は「伸展した」高次構造、すなわちβ鎖内の高次構造様でなければならない。伸展した高次構造はＸのアクセス容易性を最大にする。算出したアクセス容易な領域をＧｌｙ-Ｘ-Ｇｌｙトリペプチド基準状態のアクセス容易な領域で割って、比率を比率を示す。これが部分的なアクセス容易性となる。アクセス容易性の割合は、１００を乗じた部分的アクセス容易性である。表面アクセス容易性を算出するための他の例示的なアルゴリズムは、ポリペプチドのＸ線座標に基づいて水球体に対するアミノ酸残基の部分的アクセス容易性を算出するプログラムｘｓａｅ（Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)のＳＯＬＶモジュールに基づく。抗体のすべてのアミノ酸の部分的表面アクセス容易性は、利用できる結晶構造情報を使用して算出されてもよい(Eigenbrot等（1993）Ｊ Mol Biol. 229:969-995)。

システイン改変抗体をコードするＤＮＡを容易に単離し、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)配列決定される。ハイブリドーマ細胞はこのようなＤＮＡの供与源として役立つ。単離した後、ＤＮＡを発現ベクターに入れ、ついでそれを、大腸菌、サルのＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞、又は他の哺乳動物の宿主細胞、例えば抗体タンパク質を産生しない骨髄腫細胞(米国特許第５８０７７１５号；米国公開特許第２００５／００４８５７２号；米国公開特許第２００４／０２２９３１０)などの宿主細胞に形質移入して、組み換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得てもよい。

【０２５６】

設定および選別の後、改変された、非常に反応性のある対になっていないＣｙｓ残基を有するシステイン改変抗体、例えばＴｈｉｏＦａｂが、(i) 細菌、例えば大腸菌システム(Skerra等（1993）Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262；Pluckthun（1992）Immunol. Revs. 130:151-188)又は哺乳類の細胞培養システム(国際公開第０１／００２４５号)、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(ＣＨＯ)における発現、および(ii) 一般的なタンパク質精製技術を用いた精製(Lowman等（1991）Ｊ. Biol. Chem 266(17): 10982-10988)によって産生されてもよい。

改変されたＣｙｓチオール基は、求電子性リンカー試薬および薬剤-リンカー中間生成物と反応して、システイン改変抗体薬剤コンジュゲートおよび他の標識したシステイン改変抗体を形成する。親抗体に存在し、鎖内および鎖間のジスルフィド結合を形成するシステイン改変抗体Ｃｙｓ残基は、反応性チオール基を全く持っておらず(還元剤で処理されない限り)、求電子性のリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間生成物と反応しない。新規に改変されたＣｙｓ残基は対形成せずに、反応することができる。すなわち求電子性のリンカー試薬又は薬剤-マレイミドなどの薬剤-リンカー中間生成物にコンジュゲートすることができる。例示的な薬剤-リンカー中間生成物には、ＭＣ-ＭＭＡＥ、ＭＣ-ＭＭＡＦ、ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥおよびＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦが含まれる。重鎖および軽鎖の改変したＣｙｓ残基の構造位置は連続する番号付けシステムに従って番号付けする。この連続する番号付けシステムは、Ｎ末端から始まるカバット番号付けシステム(Kabat等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)に関連しており、ａ、ｂ、ｃで示す挿入がカバット番号付けスキーム(下列)とは異なる。カバット番号付けシステムを用いると、実際の直鎖のアミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲないしＣＤＲが短

くなっているアミノ酸か、又はＦＲないしＣＤＲに挿入を含むアミノ酸を含みうる。システイン改変重鎖変異体部位は連続する番号付けおよびカバット番号付けスキームによって同定される。

【０２５７】

一実施態様では、システイン改変抗ＣＤ２２抗体は、

(a) システインによって親抗ＣＤ２２抗体の一又は複数のアミノ酸残基を置換する、そして、

(b) チオール反応性の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ＣＤ２２抗体のチオール反応性を決定する

ことを含む方法によって調製される。

システイン改変抗体は親抗体よりチオール反応性の試薬との反応性が高くてもよい。

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖ないし軽鎖、又は定常ドメインないし可変ドメインに位置してもよい。また、抗体断片、例えばＦａｂは、抗体断片のアミノ酸を置換する一又は複数のシステインアミノ酸によって改変して、システイン改変抗体断片を形成してもよい。

本発明の他の実施態様は、

(a) 一又は複数のシステインアミノ酸を親抗ＣＤ２２抗体に導入して、システイン改変抗ＣＤ２２抗体を生成する、そして、

(b) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定する

ことを含み、

このとき、システイン改変抗体は親抗体よりもチオール反応性の試薬と反応性が高いものである、システイン改変抗ＣＤ２２抗体を調製する(作製する)方法を提供する。

【０２５８】

システイン改変抗体を調製する方法の工程(a)は、

(i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、

(ii) システイン改変抗体を発現させる、そして、

(iii) システイン改変抗体を単離して、精製する

ことを含む。

システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、ファージ又はファジミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

また、システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、

(i) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、

(ii) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定する

ことを含んでもよい。

本発明の他の実施態様は、

(a) 親抗体に一又は複数のシステインアミノ酸を導入して、システイン改変抗体を生成する、

(b) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、

(c) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定する、そして、

(d) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定する

ことを含む、チオール反応のために高い反応性を有し、対形成をしないシステインアミノ酸を有するシステイン改変抗体をスクリーニングする方法である。

【０２５９】

システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(a)は、

(i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、

(ii) システイン改変抗体を発現させる、そして、

(iii) システイン改変抗体を単離して、精製する

ことを含んでもよい。

システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、ファージ又はファジミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

また、システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、

(i) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、

(ii) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定する

ことを含んでもよい。

【０２６０】

抗ＣＤ２２ １０Ｆ４ ＩｇＧ変異体のシステイン改変

本明細書中に記載のシステイン改変方法によって、完全長キメラ親モノクローナル抗ＣＤ２２抗体の重鎖１１８(ＥＵ番号付け)(連続する番号付けで言うと重鎖位置１２１に相当)部位にシステインを導入した。

親抗体、「ｓｔｄ 抗-ＣＤ２２ Ｈｕ １０Ｆ４ｖ３ Ｆｃ」(重鎖配列：配列番号：８８、軽鎖配列：配列番号：８７、図５Ｂ)をシステイン改変して、「Ａ１１８Ｃ ｔｈｉｏ ｈｕ抗ＣＤ２２ １０Ｆ４ｖ３」(重鎖配列：配列番号：９２、軽鎖配列：配列番号：９１、図１７)、「Ｓ４００Ｃ ｔｈｉｏ ｈｕ抗ＣＤ２２ １０Ｆ４ｖ３」(重鎖配列：配列番号：９３、軽鎖配列：配列番号：９１、図１７)、又は「Ｖ２０５Ｃ ｔｈｉｏ 抗ＣＤ２２ １０Ｆ４ｖ３」(重鎖配列：配列番号：８８、軽鎖配列：配列番号：９１、図５Ｂおよび１７)とした。

これらのシステイン改変モノクローナル抗体を、１ｍＭのシステインを含有する培地における一過性の発酵によって、ＣＨＯ(チャイニーズハムスター卵巣)細胞に発現させた。

【０２６１】

標識したシステイン改変抗ＣＤ２２抗体

システイン改変抗ＣＤ２２抗体は部位特異的であり、チオール反応性の試薬と効率よくカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能性リンカー試薬、キャプチャ、すなわち親和性、標識試薬(例えばビオチン-リンカー試薬)、検出標識(例えば蛍光体試薬)、固相固定化試薬(例えばＳＥＰＨＡＲＯＳＥ™、ポリスチレン又はガラス)、又は薬剤-リンカー中間生成物であってもよい。チオール反応性試薬の一例はＮ-エチルマレイミド(ＮＥＭ)である。ある例示的な実施態様では、ビオチン-リンカー試薬とのＴｈｉｏＦａｂの反応によりビオチン化されたＴｈｉｏＦａｂが生じ、これによって改変されたシステイン残基の存在および反応性が検出され、測定されうる。多機能リンカー試薬とのＴｈｉｏＦａｂの反応により、薬剤成分試薬又は他の標識とさらに反応しうる官能化されたリンカーを有するＴｈｉｏＦａｂが生じる。薬剤-リンカー中間生成物とのＴｈｉｏＦａｂの反応により、ＴｈｉｏＦａｂ薬剤コンジュゲートが生じる。

本明細書中で記述される例示的な方法は一般に、抗体の同定および産生、さらに一般的には、本明細書中に記載の設定およびスクリーニングの工程によって他のタンパク質に応用されてもよい。

【０２６２】

このような手法は、反応基が例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性の結合パートナーである他のチオール反応性試薬のコンジュゲーションに応用されてもよい(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。チオール反応性の試薬は、薬剤成分、フルオロホア、例としてフルオレセインまたはローダミンのような蛍光染料、イメージングまたは放射性治療用金属のためのキレート剤、ペプチジルまたは非ペプチジル標識ないしは検出用タグ、又はポリエチレングリコールの各種アイソフォームなどのクリアランス-改変剤、第三成分に結合するペプチド、ま

たは他の炭水化物または親油性剤であってもよい。

【０２６３】

システイン改変抗ＣＤ２２抗体の使用

システイン改変抗ＣＤ２２抗体とそのコンジュゲートは治療用及び／又は診断用の薬剤としての使用が明らかにされうる。本発明はさらに、Ｂ細胞関連疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理するか、治療するかまたは、寛解する方法を提供する。特に、本発明は、癌、例えばリンパ腫、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などの細胞増殖性疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理するか、治療するかまたは、寛解する方法を提供する。本発明はまた更に、ＣＤ２２関連の疾患又はこのような疾患を発達させる素因を診断するための方法、並びに好ましくはＢ細胞関連のＣＤ２２ポリペプチドを結合する抗体、及び抗体の抗原結合断片を同定するための方法を提供する。

本発明の他の実施態様は、Ｂ細胞関連の疾患に応答する状態の治療において有用な医薬の調製のためのシステイン改変抗ＣＤ２２抗体の使用に関する。

【０２６４】

システイン改変抗体薬剤コンジュゲート(Ｔｈｉｏ-抗体薬剤コンジュゲート)

本発明の他の態様は、システイン改変抗ＣＤ２２抗体(Ａｂ)と、アウリスタチン薬剤成分(Ｄ)を含む抗体-薬剤コンジュゲート化合物であって、このとき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に付着され、この化合物は式Ｉを有するものであり、

$$Ab–(L–D)_p \qquad \text{式 I}$$

このときｐは１、２、３又は４であり、システイン改変抗体は、親抗ＣＤ２２抗体の一又は複数のアミノ酸残基を一又は複数の遊離したシステインアミノ酸に置換することを含む方法によって調製される。

【０２６５】

図１０は、アウリスタチン薬剤成分が軽鎖(ＬＣ-ＡＤＣ)、重鎖(ＨＣ-ＡＤＣ)、及びＦｃ領域(Ｆｃ-ＡＤＣ)内の改変したシステイン基に付着している、システイン改変抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の実施態様を示す。

システイン改変抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートの考えられる利点には、ＰＫパラメーターの改善である安全性の改善(より大きな治療係数)が挙げられ、コンジュゲートを安定化し、かつその活性な結合高次構造を保持しうる抗体鎖間ジスルフィド結合が保たれており、薬剤コンジュゲートの部位が決定され、そして、システイン改変抗体の薬剤-リンカー試薬へのコンジュゲートからシステイン改変抗体薬剤コンジュゲートを調製することでより均一な産物が得られる。

【０２６６】

リンカー

「リンカー」、「リンカーユニット」又は「連結」は、共有結合を含む化学的成分又は共有結合にて抗体を薬剤成分に付着させる原子の鎖を意味する。様々な実施態様では、リンカーはＬと表される。「リンカー」(Ｌ)は、一又は複数の薬剤成分(Ｄ)と抗体ユニット(Ａｂ)を連結させて、式Ｉの抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)を形成させるために用いられうる、二官能性成分又は多機能性成分である。抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、薬剤及び抗体への結合について反応性機能を有するリンカーを用いて都合良く調製されうる。システイン改変抗体(Ａｂ)のシステインチオールは、リンカー試薬、薬剤成分又は薬剤-リンカー中間生成物の求電子性の官能基と結合することができる。

一態様では、リンカーは、抗体に存在する求核性システインに反応することができる求電子性基を有する反応部位を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子

性基と反応することができ、リンカーに共有結合する。有用な求電子性の基には、マレイミドおよびハロアセトアミド基を含むが、これらに限定されるものではない。

リンカーには、二価の基、例としてalkyldiyl、アリーレン、ヘテロアリーレン、アルキロキシ(例としてポリエチレンオキシ、ＰＥＧ、ポリメチレンオキシ)及びアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、Jeffamine™)の繰り返しユニットである-(CR_2)$_n$O(CR_2)$_n$-などの成分、及び、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。

システイン改変抗体は、Klussman,等 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773の７６６ページのコンジュゲート法及び、実施例ｘのプロトコールに従って、マレイミド又はα-ハロカルボニルなどの求電子性の官能基を有するリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間生成物と反応する。

【０２６７】

リンカーは一又は複数のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分には、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」又は「ｖｃ」)、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ニル(「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」)、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」)、一又は複数の繰り返しユニットとしてのエチレンオキシ-CH_2CH_2O-(「ＥＯ」又は「ＰＥＯ」)が含まれる。更なるリンカー成分は当分野において周知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

一実施態様では、ＡＤＣのリンカーＬは以下の式を有する。

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

このとき、
-Ａ-は、抗体(Ａｂ)のシステインチオールに共有結合にて付着した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、独立したアミノ酸ユニットであり、
ｗはそれぞれ、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にて付着した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。

【０２６８】

ストレッチャーユニット

ストレッチャユニット(-Ａ-)は、存在する場合には、抗体ユニットをアミノ酸ユニット(-Ｗ-)に連結することができる。この点に関しては、抗体(Ａｂ)は、ストレッチャーの官能基と結合することができる官能基を有する。天然ないし化学的操作のいずれにかによって抗体に存在することができる有用な官能基には、スルフヒドリル(-ＳＨ)、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭水化物のアノマー水酸基およびカルボキシルが含まれるがこれらに限定されるものではない。一態様では、抗体官能基はスルフヒドリル又はアミノである。スルフヒドリル基は、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成されうる。あるいは、2-イミノチオラン(トラウトの試薬)又は他のスルフヒドリル生成試薬を用いて、抗体のリジン成分のアミノ基を反応させることによって、スルフヒドリル基を生成することができる。一実施態様では、抗体(Ａｂ)は、ストレッチャーユニットの求電子性の官能基と結合することができる遊離したシステインチオール基を有する。式Ｉのコンジュゲートの例示的なストレッチャーユニットは、式ＩＩ及び式ＩＩＩで示すものであり、このときＡｂ、-Ｗ-、-Ｙ-、-Ｄ、ｗ及びｙは前記に定義した通りであり、R^1

^{7}は、$(CH_2)_r$、C_3-C_8カルボシクリル、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カルボシクリル)、(C_3-C_8カルボシクリル)-$(CH_2)_r$、C_3-C_8ヘテロシクリル、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8ヘテロシクリル)、-(C_3-C_8ヘテロシクリル)-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_r$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$-から選択される二価の基であり、$R^b$はH、$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の範囲の整数である。

【0269】

アリーレンには、芳香族環システムから2つの水素原子を除去して得られる6~20の炭素原子の二価の芳香族炭化水素基が含まれる。代表的なアリーレン基には、ベンゼン、置換されたベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから得られる基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ヘテロシクリル基には、一又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素及び硫黄である環式システムが含まれる。複素環基は、1~20の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1~3のヘテロ原子を含む。複素環は、3~7員環を有するモノシクロ(2~6の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1~3のヘテロ原子)又は7~10員環を有するビシクロ(4~9の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1~3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1, 3, 4, 6, 7及び9章;"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に13, 14, 16, 19及び28号;及び、J. Am Chem Soc. (1960) 82:5566に記載される。

【0270】

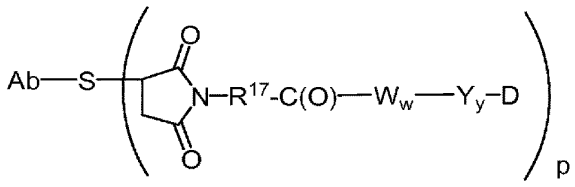
複素環の例には、例示のためであって限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、プテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、β-カルボリニル、フェナンスリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれる。

「カルボシクリル基(Carbocyclyl)」には、単環として3~7の炭素原子又は二環として7~12の炭素原子を有する飽和ないしは不飽和の環が含まれる。単環の炭素環は3~

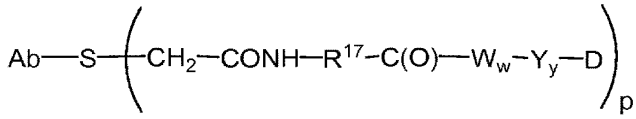
６の環状原子、より一般的には５又は６の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばビシクロ[４，５]、[５，５]、[５，６]又は[６，６]システムとして配置した７～１２の環状原子、又はビシクロ[５，６]又は[６，６]システムとして配置した９又は１０の環状原子を有する。単環の炭素環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１-シクロペント-１-エニル、１-シクロペント-２-エニル、１-シクロペント-３-エニル、シクロヘキシル、１-シクロヘキス-１-エニル、１-シクロヘキス-２-エニル、１-シクロヘキス-３-エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。

【０２７１】

ＩＩからＶＩなどの式ＩのＡＤＣのすべての例示的な実施態様から、明確に示していない場合であっても、改変したシステイン残基の数に応じて、１から４の薬剤成分が抗体に連結している(ｐ＝１～４)ことが理解される。

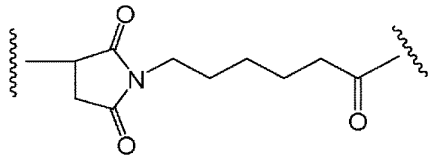


II



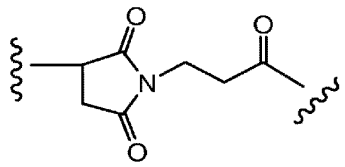
III

図示する式ＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ^{17}が-(ＣＨ$_2$)$_5$-である、マレイミド-カプロイル(ＭＣ)から得られる。



MC

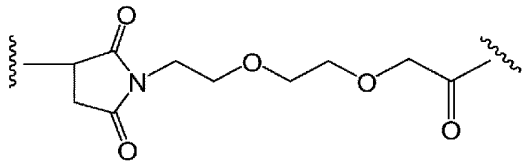
図示する式ＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ^{17}が-(ＣＨ$_2$)$_2$-である、マレイミド-プロパノイル(ＭＰ)から得られる。



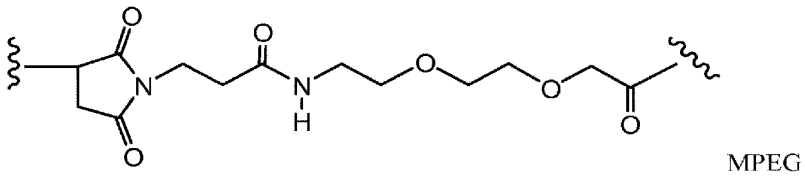
MP

【０２７２】

他の図示する式ＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ^{17}が－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_r$－ＣＨ$_2$－であり、ｒが２である。

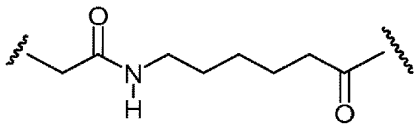


他の図示する式ＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ１７が－（ＣＨ$_2$）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_r$－ＣＨ$_2$－であり、Ｒ^{b}がＨであり、各々のｒが２である。



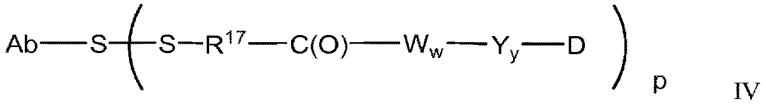
MPEG

図示する式ＩＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ１７が－（ＣＨ$_2$）$_5$－である。



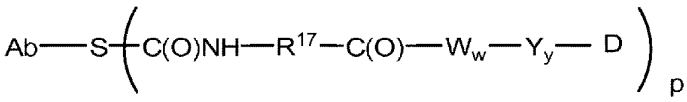
【０２７３】

他の実施態様では、ストレッチャーユニットは、抗体の改変されたシステイン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り、システイン改変抗ＣＤ２２抗体に連結する。この実施態様の代表的なストレッチャーユニットは、式ＩＶで表され、Ｒ^{17}、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは前記に定義する通りである。

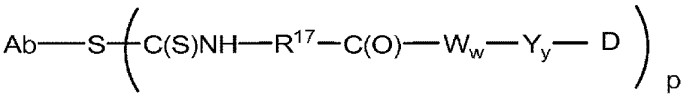


IV

さらに他の実施態様では、ストレッチャーの反応基は、抗体の遊離したシステインチオールと結合することができるチオール反応性の官能基を含む。チオール反応性の官能基の例には、限定するものではないが、マレイミド、α－ハロアセチル、活性エステル、例として、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、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸クロリド、塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートが含まれる。この実施態様の代表的なストレッチャーユニットは、式ＶａおよびＶｂに表され、このとき、－Ｒ^{17}－、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは前記に定義した通りである。



Va



Vb

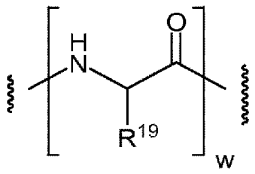
他の実施態様では、リンカーは、分岐した多機能性リンカー成分を介して一より多い薬剤成分を抗体へ共有結合的に付着させるために樹枝状型である(Sun等 (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215 ; Sun等 (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-176 ; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増やす、すなわち負荷することができ、これはＡＤＣの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は１つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。

【０２７４】

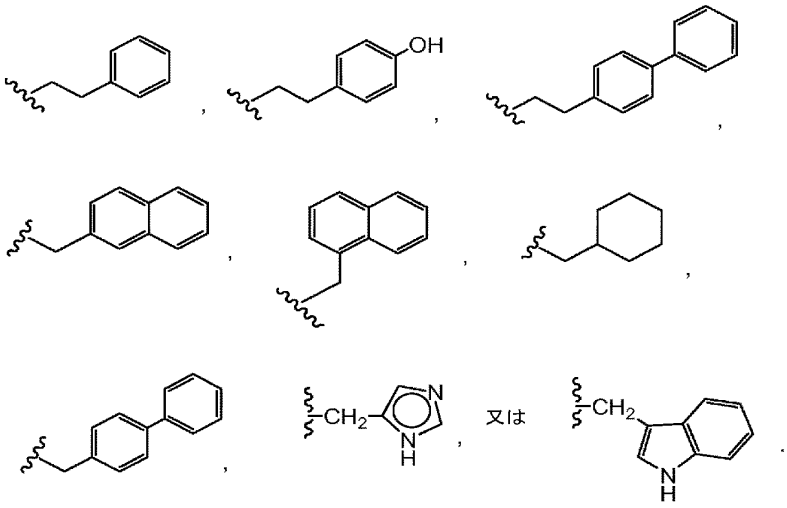
アミノ酸ユニット

リンカーはアミノ酸残基を含んでいてもよい。アミノ酸ユニット(-Ｗｗ-)は、存在する場合には、抗体(Ａｂ)を本発明のシステイン改変抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の薬剤成分(Ｄ)に連結する。

-Ｗｗ-は、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のユニットである。アミノ酸ユニットを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。各々の-Ｗ-ユニットはそれぞれ、以下の角括弧で示す式を有し、ｗは、０から１２の範囲の整数である。



このとき、Ｒ^{19}は、ヒドロゲン、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$_2$ＳＣＨ$_3$、-ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$、-ＣＨ$_2$ＣＯＯＨ、-ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$、-ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＯＨ、-(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣ(=ＮＨ)ＮＨ$_2$、-(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨ$_2$、-(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣＯＣＨ$_3$、-(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣＨＯ、-(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣ(=ＮＨ)ＮＨ$_2$、-(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨ$_2$、-(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣＯＣＨ$_3$、-(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣＨＯ、-(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$、-(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣＯＮＨ$_2$、-ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ(ＯＨ)ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$、2-pyridylmethyl-、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、



であり、
R^{19}が水素以外である場合に、R^{19}が付着される炭素原子はキラルである。R^{19}が付着される各々の炭素原子は、独立して(Ｓ)又は(Ｒ)配位又はラセミ混合物にある。したがって、アミノ酸ユニットは、鏡像異性的に純粋であるか、ラセミ性であるか、又はジアステレオ異性であってもよい。

【０２７５】

例示的な-Ｗｗ-アミノ酸ユニットには、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドが含まれる。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(ｖｃ又はｖａｌ-ｃｉｔ)、アラニン-フェニルアラニン(ａｆ又はａｌａ-ｐｈｅ)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(ｇｌｙ-ｖａｌ-ｃｉｔ)およびグリシン-グリシン-グリシン(ｇｌｙ-ｇｌｙ-ｇｌｙ)が含まれる。アミノ酸リンカーを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。

アミノ酸ユニットは、腫瘍関連プロテアーゼを含む一又は複数の酵素によって切断され、薬剤成分(-Ｄ)を遊離する。この薬剤成分は、一実施態様では、薬剤(Ｄ)を提供するために、放出時にインビボでプロトン化される。アミノ酸リンカー構成成分は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、Ｃ及びＤ、又はプラスミンプロテアーゼによって酵素的に切断されるために設定し、その選択性が最適化されうる。

【０２７６】

スペーサーユニット

スペーサユニット(-Ｙｙ-)は、存在する場合(ｙ＝１又は２)には、アミノ酸ユニットが存在する(ｗ＝１～１２)場合に、アミノ酸ユニット(-Ｗｗ-)を薬剤部分(Ｄ)に連結する。あるいは、アミノ酸ユニットがない場合には、スペーサーユニットはストレッチャーユニットを薬剤成分に連結する。アミノ酸ユニットおよびストレッチャーユニットがともにない(ｗ、ｙ＝０)場合には、スペーサーユニットも薬剤成分を抗体ユニットに連結する。スペーサーユニットは、自己犠牲型及び非自己犠牲型の２つの一般的なタイプである。非自己犠牲的なスペーサーユニットは、抗体-薬剤コンジュゲート又は薬剤成分-リンカーからアミノ酸ユニットが切断、特に酵素的に切断された後に、スペーサーユニットの一部ないしはすべてが薬剤成分に結合したままとなるものである。グリシン-グリシンスペーサーユニット又はグリシンスペーサーユニットを含むＡＤＣが腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ又はリンパ球関連プロテアーゼによって酵素切断される場合、グリシン-グリシン-薬剤成分又はグリシン-薬剤成分が$Ab-A_a-Ww-$から切断

される。一実施態様では、独立した加水分解反応が標的細胞の中で起こり、グリシン-薬剤成分の結合が切断され、薬剤が遊離される。

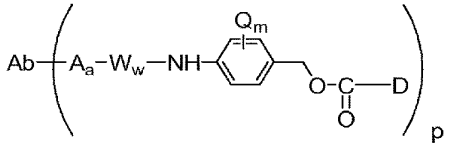
他の実施態様では、-Yy-は、フェニレン部分がQ_mに置換しているp-アミノベンジルカルバモイル(PAB)ユニットであり、このときQは-C_1-C_8アルキル、-O-(C_1-C_8アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、そして、mは0~4の範囲の整数である。

【0277】

非自己犠牲型スペーサーユニット(-Y-)の例示的な実施態様は、-Gly-Gly-、-Gly-、-Ala-Phe-、-Val-Cit-である。

一実施態様では、スペーサーユニットがない(y=0)、又は薬学的に許容可能な塩ないしはその溶媒和化合物である、薬剤成分-リンカー又はADCが提供される。

あるいは、自己犠牲的なスペーサーユニットを含むADCは-Dを放出しうる。一実施態様では、-Y-はPABグループのアミノ窒素原子を介して-Ww-に連結されるPABグループであり、カルボナート、カルバメートまたはエーテル基を介して-Dに直接連結しており、このときADCは以下のような例示的な構造を有する。

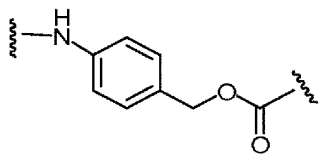


このとき、Qは、-C_1-C_8アルキル、-O-(C_1-C_8アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、mは0~4の範囲の整数であり、そして、pは1から4の範囲である。

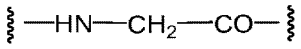
【0278】

自己犠牲的なスペーサーの他の例には、PABグループに電子的に類似している芳香族化合物、例として、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay等 (1999) Bioorg. Med. Chem Lett. 9:2237)、複素環式のPAB類似体(米国公開特許2005/0256030)、β-グルクロニド(国際公開2007/011968)、およびオルトないしはパラ-アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されるものではない。アミド結合加水分解の際に環化されるスペーサー、例として、置換した、及び、置換していない4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues等 (1995) Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]、及び、ビシクロ[2.2.2]環システム(Storm等 (1972) J. Amer. Chem Soc. 94: 5815)、及び2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry, 等 (1990) J. Org. Chem 55:5867)などが使われてもよい。また、グリシンで置換されるアミン含有薬剤の除去(Kingsbury等 (1984) J. Med. Chem 27:1447)は、ADCに有用な自己犠牲的スペーサーの例である。

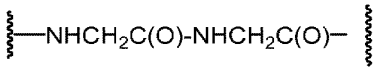
例示的なスペーサーユニット(-Yy-)を式X~XIIIに示す。



X



XI



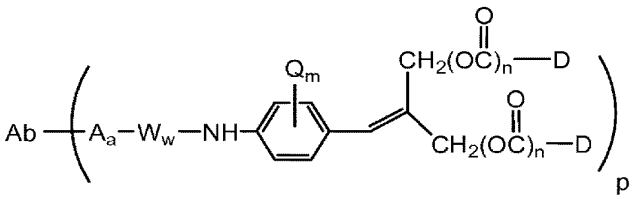
XII

【０２７９】

樹枝状リンカー

他の実施態様では、リンカーＬは、分岐状の、多機能リンカー成分により一又は複数の薬剤成分が抗体に共有結合するために樹枝型のリンカーであってもよい(Sun等（2002）Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun等（2003）Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増す、すなわち負荷することができ、これはＡＤＣの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は１つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。分岐状の、樹枝状リンカーの例示的な実施態様には、２，６-ビス(ヒドロキシメチル)-ｐ-クレゾールおよび２，４，６-トリス(ヒドロキシメチル)-フェノールデンドリマーユニット(国際公開２００４／０１９９３；Szalai等（2003）Ｊ．Amer．Chem Soc．125：15688-15689；Shamis等（2004）Ｊ．Amer．Chem Soc．126：1726-1731；Amir等（2003）Angew．Chem Int．Ed．42：4494-4499)が含まれる。

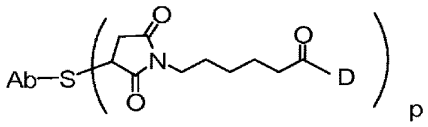
一実施態様では、スペーサーユニットは分岐状ビス(ヒドロキシメチル)スチレン(ＢＨＭＳ)であり、これを用いて複数の薬剤を取り込み、放出することができ、以下の構造を有し、



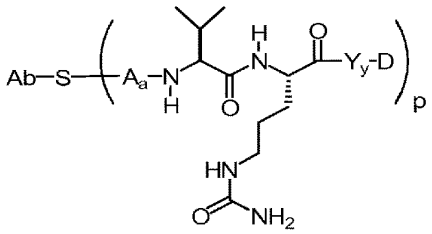
２-(4-アミノベンジリデン)プロパン１，３-ジオールデンドリマーユニットを含み(国際公開２００４／０４３４９３；de Groot等（2003）Angew．Chem Int．Ed．42：4490-4494)、Ｑは、-Ｃ$_1$-Ｃ$_8$アルキル、-Ｏ-(Ｃ$_1$-Ｃ$_8$アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、ｍは０～４の範囲の整数であり、ｎは０又は１であり、そして、ｐは１から４の範囲である。

【０２８０】

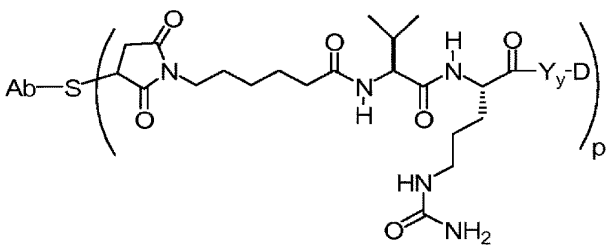
式Ｉの抗体-薬剤コンジュゲート化合物の例示的な実施態様には、ＸＩＩＩａ(ＭＣ)、ＸＩＩＩｂ(ｖａｌ-ｃｉｔ)、ＸＩＩＩｃ(ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ)、及びＸＩＩＩｄ(ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ)が含まれる。



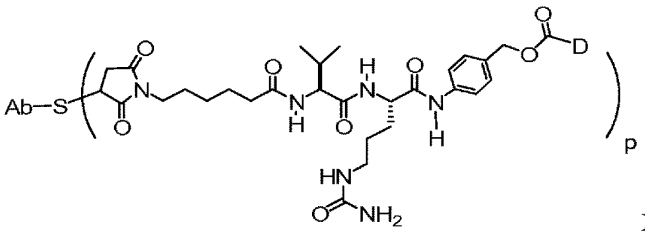
XIIIa



XIIIb



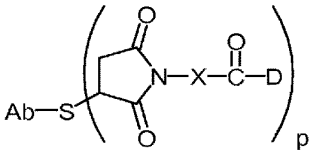
XIIIc



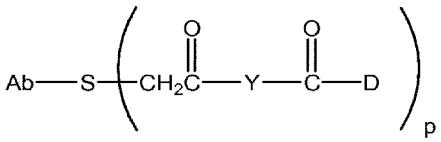
XIIId

【０２８１】

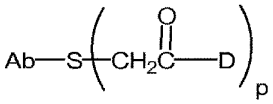
式Ｉａの抗体－薬剤コンジュゲート化合物の他の例示的な実施態様には、ＸＩＶａ－ｅが含まれる。



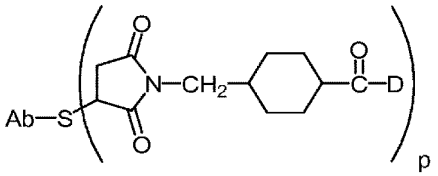
XIVa



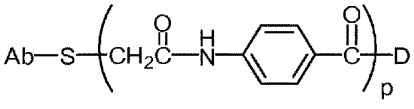
XIVb



XIVc

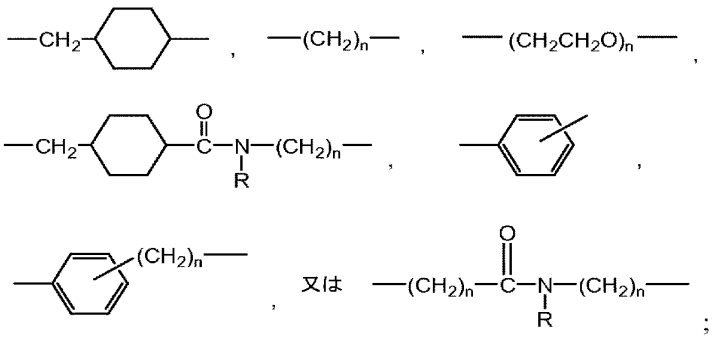


XIVd

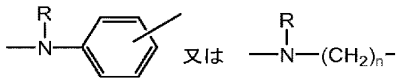


XIVe

このとき、Ｘは以下のものであり、



Ｙは以下の通りであり、



そして、Ｒはそれぞれ Ｈ 又は Ｃ$_1$ - Ｃ$_6$ アルキルであり、そして、ｎは１～１２である。

【０２８２】

他の実施態様では、リンカーは、抗体に存在する求電子性の基に反応することができる求核基を有する反応性の官能基を有する。抗体上の有用な求電子性の基は、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されるものではない。リンカーの求核基のヘテロ原子は抗体上の求電子性の基と反応して、抗体ユニットに共有結合することができる。リンカーの有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、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アリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定するものではない。抗体の求電子性の基は、リンカーへの付着に都合の良い部位を提供する。

一般的に、ペプチド - タイプのリンカーは、２以上のアミノ酸および / またはペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野では周知である液相合成方法(E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)に従って調製されうる。リンカー中間生成物は、スペーサー、ストレッチャーおよびアミノ酸ユニットを含む反応のいずれかの組合せ又は連続によってアセンブリされてもよい。スペーサー、ストレッチャー及びアミノ酸ユニットは、天然で求電子性、求核性、又は遊離の基である反応性官能基を用いうる。反応性官能基には、カルボキシル、ヒドロキシル、パラ-ニトロフェニルカルボネート、イソチオシアネート、及びＯ - メシル、Ｏ - トシル、 - Ｃｌ、 - Ｂｒ、 - Ｉなどの脱離基、又はマレイミドが含まれるが、これらに限定されるものではない。

他の実施態様では、リンカーは、溶解性又は反応性を変更した基に置換されてもよい。例えば、ＡＤＣを調製するために用いる合成手段に応じて、スルホン酸(- ＳＯ$_3^-$)又はアンモニウムなどの荷電性の置換基は、試薬の水溶性を増し、抗体又は薬剤成分とリンカー試薬とのカップリング反応を容易にしうるか、またはＤとＡｂ - Ｌ(抗体 - リンカー中間生成物)とのカップリング反応、又はＡｂとＤ - Ｌ(薬剤 - リンカー中間生成物)とのカップリング反応を容易にしうる。

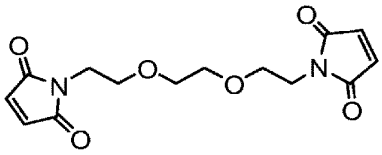
【０２８３】

リンカー試薬

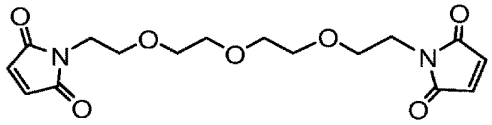
抗体とアウリスタチンとのコンジュゲートは、種々の二官能性リンカー試薬、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、スクシンイミジ

ル-４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシラート(ＳＭＣＣ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-２,６-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、１,５-ジフルオロ-２,４-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。

また、抗体薬剤コンジュゲートは、以下のリンカー試薬、ＢＭＰＥＯ、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ-ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ-ＥＭＣＳ、スルホ-ＧＭＢＳ、スルホ-ＫＭＵＳ、スルホ-ＭＢＳ、スルホ-ＳＩＡＢ、スルホ-ＳＭＣＣ、およびスルホ-ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ(スクシンイミジル-(４-ビニルスルホン)ベンゾアート)、及びビスマレイミド試薬、例えばＤＴＭＥ、ＢＭＢ、ＢＭＤＢ、ＢＭＨ、ＢＭＯＥ、ＢＭ(ＰＥＯ)３、及びＢＭ(ＰＥＯ)４にて調製されうる。これらはPierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, International +815-968-0747から市販されている。ビスマレイミド試薬により、連続した様式又は同時の様式で、チオール含有薬剤成分、標識又はリンカー中間生成物にシステイン改変抗体のチオール基が付着することができる。システイン改変抗体、薬剤成分、標識又はリンカー中間生成物のチオール基と反応することができるマレイミド以外の他の官能基には、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネートおよびイソチオシアネートが含まれる。



$BM(PEO)_3$



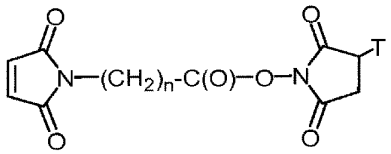
$BM(PEO)_4$

【０２８４】

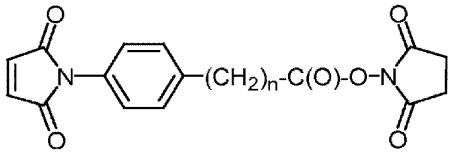
また、有用なリンカー試薬は、Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)などの他の商業的供給源により得ることができるし、Toki等 (2002) J. Org. Chem 67:1866-1872；Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem 60:5352-5355；Frisch等 (1996) Bioconjugate Chem 7:180-186；米国特許第６２１４３４５号；国際公開０２／０８８１７２；米国特許公開２００３１３０１８９；米国特許公開２００３０９６７４３；国際公開０３／０２６５７７；国際公開０３／０４３５８３；及び国際公開０４／０３２８２８に記載の手段に従って合成してもよい。

【０２８５】

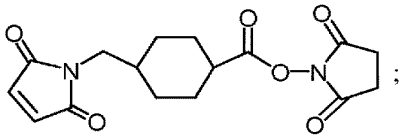
式(ＩＩＩａ)のストレッチャーは、以下のリンカー試薬をアミノ酸ユニットのＮ末端と反応させることによって、リンカーに導入することができる。

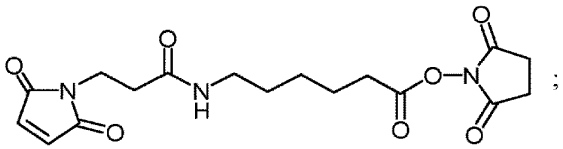


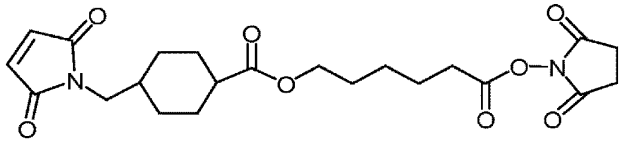
このときｎは１～１０の範囲の整数であり、Ｔは－Ｈ又は－ＳＯ3Ｎａであり、

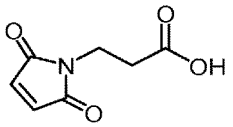


このときｎは０～３の範囲の整数である。

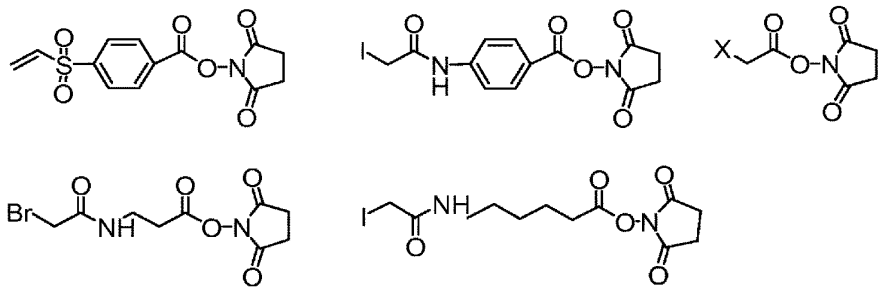

;


;


；及び


.

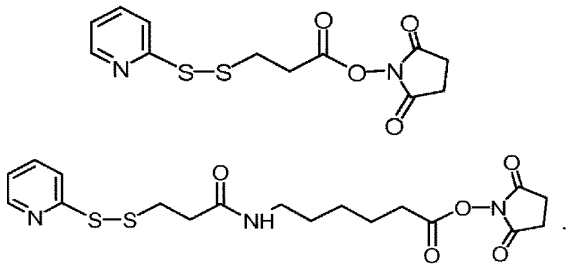
ストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬をアミノ酸ユニットのＮ末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。



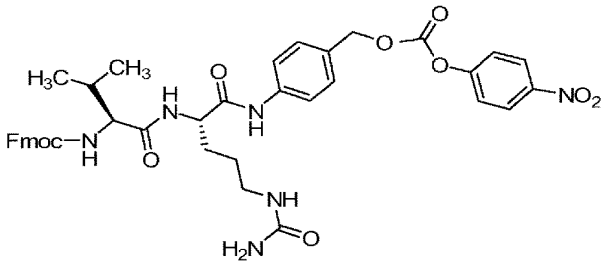
このときＸはＢｒ又はＩである。

【０２８６】

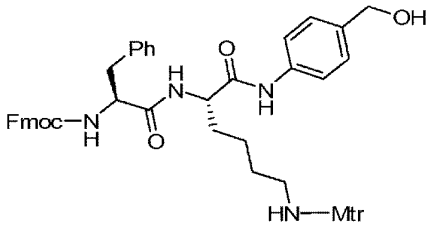
また、式のストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬をアミノ酸ユニットのＮ末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。



OnCusp
Ex. 1002

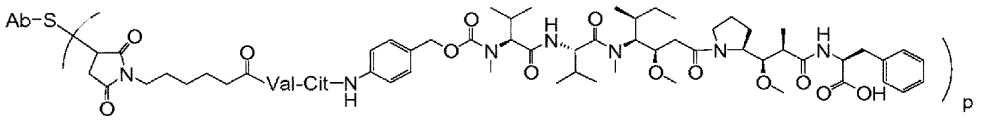


マレイミドストレッチャーユニットとＰＡＢ自己-犠牲的スペーサーユニットとを有する例示的なｐｈｅ-ｌｙｓ(Ｍｔｒ、モノ-4-メトキシトリチル)ジペプチドリンカー試薬は、Dubowchik,等（1997）Tetrahedron Letters, 38:5257-60に従って調製されてもよく、以下の構造を有する。

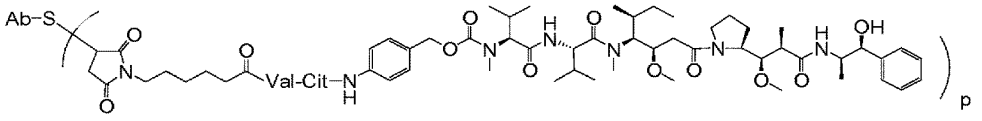


【０２８８】

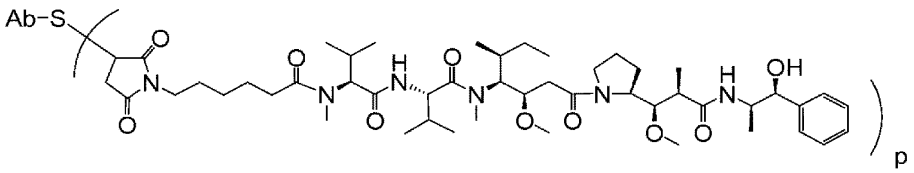
本発明の例示的な抗体-薬剤コンジュゲート化合物には、以下のものが含まれる。



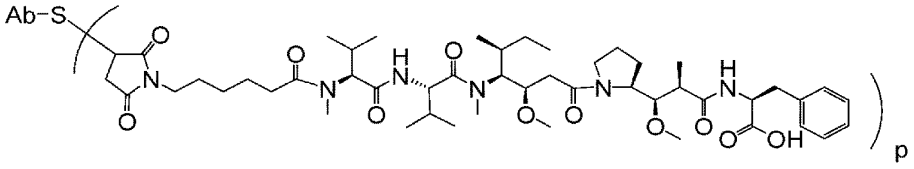
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

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はシステイン改変抗ＣＤ２２抗体である。

【０２８９】

システイン改変抗ＣＤ２２抗体－薬剤コンジュゲートの調製

式ＩのＡＤＣは、当業者に公知の有機化学的反応、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) システイン改変抗体のシステイン基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって抗体－リンカー中間生成物Ａｂ－Ｌを形成させ、その後に薬剤成分Ｄと反応させる、及び(2) 薬剤成分の求核基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって薬剤－リンカー中間生成物Ｄ－Ｌを形成させ、その後にシステイン改変抗体のシステイン基と反応させる、などによって調製されてもよい。コンジュゲート方法(1)及び(2)は、様々なシステイン改変抗体、薬剤成分及びリンカーを用いて行い、式Ｉの抗体－薬剤コンジュゲートを調製してもよい。

抗体システインチオール基は求核基であり、反応して、リンカー試薬及び薬剤－リンカー中間生成物の求電子基と共有結合することができる。このリンカー試薬及び薬剤－リンカー中間生成物には、(i) 活性エステル類、例えばＮＨＳエステル類、ＨＯＢｔエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物、(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類、(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、及び(iv) スルフィド交換による、ピリジルジスルフィドを含むジスルフィドが含まれる。薬剤成分の求核基には、リンカー成分及びリンカー試薬の求電子基と共有結合するために反応することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０２９０】

システイン改変抗体は、ＤＴＴ(クリーランド試薬、ジチオトレイトール)又はＴＣＥＰ(トリス(２－カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド；Getz等 (1999) Anal. Biochem Vol 273: 73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)などの還元剤にて処理した後に、鎖間及び鎖内のジスルフィド結合を再形成させるために再酸化させることによって、リンカー試薬とのコンジュゲートに対して反応性にしてもよい(実施例ｘ)。例えば、ＣＨＯ細胞に発現される完全長のシステイン改変モノクローナル抗体(ＴｈｉｏＭａｂ)を、新たに導入したシステイン残基と培養培地中に存在するシステインとの間で形成しうるシステイ

ン付加物のジスルフィド結合を還元するために、およそ５０倍の過剰なＴＣＥＰにて３７℃で３時間かけて還元する。還元されたＴｈｉｏＭａｂを希釈して、１０ｍＭ 酢酸ナトリウム、ｐＨ５にてＨｉＴｒａｐ Ｓカラムに流し、０．３Ｍ 塩化ナトリウムを含むＰＢＳにて溶出する。希釈(２００ｎＭ)硫酸銅水($CuSO_4$)、室温に終夜置くことにより親Ｍａｂに存在するシステイン残基間にジスルフィド結合が再構築された。あるいは、デヒドロアスコルビン酸(ＤＨＡＡ)は、システイン付加物の還元分解反応の後にシステイン改変抗体の鎖内ジスルフィド基を再構築させるための有効な酸化体である。当分野で公知の他の酸化体、すなわち酸化剤および酸化条件が用いられてもよい。外気酸化も有効である。この低刺激性の部分的な再酸化工程により、高品位の鎖内ジスルフィドが効率よく形成され、新たに導入されたシステイン残基のチオール基が維持される。およそ１０倍過剰な薬剤-リンカー中間生成物、例えばＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥを添加し、混合して、室温におよそ１時間置いて、コンジュゲートに作用させ、１０Ｆ４ｖ３抗ＣＤ２２抗体-薬剤コンジュゲートを形成させた。コンジュゲート混合物をゲル濾過し、ＨｉＴｒａｐ Ｓカラムに流して溶出させ、過剰な薬剤-リンカー中間生成物と他の不純物を除去した。

【０２９１】

図１２は、コンジュゲートのために細胞培養物から発現されるシステイン改変抗体を調製するための一般的な方法を示す。細胞培養培地にシステインを含む場合、新たに導入されたシステインアミノ酸と培地のシステインとの間にジスルフィド付加物が形成しうる。これらのシステイン付加物(図１２の例示的なＴｈｉｏＭａｂ(左)に○で示す)は、コンジュゲートのために反応するシステイン改変抗体を生成するために還元されなければならない。システイン付加物は、おそらく様々な鎖間ジスルフィド結合とともに、ＴＣＥＰなどの還元剤によって抗体の還元型を生じさせるために、還元により切断される。対形成したシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、ＤＨＡＡ又は周囲酸素への曝露による不完全酸化条件下で再形成される。新たに導入され、改変され、対形成しないシステイン残基は、リンカー試薬や薬剤-リンカー中間生成物と反応して本発明の抗体コンジュゲートを形成するために利用されうる状態にある。哺乳類の細胞株において発現されるＴｈｉｏＭａｂは、-Ｓ-Ｓ-結合形成によって外部からコンジュゲートされた改変ＣｙｓへのＣｙｓ付加物となる。したがって、精製されたＴｈｉｏＭａｂを、実施例Ｘに記載の還元及び再酸化の手順にて処理して、反応性のＴｈｉｏＭａｂｓを生産する。これらのＴｈｉｏＭａｂを用いて、細胞障害性剤、蛍光体および他の標識を含むマレイミドとコンジュゲートさせる。

【０２９２】

スクリーニング方法

本発明の更なる他の実施態様は、ＣＤ２２ポリペプチドを含むと思われる試料においてＣＤ２２ポリペプチドの存在を決定する方法であって、ＣＤ２２ポリペプチドに結合するシステイン改変抗ＣＤ２２抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートに該試料を曝し、システイン改変抗ＣＤ２２抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートの該試料中のＣＤ２２ポリペプチドへの結合を決定することを含み、この結合が存在する場合に該試料においてＣＤ２２ポリペプチドの存在が示される方法に関する。場合によって、前記試料は、ＣＤ２２ポリペプチドを発現すると思われる細胞(癌細胞でもよい)を含みうる。前記方法に用いられるシステイン改変抗ＣＤ２２抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートは、場合によって、検出可能に標識されても、固体支持体に付着されなどしていてもよい。

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、(a)該哺乳動物から得た組織細胞を含む試験試料を、ＣＤ２２ポリペプチドに結合するシステイン改変抗ＣＤ２２抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートと接触させ、(b)試験試料中において、システイン改変抗ＣＤ２２抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートとＣＤ２２ポリペプチドとの複合体の形成を検出することを含み、複合体が形成される場合に該哺乳動物での腫瘍の存在が示される方法に関する。場合によって、システイン改変抗ＣＤ２２抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートは、検出可能に標識されるか、固体支持体に付着されなどし、及び/又は組織細胞の試験試料は癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。

【０２９３】

抗体-薬剤コンジュゲートの代謝産物

代謝産物が先行技術に対して新規性及び非自明性を有する限りにおいて、本明細書中に記載のＡＤＣ化合物のインビボ代謝産物も、本発明の権利内である。このような生成物は、投与された化合物の、例えば酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素切断などから生じうる。したがって、本発明は、代謝産物が生じるために十分な時間、本発明の化合物を哺乳動物と接触させることを含む方法によって生成される新規の自明でない化合物を包含する。

典型的には、代謝産物は、放射性標識した(例えば^{14}Ｃ又は^{3}Ｈ)ＡＤＣを調製して、ラット、マウス、モルモット、サルなどの動物又はヒトに検出可能な用量(例えば、およそ０．５ｍｇ／ｋｇ以上)で非経口投与し、代謝が生じるために十分な時間(典型的にはおよそ３０秒から３０時間)をおいて、尿、血液又は他の生体試料から変換生成物を単離することによって同定される。標識されているので、これら生成物は容易に単離される(他のものは、代謝産物中に残っているエピトープを結合することができる抗体を用いて単離される)。代謝産物の構造は従来の様式、例えばＭＳ、ＬＣ／ＭＳ又はＮＭＲ分析によって決定される。通常、当分野の技術者に周知の従来の薬物代謝研究と同じ方法で代謝産物の分析が行われる。インビボで見られない限り、変換生成物は本発明のＡＤＣ化合物の治療的投薬のための診断検査法において有用である。

【０２９４】

薬学的製剤

Ｔｈｉｏ-抗体薬剤コンジュゲートを含む抗体-薬剤コンジュゲートの投与

ｔｈｉｏ-抗体薬剤コンジュゲート(ＴＤＣ)を含む本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、治療される症状に適切な任意の手段によって投与されてもよい。典型的にＡＤＣは、非経口的に、すなわち注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、くも膜下腔内および硬膜外投与される。

これらの癌を治療するために、一実施態様では、抗体-薬剤コンジュゲートは静脈内注入により投与される。注入により投与される用量は、１用量当たりおよそ１μｇ／ｍ２からおよそ１００００μｇ／ｍ^{2}の範囲で、一般に週１回、合計１、２、３又は４回の用量である。あるいは、用量範囲は、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ１０００μｇ／ｍ^{2}、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ８００μｇ／ｍ^{2}、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ６００μｇ／ｍ^{2}、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ４００μｇ／ｍ^{2}、およそ１０μｇ／ｍ^{2}からおよそ５００μｇ／ｍ^{2}、およそ１０μｇ／ｍ^{2}からおよそ３００μｇ／ｍ^{2}、およそ１０μｇ／ｍ^{2}からおよそ２００μｇ／ｍ^{2}、およびおよそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ２００μｇ／ｍ^{2}である。投薬は、１日１回、１週間に１回、１週間に複数回(１日１回より少ない)、１か月に複数回(１日１回より少ない)、１か月に複数回(１週間に１回より少ない)、１か月に１回又は疾患の症状が寛解又は緩和するように間欠的に投与されてもよい。投与は、腫瘍又はリンパ腫の症状、治療される白血病が寛解するまで開示したいずれかの間隔で継続されてもよい。このような寛解又は軽減がこのような継続的な投与によって延長される症状の寛解又は軽減が達成される後に、投与を続けてもよい。

【０２９５】

また、本発明は、自己免疫性疾患に罹っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれか一のヒト化10Ｆ4抗体-薬剤コンジュゲートを投与することを含む、自己免疫性疾患の緩和方法を提供する。好ましい実施態様では、抗体は、静脈内または皮下に投与される。抗体-薬剤コンジュゲートは１用量につきおよそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲の用量で静脈内投与され、そして具体的な実施態様では、用量は１μｇ／ｍ^{2}からおよそ５００μｇ／ｍ^{2}である。投薬は、１日１回、１週間に１回、１週間に複数回(１日１回より少ない)、１か月に複数回(１日１回より少ない)、１か月に複数回(１週間に１回より少ない)、１か月に１回又は疾患の症状が寛解又は緩和するように間欠的に投与されてもよい。投与は、治療される自己免疫性疾患の症状が寛解又は緩和するまで開示したいずれかの間隔で継続されてもよい。このような寛解又は軽減がこのような継

続的な投与によって延長される症状の寛解又は軽減が達成される後に、投与を続けてもよい。

また、本発明は、Ｂ細胞増殖性疾患(リンパ腫及び白血病を含むがこれらに限定するものではない)又は自己免疫性疾患などのＢ細胞疾患を患っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれか一に記載のヒト化１０Ｆ４抗体であって、細胞障害性分子や検出可能な分子にコンジュゲートされていない抗体を投与することを含むＢ細胞疾患の治療方法を提供する。抗体は一般的に、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ１０００ｍｇ／ｍ^{2}の用量範囲で投与されるであろう。

【０２９６】

一態様では、本発明はさらに、少なくとも一の本発明の抗ＣＤ２２抗体及び／又は少なくとも一のこのイムノコンジュゲート及び／又は少なくとも一の本発明の抗ＣＤ２２抗体-薬剤コンジュゲートを含有する薬学的製剤を提供する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1) 抗ＣＤ２２抗体及び／又は抗ＣＤ２２抗体-薬剤コンジュゲート及び／又はこのイムノコンジュゲートと、2) 薬学的許容性のある担体とを含有する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1) 抗ＣＤ２２抗体及び／又はこのイムノコンジュゲートと、場合によって2) 少なくとも一の付加的治療剤とを含有する。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲート又は本発明の抗体-薬剤コンジュゲートを含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体又は抗体-薬剤コンジュゲートと、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))、水溶液又は凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３-ペンタノール；及びｍ-クレゾール)；低分子量(約１０残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Ｚｎ-タンパク質複合体)；及び／又はTWEEN^{TM}、PLURONICS^{TM}又はポリエチレングリコール(ＰＥＧ)等の非イオン性界面活性剤を含む。インビボ投与に用いられる薬学的製剤は一般に滅菌されている。これは滅菌濾過メンブレンによる滅菌によって容易に達成される。

【０２９７】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルションに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(２-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、Ｌ-グルタミン酸とγ エチル-Ｌ-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-

グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT™(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を１００日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体ないしイムノコンジュゲートが体内に長時間残ると、３７℃の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間Ｓ-Ｓ結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

【０２９８】

抗体-薬剤コンジュゲート治療

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)を用いて、例えば腫瘍抗原の過剰発現に特徴がある様々な疾患ないしは疾病を治療することが考慮される。例示的な症状又は過剰増殖性疾患には、良性ないし悪性の腫瘍；白血病およびリンパ系の悪性腫瘍が含まれる。他には、神経系、神経膠、星状性、視床下部、腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性、胚盤胞性、炎症性、血管形成性、及び、自己免疫性を含む免疫性の疾患が含まれる。

動物モデルおよび細胞に基づくアッセイにおいて同定されるＡＤＣ化合物はさらに、腫瘍を有する高次霊長類及びヒトの臨床試験で試験されうる。ヒトの臨床試験は、Ｂ細胞増殖性疾患、例えば限定するものではないが、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を経験する患者において、本発明の抗ＣＤ２２モノクローナル抗体ないしイムノコンジュゲートの有効性を試験するために設定されうる。臨床試験は、公知の治療的投薬計画、例えば放射線および/または公知の化学療法剤および/または細胞障害性剤を伴う化学療法と組み合わせてＡＤＣの有効性を評価するように設定されてもよい。

【０２９９】

通常、治療される疾患ないし疾病は、過剰増殖性疾患、例えばＢ細胞増殖性疾患および/またはＢ細胞癌である。本明細書中で治療される癌の例には、限定するものではないが、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Ｂ細胞増殖性疾患が含まれる。

癌はＣＤ２２発現細胞を含んでおり、本発明のＡＤＣは癌細胞に結合することが可能である。癌のＣＤ２２発現を決定するために、様々な診断用/予後用のアッセイが利用できる。一実施態様では、ＣＤ２２過剰発現はＩＨＣによって分析されてもよい。腫瘍生検のパラフィン包埋組織切片はＩＨＣアッセイに用い、試験した腫瘍細胞の割合や染色の程度に関して、ＣＤ２２タンパク質染色強度判定基準に照らし合わせてもよい。

【０３００】

疾患の予防又は治療のために、ＡＤＣの好適な用量は、上記のように、治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、分子を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。分子は一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約１μｇ/ｋｇ～１５ｍｇ/ｋｇ(例えば０．１～２０ｍｇ/ｋｇ)の分子が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初回候補用量である。ある典型的な１日量は、上記の要因に応じて、約１μｇ/ｋｇ～約１００ｍｇ/ｋｇ以上の範囲であろう。患者に投与されるＡＤＣの例示的な用量は、およそ０．１からおよそ１０ｍｇ/患者体重ｋｇの範囲である。

症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。例示的な用量投薬計画は、およそ４ｍｇ／ｋｇの初回負荷投与量の後に、およそ２ｍｇ／ｋｇの抗ＥｒｂＢ２抗体の維持用量を毎週投与することを含む。他の投与計画が有用でもよい。この治療の経過は従来技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

【０３０１】

併用療法

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、薬学的組合せ製剤又は併用療法としての用量投薬計画において、抗癌性質を有する第二の化合物を組み合わされてもよい。薬学的併用製剤又は用量投薬計画の第二の化合物は、それらが互いに悪影響を与えないように、併用のＡＤＣに対して相補的な活性を有するのが好ましい。

第二の化合物は、化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、増殖阻害性剤、抗ホルモン剤および／または心臓保護剤であってもよい。このような分子は、意図する目的のために有効である量で好適に組み合わされる。また、本発明のＡＤＣを含有する製薬的組成物は、治療的に有効な量の化学療法剤、例えばチューブリン形成インヒビター、トポイソメラーゼインヒビター又はＤＮＡ結合剤を有してもよい。

一態様では、第一の化合物は本発明の抗ＣＤ２２　ＡＤＣであり、第二の化合物は抗ＣＤ２０抗体(ネイキッド抗体ないしはＡＤＣ)である。一実施態様では、第二の化合物は、抗ＣＤ２０抗体リツキシマブ(リツキサン(登録商標))又は２Ｈ７(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)である。本発明の抗ＣＤ２２　ＡＤＣとの併用免疫療法に有用な他の抗体には、抗ＶＥＧＦ(例えば、アバスチン(登録商標))が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【０３０２】

他の治療的投薬計画は、放射線療法および／または骨髄および末しょう血液移植、および／または細胞障害性剤、化学療法剤又は増殖阻害性剤を含むがこれらに限定されない本発明に従って同定される抗癌剤の投与と組み合わされてもよい。前記のうちの一実施態様では、化学療法剤は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン(オンコビン^{TM})、プレドニゾロン、ＣＨＯＰ、ＣＶＰないしはＣＯＰ、又は抗ＣＤ２０(例えばリツキサン(登録商標))ないしは抗ＶＥＧＦ(例えばアバスチン(登録商標))などの免疫治療法などの薬剤又は薬剤の組合せである。併用療法は同時又は連続的な投薬計画として投与されてもよい。連続して投与される場合、組合せは２以上の投与で投与されてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の製薬的製剤を用いての同時投与や、いずれかの順序での連続投与が含まれ、このとき、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間があるのが好ましい。

一実施態様では、ＡＤＣによる治療は、本明細書において同定される抗癌剤、および異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害性剤の併用投与を伴う。化学療法剤には、タキサン(例えばパクリタキセルおよびドセタキセル)および／またはアンスラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤のための調製や投薬計画は、製造業者の指示に従って使われてもよいし、又は経験的に熟練した専門家によって測定されうる。このような化学療法の調製や投薬計画は、"Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.にも記載される。

【０３０３】

前記いずれかの同時投与される薬剤の好適な用量は現在用いられている通りでもよいし、新規に同定される薬剤と他の化学療法剤ないしは治療の組み合わされる作用(相乗)に応じて低くしてもよい。

併用療法により「相乗効果」が生じ得、「相乗的」、すなわち、同時に用いた活性成分が別々に該化合物を用いて生じる効果の合計よりも多い場合に生じる効果が生じうる。活性成分が、(1) 組み合わせた単位用量製剤に同時に製剤化され、投与されるか、又は同時に送達される場合、(2) 別々の製剤として交互に又は同時に送達される場合、または、(3

)いくつかの他の投薬計画によってなされる場合に、相乗効果が達成されうる。交替療法で送達される場合、例えば異なる注射器での異なる注入によって、化合物が投与されるかまたは順次送達される場合に、相乗効果が達成されてもよい。通常は、交替療法の間、各々の活性成分の有効用量は順次、すなわち連続的に投与されるのに対して、併用療法では、２以上の活性成分の有効用量は一緒に投与される。

【０３０４】

抗体－薬剤コンジュゲートの代謝産物

代謝産物が先行技術に対して新規性及び非自明性を有する限りにおいて、本明細書中に記載のＡＤＣ化合物のインビボ代謝産物も、本発明の権利内である。このような生成物は、投与された化合物の、例えば酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素切断などから生じうる。したがって、本発明は、代謝産物が生じるために十分な時間、本発明の化合物を哺乳動物と接触させることを含む方法によって生成される新規の自明でない化合物を包含する。

典型的には、代謝産物は、放射性標識した(例えば^{14}Ｃ又は^{3}Ｈ)ＡＤＣを調製して、ラット、マウス、モルモット、サルなどの動物又はヒトに検出可能な用量(例えば、およそ０．５ｍｇ／ｋｇ以上)で非経口投与し、代謝が生じるために十分な時間(典型的にはおよそ３０秒から３０時間)をおいて、尿、血液又は他の生体試料から変換生成物を単離することによって同定される。標識されているので、これら生成物は容易に単離される(他のものは、代謝産物中に残っているエピトープを結合することができる抗体を用いて単離される)。代謝産物の構造は従来の様式、例えばＭＳ、ＬＣ／ＭＳ又はＮＭＲ分析によって決定される。通常、当分野の技術者に周知の従来の薬物代謝研究と同じ方法で代謝産物の分析が行われる。インビボで見られない限り、変換生成物は本発明のＡＤＣ化合物の治療的投薬のための診断検査法において有用である。

【０３０５】

抗ＣＤ２２抗体及びイムノコンジュゲートの更なる使用方法

診断法と検出の方法

一態様では、本発明の抗ＣＤ２２抗体及びイムノコンジュゲートは、生体試料中のＣＤ２２の存在を検出するために有用である。本明細書中で用いる「検出する」なる用語は、定量的又は定性的な検出を包含する。ある実施態様では、生体試料は、細胞又は組織を含む。ある実施態様では、このような組織には、他の組織、例えばＢ細胞及び／又はＢ細胞関連組織と比較して高いレベルでＣＤ２２を発現する正常及び／又は癌性組織が含まれる。

一態様では、本発明は、生体試料中のＣＤ２２の存在を検出する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、ＣＤ２２への抗ＣＤ２２抗体の結合に許容される条件下で抗ＣＤ２２抗体と生体試料を接触させ、抗ＣＤ２２抗体とＣＤ２２との間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。

【０３０６】

一態様では、本発明は、ＣＤ２２の発現増加と関係している疾患を診断する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、抗ＣＤ２２抗体と試験細胞を接触させ、ＣＤ２２への抗ＣＤ２２抗体の結合を検出することによって試験細胞によるＣＤ２２の発現レベル(量的に又は質的に)を測定し、そして、試験細胞によるＣＤ２２の発現レベルをコントロール細胞(例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞、又はこの正常細胞と同等のレベルでＣＤ２２を発現する細胞)によるＣＤ２２の発現レベルと比較することを含み、コントロール細胞と比べて試験細胞によるＣＤ２２の発現レベルが高い場合にＣＤ２２の発現の増加に関連する細胞増殖性疾患の存在が示される。ある実施態様では、試験細胞は、ＣＤ２２の発現の増加に関連する疾患があると疑われる患者から得られる。ある実施態様では、前記疾患は、癌又は腫瘍などの細胞増殖性疾患である。

本発明の抗体を用いて診断されうる例示的な細胞増殖性疾患には、Ｂ細胞疾患及び／又はＢ細胞増殖性疾患、例として限定するものではないが、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ＮＨ

Ｌ、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が含まれる。

【０３０７】

ある実施態様では、上記のような診断ないし検出の方法は、表面にＣＤ２２を発現する細胞から得た膜調製物中又は細胞の表面において発現されるＣＤ２２に対する抗ＣＤ２２抗体の結合を検出することを含む。ある実施態様では、前記方法は、ＣＤ２２への抗ＣＤ２２抗体の結合に許容される条件下で抗ＣＤ２２抗体と細胞を接触させ、抗ＣＤ２２抗体と細胞表面上のＣＤ２２との間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。細胞の表面上に発現されたＣＤ２２への抗ＣＤ２２抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは「ＦＡＣＳ」アッセイである。

ある他の方法は、ＣＤ２２に対する抗ＣＤ２２抗体の結合を検出するために用いてもよい。前期の方法には、限定するものではないが、当分野で周知である抗原-結合アッセイ、例えばウェスタンブロット、放射性免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡ(抗体結合免疫吸着検定)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインＡイムノアッセイ、及び免疫組織化学(ＩＨＣ)が含まれる。

ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は標識される。標識には、限定するものではないが、直接検出される標識又は分子(例えば、蛍光、発色、高電子密度、化学発光、及び放射性標識)、並びに、例えば酵素反応又は分子相互作用によって間接的に検出される酵素ないしはリガンドなどの分子が含まれる。例示的な標識には、限定するものではないが、放射性同位体である^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ及び^{131}Ｉ、フルオロフォア、例えば希有土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第４７３７４５６号)、ルシフェリン、２,３-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、西洋わさびペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-６-リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環のオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、ＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ又はマイクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために水素ペルオキシダーゼを用いる酵素とカップリングさせたもの、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離基などが含まれる。

【０３０８】

ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は不溶性基質に固定される。固定化は、溶液中で遊離したままであるいずれかのＣＤ２２から抗ＣＤ２２抗体を分離することを伴う。これは従来、水不溶性基質ないしは表面に吸着させる(Bennich等, 米国特許第３７２７６０号)又は共有的にカップリングさせる(例えば、グルタールアルデヒド架橋結合を使用する)などしてアッセイ手順の前に抗ＣＤ２２抗体を不溶化するか、又は抗ＣＤ２２抗体とＣＤ２２との複合体の形成の後に、例えば免疫沈降によって抗ＣＤ２２抗体を不溶化することによって達成される。

診断ないし検出の上記いずれかの実施態様は、抗ＣＤ２２抗体の代わりに、ないしは抗ＣＤ２２抗体に加えて本発明のイムノコンジュゲートを用いて行われうる。

【０３０９】

治療法

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えばインビトロ、エクスビボ、及びインビボの治療法で使われてもよい。一態様では、本発明は、ＣＤ２２へのイムノコンジュゲートの結合が許容される条件下で抗ＣＤ２２抗体ないしはそのイムノコンジュゲートに細胞を曝すことを含む、インビボ又はインビトロでの細胞の成長ないしは増殖を阻害するための方法を提供する。「細胞成長又は増殖を阻害する」ことは、細胞の成長ないしは増殖を少なくとも１０%、２０%、３０%、４０%、５０%、６０%、７０%、８０%、９

０％、９５％又は１００％低減することを意味し、細胞死を誘導することを含む。ある実施態様では、細胞は腫瘍細胞である。ある実施態様では、細胞はＢ細胞である。ある実施態様では、細胞は、例えば本明細書中に例示したような異種移植片である。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、Ｂ細胞増殖性疾患を治療するか又は予防するために用いる。ある実施態様では、細胞増殖性疾患は、ＣＤ２２の発現及び／又は活性の増加と関係している。例えば、ある実施態様では、Ｂ細胞増殖性疾患は、Ｂ細胞の表面上のＣＤ２２の発現増加と関係している。ある実施態様では、Ｂ細胞増殖性疾患は腫瘍又は癌である。本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートによって処置されるＢ細胞増殖性疾患の例には、限定するものではないが、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が含まれる。

【０３１０】

一態様では、本発明は、抗ＣＤ２２抗体ないしそのイムノコンジュゲートの有効量を個体に投与することを含むＢ細胞増殖性疾患を治療するための方法を提供する。ある実施態様では、Ｂ細胞増殖性疾患を治療するための方法は、抗ＣＤ２２抗体又は抗ＣＤ２２イムノコンジュゲートと、場合によって以下に挙げるような少なくとも一の付加的治療剤とを含有する薬学的製剤の有効量を個体に投与することを含む。ある実施態様では、細胞増殖性疾患を治療するための方法は、1) 抗ＣＤ２２抗体と細胞障害性剤とを含むイムノコンジュゲートと、場合によって2) 以下に挙げるような少なくとも一の付加的治療剤とを含有する薬学的製剤の有効量を個体に投与することを含む。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの少なくともいくつかは、ヒト以外の種のＣＤ２２を結合しうる。したがって、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えば、ＣＤ２２を含む細胞培養物において、ヒトにおいて、又は、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが交差反応するＣＤ２２を有する他の哺乳動物(例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス)においてＣＤ２２を結合するために用いてもよい。一実施態様では、抗ＣＤ２２抗体ないしイムノコンジュゲートは、イムノコンジュゲートのコンジュゲートした細胞毒素が細胞内部に送達するように、ＣＤ２２を抗体ないしイムノコンジュゲートと接触させて抗体ないしイムノコンジュゲート-抗原複合体を形成させることによってＢ細胞上のＣＤ２２をターゲティングするために使われてもよい。一実施態様では、ＣＤ２２はヒトＣＤ２２である。

【０３１１】

一実施態様では、抗ＣＤ２２抗体ないしイムノコンジュゲートは、個体のＣＤ２２が結合されるように抗体ないしイムノコンジュゲートを個体に投与することを含む、ＣＤ２２発現及び／又は活性の増加と関係する疾患を患っている個体において抗体を結合させるための方法に用いられうる。一実施態様では、結合した抗体ないしイムノコンジュゲートはＣＤ２２を発現するＢ細胞内に取り込まれる。一実施態様では、ＣＤ２２はヒトのＣＤ２２であり、個体はヒト個体である。あるいは、個体は、抗ＣＤ２２抗体が結合するＣＤ２２を発現している哺乳動物であってもよい。また更に、個体は、ＣＤ２２が(例えば、ＣＤ２２の投与によって、又はＣＤ２２をコードする導入遺伝子の発現によって)導入された哺乳動物であってもよい。

抗ＣＤ２２抗体ないしイムノコンジュゲートは、治療目的のためにヒトに投与されうる。さらに、抗ＣＤ２２抗体ないしイムノコンジュゲートは、獣医学の目的のため又はヒト疾患の動物モデルとして、抗体が交差反応するＣＤ２２を発現する非ヒト哺乳動物(例えば、霊長類、ブタ、ラット又はマウス)に投与されうる。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの治療有効性を評価するため(例えば、投与の用量及び時間経過の試験する)に有用となりうる。

【０３１２】

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが、治療において単独、又は他の組成物と組

み合わせて使われてもよい。例えば、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、少なくとも一の付加的治療剤及び／又はアジュバントと同時に投与されてもよい。ある実施態様では、付加的治療剤は、細胞障害性剤、化学療法剤又は増殖阻害性剤である。このような実施態様のうちの一つでは、化学療法剤は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン(オンコビンＴＭ)、プレドニゾロン、ＣＨＯＰ、ＣＶＰないしはＣＯＰ、又は抗ＣＤ２０(例えばリツキサン(登録商標))ないしは抗ＶＥＧＦ(例えばアバスチン(登録商標))などの免疫治療法などの薬剤又は薬剤の組合せであって、この併用療法は、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を含むＢ細胞増殖性疾患などの癌及び／又はＢ細胞疾患の治療に有用である。

【０３１３】

上記の併用治療には、併用投与(２以上の治療剤が同じか又は別の製剤に包含される)、及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは付加的治療剤及び／又はアジュバントの前、同時及び／又はその後に投与することができる。また、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、放射線療法と組み合わせて使われてもよい。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、及び鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体ないしイムノコンジュゲートを、特に抗体ないしイムノコンジュゲートの用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかにある程度依存して、任意の好適な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって投与することができる。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、医学的実用性に合わせた様式で調製し、１回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体ないしイムノコンジュゲートとを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の抗体ないしイムノコンジュゲートの量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の１～９９％で、或いは経験的／臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

【０３１４】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの好適な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの一又は複数の他の付加的な治療剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体ないしイムノコンジュゲートのタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体ないしイムノコンジュゲートを予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体ないしイムノコンジュゲートへの応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体ないしイムノコンジュゲートは一時的又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ(例えば０．１ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ)の抗体ないしイムノコンジュゲートを、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量とすることができる。ある典型的な１日量は、上記の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体ないしイムノコンジュゲートの用量の例は、約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲であろう。ゆえに、約０．５ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇ又は１０ｍｇ／

ｋｇの抗体ないしイムノコンジュゲートの一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約２～約２０、例えば約6用量の抗体ないしイムノコンジュゲートが投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約４ｍｇ／ｋｇの初期負荷投与量の後、約２ｍｇ／ｋｇの毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

【０３１５】

アッセイ

本発明の抗ＣＤ２２抗体及びイムノコンジュゲートは、当分野で公知の様々なアッセイによって、それらの物理的／化学的な性質及び／又は生物活性について特徴付けされうる。

【０３１６】

活性アッセイ

一態様では、アッセイは、生物学的な活性を有する抗ＣＤ２２抗体ないしそのイムノコンジュゲートを同定するために提供される。生物学的な活性には、例えば、細胞成長又は増殖の阻害能(例えば「細胞殺傷」活性)、又はプログラムされた細胞死(アポトーシス)を含む細胞死誘導能が含まれうる。また、インビボ及び／又はインビトロでのこのような生物学的な活性を有する抗体ないしイムノコンジュゲートが提供される。

ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体又はそのイムノコンジュゲートは、インビトロでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。細胞成長又は増殖の阻害のためのアッセイは当分野で周知である。本明細中に記載の「細胞殺傷」アッセイにて例示した細胞増殖のためのあるアッセイは、細胞生存度を測定する。このようなあるアッセイは、Promega (Madison, WI)から市販されているCellTiter-Glo^{TM}発光細胞生存率アッセイである。このアッセイは、代謝活性のある細胞の指標であるＡＴＰの存在の量に基づいて生細胞数を決定する。Crouch等 (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第６６０２６７７号を参照。アッセイは、自動ハイスループットスクリーニング(ＨＴＳ)に用いられるように96-又は３８４-ウェルフォーマットで行ってもよい。Cree等 (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404を参照。アッセイ手順は、単一の試薬(ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ-Ｇｌｏ(登録商標)試薬)を直接培養細胞に加えることを伴う。この結果細胞溶解が生じ、ルシフェラーゼ反応によって生産される発光シグナルが生成される。この発光シグナルは、培養物中に存在する生細胞の数に直接比例している、ＡＴＰの存在の量に比例する。データは、ルミノメーター又はＣＣＤカメラ画像デバイスによって記録することができる。発光の結果は相対的な光の単位(ＲＬＵ)として表す。

【０３１７】

細胞増殖についての他のアッセイは「ＭＴＴ」アッセイであり、これは、ミトコンドリアレダクターゼによる3-(４,５-ジメチルチアゾール-２-イル)-２,５-ジフェニルテトラゾリウムブロマイドのホルマザンへの酸化を測定する比色アッセイである。CellTiter-GloTMアッセイのように、このアッセイは、細胞培養物に存在する代謝活性のある細胞の数を表す。例としてMosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63及びZhang等 (2005) Cancer Res. 65: 3877-3882を参照。

一態様では、抗ＣＤ２２抗体は、インビトロでの細胞死を誘導する能力について試験される。細胞死の誘導についてのアッセイは当分野で周知である。いくつかの実施態様では、このようなアッセイは、例えば、プロピジウムヨウ素(ＰＩ)トリパンブルー(Moore等 (1995) Cytotechnology, 17:1-11を参照)、又は7ＡＡＤの取り込みによって示される膜統合性の喪失を測定する。例示的なＰＩ取り込みアッセイでは、細胞は、１０％の熱不活性化ＦＢＳ(Hyclone)と２ｍＭのＬ-グルタミンを添加した、ダルベッコ変更イーグル培地(Ｄ-ＭＥＭ):ハムＦ-１２(５０:５０)中で培養する。したがって、このアッセイは、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で行う。１００×２０ｍｍのディッシュにディッシュ当たり３×１０^{6}の密度で細胞を播き、終夜接着させる。培地を取り除き、新鮮な培地の

み、又は様々な濃度の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。細胞を３日間インキュベートする。処置後、単層をＰＢＳにて洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、１２００ｒｐｍで４℃で５分間遠心して、ペレットを３ｍｌの冷却Ｃａ$^{2+}$結合バッファ(１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．４、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、２．５ｍＭ $CaCl_2$)に再懸濁し、細胞凝集塊を取り除くために３５ｍｍのストレーナーを取り付けた１２×７５ｍｍチューブ(チューブ当たり１ｍｌ、１処理群につき３チューブ)に分注する。次いで、チューブにＰＩ(１０μｇ／ｍｌ)を加える。試料は、ＦＡＣＳＣＡＮ^{TM}フローサイトメーター及びＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ^{TM}ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析される。次いで、ＰＩ取り込みによって定まる統計学的に有意なレベルの細胞死を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。

【０３１８】

一態様では、抗ＣＤ２２抗体ないしイムノコンジュゲートは、インビトロでのアポトーシス(プログラムされた細胞死)を誘導する能力について試験される。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの例示的なアッセイはアネキシン結合アッセイである。例示的なアネキシン結合アッセイでは、細胞を培養し、前段落で述べたようにディッシュに播く。培地を取り除き、新鮮培地のみ、又は０．００１～１０μｇ／ｍｌの抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。３日間のインキュベート後、単層をＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、細胞を遠心して、Ｃａ２＋結合バッファに再懸濁し、前段落で述べたようにチューブに分注する。その後、チューブに標識したアネキシン(例えばアネキシンＶ-ＦＩＴＣ)(１μｇ／ｍｌ)を加える。試料は、ＦＡＣＳＣＡＮ^{TM}フローサイトメーター及びＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ^{TM}ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア(BD Biosciences)を用いて分析される。次いで、コントロールと比べて統計学的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの他の例示的なアッセイは、ゲノムＤＮＡのヌクレオソーム間分解を検出するためのヒストンＤＮＡ ＥＬＩＳＡ比色アッセイである。このアッセイは、例えば細胞死検出ＥＬＩＳＡキット(Roche, Palo Alto, CA)を用いて行うことができる。

上記いずれかのインビトロアッセイに用いるための細胞には、天然でＣＤ２２を発現する又はＣＤ２２を発現するように操作された細胞ないしは細胞株が含まれる。このような細胞には、同じ細胞起源の正常細胞と比べてＣＤ２２を過剰発現する腫瘍細胞が含まれる。また、このような細胞には、ＣＤ２２を発現する細胞株(腫瘍細胞株を含む)や、正常にＣＤ２２を発現しないがＣＤ２２をコードする核酸を形質移入してある細胞株が含まれる。

【０３１９】

一態様では、抗ＣＤ２２抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビボでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビボでの腫瘍成長を阻害する能力について試験される。異種移植片モデルなどのインビボモデルシステムが前記の試験のために用いられうる。例示的な異種移植片システムでは、好適に免疫を低下させた非ヒト動物、例えばＳＣＩＤマウスにヒト腫瘍細胞が導入される。本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは動物に投与される。抗体ないしイムノコンジュゲートの腫瘍成長を阻害するか又は減少させる能力が測定される。上記の異種移植片システムのある実施態様では、ヒト腫瘍細胞はヒト患者の腫瘍細胞である。このような異種移植片モデルを調製するために有用な細胞には、ヒトの白血病およびリンパ腫細胞株が含まれ、これには、限定されるものではないが、ＢＪＡＢ-ｌｕｃ細胞(ルシフェラーゼレポーター遺伝子を形質移入したＥＢＶ陰性バーキットリンパ腫細胞株)、ラモス細胞(ATCC, Manassas, VA, CRL-1923)、ラージ細胞(ATCC, Manassas, VA, CCL-86)、ＳｕＤＨＬ-４細胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、ＤｏＨＨ2細胞(Kluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 5:221-224 (1991)およびKluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 8:1385-1391 (1994)を参照)、Ｇｒａｎｔａ-５１９細胞(Jadayel, D.M等, Leukemia 11(1): 64-72 (1997)を参照)が含まれる。ある実施態様では、皮下

投与や、哺乳動物の脂肪体などの好適な部位に移植することによって好適に免疫を低下させた非ヒト動物にヒト腫瘍細胞を導入する。

【０３２０】

結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、抗ＣＤ２２抗体はその抗原結合活性について試験される。例えば、ある実施態様では、抗ＣＤ２２抗体は、細胞の表面に発現されるＣＤ２２に結合する能力について試験される。ＦＡＣＳアッセイが前記の試験に用いられてもよい。

一態様では、競合アッセイを用いて、ＣＤ２２への結合についてマウス１０Ｆ４．４．１抗体、ヒト化１０Ｆ４ｖ１抗体、ヒト化１０Ｆ４ｖ３抗体及び／又はマウス５Ｅ８．１．８抗体と競合するモノクローナル抗体を同定してもよい。ある実施態様では、前記の競争する抗体は、マウス１０Ｆ４．４．１抗体、ヒト化１０Ｆ４ｖ１抗体、ヒト化１０Ｆ４ｖ３抗体及び／又はマウス５Ｅ８．１．８抗体が結合する同じエピトープ(例えば線形又は立体のエピトープ)に結合する。例示的な競合アッセイには、限定するものではないが、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)に挙げられるものなどの常套的アッセイが含まれる。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)のMorris (1996) "Epitope Mapping Protocols,"に示される。２つの抗体のそれぞれが５０％以上他の結合をブロックする場合、これらの抗体は同じエピトープに結合すると言える。

【０３２１】

例示的な競合アッセイでは、固定されたＣＤ２２は、ＣＤ２２に結合する第一標識抗体(例えばマウス１０Ｆ４．４．１抗体、ヒト化１０Ｆ４ｖ１抗体、ヒト化１０Ｆ４ｖ３抗体及び／又はマウス５Ｅ８．１．８抗体)と、ＣＤ２２への結合について第一抗体と競合する能力について試験されている第二非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートされる。二次抗体はハイブリドーマ上清に存在してもよい。コントロールとして、固定したＣＤ２２を第一標識抗体を含むが第二非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートする。ＣＤ２２への第一抗体の結合に許容される条件下でのインキュベートの後、過剰な結合していない抗体を取り除き、固定されたＣＤ２２と結合している標識の量を測定する。固定されたＣＤ２２と結合している標識の量がコントロール試料と比較して試験試料において実質的に減少している場合、二次抗体がＣＤ２２への結合について第一抗体と競合していることが示唆される。ある実施態様では、固定されたＣＤ２２は、細胞の表面上に、又はその表面上にＣＤ２２を発現する細胞から得た膜調製物中に存在する。

一態様では、精製した抗ＣＤ２２抗体はさらに、限定するものではないが、Ｎ末端配列決定法、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィ(ＨＰＬＣ)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィ及びパパイン消化を含む、一連のアッセイによって特徴付けることができる。

【０３２２】

一実施態様では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を有する変更された抗体を考慮し、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、更に特定のエフェクター機能(補体又はＡＤＣＣなど)が不要又は有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施態様では、抗体のＦｃ活性を測定して、所望の特性だけが維持されていることを確認する。インビボ及び／又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、ＣＤＣ及び／又はＡＤＣＣ活性の減少／枯渇を確認することができる。例えば、Ｆｃレセプター(ＦｃＲ)結合アッセイを行って、抗体がＦｃγＲ結合を欠損している(すなわちＡＤＣＣ活性を欠損していると思われる)が、ＦｃＲｎ結合能は維持していることを確認することができる。ＡＤＣＣを仲介する第一細胞であるＮＫ細胞は、ＦｃγＲIIIのみを発現し、その一方で単核細胞はＦｃγＲＩ、ＦｃγＲII及びＦｃγＲIIIを発現する。造血系細胞でのＦｃＲ発現については、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のＡＤＣＣ活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第５５００３６２号又は同第５８２１３３７号に記載されてい

る。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(ＰＢＭＣ)及びナチュラルキラー(ＮＫ)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のＡＤＣＣ活性は、例えばClynes 等のPNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルにおいてインビボに評価することができる。また、Ｃ１ｑ結合アッセイを行って、抗体がＣ１ｑに結合できない、つまりＣＤＣ活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, Ｊ. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載のように、ＣＤＣアッセイを行ってもよい。また、ＦｃＲｎ結合及びインビボクリアランス/半減期測定を、当分野で公知の方法を用いて行うことができる。

【実施例】

【０３２３】

以下は本発明の方法および組成物の例である。前述の一般的な記載から、様々な他の実施態様が実施されうることが理解されるであろう。

【０３２４】

実施例１：マウス抗ヒトＣＤ２２モノクローナル抗体の調製

ヒトＣＤ２２を特異的に結合することができるマウスモノクローナル抗体を調製した。６週齢のＢＡＬＢ/ｃ雌マウスの足蹠に、ドメイン３及び４を欠く精製したヒトＣＤ２２ｈｉｓ-８タグ化細胞外ドメイン(配列番号：３０(ＥＣＤ)＋Ｃ末端の配列GRAHHHHHHHH)又はドメイン１-７を含むＣＤ２２ ｈｉｓ-８タグ化細胞外ドメイン(配列番号：２８(ＥＣＤ)＋上記のＨｉｓ配列タグ)にＲｉｂｉのアジュバントを含むものを投与して免疫化した。初回免疫化の１週間及び３週間後に同じ様式で投与を行った。最終投与の３日後、鼠径部及び膝窩部のリンパ節を取り出して回収し、組織をスティールガーゼに通して単細胞懸濁液を作製した。細胞を、５０％ｗ/ｖポリエチレングリコール４０００を含む高グルコース(ＤＭＥＭ)中でＰ３Ｘ６３-Ａｇ８.６５３(ＡＴＣＣ ＣＲＬ １５８０)などのマウス骨髄腫と４：１の比で融合させた。ついで、融合した細胞を９６ウェル組織培養プレートのウェルに2×10^5の濃度で播いた。２４時間後にＨＡＴ選択培地(ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン、Sigma, #H0262)を添加した。融合の１５日後、酵素結合免疫吸着検定法(ＥＬＩＳＡ)を用いて、成長している細胞の上清をヒトＣＤ２２に特異的な抗体の存在下において試験した。

マウス抗ヒトＣＤ２２ １０Ｆ４.４.１(ｍｕ １０Ｆ４)及び５Ｅ８.１.８(ｍｕ ５Ｅ８)モノクローナル抗体を、細胞ベースのアッセイに基づく更なる試験と抗体がヒトＣＤ２２に特異的に結合することを示すプレートアッセイのために選別した。以降の段落にアッセイを記載する。

ＥＬＩＳＡベースのアッセイ：ＥＬＩＳＡによる抗ＣＤ２２抗体のスクリーニングは以下の通りに行い、すべてのインキュベートは室温で行った。試験プレート(Nunc Immunoplate)を精製したＣＤ２２を含む５０ｍＭ 炭酸ナトリウムバッファ，ｐＨ９.６にて２時間コートし、その後、０.５％ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(ＰＢＳ)にて３０分間ブロックし、その後０.０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ(ＰＢＳＴ)にて４回洗浄した。試験抗体上清を添加して、振とうしながら２時間インキュベートし、その後ＰＢＳＴにて４回洗浄した。２５ｍｌのリン酸クエン酸バッファ，ｐＨ５.０中に１０ｍｇのｏ-フェニレンジアミンジヒドロクロライド(Sigma, #P8287)と１０μｌの３０％過酸化水素溶液を含む溶液を１００μｌ/ウェル添加して１５分間インキュベートしてプレートを反応させる。２.５Ｍ 硫酸を１００μｌ/ウェル添加して反応を止める。自動ＥＬＩＳＡプレート読み取り機にてプレートの４９０ｎｍの吸光度を読み取ってデータを得る。

【０３２５】

実施例２：抗ヒトＣＤ２２モノクローナル抗体(ＭＡｂ)の分析のためのＦＡＣＳに基づくアッセイ

表面上にヒトＣＤ２２を発現するＣＨＯ細胞を、抗ＣＤ２２ハイブリドーマ上清を含む１００μｌのＦＡＣＳバッファ(０.１％ ＢＳＡ、１０ｍＭ アジ化ナトリウムを含むＰＢＳ，ｐＨ７.４)とともに４℃で３０分間インキュベートした後、ＦＡＣＳバッファにて１回洗浄した。一定量の抗体/細胞混合物を、ポリクローナルＦＩＴＣコンジュゲートヤギ

ないしウサギの抗マウスＩｇＧ(Accurate Chem Co., Westbury, NY)(マウス試験抗体用)又はヤギないしウサギの抗ヒトＩｇＧ(ヒト化抗体用)とともに４℃で３０分間インキュベートした後にＦＡＣＳバッファにて３回洗浄して、抗ＣＤ２２結合の量を決定した。

【０３２６】

実施例３：ヒト化抗ＣＤ２２抗体の調製

高頻度可変領域(ＨＶＲ)アミノ酸残基(相補性決定領域又はＣＤＲと交換可能に称される)を部位特異的突然変異誘発(Kunkel等, Methods Enzymol. (1987), 154:367-382)によって改変して、ヒト化１０Ｆ４抗体をヒト化１０Ｆ４ｖ１及びヒト化１０Ｆ４ｖ２の２つの変異体(それぞれ「１０Ｆ４ｖ１」、「ｈｕ１０Ｆ４ｖ１」、「１０Ｆ４ｖ２」又は「ｈｕ１０Ｆ４ｖ２」とも称される)に生成した。本明細書中に開示したいくつかの研究に用いた第三のバージョンであるヒト化１０Ｆ４ｖ３(「１０Ｆ４ｖ３」又は「ｈｕ１０Ｆ４ｖ３」)は、ｈｕ１０Ｆ４ｖ２と同じ成熟タンパク質の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を有するが、タンパク質発現に用いたベクターに含まれるシグナル配列が異なる。

マウス１０Ｆ４抗体のヒト化を本明細書中に開示するように行った。簡単に言うと、マウス１０Ｆ４の軽鎖及び重鎖の高頻度可変領域を改変したコンセンサスフレームワーク配列内にクローニングし、図２Ａ及び図２Ｂに示す軽鎖及び重鎖の可変領域アミノ酸配列を生成した。本発明の抗体のフレームワーク配列として用いうるオルタナティブな軽鎖及び重鎖のフレームワーク配列を図３及び図４に示す。

基本的にはLee等, J. Mol. Biol. 340:1073-93 (2004)に記載のように、ｐｈｏＡプロモーターの制御下に２つのオープンリーディングフレームを有する一価のＦａｂ-ｇ３ディスプレイベクター(ｐＶ０３５０-２Ｂ)ファジミドを、１０Ｆ４抗体のヒト化に用いた。第一のオープンリーディングフレームには、アクセプター軽鎖配列のＶＬ及びＣＨ１ドメインに融合したタンパク質分泌のための大腸菌熱安定ＳＴIIシグナル配列が含まれる。第二のオープンリーディングフレームには、アクセプター重鎖配列のＶＨ及びＣＨ１ドメインに融合したＳＴIIシグナル配列とその後ろに切断型微量ファージコートタンパク質Ｐ３が含まれる。

【０３２７】

マウス１０Ｆ４のＶＨドメイン及びＶＬドメイン(それぞれ配列番号：８９及び９０)をヒトサブグループIIIコンセンサスＶＨ(ｈｕIII)ドメイン(配列番号：２４)及びヒトコンセンサスκＩ(ｈｕＫＩ)ドメイン(配列番号：２５)とそれぞれ配列比較した。マウス抗ヒトＣＤ２２ ＭＡｂ １０Ｆ４の高頻度可変領域(ＨＶＲ、本明細書中では相補性決定領域(ＣＤＲ)と交換可能に称される)のアミノ酸配列を以下のようにコンセンサスフレームワーク配列内に挿入した。ｍｕ１０Ｆ４抗体の軽鎖ＨＶＲ(ＨＶＲ-Ｌ１(カバット位２４-３４)、ＨＶＲ-Ｌ２(カバット位５０-５６)、及びＨＶＲ-Ｌ３(カバット位８９-９７))を、ヒトκＩ(ｈｕＫＩ)コンセンサス配列抗体フレームワーク内に改変して、ヒト化１０Ｆ４ｖ１軽鎖(配列番号：１７、図２Ｂ)を生成した。ｍｕ１０Ｆ４抗体の重鎖ＨＶＲ(ＨＶＲ-Ｈ１(カバット位２６-３５)、ＨＶＲ-Ｈ２(カバット位４９-６５)、及びＨＶＲ-Ｈ３(カバット位９５-１０２))を、ｈｕmIII配列と３つの位置が異なる(Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及びＬ７８Ａ)(Carter等I, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)を参照)改変したヒトサブグループIII(ｈｕmIII)コンセンサスＶＨドメイン内に改変して、ヒト化１０Ｆ４ｖ１重鎖可変領域(配列番号：１６、図２Ａ)を生成した。アクセプターフレームワーク内へのＨＶＲの遺伝子改変は、各高頻度可変領域用の異なるオリゴヌクレオチドを用いたキュンケル突然変異誘発によって行った。各クローンの配列は標準的なＤＮＡ配列決定技術によって決定した。図２Ａ及び２Ｂに示す高頻度可変領域とフレームワーク領域はカバット番号付けに従って番号を付けた(上掲のKabat等 (1991))。軽鎖及び重鎖を配列決定し、ｈｕＫＩ、ｈｕｍＩＩＩ、マウス１０Ｆ４、ヒト化１０Ｆ４ｖ１ 及びヒト化１０Ｆ４ｖ２の可変領域(ＨＶＲ及びフレームワーク領域(ＦＲ)を含む)のアミノ酸配列を図２Ａ及び２Ｂに示す。ヒト化１０Ｆ４ｖ３抗体は１０Ｆ４ｖ２と同じアミノ酸配列である。

抗体、抗体断片、ＶＬドメイン又はＶＨドメインのアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を、当分野で公知の様々な方法によって調製する。これらの方法には、限定するも

のではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗体、抗体断片、ＶＬドメイン又はＶＨドメインの変異体ないしは非変異体の、オリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製が含まれる。例えば、キュンケル法を用いた変異アミノ酸を有するアミノ酸置換のために、ＶＨ内、場合によって一又は複数のＣＤＲ内のＶＬの利用可能なアミノ酸位置をターゲットとすることによってライブラリを作製することができる。例えば、Kunkel等, Methods Enzymol. (1987), 154:367-382及び本明細書中の実施例を参照のこと。また、ランダム化配列の生成も以下の実施例に記載する。

【０３２８】

オリゴヌクレオチド配列は、本発明のポリペプチドのＣＤＲ(ＨＶＲ)又はＦＲ領域の特定の位置に対して設定されたコドンセットの一又は複数を含む。コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。コドンセットは、ＩＵＢコードによって下で示すように、特定のヌクレオチドまたはヌクレオチドの等モル混合物を示すために符号を使って表される。

ＩＵＢコード
Ｇ　グアニン
Ａ　アデニン
Ｔ　チミン
Ｃ　シトシン
Ｒ（ＡまたはＧ）
Ｙ（ＣまたはＴ）
Ｍ（ＡまたはＣ）
Ｋ（ＧまたはＴ）
Ｓ（ＣまたはＧ）
Ｗ（ＡまたはＴ）
Ｈ（ＡまたはＣまたはＴ）
Ｂ（ＣまたはＧまたはＴ）
Ｖ（ＡまたはＣまたはＧ）
Ｄ（ＡまたはＧまたはＴ）Ｈ
Ｎ（ＡまたはＣまたはＧまたはＴ）

【０３２９】

例えば、コドンセットＤＶＫでは、ＤはヌクレオチドＡまたはＧまたはＴであり、ＶはＡまたはＧまたはＣであり、ＫはＧまたはＴである。このコドンセットは１８個の異なるコドンを表し、アミノ酸Ａｌａ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｙｓ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｓｅｒ、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、ＧｌｙおよびＣｙｓをコードすることができる。

オリゴヌクレオチドまたはプライマーのセットは、標準の方法を使って合成できる。一組のオリゴヌクレオチドは、例えば、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを代表し、所望のアミノ酸群をコードする配列を含む固相法によって合成することができる。ある位置での選ばれたヌクレオチド「縮退」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。そのようなある種のコドンセットを有しているヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー（Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能）を使って合成することができ、または市販品を入手することができる（例えば、Life Technologies, Rockville, MDから）。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明で使用されるように、オリゴヌクレオチドは可変ドメイン核酸鋳型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、クローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

【０３３０】

１つの方法では、変異体アミノ酸をコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチドが媒介

する突然変異誘発によって作製することができる。この手法はZoller等, Nucleic Acids Res. 10: 6487-6504頁(1987)が記載しているように、当技術分野で公知である。つまり、変異体アミノ酸をコードしている核酸配列は所望のコドンセットをコードしているオリゴヌクレオチドセットをＤＮＡ鋳型とハイブリダイズすることによって作製され、前記鋳型は可変部核酸鋳型配列を含むプラスミドの一本鎖型である。ハイブリダイゼーションの後、ＤＮＡポリメラーゼを用いて鋳型の二次相補鎖すべてを合成し、この相補鎖はオリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、前記オリゴヌクレオチドセットによって提供されるコドンセットを含むようになる。

通常、長さが少なくとも２５ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが使われる。最適オリゴヌクレオチドは、突然変異体をコードするヌクレオチドの両側が鋳型と完全に相補性である１２から１５個のヌクレオチドを持つ。これにより、オリゴヌクレオチドが正しく一本鎖ＤＮＡ鋳型分子にハイブリダイズするようになる。オリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知の手法、例えばCrea等, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75: 5765頁(1978)に記載の手法を使って容易に合成される。

【０３３１】

ＤＮＡ鋳型はバクテリオファージＭ１３ベクター（市販のＭ１３ｍｐ１８およびＭ１３ｍｐ１９ベクターが適当）に由来するベクター、またはViera等, Meth. Enzymol. 153: 3頁(1987)に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきＤＮＡは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの１つに挿入することができる。一本鎖鋳型の生産は、上掲Sambrook等のセクション４．２１～４．４１で記載されている。

天然のＤＮＡ配列を変えるために、オリゴヌクレオチドが適当なハイブリダイゼーション条件の下で一本鎖鋳型にハイブリダイズされる。ＤＮＡ重合酵素、通常、Ｔ７ＤＮＡポリメラーゼまたはＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片を次に加え、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを使って鋳型の相補鎖を合成する。こうしてＤＮＡの１つの鎖は遺伝子１の突然変異した形態をコードし、他の鎖（元の鋳型）は遺伝子１の未変性、未変更の配列をコードするようにヘテロ二本鎖分子が形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞、通常大腸菌ＪＭ１０１のような原核生物に形質転換される。細胞を増殖させた後にアガロースプレートの上へプレートし、突然変異したＤＮＡを含む細菌コロニーを同定するために３２リン酸塩で放射性標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使ってスクリーニングする。

【０３３２】

上記の方法は、プラスミドの両方の鎖が突然変異を含むホモ二本鎖分子が作製されるように修正することができる。この修正は以下の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチドを先に述べたように一本鎖鋳型にアニールする。３つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン（ｄＡＴＰ）、デオキシリボグアノシン（ｄＧＴＰ）およびデオキシリボチミジン（ｄＴＴ）の混合物を、ｄＣＴＰ-（ａＳ）と呼ばれる修飾されたチオデオキシリボシトシン（Ａｍｅｒｓｈａｍから入手できる）と合わせる。この混合物を鋳型-オリゴヌクレオチド複合体に加える。ＤＮＡポリメラーゼをこの混合物へ追加すると、突然変異した塩基以外は鋳型と同一のＤＮＡ鎖が生成する。さらに、この新しいＤＮＡ鎖はｄＣＴＰの代わりにｄＣＴＰ-（ａＳ）を含み、これはＤＮＡ鎖を制限酵素による消化作用から保護するのに役立つ。二本鎖ヘテロ二本鎖の鋳型鎖に適当な制限酵素でニックを入れた後、突然変異を起こさせる部位を含む領域の後方で鋳型鎖はＥｘｏＩＩＩヌクレアーゼまたは適当な他のヌクレアーゼで消化することができる。反応を終了すると、部分的にだけ一本鎖の分子が残る。次に、完全な二本鎖ＤＮＡホモ二本鎖が、４つのデオキシリボヌクレオチド三燐酸のすべて、ＡＴＰおよびＤＮＡリガーゼの存在下でＤＮＡポリメラーゼを使って形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞に形質転換することができる。

前に示したように、オリゴヌクレオチドセットの配列の長さは鋳型核酸にハイブリダイズするために十分な長さであり、また、必須ではないが制限部位を含むこともできる。Ｄ

ＮＡ鋳型はバクテリオファージＭ１３ベクターに由来するベクター、またはVi era等((1987), Meth. Enzymol. 153: 3頁)に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきＤＮＡは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの１つに挿入する必要がある。一本鎖鋳型の生産は、上掲Sambrook等のセクション４．２１～４．４１で記載されている。

【０３３３】

他の方法によると、ライブラリーは上流および下流のオリゴヌクレオチドセットを提供することによって生成することができ、各セットは、オリゴヌクレオチドの配列内で提供されたコドンセットによって確立された異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを持つ。上流および下流のオリゴヌクレオチドセットは、可変ドメイン鋳型核酸配列と共に、ＰＣＲ産物の「ライブラリー」を作製するためにＰＣＲ法で使うことができる。ＰＣＲ産物は確立された分子生物学的手法を使って他の関連した、または無関係な核酸配列、例えばウイルスのコートタンパク質構成成分および二量体化ドメインと融合することができるので、「核酸カセット」と呼ぶこともある。

