

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-536446
(P2015-536446A)

(43) 公表日 平成27年12月21日(2015.12.21)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573	A 4 B 0 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 A 4 C 0 8 6
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
C 12 Q 1/48 (2006.01)	C 12 Q 1/48	Z
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-536969 (P2015-536969)	(71) 出願人	509181220 ファーマサイクリックス、インク。
(86) (22) 出願日	平成25年10月11日 (2013.10.11)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 085, サニーベイル, イースト アーク エス アベニュー 995
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月21日 (2015.4.21)	(74) 代理人	100082072
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/064688	弁理士	清原 義博
(87) 國際公開番号	W02014/059368	(72) 発明者	チャン, ペティー, ワイ。 アメリカ合衆国 95014 カリフォル ニア州 クパチーノ リンゼイ・アベニュ ー 10375
(87) 國際公開日	平成26年4月17日 (2014.4.17)	(72) 発明者	チャン, ステラ アメリカ合衆国 95122 カリフォル ニア州 サンノゼ サマートン・ドライブ 2195
(31) 優先権主張番号	61/712,675		
(32) 優先日	平成24年10月11日 (2012.10.11)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

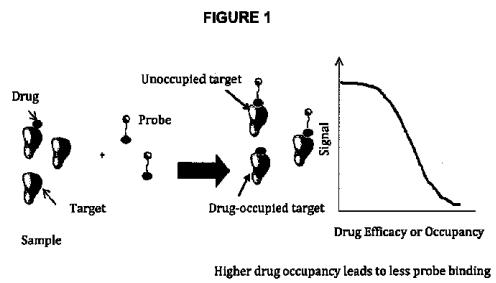
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TECファミリーキナーゼ阻害剤療法のためのコンパニオン診断

(57) 【要約】

本発明は、標的キナーゼに対するTECファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定するための方法、アッセイ、及びシステムを提供する。方法、アッセイ、及びシステムは、TECファミリーキナーゼ阻害剤（例えば、BTK阻害剤）による標的キナーゼの占有率を決定することに関連する。このような定量的測定法を使用して、対象者の治療法、及び全体的な健康管理法についての情報を提供する。例えば、疾患を診断、予測、及びモニタリングするため、又はTECファミリーキナーゼ阻害剤を用いる治療による効果が見込まれることを示すための、診断キットが提供される。別の例では、TECファミリーキナーゼ阻害剤療法に対する応答を特定するため、治療レジメンを決定するため、及びTECファミリーキナーゼ阻害剤に対する耐性を検出するための診断キットも提供される。

【選択図】図1

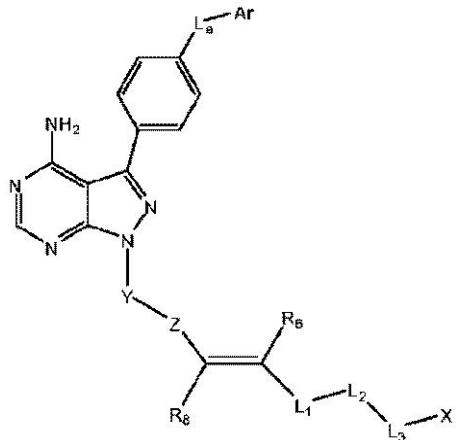


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(II)の構造を有するプローブを含むTECファミリーーキナーゼ阻害剤療法を受けている患者における薬剤標的の占有率を決定するためのキットであって、式(II)の構造は

【化1】



式(II)

からなり、

(式中、

L_aは、CH₂、O、NH又はSであり、

Arは、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

Yは、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

Zは、C(O)、OC(O)、NHC(O)、C(S)、S(O)_n、OS(O)_n、NHS(O)_nであり、式中、nは1又は2であり、

R₆及びR₈は、独立して、H、場合により置換されたアルキル、又は場合により置換されたヘテロアルキルから選択され、

L₁は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、

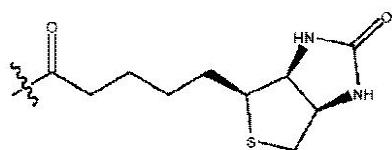
L₂は、結合、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、又は-N(H)C(O)(CH₂)_mC(O)N(H)-であり、式中、mは2~6であり、

L₃は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、かつXは検出可能な標識である)、前記プローブはTECファミリーーキナーゼに結合する、キット。

【請求項2】

Xが

【化2】



である、請求項1に記載のキット。

【請求項3】

前記プローブが、

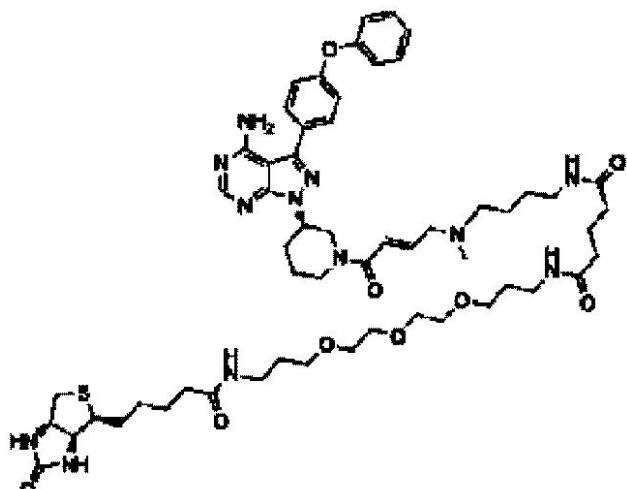
10

20

30

40

【化3】



10

の構造を有する、請求項1に記載のキット。

【請求項4】

前記プローブは、ブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)、ITK、TEC、B MX、TX K、又はBLKに結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載のキット。

【請求項5】

プレート、マイクロプレート、ビーズ、又は複数のビーズから選択される1つ以上の固体支持体を更に含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項6】

前記固体支持体を捕捉剤によりコートしてコート固体支持体を作製し、ここで、前記捕捉剤はプローブに結合するものである、請求項5に記載のキット。

【請求項7】

前記捕捉剤がストレプトアビジン又は抗体である、請求項6に記載のキット。

【請求項8】

一次検出剤、及び場合により、前記一次検出剤に結合する二次検出剤を更に含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項9】

前記一次検出剤又は二次検出剤が、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む、請求項8に記載のキット。