オリゴヌクレオチドセットは、核酸カセットを作製するための鋳型として可変ドメイン核酸鋳型配列を使ってＰＣＲ法で使うことができる。可変ドメイン核酸鋳型配列は、対象核酸配列（すなわち、置換の対象となるアミノ酸をコードしている核酸配列）を含む免疫グロブリンの軽鎖または重鎖のいかなる部分でもよい。可変ドメイン核酸鋳型配列は、第１の核酸鎖および相補性の第２の核酸鎖を有する二本鎖ＤＮＡ分子の一部である。可変ドメイン核酸鋳型配列は、少なくとも可変ドメインの一部を含み、また少なくとも１つのＣＤＲを持つ。場合によっては、可変ドメイン核酸鋳型配列は複数のＣＤＲを含む。可変ドメイン核酸鋳型配列の上流部および下流部は、上流域のオリゴヌクレオチドセットおよび下流域のオリゴヌクレオチドセットの構成メンバーによるハイブリダイゼーションの対象とすることができる。

【０３３４】

上流のプライマーセットの第１のオリゴヌクレオチドは第１の核酸鎖にハイブリダイズすることができ、下流のプライマーセットの第２のオリゴヌクレオチドは第２の核酸鎖にハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドプライマーは１つまたは複数のコドンセットを含むことができ、可変部核酸鋳型配列の一部にハイブリダイズするように設計することができる。これらのオリゴヌクレオチドの使用により、ＰＣＲ後に２つ以上のコドンセットをＰＣＲ産物（すなわち核酸カセット）に導入することができる。抗体可変ドメインをコードしている核酸配列の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーは、アミノ酸置換の対象となるＣＤＲ残基をコードする部分を含む。

上流域および下流域のオリゴヌクレオチドセットは、オリゴヌクレオチド配列内に制限部位を含むように合成することもできる。これらの制限部位は、さらなる抗体配列を有している発現ベクターへの核酸カセット（すなわちＰＣＲ反応生成物）の挿入を容易にする。一実施態様では、制限部位は外来の核酸配列を導入することなく、または元のＣＤＲまたはフレームワーク核酸配列を取り除くことなく核酸カセットのクローニングを容易にするようになっている。

【０３３５】

核酸カセットは、ＰＣＲ反応によって作製した対象アミノ酸置換を含む軽鎖または重鎖の配列の一部またはすべての発現のために、いかなる適当なベクターにもクローニングすることができる。本発明で詳述される方法によると、核酸カセットはウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合した軽鎖または重鎖配列の一部またはすべて（すなわち、融合タンパク質を形成）の生産を可能にしているベクターにクローニングされるか、あるいは、粒子または細胞の表面で提示される。数種類のベクターが入手でき、それらは本発明の実施に用いることができるが、ファージミドベクターが本明細書での使用には好ましいベクターであり、その訳はそれらが相対的に容易に構築し、また容易に増幅することができるからである。当業者に公知のように、ファージミドベクターは、通常、プロモーター、シグナル配列、表現型選択遺伝子、複製起点部位および他の必要な構成成分を含む

様々な構成成分を含む。

特定の変異体アミノ酸の組合せが発現される場合、核酸カセットは、重鎖または軽鎖の可変ドメインのすべてまたは一部をコードすることができ、また変異体アミノ酸の組合せをコードすることができる配列を含む。ライブラリーの場合のようにこれらの変異体アミノ酸または変異体アミノ酸の組合せを含んでいる抗体の作製のために、核酸カセットは、さらなる抗体配列、例えば軽鎖および重鎖可変部の可変または定常ドメインのすべてまたは一部を含んでいる発現ベクターに挿入することができる。これらのさらなる抗体配列は他の核酸配列、例えばウイルスコートタンパク質をコードする配列と融合することができ、したがって融合タンパク質の生産を可能にする。

【０３３６】

実施例４：可変領域配列決定

マウス及びヒト化１０Ｆ４モノクローナル抗体の核酸及びアミノ酸配列は標準的な手順によって決定した。全ＲＮＡは、RNeasy(登録商標) Mini Kit (Qiagen, Germany)を用いてマウス抗ヒトＣＤ２２ １０Ｆ４．４．１モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽鎖(ＶＬ)及び可変重鎖(ＶＨ)ドメインを変性プライマーによるＲＴ-ＰＣＲを用いて増幅した。フォワードプライマーは抗体のＶＬ及びＶＨ領域のＮ末端アミノ酸配列に特異的とした。それぞれ、軽鎖及び重鎖のリバースプライマーは、種間で高度に保存されている定常軽鎖(ＣＬ)及び定常重鎖ドメイン１(ＣＨ１)の領域にアニールするように設定した。増幅したＶＨ及びＶＬをｐＲＫ哺乳動物細胞発現ベクターにクローニングした(Shields等, Ｊ. Biol. Chem 276:659-04 (2000))。インサートのポリヌクレオチド配列を常法の配列決定法を用いて決定した。マウスキメラ１０Ｆ４及びヒト化１０Ｆ４ｖ１及びヒト化１０Ｆ４ｖ２軽鎖及び重鎖の可変領域のアミノ酸配列を図２Ａ及び２Ｂに示す。

ヒト化１０Ｆ４ｖ１のＨＶＲ-Ｌ１位置２８(Ｎ２８)をさらに改変した(配列番号：９)(図２Ｂを参照)。この位置のアスパラギン残基をバリン残基に置き換え(Ｎ２８Ｖ)、ｈｕ１０Ｆ４ｖ２及びｈｕ１０Ｆ４ｖ３変異体用のＨＶＲ-Ｌ１(配列番号：１０)を生成した。これらは改善した結合親和性を示した。これらの変異体は同じ可変ドメイン配列と成熟抗体の定常ドメイン配列を含み、本発明の成熟抗体には見られないシグナル配列のみが異なる。

【０３３７】

ｈｕ１０Ｆ４ｖ１のＨＶＲ-Ｌ１高頻度可変領域のアミノ酸Ａｓｎ２８(Ｎ２８)及び/又はＡｓｎ３０(Ｎ３０)のいずれか又は両方に、更なるアミノ酸配列改変を行った(図２Ｂを参照)。Ｎ２８及びＮ３０は脱アミノ化の候補部位であるので、これらの部位でのアミノ酸変化を試験した。例えば、位置２８のアスパラギン(Ｎ２８)をＡ、Ｑ、Ｓ、Ｄ、Ｖ又はＩに選択的に置換し、位置３０のアスパラギン(Ｎ３０)をＡ又はＱに選択的に置換した。本発明に係るＨＶＲ-Ｌ１ドメイン内のアミノ酸配列変化は、標準的な手順を用いてファージＥＬＩＳＡアッセイ(ＩＣ５０)の競合分析によって試験した結合親和性とともに、表２に示す。

表２　ｈｕ１０Ｆ４ｖ１抗体の置換変異

HVR-L1の アミノ酸変化 図2B	HVR-L1 配列番号	結合親和性 (nM)
変化なし (N28, N30)	9	8
N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7.3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12
N28V, N30	10	7.3
N28I, N30	23	9.8
N28, N30A	32	7.7
N28, N30Q	33	10

【０３３８】
ヒト化１０Ｆ４抗体の完全長ヒトＩｇＧ１バージョンの生成のために、重鎖及び軽鎖を前記のｐＲＫプラスミドに別々にサブクローニングする(Gorman, C.M等 (1990), DNA Protein Eng. Tech. 2: 3)。効率の良い手順(Graham等, supra & Gorman, C.M, Science 221: 551)を用いて、適切な重鎖及び軽鎖のプラスミド(所望の配列変化(一又は複数)に応じて)を２９３(Graham, F.L.等 (1977), J. Gen. Virol. 36: 59)として知られるアデノウイルス形質転換ヒト胚性腎細胞株に同時に形質移入する。培地を無血清に換えて、５日まで毎日回収する。プロテインＡ-セファロースＣＬ-４Ｂ(Pharmacia)を用いて集めた上清から抗体を精製する。溶出した抗体のバッファをＧ２５ゲル濾過によってＰＢＳに交換し、Ｃｅｎｔｒｉｐｒｅｐ-３０又はＣｅｎｔｒｉｃｏｎ-１００(Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮し、４℃に保存する。抗体の濃度は全ＩｇＧ-結合ＥＬＩＳＡを用いて決定する。
本発明に係る例示的な重鎖ＩｇＧ１定常ドメインを図５Ａに示す。例示的なヒト軽鎖κ定常ドメインは、例えばRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号：３７）を含む。ｈ１０Ｆ４ｖ２の完全長アミノ酸配列を図５Ｂに示し、この軽鎖及び重鎖の定常領域を下線で示す。ｈ１０Ｆ４ｖ１、ｖ２及びｖ３抗体はＩｇＧ１アイソタイプである。
【０３３９】
抗ＣＤ２２抗体の特徴付け
実施例５：エピトープマッピング
１０Ｆ４．４．１および５Ｅ８．１．８抗体が結合したＣＤ２２のエピトープを以下の手順に従って決定した。主要なＣＤ２２アイソフォーム(ＣＤ２２β)の７つの免疫グロブリン様ドメインを様々に欠損しているＣＤ２２配列をクローニングして、安定発現のために細胞に形質移入した。例えば、ドメイン１(Δ１)、ドメイン２(Δ２)又はドメイン３および４(Δ３，４)を欠いているＣＤ２２変異体をクローニングして、ＣＨＯ細胞に形質移入し、細胞に発現させた。コントロール細胞はＣＤ２２βを発現した。ストラタジーンＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ ＸＬ™試薬キットを用いて欠損させた。アミノ酸２２-１３８の欠失によってドメイン１の欠失を行い、アミノ酸１３９-２４２の欠失によってドメイン２の欠失を行い、そして、欠失したドメイン３及び４は微量なアイソフォームＣＤ２２αとして用いた(アミノ酸２４１-４１７の欠失)。すべてのアミノ酸番号は、Wilson, G.L.等(Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)の図１を参照)による、完全長前駆体ＣＤ２２βの番号付けを指す。図１４は欠失したドメインの線図である。アイソタイプコントロールを用いたフローサイトメトリによって結合を測定した。１０Ｆ４．４．１の結合は、ヤギ抗マウスＩｇＧ Ａｌｅｘａ ４８８を用いて検出した。５Ｅ８．１．８の結合は、

ビオチン化したヤギ抗マウスＩｇＧプラスストレプトアビジンＰＥを用いて検出した。特定のＥＣＤドメインの非存在下ではマウス１０Ｆ４．４．１又はマウス５Ｅ８．１．８抗体の結合に対して悪影響があることから、抗体がそれらのドメインを結合したことが示唆された。マウスの１０Ｆ４．４．１および５Ｅ８．１．８は、これらの条件下では同じ結合特徴を示した。いずれも、ドメイン１又はドメイン２を欠いているＣＤ２２を結合せず、ドメイン１および２を含むが、ドメイン３および４を欠いているＣＤ２２を結合した。この方法を用いて、１０Ｆ４．４．１および５Ｅ８．１．８が、配列番号：２７のアミノ酸２２からアミノ酸２４０の配列内の、ヒトＣＤ２２のドメイン１および２に結合することが決定された(上掲のWilson, G.L.等, (1991)を参照)。

【０３４０】

実施例６：可溶性抗原に対する結合親和性の特徴付け

可溶性ＣＤ２２の細胞外ドメイン(ＥＣＤ)についてのマウス及びヒト化１０Ｆ４抗体の結合親和性は、ＢＩＡＣＯＲＥ(登録商標)３０００システム(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた表面プラスモン共鳴測定によって測定した。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(３-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(ＥＤＣ)及びN-ヒドロキシスクシニミド(ＮＨＳ)で活性化した。抗ＣＤ２２ ＩｇＧ１抗体１０Ｆ４(マウス又はヒト化)を１０ｍＭ 酢酸ナトリウム(ｐＨ４．８)にて５μｇ／ｍＬの濃度に希釈し、およそ５００反応単位(ＲＵ)の抗体がカップリングするまで、５μｌ／分の流速で注入して、前記の活性化したチップをコートした。次に、１Ｍ エタノールアミンを注入して反応していない基をブロックした。動力学的な測定のために、ヒトＣＤ２２-β-ＥＣＤ-Ｈｉｓタグ化可溶性抗原の２倍の段階希釈物(およそ５００ｎＭ～およそ７．８ｎＭ)を２５℃、３０μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳに注入した。単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)（BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})を算出した。平衡解離定数(Ｋｄ)は比率k_{off}/k_{on}として算出した。コントロールとして抗ＣＤ２２抗体であるＲＦＢ４(Chemicon International, Inc., Temecula, CA, catalog no. CBL147)を用いた。この実験の結果を下記の表２に示す。

表２　可溶性ヒトＣＤ２２に対する抗ＣＤ２２結合親和性
(ＢＩＡＣＯＲＥ(登録商標)分析)

クローン	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)
マウス 10F4	0.19	2.8	15
キメラ 10F4	0.26	4.2	16
ヒト化 10F4v1	0.18	3.5	19
ヒト化 10F4v2	0.32	2.5	7.8
コントロール RFB4	0.33	1.4	4.2

【０３４１】

実施例７：細胞表面抗原に対する結合親和性の特徴付け

ＣＨＯ細胞の表面に発現されるヒトおよびカニクイザル(ｃｙｎｏ)のＣＤ２２に対するマウス１０Ｆ４．４．１およびヒト化１０Ｆ４ｖ１及び１０Ｆ４ｖ２の結合親和性を、競合アッセイを用いて調べた。簡単に言うと、ＣＨＯ細胞は完全長ヒトＣＤ２２(配列番号：２７)又はカニクイザル(ｃｙｎｏ)ＣＤ２２(配列番号：３１)を安定して発現する。抗ＣＤ２２抗体(マウス又はヒト化の１０Ｆ４ｖ１又はｖ２)を、およそ１０μＣｉ／μｇの比活性にＩｏｄｏｇｅｎ(登録商標)[^{125}Ｉ]試薬にてヨード化した。段階的に希釈した標識していない抗ＣＤ２２抗体を用いて細胞に基づく競合的結合アッセイを行った。４℃で４時間かけて抗体を細胞に結合させた。抗体の結合親和性K_Dは、非線形曲線フィッティングプログラムを利用して実行した標準的なスキャッチャード分析により決定した(例と

してMunson等, Anal Biochem, 107: 220-239, 1980を参照)。この実験の結果を以下の表３に示す。

表３　ヒトおよびＣｙｎｏのＣＤ２２に対する１０Ｆ４　ＭＡｂ結合親和性

抗体	ヒト CD22 Kd (nM)	Cyno CD22 Kd (nM)
Mu 10F4.4.1	2.4	2.3
Hu 10F4v1*	1.1, 1.7	1.4, 1.8
Hu 10F4v2	1.6	2.1

＊繰り返したアッセイ

結果から、マウス及びヒト化の１０Ｆ４が、およそ同等の親和性でＣＨＯ細胞の表面に発現されるヒトおよびｃｙｎｏのＣＤ２２を結合することが示される。

【０３４２】

実施例８：抗-ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートの産生

抗ＣＤ２２抗体ＲＦＢ４、マウス５Ｅ８、マウス１０Ｆ４、ヒト化１０Ｆ４ｖ１、ヒト化ｔｈｉｏＭＡｂ　１０Ｆ４ｖ１(ｔｈｉｏ-１０Ｆ４ｖ１)、ヒト化１０Ｆ４ｖ２、及びヒト化１０Ｆ４ｖ３を以下の薬剤-リンカー成分にコンジュゲートさせることによって抗ＣＤ２２　ＡＤＣを産生させた。ｓｐｐ-ＤＭ１、ｓｍｃｃ-ＤＭ１、ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ；Ｃ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦＭＣ-ＭＭＡＥおよびＭＣ-ＭＭＡＦ。これら薬剤及びリンカー成分は、本明細書、並びに２００４年２月５日に公開の国際公開２００４／０１０９５７、及び２００５年９月９日に公開の国際公開２００６／０３４４８８に開示されている(これら特許出願はそれぞれ、出典明記によってその全体が本明細書中に援用される)。国際公開２００４／０１０９５７に記載の方法論に従って標準的な方法を用いて、結合の前に、抗体をＴＣＥＰにて部分的に還元した。Doronina等 (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784および米国公開特許２００５／０２３８６４９Ａ１に記載の方法論に従って標準的な方法を用いて、部分的に還元した抗体を上記の薬剤-リンカー成分にコンジュゲートした。簡単に言うと、部分的に還元した抗体を薬剤リンカー成分と組み合わせて、該成分をシステイン残基にコンジュゲートさせた。コンジュゲート反応を止め、ＡＤＣを精製した。各々のＡＤＣについての薬剤負荷(抗体当たりの薬剤成分の平均数)をＨＰＬＣにて測定した。ＡＤＣの調製に有用な他のリンカーには、ＢＭＰＥＯ、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ-ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ-ＥＭＣＳ、スルホ-ＧＭＢＳ、スルホ-ＫＭＵＳ、スルホ-ＭＢＳ、スルホ-ＳＩＡＢ、スルホ-ＳＭＣＣ、およびスルホ-ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ(スクシンイミジル-(４-ビニルスルホン)ベンゾアート)、及びビス-マレイミド試薬、例えばＤＴＭＥ、ＢＭＢ、ＢＭＤＢ、ＢＭＨ、ＢＭＯＥ、ＢＭ(ＰＥＯ)$_3$、及びＢＭ(ＰＥＯ)$_4$が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０３４３】

また、抗ＣＤ２２　ＡＤＣは、抗体のリジン残基にコンジュゲートさせて生成する。本明細書において開示されるように、例えば、トラウトの試薬(Pierce Chemical Co.)を用いて抗体のリジンをスルフヒドリル基に変換する。結果として生じるスルフヒドリル基は、ＡＤＣの調製のためのリンカー又はリンカー薬剤分子と反応することができる。あるいは、ＡＤＣは、リンカーであるＳＰＰ(Ｎ-スクシンイミジル４(２'-ピリジルチオ)ペンタノエート)と抗ＣＤ２２抗体のリジンを反応させることによって生成される。このリンカーは既に薬剤分子に付着されていてもよいし、マレイミドなどの薬剤分子と後に反応させてもよい。例えば、抗体は、ＳＰＰと反応させて、その後Wang, L.等, Protein Science 14:2436-2446 (2005)に開示されるｆａｓとコンジュゲートさせることによって変更される。この文献は出典明記によってその全体が本明細書中に援用される。また、抗ＣＤ２２抗体のリジン残基をリンカーであるＳＭＣＣ(Pierce Chemical Co.)とｐＨ７～９で反応させて、ＳＭＣＣのアミン反応性Ｎ-ヒドロキシスクシンイミド(ＮＨＳエステル)が抗体

との安定アミド結合を形成するようにしてもよい。ＳＭＣＣのスルフヒドリル反応性のマレイミド基はｐＨ６．５～７．５でＤＭ１のスルフヒドリル基と反応して(Pierce Chemical Co., piercenet.comを参照)、ＡＤＣを形成する。リジン又はシステイン残基はリンカー-薬剤と反応して、平均して抗体当たりおよそ１～８のリンカー薬剤分子、あるいは抗体当たり１～６、１～４、１～３又は１～２のリンカー薬剤分子を負荷(積載)するＡＤＣを生産する。

ＡＤＣ 抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ＳＭＣＣ-ＤＭ１および抗ＧＰ１２０-ＳＭＣＣ-ＤＭ１はこの方法に従って調製した。ただし、ＲＦＢ４-ｓｍｃｃ-ＤＭ１は低薬剤負荷(１．９５)、中間の薬剤負荷(３．７)および高薬剤負荷(６．７５)で調製した。抗ＧＰ１２０-ｓｍｃｃ-ＤＭ１は高い(６．１)薬剤負荷で調製した。以降の本明細書中の実施例９および表９に示すように、これらのＡＤＣは、インビボにおいて有効であったことが示された。

【０３４４】

実施例９：抗-ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートの有効性

有効性決定因子のインビトロ研究。

リンパ腫細胞株において抗ＣＤ２２ ＡＤＣ(またはＴＤＣ)有効性の決定因子を決定した。Ｂ細胞の表面に発現されるＣＤ２２はそのリガンド(一又は複数)又は抗体が結合した際に取り込まれることが知られている(Sato, S.等, Immunity 5:551-562 (1996))。ＣＤ２２のＢ細胞表面発現のレベルおよび／またはＣＤ２２の内部移行が有効性に影響するか否か、そしてどのように作用するのかを試験するために、以下のインビトロ研究を行った。

【０３４５】

複数のリンパ腫細胞株上のヒトＣＤ２２の表面発現。表面上に様々な量のＣＤ２２を発現する１９個のリンパ腫細胞株を培養して、対数期増殖中に回収した。１００μｇ／ｍｌの各々正常なマウスＩｇＧおよび正常なヒトＩｇＧを含有するＦＡＣＳ洗浄バッファ(ＰＢＳ；０．５％ウシ血清アルブミン；０．１％アジ化ナトリウム)に細胞を再懸濁して、氷上に置いた。およそ1×10^{6}細胞／１００μｌを抗ｈｕＣＤ２２ ＡＰＣ(ｍＩｇＧ１、クローンＲＦＢ４、Southern Biotech #9361-11)又はマウスＩｇＧ１ ＡＰＣアイソタイプ(BD Pharmingen #555751)にて氷上で３０分間かけて染色した。死細胞は7-ＡＡＤ (BD Pharmingen #559925)にて染色した。ＢＤ ＦａｃｓＣａｌｉｂｕｒ™フローサイトメーターにてデータを得、ＦｌｏｗＪｏ™ソフトウェアにて分析した。ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１又は各々の遊離薬剤(ＤＭ１、ＭＭＡＦ又はＭＭＡＥ)についてのＩＣ５０測定値は、上記のリンパ腫細胞を培養して、対数期の培養細胞を回収して、９６ウェルプレートの１ウェルにつき５０００細胞を含む９０μｌの培養液を播くことによって測定した。ＡＤＣと遊離した薬剤を検出範囲内で段階的に希釈した(ＡＤＣは３００μｇ/ｍｌまたは遊離薬剤は９０ｎＭから始め、基本的にはゼロアッセイターゲットまで希釈する)。１０μｌの一定量の希釈したＡＤＣまたは遊離薬剤を、細胞を含む複数のウェル(複製)に添加し、３７℃で３日間インキュベートした。各ウェルに１００μｌのＣｅｌｌＴｉｔｅｒ ＧｌｏTM を加えて、３０分間インキュベートした。化学発光を検出して、ＰｒｉｓｍTM ソフトウェアを用いてデータを分析した。結果を図６Ａに示す。ここでは、表面ＣＤ２２レベルの高さがｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１のＩＣ５０の低さ(有効性が高い)と相関している。図６Ｃは、遊離薬剤に対する細胞固有の感受性とＡＤＣのＩＣ５０との間に強い相関があることを示す。

ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１の内部移行をＦＡＣＳアッセイにて測定した。簡単に言うと、ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１の存在下で、ＣＤ２２-ＦＩＴＣ(ＲＦＢ４)による標準的なＦＡＣＳ技術によって、リンパ腫細胞を染色し、氷上で２０～３０分間インキュベートした。最初の染色後の細胞表面上のＣＤ２２レベルを決定するために、冷却したＲＰＭＩ／１０％ＦＢＳ培地にて細胞を洗浄して、２００μｌの予め温めたＲＰＭＩ／１０％ＦＢＳを加えて、３７℃で１５分間インキュベートした。８０μｌの染色バッファと２０μｌの熱不活性化正常マウス血清(ＨＩ ＮＭＳ)を添加した後、氷上で１５分

間インキュベートした。抗ＤＭ１-Ａｌｅｘａ-６４７を加え、氷上で２０～３０分間インキュベートし、そして、細胞を洗浄して、ＦＡＣＳ分析の前に２００μｌのＰＢＳ／１％パラホルムアルデヒドにて固定した。最初の染色の後の表面および内部のＣＤ２２染色を決定するために、冷却したＲＰＭＩ／１０％ＦＢＳにて細胞を洗浄して、予め温めたＲＰＭＩ／１０％ＦＢＳを加えて、３７℃で１５分間インキュベートした。次いで細胞をＦＡＣＳ洗浄にて洗浄して、固定試薬Ａ(Dako™ #k2311)にて室温で１５分かけて固定し、固定試薬Ｂ(Dako™)にて工程を繰り返した。染色バッファとＨＩ ＮＭＳを加えて、細胞混合物を氷上で１５分間インキュベートした。固定試薬Ｂの後、抗ＤＭ１-Ａｌｅｘａ-６４７を加え、室温にて２０～３０分間インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ洗浄にて洗浄し、ＰＢＳ／１％パラホルムアルデヒドにて固定した。各々の細胞混合物(表面染色、内部移行後の表面染色、及び内部染色)についてＢＤ ＦａｃｓＣａｌｉｂｕｒ™フローサイトメーターを用いてＦＡＣＳ分析を行い、ＦｌｏｗＪｏ™ソフトウェアにて分析した。結果を図６Ｂと図６Ｄに示す。図６Ｂでは内部移行したＤＭ１の量の高さがＩＣ５０の低さ(高い有効性)と相関しており、図６Ｄでは、内部移行したＤＭ１が蛍光顕微鏡検査法によって視覚化されている。

【０３４６】

インビボ有効性研究

インビボでの腫瘍体積の低減能について、毒素をコンジュゲートしているか、又は毒素をコンジュゲートしていない抗ＣＤ２２モノクローナル抗体の有効性を試験するために、以下のプロトコールを行った。

ＳＣＩＤマウスの側腹皮下に、２×１０^{7}個のヒトＢ細胞リンパ腫細胞株を注入した。ヒトの細胞株には、ヒトバーキットリンパ腫細胞株であるＤａｕｄｉ、Ｒａｍｏｓ及びＲａｊｉ細胞(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAから入手可能)、及び他のＢ細胞株、例えば、Ｕ-６９８-Ｍ細胞及びＳｕ-ＤＨＬ-４細胞(DSMZ, Braunschweig, Germanyから入手可能；Ｓｕ-ＤＨＬ-４細胞にはルシフェラーゼレポーター遺伝子を形質移入した)、ＤｏＨＨ２細胞(上掲のKluin-Neilemans, H.C. (1991))、及びＧｒａｎｔａ-５１９(マントル細胞リンパ腫細胞、Jadayel, D.M等, Leukemia 11(1): 64-72 (1997))、及びＢＪＡＢ-ｌｕｃ細胞(レポーター遺伝子ルシフェラーゼを発現するＢＪＡＢヒトＢ細胞リンパ芽球様細胞株)を含めた。腫瘍が１００～２００ｍｍ^{3}の平均腫瘍体積に達したときに、マウスを複数のグループに分け、以下の表４～１６に示すように毒素コンジュゲート抗体又はコンジュゲートしていない抗体を０日目に静脈内注射して処置した。

【０３４７】

Ｂ細胞腫瘍体積を低減する抗ＣＤ２２メイタンシン薬剤コンジュゲート

６５匹のＳＣＩＤマウスの側腹の皮下に、マウス当たり０．２ｍｌの体積の２×１０^{7}個のＢＪＡＢ-ｌｕｃ細胞を注射した。細胞をＨＢＳＳに懸濁した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々９匹の４つのグループにランダムに分け、以下の表４に示す抗ＣＤ２２又はコントロール抗体の単回Ｉ.Ｖ.処置(尾静脈から)を行った。

表４ インビボ腫瘍体積の減少

抗体投与

投与された抗体	TI	PR	CR	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 (μg/m^2)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3.0	200	4.6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3.4	200	4.0
hu10F4v1	9/9	0	0	3.4	---	---

「ＴＩ」-各グループの最終時点での腫瘍発症率、分子は腫瘍を持つ動物の数を指し、分母は動物の総数を指す。「ＰＲ」は、腫瘍が最初の体積から５０～９９％退縮している動

物の数を指す。「ＣＲ」は、完全な寛解に達した動物の数を指す。
各々の処置グループの平均腫瘍体積を、抗体投与後３２日間モニターした。カリパスにて腫瘍測定値を得た。毒素－コンジュゲート抗ＣＤ２２抗体の有効性は、コントロール及びコンジュゲートしていない抗体と比較して決定した。結果を図７Ａに示す。マウス及びヒト化の１０Ｆ４ｖ１－ｓｍｃｃ－ＤＭ１モノクローナル抗体は、コンジュゲートしていない抗ＣＤ２２抗体及び非特異的なコントロール抗体と比較して、有意に腫瘍増殖を遅延させた。

【０３４８】

上記と同じプロトコールを用いてアッセイを行い、以下の表５に示すように、毒素コンジュゲートヒト化１０Ｆ４ｖ２を毒素コンジュゲートマウス及びネイキッドヒト化抗体と比較した。

表５　インビボ腫瘍体積の減少
抗体投与

投与された抗体	TI	PR	CR	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 (μg/m^2)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4.7	200	2.9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4.5	200	3.0
hu10F4v2	9/9	0	0	4.5	---	---

「ＴＩ」－各グループの最終時点での腫瘍発症率、分子は研究グループの中の腫瘍を持つ動物の数を指し、分母は動物の総数を指す。「ＰＲ」は、腫瘍が最初の体積から５０～９９％退縮している動物の数を指す。「ＣＲ」は、完全な寛解に達した動物の数を指す。
各々の処置グループの平均腫瘍体積を、抗体投与後３２日間モニターした。カリパスにて腫瘍測定値を得た。毒素－コンジュゲート抗ＣＤ２２抗体の有効性は、コントロール及びコンジュゲートしていない抗体と比較して決定した。結果を図７Ｂに示す。マウス１０Ｆ４－ｓｍｃｃ－ＤＭ１及びヒト化１０Ｆ４ｖ２－ｓｍｃｃ－ＤＭ１モノクローナル抗体は、コンジュゲートしていない抗ＣＤ２２抗体及び非特異的なコントロール抗体と比較して、有意に腫瘍増殖を遅延させた。

【０３４９】

本明細書中に開示したコンジュゲート方法に従って、抗ＣＤ２２抗体を、ｓｐｐリンカー又はｓｍｃｃリンカーによりＤＭ１にコンジュゲートさせた。ネイキッド抗ＣＤ２２抗体をポジティブコントロールとして用い、毒素コンジュゲートである抗ＨＥＲ２－ｓｐｐ－ＤＭ１および抗ＨＥＲ２－ｓｍｃｃ－ＤＭ１をネガティブコントロールとして用いた。８０匹のＳＣＩＤマウスの側腹皮下に、マウス当たり０．２ｍｌの体積の２×１０^{7}個のＢＪＡＢ－ｌｕｃ細胞を注射した。細胞をＨＢＳＳに懸濁した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々１０匹の６つのグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を静脈内投与した。投与は、週１回、合計３回繰り返した。表６を参照。

表６　インビボ腫瘍体積の減少
抗体投与

投与された抗体	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 ($\mu g/m^2$)
抗-Her2-spp-DM1 *	4	214
抗-Her2-smcc-DM1 **	6.9	405
抗-CD22-spp-DM1 *	5	214
抗-CD22-spp-DM1	2.5	107
抗-CD22-smcc-DM1 **	10	405
ネイキッド抗-CD22	10	---

* 一致した薬剤負荷
** 一致した薬剤負荷

週２回で３週間、その後週１回、全８週間の間、平均腫瘍体積をモニターした。経時的な腫瘍体積の変化(図７Ｃ)から、２１４及び１０７μｇ／ｍ^{2}のＤＭ１で投与した抗ＣＤ２２-ｓｐｐ-ＤＭ１と４０５μｇ／ｍ^{2}で投与した抗ＣＤ２２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１がＢＪＡＢ-１ｕｃ異種移植片腫瘍において強くて同等の抗腫瘍活性を示したことが示された。すべての抗ＣＤ２２　ＡＤＣグループは完全な応答を示した。

【０３５０】

本明細書中に開示したコンジュゲート方法に従って、抗ＣＤ２２抗体である、ＲＦＢ４、５Ｅ８及び７Ａ２をｓｍｃｃリンカーを介してＤＭ１にコンジュゲートした。毒素コンジュゲートである抗ＨＥＲ２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１(本明細書中ではＨＥＲ-ｓｍｃｃ-ＤＭ１又はＨＥＲ２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１とも交換可能に称する)をネガティブコントロールとして用いた。

ＳＣＩＤマウスの様々な異種移植片においてこれら抗体の腫瘍体積低減能を試験した。マウスの異種移植片を生成するために用いたヒトＢ細胞リンパ腫細胞株はＲａｍｏｓ細胞及びＢＪＡＢ-１ｕｃ細胞とした。それぞれの異種移植片について、ＳＣＩＤマウスの側腹皮下にマウス当たり０．１ｍｌの体積の５×１０^{6}個のヒトＢ細胞リンパ腫Ｒａｍｏｓ細胞(又は０．２ｍｌの２×１０^{7}個のＢＪＡＢ-１ｕｃ細胞)を注射した。細胞をＨＢＳＳに懸濁した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々８～１０匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を単回静脈内投与した。それぞれのグループについてＤＭ１薬剤負荷を２００μｇ/ｍ^{2}に正規化して、投与したＤＭ１の用量を求めた。平均腫瘍体積を週に２回、４週間モニターした。結果を以下の表７及び８に示し、図８Ａ及び８Ｂにそれぞれプロットした。

表７　インビボ腫瘍体積の減少、Ｒａｍｏｓ異種移植片
抗体投与

投与された抗体	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 ($\mu g/m^2$)
抗-HER2-smcc-DM1	4.2	200
抗-CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200
抗-CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200

表８　インビボ腫瘍体積の減少、ＢＪＡＢ-１ｕｃ異種移植片
抗体投与

投与された抗体	Ab 用量 (mg/kg)	DM1 用量 (μg/m^2)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-HER2-smcc-DM1	4.2	200	3.2
抗-CD22 (7A2)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗-CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200	4.25

これらの結果は、抗ＣＤ２２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１抗体薬剤コンジュゲートが、コントロール抗体又はネイキッド抗ＣＤ２２抗体と比較して、Ｒａｍｏｓ及びＢＪＡＢ-ｌｕｃ異種移植片のＢ細胞腫瘍体積を有意に低減することを示す。

【０３５１】

抗ＣＤ２２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１抗体薬剤コンジュゲートのＢＪＡＢ-ｌｕｃ ＳＣＩＤマウス異種移植片の腫瘍体積を低減する能力に対する、抗体薬剤負荷(抗体集団における１抗体にコンジュゲートした薬剤分子の平均数)の効果を調べた。１４０匹のＳＣＩＤマウスの側腹皮下に、マウス当たり０．２ｍｌの体積の２×１０^{7}個のＢＪＡＢ-ｌｕｃ細胞を注射した。細胞をＨＢＳＳに懸濁した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々８～１０匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を単回静脈内投与した。薬剤負荷が相対的に低い、中間の又は高い(平均薬剤負荷がそれぞれ抗体当たり１．９５、３．７又は６．７５のコンジュゲートＤＭ１分子である)抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ｓｍｃｃ-ＤＭ１集団を試験抗体として投与した。ネイキッドＲＦＢ４抗体及び抗ＧＰ１２０-ｓｍｃｃ-ＤＭ１(高薬剤負荷)をコントロールとした。抗体薬剤コンジュゲート(試験及びコントロール)の用量は５ｍｇ／ｋｇタンパク質レベルの用量に正規化した。抗体へのリンカーのコンジュゲート付着はリジン残基を介していた。表９を参照のこと。

表９　インビボ腫瘍体積の減少、ＢＪＡＢ-ｌｕｃ異種移植片
抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ｓｍｃｃ-ＤＭ１投与

投与された抗体	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 (μg/m^2)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-CD22(RFB4) (ネイキッド抗体)	10	--	--
抗 -CD22(RFB4)-smcc-DM1 (低)	5	144	1.95
抗-CD22(RFB4) -smcc-DM1 (中間)	5	273	3.7
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (高)	5	497	6.75
抗-GP120-smcc-DM1 (高)	5	449	6.1

同じタンパク質レベル(５ｍｇ/ｋｇ)で投与する場合、薬剤負荷が高い抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ｓｍｃｃ-ＤＭ１(１抗体分子につき６．７５ＤＭ１分子)は、３．７の中間の負荷である抗体薬剤コンジュゲートよりもわずかに良好に腫瘍体積を低減するのに対し、薬剤負荷が低い抗体薬剤コンジュゲートの効果は、コントロールコンジュゲートないしはネイキッド抗体とは異ならなかった。結果を図９にプロットした。

【０３５２】

Ｂ細胞腫瘍体積を低減する抗ＣＤ２２アウリスタチン薬剤コンジュゲート

マウス異種移植片の腫瘍体積に対する抗ＣＤ２２アウリスタチンＭＭＡＦ薬剤コンジュゲートの効果を調べた。本明細書中に開示した方法に従って、抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)とコ

ントロール抗体である抗ＧＰ１２０をＭＣ-ｖｃＰＡＢリンカー又はＭＣリンカーを介してＭＭＡＦにコンジュゲートした。ＳＣＩＤマウスの側腹皮下に、マウス当たり０．２ｍｌの体積の５×１０^{6}個のＲａｍｏｓ細胞を注射した。細胞をＨＢＳＳに懸濁した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々８～１０匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体をマウスに単回静脈内投与した。表１０に、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示す。

表１０　インビボ腫瘍体積の減少、Ｒａｍｏｓ異種移植片
抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ＭＭＡＦコンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 用量 ($\mu g/m^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6.6	4.2
抗-CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6.9	4.0
抗-GP120-MCvcPAB-MMAF	405	5.8	4.8
抗-GP120-MC-MMAF	405	5.9	4.7

Ｒａｍｏｓ　ＲＡ１異種移植片において抗ＣＤ２２-ＭＣ-ＭＭＡＦは抗ＣＤ２２-ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦと同等の活性を示した。結果を図１０にプロットする。

【０３５３】

マウス異種移植片の腫瘍体積に対する抗ＣＤ２２アウリスタチンＭＭＡＥ及びＤＭ１薬剤コンジュゲートの効果を調べた。本明細書中に開示した方法に従って、抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)とコントロール抗体である抗ＧＰ１２０をＭＣ-ｖｃＰＡＢリンカー又はＭＣリンカーを介してＭＭＡＥに、ｓｍｃｃリンカーを介してＤＭ１にコンジュゲートした。ＳＣＩＤマウスの側腹皮下に、マウス当たり０．１ｍｌの体積の５×１０^{6}個のＲａｍｏｓ細胞を注射した。細胞をＨＢＳＳに懸濁した。ＰＢＳをコントロールとして投与した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々８～１０匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を各マウスに単回静脈内投与した。表１１に、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示す。

表１１　インビボ腫瘍体積の減少、Ｒａｍｏｓ異種移植片
抗ＣＤ２２(ＲＦＢ４)-ＭＭＡＥ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAE 又は DM1 用量 ($\mu g/m^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-GP120-smcc-DM1	405	6.7	4.1
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1	405	6.5	4.25
抗-GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6.0	4.7
抗 CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6.3	4.5
PBS	--	--	--

Ｒａｍｏｓ　ＲＡ１異種移植片において抗ＣＤ２２-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥは強力な抗腫瘍活性を示した。抗ＣＤ２２-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥは抗ＣＤ２２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１よりも優れた活性を示した。ＡＤＣコントロールである抗ＧＰ１２０-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥは有意な活性を示さなかった。結果を図１１にプロットする。

【０３５４】

マウス異種移植片の腫瘍体積に対する抗ＣＤ２２アウリスタチンＭＭＡＦ及びＤＭ１薬剤コンジュゲートの効果を調べた。抗ＣＤ２２　ｈｕ１０Ｆ４ｖ２-ＭＣ-ＭＭＡＦ、ｈｕ１０Ｆ４ｖ２-ｓｍｃｃ-ＤＭ１及びｔｈｉｏ-１０Ｆ４ｖ１-ＭＣ-ＭＭＡＦを投与し、腫瘍体積に対する効果について比較した。抗Ｈｅｒ２-ＭＣ-ＭＭＡＦ及び抗Ｈｅｒ２-ｓｍ

ｃｃ-ＤＭ１をコントロール抗体とした。ＳＣＩＤマウスの側腹皮下に、マウス当たり０．２ｍｌの体積の２×１０^{7}個のＢＪＡＢ-ｌｕｃ細胞を注射した。細胞をＨＢＳＳに懸濁した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々８～１０匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を各マウスに単回静脈内投与した。本明細書中に開示したように「Ｔｈｉｏ」はｔｈｉｏＭａｂを指し、リンカー-薬剤成分が抗体のシステイン改変部位を介して抗体にコンジュゲートしているものである。表１２に、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示す。

表１２　インビボ腫瘍体積の減少、ＢＪＡＢ-ｌｕｃ異種移植片
Ｈｕ１０Ｆ４　ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF又はDM1用量 ($\mu g/m^2$)	Ab用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-Her2-MC-MMAF	100	1.1	6.3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2.0	3.4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1.0	3.4
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4.6	1.5
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2.3	1.5
抗-Her2-smcc-DM1	200	4.2	3.2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4.5	3.0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2.3	3.0

ＢＪＡＢ-ｌｕｃ異種移植片においてＨｕ１０Ｆ４ｖ２　ＡＤＣは強力は抗腫瘍活性を示した。結果を図１２にプロットする。

【０３５５】

上記の実験に開示した手順を用いて、異なる異種移植片における異なる用量のｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ｓｍｃｃ-ＤＭ１及び-ＭＣ-ＭＭＡＦ　ＡＤＣの効果を調べた。ＳｕＤＨＬ４-ｌｕｃ、ＤｏＨＨ２及びＧｒａｎｔａ-５１９の異種移植片を本明細書に開示したように調製した。平均腫瘍サイズが１００～２００ｍｍ^{3}に達したときに、マウスを各々８～１０匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を各マウスに単回静脈内投与した。表１３Ａ-１３Ｃに、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示し、結果を図１３Ａ-１３Ｃに示す。

表１３Ａ　ＳｕＤＨＬ４-ｌｕｃ異種移植片におけるインビボ腫瘍体積の減少
Ｈｕ１０Ｆ４ｖ３　ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF又はDM1用量 ($\mu g/m^2$)	Ab用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13.6	2.9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6.8	2.9
抗-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.3	3.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.0

表１３Ｂ　ＤｏＨＨ２異種移植片におけるインビボ腫瘍体積の減少
Ｈｕ１０Ｆ４ｖ３　ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu g/m^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11.8	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
抗-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.1	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
ネイキッド hu10F4v3	--	13.1	--

表１３Ｃ　Ｇｒａｎｔａ-５１９異種移植片におけるインビボ腫瘍体積の減少　Ｈｕ１０Ｆ４ｖ３　ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu g/m^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	300	5.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2.9	3.35
抗-Her2-MC-MMAF	300	4.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3.3	3.04
ネイキッド hu10F4v3	--	6.6	--

試験したすべての異種移植片モデルにおいて抗ＣＤ２２　ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ｓｍｃｃ-ＤＭ１及び-ＭＣ-ＭＭＡＦ　ＡＤＣは強力な腫瘍低減を示した。

【０３５６】

実施例１０：システイン改変抗ＣＤ２２抗体の調製

本明細書中に開示するようにシステイン改変抗ＣＤ２２抗体の調製を行った。１０Ｆ４ｖ２と同じ可変領域及び定常領域の配列(軽鎖、配列番号：８７、及び重鎖、配列番号：８８、図５Ｂ)を有する１０Ｆ４ｖ３抗体をコードするＤＮＡに本明細書中に開示した方法によって突然変異を誘発し、軽鎖、重鎖又は重鎖のＦｃ領域を改変した。軽鎖をコードするＤＮＡに突然変異を誘発し、図１７Ａに示すように軽鎖のカバット位置２０５(連続した位置２１０)のシステインをバリンに置換した(ヒト化抗体１０Ｆ４ｖ３　ｔｈｉｏｍａｂの軽鎖配列番号：９１)。重鎖をコードするＤＮＡに突然変異を誘発し、図１７Ｂに示すように重鎖のＥＵ位置１１８(連続した位置１２１)のシステインをアラニンに置換した(ヒト化抗体１０Ｆ４ｖ３　ｔｈｉｏｍａｂの重鎖配列番号：９２)。Ｆｃ領域に突然変異を誘発し、図１７Ｃに示すように重鎖Ｆｃ領域のＥＵ位置４００(連続した位置４０３)のシステインをセリンに置換した(重鎖配列番号：９３)。

【０３５７】

還元及び再酸化によるシステイン改変抗ＣＤ２２抗体の調製

ＣＨＯ細胞に発現する完全長のシステイン改変抗ＣＤ２２モノクローナル抗体(ＴｈｉｏＭａｂ)をおよそｐＨ８．０の５００ｍＭ ホウ酸ナトリウム及び５００ｍＭ 塩化ナトリウムに溶解し、およそ５０～１００倍過剰な１ｍＭ ＴＣＥＰ(トリス(２-カルボキシエチル)ホスフィンハイドロクロライド；Getz等 (1999) Anal. Biochem Vol 273: 73-80；S

oltec Ventures, Beverly, MA)にて３７℃でおよそ１～２時間かけて還元する。還元したＴｈｉｏＭａｂを希釈し、１０ｍＭ 酢酸ナトリウム、ｐＨ５にてＨｉＴｒａｐ Ｓカラムに流し、０．３Ｍ塩化ナトリウムを含むＰＢＳにて溶出する。溶出した還元ＴｈｉｏＭａｂをｐＨ７の２ｍＭデヒドロアスコルビン酸(ｄｈＡＡ)にて３時間、又は２ｍＭ 硫酸銅水溶液(ＣｕＳＯ$_4$)にて室温で終夜をかけて処理する。外気酸化も有効であるかもしれない。Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５樹脂に溶出することによってバッファを交換し、１ｍＭ ＤＴＰＡを有するＰＢＳにて溶出する。この溶液の２８０ｎｍの吸光度から還元した抗体の濃度を決定し、ＤＴＮＢ(Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて４１２ｎｍの吸光度を決定することによってチオールの濃度を決定することによってチオール／Ａｂ値を確認する。

【０３５８】

実施例１１：システイン改変抗ＣＤ２２抗体と薬剤-リンカー中間生成物とのコンジュゲートによるシステイン改変抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートの調製

実施例１０の還元及び再酸化の手順の後に、システイン改変抗ＣＤ２２抗体をＰＢＳ(リン酸緩衝生理食塩水)バッファに溶解し、氷上で冷却する。マレイミドなどのチオール反応性官能基を有する、アウリスタチン薬剤リンカー中間生成物、例としてＭＣ-ＭＭＡＥ（マレイミドカプロイル-モノメチル アウリスタチンＥ)、ＭＣ-ＭＭＡＦ、ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ、又はＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦの抗体当たりの改変システインと比較したときのおよそ１．５モル等価物をＤＭＳＯに溶解し、アセトニトリルと水にて希釈し、ＰＢＳ中の冷却した還元、再酸化抗体に加える。およそ１時間後、過剰のマレイミドを加えて、反応を止め、任意の反応していない抗体チオール基をキャップする。遠心限外濾過によって反応混合物を濃縮し、システイン改変抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートを精製し、ＰＢＳのＧ２５樹脂により溶出して脱塩し、滅菌条件下にて０．２μｍフィルターにより濾過し、貯蔵のために凍結する。

以下のようにｈｕ １０Ｆ４ｖ３ ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏｍａｂ-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１の調製を行った。抗体の表面上の反応していないマレイミド基を残すビス-マレイミド試薬であるＢＭ(ＰＥＯ)４ (Pierce Chemical)によってｈｕ １０Ｆ４ｖ３ ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏｍａｂの遊離システインを改変した。これは、５０％エタノール／水混合物にＢＭ(ＰＥＯ)４を１０ｍＭの濃度にまで溶解して、１０倍モル過剰のＢＭ(ＰＥＯ)４をおよそ１．６ｍｇ／ｍｌ(１０μモル)の濃度のｈｕ４Ｄ５Ｆａｂｖ８-(Ｖ１１０Ｃ) ＴｈｉｏＦａｂを含むリン酸緩衝生理食塩水溶液に加えて、１時間反応させることによって行った。過剰なＢＭ(ＰＥＯ)４は、１５０ｍＭ ＮａＣｌバッファを有する３０ｍＭ クエン酸塩、ｐＨ６のゲル濾過(ＨｉＴｒａｐカラム、Pharmacia)によって除去した。ジメチルアセトアミド(ＤＭＡ)に溶解したおよそ１０倍モル過剰のＤＭ１を、ｈｕ４Ｄ５Ｆａｂｖ８-(Ｖ１１０Ｃ) ＴｈｉｏＦａｂ-ＢＭＰＥＯ中間生成物に加えた。また、ジメチルホルムアミド(ＤＭＦ)が薬剤成分試薬を溶解するために使用されてもよい。反応混合物を終夜反応させて、ＰＢＳにてゲル濾過又は透析を行って、反応しなかった薬剤を除去した。ＰＢＳのＳ２００カラムのゲル濾過を用いて、高分子量集合体を取り除き、精製されたｈｕ １０Ｆ４ｖ３ ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏｍａｂ-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１に与えた。

同じプロトコールによって、コントロールＨＣ（Ａ１１８Ｃ）ＭＡｂ-ＭＣ-ＭＭＡＦ、コントロールＨＣ ＴｈｉｏＭＡｂ-ＭＣ-ＭＭＡＦ、コントロール ＨＣＴｈｉｏＭＡｂ-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥおよびコントロールＨＣ ＴｈｉｏＭａｂ-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１を調製した。

上記の手順によって、以下のシステイン改変抗ＣＤ２２抗体薬剤コンジュゲートを調製して、試験した。

Ａ１１８Ｃ ｔｈｉｏ ｈｕ １０Ｆ４ｖ３およびＭＣ-ＭＭＡＦのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕ ｔｈｉｏ-ＨＣ-１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦ、

Ａ１１８Ｃ ｔｈｉｏ ｈｕ １０Ｆ４ｖ３及びＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕ ｔｈｉｏ-ＨＣ-１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ、

Ａ１１８Ｃ ｔｈｉｏ ｈｕ ＨＣ-１０Ｆ４ｖ３及びｂｍｐｅｏ-ＤＭ１のコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕ ＨＣ-１０Ｆ４ｖ３-ｂｍｐｅｏ-ＤＭ１、
Ｖ２０５Ｃ ｔｈｉｏ ｈｕ ＬＣ-１０Ｆ４ｖ３及びＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕ ＬＣ-１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ、及び、
Ｓ４００Ｃ ｔｈｉｏ ｈｕ Ｆｃ-１０Ｆ４ｖ３及びＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕ Ｆｃ-１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ。

【０３５９】

実施例１２：システイン改変ＴｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲートの細胞表面抗原への結合親和性の特徴付け

ＢＪＡＢ-ｌｕｃ細胞に発現されるＣＤ２２へのｔｈｉｏ ｈｕ １０Ｆ４ｖ３薬剤コンジュゲートの結合親和性をＦＡＣＳ分析にて測定した。簡単に言うと、およそ１×１０６細胞を含む１００μｌを、様々な量の以下のいずれか一の抗ＣＤ２２ ＴｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲートと接触させた。ｔｈｉｏ ｈｕ ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ)１０Ｆ４ｖ３-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、ｔｈｉｏ ｈｕ Ｆｃ(Ｓ４００Ｃ)１０Ｆ４ｖ３-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、ｔｈｉｏ ｈｕ ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)１０Ｆ４ｖ３-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、ｔｈｉｏ ｈｕ ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦ、又はｔｈｉｏ ｈｕ ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)１０Ｆ４ｖ３-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１(それぞれ図１８Ａ-１８Ｅを参照)。ビオチン化されたヤギ抗ｈｕＦｃプラスストレプトアビジン-ＰＥを用いて、細胞表面に結合した抗ＣＤ２２抗体を検出した。図１８Ａ-１８Ｅのプロット線は、試験したｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートのすべてについて抗原結合がおよそ同じであったことを示す。

【０３６０】

実施例１３：抗-ＣＤ２２ ＴｈｉｏＭａｂ薬剤コンジュゲートによるインビボ腫瘍体積低減についてのアッセイ

異種移植片モデルにおいてＢ細胞腫瘍体積を低減するために実施例１１に従って調製したｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートの能力を、本明細書中の実施例９に開示した手順に従って試験した。Ｇｒａｎｔａ-５１９細胞異種移植片腫瘍を有するＳＣＩＤマウスに、コントロールおよび抗ＣＤ２２ヒト化１０Ｆ４ｖ３ ｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートを、以下の表１４に示す用量で０日目に投与した。コントロールＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏｍａｂは抗ＨＥＲ２ ４Ｄ５抗体とした。

表１４ Ｇｒａｎｔａ-５１９異種移植片におけるインビボ腫瘍体積低減、ｔｈｉｏ Ｈｕ１０Ｆ４ｖ３ ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦコンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu g/m^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤 /Ab)
Thio Control HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.99	1.65
Thio Control HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.33	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.41	1.95
Thio 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3.76	1.8
Thio 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6

この実験の結果を図１９に示す。表１４に示す用量のｔｈｉｏ １０Ｆ４ｖ３-ＬＣ-(Ｖ２０５Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥおよびｔｈｉｏ １０Ｆ４ｖ３-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ ｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートの投与によって、試験の間に、平均腫瘍体積の減少が生じた。

【０３６１】

薬剤用量は異なるが同じプロトコールを用いて、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ-５１９異種移植片において更なるｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートを試験した。コントロール抗体又はコントロールｔｈｉｏｍａｂは、抗ＨＥＲ２ ４Ｄ５抗体又はＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏｍａｂとした。結果を以下の表１５に示す。

表１５ Ｇｒａｎｔａ-５１９異種移植片におけるインビボ腫瘍体積低減、ｔｈｉｏ Ｈｕ１０Ｆ４ｖ３ ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦおよびＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu g/m^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤 /Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3.2	3.1
Thio Control HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio Control HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	6.5	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2.7	1.9
Thio Control HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.1	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	75	2.6	1.95

この実験の結果を図２０Ａに示す。１５０および７５μｇ／ｍ２のｔｈｉｏ １０Ｆ４ｖ３-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ ｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートの投与により、試験の間に、平均腫瘍体積の減少が生じた。同じ試験において、初めの７日の体重変化の割合を各々の用量グループにおいて決定した。図２０Ｂにプロットした結果は、これらのｔｈｉｏｍａｂ薬剤コンジュゲートの投与によってこの間に体重損失が生じなかったことを示す。

【０３６２】

同じ試験において、上記の実施例に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いて、投与されるＴＤＣおよび用量を変化させて、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスの濾胞性リンパ腫ＤＯＨＨ２異種移植片におけるＴＤＣの有効性を調べた。ＴＤＣおよび用量を以下の表１６に示す。

表１６ ＤＯＨＨ２異種移植片におけるインビボ腫瘍体積減少、Ｔｈｉｏ Ｈｕ１０Ｆ４ｖ３ ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦおよびＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu g/m^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤 /Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6.4	3.1
Thio Control HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	21.9	1.79
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio Control HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	26.0	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21.4	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10.7	1.9
Thio Control HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.4	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10.2	1.95

図２０Ｃは、同じ重鎖Ａ１１８Ｃ抗ＣＤ２２ ＴＤＣであるが表１６に示すように高い用量で処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスの濾胞性リンパ腫ＤＯＨＨ２異種移植片における経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしているグラフである。抗ＣＤ２２ １０Ｆ４ｖ３-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ ＴＤＣは、この試験において最も効果的な試験薬剤であるようであった。しかしながら、この実験において服用レベルを増加すると、抗-ＨＥＲ２-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥコントロールにいくらかの有効性が示された。この活性は、おそらく循環中のＡＤＣからの薬剤の放出に起因している。抗-ＣＤ２２ ｈｕ１０Ｆ４-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ-ＭＭＡＦ及び-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１試験薬剤は中間の有効性を示し、これはこれらリンカーの安定性の増加と一致しており、結合しない抗ＨＥＲ２コントロールはほとんど活性を示さなかった。図２０ＤはＤＯＨＨ２異種移植片試験のマウスの体重変化の割合をプロットしたものであり、試験の開始１４日間では体重の有意な変化がなかったことを示す。

【０３６３】

実施例１４：ラットおよびカニクイザルにおける抗-ＣＤ２２ 薬剤コンジュゲートの安全性

サル

ｈｕ１０Ｆ４抗ＣＤ２２抗体は、ヒトＣＤ２２に対するのと同等の親和性を有してカニクイ(ｃｙｎｏ)サルＣＤ２２と交差反応する。ｈｕ１０Ｆ４抗ＣＤ２２抗体はラットＣＤ２２と交差反応しない。したがって、標的非依存的及び標的依存的な安全性と抗ＣＤ２２薬剤コンジュゲートの毒性を、ラットおよびｃｙｎｏにおいて評価した。

ラットにおける安全性と毒性

ラットにおける安全性と毒性の研究のために、２つの研究を行った。一つは、薬剤が切断可能なリンカー(-ｖｃ-又は-ｓｐｐ-)又は切断不可能なリンカー(ＭＣ又はＳＭＣＣ(ＭＣＣとも称する))を介して連結されているｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、-ＳＰＰ-ＤＭ１、-ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ、又は-ＭＣ-ＭＭＡＦコンジュゲートを、１日目にラットに静脈内投与した。ビヒクルをコントロールとして投与した。薬物動態学的分析のために５日目に、そして１２日目(解剖時)に血液試料を採取した。週に少なくとも３回、臨床診察と体重記録を行った。血清ＡＳＴ(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)を毒性の指標としてモニターした。切断可能なリンカーを含む２０ｍｇ／ｋｇのｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ｖｃＭＭＡＥおよびｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＰＰ-ＤＭ１を投与したラットにおいて、０日目と比較して５日目に血清ＡＳＴレベルが増加した(図２１Ａ)。２０ｍｇ／ｋｇのｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦ又はｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣＣ-ＤＭ１(切断不可能なリンカー、図２１Ｂ)を投与したラットにおいて、０日目と比較して５日目に好中球レ

ベルが増加した。ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ｖｃ-ＭＭＡＥ又はｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＰＰ-ＤＭ１を投与したラットにおいて、０日目と比較して５日目に好中球レベルが減少した。切断不可能なリンカーを含むＡＤＣを投与したラットにおける血清ＡＳＴの増加と好中球の減少は、このＡＤＣの毒性の増加を表す。

同じラットの試験において、６匹のグループに、２０、４０又は６０ｍｇ／ｋｇのｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦ又はｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１を１日目に投与し、１２日間モニターした。ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦを投与したラットでは、以下の所見が観察されなかった。体重の減少、血清肝酵素の増加、血小板の減少、または好中球の減少。ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１を投与したラットでは、可逆的な体重の減少と血清肝酵素の可逆的な増加が、４０および６０ｍｇ／ｋｇの服用レベルで観察されたのに対して好中球の可逆的な減少と血小板の一過性の減少が６０ｍｇ／ｋｇの用量で観察された。

【０３６４】

カニクイザルにおける安全性と毒性

霊長動物モデルにおいて抗ＣＤ２２ ＡＤＣの安全性と毒性を評価するために、３０匹のカニクイザルを以下の処置群に割り当てた。ビヒクルコントロール(６頭)、２、４および６ｍｇ／ｍ^2 薬剤用量のｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１(０、１０、２０および３０ｍｇ／ｋｇの抗体用量の等価物；各用量グループ当たり４頭)、および２、４および６ｍｇ／ｍ^2 の用量のｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦ(各用量グループ当たり４頭)。１日目及び２２日目に動物に静脈内投与した。体重、摂食量および病理学指標の変化について動物を評価した。毒物的効果、薬力学的効果、及び抗薬剤抗体効果を評価するために血液試料を採取してアッセイした。各グループの半分の動物をそれぞれ２５日目及び４３日目に安楽死させ、組織試料を採取した。

いずれのＡＤＣグループにも注目すべき体重変化はなかった。血清肝酵素ＡＳＴ(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、ＡＬＴ(アミノトランスフェラーゼ)およびＧＧＴ(γ-グルタミルトランスペプチダーゼ)のレベルを、関連する分野で周知の標準的な分析法に従ってアッセイした。血清肝酵素の可逆的な増加は３０ｍｇ／ｋｇのいずれのＡＤＣを投与した動物においても観察されたが、ＡＬＴはＤＭ１グループにおいて上昇したのに対して、ＡＳＴおよびＧＧＴはＭＭＡＦグループにおいて上昇した。ＤＭ１グループの２０ｍｇ／ｋｇを投与した４頭のうちの２頭、そして３０ｍｇ／ｋｇを投与した４頭のうちの４頭において、座骨神経退化がわずか～軽度に生じた。ＭＭＡＦグループの３０ｍｇ／ｋｇを投与した４頭のうちの１頭において座骨神経退化が極わずかに生じた。様々な臓器の組織を顕微鏡で調べた。３０ｍｇ/ｋｇのＭＭＡＦグループの４頭のうちの２頭は不明の重要な肺病変があったのに対して、ＤＭ１グループでは観察されなかった。

【０３６５】

ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦ及び-ＳＭＣＣ-ＤＭ１ ＡＤＣによる末梢のＢ細胞の枯渇は、０日目及び２２日目に投与したカニクイザルにおいて４３日間にわたって血中のＣＤ２０+細胞レベルを測定することによって決定した。試験の間に定期的に採取した血液は、蛍光性標識抗ＣＤ２０抗体を用いたＦＡＣＳによってアッセイした。抗ＣＤ２２ＭＭＡＦおよびＤＭ１ ＡＤＣは、図２２Ａ(ＭＭＡＦグループ)および図２２Ｂ(ＤＭ１グループ)に示すようにカニクイザル末梢Ｂ細胞を減少(枯渇)させる。ＣＤ４＋細胞が同じ期間で有意に減少されなかったことを示す図２３Ａ及び２３Ｂに示すように、他のリンパ球集団についてＭＭＡＦ又はＤＭ１ ＡＤＣの有意な作用は観察されなかった。

図２４Ａおよび２４Ｂの顕微鏡写真に示されるように、コントロールと比較してカニクイザルの扁桃腺試料においてＨｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１は、胚中心Ｂ細胞を減少させた。例示的な胚中心は、図２４Ａの円で示す。図２４Ｂに示されるように、胚中心Ｂ細胞の完全な除去は１０ｍｇ／ｋｇの服用レベルで観察された。同じ結果は、同じ条件下でのｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦ ＡＤＣの投与の後に得られた。

１０ｍｇ／ｋｇで投与されるＨｕ１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦは、カニクイザルの脾臓濾胞性胚中心から分化するＢ細胞を減少させた。図２５Ａの線図および図２５Ｂおよび２

５Ｃの組織顕微写真を参照。ｈｕ１０Ｆ４ｖ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１ ＡＤＣを同じ条件下で試験した場合に、同じ結果が得られた。胚中心は、Ｋｉ-６７染色を用いて図２５Ｂの暗領域として観察され、図２５Ｄの検出可能的に標識した抗ＩｇＤ抗体によって染色した場合には暗領域に囲まれた非染色領域として現れる。抗-１０Ｆ４ｖ３-ＭＣ-ＭＭＡＦによる胚中心Ｂ細胞の枯渇による胚中心の喪失を図２５Ｃ及び２５Ｅに示す。ゆえに、これらの細胞分裂阻害剤はＢ細胞群の増殖に影響を及ぼす。

【受託番号】

【０３６６】

下記のハイブリドーマは、アメリカ培養細胞系統保存機関(登録商標)、PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA(ＡＴＣＣ(登録商標))に寄託されている。

細胞株	ＡＴＣＣ寄託番号	寄託日
ハイブリドーマ１０Ｆ４．４．１	ＰＴＡ-７６２１	２００６年５月２６日
ハイブリドーマ５Ｅ８．１．８	ＰＴＡ-７６２０	２００６年５月２６日

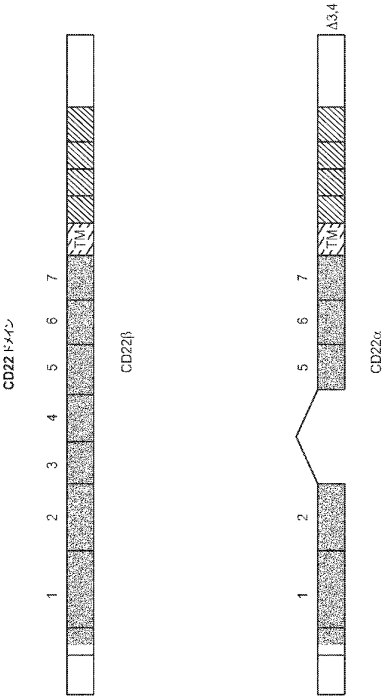
これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から３０年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。これらの細胞系統は、ブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とＡＴＣＣとの間の合意に従い、ＡＴＣＣから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、細胞系統を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第１２２条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号８８６ＯＧ６３８の３７ＣＦＲ第１．１４条を含む)に従って権利を有すると米国特許商標庁長官が決定した者に細胞系統を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した細胞系統が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、通知により細胞系統を同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託された細胞系統の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

前述の発明は、理解を明確にするための図説及び実施例によってある程度詳細に記載されているが、この説明及び実施例は本発明の権利範囲を限定するものとみなされるものではない。本明細書中において引用したすべての特許文献及び科学文献の開示内容は、出典明記によってその全体が特別に援用される。

OnCusp
Ex. 1002

【図１Ａ】



【図１Ｂ】

```
  1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrale gdlesfilfh
 61 npeynknask fdgtmlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwne rihlnvserp fpphlqippe lgesqevtlt cllnfscygy pigiqwlieg
181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shngkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 tpkleikvtp saaivregda vtmtcevsss npeyttvswl kdgrsikkqn tfrinlrevt
301 kdgqykycag vsndvgpgrs eevflqvqya pepstvqiln spaveqgave flcmslangl
361 ptpytwyhng kemqgrteex vhipkiipwh agtyscvaen ilgtgqrgpg aelnvqyppk
421 kvttvignpr pireqdtvtl scrynsnpsv vtryewkphg aweeps qvl klqnvqwnnt
481 tiecarcnsw cswaspvaln vqyaprdvrv rkikplselh sgnsvs qcd fssshpkevq
541 ffwekngril gkesqlnfds ispeqaqgys cwvnnsigqt askawtlevl yapsrlrvsm
601 spgdqvmegk satttcesda nppvshytwf dwnngsiphh sqklrlepvk vqnsgaywcq
661 gtnsvgkgrs plstltvyys petigrrvav glgslaill laicglklqr rwkntqsqqg
721 lqenseqqsf fvrnkkvrra plsegphslg cynpmmedgi syttlrfpem nipatgdaes
781 serqrpprtc ddtytysalh krqvgdyenv ipdfpedegi hyselIqfgv gerpqaqenv
841 dyvilkh （配列番号:27）
```

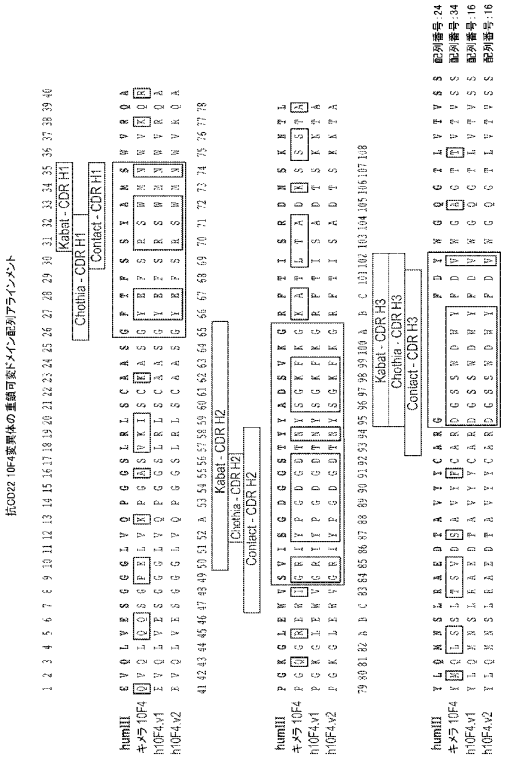
【図１Ｃ】

```
  1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrale gdlesfilfh
 61 npeynknask fdgtmlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwne rihlnvserp fpphlqippe lgesqevtlt cllnfscygy pigiqwlieg
181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shngkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 ppkkvtvtvq npepkregdt vtlscnynss npsvtryewk phgaweepsl gvlkiqnvgw
301 dhttiacaac nswcswaspv alnvqyaprd vrvrkikpls eihsgnsvsl qcdfssshpk
361 evqffwekng rllgkesqln fdsispedag sysccvnnsi gqtaskawtl evlyapsrlr
421 vsmspgdqvm egksatltce sdanppvshy twfdwnngsl pyhsqklrle pvkvqhsgay
481 wcqgtnsvgk grsplstltv yyspetigrr vavglgsvla illlaicglk lqrrwkrtqs
541 qqglqensse gqsffvrnkk vrrptplseg phslgcynpm medgisyatl rfpetktprt
601 gdaetselqr lppdcddtvt ysvlqkrqvg dyenvipdfp edegihysel iqfgvgerpq
661 aqenvdyvil kh （配列番号:29）
```

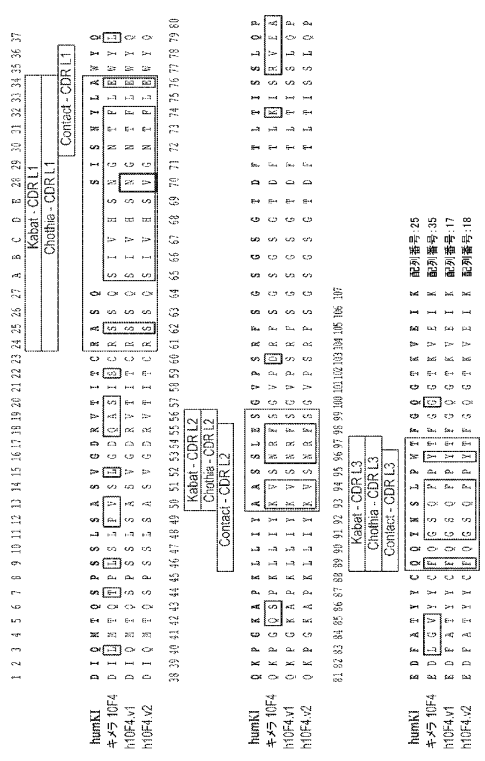
【図１Ｄ】

```
MHLLGPWLLLLEYLAFSDS SKWNIEHPGTIYAWEGACIWVPCTYRVLDGA
LETPILFHNPEYNQNMSKFEGTRLYESTKDGKVPSGQKRVQFLGNKINNNC
TLSIHPVHVNDSGQLGLRMVSKTEKKWMERIHLNVSERPFTPHIQLPPKLQE
SQEVTLTCLLNFSCYGYQIQLQWLIEGAPMSQAAVTLTSLSTKSVFTRSEL
KFSPQWSHHGKIVTCELHDVDGKVLSEDTVQLNVKHTPKLTIEVTPNETIV
RKGDSVTMTCKVNSSNPEYTTVSWLKDDIPLEKQNTLMLTLHEVTKSQTGT
YCCRVSNDVGPATSEKVFLQVQYAPEPSRVQISQSPAVEGSEVNFLCISPA
NPLPTKYTWYHNGKEVQGRTEKQPGIQKLLFWHAGTYSCVAENILGIGERG
PGTELDVQYPPKKVTMVIENPTPIREGDTVTLSCNYSSSNPIVNHYEWRPR
GAWKPSLEVGKIQNIGWNNTAVACAACNNWCSWASPVTLNVLYAPRGVRV
RKIKPLSEIHSGNLVSLQCDFSSSHPKEVQFFWEKNGSLLGKESQLNFDS I
SPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPSRLPVSMSQGNQVMEGKTA
ILTCESDANPPVYSYAWFDWNNQSLPYSGRMLRLEPVKVQHSGAYWCQGTN
RVGKGHSPLITLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCLAILILAVCGFKVQRRWKR
TQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRPTPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYATL
RFPETKTPRTGDAETSELQRLPPDCDDTVTYSVLQKRQVGDYENVIPDFPE
DEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVDYVILKH （配列番号:31）
```

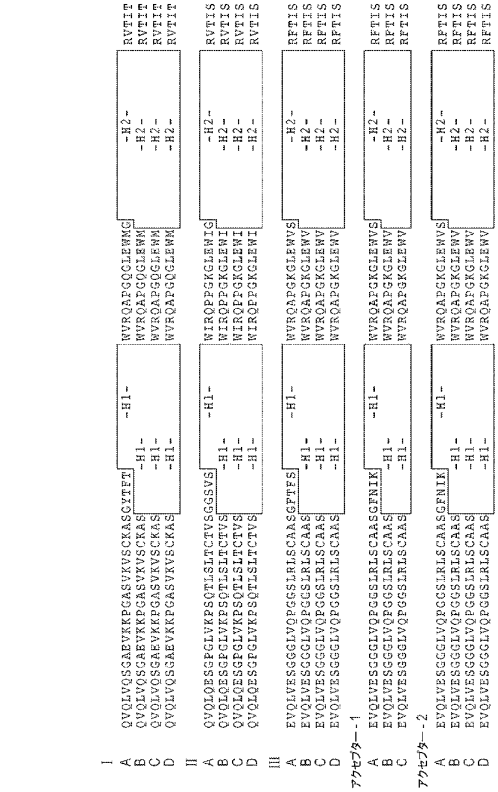
【図２Ａ】



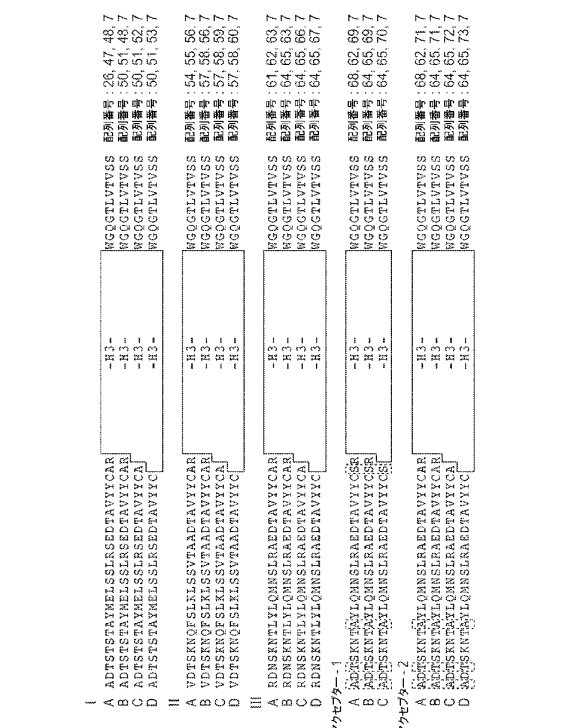
【図２Ｂ】



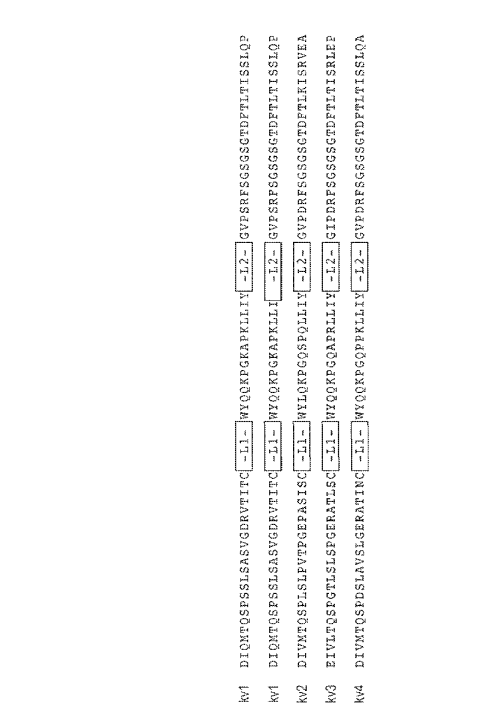
【図３Ａ】



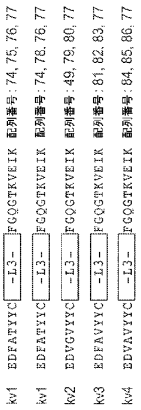
【図３Ｂ】



【図４Ａ】



【図４Ｂ】



【図５Ａ】

```
          230        240        250        260        270
humIgG1     PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
humIgG2     PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
humIgG3     PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV
humIgG4     PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
              ****                                  *     * *

          280        290        300        310        320
humIgG1     DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG2     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
humIgG3     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG4     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
                          *    *    *                    *

          330        340        350        360        370
humIgG1     APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
                                       D L
humIgG2     APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG3     APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG4     SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
            **         *          *
          380        390        400        410        420
humIgG1     EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
humIgG2     EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
humIgG3     EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH
humIgG4     EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
              *         *    *          *          *   *
          430        440
humIgG1     EALHNHYTQKSLSLSPGK  配列番号: 38
humIgG2     EALHNHYTQKSLSLSPGK  配列番号: 39
humIgG3     EALHNRFTQKSLSLSPGK  配列番号: 40
humIgG4     EALHNHYTQKSLSLSLGK  配列番号: 41
              **         *
```

κ軽鎖定常領域コンセンサス配列:

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  配列番号: 37
```

【図５Ｂ】

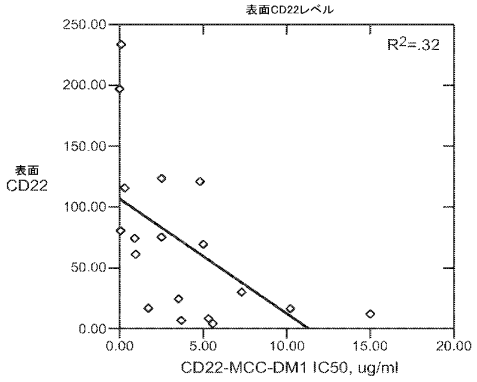
抗CD22 h10F4v2軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC （配列番号:87）

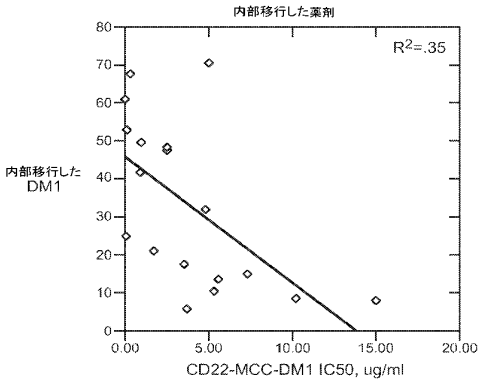
抗CD22 h10F4v2重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号:88）

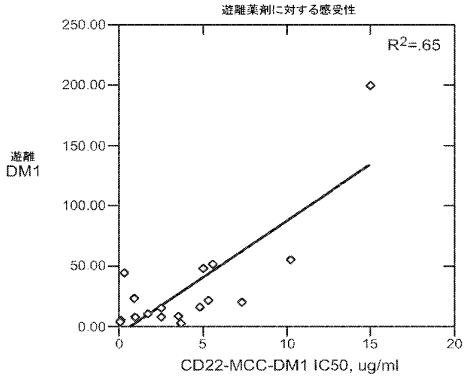
【図６Ａ】



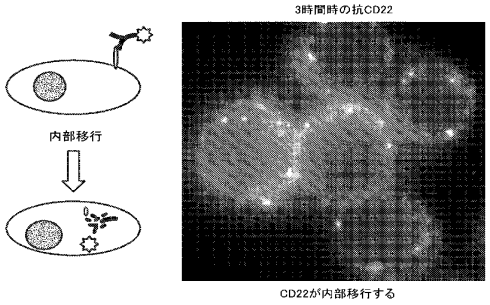
【図６Ｂ】



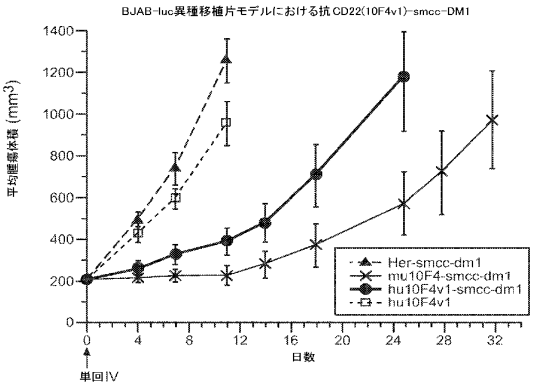
【図６Ｃ】



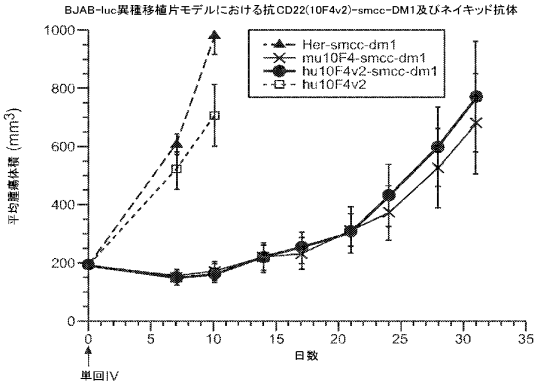
【図６Ｄ】



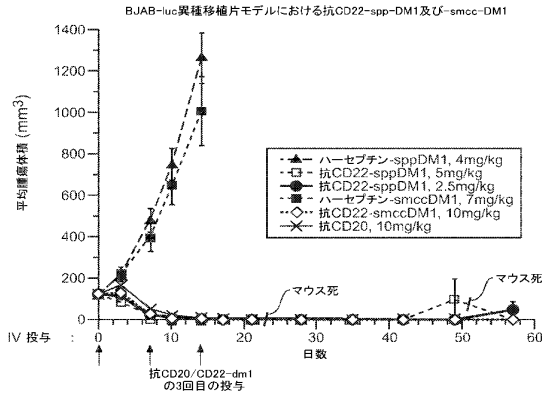
【図７Ａ】



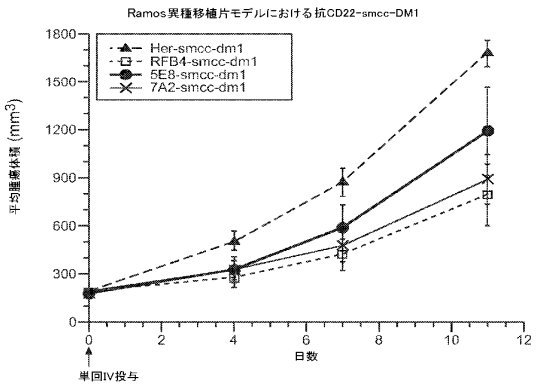
【図７Ｂ】



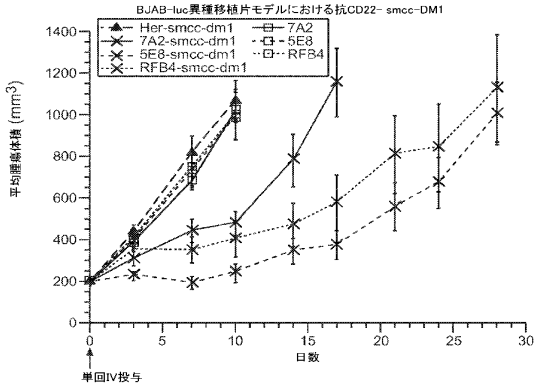
【図７Ｃ】



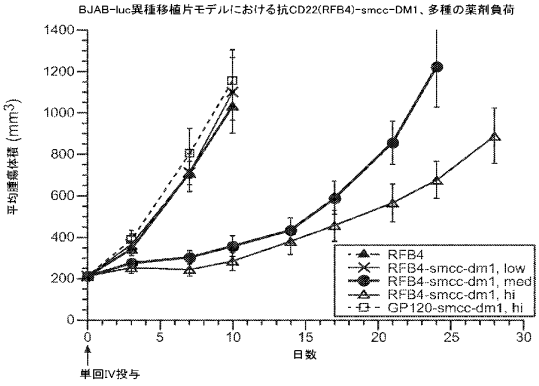
【図８Ａ】



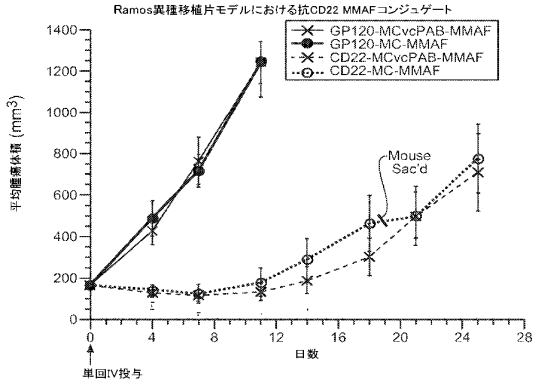
【図８Ｂ】



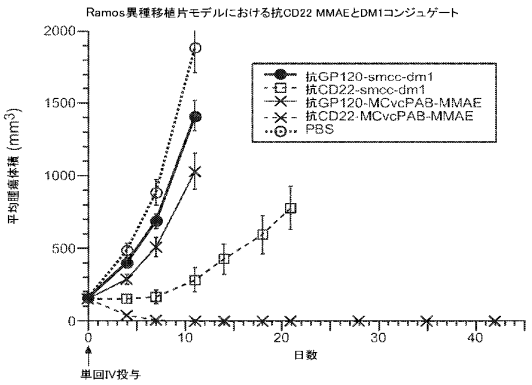
【図９】



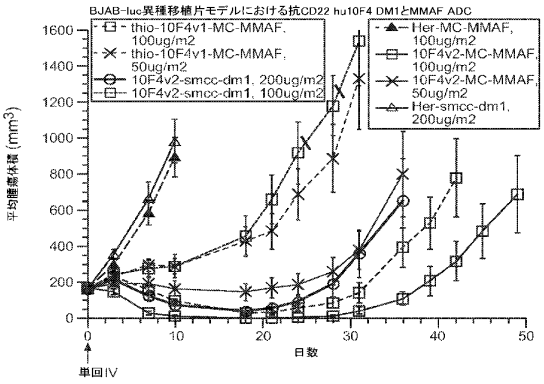
【図１０】



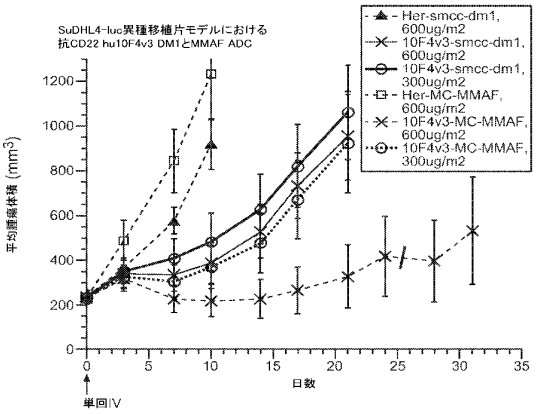
【図１１】



【図１２】

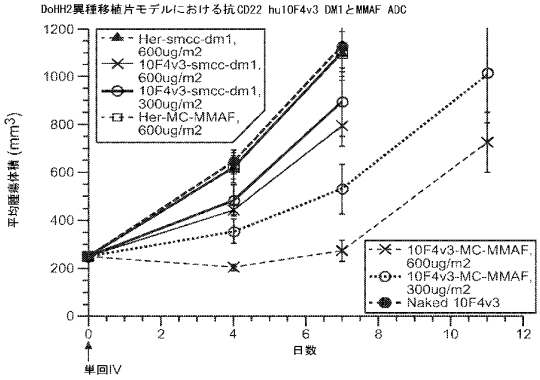


【図１３Ａ】

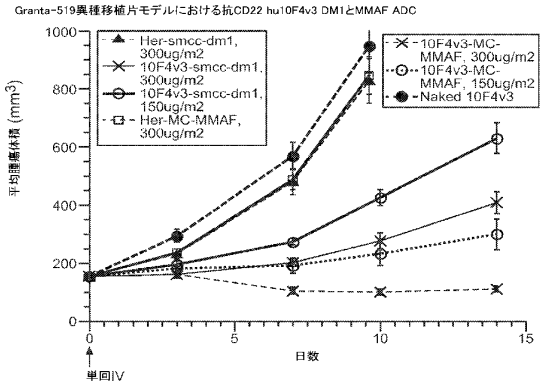


OnCusp
Ex. 1002

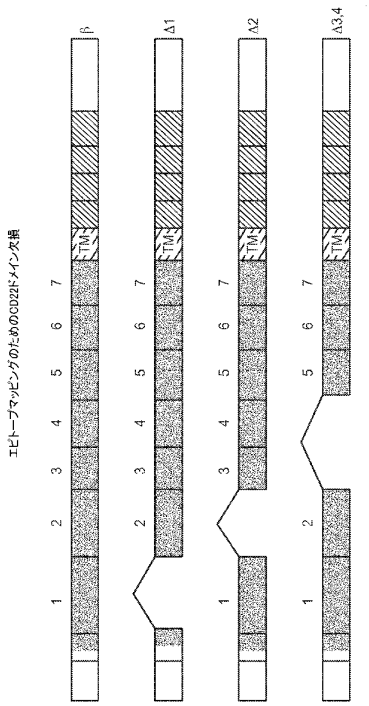
【図１３Ｂ】



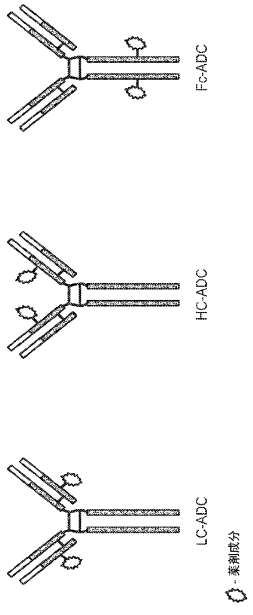
【図１３Ｃ】



【図１４】

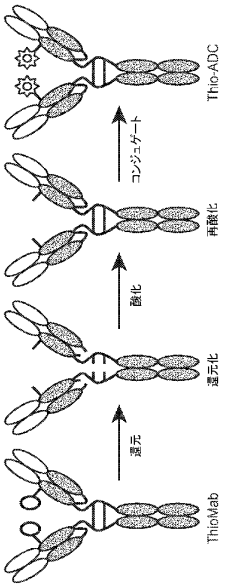


【図１５】



OnCusp
Ex. 1002

【図１６】



【図１７Ａ】

抗CD22 V205C h10F4v3システイン改変軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTK
SFNRGEC （配列番号：91）

【図１７Ｂ】

抗CD22 A118C h10F4v3システイン改変重鎖

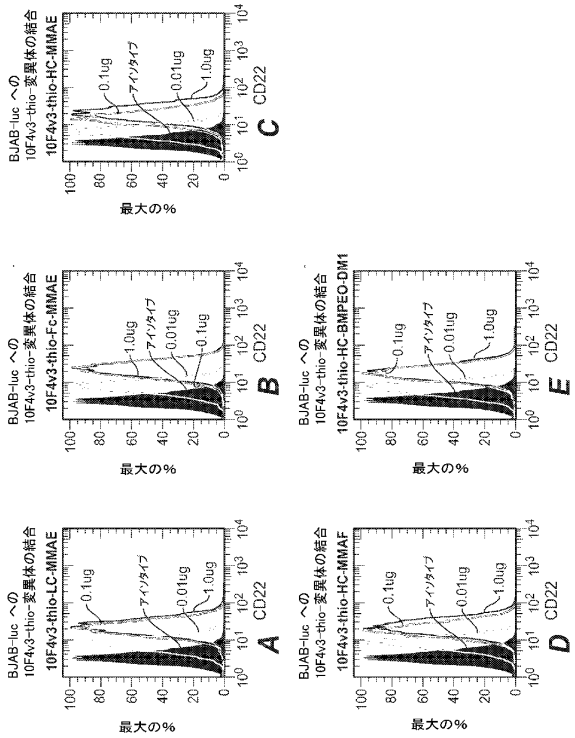
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号：92）

【図１７Ｃ】

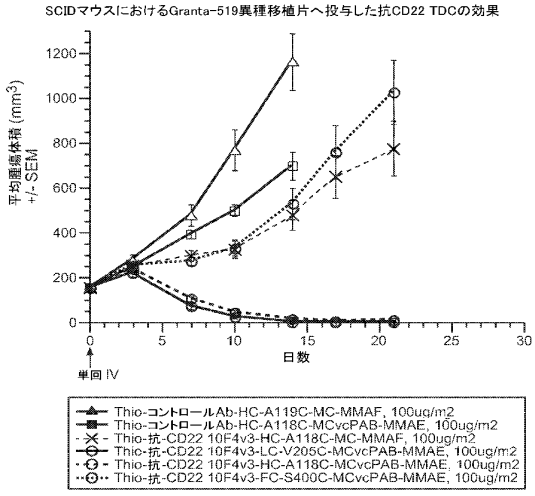
抗CD22 S400C h10F4v3システイン改変Fc領域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSPSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号：93）

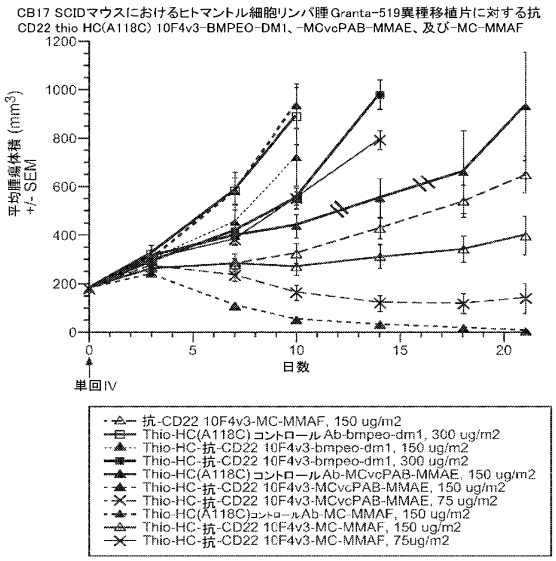
【図１８】



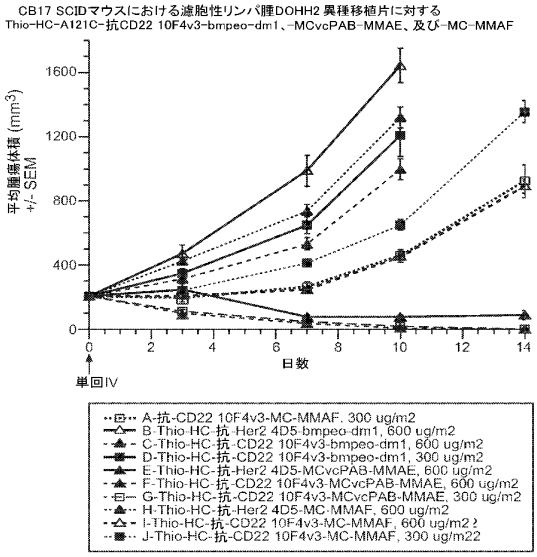
【図１９】



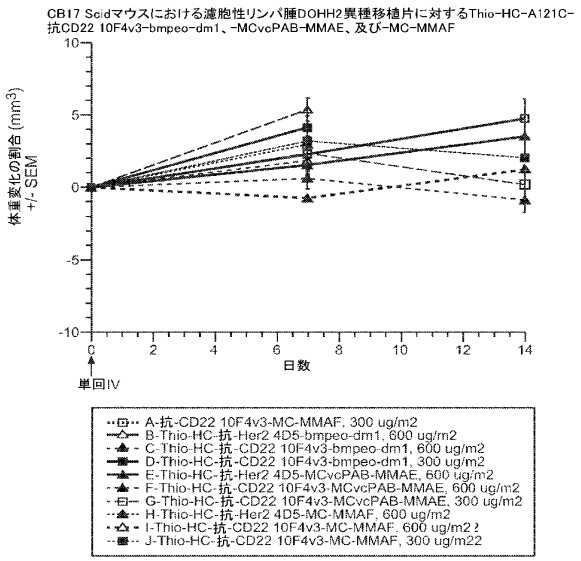
【図２０Ａ】



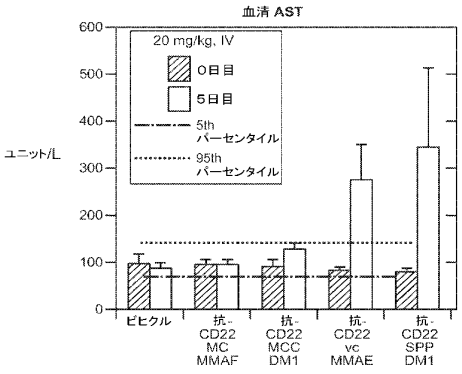
【図２０Ｂ】



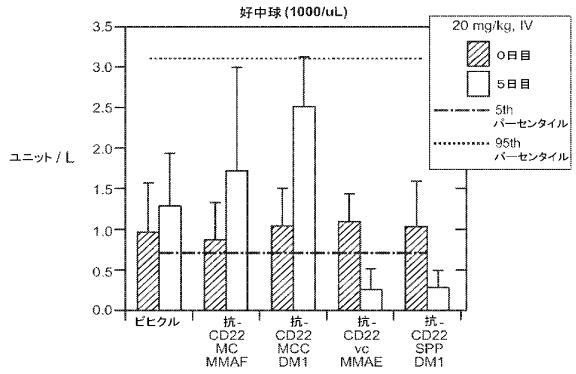
【図２０Ｃ】



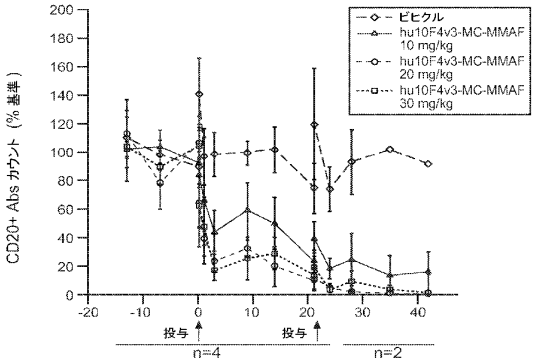
【図２１Ａ】



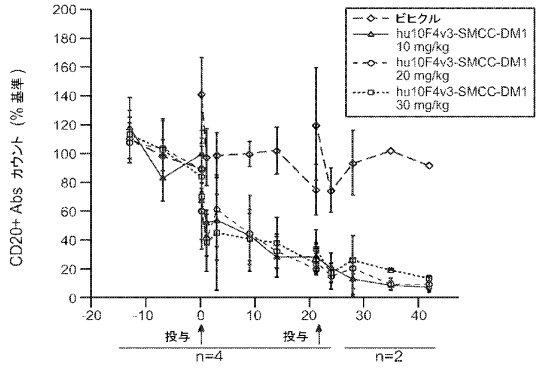
【図２１Ｂ】



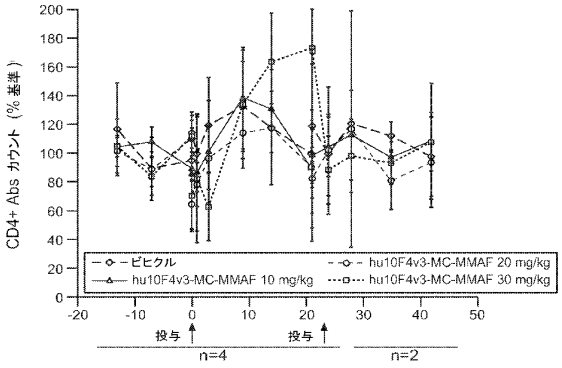
【図２２Ａ】



【図２２Ｂ】

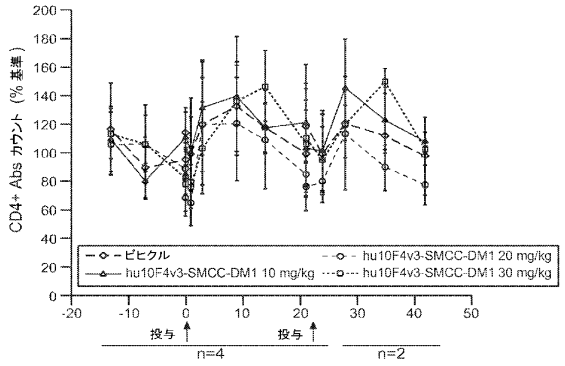


【図２３Ａ】

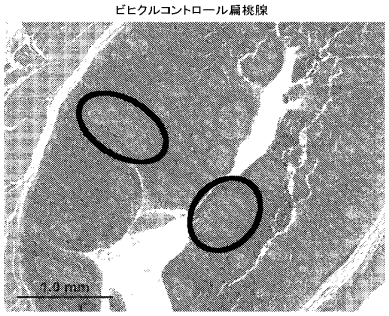


OnCusp
Ex. 1002

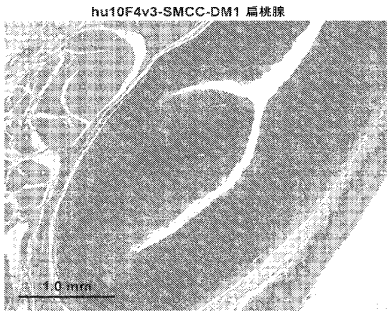
【図２３Ｂ】



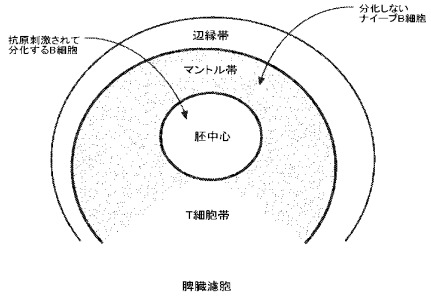
【図２４Ａ】



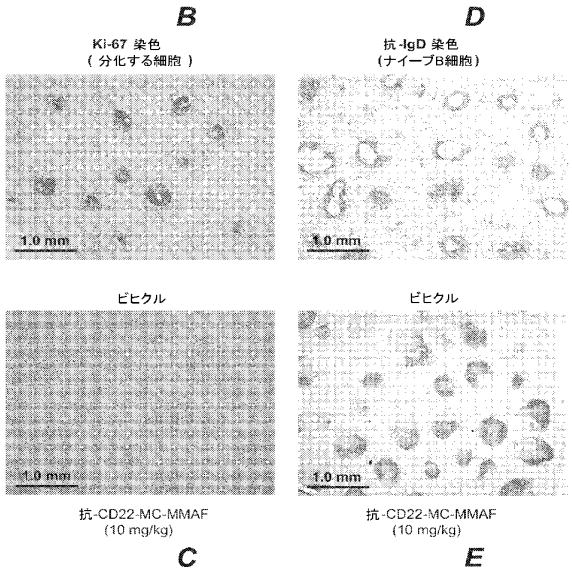
【図２４Ｂ】

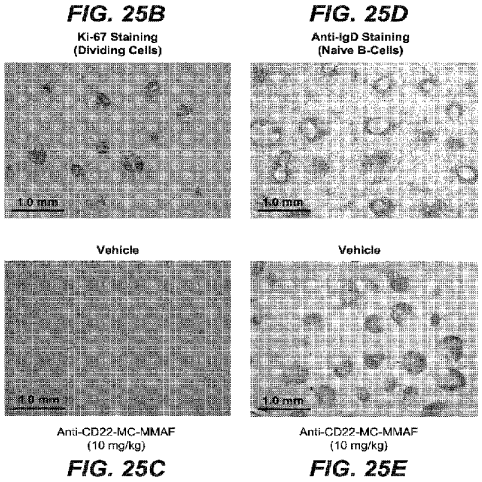


【図２５Ａ】



【図２５Ｂ】





【配列表】
2009538629000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成21年2月3日(2009.2.3)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１２】
本発明は抗ＣＤ２２抗体およびその使用方法を提供する。
一態様では、ＣＤ２２に結合する抗体であって、
(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：１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、
(5) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び、
(6) 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、５つ又は６つのＨＶＲを含んでなる抗体が提供される。
他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：１０の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、及び、
(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。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１３】
他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：９の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、及び、
(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。
他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３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：９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、
(4) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び、
(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。

他の態様では、ＣＤ２２に結合する抗体は、(a) 配列番号：６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｈ３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：１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ１、
(4) 配列番号：１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ-Ｌ２、及び、
(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。
【手続補正３】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】請求項５９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【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。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/069889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48 C07K16/28

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)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/042240 A (WYETH CORP [US]; IYER ANAND [US]; DUNUSSI-JOANNOPOULOS KYRIAKI [US]) 20 April 2006 (2006-04-20) Seq. 28 is 92.24% identical to Seq. 87 of application	1-238
X	WO 03/072736 A (UNIV DUKE [US]; TEDDER THOMAS F [US]) 4 September 2003 (2003-09-04) Seq. 29 is anti-CD22 light chain and comprises Seq. 12 of application the whole document	1-238

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 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
26 November 2007	12/12/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sommerfeld, Teresa

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/069889

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 03/093320 A (CELLTECH R & D LTD. [GB]; POPPLEWELL ANDREW GEORGE [GB]; TICKLE SIMON P) 13 November 2003 (2003-11-13) Seq. 28 is 92.24% identical to Seq. 87 of application the whole document	1-238
A	WO 2005/113003 A (GENENTECH INC [US]; CHAN ANDREW C [US]; GONG QIAN [US]; MARTIN FLAVIUS) 1 December 2005 (2005-12-01) Seq.32 is 95.35% identical to Seq. 88 of application	
A	LEONARD JOHN P ET AL: "Epratuzumab, a humanized anti-CD22 antibody, in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II clinical trial results." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 15 AUG 2004, vol. 10, no. 16, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 5327-5334, XP002459865 ISSN: 1078-0432	
A	DIJOSEPH J F ET AL: "ANTIBODY-TARGETED CHEMOTHERAPY WITH CMC-544: A CD22-TARGETED IMMUNOCONJUGATE OF CALICHEAMICIN FOR THE TREATMENT OF B-LYMPHOID MALIGNANCIES" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 103, no. 5, March 2004 (2004-03), pages 1807-1814, XP008060153 ISSN: 0006-4971	
A	WO 2005/117986 A (GENENTECH INC [US]; EBENS JR ALLEN J [US]; JACOBSON FREDERIC S [US]; P) 15 December 2005 (2005-12-15)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/069889

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. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 142, 143, 145, 146, 148-152, 154, 221, 223-225 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/069889

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006042240 A	20-04-2006	AR 052774 A1	04-04-2007
		AU 2005295041 A1	20-04-2006
		CA 2582919 A1	20-04-2006
		EP 1796735 A2	20-06-2007
WO 03072736 A	04-09-2003	AU 2003215365 A1	09-09-2003
		AU 2003224624 A1	09-09-2003
		CA 2475509 A1	04-09-2003
		CA 2476776 A1	04-09-2003
		CN 1646161 A	27-07-2005
		EP 1476120 A2	17-11-2004
		EP 1485130 A2	15-12-2004
		JP 2005526044 T	02-09-2005
		JP 2005526501 T	08-09-2005
		WO 03072036 A2	04-09-2003
WO 03093320 A	13-11-2003	AU 2003223007 A1	17-11-2003
		CA 2484420 A1	13-11-2003
		CN 1662558 A	31-08-2005
		EP 1504035 A2	09-02-2005
		JP 2006506955 T	02-03-2006
		KR 20050025167 A	11-03-2005
		MX PA04010787 A	07-03-2005
		NZ 536757 A	30-06-2006
		US 2003235869 A1	25-12-2003
		US 2007059307 A1	15-03-2007
		ZA 200408851 A	10-11-2005
WO 2005113003 A	01-12-2005	AU 2005244751 A1	01-12-2005
		BR PI0508762 A	14-08-2007
		CA 2563432 A1	01-12-2005
		EP 1735000 A2	27-12-2006
		KR 20070012408 A	25-01-2007
WO 2005117986 A	15-12-2005	AU 2005249490 A1	15-12-2005
		CA 2567520 A1	15-12-2005
		EP 1753463 A2	21-02-2007
		KR 20070037575 A	05-04-2007

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード(参考)
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61K	39/395	N	4H045
A61P 35/04	***(2006.01)***	A61P	35/00		
A61P 35/02	***(2006.01)***	A61P	35/04		
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	35/02		
G01N 33/53	***(2006.01)***	A61P	43/00	105	
G01N 21/78	***(2006.01)***	G01N	33/53	D	
		G01N	33/53	K	
		G01N	21/78	C	

(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,MT,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 グレイ, アラン エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリズベン, ケストレル コート 122
(72)発明者 リャン, ウェイ-チン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, シー スプレイ レーン 840 112号室
(72)発明者 ウー, ヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, ブライス ストリート 1160
(72)発明者 ユ, シャン-ファン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95035, ミルピータス, サンダルウッド レーン 103

Fターム(参考) 2G054 AA07 AA08 AB05 CA22 CA23 CE02 EA03
4B024 AA01 BA43 CA04 CA20 DA02 EA03 GA11
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB11 CC05 DD84 DD87 DD51
4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74

(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2010-513524
(P2010-513524A)

(43)公表日　平成22年4月30日(2010.4.30)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07D 471/04	(2006.01)	C07D 471/04	104Z	4C065
A61K 31/4745	(2006.01)	C07D 471/04	CSP	4C084
A61K 31/496	(2006.01)	A61K 31/4745		4C086
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 31/496		
A61P 43/00	(2006.01)	A61K 45/00		

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 187 頁）　最終頁に続く

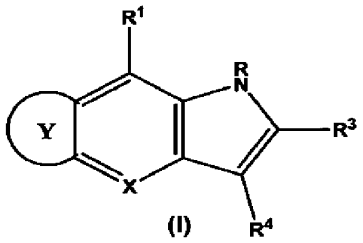
(21)出願番号　特願2009-542924 (P2009-542924)
(86)(22)出願日　平成19年12月19日 (2007.12.19)
(85)翻訳文提出日　平成21年8月18日 (2009.8.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/026065
(87)国際公開番号　WO2008/079293
(87)国際公開日　平成20年7月3日 (2008.7.3)
(31)優先権主張番号　60/876,501
(32)優先日　平成18年12月21日 (2006.12.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　596129215
シェーリング　コーポレイション
Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ
アメリカ合衆国　ニュージャージー　０７０３３－０５３０，ケニルワース，ギャロッピング　ヒル　ロード　２０００
(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

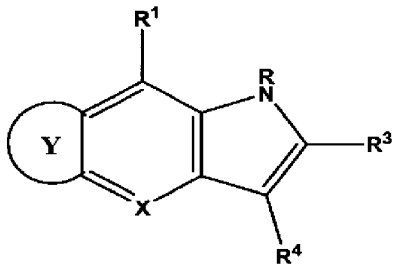
(54)【発明の名称】ＫＳＰキネシン活性を阻害するためのピロロ［３，２－Ａ］ピリジン誘導体

(57)【要約】
本発明は、式Ｉ（式中、Ｒ、Ｒ^{1}、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、Ｘ、および環Ｙは、本明細書中で定義されるとおりである）の化合物を提供する。本発明はまた、ＫＳＰキネシン活性に関連する細胞増殖性の疾患または障害を治療するため、およびＫＳＰキネシン活性を阻害するために有用であるこれらの化合物を含む組成物を提供する。被験体において、ＫＳＰキネシン活性に関連する細胞増殖性の疾患、障害を処置するため、および／またはＫＳＰキネシン活性を阻害するための方法であって、このような処置の必要な被験体に対して、有効な量の少なくとも１つの本発明の化合物を投与することを包含する、方法も提供される。



(I)

【特許請求の範囲】
【請求項１】
構造式（Ｉ）：
【化１６７】



式(I)

によって表される化合物、あるいはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物またはエステルであって、
環Ｙは、式Ｉに示すように縮合された３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルであり、該３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルは、必要に応じて、１～２個のR^2部分で置換されており；
ＸはＮまたはＮ－酸化物であり；
ＲおよびＲ^{1}は各々独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}$－OR^8、－$C(O)R^5$、－$C(S)R^5$、－$C(O)OR^8$、－$C(S)OR^8$、－$OC(O)R^8$、－$OC(S)R^8$、－$C(O)NR^5R^6$、－$C(S)NR^5R^6$、－$C(O)NR^5OR^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)NR^8NR^5R^6$、－$C(S)NR^8NR^5R^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)SR^8$、－NR^5R^6、－$NR^5C(O)R^6$、－$NR^5C(S)R^6$、－$NR^5C(O)OR^8$、－$NR^5C(S)OR^8$、－$OC(O)NR^5R^6$、－$OC(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5R^6$、－$NR^5C(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5OR^8$、－$NR^5C(S)NR^5OR^8$、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}SR^8$、SO_2R^8、－$S(O)_{1-2}NR^5R^6$、－$N(R^8)SO_2R^8$、－$S(O)_{1-2}NR^6OR^8$、－ＣＮ、－OCF_3、－SCF_3、－$C(=NR^8)NR^5$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、ハロアルキルおよびアルキルシリルからなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアラルキルの各々が独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；
各々のR^2は独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、アルキルシリル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}$－OR^8、－$C(O)R^5$、－$C(S)R^5$、－$C(O)OR^8$、－$C(S)OR^8$、－$OC(O)R^8$、－$OC(S)R^8$、－$C(O)NR^5R^6$、－$C(S)NR^5R^6$、－$C(O)NR^5OR^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)NR^8NR^5R^6$、－$C(S)NR^8NR^5R^6$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)SR^8$、－NR^5R^6、－$NR^5C(O)R^6$、－$NR^5C(S)R^6$、－$NR^5C(O)OR^8$、－$NR^5C(S)OR^8$、－$OC(O)NR^5R^6$、－$OC(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5R^6$、－$NR^5C(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5OR^8$、－$NR^5C(S)NR^5OR^8$、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}SR^8$、SO_2R^8、－$S(O)_{1-2}NR^5R^6$、－$N(R^8)SO_2R^8$、－$S(O)_{1-2}NR^6OR^8$、－ＣＮ、－OCF_3、－SCF_3、－$C(=NR^8)NR^5$、－$C(O)NR^8$（ＣＨ

$_2)_{1-10}NR^5R^6$、$-C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、$-C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、および$-C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$からなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は1～5個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されているか；

あるいは同じ炭素原子上の2つのR^2はそれらが結合する炭素原子と必要に応じて一緒になって、C=O、C=Sまたはエチレンジオキシ基を形成し；

R^3およびR^4は各々独立して、H、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、$-C(O)R^5$、$-C(S)R^5$、$-C(O)OR^8$、$-C(S)OR^8$、$-OC(O)R^8$、$-OC(S)R^8$、$-C(O)NR^5R^6$、$-C(S)NR^5R^6$、$-C(O)NR^5OR^8$、$-C(S)NR^5OR^8$、$-C(O)NR^8NR^5R^6$、$-C(S)NR^8NR^5R^6$、$-C(S)NR^5OR^8$、$-C(O)SR^8$、$-NR^5R^6$、$-NR^5C(O)R^6$、$-NR^5C(S)R^6$、$-NR^5C(O)OR^8$、$-NR^5C(S)OR^8$、$-OC(O)NR^5R^6$、$-OC(S)NR^5R^6$、$-NR^5C(O)NR^5R^6$、$-NR^5C(S)NR^5R^6$、$-NR^5C(O)NR^5OR^8$、$-NR^5C(S)NR^5OR^8$、$-(CR^{11}R^{12})_{0-6}SR^8$、$SO_2R^8$、$-S(O)_{1-2}NR^5R^6$、$-N(R^8)SO_2R^8$、$-S(O)_{1-2}NR^6OR^8$、$-CN$、$-C(=NR^8)NR^5R^6$、$-C(=NOR^8)NR^5$、$-C=N-N(R^8)-C(=S)NR^5R^6$、$-C(O)N(R^8)-(CN^{40}R^{41})_{1-5}-C(=NR^8)NR^5R^6$、$-C(O)N(R^8)(CR^{40}R^{41})_{1-5}-NR^5R^6$、$-C(O)N(R^8)(CR^{40}R^{41})_{1-5}-C(O)-NR^5R^6$、$-C(O)N(R^8)(CR^{40}R^{41})_{1-5}-OR^8$、$-C(S)NR^8(CH_2)_{1-5}NR^5R^6$および$-C(S)NR^8(CH_2)_{1-5}OR^8$からなる群より選択され、該アルキル、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は独立して1～5個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^5およびR^6は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、$-OR^8$、$-C(O)R^8$、および$-C(O)OR^8$からなる群より選択され、ただし、R^5およびR^6は同時に$-OR^8$ではなく；該アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、1～4個のR^9部分によって必要に応じて置換されているか；またはR^5およびR^6は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；

各々のR^8は独立して、H、アルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、およびヘテロアラルキルからなる群より選択され、Hを除くR^8の各メンバーは1～4個のR^9部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^9は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、$-NO_2$、$-OR^{11}$、$-OC(=O)R^{11}$、$(C_1-C_6$アルキル$)-OR^{11}$、$-CN$、$-NR^{11}R^{12}$、$-C(O)R^{11}$、$-C(O)OR^{11}$、$-C(O)NR^{11}R^{12}$、$-CF_3$、$-OCF_3$、$-CF_2CF_3$、$-C(=NOH)R^{11}$、$-N(R^{11})C(=O)R^{12}$、$-C(=NR^{11})NR^{11}R^{12}$、および$-NR^{11}C(=O)OR^{12}$からなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、1～4個のR^{42}部分で置換されてもよく；ここで該シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、該シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリール内のいず

れかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成するか；または２つのR^9部分は、同じ炭素原子に結合するとき、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になってＣ＝ＯまたはＣ＝Ｓ基を形成し；

各々のR^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-4}$$NR^5R^6$、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－Ｃ（Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（Ｏ）OR^8、－ＯＣ（Ｏ）R^5、－ＯＣ（Ｏ）NR^5R^6、－NR^5Ｃ（Ｏ）R^6、－NR^5Ｃ（Ｏ）OR^6、－NR^5Ｃ（Ｏ）NR^5R^6、－SR^8、－Ｓ（Ｏ）R^8、および－Ｓ（Ｏ）$_2$$R^8$からなる群より選択され、該アルキル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々は必要に応じて、１～４個のR^{13}部分で独立して置換され；

各々のR^{11}は独立して、Ｈまたはアルキルであり；

各々のR^{12}は独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールであり、またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、ＯまたはＳから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－NH_2、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}は独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、アルキルシリル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－ＣＮ、－$NR^{11}R^{12}$、－Ｃ（Ｏ）R^{11}、－Ｃ（Ｏ）OR^{11}、－Ｃ（Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－Ｎ（R^{11}）Ｃ（Ｏ）R^{12}、および－NR^{11}Ｃ（Ｏ）OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換され；かつ

各々のR^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；

ただし、ＲおよびＲ^{3}はそれらがそれぞれ結合されることが示される環の窒素および炭素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはヘテロシクレニルの環を形成し、該環は必要に応じて、オキソ、チオキソ、－OR^{12}、－$NR^{11}R^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）R^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）OR^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、および－NR^{11}Ｃ（＝Ｏ）R^{12}からなる群より独立して選択される１～３個の部分で置換されている、化合物。

【請求項２】

環Ｙが３員～７員のシクロアルキルであり、１～２個のR^2部分で必要に応じて置換されている、請求項１に記載の化合物。

【請求項３】

環Ｙが６員のシクロアルキルであり、１～２個のR^2部分で必要に応じて置換されている、請求項１または２に記載の化合物。

【請求項４】

環Ｙが１つのR^2部分で置換されている、請求項１、２または３に記載の化合物。

【請求項５】

R^2がアルキルである、請求項１～４のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項６】
R^2がｔ－ブチルである、請求項５に記載の化合物。
【請求項７】
Ｒが、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）R^5からなる群より選択される、請求項１に記載の化合物。
【請求項８】
R^5がアルキルである、請求項７に記載の化合物。
【請求項９】
R^1がＨである、請求項１に記載の化合物。
【請求項１０】
ＲがＨである、請求項９に記載の化合物。
【請求項１１】
請求項１に記載の化合物であって、R^3およびR^4が各々独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｃ（Ｏ）R^5、－Ｃ（Ｏ）OR^8、－Ｃ（Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（Ｏ）$NR^8NR^5R^6$、－NR^5R^6、－$NR^5C(O)R^6$、－$N(R^8)SO_2R^8$、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯR^8）R^5、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（R^8）－Ｃ（＝Ｓ）NR^5R^6からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々が独立して、１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換されており；
R^5およびR^6の各々が独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されるか；またはR^5およびR^6が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^8が独立して、１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；
各々のR^9が独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－OR^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）R^{11}、－ＣＮ、－$NR^{11}R^{12}$、－$NR^{11}C(=O)OR^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、－$NR^{11}C(=O)R^{12}$、および－Ｃ（Ｏ）OR^{11}からなる群より選択され；該アルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のR^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上の２つのラジカルを含み、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のR^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－NR^5R^6、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（＝Ｏ）OR^8、－ＯＣ（＝Ｏ）R^5、－ＯＣ（＝Ｏ）NR^5R^6、－$NR^5C(=O)R^6$、－$NR^5C(=O)OR^6$、－$NR^5C(=O)NR^5R^6$、および－Ｓ（＝Ｏ）$_2R^8$からなる群より選択され、該ヘテロシクリル、アリールおよびヘテロアリール部分の各々が必要に応じて、１～４個のR^{13}部分で独立して置換され；
各々のR^{11}が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ
各々のR^{12}が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子

を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－NH_2、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、$-NO_2$、$-OR^{11}$、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－ＣＮ、$-NR^{11}R^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）R^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）OR^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、$-CF_3$、$-OCF_3$、$-NR^{11}C(=O)R^{12}$、および$-NR^{11}C(=O)OR^{12}$からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ

各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。

【請求項１２】

請求項１１に記載の化合物であって、R^3が、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、－Ｃ（Ｏ）R^5、－Ｃ（Ｏ）OR^8、－Ｃ（Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（Ｏ）$NR^8NR^5R^6$、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯR^8）R^5、および$-C=N-N(R^8)-C(=S)NR^5R^6$からなる群より選択され、該アルキル、およびアルケニルの各々が独立して、１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^5およびR^6が独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されるか；またはR^5およびR^6が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^8が独立して、１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；

各々のR^9が独立して、アルキル、アリール、ヘテロアリール、$-OR^{11}$、－Ｏ（＝Ｏ）R^{11}、－ＣＮ、$-NR^{11}R^{12}$、および－Ｃ（Ｏ）OR^{11}からなる群より選択され、該アルキル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のR^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々のR^{10}は独立して、アルコキシ、ＯＨ、ハロアルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、$-NR^5R^6$、－ＣＮ、－ＯＣ（＝Ｏ）R^5、および－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキルからなる群より選択され、該ヘテロシクリル、およびアリールの各々が必要に応じて独立して、１～４個のR^{13}部分で置換されており；

各々のR^{11}が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ

各々のR^{12}が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、ＯもしくはＳから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアル

ケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－NH_2、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；

各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－ＣＮ、－$NR^{11}R^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）R^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）OR^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－NR^{11}Ｃ（＝Ｏ）R^{12}、および－NR^{11}Ｃ（＝Ｏ）OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。

【請求項１３】

請求項１２に記載の化合物であって、R^3がＨ、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、H_2ＮＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－ＮＨ－（Ｃ＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－、アルコキシ、NH_2－アルキル－、ＮＣ－アルキル－、アリール－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－、ＮＣ－アルキル－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル－、H_2Ｎ－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－Ｎ＝ＣＨ－、アルキル－Ｃ（＝ＮＯＨ）－、およびヘテロシクリル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；該アルキル、アルケニル、ならびにアリール－アルキル－、およびアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の「アルキル」部分の各々が、ヒドロキシおよびNH_2からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換されており；該アリール－アルキル－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の各々の「アリール」部分が、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、NH_2、およびヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換されており；任意の該R^3基の「アリール」部分が、２つの隣接する基を含むとき、このような部分が、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、５～６員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成している、化合物。

【請求項１４】

請求項１１に記載の化合物であって、R^4が、Ｈ、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、アリール、－Ｃ（＝Ｏ）R^5、－Ｃ（＝Ｏ）OR^8、－Ｃ（＝Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^8NR^5R^6$、－NR^5R^6、－NR^5Ｃ（＝Ｏ）R^6、－$NR^8SO_2R^8$からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々が独立して、１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^5およびR^6が独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されているか；またはR^5およびR^6が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のR^9部分で必要に応じ

て置換されており；
各々のR[8]が独立して、１～４個のR[9]部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；
各々のR[9]が独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－OC(=O)R[11]、－CN、－NR[11]R[12]、－NR[11]C(=O)OR[12]、－C(=O)NR[11]R[12]、－NR[11]C(=O)R[12]、および－C(=O)OR[11]からなる群より選択され；該アルキル、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のR[42]部分で必要に応じて置換されており；ここで該ヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルが必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のR[10]が独立して、H、アルキル、アルコキシ、OH、CN、－O－アルキル－O－アルキル、－NR[5]R[6]、ハロアルコキシ、－C(=O)NR[5]R[6]、－NR[5]C(=O)R[6]、－NR[5]C(=O)OR[6]および－S(=O)$_2$R[8]からなる群より選択され；
各々のR[42]が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO$_2$、－OR[11]、－(C$_1$－C$_6$アルキル)－OR[11]、－CN、－NR[11]R[12]、－C(=O)R[11]、－C(=O)OR[11]、－C(=O)NR[11]R[12]、－CF$_3$、－OCF$_3$、－NR[11]C(=O)R[12]、および－NR[11]C(=O)OR[12]からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR[43]部分で必要に応じて置換されており；
各々のR[11]が独立して、Hまたはアルキルであり；かつ
各々のR[12]が独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR[11]およびR[12]が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、N、Oもしくは Sから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該R[12]のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－CN、－OH、－NH$_2$、－N(H)アルキル、－N(アルキル)$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF$_3$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；
各々のR[43]が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。
【請求項１５】
請求項１４に記載の化合物であって、R[4]が、H、ハロ、ニトロ、H$_2$N－、アルキル、HO－アルキル－、(HO)$_2$アルキル－、アルキル－C(=O)－アルキル－C(=O)－NH－、アルケニル－C(=O)－アルキル－C(=O)－NH－、H$_2$N－C(=O)－アルキル－からなる群より選択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－C(=O)－NH－、NC－アルキル－、H$_2$N－アルキル－、アルキル－O－C(=O)－NH－、HO－C(=O)－NH－、アルキル－C(=O)－O－アルキル－C(=O)－NH－、アルキル－O－C(=O)－アルケニル－、ヘテロアリール－C(=O)－NH－、ヘテロシクリル、HO－アルキニル－、アルキル－O－アルキル－NH－、HO－アルキル－NH－、アルキル－S(=O)$_2$NH－、アルキル－O－C(=O)－、HO－アルキル－NH－C(=O)－、(HO)$_2$アルキル－NH－C(=O)－、H$_2$N－アルキル－NH－C(=O)－、ヘテロシクリル－アルキル－NH－C(=O)－、ヘテロアリール－アルキル－NH－C(=O)－、アルケニル－NH－C(=O)－、H$_2$N－NH－C(=O)－、H$_2$N－C(=O)－、アルキル－C(=O)－NH－

、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリールで置換されており、これが必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、$Ｈ_2Ｎ$－およびアルキル－Ｓ（＝Ｏ）－からなる群より選択される１～２個の部分で置換されている、化合物。

【請求項１６】

請求項１に記載の化合物であって、ここで：

ＸがＮであり；

環Ｙがアルキルで置換されている６員のシクロアルキルであり、

Ｒが、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）$Ｒ^5$からなる群より選択され；

$Ｒ^1$がＨであり；

$Ｒ^3$が、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルコキシ、－Ｃ（Ｏ）$Ｒ^5$、－Ｃ（Ｏ）$ＯＲ^8$、－Ｃ（Ｏ）$ＮＲ^5Ｒ^6$、－Ｃ（Ｏ）$ＮＲ^8ＮＲ^5Ｒ^6$、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯ$Ｒ^8$）$Ｒ^5$、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（$Ｒ^8$）－Ｃ（＝Ｓ）$ＮＲ^5Ｒ^6$からなる群より選択され、該アルキル、およびアルケニルの各々は独立して１～５個の$Ｒ^{10}$部分によって必要に応じて置換されており；かつ

$Ｒ^4$は、Ｈ、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、アリール、－Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^5$、－Ｃ（＝Ｏ）$ＯＲ^8$、－Ｃ（＝Ｏ）$ＮＲ^5Ｒ^6$、－Ｃ（＝Ｏ）$ＮＲ^8ＮＲ^5Ｒ^6$、－$ＮＲ^5Ｒ^6$、－$ＮＲ^5$Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^6$、－$ＮＲ^8Ｓ_2Ｒ^8$からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、およびアリールの各々は、独立して１～５個の$Ｒ^{10}$部分で必要に応じて置換され；

各々の$Ｒ^5$および$Ｒ^6$は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が１～４個の$Ｒ^9$部分によって必要に応じて置換されているか；または$Ｒ^5$および$Ｒ^6$は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；その各々が１～４個の$Ｒ^9$部分によって必要に応じて置換されており；

各々の$Ｒ^8$は独立して、１～４個の$Ｒ^9$部分によって必要に応じて置換されているアルキルであり；

各々の$Ｒ^9$は独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－$ＯＲ^{11}$、－Ｏ Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^{11}$、－ＣＮ、－$ＮＲ^{11}Ｒ^{12}$、－Ｎ（$Ｒ^{11}$）Ｃ（＝Ｏ）$ＯＲ^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）$ＮＲ^{11}Ｒ^{12}$、－Ｎ（$Ｒ^{11}$）Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^{12}$、および－Ｃ（Ｏ）$ＯＲ^{11}$からなる群より選択され、該アルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、必要に応じて１～４個の$Ｒ^{42}$部分で置換されており；ここで該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々の$Ｒ^{10}$が独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－$ＮＲ^5Ｒ^6$、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）$ＮＲ^5Ｒ^6$、－Ｃ（＝Ｏ）$ＯＲ^8$、－Ｏ Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^5$、－Ｏ Ｃ（＝Ｏ）$ＮＲ^5Ｒ^6$、－$ＮＲ^5$Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^6$、－$ＮＲ^5$Ｃ（＝Ｏ）$ＯＲ^6$、－$ＮＲ^5$Ｃ（＝Ｏ）$ＮＲ^5Ｒ^6$、および－Ｓ（Ｏ）$_2Ｒ^8$からなる群より選択され、該ヘテロシクリル、アリールおよびヘテロアリール部分の各々は必要に応じて、１～４個の$Ｒ^{13}$部分で独立して置換されており；

各々の$Ｒ^{11}$が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ

各々の$Ｒ^{12}$が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；または$Ｒ^{11}$および$Ｒ^{12}$は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子

を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－NH_2、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、$-NO_2$、$-OR^{11}$、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－ＣＮ、$-NR^{11}R^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）R^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）OR^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、$-CF_3$、$-OCF_3$、$-NR^{11}C(=O)R^{12}$、および$-NR^{11}C(=O)OR^{12}$からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ

各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。

【請求項１７】

請求項１６に記載の化合物であって、式中：

ＸがＮであり；

環Ｙがアルキルで置換されている６員のシクロアルキルであり、

Ｒが、Ｈおよびアルキル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；

R^1がＨであり；

R^3が、Ｈ、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、H_2NNH－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－ＮＨ－（Ｃ＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－、アルコキシ、NH_2－アルキル－、ＮＣ－アルキル－、アリール－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－、ＮＣ－アルキル－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル－、H_2N－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－Ｎ＝ＣＨ－、アルキル－Ｃ（＝ＮＯＨ）－、およびヘテロシクリル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；該アルキル、アルケニル、ならびにアリール－アルキル－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の「アルキル」部分の各々が、ヒドロキシおよびNH_2からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；該アリール－アルキル－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の各々の「アリール」部分が、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、NH_2、アリール－（＝Ｏ）－ＮＨ－およびヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；任意の該R^3基の「アリール」部分が２つの隣接する部分を含むとき、このような部分は、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、５～６員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；かつ

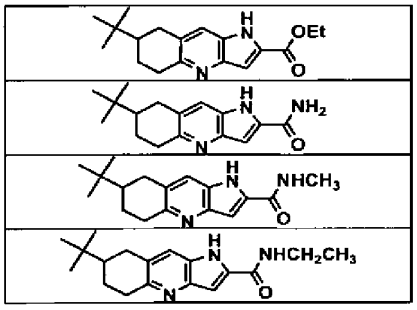
R^4が、Ｈ、ハロ、ニトロ、H_2N－、アルキル、ＨＯ－アルキル－、（ＨＯ）$_2$アルキル－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルケニル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、H_2N－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－からなる群より選択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＮＣ－アルキル－、H_2N－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＨＯ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－アルケニル－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロシクリル、ＨＯ

－アルキニル－、アルキル－Ｏ－アルキル－ＮＨ－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、（ＨＯ）$_2$アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、Ｈ$_2$Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルケニル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、Ｈ$_2$Ｎ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、Ｈ$_2$Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリールで置換されており、これは必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、Ｈ$_2$Ｎ－、アルキル－Ｓ、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）－およびアルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－からなる群より選択される１～２個の部分で置換されている、化合物。

【請求項１８】

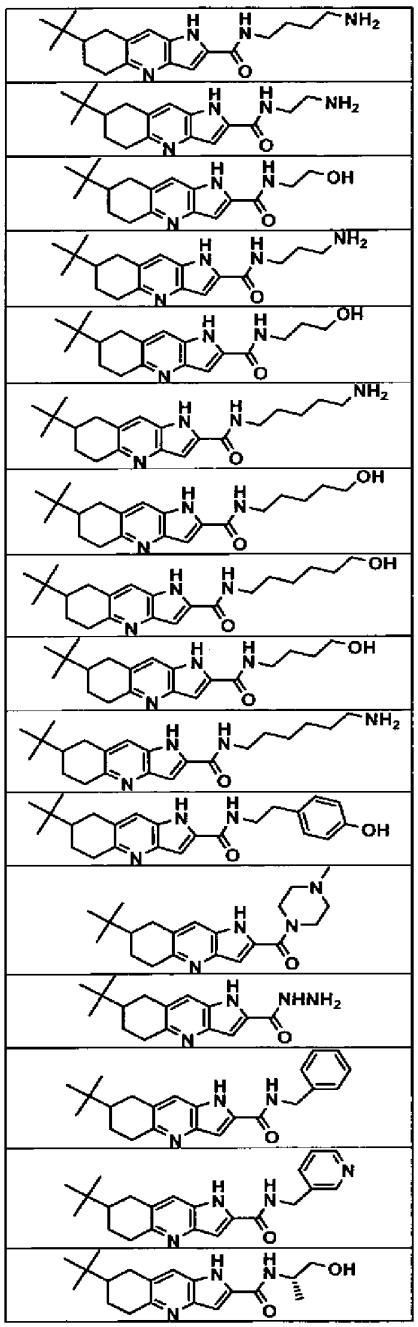
以下：

【表Ｅ－１】



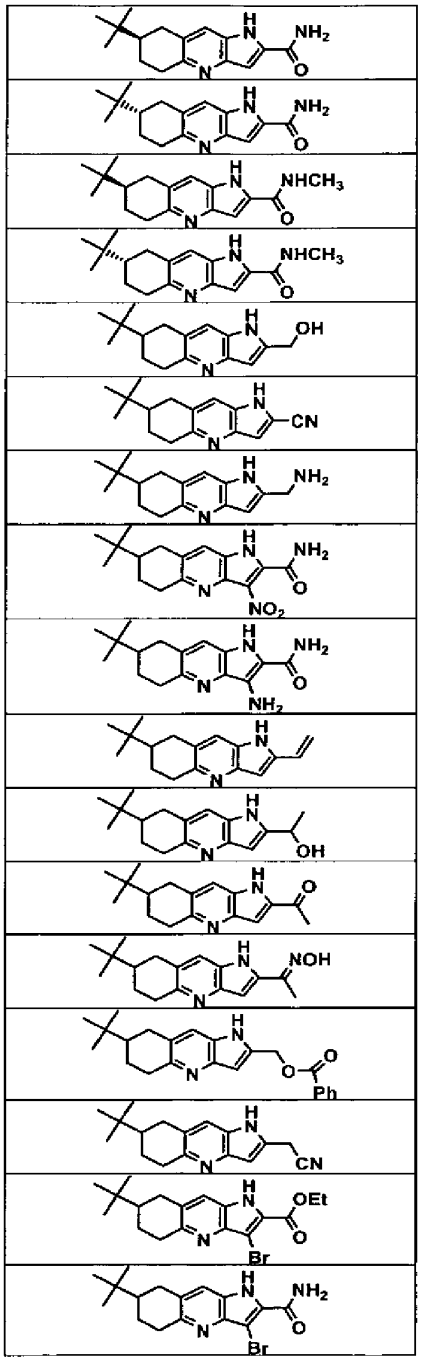
OnCusp
Ex. 1002

【表E－2】



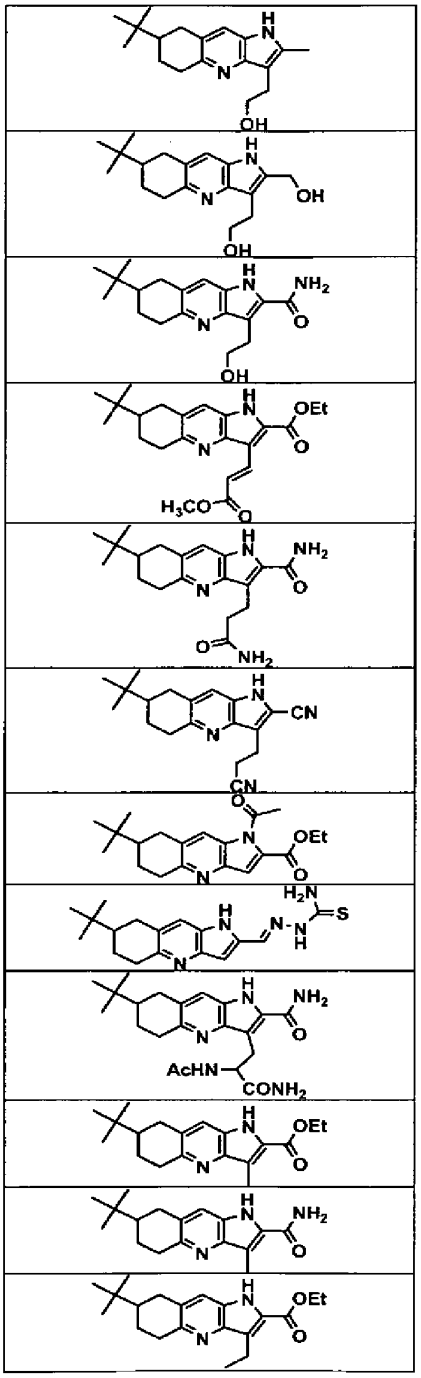
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－３】



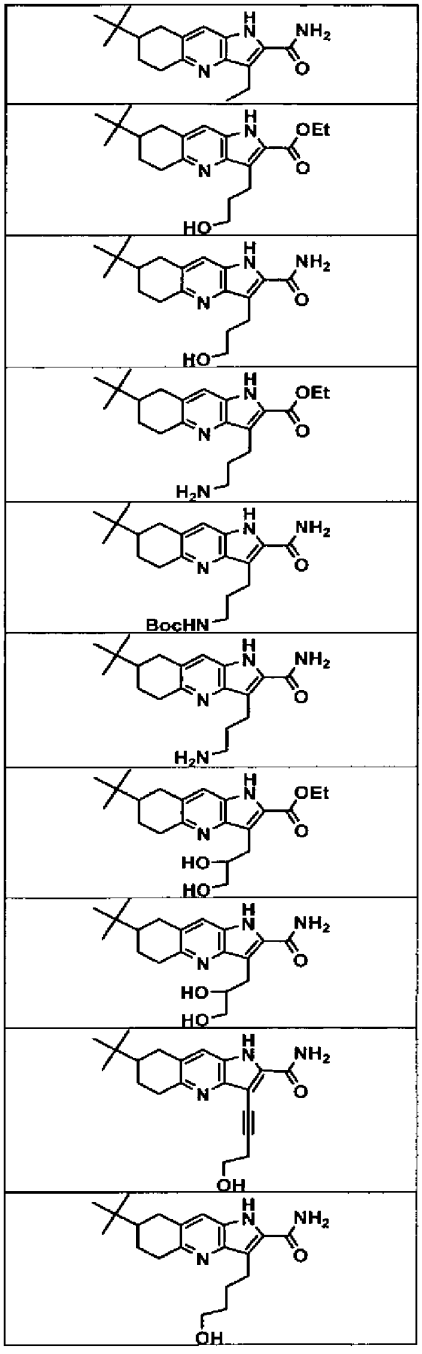
OnCusp
Ex. 1002

【表E－4】



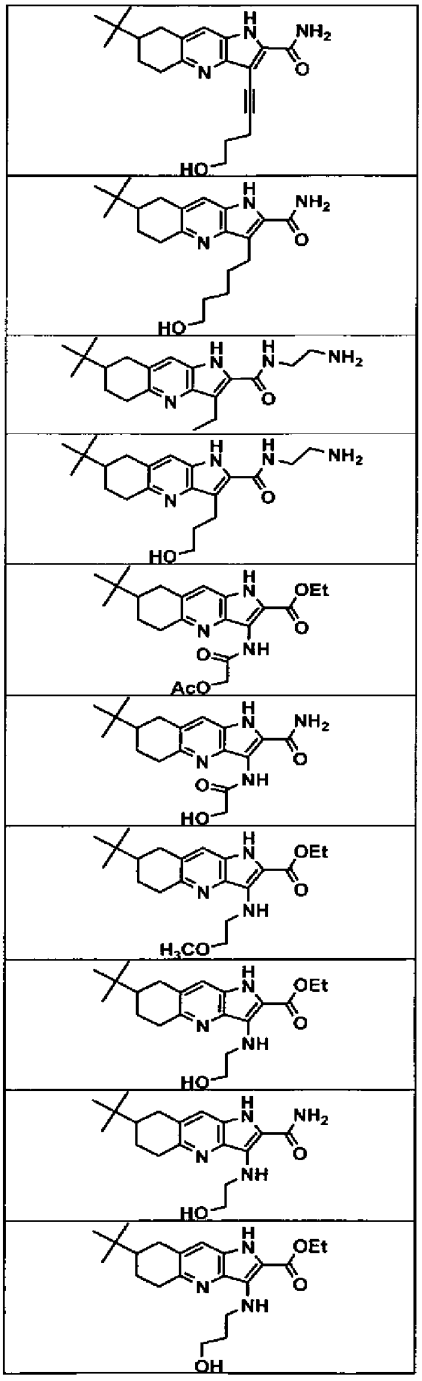
OnCusp
Ex. 1002

【表E－5】

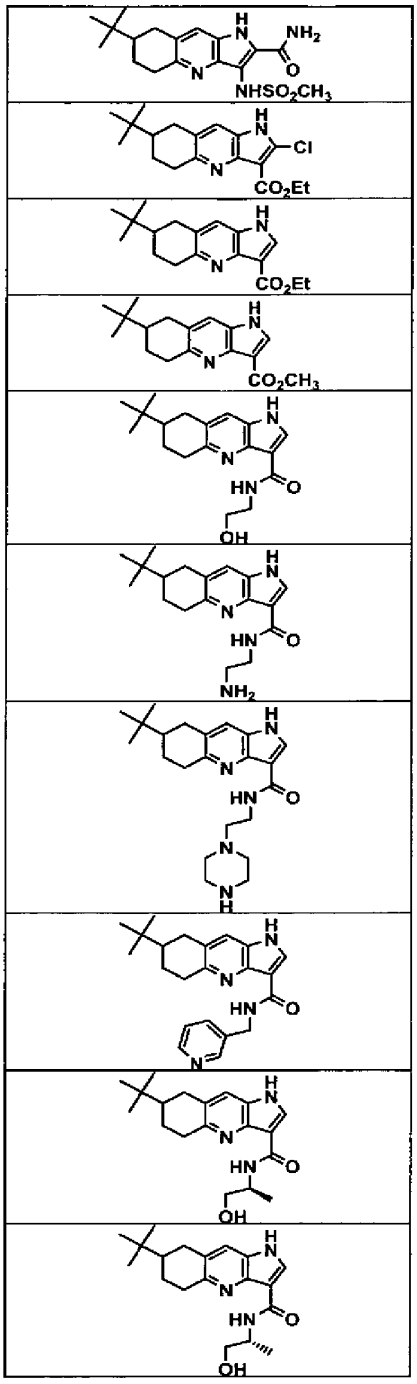


OnCusp
Ex. 1002

【表E－6】

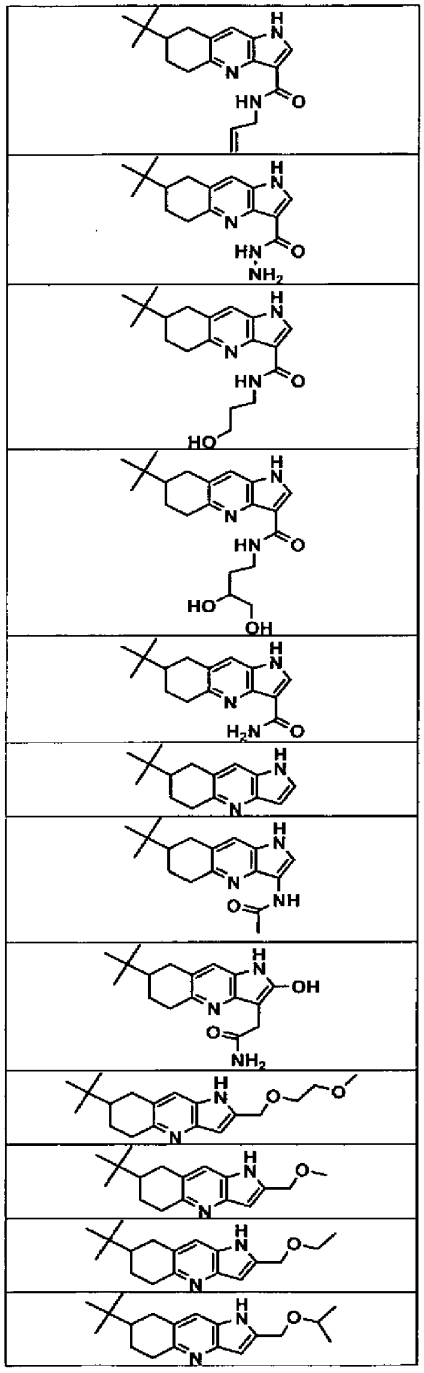


【表Ｅ－７】

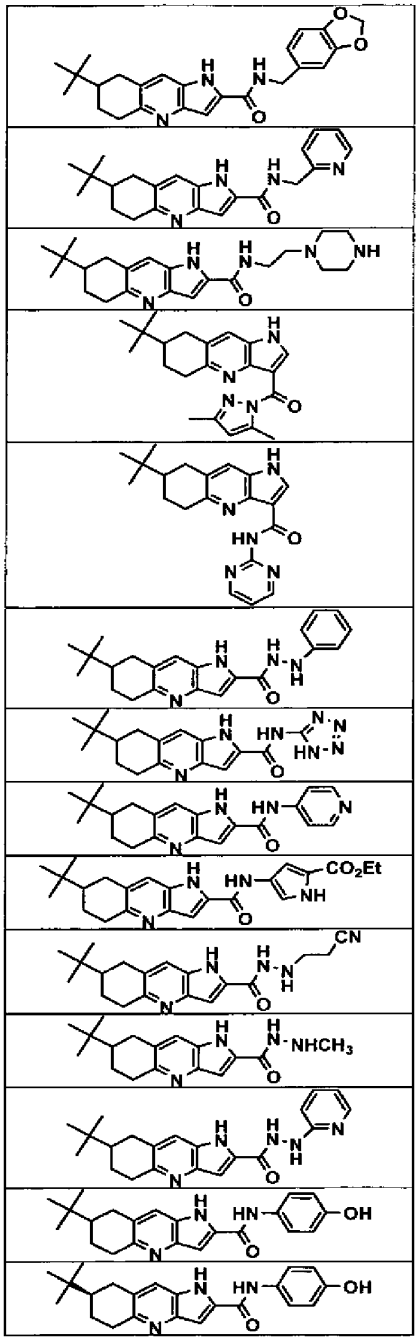


OnCusp
Ex. 1002

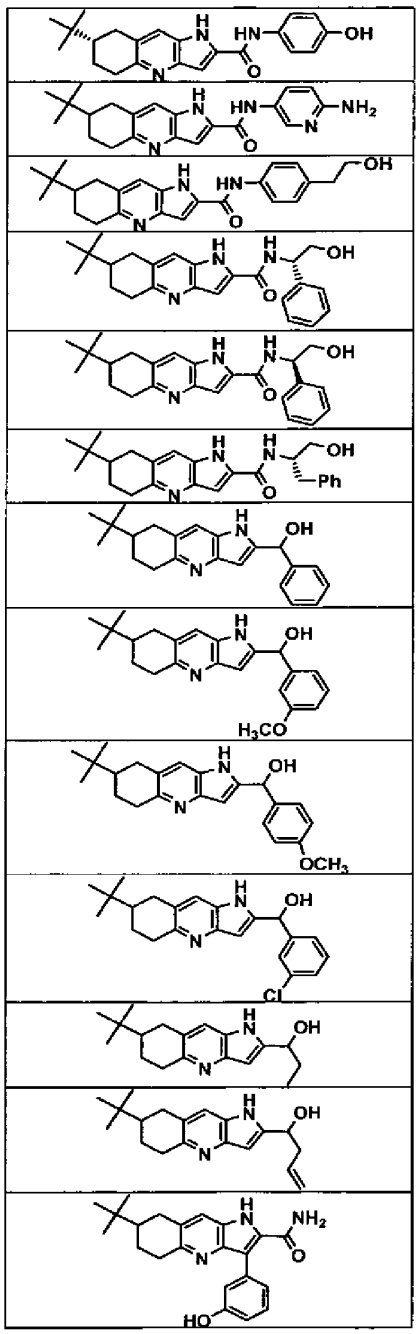
【表Ｅ－８】



【表Ｅ－９】

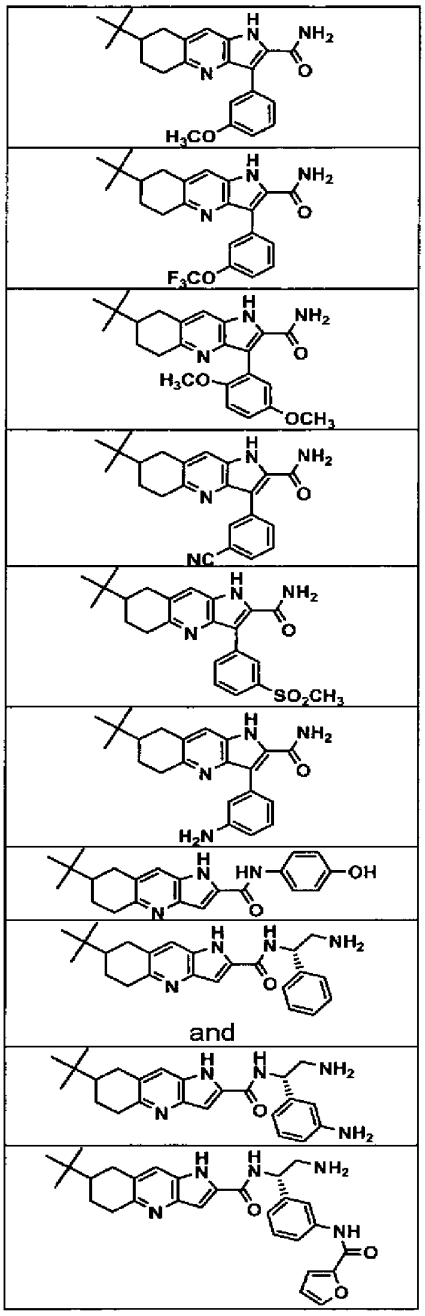


【表Ｅ－１０】



OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－１１】



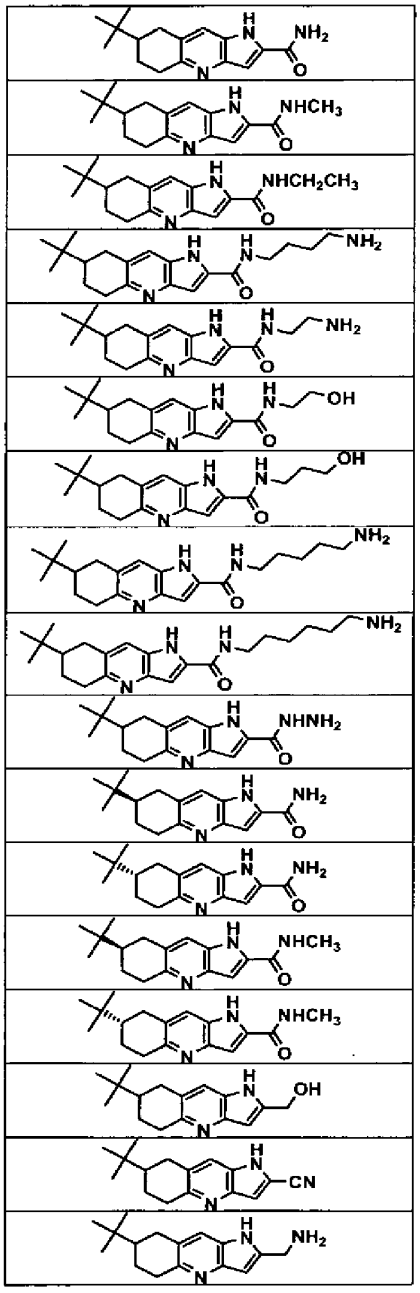
からなる群より選択される、請求項１、１６または１７に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

【請求項１９】

以下：

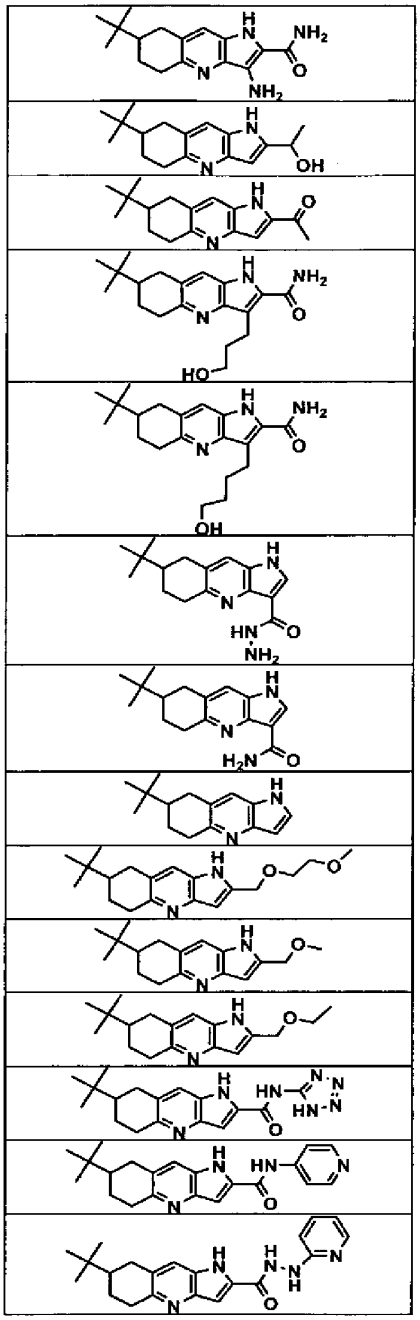
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｆ－１】

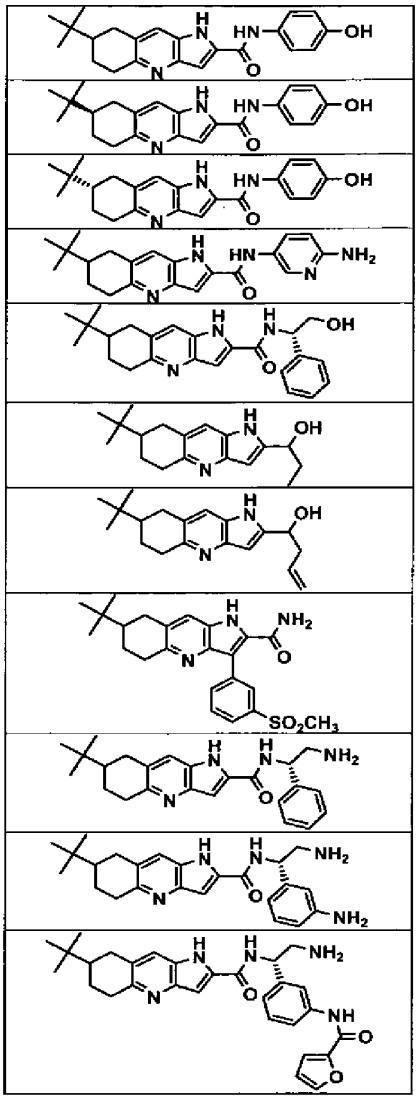


OnCusp
Ex. 1002

【表Ｆ－２】



【表Ｆ－３】



からなる群より選択される、請求項１８に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

【請求項２０】

請求項１、１６、１７もしくは１８に記載の化合物の単離型もしくは精製型、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

【請求項２１】

請求項１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物、またはその薬学的に許容される塩、もしくはエステルの治療上有効な量を、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む薬学的組成物。

【請求項２２】

抗癌剤、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有の多剤耐性のインヒビター、制吐剤、および免疫増強薬からなる群より選択される１つ以上の化合物をさらに含む、請求項２１に記載の薬学的組成物。

【請求項２３】

前記抗癌剤がエストロゲンレセプターモジュレーター、アンドロゲンレセプターモジュ

レーター、レチノイドレセプターモジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管形成インヒビター、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、ならびにアポトーシス誘発剤からなる群より選択される、請求項２２に記載の薬学的組成物。

【請求項２４】

細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、タキサン、トポイソメラーゼＩＩインヒビター、トポイソメラーゼＩインヒビター、チューブリン相互作用剤、ホルモン剤、チミジレートシンターゼインヒビター、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、シグナル伝達インヒビター、ＥＧＦＲキナーゼインヒビター、ＥＧＦＲに対する抗体、Ｃ－ａｂｌキナーゼインヒビター、オーロラキナーゼインヒビター、ホルモン療法併用、およびアロマターゼ併用からなる群より選択される１つ以上の抗癌剤をさらに含む、請求項２３に記載の薬学的組成物。

【請求項２５】

ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロクスウリジン、シタラビン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコビリン、オキサリプラチン、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、デオキシコフォルマイシン、マイトマイシン－Ｃ、Ｌ－アスパラギナーゼ、テニポシド１７α－エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミソール、ナベルベン、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、ドロキサフィン、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン、エルビタックスおよびそれらの混合物からなる群より選択される１つ以上の薬剤をさらに含む、請求項２４に記載の薬学的組成物。

【請求項２６】

ＫＳＰ活性を阻害する必要がある被験体においてＫＳＰ活性を阻害する方法であって、該被験体に対して、請求項１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステルの有効量を投与することを包含する、方法。

【請求項２７】

細胞増殖性疾患を処置する必要がある被験体において細胞増殖性疾患を処置する方法であって、該被験体に対して請求項１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステルの有効量を投与することを包含する、方法。

【請求項２８】

前記細胞増殖性疾患が癌、過形成、心肥大、自己免疫疾患、真菌性障害、関節炎、移植片拒絶、炎症性腸疾患、免疫障害、炎症、医療処置後に誘発される細胞増殖である、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

前記癌が脳腫瘍、尿生殖器路癌、心臓癌、胃腸癌、肝臓癌、骨癌、神経系の癌、および肺癌からなる群より選択される、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】
前記癌が肺腺癌、小細胞肺癌、膵臓癌、および乳癌から選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
放射線療法をさらに包含する、請求項２７に記載の方法。
【請求項３２】
抗癌剤、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有の多剤耐性のインヒビター、制吐剤、および免疫増強薬からなる群より選択される少なくとも１つの化合物を前記被験体に投与することをさらに包含する、請求項２７に記載の方法。
【請求項３３】
前記疾患が癌である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
放射線療法をさらに包含する、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記抗癌剤がエストロゲンレセプターモジュレーター、アンドロゲンレセプターモジュレーター、レチノイドレセプターモジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管形成インヒビター、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、ならびにアポトーシス誘発剤からなる群より選択される、請求項３２または３３に記載の方法。
【請求項３６】
細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、タキサン、トポイソメラーゼＩＩインヒビター、トポイソメラーゼＩインヒビター、チューブリン相互作用剤、ホルモン剤、チミジレートシンターゼインヒビター、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、シグナル伝達インヒビター、ＥＧＦＲキナーゼインヒビター、ＥＧＦＲに対する抗体、Ｃ－ａｂｌキナーゼインヒビター、ホルモン療法併用、およびアロマターゼ併用からなる群より選択される１つ以上の抗癌剤をさらに包含する、請求項３２または３３に記載の方法。
【請求項３７】
ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロクスウリジン、シタラビン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコビリン、オキサリプラチン、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、デオキシコフォルマイシン、マイトマイシン－Ｃ、Ｌ－アスパラギナーゼ、テニポシド１７α－エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミソール、ナベルベン、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、ドロキサフィン、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン、エルビタックスおよびそれらの混合物からなる群より選択される１つ以上の薬剤をさらに包含する、請求項３２または３３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
発明の分野
本発明は、キネシン紡錘体タンパク質（「ＫＳＰ」）キネシン活性に関連する細胞増殖性の疾患または障害を処置するため、およびＫＳＰキネシン活性を阻害するために有用である化合物および組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
癌は米国および世界中において主な死因である。癌細胞は、構成性増殖シグナル、細胞周期チェックポイントの欠陥、ならびにアポトーシス経路の欠陥によってしばしば特徴付けられる。細胞増殖をブロックでき、かつ腫瘍細胞のアポトーシスを増強することができる新規の化学療法薬の開発が大いに必要とされている。
【０００３】
癌を処置するために使用される従来の治療剤としては、微小管を標的とするタキサンおよびビンカアルカロイドが挙げられる。微小管は紡錘体の不可欠な構造要素であり、これは、細胞分裂から生じる娘細胞の各々への複製された姉妹染色分体の分配を担っている。微小管の崩壊または微小管動態との干渉は、細胞分裂を阻害し、かつアポトーシスを誘発し得る。
【０００４】
しかし、微小管はまた、非増殖性細胞における重要な構造要素でもある。例えば、それらは、細胞内でのあるいは軸索に沿っての細胞小器官および小胞の輸送に必要とされる。微小管を標的とする薬物はこれらの異なる構造の間を区別しないため、それらは、有用性および投薬を制限する望ましくない副作用を有し得る。副作用を回避しかつ効果を改善する、改善された特異性を有する化学療法剤の必要性がある。
【０００５】
微小管は、それらの機能について、モータータンパク質の２つの分類であるキネシンおよびダイニンに依存する。キネシンは、微小管に沿って運動するモータータンパク質である。それらは、約３２０アミノ酸長である、保存されたモータードメインによって特徴付けられる。モータードメインは、エネルギー源としてのＡＴＰに結合しそしてこれを加水分解して微小管に沿う細胞性カーゴ（ｃａｒｇｏ）の指向性運動を駆動し、そしてまた、微小管結合インターフェース（ｍｉｃｒｏｔｕｂｕｌｅ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｉｎｔｅｒｆａｃｅ）を含む（非特許文献１）。
【０００６】
キネシンは、高度の機能的多様性を示し、そして、いくつかのキネシンは、有糸分裂および細胞分裂の間、特に必要とされる。異なる有系分裂性キネシンは、二極性紡錘体の形成、紡錘体動態、および染色体運動を含む、有糸分裂の全ての態様に関与する。したがって、有系分裂性キネシンの機能への干渉は、正常な有糸分裂を妨害し、かつ細胞分裂を妨げ得る。具体的には、中心体分離のために必要とされる、有系分裂性キネシンＫＳＰ（ＥＧ５とも呼ばれる）は、有糸分裂の間に必須の機能を有すると示された。ＫＳＰ機能が阻害された細胞は、分離されていない中心体によって有糸分裂が停止する（非特許文献２）。これは、微小管の単一星状配列（ｍｏｎｏａｓｔｒａｌ　ａｒｒａｙ）の形成をもたらし、この末端で、複製された染色分体が、ロゼット様立体配置で結合されている。さらに、この有系分裂停止は、腫瘍細胞の増殖阻害をもたらす（非特許文献３）。ＫＳＰのインヒビターは、癌などの増殖性疾患の処置に望ましい。
【０００７】
キネシンインヒビターは公知であり、そしていくつかの分子が最近、文献に述べられている。例えば、アドシアスルフェート－２（ａｄｏｃｉａｓｕｌｆａｔｅ－２）は、ＣＥＮＰ－Ｅを含むいくつかのキネシンの微小管刺激されるＡＴＰアーゼ活性を阻害する（非特許文献４）。別の非選択的阻害剤である、ローズベンガル（Ｒｏｓｅ　Ｂｅｎｇａｌ）ラクトンは、微小管結合性部位をブロックすることによって、キネシン機能を妨害する（

非特許文献５）。表現型スクリーニングを使用して単離された化合物である、モナストロール（Ｍｏｎａｓｔｒｏｌ）は、ＫＳＰモータードメインの選択的阻害薬である（非特許文献６）。モナストールでの細胞の処理は、細胞を単極性紡錘体での有糸分裂において停止させる。

【０００８】

特許文献１および特許文献２は、ＫＳＰキネシン活性に関連する細胞増殖性の疾患または障害を処置するため、およびＫＳＰキネシン活性を阻害するために有用である化合物を開示している。

【０００９】

ＫＳＰ、ならびに他の有系分裂性キネシンは、抗増殖活性を有する新規の化学療法剤の開発において魅力的な標的である。ＫＳＰの阻害、および癌等の増殖性疾患の処置に有用な化合物が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】国際公開第２００６／０９８９６１号パンフレット

【特許文献２】国際公開第２００６／０９８９６２号パンフレット

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｍａｎｄｅｌｋｏｗ ａｎｄ Ｍａｎｄｅｌｋｏｗ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２００２，１２：５８５～５９１

【非特許文献２】Ｂｌａｎｇｙら、Ｃｅｌｌ １９９５，８３：１１５９～１１６９

【非特許文献３】Ｋａｉｓｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９９，２７４：１８９２５～１８９３１

【非特許文献４】Ｓａｋｏｗｉｃｚら、Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９８，２８０：２９２～２９５

【非特許文献５】Ｈｏｐｋｉｎｓら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２０００，３９：２８０５～２８１４

【非特許文献６】Ｍａｙｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９９，２８６：９７１～９７４

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

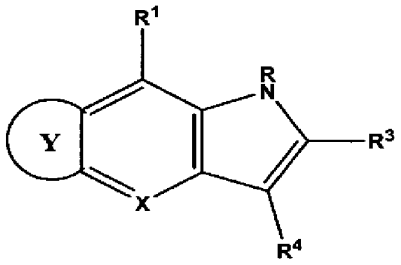
【００１２】

発明の要旨

一実施形態では、本発明は、構造式（Ｉ）：

【００１３】

【化１】



式Ｉ

によって表される化合物、あるいはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物またはエステルを提供し、式中：

環Ｙは、式Ｉに示すように縮合された３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルであり、該３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルは、必要に応じて、１～

２個のR^{2}部分で置換されており；
ＸはＮまたはＮ－酸化物であり；
ＲおよびR^{1}は各々独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、－（ＣR^{11}R^{12}）$_{0-6}$－ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）R^{5}、－Ｃ（Ｓ）R^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）R^{8}、－ＯＣ（Ｓ）R^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＳR^{8}、－ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＯＣ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－（ＣR^{11}R^{12}）$_{0-6}$ＳR^{8}、ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮR^{5}R^{6}、－Ｎ（R^{8}）ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮR^{6}ＯR^{8}、－ＣＮ、－ＯＣＦ$_{3}$、－ＳＣＦ$_{3}$、－Ｃ（＝NR^{8}）ＮR^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＯR^{8}、ハロアルキルおよびアルキルシリルからなる群より選択され、このアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアラルキルの各々が独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；
各々のR^{2}は独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、アルキルシリル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－（ＣR^{11}R^{12}）$_{0-6}$－ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）R^{5}、－Ｃ（Ｓ）R^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）R^{8}、－ＯＣ（Ｓ）R^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＳR^{8}、－ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＯＣ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－（ＣR^{11}R^{12}）$_{0-6}$ＳR^{8}、ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮR^{5}R^{6}、－Ｎ（R^{8}）ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮR^{6}ＯR^{8}、－ＣＮ、－ＯＣＦ$_{3}$、－ＳＣＦ$_{3}$、－Ｃ（＝NR^{8}）ＮR^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＮR^{5}R^{6}、および－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＯR^{8}からなる群より選択され、このアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されているか；
あるいは同じ炭素原子上の２つのR^{2}はそれらが結合する炭素原子と必要に応じて一緒になって、Ｃ＝Ｏ、Ｃ＝Ｓまたはエチレンジオキシ基を形成し；
R^{3}およびR^{4}は各々独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－Ｃ（Ｏ）R^{5}、－Ｃ（Ｓ）R^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）R^{8}、－ＯＣ（Ｓ）R^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＳR^{8}、－ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＯＣ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－（ＣR^{11}R^{12}）$_{0-6}$ＳR^{8}、ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮR^{5}R^{6}、－Ｎ（R^{8}）ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$

NR^6OR^8、-CN、-C(=NR^8)NR^5R^6、-C(=NOR^8)R^5、-C=N-N(R^8)-C(=S)NR^5R^6、-C(O)N(R^8)-($CR^{40}R^{41}$)$_{1-5}$-C(=NR^8)NR^5R^6、-C(O)N(R^8)($CR^{40}R^{41}$)$_{1-5}$-NR^5R^6、-C(O)N(R^8)($CR^{40}R^{41}$)$_{1-5}$-C(O)-NR^5R^6、-C(O)N(R^8)($CR^{40}R^{41}$)$_{1-5}$-OR^8、-C(S)NR^8(CH_2)$_{1-5}$$NR^5R^6$および-C(S)$NR^8$($CH_2$)$_{1-5}OR^8$からなる群より選択され、このアルキル、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は独立して1~5個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^5およびR^6は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、-OR^8、-C(O)R^8、および-C(O)OR^8からなる群より選択され、ただし、R^5およびR^6は同時に-OR^8ではなく；このアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、1~4個のR^9部分によって必要に応じて置換されているか；またはR^5およびR^6は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；

各々のR^8は独立して、H、アルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、およびヘテロアラルキルからなる群より選択され、Hを除くR^8の各メンバーは1~4個のR^9部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^9は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、-NO_2、-OR^{11}、-OC(=O)R^{11}、-(C_1-C_6アルキル)-OR^{11}、-CN、-$NR^{11}R^{12}$、-C(O)R^{11}、-C(O)OR^{11}、-C(O)$NR^{11}R^{12}$、-CF_3、-OCF_3、-CF_2CF_3、-C(=NOH)R^{11}、-NR^{11}C(=O)R^{12}、-C(=NR^{11})$NR^{11}R^{12}$、および-NR^{11}C(=O)OR^{12}からなる群より選択され、このアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、1~4個のR^{42}部分で必要に応じて置換されてもよく；ここでこのシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、このシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に2つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、5員または6員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成するか；または2つのR^9部分は、同じ炭素原子に結合するとき、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、C=OまたはC=S基を形成し；

各々のR^{10}は独立して、H、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、アルコキシ、OH、CN、ハロ、-($CR^{11}R^{12}$)$_{0-4}$$NR^5R^6$、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、-O-アルキル-O-アルキル、-C(O)NR^5R^6、-C(O)OR^8、-OC(O)R^5、-OC(O)NR^5R^6、-NR^5C(O)R^6、-NR^5C(O)OR^6、-NR^5C(O)NR^5R^6、-SR^8、-S(O)R^8、および-S(O)$_2$$R^8$からなる群より選択され、このアルキル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々は必要に応じて、1~4個のR^{13}部分で独立して置換されており；

各々のR^{11}は独立して、Hまたはアルキルであり；

各々のR^{12}は独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールであり、またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応

じて一緒になって、Ｎ、ＯまたはＳから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；このＲ^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－ＮＨ$_2$、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、ＣＦ$_3$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{13}は独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、アルキルシリル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のＲ^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＮＯ$_2$、－ＯＲ^{11}、－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル）－ＯＲ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＣＦ$_3$、－ＯＣＦ$_3$、－Ｎ（Ｒ^{11}）Ｃ（Ｏ）Ｒ^{12}、および－ＮＲ^{11}Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{12}からなる群より選択され、このアリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は１～４個のＲ^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ

各々のＲ^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；

ただし、ＲおよびＲ^{3}はそれらがそれぞれ結合されることが示される環の窒素および炭素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはヘテロシクレニルの環を形成し、この環は必要に応じて、オキソ、チオキソ、－ＯＲ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、および－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}からなる群より独立して選択される１～３個の部分で置換されている。

【００１４】

治療上有効な量の少なくとも１つの本発明の化合物および薬学的に許容される担体をこの被験体に投与することを包含する、被験体におけるＫＳＰキネシン活性に関連する細胞増殖性の疾患、障害の処置のため、および／またはＫＳＰキネシン活性を阻害するための薬学的処方または組成物も提供される。

【００１５】

被験体において、ＫＳＰキネシン活性に関連する細胞増殖性の疾患、障害を処置するため、および／またはＫＳＰキネシン活性を阻害するための方法であって、このような処置の必要な被験体に対して、有効な量の少なくとも１つの本発明の化合物を投与することを包含する、方法も提供される。

【００１６】

実行する実施例以外で、または特段の注記がない場合、本明細書および特許請求の範囲に用いられる成分、反応条件などの量を表す全ての数は、全ての場合に「約、ほぼ」という用語で修飾されるものと理解されるべきである。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

詳細な説明

１実施形態では、本発明は、構造式Ｉで示される化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルを開示し、この種々の部分は上記されるとおりである。

【００１８】

別の実施形態では、式（Ｉ）において、環Ｙは３～７員のシクロアルキルであり、必要に応じて１～２個のＲ^{2}部分で置換されている。

【００１９】

別の実施形態では、式（Ｉ）において、環Ｙは６員のシクロアルキルであり、必要に応じて１～２個のＲ^{2}部分で置換されている。

【００２０】

別の実施形態では、式（Ｉ）において、環Ｙは１つのＲ^{2}部分で置換されている。

【００２１】
別の実施形態では、式（Ｉ）において、R^2はアルキルである。
【００２２】
別の実施形態では、式（Ｉ）において、R^2は－ブチルである。
【００２３】
別の実施形態では、式（Ｉ）において、Ｒは、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）R^5からなる群より選択される。
【００２４】
別の実施形態では、式（Ｉ）において、Ｒは、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）R^5からなる群より選択され、ここでR^5はアルキルである。
【００２５】
別の実施形態では、式（Ｉ）において、R^1はＨである。
【００２６】
別の実施形態では、式（Ｉ）において、ＲはＨである。
【００２７】
別の実施形態では、式（Ｉ）において：
R^3およびR^4は各々独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｃ（Ｏ）R^5、－Ｃ（Ｏ）ＯR^8、－Ｃ（Ｏ）Ｎ$R^5$$R^6$、－Ｃ（Ｏ）Ｎ$R^8$Ｎ$R^5$$R^6$、－Ｎ$R^5$$R^6$、－Ｎ$R^5$Ｃ（Ｏ）$R^6$、－Ｎ（$R^8$）$SO_2$$R^8$、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯ$R^8$）$R^5$、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（$R^8$）－Ｃ（＝Ｓ）Ｎ$R^5$$R^6$からなる群より選択され、このアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、およびアリールの各々は独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；
各々のR^5およびR^6は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、このアルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されるか；またはR^5およびR^6は、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^8は独立して、１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；
各々のR^9は独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＯR^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）R^{11}、－ＣＮ、－Ｎ$R^{11}$$R^{12}$、－Ｎ$R^{11}$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^{11}$$R^{12}$、－Ｎ$R^{11}$Ｃ（＝Ｏ）$R^{12}$、および－Ｃ（Ｏ）Ｏ$R^{11}$からなる群より選択され；このアルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のR^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここでこのヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、このヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のR^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－Ｎ$R^5$$R^6$、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^5$$R^6$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^8$、－ＯＣ（＝Ｏ）$R^5$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^5$$R^6$、－Ｎ$R^5$Ｃ（＝Ｏ）$R^6$、－Ｎ$R^5$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^6$、－Ｎ$R^5$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^5$$R^6$、および－Ｓ（＝Ｏ）$_2$$R^8$からなる群より選択され、このヘテロシクリル、アリールおよびヘテロアリール基の各々が必要に応じて、１～４個のR^{13}部分で独立して置換されており；
各々のR^{11}は独立して、Ｈまたはアルキルであり；

各々のR^{12}は独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、N、Oもしくは Sから選択される0～2個のさらなるヘテロ原子を有する3～6員の複素環を形成し；このR^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－CN、－OH、－NH$_2$、－N（H）アルキル、－N（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF$_3$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される1～3個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO$_2$、－OR^{11}、－（C$_1$－C$_6$アルキル）－OR^{11}、－CN、－NR^{11}R^{12}、－C（＝O）R^{11}、－C（＝O）OR^{11}、－C（＝O）NR^{11}R^{12}、－CF$_3$、－OCF$_3$、－NR^{11}C（＝O）R^{12}、および－NR^{11}C（＝O）OR^{12}からなる群より選択され、このアリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、1～4個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ

各々のR^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される。

【0028】

別の実施形態では、式（I）において：

R^{3}は、H、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルコキシ、－C（O）R^5、－C（O）OR^8、－C（O）NR^{5}R^6、－C（O）NR^{8}NR^{5}R^6、－CN、－C（＝NOR^8）R^5、および－C＝N－N（R^8）－C（＝S）NR^{5}R^{6}からなる群より選択され、このアルキル、およびアルケニルの各々が独立して、1～5個のR^{10}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{5}およびR^{6}は独立して、H、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、このアルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、1～4個のR^{9}部分で必要に応じて置換されるか；またはR^{5}およびR^{6}は、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が1～4個のR^{9}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{8}は独立して、1～4個のR^{9}部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；

各々のR^{9}は独立して、アルキル、アリール、ヘテロアリール、－OR^{11}、－OC（＝O）R^{11}、－CN、－NR^{11}R^{12}、および－C（O）OR^{11}からなる群より選択され、このアルキル、アリール、およびヘテロアリールの各々は独立して、1～4個のR^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここでこのアリール、およびヘテロアリールの各々は、このヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に2つのラジカルを含み、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、5員または6員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々のR^{10}は独立して、アルコキシ、OH、ハロアルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、－NR^{5}R^6、－CN、－OC（＝O）R^5、および－O－アルキル－O－アルキルからなる群より選択され、該ヘテロシクリル、およびアリールの各々が必要に応じて独立して、1～4個のR^{13}部分で置換され；

各々のR^{11}は独立して、Hまたはアルキルであり；かつ

各々のR^{12}は独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリー

ル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；このR^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－NH_2、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；

各々のR^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－ＣＮ、－$NR^{11}R^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）R^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）OR^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－NR^{11}Ｃ（＝Ｏ）R^{12}、および－NR^{11}Ｃ（＝Ｏ）OR^{12}からなる群より選択され、このアリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される。

【００２９】

別の実施形態では、式（Ｉ）において、R^3はＨ、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、H_2ＮＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－ＮＨ－（Ｃ＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－、アルコキシ、NH_2－アルキル－、ＮＣ－アルキル－、アリール－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－、ＮＣ－アルキル－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル－、H_2Ｎ－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－Ｎ＝ＣＨ－、アルキル－Ｃ（＝ＮＯＨ）－、およびヘテロシクリル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；このアルキル、アルケニル、ならびにアリール－アルキル－、およびアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の「アルキル」部分の各々は、ヒドロキシおよびNH_2からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；このアリール－アルキル－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の各々の「アリール」部分は、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、NH_2、およびヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；任意のこのR^3基の「アリール」部分が、２つの隣接する基を含むとき、このような部分は、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、５～６員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成する。

【００３０】

別の実施形態では、式（Ｉ）において：

R^4は、Ｈ、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、アリール、－Ｃ（＝Ｏ）R^5、－Ｃ（＝Ｏ）OR^8、－Ｃ（＝Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^8NR^5R^6$、－NR^5R^6、－NR^5Ｃ（＝Ｏ）R^6、－$NR^8SO_2R^8$からなる群より選択され、このアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々が独立して、１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^5およびR^6は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、このアルキル、アルケニル、およびヘテロアリールの各々が、

１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されるか；またはＲ^{5}およびＲ^{6}は、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{8}は独立して、１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；

各々のＲ^{9}は独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{11}からなる群より選択され、このアルキル、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のＲ^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここでこのヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が、このヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルが必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々のＲ^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、ハロアルコキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{6}および－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$Ｒ^{8}からなる群より選択され；

各々のＲ^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＮＯ$_{2}$、－ＯＲ^{11}、－（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）－ＯＲ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＣＦ$_{3}$、－ＯＣＦ$_{3}$、－Ｎ（Ｒ^{11}）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}、および－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}からなる群より選択され、このアリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のＲ^{43}部分で必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{11}は独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ

各々のＲ^{12}は独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはＲ^{11}およびＲ^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；このＲ^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－ＮＨ$_{2}$、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_{2}$、ハロ、ハロアルキル、ＣＦ$_{3}$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される。

【００３１】

別の実施形態では、式（Ｉ）において、Ｒ^{4}は、Ｈ、ハロ、ニトロ、Ｈ$_{2}$Ｎ－、アルキル、ＨＯ－アルキル－、（ＨＯ）$_{2}$アルキル－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルケニル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、Ｈ$_{2}$Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－からなる群より選択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＮＣ－アルキル－、Ｈ$_{2}$Ｎ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＨＯ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－アルケニル－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロシクリル、ＨＯ－アルキニル－、アルキル－Ｏ－アルキル－ＮＨ－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、（ＨＯ）$_{2}$アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－

、H_2N－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルケニル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリールで置換されており、これは必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、H_2N－およびアルキル－Ｓ（＝Ｏ）－からなる群より選択される１～２個の部分で置換されている。

【００３２】

別の実施形態では、式（Ｉ）において：

ＸはＮであり；

環Ｙはアルキルで置換されている６員のシクロアルキルであり、

Ｒは、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）R^5からなる群より選択され；

R^1はＨであり；

R^3は、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルコキシ、－Ｃ（Ｏ）R^5、－Ｃ（Ｏ）ＯR^8、－Ｃ（Ｏ）ＮR^5 R^6、－Ｃ（Ｏ）ＮR^8 ＮR^5 R^6、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯR^8）R^5、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（R^8）－Ｃ（＝Ｓ）ＮR^5 R^6からなる群より選択され、このアルキル、およびアルケニルの各々は独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；かつ

R^4は、Ｈ、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクレニル、アリール、－Ｃ（＝Ｏ）R^5、－Ｃ（＝Ｏ）ＯR^8、－Ｃ（＝Ｏ）ＮR^5 R^6、－Ｃ（＝Ｏ）ＮR^8 ＮR^5 R^6、－ＮR^5 R^6、－ＮR^5Ｃ（＝Ｏ）R^6、－ＮR^8 SO_2 R^8からなる群より選択され、このアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクレニル、およびアリールの各々は、独立して１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換され；

各々のR^5およびR^6は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリールおよびヘテロアリールからなる群より選択され、このアルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されているか；またはR^5およびR^6は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；その各々が１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^8は独立して、１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されているアルキルであり；

各々のR^9は独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＯR^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）R^{11}、－ＣＮ、－ＮR^{11} R^{12}、－ＮR^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯR^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮR^{11} R^{12}、－ＮR^{11}Ｃ（＝Ｏ）R^{12}、および－Ｃ（Ｏ）ＯR^{11}からなる群より選択され；このアルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、必要に応じて１～４個のR^{42}部分で置換されており；ここでこのヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、このヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々のR^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－ＮR^5 R^6、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＮR^5 R^6、－Ｃ（＝Ｏ）ＯR^8、－ＯＣ（＝Ｏ）R^5、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮR^5 R^6、－ＮR^5Ｃ（＝Ｏ）R^6、－ＮR^5Ｃ（＝Ｏ）ＯR^6、－ＮR^5Ｃ（＝Ｏ）ＮR^5 R^6、および－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ R^8からなる群より選択され、このヘテロシクリル、アリールおよびヘテロアリール基の各々は必要に応じて、１～４個のR^{13}部分で独立して置換されており；

各々のR^{11}は独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ

各々のR^{12}は独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールであるか、またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、N、OまたはSから選択される0～2個のさらなるヘテロ原子を有する3～6員の複素環を形成し；このR^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－CN、－OH、－NH_2、－N(H)アルキル、－N(アルキル)$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される1～3個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－(C$_1$－C$_6$アルキル)－OR^{11}、－CN、－$NR^{11}R^{12}$、－C(=O)R^{11}、－C(=O)OR^{11}、－C(=O)$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－NR^{11}C(=O)R^{12}、および－NR^{11}C(=O)OR^{12}からなる群より選択され、このアリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は1～4個のR^{43}部分で必要に応じて置換され；かつ