【請求項10】

前記一次検出剤が、抗BTK抗体、抗ITK抗体、抗TEC抗体、抗TXK抗体、抗B MX抗体、又は抗BLK抗体である、請求項9に記載のキット。

【請求項11】

前記一次又は二次検出剤に電気化学発光タグを複合させる、請求項8～10のいずれか一項に記載のキット。

【請求項12】

TECファミリーキナーゼ阻害剤療法を受けている患者における薬剤標的の占有率を決定するための方法であって、

40

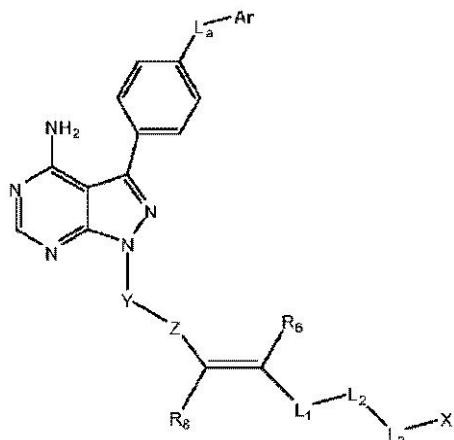
(a) TECファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させて、プローブの結合しているキナーゼを形成させること、

(b) 前記サンプル中の、プローブの結合しているキナーゼの量を検出することと、

(c) 前記サンプルにおいて検出されたプローブの結合しているキナーゼの量に基づき前記TECファミリーキナーゼの標的占有率を決定することと、を含み、

前記サンプルは、不可逆的TECファミリーキナーゼ阻害剤の少なくとも一回量を投与された患者から得たものであり、前記プローブは、式(I)I)

【化4】



式(I-I)

の構造を含む

(式中、

 L_a は、 $C H_2$ 、O、NH又はSであり、

Arは、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

Yは、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

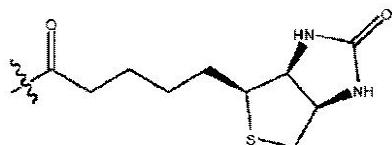
Zは、C(O)、OC(O)、NHC(O)、C(S)、S(O)_n、OS(O)_n、NHS(O)_nであり、式中、nは1又は2であり、 R_6 及び R_8 は、独立して、H、場合により置換されたアルキル、又は場合により置換されたヘテロアルキルから選択され、 L_1 は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、 L_2 は、結合、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、又は-N(H)C(O)(CH₂)_mC(O)N(H)-であり、式中、mは2~6であり、 L_3 は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、かつ

Xは検出可能な標識である)、方法。

【請求項13】

Xが

【化5】



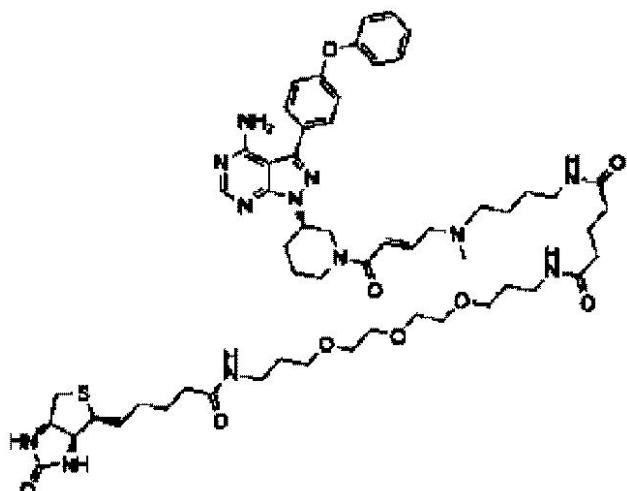
である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記プローブが

40

【化6】



10

の構造を有する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

標的占有率を決定することが、i) 前記サンプル中に検出された前記プローブの結合しているキナーゼの量に基づき、前記TECファミリーキナーゼ阻害剤の結合していない結合部位の数を求めることと、ii) 前記サンプル中の活性型TECファミリーキナーゼの総量に対し前記数を比較することと、を含む、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項16】

前記TECファミリーキナーゼの標的占有率に基づき治療レジメンを決定すること又は修正することを更に含む、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

TECファミリーキナーゼ阻害剤療法を受けている患者における薬剤標的の占有率をモニタリングする方法であって、治療過程の2つ以上の時点で、請求項12～16のいずれか一項に記載の方法を実施する、方法。

30

【請求項18】

i) 前記標的占有率が約50%未満の場合に、前記TECファミリーキナーゼ阻害剤の投与量を増加させることと、ii) 前記標的占有率が少なくとも約70%を上回る場合に、前記TECファミリーキナーゼ阻害剤の投与量を減少させることと、iii) 前記TECファミリーキナーゼ阻害剤の同等の治療レジメンを維持すること、又はiv) 前記治療レジメンを中断することと、を更に含む、請求項16又は17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記標的占有率に基づき前記TECファミリーキナーゼ阻害剤療法の有効性を決定することを更に含み、前記TECファミリーキナーゼ阻害剤が、i) 前記TECファミリーキナーゼの占有率が少なくとも約70%であるとき有効であり、又はii) 前記TECファミリーキナーゼの占有率が約50%未満であるとき有効ではない、請求項12～18のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項20】

前記TECファミリーキナーゼ阻害剤がブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)の阻害剤である、請求項12～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記TECファミリーキナーゼ阻害剤がイブルチニブである、請求項12～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

プローブの結合しているキナーゼを捕捉剤により捕捉することを更に含む、請求項12～21のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 2 3】

前記捕捉剤がストレプトアビジン又は抗体である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記捕捉剤が固体支持体に付加されている、請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記固体支持体がプレート、マイクロプレート、ビーズ、又は複数のビーズである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記プローブの結合しているキナーゼを、一次検出剤、及び場合により、該一次検出剤に結合する二次検出剤と接触させることを更に含む、請求項 1 2 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 2 7】

前記一次検出剤又は二次検出剤が、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記一次検出剤が、抗 BTK 抗体、抗 ITK 抗体、抗 TXK 抗体、抗 TEC 抗体、抗 BMX 抗体、又は抗 BLK 抗体である、請求項 2 6 又は 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記一次又は二次検出剤に化学発光タグを複合させる、請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 3 0】

患者が癌に罹患している、請求項 1 2 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法

【請求項 3 1】

癌が、ホジキンリンパ腫若しくは非ホジキンリンパ腫 (NHL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、マントル細胞リンパ腫 (MCL)、濾胞性リンパ腫 (FL)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、ワルデンストームマクログロブリン血症、又は多発性骨髄腫 (MM) である、請求項 3 0 に記載の方法。 。

【請求項 3 2】

前記サンプルが血液サンプル、リンパ液サンプル、又は腫瘍生検サンプルである、請求項 1 2 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国特許仮出願番号第 61 / 712,675 号 (2012 年 10 月 11 日出願) の利益に関する優先権を請求し、前記仮出願特許は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本明細書には、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤の投与を含む治療と組み合わせて使用するための、コンパニオン診断法及びキットが記載される。 40