各々のR^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される。

【００３３】

別の実施形態では、式(I)において：

XはNであり；

環Yはアルキルで置換されている6員のシクロアルキルであり；

Rは、Hおよびアルキル－C(=O)－からなる群より選択され；

R^1はHであり；

R^3は、H、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、H_2NNH－C(=O)－、アルキル－NH－NH－(C=O)－、ヘテロアリール－NH－NH－C(=O)－、アリール－アルキル－、アルコキシ、NH_2－アルキル－、NC－アルキル－、アリール－C(=O)－O－アルキル－、アルキル－O－C(=O)－、H_2N－C(=O)－、アリール－NH－NH－C(=O)－、アリール－NH－C(=O)－、ヘテロアリール－NH－C(=O)－、アルキル－C(=O)－、アルキル－NH－C(=O)－、アリール－アルキル－NH－C(=O)－、HO－アルキル－アリール－NH－C(=O)－、ヘテロアリール－アルキル－NH－C(=O)－、ヘテロシクリル－アルキル－NH－C(=O)－、H_2N－アルキル－NH－C(=O)－、HO－アルキル－NH－C(=O)－、アルキル－O－アルキル－、NC－アルキル－NH－NH－C(=O)－、アルキル－O－アルキル－O－アルキル－、H_2N－C(=S)－NH－N=CH－、アルキル－C(=NOH)－、およびヘテロシクリル－C(=O)－からなる群より選択され；このアルキル、アルケニル、ならびににアリール－アルキル－、およびアリール－アルキル－NH－C(=O)－の「アルキル」部分の各々は、ヒドロキシおよびNH_2からなる群より選択される1～2個の部分で必要に応じて置換され；このアリール－アルキル－、アリール－NH－C(=O)－、およびアリール－アルキル－NH－C(=O)－の各々の「アリール」部分は、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、NH_2、アリール－C(=O)－NHおよびヘテロアリール－C(=O)－NH－からなる群より選択される1～2個の部分で必要に応じて置換され；任意のこのR^3基の「アリール」部分は、2つの隣接する基を含み、このような部分が、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、5～6員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；かつ

R^4は、H、ハロ、ニトロ、H_2N－、アルキル、HO－アルキル－、(HO)$_2$アルキル－、アルキル－C(=O)－アルキル－C(=O)－NH－、アルケニル－C(=O)－アルキル－C(=O)－NH－、H_2N－C(=O)－アルキル－からなる群より選

択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＮＣ－アルキル－、$Ｈ_2$Ｎ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＨＯ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－アルケニル－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロシクリル、ＨＯ－アルキニル－、アルキル－Ｏ－アルキル－ＮＨ－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、（ＨＯ）$_2$アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、$Ｈ_2$Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルケニル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、$Ｈ_2$Ｎ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、$Ｈ_2$Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリールで置換されており、これは必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、$Ｈ_2$Ｎ－、アルキル－Ｓ、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）－およびアルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－からなる群より選択される１～２個の部分で置換されている。

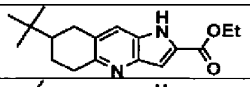
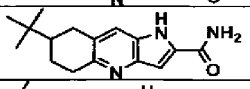
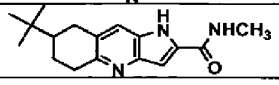
【００３４】

別の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、下の表に列挙される化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステルからなる群より選択される。この表はまた、終点アッセイに基づくＫＳＰ阻害活性（$ＩＣ_{50}$評点）を挙げている。１００００ｎＭより大きい（すなわち、１０μＭより大きい）$ＩＣ_{50}$値をＤクラスと指定する。１０００ｎＭ（１μＭ）～１００００ｎＭ（１０μＭ）の間の$ＩＣ_{50}$値を、Ｃクラスと指定する。１００ｎＭ（０．１μＭ）～１０００ｎＭ未満（＜１μＭ）の間の$ＩＣ_{50}$値を、Ｂクラスと指定する。１００ｎＭ未満（＜０．１μＭ）の$ＩＣ_{50}$値を、Ａクラスと指定する。これらの化合物の合成および特徴づけは、本出願の「実施例」において本明細書の以下において記載される。

【００３５】

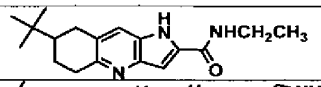
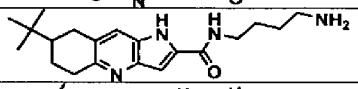
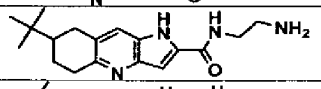
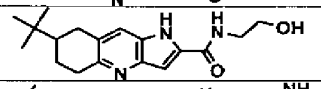
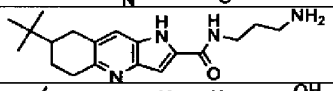
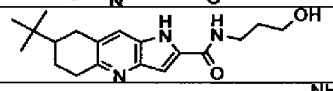
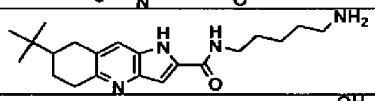
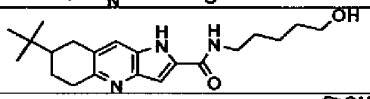
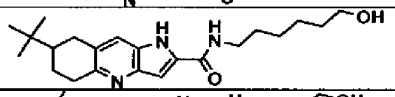
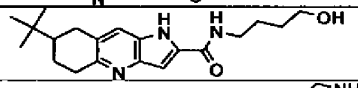
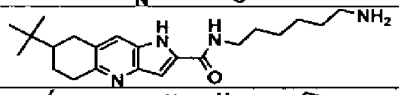
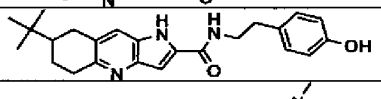
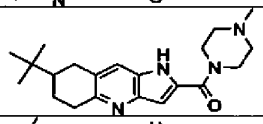
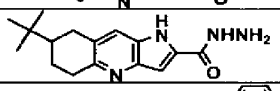
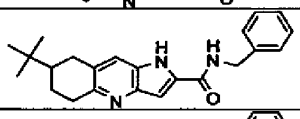
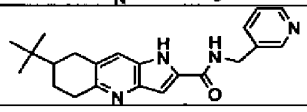
【表１－１】

表1

実施例	構造	IC_{50} 評点
1		C
2		A
3		A

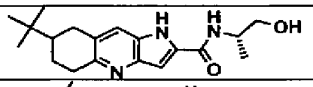
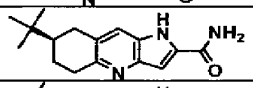
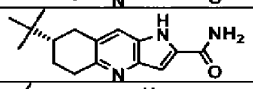
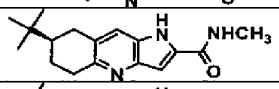
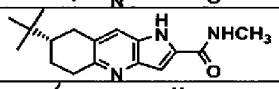
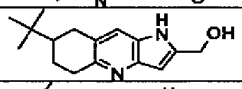
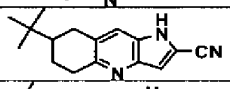
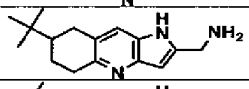
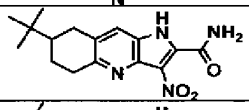
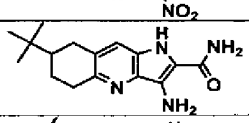
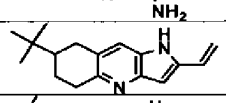
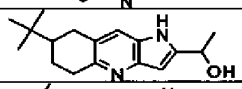
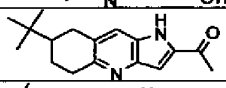
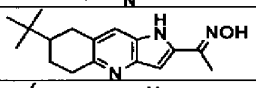
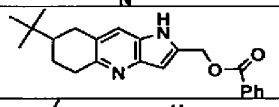
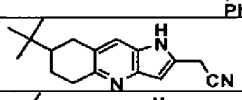
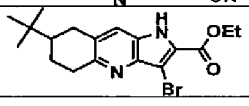
【００３６】

【表１－２】

4		B
5		B
6		B
7		B
8		C
9		B
10		B
11		C
12		D
13		C
14		B
15		D
16		D
17		A
18		D
19		D

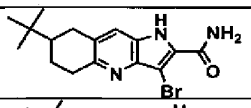
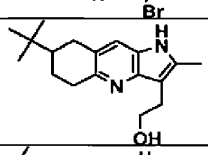
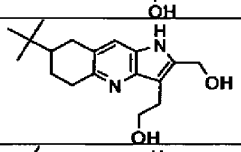
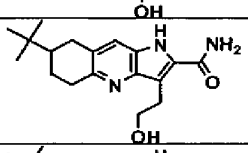
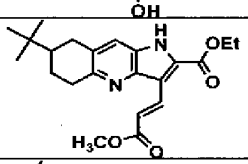
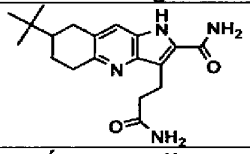
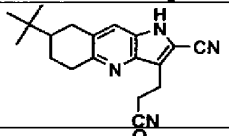
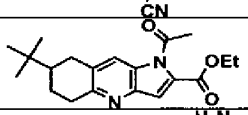
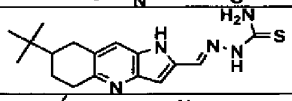
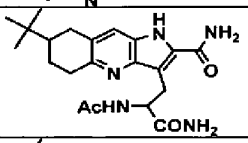
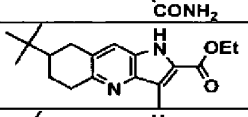
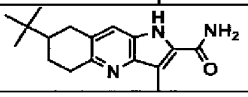
【００３７】

【表１－３】

20		C
21A		A
21B		B
22A		A
22B		B
23		A
24		A
25		B
26		D
27		B
28		C
29		B
30		B
31		D
32		D
33		C
34		D

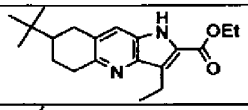
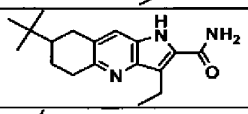
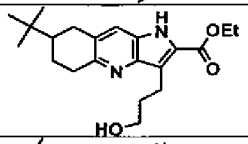
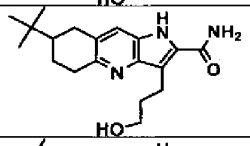
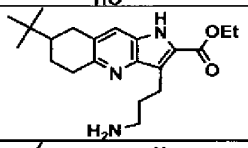
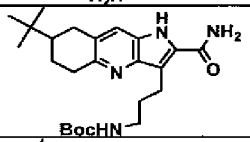
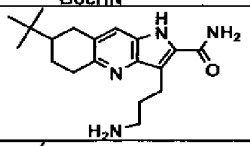
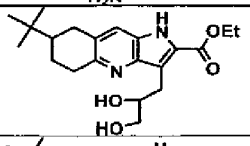
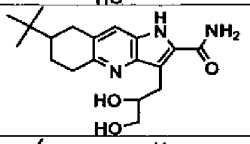
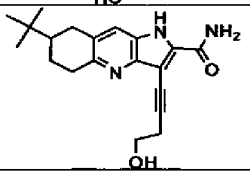
【００３８】

【表１－４】

35		D
36		D
37		D
38		C
39		D
40		C
41		C
42		D
43		D
44		D
45		D
46		D

【００３９】

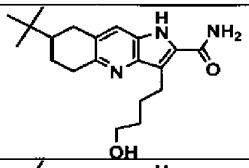
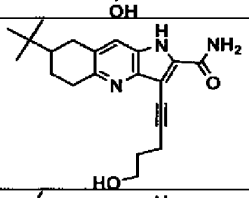
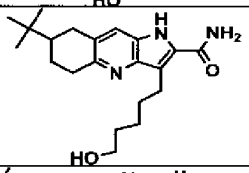
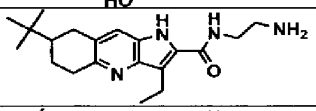
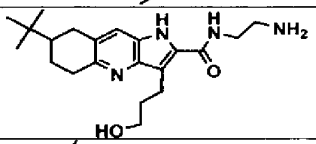
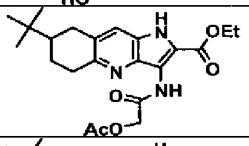
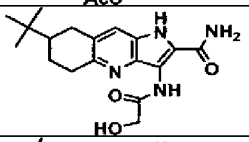
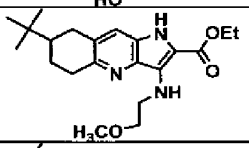
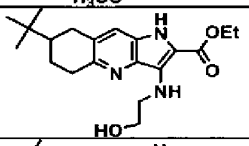
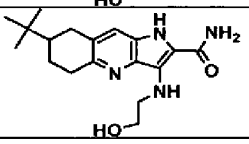
【表１－５】

47		D
48		C
49		D
50		B
51		D
52		D
53		D
54		D
55		D
56		D

【００４０】

OnCusp
Ex. 1002

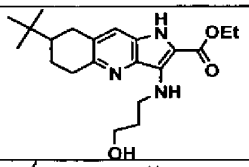
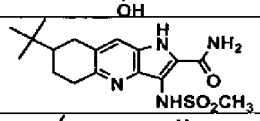
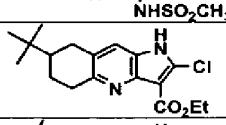
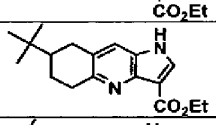
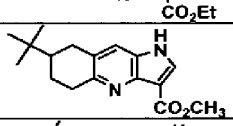
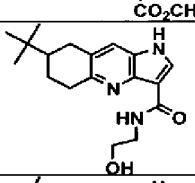
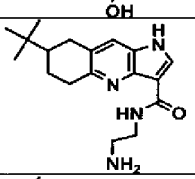
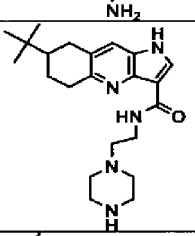
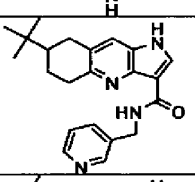
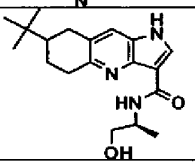
【表１－６】

57		B
58		D
59		C
60		>B
61		>B
62		D
63		C
64		D
65		D
66		C

【００４１】

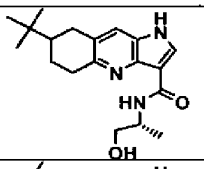
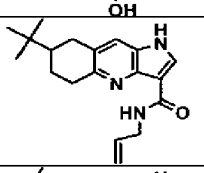
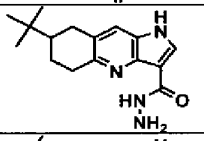
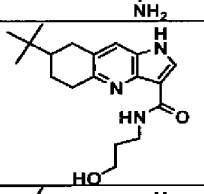
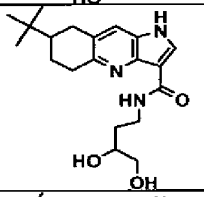
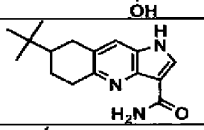
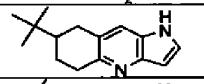
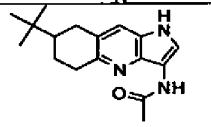
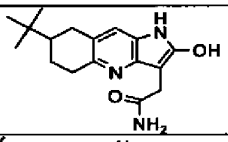
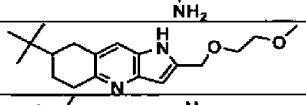
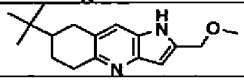
OnCusp
Ex. 1002

【表１－７】

67		D
68		C
69		D
70		D
71		D
72		C
73		D
74		D
75		D
76		D

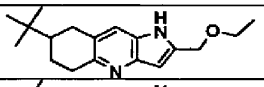
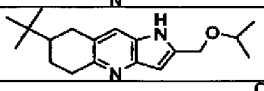
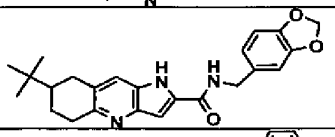
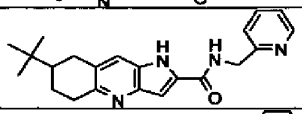
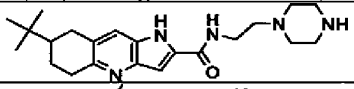
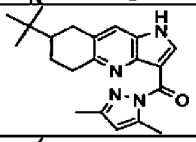
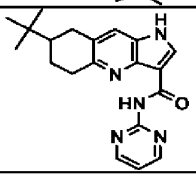
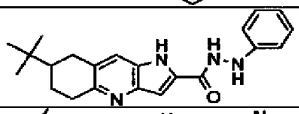
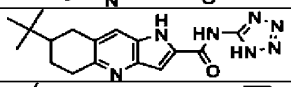
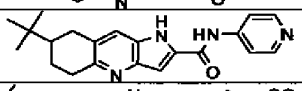
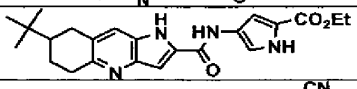
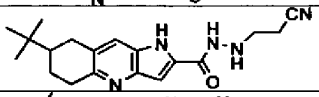
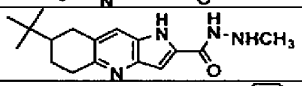
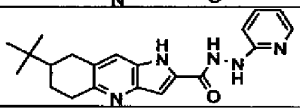
【００４２】

【表１－８】

77		D
78		D
79		B
80		C
81		D
82		B
83		A
84		C
85		D
86		B
87		B

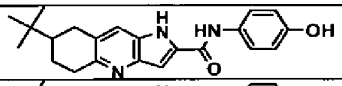
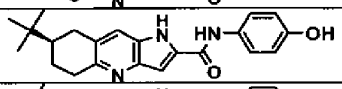
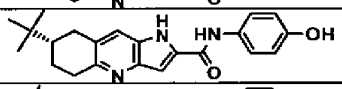
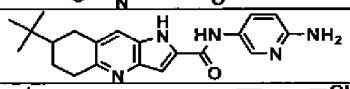
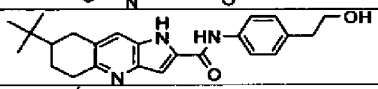
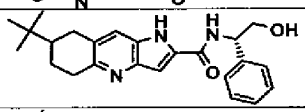
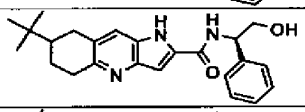
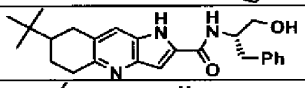
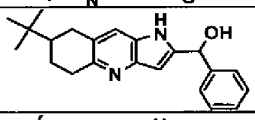
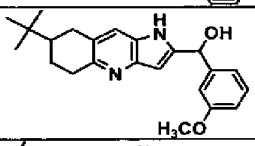
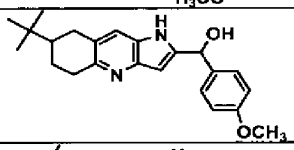
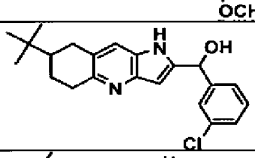
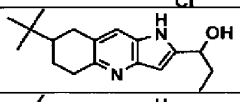
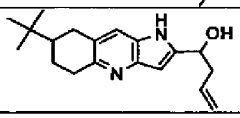
【００４３】

【表１－９】

88		B
89		D
90		D
91		D
92		C
93		D
94		D
95		D
96		B
97		B
98		D
99		D
100		D
101		B

【００４４】

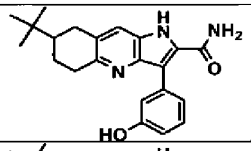
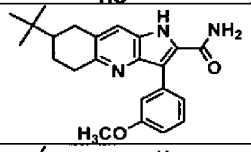
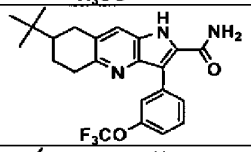
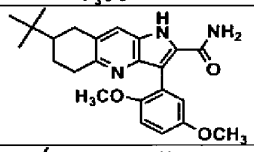
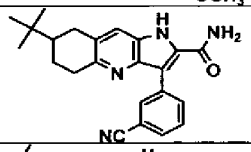
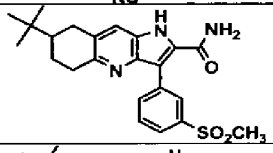
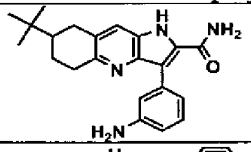
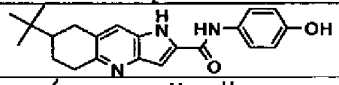
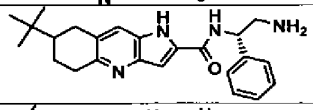
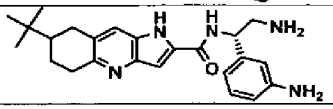
【表１－１０】

102		B
103A		B
103B		D
104		B
105		C
106		B
107		D
108		D
109		D
110		D
111		D
112		D
113		B
114		B

【００４５】

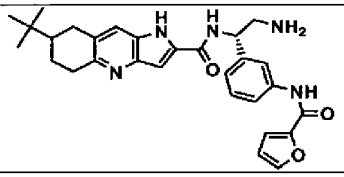
OnCusp
Ex. 1002

【表１－１１】

115		C
116		D
117		D
118		D
119		D
120		B
121		D
121		B
122		B
123		A

【００４６】

【表１－１２】

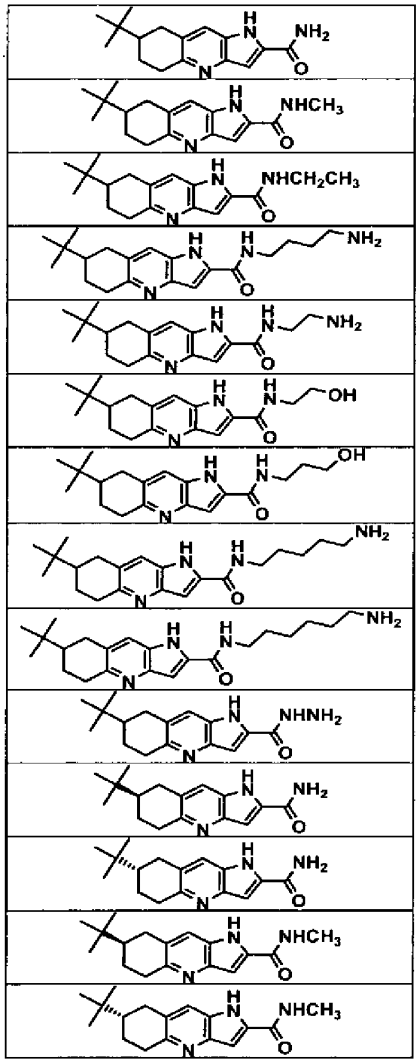
124		A

別の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、以下またはその薬学的に許容される塩、溶媒

OnCusp
Ex. 1002

和化合物もしくはエステルからなる群より選択される：

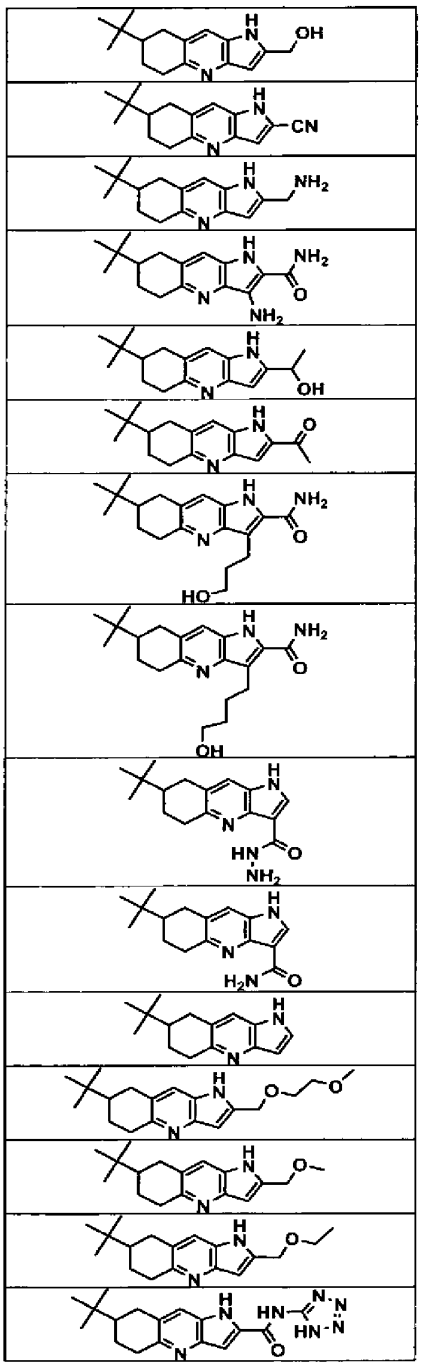
【表Ａ－１】



【００４７】

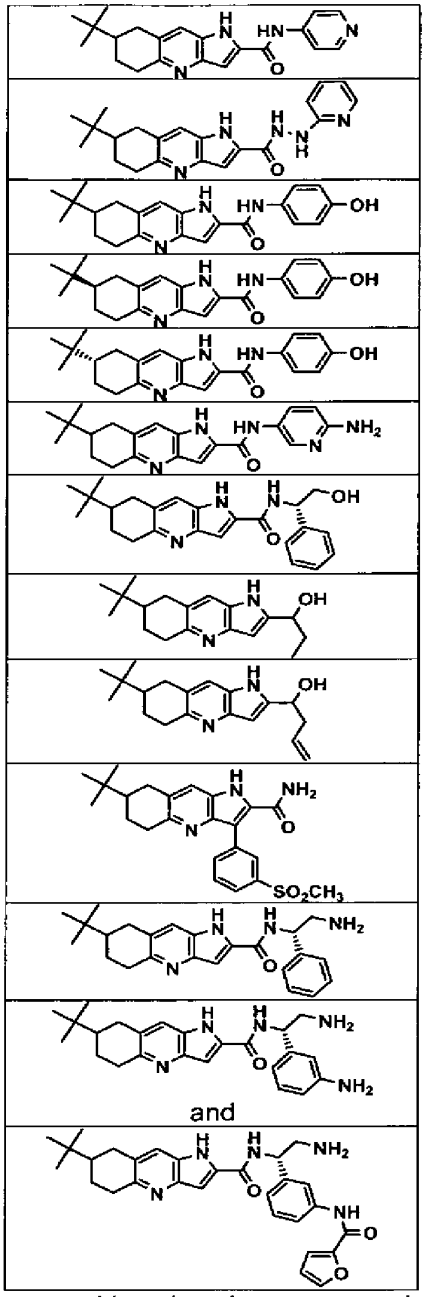
OnCusp
Ex. 1002

【表A－2】



【００４８】

【表Ａ－３】



【００４９】

他の実施形態では、本発明は、そのような化合物、そのような化合物の１つ以上を含む薬学的処方物または組成物を作成するプロセス、および下で詳細に考察されるようなＫＳＰキネシン活性に関連する１つ以上の状態または疾患を処置または防止する方法を提供する。

【００５０】

上記で、および明細書を通じて使用する場合、以下の用語は別途指摘しない限り、次の意味を有するものと理解される：

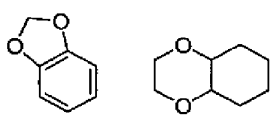
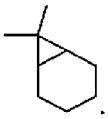
「被験体」とは、哺乳類および非哺乳類動物の両方を包含する。

【００５１】
「哺乳動物、哺乳類」とは、ヒトおよび他の哺乳類動物を包含する。
【００５２】
「置換された」という用語は、現存の状況下で指定された原子の正常な原子価を超えず、かつその置換が安定な化合物を生じるという条件で、指定された原子の１個以上の水素が、指示された群からの選択物と置換されていることを意味する。置換基および／または変数の組合せは、そのような組合せが安定な化合物を生じる場合のみに許容される。「安定な化合物」または「安定な構造」とは、反応混合物、および処方物から有効な治療剤への有用な純度までの単離に耐えるほど十分に強い化合物を意味する。
【００５３】
「必要に応じて置換されている」という用語は、特定された基、ラジカルまたは部分による任意の置換を意味する。本明細書の本文、スキーム、実施例および表の未充足の原子価を持ついずれの原子も、その原子価を充足するために水素原子（単数または複数）を有すると見なされることに注目すべきである。
【００５４】
別途記載しない限り、ある用語がそれ自体で、または他の用語と組合されて使用されるかどうかにかかわらず、以下の定義が適用される。したがって「アルキル」の定義は、「アルキル」はもちろんのこと、「ヒドロキシアルキル」、「ハロアルキル」、「アルコキシ」などの「アルキル」部分にも適用される。
【００５５】
「アルキル」とは、直鎖であってもまたは分岐であってもよく、かつその鎖内に約１～約２０個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を意味する。好ましいアルキル基は、鎖内に約１～約１２個の炭素原子を含む。さらに好ましいアルキル基は、鎖内に約１～約６個の炭素原子を含む。分岐とは、１個以上の低級アルキル基、例えばメチル、エチルまたはプロピルがアルキル直鎖に結合されていることを意味する。「低級アルキル」とは、直鎖であっても、または分岐されてもよい、鎖内に約１～約６個の炭素原子を有する基を意味する。「アルキル」は、非置換であっても、または１つ以上の置換基で必要に応じて置換されてもよく、この置換基は同じであっても、異なってもよく、この各々の置換基は独立して、ハロ、アルキル、アリール、シクロアルキル、シアノ、ヒドロキシ、アルコキシ、アルキルチオ、アミノ、－ＮＨ（アルキル）、－ＮＨ（シクロアルキル）、－Ｎ（アルキル）$_2$、カルボキシ、および－Ｃ（Ｏ）Ｏ－アルキルからなる群より選択される。適切なアルキル基の非限定的な例としては、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、およびｔ－ブチルが挙げられる。「アルキル」は、「アルキレン」を包含し、これは、上記で定義されるアルキル基から水素原子を除去することによって得られる二官能性基をいう。アルキレンの非限定的な例としては、メチレン（－ＣＨ$_2$－）、エチレン（－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－）、およびプロピレン（－Ｃ$_3$Ｈ$_6$－；これは、鎖状であっても分岐していてもよい）が挙げられる。
【００５６】
「アルケニル」は、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含み、かつ鎖状であっても分岐していてもよく、かつ鎖中に約２～約１５の炭素原子を含む脂肪族炭水化物基を意味する。好ましいアルケニル基は、鎖中に約２～約１２の炭素原子を有し；そしてより好ましくは鎖中に約２～約６の炭素原子を有する。分岐したとは、１つ以上の低級アルキル基、例えば、メチル、エチルまたはプロピルが、アルケニル直鎖へ結合されていることを意味する。「低級アルケニル」は、鎖状であっても分岐していてもよい鎖中の約２～約６の炭素原子を意味する。「アルケニル」は、非置換であってもよいし、または同一であっても異なっていてもよい１つ以上の置換基によって必要に応じて置換されていてもよく、各置換基は、独立して、ハロ、アルキル、アリール、シクロアルキル、シアノ、アルコキシおよび－Ｓ（アルキル）からなる群より選択される。好適なアルケニル基の非限定的な例としては、エテニル、プロペニル、ｎ－ブテニル、３－メチルブタ－２－エニル、ｎ－ペンテニル、オクテニル、およびデセニルが挙げられる。

【００５７】
「アルキニル」とは、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を含み、かつ鎖状であっても分岐していてもよく、そして鎖中に約２～約１５の炭素原子を含む脂肪族炭水化物基を意味する。好ましいアルキニル基は、鎖中に約２～約１２の炭素原子を有し；そしてより好ましくは鎖中に約２～約４の炭素原子を有する。分岐したとは、１つ以上の低級アルキル基、例えば、メチル、エチルまたはプロピルが、アルキニル直鎖へ結合されていることを意味する。「低級アルキニル」とは、鎖状であっても分岐していてもよい鎖中の約２～約６の炭素原子を意味する。好適なアルキニル基の非限定的な例としては、エチニル、プロピニル、２－ブチニルおよび３－メチルブチニルが挙げられる。「アルキニル」は、非置換であっても、または同一であっても異なっていてもよい１つ以上の置換基によって必要に応じて置換されてもよく、各置換基は、独立して、アルキル、アリールおよびシクロアルキルからなる群より選択される。
【００５８】
「アリール」とは、約６～約１４の炭素原子、好ましくは約６～約１０の炭素原子を含む芳香族単環式または多環式環系を意味する。アリール基は、同一であっても異なっていてもよく、そして本明細書中で定義されるとおりである、１つ以上の「環系置換基」で必要に応じて置換されてもよい。好適なアリール基の非限定的な例としては、フェニルおよびナフチルが挙げられる。
【００５９】
「ヘテロアリール」とは、約５～約１４の環原子、好ましくは約５～約１０の環原子を含む芳香族単環式または多環式環系を意味し、ここで、この環原子の１つ以上は、単独でまたは組み合わせて、炭素以外の元素、例えば、窒素、酸素または硫黄である。好ましいヘテロアリールは、約５～約６の環原子を含む。「ヘテロアリール」は、同一であっても異なっていてもよく、かつ本明細書中で定義されるとおりである、１つ以上の「環系置換基」によって必要に応じて置換されてもよい。ヘテロアリールの語根名（ｒｏｏｔ　ｎａｍｅ）の前の接頭語アザ、オキサまたはチアとは、少なくとも窒素、酸素または硫黄の原子がそれぞれ、環原子として存在することを意味する。ヘテロアリールの窒素原子は、必要に応じて対応のＮ－オキシドへ酸化され得る。好適なヘテロアリールの非限定的な例としては、ピリジル、ピラジニル、フラニル、チエニル、ピリミジニル、ピリドン（Ｎ置換ピリドンを含む）、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、ピラゾリル、フラザニル、ピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、１，２，４－チアジアゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、キノキサリニル、フタラジニル、オキシインドリル、イミダゾ［１，２－ａ］ピリジニル、イミダゾ［２，１－ｂ］チアゾリル、ベンゾフラザニル、インドリル、アザインドリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチエニル、キノリニル、イミダゾリル、チエノピリジル、キナゾリニル、チエノピリミジル、ピロロピリジル、イミダゾピリジル、イソキノリニル、ベンゾアザインドリル、１，２，４－トリアジニル、ベンゾチアゾリルなどが挙げられる。用語「ヘテロアリール」はまた、部分的に飽和されたヘテロアリール部分、例えば、テトラヒドロイソキノリル、テトラヒドロキノリルなどのこともいう。
【００６０】
「アラルキル」または「アリールアルキル」とは、アリール－アルキル－基を意味し、ここで、アリールおよびアルキルは、前述されるとおりである。好ましいアラルキルは、低級アルキル基を含む。好適なアラルキル基の非限定的な例としては、ベンジル、２－フェネチル、およびナフタレニルメチルが挙げられる。親部分への結合は、アルキルを通じてである。
【００６１】
「アルキルアリール」とは、アルキル－アリール－基を意味し、ここで、アルキルおよびアリールは、前述されるとおりである。好ましいアルキルアリールは、低級アルキル基を含む。好適なアルキルアリール基の非限定的な例は、トリルである。親部分への結合は、アリールを通じてである。

【００６２】
「シクロアルキル」とは、約３～約１０の炭素原子、好ましくは約５～約１０の炭素原子を含む非芳香族単環式または多環式環系を意味する。好ましいシクロアルキル環は、約５～約７の環原子を含む。シクロアルキルは、同一であっても異なっていてもよく、かつ本明細書中で定義されるとおりである、１つ以上の「環系置換基」によって必要に応じて置換されてもよい。好適な単環式シクロアルキルの非限定的な例としては、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなどが挙げられる。好適な多環式シクロアルキルの非限定的な例としては、１－デカリニル、ノルボルニル、アダマンチルなどが挙げられる。
【００６３】
「シクロアルキルアルキル」とは、アルキル部分（上記で定義される）を介して親コアへ連結された、上記で定義されるとおりのシクロアルキル部分を意味する。好適なシクロアルキルアルキルの非限定的な例としては、シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチルなどが挙げられる。
【００６４】
「シクロアルケニル」とは、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む、約３～約１０の炭素原子、好ましくは約５～約１０の炭素原子を含む非芳香族単環式または多環式環系を意味する。好ましいシクロアルケニル環は、約５～約７の環原子を含む。シクロアルケニルは、同一であっても異なっていてもよく、かつ上記されるとおりである、１つ以上の「環系置換基」によって必要に応じて置換されてもよい。好適な単環式シクロアルケニルの非限定的な例としては、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロペンタ－１，３－ジエニルなどが挙げられる。好適な多環式シクロアルケニルの非限定的な例は、ノルボルニレニル（ｎｏｒｂｏｒｎｙｌｅｎｙｌ）である。
【００６５】
「シクロアルケニルアルキル」とは、アルキル部分（上記で定義される）を介して親コアへ連結された、上記で定義されるとおりのシクロアルケニル部分を意味する。好適なシクロアルケニルアルキルの非限定的な例としては、シクロペンテニルメチル、シクロヘキセニルメチルなどが挙げられる。
【００６６】
「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素を意味する。好ましいのは、フッ素、塩素および臭素である。
【００６７】
「環系置換基」とは、例えば環系上の利用可能な水素を置換する、芳香族または非芳香族環系へ結合された置換基を意味する。環系置換基は、同一であっても異なっていてもよく、各々は、以下からなる群から独立して選択される：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、アルキルアリール、ヘテロアラルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロアリール、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、アシル、アロイル、ハロ、ニトロ、シアノ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、アラルコキシカルボニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、アルキルチオ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、アラルキルチオ、ヘテロアラルキルチオ、シクロアルキル、ヘテロシクリル、－Ｃ（＝Ｎ－ＣＮ）－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝ＮＨ）－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝ＮＨ）－ＮＨ（アルキル）、Ｙ$_1$Ｙ$_2$Ｎ－、Ｙ$_1$Ｙ$_2$Ｎ－アルキル－、Ｙ$_1$Ｙ$_2$ＮＣ（Ｏ）－、Ｙ$_1$Ｙ$_2$ＮＳＯ$_2$－および－ＳＯ$_2$ＮＹ$_1$Ｙ$_2$；ここで、Ｙ$_1$およびＹ$_2$は、同一であっても異なっていてもよく、かつ水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、およびアラルキルからなる群より独立して選択される。「環系置換基」とはまた、環系上の２つの隣接する炭素原子上の２つの利用可能な水素（各炭素上の１つのＨ）を同時に置換する、単一部分も意味し得る。このような部分の例は、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ、－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$－などであり、これらは、例えば、以下のような部分を形成する：

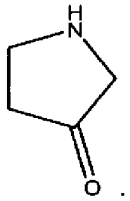
【００６８】
【化２】


および

.

「ヘテロアリールアルキル」とは、アルキル部分（上記で定義される）を介して親コアへ連結された、上記で定義されるとおりのヘテロアリール部分を意味する。好適なヘテロアリールの非限定的な例としては、２－ピリジニルメチル、キノリニルメチルなどが挙げられる。

【００６９】
「ヘテロシクリル」とは、約３～約１０の環原子、好ましくは約５～約１０の環原子を含む非芳香族飽和単環式または多環式環系を意味し、ここで、この環系におけるこの原子の１つ以上は、単独でまたは組み合わせて、炭素以外の元素、例えば、窒素、酸素または硫黄である。隣接する酸素および／または硫黄の原子は環系に存在しない。好ましいヘテロシクリルは、約５～約６の環原子を含む。ヘテロシクリルの語根名の前の接頭語アザ、オキサまたはチアとは、少なくとも窒素、酸素または硫黄の原子が、それぞれ、環原子として存在することを意味する。ヘテロシクリル環中の任意の－ＮＨは、例えば、－Ｎ（Ｂｏｃ）、－Ｎ（ＣＢｚ）、－Ｎ（Ｔｏｓ）基などとして保護された状態で存在してもよく；このような保護もまた本発明の一部と考えられる。ヘテロシクリルは、同一であっても異なっていてもよく、かつ本明細書中で定義されるとおりである、１つ以上の「環系置換基」によって必要に応じて置換されてもよい。ヘテロシクリルの窒素または硫黄の原子は、対応のＮ－オキシド、Ｓ－オキシドまたはＳ，Ｓ－ジオキシドへ必要に応じて酸化され得る。好適な単環式ヘテロシクリル環の非限定的な例としては、ピペリジル、ピロリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアゾリジニル、１，４－ジオキサニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニル、ラクタム、ラクトンなどが挙げられる。「ヘテロシクリル」とはまた、環系上の同一炭素原子上の２つの利用可能な水素を同時に置換する単一部分（例えば、カルボニル）をも意味し得る。このような部分の例は、ピロリドンである：

【００７０】
【化３】


.

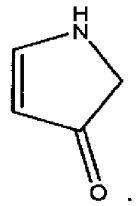
「ヘテロシクリルアルキル」とは、アルキル部分（上記で定義される）を介して親コアへ連結された、上記で定義されるとおりのヘテロシクリル部分を意味する。好適なヘテロシクリルアルキルの非限定的な例としては、ピペリジニルメチル、ピペラジニルメチルなどが挙げられる。

【００７１】
「ヘテロシクレニル」とは、約３～約１０の環原子、好ましくは約５～約１０の環原子を含む非芳香族単環式または多環式環系を意味し、ここで、環系における原子の１つ以上は、単独でまたは組み合わせて、炭素以外の元素、例えば、窒素、酸素または硫黄の原子であり、かつこの環は、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合または炭素－窒素二重結合を含む。隣接する酸素および／または硫黄の原子はこの環系に存在しない。好ましいヘテロシクレニル環は、約５～約６の環原子を含む。ヘテロシクレニルの語根名の前の接頭語

アザ、オキサまたはチアとは、少なくとも窒素、酸素または硫黄の原子が、それぞれ、環原子として存在することを意味する。ヘテロシクレニルは、１つ以上の環系置換基によって必要に応じて置換されてもよく、ここで、「環系置換基」は上記で定義されるとおりである。ヘテロシクレニルの窒素または硫黄の原子は、対応のＮ－オキシド、Ｓ－オキシドまたはＳ，Ｓ－ジオキシドへ必要に応じて酸化されてもよい。好適なヘテロシクレニル基の非限定的な例としては、１，２，３，４－テトラヒドロピリジン、１，２－ジヒドロピリジル、１，４－ジヒドロピリジル、１，２，３，６－テトラヒドロピリジン、１，４，５，６－テトラヒドロピリミジン、２－ピロリニル、３－ピロリニル、２－イミダゾリニル、２－ピラゾリニル、ジヒドロイミダゾール、ジヒドロオキサゾール、ジヒドロオキサジアゾール、ジヒドロチアゾール、３，４－ジヒドロ－２Ｈ－ピラン、ジヒドロフラニル、フルオロジヒドロフラニル、７－オキサビシクロ［２．２．１］ヘプテニル、ジヒドロチオフェニル、ジヒドロチオピラニルなどが挙げられる。「ヘテロシクレニル」はまた、環系上の同一炭素原子上の２つの利用可能な水素を同時に置換する単一部分（例えば、カルボニル）をも意味し得る。このような部分の例は、ピロリジノンである：

【００７２】

【化４】



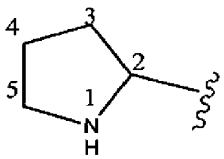
「ヘテロシクレニルアルキル」とは、アルキル部分（上記で定義される）を介して親コアへ連結された、上記で定義されるとおりのヘテロシクレニル部分を意味する。

【００７３】

本発明のヘテロ原子含有環系において、Ｎ、ＯまたはＳに隣接する炭素原子上にヒドロキシル基は存在せず、同様に、別のヘテロ原子に隣接する炭素上にＮ基もＳ基も存在しないことが、理解されるべきである。したがって、例えば、以下の環：

【００７４】

【化５】



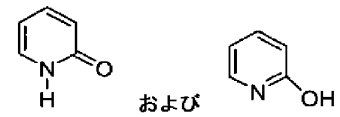
において、２および５と印された炭素へ直接結合された－ＯＨは存在しない。

【００７５】

互変異性形態、例えば、以下の部分：

【００７６】

【化６】



は、本発明の特定の実施形態において等価と考えられることも注意されるべきである。

【００７７】

「アルキニルアルキル」とは、アルキニル－アルキル－基を意味し、ここで、アルキニルおよびアルキルは、前述されるとおりである。好ましいアルキニルアルキルは、低級アルキニルおよび低級アルキル基を含む。親部分への結合は、アルキルによってである。好

適なアルキニルアルキル基の非限定的な例としては、プロパルギルメチルが挙げられる。

【００７８】

「ヘテロアラルキル」は、ヘテロアリール－アルキル－基を意味し、ここで、ヘテロアリールおよびアルキルは、前述されるとおりである。好ましいヘテロアラルキルは、低級アルキル基を含む。好適なアラルキル基の非限定的な例としては、ピリジルメチル、およびキノリン－３－イルメチルが挙げられる。親部分への結合は、アルキルを通じてである。

【００７９】

「ヒドロキシアルキル」とは、ＨＯ－アルキル－基を意味し、ここで、アルキルは、前述されるとおりである。好ましいヒドロキシアルキルは、低級アルキルを含む。好適なヒドロキシアルキル基の非限定的な例としては、ヒドロキシメチルおよび２－ヒドロキシエチルが挙げられる。

【００８０】

「アシル」とは、Ｈ－Ｃ（Ｏ）－、アルキル－Ｃ（Ｏ）－またはシクロアルキル－Ｃ（Ｏ）－基を意味し、ここで、この種々の基は、前述されるとおりである。親部分への結合は、カルボニルを通じてである。好ましいアシルは、低級アルキルを含む。好適なアシル基の非限定的な例としては、ホルミル、アセチルおよびプロパノイルが挙げられる。

【００８１】

「アロイル」は、アリール－Ｃ（Ｏ）－基を意味し、ここで、アリール基とは、前述されるとおりである。親部分への結合は、カルボニルを通じてである。好適な基の非限定的な例としては、ベンゾイルおよび１－ナフトイルが挙げられる。

【００８２】

「アルコキシ」とは、アルキル－Ｏ－基を意味し、ここで、アルキル基とは、前述されるとおりである。好適なアルコキシ基の非限定的な例としては、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、イソプロポキシおよびｎ－ブトキシが挙げられる。親部分への結合は、エーテル酸素を通じてである。

【００８３】

「アリールオキシ」とは、アリール－Ｏ－基を意味し、ここで、アリールと基は、前述されるとおりである。好適なアリールオキシ基の非限定的な例としては、フェノキシおよびナフトキシが挙げられる。親部分への結合は、エーテル酸素を通じてである。

【００８４】

「アラルキルオキシ」とは、アラルキル－Ｏ－基を意味し、ここで、アラルキル基とは、前述されるとおりである。好適なアラルキルオキシ基の非限定的な例としては、ベンジルオキシおよび１－または２－ナフタレンメトキシが挙げられる。親部分への結合は、エーテル酸素を通じてである。

【００８５】

「アルキルチオ」とは、アルキル－Ｓ－基を意味し、ここで、アルキル基とは、前述されるとおりである。好適なアルキルチオ基の非限定的な例としては、メチルチオおよびエチルチオが挙げられる。親部分への結合は、硫黄を通じてである。

【００８６】

「アリールチオ」とは、アリール－Ｓ－基を意味し、ここで、アリール基とは、前述されるとおりである。好適なアリールチオ基の非限定的な例としては、フェニルチオおよびナフチルチオが挙げられる。親部分への結合は、硫黄を通じてである。

【００８７】

「アラルキルチオ」とは、アラルキルＳ－基を意味し、ここで、アラルキル基とは、前述されるとおりである。好適なアラルキルチオ基の非限定的な例は、ベンジルチオである。親部分への結合は、硫黄を通じてである。

【００８８】

「アルキルシリル」とは、アルキル－Ｓｉ－基を意味し、ここで、アルキルとは前で定義したとおりであり、そして親部分への結合点は、Ｓｉ上にある。好ましいアルキルシリ

ルは、低級アルキルを含む。アルキルシリル基の例は、トリメチルシリル（－Ｓｉ（ＣＨ$_3$）$_3$）である。

【００８９】

「アルコキシカルボニル」とは、アルキル－Ｏ－ＣＯ－基を意味する。好適なアルコキシカルボニル基の非限定的な例としては、メトキシカルボニルおよびエトキシカルボニルが挙げられる。親部分への結合は、カルボニルを通じてである。

【００９０】

「アリールオキシカルボニル」とは、アリール－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－基を意味する。好適なアリールオキシカルボニル基の非限定的な例としては、フェノキシカルボニルおよびナフトキシカルボニルが挙げられる。親部分への結合は、カルボニルを通じてである。

【００９１】

「アラルコキシカルボニル」とは、アラルキルＯ－Ｃ（Ｏ）－基を意味する。好適なアラルコキシカルボニル基の非限定的な例は、ベンジルオキシカルボニルである。親部分への結合は、カルボニルを通じてである。

【００９２】

「アルキルスルホニル」とは、アルキル－Ｓ（Ｏ$_2$）－基を意味する。好ましい基は、アルキル基が低級アルキルであるものである。親部分への結合は、スルホニルを通じてである。

【００９３】

「アリールスルホニル」とは、アリール－Ｓ（Ｏ$_2$）－基を意味する。親部分への結合は、スルホニルを通じてである。

【００９４】

「置換された」という用語は、指定された原子上の１つ以上の水素が、記載された基からの選択で置き換えられることを意味し、ただし、現存する状況下での指定された原子の通常の価数を超えず、かつこの置換が安定な化合物を生じさせる場合である。置換基および／または変数の組み合わせは、この組み合わせが安定な化合物を生じさせる場合にのみ許容可能である。「安定な化合物」または「安定な構造」とは、反応混合物からの有用な程度の純度までの単離、および有効な治療剤への製剤化を耐えるのに十分に頑丈である化合物を意味する。

【００９５】

「必要に応じて置換された」という用語は、特定の基（ｇｒｏｕｐｓ）、ラジカル（ｒａｄｉｃａｌｓ）または部分での任意の置換を意味する。

【００９６】

化合物についての「精製された」、「精製された形態で」または「単離されかつ精製された形態で」という用語は、合成プロセスまたは天然源あるいはそれらの組み合わせから単離された後のその化合物の物理的状態をいう。したがって、化合物について「精製された」、「精製された形態で」または「単離されそして精製された形態で」という用語は、本明細書中に記載されるかまたは当業者に周知である標準的な分析技術によって性質決定されるに十分な純度の、本明細書中に記載されるかまたは当業者に周知である精製プロセス（単数または複数）から得られた後のその化合物の物理的状態をいう。

【００９７】

本明細書中の本文、スキーム、実施例および表における、未充足の価数を有する任意の炭素およびヘテロ原子は、その価数を充足するに十分な数の水素原子（単数または複数）を有すると考えられることにも注意されるべきである。

【００９８】

化合物中の官能基が「保護された」と称される場合、これは、化合物が反応へ供される際に、この基が、保護された部位での望まれない副反応を防ぐ改変された形態にあることを意味する。好適な保護基は、当業者によって、ならびに例えばＴ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅら，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（１９９１），Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋのような標準的な教科書を参照することによ

って、認識される。

【００９９】

任意の変数（例えば、アリール、複素環、R^2など）が任意の構成で、または式Ｉにおいて２回以上生じる場合、各出現におけるその定義は、あらゆる他の出現でのその定義から独立している。

【０１００】

本明細書中で使用される場合、「組成物」という用語は、特定の量で特定の成分を含む生成物、ならびに特定の量の特定の成分の組み合わせから直接的または間接的に生じる任意の生成物を包含するものと意図する。

【０１０１】

「薬学的組成物」という用語はまた、２つ以上（例えば、２つの）薬学的活性剤、例えば、本発明の化合物および本明細書中に記載される追加の薬剤のリストから選択される追加の薬剤、ならびに任意の薬学的に不活性な賦形剤などから構成される、バルク組成物および個々の投薬単位の両方を含むことを意図する。バルク組成物および各個の投薬単位は、固定量の上述の「２以上の薬学的活性剤」を含んでもよい。バルク組成物とは、個々の投薬単位へまだ形成されていない材料である。例示的な投薬単位は、錠剤、丸剤などの経口投薬単位である。同様に、本発明の薬学的組成物を投与することによって患者を治療する本明細書中で記載される方法もまた、上述のバルク組成物および個々の投薬単位の投与を包含するように意図される。

【０１０２】

本発明の化合物のプロドラッグおよび溶媒和化合物もまた、本明細書中で意図される。プロドラッグの考察は、Ｔ．ＨｉｇｕｃｈｉおよびＶ．Ｓｔｅｌｌａ，Ｐｒｏ－ｄｒｕｇｓ ａｓ Ｎｏｖｅｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ（１９８７）１４ ｏｆ ｔｈｅ Ａ．Ｃ．Ｓ． Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ、ならびにＢｉｏｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，（１９８７）Ｅｄｗａｒｄ Ｂ．Ｒｏｃｈｅ，編，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓに提供されている。「プロドラッグ」という用語は、インビボで変換されて、式（Ｉ）の化合物またはこの化合物の薬学的に許容される塩、水和物もしくは溶媒和化合物を生じる、化合物（例えば、薬物前駆体）を意味する。この変換は、例えば血液中での加水分解による機構のような、種々の機構によって（例えば、代謝または化学プロセスによって）生じてもよい。プロドラッグの使用の考察は、Ｔ．ＨｉｇｕｃｈｉおよびＷ．Ｓｔｅｌｌａ，「Ｐｒｏ－ｄｒｕｇｓ ａｓ Ｎｏｖｅｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，」第１４巻 ｔｈｅ Ａ．Ｃ．Ｓ． Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ、ならびにＢｉｏｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，編．Ｅｄｗａｒｄ Ｂ．Ｒｏｃｈｅ，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，１９８７において提供される。

【０１０３】

例えば、式（Ｉ）の化合物またはこの化合物の薬学的に許容される塩、水和物もしくは溶媒和化合物がカルボン酸官能基を含む場合、プロドラッグは、この酸基の水素原子を例えば以下のような基で置換することによって形成されるエステルを含んでもよい：（C_1－C_8）アルキル、（C_2－C_{12}）アルカノイルオキシメチル、４～９の炭素原子を有する１－（アルカノイルオキシ）エチル、５～１０の炭素原子を有する１－メチル－１－（アルカノイルオキシ）－エチル、３～６の炭素原子を有するアルコキシカルボニルオキシメチル、４～７の炭素原子を有する１－（アルコキシカルボニルオキシ）エチル、５～８の炭素原子を有する１－メチル－１－（アルコキシカルボニルオキシ）エチル、３～９の炭素原子を有するＮ－（アルコキシカルボニル）アミノメチル、４～１０の炭素原子を有する１－（Ｎ－（アルコキシカルボニル）アミノ）エチル、３－フタリジル、４－クロトノラクトニル、γ－ブチロラクトン－４－イル、ジ－Ｎ，Ｎ－（C_1－C_2）アルキルアミノ（C_2－C_3）アルキル（例えば、β－ジメチルアミノエチル）、カルバモイル－

（C_1－C_2）アルキル、Ｎ，Ｎ－ジ（C_1－C_2）アルキルカルバモイル－（Ｃ１－Ｃ２）アルキルおよびピペリジノ－、ピロリジノ－またはモルホリノ（C_2－C_3）アルキルなど。

【０１０４】

同様に、式（Ｉ）の化合物がアルコール官能基を含む場合、プロドラッグは、このアルコール基の水素原子を例えば以下のような基で置換することによって形成されてもよい：（C_1－C_6）アルカノイルオキシメチル、１－（（C_1－C_6）アルカノイルオキシ）エチル、１－メチル－１－（（C_1－C_6）アルカノイルオキシ）エチル、（C_1－C_6）アルコキシカルボニルオキシメチル、Ｎ－（C_1－C_6）アルコキシカルボニルアミノメチル、スクシノイル、（C_1－C_6）アルカノイル、α－アミノ（C_1－C_4）アルカニル、アリールアシルおよびα－アミノアシル、またはα－アミノアシル－α－アミノアシル［ここで、各α－アミノアシル基は、独立して、天然に存在するＬ－アミノ酸、Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）$_2$、－Ｐ（Ｏ）（Ｏ（C_1－C_6）アルキル）$_2$またはグリコシル（炭水化物のヘミアセタール形態のヒドロキシル基の除去から得られる基）などから選択される。

【０１０５】

式（Ｉ）の化合物がアミン官能基を組み込む場合、プロドラッグは、このアミン基の水素原子を例えば以下のような基で置換することによって形成されてもよい：Ｒ－カルボニル、ＲＯ－カルボニル、ＮＲＲ’－カルボニル［ここで、ＲおよびＲ’は、各々、独立して、（C_1－C_{10}）アルキル、（C_3－C_7）シクロアルキル、ベンジルであるか、あるいはＲ－カルボニルは、天然α－アミノアシルまたは天然α－アミノアシルである］、－Ｃ（ＯＨ）Ｃ（Ｏ）ＯＹ^1［式中、Ｙ^{1}は、Ｈ、（C_1－C_6）アルキルまたはベンジルである］－Ｃ（ＯＹ^2）Ｙ^3［式中、Ｙ^{2}は、（C_1－C_4）アルキルであり、そしてＹ^{3}は、（C_1－C_6）アルキル、カルボキシ（C_1－C_6）アルキル、アミノ（C_1－C_4）アルキル、またはモノ－Ｎ－（C_1－C_6）アルキルアミノアルキルもしくはジ－Ｎ，Ｎ－（C_1－C_6）アルキルアミノアルキルである］、－Ｃ（Ｙ^4）Ｙ^5［式中、Ｙ^{4}は、Ｈまたはメチルであり、かつＹ^{5}は、モノ－Ｎ－（C_1－C_6）アルキルアミノモルホリノもしくはジ－Ｎ，Ｎ－（C_1－C_6）アルキルアミノモルホリノ、ピペリジン－１－イルまたはピロリジン－１－イルである］など。

【０１０６】

本発明の１つ以上の化合物は、薬学的に許容される溶媒（例えば、水、エタノールなど）と共に非溶媒和形態および溶媒和形態で存在してもよく、そして本発明は溶媒和形態および非溶媒和形態の両方を含むことが意図される。「溶媒和化合物」とは、１つ以上の溶媒分子との、本発明の化合物の物理的結合を意味する。この物理的結合は、水素結合を含む、種々の程度のイオン結合および共有結合を包含する。特定の場合において、例えば１つ以上の溶媒分子が結晶性固体の結晶格子中に組み込まれる場合に、溶媒和化合物は単離可能である。「溶媒和化合物」とは、溶液相および単離可能な溶媒の両方を包含する。好適な溶媒和化合物の非限定的な例としては、エタノラート、メタノラートなどが挙げられる。「水和物」とは、溶媒分子がH_2Oである溶媒和化合物である。

【０１０７】

本発明の１つ以上の化合物は、必要に応じて、溶媒和化合物へ変換されてもよい。溶媒和化合物の調製は一般的に公知である。したがって、例えば、Ｍ．Ｃａｉｒａら、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉ．，９３（３），６０１～６１１（２００４）は、酢酸エチル中における、および水からの抗真菌性フコナゾールの溶媒和化合物の調製を記載している。溶媒和化合物、半溶媒和化合物（ｈｅｍｉｓｏｌｖａｔｅ）、水和物などの類似の調製は、Ｅ．Ｃ．ｖａｎ Ｔｏｎｄｅｒら，ＡＡＰＳ ＰｈａｒｍＳｃｉＴｅｃｈ．，５（１），ａｒｔｉｃｌｅ １２（２００４）；およびＡ．Ｌ．Ｂｉｎｇｈａｍら、Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，６０３～６０４（２００１）によって記載されている。典型的な非限定的なプロセスは、周囲温度より高い温度で所望量の所望の溶媒（有機物もしくは水またはその混合液）中に本発明の化合物を溶解する工程、および結晶を形成するに十分な速度でこの溶液を冷却し、次いでこれを標準的な方法で単離する工程を包含する。例

えばＩ．Ｒ．分光法等の分析技術によって、溶媒和化合物（または水和物）としての結晶中の溶媒（または水）の存在が示される。

【０１０８】

「有効量」または「治療上有効な量」とは、上述の疾患を阻害し、したがって所望の治療的、改善的、阻害的または予防的効果を生じさせることにおいて有効な量の本発明の化合物または組成物を記載することを意味する。

【０１０９】

式（Ｉ）の化合物は塩を形成し得、これもまた本発明の範囲内である。本明細書における式（Ｉ）の化合物への言及は、特に述べない限り、その塩への言及を含むことが理解される。用語「塩」とは、本明細書中で使用される場合、無機酸および／または有機酸によって形成される酸性塩、ならびに無機塩基および／または有機塩基によって形成される塩基性塩を意味する。さらに、式（Ｉ）の化合物が塩基性部分（例えば、ピリミジンまたはイミダゾール、しかしこれらに限定されない）および酸性部分（例えば、カルボン酸、しかしこれらに限定されない）の両方を含む場合、双性イオン（「内塩」）が形成され得、そして本明細書中で使用される用語「塩」に包含される。薬学的に許容される（すなわち、無毒性で、生理学的に許容される）塩が好ましいが、他の塩もまた有用である。式（Ｉ）の化合物の塩は、例えば、媒体（例えば、ここで塩が析出するもの）中においてまたは水性媒体中において、式（Ｉ）の化合物をある量（例えば、当量）の酸または塩基と反応させ、続いて凍結乾燥することによって形成され得る。

【０１１０】

例示的な酸付加塩としては、酢酸塩、アスコルビン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、フマル酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、リン酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩（ｔａｒｔａｒａｔｅｓ）、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩（トシル酸塩としても公知）などが挙げられる。さらに、塩基性の薬学的化合物からの薬学的に有用な塩の形成に好適と一般的に考えられる酸は、例えば、Ｐ．Ｓｔａｈｌら、Ｃａｍｉｌｌｅ Ｇ．（編）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ．Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｕｓｅ．（２００２）Ｚｕｒｉｃｈ：Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ；Ｓ．Ｂｅｒｇｅら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９７７）６６（１）１～１９；Ｐ．Ｇｏｕｌｄ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊ．ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ（１９８６）３３ ２０１～２１７；Ａｎｄｅｒｓｏｎら、Ｔｈｅ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９９６），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；およびＴｈｅ Ｏｒａｎｇｅ Ｂｏｏｋ（Ｆｏｏｄ ＆ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．、彼らのウェブサイト上）において考察されている。これらの開示は、それらを参照することによって本明細書中に援用される。

【０１１１】

例示的な塩基性塩としては、アンモニウム塩、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、リチウム、およびカリウムの塩、アルカリ土類金属塩、例えば、カルシウムおよびマグネシウムの塩、有機塩基（例えば、有機アミン）（例えば、ジシクロヘキシルアミン、ｔ－ブチルアミン）との塩、ならびにアミノ酸（例えば、アルギニン、リシン）との塩などが挙げられる。塩基性窒素含有基は、ハロゲン化低級アルキル（例えば、メチル、エチルおよびブチルの、塩化物、臭化物およびヨウ化物）、硫酸ジアルキル（例えば、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル、および硫酸ジブチル）、長鎖ハロゲン化物（例えば、デシル、ラウリルおよびステアリルの、塩化物、臭化物およびヨウ化物）、ハロゲン化アラルキル（例えば、臭化ベンジルおよび臭化フェネチル）などのような薬剤で四級化され（ｑｕａｒｔｅｒｎｉｚｅ）てもよい。

【０１１２】

全てのこのような酸性塩および塩基性塩は、本発明の範囲内の薬学的に許容される塩であるものと意図され、かつ全ての酸性塩および塩基性塩は、本発明の目的のために対応の化合物の遊離形態と等価であると考えられる。

【０１１３】

本発明の化合物の薬学的に許容されるエステルとしては、以下の群が挙げられる：（１）ヒドロキシ基のエステル化によって得られるカルボン酸エステル、ここで、このエステル集団（ｇｒｏｕｐｉｎｇ）のカルボン酸部分の非カルボニル部分は、直鎖または分岐鎖アルキル（例えば、アセチル、ｎ－プロピル、ｔ－ブチル、またはｎ－ブチル）、アルコキシアルキル（例えば、メトキシメチル）、アラルキル（例えば、ベンジル）、アリールオキシアルキル（例えば、フェノキシメチル）、アリール（例えば、例えばハロゲン、C_{1-4}アルキル、またはC_{1-4}アルコキシまたはアミノで必要に応じて置換されたフェニル）から選択される；（２）スルホン酸エステル、例えば、アルキルスルホニルまたはアラルキルスルホニル（例えば、メタンスルホニル）；（３）アミノ酸エステル（例えば、Ｌ－バリルまたはＬ－イソロイシル）；（４）ホスホン酸エステル、ならびに（５）一、二または三リン酸エステル。リン酸エステルは、例えば、C_{1-20}アルコールまたはその反応性誘導体によって、あるいは２，３－ジ（C_{6-24}）アシルグリセロールによって、さらにエステル化されてもよい。

【０１１４】

式（Ｉ）の化合物ならびにその塩、溶媒和化合物、エステルおよびプロドラッグは、それらの互変異性形態で（例えば、アミドまたはイミノエーテルとして）存在してもよい。全てのこのような互変異性形態は、本発明の部分として本明細書中で意図される。

【０１１５】

式（Ｉ）の化合物は、不斉またはキラル中心を含んでもよく、したがって、異なる立体異性形態で存在してもよい。式（Ｉ）の化合物の全ての立体異性形態ならびにそれらの混合物（ラセミ混合物を含む）は、本発明の部分を形成することが、意図される。さらに、本発明は、全ての幾何異性体および位置異性体を包含する。例えば、式（Ｉ）の化合物が二重結合または縮合環を含む場合、シス形態およびトランス形態の両方、ならびに混合物が、本発明の範囲内に含まれる。

【０１１６】

ジアステレオマー混合物は、当業者に周知の方法によって、例えば、クロマトグラフィーおよび／または分別結晶化によって、それらの物理化学的差異に基づいて、それらの個々のジアステレオマーへ分離され得る。好適な光学活性化合物（例えば、キラルアルコールまたはモーシャー酸クロリド（Ｍｏｓｈｅｒ’ｓ ａｃｉｄ ｃｈｌｏｒｉｄｅ）等のキラル助剤）との反応によりエナンチオマー混合物をジアステレオマー混合物へ変換し、ジアステレオマーを分離し、そして個々のジアステレオマーを対応の純粋なエナンチオマーへ変換する（例えば、加水分解する）ことによって、エナンチオマーを分離してもよい。また、式（Ｉ）の化合物のいくつかは、アトロプ異性体（例えば、置換されたビアリール）であってもよく、そして本発明の部分と考えられる。エナンチオマーはまた、キラルＨＰＬＣカラムの使用によって分離されてもよい。

【０１１７】

式（Ｉ）の化合物は異なる互変異性型で存在し得ることも可能であり、そして全てのこのような形態は本発明の範囲内に包含される。また、例えば、この化合物の全てのケト－エノール型およびイミン－エナミン型も本発明に包含される。

【０１１８】

本発明の化合物（この化合物の塩、溶媒和化合物、エステルおよびプロドラッグ、ならびにこのプロドラッグの塩、溶媒和化合物およびエステルのものを含む）の全ての立体異性体（例えば、幾何異性体、光学異性体など）、例えば、種々の置換基上の不斉炭素に起因して存在し得るもの［エナンチオマー形態（これは、不斉炭素の不在においてさえ存在し得る）、回転異性型、アトロプ異性体、およびジアステレオマー型を含む］は、位置異性体（例えば、４－ピリジルおよび３－ピリジルなど）がそうであるように、本発明の範

囲内にあると意図される。（例えば、式（Ｉ）の化合物が二重結合または縮合環を含む場合、シス形態およびトランス形態の両方、ならびに混合物が、本発明の範囲内に含まれる。また、例えば、この化合物の全てのケト－エノール形態およびイミン－エナミン形態も本発明に含まれる。）本発明の化合物の個々の立体異性体は、例えば、実質的に他の異性体を含まなくてもよいし、あるいは、例えば、ラセミ体として、または全ての他の、もしくは他の選択される立体異性体と混合されてもよい。本発明のキラル中心は、ＩＵＰＡＣ　１９７４　Ｒｅｃｏｍｍｅｎｄａｔｉｏｎｓによって定義されるＳまたはＲ立体配置を有し得る。「塩」、「溶媒和化合物」、「エステル」、「プロドラッグ」などという用語の使用は、本発明の化合物のエナンチオマー、立体異性体、回転異性体、互変異性体、位置異性体、ラセミ体またはプロドラッグの塩、溶媒和化合物、エステルおよびプロドラッグへ同様に適用されるものと意図する。

【０１１９】

本発明はまた、１つ以上の原子が、天然において通常見られる原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子によって置換されているという事実以外は、本明細書中で記載されるものと同一である、同位体で標識された本発明の化合物を包含する。本発明の化合物中へ組み込まれ得る同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素および塩素の同位体、例えば、それぞれ、^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{13}Ｃ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{18}Ｏ、^{17}Ｏ、^{31}Ｐ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{18}Ｆ、および^{36}Ｃｌが挙げられる。

【０１２０】

特定の同位体で標識された式（Ｉ）の化合物（例えば、^{3}Ｈおよび^{14}Ｃで標識されたもの）は、化合物および／または基質（ｓｕｂｓｔｒａｔｅ）組織分布アッセイにおいて有用である。トリチウム化（すなわち、^{3}Ｈ）および炭素－１４（すなわち、^{14}Ｃ）同位体が、それらの調製の容易さおよび検出能について特に好ましい。さらに、重水素（すなわち、^{2}Ｈ）などのより重い同位体で置換するほど、より高い代謝的安定性（例えば、インビボ半減期の延長、または必要投薬量の減少）から生じる特定の治療的利益が得られ得、したがって、いくつかの状況においては好ましい場合がある。式（Ｉ）の同位体標識された化合物は、同位体で標識されていない試薬の代わりに好適な同位体で標識されている試薬を使用することによって、後述のスキームおよび／または実施例において開示されるものと類似の手順に従うことによって、一般的に調製され得る。

【０１２１】

式（Ｉ）の化合物、ならびに式（Ｉ）の化合物の塩、溶媒和化合物、エステルおよびプロドラッグの多形相が本発明に含まれるものと意図する。

【０１２２】

一般的に、式（Ｉ）の化合物は、当業者に周知の種々の方法によって、例えば、下記スキーム１において概説される方法によって、および本明細書中に開示される実施例において、調製されてもよい。

【０１２３】

本発明の化合物は、有糸分裂の変更を伴う、種々の適用において有用であり得る。当業者によって理解されるとおり、有糸分裂は、種々の様式で変更され得；すなわち、有糸分裂経路における成分の活性を増加させるかまたは減少させることによって、有糸分裂に影響を与えることができる。特定の成分を阻害するかまたは活性化することにより、平衡を乱すことによって、有糸分裂に影響を与え（例えば、これを中断し）てもよい。有糸分裂を変更するために、類似のアプローチが使用されてもよい。

【０１２４】

特定の実施形態において、本発明の化合物は、有糸分裂紡錘体形成を阻害し、これによって有糸分裂において長期の細胞周期停止を生じさせるために用いられてもよい。この文脈において「阻害する」とは、有糸分裂紡錘体形成を減少させるかもしくはこれに干渉すること、または有糸分裂紡錘体機能不全を生じさせることを意味する。本明細書中において「有糸分裂紡錘体形成」とは、有糸分裂キネシンによる二極性構造体への微小管の組織

化を意味する。本明細書中において「有糸分裂紡錘体機能不全」とは、有糸分裂停止および単極性紡錘体形成を意味する。

【０１２５】

本発明の化合物は、有糸分裂キネシン、ＫＳＰに結合するか、および／またはその活性を阻害するために有用であり得る。一実施形態において、ＫＳＰはヒトＫＳＰであるが、この化合物は、他の生物由来のＫＳＰキネシンに結合するか、またはその活性を阻害するために用いられてもよい。この文脈において、「阻害する」とは、紡錘体極分離を増加させるかもしくは減少させること、有糸分裂紡錘体極の奇形を生じさせること（すなわち、スプレイング（ｓｐｌａｙｉｎｇ））またはそうでなければ、有糸分裂紡錘体の形態学的混乱（ｐｅｒｔｕｒｂａｔｉｏｎ）を引き起こすことを意味する。また、ＫＳＰの改変体および／またはフラグメントも、これらの目的についてのＫＳＰの定義内に含まれる（米国特許６，４３７，１１５を参照のこと）。さらに、本発明の化合物はまた、他の有糸分裂キネシンに結合するかまたはこれを調節するためにも有用である。

【０１２６】

本発明の化合物は、細胞増殖性疾患を治療するために用いられ得る。本明細書において提供される化合物、組成物および方法によって治療され得るこのような疾患状態としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：癌（下記においてさらに考察される）、過形成、心臓肥大、自己免疫性疾患、真菌性障害、関節炎、移植片拒絶、炎症性腸疾患、免疫障害、炎症、医学的処置（手術、血管形成術などが挙げられるが、これらに限定されない）後に誘発される細胞増殖。治療は、細胞増殖を阻害することを含む。場合によっては、細胞が、高または低増殖状態（異常状態）でなくそして依然として治療を必要としてもよいことが理解される。例えば、創傷治癒の間、細胞は、「正常に」増殖され得るが、増殖強化が望まれ得る。したがって、一実施形態において、本発明は、これらの障害または状態のいずれか１つを伴う差し迫った苦しみにさらされているかまたはこれに苦しんでいる細胞または被験体への適用を含む。

【０１２７】

本明細書において提供される化合物、組成物および方法は、例えば、皮膚癌、乳癌、脳腫瘍、結腸癌、胆嚢癌、甲状腺癌、子宮頸癌、精巣癌などの固形腫瘍を含む癌の治療に特に有用である。より詳細には、本発明の化合物、組成物および方法によって治療され得る癌としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

心臓：肉腫（血管肉腫、線維肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫）、粘液腫、横紋筋腫、線維腫、脂肪腫および奇形腫；

肺：気管支原生癌（扁平上皮細胞、未分化小細胞、未分化大細胞、腺癌）、肺胞（細気管支）癌、気管支腺腫、肉腫、リンパ腫、軟骨性過誤腫、中皮腫；

胃腸：食道（扁平上皮癌、腺癌、平滑筋肉腫、リンパ腫）、胃（癌腫、リンパ腫、平滑筋肉腫）、膵臓（導管腺癌、膵島細胞腺腫（インスリノーマ）、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍（ガストリノーマ）、カルチノイド腫瘍、ビポーマ）、小腸（腺癌、リンパ腫、カルチノイド腫瘍、カポジ肉腫、平滑筋腫、血管腫、脂肪腫、神経線維腫、線維腫）、大腸（腺癌、管状腺腫、絨毛腺腫、過誤腫、平滑筋腫）；

尿生殖器路：腎臓（腺癌、ウィルムス腫瘍（腎芽細胞腫）、リンパ腫、白血病）、膀胱および尿道（扁平上皮癌、移行上皮癌、腺癌）、前立腺（腺癌、肉腫）、精巣（精上皮腫、奇形腫、精上皮腫、奇形癌、絨毛膜癌、肉腫、間質細胞癌、線維腫、線維腺腫、類腺腫瘍、脂肪腫）；

肝臓：肝臓癌（肝細胞癌）、胆管癌、肝芽腫、血管肉腫、肝細胞腺腫、血管腫；

骨：骨原性肉腫（骨肉腫）、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫（細網肉腫）、多発性骨髄腫、悪性巨細胞腫脊索腫、オステオクロンフローマ（ｏｓｔｅｏｃｈｒｏｎｆｒｏｍａ）（骨軟骨腫）、良性軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、類骨骨腫および巨細胞腫；

神経系：頭骨（骨腫、血管腫、肉芽腫、黄色腫、変形性骨炎）、髄膜（髄膜腫、髄膜肉腫、神経膠腫症）、脳（星状細胞腫、髄芽細胞腫、神経膠腫、上衣細胞腫、胚細胞腫（松果

体腫）、多形性膠芽腫、乏突起細胞腫（オリゴデンデログリオーマ）、シュワン細胞腫（神経鞘腫）、網膜芽細胞腫、先天性腫瘍）、脊髄神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、肉腫；
婦人科：子宮（子宮内膜癌）、頚部（子宮頚癌、前腫瘍子宮頸部形成異常）、卵巣（卵巣癌（漿液性嚢胞腺癌、ムチン性嚢胞腺癌、未分類の癌腫）、果粒層－卵胞膜細胞腫瘍、セルトリ－ライディッヒ細胞腫、未分化胚細胞腫、悪性奇形腫）、外陰（扁平上皮癌、上皮内癌腫、腺癌、線維肉腫、黒色腫）、膣（明細胞癌、扁平上皮癌、ブドウ状肉腫（胎児性横紋筋肉腫）、ファロピアン管（癌腫）；
血液性：血液（骨髄性白血病（急性および慢性）、急性リンパ芽球性白血病、急性および慢性リンパ球性白血病、骨髄増殖性疾患、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群）、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（悪性リンパ腫）、Ｂ細胞リンパ腫、Ｔ細胞性リンパ腫、毛様細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、前骨髄性白血病；
皮膚：悪性黒色腫、基底細胞癌、扁平上皮癌、カポジ肉腫、モルズ（ｍｏｌｅｓ）異形成性母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド、乾癬；
副腎：神経芽腫；ならびに
他の腫瘍：キセノデローマ　ピグメントサム（ｘｅｎｏｄｅｒｏｍａ　ｐｉｇｍｅｎｔｏｓｕｍ）、ケラトカントーマ（ｋｅｒａｔｏｃｔａｎｔｈｏｍａ）および甲状腺濾胞癌を含む。
本明細書中で使用される場合、癌の治療とは、上述の状態のいずれか１つに罹患した細胞を含む、癌性細胞の処理を包含する。

【０１２８】

本発明の化合物はまた、癌の化学的予防において有用であり得る。化学的予防とは、初期突然変異事象を遮断することによって、または傷害を既に受けた前悪性細胞の進行を遮断するか、もしくは腫瘍再発を阻害することによって、侵襲性癌の進行を阻害することと定義される。

【０１２９】

本発明の化合物はまた、腫瘍血管新生および転移を阻害することにおいて有用であり得る。

【０１３０】

本発明の化合物はまた、米国特許６，２８４，４８０に記載されるように、ｂｉｍＣキネシンサブグループの真菌メンバーの活性を調節することによって、抗真菌剤として有用であり得る。

【０１３１】

本発明の化合物はまた、１つ以上の他の公知の治療剤および抗癌剤と組み合わせて有用である。本化合物と他の抗癌剤または化学療法剤との組み合わせは、本発明の範囲内である。このような薬剤の例は、Ｖ．Ｔ．ＤｅｖｉｔａおよびＳ．Ｈｅｌｌｍａｎ（編者），第６版（２００１年２月１５日）によって、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓによる、Ｃａｎｃｅｒ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙに見出すことができる。当業者は、関連する薬物および癌の特定の特徴に基づいて、薬剤のどの組み合わせが有用かを識別することができる。このような抗癌剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：エストロゲン受容体モジュレーター、アンドロゲン受容体モジュレーター、レチノイド受容体モジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質転移酵素インヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビターおよび他の血管新生インヒビター、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、アポトーシス誘発剤、細胞周期チェックポイントを干渉する薬剤。本発明の化合物はまた、放射線治療と共に投与される場合に有用である。

【０１３２】

「エストロゲン受容体モジュレーター」という句は、機構にかかわらず、この受容体へのエストロゲンの結合に干渉するかまたはこれを阻害する化合物をいう。エストロゲン受容体モジュレーターの例としては、限定はしないが、タモキシフェン、ラロキシフェン、

イドキシフェン、ＬＹ３５３３８１、ＬＹ１１７０８１、トレミフェン、フルベストラント、４－［７－（２，２－ジメチル－１－オキソプロポキシ－４－メチル－２－［４－［２－（１－ピペリジニル）エトキシ］フェニル］－２Ｈ－１－ベンゾピラン－３－イル］－フェニル－２，２－ジメチルプロパノエート、４，４’－ジヒドロキシベンゾフェノン－２，４－ジニトロフェニル－イドラゾン、および　ＳＨ６４６が挙げられる。

【０１３３】

「アンドロゲン受容体モジュレーター」という句は、機構にかかわらず、この受容体へのアンドロゲンの結合に干渉するかまたはこれを阻害する化合物をいう。アンドロゲン受容体モジュレーターの例としては、フィナステライドおよび他の５α－レダクターゼインヒビター、ニルタミド、フルタミド、ビカルタミド、リアロゾール、およびアビラテロンアセテートが挙げられる。

【０１３４】

「レチノイド受容体モジュレーター」という句は、機構にかかわらず、この受容体へのレチノイドの結合に干渉するかまたはこれを阻害する化合物をいう。このようなレチノイド受容体モジュレーターの例としては、ベキサロテン、トレチノイン、１３－シス－レチノイン酸、９－シス－レチノイン酸、ジフルオロメチルオルニチン、ＩＬＸ２３～７５５３、トランス－Ｎ－（４’－ヒドロキシフェニル）レチナミド、およびＮ－４－カルボキシフェニルレチナミドが挙げられる。

【０１３５】

「細胞毒性／細胞増殖抑制剤」という句は、主に細胞の機能に直接干渉することによって細胞死を生じさせるかもしくは細胞増殖を阻害するか、または細胞有糸分裂（ｍｙｃｏｓｉｓ）を阻害するかもしくはこれに干渉する、化合物をいい、これには以下を包含する：アルキル化剤、腫瘍壊死因子、インターカレータ（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｏｒｓ）、低酸素症活性化可能な化合物、微小管インヒビター／微小管安定化剤、有糸分裂キネシンのインヒビター、有糸分裂進行に関与するキナーゼのインヒビター、代謝拮抗物質；生物反応改変物質；ホルモン／抗ホルモン治療剤、造血成長因子、モノクローナル抗体標的化治療剤（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ａｇｅｎｔｓ）、モノクローナル抗体治療薬、トポイソメラーゼインヒビター、プロテアソームインヒビター、およびユビキチンリガーゼインヒビター。

【０１３６】

細胞毒性剤の例としては、限定はしないが、セルテネフ（ｓｅｒｔｅｎｅｆ）、カケクチン（ｃａｃｈｅｃｔｉｎ）、イホスファミド、タソネルミン（ｔａｓｏｎｅｒｍｉｎ）、ロニダミン、カルボプラチン、アルトレタミン、プレドニムスチン、ジブロモズルシトール、ラニムスチン、ホテムスチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、テモゾロミド（ＴＥＭＯＤＡＲ（商標）、Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ製）、シクロホスファミド、ヘプタプラチン（ｈｅｐｔａｐｌａｔｉｎ）、エストラムスチン、インプロスルファントシラート、トロホスファミド、ニムスチン、塩化ジプロスピジウム、プミテパ、ロバプラチン（ｌｏｂａｐｌａｔｉｎ）、サトラプラチン、ポルフィロマイシン、シスプラチン、ドキソルビシン、イロフルベン、デキシホスファミド（ｄｅｘｉｆｏｓｆａｍｉｄｅ）、シス－アミンジクロロ（２－メチル－ピリジン）白金、ベンジルグアニン、グルホスファミド、ＧＰＸ１００、（トランス，トランス，トランス）－ビス－μ－（ヘキサン－１，６－ジアミン）－μ－［ジアミン－白金（ＩＩ）］ビス［ジアミン（クロロ）白金（ＩＩ）］テトラクロライド、ジアリジジニルスペルミン（ｄｉａｒｉｚｉｄｉｎｙｌｓｐｅｒｍｉｎｅ）、三酸化ヒ素、１－（１１－ドデシルアミノ－１０－ヒドロキシウンデシル）－３，７－ジメチルキサンチン、ゾルビシン、イダルビシン、ダウノルビシン、ビサントレン、ミトキサントロン、ピラルビシン、ピナフィド（ｐｉｎａｆｉｄｅ）、バルルビシン、アムルビシン、アンチネオプラストン、３’－デアンシノ－３’－モルホリノ－１３－デオキソ－１０－ヒドロキシカルミノマイシン、アンナマイシン（ａｎｎａｍｙｃｉｎ）、ガラルビシン（ｇａｌａｒｕｂｉｃｉｎ）、エリナフィド、ＭＥＮ１０７５５、４－デメトキシ－

３－デアミノ－３－アジリジニル－４－メチルスルホニル－ダウノムビシン（ｄａｕｎｏｍｂｉｃｉｎ）（ＷＯ００／５００３２を参照のこと）、メトキシトレキサート（ｍｅｔｈｏｘｔｒｅｘａｔｅ）、ゲムシタビン、およびそれらの混合物が挙げられる。

【０１３７】

低酸素症活性化可能な化合物の例は、チラパザミン（ｔｉｒａｐａｚａｍｉｎｅ）である。

【０１３８】

プロテアソームインヒビターの例としては、ラクタシスチンおよびボルテゾミブが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３９】

微小管インヒビター／微小管安定化剤の例としては、パクリタキセル、硫酸ビンデシン、３’，４’－ジデヒドロ－４’－デオキシ－８’－ノルビンカロイコブラスチン、ドセタキセル、リゾキシン、ドラスタチン、イセチオン酸ミボブリン、アウリスタチン、セマドチン、ＲＰＲ１０９８８１、ＢＭＳ１８４４７６、ビンフルニン、クリプトフィシン、２，３，４，５，６－ペンタフルオロ－Ｎ－（３－フルオロ－４－メトキシフェニル）ベンゼンスルホンアミド、アンヒドロビンブラスチン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｌ－バリル－Ｌ－バリル－Ｎ－メチル－Ｌ－バリル－Ｌ－プロリル－Ｌ－プロリン－ｔ－ブチルアミド、ＴＤＸ２５８、エポチロン（例えば、米国特許６，２８４，７８１および６，２８８，２３７を参照のこと）およびＢＭＳ１８８７９７が挙げられる。

【０１４０】

トポイソメラーゼインヒビターのいくつかの例は、トポテカン、ヒカプトアミン（ｈｙｃａｐｔａｍｉｎｅ）、イリノテカン、ルビテカン、６－エトキシプロピオニル－３’，４’－Ｏ－エキソ－ベンジリデン－カルトロイシン、９－メトキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－５－ニトロピラゾロ［３，４，５－ｋｌ］アクリジン－２－（６Ｈ）プロパンアミン、１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［デ］ピラノ［３’，４’：ｂ，７］－インドリジノ［１，２ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）ジオン、ルルトテカン、７－［２－（Ｎ－イソプロピルアミノ）エチル］－（２０Ｓ）カンプトテシン、ＢＮＰ１３５０、ＢＮＰＩ１１００、ＢＮ８０９１５、ＢＮ８０９４２、エトポシドホスファート、テニポシド、ソブゾキサン、２’－ジメチルアミノ－２’－デオキシ－エトポシド、ＧＬ３３１、Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチル］－９－ヒドロキシ－５，６－ジメチル－６Ｈ－ピリド［４，３－ｂ］カルバゾール－１－カルボキサミド、アスラクリン、（５ａ，５ａＢ，８ａａ，９ｂ）－９－［２－［Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチル］－Ｎ－メチルアミノ］エチル］－５－［４－ヒドロキシ－３，５－ジメトキシフェニル］－５，５ａ，６，８，８ａ，９－ヘキソヒドロフロ（３’，４’：６，７）ナフト（２，３－ｄ）－１，３－ジオキソール－６－オン、２，３－（メチレンジオキシ）－５－メチル－７－ヒドロキシ－８－メトキシベンゾ［ｃ］－フェナントリジニウム、６，９－ビス［（２－アミノエチル）アミノ］ベンゾ［ｇ］イソキノリン（ｉｓｏｇｕｉｎｏｌｉｎｅ）－５，１０－ジオン、５－（３－アミノプロピルアミノ）－７，１０－ジヒドロキシ－２－（２－ヒドロキシエチルアミノメチル）－６Ｈ－ピラゾロ［４，５，１－デ］アクリジン－６－オン、Ｎ－［１－［２－（ジエチルアミノ）エチルアミノ］－７－メトキシ－９－オキソ－９Ｈ－チオキサンテン－４－イルメチル］ホルムアミド、Ｎ－（２－（ジメチルアミノ）エチル）アクリジン－４－カルボキサミド、６－［［２－（ジメチルアミノ）エチル］アミノ］－３－ヒドロキシ－７Ｈ－インデノ［２，１－ｃ］キノリン－７－オン、ジメスナ、およびカンプトスター（ｃａｍｐｔｏｓｔａｒ）である。

【０１４１】

本発明の化合物と組み合わせて用いられ得る他の有用な抗癌剤としては、チミジル酸シンターゼインヒビター、例えば、５－フルオロウラシルが挙げられる。

【０１４２】

一実施形態において、有糸分裂キネシンのインヒビターとしては、ＫＳＰのインヒビタ

ー、ＭＫＬＰ１のインヒビター、ＣＥＮＰ－Ｅのインヒビター、ＭＣＡＫのインヒビター、Ｋｉｆ１４のインヒビター、Ｍｐｈｏｓｐｈ１のインヒビターおよびＲａｂ６－ＫＩＦＬのインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４３】

「有糸分裂進行に関与するキナーゼのインヒビター」という句としては、オーロラキナーゼのインヒビター、Ｐｏｌｏ様キナーゼ（ＰＬＫ）のインヒビター（特に、ＰＬＫ－１のインヒビター）、ｂｕｂ－１のインヒビターおよびｂｕｂ－Ｒ１のインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４４】

「抗増殖剤」という句は、アンチセンスＲＮＡおよびＤＮＡオリゴヌクレオチド、例えば、Ｇ３１３９、ＯＤＮ６９８、ＲＶＡＳＫＲＡＳ、ＧＥＭ２３１、およびＩＮＸ３００１、ならびに代謝拮抗物質、例えば、エノシタビン、カルモフール、テガフール、ペントスタチン、ドキシフルリジン、トリメトレキサート、フルダラビン、カペシタビン、ガロシタビン、シタラビンオクホスファート、ホステアビン水酸化ナトリウム（ｆｏｓｔｅａｂｉｎｅ　ｓｏｄｉｕｍ　ｈｙｄｒａｔｅ）、ラルチトレキセド、パルチトレキセド（ｐａｌｔｉｔｒｅｘｉｄ）、エミテフル、チアゾフリン、デシタビン、ノラトレキセド、ペメトレキセド、ネルザラビン、２’－デオキシ－２’－メチリデンシチジン、２’－フルオロメチレン－２’－デオキシシチジン、Ｎ－［５－（２，３－ジヒドロ－ベンゾフリル）スルホニル］－Ｎ’－（３，４－ジクロロフェニル）ウレア、Ｎ６－［４－デオキシ－４－［Ｎ２－［２（Ｅ），４（Ｅ）－テトラデカジエノイル］グリシルアミノ］－Ｌ－グリセロ－Ｂ－Ｌ－マンノ－ヘプトピラノシル］アデニン、アプリジン（ａｐｌｉｄｉｎｅ）、エクテイナシジン、トロキサシタビン、４－［２－アミノ－４－オキソ－４，６，７，８－テトラヒドロ－３Ｈ－ピリミジノ［５，４－ｂ］［１，４］チアジン－６－イル－（Ｓ）－エチル］－２，５－チエノイル－Ｌ－グルタミン酸、アミノプテリン、５－フルオロウラシル（５－ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｌ）、アラノシン、１１－アセチル－８－（カルバモイルオキシメチル）－４－ホルミル－６－メトキシ－１４－オキサ－１，１１－ジアザテトラシクロ（７．４．１．０．０）－テトラデカ－２，４，６－トリエン－９－イル酢酸エステル、スワインソニン、ロメトレキソール、デクスラゾキサン、メチオニナーゼ、２’－シアノ－２’－デオキシ－Ｎ４－パルミトイル－１－Ｂ－Ｄ－アラビノフラノシルシトシンならびに３－アミノピリジン－２－カルボキシアルデヒドチオセミカルバゾンを包含する。

【０１４５】

モノクローナル抗体標的化治療剤の例としては、癌細胞特異的または標的細胞特異的モノクローナル抗体へ結合された細胞毒性剤また放射性同位体を有する治療薬が挙げられる。例としてはＢｅｘｘａｒが挙げられる。

【０１４６】

癌を治療するために有用なモノクローナル抗体治療薬の例としては、Ｅｒｂｉｔｕｘ（Ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）が挙げられる。

【０１４７】

「ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター」という句は、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡレダクターゼのインヒビターを指す。使用され得るＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビターの例としては、ロバスタチン（ＭＥＶＡＣＯＲ（登録商標）；米国特許４，２３１，９３８、４，２９４，９２６および４，３１９，０３９を参照のこと）、シンバスタチン（ＺＯＣＯＲ（登録商標）；米国特許第４，４４４，７８４号、同第４，８２０，８５０号および同第４，９１６，２３９号を参照のこと）、プラバスタチン（ＰＲＡＶＡＣＨＯＬ（登録商標）；米国特許第４，３４６，２２７号、同第４，５３７，８５９号、同第４，４１０，６２９号、同第５，０３０，４４７号および同第５，１８０，５８９号を参照のこと）、フルバスタチン（ＬＥＳＣＯＬ（登録商標）；米国特許第５，３５４，７７２号、同第４，９１１，１６５号、同第４，９２９，４３７号、同第５，１８９，１６４号、同第５，１１８，８５３号、同第５，２９０，９４６号および同

第５，３５６，８９６号を参照のこと）ならびにアトルバスタチン（ＬＩＰＩＴＯＲ（登録商標）；米国特許第５，２７３，９９５号、同第４，６８１，８９３号、同第５，４８９，６９１号および同第５，３４２，９５２号を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。これらならびに本方法において用いられ得る追加のＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビターの構造式は、Ｍ．Ｙａｌｐａｎｉ，「Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ Ｌｏｗｅｒｉｎｇ Ｄｒｕｇｓ」、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＆ Ｉｎｄｕｓｔｒｙ，ｐｐ．８５～８９（１９９６年２月５日）の第８７頁、ならびに米国特許第４，７８２，０８４号および同第４，８８５，３１４号に記載されている。本明細書中で使用される用語ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビターは、全ての薬学的に許容されるラクトンおよび開環された酸型（すなわち、ラクトン環が開環されて遊離酸を形成する場合）ならびにＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ阻害活性を有する化合物の塩およびエステル型を包含し、したがって、このような塩、エステル、開環酸およびラクトン型の使用は、本発明の範囲内に包含される。

【０１４８】

「プレニル－タンパク質転移酵素インヒビター」という句は、ファルネシル－タンパク質転移酵素（ＦＰＴアーゼ）、ゲラニルゲラニル－タンパク質転移酵素Ｉ（ＧＧＰＴアーゼ－Ｉ）、およびゲラニルゲラニル－タンパク質転移酵素ＩＩ（ＧＧＰＴアーゼ－ＩＩ、またＲａｂ ＧＧＰＴアーゼとも呼ばれる）を含む、プレニル－タンパク質転移酵素のいずれか１つまたはいずれかの組み合わせを阻害する化合物をいう。

【０１４９】

プレニル－タンパク質転移酵素インヒビターの例は、以下の公開公報および特許公報に見ることができる：

【０１５０】

【化６－２】

WO 96/30343, WO 97/18813, WO 97/21701, WO 97/23478, WO 97/38665, WO 98/28980, WO 98/29119, WO 95/32987, 米国特許番号5,420,245, 5,523,430, 5,532,359, 5,510,510, 5,589,485, 5,602,098, 欧州特許出願公開番号 0 618 221, 欧州特許出願公開番号 0 675 112, 欧州特許出願公開番号 0 604181, 欧州特許出願公開番号 0 696 593, WO 94/19357, WO 95/08542, WO 95/11917, WO 95/12612, WO 95/12572, WO 95/10514, 米国特許番号5,661,152, WO 95/10515, WO 95/10516, WO 95/24612, WO 95/34535, WO 95/25086, WO 96/05529, WO 96/06138, WO 96/06193, WO 96/16443, WO 96/21701, WO 96/21456, WO 96/22278, WO 96/24611, WO 96/24612, WO 96/05168, WO 96/05169, WO 96/00736, 米国特許番号 5,571,792, WO 96/17861, WO 96/33159, W0 96/34850,

【０１５１】

【化６－３】

WO 96/34851, WO 96/30017, WO 96/30018, WO 96/30362, WO 96/30363, WO 96/31111, WO 96/31477, WO 96/31478, WO 96/31501, WO 97/00252, WO 97/03047, WO 97/03050, WO 97/04785, WO 97/02920, WO 97/17070, WO 97/23478, WO 97/26246, WO, 97/30053, WO 97/44350, WO 98/02436, および 米国特許番号 5,532,359.

血管新生に対するプレニル－タンパク質転移酵素インヒビターの役割の例については、Ｅｕｒｏｐｅａｎ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，Ｖｏｌ．３５，Ｎｏ．９，ｐｐ．１３９４～１４

０１（１９９９）を参照のこと。
【０１５２】
ファルネシルタンパク質転移酵素インヒビターの例としては、ＳＡＲＡＳＡＲ（商標）（４－［２－［４－［（１１Ｒ）－３，１０－ジブロモ－８－クロロ－６，１１－ジヒドロ－５Ｈ－ベンゾ［５，６］シクロヘプタ［１，２－ｂ］ピリジン－１１－イル－］－１－ピペリジニル］－２－オキソエチル］－１－ピペリジンカルボキサミド、Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ製）、チピファルニブ（Ｚａｒｎｅｓｔｒａ（登録商標）またはＲ１１５７７７、Ｊａｎｓｓｅｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ製）、Ｌ７７８，１２３（ファルネシルタンパク質転移酵素インヒビター、Ｍｅｒｃｋ ＆ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ Ｓｔａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ製）、ＢＭＳ ２１４６６２（ファルネシルタンパク質転移酵素インヒビター、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ製）が挙げられる。
【０１５３】
「血管新生インヒビター」という句は、機構にかかわらず、新しい血管の形成を阻害する化合物をいう。血管新生インヒビターの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：チロシンキナーゼインヒビター、例えば、チロシンキナーゼ受容体Ｆｌｔ－１（ＶＥＧＦＲ１）およびＦｌｋ－１／ＫＤＲ（ＶＥＧＦＲ２）のインヒビター、表皮由来成長因子、線維芽細胞由来成長因子、または血小板由来成長因子のインヒビター、ＭＭＰ（マトリクスメタロプロテアーゼ）インヒビター、インテグリン遮断薬、インターフェロン－α（例えば、イントロンおよびＰｅｇ－イントロン）、インターロイキン－１２、ペントサン多硫酸ナトリウム、シクロオキシゲナーゼインヒビター、以下を含む：非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、例えばアスピリンおよびイブプロフェン、ならびに選択的シクロゲナーゼ－２インヒビター、例えばセレコキシブおよびロフェコキシブ（ＰＮＡＳ，Ｖｏｌ．８９，ｐ．７３８４（１９９２）；ＪＮＣＩ，Ｖｏｌ．６９，ｐ．４７５（１９８２）；Ａｒｃｈ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．，Ｖｏｌ．１０８，ｐ．５７３（１９９０）；Ａｎａｔ．Ｒｅｃ．，Ｖｏｌ．２３８，ｐ．６８（１９９４）；ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．３７２，ｐ．８３（１９９５）；Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｖｏｌ．３１３，ｐ．７６（１９９５）；Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，Ｖｏｌ．１６，ｐ．１０７（１９９６）；Ｊｐｎ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，Ｖｏｌ．７５，ｐ．１０５（１９９７）；Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，Ｖｏｌ．５７，ｐ．１６２５（１９９７）；Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌ．９３，ｐ．７０５（１９９８）；Ｉｎｔｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，Ｖｏｌ．２，ｐ．７１５（１９９８）；Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，Ｖｏｌ．２７４，ｐ．９１１６（１９９９））、ステロイド系抗炎症薬（例えば、コルチコステロイド、鉱質コルチコイド、デキサメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレド、ベタメタゾン）、カルボキシアミドトリアゾール、コンブレタスタチンＡ－４、スクアラミン、６－Ｏ－クロロアセチル－カルボニル）－フマギロール、サリドマイド、アンギオスタチン、トロポニン－１、アンギオテンシンＩＩアンタゴニスト（Ｆｅｒｎａｎｄｅｚら，Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１０５：１４１～１４５（１９８５）を参照のこと）、ならびにＶＥＧＦに対する抗体（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１７，ｐｐ．９６３～９６８（Ｏｃｔｏｂｅｒ １９９９）；Ｋｉｍら，Ｎａｔｕｒｅ，３６２，８４１～８４４（１９９３）；ＷＯ００／４４７７７；およびＷＯ００／６１１８６を参照のこと）。
【０１５４】
血管新生を調節するかまたは阻害しそしてまた本発明の化合物と組み合わせて使用されてもよい他の治療薬としては、凝固および線維素溶解システムを調節するかまたは阻害する薬剤（Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｌａ．Ｍｅｄ．３８：６７９～６９２（２０００）中の概説を参照のこと）が挙げられる。凝固および線維素溶解経路を調節するかまたは阻害するこのような薬剤の例としては、ヘパリン（Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．８０：１０～

２３（１９９８）を参照のこと）、低分子量ヘパリンおよびカルボキシペプチダーゼＵインヒビター（活性トロンビン活性化性線維素溶解インヒビター（ａｃｔｉｖｅ　ｔｈｒｏｍｂｉｎ　ａｃｔｉｖａｔａｂｌｅ　ｆｉｂｒｉｎｏｌｙｓｉｓ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）［ＴＡＦＩａ］のインヒビターとしても公知）（Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ　Ｒｅｓ．１０１：３２９～３５４（２００１）を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。ＴＡＦＩａインヒビターの例は、ＰＣＴ公開公報ＷＯ０３／０１３，５２６に記載されている。

【０１５５】

「細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤」という句は、細胞周期チェックポイントシグナルを変換するタンパク質キナーゼを阻害する化合物であって、それによってＤＮＡ損傷剤に対して癌細胞を敏感にする化合物をいう。このような薬剤としては、ＡＴＲ、ＡＴＭ、Ｃｈｋ１およびＣｈｋ２キナーゼのインヒビター、ならびにｃｄｋおよびｃｄｃキナーゼインヒビターが挙げられ、そして特に７－ヒドロキシスタウロスポリン、フラボピリドール、ＣＹＣ２０２（Ｃｙｃｌａｃｅｌ）およびＢＭＳ－３８７０３２によって例示される。

【０１５６】

「細胞増殖および生存のシグナル伝達の経路のインヒビター」という句は、細胞表面受容体およびそれらの表面受容体の下流でのシグナル伝達カスケードを阻害する薬剤をいう。このような薬剤としては、ＥＧＦＲのインヒビター（例えばゲフィチニブおよびエルロチニブ）、ＥＧＦＲに対する抗体（例えばＣ２２５）、ＥＲＢ－２のインヒビター（例えばトラスツズマブ）、ＩＧＦＲのインヒビター、サイトカイン受容体のインヒビター、ＭＥＴのインヒビター、ＰＩ３Ｋのインヒビター（例えばＬＹ２９４００２）、セリン／トレオニンキナーゼ（ＷＯ０２／０８３０６４、ＷＯ０２／０８３１３９、ＷＯ０２／０８３１４０およびＷＯ０２／０８３１３８に記載されるようなＡｋｔのインヒビターを含むが、これらに限定されない）、Ｒａｆキナーゼのインヒビター（例えばＢＡＹ－４３～９００６）、ＭＥＥＫのインヒビター（例えばＣＩ－１０４０およびＰＤ－０９８０５９）、ｍＴＯＲのインヒビター（例えばＷｙｅｔｈ　ＣＣＩ－７７９）、ならびにＣ－ａｂｌキナーゼのインヒビター（例えばＧＬＥＥＶＥＣ（商標）、Ｎｏｖａｒｔｉｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）が挙げられる。このような薬剤は、小分子インヒビター化合物および抗体アンタゴニストを包含する。

【０１５７】

「アポトーシス誘発剤」という句は、ＴＮＦ受容体ファミリーメンバー（ＴＲＡＩＬ受容体を含む）の活性化剤を包含する。

【０１５８】

本発明はまた、選択的ＣＯＸ－２インヒビターであるＮＳＡＩＤとの組み合わせを包含する。本明細書の目的のために、ＣＯＸ－２の選択的インヒビターであるＮＳＡＩＤは、細胞またはミクロソームアッセイによって評価されるＣＯＸ－１についてのＩＣ５０を上回るＣＯＸ－２についてのＩＣ５０の率によって測定した場合、少なくとも１００倍、ＣＯＸ－１よりもＣＯＸ－２を阻害するという特異性を有するものと定義される。本治療法に特に有用であるＣＯＸ－２のインヒビターは、以下である：３－フェニル－４－（４－（メチルスルホニル）フェニル）－２－（５Ｈ）－フラノン；および５－クロロ－３－（４－メチルスルホニル）フェニル－２－（２－メチル－５ピリジニル）ピリジン；またはそれらの薬学的に許容される塩。

【０１５９】

ＣＯＸ－２の特異的インヒビターとして記載されており、したがって本発明において有用である化合物としては、パレコキシブ、ＣＥＬＩＥＢＲＥＸ（登録商標）およびＢＥＸＴＲＡ（登録商標）またはそれらの薬学的に許容される塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６０】

血管新生インヒビターの他の例としては、エンドスタチン、ウクライン、ランピルナー

ゼ（ｒａｎｐｉｒｎａｓｅ）、ＩＭ８６２、５－メトキシ－４－［２－メチル－３－（３－メチル－２－ブテニル）オキシラニル］－１－オキサスピロ［２，５］オクタ－６－イル（クロロアセチル）カルバメート、アセチルジナナリン（ａｃｅｔｙｌｄｉｎａｎａｌｉｎｅ）、５－アミノ－１－［［３，５－ジクロロ－４－（４－クロロベンゾイル）フェニル］メチル］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾール－４－カルボキサミド、ＣＭ１０１、スクアラミン、コンブレタスタチン、ＲＰＩ４６１０、ＮＸ３１８３８、硫酸化マンノペンタオースホスフェート、７，７－（カルボニル－ビス［イミノ－Ｎ－メチル－４，２－ピロロカルボニルイミノ［Ｎ－メチル－４，２－ピロール］－カルボニルイミノ］－ビス－（１，３－ナフタレンジスルホナート）、および３－［（２，４－ジメチルピロール－５－イル）メチレン］－２－インドリノン（ＳＵ５４１６）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６１】

上記で使用される場合、「インテグリン遮断薬（ブロッカー）」とは、以下をいう：$\alpha_V\beta_3$インテグリンへの生理学的リガンドの結合を、選択的にアンタゴナイズするか、阻害するかまたは無効にする化合物；$\alpha_V\beta_5$インテグリンへの生理学的リガンドの結合を、選択的にアンタゴナイズするか、阻害するかまたは無効にする化合物；$\alpha_V\beta_3$インテグリンおよび$\alpha_V\beta_5$インテグリンの両方への生理学的リガンドの結合を、アンタゴナイズするか、阻害するかまたは無効にする化合物；ならびに毛細管内皮細胞上で発現される特定のインテグリン（単数または複数）の活性をアンタゴナイズするか、阻害するかまたは無効にする化合物。この用語はまた、$\alpha_V\beta_6$、$\alpha_V\beta_8$、$\alpha_1\beta_1$、$\alpha_2\beta_1$、$\alpha_5\beta_1$、$\alpha_6\beta_1$、および$\alpha_6\beta_4$インテグリンのアンタゴニストをも指す。この用語はまた、$\alpha_V\beta_3$、$\alpha_V\beta_5$、$\alpha_V\beta_6$、$\alpha_V\beta_8$、$\alpha_1\beta_1$、$\alpha_2\beta_1$、$\alpha_5\beta_1$、$\alpha_6\beta_1$および$\alpha_6\beta_4$インテグリンの任意の組み合わせのアンタゴニストをも指す。

【０１６２】

チロシンキナーゼインヒビターのいくつかの例としては、Ｎ－（トリフルオロメチルフェニル）－５－メチルイソオキサゾール－４－カルボキサミド、３－［（２，４－ジメチルピロール－５－イル）メチリデニル）インドリン－２－オン、１７－（アリルアミノ）－１７－デメトキシゲルダナマイシン、４－（３－クロロ－４－フルオロフェニルアミノ）－７－メトキシ－６－［３－（４－モルホリニル）プロポキシ］キナゾリン、Ｎ－（３－エチニルフェニル）－６，７－ビス（２－メトキシエトキシ）－４－キナゾリンアミン、ＢＩＢＸ１３８２、２，３，９，１０，１１，１２－ヘキサヒドロ－１０－（ヒドロキシメチル）－１０－ヒドロキシ－９－メチル－９，１２－エポキシ－１Ｈ－ジインドロ［１，２，３－ｆｇ：３’，２’，１’－ｋｌ］ピロロ［３，４－ｉ］［１，６］ベンゾジアゾシン－１－オン、ＳＨ２６８、ゲニステイン、ＳＴＩ５７１、ＣＥＰ２５６３、４－（３－クロロフェニルアミノ）－５，６－ジメチル－７Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジンメタンスルホナート、４－（３－ブロモ－４－ヒドロキシフェニル）アミノ－６，７－ジメトキシキナゾリン、４－（４’－ヒドロキシフェニル）アミノ－６，７－ジメトキシキナゾリン、ＳＵ６６６８、ＳＴＩ５７１Ａ、Ｎ－４－クロロフェニル－４－（４－ピリジルメチル）－１－フタラジンアミン、およびＥＭＤ１２１９７４が挙げられる。

【０１６３】

抗癌化合物以外の化合物との組み合わせもまた、本発明の方法に包含される。例えば、本発明の化合物とＰＰＡＲ－γ（すなわち、ＰＰＡＲ－ガンマ）アゴニストおよびＰＰＡＲ－δ（すなわち、ＰＰＡＲ－デルタ）アゴニストとの組み合わせは、特定の悪性疾患（ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ）の治療において有用である。ＰＰＡＲ－γおよびＰＰＡＲ－δは、核ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γおよびδである。内皮細胞上におけるＰＰＡＲ－γの発現およびその血管新生への関与は、文献（Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１９９８；３１：９０９～９１３；Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９９；２７４：９１１６～９１２１；Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．２０００；４１：２３０９～２３１７を参照のこと）に報告されている。つい最近、ＰＰＡＲ－γアゴニストは、インビトロでＶＥＧＦに対する血管新生応答を阻害し；

トログリタゾンおよびロシグリタゾンマレアートの両方が、マウスにおいて網膜新生血管形成の発達を阻害することが示されている（Ａｒｃｈ．Ｏｐｈｔｈａｍｏｌ．２００１；１１９：７０９～７１７）。ＰＰＡＲ－γアゴニストおよびＰＰＡＲ－γ／αアゴニストの例としては、チアゾリジンジオン（例えば、ＤＲＦ２７２５、ＣＳ－０１１、トログリタゾン、ロシグリタゾン、およびピオグリタゾン）、フェノフィブラート、ゲムフィブロジル、クロフィブラート、ＧＷ２５７０、ＳＢ２１９９９４、ＡＲ－Ｈ０３９２４２、ＪＴＴ－５０１、ＭＣＣ－５５５、ＧＷ２３３１、ＧＷ４０９５４４、ＮＮ２３４４、ＫＲＰ２９７、ＮＰ０１１０、ＤＲＦ４１５８、ＮＮ６２２、ＧＩ２６２５７０、ＰＮＵ１８２７１６、ＤＲＦ５５２９２６、２－［（５，７－ジプロピル－３－トリフルオロメチル－１，２－ベンゾイソオキサゾール－６－イル）オキシ］－２－メチルプロピオン酸、および２（Ｒ）－７－（３－（２－クロロ－４－（４－フルオロフェノキシ）フェノキシ）プロポキシ）－２－エチルクロマン－２－カルボン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６４】

一実施形態において、本発明の化合物と組み合わせて用いられ得る有用な抗癌（抗新生物としても公知）剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホルアミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロクスウリジン、シタラビン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコビリン（ｌｅｕｃｏｖｉｒｉｎ）、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（商標）、Ｓａｎｏｆｉ－Ｓｙｎｔｈｅｌａｂｏ Ｐｈａｒｍａｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｆｒａｎｃｅ製）、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、デオキシコホルマイシン、マイトマイシン－Ｃ、Ｌ－アスパラギナーゼ、テニポシド１７α－エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミソール、ナベルベン（Ｎａｖｅｌｂｅｎｅ）、アナストラゾール、レトラゾール（Ｌｅｔｒａｚｏｌｅ）、カペシタビン、レロキサフィン（Ｒｅｌｏｘａｆｉｎｅ）、ドロキサフィン（Ｄｒｏｌｏｘａｆｉｎｅ）、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シクロホスファミド（シトキサン）、ゲムシタビン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン、エルビタックス（Ｅｒｂｉｔｕｘ）ならびにそれらの混合物。

【０１６５】

本発明の別の実施形態は、癌の治療のための遺伝子治療と組み合わせての本発明の化合物の使用である。癌を治療することへの総合戦略の概説については、Ｈａｌｌら（Ａｍ Ｊ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ ６１：７８５～７８９，１９９７）およびＫｕｆｅら（Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，第５版，ｐｐ８７６～８８９，ＢＣ Ｄｅｃｋｅｒ，Ｈａｍｉｌｔｏｎ ２０００）を参照のこと。遺伝子治療を用いて、腫瘍抑制遺伝子を送達してもよい。このような遺伝子の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：組換えウイルス媒介遺伝子導入によって送達され得る、ｐ５３（例えば、米国特許６，０６９，１３４を参照のこと）、ｕＰＡ／ｕＰＡＲアンタゴニスト（「Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ａ ｕＰＡ／ｕＰＡＲ Ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ Ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｔｕｍｏｒ Ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ Ｄｉｓｓｅｍｉｎａｔｉｏｎ ｉｎ Ｍｉｃｅ，」Ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｕｇｕｓｔ １９９８；５（８）：１１０５～１３）、

およびインターフェロンガンマ（Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２０００；１６４：２１７～２２２）。

【０１６６】

本化合物はまた、固有多剤耐性（ＭＤＲ）（特に、高レベルの発現の輸送蛋白質と関連するＭＤＲ）の１つ以上のインヒビターと組み合わせて投与されてもよい。このようなＭＤＲインヒビターとしては、ｐ－糖蛋白質（Ｐ－ｇｐ）のインヒビター、例えば、ＬＹ３３５９７９、ＸＲ９５７６、ＯＣ１４４－０９３、Ｒ１０１９２２、ＶＸ８５３およびＰＳＣ８３３（バルスポダール）が挙げられる。

【０１６７】

本発明の化合物はまた、本発明の化合物（単独でまたは放射線治療と共の）の使用から生じ得る急性、遅延、晩期、および先行的嘔吐を含む、吐き気または嘔吐を治療するために１つ以上の制吐剤と組み合わせて用いられてもよい。嘔吐の予防または処置のために、本発明の化合物は、以下の１つ以上と組み合わせて使用されてもよい：他の抗嘔吐薬、特に、ニューロキニン－１受容体アンタゴニスト、５ＨＴ３受容体、アンタゴニスト、例えば、オンダンセトロン、グラニセトロン、トロピセトロン、およびザチセトロン（ｚａｔｉｓｅｔｒｏｎ）、ＧＡＢＡＢ受容体アゴニスト、例えば、バクロフェン、コルチコステロイド、例えばデカドロン（デキサメサゾン）、ケナログ、アリストコート、ナサリド、プレフェリド（Ｐｒｅｆｅｒｉｄ）、ベネコルテン（Ｂｅｎｅｃｏｒｔｅｎ）、あるいは米国特許第２，７８９，１１８号、同第２，９９０，４０１号、同第３，０４８，５８１号、同第３，１２６，３７５号、同第３，９２９，７６８号、同第３，９９６，３５９号、同第３，９２８，３２６号、および同第３，７４９，７１２号に記載されるもの、抗ドーパミン作用薬、例えば、フェノチアジン（例えば、プロクロルペラジン、フルフェナジン、チオリダジンおよびメソリダジン）、メトクロプラミドまたはドロナビノール。一実施形態において、ニューロキニン－１受容体アンタゴニスト、５ＨＴ３受容体アンタゴニストおよびコルチコステロイドから選択される抗嘔吐薬が、本発明の化合物の投与時に生じ得る嘔吐の治療または予防のためにアジュバントとして投与される。

【０１６８】

本発明の化合物と組み合わせて使用され得るニューロキニン－１受容体アンタゴニストの例は、米国特許第５，１６２，３３９号、同第５，２３２，９２９号、同第５，２４２，９３０号、同第５，３７３，００３号、同第５，３８７，５９５号、同第５，４５９，２７０号、同第５，４９４，９２６号、同第５，４９６，８３３号、同第５，６３７，６９９号、および同第５，７１９，１４７号に記載されており、これらの内容は、参照により本明細書中に援用される。ある実施形態において、本発明の化合物と組み合わせての使用のためのニューロキニン－１受容体アンタゴニストは、以下から選択される：２－（Ｒ）－（１－（Ｒ）－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）エトキシ）－３－（Ｓ）－（４－フルオロフェニル）－４－（３－（５－オキソ－１Ｈ，４Ｈ－１，２，４－トリアゾロ）メチル）モルホリン、またはその薬学的に許容される塩（これは、米国特許第５，７１９，１４７号に記載されている）。

【０１６９】

本発明の化合物はまた、例えば、レバミソール、イソプリノシンおよびザダキシン（Ｚａｄａｘｉｎ）などの１つ以上の免疫増強薬と共に投与されてもよい。

【０１７０】

したがって、本発明は、以下から選択される第２の化合物と組み合わせての（例えば、細胞増殖性疾患を治療または予防するための）本発明の化合物の使用を包含する：エストロゲン受容体モジュレーター、アンドロゲン受容体モジュレーター、レチノイド受容体モジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質転移酵素インヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管新生インヒビター、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有多剤耐性のインヒビター、抗嘔吐薬、免疫増強薬、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、ならびにアポトーシス誘発剤。

【０１７１】
一実施形態において、本発明は、以下から選択される第２の化合物と組み合わせての本発明の化合物の生成物および使用を包含する：細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、タキサン、トポイソメラーゼＩＩインヒビター、トポイソメラーゼＩインヒビター、チューブリン相互作用剤（ｔｕｂｕｌｉｎ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｎｇ ａｇｅｎｔ）、ホルモン剤、チミジル酸シンターゼインヒビター、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ファルネシルタンパク質転移酵素インヒビター、シグナル伝達インヒビター、ＥＧＦＲキナーゼインヒビター、ＥＧＦＲに対する抗体、Ｃ－ａｂｌキナーゼインヒビター、ホルモン療法併用およびアロマターゼ併用。
【０１７２】
「癌を処置（治療）すること」または「癌の処置（治療）」という用語は、癌性状態に罹患している哺乳動物への投与を指しており、そして癌性細胞を殺すことによって癌性状態を緩和する効果だけでなく、癌の増殖および／または転移の阻害を生じさせる効果のことも指す。
【０１７３】
一実施形態において、第２の化合物として使用される血管新生インヒビターは、チロシンキナーゼインヒビター、表皮由来成長因子のインヒビター、線維芽細胞由来成長因子のインヒビター、血小板由来成長因子のインヒビター、ＭＷ（マトリクスメタロプロテアーゼ）インヒビター、インテグリン遮断薬、インターフェロン－α、インターロイキン－１２、ペントサンポリスルフェート、シクロオキシゲナーゼインヒビター、カルボキシアミドトリアゾール、コンブレタスタチンＡ－４、スクアラミン、６－Ｏ－クロロアセチル－カルボニル）－フマギロール、サリドマイド、アンギオスタチン、トロポニン－１、またはＶＥＧＦに対する抗体から選択される。ある実施形態において、エストロゲン受容体モジュレーターは、タモキシフェンまたはラロキシフェンである。
【０１７４】
放射線治療および以下から選択される少なくとも１つの化合物と組み合わせて治療上有効な量の少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物を投与することを含む癌を処置する方法も、本発明に含まれる：エストロゲン受容体モジュレーター、アンドロゲン受容体モジュレーター、レチノイド受容体モジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質転移酵素インヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管新生インヒビター、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有の多剤耐性のインヒビター、抗嘔吐薬、および免疫増強薬、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、およびアポトーシス誘発剤。
【０１７５】
本発明のなお別の実施形態は、パクリタキセルまたはトラスツズマブと組み合わせて治療上有効な量の少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物を投与することを包含する癌を処置する方法である。
【０１７６】
本発明はまた、治療上有効な量の少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物および以下から選択される少なくとも１つの化合物を含む、細胞増殖性疾患（例えば、癌、過形成、心臓肥大、自己免疫性疾患、真菌性障害、関節炎、移植片拒絶、炎症性腸疾患、免疫障害、炎症、医学的処置後に誘発される細胞増殖）を治療または予防するために有用な薬学的組成物を包含する：エストロゲン受容体モジュレーター、アンドロゲン受容体モジュレーター、レチノイド受容体モジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質転移酵素インヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管新生インヒビター、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、およびアポトーシス誘発剤。
【０１７７】
本発明の別の局面は、ＫＳＰキネシン活性を選択的に阻害する方法であって、その必要

がある被験体（例えば、細胞、動物、またはヒト）において、少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルとその被験体とを接触させる工程を包含する方法に関する。

【０１７８】

好ましいＫＳＰキネシンインヒビターは、低濃度でＫＳＰキネシン活性を特異的に阻害し得るもの、例えば、５０μＭ以下、より好ましくは１００ｎＭ以下、最も好ましくは５０ｎＭ以下の濃度で５０％以上の阻害のレベルを生じさせるものである。

【０１７９】

本発明の別の局面は、ＫＳＰと関連する疾患または状態を治療または予防する方法であって、その必要がある被験体（例えば、ヒト）において、治療上有効な量の少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルをその被験体に投与することを包含する方法に関する。

【０１８０】

好ましい投薬量は、約０．００１～５００ｍｇ／体重ｋｇ／日の、式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである。特に好ましい投薬量は、約０．０１～２５ｍｇ／体重ｋｇ／日の、式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである。

【０１８１】

「有効量」および「治療上有効な量」という句は、治療されている状態または疾患の症状の緩和ならびに１つ以上の細胞増殖性疾患の進行の予防、遅延化または停止を含む、投与者（例えば、研究者、医師、または獣医師）によって求められている、組織、系、または被験体（例えば、動物またはヒト）の生物学的または医学的応答を誘発する、式（Ｉ）の化合物ならびに本明細書中に記載される他の薬理学的または治療的薬剤の量を意味する。本発明の製剤または組成物、組み合わせおよび治療は、これらの化合物と例えば動物またはヒトの体の作用部位とを接触させる任意の好適な手段によって与えられてもよい。

【０１８２】

上記化合物の薬学的に許容される塩の投与について、上述の重量は、この塩から誘導される治療的化合物の酸当量または塩基当量の重量をいう。

【０１８３】

上述されるように、本発明は、ある量の少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルと、ある量の上記に列挙される１つ以上の追加の治療剤（同時にまたは連続して投与される）とを含む組み合わせを包含し、ここで、この化合物／処置のこの量が所望の効果を生じる。

【０１８４】

このような投与の必要がある患者へ併用療法を施す場合、この併用におけるこの治療剤、または治療剤を含む薬学的組成物（単数または複数）は、例えば、連続して、同時に、共に、一斉になどの任意の順序で投与されてもよい。このような併用療法における種々の活性剤（ａｃｔｉｖｅｓ）の量は、異なる量（異なる投薬量）であってもまたは同一の量（同一の投薬量）であってもよい。したがって、例示目的のために、式（Ｉ）の化合物および追加の治療剤は、単一投薬単位（例えば、カプセル剤、錠剤など）中に固定量（投薬量）で存在してもよい。固定量の２つの異なる活性化合物を含有するこのような単一投薬単位の市販例は、ＶＹＴＯＲＩＮ（登録商標）（Ｍｅｒｃｋ　Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ製）である。

【０１８５】

固定用量として処方される場合、このような併用製品は、本明細書中で記載される投薬量範囲内の本発明の化合物と、その投薬量範囲内の他の薬学的活性剤または治療とを使用する。併用製剤が不適切である場合、式（Ｉ）の化合物はまた、公知の治療薬と共に連続的に投与されてもよい。本発明は、投与の順序が限定されず；式（Ｉ）の化合物は、公知の治療剤の投与の前または後のいずれに投与されてもよい。このような技術は、当業者お

よび主治医の技術範囲内にある。

【０１８６】

本発明の化合物の薬理学的特性は、多数の薬理学的アッセイによって確認され得る。ＫＳＰに対する本発明の化合物の阻害活性は、当該分野において公知の方法によって、例えば、実施例に記載の方法を使用することによって、評価され得る。

【０１８７】

有効成分が単独で投与されることが可能である一方、それを薬学的組成物として存在させることが好ましい。本発明の組成物は、上記で定義される、少なくとも１つの有効成分、ならびにその１つ以上の許容される担体、アジュバントまたはビヒクルおよび必要に応じて他の治療剤を一緒に含む。各々の担体、アジュバントまたはビヒクルは、組成物の他の成分と適合性であり、かつ治療の必要がある哺乳動物に対して有害でないという意味で、許容性でなければならない。

【０１８８】

したがって、本発明はまた、少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルと、少なくとも１つの薬学的に許容される担体、アジュバントもしくはビヒクルとを含む薬学的組成物に関する。

【０１８９】

本発明によって記載される化合物から薬学的組成物を調製するために、不活性な、薬学的に許容される担体は、固体であっても、または液体であってもよい。固体形態の調製物としては、散剤、錠剤、分散性顆粒剤、カプセル剤、カシェ剤および坐剤が挙げられる。散剤および錠剤は、約５～約９５パーセントの有効成分から構成され得る。好適な固形担体は、当業者に公知であり、例えば、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖またはラクトースである。錠剤、散剤、カシェ剤およびカプセル剤は、経口投与に好適な固形投薬形態として使用され得る。薬学的に許容される担体および種々の組成物の製造方法の例は、Ａ．Ｇｅｎｎａｒｏ（編），Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第１８版，（１９９０），Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａにおいて見られ得る。

【０１９０】

薬学的組成物という用語はまた、２以上の（例えば、２の）薬学的活性剤、例えば、本発明の化合物および本明細書中に記載される追加の薬剤のリストから選択される追加の薬剤、ならびに薬学的に不活性な賦形剤から構成される、バルク組成物および個々の投薬単位の両方を含むものと意図される。バルク組成物および各個の投薬単位は、固定量の上述の「２つ以上の薬学的活性剤」を含有し得る。バルク組成物は、個々の投薬単位へまだ形成されていない材料である。例示的な投薬単位は、錠剤、丸剤などの経口投薬形態である。同様に、本発明の薬学的組成物を投与することによって被験体を治療する本明細書中で記載される方法はまた、上述のバルク組成物および個々の投薬単位の投与を包含するものと意図する。

【０１９１】

さらに、本発明の組成物は、任意の１つ以上の成分あるいは有効成分の速度制御放出を提供して治療効果を最適化するために、徐放性型に処方されてもよい。徐放に好適な剤形としては、種々の崩壊速度の層を含む層状錠剤、または有効成分に含浸されかつ錠剤型に成形された制御放出ポリマーマトリクス、またはこのような含浸もしくは封入された多孔性ポリマーマトリクスを含むカプセル剤が挙げられる。

【０１９２】

液体形態調製物としては、液剤、懸濁剤およびエマルジョンが挙げられる。例としては、経口液剤、懸濁剤およびエマルジョン用の乳白剤および甘味料の非経口注射または添加のための水または水－プロピレングリコール液剤が言及され得る。液体型の調製物としてはまた、鼻内投与用の液剤を挙ることができる。

【０１９３】

吸入に好適なエアロゾル調製物としては、薬学的に許容される担体（例えば、不活性圧

縮ガス、例えば、窒素）と組み合わされ得る、粉末型の溶液および固体を挙げることができる。

【０１９４】

経口または非経口投与用の液体形態調製物へ使用直前に変換されるように意図される固体形態調製物もまた含まれる。このような液体形態としては、液剤、懸濁剤およびエマルジョンが挙げられる。

【０１９５】

本発明の化合物はまた、経皮的に送達可能であり得る。経皮組成物は、クリーム、ローション、エアロゾルおよび／またはエマルジョンの形態をとってもよく、そして、この目的について当該分野において通常であるように、マトリクスまたはリザーバタイプの経皮パッチに含まれてもよい。

【０１９６】

本発明の化合物はまた、皮下に送達されてもよい。

【０１９７】

好ましくは、この化合物は経口投与される。

【０１９８】

好ましくは、薬学的調製物は、単位投薬形態である。このような形態において、調製物は、好適な量の活性成分、例えば、所望の目的を達成するに有効な量を含む適切なサイズの単位用量へ分割される。

【０１９９】

調製物の単位用量中の活性な化合物の量は、特定の適用に従って、約１ｍｇ～約１００ｍｇ、好ましくは約１ｍｇ～約５０ｍｇ、より好ましくは約１ｍｇ～約２５ｍｇで変化されてもよいし、または調節されてもよい。

【０２００】

使用される実際の投薬量は、患者の要件および治療される状態の重篤度に依存して、変化されてもよい。特定の状況についての適切な投薬レジメンの決定は、当該分野の技術範囲内にある。便宜上、総１日投薬量は、必要に応じて、分割されかつその日の間に少しずつ投与されてもよい。

【０２０１】

本発明の化合物ならびに／またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルの投与量および頻度は、患者の年齢、状態およびサイズならびに処置されている症状の重篤度などの因子を考慮する主治医の判断に従って調節される。経口投与についての典型的な推奨される１日投薬量レジメンは、２～４回の分割投与で、約１ｍｇ／日～約５００ｍｇ／日、好ましくは１ｍｇ／日～２００ｍｇ／日の範囲に及んでもよい。

【０２０２】

本発明の別の局面は、治療上有効な量の少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルと、少なくとも１つの薬学的に許容される担体、アジュバントもしくはビヒクルとを含むキットである。

【０２０３】

本発明のなお別の局面は、ある量の少なくとも１つの式（Ｉ）の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルと、ある量の少なくとも１つの上記で列挙される追加の治療剤とを含むキットであり、ここで、この量の２つ以上の成分が所望の治療的効果を生じさせる。

【０２０４】

本明細書に開示される本発明は、以下の調製および実施例によって例証され、これらは本開示の範囲を限定するとは解釈されるべきでない。代替の機構経路および類似の構造体は、当業者に明らかである。

【実施例】

【０２０５】

下記の溶媒および試薬は、括弧中のそれらの略語によって言及されてもよい：

薄層クロマトグラフィー：ＴＬＣ
ジクロロメタン：CH_2Cl_2
酢酸エチル：ＡｃＯＥｔまたはＥｔＯＡｃ
メタノール：ＭｅＯＨ
トリフルオロアセテート：ＴＦＡ
トリエチルアミンEt_3NまたはＴＥＡ
ブトキシカルボニル：ｎ－ＢｏｃまたはＢｏｃ
核磁気共鳴分光法：ＮＭＲ
液体クロマトグラフィー質量分析：ＬＣＭＳ
高分解能質量分析：ＨＲＭＳ
ミリリットル：ｍＬ
ミリモル：ｍｍｏｌ
マイクロリットル：μＬ
グラム：ｇ
ミリグラム：ｍｇ
室温またはｒｔ（周囲）：約２５℃
ジメトキシエタン：ＤＭＥ。

【０２０６】

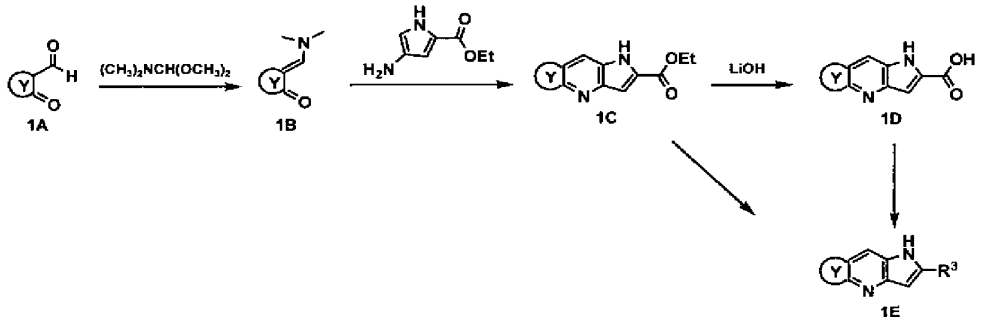
調製の一般的方法

本発明の化合物は、当業者に明白な多数の方法によって調製され得る。好ましい方法としては、限定はしないが、本明細書に記載される一般的な合成手順が挙げられる。当業者は、付属の置換基の選択次第で１つの経路が最適であることを理解する。さらに、当業者は、ある場合には、工程の順序が官能基の不適合性を回避するように変化されてもよいことを理解する。当業者はまた、当業者に公知の方法によるR^3およびR^4基の修飾によって、種々のR^3およびR^4基を有する化合物を得ることができることを理解する。

【０２０７】

【化７】

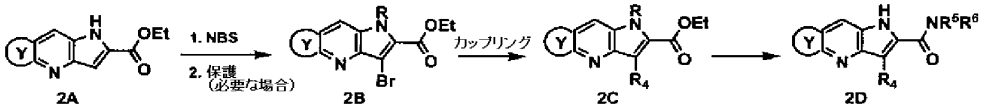
スキーム1



式（Ｉ）の適切に置換されたピロール誘導体は、以下のとおり調製され得る。ケトン１ＡをＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミドジメチルアセタールで処理して、１Ｂを得て、これを４－アミノ－１Ｈ－ピロール－２－カルボン酸エチルエステルで環化して化合物１Ｃを得た。このエステルを、加水分解してカルボン酸１Ｄを塩基性条件下で得てもよい。このエステル１Ｃまたは酸１Ｄを、還元、求核試薬での処理、またはいくつかの標準的な修飾などの当業者に公知の方法によって種々のR^3基に変換してもよい。例えば、シアン化ナトリウムの有無において、適切に置換されるかまたは非置換のアミンとのエステル１Ｃの反応によって、アミド生成物を得ることができる。あるいは、このアミドは、酸１Ｄの反応性カルボキシ誘導体（例えば、酸塩化物）での適切なアミンの処置、または適切なカップリング試薬（例えば、ＨＡＴＵ）の存在下での酸１Ｄとの反応によって調製され得る。

【０２０８】
【化８】

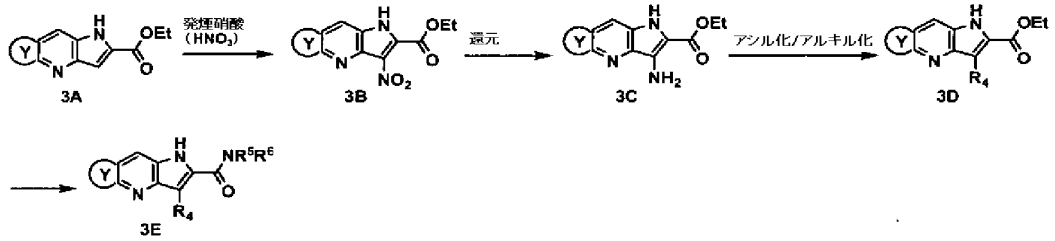
スキーム２



炭素または窒素がピロール環に直接結合される、式（Ｉ）のＲ^{4}置換化合物のいくつかは以下のように調製され得る。ピロール誘導体２Ａのブロモ化試薬、好ましくは適切な溶媒中のＮ－ブロモコハク酸イミドでの処理によって、化合物２Ｂが得られた。ピロールＮＨ基は、次の反応に必要な場合適切な保護基、好ましくはＢｏｃで保護され得る。このブロモ化合物２Ｂは、適切なボロン酸、スズ試薬またはアルキレンと反応されて、炭素結合誘導体２Ｃが得られるが、Ｂｕｃｋｗａｌｄ型カップリング条件下でのアミンでの２Ｂの処理は、窒素連結誘導体２Ｃをもたらし得る。保護基の脱保護、必要な場合、その後の適切なアミンでの処理によって、化合物２Ｄが得られた。いくつかのＲ^{4}基を、当業者に公知の方法によって適切な段階で修飾してもよい。

【０２０９】
【化９】

スキーム３



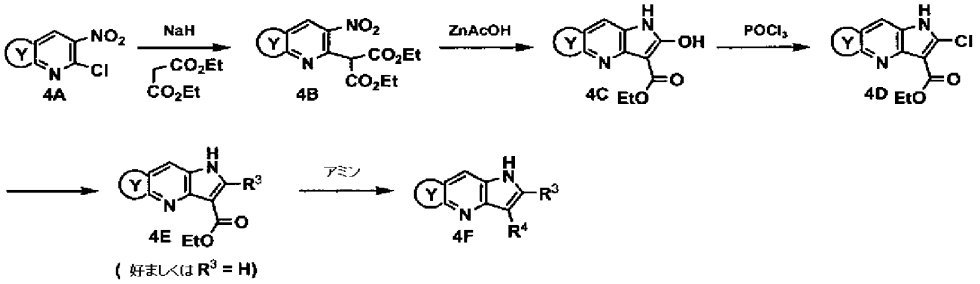
窒素がピロール環に結合されている式ＩのＲ^{4}置換化合物のいくつかはまた、以下のように調製されてもよい。ニトロ化試薬、好ましくは発煙硝酸でのピロール誘導体３Ａの処理によって化合物３Ｂを得た。ニトロ基の還元によって、アミノ化合物３Ｃを得て、これを当業者に公知の方法によってアシル化またはアルキル化して、異なるＲ４基を有する化合物を得てもよい。アミンでの化合物３Ｄのさらなる処理、続いてスキーム１に記載される適切な方法によって、化合物３Ｅを得ることができる。Ｒ^{4}基のいくつかは、当業者に公知の方法によって適切な段階で修飾され得る。

【０２１０】

OnCusp
Ex. 1002

【化１０】

スキーム4



好ましくはＲ^{4}がアミド基である式ＩのＲ^{3}およびＲ^{4}置換化合物のいくつかは、以下のとおり調製され得る。塩基の存在下でのマロン酸ジエチルでの化合物４Ａの処理で化合物４Ｂが得られた。ニトロ基の、好ましくは亜鉛／酢酸での還元、続いて、オキシ塩化リンでの処理で、化合物４Ｄが得られた。化合物４Ｄのクロロ基を官能化して、当業者に公知の方法によって異なるＲ^{4}基を得てもよいし、または好ましくは、これを還元して、好ましくはＲ^{4}がＨである化合物４Ｅを得てもよい。化合物４Ｅのエステル基を、スキーム１に記載の方法、好ましくは、シアン化ナトリウムの存在下でのアミンとの反応によって異なるアミンで処理して、Ｒ^{4}がアミド基である化合物４Ｆを得てもよい。

【０２１１】

以下の実施例で本発明を例示するが、これはその詳細に対して本発明を限定すると解釈されるべきではない。他に示さない限り、以下の実施例の全ての部および割合（パーセンテージ）は、同様に、本明細書を通じて、重量による。

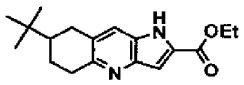
【０２１２】

調製の特定の方法－実施例

（実施例１）

【０２１３】

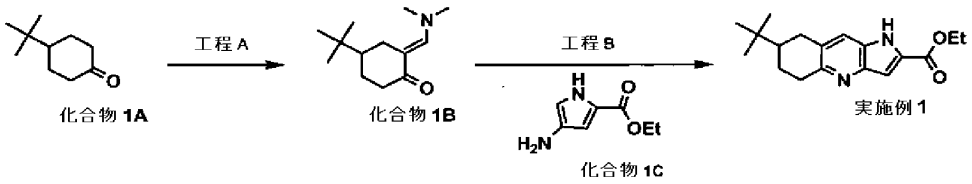
【化１１】



調製例１：

【０２１４】

【化１２】



工程Ａ：

４－ｔｅｒｔ－ブチルシクロヘキサノン（１０ｇ、６４．８３ｍｍｏｌ、１当量）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドジメチルアセタール（８．６ｍＬ、６４．８３ｍｍｏｌ、１当量）およびトルエン（２０ｍＬ）の混合物を１００で１８時間加熱した。濃縮して１３．５ｇの化合物１Ｂを得て、これをさらなる精製なしに次の反応に用いた。

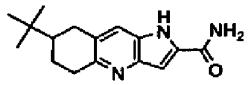
【０２１５】

工程Ｂ：
４－ニトロピロール－２－カルボン酸エチルエステル、ＥｔＯＨ、１０％Ｐｄ（ＯＨ）$_2$－Ｃの混合物を、Ｈ$_2$ｐａｒｒシェーカーで、４０ｐｓｉで１８時間攪拌した。セライトで濾過して、エタノールで洗浄した。その濾液を濃縮して、化合物１Ｃを得た。化合物１Ｂ（５ｇ、２３．９ｍｍｏｌ、１当量）、化合物１Ｃ（３．６８ｇ、２３．９ｍｍｏｌ、１当量）および酢酸（１００ｍＬ）の混合物を８０℃で７２時間加熱した。室温まで冷却して濃縮した。この残渣に、ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（５００ｍＬ）を添加して、飽和ＮａＨＣＯ$_3$（３×３００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をＮａＳＯ$_4$で乾燥し、濾過して、濃縮した。この残渣にＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（５００ｍＬ）、続いてジエチルエーテル（２００ｍＬ）を添加し、得られた固体をろ過した。その固体をジエチルエーテルで洗浄し、乾燥して実施例１を得た（２．５ｇ）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３０１。

（実施例２）

【０２１６】

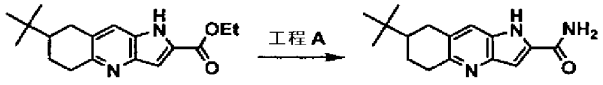
【化１３】



調製例２：

【０２１７】

【化１４】



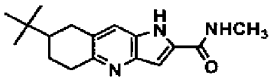
実施例１　　実施例２

工程Ａ：
実施例１（０．０２ｇ、０．０６６ｍｍｏｌ、１当量）およびメタノール（１０ｍＬ）の混合物を飽和アンモニアし、６０℃で７２時間加熱した。濃縮して、７％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、実施例２（１０ｍｇ）を得た。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝２７２。

（実施例３）

【０２１８】

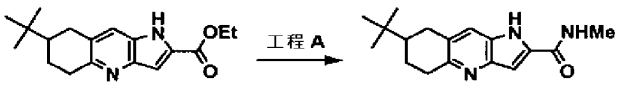
【化１５】



調製例３：

【０２１９】

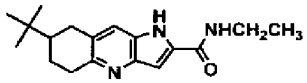
【化１６】



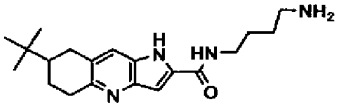
実施例１　　実施例３

工程Ａ：
実施例１（０．０３ｇ、０．１ｍｍｏｌ、１当量）およびメタノール中のメチルアミンの２Ｍ溶液（５ｍＬ）の混合物を６４℃で１８時間加熱した。濃縮して、９％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、実施例３（２５ｍｇ）を得た。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝２８６。

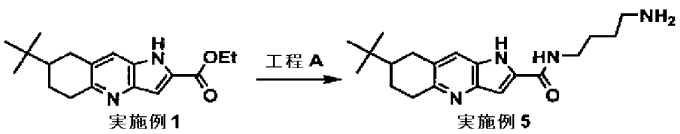
（実施例４）
【０２２０】
【化１７】



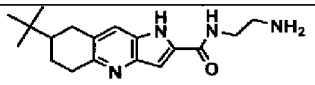
実施例３の手順と同様の手順に従い、ただし、メチルアミンの代わりにエチルアミンを用いて、表題の化合物の実施例４を調製した。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３００。
（実施例５）
【０２２１】
【化１８】



調製例５：
【０２２２】
【化１９】

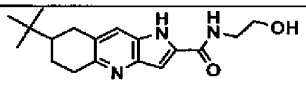
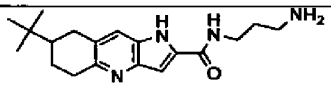
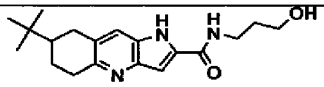
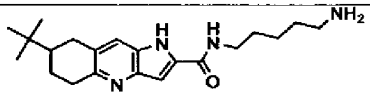
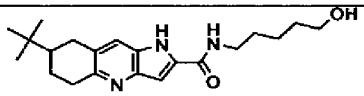
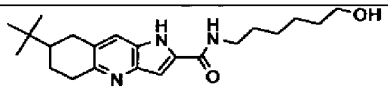
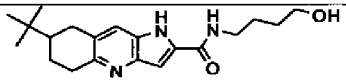
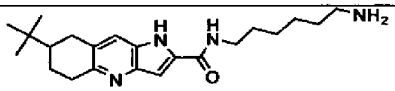
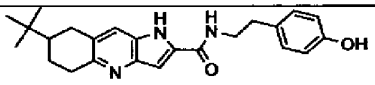
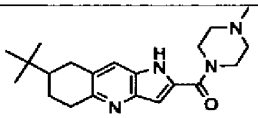
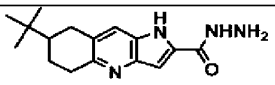
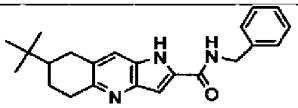
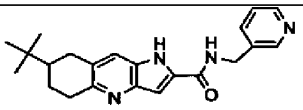


工程Ａ：
実施例１（０．０３ｇ、０．１ｍｍｏｌ、１当量）および１，４－ジアミノブタン（４ｍＬ）の混合物を１２０℃で１８時間おいた。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）に注いで、水（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。１５％のＭｅＯＨ（NH_3）／CH_2Cl_2で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、表題の化合物の実施例５（４０ｍｇ）を得る。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３４３。
（実施例６－１２）
実施例５の手順と同様の手順に従い、ただし適切に置換したアミンを用いて、表１の化合物を実施例１から調製した。
【表Ｂ－１】

実施例	構造	LCMS: MH^+
6		315

【０２２３】

【表Ｂ－２】

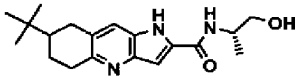
7		316
8		329
9		330
10		357
11		358
12		372
13		344
14		371
15		392
16		355
17		287
18		362
19		363

【０２２４】

（実施例２０）

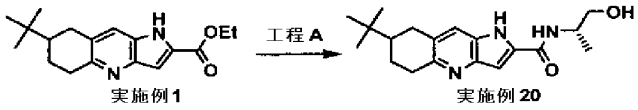
【０２２５】

【化２０】



調製例２０：

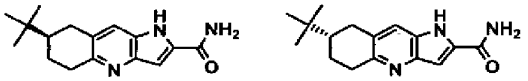
【０２２６】
【化２１】



実施例1　　実施例20

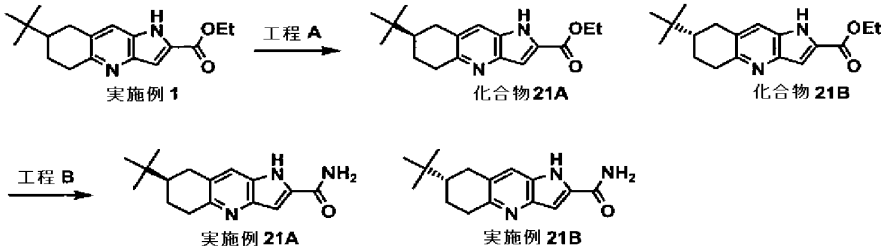
工程Ａ：
実施例１（０．０３ｇ、０．１ｍｍｏｌ、１当量）、（Ｓ）－２－アミノ－１－プロパノール（０．０７８ｍＬ、１ｍｍｏｌ、１０当量）、シアン化ナトリウム（０．００５ｇ、０．１ｍｍｏｌ、１当量）およびｏ－キシレンの混合物を１３８℃で１８時間加熱した。室温まで冷却して、ＥｔＯＡＣ（２００ｍＬ）で希釈し、水（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して、濃縮した。１００％のＥｔＯＡｃおよび５％のＭｅＯＨ（NH_3）／ＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、表題の化合物、実施例２０（１０ｍｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３３０。

（実施例２１Ａおよび２１Ｂ）
【０２２７】
【化２２】



実施例21A　　実施例21B

調製例２１Ａおよび２１Ｂ
【０２２８】
【化２３】

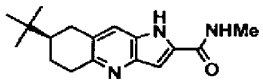


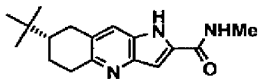
実施例1　　化合物21A　　化合物21B
実施例21A　　実施例21B

工程Ａ：
実施例１（０．２５ｇ）を、１／１／ＩＰＡ／ヘキサンで溶出するキラルパックＡＤカラムを用いてＨＰＬＣで分離した。異性体Ａ、化合物２１Ａ（０．０８２ｇ）、および異性体Ｂ、化合物２１Ｂ（０．１１ｇ）を得た。
【０２２９】
工程Ｂ：
化合物２１Ａおよび２１Ｂを、実施例１からの実施例２の調製について記載された手順を用いて、それぞれ実施例２１Ａおよび実施例２１Ｂに変換した。実施例２１Ａ、ＬＣＭＳ：MH^+＝２７２および実施例２１Ｂ、ＬＣＭＳ：MH^+＝２７２。

（実施例２２Ａおよび２２Ｂ）
【０２３０】

【化２４】


実施例 22A

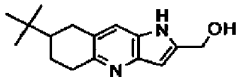

実施例 22B

実施例３の手順と同様の手順に従い、実施例２２Ａおよび２２Ｂを、それぞれ化合物２１Ａおよび２１Ｂから調製した。実施例２２Ａ，ＬＣＭＳ：MH^+ = ２８６および実施例２２Ｂ，ＬＣＭＳ：MH^+ = ２８６。

（実施例２３）

【０２３１】

【化２５】



調製例２３：

【０２３２】

【化２６】


実施例 1　　実施例 23

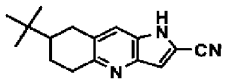
工程Ａ：

ＴＨＦ（４ｍＬ）中の実施例１（０．１ｇ、０．３３ｍｍｏｌ、１当量）の混合物に、ジエチルエーテル中の水素化アルミニウムリチウムの１Ｍ溶液（０．４ｍＬ、０．４ｍｍｏｌ、１．１当量）を添加し、その反応混合物を６０℃で０．５時間加熱した。室温まで冷却して、水（５ｍＬ）を注意深く添加した。その混合物をＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）に注ぎ、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を１０％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、表題の化合物の実施例２３（０．０３０ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+ = ２５９。

（実施例２４）

【０２３３】

【化２７】



調製例２４：

【０２３４】

【化２８】


実施例 2　　実施例 24

工程Ａ：

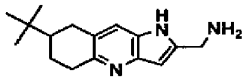
ピリジン（１ｍＬ）中の実施例２（０．０５ｇ、０．１９ｍｍｏｌ、１当量）の混合物に、０℃で$POCl_3$（０．０１９ｍＬ、０．２ｍｍｏｌ、１．１当量）を添加した。室

温まで温めて、０．５時間撹拌した。追加量のＰＯＣｌ$_3$（０．１ｍＬ）をこの反応混合物に添加して、室温で１時間撹拌した。水（２ｍＬ）でクエンチして、ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（２００ｍＬ）に注いで、飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をＮａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥し、濾過して、濃縮した。その残渣を、１／１のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、表題の化合物、実施例２４（０．００７ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝２５４。

（実施例２５）

【０２３５】

【化２９】



調製例２５：

【０２３６】

【化３０】



実施例2　　実施例25

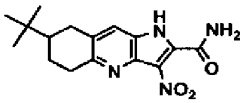
工程Ａ：

ＡｌＣｌ$_3$（０．０４５ｇ、０．３３ｍｍｏｌ、１．５当量）に、ジエチルエーテル中の水素化アルミニウムリチウムの１Ｍ溶液（０．９９ｍＬ、０．９９ｍｍｏｌ、４．５当量）を０℃で添加して、５分間撹拌した。この反応混合物に、実施例２（０．０６ｇ、０．２２ｍｍｏｌ、１当量）を、続いてＴＨＦ（３ｍＬ）を添加した。この反応混合物を、室温まで温めて、１８時間撹拌した。飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液（５ｍＬ）を、この反応混合物に注意深く添加して、１０分間撹拌した。ＥｔＯＡｃ（１５０ｍＬ）に注いで、飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液（１００ｍＬ）で、続いてブライン（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をＮａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を７％のＭｅＯＨ（ＮＨ$_3$）／ＥｔＯＡＣで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、表題の化合物、実施例２５（０．０６ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝２５８。

（実施例２６）

【０２３７】

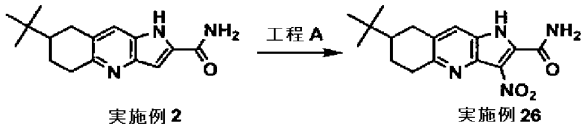
【化３１】



調製例２６：

【０２３８】

【化３２】



実施例2　　実施例26

工程Ａ：

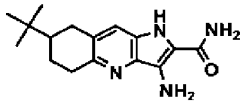
実施例２（０．１ｇ、０．３７ｍｍｏｌ）および発煙硝酸（３ｍＬ）の混合物を室温で１時間撹拌した。氷のなかにゆっくり注いだ。飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液を用いてｐＨ６～

７まで注意深く中和して、CH_2Cl_2（２００ｍＬ）に注いだ。その有機層を分離し、Na_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣をＥｔＯＡＣで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して表題の化合物、実施例２６（０．０９ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３１７。

（実施例２７）

【０２３９】

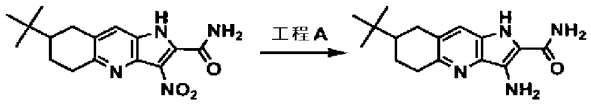
【化３３】



調製例２７：

【０２４０】

【化３４】



実施例26　　実施例27

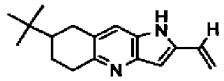
工程Ａ：

実施例２６（０．０９ｇ、０．２８ｍｍｏｌ）、２０％の$Pd(OH)_2$－Ｃ（０．０６ｇ）およびＭｅＯＨ（１０ｍＬ）の混合物を、室温で１時間水素バルーン雰囲気中で撹拌した。セライト上で触媒を濾過して、ＭｅＯＨで洗浄して濃縮した。その残渣を５％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡＣで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して表題の化合物、実施例２７（０．０６ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝２８７。

（実施例２８）

【０２４１】

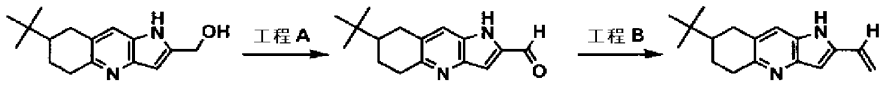
【化３５】



調製例２８：

【０２４２】

【化３６】



実施例23　　化合物28A　　実施例28

工程Ａ：

実施例２３（０．１３ｇ、０．５ｍｍｏｌ、１当量）、MnO_2（０．５３ｇ、６ｍｍｏｌ、１２当量）および$CHCl_3$（５ｍＬ）の混合物を室温で１．５時間撹拌した。その混合物を６０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して化合物２８Ａ（０．０７ｇ）を得た。

【０２４３】

工程Ｂ：

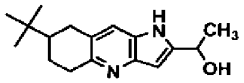
トルエン（７ｍＬ）中のメチルトリフェニルホスホニウムブロミド（０．２９ｇ、０．８２ｍｍｏｌ、３当量）の混合物に、トルエン中（１．３５ｍＬ、０．６７５ｍｍｏｌ、２．５当量）中のＫＨＭＤＳの０．５Ｍ溶液を０℃で添加した。反応混合物を０℃で０．

５時間撹拌した。トルエン（４ｍＬ）中の化合物２８Ａ（０．０７ｇ、０．２７ｍｍｏｌ、１当量）の混合物を、この反応混合物に０℃で添加し、１０分間撹拌した。室温まで温めて、３０分間撹拌した。飽和$NaHCO_3$水溶液でクエンチして、ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）に注いだ。その有機層を分離し、Na_2SO_4で乾燥し、濾過して、濃縮した。その残渣を４０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、実施例２８（０．０４ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝２５５。

（実施例２９）

【０２４４】

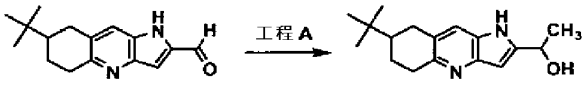
【化３７】



調製例２９：

【０２４５】

【化３８】



化合物**28A**　　実施例**29**

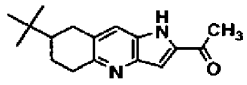
工程Ａ：

ＴＨＦ（４ｍＬ）中の化合物２８Ａ（０．１ｇ、０．３９ｍｍｏｌ、１当量）の混合物に、ＴＨＦ中のＭｅＭｇＢｒの１Ｍ溶液（０．８２ｍＬ、０．８２ｍｍｏｌ、２．１当量）を－７８℃で添加して、２０分間撹拌した。０℃まで温めて、１時間撹拌した。その反応混合物を－７８℃まで冷却して、ＴＨＦ中のＭｅＭｇＢｒの１Ｍ溶液（０．６ｍＬ）を添加して、１０分間撹拌した。０℃まで温めて、０．５時間撹拌した。その反応混合物を飽和NH_4Cl水溶液でクエンチして、ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）に注いだ。その有機層を分離し、ブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を５％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して実施例２９（０．０９ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝２７３。

（実施例３０）

【０２４６】

【化３９】



調製例３０：

【０２４７】

【化４０】

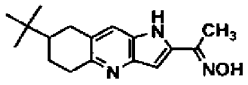


実施例**29**　　実施例**30**

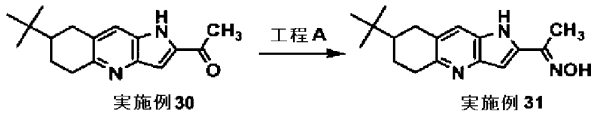
工程Ａ：

実施例２９（０．０９ｇ、０．３３ｍｍｏｌ、１当量）、MnO_2（０．３５ｇ、４ｍｍｏｌ、１２当量）および$CHCl_3$（５ｍＬ）の混合物を室温で１時間撹拌した。その混合物を６０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して実施例３０（０．０８ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝２７１。

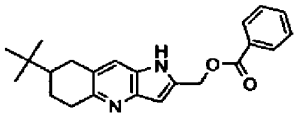
【０２４８】
（実施例３１）
【０２４９】
【化４１】



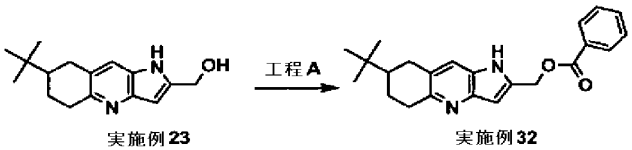
調製例３１：
【０２５０】
【化４２】



工程Ａ：
実施例３０（０．０９ｇ、０．３３ｍｍｏｌ、１当量）、ヒドロキシルアミン塩酸塩（０．０９２ｇ、１．３３ｍｍｏｌ、４当量）およびピリジン（４ｍＬ）の混合物を、室温で１８時間撹拌した。その混合物を１／１のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって濃縮し精製して実施例３１（０．０７ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝２８６。
【０２５１】
（実施例３２）
【０２５２】
【化４３】

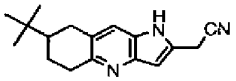


調製例３１：
【０２５３】
【化４４】

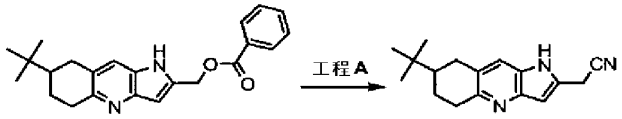


工程Ａ：
無水ＴＨＦ（５ｍＬ）中の実施例２３（０．１ｇ、０．３９ｍｍｏｌ、１当量）の溶液に、トリアチルアミン（０．１ｍＬ、０．７４ｍｍｏｌ、１．９当量）を添加した。その反応混合物を０℃まで冷却して、塩化ベンゾイル（０．０６７ｍＬ、０．５８ｍｍｏｌ、１．５当量）を添加した。反応混合物を室温まで温めて、１８時間撹拌した。CH_2Cl_2（１５０ｍＬ）に注いで、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を１／４のＥｔＯＡｃ／ヘキサン、続いて１／１のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の実施例３２（０．０７ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６３。
【０２５４】
（実施例３３）

【０２５５】
【化４５】

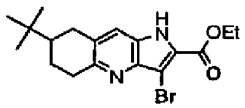


調製例３３：
【０２５６】
【化４６】



実施例32　　実施例33

工程Ａ：
実施例３２（０．０７ｇ、０．１９３ｍｍｏｌ、１当量）、シアン化カリウム（０．０３８ｇ、０．５８ｍｍｏｌ、３当量）およびＤＭＳＯ（３ｍＬ）の混合物を、６４℃で４時間加熱した。室温まで冷却してCH_2Cl_2（２００ｍＬ）中に注いで、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥して、濾過して濃縮した。その残渣を１／９のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の実施例３３（０．０３ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝２６８。
【０２５７】
（実施例３４）
【０２５８】
【化４７】



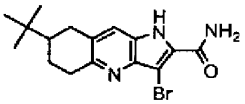
調製例３４：
【０２５９】
【化４８】



実施例1　　実施例34

工程Ａ：
無水ＤＭＦ（４ｍＬ）中の実施例１（０．１ｇ、０．３３２ｍｍｏｌ、１当量）の混合物に、０℃でＮＢＳ（０．０７ｇ、０．３９ｍｍｏｌ、１．１８当量）を添加し、その反応混合物を０℃で１．５時間撹拌した。ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）に注いで、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を１／２のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の実施例３４（０．０６ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：$M+2H^+$＝３８１。
【０２６０】
（実施例３５）
【０２６１】

【化４９】



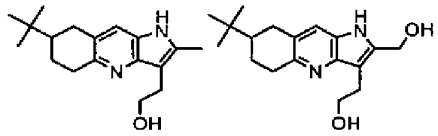
実施例１からの実施例２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例３４から実施例３５を調製した。ＬＣＭＳ：Ｍ＋２Ｈ$^{+}$＝３５２。

【０２６２】

（実施例３６および３７）

【０２６３】

【化５０】

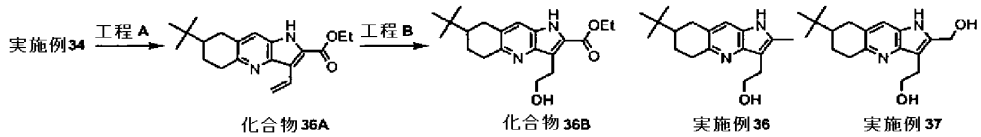


実施例36　　実施例37

調製例３６および３７：

【０２６４】

【化５１】



化合物36A　化合物36B　実施例36　実施例37

工程Ａ：

無水ＤＭＦ（１０ｍＬ）中の実施例３４（０．６４ｇ、１．６９ｍｍｏｌ、１当量）の混合物に、トリブチル（ビニル）スズ（１．４８ｍＬ、５．０６ｍｍｏｌ、３当量）、続いてテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（０）（０．４７ｇ、０．４ｍｍｏｌ、０．２４当量）を添加してその反応混合物を１００℃で１８時間加熱した。室温まで冷却してＭｅＯＨ中のＫＦの飽和溶液（５ｍＬ）を添加して、１．５時間撹拌した。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）に注いで、水（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して、濃縮した。その残渣を３０％のEt_2O／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して化合物３６Ａ（０．６ｇ）を得た。

【０２６５】

工程Ｂ：

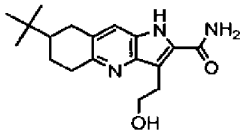
無水ＴＨＦ（５ｍＬ）中の化合物３６Ａ（０．１２ｇ、０．３７ｍｍｏｌ、１当量）の混合物に、ボラン－硫化メチル複合体（０．２ｍＬ、２．６ｍｍｏｌ、７．１当量）を添加して、その反応混合物を室温で１８時間撹拌した。その反応混合物に１ＮのＮａＯＨ（２ｍＬ）水溶液、続いて３０％の過酸化水素（２ｍＬ）を添加し、室温で１時間撹拌した。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）に注いで、水（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣をＥｔＯＡｃ、続いて５％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、以下の生成物；化合物３６Ｂ（０．０３ｇ）、実施例３７（０．０２ｇ）および実施例３８（０．１５ｇ）を得た。実施例３６、ＬＣＭＳ：ＭＨ$^{+}$＝２８７、および実施例３７、ＬＣＭＳ：ＭＨ$^{+}$＝３０３。

【０２６６】

（実施例３８）

【０２６７】

【化５２】



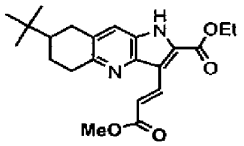
実施例３８は、実施例１からの実施例２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例３６Ｂから調製した。ＬＣＭＳ：Ｍ＋２Ｈ$^{+}$＝３３１。

【０２６８】

（実施例３９）

【０２６９】

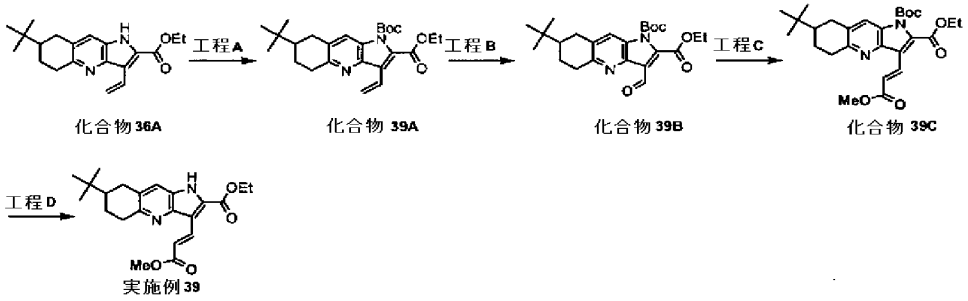
【化５３】



調製例３９：

【０２７０】

【化５４】



工程Ａ：

化合物３６Ａ（０．２２ｇ、０．６７ｍｍｏｌ、１当量）、CH_2Cl_2（１０ｍＬ）、t－Boc_2O（０．４４１ｇ、２ｍｍｏｌ、３当量）、ＤＭＡＰ（２ｍｇ）およびトリアチルアミン（０．２ｍＬ、２ｍｍｏｌ、３当量）の混合物を、室温で１８時間攪拌した。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）に注ぎ、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を４０％のEt_2O／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、生成物の化合物３９Ａ（０．２３ｇ）を得た。

【０２７１】

工程Ｂ：

化合物３９Ａ（０．１２ｇ、０．２８ｍｍｏｌ、１当量）、９／１のＭｅＯＨ／CH_2Cl_2（１０ｍＬ）の混合物を－７８℃に冷却して、オゾン流を５分間通過させた。硫化ジメチル（１ｍＬ）をこの反応混合物に添加した。その反応混合物を室温まで温めて４時間攪拌した。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）に注いで、飽和$NaHCO_3$（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥して、濾過して、濃縮して粗生成物の化合物３９Ｂを得て、これをさらなる精製なしに次の反応に用いた。

【０２７２】

工程Ｃ：

無水ＴＨＦ（５ｍＬ）中のジエチルホスホノ酢酸メチル（０．１５４ｍＬ、０．８４ｍｍｏｌ、３当量）の混合物に、鉱油（０．０３４ｇ、０．８４ｍｍｏｌ、３当量）中の６

０％の水素化ナトリウムの混合物を０℃で添加し、０℃で２５分間撹拌した。その反応混合物をシリンジを介して化合物３９Ｂ（０．１２ｇ、０．２８ｍｍｏｌ、１当量）に添加して、室温で１．５時間撹拌した。水（２ｍＬ）でクエンチした。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）に注ぎ、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して、濃縮した。その残渣を４０％のEt_2O／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の化合物３９Ｃ（０．１２ｇ）を得た。

【０２７３】

工程Ｄ：

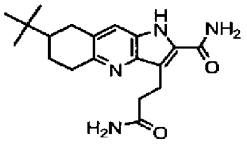
化合物３９Ｃ（０．１２ｇ、０．２５ｍｍｏｌ、１当量）、CH_2Cl_2（１０ｍＬ）およびトリフルオロ酢酸（０．５７ｍＬ、７．４ｍｍｏｌ、３０当量）の混合物を、室温で７２時間撹拌した。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）で希釈して、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮して、生成物、実施例３９（０．０９ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３８５。

【０２７４】

（実施例４０）

【０２７５】

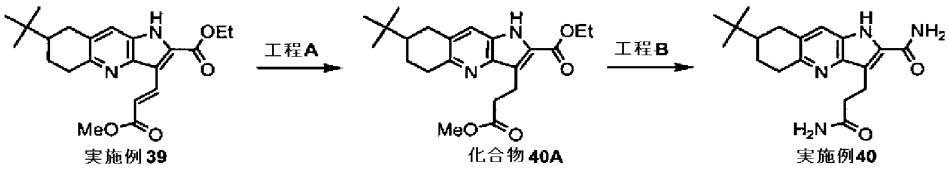
【化５５】



調製例４０：

【０２７６】

【化５６】



工程Ａ：

実施例３９（０．０９ｇ、０．２８ｍｍｏｌ）、２０％の$Pd(OH)_2$－Ｃ（０．０４ｇ）およびＭｅＯＨ（１０ｍＬ）の混合物を、水素バルーン雰囲気中において室温で１時間撹拌した。触媒をセライト上で濾過して、ＭｅＯＨで洗浄し、濃縮して粗生成物の化合物４０Ａ（０．０６ｇ）を得て、これをさらなる精製なしに次の工程に用いた。

【０２７７】

工程Ｂ：

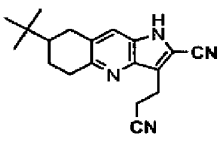
実施例１からの実施例２の調製について記載したのと同じ手順を用いて、化合物４０Ａを実施例４０に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+＝３４３。

【０２７８】

（実施例４１）

【０２７９】

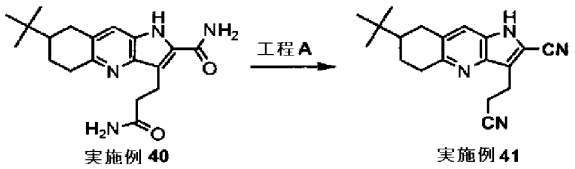
【化５７】



調製例４１：

【０２８０】

【化５８】



工程Ａ：

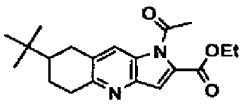
無水ＴＨＦ（５ｍＬ）中の実施例４０（０．０６ｇ、０．１８ｍｍｏｌ）の混合物に、４部の（メトキシカルボニルスルファモイル）トリエチルアンモニウムヒドロキシド、内塩（０．２５１ｇ、１．０５ｍｍｏｌ、６当量）を２時間にわたって添加した。その反応混合物を室温で１８時間撹拌した。その反応混合物を１／１のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで、続いて４０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、生成物；実施例４１（０．０１ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３０７。

【０２８１】

（実施例４２）

【０２８２】

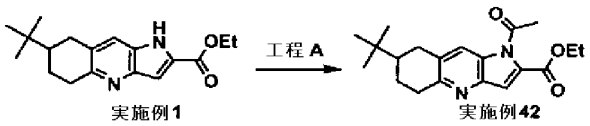
【化５９】



調製例４２：

【０２８３】

【化６０】



工程Ａ：

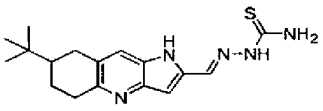
実施例１（０．３２ｇ、１．０７ｍｍｏｌ、１当量）、無水酢酸（０．２５ｍＬ、２．６６ｍｍｏｌ、２．５当量）、４－（ジメチルアミノ）ピリジン（０．０１４ｇ、０．１２ｍｍｏｍ、０．１１当量）およびCH_2Cl_2（１０ｍＬ）の混合物を室温で９６時間撹拌した。１／１のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって濃縮および精製して、表題の化合物、実施例４２（０．２２ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３４３。

【０２８４】

（実施例４３）

【０２８５】

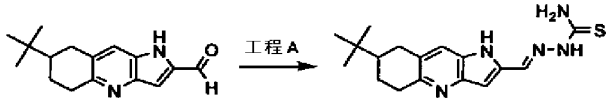
【化６１】



調製例４３：

【０２８６】

【化６２】



化合物28A　　実施例43

工程Ａ：

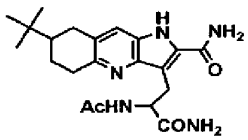
化合物２８Ａ（３０ｍｇ、０．１２ｍｍｏｌ）およびチオセミカルバジド（１０７ｍｇ、１．２ｍｍｏｌ）の混合物を、１滴の濃塩酸を加えた水／エタノール（３ｍｌ／７ｍｌ）中で室温で一晩攪拌した。酢酸エチルおよび水を添加した。その混合物を炭酸カリウムでクエンチした。層を分けて、有機層を水で洗浄し、乾燥し（$MgSO_4$）、濾過した。真空中で溶媒を除去して黄色の固体を得た。その固体をエーテルで洗浄して、実施例４３を黄色の固体として得た（８ｍｇ、２０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３３０。

【０２８７】

（実施例４４）

【０２８８】

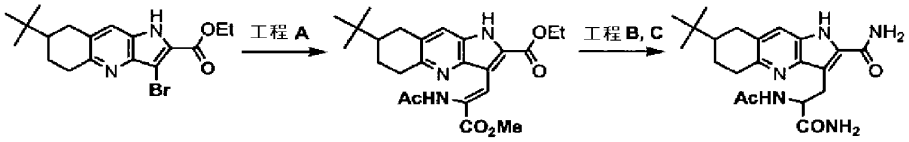
【化６３】



調製例４４：

【０２８９】

【化６４】



実施例34　　化合物44A　　実施例44

工程Ａ：

実施例３４（０．１ｇ、０．２６ｍｍｏｌ）、酢酸ナトリウム（０．０８５ｇ、１．０４ｍｍｏｌ、４当量）、メチル２－アセトアミドアクリレート（０．０７６ｇ、０．５３ｍｍｏｌ、２当量）、ジクロロビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（ＩＩ）（０．００１８３ｇ、０．００２６ｍｍｏｌ、０．１当量）および２／１のEt_3N／ＤＭＦ（３ｍＬ）の混合物を１３０℃で４時間加熱した。室温まで冷却して、セライトを通してろ過し、ＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で洗浄した。その濾液を飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残滓を３０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン、続いて６０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、生成物の化合物４４Ａ（０．０２ｇ）を得た。

【０２９０】

工程Ｂ：

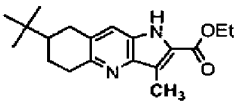
実施例３９からの実施例４０の調製について記載したのと同じ手順を用いて、化合物４４Ａを実施例４４に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+＝４００。

【０２９１】

（実施例４５）

【０２９２】

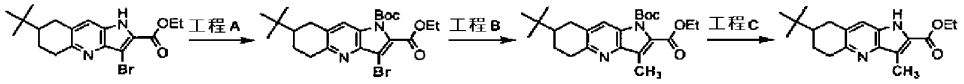
【化６５】



調製例４５：

【０２９３】

【化６６】



工程Ａ：

化合物３６Ａからの化合物３９Ａの調製について記載したのと同じ手順を用いて、実施例３４を化合物４５Ａに変換した。

【０２９４】

工程Ｂ：

化合物４５Ａ（０．１ｇ、０．２１ｍｍｏｌ、１当量）、K_2CO_3（０．０８６ｇ、０．６３ｍｍｏｌ、３当量）、メチルボロン酸（０．０３８ｇ、０．６３ｍｍｏｌ、３当量）、Ｐｄ（ＰＰｈ３）４（０．０４９ｇ、０．０４２ｍｍｏｌ、０．２当量）およびトルエン（５ｍＬ）の混合物を、８０℃で１８時間加熱した。室温まで冷却してCH_2Cl_2（２００ｍＬ）で希釈し、水（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を３０％のEt_2O／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の化合物４５Ｂ（０．０８ｇ）を得た。

【０２９５】

工程Ｃ：

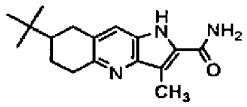
化合物３９Ｃからの実施例３９の調製について記載したのと同じ手順を用いて、化合物４５Ｂを実施例４５に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+＝３１５。

【０２９６】

（実施例４６）

【０２９７】

【化６７】



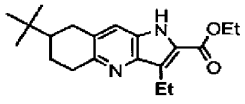
実施例１からの実施例２の調製について記載したのと同じ手順を用いて、実施例４５から実施例４６を調製した。ＬＣＭＳ：MH^+＝２８６。

【０２９８】

（実施例４７）

【０２９９】

【化６８】



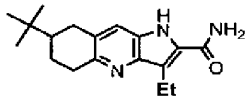
実施例３９からの化合物４０の調製について記載したのと同じ手順を用いて、化合物３６Ａから実施例４７を調製した。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３２９。

【０３００】

（実施例４８）

【０３０１】

【化６９】



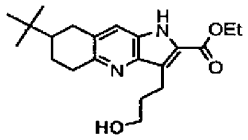
実施例１からの実施例２の調製について記載したのと同じ手順を用いて、実施例４７から実施例４８を調製した。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３００。

【０３０２】

（実施例４９）

【０３０３】

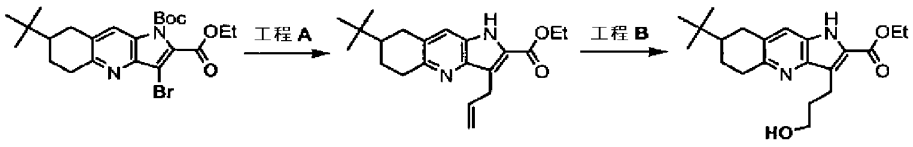
【化７０】



調製例４９：

【０３０４】

【化７１】



化合物45A　　化合物49A　　実施例49

工程Ａ：

実施例３４からの化合物３６Ａの調製について記載したのと同じ手順を用い、ただしトリブチル（ビニル）スズの代わりにトリブチル（アリル）スズを用いて、化合物４５Ａを化合物４９Ａに変換した。

【０３０５】

工程Ｂ：

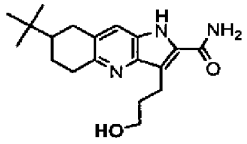
化合物３６Ａからの化合物３６Ｂの調製について記載したのと同じ手順を用いて、化合物４９Ａを実施例４９に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３５９。

【０３０６】

（実施例５０）

【０３０７】

【化７２】



実施例１からの実施例２の調製について記載したのと同じ手順を用いて、実施例４９か

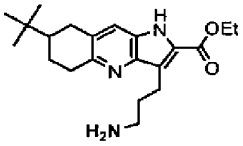
ら実施例５０を調製した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^{+}$＝３３０。

【０３０８】

（実施例５１）

【０３０９】

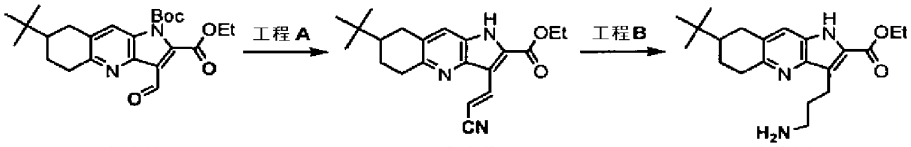
【化７３】



調製例５１：

【０３１０】

【化７４】



化合物39B　化合物51A　実施例51

工程Ａ：

化合物３９Ｂからの化合物３９Ｃの調製について記載したのと同じ手順を用い、ただしメチルジエチルホスホノアセテートの代わりにジエチル（シアノメチル）ホスホネートを用いて、化合物３９Ｂを化合物５１Ａに変換した。

【０３１１】

工程Ｂ：

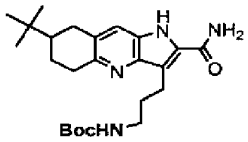
化合物５１Ａ（０．１ｇ、０．２８ｍｍｏｌ）、１０％のＰｄ－Ｃ（０．１ｇ）およびＥｔＯＨ（１０ｍＬ）の混合物を、水素ｐａｒｒシェーカー中で６０ｐｓｉで７２時間撹拌した。セライト上で触媒を濾過して、ＭｅＯＨで洗浄して、濃縮した。残渣を３／１のＭｅＯＨ／ＴＨＦ（４ｍＬ）にとって、－５℃に冷却し、塩化コバルト（ＩＩ）水和物（０．０３７ｇ）を、続いて水素化ホウ素ナトリウム（０．０１１ｇ）を添加した。－５℃で１５分間撹拌し、２ＮのＨＣｌ（３ｍＬ）でクエンチした。ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）に注いで、飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して、濃縮した。その残渣を　１０％のＭｅＯＨ（NH_3）／CH_2Cl_2で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の実施例５１を得た。

【０３１２】

（実施例５２）

【０３１３】

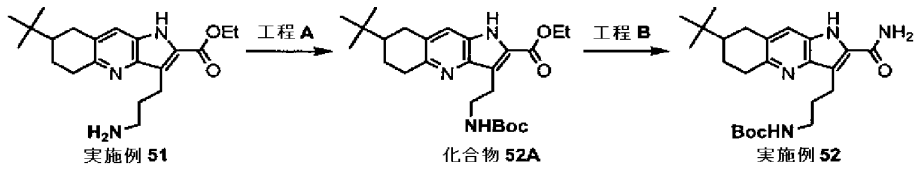
【化７５】



調製例５２：

【０３１４】

【化７６】



実施例51　　化合物52A　　実施例52

工程Ａ：

化合物３６Ａからの化合物３９Ａの調製について記載されたのと同様の手順を用いて実施例５１を化合物５２Ａに変換した。

【０３１５】

工程Ｂ：

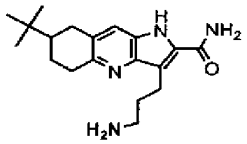
実施例１からの実施例２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物５２Ａから実施例５２を調製した。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝４２９。

【０３１６】

（実施例５３）

【０３１７】

【化７７】



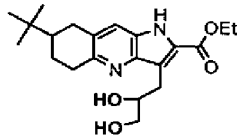
化合物３９Ｃからの実施例３９の調製について記載されたのと同様の手順を用いて実施例５２を実施例５３に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３２９。

【０３１８】

（実施例５４）

【０３１９】

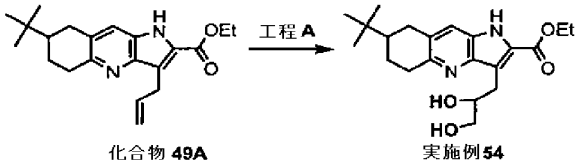
【化７８】



調製例５４：

【０３２０】

【化７９】



化合物49A　　実施例54

工程Ａ：

化合物４９Ａ（０．１ｇ、０．２９ｍｍｏｌ、１当量）、無水オスミウム酸カリウム（０．０１６ｇ、０．０４４ｍｍｏｌ、０．１５当量）、４－メチルモルホリンＮ－酸化物（０．０５１ｇ、０．４４ｍｍｏｌ、１．５当量）、アセトン（６ｍＬ）および水（２ｍＬ）の混合物を室温で１８時間撹拌した。ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）に注いで、水（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して、濃縮した。その残

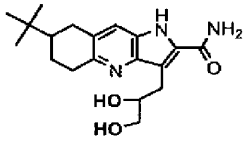
渣を５％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の実施例５４（０．０５ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３７５。

【０３２１】

（実施例５５）

【０３２２】

【化８０】



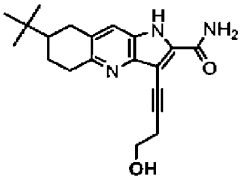
実施例１からの実施例２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例５４から実施例５５を調製した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３４６。

【０３２３】

（実施例５６）

【０３２４】

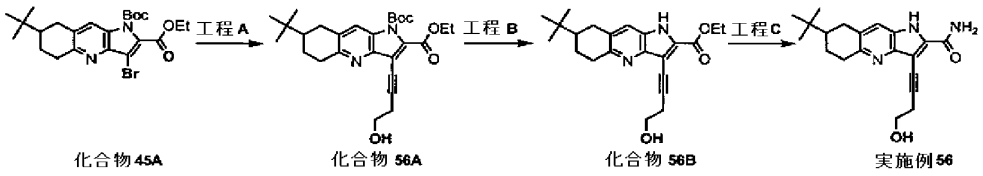
【化８１】



調製例５６：

【０３２５】

【化８２】



化合物45A　化合物56A　化合物56B　実施例56

工程Ａ：

化合物４５Ａ（０．４ｇ、０．８４ｍｍｏｌ、１当量）、ブチン－１－オール（０．０７６ｍＬ、１ｍｍｏｌ、１．２当量）、ヨウ化銅（Ｉ）（０．０３２ｇ、０．１６８ｍｍｏｌ、０．２当量）、トリエチルアミン（０．１３２ｍＬ、０．０９２ｍｍｏｌ、１．１当量）、Ｐｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$（０．０９７ｇ、０．０８４ｍｍｏｌ、０．１当量）およびＤＭＦ（８ｍＬ）の混合物を８０℃で４．５時間加熱した。室温まで冷却して、ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）で希釈して、水（２×１００ｍＬ）で、続いてブライン（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して、濃縮した。その残渣を１／１のＥｔＯＡＣ／ヘキサン、続いてＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の化合物５６Ａ（０．３ｇ）を得た。

【０３２６】

工程Ｂ：

化合物３９Ｃからの実施例３９の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物５６Ａを化合物５６Ｂに変換した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３１５。

【０３２７】

工程Ｃ：

実施例１からの実施例２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物５６Ｂ

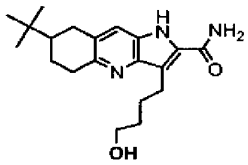
から実施例５６を調製した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３４０。

【０３２８】

（実施例５７）

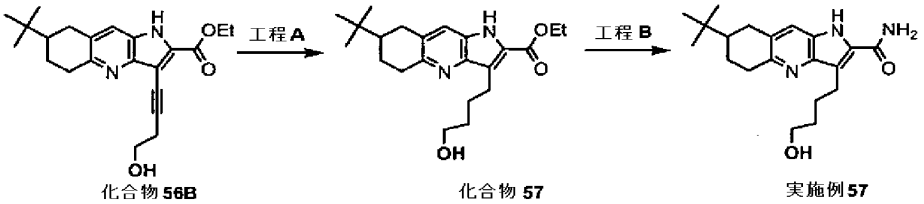
【０３２９】

【化８３】



【０３３０】

【化８４】



工程Ａ：

化合物５６Ｂ（０．１３０ｇ、０．３５ｍｍｏｌ）、１０％のＰｄ－Ｃ（０．０５０ｇ）およびＥｔＯＨ（１０ｍＬ）の混合物を、水素ｐａｒｒシェーカー中で６０ｐｓｉで４時間撹拌した。セライトで触媒を濾過し、ＭｅＯＨで洗浄し、濃縮して粗生成物の化合物５７を得て、これをさらに精製することなく次の反応に用いた。

【０３３１】

工程Ｂ：

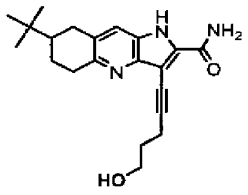
実施例１からの実施例２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物５７から実施例５７を調製した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３４４。

【０３３２】

（実施例５８）

【０３３３】

【化８５】



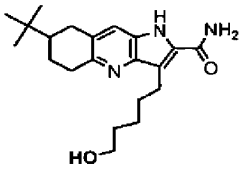
化合物４５Ａからの実施例５６の調製について記載されたのと同じ手順を用い、ただし４－ブチン－１－オールの代わりに４－ペンチン－１－オールを用いて、化合物４５Ａを実施例５８に変換した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３５４。

【０３３４】

（実施例５９）

【０３３５】

【化８６】



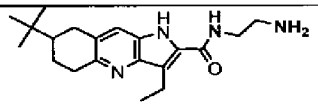
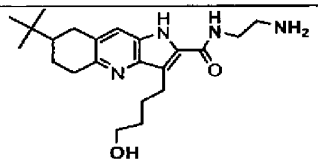
化合物５６Ｂからの実施例５７の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例５８から実施例５９を調製した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３５８。

【０３３６】

（実施例６０および６１）

実施例５の手順と同様の手順に従い、ただし１，４－ジアミノブタンの代わりにエチレンジアミンを用いて、実施例４７および化合物５７をそれぞれ実施例６０および６１に変換した。

【表Ｃ】

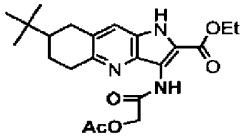
実施例	構造	LCMS: MH$^+$
60		343
61		387

【０３３７】

（実施例６２）

【０３３８】

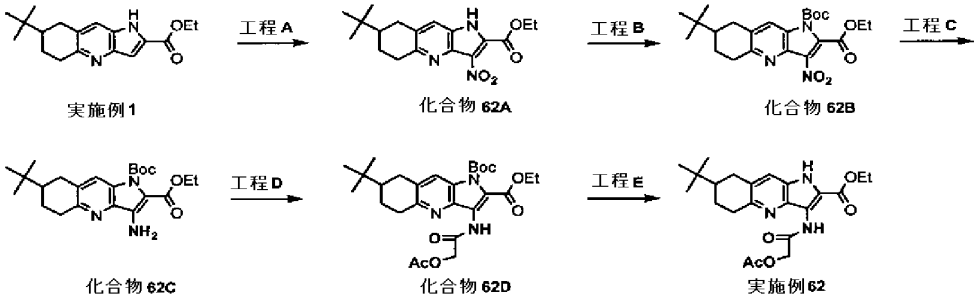
【化８７】



調製例６２：

【０３３９】

【化８８】



工程Ａ：

実施例１（１．５ｇ、４．９９ｍｍｏｌ、１当量）および発煙硝酸（３ｍＬ）の混合物

を室温で３時間撹拌した。氷／飽和$NaHCO_3$水溶液の混合物中に注意深く注ぎ、CH_2Cl_2（３×２００ｍＬ）で抽出した。合わせた有機相をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮して、粗生成物の化合物６２Ａを得て、これをさらに精製することなく次の反応に用いた。

【０３４０】

工程Ｂ：

化合物３６Ａからの化合物３９Ａの調製について記載されるのと同じ手順を用いて化合物６２Ａを化合物６２Ｂに変換した。

【０３４１】

工程Ｃ：

化合物６２Ｂ（０．３５ｇ、０．７８ｍｍｏｌ）、２０％の$Pd(OH)_2$－Ｃ（０．０５ｇ）およびＭｅＯＨ（１０ｍＬ）の混合物を、水素バルーン雰囲気中において室温で１．５時間撹拌した。セライトで触媒を濾過し、ＭｅＯＨで洗浄して濃縮した。その残渣を３０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の化合物６２Ｃ（０．２２ｇ）を得た。

【０３４２】

工程Ｄ：

CH_2Cl_2（７ｍＬ）中の化合物６２Ｃ（０．２２ｇ、０．５３ｍｍｏｌ）の混合物にＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（０．１２ｍＬ、０．６９ｍｍｏｌ、１．３当量）を添加した。その反応混合物を０℃まで冷却して、アセトキシアセチルクロリド（０．１４ｍＬ、１．３ｍｍｏｌ、１．３当量）を添加した。その反応混合物を室温まで温めて、７２時間撹拌した。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を、４０％のＥｔＯＡＣ／ヘキサン、続いて６０％のＥｔＯＡｃで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、生成物の化合物６２Ｄ（０．１４ｇ）を得た。

【０３４３】

工程Ｅ：

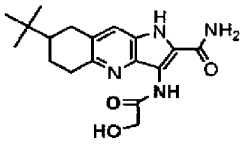
化合物３９Ｃからの実施例３９の調製について記載されるのと同じ手順を用いて化合物６２Ｄを実施例６２に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+＝４１６。

【０３４４】

（実施例６３）

【０３４５】

【化８９】



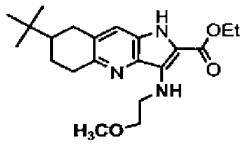
実施例１からの実施例２の調製について記載されるのと同じ手順を用いて、実施例６３を実施例６２から調製した。ＬＣＭＳ：MH^+＝３４５。

【０３４６】

（実施例６４）

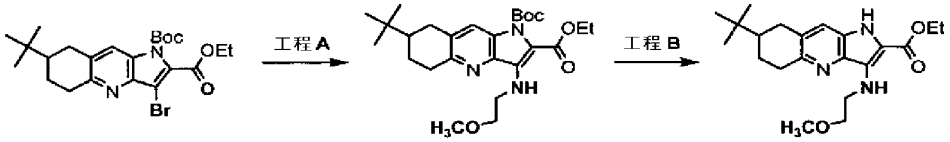
【０３４７】

【化９０】

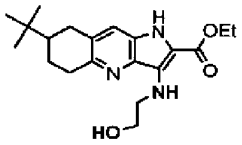


調製例６４：

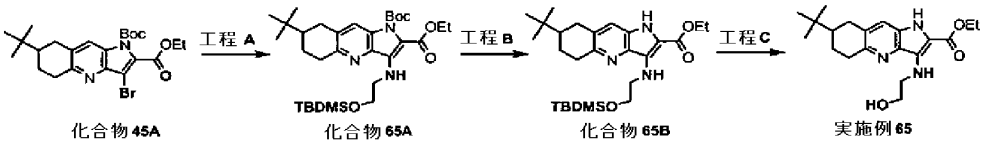
【０３４８】
【化９１】



工程Ａ：
化合物４５Ａ（０．２４ｇ、０．５ｍｍｏｌ、１当量）、炭酸セシウム（０．２２９ｇ、０．７ｍｍｏｌ、１．４当量）、ＢＩＮＡＰ（０．０３１ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ、０．１当量）、$Pd_2(dba)_3$（０．０２３ｇ、０．０２５ｍｍｏｌ、０．０５当量）、２－メトキシエチルアミン（０．０５２ｍＬ、０．６ｍｍｏｌ、１．２当量）およびトルエン（５ｍＬ）の混合物を１００℃で１８時間加熱した。室温まで冷却して３５％のEt_2O／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、生成物の化合物６４Ａ（０．０４ｇ）を得た。
【０３４９】
工程Ｂ：
化合物３９Ｃからの実施例３９の調製について記載されるのと同じ手順を用いて化合物６４Ａを実施例６４に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+＝３７４。
【０３５０】
（実施例６５）
【０３５１】
【化９２】



調製例６５：
【０３５２】
【化９３】



工程Ａ：
化合物４５Ａからの化合物６４Ａの調製について記載されるのと同じ手順を用い、ただし２－メトキシエチルアミンの代わりに２－トリメチルシラニルオキシ－エチルアミンを用いて、化合物４５Ａを化合物６５Ａに変換した。
【０３５３】
工程Ｂ：
化合物３９Ｃからの実施例３９の調製について記載されるのと同じ手順を用いて、化合物６５Ａを化合物６５Ｂに変換した。
【０３５４】
工程Ｃ：
化合物６５Ｂ（０．３４ｇ、０．７２ｍｍｏｌ、１当量）、１Ｍ溶液のフッ化テトラブチルアンモニウムが含有されるＴＨＦ（１．９ｍＬ、１．９ｍｍｏｌ、２．６当量）およびＴＨＦ（１０ｍＬ）の混合物を室温で１８時間攪拌した。ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）で

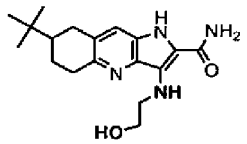
希釈して、水（２×１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を４０％のＥｔＯＡＣ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して所望の生成物の実施例６５（０．０９ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６０。

【０３５５】

（実施例６６）

【０３５６】

【化９４】



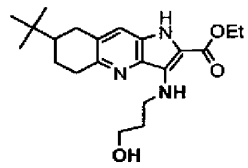
実施例１からの実施例２の調製について記載されるのと同じ手順を用いて、実施例６６を実施例６５から調製した。ＬＣＭＳ：MH^+＝３３１。

【０３５７】

（実施例６７）

【０３５８】

【化９５】



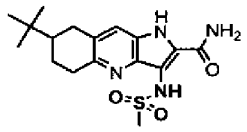
化合物４５Ａからの実施例６５の調製について記載されるのと同じ手順を用い、ただし２－メトキシエチルアミンの代わりに２－トリメチルシラニルオキシ－プロピルアミンを用いて実施例６７を化合物４５Ａから調製した。ＬＣＭＳ：MH^+＝３７４。

【０３５９】

（実施例６８）

【０３６０】

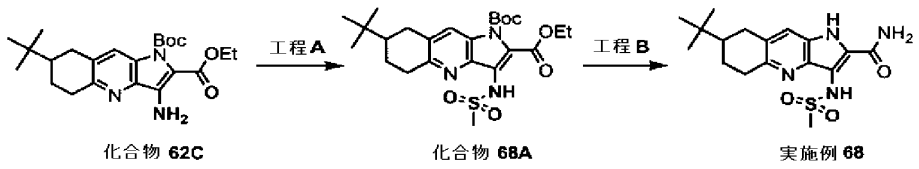
【化９６】



調製例６８：

【０３６１】

【化９７】



化合物 **62C**　　化合物 **68A**　　実施例 **68**

工程Ａ：

化合物６２Ｃ（０．１ｇ、０．２４ｍｍｏｌ、１当量）およびピリジン（１ｍＬ）の混合物に、塩化メタンスルホニル（０．０７５ｍＬ、０．９６ｍｍｏｌ、４当量）を添加し

、その反応混合物を室温で１８時間攪拌した。CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中に注いで、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層をNa_2SO_4で乾燥し、濾過して濃縮した。その残渣を３０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、生成物の化合物６８Ａ（０．０９ｇ）を得た。

【０３６２】

工程Ｂ：

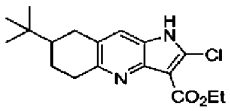
実施例１からの実施例２の調製について記載されるのと同じ手順を用いて、化合物６８Ａを実施例６８に変換した。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６５。

【０３６３】

（実施例６９）

【０３６４】

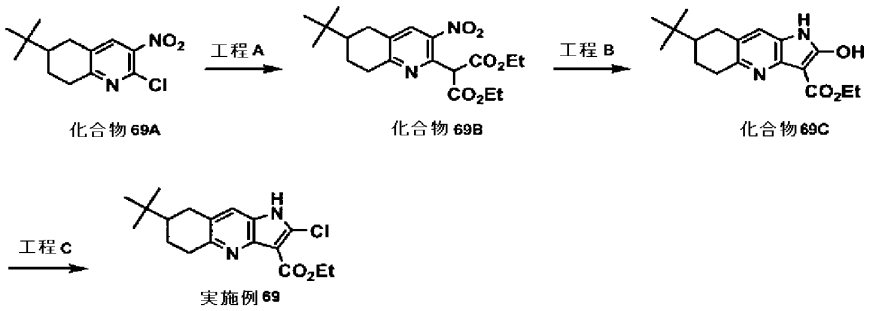
【化９８】



調製例６９：

【０３６５】

【化９９】



工程Ａ：

ＤＭＦ（２０ｍＬ）中のＮａＨ（７７６ｍｇ、１９．４ｍｍｏｌ）の懸濁液に０℃でN_2下でマロン酸ジエチル（２．９５ｍｌ，１９．４ｍｍｏｌ）を加えた。冷却槽を除いて、その混合物を室温まで温めた。ＤＭＦ（ｍｌ）中の化合物６９Ａ（１．７４ｇ、６．４７ｍｍｏｌ）の溶液を添加して、その混合物を室温で一晩攪拌した。その混合物を、飽和塩化アンモニウム溶液でクエンチして、水および酢酸エチルで希釈した。層を分けて、その水層を酢酸エチル（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥し（$MgSO_4$）て濾過した。真空中での溶媒の除去、その後のカラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，９：１（ｖ／ｖ）］によって化合物６９Ｂを黄色の油状物として得た（７８７ｍｇ、３１％）。

【０３６６】

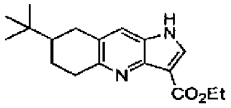
工程Ｂ：

酢酸（５ｍＬ）中の化合物６９Ｂ（３１０ｍｇ、０．７９ｍｍｏｌ）の溶液に、室温で亜鉛粉末（５１３ｍｇ、７．９ｍｍｏｌ）を少量ずつ加えた。その懸濁物を８０℃で２時間加熱した。室温まで冷却した後、その固体をセライトを通して濾過した。次いでその溶媒を真空中で除去した。その残渣を酢酸エチル中に溶解して、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で中和した。層を分離して水層を酢酸エチル（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥（$MgSO_4$）して、濾過した。真空中での溶媒の除去によって黄色の固体を得た。その固体をエーテルで洗浄して、化合物６９Ｃを黄色の固体として得た（２１２ｍｇ、８５％）。

【０３６７】

工程Ｃ：
化合物６９Ｃ（５０ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）をオキシ塩化リン（０．５ｍｌ）に溶解し、その混合物を１００℃で２時間加熱した。室温まで冷却した後、酢酸エチルを添加した。その混合物を氷／水の混合物に注意深く添加した。層を分離して水層を酢酸エチル（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥して（$MgSO_4$）濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：２（ｖ／ｖ）］によって、実施例６９を黄色の油状物として得た（４６ｍｇ、％）。ＬＣＭＳ　MH^+＝３３５。

【０３６８】
（実施例７０）
【０３６９】
【化１００】



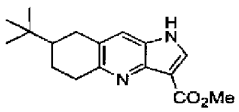
調製例７０：
【０３７０】
【化１０１】



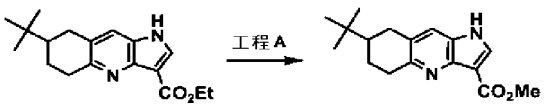
実施例69　　実施例70

工程Ａ：
実施例６９（３５ｍｇ、０．１１ｍｍｏｌ）をエタノール（１０ｍＬ）中に室温で溶解し、触媒量のＰｄ／Ｃ、続いてトリアチルアミン（２０μＬ）を添加した。その混合物を水素（バルーン）下で一晩攪拌した。その混合物を、セライトを通して濾過して溶媒を真空中で除去した。カラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：２（ｖ／ｖ）］によって実施例７０を白色固体（ｍｇ、％）として得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３０１。

【０３７１】
（実施例７１）
【０３７２】
【化１０２】



調製例７１：
【０３７３】
【化１０３】



実施例70　　実施例71

工程Ａ：
実施例７０（５５ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）および触媒量のナトリウムメトキシドの溶液を、メタノール（１０ｍｌ）中で還流しながら１８時間攪拌した。その混合物を室温で

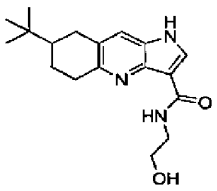
冷却して溶媒を真空中で除去した。その混合物をジクロロメタンおよび水で希釈した。層を分離してその水層をジクロロメタン（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって白色固体を得た。その固体をエーテルで洗浄してメチルエステル実施例７１を白色固体として得た（４７ｍｇ、９０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝２８７。

【０３７４】

（実施例７２）

【０３７５】

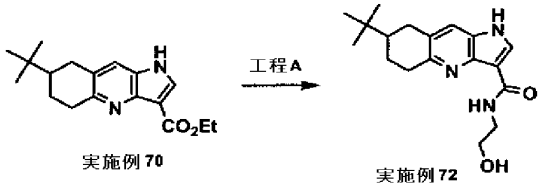
【化１０４】



調製例７２：

【０３７６】

【化１０５】



工程Ａ：

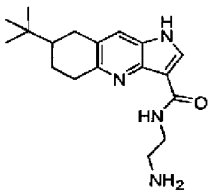
実施例７０（４８ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）、２－ヒドロキシルアミン（１ｍｌ）および触媒量のシアン化ナトリウムの溶液を密閉試験管中において１２０℃で一晩加熱した。室温まで冷却した後、その混合物を水および酢酸エチルで希釈した。その有機層を水（２×１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって白色の固体を得た。その固体をエーテルで洗浄して実施例７２を白色固体として得た（３０ｍｇ、６０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３１６。

【０３７７】

（実施例７３）

【０３７８】

【化１０６】

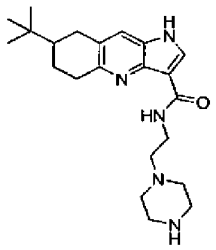


実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例７３を調製した。実施例７３が得られた（７ｍｇ、５５％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３１５。

【０３７９】

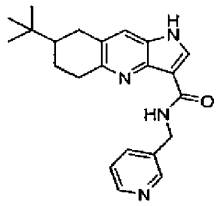
（実施例７４）

【０３８０】
【化１０７】



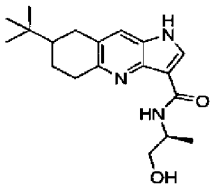
実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例７４を調製した。実施例７４が得られた（３０ｍｇ、４５％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３８４。

【０３８１】
（実施例７５）
【０３８２】
【化１０８】



実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例７５を調製した。実施例７５が得られた（３１ｍｇ、５２％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６３。

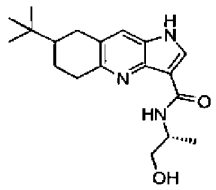
【０３８３】
（実施例７６）
【０３８４】
【化１０９】



実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例７６を調製した。実施例７６が得られた（２７ｍｇ、４８％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３３０。

【０３８５】
（実施例７７）
【０３８６】

【化１１０】



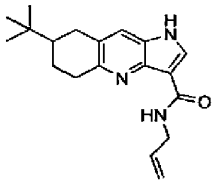
実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例７７を調製した。実施例８２が得られた（２４ｍｇ、４３％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３３０。

【０３８７】

（実施例７８）

【０３８８】

【化１１１】



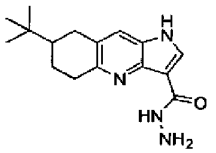
実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例７８を調製した。実施例７８が得られた（４８ｍｇ、５３％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３１２。

【０３８９】

（実施例７９）

【０３９０】

【化１１２】



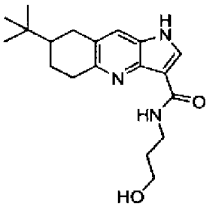
実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例７９を調製した。実施例７８が得られた（２８ｍｇ、５３％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝２８７。

【０３９１】

（実施例８０）

【０３９２】

【化１１３】



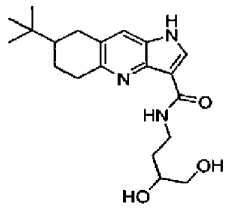
実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例８０を調製した。実施例８０が得られた（１８ｍｇ、３０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３３０。

【０３９３】

（実施例８１）

【０３９４】

【化１１４】



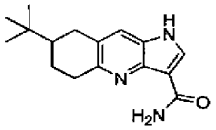
実施例７０からの実施例７２の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例７０から実施例８１を調製した。実施例８１が得られた（２３ｍｇ、４０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３４６。

【０３９５】

（実施例８２）

【０３９６】

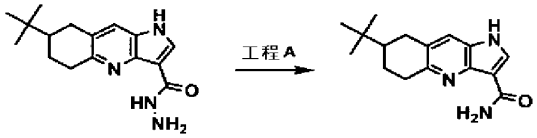
【化１１５】



調製例８２：

【０３９７】

【化１１６】



実施例79　　実施例82

工程Ａ：

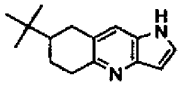
実施例７９（１５ｍｇ、０．０５２ｍｍｏｌ）および触媒量のラネー（Ｒａｎｅｙ）Ｎｉの混合物を水中で１００℃で１時間加熱した。その混合物を室温まで冷却し、その固体を、セライトを通して濾過した。酢酸エチルを添加し、層を分離して、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって白色の固体を得た。その固体をエーテルで洗浄して実施例８２を白色固体として得た（１１ｍｇ、７４％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝２７２。

【０３９８】

（実施例８３）

【０３９９】

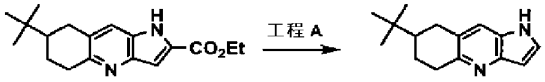
【化１１７】



調製例８３：

【０４００】

【化１１８】



実施例1　　実施例83

工程Ａ：

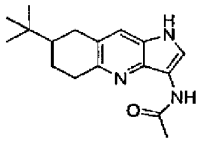
実施例１（１００ｍｇ、０．０５２ｍｍｏｌ）、ＮＭＰ（３ｍＬ）、Ｎ－メチルピペラジン（１ｍＬ）の混合物を２００℃で２４時間加熱した。その混合物を室温まで冷却し、ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）に注いで、水（１００ｍＬ）で洗浄した。その有機層を乾燥し（Na_2SO_4）、濾過して濃縮した。その残渣を１０％のＭｅＯＨ／ＥｔＯＡＣで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製して生成物の実施例８３（０．０１ｇ）を得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝２２９。

【０４０１】

（実施例８４）

【０４０２】

【化１１９】



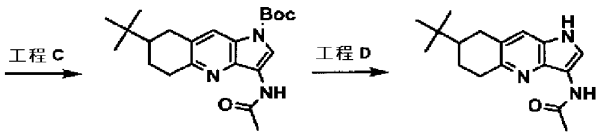
調製例８４：

【０４０３】

【化１２０】



実施例83　　化合物84A　　化合物84B



化合物84C　　実施例84

工程Ａ：

発煙硝酸（１０ｍｌ）中の実施例８３（６１０ｍｇ、２．６７ｍｍｏｌ）の混合物を室温で３０分間攪拌した。その混合物を酢酸エチル／水／氷の混合物にゆっくり添加して、炭酸カリウムで注意深くクエンチした。層を分離して水層を酢酸エチル（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって、化合物８４Ａを褐色の固体として得た。化合物８４Ａは、さらに精製することなく次の工程に

用いた。

【０４０４】

工程Ｂ：

ジクロロメタン（２０ｍｌ）中の化合物８４Ａ（工程１）の溶液に、$(Boc)_2O$（１．２ｇ、５．３４ｍｍｏｌ）、続いてトリアチルアミン（１．１ｍｌ，８．０１ｍｍｏｌ）を添加した。触媒量のＤＭＡＰを添加してその混合物を室温で３時間攪拌した。その混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液でクエンチした。層を分離して、その水層をジクロロメタン（１００×２）で抽出し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン）によって化合物８４Ｂを白色固体として得た（５１８ｍｇ、５２％）。

【０４０５】

工程Ｃ：

メタノール（ｍｌ）中の化合物８４Ｂ（１８０ｍｇ、０．４８ｍｍｏｌ）の溶液に、$Pd(OH)_2$／Ｃ（３４ｍｇ、０．０４８ｍｍｏｌ）、無水酢酸（０．１ｍｌ、０．９６ｍｍｏｌ）を添加した。その混合物を水素（バルーン）下で一晩攪拌した。その混合物を、セライトを通して濾過して溶媒を真空中で除去した。カラムクロマトグラフィー（酢酸エチル）によって化合物８４Ｃを黄色の泡状物として得た（１２２ｍｇ、６６％）。

【０４０６】

工程Ｄ：

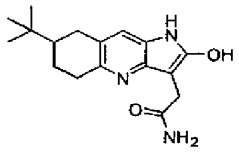
ジクロロメタン（５ｍｌ）中の化合物８４Ｃ（５０ｍｇ、０．１３ｍｍｏｌ）の溶液に、トリフルオロ酢酸（０．１ｍｌ）を添加した。その混合物を還流して３時間加熱した。室温まで冷却した後、真空中で溶媒を除去した。酢酸エチルを添加して、その混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液でクエンチした。層を分離して、その水層をジクロロメタン（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって黄色の固体を得た。その固体をエーテルで洗浄して実施例８４を黄色の固体として得た（１９ｍｇ、５０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝２８６。

【０４０７】

（実施例８５）

【０４０８】

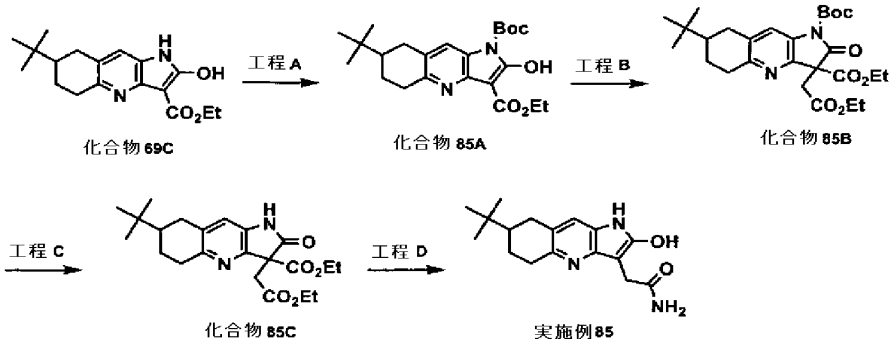
【化１２１】



調製例８５：

【０４０９】

【化１２２】



工程Ａ：

ジクロロメタン（２０ｍｌ）中の化合物６９Ｃ（１．０ｇ、３．１６ｍｍｏｌ）の溶液に、（ＢｏＣ）$_2$Ｏ（２．１ｇ、９．４８ｍｍｏｌ）、続いてトリアチルアミン（１．３３ｍｌ，９．４８ｍｍｏｌ）を添加した。触媒量のＤＭＡＰを添加して、その混合物を室温で２時間攪拌した。その混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液でクエンチした。層を分離して、その水層をジクロロメタン（２×１５０ｍＬ）で抽出し、乾燥して（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン中の５％の酢酸エチル）によって化合物８５Ａを白色固体として得た（９６１ｍｇ、７３％）。

【０４１０】

工程Ｂ：

ＤＭＦ（５ｍｌ）中の化合物８５Ａ（１１０ｍｇ、０．２６ｍｍｏｌ）の溶液に室温で、炭酸カリウム（１８３ｍｇ、１．３２ｍｍｏｌ）、続いてブロモエチルアセテート（０．０６ｍｌ，０．５３ｍｍｏｌ）を添加した。その混合物を室温で一晩攪拌した。その混合物を酢酸エチルおよび水で希釈した。層を分離してその水層をジクロロメタン（２×５０ｍＬ）で抽出し、乾燥して（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，５：１（ｖ／ｖ）］によって化合物８５Ｂを無色の油状物として得た（７４ｍｇ、５６％）。

【０４１１】

工程Ｃ：

ジクロロメタン（５ｍｌ）中の化合物８５Ｂ（６５ｍｇ、０．１３ｍｍｏｌ）の溶液に、トリフルオロ酢酸（０．３ｍｌ）を添加した。その混合物を一晩加熱還流した。室温まで冷却した後、真空中で溶媒を除去した。酢酸エチルを添加して、その混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液でクエンチした。層を分離して、その水層をジクロロメタン（２×５０ｍＬ）で抽出し、乾燥して（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって、化合物８８Ｃを黄色の油状物として得た。化合物８５Ｃをさらに精製することなく次の工程に用いた。

【０４１２】

工程Ｄ：

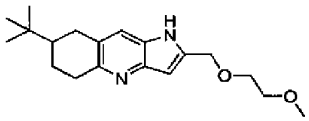
メタノール（５ｍｌ）中の化合物８５Ｃ（工程３）の溶液に０℃で、この溶液を通して２０分間アンモニアをパージした。次いで、その混合物を密閉した試験管中で、６０℃で２日間加熱した。室温まで冷却した後、その固体を濾過して実施例８５を白色固体として得た（２２ｍｇ、５５％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３０２。

【０４１３】

（実施例８６）

【０４１４】

【化１２３】



調製例８６：

【０４１５】

【化１２４】



実施例23　　化合物86A　　実施例86

工程Ａ：

実施例２３（２８９ｍｇ、１．１２ｍｍｏｌ）を、オキシ塩化リン（１．６ｍｌ）に溶解して、その混合物を室温で４時間攪拌した。酢酸エチルを添加した。その混合物を、氷／水の混合物を注意深く添加することによってクエンチした。層を分離して、その有機層を水（２×１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって、塩化物の化合物８６Ａを黄色の固体として得た。化合物８６Ａをさらに精製することなく次の工程に用いた。

【０４１６】

工程Ｂ：

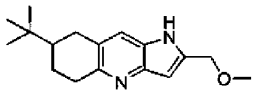
２－メトキシエタノール（１ｍｌ）中の化合物８６Ａ（５０ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）の溶液に、室温で炭酸カリウム（５０ｍｇ、０．３６ｍｍｏｌ）を添加した。その混合物を１００℃で４時間攪拌した。室温まで冷却した後、その混合物を酢酸エチルおよび水で希釈した。層を分離して、その有機層を水で洗浄し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル）によって実施例８６を白色固体として得た（３７ｍｇ、６５％）。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３１７。

【０４１７】

（実施例８７）

【０４１８】

【化１２５】



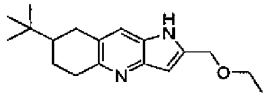
化合物８６Ａからの実施例８６の調製について記載されたのと同様の手順を用い、ただし２－メトキシエタノールの代わりにメタノールを用いて、化合物８６Ａから実施例８７を調製した。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝２７３。

【０４１９】

（実施例８８）

【０４２０】

【化１２６】



化合物８６Ａからの実施例８６の調製について記載されたのと同様の手順を用い、ただし２－メトキシエタノールの代わりにエタノールを用いて、化合物８６Ａから実施例８８

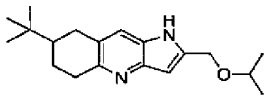
を調製した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝２８７。

【０４２１】

（実施例８９）

【０４２２】

【化１２７】



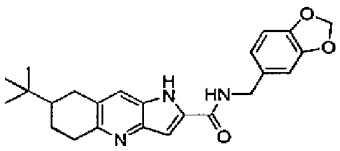
化合物８６Ａからの実施例８６の調製について記載されたのと同様の手順を用い、ただし２－メトキシエタノールの代わりにイソプロパノールを用いて、化合物８６Ａから実施例８９を調製した。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３０１。

【０４２３】

（実施例９０）

【０４２４】

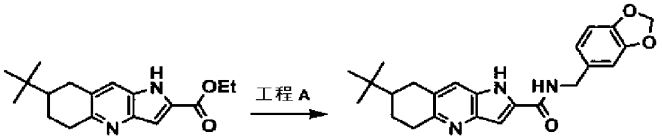
【化１２８】



調製例９０：

【０４２５】

【化１２９】



実施例1　　実施例90

工程Ａ：

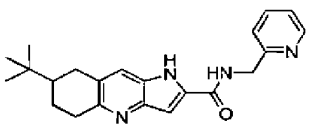
実施例１（５０ｍｇ、０．１７ｍｍｏｌ）、アミン（０．５ｍｌ）および触媒量のシアン化ナトリウムの溶液を、密閉したチューブ中で、１２０℃で一晩加熱した。室温まで冷却した後、その混合物を水および酢酸エチルで希釈した。その有機層を水（１００×２）で洗浄し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって白色の固体を得た。その固体をエーテルで洗浄して、実施例９０を白色固体として得た（２８ｍｇ、４０％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝４０６。

【０４２６】

（実施例９１）

【０４２７】

【化１３０】



実施例１からの実施例９０の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例９１を調製した。実施例９１は黄色の固体として得た（３１ｍｇ、５０％）。Ｌ

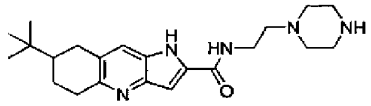
ＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３６３。

【０４２８】

（実施例９２）

【０４２９】

【化１３１】



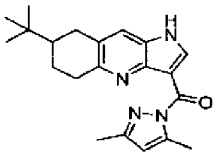
実施例１からの実施例９０の調製について記載されたのと同じ手順を用いて、実施例１から実施例９２を調製した。実施例９２は白色固体として得た（３２ｍｇ、４０％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３８４。

【０４３０】

（実施例９３）

【０４３１】

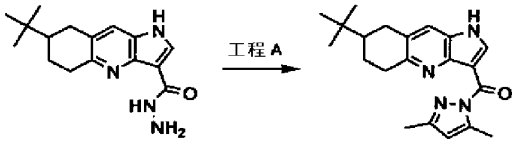
【化１３２】



調製例９３：

【０４３２】

【化１３３】



実施例79　　実施例93

工程Ａ：

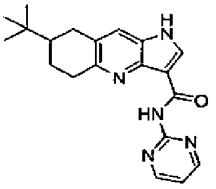
テトラヒドロフラン（５ｍｌ）中の実施例７９（１５０ｍｇ、０．５２ｍｍｏｌ）の溶液に、２，４－ペンタンジオン（１０８μｌ，１．０５ｍｍｏｌ）および１滴の濃塩酸を添加した。その混合物を室温で１時間攪拌した。酢酸エチルおよび水を添加した。その混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液でクエンチした。層を分離し、その水層を酢酸エチル（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去によって白色の固体を得た。その固体をエーテルで洗浄して、実施例９３を白色固体として得た（６４ｍｇ、３５％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３５１。

【０４３３】

（実施例９４）

【０４３４】

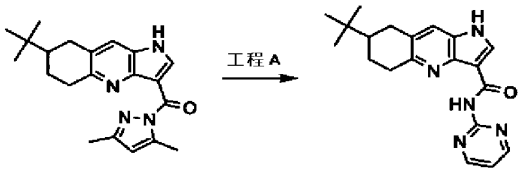
【化１３４】



調製例９４：

【０４３５】

【化１３５】



工程Ａ：

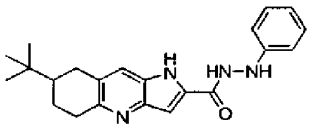
アセトニトリル（２ｍｌ）中の実施例９３（６５ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）および２－アミノピリミジン（１８０ｍｇ、１．９ｍｍｏｌ）の混合物をマイクロ波（１０分，１５０℃）中で加熱した。固体を濾過しメタノールで洗浄して、実施例９４を白色固体として得た（７ｍｇ、１０％）。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３５０。

【０４３６】

（実施例９５）

【０４３７】

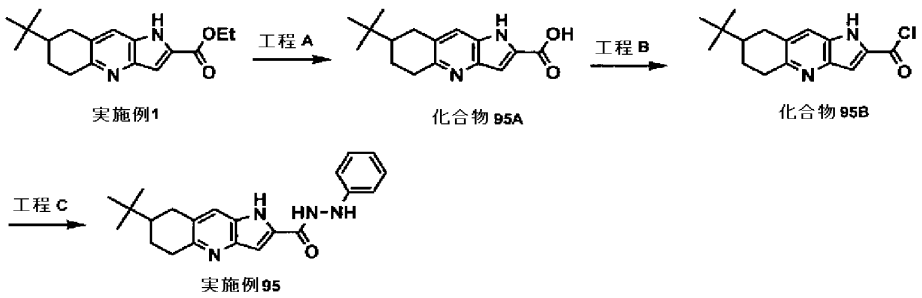
【化１３６】



調製例９５：

【０４３８】

【化１３７】



工程Ａ：

実施例１（１．５ｇ、４．９９ｍｍｏｌ）および水酸化リチウム（２４０ｍｇ、１０ｍｍｏｌ）を、水／メタノール／テトラヒドロフラン（１：１：１ｖ／ｖ）の混合物中で還流して１時間攪拌した。室温まで冷却した後、真空中で溶媒を除去した。その混合物を水

で希釈して、溶液のｐＨが３になるまで濃塩酸を添加した。その固体を濾過して、水で洗浄して、真空下で乾燥して、化合物９５Ａを白色固体として得た（１．２ｇ、９０％）。

【０４３９】

工程Ｂ：

化合物９５Ａ（５５ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）を、塩化チオニル（２．５ｍｌ）およびジクロロメタン（２．５ｍｌ）の混合物に溶解した。触媒量のＤＭＦ（１滴）を添加して、その混合物を室温で１５分間撹拌し、溶媒を真空中で除去して化合物９５Ｂを黄色の固体として得た。化合物９５Ｂをさらに精製することなく次の工程に用いた。

【０４４０】

工程Ｃ：

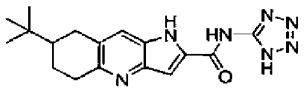
テトラヒドロフラン（１０ｍｌ）中の化合物９５Ｂ（工程２）の懸濁液に室温で過剰のフェニルヒドラジン（２～４当量）を添加して、その混合物を室温で一晩撹拌した。溶媒を真空中で除去し、続いてカラムクロマトグラフィー［メタノール－ジクロロメタン，５：９５（ｖ／ｖ）］によって実施例９５を黄色の固体として得た（２９ｍｇ、４０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６３。

【０４４１】

（実施例９６）

【０４４２】

【化１３８】



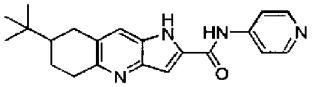
実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例９６を調製した。実施例９６を白色固体として得た（５ｍｇ、９％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３４０。

【０４４３】

（実施例９７）

【０４４４】

【化１３９】



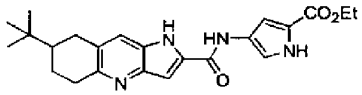
実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例９７を調製した。実施例９７を黄色の固体として得た（３１ｍｇ、５０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３４９。

【０４４５】

（実施例９８）

【０４４６】

【化１４０】

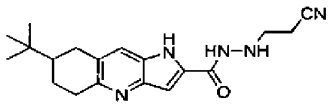


実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例９８を調製した。実施例９８を白色の固体として得た（２６ｍｇ、３５％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝４０９。

【０４４７】

（実施例９９）

【０４４８】
【化１４１】

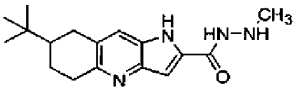


実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例９９を調製した。実施例９９を黄色の固体として得た（１５ｍｇ、２５％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３４０。

【０４４９】

（実施例１００）

【０４５０】
【化１４２】

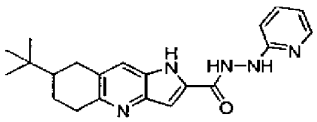


実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１００を調製した。実施例１００を白色固体として得た（２４ｍｇ、４５％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３０１。

【０４５１】

（実施例１０１）

【０４５２】
【化１４３】

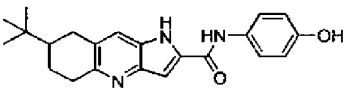


実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１０１を調製した。実施例１０１を黄色の固体として得た（３３ｍｇ、５０％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３６４。

【０４５３】

（実施例１０２）

【０４５４】
【化１４４】



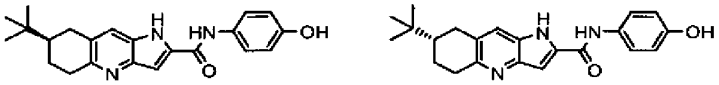
実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１０２を調製した。実施例１０２を黄色の固体として得た（３６ｍｇ、５５％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３６４。

【０４５５】

（実施例１０３Ａおよび１０３Ｂ）

【０４５６】

【化１４５】

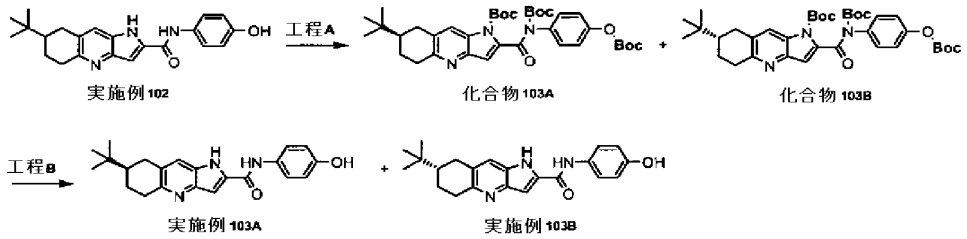


実施例103A　　実施例103B

調製例１０３Ａおよび１０３Ｂ：

【０４５７】

【化１４６】



実施例102　化合物103A　化合物103B

実施例103A　実施例103B

工程Ａ：

テトラヒドロフラン（２０ｍｌ）中の実施例１０２（３１０ｍｇ、１．１４ｍｍｏｌ）の溶液に、$(Boc)_2O$（１．４ｇ、６．３ｍｍｏｌ）、続いてトリアチルアミン（０．９ｍｌ，６．３ｍｍｏｌ）を添加した。触媒量のＤＭＡＰを添加して、その混合物を室温で一晩攪拌した。その混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液でクエンチした。層を分離して、その水層をジクロロメタン（２×１００ｍＬ）で抽出し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー[ヘキサン－酢酸エチル，５：１（ｖ／ｖ）]によって化合物１０３Ａおよび化合物１０３Ｂ（３３４ｍｇ、８０％）の混合物を無色の油状物として得た。

【０４５８】

工程Ｂ：

工程１由来の化合物１０３Ａおよび１０３Ｂの混合物のキラルＨＰＬＣ分離[キラルＡＤ，ヘキサン－イソプロパノール，１：１（ｖ／ｖ）]によって最初に極性の低い方の異性体化合物１０３Ｂを白色の泡状物として得た。$[\alpha]_D^{20}$－５５（ｃ　０．４９，ＭｅＯＨ）および極性の強い方の異性体化合物１０３Ａを白色の泡状物として得た。$[\alpha]_D^{20}$＋５４（ｃ　０．４９，ＭｅＯＨ）。化合物１０３Ｂをジクロロメタン（５ｍｌ）およびトリフルオロ酢酸（５ｍｌ）に溶解した。その混合物を室温で２時間攪拌し、溶媒を真空中で除去して実施例１０３Ｂをトリフルオロ酢酸塩として、黄色の固体として得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６４。

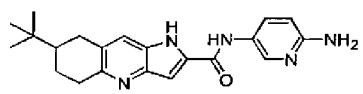
化合物１０３Ａをジクロロメタン（５ｍｌ）およびトリフルオロ酢酸（５ｍｌ）に溶解した。その混合物を室温で２時間攪拌し、その溶媒を真空中で除去して実施例１０３Ａをトリフルオロ酢酸塩として黄色の固体として得た。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６４。

【０４５９】

（実施例１０４）

【０４６０】

【化１４７】



実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１０４を調製した。実施例１０４を黄色の固体として得た（２９ｍｇ、４５％）

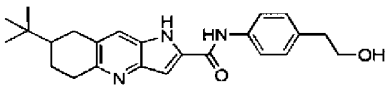
。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３６４。

【０４６１】

（実施例１０５）

【０４６２】

【化１４８】



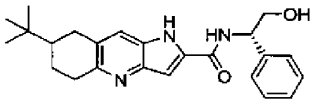
実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１０５を調製した。実施例１０５を白色の固体として得た（８６ｍｇ、５５％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３９２。

【０４６３】

（実施例１０６）

【０４６４】

【化１４９】



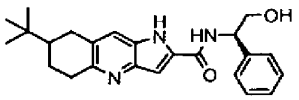
実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１０６を調製した。実施例１０６を白色の固体として得た（３５ｍｇ、５０％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３９２。

【０４６５】

（実施例１０７）

【０４６６】

【化１５０】



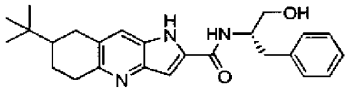
実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１０７を調製した。実施例１０７を黄色の固体として得た（３９ｍｇ、５５％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３９２。

【０４６７】

（実施例１０８）

【０４６８】

【化１５１】

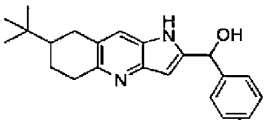


実施例１からの実施例９５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例１から実施例１０８を調製した。実施例１０８を（３３ｍｇ、４５％）として得た。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝４０６。

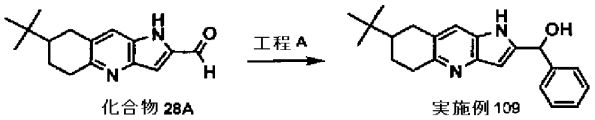
【０４６９】

（実施例１０９）

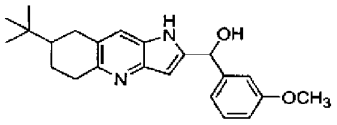
【０４７０】
【化１５２】



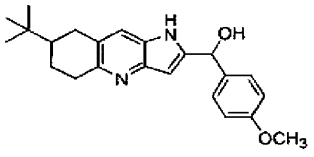
調製例１０９：
【０４７１】
【化１５３】



工程Ａ：
テトラヒドロフラン（５ｍｌ）中の化合物２８Ａ（３０ｍｇ、０．１２ｍｍｏｌ、実施例１０７，工程１）の溶液に０℃で、フェニルマグネシウムブロミド（０．１２ｍｌ，０．３５ｍｍｏｌ、３．０Ｍがエーテル中）を添加して、その混合物を０℃で１５分間攪拌し、その後、飽和塩化アンモニウム溶液でクエンチした。酢酸エチルおよび水を添加した。層を分離して、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：１（ｖ／ｖ）］によって、実施例１０９を白色固体として（２５ｍｇ、６５％）得た。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３３５。
【０４７２】
（実施例１１０）
【０４７３】
【化１５４】



化合物２８Ａからの実施例１０９の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物２８Ａから実施例１１０を調製した。カラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：１（ｖ／ｖ）］によって実施例１１０を白色固体として得た（２６ｍｇ、６２％）。ＬＣＭＳ：MH^+ ＝３６５。
【０４７４】
（実施例１１１）
【０４７５】
【化１５５】



化合物２８Ａからの実施例１０９の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物２８Ａから実施例１１１を調製した。カラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：１（ｖ／ｖ）］によって実施例１１１を白色固体として得た（２６ｍｇ、６０％

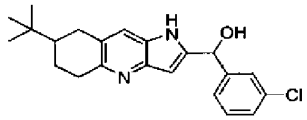
)。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３６５。

【０４７６】

（実施例１１２）

【０４７７】

【化１５６】



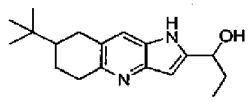
化合物２８Ａからの実施例１０９の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物２８Ａから実施例１１２を調製した。カラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：１（ｖ／ｖ）］によって実施例１１２を白色固体として得た（３０ｍｇ、７０％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３６９。

【０４７８】

（実施例１１３）

【０４７９】

【化１５７】



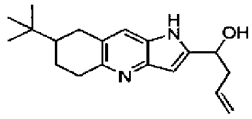
化合物２８Ａからの実施例１０９の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物２８Ａから実施例１１３を調製した。カラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：１（ｖ／ｖ）］によって実施例１１３を白色固体として得た（２４ｍｇ、７２％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝２８７。

【０４８０】

（実施例１１４）

【０４８１】

【化１５８】



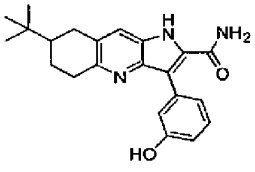
化合物２８Ａからの実施例１０９の調製について記載されたのと同じ手順を用いて化合物２８Ａから実施例１１４を調製した。カラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，１：１（ｖ／ｖ）］によって実施例１１４を白色固体として得た（２４ｍｇ、７０％）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝２９９。

【０４８２】

（実施例１１５）

【０４８３】

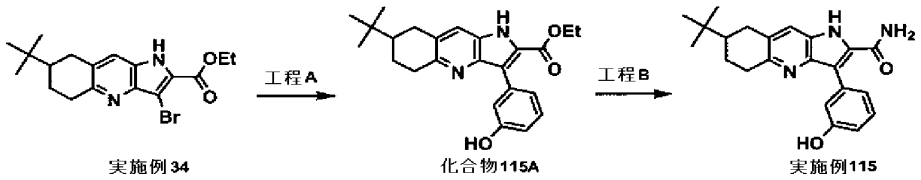
【化１５９】



調製例１１５：

【０４８４】

【化１６０】



実施例34　　化合物115A　　実施例115

工程Ａ：

実施例３４（５０ｍｇ、０．１３ｍｍｏｌ）およびフェニルボロン酸（２４ｍｇ、０．１７ｍｍｏｌ）の混合物に、トルエン（１ｍｌ）およびエタノール（１ｍｌ）、続いて２Ｎの飽和炭酸水素ナトリウム（０．５ｍｌ）を添加した。その混合物を窒素で１０分間パージして、テトラキス（トリフェニル）ホスフィンパラジウム（１０％ｍｍｏｌ）を添加した。その混合物を密閉した試験管中で、９０℃で一晩加熱した。室温まで冷却した後、酢酸エチルおよび飽和塩化アンモニウム溶液を添加した。層を分離し、乾燥して（$MgSO_4$）、濾過した。真空中での溶媒の除去、続いてカラムクロマトグラフィー［ヘキサン－酢酸エチル，２：１（ｖ／ｖ）］によって、化合物１１５Ａを白色固体として得た（３６ｍｇ、７０％）。

【０４８５】

工程Ｂ：

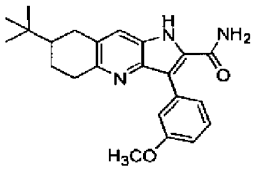
メタノール（５ｍｌ）中の化合物１１５Ａ（上記より）の溶液に０℃で、この溶液を通して２０分間アンモニアをパージした。次いでこの混合物を密閉した試験管中で６０～７５℃で２日間加熱した。室温まで冷却した後、その固体を濾過してエーテルで広範に洗浄して、実施例１１５を白色固体として得た（３０ｍｇ、９０％）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３６４。

【０４８６】

（実施例１１６）

【０４８７】

【化１６１】



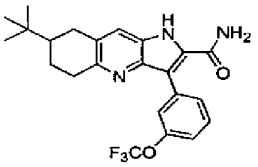
実施例３４からの実施例１１５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例３４から実施例１１６を調製した。実施例１１６を白色固体として得た（３２ｍｇ、６３％，２工程）。ＬＣＭＳ：MH^+＝３７８。

【０４８８】

（実施例１１７）

【０４８９】

【化１６２】



実施例３４からの実施例１１５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例

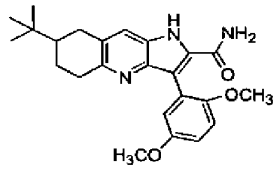
３４から実施例１１７を調製した。実施例１１７を白色固体として得た（３３ｍｇ、５９％，２工程）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝４３２。

【０４９０】

（実施例１１８）

【０４９１】

【化１６３】



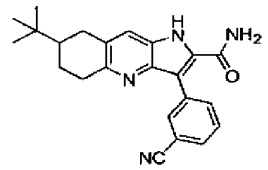
実施例３４からの実施例１１５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例３４から実施例１１８を調製した。実施例１１８を白色固体として得た（３１ｍｇ、５９％，２工程）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝４０８。

【０４９２】

（実施例１１９）

【０４９３】

【化１６４】



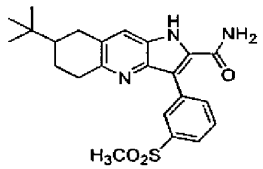
実施例３４からの実施例１１５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例３４から実施例１１９を調製した。実施例１１９を白色固体として得た（２７ｍｇ、５４％，２工程）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３７３。

【０４９４】

（実施例１２０）

【０４９５】

【化１６５】



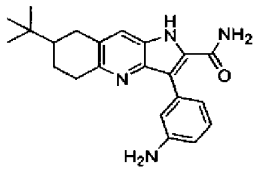
実施例３４からの実施例１１５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例３４から実施例１２０を調製した。実施例１２０を白色固体として得た（３３ｍｇ、５９％，２工程）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝４２６。

【０４９６】

（実施例１２１）

【０４９７】

【化１６６】



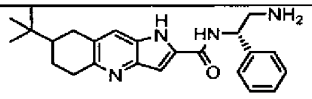
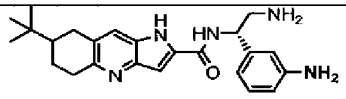
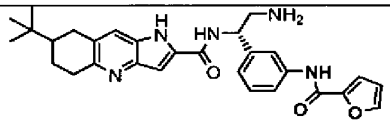
実施例３４からの実施例１１５の調製について記載されたのと同じ手順を用いて実施例３４から実施例１２１を調製した。実施例１２１を白色固体として得た（２２ｍｇ、４５％，２工程）。ＬＣＭＳ：ＭＨ$^+$＝３６３。

【０４９８】

（実施例１２２、１２３および１２４）

特許番号ＷＯ２００６０９８９６１で同様の化合物の調製について記載された手順を用いて、化合物９５Ｂから実施例１２２～１２４を調製した。

【表Ｄ】

実施例	構造	LCMS: MH$^+$
122		391
123		406
124		500

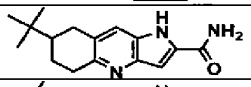
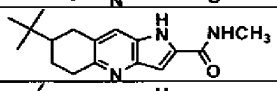