【背景技術】**【0 0 0 3】**

TEC キナーゼファミリーは、非受容体型タンパク質チロシンキナーゼ (PTK) のサブファミリーである。TEC キナーゼファミリーは、TEC、BTK (ブルトン型チロシンキナーゼ)、ITK (インターロイキン 2 誘導型 T 細胞キナーゼ) / EMT / TSK、BMX、及び TXK / RLK の 5 つのメンバーからなる。このファミリーは、ホスホイノシチドに結合することが既知であるプレクストリン相同 (PH) ドメインが存在することを特徴とする。TEC ファミリーキナーゼは、ホスホチロシン介在性及びリン脂質介在性

のシグナル伝達システムに関与する。多くのT E Cファミリータンパク質は、造血組織において豊富に発現し、血液細胞の増殖及び分化過程において重要な役割を果たす。B T K遺伝子の変異により、ヒトにおいてはX染色体連鎖無ガンマクロブリン血症(X L A)及びマウスにおいてはX染色体連鎖免疫不全(X i d)が生じることから、B T K活性はB細胞の発生過程に不可欠であることが示唆されている。I T Kは、T h 2及びT h 17細胞の発達及びエフェクター機能にとって機能上重要である。加えて、T E Cファミリーキナーゼは、サイトカイン受容体、リンパ球表面抗原、ヘテロ三量体Gタンパク質共役型受容体及びインテグリン分子の細胞内シグナル伝達機序に関与することが示唆されている。これまでに、癌、自己免疫障害、及び炎症性疾患など、T E Cファミリーキナーゼの活性と関連する多様な疾患の治療のために、T E Cキナーゼの阻害剤が開発されている。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 4】

本明細書では、T E Cファミリーキナーゼ阻害剤の投与を含む治療と組み合わせて使用するためのコンパニオン診断法及びキットが記載される。いくつかの実施形態では、提供されるコンパニオン診断法は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上の阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイを包含する。したがって、本明細書では、T E Cキナーゼファミリーのキナーゼ阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイが記載される。本明細書では更に、T E Cキナーゼファミリーの不可逆的キナーゼ阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイが記載される。本明細書では更に、T E Cキナーゼファミリーの可逆的キナーゼ阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイが記載される。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、B T K、I T K、B M X、T X K、T E C、又はこれらの任意の組み合わせの阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、構造的に相同な1種以上のキナーゼの阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、構造的に相同な1種以上のチロシンキナーゼ(例えば、構造的に相同的活性部位を有するキナーゼ)の阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、E G F Rファミリーのキナーゼの阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、H E R 1(E G F R、E r b B 1)、H E R 2/c - n e u(E r b B 2)、H E R 3(E r b B 3)及びH E R 4(E r b B 4)、又はJ A K 3の阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、S R Cファミリーのチロシンキナーゼの阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、Bリンパ球キナーゼ(B L K)の阻害剤でもある。本明細書は、提供されるタンパク質占有率アッセイに使用するための例示的な試薬及びプローブを更に記載する。

20

【0 0 0 5】

本明細書における特定の実施形態では、E L I S Aプローブアッセイであるタンパク質占有率アッセイが記載される。いくつかの実施形態では、E L I S Aプローブアッセイは、T E Cファミリーキナーゼ阻害剤の結合していないT E Cファミリーキナーゼの相対量を定量するための、プレートベースの電気化学発光アッセイである。いくつかの実施形態では、T E Cファミリーキナーゼ阻害剤は不可逆的T E Cファミリーキナーゼ阻害剤である。例えば、いくつかの実施形態では、T E Cファミリーキナーゼ阻害剤は、T E Cファミリーキナーゼの活性部位に結合し、システイン残基によりジスルフィド結合を形成する。いくつかの実施形態では、アッセイは、T E Cファミリーキナーゼ阻害剤の結合していないT E Cファミリーキナーゼに対しプローブを結合させることを包含する。いくつかの

30

40

50

実施形態では、プローブは、リンカー（例えば、長鎖リンカー）により、検出可能な標識（例えば、ビオチン）が付加されたT E Cファミリーーキナーゼ阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤はB T K阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤は不可逆的B T K阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤はイブルチニブである。いくつかの実施形態では、プローブは本明細書に記載の化合物I - 5であり、長鎖リンカーによりビオチンに連結されているイブルチニブからなる。プローブによるサンプル標識は、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤により占有されないB T Kの検出を可能にする。いくつかの実施形態では、プローブは、ストレプトアビジンコートプレートにより捕捉されたT E Cファミリーーキナーゼ（すなわち、プローブの結合しているキナーゼ）と複合体形成する。いくつかの実施形態では、複合体を形成していない過剰なプローブは、ストレプトアビジンに対する結合に関し、プローブの結合しているキナーゼと競合する。

10

【0006】

本明細書では、T E Cキナーゼファミリー阻害剤の有効性を決定するための方法も記載される。本明細書は、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のメンバーの阻害により、疾患有する患者に治療効果がもたらされる疾患を含む、T E Cキナーゼファミリーの1種以上のメンバーの活性と関連する疾患の治療における診断、予測、並びに治療レジメンの決定及び修正においてタンパク質占有率アッセイを使用するための方法を更に記載する。いくつかの実施形態では、特許（patent）は、例えば、癌、自己免疫障害、及び／又は炎症性疾患など、T E Cファミリーーキナーゼの異常な活性化と関連する疾患又は障害を有するとして診断される。

20

【0007】

一態様では、本明細書では、プレートベースのシステムを含む、タンパク質占有率アッセイが提供される。いくつかの実施形態では、プレートベースのタンパク質占有率アッセイは、電気化学発光アッセイを含む。

【0008】

本明細書には、サンプル中の、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤の結合していない（例えば、活性部位が阻害剤により占有されていない）T E Cファミリーーキナーゼの量を定量するための方法が記載される。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤の結合していないB T Kの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤はB T K阻害剤である。いくつかの実施形態では、B T K阻害剤はイブルチニブである。いくつかの実施形態では、B T K阻害剤はA V L - 2 9 2である。いくつかの実施形態では、B T K阻害剤はO N O - W G - 3 0 7である。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合していないT E Cファミリーーキナーゼの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合していないB T Kの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合していないI T Kの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合していないB M Xの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合していないT E Cの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合していないT X Kの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合していないB L Kの量を定量することを含む。

30

【0009】

いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤に結合されていないB T Kキナーゼ活性部位の数を求めるることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤に結合されていないI T Kキナーゼ活性部位の数を求めるることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、T E Cファミリーーキナーゼ阻害剤に結合されていないB M X活性部位の数を求めるることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、T E Cファミリーーキナ-

40

50

ーゼ阻害剤に結合されていない TXK 活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤に結合されていない TEC 活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤に結合されていない BLK 活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤は、TEC キナーゼファミリーの 2 種以上のメンバーを阻害する。いくつかの実施形態では、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤は、BTK、ITK、B MX 、TXK、TEC、又はこれらの任意の組み合わせを阻害する。いくつかの実施形態では、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤は、EGFR 又は SRC ファミリーのチロシンキナーゼを阻害する。