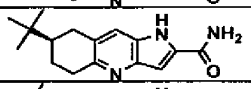
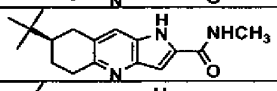
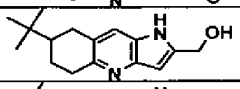
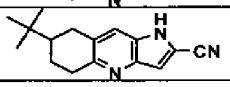
【０４９９】

下の表２はいくつかの代表的な化合物についてのＩＣ$_{50}$値である：

【０５００】

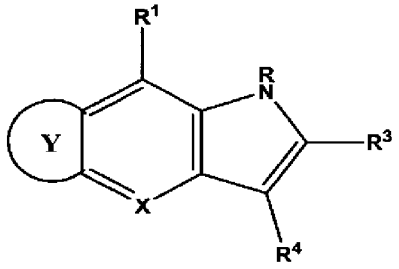
【表２】

表2

実施例	構造	IC_{50} (μM)
2		0.03
3		0.05
21A		0.03
22A		0.02
23		0.04
24		0.05

引用文献－
標的としてのＫＳＰ／キネシン
１）Ｂｌａｎｇｙ，Ａら、（１９９５）Ｃｅｌｌ　８３，１１５９～１１６９（ヒトＫＳＰのクローニング、有糸分裂における機能）。
２）Ｓａｗｉｎ，Ｋ．およびＭｉｔｃｈｉｓｏｎ，Ｔ．Ｊ．（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９２，４２８９～４２９３（Ｘｅｎｏｐｕｓ　Ｅｇｄ５，保存されたモータードメイン、機能）。
３）Ｈｕａｎｇ、Ｔ．－Ｇ．およびＨａｃｋｎｅｙ，Ｄ．Ｄ．（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９，１６４９３～１６５０１（Ｄｒｏｓｐｈｉｌａのキネシン最小モータードメインの定義、Ｅ．ｃｏｌｉからの発現および精製）。
４）Ｋａｉｓｅｒ　Ａ．ら、（１９９９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４，１８９２５～１８９３１（ＫＳＰモータードメインの過剰発現、有糸分裂における機能、ＫＳＰを標的することによる増殖の阻害）。
５）Ｋａｐｏｏｒ　Ｔ．ＭおよびＭｉｔｃｈｉｓｏｎ，ＴＪ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９６，９１０６～９１１１（ＫＳＰモータードメインの使用、そのインヒビター）。
６）Ｍａｙｅｒ，Ｔ．Ｕ．（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８６，９７１～９７４（抗癌剤としてのＫＳＰインヒビター）。
【０５０１】
ＫＳＰアッセイ（エンドポイントおよび反応速度論）
７）Ｗｏｈｌｋｅ，Ｇ．ら、（１９９７）Ｃｅｌｌ　９０，２０７～２１６（キネシンモータードメインの発現および精製、反応速度論的アッセイ、エンドポイント法）。
８）Ｇｅｌａｄｅｏｐｏｕｌｏｓ，ＴＰ．ら、（１９９１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９２，１１２～１１６（エンドポイント法の基礎）。
９）Ｓａｋｏｗｉｃｚ，Ｒ．ら、（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８０，２９２～２９５（反応速度論的アッセイ）。
１０）Ｈｏｐｋｉｎｓ，Ｓ．Ｃ．ら、（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３９，２８０５～２８１４（エンドポイント法および反応速度論的アッセイ）。
１１）Ｍａｌｉｇａ，Ｚ．ら、（２００２）Ｃｈｅｍ．＆Ｂｉｏｌ．９，９８９～９９６（反応速度論的アッセイ）。
【０５０２】
広範な本発明の概念から逸脱することなく上記の実施形態を変更することができるということは、当業者に理解される。従って、本発明は開示した特定の実施形態には限定されず、添付の特許請求の範囲によって定義されているような本発明の趣旨および範囲内である改変を網羅することを意図するということが理解される。
【手続補正書】
【提出日】平成21年8月18日(2009.8.18)
【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】
構造式（Ｉ）：

【化１６７】



式(I)

によって表される化合物、あるいはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物またはエステルであって、

環Ｙは、式Ｉに示すように縮合された３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルであり、該３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルは、必要に応じて、１～２個のR^2部分で置換されており；

ＸはＮまたはＮ－酸化物であり；

ＲおよびＲ^{1}は各々独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}$－OR^8、－$C(O)R^5$、－$C(S)R^5$、－$C(O)OR^8$、－$C(S)OR^8$、－$OC(O)R^8$、－$OC(S)R^8$、－$C(O)NR^5R^6$、－$C(S)NR^5R^6$、－$C(O)NR^5OR^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)NR^8NR^5R^6$、－$C(S)NR^8NR^5R^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)SR^8$、－NR^5R^6、－$NR^5C(O)R^6$、－$NR^5C(S)R^6$、－$NR^5C(O)OR^8$、－$NR^5C(S)OR^8$、－$OC(O)NR^5R^6$、－$OC(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5R^6$、－$NR^5C(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5OR^8$、－$NR^5C(S)NR^5OR^8$、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}SR^8$、SO_2R^8、－$S(O)_{1-2}NR^5R^6$、－$N(R^8)SO_2R^8$、－$S(O)_{1-2}NR^6OR^8$、－ＣＮ、－OCF_3、－SCF_3、－$C(=NR^8)NR^5$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、ハロアルキルおよびアルキルシリルからなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアラルキルの各々が独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^2は独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、アルキルシリル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}$－OR^8、－$C(O)R^5$、－$C(S)R^5$、－$C(O)OR^8$、－$C(S)OR^8$、－$OC(O)R^8$、－$OC(S)R^8$、－$C(O)NR^5R^6$、－$C(S)NR^5R^6$、－$C(O)NR^5OR^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)NR^8NR^5R^6$、－$C(S)NR^8NR^5R^6$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)SR^8$、－NR^5R^6、－$NR^5C(O)R^6$、－$NR^5C(S)R^6$、－$NR^5C(O)OR^8$、－$NR^5C(S)OR^8$、－$OC(O)NR^5R^6$、－$OC(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5R^6$、－$NR^5C(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5OR^8$、－$NR^5C(S)NR^5OR^8$、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}SR^8$、SO_2R^8、－$S(O)_{1-2}NR^5R^6$、－$N(R^8)SO_2R^8$、－$S(O)_{1-2}NR^6OR^8$、－ＣＮ、－OCF_3、－SCF_3、－$C(=NR^8)NR^5$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、および－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$からなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリ

ル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されているか；

あるいは同じ炭素原子上の２つのR^{2}はそれらが結合する炭素原子と必要に応じて一緒になって、Ｃ＝Ｏ、Ｃ＝Ｓまたはエチレンジオキシ基を形成し；

R^{3}およびR^{4}は各々独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－Ｃ（Ｏ）R^{5}、－Ｃ（Ｓ）R^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）R^{8}、－ＯＣ（Ｓ）R^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＳR^{8}、－ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＯR^{8}、－ＯＣ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＯＣ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｏ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－ＮR^{5}Ｃ（Ｓ）ＮR^{5}ＯR^{8}、－（ＣR^{11}R^{12}）$_{0-6}$ＳR^{8}、ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮR^{5}R^{6}、－Ｎ（R^{8}）ＳＯ$_{2}$R^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮR^{6}ＯR^{8}、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮR^{8}）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（＝ＮＯR^{8}）ＮR^{5}、－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（R^{8}）－Ｃ（＝Ｓ）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^{8}）－（ＣＮ^{40}R^{41}）$_{1-5}$－Ｃ（＝ＮR^{8}）ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^{8}）（ＣR^{40}R^{41}）$_{1-5}$－ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^{8}）（ＣR^{40}R^{41}）$_{1-5}$－Ｃ（Ｏ）－ＮR^{5}R^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^{8}）（ＣR^{40}R^{41}）$_{1-5}$－ＯR^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-5}$ＮR^{5}R^{6}および－Ｃ（Ｓ）ＮR^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-5}$ＯR^{8}からなる群より選択され、該アルキル、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^{5}およびR^{6}は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－ＯR^{8}、－Ｃ（Ｏ）R^{8}、および－Ｃ（Ｏ）ＯR^{8}からなる群より選択され、ただし、R^{5}およびR^{6}は同時に－ＯR^{8}ではなく；該アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^{9}部分によって必要に応じて置換されているか；またはR^{5}およびR^{6}は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；

各々のR^{8}は独立して、Ｈ、アルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、およびヘテロアラルキルからなる群より選択され、Ｈを除くR^{8}の各メンバーは１～４個のR^{9}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のR^{9}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－ＮＯ$_{2}$、－ＯR^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）R^{11}、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）－ＯR^{11}、－ＣＮ、－ＮR^{11}R^{12}、－Ｃ（Ｏ）R^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＯR^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＮR^{11}R^{12}、－ＣＦ$_{3}$、－ＯＣＦ$_{3}$、－ＣＦ$_{2}$ＣＦ$_{3}$、－Ｃ（＝ＮＯＨ）R^{11}、－Ｎ（R^{11}）Ｃ（＝Ｏ）R^{12}、－Ｃ（＝ＮR^{11}）ＮR^{11}R^{12}、および－ＮR^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯR^{12}からなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のR^{42}部分で置換されてもよく；ここで該シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、該シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル

、またはヘテロアリールを形成するか；または２つのＲ^{9}部分は、同じ炭素原子に結合するとき、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になってＣ＝ＯまたはＣ＝Ｓ基を形成し；

各々のＲ^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、－（ＣＲ^{11}Ｒ^{12}）$_{0-4}$ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{8}、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ^{5}、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＳＲ^{8}、－Ｓ（Ｏ）Ｒ^{8}、および－Ｓ（Ｏ）$_{2}$Ｒ^{8}からなる群より選択され、該アルキル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々は必要に応じて、１～４個のＲ^{13}部分で独立して置換され；

各々のＲ^{11}は独立して、Ｈまたはアルキルであり；

各々のＲ^{12}は独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールであり、またはＲ^{11}およびＲ^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、ＯまたはＳから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該Ｒ^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－ＮＨ$_{2}$、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_{2}$、ハロ、ハロアルキル、ＣＦ$_{3}$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{13}は独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、アルキルシリル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のＲ^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＮＯ$_{2}$、－ＯＲ^{11}、－（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）－ＯＲ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＣＦ$_{3}$、－ＯＣＦ$_{3}$、－Ｎ（Ｒ^{11}）Ｃ（Ｏ）Ｒ^{12}、および－ＮＲ^{11}Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は１～４個のＲ^{43}部分で必要に応じて置換され；かつ

各々のＲ^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；

ただし、ＲおよびＲ^{3}はそれらがそれぞれ結合されることが示される環の窒素および炭素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはヘテロシクレニルの環を形成し、該環は必要に応じて、オキソ、チオキソ、－ＯＲ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、および－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}からなる群より独立して選択される１～３個の部分で置換されている、化合物。

【請求項２】

環Ｙが３員～７員のシクロアルキルであり、１～２個のＲ^{2}部分で必要に応じて置換されている、請求項１に記載の化合物。

【請求項３】

環Ｙが６員のシクロアルキルであり、１～２個のＲ^{2}部分で必要に応じて置換されている、請求項１または２に記載の化合物。

【請求項４】

環Ｙが１つのＲ^{2}部分で置換されている、請求項１、２または３に記載の化合物。

【請求項５】

Ｒ^{2}がアルキルである、請求項１～４のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項６】

Ｒ^{2}がｔ－ブチルである、請求項５に記載の化合物。

【請求項７】
Ｒが、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{5}からなる群より選択される、請求項１に記載の化合物。
【請求項８】
Ｒ^{5}がアルキルである、請求項７に記載の化合物。
【請求項９】
Ｒ^{1}がＨである、請求項１に記載の化合物。
【請求項１０】
ＲがＨである、請求項９に記載の化合物。
【請求項１１】
請求項１に記載の化合物であって、Ｒ^{3}およびＲ^{4}が各々独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）Ｒ^{6}、－Ｎ（Ｒ^{8}）ＳＯ$_{2}$Ｒ^{8}、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯＲ^{8}）Ｒ^{5}、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（Ｒ^{8}）－Ｃ（＝Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々が独立して、１～５個のＲ^{10}部分で必要に応じて置換されており；
Ｒ^{5}およびＲ^{6}の各々が独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されるか；またはＲ^{5}およびＲ^{6}が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されており；
各々のＲ^{8}が独立して、１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；
各々のＲ^{9}が独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＯＲ^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}、および－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{11}からなる群より選択され；該アルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のＲ^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上の２つのラジカルを含み、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のＲ^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{8}、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{5}、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、および－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$Ｒ^{8}からなる群より選択され、該ヘテロシクリル、アリールおよびヘテロアリール部分の各々が必要に応じて、１～４個のＲ^{13}部分で独立して置換され；
各々のＲ^{11}が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ
各々のＲ^{12}が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはＲ^{11}およびＲ^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、ＯもしくはＳから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該Ｒ^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－ＮＨ$_{2}$、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_{2}$、ハロ、

ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－CN、－$NR^{11}R^{12}$、－C（＝O）R^{11}、－C（＝O）OR^{11}、－C（＝O）$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－NR^{11}C（＝O）R^{12}、および－NR^{11}C（＝O）OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ

各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。

【請求項１２】

請求項１１に記載の化合物であって、R^3が、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、－C（O）R^5、－C（O）OR^8、－C（O）NR^5R^6、－C（O）$NR^8NR^5R^6$、－CN、－C（＝NOR^8）R^5、および－C＝N－N（R^8）－C（＝S）NR^5R^6からなる群より選択され、該アルキル、およびアルケニルの各々が独立して、１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^5およびR^6が独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されるか；またはR^5およびR^6が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^8が独立して、１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；

各々のR^9が独立して、アルキル、アリール、ヘテロアリール、－OR^{11}、－OC（＝O）R^{11}、－CN、－$NR^{11}R^{12}$、および－C（O）OR^{11}からなる群より選択され、該アルキル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のR^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々のR^{10}は独立して、アルコキシ、ＯＨ、ハロアルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、－NR^5R^6、－CN、－OC（＝O）R^5、および－O－アルキル－O－アルキルからなる群より選択され、該ヘテロシクリル、およびアリールの各々が必要に応じて独立して、１～４個のR^{13}部分で置換されており；

各々のR^{11}が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ

各々のR^{12}が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－CN、－OH、－NH_2、－N（Ｈ）アルキル、－N（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリー

ルオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；

各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－CN、－$NR^{11}R^{12}$、－C（＝O）R^{11}、－C（＝O）OR^{11}、－C（＝O）$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－NR^{11}C（＝O）R^{12}、および－NR^{11}C（＝O）OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。

【請求項１３】

請求項１２に記載の化合物であって、R^3がH、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、H_2NNH－C（＝O）－、アルキル－NH－NH－（C＝O）－、ヘテロアリール－NH－NH－C（＝O）－、アリール－アルキル－、アルコキシ、NH_2－アルキル－、NC－アルキル－、アリール－C（＝O）－O－アルキル－、アルキル－O－C（＝O）－、H_2N－C（＝O）－、アリール－NH－NH－C（＝O）－、アリール－NH－C（＝O）－、ヘテロアリール－NH－C（＝O）－、アルキル－C（＝O）－、アルキル－NH－C（＝O）－、アリール－アルキル－NH－C（＝O）－、HO－アルキル－アリール－NH－C（＝O）－、ヘテロアリール－アルキル－NH－C（＝O）－、ヘテロシクリル－アルキル－NH－C（＝O）－、H_2N－アルキル－NH－C（＝O）－、HO－アルキル－NH－C（＝O）－、アルキル－O－アルキル－、NC－アルキル－NH－NH－C（＝O）－、アルキル－O－アルキル－O－アルキル－、H_2N－C（＝S）－NH－N＝CH－、アルキル－C（＝NOH）－、およびヘテロシクリル－C（＝O）－からなる群より選択され；該アルキル、アルケニル、ならびにアリール－アルキル－、およびアリール－アルキル－NH－C（＝O）－の「アルキル」部分の各々が、ヒドロキシルおよびNH_2からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換されており；該アリール－アルキル－、アリール－NH－C（＝O）－、およびアリール－アルキル－NH－C（＝O）－の各々の「アリール」部分が、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、NH_2、およびヘテロアリール－C（＝O）－NH－からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換されており；任意の該R^3基の「アリール」部分が、２つの隣接する基を含むとき、このような部分が、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、５～６員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成している、化合物。

【請求項１４】

請求項１１に記載の化合物であって、R^4が、H、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、アリール、－C（＝O）R^5、－C（＝O）OR^8、－C（＝O）NR^5R^6、－C（＝O）$NR^8NR^5R^6$、－NR^5R^6、－NR^5C（＝O）R^6、－$NR^8SO_2R^8$からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々が独立して、１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^5およびR^6が独立して、H、アルキル、アルケニル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されているか；またはR^5およびR^6が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のR^9部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^8が独立して、１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；

各々のR^9が独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＯＣ（＝Ｏ）R^{11}、－ＣＮ、－$NR^{11}R^{12}$、－$NR^{11}C(=O)OR^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、－$NR^{11}C(=O)R^{12}$、および－Ｃ（＝Ｏ）OR^{11}からなる群より選択され；該アルキル、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のR^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該ヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルが必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々のR^{10}が独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－NR^5R^6、ハロアルコキシ、－Ｃ（＝Ｏ）NR^5R^6、－$NR^5C(=O)R^6$、－$NR^5C(=O)OR^6$および－$S(=O)_2R^8$からなる群より選択され；

各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－ＣＮ、－$NR^{11}R^{12}$、－Ｃ（＝Ｏ）R^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）OR^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－$NR^{11}C(=O)R^{12}$、および－$NR^{11}C(=O)OR^{12}$からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{11}が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ

各々のR^{12}が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－NH_2、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。

【請求項１５】

請求項１４に記載の化合物であって、R^4が、Ｈ、ハロ、ニトロ、H_2N－、アルキル、ＨＯ－アルキル－、（ＨＯ）$_2$アルキル－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルケニル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、H_2N－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－からなる群より選択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＮＣ－アルキル－、H_2N－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＨＯ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－アルケニル－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロシクリル、ＨＯ－アルキニル－、アルキル－Ｏ－アルキル－ＮＨ－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－、アルキル－$S(=O)_2$ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、（ＨＯ）$_2$アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルケニル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリールで置換されており、これが必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、H_2N－およびアルキル－Ｓ（＝Ｏ）－からなる群より選択される１～２個の部分

で置換されている、化合物。
【請求項１６】
請求項１に記載の化合物であって、ここで：
ＸがＮであり；
環Ｙがアルキルで置換されている６員のシクロアルキルであり、
Ｒが、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）R^5からなる群より選択され；
R^1がＨであり；
R^3が、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルコキシ、－Ｃ（Ｏ）R^5、－Ｃ（Ｏ）OR^8、－Ｃ（Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（Ｏ）$NR^8NR^5R^6$、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯR^8）R^5、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（R^8）－Ｃ（＝Ｓ）NR^5R^6からなる群より選択され、該アルキル、およびアルケニルの各々は独立して１～５個のR^{10}部分によって必要に応じて置換されており；かつ
R^4は、Ｈ、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、アリール、－Ｃ（＝Ｏ）R^5、－Ｃ（＝Ｏ）OR^8、－Ｃ（＝Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^8NR^5R^6$、－NR^5R^6、－NR^5Ｃ（＝Ｏ）R^6、－$NR^8SO_2R^8$からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、およびアリールの各々は、独立して１～５個のR^{10}部分で必要に応じて置換され；
各々のR^5およびR^6は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されているか；またはR^5およびR^6は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；その各々が１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されており；
各々のR^8は独立して、１～４個のR^9部分によって必要に応じて置換されているアルキルであり；
各々のR^9は独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－OR^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）R^{11}、－ＣＮ、－$NR^{11}R^{12}$、－Ｎ（R^{11}）Ｃ（＝Ｏ）OR^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）$NR^{11}R^{12}$、－Ｎ（R^{11}）Ｃ（＝Ｏ）R^{12}、および－Ｃ（Ｏ）OR^{11}からなる群より選択され、該アルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、必要に応じて１～４個のR^{42}部分で置換されており；ここで該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のR^{10}が独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－NR^5R^6、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）NR^5R^6、－Ｃ（＝Ｏ）OR^8、－ＯＣ（＝Ｏ）R^5、－ＯＣ（＝Ｏ）NR^5R^6、－NR^5Ｃ（＝Ｏ）R^6、－NR^5Ｃ（＝Ｏ）OR^6、－NR^5Ｃ（＝Ｏ）NR^5R^6、および－Ｓ（Ｏ）$_2R^8$からなる群より選択され、該ヘテロシクリル、アリールおよびヘテロアリール部分の各々は必要に応じて、１～４個のR^{13}部分で独立して置換されており；
各々のR^{11}が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ
各々のR^{12}が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－NH_2、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、

ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－（C_1－C_6アルキル）－OR^{11}、－CN、－$NR^{11}R^{12}$、－C（＝O）R^{11}、－C（＝O）OR^{11}、－C（＝O）$NR^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－NR^{11}C（＝O）R^{12}、および－NR^{11}C（＝O）OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ

各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。

【請求項１７】

請求項１６に記載の化合物であって、式中：

ＸがＮであり；

環Ｙがアルキルで置換されている６員のシクロアルキルであり、

Ｒが、Ｈおよびアルキル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；

R^1がＨであり；

R^3が、Ｈ、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、H_2ＮＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－ＮＨ－（Ｃ＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－、アルコキシ、NH_2－アルキル－、ＮＣ－アルキル－、アリール－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－、ＮＣ－アルキル－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル－、H_2Ｎ－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－Ｎ＝ＣＨ－、アルキル－Ｃ（＝ＮＯＨ）－、およびヘテロシクリル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；該アルキル、アルケニル、ならびにアリール－アルキル－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の「アルキル」部分の各々が、ヒドロキシおよびNH_2からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；該アリール－アルキル－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の各々の「アリール」部分が、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、NH_2、アリール－（＝Ｏ）－ＮＨ－およびヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；任意の該R^3基の「アリール」部分が２つの隣接する部分を含むとき、このような部分は、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、５～６員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；かつ

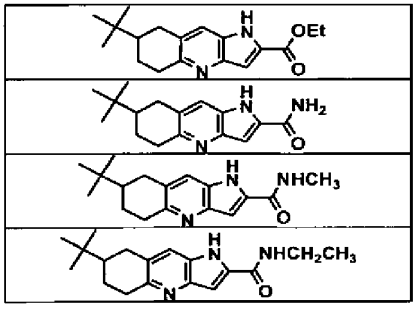
R^4が、Ｈ、ハロ、ニトロ、H_2Ｎ－、アルキル、ＨＯ－アルキル－、（ＨＯ）$_2$アルキル－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルケニル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、H_2Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－からなる群より選択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＮＣ－アルキル－、H_2Ｎ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＨＯ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－アルケニル－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロシクリル、ＨＯ－アルキニル－、アルキル－Ｏ－アルキル－ＮＨ－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、（ＨＯ）$_2$アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）

－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルケニル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、H_2N－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリールで置換されており、これは必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、H_2N－、アルキル－Ｓ、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）－およびアルキル－$S(=O)_2$－からなる群より選択される１～２個の部分で置換されている、化合物。

【請求項１８】

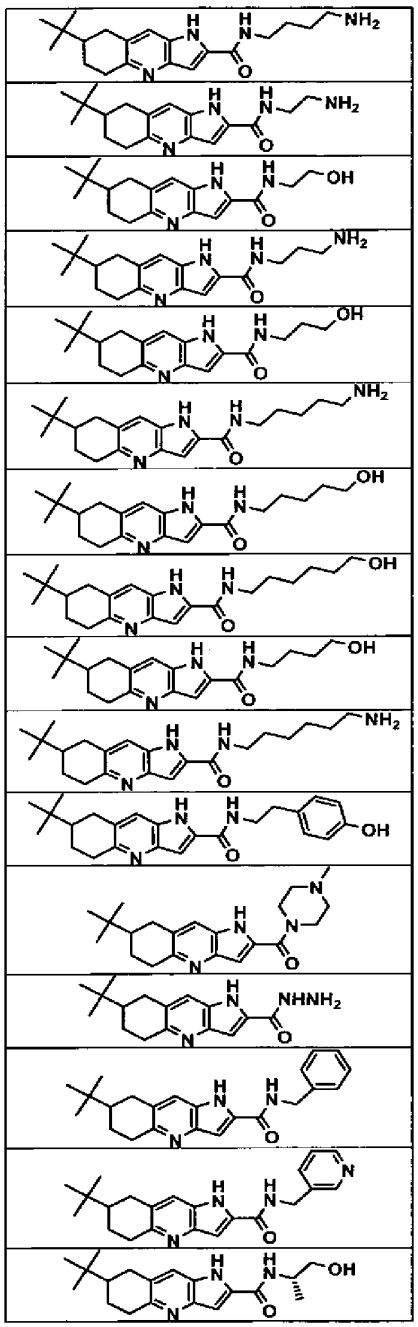
以下：

【表Ｅ－１】



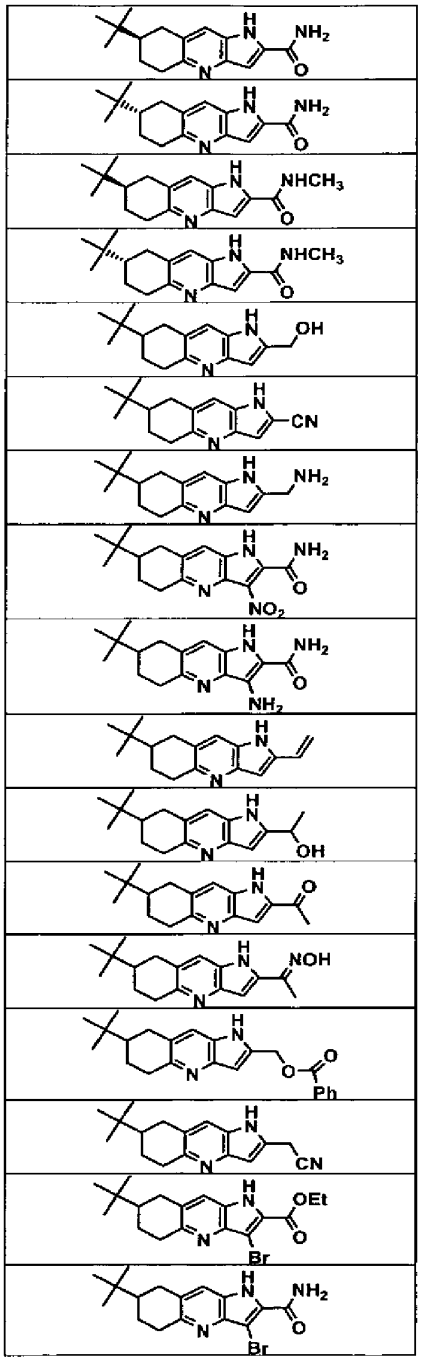
OnCusp
Ex. 1002

【表E－2】



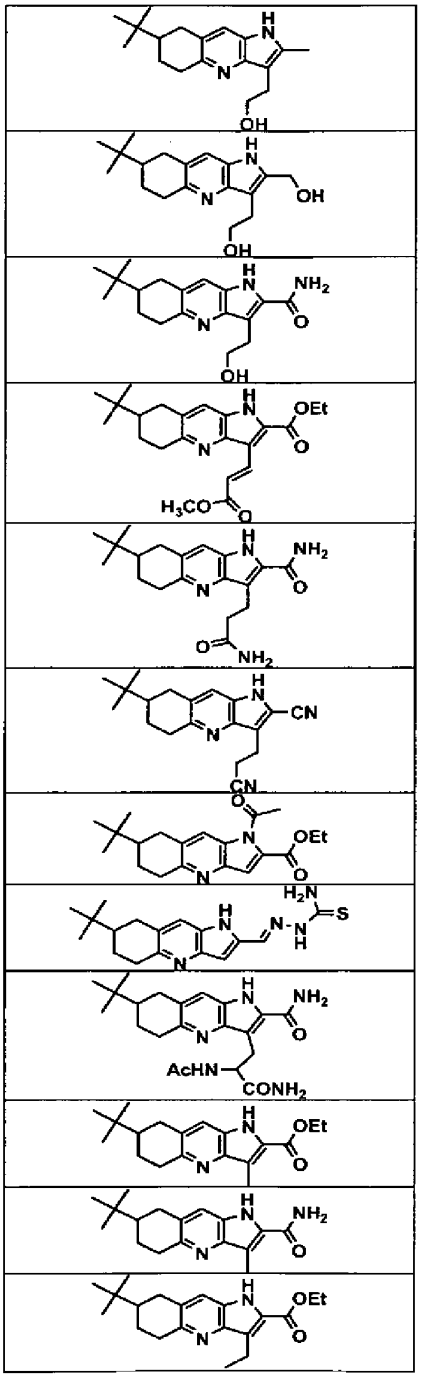
OnCusp
Ex. 1002

【表E－3】



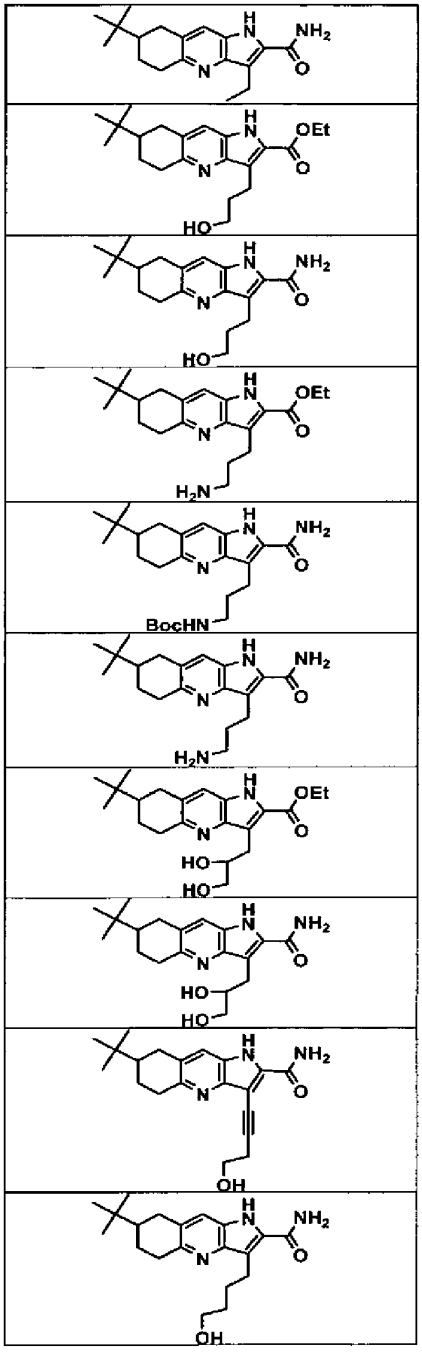
OnCusp
Ex. 1002

【表E－4】



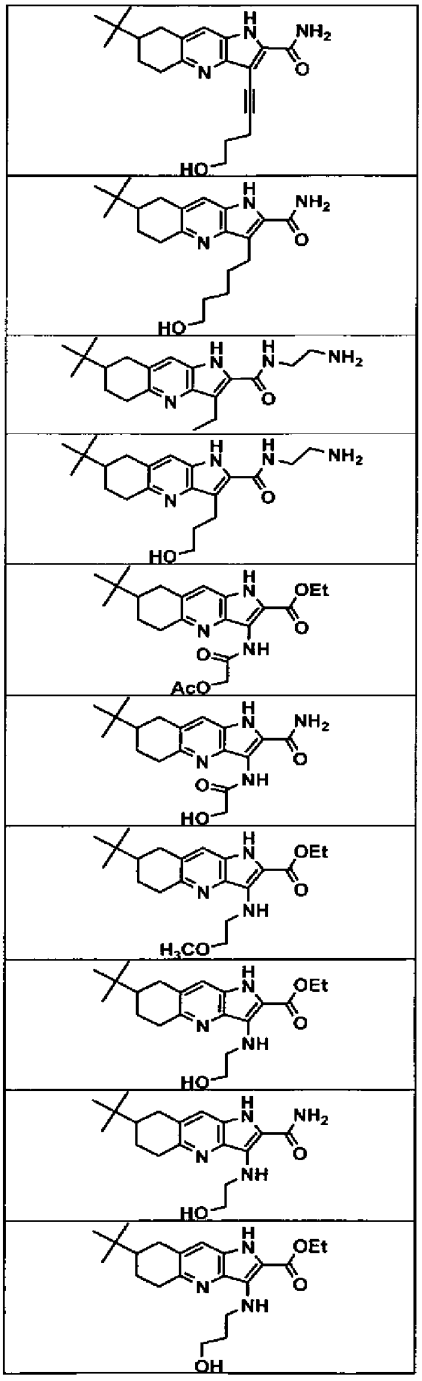
OnCusp
Ex. 1002

【表E－5】



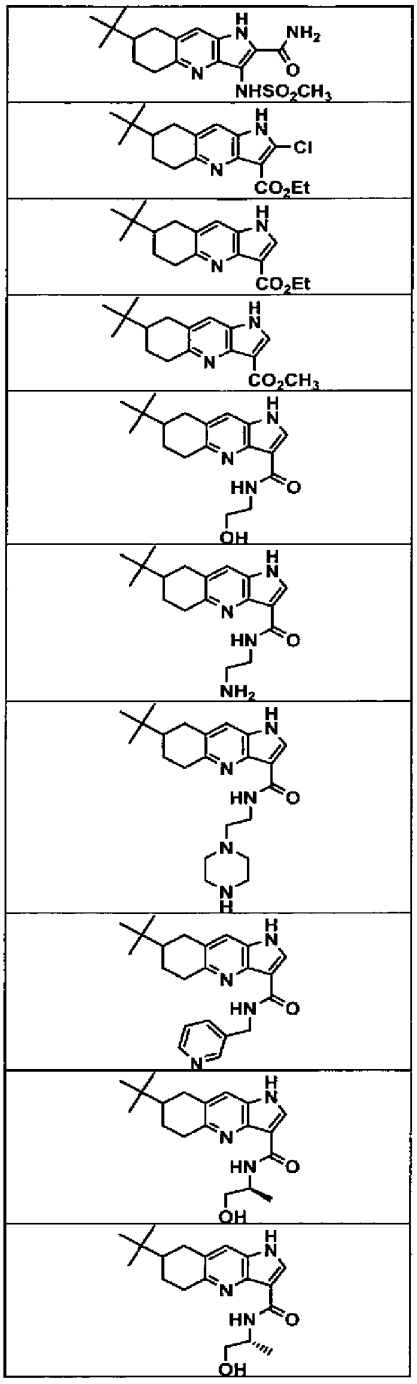
OnCusp
Ex. 1002

【表E－6】



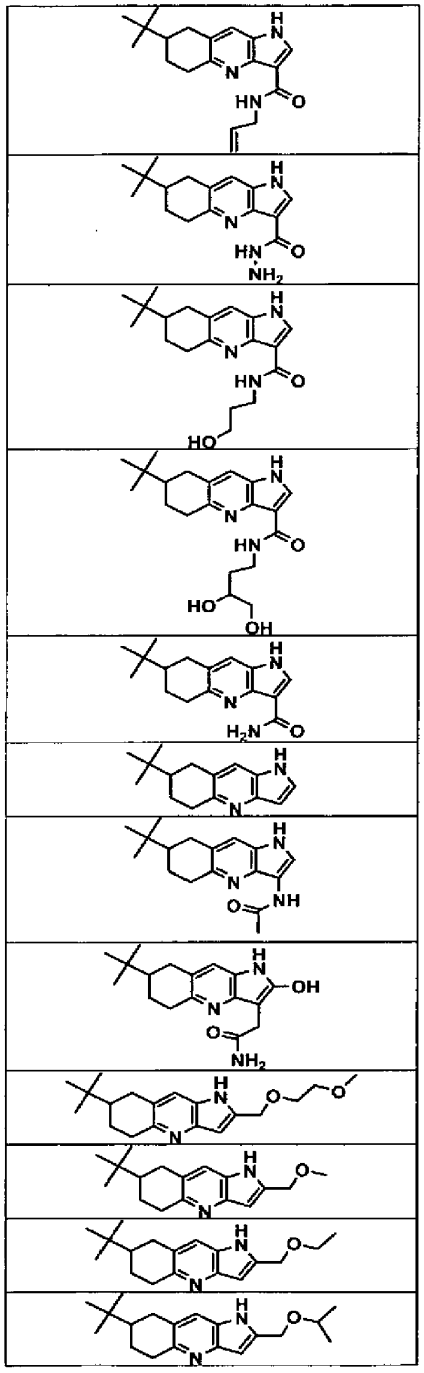
OnCusp
Ex. 1002

【表E－7】



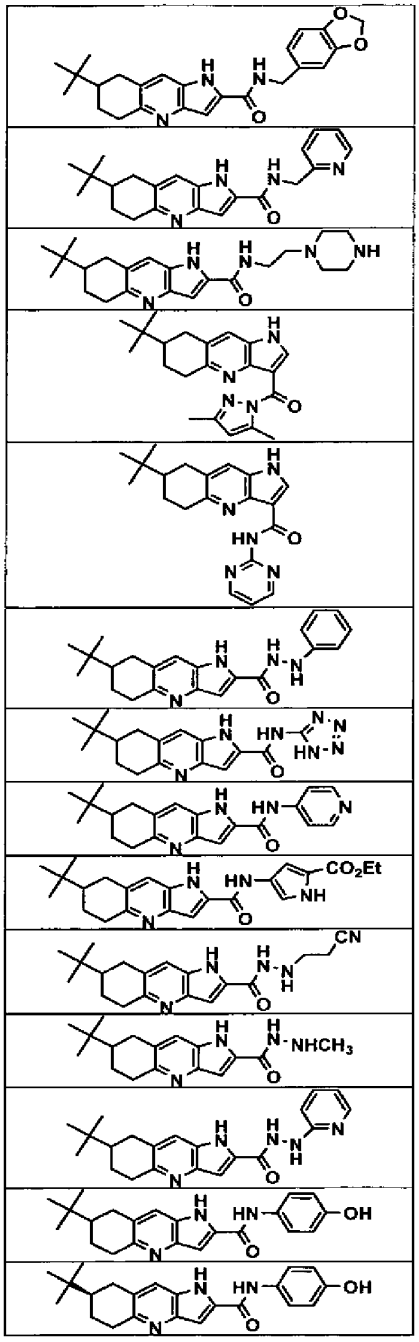
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－８】



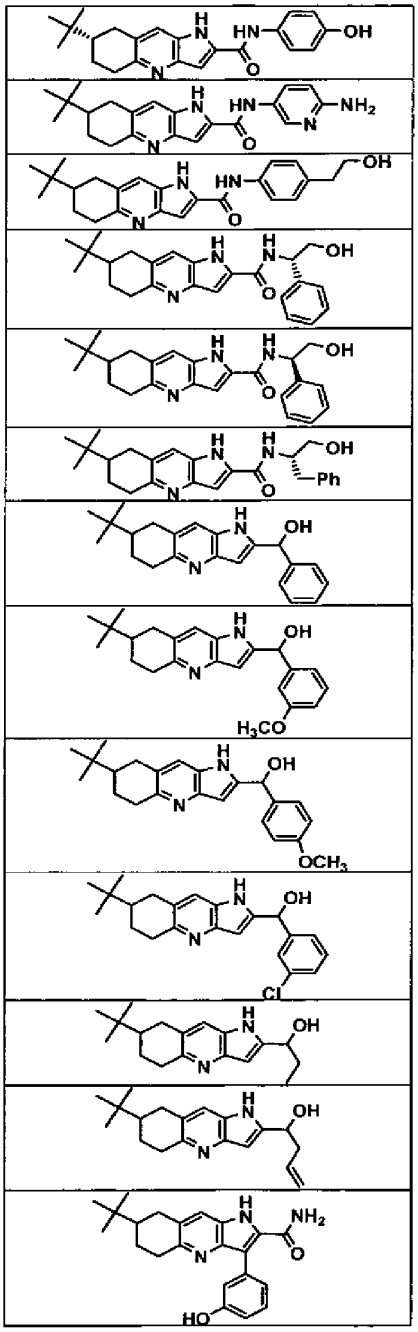
OnCusp
Ex. 1002

【表E－9】



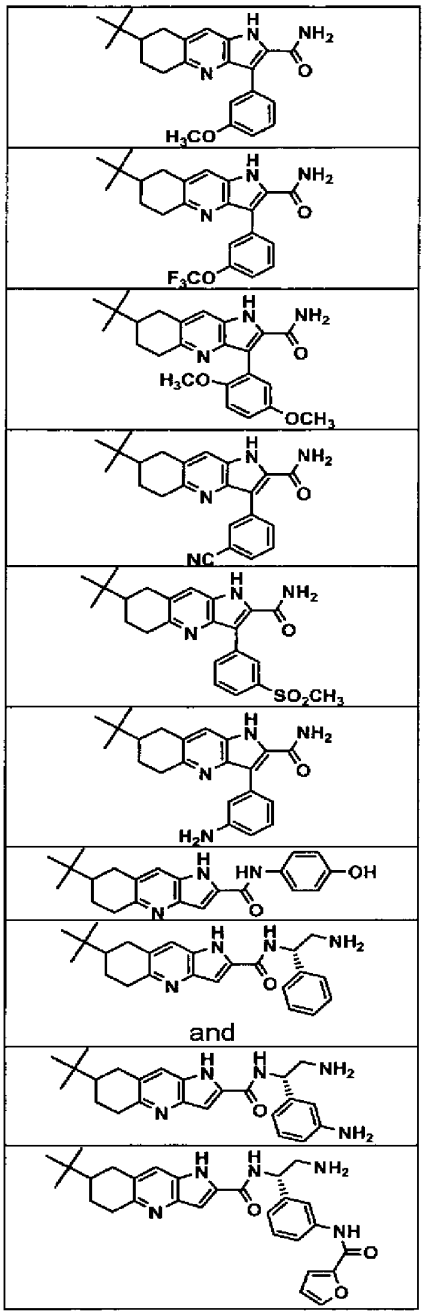
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－１０】



OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－１１】



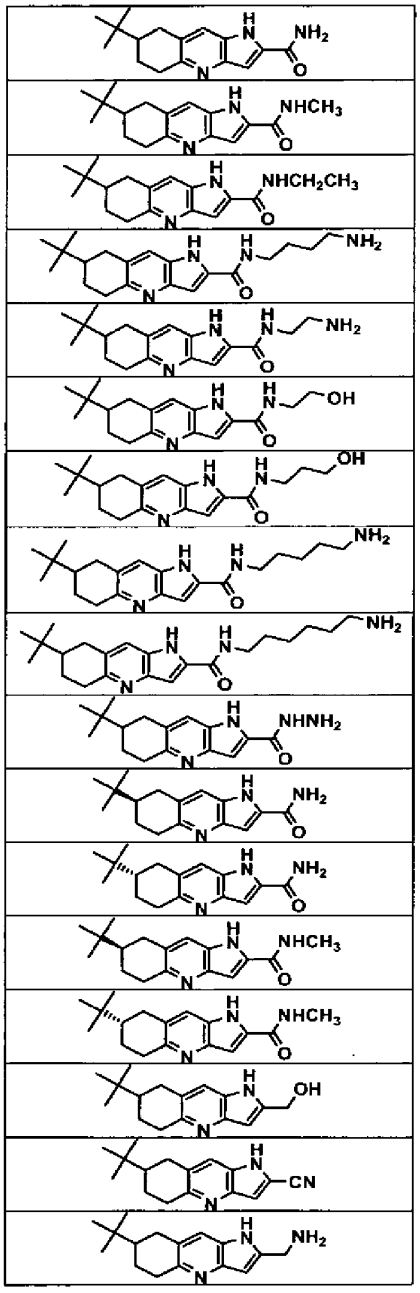
からなる群より選択される、請求項１、１６または１７に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

【請求項１９】

以下：

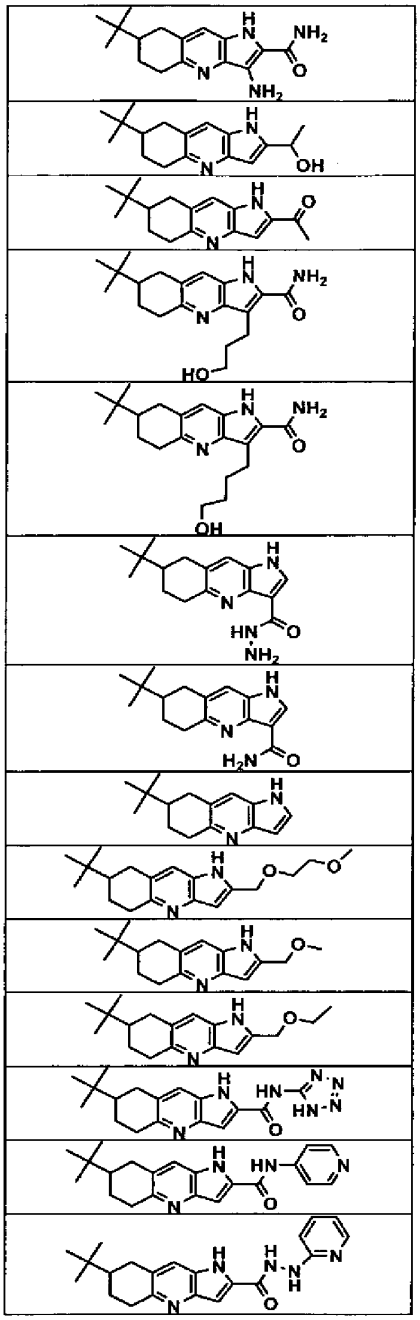
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｆ－１】

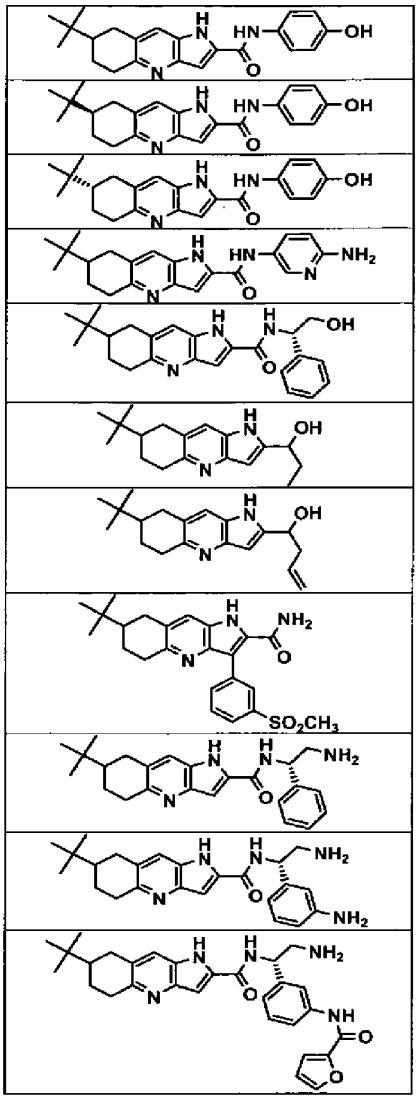


OnCusp
Ex. 1002

【表Ｆ－２】



【表Ｆ－３】



からなる群より選択される、請求項１８に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

【請求項２０】

請求項１、１６、１７もしくは１８に記載の化合物の単離型もしくは精製型、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

【請求項２１】

請求項１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物、またはその薬学的に許容される塩、もしくはエステルの治療上有効な量を、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む薬学的組成物。

【請求項２２】

抗癌剤、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有の多剤耐性のインヒビター、制吐剤、および免疫増強薬からなる群より選択される１つ以上の化合物をさらに含む、請求項２１に記載の薬学的組成物。

【請求項２３】

前記抗癌剤がエストロゲンレセプターモジュレーター、アンドロゲンレセプターモジュ

レーター、レチノイドレセプターモジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管形成インヒビター、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、ならびにアポトーシス誘発剤からなる群より選択される、請求項２２に記載の薬学的組成物。

【請求項２４】

細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、タキサン、トポイソメラーゼＩＩインヒビター、トポイソメラーゼＩインヒビター、チューブリン相互作用剤、ホルモン剤、チミジレートシンターゼインヒビター、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、シグナル伝達インヒビター、ＥＧＦＲキナーゼインヒビター、ＥＧＦＲに対する抗体、Ｃ－ａｂｌキナーゼインヒビター、オーロラキナーゼインヒビター、ホルモン療法併用、およびアロマターゼ併用からなる群より選択される１つ以上の抗癌剤をさらに含む、請求項２３に記載の薬学的組成物。

【請求項２５】

ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロクスウリジン、シタラビン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコビリン、オキサリプラチン、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、デオキシコフォルマイシン、マイトマイシン－Ｃ、Ｌ－アスパラギナーゼ、テニポシド１７α－エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミソール、ナベルベン、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、ドロキサフィン、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン、エルビタックスおよびそれらの混合物からなる群より選択される１つ以上の薬剤をさらに含む、請求項２４に記載の薬学的組成物。

【請求項２６】

ＫＳＰ活性を阻害する必要がある被験体においてＫＳＰ活性を阻害するための組成物であって、請求項１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステルの有効量を含む、組成物。

【請求項２７】

被験体において細胞増殖性疾患を処置するための組成物であって、請求項１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステルの有効量を含む、組成物。

【請求項２８】

前記細胞増殖性疾患が癌、過形成、心肥大、自己免疫疾患、真菌性障害、関節炎、移植片拒絶、炎症性腸疾患、免疫障害、炎症、医療処置後に誘発される細胞増殖である、請求項２７に記載の組成物。

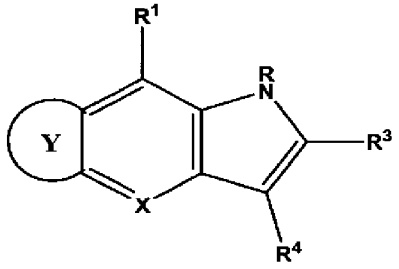
【請求項２９】

前記癌が脳腫瘍、尿生殖器路癌、心臓癌、胃腸癌、肝臓癌、骨癌、神経系の癌、および肺癌からなる群より選択される、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３０】

前記癌が肺腺癌、小細胞肺癌、膵臓癌、および乳癌から選択される、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３１】
前記組成物が放射線療法と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項２７に記載の組成物。
【請求項３２】
前記組成物が抗癌剤、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有の多剤耐性のインヒビター、制吐剤、および免疫増強薬からなる群より選択される少なくとも１つの化合物と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項２７に記載の組成物。
【請求項３３】
前記疾患が癌である、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３４】
前記組成物が放射線療法と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項３３に記載の組成物。
【請求項３５】
前記抗癌剤がエストロゲンレセプターモジュレーター、アンドロゲンレセプターモジュレーター、レチノイドレセプターモジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管形成インヒビター、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、ならびにアポトーシス誘発剤からなる群より選択される、請求項３２または３３に記載の組成物。
【請求項３６】
前記組成物が、細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、タキサン、トポイソメラーゼＩＩインヒビター、トポイソメラーゼＩインヒビター、チューブリン相互作用剤、ホルモン剤、チミジレートシンターゼインヒビター、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、シグナル伝達インヒビター、ＥＧＦＲキナーゼインヒビター、ＥＧＦＲに対する抗体、Ｃ－ａｂｌキナーゼインヒビター、ホルモン療法併用、およびアロマターゼ併用からなる群より選択される１つ以上の抗癌剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項３２または３３に記載の組成物。
【請求項３７】
前記組成物が、ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロクスウリジン、シタラビン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコビリン、オキサリプラチン、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、デオキシコフォルマイシン、マイトマイシン－Ｃ、Ｌ－アスパラギナーゼ、テニポシド１７α－エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミゾール、ナベルベン、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、ドロキサフィン、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン、エルビタックスおよびそれらの混合物からなる群より選択される１つ以上の薬剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項３２または３３に記載の組成物。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１２】
本発明は、例えば以下の項目を提供する。
（項目１）
構造式（Ｉ）：
【化１６７】



式(I)

によって表される化合物、あるいはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物またはエステルであって、
環Ｙは、式Ｉに示すように縮合された３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルであり、該３～７員のシクロアルキルまたはシクロアルケニルは、必要に応じて、１～２個のR^2部分で置換されており；
ＸはＮまたはＮ－酸化物であり；
ＲおよびＲ^{1}は各々独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}$－OR^8、－$C(O)R^5$、－$C(S)R^5$、－$C(O)OR^8$、－$C(S)OR^8$、－$OC(O)R^8$、－$OC(S)R^8$、－$C(O)NR^5R^6$、－$C(S)NR^5R^6$、－$C(O)NR^5OR^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)NR^8NR^5R^6$、－$C(S)NR^8NR^5R^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)SR^8$、－NR^5R^6、－$NR^5C(O)R^6$、－$NR^5C(S)R^6$、－$NR^5C(O)OR^8$、－$NR^5C(S)OR^8$、－$OC(O)NR^5R^6$、－$OC(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5R^6$、－$NR^5C(S)NR^5R^6$、－$NR^5C(O)NR^5OR^8$、－$NR^5C(S)NR^5OR^8$、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}SR^8$、SO_2R^8、－$S(O)_{1-2}NR^5R^6$、－$N(R^8)SO_2R^8$、－$S(O)_{1-2}NR^6OR^8$、－CN、－OCF_3、－SCF_3、－$C(=NR^8)NR^5$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、－$C(O)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}NR^5R^6$、－$C(S)NR^8(CH_2)_{1-10}OR^8$、ハロアルキルおよびアルキルシリルからなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアラルキルの各々が独立して１～５個のＲ^{10}部分によって必要に応じて置換されており；
各々のＲ^{2}は独立して、Ｈ、ハロ、アルキル、シクロアルキル、アルキルシリル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－（$CR^{11}R^{12}$）$_{0-6}$－OR^8、－$C(O)R^5$、－$C(S)R^5$、－$C(O)OR^8$、－$C(S)OR^8$、－$OC(O)R^8$、－$OC(S)R^8$、－$C(O)NR^5R^6$、－$C(S)NR^5R^6$、－$C(O)NR^5OR^8$、－$C(S)NR^5OR^8$、－$C(O)NR$

^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＳＲ^{8}、－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{8}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）ＯＲ^{8}、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＯＣ（Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－（ＣＲ^{11}Ｒ^{12}）$_{0-6}$ＳＲ^{8}、ＳＯ$_{2}$Ｒ^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｎ（Ｒ^{8}）ＳＯ$_{2}$Ｒ^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮＲ^{6}ＯＲ^{8}、－ＣＮ、－ＯＣＦ$_{3}$、－ＳＣＦ$_{3}$、－Ｃ（＝ＮＲ^{8}）ＮＲ^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、および－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-10}$ＯＲ^{8}からなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は１～５個のＲ^{10}部分によって必要に応じて置換されているか；

あるいは同じ炭素原子上の２つのＲ^{2}はそれらが結合する炭素原子と必要に応じて一緒になって、Ｃ＝Ｏ、Ｃ＝Ｓまたはエチレンジオキシ基を形成し；

Ｒ^{3}およびＲ^{4}は各々独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{5}、－Ｃ（Ｓ）Ｒ^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＯＲ^{8}、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ^{8}、－ＯＣ（Ｓ）Ｒ^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＳＲ^{8}、－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{8}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）ＯＲ^{8}、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＯＣ（Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{5}ＯＲ^{8}、－（ＣＲ^{11}Ｒ^{12}）$_{0-6}$ＳＲ^{8}、ＳＯ$_{2}$Ｒ^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｎ（Ｒ^{8}）ＳＯ$_{2}$Ｒ^{8}、－Ｓ（Ｏ）$_{1-2}$ＮＲ^{6}ＯＲ^{8}、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＲ^{8}）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（＝ＮＯＲ^{8}）ＮＲ^{5}、－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（Ｒ^{8}）－Ｃ（＝Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{8}）－（ＣＮ^{40}Ｒ^{41}）$_{1-5}$－Ｃ（＝ＮＲ^{8}）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{8}）（ＣＲ^{40}Ｒ^{41}）$_{1-5}$－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{8}）（ＣＲ^{40}Ｒ^{41}）$_{1-5}$－Ｃ（Ｏ）－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{8}）（ＣＲ^{40}Ｒ^{41}）$_{1-5}$－ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-5}$ＮＲ^{5}Ｒ^{6}および－Ｃ（Ｓ）ＮＲ^{8}（ＣＨ$_{2}$）$_{1-5}$ＯＲ^{8}からなる群より選択され、該アルキル、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は独立して１～５個のＲ^{10}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{5}およびＲ^{6}は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{8}、および－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{8}からなる群より選択され、ただし、Ｒ^{5}およびＲ^{6}は同時に－ＯＲ^{8}ではなく；該アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されているか；またはＲ^{5}およびＲ^{6}は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；

各々のＲ^{8}は独立して、Ｈ、アルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、およびヘテロアラルキルからなる群より選択され、Ｈを除くＲ^{8}の各メンバーは１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{9}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、ヘテロアリール、－ＮＯ$_{2}$、－ＯＲ^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）－ＯＲ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{11}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＣＦ$_{3}$、－ＯＣＦ

$_3$、－CF_2CF_3、－C(=NOH)R^{11}、－N(R^{11})C(=O)R^{12}、－C(=NR^{11})N$R^{11}R^{12}$、および－NR^{11}C(=O)OR^{12}からなる群より選択され、該アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、1～4個のR^{42}部分で置換されてもよく；ここで該シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリールの各々は、該シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に2つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、5員または6員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成するか；または2つのR^9部分は、同じ炭素原子に結合するとき、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になってC=OまたはC=S基を形成し；

各々のR^{10}は独立して、H、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、アルコキシ、OH、CN、ハロ、－($CR^{11}R^{12}$)$_{0-4}$$NR^5R^6$、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－O－アルキル－O－アルキル、－C(O)NR^5R^6、－C(O)OR^8、－OC(O)R^5、－OC(O)NR^5R^6、－NR^5C(O)R^6、－NR^5C(O)OR^6、－NR^5C(O)NR^5R^6、－SR^8、－S(O)R^8、および－S(O)$_2$$R^8$からなる群より選択され、該アルキル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々は必要に応じて、1～4個のR^{13}部分で独立して置換され；

各々のR^{11}は独立して、Hまたはアルキルであり；

各々のR^{12}は独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールであり、またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、N、OまたはSから選択される0～2個のさらなるヘテロ原子を有する3～6員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－CN、－OH、－NH_2、－N(H)アルキル、－N(アルキル)$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF_3、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される1～3個の部分で必要に応じて置換されており；

各々のR^{13}は独立して、H、ハロ、アルキル、アルキルシリル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；

各々のR^{42}は独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO_2、－OR^{11}、－(C_1－C_6アルキル)－OR^{11}、－CN、－N$R^{11}R^{12}$、－C(O)R^{11}、－C(O)OR^{11}、－C(O)N$R^{11}R^{12}$、－CF_3、－OCF_3、－N(R^{11})C(O)R^{12}、および－NR^{11}C(O)OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は1～4個のR^{43}部分で必要に応じて置換され；かつ

各々のR^{43}は独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；

ただし、RおよびR^{3}はそれらがそれぞれ結合されることが示される環の窒素および炭素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはヘテロシクレニルの環を形成し、該環は必要に応じて、オキソ、チオキソ、－OR^{12}、－N$R^{11}R^{12}$、－C(=O)R^{12}、－C(=O)OR^{12}、－C(=O)N$R^{11}R^{12}$、および－NR^{11}C(=O)R^{12}からなる群より独立して選択される1～3個の部分で置換されている、化合物。

（項目2）

環Yが3員～7員のシクロアルキルであり、1～2個のR^2部分で必要に応じて置換さ

れている、項目１に記載の化合物。
（項目３）
環Ｙが６員のシクロアルキルであり、１～２個のＲ^{2}部分で必要に応じて置換されている、項目１または２に記載の化合物。
（項目４）
環Ｙが１つのＲ^{2}部分で置換されている、項目１、２または３に記載の化合物。
（項目５）
Ｒ^{2}がアルキルである、項目１～４のいずれか１項に記載の化合物。
（項目６）
Ｒ^{2}がｔ－ブチルである、項目５に記載の化合物。
（項目７）
Ｒが、Ｈおよび－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{5}からなる群より選択される、項目１に記載の化合物。
（項目８）
Ｒ^{5}がアルキルである、項目７に記載の化合物。
（項目９）
Ｒ^{1}がＨである、項目１に記載の化合物。
（項目１０）
ＲがＨである、項目９に記載の化合物。
（項目１１）
項目１に記載の化合物であって、Ｒ^{3}およびＲ^{4}が各々独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{5}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{8}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（Ｏ）Ｒ^{6}、－Ｎ（Ｒ^{8}）ＳＯ$_{2}$Ｒ^{8}、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯＲ^{8}）Ｒ^{5}、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（Ｒ^{8}）－Ｃ（＝Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々が独立して、１～５個のＲ^{10}部分で必要に応じて置換されており；
Ｒ^{5}およびＲ^{6}の各々が独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されるか；またはＲ^{5}およびＲ^{6}が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されており；
各々のＲ^{8}が独立して、１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；
各々のＲ^{9}が独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＯＲ^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}、および－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{11}からなる群より選択され；該アルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のＲ^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上の２つのラジカルを含み、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のＲ^{10}は独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{8}、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{5}、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{6}、－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}、および－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$Ｒ^{8}からなる群より選択され、該ヘテロシクリル、アリールおよびヘテ

ロアリール部分の各々が必要に応じて、１～４個のＲ^{13}部分で独立して置換され；
各々のＲ^{11}が独立して、Ｈまたはアルキルであり；かつ
各々のＲ^{12}が独立して、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはＲ^{11}およびＲ^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、Ｎ、Ｏもしくは Ｓから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該Ｒ^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－ＮＨ$_2$、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、ＣＦ$_3$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；
各々のＲ^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；
各々のＲ^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＮＯ$_2$、－ＯＲ^{11}、－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル）－ＯＲ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＣＦ$_3$、－ＯＣＦ$_3$、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}、および－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、１～４個のＲ^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ
各々のＲ^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。
（項目１２）
項目１１に記載の化合物であって、Ｒ^{3}が、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^5、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^8、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5}Ｒ^6、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^6、－ＣＮ、－Ｃ（＝ＮＯＲ^8）Ｒ^5、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ（Ｒ^8）－Ｃ（＝Ｓ）ＮＲ^{5}Ｒ^{6}からなる群より選択され、該アルキル、およびアルケニルの各々が独立して、１～５個のＲ^{10}部分で必要に応じて置換されており；
各々のＲ^{5}およびＲ^{6}が独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されるか；またはＲ^{5}およびＲ^{6}が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が１～４個のＲ^{9}部分で必要に応じて置換されており；
各々のＲ^{8}が独立して、１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；
各々のＲ^{9}が独立して、アルキル、アリール、ヘテロアリール、－ＯＲ^{11}、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、および－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{11}からなる群より選択され、該アルキル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、１～４個のＲ^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のＲ^{10}は独立して、アルコキシ、ＯＨ、ハロアルコキシ、ヘテロシクリル、アリール、－ＮＲ^{5}Ｒ^6、－ＣＮ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^5、および－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキルからなる群より選択され、該ヘテロシクリル、およびアリールの各々が必要に応じて独立して、１～４個のＲ^{13}部分で置換されており；

各々のR^{11}が独立して、Hまたはアルキルであり；かつ
各々のR^{12}が独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、N、Oもしくは Sから選択される0～2個のさらなるヘテロ原子を有する3～6員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－CN、－OH、－NH$_2$、－N(H)アルキル、－N(アルキル)$_2$、ハロ、ハロアルキル、CF$_3$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される1～3個の部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択され；
各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO$_2$、－OR^{11}、－(C$_1$－C$_6$アルキル)－OR^{11}、－CN、－NR^{11}R^{12}、－C(=O)R^{11}、－C(=O)OR^{11}、－C(=O)NR^{11}R^{12}、－CF$_3$、－OCF$_3$、－NR^{11}C(=O)R^{12}、および－NR^{11}C(=O)OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、1～4個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。
（項目13）
項目12に記載の化合物であって、R^{3}がH、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、H$_2$NNH－C(=O)－、アルキル－NH－NH－(C=O)－、ヘテロアリール－NH－NH－C(=O)－、アリール－アルキル－、アルコキシ、NH$_2$－アルキル－、NC－アルキル－、アリール－C(=O)－O－アルキル－、アルキル－O－C(=O)－、H$_2$N－C(=O)－、アリール－NH－NH－C(=O)－、アリール－NH－C(=O)－、ヘテロアリール－NH－C(=O)－、アルキル－C(=O)－、アルキル－NH－C(=O)－、アリール－アルキル－NH－C(=O)－、HO－アルキル－アリール－NH－C(=O)－、ヘテロアリール－アルキル－NH－C(=O)－、ヘテロシクリル－アルキル－NH－C(=O)－、H$_2$N－アルキル－NH－C(=O)－、HO－アルキル－NH－C(=O)－、アルキル－O－アルキル－、NC－アルキル－NH－NH－C(=O)－、アルキル－O－アルキル－O－アルキル－、H$_2$N－C(=S)－NH－N=CH－、アルキル－C(=NOH)－、およびヘテロシクリル－C(=O)－からなる群より選択され；該アルキル、アルケニル、ならびにアリール－アルキル－、およびアリール－アルキル－NH－C(=O)－の「アルキル」部分の各々が、ヒドロキシおよびNH$_2$からなる群より選択される1～2個の部分で必要に応じて置換されており；該アリール－アルキル－、アリール－NH－C(=O)－、およびアリール－アルキル－NH－C(=O)－の各々の「アリール」部分が、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、NH$_2$、およびヘテロアリール－C(=O)－NH－からなる群より選択される1～2個の部分で必要に応じて置換されており；任意の該R^{3}基の「アリール」部分が、2つの隣接する基を含むとき、このような部分が、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、5～6員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成している、化合物。
（項目14）
項目11に記載の化合物であって、R^{4}が、H、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、アリール、－C(=O)R^5、－C(=O)OR^8、－C(=O)NR^{5}R^6、－C(=O)NR^{8}NR^{5}R^6、－NR^{5}R^6、－NR^{5}C(=O)R^6、－NR^{8}SO$_2$R^{8}からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリルおよびアリールの各々が独立して、1～5個のR^{10}部分で必要

に応じて置換されており；
各々のR^{5}およびR^{6}が独立して、H、アルキル、アルケニル、およびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、およびヘテロアリールの各々が、1～4個のR^{9}部分で必要に応じて置換されているか；またはR^{5}およびR^{6}が、同じ窒素原子と結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し、その各々が1～4個のR^{9}部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^{8}が独立して、1～4個のR^{9}部分によって必要に応じて置換されている、アルキルであり；
各々のR^{9}が独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－OC(=O)R^{11}、－CN、－NR^{11}R^{12}、－NR^{11}C(=O)OR^{12}、－C(=O)NR^{11}R^{12}、－NR^{11}C(=O)R^{12}、および－C(=O)OR^{11}からなる群より選択され；該アルキル、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が独立して、1～4個のR^{42}部分で必要に応じて置換されており；ここで該ヘテロシクリルおよびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に2つのラジカルを含むとき、このようなラジカルが必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、5員または6員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；
各々のR^{10}が独立して、H、アルキル、アルコキシ、OH、CN、－O－アルキル－O－アルキル、－NR^{5}R^{6}、ハロアルコキシ、－C(=O)NR^{5}R^{6}、－NR^{5}C(=O)R^{6}、－NR^{5}C(=O)OR^{6}および－S(=O)$_{2}$R^{8}からなる群より選択され；
各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－NO$_{2}$、－OR^{11}、－(C$_{1}$－C$_{6}$アルキル)－OR^{11}、－CN、－NR^{11}R^{12}、－C(=O)R^{11}、－C(=O)OR^{11}、－C(=O)NR^{11}R^{12}、－CF$_{3}$、－OCF$_{3}$、－NR^{11}C(=O)R^{12}、および－NR^{11}C(=O)OR^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は、1～4個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^{11}が独立して、Hまたはアルキルであり；かつ
各々のR^{12}が独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}が、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、N、Oもしくは Sから選択される0～2個のさらなるヘテロ原子を有する3～6員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－CN、－OH、－NH$_{2}$、－N(H)アルキル、－N(アルキル)$_{2}$、ハロ、ハロアルキル、CF$_{3}$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される1～3個の部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。
（項目15）
項目14に記載の化合物であって、R^{4}が、H、ハロ、ニトロ、H$_{2}$N－、アルキル、HO－アルキル－、(HO)$_{2}$アルキル－、アルキル－C(=O)－アルキル－C(=O)－NH－、アルケニル－C(=O)－アルキル－C(=O)－NH－、H$_{2}$N－C(=O)－アルキル－からなる群より選択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－C(=O)－NH－、NC－アルキル－、H$_{2}$N－アルキル－、アルキル－O－C(=O)－NH－、HO－C(=O)－NH－、アルキル－C(=O)－O－アルキル－C(=O)－NH－、アルキル－O－C(=O)－アルケニル－、ヘテロアリール－C(=O

)－ＮＨ－、ヘテロシクリル、ＨＯ－アルキニル－、アルキル－Ｏ－アルキル－ＮＨ－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－、アルキル－Ｓ(＝Ｏ)$_2$ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ(＝Ｏ)－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、(ＨＯ)$_2$アルキル－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、Ｈ$_2$Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、アルケニル－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、Ｈ$_2$Ｎ－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、Ｈ$_2$Ｎ－Ｃ(＝Ｏ)－、アルキル－Ｃ(＝Ｏ)－ＮＨ－、ヘテロアリール－Ｃ(＝Ｏ)－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ(＝Ｏ)－、およびアリールで置換されており、これが必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、Ｈ$_2$Ｎ－およびアルキル－Ｓ(＝Ｏ)－からなる群より選択される１～２個の部分で置換されている、化合物。

（項目１６）

項目１に記載の化合物であって、ここで：

ＸがＮであり；

環Ｙがアルキルで置換されている６員のシクロアルキルであり、

Ｒが、Ｈおよび－Ｃ(Ｏ)Ｒ^{5}からなる群より選択され；

Ｒ^{1}がＨであり；

Ｒ^{3}が、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルコキシ、－Ｃ(Ｏ)Ｒ^5、－Ｃ(Ｏ)ＯＲ^8、－Ｃ(Ｏ)ＮＲ^{5}Ｒ^6、－Ｃ(Ｏ)ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^6、－ＣＮ、－Ｃ(＝ＮＯＲ^8)Ｒ^5、および－Ｃ＝Ｎ－Ｎ(Ｒ^8)－Ｃ(＝Ｓ)ＮＲ^{5}Ｒ^{6}からなる群より選択され、該アルキル、およびアルケニルの各々は独立して１～５個のＲ^{10}部分によって必要に応じて置換されており；かつ

Ｒ^{4}は、Ｈ、ハロ、ニトロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、アリール、－Ｃ(＝Ｏ)Ｒ^5、－Ｃ(＝Ｏ)ＯＲ^8、－Ｃ(＝Ｏ)ＮＲ^{5}Ｒ^6、－Ｃ(＝Ｏ)ＮＲ^{8}ＮＲ^{5}Ｒ^6、－ＮＲ^{5}Ｒ^6、－ＮＲ^{5}Ｃ(＝Ｏ)Ｒ^6、－ＮＲ^{8}ＳＯ$_2$Ｒ^{8}からなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、およびアリールの各々は、独立して１～５個のＲ^{10}部分で必要に応じて置換され；

各々のＲ^{5}およびＲ^{6}は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アリール、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールからなる群より選択され、該アルキル、アルケニル、アリール、およびヘテロアリールの各々が１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されているか；またはＲ^{5}およびＲ^{6}は、同じ窒素原子に結合するとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；その各々が１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されており；

各々のＲ^{8}は独立して、１～４個のＲ^{9}部分によって必要に応じて置換されているアルキルであり；

各々のＲ^{9}は独立して、アルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＯＲ^{11}、－ＯＣ(＝Ｏ)Ｒ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｎ(Ｒ^{11})Ｃ(＝Ｏ)ＯＲ^{12}、－Ｃ(＝Ｏ)ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｎ(Ｒ^{11})Ｃ(＝Ｏ)Ｒ^{12}、および－Ｃ(Ｏ)ＯＲ^{11}からなる群より選択され、該アルキル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が独立して、必要に応じて１～４個のＲ^{42}部分で置換されており；ここで該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールの各々が、該ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール内のいずれかの隣接する炭素原子上に２つのラジカルを含むとき、このようなラジカルは必要に応じ、かつ独立して各々の出現において、それらが結合される炭素原子と一緒になって、５員または６員のシクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、またはヘテロアリールを形成し；

各々のＲ^{10}が独立して、Ｈ、アルキル、アルコキシ、ＯＨ、ＣＮ、ハロ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル、－ＮＲ^{5}Ｒ^6、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、－Ｃ(＝Ｏ)ＮＲ^{5}Ｒ^6、－Ｃ(＝Ｏ)ＯＲ^8、－ＯＣ(＝Ｏ)Ｒ^5、－ＯＣ(＝Ｏ)ＮＲ^{5}Ｒ^6、－ＮＲ^{5}Ｃ(＝Ｏ)Ｒ^6、－ＮＲ^{5}Ｃ(＝Ｏ)ＯＲ^6、－ＮＲ^{5}Ｃ(＝Ｏ)ＮＲ^{5}Ｒ^6、および－Ｓ(Ｏ)$_2$Ｒ^{8}からなる群より選択され、該ヘテロシクリル、アリールおよびヘテロ

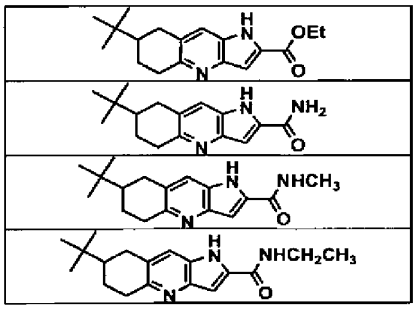
アリール部分の各々は必要に応じて、１～４個のR^{13}部分で独立して置換されており；
各々のR^{11}が独立して、Hまたはアルキルであり；かつ
各々のR^{12}が独立して、H、アルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニル、もしくはヘテロアリールであるか；またはR^{11}およびR^{12}は、同じ窒素原子に結合されるとき、それらが結合される窒素原子と必要に応じて一緒になって、N、Oもしくは Sから選択される０～２個のさらなるヘテロ原子を有する３～６員の複素環を形成し；該R^{12}のアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロシクレニルおよびヘテロアリールの各々は独立して、－ＣＮ、－ＯＨ、－ＮＨ$_2$、－Ｎ（Ｈ）アルキル、－Ｎ（アルキル）$_2$、ハロ、ハロアルキル、ＣＦ$_3$、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリール、アリールオキシおよびヘテロアリールからなる群より選択される１～３個の部分で必要に応じて置換されており；
各々のR^{13}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシからなる群より選択され；
各々のR^{42}が独立して、ハロ、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＮＯ$_2$、－ＯＲ^{11}、－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル）－ＯＲ^{11}、－ＣＮ、－ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{11}、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{11}Ｒ^{12}、－ＣＦ$_3$、－ＯＣＦ$_3$、－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{12}、および－ＮＲ^{11}Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{12}からなる群より選択され、該アリール、ヘテロシクリル、およびヘテロアリールの各々は１～４個のR^{43}部分で必要に応じて置換されており；かつ
各々のR^{43}が独立して、ハロ、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、シアノおよびヒドロキシルからなる群より選択される、化合物。
（項目１７）
項目１６に記載の化合物であって、式中：
ＸがＮであり；
環Ｙがアルキルで置換されている６員のシクロアルキルであり、
Ｒが、Ｈおよびアルキル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；
R^{1}がＨであり；
R^{3}が、Ｈ、アルキル、アルケニル、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、Ｈ$_2$ＮＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－ＮＨ－（Ｃ＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－、アルコキシ、ＮＨ$_2$－アルキル－、ＮＣ－アルキル－、アリール－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、Ｈ$_2$Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、Ｈ$_2$Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－、ＮＣ－アルキル－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル－、Ｈ$_2$Ｎ－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－Ｎ＝ＣＨ－、アルキル－Ｃ（＝ＮＯＨ）－、およびヘテロシクリル－Ｃ（＝Ｏ）－からなる群より選択され；該アルキル、アルケニル、ならびにアリール－アルキル－、アリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の「アルキル」部分の各々が、ヒドロキシおよびＮＨ$_2$からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；該アリール－アルキル－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－の各々の「アリール」部分が、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシル、ＮＨ$_2$、アリール－（＝Ｏ）－ＮＨ－およびヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－からなる群より選択される１～２個の部分で必要に応じて置換され；任意の該R^{3}基の「アリール」部分が２つの隣接する部分を含むとき、このような部分は、それらが結合される炭素原子と必要に応じて一緒になって、５～６員のヘテロシクリルまたはヘテロアリールを形成し；かつ
R^{4}が、Ｈ、ハロ、ニトロ、Ｈ$_2$Ｎ－、アルキル、ＨＯ－アルキル－、（ＨＯ）$_2$アル

キル－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルケニル－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、$Ｈ_2$Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－アルキル－からなる群より選択され、その「アルキル」は必要に応じて、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＮＣ－アルキル－、$Ｈ_2$Ｎ－アルキル－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ＨＯ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－アルケニル－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロシクリル、ＨＯ－アルキニル－、アルキル－Ｏ－アルキル－ＮＨ－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＨ－、アルキル－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、ＨＯ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、（ＨＯ）$_2$アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、$Ｈ_2$Ｎ－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロシクリル－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－アルキル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルケニル－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、$Ｈ_2$Ｎ－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、$Ｈ_2$Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルキル－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、ヘテロアリール－Ｃ（＝Ｏ）－、アリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、ヘテロアリール－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、およびアリールで置換されており、これは必要に応じてヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルコキシ、シアノ、$Ｈ_2$Ｎ－、アルキル－Ｓ、アルキル－Ｓ（＝Ｏ）－およびアルキル－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－からなる群より選択される１～２個の部分で置換されている、化合物。

（項目１８）

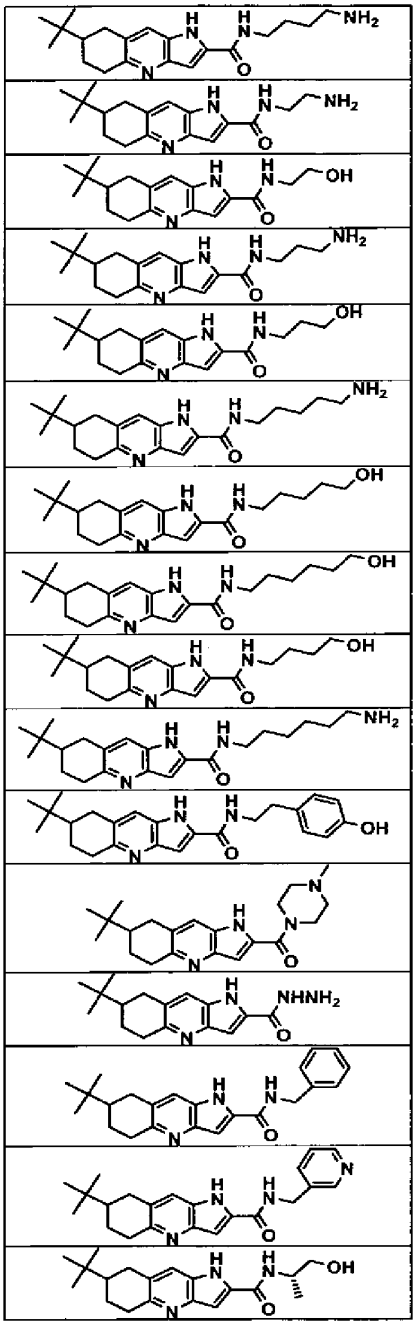
以下：

【表Ｅ－１】



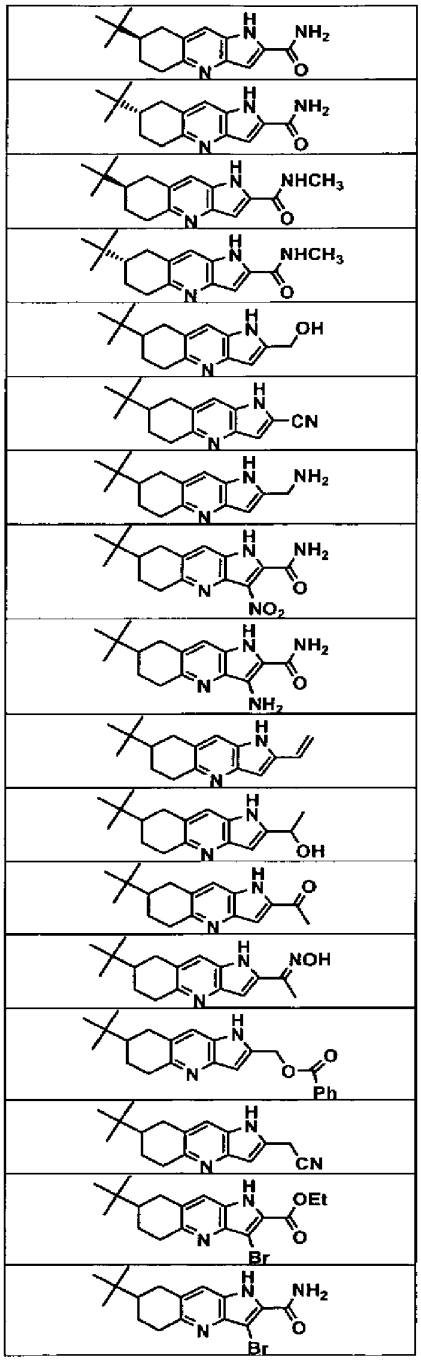
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－２】



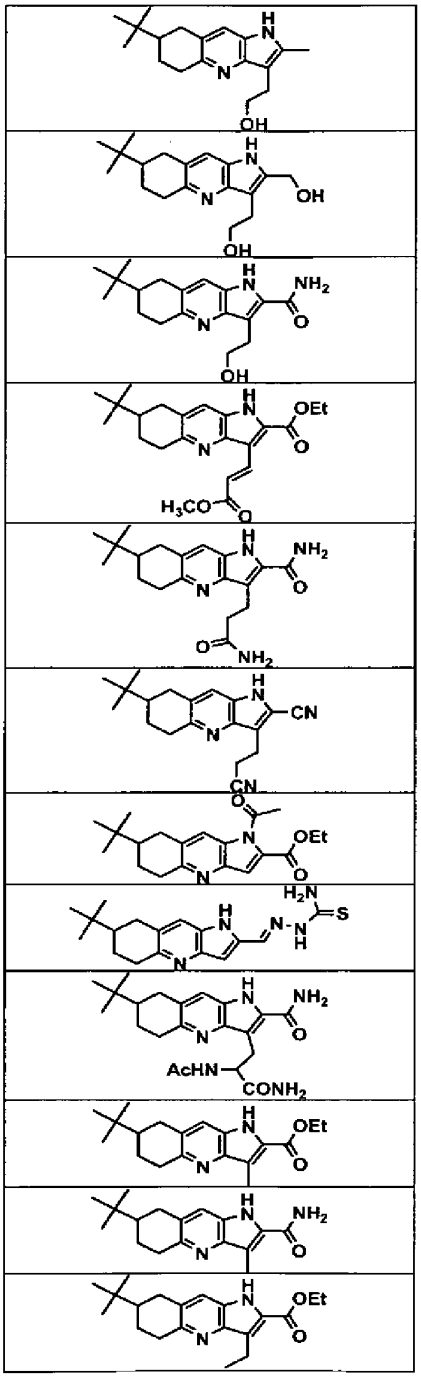
OnCusp
Ex. 1002

【表E－3】

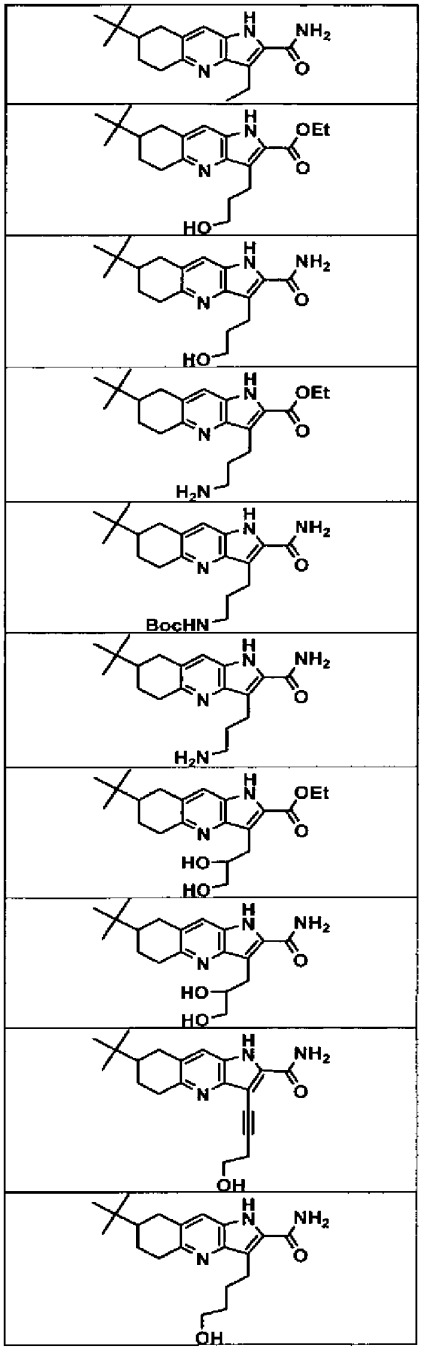


OnCusp
Ex. 1002

【表E－4】

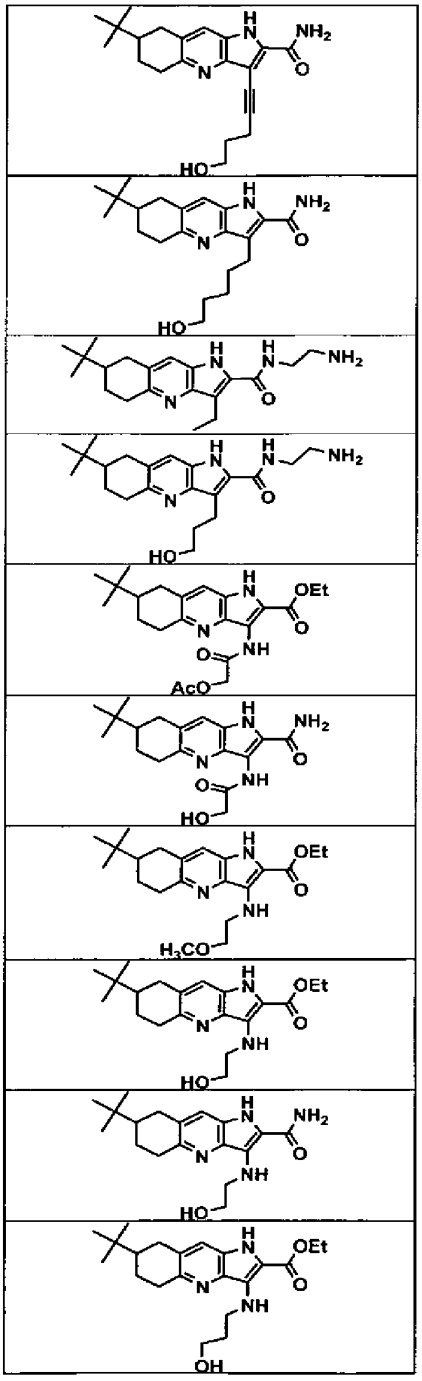


【表Ｅ－５】


NH2
OEt
HO
NH2
HO
OEt
H2N
NH2
BocHN
NH2
H2N
OEt
HO
HO
NH2
HO
HO
NH2
OH
NH2
OH

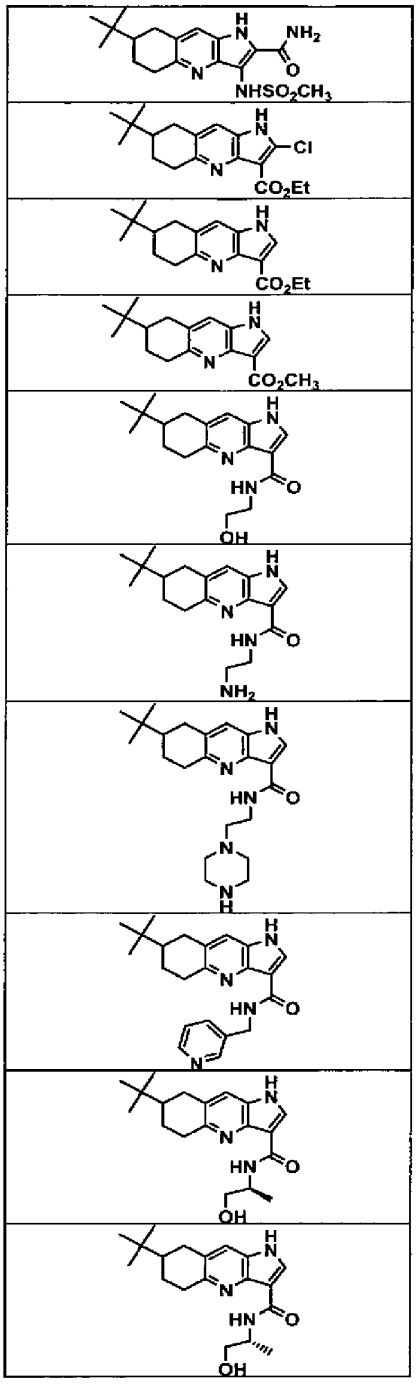
OnCusp
Ex. 1002

【表E－6】



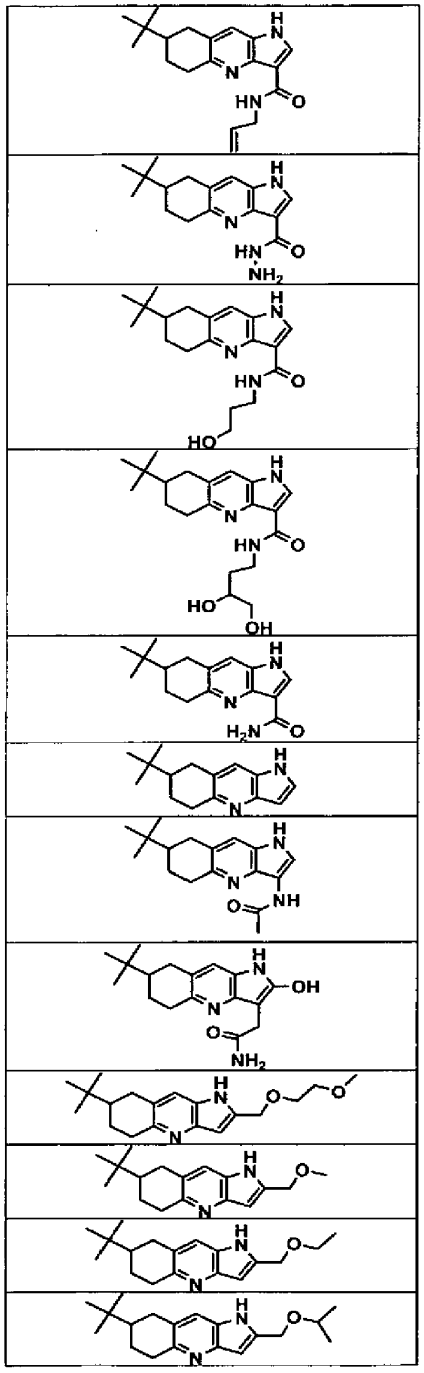
OnCusp
Ex. 1002

【表E－7】



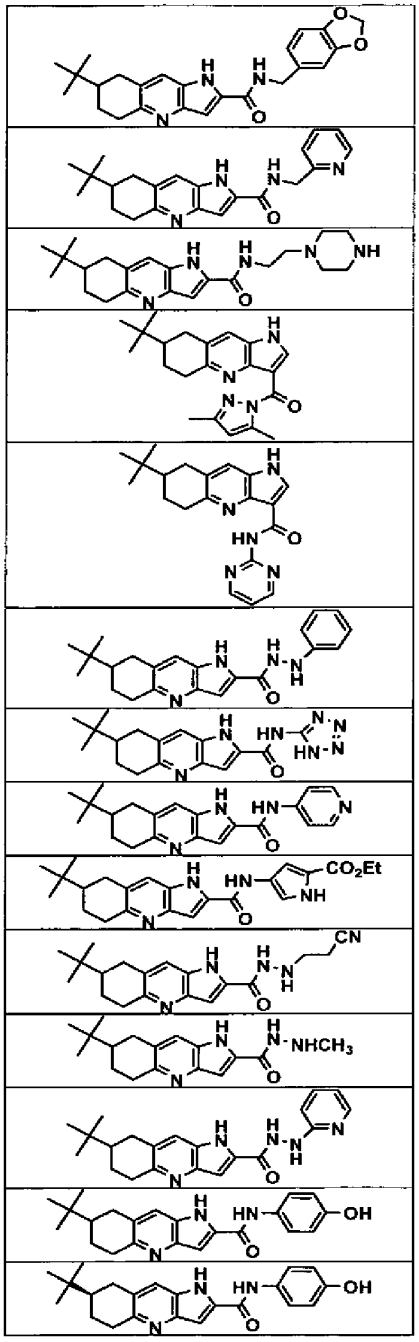
OnCusp
Ex. 1002

【表E－8】



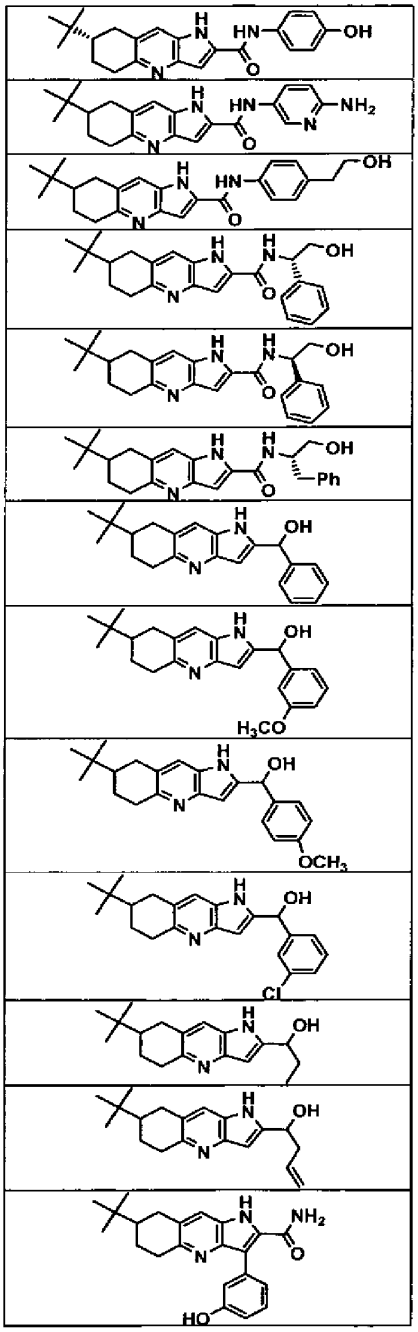
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－９】



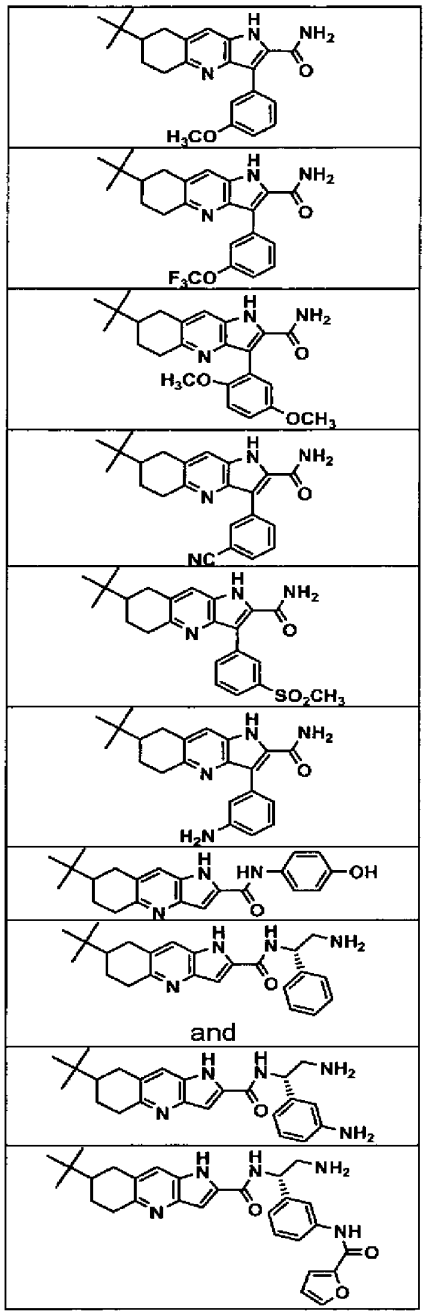
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－１０】



OnCusp
Ex. 1002

【表Ｅ－１１】



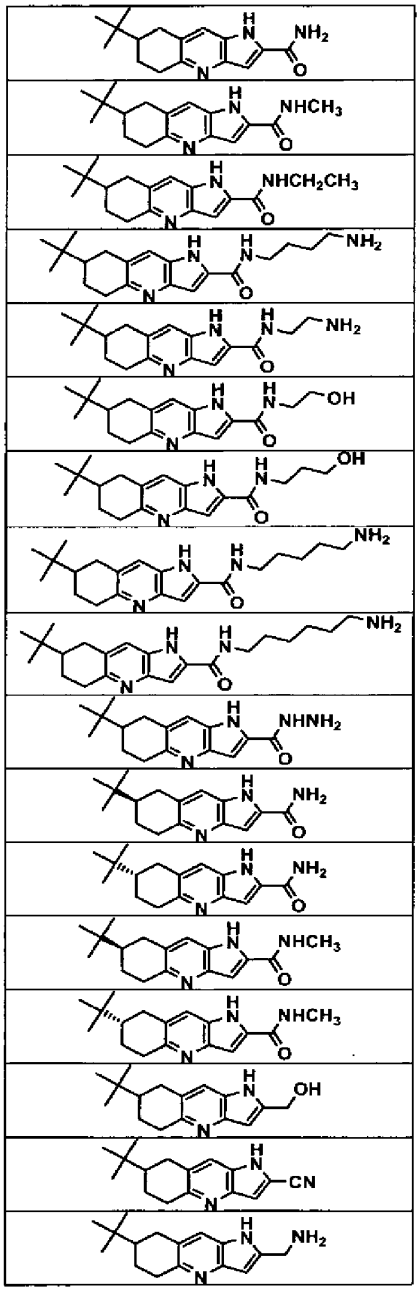
からなる群より選択される、項目１、１６または１７に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

（項目１９）

以下：

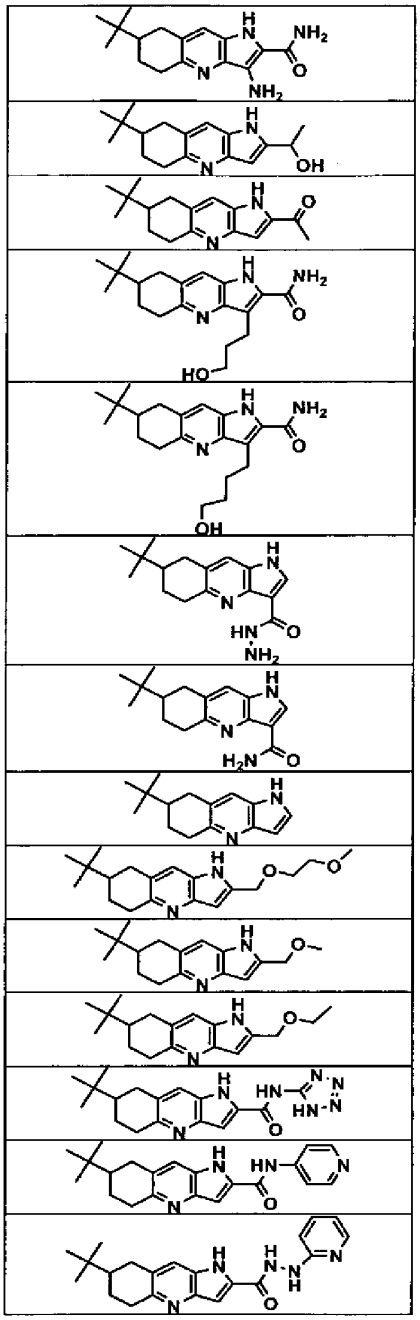
OnCusp
Ex. 1002

【表Ｆ－１】

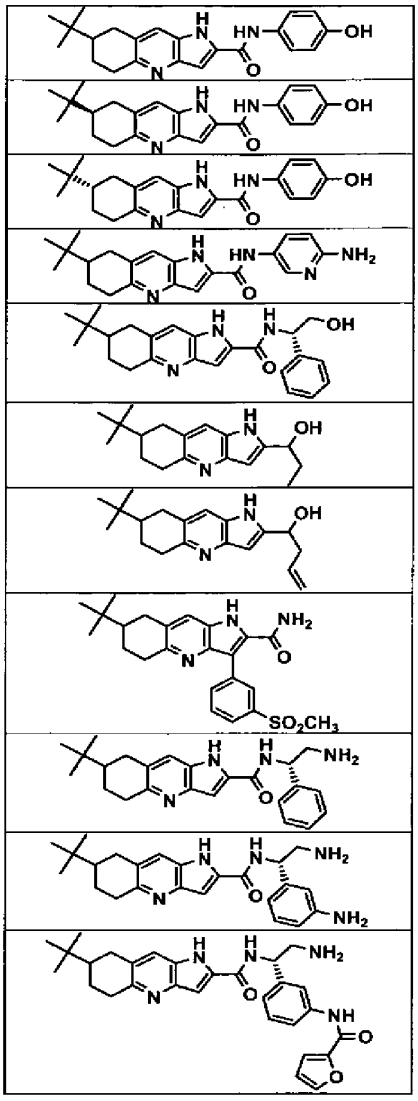


OnCusp
Ex. 1002

【表Ｆ－２】



【表Ｆ－３】



からなる群より選択される、項目１８に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

（項目２０）

項目１、１６、１７もしくは１８に記載の化合物の単離型もしくは精製型、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステル。

（項目２１）

項目１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物、またはその薬学的に許容される塩、もしくはエステルの治療上有効な量を、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む薬学的組成物。

（項目２２）

抗癌剤、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有の多剤耐性のインヒビター、制吐剤、および免疫増強薬からなる群より選択される１つ以上の化合物をさらに含む、項目２１に記載の薬学的組成物。

（項目２３）

前記抗癌剤がエストロゲンレセプターモジュレーター、アンドロゲンレセプターモジュレーター、レチノイドレセプターモジュレーター、細胞毒性/細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル-タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、ＨＭＧ-ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管形成インヒビター、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、ならびにアポトーシス誘発剤からなる群より選択される、項目２２に記載の薬学的組成物。

（項目２４）

細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、タキサン、トポイソメラーゼＩＩインヒビター、トポイソメラーゼＩインヒビター、チューブリン相互作用剤、ホルモン剤、チミジレートシンターゼインヒビター、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、シグナル伝達インヒビター、ＥＧＦＲキナーゼインヒビター、ＥＧＦＲに対する抗体、Ｃ-ａｂｌキナーゼインヒビター、オーロラキナーゼインヒビター、ホルモン療法併用、およびアロマターゼ併用からなる群より選択される１つ以上の抗癌剤をさらに含む、項目２３に記載の薬学的組成物。

（項目２５）

ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロクスウリジン、シタラビン、６-メルカプトプリン、６-チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコビリン、オキサリプラチン、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、デオキシコフォルマイシン、マイトマイシン-Ｃ、Ｌ-アスパラギナーゼ、テニポシド１７α-エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミソール、ナベルベン、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、ドロキサフィン、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン、エルビタックスおよびそれらの混合物からなる群より選択される１つ以上の薬剤をさらに含む、項目２４に記載の薬学的組成物。

（項目２６）

ＫＳＰ活性を阻害する必要がある被験体においてＫＳＰ活性を阻害する方法であって、該被験体に対して、項目１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステルの有効量を投与することを包含する、方法。

（項目２７）

細胞増殖性疾患を処置する必要がある被験体において細胞増殖性疾患を処置する方法であって、該被験体に対して項目１、１６、１７もしくは１８のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはその薬学的に許容される塩、溶媒和化合物もしくはエステルの有効量を投与することを包含する、方法。

（項目２８）

前記細胞増殖性疾患が癌、過形成、心肥大、自己免疫疾患、真菌性障害、関節炎、移植片拒絶、炎症性腸疾患、免疫障害、炎症、医療処置後に誘発される細胞増殖である、項目２７に記載の方法。

（項目２９）

前記癌が脳腫瘍、尿生殖器路癌、心臓癌、胃腸癌、肝臓癌、骨癌、神経系の癌、および

肺癌からなる群より選択される、項目２８に記載の方法。
（項目３０）
前記癌が肺腺癌、小細胞肺癌、膵臓癌、および乳癌から選択される、項目２８に記載の方法。
（項目３１）
放射線療法をさらに包含する、項目２７に記載の方法。
（項目３２）
抗癌剤、ＰＰＡＲ－γアゴニスト、ＰＰＡＲ－δアゴニスト、固有の多剤耐性のインヒビター、制吐剤、および免疫増強薬からなる群より選択される少なくとも１つの化合物を前記被験体に投与することをさらに包含する、項目２７に記載の方法。
（項目３３）
前記疾患が癌である、項目３２に記載の方法。
（項目３４）
放射線療法をさらに包含する、項目３３に記載の方法。
（項目３５）
前記抗癌剤がエストロゲンレセプターモジュレーター、アンドロゲンレセプターモジュレーター、レチノイドレセプターモジュレーター、細胞毒性／細胞増殖抑制剤、抗増殖剤、プレニル－タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼインヒビター、血管形成インヒビター、細胞増殖および生存のシグナル伝達のインヒビター、細胞周期チェックポイントに干渉する薬剤、ならびにアポトーシス誘発剤からなる群より選択される、項目３２または３３に記載の方法。
（項目３６）
細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、タキサン、トポイソメラーゼＩＩインヒビター、トポイソメラーゼＩインヒビター、チューブリン相互作用剤、ホルモン剤、チミジレートシンターゼインヒビター、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、シグナル伝達インヒビター、ＥＧＦＲキナーゼインヒビター、ＥＧＦＲに対する抗体、Ｃ－ａｂｌキナーゼインヒビター、ホルモン療法併用、およびアロマターゼ併用からなる群より選択される１つ以上の抗癌剤をさらに包含する、項目３２または３３に記載の方法。
（項目３７）
ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロクスウリジン、シタラビン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコビリン、オキサリプラチン、ペントスタチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、デオキシコフォルマイシン、マイトマイシン－Ｃ、Ｌ－アスパラギナーゼ、テニポシド１７α－エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミソール、ナベルベン、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、ドロキサフィン、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン、エルビタックスおよびそれらの混合物からなる群より選択される１つ以上の薬剤をさらに包含する、項目３２または３３に記載の方法。
発明の要旨

一実施形態では、本発明は、構造式（Ｉ）：

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/026065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D401/04 A61K31/437 A61P35/00 A61P37/00 A61P19/00
A61P29/00

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)
C07D 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, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE CHEMCATS Chemical Abstract Service, Columbus, Ohio (US); XP002474606 Order Number: kcd-130931	1-3, 11-14
X,P	& 6 September 2007 (2007-09-06), AURORA SCREENING LIBRARY ----	1-3, 11-14
X,P	DATABASE CHEMCATS Chemical Abstract Service, Columbus, Ohio (US); XP002474607 Order numbers: AH-262/37262010; STOCK4S-80851; STOCKS2S-63899; STOCKS2S-15096; STOCKS1S-84663; STOCKS2S-62289; STOCK1S-49086; STOCKS1S-43336; STOCK1S-48823, STOCK1S-48372; STOCK1S-44438 -/--	1-3, 11-14

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 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
1 April 2008	14/04/2008

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	Marzi, Elena

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/026065

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	& 9 July 2007 (2007-07-09), INTERCHIM INTERMEDIATES	1-3, 11-14
A	WO 2006/098962 A (SCHERING CORP [US]; TAGAT JAYARAMAN R [US]; GUZI TIMOTHY J [US]; LABRO) 21 September 2006 (2006-09-21) cited in the application page 1, lines 2-5 claims 1-70	1-37
A	WO 2006/098961 A (SCHERING CORP [US]; TAGAT JAYARAMAN R [US]; GUZI TIMOTHY J [US]; LABRO) 21 September 2006 (2006-09-21) cited in the application claims 1-71 page 1, lines 2-5	1-37

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/026065

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. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2007 /026065

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 26-37 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/026065

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006098962 A	21-09-2006	AR 053158 A1	25-04-2007
		CA 2599901 A1	21-09-2006
		EP 1863571 A1	12-12-2007
		US 2006281778 A1	14-12-2006
WO 2006098961 A	21-09-2006	AR 052682 A1	28-03-2007
		AU 2006223461 A1	21-09-2006
		CA 2599899 A1	21-09-2006
		EP 1871776 A2	02-01-2008
		KR 20070113267 A	28-11-2007

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P 43/00	105	
A61P 37/02	***(2006.01)***	A61P 35/00		
A61P 31/10	***(2006.01)***	A61P 37/02		
A61P 19/02	***(2006.01)***	A61P 31/10		
A61P 37/06	***(2006.01)***	A61P 19/02		
A61P 1/04	***(2006.01)***	A61P 37/06		
A61P 29/00	***(2006.01)***	A61P 1/04		
		A61P 29/00		

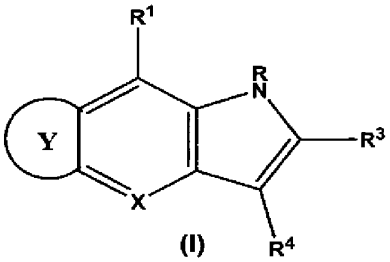
(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,I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

(72)発明者 パリワル， スニール
アメリカ合衆国 ニュージャージー 08831， モンロー タウンシップ， ゴルフ ビュー コート 5
(72)発明者 ツイ， ホン-チュン
アメリカ合衆国 ニュージャージー 08816， イースト ブラウンズウィック， コートランド ドライブ 41
(72)発明者 タガート， ジャヤラム アール．
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07090， ウエストフィールド， ボイントン コート 133
(72)発明者 デュカ， ホセ エス．
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07016， クランフォード， タキシード プレイス 3
(72)発明者 レスバーグ， チャールズ エー．
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07078， ショート ヒルズ， エルムウッド プレイス 40
(72)発明者 ドール， ロナルド ジェイ．