【0010】

10

いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合されていない BTK キナーゼ活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合されていない ITK キナーゼ活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合されていない B MX 活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合されていない TXK 活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合されていない TEC 活性部位の数を求めるなどを含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の、イブルチニブに結合されていない BLK 活性部位の数を求めるなどを含む。

【0011】

20

いくつかの実施形態では、タンパク質占有率アッセイは、サンプルをプローブと接触させることと、プローブに結合する TEC ファミリーーキナーゼ（すなわち、プローブの結合しているキナーゼ）を検出することと、を含み、ここで、プローブは、リンカーにより標識が付加された TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、プローブはイブルチニブの誘導体であり、イブルチニブにはリンカーにより標識が付加される。いくつかの実施形態では、標識はビオチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、プローブは、本明細書に記載の通りの式(I)、(II)、又は(III)のプローブから選択される。いくつかの実施形態では、プローブは、本明細書に記載の通りのプローブ化合物 I - 1、I - 2、I - 3、I - 4、又は I - 5 から選択される。いくつかの実施形態では、プローブはプローブ化合物 I - 5 である。

30

【0012】

本明細書のいくつかの実施形態では、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤を投与された患者由来のサンプルにおけるタンパク質占有率を検出するためのコンパニオン診断キットが開示される。いくつかの実施形態では、キットは、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤に結合していない TEC ファミリーーキナーゼに結合するプローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブは、TEC ファミリーーキナーゼに結合する阻害剤を含む（例えば、プローブは、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤の誘導体である）。いくつかの実施形態では、阻害剤には標識を付加する。いくつかの実施形態では、プローブは、更にリンカーを含み、リンカーは、標識を阻害剤に付加させ得る。いくつかの実施形態では、プローブは、TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤の誘導体である。いくつかの実施形態では、プローブは、リンカーにより標識が付加された TEC ファミリーーキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、プローブは、イブルチニブの誘導体である。いくつかの実施形態では、プローブは、リンカーにより標識が付加されたイブルチニブからなる。いくつかの実施形態では、プローブは、リンカーによりビオチンを付加したイブルチニブからなる。いくつかの実施形態では、プローブは、式(I)、(II)、又は(III)の化合物である。いくつかの実施形態では、プローブは、化合物 I - 1、I - 2、I - 3、I - 4、又は I - 5 である。いくつかの実施形態では、キットは、1 つ以上の固体支持体を更に含む。

40

【0013】

本明細書では、(a) TEC ファミリーーキナーゼ、又はチロシンキナーゼ相同体を含むサンプルをプローブと接触させることと、(b) プローブの結合しているキナーゼの量を

50

検出することと、(c)サンプル中の、プローブの結合しているキナーゼの量に基づき、キナーゼの占有率を決定することと、を含む、方法が更に開示される。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。

【0014】

本明細書では、(a)T E C ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させることと、(b)プローブの結合しているキナーゼの量を検出することと、(c)プローブの結合しているキナーゼの量に基づきキナーゼの占有率を決定することと、(d)キナーゼの占有率に基づき治療レジメンを決定することと、を含む、治療レジメンを決定するための方法が更に開示される。いくつかの実施形態では、治療レジメンを決定することは、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤を投与することを含む。いくつかの実施形態では、治療レジメンを決定することは、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤を用い治療レジメンを修正することを含む。いくつかの実施形態では、治療レジメンを修正することは、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤を用い、治療レジメンを増加、減少、開始又は終了することを含む。いくつかの実施形態では、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤を用いる治療レジメンは、標的の占有率が上昇したときに修正される。いくつかの実施形態では、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤を用いる治療レジメンは、標的の占有率が低下したときに修正される。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。

10

20

30

40

【0015】

本明細書では、(a)T E C ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させることと、(b)プローブの結合しているキナーゼの存在又は非存在を検出することと、(c)プローブの結合しているキナーゼの量に基づきキナーゼの占有率を決定することと、(d)キナーゼの占有率に基づきT E C ファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定することと、を含む、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定するための方法が更に開示される。いくつかの実施形態では、標的の占有率が少なくとも約70%であるとき、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤は有効である。いくつかの実施形態では、標的の占有率が約50%未満であるとき、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤は有効ではない。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。

【0016】

本明細書は、(a)T E C ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させることと、(b)プローブの結合しているキナーゼの量を検出することと、(c)プローブの結合しているキナーゼの量に基づきT E C ファミリーキナーゼの占有率を決定することと、(d)キナーゼの占有率に基づき、対象者を、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤レスポンダー又はT E C ファミリーキナーゼ阻害剤非レスポンダーとして識別することと、を含む、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤療法のレスポンダーを識別するための方法を更に開示し、ここで、サンプルは、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤の少なくとも1回の投与を受けた対象者由来のものである。いくつかの実施形態では、対象者は、標的の占有率が少なくとも約70%であるとき、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤のレスポンダーであるとして識別される。いくつかの実施形態では、対象者は、標的の占有率が約50%未満であるとき、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤のレスポンダーではないとして識別される。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。

【0017】

本明細書では、(a)T E C ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させ

50

ることと、(b) プローブの結合しているキナーゼの量を検出することと、(c) プローブの結合しているキナーゼの量に基づき TEC ファミリーキナーゼの占有率を決定することと、(d) TEC ファミリーキナーゼの占有率に基づき TEC ファミリーキナーゼ阻害剤耐性を決定することと、を含む、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤耐性を決定するための方法が更に開示される。いくつかの実施形態では、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤耐性は、標的の占有率が約 50% 未満であるとき、決定される。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。

【0018】

本明細書では、(a) TEC ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させて、プローブの結合しているキナーゼを形成させることと、(b) プローブの結合しているキナーゼの量を検出することと、(c) プローブの結合している標的の量に基づき、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤によりキナーゼの占有率を決定することと、(d) TEC ファミリーキナーゼの占有率に基づき、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤を検証することと、を含む、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤を検証するための方法が更に開示される。いくつかの実施形態では、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤を検証することは、TEC ファミリーキナーゼに対する TEC ファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定することを含む。いくつかの実施形態では、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤により TEC ファミリーキナーゼの占有率を決定することは、プローブの結合しているキナーゼの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、TEC ファミリーキナーゼの占有率が少なくとも約 70% であるとき、製剤は有効である。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。

【0019】

本明細書では、(a) TEC ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させることと、(b) プローブの結合しているキナーゼの存在又は非存在を検出することと、(c) プローブの結合しているキナーゼの量に基づき TEC ファミリーキナーゼモジュレータを識別することと、を含む、TEC ファミリーキナーゼに結合する TEC ファミリーキナーゼモジュレータを識別するための方法が更に開示される。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、サンプルは、推定上の TEC ファミリーキナーゼモジュレータにより前処理されたサンプルである。いくつかの実施形態では、サンプルは生体外で前処理される。いくつかの実施形態では、サンプルは、推定上の TEC ファミリーキナーゼモジュレータを投与された対象者（例えば、患者）由来のサンプルである。