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07960， コンベント ステーション， コンコード レーン 8
(72)発明者 シー， ネン-ヤン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02420， レキシントン， タイラー ロード 2

Fターム(参考) 4C065 AA01 AA04 BB04 CC09 DD01 EE02 HH01 JJ01 KK02 KK04 KK05 KK08 LL06 PP07 PP12 PP15 PP18 QQ05
4C084 AA19 MA02 NA05 ZA361 ZA681 ZA961 ZB071 ZB081 ZB111 ZB261 ZB351 ZC751
4C086 AA01 AA02 AA03 CB05 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA68 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB21 ZB26 ZB35

【要約の続き】

OnCusp
Ex. 1002



(I)

(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2011-519864
(P2011-519864A)

(43)公表日　平成23年7月14日(2011.7.14)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	***(2006.01)***	C07K	16/28	ZNA	4C063
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	C	4C076
A61K 47/48	***(2006.01)***	A61K	39/395	L	4C085
C07D 401/12	*(2006.01)*	A61K	39/395	Y	4H045
		A61K	47/48		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 85 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2011-507634 (P2011-507634)
(86)(22)出願日	平成21年4月30日 (2009.4.30)
(85)翻訳文提出日	平成22年12月28日 (2010.12.28)
(86)国際出願番号	PCT/US2009/042267
(87)国際公開番号	WO2009/134977
(87)国際公開日	平成21年11月5日 (2009.11.5)
(31)優先権主張番号	61/049,291
(32)優先日	平成20年4月30日 (2008.4.30)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	61/147,966
(32)優先日	平成21年1月28日 (2009.1.28)
(33)優先権主張国	米国 (US)

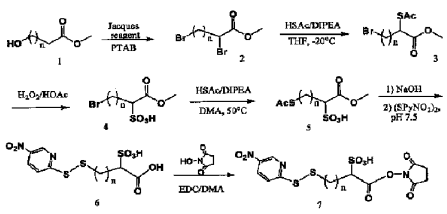
(71)出願人　504039155
イミュノジェン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１，ウォルサム，ウィンター・ストリート　８３０
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行

最終頁に続く

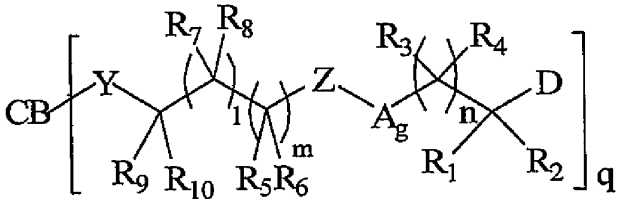
(54)【発明の名称】クロスリンカーおよびそれらの使用

(57)【要約】
荷電またはプロ荷電クロスリンク部分ならびにその荷電またはプロ荷電クロスリンク部分を含む細胞結合剤および薬物のコンジュゲート、ならびにそれらを作る方法。
【選択図】図１

Figure 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（ＩＩ）の細胞結合剤－薬物コンジュゲートであって、
【化１】



(II)

[式中：
ＣＢは細胞結合剤を表し；
Ｄはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エステル、エーテル、カルバメート、またはアミド結合により細胞結合剤に連結した薬物を表し；
R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、SO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-から選択される陰イオン、ならびに窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$およびX-$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される陽イオンから選択される荷電した置換基、またはフェニルであり、ここで：
R_{11}、R_{12}およびR_{13}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝または環状アルキルであり、Ｘはフェニルまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し；
１、ｍおよびｎは０または１から４までの整数であり；
Ａはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、またはSO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-から選択される陰イオン、ならびに窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$およびX-$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される陽イオンから選択される荷電した置換基であり、ここでＸは上記と同じ定義を有し、ここでｇは０または１であり；
Ｚは式$(OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、またはＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２単位であり、ここでＥ１およびＥ２は同じもしくは異なっており、それはＣ＝Ｏ、Ｏ、もしくはＮＲ１４であり、ここでR_{14}はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Ｐは２～２０アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１もしくはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じもしくは異なっており、それは式$(OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２では無いならば、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも１個は

荷電した置換基であり、またはｇが１である場合、Ａ、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり；
Ｙはカルボニル、チオエーテル、アミド、ジスルフィド、またはヒドラゾン基を表し；
ｑは１から２０までの整数を表す］
である、前記コンジュゲート。
【請求項２】
Ｄがチオテパ；シクロホスファミド（ＣＹＴＯＸＡＮ（商標））；ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファンから選択されるアルキルスルホネート類；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパから選択されるアジリジン類；エチレンイミン類；およびメチルアメラミン類（ｍｅｔｈｙｌａｍｅｌａｍｉｎｅｓ）；ブラタシンおよびブラタシノンから選択されるアセトゲニン類；カンプトテシン；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５；ＣＣ－１０６５のアドゼレシン、カルゼレシンまたはビゼレシン合成類似体；クリプトフィシン類；ドラスタチン；デュオカルマイシン；デュオカルマイシンのＫＷ－２１８９またはＣＢＩ－ＴＭＩ合成類似体；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコディクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードから選択されるナイトロジェンマスタード類；ニトロソ尿素類（ｎｉｔｒｏｓｕｒｅａｓ）、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質（例えばカリケアマイシン、特にカリケアマイシンガンマ１およびカリケアマイシンシータＩ；ダイネマイシン、ダイネマイシンＡを含む；エスペラマイシン；ネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連する色素タンパク質エネジイン抗生物質クロモモフォア類、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン類、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン；クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、ナイトマイシン類（ｎｉｔｏｍｙｃｉｎｓ）、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン類、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキセートおよび５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）から選択される代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセートから選択される葉酸類似体；フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン選択されるプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、５－ＦＵから選択されるピリミジン類似体；カルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンから選択されるアンドロゲン類；抗副腎薬、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；フロリン酸から選択される葉酸補充薬；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキセート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォミチン（ｅｌｆｏｍｉｔｈｉｎｅ）；エリプチニウムアセテート；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；マイタンシンおよびアンサミトシン類から選択されるマイタンシノイド類；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；２，２’，２’’－トリクロロトリエチルアミン；Ｔ－２トキシン、ベラクリンＡ、ロリジンＡおよびアングイジンから選択されるトリコテセン類；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポ

プロマン；ガシトシン；アラビノシド（“Ａｒａ－Ｃ”）；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン類；クロラムブシル；ゲムシタビン；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチンおよびカルボプラチンから選択されるプラチナ類似体；ビンブラスチン；プラチナ；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；マイトマイシンＣ；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；ＣＰＴ－１１；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオミチン（ｄｉｆｌｕｏｒｏｍｅｔｈｙｌｏｍｉｔｈｉｎｅ）（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸；カペシタビン；タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼを阻害する４（５）－イミダゾール類、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、およびトレミフェン（ファレストン）を含む抗エストロゲン薬；ならびにフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンから選択される抗アンドロゲン薬から選択される抗ホルモン剤、ｓｉＲＮＡまたはその組み合わせ；ならびに上記のいずれかの医薬的に許容できる塩類、酸類、または誘導体から選択される、請求項１に記載のコンジュゲート。

【請求項３】

Ｄがマイタンシノイド類、ＣＣ－１０６５類似体、モルホリノドキソルビシン、タキサン類、カリケアマイシン類、アウリスタチン類、ピロロベンゾジアゼピン二量体、ｓｉＲＮＡまたはその組み合わせ、および上記のいずれかの医薬的に許容できる塩類、酸類、または誘導体から選択される、請求項１または２に記載のコンジュゲート。

【請求項４】

細胞結合剤が、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、微生物感染細胞、寄生生物感染細胞、自己免疫細胞、活性化された細胞、骨髄細胞、活性化されたＴ細胞、Ｂ細胞、またはメラニン細胞、ＩＧＦ－ＩＲ、ＣａｎＡｇ、ＥＧＦＲ、ＥｐｈＡ２受容体、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＶＥＧＦ、ＴＦ、ＭＹ９、抗Ｂ４、ＥｐＣＡＭ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ６、ＣＤ１１、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２６、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ５６、ＣＤ７９、ＣＤ１０５、ＣＤ１３８、ＥｐｈＡ受容体類、ＥｐｈＢ受容体類、ＥＧＦｒ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ＨＥＲ３、メソテリン、ｃｒｉｐｔｏ、アルファ$_{v}$ベータ$_{3}$、インテグリン、アルファ$_{v}$ベータ$_{5}$インテグリン、アルファ$_{v}$ベータ$_{6}$インテグリン、Ａｐｏ２、およびＣ２４２抗原の内の１種類以上を発現する細胞；ならびにインスリン成長因子受容体、上皮成長因子受容体、または葉酸受容体を発現する細胞から選択される標的細胞に結合する、請求項１に記載のコンジュゲート。

【請求項５】

細胞結合剤が、抗体、単鎖抗体、標的細胞に結合する抗体断片、モノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、または標的細胞に結合するモノクローナル抗体断片、キメラ抗体、標的細胞に結合するキメラ抗体断片、ドメイン抗体、標的細胞に結合するドメイン抗体断片、抗体を模倣するａｄｎｅｃｔｉｎ類、ＤＡＲＰｉｎ類、リンフォカイン、ホルモン、ビタミン、成長因子、コロニー刺激因子、または栄養素輸送分子である、請求項１に記載のコンジュゲート。

【請求項６】

抗体が表面再構成（ｒｅｓｕｒｆａｃｅｄ）抗体、表面再構成単鎖抗体、またはその表面再構成抗体断片である、請求項５に記載のコンジュゲート。

【請求項７】

抗体がそれらのモノクローナル抗体、単鎖モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体断片である、請求項５に記載のコンジュゲート。

【請求項８】

抗体がそれらのヒト抗体、ヒト化抗体もしくは表面再構成抗体、ヒト化単鎖抗体、またはヒト化抗体断片である、請求項５に記載のコンジュゲート。

【請求項９】

抗体がそれらのキメラ抗体、キメラ抗体断片、ドメイン抗体、またはドメイン抗体断片である、請求項５に記載のコンジュゲート。

【請求項１０】

抗体がＭｙ９－６、Ｂ４、Ｃ２４２、Ｎ９０１、ＤＳ６、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２受容体、ＣＤ３８、ＩＧＦ－ＩＲ、ＣＮＴＯ　９５、Ｂ－Ｂ４、トラスツズマブ、ペルツズマブ、ビバツズマブ、シブロツズマブ、ペルツズマブ、またはリツキシマブである、請求項８に記載のコンジュゲート。

【請求項１１】

腫瘍細胞が乳癌細胞、前立腺癌細胞、卵巣癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、扁平上皮癌細胞、小細胞肺癌細胞、および精巣癌細胞から選択される、請求項４に記載のコンジュゲート。

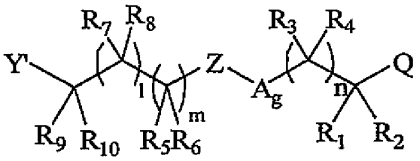
【請求項１２】

腫瘍を処置する方法であって、処置を必要とする対象に療法上有効量の請求項１に記載のコンジュゲートを投与することを含む、前記方法。

【請求項１３】

式（Ｉ）により表されるクロスリンカーであって、

【化２】



(I)

[式中：

Ｙ’は細胞結合剤との反応を可能にする官能基を表し；

Ｑはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エステル、エーテル、カルバメートまたはアミド結合を通した細胞毒性薬物の連結を可能にする官能基を表し；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、SO_3^-、Ｘ－SO_3^-、OPO_3^{2-}、Ｘ－OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、Ｘ－PO_3^{2-}、CO_2^-から選択される陰イオン、ならびに窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$および$X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される陽イオンから選択される荷電した置換基、またはフェニルであり、ここで：

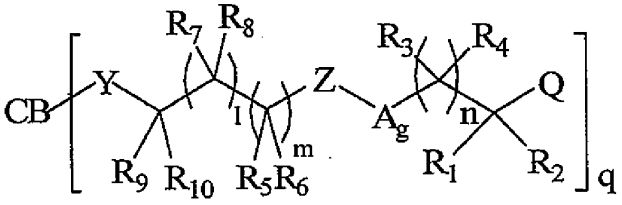
R_{11}、R_{12}およびR_{13}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルであり、Ｘはフェニルまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し；

ｌ、ｍおよびｎは０または１から４までの整数であり；

Ａはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、またはSO_3^-、Ｘ－SO_3^-、OPO_3^{2-}、Ｘ－OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、Ｘ－PO_3^{2-}、CO_2^-から選択される陰イオン、ならびに窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$および$X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される陽イオンから選択される荷電した置換基であり、ここでＸは上記と同じ定義を有し、ここでｇ

は０または１であり；ならびに
Ｚは式（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、またはＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２単位であり、ここでＥ１およびＥ２は同じもしくは異なっており、それはＣ＝Ｏ、Ｏ、もしくはＮＲ１４であり、ここでＲ$_{14}$はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Ｐは２～２０アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１もしくはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じもしくは異なっており、それは式（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２では無いならば、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$、およびＲ$_{10}$の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり、またはｇが１である場合、Ａ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$、およびＲ$_{10}$の内の少なくとも１個は荷電した置換基である］である、前記クロスリンカー。

【請求項１４】
式（ＩＩＩ）の化合物であって：
【化３】



(III)

［式中：
ＣＢは細胞結合剤を表し；
Ｑはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エステル、エーテル、カルバメートまたはアミド結合を通した細胞毒性薬物の連結を可能にする官能基を表し；
Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$、およびＲ$_{10}$は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、ＳＯ$_3^-$、Ｘ－ＳＯ$_3^-$、ＯＰＯ$_3^{2-}$、Ｘ－ＯＰＯ$_3^{2-}$、ＰＯ$_3^{2-}$、Ｘ－ＰＯ$_3^{2-}$、ＣＯ$_2^-$から選択される陰イオン、ならびに窒素を含む複素環、Ｎ$^+$Ｒ$_{11}$Ｒ$_{12}$Ｒ$_{13}$およびＸ－Ｎ$^+$Ｒ$_{11}$Ｒ$_{12}$Ｒ$_{13}$から選択される陽イオンから選択される荷電した置換基、またはフェニルであり、ここで：
Ｒ$_{11}$、Ｒ$_{12}$およびＲ$_{13}$は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルであり、Ｘはフェニルまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し；
ｌ、ｍおよびｎは０または１から４までの整数であり；
Ａはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝も

しくは環状アルキル、またはSO$_3^-$、X-SO$_3^-$、OPO$_3^{2-}$、X-OPO$_3^{2-}$、PO$_3^{2-}$、X-PO$_3^{2-}$、CO$_2^-$から選択される陰イオン、ならびに窒素を含む複素環、N$^+$R$_{11}$R$_{12}$R$_{13}$およびX-N$^+$R$_{11}$R$_{12}$R$_{13}$から選択される陽イオンから選択される荷電した置換基であり、ここでXは上記と同じ定義を有し、ここでgは0または1であり；

Zは式（OCH$_2$CH$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでpは0もしくは2から約1000までの整数であり、またはF1-E1-P-E2-F2単位であり、ここでE1およびE2は同じもしくは異なっており、それはC=O、O、もしくはNR14であり、ここでR$_{14}$はH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、2個から6個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Pは2~20アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでE1もしくはE2は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の1つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにF1およびF2は同じもしくは異なっており、それは式（OCH$_2$CH$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでpは0もしくは2から約1000までの整数であり、ZがF1-E1-P-E2-F2では無いならば、R$_1$、R$_2$、R$_3$、R$_4$、R$_5$、R$_6$、R$_7$、R$_8$、R$_9$、およびR$_{10}$の内の少なくとも1個は荷電した置換基であり、またはgが1である場合、A、R$_1$、R$_2$、R$_3$、R$_4$、R$_5$、R$_6$、R$_7$、R$_8$、R$_9$、およびR$_{10}$の内の少なくとも1個は荷電した置換基であり；ならびに

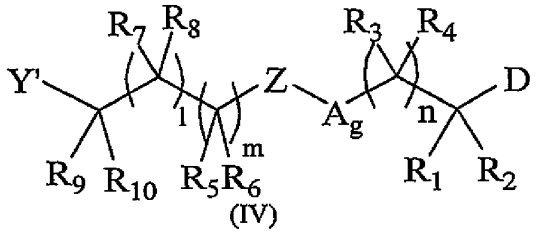
Yはカルボニル、チオエーテル、アミド、ジスルフィド、またはヒドラゾン基を表し；qは1から20までの整数を表す]

である、前記化合物。

【請求項15】

式（IV）の化合物であって：

【化4】



(IV)

[式中：

Y'は細胞結合剤との反応を可能にする官能基を表し；

Dはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エステル、エーテル、カルバメート、またはアミド結合により細胞結合剤に連結した薬物を表し；

R$_1$、R$_2$、R$_3$、R$_4$、R$_5$、R$_6$、R$_7$、R$_8$、R$_9$、およびR$_{10}$は同じまたは異なっており、それはH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、2個から6個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、SO$_3^-$、X-SO$_3^-$、OPO$_3^{2-}$、X-OPO$_3^{2-}$、PO$_3^{2-}$、X-PO$_3^{2-}$、CO$_2^-$から選択される陰イオン、ならびに窒素を含む複素環、N$^+$R$_{11}$R$_{12}$R$_{13}$およびX-N$^+$R$_{11}$R$_{12}$R$_{13}$から選択される陽イオンから選択される荷電した置換基、またはフェニルであり、ここで：

R$_{11}$、R$_{12}$およびR$_{13}$は同じまたは異なっており、それはH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルであり、Xはフェニルまたは1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し

；
１、ｍおよびｎは０または１から４までの整数であり；
Ａはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、またはＳＯ$_3^-$、Ｘ－ＳＯ$_3^-$、ＯＰＯ$_3^{2-}$、Ｘ－ＯＰＯ$_3^{2-}$、ＰＯ$_3^{2-}$、Ｘ－ＰＯ$_3^{2-}$、ＣＯ$_2^-$、窒素を含む複素環、Ｎ$^+$Ｒ$_{11}$Ｒ$_{12}$Ｒ$_{13}$もしくはＸ－Ｎ$^+$Ｒ$_{11}$Ｒ$_{12}$Ｒ$_{13}$から選択される荷電した置換基であり、ここでＸは上記と同じ定義を有し、ここでｇは０または１であり；ならびに
Ｚは式（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、またはＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２単位であり、ここでＥ１およびＥ２は同じもしくは異なっており、それはＣ＝Ｏ、Ｏ、もしくはＮＲ１４であり、ここでＲ$_{14}$はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Ｐは２～２０アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１もしくはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じもしくは異なっており、それは式（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２では無いならば、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$、およびＲ$_{10}$の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり、またはｇが１である場合、Ａ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$、およびＲ$_{10}$の内の少なくとも１個は荷電した置換基である］である、前記化合物。

【請求項１６】
有効量の請求項１に記載のコンジュゲート、その医薬的に許容できる塩または溶媒和物、および医薬的に許容できるキャリヤー、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】
この出願は２００８年４月３０日に出願された米国仮出願第６１／０４９，２９１号に対する、および２００９年１月２８日に出願された米国仮出願第６１／１４７，９６６号に対する優先権を主張する。

【０００２】
[01] 本発明は、新規の荷電したクロスリンカーおよび標的細胞により処理されて荷電した部分を与えることができるクロスリンカーの合成に関する。本発明は、細胞結合剤（ｃｅｌｌ－ｂｉｎｄｉｎｇ ａｇｅｎｔ）のこれらのクロスリンカーを用いた修飾、それに続く薬物との反応、またはその薬物のこれらのクロスリンカーを用いた修飾、それに続く細胞結合剤との反応を含む、細胞結合剤－薬物コンジュゲートを作る方法にも関する。コンジュゲートを作るその向上した方法は、細胞結合剤ごとにより多い数の薬物分子を連結させ、結果的により大きな効力をもたらし、そのコンジュゲートにより大きな水溶性を与える能力を提供する。

【背景技術】

【０００３】
[02] 二官能性修飾試薬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（ＳＰＤＰ）は、２個のタンパク質をジスルフィド結合を通して連結するために用いられてきた。その試薬は、修飾工程において第１のタンパク質と反応して活性なジスルフィドを含む基を導入する。次いでコンジュゲーション工程において遊離のチオール基を含む第２のタンパク質を添加して２個のタンパク質の間にジスルフィド結合を形成する。ＳＰＤＰの多くの誘導体およびＳＰＤＰのイミド型が記述されている(米国特許第４，５６３，３０４号；Ｊ. Carlsson et al. 173 Biochem J. 723-737 (1978)；Goff D. A., C

arroll, S. F. 1 BioConjugate Chem 381-386 (1990); L. Delprino et al. 82 J. Pharm Sci. 506-512 (1993); S. Arpicco et al., 8 BioConjugate Chem 327-337 (1997))。

【０００４】

[03] 細胞結合剤の、高度に細胞毒性の薬物とのコンジュゲートが記述されている(米国特許第５，２０８，０２０号、第５，４１６，０６４号；第５，４７５，０９２号、第５，５８５，４９９号、第６，４３６，９３１号、第６，３７２，７３８号、および第６，３４０，７０１号；R.V.J. Chari et al., 52 Cancer Res. 127-131 (1992))。これらのコンジュゲートでは、まず細胞結合剤を二官能性薬剤、例えばＳＰＤＰ、ＳＰＰまたはＳＭＣＣにより修飾して活性なジスルフィドまたはマレイミド部分を導入する。チオールを含む細胞毒性薬物との反応は、細胞結合剤、例えばモノクローナル抗体および薬物がジスルフィド結合またはチオエーテル結合を通して連結されたコンジュゲートを与える。

【０００５】

[04] ニトロピリジルジチオ、ジニトロピリジルジチオ、Ｎ，Ｎ-ジアルキルカルボキサミドピリジルジチオまたはジ-（Ｎ，Ｎ-ジアルキルカルボキサミド）ピリジルジチオ基および反応性カルボキシルエステル基、例えばＮ-スクシンイミジルエステル基またはＮ-スルホスクシンイミジルエステル基を含むヘテロ二官能性（Ｈｅｔｅｒｏｂｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ）クロスリンカーが記述されている（米国特許第６，９１３，７４８号）。Ｎ-スルホスクシンイミジル基の存在はこれらのクロスリンカーにより高い水溶性を与えると主張された。しかし、一度その細胞結合剤がこれらのクロスリンカーと反応すると、そのＮ-スルホスクシンイミジル基は置き換えられ、修飾された細胞結合剤およびその薬物コンジュゲートの両方に関して、水溶性の利点は失われる。細胞結合剤-薬物コンジュゲートにおいて用いられる細胞毒性薬物はしばしば水溶液中でごくわずかしか溶けないため、十分な数の薬物分子を細胞結合剤に連結させてなお水溶性を維持するのはしばしば困難である。加えて、反応は希釈溶液中で実施されなければならず、それは大量の溶液を用いる必要があるためスケールアップしにくい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】米国特許第４，５６３，３０４号
【特許文献２】米国特許第５，２０８，０２０号
【特許文献３】米国特許第５，４１６，０６４号
【特許文献４】米国特許第５，４７５，０９２号
【特許文献５】米国特許第５，５８５，４９９号
【特許文献６】米国特許第６，４３６，９３１号
【特許文献７】米国特許第６，３７２，７３８号
【特許文献８】米国特許第６，３４０，７０１号
【特許文献９】米国特許第６，９１３，７４８号

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】J. Carlsson et al. 173 Biochem J. 723-737 (1978)
【非特許文献２】Goff D. A., Carroll, S. F. 1 BioConjugate Chem 381-386 (1990)
【非特許文献３】L. Delprino et al. 82 J. Pharm Sci. 506-512 (1993)
【非特許文献４】S. Arpicco et al., 8 BioConjugate Chem 327-337 (1997)
【非特許文献５】R.V.J. Chari et al., 52 Cancer Res. 127-131 (1992)

【発明の概要】

【０００８】

[05] 本発明は荷電したリンカーを提供し、ここでその電荷は細胞結合剤の修飾の後および結果として得られた薬物コンジュゲートの両方において保持される。より具体的には、本発明は薬物を細胞結合剤（例えば抗体）に連結させるための荷電したリンカーの使用に関する。本発明の１観点において、その荷電したリンカーは細胞結合剤を修飾してそれ

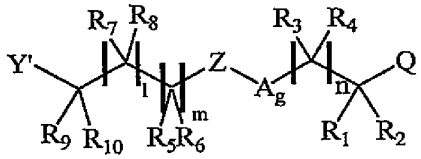
らを薬物に連結させるために用いられる。本発明の別の観点において、その荷電したリンカーは薬物を修飾してそれらを細胞結合剤に連結させるために用いられる。本発明のさらに別の観点において、その荷電したリンカーは薬物および細胞結合剤を同時に連結させるために用いられる。全ての場合において、好ましい最終結果は薬物-荷電したリンカー-細胞結合剤コンジュゲートであり、それは式CB-(-L^c-D)$_q$により表すことができ、ここでCBは細胞結合剤であり、L^{c}は荷電したリンカーであり、Dは薬物分子であり、qは1から20までの整数である。細胞結合剤-薬物コンジュゲート中のリンカー中の荷電した基（単数又は複数）の存在は、いくつかの利点、例えばi）最終産物のより大きな水溶性、ii）水溶液中でより高い濃度において作動する能力、iii）結果としてより高い効力をもたらす、細胞結合剤の分子ごとにより大きな数の薬物分子を連結させる能力、iv）結果としてより高い効力をもたらす、荷電したコンジュゲート種が標的細胞内部に維持される可能性、およびv）荷電した薬物種を細胞から排出することができないであろう、多剤耐性細胞の向上した感受性を提供する。本発明は、薬物および細胞結合剤に結び付けて、細胞内で代謝されて1個以上の荷電した部分を含む薬物代謝産物を生成することができるコンジュゲートを与えることができるリンカーも記述する。これらのリンカーをプロ荷電（pro-charged）リンカーと呼ぶことにする。そのリンカーの、細胞による処理の後に荷電した状態になるであろう部分を、プロ荷電部分と呼ぶことにする。

【0009】

[06] 本発明の1観点において、荷電またはプロ荷電クロスリンカーは式（I）により表され、ここでY'は細胞結合剤と反応することができ、Qは細胞毒性薬物と反応することができる：

【0010】

【化1】



(I)

【0011】

ここで：

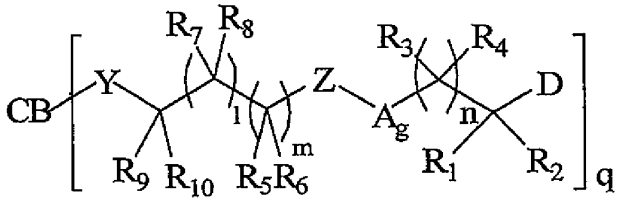
Y'は細胞結合剤との反応を可能にする官能基を表し；

Qはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エーテル、エステル、カルバメートまたはアミド結合を通した細胞毒性薬物の連結を可能にする官能基を表し；

R$_1$、R$_2$、R$_3$、R$_4$、R$_5$、R$_6$、R$_7$、R$_8$、R$_9$、およびR$_{10}$は同じまたは異なっており、それはH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、2個から6個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO$_3^-$、X-SO$_3^-$、OPO$_3^{2-}$、X-OPO$_3^{2-}$、PO$_3^{2-}$、X-PO$_3^{2-}$、CO$_2^-$、および陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、N$^+$R$_{11}$R$_{12}$R$_{13}$もしくはX-N$^+$R$_{11}$R$_{12}$R$_{13}$、またはフェニルであり、ここで：

R$_{11}$、R$_{12}$およびR$_{13}$は同じまたは異なっており、それはH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルであり、Xはフェニルまたは1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し

；
１、ｍおよびｎは０または１から４までの整数であり；ならびに
Ａはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、または陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-、および陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$もしくはX-$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される荷電した置換基であり、ここでＸは上記と同じ定義を有し、ここでｇは０または１であり；
Ｚは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、またはＦ１-Ｅ１-Ｐ-Ｅ２-Ｆ２単位であり、ここでＥ１およびＥ２は同じもしくは異なっており、それはＣ＝Ｏ、Ｏ、もしくはNR_{14}であり、ここでR_{14}はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Ｐは２～２０アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１もしくはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じもしくは異なっており、それは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、ＺがＦ１-Ｅ１-Ｐ-Ｅ２-Ｆ２では無いならば、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり、またはｇが１である場合、Ａ、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも１個は荷電した置換基である。
【００１２】
[07] 別の観点において、本発明は式（ＩＩ）の細胞結合剤-薬物コンジュゲートを提供し、ここでその細胞結合剤、ＣＢ、およびその薬物、Ｄ、はその荷電またはプロ荷電クロスリンカーの２つの末端において反応しており：
【００１３】
【化２】



(II)

【００１４】
ここで：
ＣＢは細胞結合剤を表し；
Ｄはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エーテル、エステル、カルバメート、またはアミド結合により細胞結合剤に連結した薬物を表し；
R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-、陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$もしくはX-$N^+R_{11}R$

$_{12}R_{13}$、またはフェニルであり、ここで：

R_{11}、R_{12}およびR_{13}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルであり、Ｘはフェニルまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し；

ｌ、ｍおよびｎは０または１から４までの整数であり；ならびに

Ａはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、または陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO_3^-、$X-SO_3^-$、OPO_3^{2-}、$X-OPO_3^{2-}$、PO_3^{2-}、$X-PO_3^{2-}$、CO_2^-、陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$もしくは$X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される荷電した置換基であり、ここでＸは上記と同じ定義を有し、ここでｇは０または１であり；

Ｚは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、またはＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２単位であり、ここでＥ１およびＥ２は同じもしくは異なっており、それはＣ＝Ｏ、Ｏ、もしくはNR_{14}であり、ここでR_{14}はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Ｐは２～２０アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１もしくはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じもしくは異なっており、それは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２では無いならば、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり、またはｇが１である場合、Ａ、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり；

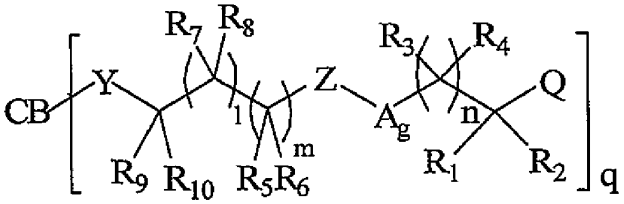
Ｙはカルボニル、チオエーテル、アミド、ジスルフィド、またはヒドラゾン基を表し；ｑは１から２０までの整数を表す。

【００１５】

[08] さらなる観点において、本発明は式（ＩＩＩ）の修飾された細胞結合剤を提供し、ここでその細胞結合剤、ＣＢは、細胞毒性薬物と反応することができる基であるＱをまだ有しているクロスリンカーと反応する：

【００１６】

【化３】



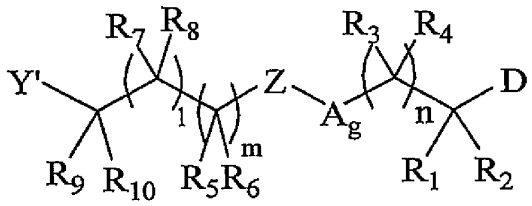
(III)

【００１７】

ここでその置換基は上記で定義されたものである。

[09] さらに別の観点において、本発明は式（ＩＶ）の修飾された薬物を提供し、ここで薬物、Ｄは、細胞結合剤と反応することができる基であるＹ’をまだ有しているクロスリンカーと反応する：

【００１８】
【化４】



(IV)

【００１９】
ここでその置換基は上記で定義されたものである。
[10] 本発明はさらに式（ＩＩ）の細胞結合剤薬物コンジュゲートを作る方法に関し、ここでその薬物は荷電またはプロ荷電リンカーを通して細胞結合剤に連結する。
【００２０】
[11] 本発明は式（ＩＩＩ）の修飾された細胞結合剤を作る方法にも関し、ここでその細胞結合剤は荷電またはプロ荷電リンカーと反応する。
[12] 本発明は式（ＩＶ）の修飾された薬物を作る方法にも関し、ここでその薬物は荷電またはプロ荷電リンカーと反応する。
【００２１】
[13] 本発明はコンジュゲートまたはその誘導体（および／またはそれらの溶媒和物、水和物および／または塩類）およびキャリヤー（医薬的に許容できるキャリヤー）を含む組成物（例えば医薬組成物）を含む。本発明は、コンジュゲートまたはその誘導体（および／またはそれらの溶媒和物、水和物および／または塩類）およびキャリヤー（医薬的に許容できるキャリヤー）を含み、さらに第２の療法薬を含む組成物（例えば医薬組成物）も含む。本組成物は、哺乳類（例えばヒト）において異常な細胞増殖を阻害する、または増殖性障害を処置するのに有用である。
【００２２】
[14] 本発明は、哺乳類（例えばヒト）において異常な細胞増殖を阻害する、または増殖性障害を処置する方法であって、前記哺乳類に療法上有効量のコンジュゲートもしくはその誘導体（および／またはそれらの溶媒和物および塩類）またはそれらの組成物を、単独または第２の療法薬との組み合わせで投与することを含む方法を含む。
【００２３】
[15] この発明の化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲート、およびそれらを含む組成物は、例えば細胞の異常な増殖により特性付けられる障害（例えば癌）を処置する、またはその重症度を和らげるのに有用である。この発明の化合物またはコンジュゲートに関する他の適用には、骨粗鬆症、抑うつ、不安、ストレス、恐怖症、パニック、精神不安、精神障害、ならびに痛みの処置、または抗てんかん薬、抗細菌薬、利尿薬および降圧薬、脂質低下薬、ならびに抗うつ薬としての適用が含まれるがそれらに限定されない。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】[16] 図１は、ニトロピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。まずヒドロキシアルカノエートエステルを示したようにジブロモアルカノエートエステルに変換し、続いてα－ブロモ置換基をスルホン酸に変換する。
【図２】[17] 図２は、ピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３】[18] 図３、４および５は、反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド置換基を有し、チオエーテル結合を通した連結を可能とする荷電したクロスリンク試薬の合成の

ための様々な経路を示す。
【図４】[18] 図３、４および５は、反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド置換基を有し、チオエーテル結合を通した連結を可能とする荷電したクロスリンク試薬の合成のための様々な経路を示す。
【図５】[18] 図３、４および５は、反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド置換基を有し、チオエーテル結合を通した連結を可能とする荷電したクロスリンク試薬の合成のための様々な経路を示す。
【図６】[19] 図６および７は、ピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図７】[19] 図６および７は、ピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図８】[20] 図８は、ニトロピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図９】[21] 図９および１０は、反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド置換基を有し、チオエーテル結合を通した連結を可能とする、ホスフェートを含む荷電したクロスリンク試薬の合成のための異なる経路を示す。
【図１０】[21] 図９および１０は、反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド置換基を有し、チオエーテル結合を通した連結を可能とする、ホスフェートを含む荷電したクロスリンク試薬の合成のための異なる経路を示す。
【図１１】[22] 図１１は、スルホネート置換基が分枝アルキル基に結合している、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。これらの試薬はピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルも有する。
【図１２】[23] 図１２は、スルホネート置換基が分枝アルキル基に結合している、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド基も有しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。
【図１３】[24] 図１３は、ピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、第四級アミンを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図１４】[25] 図１４は、反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド置換基を有し、チオエーテル結合を通した連結を可能とする、第四級アミンクロスリンク試薬の合成を示す。
【図１５】[26] 図１５は、ピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。これらの化合物では、そのスルホネート置換基はカルボキシルエステルに対してβ位にある炭素原子上にある。
【図１６】[27] 図１６は、ピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルを含む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。これらの化合物では、そのホスフェート置換基はカルボキシルエステルに関してβ位にある。
【図１７】[28] 図１７、１８および１９は、ニトロピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルに加えてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖を含む、様々なスルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図１８】[28] 図１７、１８および１９は、ニトロピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルに加えてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖を含む、様々なスルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図１９】[28] 図１７、１８および１９は、ニトロピリジルジスルフィド基および反応性カルボン酸エステルに加えてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖を含む、様々なスルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図２０】[29] 図２０および２１は、マレイミド基および反応性カルボン酸エステルに加えてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖を含む、様々なスルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図２１】[29] 図２０および２１は、マレイミド基および反応性カルボン酸エステルに加えてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖を含む、様々なスルホン酸を含むクロスリン

ク試薬の合成を示す。
【図２２】[30] 図２２は、ホスフェート置換基が芳香族基に結合している、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびニトロピリジルジチオ基も有しており、それはジスルフィド結合を通した連結を可能にする。
【図２３】[31] 図２３は、ホスフェート置換基が分枝アルキル基に結合している、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびニトロピリジルジチオ基も有しており、それはジスルフィド結合を通した連結を可能にする。
【図２４】[32] 図２４～３１は、酸不安定性（ａｃｉｄ-ｌａｂｉｌｅ）結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図２５】[32] 図２４～３１は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図２６】[32] 図２４～３１は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図２７】[32] 図２４～３１は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図２８】[32] 図２４～３１は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図２９】[32] 図２４～３１は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３０】[32] 図２４～３１は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３１】[32] 図２４～３１は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、スルホネートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３２】[33] 図３２～３６は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３３】[33] 図３２～３６は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３４】[33] 図３２～３６は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３５】[33] 図３２～３６は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３６】[33] 図３２～３６は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、ホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３７】[34] 図３７～３８は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、第四級アミンを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３８】[34] 図３７～３８は、酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分も組み込む、第四級アミンを含むクロスリンク試薬の合成を示す。
【図３９】[35] 図３９～４２は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分も組み込む、荷電したクロスリンク試薬の合成を示す。
【図４０】[35] 図３９～４２は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分も組み込む、荷電したクロスリンク試薬の合成を示す。
【図４１】[35] 図３９～４２は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分も組み込む、荷電したクロスリンク試薬の合成を示す。
【図４２】[35] 図３９～４２は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分も組み込む、荷電したクロスリンク試薬の合成を示す。
【図４３】[36] 図４３～４４はホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示しており、そのホスフェート置換基は芳香族残基に、またはアルキル基に結合している。これら

の試薬は反応性カルボン酸エステルおよびニトロピリジルジチオ基も有しており、それはジスルフィド結合を通した連結を可能にする。
【図４４】[36] 図４３～４４はホスフェートを含むクロスリンク試薬の合成を示しており、そのホスフェート置換基は芳香族残基に、またはアルキル基に結合している。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびニトロピリジルジチオ基も有しており、それはジスルフィド結合を通した連結を可能にする。
【図４５】[37] 図４５～４９は、反応性カルボン酸エステルおよびハロアセチル置換基を有する荷電したクロスリンク薬剤の合成を示しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。
【図４６】[37] 図４５～４９は、反応性カルボン酸エステルおよびハロアセチル置換基を有する荷電したクロスリンク薬剤の合成を示しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。
【図４７】[37] 図４５～４９は、反応性カルボン酸エステルおよびハロアセチル置換基を有する荷電したクロスリンク薬剤の合成を示しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。
【図４８】[37] 図４５～４９は、反応性カルボン酸エステルおよびハロアセチル置換基を有する荷電したクロスリンク薬剤の合成を示しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。
【図４９】[37] 図４５～４９は、反応性カルボン酸エステルおよびハロアセチル置換基を有する荷電したクロスリンク薬剤の合成を示しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。
【図５０】[38] 図５０は、負に荷電したカルボキシレート代謝産物を生成するであろうプロ荷電リンカーの合成を示す。
【図５１】[39] 図５１は、リンカー１５８の薬物およびモノクローナル抗体へのコンジュゲートならびにそのコンジュゲートが標的細胞のリソソーム中でどのように処理されて負に荷電したカルボキシレートを有する薬物を含む代謝産物を与えるかを示す。
【図５２】[40] 図５２は、正に荷電したアミンを含む代謝産物を生成するであろうプロ荷電リンカーの合成を示す。
【図５３】[41] 図５３は、プロ荷電リンカーの薬物およびモノクローナル抗体へのコンジュゲートならびにそのコンジュゲートが標的細胞のリソソーム中でどのように処理されて正に荷電したアミンを有する薬物の代謝産物を与えるかを示す。
【図５４】[42] 図５４は、荷電したカルボキシレート代謝産物を生成するであろうプロ荷電リンカーの合成を示す。
【図５５】[43] 図５５は、リンカー１７２の薬物およびモノクローナル抗体へのコンジュゲートならびにそのコンジュゲートが標的細胞のリソソーム中でどのように処理されてカルボン酸およびリシン残基を有する薬物を含む代謝産物を与えるかを示す。
【図５６】[44] 図５６は、細胞結合剤の修飾および荷電したリンカーを有する細胞結合剤-薬物コンジュゲートの生成における荷電したリンカーの使用を示す。
【図５７Ａ】[45] 図５７（Ａ）、（Ｂ）および（Ｃ）は、荷電したクロスリンカーが組み込まれている細胞結合剤-薬物コンジュゲートのインビトロでの効力を示す。
【図５７Ｂ】[45] 図５７（Ａ）、（Ｂ）および（Ｃ）は、荷電したクロスリンカーが組み込まれている細胞結合剤-薬物コンジュゲートのインビトロでの効力を示す。
【図５７Ｃ】[45] 図５７（Ａ）、（Ｂ）および（Ｃ）は、荷電したクロスリンカーが組み込まれている細胞結合剤-薬物コンジュゲートのインビトロでの効力を示す。
【図５８】[46] 図５８は、荷電したクロスリンカーを有する細胞結合剤-薬物コンジュゲートのインビトロでの効力および標的選択性を示す。
【図５９】[47] 図５９は、荷電したクロスリンカーを有する細胞結合剤-薬物コンジュゲートの質量スペクトルを示す。
【図６０】[48] 図６０は、抗ＣａｎＡｇ（ｈｕＣ２４２）-スルホネートリンカー-マイタンシノイド（ｍａｙｔａｎｓｉｎｏｉｄ）コンジュゲートの、マイタンシノイドのロ

ード（ｌｏａｄ）（Ｅ：Ａ）の増大に伴う、ＣＯＬＯ２０５細胞に対する細胞毒性を示す。

【図６１】[49] 図６１は、抗ＣａｎＡｇ（ｈｕＣ２４２）-スルホネートリンカー-マイタンシノイドコンジュゲートの、マイタンシノイドのロード（Ｅ：Ａ）の増大に伴う、多剤耐性ＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性を示す。

【図６２】[50] 図６２は、リンカー中にスルホネート基を有する、または有しない抗ＣａｎＡｇ（ｈｕＣ２４２）-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性ＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性を比較する。

【図６３】[51] 図６３は、リンカー中にスルホネート基を有する、または有しない抗ＥｐＣＡＭ（Ｂ３８．１）-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性ＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性を比較する。

【図６４】[52] 図６４は、リンカー中にスルホネート基を有する、または有しない抗ＥｐＣＡＭ（Ｂ３８．１）-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性ＨＣＴ１５細胞に対する細胞毒性を比較する。

【図６５】[53] 図６５は、リンカー中にスルホネート基を有する、または有しない抗ＥｐＣＡＭ（Ｂ３８．１）-マイタンシノイドコンジュゲートの、多剤耐性ＣＯＬＯ２０５-ＭＤＲ細胞に対する細胞毒性を比較する。

【図６６】[54] 図６６は、抗ＥｐＣＡＭ抗体-マイタンシノイドコンジュゲートのＣＯＬＯ２０５ ｍｄｒ異種移植片（別個の腫瘍）に対するインビボでの抗腫瘍活性を示す。

【図６７】[55] 図６７は、抗ＥｐＣＡＭ抗体-マイタンシノイドコンジュゲートのＣＯＬＯ２０５異種移植片（別個の腫瘍）に対するインビボでの抗腫瘍活性を示す。

【図６８】[56] 図６８～７０は、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成の方法を示す。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド基を有しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。

【図６９】[56] 図６８～７０は、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成の方法を示す。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド基を有しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。

【図７０】[56] 図６８～７０は、スルホン酸を含むクロスリンク試薬の合成の方法を示す。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびマレイミド基を有しており、それはチオエーテル結合を通した連結を可能にする。

【図７１】[57] 図７１は、第四級アミンを含むクロスリンク試薬の合成の方法を示す。これらの試薬は反応性カルボン酸エステルおよびピリジルジチオ基も有しており、それはジスルフィド結合を通した連結を可能にする。

【図７２Ａ】[58] 図７２（Ａ）および（Ｂ）は、ＣＤ-１マウスにおいてそれぞれ１２．９ｍｇ／ｋｇおよび７．９ｍｇ／ｋｇ（静脈内）で投与された、３．５ＤＭ４／Ａｂまたは６．４ＤＭ４／ＡｂでのｈｕＣ２４２抗体-スルホ-Ｍａｌ-[^{3}Ｈ標識]-ＤＭ４コンジュゲートの血漿薬物動態を示す。Ａ．Ａｂ濃度（ＥＬＩＳＡにより、または３Ｈの計数により測定した）対投与後の時間。Ｂ．マイタンシノイド（ＤＭ４）／抗体（Ａｂ）比対投与後の時間。

【図７２Ｂ】[58] 図７２（Ａ）および（Ｂ）は、ＣＤ-１マウスにおいてそれぞれ１２．９ｍｇ／ｋｇおよび７．９ｍｇ／ｋｇ（静脈内）で投与された、３．５ＤＭ４／Ａｂまたは６．４ＤＭ４／Ａｂを有するｈｕＣ２４２抗体-スルホ-Ｍａｌ-[^{3}Ｈ標識]-ＤＭ４コンジュゲートの血漿薬物動態を示す。Ａ．Ａｂ濃度（ＥＬＩＳＡにより、または３Ｈの計数により測定した）対投与後の時間。Ｂ．マイタンシノイド（ＤＭ４）／抗体（Ａｂ）比対投与後の時間。

【００２５】

[59] 図１～７１において、適用可能な場合、ｎは０または１から１０までの整数を表し、ｍは０または１から２０００までの整数を表す。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

[60] 本明細書で開示される新規コンジュゲートは、荷電またはプロ荷電クロスリンカーを用いる。いくつかの適切なクロスリンカーおよびそれらの合成の例を図１～１０において示す。好ましくは、荷電またはプロ荷電クロスリンカーは、スルホネート、ホスフェート、カルボキシルまたは第四級アミン置換基を含むクロスリンカーであり、それは修飾された細胞結合剤および細胞結合剤-薬物コンジュゲートの溶解性を、特に２～２０薬物／抗体が連結されたモノクローナル抗体-薬物コンジュゲートに関して、著しく増大させる。プロ荷電部分を含むリンカーから調製したコンジュゲートは、そのコンジュゲートが細胞内で代謝された後に１個以上の荷電した部分を生成するであろう。

【００２７】

クロスリンカー

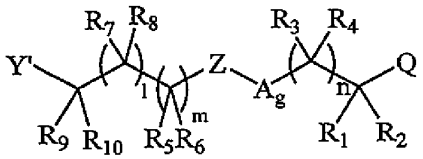
[61] 本発明の荷電したクロスリンカーを生成するための合成経路を図１～４９において示す。プロ荷電部分を有するリンカーを生成するための合成経路を図５０、５２、および５４において示す。図５１、５３および５５は、それぞれのプロ荷電リンカーと薬物とモノクローナル抗体のそれぞれのコンジュゲートおよびどのようにこれらのコンジュゲートが標的細胞内で代謝されて荷電した代謝産物を与えるであろうかを示す。そのクロスリンカーは３種類の要素を有する：ａ）荷電した、またはこれらのリンカーを用いているコンジュゲートが細胞内で代謝される際に荷電した状態になるであろう置換基。その電荷は陰イオン性、例えば、それらに限定されるわけではないが、カルボキシレート、スルホネートもしくはホスフェート、または陽イオン性、例えば、それらに限定されるわけではないが、第三級、第四級、もしくは第一級アミンもしくは窒素を含む複素環のどちらかであろう、ｂ）細胞結合剤と反応することができる基、例えばＮ-ヒドロキシスクシンイミド（Ｎ-ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｍｉｍｉｄｅ）エステル、マレイミド基、ハロアセチル基、およびヒドラジド、ならびにｃ）薬物と反応することができる基、例えば、それらに限定されるわけではないが、ジスルフィド、マレイミド、ハロアセチル、およびヒドラジド。その荷電またはプロ荷電置換基は、本明細書で記述される方法により導入することができる。例えば、スルホネートの電荷は、まず商業的に入手可能なハロエステル化合物をチオアセテートで処理してチオアセチル化合物を生成し、続いてそのチオアセチル基を過酸化水素を用いて酸化してスルホネート基にすることにより導入することができる。ホスフェートを含むクロスリンカーは、本明細書で記述される方法により合成することができる。まず、望まれる反応性の基、例えば、それらに限定されるわけではないが、チオール、マレイミド、ハロアセチルおよびヒドラジドを、図６～１０において示した反応により導入し、続いてホスフェートエステルを加水分解してホスフェートを有する荷電したクロスリンカーを与える。正に荷電した第四級アミン置換基は、アミンのα，β-不飽和ケトンとの反応によりクロスリンカー中に導入することができる（例えば図１３および３７を参照）。あるいは、荷電したアミン置換基は、選択されたアミンまたは窒素を含む複素環を用いてハロゲンを置き換えることにより導入することができる。

【００２８】

[62] 好ましくは、そのクロスリンカーは下記の式（Ｉ）の化合物である：

【００２９】

【化５】



(I)

【００３０】

ここで、Ｙ’は細胞結合剤との反応を可能にする官能基を表し；

Qはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エステル、エーテル、カルバメートまたはアミド結合を通した薬物の連結を可能にする官能基を表し；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}は同じまたは異なっており、それはH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、2個から6個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-、陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$もしくはX-$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$、またはフェニルであり、ここで：

R_{11}、R_{12}およびR_{13}は同じまたは異なっており、それはH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルであり、Xはフェニルまたは1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し；

l、mおよびnは0または1から4までの整数であり；

Aはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、または陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-、および陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$もしくはX-$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される荷電した置換基であり、ここでXは上記と同じ定義を有し、ここでgは0または1であり；

Zは式$(OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでpは0もしくは2から約10000までの整数であり、またはF1-E1-P-E2-F2単位であり、ここでE1およびE2は同じもしくは異なっており、それはC=O、O、もしくはNR14であり、ここでR_{14}はH、1個から6個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、3個から6個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、2個から6個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Pは2~20アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでE1もしくはE2は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の1つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにF1およびF2は同じもしくは異なっており、それは式$(OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでpは0もしくは2から約10000までの整数であり、ZがF1-E1-P-E2-F2では無いならば、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも1個は荷電した置換基であり、またはgが1である場合、A、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の内の少なくとも1個は荷電した置換基である。

【００３１】

[63] 細胞結合剤との反応を可能にする官能基Y'の例には、アミン反応性薬剤、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、N-ヒドロキシスクシンイミド（N-hydroxysuccinmide）エステル類、p-ニトロフェニルエステル類、ジニトロフェニルエステル類、ペンタフルオロフェニルエステル類；チオール反応性薬剤、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、ピリジルジスルフィド類、ニトロピリジルジスルフィド類、マレイミド類、ハロアセテート類およびカルボン酸クロリド類が含まれる。

【００３２】

[64] 細胞毒性薬物の連結を可能にする官能基Qの例には、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エステル、カルバメート、またはアミド結合を通した連結を可能にする基が含まれる。その官能基には、チオール、ジスルフィド、アミノ、カルボキシ、アルデヒド類、マレイミド、ハロアセチル、ヒドラジン類、およびヒ

ドロキシが含まれるが、それらに限定されない。

【００３３】

[65] 直鎖アルキル類の例には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルが含まれる。３～６個の炭素原子を有する分枝または環状アルキル類の例には、イソプロピル、ｓｅｃ-ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ-ブチル、ペンチル、ヘキシル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、およびシクロヘキシルが含まれる。

【００３４】

[66] ２～６個の炭素原子を有する直鎖アルキル類の例には、エテニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニルが含まれる。２～６個の炭素原子を有する分枝または環状アルケニル類の例には、イソブテニル、イソペンテニル、２-メチル-１-ペンテニル、２-メチル-２-ペンテニルが含まれる。

【００３５】

[67] ２～６個の炭素原子を有する直鎖アルキニル類の例には、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニルが含まれる。６個までの炭素原子を有する分枝または環状アルキニル類の例には、３-メチル-１-ブチニル、３-メチル-１-ペンチニル、４-メチル-２-ヘキシニルが含まれる。

【００３６】

[68] 好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネート、ホスフェートまたはトリアルキルアンモニウムから選択される荷電した置換基であり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｑおよび Ｙ’はそれぞれ独立してジスルフィド置換基、マレイミド、ハロアセチル基、またはＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。別のより好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｑはジスルフィド、マレイミドまたはハロアセチル部分であり、Ｙ’はマレイミド部分またはＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。さらにもっと好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｑはピリジルジチオまたはニトロピリジルジチオ基、マレイミドまたはハロアセチル部分であり、Ｙ’はＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。

【００３７】

[69] 式（Ｉ）の２-ジチオニトロピリジルおよび２-ジチオ-ジニトロピリジルを含むクロスリンカーの合成は、例えば図１、２において示されており、対応する式（Ｉ）の４-ジチオニトロピリジルおよび４-ジチオ-ジニトロピリジルを含むクロスリンカーの合成は、例えば図６において示されている。スルホネート基を有する式（Ｉ）のマレイミドを含む荷電したクロスリンカーの合成は、例えば図３、４および５において示されている。ホスフェート基を有する式（Ｉ）のマレイミドを含む荷電したクロスリンカーの合成は、例えば図９および１０において示されている。式（Ｉ）の第四級アミンを含む荷電したクロスリンカーの合成は、例えば図１３および１４において示されている。式（Ｉ）のポリエチレングリコールを含む荷電したクロスリンカーの合成は、例えば図１７～２１において示されている。酸不安定性結合を通した連結を可能にするヒドラジド部分を有する式（Ｉ）の荷電したクロスリンカーの合成は、例えば図２４～３６において示されている。

【００３８】

細胞結合剤薬物コンジュゲート

[70] 荷電またはプロ荷電クロスリンカーを用いて、高い数（＞６）の薬物分子を導入することができる。限定的で無い例において、図５７は、本発明の荷電したクロスリンカーを用いて調製された細胞結合剤-薬物コンジュゲートが高い効力を示すことを例証している。加えて、高い数の薬物分子の連結の後でさえもそのコンジュゲートは標的細胞に対して非常に効力が強いが非標的細胞に対しては遥かに効力が弱いため、その効力は標的選択的である（例えば図５８を参照）。図５９において例証されているように、質量スペク

トル分析はその薬物が細胞結合剤に荷電したクロスリンカーを通して共有結合により連結されていることを示している。

【００３９】

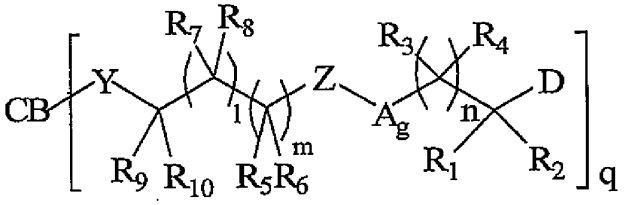
[71] 本発明のコンジュゲートは次の式、ＣＢ-(-L^c-Ｄ)$_q$により表すことができ、ここでＣＢは細胞結合剤であり、L^cは荷電またはプロ荷電リンカーであり、Ｄは薬物分子であり、ｑは１から２０までの整数である。

【００４０】

[72] 好ましくは、コンジュゲートは次の式（ＩＩ）を有する：

【００４１】

【化６】



(II)

【００４２】

ここで、ＣＢは細胞結合剤を表し、

Ｄはジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エステル、カルバメート、またはアミド結合により細胞結合剤に連結された薬物を表し；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニル、陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-、陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$もしくはX-$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$、またはフェニルであり、ここで：

R_{11}、R_{12}およびR_{13}は同じまたは異なっており、それはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝または環状アルキルであり、Ｘはフェニルまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキルを表し；

１、ｍおよびｎは０または１から４までの整数であり；

Ａはフェニルまたは置換されたフェニルであり、ここでその置換基は、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、または３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、または陰イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、SO_3^-、X-SO_3^-、OPO_3^{2-}、X-OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、X-PO_3^{2-}、CO_2^-、陽イオン、例えば、それらに限定されるわけでは無いが、窒素を含む複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$もしくはX-$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$から選択される荷電した置換基であり、ここでＸは上記と同じ定義を有し、ここでｇは０または１であり；

Ｚは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、またはＦ１-Ｅ１-Ｐ-Ｅ２-Ｆ２単位であり、ここでＥ１およびＥ２は同じもしくは異なっており、それはＣ＝Ｏ、Ｏ、もしくはＮＲ１４であり、ここでR_{14}はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝もしくは環状アルキル、２個から６個までの炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルケニルもしくはアルキニルであり；Ｐは２～

２０アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１もしくはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じもしくは異なっており、それは式（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０もしくは２から約１０００までの整数であり、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２では無いならば、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$、およびＲ$_{10}$の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり、またはｇが１である場合、Ａ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、Ｒ$_9$、およびＲ$_{10}$の内の少なくとも１個は荷電した置換基であり；

Ｙはカルボニル、チオエーテル、アミド、ジスルフィド、またはヒドラゾン基を表し；

ｑは１から２０までの整数を表す。

【００４３】

[73] 下記でより詳細に記述するように、その薬物は多くの小さい分子の薬物の内のいずれかであることができ、それにはマイタンシノイド類、ＣＣ－１０６５類似体、モルホリノ類（ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏｓ）、ドキソルビシン類、タキサン類（ｔａｘａｎｅｓ）、クリプトフィシン類（ｃｒｙｐｔｏｐｈｙｃｉｎｓ）、エポチロン類（ｅｐｏｔｈｉｌｏｎｅｓ）、カリケアマイシン類（ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎｓ）、アウリスタチン類（ａｕｒｉｓｔａｔｉｎｓ）、およびピロロベンゾジアゼピン（ｐｙｒｒｏｌｏｂｅｎｚｏｄｉａｚｅｐｉｎｅ）二量体類が含まれるがそれらに限定されない。

【００４４】

[74] 好ましい態様において、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_9$、Ｒ$_{10}$の内の１個はスルホネート、ホスフェート、カルボキシレートまたはトリアルキルアンモニウムから選択される荷電した置換基であり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｄはマイタンシノイド、ＣＣ－１０６５類似体またはピロロベンゾジアゼピン二量体である。別のより好ましい態様において、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_9$、Ｒ$_{10}$の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｄはジスルフィド、チオエステル、もしくはチオエーテル結合を通して連結されたマイタンシノイド、ＣＣ－１０６５類似体またはピロロベンゾジアゼピン二量体である。さらにもっと好ましい態様において、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_9$、Ｒ$_{10}$の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｑはマイタンシノイド、ＣＣ－１０６５類似体、またはタキサンである。

【００４５】

[75] 好ましい態様において、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２単位である場合、Ｅ１およびＥ２は同じまたは異なっており、それはＣ＝ＯまたはＮＲ１４であり、ここでＲ$_{14}$はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝または環状アルキルであり、Ｐは２～８アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１またはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ、好ましいアミノ酸残基はグリシン（ｇｌｙ）、アラニン（ａｌａ）、ロイシン（ｌｅｕ）、グルタミン酸（ｇｌｕ）、またはリシン（ｌｙｓ）であり、それはあらゆる組み合わせまたはあらゆる順序（例えば、ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙまたはａｌａ－ｌｅｕ－ａｌａ－ｌｅｕ等）で用いることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じまたは異なっており、それは式（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０または２から約１０００までの整数である。

【００４６】

[76] より好ましい態様において、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２単位である場合、Ｅ１およびＥ２は同じまたは異なっており、それはＣ＝ＯまたはＮＲ１４であり、ここでＲ$_{14}$はＨまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキルであり、Ｐは２～５アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１またはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されているこ

とができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じまたは異なっており、それは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０または２から２４までの整数である。

【００４７】

[77] 好ましくは、それぞれの細胞結合剤に結合している薬物の数であるｑは１～２０、より好ましくは２～１８、さらにもっと好ましくは２～１６、最も好ましくは２～１０である。

【００４８】

[78] そのコンジュゲートを合成するため、その細胞結合剤を本発明のクロスリンカーを用いて修飾して反応性ジスルフィド基、マレイミド、ハロアセチルまたはヒドラジド基を導入することができる。ジスルフィド結合を通して連結された細胞結合剤-薬物コンジュゲートの合成は、修飾された細胞結合剤中のジスルフィド結合と遊離のチオール基を含む薬物の間のジスルフィド交換により成し遂げられる。チオエーテルを通して連結された細胞結合剤-薬物コンジュゲートの合成は、マレイミドまたはハロアセチルで修飾された細胞結合剤と遊離のチオール基を含む薬物の反応により成し遂げられる。酸不安定性ヒドラゾン結合を有するコンジュゲートの合成は、当分野で既知の方法（例えば、P. Hamann et al., BioConjugate Chem, 13; 40-46, 2002; B. Laguzza et al., J. Med. Chem, 32; 548-555, 1959; P. Trail et al., Cancer Res., 57; 100-105, 1997を参照）により、カルボニル基とリンカー中のヒドラジド部分の反応により成し遂げることができる。

【００４９】

[79] あるいは、その薬物は本発明のクロスリンカーを用いて修飾して細胞結合剤と反応することができる官能性を有する式（ＩＶ）の修飾された薬物を与えることができる。例えば、チオールを含む薬物は、マレイミド置換基を有する式（Ｉ）の荷電またはプロ荷電クロスリンカーと水性緩衝液中で中性ｐＨにおいて反応して、チオエーテル結合を通してその荷電したリンカーにつながった薬物を与えることができる。チオールを含む薬物は、ピリジルジチオ部分を有する荷電したリンカーとのジスルフィド交換を経て、ジスルフィド結合を通してその荷電したクロスリンカーに結合した修飾された薬物を与えることができる。ヒドロキシル基を有する薬物は、ハロゲンを有する荷電またはプロ荷電クロスリンカーと穏やかな塩基の存在下で反応してエーテル結合を有する修飾された薬物を与えることができる。ヒドロキシル基を含む薬物は、カルボキシル基を有する式（Ｉ）の荷電したクロスリンカーと脱水剤、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下で縮合してエステル結合を与えることができる。アミノ基を含む薬物は、同様に式（Ｉ）の荷電またはプロ荷電クロスリンカー上のカルボキシル基との縮合を経てアミド結合を与えることができる。

【００５０】

[80] そのコンジュゲートは、標準的な生化学的手段、例えばＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５もしくはＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ３００カラム上でのゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、およびイオン交換により、または透析により、以前に記述されたようにして精製されてよい。ある場合（例えば葉酸、メラニン細胞刺激ホルモン、ＥＧＦ等）では、その細胞結合剤-薬物コンジュゲートはクロマトグラフィーにより、例えばＨＰＬＣ、中圧カラムクロマトグラフィーまたはイオン交換により精製することができる。

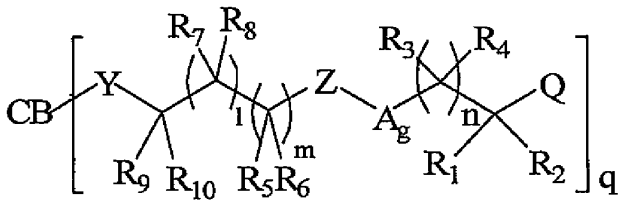
【００５１】

修飾された細胞結合剤

[81] 本発明のクロスリンカーとの反応により修飾された細胞結合剤は好ましくは式（ＩＩＩ）により表され：

【００５２】

【化７】



(III)

【００５３】

ここで、その置換基は荷電またはプロ荷電リンカーおよび細胞結合剤薬物コンジュゲートに関して上記で記述されたものである。

[82] 好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネート、ホスフェート、カルボキシルまたはトリアルキルアンモニウムから選択される荷電した置換基であり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｑはジスルフィド置換基、マレイミド、ハロアセチル基、またはＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルであり、Ｙはチオエーテル、アミド、またはジスルフィドである。別のより好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｑはジスルフィド、マレイミドまたはハロアセチル部分であり、Ｙはチオエーテル、アミド、またはジスルフィドである。さらにもっと好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｑはピリジルジチオまたは二トロピリジルジチオ基であり、Ｙはチオエーテル、アミド、またはジスルフィドである。

【００５４】

[83] 好ましい態様において、ＺがＦ１-Ｅ１-Ｐ-Ｅ２-Ｆ２単位である場合、Ｅ１およびＥ２は同じまたは異なっており、それはＣ＝ＯまたはＮＲ１４であり、ここでR_{14}はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝または環状アルキルであり、Ｐは２～８アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１またはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ、好ましいアミノ酸残基はグリシン（ｇｌｙ）、アラニン（ａｌａ）、ロイシン（ｌｅｕ）、グルタミン酸（ｇｌｕ）、またはリシン（ｌｙｓ）であり、それはあらゆる組み合わせまたはあらゆる順序（例えば、ｇｌｙ-ｇｌｙ-ｇｌｙまたはａｌａ-ｌｅｕ-ａｌａ-ｌｅｕ等）で用いることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じまたは異なっており、それは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０または２から約１０００までの整数である。

【００５５】

[84] より好ましい態様において、ＺがＦ１-Ｅ１-Ｐ-Ｅ２-Ｆ２単位である場合、Ｅ１およびＥ２は同じまたは異なっており、それはＣ＝ＯまたはＮＲ１４であり、ここでR_{14}はＨまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキルであり、Ｐは２～５アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１またはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じまたは異なっており、それは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０または２から２４までの整数である。

【００５６】

[85] 修飾された細胞結合剤は、細胞結合剤を当分野で他のクロスリンカーに関して既知の方法により荷電したクロスリンカーと反応させることにより調製することができる（

米国特許第６，３４０，７０１　Ｂ１号、第５，８４６，５４５号、第５，５８５，４９９号、第５，４７５，０９２号、第５，４１４，０６４号、第５，２０８，０２０号、および第４，５６３，３０４号；R.V.J. Chari et al. Cancer Research 52, 127-131, 1992; R.V.J. Chari et al. Cancer Research 55, 4079-4084, 1995; J. Carlsson et al. 173 Biochem J. (1978) 723-737(1978); Goff, D. A., Carroll, S. F. 1 BioConjugate Chem 381-386 (1990); L. Delprino et al. 82 J. Pharm Sci. 506-512 (1993); S. Arpicco et al., 8 BioConjugate Chem 327-337 (1997))。好都合なことに、そのクロスリンカー基は水溶性であり、または水溶液中で可溶性を維持するのにごく小さな百分率の有機溶媒しか必要としないため、その細胞結合剤とそのクロスリンカーの間の反応は水溶液中で実施することができる。そのクロスリンク試薬を、場合により水と混和性の少量（典型的には＜１０体積％）の極性有機溶媒、例えば様々なアルコール類、例えばメタノール、エタノール、およびプロパノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、またはジメチルスルホキシドを含む水性緩衝液中で高濃度で、例えば１～１００ｍＭで溶解させ、次いで適切な分割量（ａｌｉｑｕｏｔ）を細胞結合剤の緩衝された水溶液に添加する。適切な分割量は、細胞結合剤あたり１～１０個のクロスリンク基、好ましくは１～５個の基を導入する溶液の量であり、添加される体積は細胞結合剤溶液の体積の１０％、好ましくは５％、最も好ましくは０～３％を超えるべきでは無い。細胞結合剤のための水溶液は、ｐＨ６～９、好ましくは６．５～７．５で緩衝されており、これらのｐＨ範囲に関して有用なあらゆる非求核性緩衝塩類を含むことができる。典型的な緩衝液にはホスフェート、トリエタノールアミンＨＣｌ、ＨＥＰＥＳ、およびＭＯＰＳ緩衝液が含まれ、それは追加の構成要素、例えばスクロースおよび塩類、例えばＮａＣｌを含むことができる。添加の後、反応を４℃から４０℃までの温度で、好ましくは周囲温度で保温する。反応の進行は、４９５ｎｍまたは別の適切な波長における吸収の増大を測定することにより監視することができる。反応が完了した後、修飾された細胞結合剤の単離を、型にはまった方法で、例えばゲル濾過クロマトグラフィーまたは吸着クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【００５７】

[86] 修飾の程度は、放出されたニトロピリジン　チオン、ジニトロピリジン　ジチオン、カルボキサミドピリジン　ジチオンまたはジカルボキサミドピリジン　ジチオン基の吸収を測定することにより評価することができる。限定的で無い例において、図５６は細胞結合剤であるＣ２４２抗体の本発明のスルホネートクロスリンカーを用いた修飾の結果を示す。リンカー／抗体（Ｌ／Ａ）組み込みの時間経過を、例えば連結された薬物／抗体（Ｄ／Ａ）と共に示す。本明細書で記述される荷電またはプロ荷電クロスリンカーは、適切な置換基を有するあらゆる細胞結合剤と反応することができる様々な官能基を有する。例えば、アミノまたはヒドロキシル置換基を有する細胞結合剤はＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルを有するクロスリンカーと反応することができ、チオール置換基を有する細胞結合剤はマレイミドまたはハロアセチル基を有するクロスリンカーと反応することができる。加えて、カルボニル置換基を有する細胞結合剤はヒドラジドを有するクロスリンカーと反応することができる。当業者は、細胞結合剤上の利用可能な官能基の既知の反応性に基づいて、どのクロスリンカーを使用すべきかをすぐに決定することができる。

【００５８】

[87] 正電荷を有するクロスリンカー（例えば化合物２１４、図７１）は、場合により有機性共溶媒（例えば１～２０％ジメチルアセトアミドまたはエタノール）を含むｐＨ５～９の水性緩衝液中で細胞結合剤と直接反応して正電荷およびチオール基を有する修飾された細胞結合剤を与えることができる。その細胞結合剤のチオール基は、マレイミド、ハロアセトアミドまたは活性なジスルフィド（例えばピリジルジチオ、ニトロピリジルジチオ基）のいずれかを有する細胞毒性薬物と反応してコンジュゲートを与えることができる。そのコンジュゲートは上記の方法により精製することができる。

【００５９】

[88] あるいは、正電荷および反応性エステルを有するクロスリンカー（例えば化合物

２１６、図７１）を細胞結合剤と（例えば、そのリシンのアミノ基を通して）直接反応させて正電荷および活性なジスルフィドを導入することができる。上記のようなチオールを含む細胞毒性薬物との反応は、正電荷を有するコンジュゲートを与えることができる。

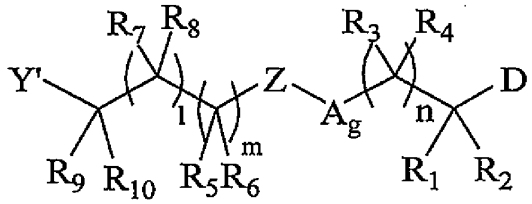
【００６０】

修飾された細胞毒性薬物

[89] 本発明のクロスリンカーとの反応により修飾された細胞毒性薬物は、好ましくは式（ＩＶ）により表され：

【００６１】

【化８】



(IV)

【００６２】

ここで、その置換基は荷電またはプロ荷電リンカーおよび細胞結合剤薬物コンジュゲートに関して上記で記述されたものである。

[90] 好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネート、ホスフェート、カルボキシルまたはトリアルキルアンモニウムから選択される荷電した置換基であり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｙ’はジスルフィド置換基、マレイミド、ハロアセチル基、またはＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。別のより好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｙ’はマレイミド部分またはＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。さらにもっと好ましい態様において、R_1、R_2、R_3、R_4、R_9、R_{10}の内の１個はスルホネートであり、残りはＨであり、ｌ、ｇおよびｍはそれぞれ０であり、ｎ＝１であり、Ｙ’はＮ-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。

【００６３】

[91] 好ましい態様において、ＺがＦ１-Ｅ１-Ｐ-Ｅ２-Ｆ２単位である場合、Ｅ１およびＥ２は同じまたは異なっており、それはＣ＝ＯまたはＮＲ１４であり、ここでR_{14}はＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３個から６個までの炭素原子を有する分枝または環状アルキルであり、Ｐは２～８アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１またはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ、好ましいアミノ酸残基はグリシン（ｇｌｙ）、アラニン（ａｌａ）、ロイシン（ｌｅｕ）、グルタミン酸（ｇｌｕ）、またはリシン（ｌｙｓ）であり、それはあらゆる組み合わせまたはあらゆる順序（例えば、ｇｌｙ-ｇｌｙ-ｇｌｙまたはａｌａ-ｌｅｕ-ａｌａ-ｌｅｕ等）で用いることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じまたは異なっており、それは式$(OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０または２から約１０００までの整数である。

【００６４】

[92] より好ましい態様において、ＺがＦ１-Ｅ１-Ｐ-Ｅ２-Ｆ２単位である場合、Ｅ１およびＥ２は同じまたは異なっており、それはＣ＝ＯまたはＮＲ１４であり、ここでR_{14}はＨまたは１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキルであり、Ｐは２～５アミノ酸長のペプチド単位であり、ここでＥ１またはＥ２は末端の窒素、末端の炭素を通

して、またはペプチドのアミノ酸の内の１つの側鎖を通してペプチドに連結されていることができ；ならびにＦ１およびＦ２は同じまたは異なっており、それは式（$OCH_2CH_2)_p$の任意のポリエチレンオキシ単位であり、ここでｐは０または２から２４までの整数である。

【００６５】

[93] その修飾された薬物は、その薬物を本発明のクロスリンカーと反応させて、細胞結合剤と反応することができる官能性を有する式（ＩＶ）の修飾された薬物を与えることにより調製することができる。例えば、チオールを含む薬物は、マレイミド置換基を有する式（Ｉ）の荷電またはプロ荷電クロスリンカーと水性緩衝液中で中性ｐＨにおいて反応して、チオエーテル結合を通してその荷電またはプロ荷電リンカーにつながった薬物を与えることができる。チオールを含む薬物は、ピリジルジチオ部分を有する荷電またはプロ荷電リンカーとのジスルフィド交換を経て、ジスルフィド結合を通してその荷電またはプロ荷電リンカーに結合した修飾された薬物を与えることができる。ヒドロキシル基を有する薬物は、ハロゲンを有する荷電したクロスリンカーと穏やかな塩基の存在下で反応してエーテル結合を有する修飾された薬物を与えることができる。ヒドロキシル基を含む薬物は、カルボキシル基を有する式（Ｉ）の荷電したクロスリンカーと脱水剤、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下で縮合してエステル結合を与えることができる。アミノ基を含む薬物は、同様に式（Ｉ）の荷電またはプロ荷電クロスリンカー上のカルボキシル基との縮合を経てアミド結合を与えることができる。その修飾された薬物は、標準的な方法、例えばシリカゲルもしくはアルミナ上でのカラムクロマトグラフィー、結晶化、分取薄層クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはＨＰＬＣにより精製することができる。

【００６６】

細胞結合剤

[94] 本発明のコンジュゲートおよび修飾された細胞結合剤を構成する細胞結合剤は、現在既知である、または既知になったあらゆる種類のものであってよく、ペプチド類および非ペプチド類を含む。その細胞結合剤は、特異的または非特異的な方式のどちらかで細胞に結合することができるあらゆる化合物であってよい。一般に、これらは抗体（特にモノクローナル抗体および抗体断片）、ａｄｎｅｃｔｉｎ類（米国公開番号：２００７００８２３６５）、インターフェロン類、リンフォカイン類、ホルモン類、成長因子類、ビタミン類、栄養素輸送分子類（例えばトランスフェリン）、またはあらゆる他の細胞結合性の分子または物質であることができる。

【００６７】

[95] 細胞結合剤が抗体（例えば、マウス、ヒト、ヒト化（ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）、表面再構成（ｒｅｓｕｒｆａｃｅｄ）またはキメラまたは当業者に既知のあらゆる他の抗体）である場合、それは抗原に結合し、それはポリペプチドであり、膜貫通型分子（例えば受容体）またはリガンド、例えば成長因子であってよい。代表的な抗原には、例えば次の分子が含まれる：レニン；ヒトの成長ホルモンおよびウシの成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質類；アルファ-１-アンチトリプシン；インスリンＡ鎖；インスリンＢ鎖；プロインスリン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；凝固因子、例えば因子ｖｍｃ、第ＩＸ因子、組織因子（ＴＦ）、およびフォン・ヴィレブランド因子；抗凝固因子、例えばプロテインＣ；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性物質；プラスミノゲン活性化因子、例えばウロキナーゼまたはヒトの尿もしくは組織型プラスミノゲン活性化因子（ｔ-ＰＡ）；ボンベシン；トロンビン；造血成長因子；腫瘍壊死因子アルファおよびベータ；エンケファリナーゼ；ＲＡＮＴＥＳ（活性化の際に制御される、通常Ｔ細胞で発現され、分泌される（ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｏｎ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｎｏｒｍａｌｌｙ Ｔ-ｃｅｌｌ ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ａｎｄ ｓｅｃｒｅｔｅｄ））；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ-１-アルファ）；血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン；ミュラー管抑制物質；リラキシンＡ鎖；リラキシンＢ鎖；プロリラキ

シン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；微生物のタンパク質、例えばベータラクタマーゼ；ＤＮアーゼ；ＩｇＥ；細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原（ＣＴＬＡ）、例えばＣＴＬＡ－４；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）；ホルモンまたは増殖因子の受容体；プロテインＡまたはＤ；リウマチ因子；神経栄養因子、例えば骨由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、ニューロトロフィン－３、－４、－５、もしくは－６（ＮＴ－３、ＮＴ４、ＮＴ－５、もしくはＮＴ－６）、または神経成長因子、例えばＮＧＦ－β；血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）；線維芽細胞成長因子、例えばａＦＧＦおよびｂＦＧＦ；上皮成長因子（ＥＧＦ）；トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）、例えばＴＧＦ－アルファおよびＴＧＦ－ベータ、これにはＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４、またはＴＧＦ－β５が含まれる；インスリン様成長因子－Ｉおよび－ＩＩ（ＩＧＦ－ＩおよびＩＧＦ－ＩＩ）；ｄｅｓ（１－３）－ＩＧＦ－Ｉ（脳ＩＧＦ－Ｉ）、インスリン様成長因子結合タンパク質類、ＥｐＣＡＭ、ＧＤ３、ＦＬＴ３、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＳＴＥＡＰ、ＣＥＡ、ＴＥＮＢ２、ＥｐｈＡ受容体、ＥｐｈＢ受容体、葉酸受容体、メソテリン（ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ）、ｃｒｉｐｔｏ、アルファ$_{v}$ベータ$_{6}$（ａｌｐｈａ$_{v}$ｂｅｔａ$_{6}$）、インテグリン類、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、トランスフェリン（ｔａｒｎｓｆｅｒｒｉｎ）受容体、ＩＲＴＡ１、ＩＲＴＡ２、ＩＲＴＡ３、ＩＲＴＡ４、ＩＲＴＡ５；ＣＤタンパク質、例えばＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ６、ＣＤ８、ＣＤ１１、ＣＤ１４、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２６、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３６、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ５２、ＣＤ５５、ＣＤ５６、ＣＤ５９、ＣＤ７０、ＣＤ７９、ＣＤ８０、ＣＤ８１、ＣＤ１０３、ＣＤ１０５、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１３８、ＣＤ１５２または米国公開番号２００８０１７１０４０もしくは米国公開番号２００８０３０５０４４において開示されている１種類以上の腫瘍関連抗原もしくは細胞表面受容体に結合する抗体、それらをそのまま援用する；エリスロポエチン；骨誘導因子（ｏｓｔｅｏｉｎｄｕｃｔｉｖｅ ｆａｃｔｏｒｓ）；免疫毒素；骨形成タンパク質（ＢＭＰ）；インターフェロン、例えばインターフェロン－アルファ、－ベータ、および－ガンマ；コロニー刺激因子類（ＣＳＦｓ）、例えばＭ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＧ－ＣＳＦ；インターロイキン類（ＩＬｓ）、例えばＩＬ－１～ＩＬ－１０；スーパーオキシドジスムターゼ；Ｔ細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；例えばＨＩＶのエンベロープの一部のようなウイルス抗原；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレシン類（ａｄｄｒｅｓｓｉｎｓ）；調節タンパク質；インテグリン類、例えばＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＩＣＡＭ、ＶＬＡ－４、ＥｐＣＡＭおよびＶＣＡＭ；腫瘍関連抗原、例えばＨＥＲ２、ＨＥＲ３またはＨＥＲ４受容体；ならびに上記で列挙したポリペプチドの内のいずれかの断片。

【００６８】

[96] 本発明に含まれる抗体に関する好ましい抗原には、次のものも含まれる：ＣＤタンパク質、例えばＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３４、およびＣＤ４６；ＥｒｂＢ受容体ファミリーのメンバー、例えばＥＧＦ受容体、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３またはＨＥＲ４受容体；細胞接着分子、例えばＬＦＡ－１、Ｍａｃ１、ｐ１５０．９５、ＶＬＡ－４、ＩＣＡＭ－１、ＶＣＡＭ、ＥｐＣＡＭ、アルファ$_{4}$／ベータ$_{7}$インテグリン、およびアルファｖ／ベータ３インテグリン、それらのアルファまたはベータサブユニットのどちらかを含む（例えば抗ＣＤ１１ａ、抗ＣＤ１８または抗ＣＤ１１ｂ抗体）；成長因子、例えばＶＥＧＦ；組織因子（ＴＦ）；ＴＧＦ－β；アルファインターフェロン（アルファ－ＩＦＮ）；インターロイキン、例えばＩＬ－８；ＩｇＥ；血液型抗原Ａｐｏ２、デスレセプター；ｆｌｋ２／ｆｌｔ３受容体；肥満（ＯＢ）受容体；ｍｐｌ受容体；ＣＴＬＡ－４；プロテインＣ等。用いることができる好ましい抗体は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ６、ＣＤ１１、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２６、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ５６、ＣＤ７９、ＣＤ１０５、ＣＤ１３８、ＥｐｈＡ受容体（例えば、ＥｐｈＡ２受容体）、ＥｐｈＢ受容体、ＥＧＦｒ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、トラスツズマブ（ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ

)、ペルツズマブ（ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ） メソテリン、ｃｒｉｐｔｏ、アルファ$_{v}$ベータ$_{6}$、インテグリン類、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、葉酸受容体（例えば、ＦＯＬＲ１）、トランスフェリン受容体、ＧＤ３、ＥｐＣＡＭに対する抗体、または米国公開番号２００８０１７１０４０もしくは米国公開番号２００８０３０５０４４において開示されている１種類以上の腫瘍関連抗原もしくは細胞表面受容体に結合する抗体であり、それらをそのまま援用する。

【００６９】

[97] 用いることができる細胞結合剤の追加の例には次のものが含まれる：

- 表面再構成抗体（米国特許第５，６３９，６４１号）；
- 次のものから選択されるが、それらに限定されない、ヒト化、または完全なヒトの抗体：ｈｕＭｙ９－６、ｈｕＢ４、ｈｕＣ２４２、ｈｕＮ９０１、ＤＳ６、ＣＤ３８、ＩＧＦ－ＩＲ、ＣＮＴＯ ９５、Ｂ－Ｂ４、トラスツズマブ、ペルツズマブ、ビバツズマブ（ｂｉｖａｔｕｚｕｍａｂ）、シブロツズマブ（ｓｉｂｒｏｔｕｚｕｍａｂ）、およびリツキシマブ（ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）（例えば米国特許第５，６３９，６４１号、第５，６６５，３５７号；および第７，３４２，１１０号、米国仮特許出願第６０／４２４，３３２号、国際特許出願ＷＯ ０２／１６，４０１、米国特許公開番号２００６００４５８７７、米国特許公開番号２００６０１２７４０７、米国特許公開番号２００５０１１８１８３、Pedersen et al., (1994) J. Mol. Biol. 235, 959-973、Roguska et al., (1994) Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol 91, 969-973、上記、Colomer et al., Cancer Invest., 19: 49-56 (2001)、Heider et al., Eur. J. Cancer, 31A: 2385-2391 (1995)、Welt et al., J. Clin. Oncol., 12: 1193-1203 (1994)、およびMaloney et al., Blood, 90: 2188-2195 (1997)を参照）；ならびに
- 抗体のエピトープ結合断片、例えばｓＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、およびＦ（ａｂ’）$_{2}$（Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al, J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff et al, Arch. Biochem Biophys. 89:230-244 (1960)）。

【００７０】

追加の細胞結合剤には、次のものにより例示される他の細胞結合タンパク質およびポリペプチドが含まれるが、それらに限定されない：

- アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ類；Zahnd et al., J. Biol. Chem, 281, 46, 35167-35175, (2006); Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) Nature Biotechnology, 23, 1257-1268）または例えば米国特許公開番号２００７０２３８６６７；米国特許第７，１０１，６７５号；およびＷＯ／２００７／１４７２１３；ＷＯ／２００７／０６２４６６）において記述されているアンキリン様リピートタンパク質もしくは合成ペプチド；
- インターフェロン類（例えばα、β、γ）；
- リンフォカイン類、例えばＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６；
- ホルモン類、例えばインスリン、ＴＲＨ（サイロトロピン放出ホルモン類）、ＭＳＨ（メラニン細胞刺激ホルモン）、ステロイドホルモン類、例えばアンドロゲン類およびエストロゲン類；
- ビタミン類、例えば葉酸；
- 成長因子類およびコロニー刺激因子類、例えばＥＧＦ、ＴＧＦ－α、Ｇ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦおよびＧＭ－ＣＳＦ（Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)）；ならびに
- トランスフェリン（O' Keefe et al, J. Biol. Chem 260:932-937 (1985)）。

【００７１】

[98] モノクローナル抗体の技法は、モノクローナル抗体の形の特異的な細胞結合剤の生産を可能にする。当分野で特によく知られているものは、マウス、ラット、ハムスターまたはいずれかの他の哺乳類を、興味のある抗原、例えば完全な標的細胞、標的細胞から単離した抗原、ウイルス全体、弱毒化したウイルス全体、およびウイルスタンパク質、例えばウイルスのコートタンパク質を用いて免疫することにより産生されるモノクローナル

抗体を作るための技法である。感作したヒト細胞を用いることもできる。モノクローナル抗体を作る別の方法は、ｓＦｖ（単鎖可変領域）、特にヒトのｓＦｖのファージライブラリーの使用である（例えばＧｒｉｆｆｉｔｈｓら、米国特許第５，８８５，７９３号；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、ＷＯ　９２／０１０４７；およびＬｉｍｉｎｇら、ＷＯ　９９／０６５８７を参照）。

【００７２】

[99] 適切な細胞結合剤の選択は、標的とする個々の細胞集団に依存する選択の問題であるが、一般には、適切なものが利用できるならば、モノクローナル抗体およびそのエピトープ結合断片が好まれる。

【００７３】

[100] 例えば、モノクローナル抗体Ｍｙ９は急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）細胞上で見つかったＣＤ３３抗原に特異的なマウスＩｇＧ$_{2a}$抗体であり（Roy et al. Blood 77:2404-2412 (1991)）、ＡＭＬの患者を処置するのに用いることができる。同様に、モノクローナル抗体抗Ｂ４はマウスＩｇＧ$_{1}$であり、それはＢ細胞上のＣＤ１９抗原に結合し（Nadler et al, J. Immunol. 131:244-250 (1983)）、標的細胞がＢ細胞、または非ホジキンリンパ腫もしくは慢性リンパ芽球性白血病におけるようなこの抗原を発現する罹病細胞である場合に用いることができる。同様に、抗体Ｎ９０１は、小細胞肺癌腫細胞上で、および神経内分泌由来の他の腫瘍の細胞上で見つかったＣＤ５６に結合するマウスのモノクローナルＩｇＧ$_{1}$抗体であり（Roy et al. J. Nat. Cancer Inst. 88:1136-1145 (1996)）、Ｃ２４２抗体はＣａｎＡｇ抗原に結合し、ペルツズマブ、トラスツズマブはＨＥＲ２／ｎｅｕに結合し、抗ＥＧＦ受容体抗体である。

【００７４】

[101] 加えて、骨髄細胞に結合するＧＭ-ＣＳＦは、急性骨髄性白血病からの罹病細胞に対する細胞結合剤として用いることができる。活性化されたＴ細胞に結合するＩＬ-２は、移植片拒絶の予防に、移植片対宿主疾患の療法および予防に、ならびに急性Ｔ細胞白血病の処置に用いることができる。メラニン細胞に結合するＭＳＨは、メラノーマの処置に用いることができる。卵巣癌および他の癌で発現している葉酸受容体を標的とする葉酸も適切な細胞結合剤である。

【００７５】

[102] 乳房および精巣の癌は、それぞれエストロゲン（またはエストロゲン類似体）またはアンドロゲン（またはアンドロゲン類似体）を細胞結合剤として用いてうまく標的とすることができる。

【００７６】

薬物

[103] 本発明において用いることができる薬物には、化学療法薬が含まれる。“化学療法薬”は、癌の処置において有用な化合物である。化学療法薬の例には次のものが含まれる：アルキル化剤、例えばチオテパ（ｔｈｉｏｔｅｐａ）およびシクロホスファミド（ＣＹＴＯＸＡＮ（商標））；アルキルスルホネート類、例えばブスルファン（ｂｕｓｕｌｆａｎ）、インプロスルファン（ｉｍｐｒｏｓｕｌｆａｎ）およびピポスルファン（ｐｉｐｏｓｕｌｆａｎ）；アジリジン類（ａｚｉｒｉｄｉｎｅｓ）、例えばベンゾドーパ（ｂｅｎｚｏｄｏｐａ）、カルボコン（ｃａｒｂｏｑｕｏｎｅ）、メツレドーパ（ｍｅｔｕｒｅｄｏｐａ）、およびウレドーパ（ｕｒｅｄｏｐａ）；エチレンイミン類およびメチルアメラミン類（ｍｅｔｈｙｌａｍｅｌａｍｉｎｅｓ）、アルトレタミン（ａｌｔｒｅｔａｍｉｎｅ）、トリエチレンメラミン（ｔｒｉｅｔｈｙｌｅｎｅｍｅｌａｍｉｎｅ）、トリエチレンホスホルアミド（ｔｒｉｅｔｙｌｅｎｅｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｅ）、トリエチレンチオホスホルアミド（ｔｒｉｅｔｈｙｌｅｎｅｔｈｉｏｐｈｏｓｐｈａｏｒａｍｉｄｅ）およびトリメチローロメラミン（ｔｒｉｍｅｔｈｙｌｏｌｏｍｅｌａｍｉｎｅ）を含む；アセトゲニン類（ａｃｅｔｏｇｅｎｉｎｓ）（特にブラタシン（ｂｕｌｌａｔａｃｉｎ）およびブラタシノン（ｂｕｌｌａｔａｃｉｎｏｎｅ））；カンプトテシン（ｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ）（合成類似体であるトポテカンを含む）；ブリオスタチン（ｂｒｙｏ

ｓｔａｔｉｎ）；カリスタチン（ｃａｌｌｙｓｔａｔｉｎ）；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン（ａｄｏｚｅｌｅｓｉｎ）、カルゼレシン（ｃａｒｚｅｌｅｓｉｎ）およびビゼレシン（ｂｉｚｅｌｅｓｉｎ）合成類似体を含む）；クリプトフィシン類（ｃｒｙｐｔｏｐｈｙｃｉｎｓ）（特に、クリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン（ｄｏｌａｓｔａｔｉｎ）；デュオカルマイシン（ｄｕｏｃａｒｍｙｃｉｎ）（その合成類似体であるＫＷ－２１８９およびＣＢＩ－ＴＭＩを含む）；エレウテロビン（ｅｌｅｕｔｈｅｒｏｂｉｎ）；パンクラチスタチン（ｐａｎｃｒａｔｉｓｔａｔｉｎ）；サルコディクチン（ｓａｒｃｏｄｉｃｔｙｉｎ）；スポンジスタチン（ｓｐｏｎｇｉｓｔａｔｉｎ）；ナイトロジェンマスタード類、例えばクロラムブシル（ｃｈｌｏｒａｍｂｕｃｉｌ）、クロルナファジン（ｃｈｌｏｒｎａｐｈａｚｉｎｅ）、コロホスファミド（ｃｈｏｌｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、エストラムスチン（ｅｓｔｒａｍｕｓｔｉｎｅ）、イホスファミド（ｉｆｏｓｆａｍｉｄｅ）、メクロレタミン（ｍｅｃｈｌｏｒｅｔｈａｍｉｎｅ）、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン（ｍｅｌｐｈａｌａｎ）、ノベムビチン（ｎｏｖｅｍｂｉｃｈｉｎ）、フェネステリン（ｐｈｅｎｅｓｔｅｒｉｎｅ）、プレドニムスチン（ｐｒｅｄｎｉｍｕｓｔｉｎｅ）、トロホスファミド（ｔｒｏｆｏｓｆａｍｉｄｅ）、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素類（ｎｉｔｒｏｓｕｒｅａｓ）、例えばカルムスチン（ｃａｒｍｕｓｔｉｎｅ）、クロロゾトシン（ｃｈｌｏｒｏｚｏｔｏｃｉｎ）、フォテムスチン（ｆｏｔｅｍｕｓｔｉｎｅ）、ロムスチン（ｌｏｍｕｓｔｉｎｅ）、ニムスチン（ｎｉｍｕｓｔｉｎｅ）、ラニムスチン（ｒａｎｉｍｕｓｔｉｎｅ）；抗生物質、例えばエネジイン（ｅｎｅｄｉｙｎｅ）抗生物質（例えばカリケアマイシン（ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎ）、特に、カリケアマイシンガンマ１およびカリケアマイシンシータＩ、例えばAngew Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994)を参照；ダイネマイシン（ｄｙｎｅｍｉｃｉｎ）、ダイネマイシンＡを含む；エスペラマイシン（ｅｓｐｅｒａｍｉｃｉｎ）；ならびに、ネオカルジノスタチンクロモフォア（ｎｅｏｃａｒｚｉｎｏｓｔａｔｉｎ　ｃｈｒｏｍｏｐｈｏｒｅ）および関連する色素タンパク質エネジイン抗生物質クロモモフォア類）、アクラシノマイシン類（ａｃｌａｃｉｎｏｍｙｓｉｎｓ）、アクチノマイシン、オースラマイシン（ａｕｔｈｒａｍｙｃｉｎ）、アザセリン（ａｚａｓｅｒｉｎｅ）、ブレオマイシン類（ｂｌｅｏｍｙｃｉｎｓ）、カクチノマイシン（ｃａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）、カラビシン（ｃａｒａｂｉｃｉｎ）、カルミノマイシン（ｃａｒｍｉｎｏｍｙｃｉｎ）、カルジノフィリン（ｃａｒｚｉｎｏｐｈｉｌｉｎ）；クロモマイシン類（ｃｈｒｏｍｏｍｙｃｉｎｓ）、ダクチノマイシン（ｄａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）、ダウノルビシン（ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ）、デトルビシン（ｄｅｔｏｒｕｂｉｃｉｎ）、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ドキソルビシン（モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン（ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ）、エソルビシン（ｅｓｏｒｕｂｉｃｉｎ）、イダルビシン（ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎ）、マルセロマイシン（ｍａｒｃｅｌｌｏｍｙｃｉｎ）、ナイトマイシン類（ｎｉｔｏｍｙｃｉｎｓ）、ミコフェノール酸（ｍｙｃｏｐｈｅｎｏｌｉｃ　ａｃｉｄ）、ノガラマイシン（ｎｏｇａｌａｍｙｃｉｎ）、オリボマイシン類（ｏｌｉｖｏｍｙｃｉｎｓ）、ペプロマイシン（ｐｅｐｌｏｍｙｃｉｎ）、ポトフィロマイシン（ｐｏｔｆｉｒｏｍｙｃｉｎ）、ピューロマイシン、クエラマイシン（ｑｕｅｌａｍｙｃｉｎ）、ロドルビシン（ｒｏｄｏｒｕｂｉｃｉｎ）、ストレプトニグリン（ｓｔｒｅｐｔｏｎｉｇｒｉｎ）、ストレプトゾシン（ｓｔｒｅｐｔｏｚｏｃｉｎ）、ツベルシジン（ｔｕｂｅｒｃｉｄｉｎ）、ウベニメクス（ｕｂｅｎｉｍｅｘ）、ジノスタチン（ｚｉｎｏｓｔａｔｉｎ）、ゾルビシン（ｚｏｒｕｂｉｃｉｎ）；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキセートおよび５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセート；プリン類似体、例えばフルダラビン（ｆｌｕｄａｒａｂｉｎｅ）、６－メルカプトプリン、チアミプリン（ｔｈｉａｍｉｐｒｉｎｅ）、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン（ｄｏｘｉｆｌｕｒｉｄｉｎｅ）、エノシタビン、フロクス

ウリジン、５－ＦＵ；アンドロゲン類、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎薬（ａｎｔｉ－ａｄｒｅｎａｌｓ）、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えばフロリン酸（ｆｒｏｌｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド（ａｌｄｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ　ｇｌｙｃｏｓｉｄｅ）；アミノレブリン酸；アムサクリン（ａｍｓａｃｒｉｎｅ）；ベストラブシル（ｂｅｓｔｒａｂｕｃｉｌ）；ビサントレン（ｂｉｓａｎｔｒｅｎｅ）；エダトラキセート（ｅｄａｔｒａｘａｔｅ）；デフォファミン（ｄｅｆｏｆａｍｉｎｅ）；デメコルシン（ｄｅｍｅｃｏｌｃｉｎｅ）；ジアジコン（ｄｉａｚｉｑｕｏｎｅ）；エルフォミチン（ｅｌｆｏｍｉｔｈｉｎｅ）；エリプチニウムアセテート（ｅｌｌｉｐｔｉｎｉｕｍ　ａｃｅｔａｔｅ）；エポチロン（ｅｐｏｔｈｉｌｏｎｅ）；エトグルシド（ｅｔｏｇｌｕｃｉｄ）；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン（ｌｅｎｔｉｎａｎ）；ロニダミン（ｌｏｎｉｄａｍｉｎｅ）；マイタンシノイド類、例えばマイタンシン（ｍａｙｔａｎｓｉｎｅ）およびアンサミトシン類（ａｎｓａｍｉｔｏｃｉｎｓ）；ミトグアゾン（ｍｉｔｏｇｕａｚｏｎｅ）；ミトキサントロン（ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ）；モピダモール（ｍｏｐｉｄａｍｏｌ）；ニトラクリン（ｎｉｔｒａｃｒｉｎｅ）；ペントスタチン（ｐｅｎｔｏｓｔａｔｉｎ）；フェナメット（ｐｈｅｎａｍｅｔ）；ピラルビシン（ｐｉｒａｒｕｂｉｃｉｎ）；ポドフィリン酸（ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）；ラゾキサン；リゾキシン（ｒｈｉｚｏｘｉｎ）；シゾフィラン（ｓｉｚｏｆｉｒａｎ）；スピロゲルマニウム（ｓｐｉｒｏｇｅｒｍａｎｉｕｍ）；テヌアゾン酸（ｔｅｎｕａｚｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）；トリアジクオン（ｔｒｉａｚｉｑｕｏｎｅ）；２，２’，２’’－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類（ｔｒｉｃｈｏｔｈｅｃｅｎｅｓ）、（特にＴ－２トキシン、ベラクリン（ｖｅｒｒａｃｕｒｉｎ）Ａ、ロリジン（ｒｏｒｉｄｉｎ）Ａおよびアングイジン（ａｎｇｕｉｄｉｎｅ））；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール（ｍｉｔｏｂｒｏｎｉｔｏｌ）；ミトラクトール（ｍｉｔｏｌａｃｔｏｌ）；ピポブロマン（ｐｉｐｏｂｒｏｍａｎ）；ガシトシン（ｇａｃｙｔｏｓｉｎｅ）；アラビノシド（ｅ）（“Ａｒａ－Ｃ”）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド類（ｔａｘｏｉｄｓ）、例えばパクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）（ＴＡＸＯＬ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ、ニュージャージー州プリンストン）およびドキセタキセル（ｄｏｘｅｔａｘｅｌ）（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）、Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ　Ｒｏｒｅｒ、フランス、アントニー）；クロラムブシル；ゲムシタビン（ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ）；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；プラチナ類似体、例えばシスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；プラチナ；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；マイトマイシンＣ；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン（ｖｉｎｏｒｅｌｂｉｎｅ）；ナベルビン（ｎａｖｅｌｂｉｎｅ）；ノバントロン（ｎｏｖａｎｔｒｏｎｅ）；テニポシド（ｔｅｎｉｐｏｓｉｄｅ）；ダウノマイシン（ｄａｕｎｏｍｙｃｉｎ）；アミノプテリン；ゼローダ（ｘｅｌｏｄａ）；イバンドロネート（ｉｂａｎｄｒｏｎａｔｅ）；ＣＰＴ－１１；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオミチン（ｄｉｆｌｕｏｒｏｍｅｔｈｙｌｏｍｉｔｈｉｎｅ）（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸；カペシタビン（ｃａｐｅｃｉｔａｂｉｎｅ）；ならびに上記のいずれかの医薬的に許容できる塩類、酸類、または誘導体。腫瘍に対するホルモンの作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば次のものもこの定義に含まれる：例えばタモキシフェン、ラロキシフェン（ｒａｌｏｘｉｆｅｎｅ）、アロマターゼを阻害する４（５）－イミダゾール類、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン（ｔｒｉｏｘｉｆｅｎｅ）、ケオキシフェン（ｋｅｏｘｉｆｅｎｅ）、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン（ｏｎａｐｒｉｓｔｏｎｅ）、およびトレミフェン（ｔｏｒｅｍｉｆｅｎｅ）（ファレストン（Ｆａｒｅｓｔｏｎ））を含む抗エストロゲン薬；ならびに抗アンドロゲン薬、例えばフルタミド（ｆｌｕｔａｍｉｄｅ）、ニルタミド（ｎｉｌｕｔａｍｉｄｅ）、ビカルタミド（ｂｉｃａｌｕｔａｍｉｄｅ

）、ロイプロリド（ｌｅｕｐｒｏｌｉｄｅ）、およびゴセレリン（ｇｏｓｅｒｅｌｉｎ）；ｓｉＲＮＡならびに上記のいずれかの医薬的に許容できる塩類、酸類、または誘導体。本発明と共に用いることができる他の化学療法薬が、米国公開番号２００８０１７１０４０または米国公開番号２００８０３０５０４４において開示されており、それらをそのまま援用する。

【００７７】

[104] 好ましい態様において、化学療法薬は本質的に小さい分子の薬物である。“小さい分子の薬物”は、本明細書において、例えば１００～１５００、より適切には１２０から１２００まで、好ましくは２００から１０００までの分子量を有していてよい、および典型的には約１０００未満の分子量を有する有機、無機、または有機金属化合物を指して広く用いられる。本発明の小さい分子の薬物は、約１０００未満の分子量を有するオリゴペプチドおよび他の生体分子を含む。小さい分子の薬物は当分野において、例えばとりわけＷＯ０５０５８３６７Ａ２、欧州特許出願第８５９０１４９５号および第８５９０３１９号において、ならびに米国特許第４，９５６，３０３号においてよく特性付けされており、それらをそのまま援用する。

【００７８】

[105] 好ましい小さい分子の薬物は、細胞結合剤への連結を可能にする小さい分子の薬物である。本発明には、既知の薬物および既知になる可能性がある薬物が含まれる。特に好ましい小さい分子の薬物には細胞毒性薬剤が含まれる。

【００７９】

[106] その細胞毒性薬剤は、結果として細胞の死をもたらす、または細胞死を誘導する、またはある方式で細胞の生存度を減少させるあらゆる化合物であってよく、ここでそれぞれの細胞毒性薬剤はチオール部分を含む。

【００８０】

[107] 好ましい細胞毒性薬剤はマイタンシノイド化合物、タキサン化合物、ＣＣ－１０６５化合物、ダウノルビシン化合物およびドキソルビシン化合物、ピロロベンゾジアゼピン二量体類、カリケアマイシン類である。アウリスタチン類ならびにその類似体および誘導体、そのいくつかを下記で記述する。

【００８１】

[108] 必ずしも小さい分子では無い他の細胞毒性薬剤、例えばｓｉＲＮＡも、本発明の範囲内に含まれる。例えば、ｓｉＲＮＡ類は本発明のクロスリンカーに、オリゴヌクレオチド類の修飾に関して一般的に用いられる方法により連結させることができる（例えば、米国特許公開２００５０１０７３２５および２００７０２１３２９２を参照）。従って、その３’または５’－ホスホラミダイト（ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｍｉｄｉｔｅ）の形のｓｉＲＮＡはヒドロキシル官能性を有するクロスリンカーの１つの末端と反応してｓｉＲＮＡとクロスリンカーの間にエステル結合を与える。同様に、ｓｉＲＮＡホスホラミダイトと末端アミノ基を有するクロスリンカーの反応は、結果としてそのクロスリンカーのｓｉＲＮＡへのアミンを通した連結をもたらす。ｓｉＲＮＡは米国特許公開番号：２００７０２７５４６５、２００７０２１３２９２、２００７０１８５０５０、２００７０１６１５９５、２００７００５４２７９、２００６０２８７２６０、２００６０００３５２５４、２００６０００８８２２、２００５０２８８２４４、２００５０１７６６６７において詳細に記述されており、それらをそのまま本明細書に援用する。

【００８２】

マイタンシノイド類

[109] 本発明において用いることができるマイタンシノイド類は当分野で周知であり、既知の方法に従って天然の源から単離する、または既知の方法に従って合成により調製することができる。

【００８３】

[110] 適切なマイタンシノイド類の例には、マイタンシノール（ｍａｙｔａｎｓｉｎｏｌ）およびマイタンシノール類似体が含まれる。適切なマイタンシノール類似体の例に

は、修飾された芳香環を有するマイタンシノール類似体および他の位置に修飾を有するマイタンシノール類似体が含まれる。

【００８４】

[111] 修飾された芳香環を有するマイタンシノールの適切な類似体の具体的な例には次のものが含まれる：

（１）Ｃ－１９－脱クロロ（米国特許第４，２５６，７４６号）（アンサミトシンＰ２のＬＡＨ還元により調製される）；

（２）Ｃ－２０－ヒドロキシ（またはＣ－２０－脱メチル）＋／－Ｃ－１９－脱クロロ（米国特許第４，３６１，６５０号および第４，３０７，０１６号）（ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）またはアクチノマイセス（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ）を用いる脱メチルまたはＬＡＨを用いる脱塩素により調製される）；および

（３）Ｃ－２０－脱メトキシ、Ｃ－２０－アシルオキシ（－ＯＣＯＲ）、＋／－脱クロロ（米国特許第４，２９４，７５７号）（アシルクロリド類を用いるアシル化により調製される）。

【００８５】

[112] 他の位置の修飾を有するマイタンシノールの適切な類似体の具体的な例には次のものが含まれる：

（１）Ｃ－９－ＳＨ（米国特許第４，４２４，２１９号）（マイタンシノールのＨ２ＳまたはＰ２Ｓ５との反応により調製される）；

（２）Ｃ－１４－アルコキシメチル（脱メトキシ／ＣＨ２ＯＲ）（米国特許第４，３３１，５９８号）；

（３）Ｃ－１４－ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル（ＣＨ２ＯＨまたはＣＨ２ＯＡｃ）（米国特許第４，４５０，２５４号）（ノカルジア（Ｎｏｃａｒｄｉａ）から調製される）；

（４）Ｃ－１５－ヒドロキシ／アシルオキシ（米国特許第４，３６４，８６６号）（ストレプトマイセスによるマイタンシノールの変換により調製される）；

（５）Ｃ－１５－メトキシ（米国特許第４，３１３，９４６号および第４，３１５，９２９号）（トレビア・ヌーディフロラ（Ｔｒｅｗｉａ　ｎｕｄｉｆｌｏｒａ）から単離された）；

（６）Ｃ－１８－Ｎ－脱メチル（米国特許第４，３６２，６６３号および第４，３２２，３４８号）（ストレプトマイセスによるマイタンシノールの脱メチルにより調製される）；

（７）４，５－脱オキシ（米国特許第４，３７１，５３３号）（マイタンシノールの３塩化チタン／ＬＡＨ還元により調製される）。

【００８６】

[113] 本発明において有用なチオールを含むマイタンシノイド類の合成は、米国特許第５，２０８，０２０号、第５，４１６，０６４号、および米国特許出願番号２００４０２３５８４０において完全に開示されている。

【００８７】

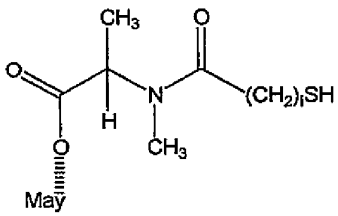
[114] Ｃ－３位、Ｃ－１４位、Ｃ－１５位またはＣ－２０位においてチオール部分を有するマイタンシノイド類は、全て有用であると予想される。Ｃ－３位が好ましく、マイタンシノールのＣ－３位が特に好ましい。Ｎ－メチル－アラニンを含むＣ－３チオール部分マイタンシノイド、およびＮ－メチル－システインを含むＣ－３チオール部分マイタンシノイド、ならびにそれぞれの類似体も好ましい。

【００８８】

[115] 本発明において有用なＮ－メチル－アラニンを含むＣ－３チオール部分マイタンシノイド誘導体の具体的な例は、式Ｍ１、Ｍ２、Ｍ３、Ｍ６およびＭ７により表される。

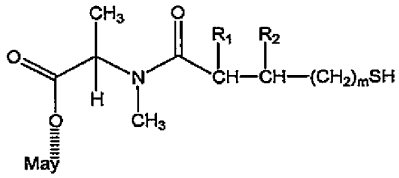
【００８９】

【化９】



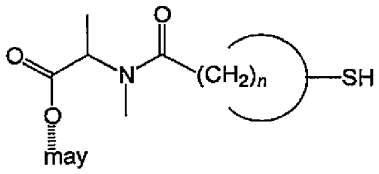
M1

【００９０】
ここで：
１は１から１０までの整数であり；および
ｍａｙはマイタンシノイドである。
【００９１】
【化１０】



M2

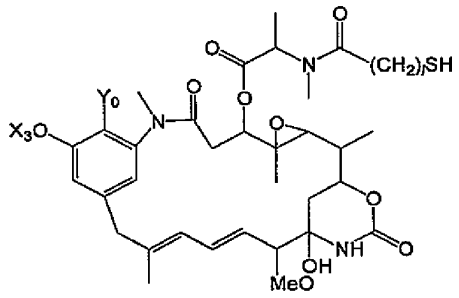
【００９２】
ここで：
R_1 および R_2 はＨ、CH_3 または CH_2CH_3 であり、同じまたは異なっていてよく；
ｍは０、１、２または３であり；ならびに
ｍａｙはマイタンシノイドである。
【００９３】
【化１１】



M3

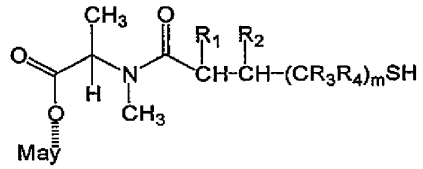
【００９４】
ここで：
ｎは３から８までの整数であり；および
ｍａｙはマイタンシノイドである。
【００９５】

【化１２】



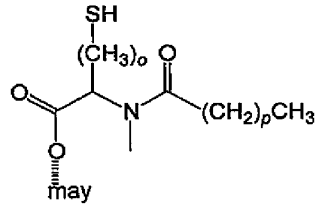
M6

【００９６】
ここで：
ｌは１、２または３であり；
Y_0はＣｌまたはＨであり；および
X_3はＨまたはCH_3である。
【００９７】
【化１３】



M7

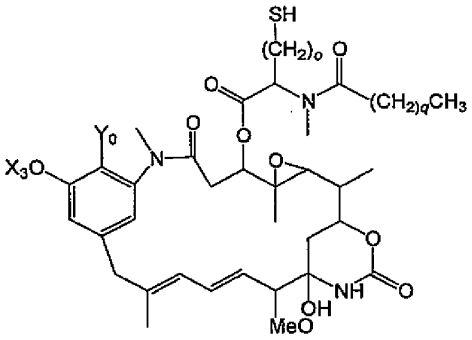
【００９８】
ここで：
R_1、R_2、R_3、R_4はＨ、CH_3またはCH_2CH_3であり、同じまたは異なっていてよく；
ｍは０、１、２または３であり；および
ｍａｙはマイタンシノイドである。
【００９９】
[116] 本発明において有用なＮ-メチル-システインを含むＣ-３チオール部分マイタンシノイド誘導体の具体的な例は、式Ｍ４およびＭ５により表される。
【０１００】
【化１４】



M4

【０１０１】
ここで：
ｏは１、２または３であり；
ｐは０～１０の整数であり；および
ｍａｙはマイタンシノイドである。
【０１０２】

【化１５】



M5

【０１０３】

ここで：

ｏは１、２または３であり；

ｑは０から１０までの整数であり；

Y_0 はＣｌまたはＨであり；および

X_3 はＨまたはCH_3である。

【０１０４】

好ましいマイタンシノイド類は、米国特許第５，２０８，０２０号；第５，４１６，０６４号；第６，３３３，４１０号；第６，４４１，１６３号；第６，７１６，８２１号；第ＲＥ３９，１５１号および第７，２７６，４９７号において記述されているマイタンシノイド類である。

【０１０５】

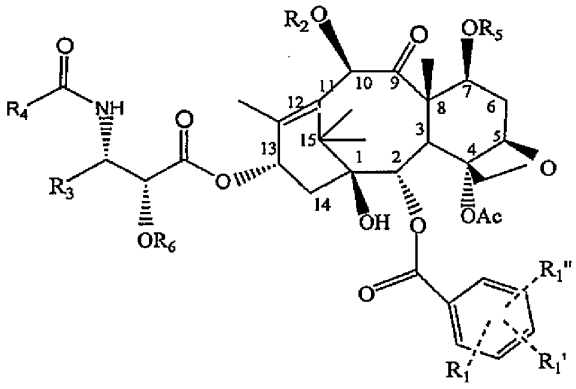
タキサン類

[117] 本発明に従う細胞毒性薬剤はタキサンであってもよい。

[118] 本発明において用いることができるタキサン類は、チオール部分を含むように修飾されている。本発明において有用ないくつかのタキサン類は、下記に示した式Ｔ１を有する：

【０１０６】

【化１６】



T1

【０１０７】

[119] これらの新規のタキサン類の４種類の態様を下記で記述する。

[120] 態様（１）、（２）、（３）、および（４）において、R_1、R_1'およびR_1''は同じまたは異なっており、それらはＨ、電子求引基、例えばＦ、NO_2、ＣＮ、Ｃｌ、CHF_2、もしくはCF_3または電子供与基、例えば-OCH_3、-OCH_2CH_3、-NR_7R_8、-OR_9であり、ここでR_7およびR_8は同じまたは異なっており、

それらは１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルキル基または１～１０個の炭素原子を有する単純な、もしくは置換されたアリールである。好ましくは、R_7およびR_8に関する炭素原子の数は１～４である。また、好ましくはR_7およびR_8は同じである。好ましい-NR_7R_8基の例には、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、およびジブチルアミノが含まれ、ここでそのブチル部分は第一級、第二級、第三級またはイソブチルのいずれかである。R_9は１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルキルである。

【０１０８】

[121] R_1は好ましくはOCH_3、Ｆ、NO_2、またはCF_3である。

[122] また、好ましくは、R_1はメタ位にあり、R_1'およびR_1''はＨまたはCH_3である。

【０１０９】

[123] 態様（１）、（２）および（４）におけるR_2は、Ｈ、１個から１０個までの炭素原子を有する複素環式、直鎖、分枝、もしくは環状エステルまたは１個から１０個までの炭素原子を有する複素環式、直鎖、分枝、もしくは環状エーテルまたは式-$CONR_{10}R_{11}$のカルバメートであり、ここでR_{10}およびR_{11}は同じまたは異なっており、それらはＨ、１個から６個までの炭素原子を有する直鎖アルキル、３～１０個の原子を有する分枝もしくは環状アルキル、または６～１０個の炭素原子を有する単純な、もしくは置換されたアリールである。エステル類に関して、好ましい例には-$COCH_2CH_3$および-$COCH_2CH_2CH_3$が含まれる。エーテル類に関して、好ましい例には-CH_2CH_3および-$CH_2CH_2CH_3$が含まれる。カルバメート類に関して、好ましい例には-$CONHCH_2CH_3$、-$CONHCH_2CH_2CH_3$、-ＣＯ-モルホリノ、-ＣＯ-ピペラジノ、-ＣＯ-ピペリジノ、または-ＣＯ-Ｎ-メチルピペラジノが含まれる。

【０１１０】

[124] 態様（３）におけるR_2はチオールを含む部分である。

[125] 態様（１）、（３）および（４）におけるR_3はアリールであり、または１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分枝もしくは環状アルキルであり、好ましくは-$CH_2CH(CH_3)_2$である。

【０１１１】

[126] 態様（２）におけるR_3は-$CH=C(CH_3)_2$である。

[127] ４種類全ての態様におけるR_4は-$OC(CH_3)_3$または-C_6H_5である。

【０１１２】

[128] 態様（１）および（２）におけるR_5はチオールを含む部分であり、R_6は上記の態様（１）、（２）および（４）に関するR_2に関するものと同じ定義を有する。

[129] 態様（３）におけるR_5およびR_6は同じまたは異なっており、上記の態様（１）、（２）および（４）に関するR_2に関するものと同じ定義を有する。

【０１１３】

[130] 態様（４）におけるR_5は上記の態様（１）、（２）および（４）に関するR_2に関するものと同じ定義を有し、R_6はチオール部分である。

[131] チオールを含む部分の導入に好ましい位置はR_2およびR_5であり、R_2が最も好ましい。

【０１１４】

[132] そのチオール部分を有する側鎖は直鎖または分枝、芳香族または複素環式であることができる。当業者は適切な側鎖をすぐに同定することができる。チオール部分の具体的な例には次のものが含まれる：-$(CH_2)_nSH$、-$CO(CH_2)_nSH$、-$(CH_2)_nCH(CH_3)SH$、-$CO(CH_2)_nCH(CH_3)SH$、-$(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$、-$CO(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$、-$CONR_{12}(CH_2)_nSH$、-$CONR_{12}(CH_2)_nCH(CH_3)SH$、または-$CONR_{12}($

$CH_2)_nC(CH_3)_2SH$、-CO-モルホリノ-XSH、-CO-ピペラジノ-XSH、-CO-ピペリジノ-XSH、および-CO-N-メチルピペラジノ-XSH、ここで
Xは1~10個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたは分枝アルキルである。
【0115】
R_{12}は1~10個の炭素原子を有する直鎖アルキル、分枝アルキルもしくは環状アルキル、または1個から10個までの炭素原子を有する単純な、もしくは置換されたアリールまたは複素環式であり、Hであることができ、
nは0~10の整数である。
【0116】
[133] 直鎖アルキル類の例には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルが含まれる。
[134] 分枝アルキル類の例には、イソプロピル、イソブチル、sec.-ブチル、tert.-ブチル、イソペンチルおよび1-エチル-プロピルが含まれる。
【0117】
[135] 環状アルキル類の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルが含まれる。
[136] 単純なアリール類の例には、フェニルおよびナフチルが含まれる。
【0118】
[137] 置換されたアリール類の例には、アルキル基で置換された、ハロゲン類、例えばCl、Br、F、ニトロ基、アミノ基、スルホン酸基、カルボン酸基、ヒドロキシ基またはアルコキシ基で置換された、上記で記述したアリール類のようなアリール類が含まれる。
【0119】
[138] 複素環式化合物の例は、複素原子がO、N、およびSから選択される化合物であり、それはモルホリノ、ピペリジノ、ピペラジノ、N-メチルピペラジノ、ピロリル(pyrrollyl)、ピリジル、フリルおよびチオフェンを含む。
【0120】
[139] チオール部分を有するタキサン類は、既知の方法に従って合成することができる。その合成のための出発物質は、商業的に入手可能である10-デアセチルバッカチンIII(10-deacetylbaccatin III)である。様々な置換基を導入するための化学がいくつかの刊行物において記述されている(Ojima et al, J. Med. Chem 39:3889-3896 (1996); Ojima et al., J. Med. Chem 40:267-278 (1997); Ojima et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96:4256-4261 (1999);米国特許第5,475,011号および米国特許第5,811,452号)。
【0121】
[140] フェニル環上の置換基R_1およびその置換基R_1の位置は、望まれる毒性の化合物が得られるまで変更することができる。さらに、そのフェニル環上の置換の程度は、望まれる毒性を達成するために変更することができる。すなわち、そのフェニル環は、望まれる毒性を得るための別の手段を提供する1個以上の置換基(例えば、フェニル環のモノ-、ジ-、またはトリ-置換)を有することができる。当業者はR_1に関する適切な化学的部分およびR_1に関する適切な位置を、型にはまった実験のみを用いて決定することができる。
【0122】
[141] 例えば、メタ位にある電子吸引基は細胞毒性の効力を増大させ、一方でパラ位における置換は親であるタキサンと比較してその効力を増大させるとは予想されない。典型的には、異なる位置(オルト、メタおよびパラ)に置換基を有する少数の代表的なタキサン類が最初に調製され、インビトロでの細胞毒性に関して評価されるであろう。
【0123】
[142] そのチオール部分は、ヒドロキシル基が既に存在する位置の内の1箇所におい

て導入することができる。様々なヒドロキシル基を保護する一方で望まれる１個を反応させる化学は、以前に記述されている（例えば上記で引用した参考文献を参照）。その置換基は、単に遊離のヒドロキシル基をジスルフィドを含むエーテル、ジスルフィドを含むエステル、またはジスルフィドを含むカルバメートに変換することにより導入される。この変換は下記のようにして達成される。望まれるヒドロキシル基を、上記のOjima et al.(1999)において記述されたように、テトラヒドロフラン中での－４０℃における商業的に入手できる試薬であるヘキサメチルジシラザンリチウム（１．２当量）を用いる処理により脱プロトン化する。次いで、得られたアルコキシド陰イオンを過剰量のジハロ化合物、例えばジブロモエタンと反応させてハロエーテルを得る。そのハロゲンのチオールによる置換（チオ酢酸カリウムとの反応および穏やかな塩基またはヒドロキシルアミンを用いる処理による）は、望まれるチオールを含むタキサンを与えるであろう。

【０１２４】

[143] あるいは、望まれるヒドロキシル基をアシルハライド、例えば３－ブロモプロピオニルクロリドとの反応により直接エステル化してブロモエステルを得ることができる。チオ酢酸カリウムを用いた処理および上記のようなさらなる処理によるそのブロモ基の置換は、チオールを含むタキサンエステルを与えるであろう。好ましいタキソイド類は、米国特許第６，３４０，７０１号；第６，３７２，７３８号；第６，４３６，９３１号；第６，５９６，７５７号；第６，７０６，７０８号；第７，００８，９４２号；第７，２１７，８１９号および第７，２７６，４９９号において記述されているタキソイド類である。

【０１２５】

ＣＣ－１０６５類似体

[144] 本発明に従う細胞毒性薬剤はＣＣ－１０６５類似体であってもよい。

[145] 本発明によると、ＣＣ－１０６５類似体はＡサブユニットおよびＢまたはＢ－Ｃサブユニットを含む。Ａサブユニットは、その天然の閉環したシクロプロピル型である、もしくはその開環したクロロメチル型であるＣＰＩ（シクロプロパピロロインドール単位）であり、または閉環したシクロプロピル型もしくは開環したクロロメチル型の、密接に関連したＣＢＩ単位（シクロプロピルベンゾインドール単位）である。ＣＣ－１０６５類似体のＢおよびＣサブユニットは非常に類似しており、それらは２－カルボキシ－インドールおよび２－カルボキシ－ベンゾフラン誘導体である。活性のために、ＣＣ－１０６５の類似体は少なくとも１個のその２－カルボキシ－インドールサブユニットまたは２－カルボキシ－ベンゾフランサブユニットを必要とするが、２個のサブユニット（すなわちＢ－Ｃ）はその類似体をより強力なものにする。天然のＣＣ－１０６５から、および公表された類似体（例えば、Warpehoski et al, J. Med. Chem 31:590-603 (1988), D. Boger et al., J. Org. Chem; 66; 6654-6661, 2001;米国特許第５，７３９，３５０号；第６，０６０，６０８号；第６，３１０，２０９号）から明らかであるように、ＢおよびＣサブユニットは、インドールまたはベンゾフラン環上の異なる位置に異なる置換基を有することもできる。

【０１２６】

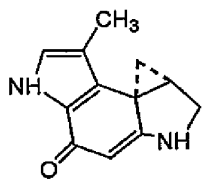
[146] チオール部分を含むＣＣ－１０６５類似体は、Ａサブユニットのピロール部分の第２級アミノ基からのアミド結合を通して式Ｆ－１のＢサブユニットまたは式Ｆ－３もしくはＦ－７のＢ－Ｃサブユニットのどちらかの Ｃ－２カルボキシ基に共有結合により連結された次の式Ａ－１｛ＣＰＩ（シクロプロピル型）｝、Ａ－２｛ＣＰＩ（クロロメチル型）｝、Ａ－３｛ＣＢＩ（シクロプロピル型）｝、およびＡ－４｛ＣＢＩ（クロロメチル型）｝のＡサブユニットの内のいずれかであることができる。

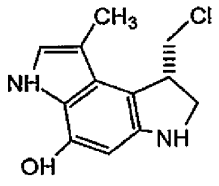
【０１２７】

Ａサブユニット

【０１２８】

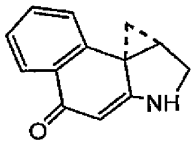
【化１７】

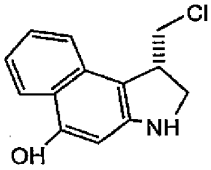

A-1


A-2

【０１２９】

【化１８】


A-3

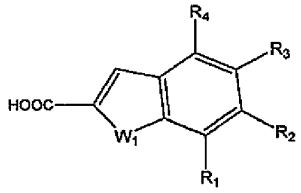

A-4

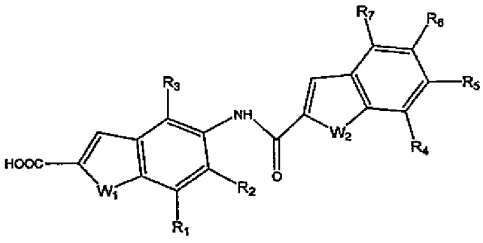
【０１３０】

Ｂならびに共有結合したＢおよびＣサブユニット

【０１３１】

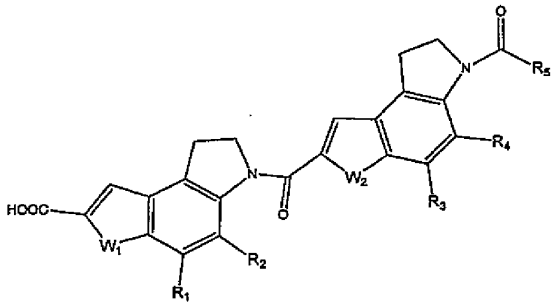
【化１９】


F-1


F-3

【０１３２】

【化２０】


F-7

【０１３３】

ここで、それぞれのW_1およびW_2は同じまたは異なっていてよく、ＯまたはＮＨであってよく；ならびに

ここで、式Ｆ－１においてR_4はチオール部分であり、式Ｆ－３においてＲまたはR_4の一方はチオール部分であり、式Ｆ－７においてＲ’またはR_4の一方はチオールを含む部分であり；ＲまたはＲ’がチオール部分である場合、同じまたは異なっていてよいR_1～R_6は水素、C_1～C_3直鎖アルキル、メトキシ、ヒドロキシル、第一級アミノ、第二級アミノ、第三級アミノ、またはアミドであり；R_4がチオール部分である場合、同じまたは異なっていてよいＲ、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5およびR_6は水素、C_1～C_3直鎖アルキル、メトキシ、ヒドロキシル、第一級アミノ、第二級アミノ、第三級アミノ、

またはアミドであり、R’はNH$_2$、アルキル、O-アルキル、第一級アミノ、第二級アミノ、第三級アミノ、またはアミドである。加えて、A-2およびA-4サブユニット中の塩素原子は別の適切なハロゲンで置き換えることができる。

【0134】

[147] 好ましい態様において、RおよびR’はチオール部分であり、R$_1$およびR$_2$はそれぞれ水素である。別の好ましい態様において、RおよびR’はチオール部分であり、R$_1$～R$_6$はそれぞれ水素である。

【0135】

[148] 特に好ましい態様において、RまたはR$_4$は-NHCO(CH$_2$)$_1$SH、-NHCOC$_6$H$_4$(CH$_2$)$_1$SH、または-O(CH$_2$)$_1$SHであり、R’は-(CH$_2$)$_1$SH、-NH(CH$_2$)$_1$SHまたは-O(CH$_2$)$_1$SHであり、ここでlは1～10の整数である。

【0136】

[149] 第一級アミンの例には、メチルアミン、エチルアミンおよびイソプロピルアミンが含まれる。

[150] 第二級アミンの例には、ジメチルアミン、ジエチルアミンおよびエチルプロピルアミンが含まれる。

【0137】

[151] 第三級アミンの例には、トリメチルアミン、トリエチルアミン、およびエチル-イソプロピル-メチルアミンが含まれる。

[152] アミド基の例には、N-メチルアセトアミド、N-メチル-プロピオンアミド、N-アセトアミド、およびN-プロピオンアミドが含まれる。

【0138】

[153] R’により表されるアルキルの例には、R’が連結基(linking group)では無い場合、C$_1$～C$_5$直鎖または分枝アルキルが含まれる。

[154] R’により表されるO-アルキルの例には、R’が連結基では無い場合、アルキル部分がC$_1$～C$_5$直鎖または分枝アルキルである化合物が含まれる。

【0139】

[155] 上記のCC-1065類似体は天然の源から単離することができ、それに続く修飾を含むそれらの調製、合成での調製、または両方の組み合わせに関する方法は、十分に記述されている(例えば米国特許第5,475,092号、第5,585,499号および第5,846,545号を参照)。好ましいCC-1065類似体は、米国特許第5,475,092号;第5,585,499号;第5,846,545号;6,534,660号;第6,586,618号;第6,756,397号および第7,049,316号において記述されているCC-1065類似体である。

【0140】

ダウノルビシン/ドキソルビシン類似体

[156] 本発明に従う細胞毒性薬剤は、ダウノルビシン類似体またはドキソルビシン類似体であってもよい。

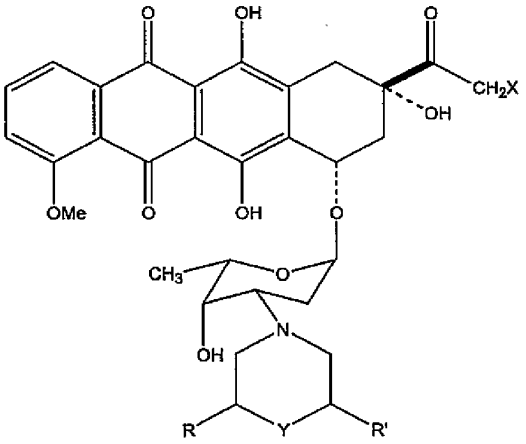
【0141】

[157] 本発明のダウノルビシンおよびドキソルビシン類似体は、チオール部分を含むように修飾されていることができる。

[158] 本発明において有用な修飾されたドキソルビシン/ダウノルビシン類似体は、下記に示した式D1を有する:

【0142】

【化２１】



D1

【０１４３】

ここで、

ＸはＨまたはＯＨであり；

ＹはＯまたはＮＲ$_2$であり、ここでＲ$_2$は１～５個の炭素原子を有する直鎖または分枝アルキルであり；

Ｒはチオール部分、Ｈ、または１～５個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝アルキルであり；および

Ｒ’はチオール部分、Ｈ、または－ＯＲ$_1$であり、ここでＲ$_1$は１～５個の炭素原子を有する直鎖または分枝アルキルであり；

ＲおよびＲ’は同時にチオール部分では無いという条件がある。

【０１４４】

[159] 好ましい態様において、ＮＲ$_2$はＮＣＨ$_3$である。別の好ましい態様において、Ｒ’は－Ｏである。

[160] 特に好ましい態様において、チオール部分は－（ＣＨ$_2$）$_n$ＳＨ、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＳＨ、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＳＨ、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＳＨ、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$ＳＨ、または－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$ＳＨであり、ここでｎは０～１０の整数である。

【０１４５】

[161] Ｒ、Ｒ$_1$およびＲ$_2$により表される、１～５個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝アルキルの例には、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ．－ブチル、ｔｅｒｔ．－ブチル、およびその８種類の異性体の配列（ａｒｒａｎｇｅｍｅｎｔｓ）のいずれかであるペンチルが含まれる。

【０１４６】

[162] Ｒ$_1$およびＲ$_2$は好ましくはメチルである。

[163] 直鎖アルキル類の例には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルが含まれる。

【０１４７】

[164] 分枝アルキル類の例には、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ．－ブチル、ｔｅｒｔ．－ブチル、イソペンチルおよび１－エチル－プロピルが含まれる。

[165] ＲまたはＲ’のどちらも連結基ではない場合、その位置にある置換基は、望まれる毒性の化合物が得られるまで変更することができる。高い毒性は、７２時間の曝露時間の際に１×１０$^{-12}$～１×１０$^{-9}$Ｍの範囲の培養された癌細胞に対するＩＣ$_{50}$を有するものと定義される。置換基の代表的な例は、Ｈ、上記のようなアルキル、およびＯ－アルキルである。当業者は、ＲおよびＲ’に関する適切な化学的部分を、型にはまった実験のみを用いて決定することができる。

【０１４８】
[166] 例えば、メチルおよびメトキシ置換基は細胞毒性の効力を増大させると予想され、一方で水素は親であるダウノルビシンと比較してその効力を増大させるとは予想されず、様々な位置に置換基を有する類似体が最初に調製され、インビトロでの細胞毒性に関して評価されるであろう。
【０１４９】
[167] チオール部分を有する本発明の修飾されたドキソルビシン／ダウノルビシン類似体は、ＷＯ ０１／３８３１８において記述されている。その修飾されたドキソルビシン／ダウノルビシン類似体は、既知の方法に従って合成することができる（例えば米国特許第５，１４６，０６４号参照）。
【０１５０】
[168] アウリスタチンはアウリスタチンＥ、アウリスタチンＥＢ（ＡＥＢ）、アウリスタチンＥＦＰ（ＡＥＦＰ）、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）を含み、それらは米国特許第５，６３５，４８３号、Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999); Molecular Cancer Therapeutics, vol. 3, No. 8, pp. 921-932 (2004); U.S. Application Number 11/134826、米国特許公開番号２００６００７４００８、２００６０２２９２５において記述されている。
【０１５１】
[169] 本発明に従う細胞毒性薬剤には、当分野で既知であるピロロベンゾジアゼピン二量体類が含まれる（米国特許第７，０４９，３１１号；第７，０６７，５１１号；第６，９５１，８５３号；第７，１８９，７１０号；第６，８８４，７９９号；第６，６６０，８５６号。
【０１５２】
類似体および誘導体
[170] 細胞毒性薬剤の当業者は、本明細書で記述された細胞毒性薬剤のそれぞれを、結果として得られる化合物が出発化合物の特異性および／または活性をなお維持しているような方式で修飾することができることをすぐに理解するであろう。当業者は、これらの化合物の多くを本明細書で記述された細胞毒性薬剤の代わりに用いることができることも理解するであろう。従って、本発明の細胞毒性薬剤には本明細書で記述された化合物の類似体および誘導体が含まれる。
【０１５３】
療法的使用
[171] この発明の細胞結合剤薬物コンジュゲート（例えば免疫コンジュゲート類）は、他の化学療法薬との組み合わせで用いることもできる。その化学療法薬は、上記で列挙されている、または米国特許第７，３０３，７４９号において記述されている。
【０１５４】
[172] 本発明の細胞結合剤薬物コンジュゲート（例えば免疫コンジュゲート類）は、患者を処置するために、および／または選択された細胞集団の増殖を調節するために、インビトロ、インビボおよび／またはエキソビボで投与することができ、それは例えば次のものを含む：肺、血液、血漿、乳房、結腸、前立腺、腎臓、膵臓、脳、骨、卵巣、精巣、およびリンパ器官の癌；自己免疫疾患、例えば全身性狼瘡、リウマチ性関節炎、および多発性硬化症；移植片拒絶、例えば腎移植片拒絶、肝移植片拒絶、肺移植片拒絶、心移植片拒絶、および骨髄移植片拒絶；移植片対宿主疾患；ウイルス感染症、例えばＣＭＶ感染、ＨＩＶ感染、およびＡＩＤＳ；ならびに寄生虫感染症、例えばジアルジア症、アメーバ症、住血吸虫症および同様のもの。好ましくは、本発明の免疫コンジュゲート類および化学療法剤は、患者における癌を処置するために、および／または癌細胞の増殖を調節するためにインビトロ、インビボおよび／またはエキソビボで投与され、それは例えば次のものを含む：血液、血漿、肺、乳房、結腸、前立腺、腎臓、膵臓、脳、骨、卵巣、精巣、およびリンパ器官の癌；より好ましくは、肺、結腸、前立腺、血漿、血液または結腸癌。
【０１５５】

[173] “選択された細胞集団の増殖を調節すること”には、選択された細胞集団（例えば、多発性骨髄腫の細胞集団、例えばＭＯＬＰ－８細胞、ＯＰＭ２細胞、Ｈ９２９細胞、および同様のもの）の増殖を阻害すること、それが分裂してより多くの細胞を生じるのを阻害すること；例えば処置していない細胞と比較して細胞分裂の増大の速度を低減すること；選択された細胞集団を殺すこと；および／または選択された細胞集団（例えば癌細胞）が転移するのを防ぐことが含まれる。選択された細胞集団の増殖は、インビトロ、インビボ、またはエキソビボで調節することができる。

【０１５６】

[174] 本発明の方法において、細胞結合剤薬物コンジュゲート（例えば免疫コンジュゲート類）は、インビトロ、インビボ、またはエキソビボで投与することができる。細胞結合剤薬物コンジュゲート（例えば免疫コンジュゲート類）は、適切な医薬的に許容できるキャリヤー、希釈剤、および／または賦形剤と共に用いることができ、それらは周知であり、当業者は臨床状況を根拠として（ａｓ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｓｉｔｕａｔｉｏｎ　ｗａｒｒａｎｔｓ）それらを決定することができる。適切なキャリヤー、希釈剤、および／または賦形剤の例には次のものが含まれる：（１）ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ約６．５、それは約１ｍｇ／ｍｌ～２５ｍｇ／ｍｌのヒト血清アルブミンを含むであろう、（２）０．９％生理食塩水（０．９％　ｗ／ｖ　ＮａＣｌ）、および（３）５％（ｗ／ｖ）デキストロース。

【０１５７】

[175] 本明細書で記述された化合物および組成物は、適切な形で、好ましくは非経口で、より好ましくは静脈内で投与されてよい。非経口投与に関して、その化合物または組成物は水性または非水性の無菌の溶液、懸濁液または乳濁液であることができる。プロピレングリコール、植物油および注射可能な有機エステル類、例えばオレイン酸エチルを溶媒またはビヒクルとして用いることができる。その組成物は、アジュバント、乳化剤または分散剤を含むこともできる

[176] その組成物は、滅菌水またはいずれかの他の注射可能な無菌の媒体中で溶解または分散させることができる無菌の固体組成物の形であることもできる。

【０１５８】

[177] 本明細書で記述される細胞結合剤薬物コンジュゲート（例えば免疫コンジュゲート類）の“療法上有効量”は、選択された細胞集団の増殖を調節する、および／または患者の疾患を処置するための投薬計画を指し、それは患者の年齢、体重、性別、食事および医学的条件、その疾患の重症度、投与の経路、ならびに薬理学的な考慮すべき事柄、例えば用いられる個々の化合物の活性、有効性、薬物動態学的および毒物学的プロフィールを含む様々な要素に従って選択される。“療法上有効量”は、標準的な医学的テキスト、例えばＰｈｙｓｉｃｉａｎｓ　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　２００４を参照することにより決定することもできる。患者は好ましくは動物、より好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトである。患者は男性または女性であり、乳児、小児または成人であることができる。

【０１５９】

[178] 細胞結合剤薬物コンジュゲート（例えば免疫コンジュゲート）の投与の適切なプロトコルの例は、次のようなものである。そのコンジュゲートは、約５日間毎日、約５日間のそれぞれの日に静脈内、大量瞬時投与（ｂｏｌｕｓ）のどちらかとして、または約５日間の継続的な注入として与えることができる。

【０１６０】

[179] あるいは、そのコンジュゲートは６週間以上の間週１回投与することができる。別の代替案として、そのコンジュゲートは２または３週間ごとに１回投与することができる。大量瞬時投与量は、約５０～約４００ｍｌの通常の生理食塩水中で与えられ、それに約５～約１０ｍｌのヒト血清アルブミンを添加することができる。継続的な注入は、２４時間の期間ごとに約２５０～約５００ｍｌの通常の生理食塩水中で与えられ、それに約２５～約５０ｍｌのヒト血清アルブミンを添加することができる。投薬量は１人あたり静

脈内で約１０ｐｇ～約１０００ｍｇ／ｋｇであろう（約１００ｎｇ～約１００ｍｇ／ｋｇの範囲）。

【０１６１】

[180] 処置の約１～約４週間後、その患者は処置の第２クールを受けることができる。当業者は投与の経路、賦形剤、希釈剤、投薬量、および時間に関する具体的な臨床プロトコルを臨床状況を根拠として決定することができる。

【０１６２】

[181] 本発明は、１種類以上の免疫コンジュゲートおよび１種類以上の化学療法薬を含む本発明の医薬的化合物および／または組成物の成分の１種類以上が入った１個以上の入れ物を含む医薬的キットも提供する。そのキットは、例えば、他の化合物および／または組成物、その化合物および／または組成物を投与するための道具（単数又は複数）、および医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を統制する政府機関により規定された形で書かれた説明書を含んでいることもできる。

【０１６３】

[182] その化合物およびコンジュゲート類（例えば免疫コンジュゲート類は、例えば細胞の異常な増殖により特性付けられる障害（例えば癌）を処置する、またはその重症度を低下させるのに有用な医薬の製造のために用いることもできるであろう。

【０１６４】

[183] 癌の療法およびそれらの投薬量、投与の経路および推奨される使用法は当分野で既知であり、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎ’ｓ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（ＰＤＲ）のような文献において記述されている。ＰＤＲは様々な癌の処置において用いられてきた薬剤の投薬量を開示している。療法上有効であるこれらの前記の化学療法薬およびコンジュゲートの投与計画および投薬量は、処置される個々の癌、その疾患の程度および当分野の熟練した医師に馴染みの他の要素に依存すると考えられ、医師はそれを決定することができる。例えば、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎ’ｓ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅの２００６年版は、Ｔａｘｏｔｅｒｅ（ｐ２９４７参照）はチューブリン脱重合の阻害剤であり；ドキソルビシン（ｐ７８６参照）、Ｄｏｘｉｌ（ｐ３３０２参照）およびオキサリプラチン（ｏｘａｌｉｐｌａｔｉｎ）（ｐ２９０８参照）はＤＮＡと相互作用する薬剤であり、イリノテカル（Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｌ）（ｐ２６０２参照）はトポイソメラーゼＩ阻害剤であり、Ｅｒｂｉｔｕｘ（ｐ９３７参照）およびＴａｒｃｅｖａ（ｐ２４７０参照）は上皮成長因子受容体と相互作用することを開示している。ＰＤＲの内容を、特にそのまま本明細書に援用する。当業者は、ＰＤＲを見直して、下記のパラメーターの内の１種類以上を用いて、この発明の教えに従って用いることができる化学療法薬およびコンジュゲートの投与計画および投薬量を決定することができる。これらのパラメーターは次のものを含む：

１．総合的な索引

ａ）製造業者による

ｂ）製品（会社の、または商標登録された薬物の名前による）

ｃ）カテゴリー索引（例えば、“抗ヒスタミン剤”、“ＤＮＡアルキル化剤”タキサン類等）

ｄ）属による／化学的な索引（商標ではない一般的な薬物名）

２．投薬の色のイメージ

３．ＦＤＡのラベル付け（ｌａｂｅｌｉｎｇ）と一致する製品情報

ａ）化学的な情報

ｂ）機能／作用

ｃ）適応および禁忌

ｄ）試験研究、副作用、警告。

【０１６５】

[184] 本明細書において、および下記の実施例において引用される全ての参考文献を特にそのまま援用する。

【実施例】

【０１６６】

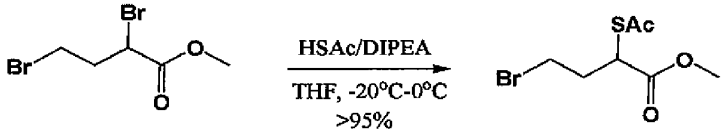
[185] ここで、本発明を限定的で無い実施例を参照することにより記述する。別途明記しない限り、全てのパーセントおよび比率は体積によるものである。

実施例１：材料および方法

メチル ２-（アセチルチオ）-４-ブロモブタノエート

【０１６７】

【化２２】



【０１６８】

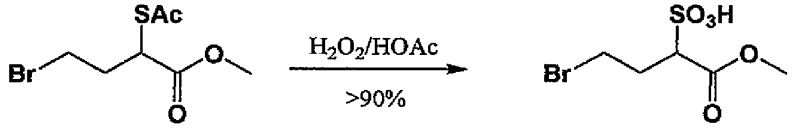
[186] ２０℃における１００ｍｌの乾燥ＴＨＦ中の１０．０ｇ（３８．４ｍｍｏｌ）のメチル ２，４-ジブロモブタノエートに、８．５ｍｌ（４８．９ｍｍｏｌ）のＤＩＰＥＡおよび５０ｍｌの乾燥ＴＨＦ中の２．７５ｍｌ（３８．５ｍｍｏｌ）のチオール酢酸の混合物を、１．５時間で滴加した。-２０℃で一夜、次いで０℃で２時間、Ａｒの下で撹拌した後、混合物を濃縮し、ＥｔＡｃ／ヘキサンで希釈し、１．０Ｍ NaH_2PO_4 で洗浄し、$MgSO_4$ で乾燥させ、濾過し、蒸発させ、SiO_2 クロマトグラフィー（１：１２~１：１０ ＥｔＡｃ／ヘキサン）で精製して、９．５ｇ（９６％）の表題化合物を得た。1H NMR (CDCl3) 4.38 (1H, t, J = 7.1Hz), 3.74 (s, 3H), 3.40 (m, 2H), 2.57 ~ 2.47 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.36 ~ 2.21 (m, 1H); 13C NMR 193.24, 171.36, 53.15, 44.45, 34.67, 30.46, 29.46; MS m/z+ 276.9 (M+Na), 278.9 (M+2+Na)。

【０１６９】

４-ブロモ-１-メトキシ-１-オキソブタン-２-スルホン酸

【０１７０】

【化２３】



【０１７１】

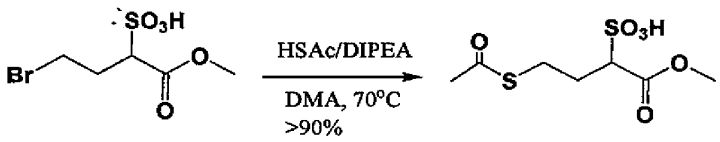
[187] ８０ｍｌの酢酸中の９．２ｇ（３６．３ｍｍｏｌ）のメチル ２-（アセチルチオ）-４-ブロモブタノエートに、４０ｍｌの過酸化水素（水中３５％）を添加した。混合物を一夜撹拌し、次いで蒸発させ、水で希釈し、$NaHCO_3$ で中和し、１：１ヘキサン／ＥｔＡｃで洗浄した。水溶液を蒸発させ、メタノール中で溶解し、濃縮し、メタノール／トルエンを用いて結晶化すると、８．６ｇ（収率９０％）の表題化合物が得られた。ｍ．ｐ．＝２８８~２９３（分解）；1H NMR (D2O) 4.12 (dd, 1H, J = 4.8, 9.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.64 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 2.54 (m, 2H); 13C NMR 172.16, 66.73, 55.66, 33.39, 32.70; MS m/z- 260.8 (M-1)。

【０１７２】

４-（アセチルチオ）-１-メトキシ-１-オキソブタン-２-スルホン酸

【０１７３】

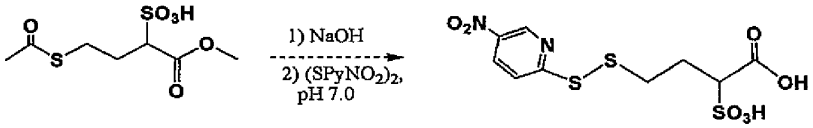
【化２４】



【０１７４】
[188] １００ｍｌのＴＨＦ中の５．０ｇ（１９．２ｍｍｏｌ）の４－ブロモ－１－メトキシ－１－オキソブタン－２－スルホン酸に、１００ｍｌのＴＨＦ中の３．０ｍｌのチオ酢酸および９．０ｍｌのＤＩＰＥＡを添加した。混合物を一夜撹拌し、次いで７０℃で１時間還流し、蒸発させ、$NaHCO_3$でｐＨ７に中和した後３×１００ｍｌの水を用いて共蒸発させた（ｃｏ－ｅｖａｐｏｒａｔｅｄ）。混合物をメタノール中で再溶解し、セライトを通して濾過し、濃縮し、SiO_2クロマトグラフィーにより、$CH_3OH/CH_2Cl_2/HCOOH$ ３７．５：２５０：１～５０：２５０：１）を用いて溶離して精製すると４．４ｇ（収率９０％）の表題化合物が得られた。1H NMR(D2O) 3.95 (dd, 1H, J = 4.1, 10.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.74 (m, 2H), 3.22 (dd, 2H, J = 7.4, 14.9 Hz), 2.39 (s, 3H); 13C NMR 203.88, 172.91, 67.32, 56.17, 29.04, 20.61; MS m/z- 254.8 (M-H)。

【０１７５】
４－（（５－ニトロピリジン－２－イル）ジスルファニル）－２－スルホブタン酸

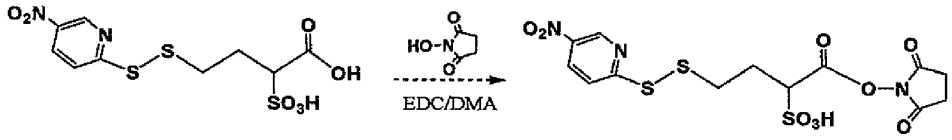
【０１７６】
【化２５】



【０１７７】
[189] １００ｍｌの水中の３．０ｇ（１１．７ｍｍｏｌ）の４－（アセチルチオ）－１－メトキシ－１－オキソブタン－２－スルホン酸に、５０ｍｌの３Ｍ ＮａＯＨを添加した。Ａｒの下で３時間撹拌した後、混合物をＡｒの下で１Ｍ H_2PO_4を用いてｐＨ７．２に中和した。混合物を、２００ｍｌのＤＭＡ中の１０．０ｇ（３２．２ｍｍｏｌ）の１，２－ビス（５－ニトロピリジン－２－イル）ジスルファンの溶液に滴加した。Ａｒの下で４時間撹拌した後、混合物を濃縮し、水で希釈し、濾過し、蒸発させ、Ｃ－１８ ４．０×２０ｃｍカラムを用いて、水／メタノール（９５：５）で溶離して精製すると、３．１ｇ（収率７５％）の表題化合物が得られた。ｍ．ｐ．＝２８８～２９１℃（分解）
1H NMR (DMF-d7) 9.29 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 8.63 (dd, 1H, J = 2.7, 8.9 Hz), 8.17 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 3.73 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 3.22～3.17 (m, 1H), 3.15～3.10 (m, 1H), 2.41～2.33 (m, 2H); 13C NMR 170.92, 169.10, 146.04, 143.67, 133.65, 120.72, 64.22, 37.82, 29.26; MS m/z- 352.8 (M-H)。

【０１７８】
１－（２，５－ジオキソピロリジン－１－イルオキシ）－４－（（５－ニトロピリジン－２－イル）ジスルファニル）－１－オキソブタン－２－スルホン酸

【０１７９】
【化２６】



【０１８０】
[190] １５ＤＭＡ中の２２０ｍｇ（０．６２ｍｍｏｌ）の４－（（５－ニトロピリジン－２－イル）ジスルファニル）－２－スルホブタン酸に、１３０ｍｇ（１．１３ｍｍｏｌ）のＮＨＳおよび４８０ｍｇ（２．５０ｍｍｏｌ）のＥＤＣを添加した。混合物をＡｒの下で一夜撹拌し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上で、$CH_2CH_2/CH_3OH/HCOOH$（１００００：１０００：１～１００００：１５００：１）で溶離して

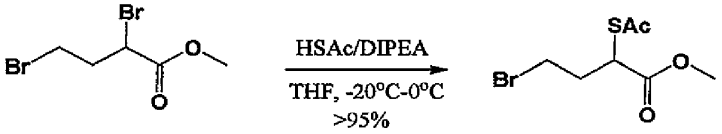
精製すると、２２７ｍｇ（収率８２％）の表題化合物が得られた。1H NMR（DMSO-d6）9.25（d, 1H, J = 5.2 Hz）, 8.57（dd, 1H, J = 2.5, 8.9 Hz）, 8.04（t, 1H, J = 8.0 + 8.9 Hz）, 3.86（dd, 1H, J = 4.9, 9.7 Hz）, 3.13～3.12（m, 2H）, 2.76（s, 4H）, 2.36～2.30（m, 1H）, 2.25～2.21（m, 1H）; 13C NMR 166.96, 165.01, 144.93, 142.26, 132.63, 119.61, 61.00, 35.03, 29.30, 25.39; MS m/z- 449.8（M-H）。

【０１８１】

メチル　２－（アセチルチオ）－４－ブロモブタノエート

【０１８２】

【化２７】



【０１８３】

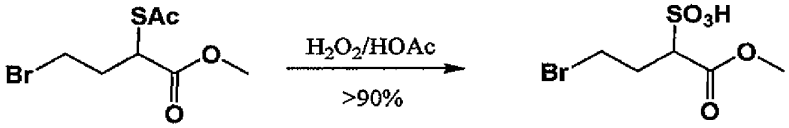
[191]　－２０℃における１００ｍｌの乾燥ＴＨＦ中の１０．０ｇ（３８．４ｍｍｏｌ）のメチル　２，４－ジブロモブタノエートに、８．５ｍｌ（４８．９ｍｍｏｌ）のＤＩＰＥＡおよび５０ｍｌの乾燥ＴＨＦ中の２．７５ｍｌ（３８．５ｍｍｏｌ）のチオール酢酸の混合物を、１．５時間で滴加した。－２０℃で一夜、次いで０℃で２時間、Ａｒの下で撹拌した後、混合物を濃縮し、ＥｔＡｃ／ヘキサンで希釈し、１．０Ｍ　NaH_2PO_4で洗浄し、$MgSO_4$で乾燥させ、濾過し、蒸発させ、ＳｉＯ２クロマトグラフィー（１：１２～１：１０　ＥｔＡｃ／ヘキサン）で精製して、９．５ｇ（９６％）の表題化合物を得た。1H NMR（CDCl3）4.38（1H, t, J = 7.1Hz）, 3.74（s, 3H）, 3.40（m, 2H）, 2.57～2.47（m, 1H）, 2.37（s, 3H）, 2.36～2.21（m, 1H）; 13C NMR 193.24, 171.36, 53.15, 44.45, 34.67, 30.46, 29.46; MS m/z+ 276.9（M+Na）, 278.9（M+2+Na）。

【０１８４】

４－ブロモ－１－メトキシ－１－オキソブタン－２－スルホン酸

【０１８５】

【化２８】



【０１８６】

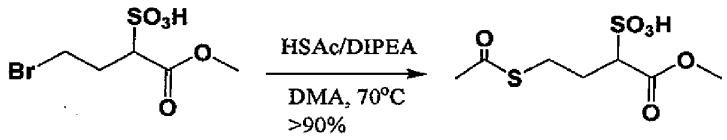
[192]　８０ｍｌの酢酸中の９．２ｇ（３６．３ｍｍｏｌ）のメチル　２－（アセチルチオ）－４－ブロモブタノエートに、４０ｍｌの過酸化水素（水中３５％）を添加した。混合物を一夜撹拌し、次いで蒸発させ、水で希釈し、$NaHCO_3$で中和し、１：１ヘキサン／ＥｔＡｃで洗浄した。水溶液を蒸発させ、メタノール中で溶解し、濃縮し、メタノール／トルエンを用いて結晶化すると、８．６ｇ（収率９０％）の表題化合物が得られた。ｍ．ｐ．＝２８８～２９３（分解）；1H NMR（D2O）4.12（dd, 1H, J = 4.8, 9.3 Hz）, 3.83（s, 3H）, 3.64（m, 1H）, 3.53（m, 1H）, 2.54（m, 2H）; 13C NMR 172.16, 66.73, 55.66, 33.39, 32.70; MS m/z- 260.8（M-1）。

【０１８７】

４－（アセチルチオ）－１－メトキシ－１－オキソブタン－２－スルホン酸

【０１８８】

【化２９】



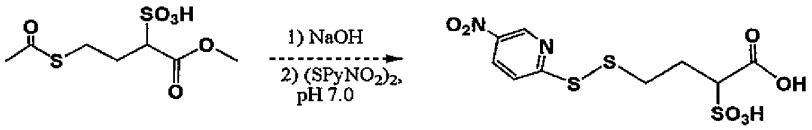
【０１８９】

[193] １００ｍｌのＴＨＦ中の５．０ｇ（１９．２ｍｍｏｌ）の４－ブロモ－１－メトキシ－１－オキソブタン－２－スルホン酸に、１００ｍｌのＴＨＦ中の３．０ｍｌのチオ酢酸および９．０ｍｌのＤＩＰＥＡを添加した。混合物を一夜撹拌し、次いで７０℃で１時間還流し、蒸発させ、ＮａＨＣＯ$_3$でｐＨ７に中和した後３×１００ｍｌの水を用いて共蒸発させた。混合物をメタノール中で再溶解し、セライトを通して濾過し、濃縮し、ＳｉＯ$_2$クロマトグラフィーにより、ＣＨ$_3$ＯＨ／ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$／ＨＣＯＯＨ　３７．５：２５０：１～５０：２５０：１）を用いて溶離して精製すると４．４ｇ（収率９０％）の表題化合物が得られた。1H NMR(D2O) 3.95 (dd, 1H, J = 4.1, 10.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.74 (m, 2H), 3.22 (dd, 2H, J = 7.4, 14.9 Hz), 2.39 (s, 3H); 13C NMR 203.88, 172.91, 67.32, 56.17, 29.04, 20.61; MS m/z- 254.8 (M-H)。

４－（（５－ニトロピリジン－２－イル）ジスルファニル）－２－スルホブタン酸

【０１９０】

【化３０】



【０１９１】

[194] １００ｍｌの水中の３．０ｇ（１１．７ｍｍｏｌ）の４－（アセチルチオ）－１－メトキシ－１－オキソブタン－２－スルホン酸に、５０ｍｌの３Ｍ　ＮａＯＨを添加した。Ａｒの下で３時間撹拌した後、混合物をＡｒの下で１Ｍ　Ｈ$_2$ＰＯ$_4$を用いてｐＨ７．２に中和した。混合物を、２００ｍｌのＤＭＡ中の１０．０ｇ（３２．２ｍｍｏｌ）の１，２－ビス（５－ニトロピリジン－２－イル）ジスルファンの溶液に滴加した。Ａｒの下で４時間撹拌した後、混合物を濃縮し、水で希釈し、濾過し、蒸発させ、Ｃ－１８　４．０×２０ｃｍカラムを用いて、水／メタノール（９５：５）で溶離して精製すると、３．１ｇ（収率７５％）の表題化合物が得られた。ｍ．ｐ．＝２８８～２９１℃（分解）

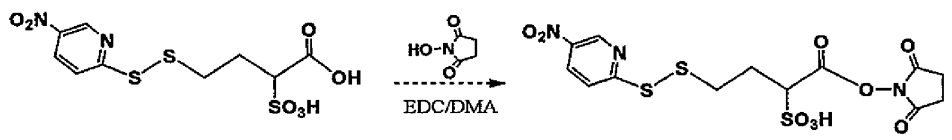
1H NMR (DMF-d7) 9.29 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 8.63 (dd, 1H, J = 2.7, 8.9 Hz), 8.17 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 3.73 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 3.22～3.17 (m, 1H), 3.15～3.10 (m, 1H), 2.41～2.33 (m, 2H); 13C NMR 170.92, 169.10, 146.04, 143.67, 133.65, 120.72, 64.22, 37.82, 29.26; MS m/z- 352.8 (M-H)。

【０１９２】

１－（２，５－ジオキソピロリジン－１－イルオキシ）－４－（（５－ニトロピリジン－２－イル）ジスルファニル）－１－オキソブタン－２－スルホン酸

【０１９３】

【化３１】



【０１９４】

[195] １５ＤＭＡ中の２２０ｍｇ（０．６２ｍｍｏｌ）の４－（（５－ニトロピリジ

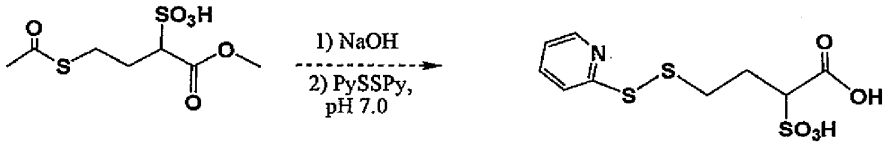
ン-２-イル）ジスルファニル）-２-スルホブタン酸に、１３０ｍｇ（１．１３ｍｍｏｌ）のＮＨＳおよび４８０ｍｇ（２．５０ｍｍｏｌ）のＥＤＣを添加した。混合物をＡｒの下で一夜撹拌し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上で、CH_2Cl_2／CH_3OH／ＨＣＯＯＨ（１００００：１０００：１～１００００：１５００：１）で溶離して精製すると、２２７ｍｇ（収率８２％）の表題化合物が得られた。1H NMR (DMSO-d6) 9.25 (d, 1H, J = 5.2 Hz), 8.57 (dd, 1H, J = 2.5, 8.9 Hz), 8.04 (t, 1H, J = 8.0 + 8.9 Hz), 3.86 (dd, 1H, J = 4.9, 9.7 Hz), 3.13~3.12 (m, 2H), 2.76 (s, 4H), 2.36~2.30 (m, 1H), 2.25~2.21 (m, 1H); 13C NMR 166.96, 165.01, 144.93, 142.26, 132.63, 119.61, 61.00, 35.03, 29.30, 25.39; MS m/z- 449.8 (M-H)。

【０１９５】

４-（ピリジン-２-イルジスルファニル）-２-スルホブタン酸

【０１９６】

【化３２】



【０１９７】

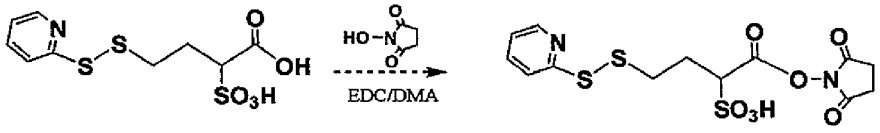
[196] １．５ｇ（５．８５ｍｍｏｌ）の４-（アセチルチオ）-１-メトキシ-１-オキソブタン-２-スルホン酸を、１００ｍｌの０．５Ｍ ＮａＯＨ溶液に添加した。Ａｒの下で３時間撹拌した後、混合物を約５０ｍｌまで濃縮し、Ａｒの下で１Ｍ H_2PO_4を用いてｐＨ７．２に中和した。混合物を、６０ｍｌのＤＭＡ中の４．０ｇ（１８．１ｍｍｏｌ）の２，２’-ジチオジピリジンの溶液に滴加した。Ａｒの下で４時間撹拌した後、混合物を濃縮し、水で希釈し、濾過し、蒸発させ、Ｃ-１８ ４．０×２０ｃｍカラムを用いて、水／メタノール（９９：１～９０：１０）で溶離して精製すると、１．３２ｇ（収率７３％）の表題化合物が得られた。1H NMR (DMF-d7) 8.39 (dd, 1H, J = 3.5, 4.8 Hz), 7.86 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 3.59 (dd, 1H, J = 5.2, 9.4 Hz), 2.90 (m, 2H), 2.28 (m, 2H); 13C NMR 172.60, 159.16, 148.93, 138.09, 121.03, 119.38, 67.49, 36.39, 28.666; MS m/z- 307.8 (M-H)。

【０１９８】

１-（２，５-ジオキソピロリジン-１-イルオキシ）-１-オキソ-４-（ピリジン-２-イルジスルファニル）ブタン-２-スルホン酸

【０１９９】

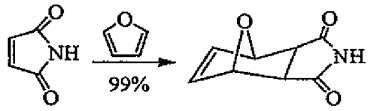
【化３３】



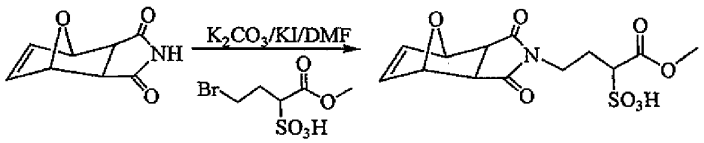
【０２００】

[197] ５０ ＤＭＡ中の６８０ｍｇ（２．２０ｍｍｏｌ）の４-（ピリジン-２-イルジスルファニル）-２-スルホブタン酸に、３００ｍｇ（２．６０ｍｍｏｌ）のＮＨＳおよび８００ｍｇ（４．１６ｍｍｏｌ）のＥＤＣを添加した。混合物をＡｒの下で一夜撹拌し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上で、CH_2Cl_2／CH_3OH／ＨＣＯＯＨ（１００００：１０００：１～１００００：１５００：１）で溶離して精製すると、７２０ｍｇ（収率８０％）の表題化合物が得られた。1H NMR (DMSO-d6) 8.40 (dd, 1H, J = 3.5, 4.7 Hz), 7.85 (m, 2H), 7.24 (m, 1H), 3.58 (dd, 1H, J = 5.1, 9.4 Hz), 2.94~2.90 (m, 2H), 2.74 (s, 4H), 2.31~2.27 (m, 2H); 13C NMR 168.16, 161.11, 147.91, 139.22, 121.63, 119.31, 66.80, 36.30, 28.36, 25.42; MS m/z- 404.9 (M-H)。

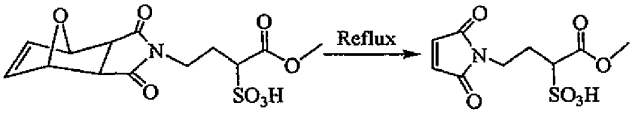
【０２０１】
３，６－エンドオキソ－Δ－テトラヒドロフタルヒド（３，６－ｅｎｄｏｘｏ－Δ－ｔｅｔｒａｈｙｄｒｏｐｈｔｈａｌｈｉｄｅ）
【０２０２】
【化３４】



【０２０３】
[198] エチルエーテル（２００ｍｌ）中のマレイミド（５．０ｇ，５１．５ｍｍｏｌ）に、フラン（５．５ｍｌ，７５．６ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を１Ｌのオートクレーブボンベ（ａｕｔｏｃｌａｖｅ　ｂｏｍｂ）の中で１００℃において８時間加熱した。ボンベを室温まで冷まし、中の固体をメタノールですすぎ、濃縮し、酢酸エチル／ヘキサン中で結晶化すると、８．４ｇ（９９％）の表題化合物が得られた。1H NMR (DMF-d7): 11.08 (s, 1H) (NH), 6.60 (m, 2H), 5.16 (m, 2H), 2.95 (m, 2H). 13C NMR 178.84, 137.69, 82.00, 49.92. MS m/z+ 188.4 (MW + Na)。
【０２０４】
メチル　４－Ｎ－（３，６－エンドオキソ－Δ－テトラヒドロフタリド）－２－スルホ－ブチレート
【０２０５】
【化３５】



【０２０６】
[199] ＤＭＡ（２０ｍｌ）中の３，６－エンドオキソ－Δ－テトラヒドロフタルヒド（３，６－ｅｎｄｏｘｏ－Δ－ｔｅｔｒａｈｙｄｒｏｐｈｔｈａｌｈｉｄｅ）（０．８０ｇ，４．８５ｍｍｏｌ）に、K_2CO_3（１．４ｇ，１０．１３ｍｍｏｌ）およびＫＩ（０．１９ｇ，１．１４ｍｍｏｌ）を添加した。Ａｒの下で１時間撹拌した後、ＤＭＡ（１０ｍｌ）中のメチル　４－ブロモ－２－スルホ－ブチレート（０．９８ｇ，３．７７ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒの下で一夜撹拌し、蒸発させ、メタノール中１％ＨＡｃ中で再溶解し、濾過し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィーにより、１：５：０．０１～１：４：０．０１　CH_3OH/CH_2Cl_2／ＨＡｃで溶離して精製すると、０．９８（７５％）ｇの表題化合物が得られた。1H NMR (DMF-d7): 6.59 (m, 2H), 5.16 (dd, 2H, J = 0.8, 7.8 Hz), 3.65-3.63 (m, 3H), 3.47 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.83 (m, 2H). 13C NMR 172.94, 162.86, 137.68, 81.98, 52.39, 49.91, 48.58, 36.01, 21.97. MS m/z- 343.9 (MW - H)。
【０２０７】
メチル　４－Ｎ－マレイミド－２－スルホ－ブチレート
【０２０８】
【化３６】



【０２０９】
[200] ふたの無い丸底フラスコ中で、２０ｍｌの１：１ＤＭＡ／１００ｍＭ　ＮａＨ

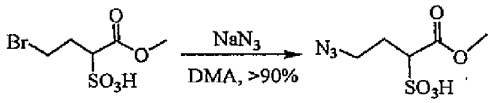
$_2PO_4$、ｐＨ７．０中のメチル　４－Ｎ－（３，６－エンドオキソ－Δ－テトラヒドロフタリド）－２－スルホ－ブチレート（０．３０ｇ，０．８７ｍｍｏｌ）を１２０～１４０℃で４時間加熱した。反応時間の間、５×１０ｍｌの水を徐々に添加して反応体積をおよそ１５ｍｌに保った。混合物を濃縮して乾燥させ、SiO_2クロマトグラフィーにより、１：５：０．０１～１：４：０．０１　CH_3OH／CH_2Cl_2／ＨＡｃで溶離して精製すると、０．２３０ｇ（９５％）の表題化合物が得られた。^1H NMR（DMF-d7）：6.60（s，2H），4.06（d，1H），3.60（m，3H），3.47（m，2H），2.43（m，2H）；^{13}C NMR 171.59，164.96，136.10，66.20，51.71，34.82，22.10．MS m/z- 276.6（MW－H）。

【０２１０】

メチル　４－アジド－２－スルホ－ブチレート

【０２１１】

【化３７】



【０２１２】

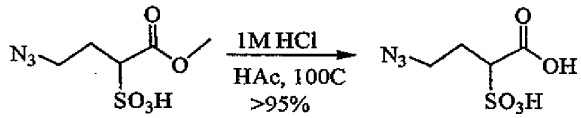
［201］　ＤＭＦ（５０ｍｌ）中のメチル　４－ブロモ－２－スルホ－ブチレート（１．０７ｇ，４．１１ｍｍｏｌ）およびアジ化ナトリウム（０．７０ｇ（１０．７ｍｍｏｌ）を、一夜攪拌した。混合物を蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィーにより、１：５：０．０１　CH_3OH／CH_2Cl_2／ＨＡｃで溶離して精製し、CH_3OH／トルエン／ヘキサンを用いて結晶化すると、１．００ｇ（９５％）の表題化合物が得られた。ｍ．ｐ＝２６７～２７２℃（分解）。1H NMR（DMF-d7）：12.06（br，1H），3.65（s，3H），3.59（dd，1H，J＝5.4，8.9 Hz），3.47（m，2H），2.24（m，2H）．^{13}C NMR 171.10，64.29，52.24，50.64，21.35．ESI MS m/z+ 267.9（M＋2Na-H），m/z- 222.0（M-H）．HRMS m/z-（$C_5H_9N_3O_5S$ -H）計算値222.0185、実測値222.0179。

【０２１３】

４－アジド－２－スルホ－酪酸

【０２１４】

【化３８】



【０２１５】

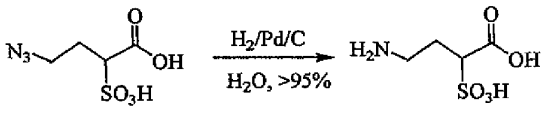
［202］　ＨＣｌ（５０ｍｌ，１．０Ｍ）およびＨＡＣ（５ｍｌ）の混合物中のメチル４－アジド－２－スルホ－ブチレート（１．００ｇ，４．０８ｍｍｏｌ）を、１００℃で８時間加熱した。混合物を蒸発させ、３×５０ｍｌの水で共蒸発させ、水／アセトンを用いて結晶化すると、１．０ｇ（９９％）の表題化合物が得られた。^1H NMR（DMF-d_7）：3.60（m，2H），3.52（m，1H），2.24（m，2H）．^{13}C NMR 170.96，63.04，50.66，29.12．ESI MS m/z- 207.7（MW-H）；HRMS m/z-（$C_4H_7N_3O_5S$ -H）計算値208.0028、実測値208.0021。

【０２１６】

４－アミノ－２－スルホ－酪酸

【０２１７】

【化３９】



【０２１８】

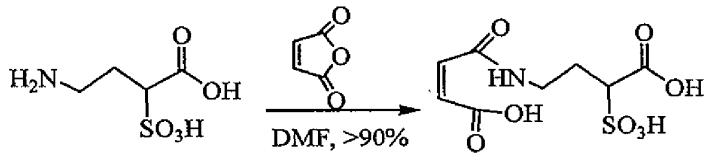
[203] ４－アジド－２－スルホ－酪酸（５００ｍｇ，２．４０ｍｍｏｌ）、水（２０ｍｌ）およびＰｄ／Ｃ（１１０ｍｇ，１０％Ｐｄ，５０％水に基づく）を、２５０ｍｌ水素化振とうボトルの中に入れた。ボトル中の空気をバキュームにより吸い出した後、２０ｐｓｉの水素をボトルの中に入れた。混合物を８時間振とうし、次いでセライトを通して濾過し、ＤＭＦで洗浄し、蒸発させ、乾燥ＤＭＦを用いて共蒸発させると、４７６ｍｇ（９１％　ＨＣｌ塩）の表題生成物が得られた。ESI MS m/z- 181.8 (MW-H)。この生成物を、それ以上精製せずに直接用いた。

【０２１９】

（Ｚ）－４－（３－カルボキシ－３－スルホプロピルアミノ）－４－オキソブタ－２－エン酸

【０２２０】

【化４０】



【０２２１】

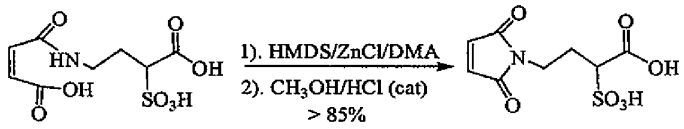
[204] 乾燥ＤＭＦ（２０ｍｌ）中の上記の４－アミノ－２－スルホ－酪酸、ＨＣｌ塩（４７６ｍｇ，２．１６ｍｍｏｌ）に、無水マレイン酸（２３２ｍｇ，２．３６ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒの下で一夜攪拌し、蒸発させ、自分で詰めた（ｓｅｌｆ　ｐａｃｋｅｄ）ｃ－１８、Φ１．０×２５ｃｍカラム上で、水で溶離して精製した。生成物を含んでいた画分を集め、蒸発させ、H_2O／アセトンを用いて結晶化すると、５５２ｍｇ（９１％）の表題生成物が得られた。^{1}H NMR (DMF-d7): 9.70 (br, 1H), 6.73 (d, 1H, J = 12.8 Hz), 6.32 (d, 1H, J = 12.8 Hz), 3.69 (m, 1H), 3.47 (m, 2H), 2.27 (m, 2H). ^{13}C NMR 171.47, 167.32, 165.87, 135.44, 133.07, 63.82, 39.13, 27.62. ESI MS m/z- 279.8 (MW-H); HRMS m/z- ($C_8H_{11}NO_8S$-H) 計算値280.0127、実測値280.0121。

【０２２２】

４－Ｎ－マレイミド－２－スルホ－ブタン酸

【０２２３】

【化４１】



【０２２４】

[205] 乾燥ＤＭＡ（５ｍｌ）および乾燥トルエン（２０ｍｌ）の混合物中の（Ｚ）－４－（３－カルボキシ－３－スルホプロピルアミノ）－４－オキソブタ－２－エン酸（３１０ｍｇ，１．１０ｍｍｏｌ）を加熱した。温度が８０℃に達した後、ＨＭＤＳ（ヘキサメチルジシラザン）（１．４０ｍｌ，６．７１ｍｍｏｌ）および$ZnCl_2$（１．８５ｍｌ、ジエチルエーテル中１．０Ｍ、１．８５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を１１５～１２５℃まで続けて加熱し、ディーン・スタークトラップを通してトルエンを集めた。反応混合物を１２０℃で６時間流した（ｆｌｕｘｅｄ）。この期間の間、２×２０ｍｌの乾燥トルエンを添加して混合物の体積をおよそ８～１０ｍｌに保った。次いで混合物を冷却し、１ｍｌの１：１０　ＨＣｌ（濃縮）／CH_3OHを添加し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上でCH_3OH／CH_2Cl_2／ＨＡｃ（１：５：０．０１～１：４：０．０１）で溶離して精製すると、２６０ｍｇ（９２％）の表題生成物が得られた。^{1}H NMR (DMF-d_7): 10.83(br, 1H), 6.95 (s, 2H) , 1H, J = 12.8 Hz), 3.65 (m, 1H), 3.54 (m,

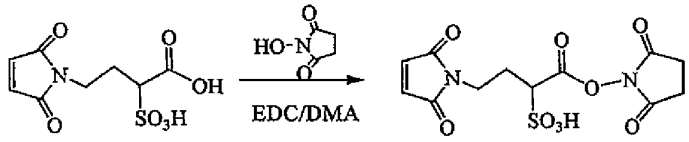
2H), 2.27 (m, 2H). ^{13}C NMR 173.61, 172.04, 135.47, 64.18, 37.1, 27.89. ESI MS m/z- 261.8 (MW - H). HRMS m/z- ($C_8H_9NO_7S$ - H) 計算値262.0021、実測値262.0027。

【0225】

スクシンイミジル 4 - N - マレイミド - 2 - スルホ - ブチレート

【0226】

【化42】



【0227】

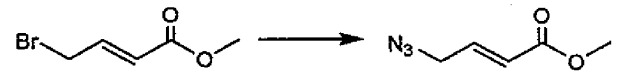
[206] DMA (10ml) 中の4 - N - マレイミド - 2 - スルホ - ブタン酸 (260mg, 0.99mmol) を、NHS (220mg, 1.91mmol) およびEDC (500mg, 2.60mmol) に添加した。混合物をArの下で一夜攪拌し、蒸発させ、SiO_2 クロマトグラフィー上でCH_2Cl_2 / CH_3OH / HAc (10000 : 1000 : 1 ~ 10000 : 2000 : 1) で溶離して精製し、次いでDMA / EtAc / ヘキサンを用いて結晶化すると、285mg (収率81%) の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (DMF-d7) 6.99 (s, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.64 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.34 (m, 2H); ^{13}C NMR 171.97, 171.82, 166.64, 135.58, 62.00, 36.66, 26.62; ESI MS m/z- 358.9 (M-H); HRMS m/z- ($C_{12}H_{12}N_2O_9S$ - H) 計算値359.0185、実測値359.0178。

【0228】

(E) - メチル 4 - アジドブタ - 2 - エノエート

【0229】

【化43】



【0230】

[207] - 20℃における100mlのDMF中のNaN_3 (2.80g, 43.01mmol) の溶液に、メチル 4 - ブロモクロトネート (5.00ml, 85%, 36.10mmol) を添加した。- 20℃で30分間攪拌した後、混合物を0℃で4時間攪拌し、蒸発させ、EtAc / ヘキサン (1 : 1) で懸濁し、濾過し、蒸発させ、SiO_2 カラム上でEtAc / ヘキサン (1 : 25 ~ 1 : 10) で溶離してクロマトグラフィー精製し、4.08g (80%) の表題生成物に関するHRMSを得た。^{1}H NMR ($CDCl_3$) 6.88 (m, 1H), 6.06 (ddd, 1H, J -= 1.7, 3.4, 15.6 Hz), 3.97 (dd, 2H, J = 1.2, 4.96 Hz), 3.73 (s, 3H); ^{13}C NMR 166.23, 140.86, 123.49, 51.95, 51.36; ESI MS m/z+ 182.5 (M+ Na + H_2O); HRMS m/z+ ($C_5H_7N_3O_2$ + H_2O + Na) 計算値182.0542、実測値182.0548。

【0231】

メチル 3 - (アセチルチオ) - 4 - アジドブタノエート

【0232】

【化44】



【0233】

[208] 0℃における60mlのTHF中の (E) - メチル 4 - アジドブタ - 2 - エノエート (4.00g, 28.37mmol) の溶液に、60mlのTHF中のチオール酢酸 (3.0ml, 42.09mmol) およびDIPEA (8.0ml, 45.92mmol) の混合物を、20分間で添加した。0℃で1時間攪拌した後、混合物を室温で一

夜撹拌し、蒸発させ、CH_2Cl_2中で再溶解し、$NaHCO_3$（飽和）および１Ｍ NaH_2PO_4／ＮａＣｌ（飽和）、ｐＨ４でそれぞれ洗浄し、ＭｇＳＯ４で乾燥させ、濾過し、蒸発させ、SiO_2カラム上でＥｔＡｃ／ヘキサン（１：８～１：４）で溶離してクロマトグラフィー精製し、４．９８ｇ（８１％）の表題生成物に関するＨＲＭＳを得た。^{1}H NMR ($CDCl_3$) 3.66 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.40 (dd, 1H, J = 7.5, 12.7 Hz), 3.31 (m, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.32 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMF-d7) 192.20, 172.48, 56.56, 53.60, 51.31, 34.58, 30.56; ESI MS m/z+ 240.0 (M+ Na), 255.9 (M+ K); HRMS m/z+ ($C_7H_{11}N_3O_3S$+ Na) 計算値240.0419、実測値240.0415。

【０２３４】

アジド－４－メトキシ－４－オキソブタン－２－スルホン酸

【０２３５】

【化４５】



【０２３６】

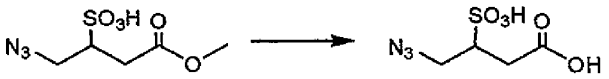
[209] ７５ｍｌの酢酸中のメチル ３－（アセチルチオ）－４－アジドブタノエート（４．００ｇ，１８．４３ｍｍｏｌ）に、２５ｍｌのH_2O_2（３０％）を添加した。混合物を一夜撹拌し、蒸発させ、ＥｔＯＨ／トルエンを用いて共蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上でCH_3OH／CH_2Cl_2／ＨＡｃ（１００：８００：１～１００：５００：１）で溶離して精製すると、３．８５（９３％）ｇの表題化合物が得られた。^{1}H NMR (CD_3OD) 3.78 (dd, 1H, J = 5.0, 12.7 Hz), 3.62 (s, 3H), 3.44 (dd, 1H, J = 7.5, 12.7 Hz), 3.33 (m, 1H), 2.84 (dd, 1H, J = 5.6, 16.5 Hz), 2.57 (dd, 1H, J = 7.5, 16.5 Hz); ^{13}C NMR (DMF-d7) 173.37, 57.31, 52.54, 52.49, 34.51; ESI MS m/z- 221.7 (M+ H)。

【０２３７】

４－アジド－３－スルホブタン酸

【０２３８】

【化４６】



【０２３９】

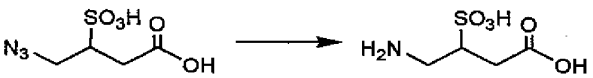
[210] １５０ｍｌの１．０Ｍ ＨＣｌ中のアジド－４－メトキシ－４－オキソブタン－２－スルホン酸（３．８０ｇ，１７．０４ｍｍｏｌ）に、８．０ｍｌのＨＡｃを添加した。混合物を１２０℃で一夜還流し、蒸発させ、水、ＥｔＯＨ、ＥｔＯＨ／トルエンを用いてそれぞれ共蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上でCH_3OH／CH_2Cl_2／ＨＡｃ（１００：５００：１～１００：４００：１）で溶離して精製すると、３．０２（８５％）ｇの表題化合物が得られた。^{1}H NMR (CD_3OD) 3.77 (dd, 1H, J = 5.1, 12.8 Hz), 3.45 (dd, 1H, J = 7.0, 12.8 Hz), 3.31 (m, 1H), 2.86 (dd, 1H, J = 4.7, 16.7 Hz), 2.51 (dd, 1H, J = 8.4, 16.7 Hz); ^{13}C NMR (DMF-d7) 173.98, 67.50, 59.78, 27.82; ESI MS m/z- 207.7 (M-H)。

【０２４０】

４－アミノ－３－スルホブタン酸

【０２４１】

【化４７】



【０２４２】

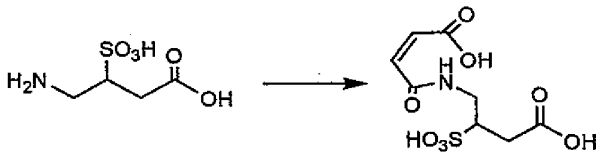
[211] ５００ｍｌの水素化ボトル中に、４－アジド－３－スルホブタン酸（３．００ｇ，１４．３５ｍｍｏｌ）、１５０ｍｌのメタノールおよび０．３２ｇのＰｄ／Ｃ（１０％Ｐｄ，５０％水（ｗｅｔ））を入れた。空気を吸い出した後、３０ｐｓｉのＨ２を導入し、混合物を一夜振とうし、セライトを通して濾過し、蒸発させ、乾燥ＥｔＯＨを用いて共蒸発させると、約２．５０ｇ（９５％）の４－アミノ－３－スルホブタン酸が得られた。^{1}H NMR (CD_3OD) 3.24 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 2.90 (dd, 1H, J = 2.6, 16.5 Hz), 2.33 (dd, 1H, J = 10.1, 16.5 Hz), ESI MS m/z- 181.60 (M-H)。得られた化合物は不安定であり、それ以上精製せずに直接用いた。

【０２４３】

（Ｚ）－４－（３－カルボキシ－２－スルホプロピルアミノ）－４－オキソブタ－２－エン酸

【０２４４】

【化４８】



【０２４５】

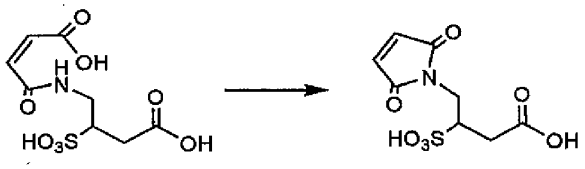
[212] １００ｍｌのＤＭＡ中の４－アミノ－３－スルホブタン酸（約２．５０ｇ，１３．６６ｍｍｏｌ）の溶液に、無水マレイン酸（１．４８ｇ，１５．１０ｍｍｏｌ）を添加し、混合物を一夜攪拌し、蒸発させ、Ｃ－１８カラム（２×３０ｃｍ）上で、水中１％ＨＡｃで溶離して精製し、ＭｅＯＨ／アセトン／トルエンを用いて結晶化すると、３．３４ｇ（８３％）の（Ｚ）－４－（３－カルボキシ－２－スルホプロピルアミノ）－４－オキソブタ－２－エン酸が得られた。^{1}H NMR (CD_3OD) 6.33 (d, 1H, J = 12.6 Hz), 6.10 (d, 1H, J = 12.6 Hz), 3.64 (dd, 1H, J = 5.8, 14.0 Hz), 3.54 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 2.78 (dd, 1H, J = 4.9, 16.8 Hz), 2.39 (m, 1H); ^{13}C NMR 173.52, 168.68, 167.98, 135.59, 127.79, 57.31, 40.56, 34.52; ESI MS m/z- 279.7 (M-H)。

【０２４６】

４－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－３－スルホブタン酸

【０２４７】

【化４９】



【０２４８】

[213] １０ｍｌの乾燥ＤＭＡおよび５０ｍｌの乾燥トルエンの混合物中の（Ｚ）－４－（３－カルボキシ－２－スルホプロピルアミノ）－４－オキソブタ－２－エン酸（４５０ｍｇ，１．６０ｍｍｏｌ）を加熱した。温度が８０℃に達した後、ＨＭＤＳ（ヘキサメチルジシラザン，１．８０ｍｌ，８．６３ｍｍｏｌ，）および$ZnCl_2$（３．２ｍｌ、ジエチルエーテル中１．０Ｍ）を添加した。混合物を１１５～１２５℃まで続けて加熱し、ディーン・スタークトラップを通してトルエンを集めた。反応混合物を１２０℃で６時間流した。この期間の間、２×２０ｍｌの乾燥トルエンを添加して混合物の体積をおよそ８～１０ｍｌに保った。次いで混合物を冷却し、１ｍｌの１：１０　ＨＣｌ（濃縮）／CH_3OHを添加し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上で１：５：０．０１　CH_3OH／CH_2Cl_2／ＨＡｃで溶離して精製すると、３１５ｍｇ（７５％）の表題生成

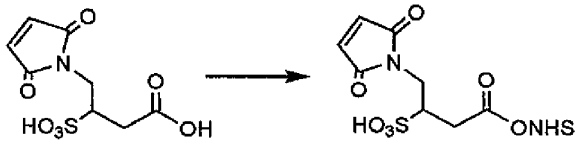
物が得られた。^{1}H NMR (DMF-d7) 6.96 (s, 2H), 4.04 (dd, 1H, J = 4.3, 13.8 Hz), 3.47 (m, 1H), 3.23 (dd, 1H, J = 7.4, 14.7Hz), 2.99 (dd, 1H, J = 3.3 , 16.8 Hz), 2.35 (dd, 1H, J = 8.1, 16.9 Hz); ^{13}C NMR 173.58, 172.18, 135.54, 54.61, 40.24, 32.43, ESI MS m/z- 261.70 (M-H)。

【0249】

1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-4-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシ)-4-オキソブタン-2-スルホン酸

【0250】

【化50】



【0251】

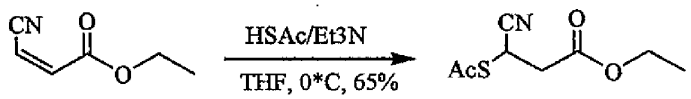
[214] 4-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-3-スルホブタン酸(110mg,0.418mmol)、EDC(240mg,1.25mmol)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(58mg,0.504mmol)を、10mlのDMA中で一夜撹拌し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー上で$CH_3OH/CH_2Cl_2/HAc$(100:900:1~100:600:1)で溶離して精製すると、112mg(75%)の表題生成物が得られた。^{1}H NMR (DMF-d7) 6.93 (s, 2H), 4.06 (dd, 1H, J = 4.8, 13.1 Hz), 3.80 (dd, 1H, J = 10.7, 13.9 Hz), 3.35 (dd, 1H J = 3.3, 17.8 Hz), 3.25 (m, 1H), 3.10 (dd, 1H, J = 2.2, 16.4 Hz), 2.87 (m, 4H); ^{13}C NMR 172.27, 170.88, 169.29, 135.55, 55.28, 40.22, 32.69, 26.66; ESI MS m/z- 261.70 (M-H)。

【0252】

エチル 3-(アセチルチオ)-3-シアノプロパノエート

【0253】

【化51】



【0254】

[215] -20℃における80mlのTHF中の(Z)-エチル 3-シアノアクリレート(5.01g,40.00mmol)に、20mlのTHF中のチオール酢酸(5.0ml,70.15mmol)およびDIPEA(16.0ml,92.03mmol)の溶液を30分間で添加した。反応物を-20℃で4時間、次いで室温で一夜保った。混合物を濃縮し、CH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$で洗浄し、$MgSO_4$で乾燥させ、濾過し、蒸発させ、SiO_2クロマトグラフィー(1:4 EtAC/ヘキサン)により精製すると、5.22g(65%)の表題化合物が得られた。Rf=0.25(1:4 EtAC/ヘキサン);^{1}H NMR ($CDCl_3$), 4.44 (m, 1H), 4.11 (dd, 2H, J = 7.1, 14.3 Hz), 3.38 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.19 (t, 3H, J = 7.2 Hz); ^{13}C NMR 194.12, 173.21, 119.82, 61.35, 33.52, 30.08, 14.62; MS m/z+ 225.9 (MW + Na), m/z- 201.7 (MW-H)。

【0255】

シアノ-3-エトキシ-3-オキソプロパン-1-スルホン酸

【0256】

【化５２】



【０２５７】

[216] 酢酸（４０ｍｌ）中のエチル　３－（アセチルチオ）－３－シアノプロパノエート（２．００ｇ，９．９５ｍｍｏｌ）に、H_2O_2（１２ｍｌ，３０％）を添加した。混合物を一夜攪拌し、蒸発させ、シリカゲルクロマトグラフィー上でメタノール／ジクロロメタン／酢酸（１：８：０．０１～１：５：０．０１）で溶離して精製すると、１．７２ｇ（８４％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (DMSO), 4.63 (m, 1H), 4.12 (dd, 2H, J = 7.1, 14.3 Hz), 3.27 (m, 1H), 3.05 (m, 1H), 1.28 (t, 3H, J = 7.2 Hz); ^{13}C NMR 173.15, 113.85, 61.38, 48.32, 26.33, 14.15; MS m/z- 205.7 (MW-H)。

【０２５８】

１－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）－４－エトキシ－４－オキソブタン－２－スルホン酸

【０２５９】

【化５３】



【０２６０】

[217] 水素化ボトル中に、シアノ－３－エトキシ－３－オキソプロパン－１－スルホン酸（２．５０ｇ，１２．０６ｍｍｏｌ）、エタノール（８０ｍｌ）、新しく濾過したラネーニッケル（０．４０ｇ）およびＢＯＣ無水物（３．３０ｇ，１５．１２ｍｍｏｌ）を入れた。ボトル内部の空気をバキュームにより吸い出した後、２０ｐｓｉの水素をボトルに導入した。ボトルを一夜振とうし、セライトを通して濾過し、蒸発させ、シリカゲルクロマトグラフィー上でメタノール／ジクロロメタン／酢酸（１：６：０．０１）で溶離して精製すると、３．１８ｇ（８５％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (DMSO), 6.82 (s, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.11 (dd, 2H, J = 7.1, 14.3 Hz), 3.53 (dd, 1H, J = 4.2, 13.4 Hz), 3.36 (m, 1H), 2.86 (m, 1H), 2.51 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.22 (t, 3H, J = 7.2 Hz); ^{13}C NMR 173.35, 155.72, 80.44, 62.05, 52.55, 41.61, 34.50, 28.85, 14.52; MS m/z- 309.8 (MW-H)。

【０２６１】

４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）－３－スルホブタン酸

【０２６２】

【化５４】



【０２６３】

[218] ＴＨＦ／H_2O（１：２，６０ｍｌ）の混合物中の１－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）－４－エトキシ－４－オキソブタン－２－スルホン酸（４０２ｍｇ，１．２９ｍｍｏｌ）に、水酸化リチウム一水和物（２．０ｇ，４７．６ｍｍｏｌ）を添加した。混合物をＡｒの下で一夜攪拌し、濃縮し、Ｃ－１８カラム（２×３０ｃｍ）上で、１００％水から水中１０％メタノールまでで溶離して精製すると、３２８ｍｇ（９０％）の表題化合物が得られた。^{1}H NMR (DMSO), 6.78 (s, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.57 (dd, 1H, J = 4.2, 13.4 Hz), 3.41 (m, 1H), 2.89 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 1.39 (s, 9H); ^{13}C NMR 174.21, 155.82, 79.85, 59.95, 42.06, 32.52, 28.88, 14.55; ESI MS 281.8 (M-H)

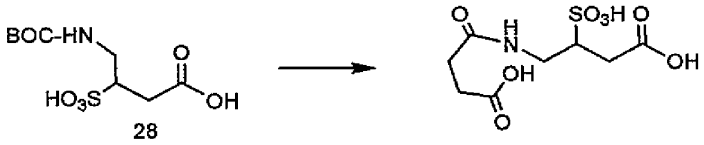
。

【０２６４】

（Ｚ）－４－（３－カルボキシ－２－スルホプロピルアミノ）－４－オキソブタ－２－エン酸

【０２６５】

【化５５】



【０２６６】

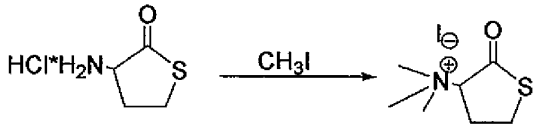
[219] ４－（Ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）－３－スルホブタン酸（３２１ｍｇ，１．１３ｍｍｏｌ）を、ＨＣｌ（濃縮）／ジオキサン（１：４，１５ｍｌ）の混合物中で３０分間攪拌し、蒸発させ、ＥｔＯＨ／トルエン（１：１，４×２０ｍｌ）を用いて共蒸発させ、乾燥させた。乾燥した物質に無水マレイン酸（１２１ｍｇ，１．２３ｍｍｏｌ）およびＤＭＡ（２０ｍｌ）を添加し、混合物を一夜攪拌し、蒸発させ、Ｃ－１８カラムを通し、水で溶離し、ＥｔＯＨ／ヘキサンを用いて結晶化すると、２６３ｍｇ（８３％）の表題化合物が得られた。ESI MS 279.8（M-H）。そのＮＭＲデータは、４－アジド－３－スルホブタン酸を用いる経路を通ったものと同じである。

【０２６７】

Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－２－オキソテトラヒドロチオフェン－３－アミニウム

【０２６８】

【化５６】



【０２６９】

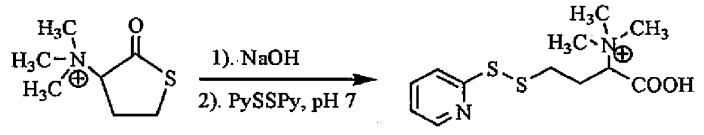
[220] ３－アミノジヒドロチオフェン－２（３Ｈ）－オン　塩酸塩（６．００ｇ，３９．１ｍｍｏｌ）、炭酸水素ナトリウム（３．２８ｇ，３９．１ｍｍｏｌ）およびヨードメタン（１３ｍｌ，２０９ｍｍｏｌ）を、乾燥メタノール（１００ｍｌ）中で一夜攪拌し、セライトを通して濾過し、蒸発させ、ＳｉＯ２カラム上でＭｅＯＨ／CH_2Cl_2／ＨＡｃ（１：５：０．０１）で溶離して精製し、ＥｔＯＨ／ヘキサンを用いて結晶化すると、５．２５ｇ（８４％）の表題生成物が得られた。ｍｐ　２２８～２３１℃。^{1}H NMR（CD_3OD）4.27（m, 1H）, 3.25（s, 9H）, 2.56 - 2.47（m, 2H）, 2.34（m, 1H）, 2.26（m, 1H）; ^{13}C NMR 168.97, 75.06, 53.25, 30.85, 16.46; ESI MS m/z+ 160.0（M+）。

【０２７０】

１－カルボキシ－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－３－（ピリジン－２－イルジスルファニル）プロパン－１－アミニウム

【０２７１】

【化５７】



【０２７２】

[221] Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－２－オキソテトラヒドロチオフェン－３－アミニウ

ムアセテート（２ｇ，９．１３ｍｍｏｌ）を、７５ｍｌの１Ｍ　ＮａＯＨ（７５ｍｌ　H_2O中３ｇ　ＮａＯＨ）中で４５分間攪拌した。４Ｍ　H_3PO_4でｐＨ７．４に中和し、濃縮し、２００ｍｌのＭｅＯＨ中の１，２-ジ（ピリジン-２-イル）ジスルファン（１１ｇ，４９．９ｍｍｏｌ）に添加した。混合物を一夜攪拌し、ＥｔＡｃで抽出した。水溶液を蒸発させ、ＭｅＯＨで懸濁し、塩を濾過し、蒸発させ、Ｃ-１８カラム（２ｃｍ×３０ｃｍ）上で水／メタノール（１００水~２０％メタノール／水）で溶離して精製すると、２．６ｇ（７５％）の表題生成物が得られた。ESI MS m/z+ 309.1（M+Na-H）。

【０２７３】

１．抗体のスルホリンカーによる修飾

[222] ８ｍｇ／ｍＬ抗体、１５倍モル過剰のスルホリンカー（ＤＭＡ中約３０ｍＭのストック溶液）において、ｈｕＣ２４２をスルホリンカーにより修飾する。反応は、ＤＭＡを含む（５％　ｖ／ｖ）１００ｍＭ　ＮａＰｉ、ｐＨ８．０の緩衝液中で、２５℃において１５、３０、１２０、および２００分間実施する。修飾されたｈｕＣ２４２を、Ｇ２５カラムにより、５０ｍＭ　ＮａＰｉ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、および２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５を用いて精製して、過剰なスルホリンカーを除去した。

【０２７４】

２．修飾されたｈｕＣ２４２の放出可能なＳｐｙ-NO_2および抗体の濃度の測定

[223] そのアッセイおよびスペクトルの測定は、１００ｍＭ　ＮａＰｉ、ｐＨ７．５中で室温において実施した。１モルのｈｕＣ２４２抗体につき放出されるＳｐｙ-NO_2のモル比を、試料のA_{280}、次いでＤＴＴ（５０μＬの１Ｍ　ＤＴＴ／試料のｍＬ）の添加の後の試料のA_{394}の増大を測定することにより計算した。ＤＴＴにより放出された２-メルカプトピリジンの濃度は、１４，２０５$M^{-1}cm^{-1}$のε_{394nm}を用いて計算される。次いで、抗体の濃度は、ＤＴＴ添加の前に測定された全A_{280nm}からＳｐｙ-NO_2の２８０ｎｍにおける吸光度の寄与（ＤＴＴ後のA_{394nm}×３３４４／１４２０５）を引算した後に２１７，５６０$M^{-1}cm^{-1}$のε_{280nm}を用いて計算することができる。次いで、Ｓｐｙ-NO_2：Ａｂのモル比を計算することができる。ｈｕＣ２４２のｍｇ／ｍＬ（ｇ／Ｌ）濃度は、１４７，０００ｇ／モルの分子量を用いて計算される。

【０２７５】

３．コンジュゲーション反応

[224] 修飾されたｈｕＣ２４２を、Ｓｐｙ-NO_2に対して１．７倍モル過剰のＤＭ４（ＤＭ４ストックのＳＨ濃度に基づく）と反応させた。反応は５０ｍＭ　ＮａＰｉ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５およびＤＭＡ（５％　ｖ／ｖ）中２．５ｍｇ／ｍＬ抗体で実施する。ＤＭ４の添加の後、反応物を２５℃で約２０時間保温した。最終的なコンジュゲートを、Ｇ２５カラムにより、１０ｍＭヒスチジン、１３０ｍＭグリシン、５％スクロース、ｐＨ５．５を用いて精製して、過剰なＤＭ４薬物を除去した。

【０２７６】

４．ｈｕＣ２４２およびＤＭ４濃度の計算

[225] ｈｕＣ２４２およびＤＭ４は共にそれぞれの構成要素を別々に測定するのに用いられる２種類の波長、すなわち２８０および２５２ｎｍを吸収する。ｈｕＣ２４２に関する２８０ｎｍにおける吸光係数は２１７，５６０、ＤＭ４に関する２８０ｎｍにおける吸光係数は５１８０M^{-1}である。ｈｕＣ２４２およびＤＭ４の２５２ｎｍ／２８０ｎｍの吸光度の比はそれぞれ０．３６８および５．０５である。濃度は次の方程式を用いて計算された：

【０２７７】

【数１】

$$C_D = \frac{A_{252} - 0.368A_{280}}{24692.4} \qquad C_{Ab} = \frac{A_{280} - 5180C_D}{217{,}560}$$

【０２７８】
結果
【０２７９】
【表１】

修飾時間	L/A	D/A	単量体の比率	遊離の薬物の%
15分	5.0	4.1	96.7%	N/D*
30分	6.1	5.4	96.2%	<1%
120分	6.6	6.8	95.7%	<1%
200分	6.6	6.3	95.9%	<1%

【０２８０】
Ｃ２４２－スルホ－ＤＭ４リンカータイトレーション
【０２８１】
【表２】

リンカーの過剰度	L:A	DM4 xs	D:A	mg/mL Ab	μg/mL DM4	%単量体	% 遊離の薬物
5	2.4	1.7	1.9	0.83	8.2	95	0
10	4.1	1.7	3.3	0.83	14.4	94	0
15	5.6	1.7	4.6	0.82	20.0	93	0
20	7.3	1.7	6.0	0.82	25.8	91	0
25	9.1	1.3	6.6	0.79	27.7	92	0.6
30	10.4	1.3	7.6	0.68	27.5	94	1.1
35	12.2	1.3	8.2	0.67	26.7	95	1.6

【０２８２】
コンジュゲーションのプロトコル：
[226] 修飾は、ｐＨ８．０、緩衝液Ａおよび５％　ＤＭＡにおいて室温で９０分間行われ、抗体濃度は７ｍｇ／ｍＬである。修飾された抗体を、ＮＡＰカラムにより、緩衝液Ａ　ｐＨ６．５を用いて精製した。コンジュゲーションは、５～１０％　ＤＭＡを含む緩衝液Ａ、ｐＨ６．５において、室温で一夜行った（ｄｏｗｎ）。薬物対リンカー比は、添加された薬物の総量に依存して１．３から１．７の範囲であった。
【０２８３】
実施例２：コンジュゲートの合成。
[227] ＳＰＰまたはＳＳＮＰＰリンカーをエタノール中でおおよそ１０ｍＭの濃度で溶解した。抗体を、緩衝液Ａ（５０ｍＭ　ＫＰｉ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５）中に透析した。リンカー反応に関して、抗体は８ｍｇ／ｍｌであり、７当量のリンカーを５％（ｖ／ｖ）エタノールの存在下で攪拌しながら添加した。反応を周囲温度で９０分間進行させた。未反応のリンカーを抗体から、示したようにｐＨ６．５の緩衝液Ａまたは１００ｍＭ　ＮａＣｌを含む１５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液、ｐＨ７．４で平衡化したＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５カラムを用いるＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５ゲル濾過により除去した。ＳＰＰリンカーに関して、修飾の程度は下記のような５０ｍＭ　ＤＴＴを用いるピリジン－２－チオンの放出および３４３ｎｍにおける吸光度の測定により評価された（遊離のピリジン－２－チオンに関して$\varepsilon_{343}=8080\,M^{-1}cm^{-1}$）。ＳＳＮＰＰに関して、修飾は３２５ｎｍにおける吸光度の測定により直接評価された（抗体に連結された４－ニトロピリジル－２－ジチオ基に関して$\varepsilon_{325}=10,964\,M^{-1}cm^{-1}$）。コンジュゲーション反応のため、チオールを含む薬物（ＤＭ１またはＤＣ４のどちらか）をＤＭＡ（Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド）中でおおよそ１０ｍＭの濃度で溶解した。薬物（示したように、抗体あたりのリンカー分子の数と比較して０．８～

１．７倍モル過剰）を、緩衝液Ａ（ｐＨ６．５またはｐＨ７．４）中２．５ｍｇ／ｍｌの濃度である抗体に、攪拌しながらゆっくりと添加し、ＤＭＡの終濃度は３％（ｖ／ｖ）であった。その反応を、周囲温度において示した時間の間進行させた。薬物とコンジュゲートした抗体を、緩衝液Ｂ（ＰＢＳ、ｐＨ６．５）で平衡化したＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５カラムを用いて精製した。ＤＭＬに関して、抗体に対する薬物のコンジュゲーションの程度を、下記のようにコンジュゲートのA_{252}およびA_{280}を測定することにより評価した。類似のアプローチをＤＣ４に関して用いた（下記参照）。

【０２８４】

ＳＰＰで修飾されたＡｂの放出可能なピリジン－２－チオンおよびＡｂ濃度の測定。

[228] 抗体１モルにつき放出されるピリジン－２－チオンのモル比は、試料のA_{280}、次いでＤＴＴ（５０μＬの１Ｍ　ＤＴＴ／試料のｍＬ）の添加の後の試料のA_{343}の増大を測定することにより計算される。ＤＴＴにより放出されたピリジン－２－チオンの濃度は、８０８０$M^{-1}cm^{-1}$のε_{343}を用いて計算される。次いで、抗体の濃度は、ＤＴＴ添加の前に測定された全A_{280nm}からピリジン－２－チオンの２８０ｎｍにおける吸光度の寄与（ＤＴＴ後のA_{343nm}×５１００／８０８０）を引算した後に１９４，７１２$M^{-1}cm^{-1}$のε_{280}を用いて計算することができる。次いで、ピリジン－２－チオン：Ａｂのモル比を計算することができる。Ａｂのｍｇ／ｍＬ（ｇ／Ｌ）濃度は、１４７，０００ｇ／モルの分子量を用いて計算される。

【０２８５】

ＳＳＮＰＰで修飾されたＡｂの、抗体と連結された５－ニトロピリジル－２－ジチオ基およびＡｂ濃度の測定。

[229] 抗体１モルにつき連結された４－ニトロピリジル－２－ジチオ基のモル比は、ＤＴＴ処理無しの試料のA_{280}およびA_{325}を測定することにより計算される。抗体に結合した４－ニトロピリジル－２－ジチオ基の数は、１０，９６４$M^{-1}cm^{-1}$のε_{325nm}を用いて計算される。次いで、抗体の濃度は、測定された全A_{280nm}から５－ニトロピリジル－２－ジチオ基の２８０ｎｍにおける吸光度の寄与（A_{325nm}×３３４４／１０９６４）を引算した後に１９４，７１２$M^{-1}cm^{-1}$のε_{280nm}を用いて計算することができる。次いで、４－ニトロピリジル－２－ジチオ基：Ａｂのモル比を計算することができる。Ａｂのｍｇ／ｍＬ（ｇ／Ｌ）濃度は、１４７，０００ｇ／モルの分子量を用いて計算される。

【０２８６】

Ａｂ－ＤＭ１のＡｂおよびＤＭ１構成要素の濃度の計算。

[230] ＡｂおよびＤＭ１は共に、それぞれの構成要素を別々に測定するのに用いられる２種類の波長、すなわち２８０および２５２ｎｍを吸収する。その構成要素は、それぞれの波長におけるそれぞれの構成要素の寄与を説明する次の代数式を用いて定量される（C_{Ab}はＡｂのモル濃度であり、C_DはＤＭ１のモル濃度である）：

１）全A_{280}＝１９４，７１２C_{Ab}＋５，７００C_D

２）全A_{252}＝（１９４，７１２×０．３７）C_{Ab}＋（４．７×５，７００）C_D

それぞれの方程式をC_{Ab}に関して解く：

【０２８７】

【数２】

$$1a)\ C_{Ab}=\frac{A_{280}-5{,}700C_D}{194{,}712}$$

【０２８８】

【数３】

$$2a)\ \frac{C_{Ab}=A_{252}-26{,}790C_D}{72{,}043}$$

【０２８９】