【0020】

本明細書では、(a) TEC ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させることと、(b) プローブの結合しているキナーゼの存在又は非存在を検出することと、(c) プローブの結合しているキナーゼの量に基づき TEC ファミリーキナーゼ阻害剤を識別することと、を含む、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤を識別するための方法が更に開示される。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、サンプルは、推定上の TEC ファミリーキナーゼ阻害剤により前処理されたサンプルである。いくつかの実施形態では、サンプルは生体外で前処理される。いくつかの実施形態では、サンプルは、推定上の TEC ファミリーキナーゼ阻害剤を投与された対象者（例えば、患者）由来のサンプルである。

【0021】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット又は組成物は、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、阻害剤は、不可逆的 TEC フ

10

20

30

40

50

アミリーキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、阻害剤は、T E C ファミリー キナーゼに共有結合する。いくつかの実施形態では、阻害剤は、T E C ファミリー キナーゼのシステイン残基に結合する。いくつかの実施形態では、阻害剤は、低分子、ポリペプチド、抗体、又は核酸である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤はブルトン型チロシンキナーゼ (B T K) の阻害剤である。いくつかの実施形態では、ブルトン型チロシンキナーゼ (B T K) の阻害剤はイブルチニブである。いくつかの実施形態では、ブルトン型チロシンキナーゼ (B T K) の阻害剤は、A V L - 2 9 2、A V L - 2 9 1、A V L - 1 0 1、C N X - 7 7 4、O N O - W G - 3 0 7 である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は、I T K の阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は、T E C キナーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は、B M X キナーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤はB L K の阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は、H E R 1、H E R 2、H E R 3、H E R 4 及びJ A K 3 から選択されるキナーゼの阻害剤である。

10

【0022】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット又は組成物は、標的キナーゼを含む。いくつかの実施形態では、標的キナーゼは、T E C ファミリー キナーゼである。いくつかの実施形態では、キナーゼは、ブルトン型チロシンキナーゼ (B T K) である。いくつかの実施形態では、キナーゼはI T K である。いくつかの実施形態では、キナーゼはB L K である。いくつかの実施形態では、キナーゼはT X K である。いくつかの実施形態では、キナーゼはB M X キナーゼである。いくつかの実施形態では、キナーゼはI T K である。いくつかの実施形態では、キナーゼはH E R 1、H E R 2、H E R 3、H E R 4、又はJ A K 3 である。

20

【0023】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット又は組成物は、1つ以上の固体支持体を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の固体支持体はプレートである。いくつかの実施形態では、1つ以上の固体支持体は、1個又は複数個のビーズである。いくつかの実施形態では、キットは2つ以上の固体支持体を含む。いくつかの実施形態では、2つ以上の固体支持体は、(a) プレート及び(b) 1個又は複数個のビーズを含む。いくつかの実施形態では、プレートはマイクロプレートである。いくつかの実施形態では、マイクロプレートはストレプトアビジンコートしたマイクロプレートである。いくつかの実施形態では、マイクロプレートはM S D マイクロプレートである。いくつかの実施形態では、ビーズはストレプトアビジンビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズは磁気ビーズである。いくつかの実施形態では、固体支持体は、コートされて、コートされた固体支持体を形成する。いくつかの実施形態では、コートされた固体支持体は、ストレプトアビジンによりコートされる。いくつかの実施形態では、コートされた固体支持体は抗体によりコートされる。いくつかの実施形態では、コートされた固体支持体は、プローブを捕捉できる。いくつかの実施形態では、コートされた固体支持体は、標識を捕捉できる。いくつかの実施形態では、コートされた固体支持体は、標的（例えば、T E C ファミリー キナーゼ）を捕捉できる。

30

【0024】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、プローブの結合している標的を一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤は抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は抗B T K 抗体である。いくつかの実施形態では、一次検出剤はタグと複合されている。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、電気化学発光タグと複合されている。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス（ビピリジン）ルテニウム（II）二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム（II）トリス・ビ

40

50

ピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、SULFO-TAGと複合されている。いくつかの実施形態では、一次検出剤はビーズである。

【0025】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、二次検出剤は、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、二次検出剤は抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は抗IgG抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は抗IgA抗体である。いくつかの実施形態では、二次検出剤はタグと複合されている。いくつかの実施形態では、二次検出剤は、電気化学発光タグと複合されている。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス(ビピリジン)ルテニウム(II)二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、二次検出剤は、SULFO-TAGと複合されている。いくつかの実施形態では、二次検出剤はビーズである。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット又は組成物は一次検出剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット又は組成物は、二次検出剤を含む。いくつかの実施形態では、検出剤は、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、検出剤検出剤は抗体を含む。いくつかの実施形態では、検出剤はタグと複合されている。いくつかの実施形態では、検出剤は、電気化学発光タグと複合されている。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス(ビピリジン)ルテニウム(II)二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、検出剤はSULFO-TAGと複合されている。いくつかの実施形態では、検出剤はビーズである。いくつかの実施形態では、検出剤は酵素と複合されている。いくつかの実施形態では、抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)又はアルカリホスファターゼ(AP)と複合されている。いくつかの実施形態では、抗体は抗BTK抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はTECファミリー-キナーゼを標的とする。いくつかの実施形態では、抗体は抗ITK抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は抗TEC抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は抗B MX抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は抗BLK抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は抗HER1抗体、抗HER2抗体、抗HER3抗体、又は抗HER4抗体である。

20

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット又は組成物は標識を含む。いくつかの実施形態では、標識はビオチンである。いくつかの実施形態では、標識はフルオロフォアである。

30

【0028】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、標的キナーゼを捕捉することを更に含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、プローブの結合している標的キナーゼを更に含む。いくつかの実施形態では、標的は抗体により捕捉される。いくつかの実施形態では、抗体は抗標的抗体である。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的是ビーズにより捕捉される。

40

【0029】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット又は組成物は抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体を固体支持体に付着させる。いくつかの実施形態では、ビーズを固体支持体に付着させる。いくつかの実施形態では、固体支持体はマイクロプレートである。いくつかの実施形態では、マイクロプレートはMSDマイクロプレートである。いくつかの実施形態では、固体支持体はビーズである。

50

【0030】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物はビーズを含む。いくつかの実施形態では、ビーズはストレプトアビジンビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズは磁気ビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズはコートされたビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズはコートされたストレプトアビジンビーズである。いくつかの実施形態では、コートされたビーズはタグによりコートされている。いくつかの実施形態では、タグは電気化学発光タグである。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス(ビピリジン)ルテニウム(II)二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、ビーズはSULFO-TAGストレプトアビジンビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズはSULFO-TAGビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズはプローブと相互作用する。いくつかの実施形態では、プローブは標識を含む。いくつかの実施形態では、ビーズは標識と相互作用する。いくつかの実施形態では、標識はビオチンを含む。いくつかの実施形態では、ビーズはプローブの結合している標的と複合体を形成する。いくつかの実施形態では、ビーズはプローブに結合する。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、プローブの結合している標的又はそれらの一部の存在又は非存在を検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、プローブの結合している標的又はそれらの一部を検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、ビーズ又はそれらの一部を検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、コートされたビーズを検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、電気化学発光タグを検出することを含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス(ビピリジン)ルテニウム(II)二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、SULFO-TAGを検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは発光を含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、電気化学発光を含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的是未占有の標的である。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的は製剤により占有されている標的である。

20

【0032】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、プローブの結合している標的の精製を更に含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の精製は、プローブの結合していない標的からのプローブの結合している標的の磁気分離を含む。いくつかの実施形態では、サンプルは前処理されたサンプルであり、ここで、前処理されたサンプルは、プローブとの接触の前にTECファミリーキナーゼ阻害剤と接触している。いくつかの実施形態では、サンプルは未処理サンプルであり、ここで、サンプルは、標識との接触の前にTECファミリーキナーゼ阻害剤と接触していない。いくつかの実施形態では、サンプルは、TECファミリーキナーゼ阻害剤を投与された患者由来のサンプルである。いくつかの実施形態では、サンプルは、TECファミリーキナーゼ阻害剤を投与されていない患者由来の対照サンプルである。いくつかの実施形態では、サンプルは、全血サンプル、末梢血サンプル、リンパ液サンプル、組織サンプル、腫瘍生検サンプル、又は骨髄サンプルである。いくつかの実施形態では、サンプルは、全血サンプル、末梢血サンプル、リンパ液サンプル、組織サンプル、腫瘍生検サンプル、又は骨髄サンプルに由来する1種以上の細胞型、又はそれらの可溶化液を含有するサンプルである。

30

【0033】

40

50

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は、プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブは阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、阻害剤は標的に結合する。いくつかの実施形態では、阻害剤は不可逆的阻害剤である。いくつかの実施形態では、阻害剤は、標的に共有結合する。いくつかの実施形態では、阻害剤は、標的のシステイン残基に結合する。いくつかの実施形態では、阻害剤は、低分子、ポリペプチド、抗体、又は核酸である。いくつかの実施形態では、阻害剤は TEC ファミリー キナーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、阻害剤は ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の阻害剤である。いくつかの実施形態では、阻害剤は、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) のシステイン残基に結合する。いくつかの実施形態では、阻害剤は、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) のシステイン 481 に結合する。いくつかの実施形態では、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の阻害剤はイブルチニブである。いくつかの実施形態では、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の阻害剤は、AVL-292、AVL-291、AVL-101、CNX-774、ONO-WG-307 である。いくつかの実施形態では、製剤は ITK の阻害剤である。いくつかの実施形態では、製剤は TEC キナーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、製剤は BMX キナーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、製剤は BLK の阻害剤である。いくつかの実施形態では、製剤は HER1、HER2、HER3、HER4 及び JAK3 から選択されるキナーゼの阻害剤である。

10

【 0034 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は標的を含む。いくつかの実施形態では、標的是キナーゼである。いくつかの実施形態では、キナーゼは、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) である。いくつかの実施形態では、キナーゼは ITK、BLK、TEC、TXK、又は BMX である。いくつかの実施形態では、キナーゼは HER1、HER2、HER3、HER4、又は JAK3 である。いくつかの実施形態では、標的はタンパク質である。

20

【 0035 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物はサンプルを含む。いくつかの実施形態では、サンプルは癌に罹患している対象者由来のものである。いくつかの実施形態では、癌は肉腫である。いくつかの実施形態では、癌は細胞腫である。いくつかの実施形態では、癌はリンパ腫である。いくつかの実施形態では、リンパ腫はホジキンリンパ腫である。いくつかの実施形態では、リンパ腫は非ホジキンリンパ腫 (NHL) である。いくつかの実施形態では、癌は白血病である。いくつかの実施形態では、癌は慢性リンパ性白血病である。いくつかの実施形態では、癌は小リンパ球性リンパ腫である。いくつかの実施形態では、癌はワルデンシュトレー ムマクログロブリン血症である。いくつかの実施形態では、癌は濾胞性リンパ腫である。いくつかの実施形態では、癌はマントル細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、癌はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、癌は多発性骨髄腫である。いくつかの実施形態では、癌は固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、サンプルは、自己免疫性又は炎症性障害に罹患している対象者由来である。

30

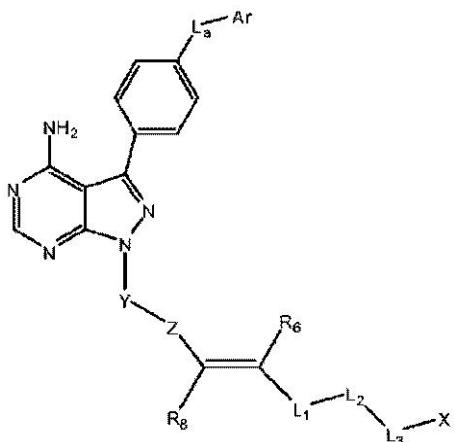
【 0036 】

本明細書に記載の特定の実施形態では、TEC ファミリー キナーゼ阻害剤療法を受けている患者において、製剤標的の占有率を決定するためのキットが記載され、キットは、式 (II) の構造を有するプローブを含み、プローブは TEC ファミリー キナーゼに結合する

40

【 0037 】

【化1】



式(I-I)

(式中、

L_aはC H 2、O、N H又はSであり、

A rは、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

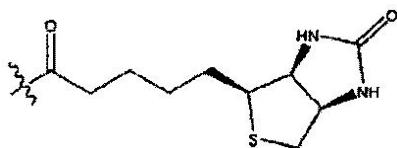
Yは、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

ZはC(O)、OC(O)、NHC(O)、C(S)、S(O)n、OS(O)n、NH S(O)nであり、式中、nは1又は2であり、

R₆及びR₈は、独立して、H、場合により置換されたアルキル又は場合により置換されたヘテロアルキルから選択され、L₁は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、L₂は、結合、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、又は-N(H)C(O)(C H 2)_mC(O)N(H)であり、式中、mは2~6であり、L₃は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、Xは検出可能な標識である)。いくつかの実施形態では、Xは

【0038】

【化2】



である。いくつかの実施形態では、プローブは

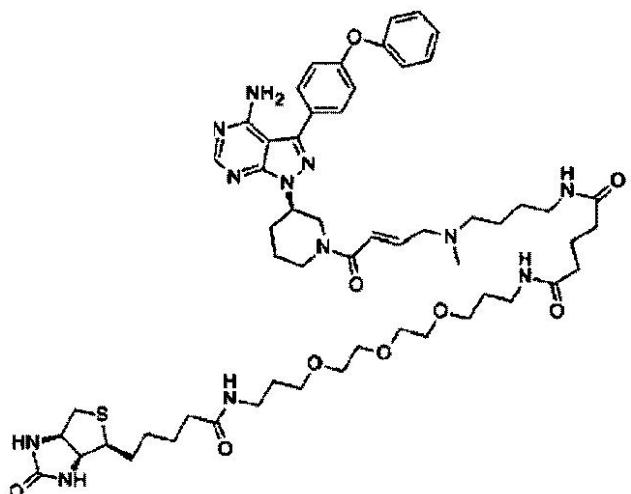
【0039】

20

20

30

【化3】



10

20

30

40

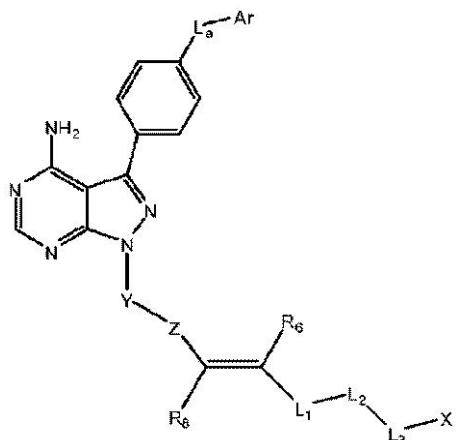
の構造を有する。いくつかの実施形態では、T E C ファミリーキナーゼはブルトン型チロシンキナーゼ（B T K）、I T K、T E C、B M X、又はT X Kである。いくつかの実施形態では、プローブはB L K、H E R 1、H E R 2、H E R 3、H E R 4又はJ A K 3に結合する。いくつかの実施形態では、キットは、1つ以上の固体支持体を更に含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の固体支持体は、プレート、マイクロプレート、1個又は複数個のビーズから選択される。いくつかの実施形態では、固体支持体を捕捉剤によりコートして、コートされた固体支持体を生成する。この捕捉剤がプローブに結合する。いくつかの実施形態では、捕捉剤はストレプトアビシン又は抗体である。いくつかの実施形態では、キットは、一次検出剤、及び場合により、一次検出剤に結合する二次検出剤を更に含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤又は二次検出剤は、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、抗B T K抗体、抗I T K抗体、抗T E C抗体、抗T X K抗体、抗B M X抗体、又は抗B L K抗体である抗体である。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、抗H E R 1抗体、抗H E R 2抗体、抗H E R 3抗体、又は抗H E R 4抗体である抗体である。いくつかの実施形態では、一次又は二次検出剤は、電気化学発光タグに複合される。いくつかの実施形態では、化学発光タグは、ルテニウム（II）トリス・ビピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドタグである。いくつかの実施形態では、T E C キナーゼ阻害剤治療剤は、不可逆的T E C キナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E C キナーゼ阻害剤治療剤は、不可逆的B T K 阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E C キナーゼ阻害剤治療剤は、イブルチニブである。

【0040】

本明細書の特定の実施形態では、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤療法を受けている患者において、製剤標的の占有率を決定するための方法が記載され、方法は、(a) T E C ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させて、プローブの結合しているキナーゼを形成させることと、(b)サンプル中の、プローブの結合しているキナーゼの量を検出することと、(c)サンプルにおいて検出されたプローブの結合しているキナーゼの量に基づき、T E C ファミリーキナーゼの標的占有率を決定することと、を含み、ここで、サンプルは、不可逆的T E C ファミリーキナーゼ阻害剤の少なくとも一回量を投与された患者から得られたものであり、プローブは式（II）の構造を有し、プローブはT E C ファミリーキナーゼに結合する

【0041】

【化4】



式(I-I)

(式中、

L_aはC H 2、O、N H又はSであり、

A rは、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

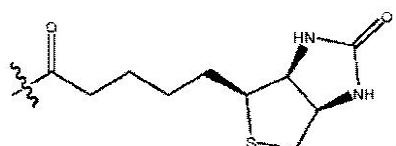
Yは、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

ZはC(O)、OC(O)、NHC(O)、C(S)、S(O)n、OS(O)n、NH S(O)nであり、式中、nは1又は2であり、

R₆及びR₈は、独立して、H、場合により置換されたアルキル又は場合により置換されたヘテロアルキルから選択され、L₁は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、L₂は、結合、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、又は-N(H)C(O)(C H 2)_mC(O)N(H)であり、式中、mは2~6であり、L₃は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、かつXは検出可能な標識である。いくつかの実施形態では、Xは

【0042】

【化5】



である。いくつかの実施形態では、プローブは

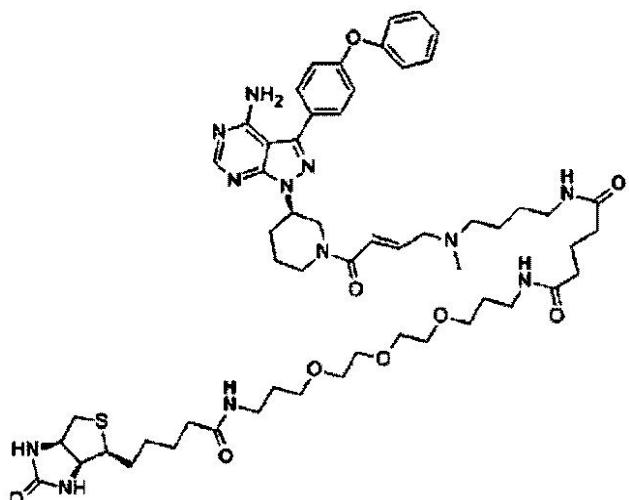
【0043】

20

20

30

【化6】



10

20

30

40

50

の構造を有する。いくつかの実施形態では、標的占有率を決定することは、i) サンプルにおいて検出されたプローブの結合しているキナーゼの量に基づき、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤に結合していない結合部位の数を求めることと、ii) サンプル中の活性型 T E C ファミリー キナーゼの総量と前記数を比較することと、を含む。いくつかの実施形態では、対照は、未処理のサンプルに対し本方法を実施したときに存在する、プローブの結合しているキナーゼの量である。いくつかの実施形態では、方法は、T E C ファミリー キナーゼの標的占有率に基づき、治療レジメンを決定又は修正することを更に含む。本明細書には、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤療法を受けている患者における製剤標的占有率をモニタリングするための方法が記載され、方法は、治療過程の 2 つ以上の時点で、キナーゼのタンパク質占有率を決定するために、本明細書に提供される方法を実施することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、治療過程にわたって標的占有率が上昇又は低下した場合に、治療レジメンを修正することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、i) 標的占有率が約 50 % 未満の場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与量又は頻度を増加させることと、ii) 標的占有率が少なくとも約 70 % を上回る場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与量又は頻度を減少させることと、iii) T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の同等の治療レジメンを維持することと、又は iv) 治療レジメンを中断することと、を更に含む。いくつかの実施形態では、標的占有率が約 50 % 未満の場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与量を増加させる。いくつかの実施形態では、標的占有率が少なくとも約 70 % を上回る場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与量を減少させる。いくつかの実施形態では、標的占有率が少なくとも約 70 % を上回る場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与量を維持する。いくつかの実施形態では、標的占有率が約 50 % 未満の場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与頻度を増加させる。いくつかの実施形態では、標的占有率が少なくとも約 70 % を上回る場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与頻度を減少させる。いくつかの実施形態では、標的占有率が少なくとも約 70 % を上回る場合に、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤の投与頻度を維持する。いくつかの実施形態では、方法は、標的占有率に基づき、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤療法の有効性を決定することを更に含む。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼの占有率が少なくとも約 70 % であるとき、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は有効である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は有効ではない。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の阻害剤である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤は、イブルチニブ、AVL-292、AVL-291、AVL-101、CNX-774、又はONO-WG-307である。いくつかの実施形態では、T E C ファミリー キナーゼ阻害剤はイブルチニブである。いくつかの実施形態では、イブルチニブの少

なくとも1回の投与量は、約10mg～約2000mg、例えば、140mg、420mg、560mg又は840mgなどである。いくつかの実施形態では、タンパク質占有率が治療過程にわたってモニタリングされる場合、患者に投与されるイブルチニブの一日用量は、1日当たり約10mg～約2000mgであり、例えば、1日当たり約140mg、420mg、560mg、又は840mgなどの一日用量である。特定の実施形態では、患者には、イブルチニブの投与量、一日当たり約420mgを維持して投与する。いくつかの実施形態では、方法は、捕捉剤によりプローブの結合しているキナーゼを捕捉することを更に含む。いくつかの実施形態では、捕捉剤はストレプトアビジン又は抗体である。いくつかの実施形態では、捕捉剤は固体支持体に付着させる。いくつかの実施形態では、固体支持体はプレート、マイクロプレート、1個又は複数個のビーズである。いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合しているキナーゼを、一次検出剤、及び場合により、一次検出剤に結合する二次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤又は二次検出剤は、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、T E C ファミリーキナーゼに結合する抗体である。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、抗BTK抗体、抗ITK抗体、抗TXK抗体、抗TEC抗体、抗B MX 抗体、又は抗BLK抗体である抗体である。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、抗HER1抗体、抗HER2抗体、抗HER3抗体、又は抗HER4抗体である抗体であるいくつかの実施形態では、方法は、一次検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、二次検出剤は、抗体、ビーズ、染料、標識、タグ、フルオロフォア、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、一次又は二次検出剤は、化学発光タグに複合される。いくつかの実施形態では、化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドタグである。いくつかの実施形態では、患者は、癌、自己免疫疾患、又は炎症性障害に罹患しているいくつかの実施形態では、癌は、肉腫、細胞腫、骨髄腫、白血病、又はリンパ腫であるいくつかの実施形態では、癌はホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫(NHL)である。いくつかの実施形態では、癌は、慢性リンパ性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、濾胞性リンパ腫(FL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、ワルデンシュトトレームマクログロブリン血症、又は多発性骨髄腫(MM)である。いくつかの実施形態では、サンプルは血液サンプル、リンパ液サンプル又は腫瘍生検サンプルである。

【0044】

参照による援用

本明細書において言及される全ての出版物及び特許出願は、それぞれの個別の出版物又は特許出願が、参照により援用されることが具体的にかつ個別に記載されているのと同等に、参照によりその全体が本明細書に援用される。本明細書で説明される開示は、本開示の出願日よりも先に開示されているという意味合いでのみ提供される。本明細書では、本発明者らによる本明細書における記載は、先行技術の効力により、又は任意のその他の理由から、係る開示を先行するものとして認めることを承認するものと解釈されない。

【図面の簡単な説明】

【0045】

当業者であれば、以下に記載の図面は例示目的のみのものであることを理解されるであろう。図面は、決して、本教示の範囲を制限することを意図するものではない。

【図1】タンパク質占有率アッセイの概略図を示す。

【図2】タンパク質占有率アッセイキットの構成要素を示す。

【図3】製剤の結合している標的を検出するためのタンパク質占有率アッセイ法の概略図を示す。

【図4】未占有の標的を検出するためのタンパク質占有率アッセイの概略図を示す。

【図5】製剤の結合している標的を検出するためのプレートベースのタンパク質占有率アッセイの概略図を示す。

10

20

30

40

50

【図 6】プローブの結合している標的を検出するためのプレートベースのタンパク質占有率アッセイの概略図を示す。

【図 7】製剤の結合している標的を検出するためのプレートベースのタンパク質占有率アッセイの概略図を示す。

【図 8】未占有の標的を検出するためのプレートベースのタンパク質占有率アッセイの概略図を示す。

【図 9】プローブの結合している標的を検出するための、プローブコートされたプレートベースのタンパク質占有率の概略図を示す。

【図 10】未占有の標的を検出するためのプローブコートされたプレートベースのタンパク質占有率アッセイの概略図を示す。

【図 11】例示的な、BTK占有率のアッセイフォーマットを示す。図 11A は、例示的な、ストレプトアビジン検出法の概略図を示す。図 11B は、例示的な、ストレプトアビジン捕捉法の概略図を示す。

【図 12】ストレプトアビジン検出による BTK 占有率アッセイを示す。図 12A は、例示的なプレートレイアウトを示す。図 12B は、ストレプトアビジン検出法の結果を示す例示的なデータを表す。

【図 13】2 種の異なる BTK 捕捉抗体を使用するストレプトアビジン検出による BTK 占有率アッセイの例示的な結果を表す。

【図 14】ストレプトアビジン捕捉による BTK 占有率アッセイを示す。図 14A は、ストレプトアビジン捕捉法の概略図を示す。図 14B は、例示的なプレートレイアウトを示す。図 14C は、ストレプトアビジン捕捉法の結果を示す例示的なデータを表す。

【図 15】2 種の異なる BTK 検出抗体を使用するストレプトアビジン捕捉による BTK 占有率アッセイの例示的な結果を表す。

【図 16】ストレプトアビジン検出及びストレプトアビジン捕捉法の比較を示す。

【図 17】ストレプトアビジン捕捉による BTK 占有率アッセイのためのプローブ最適化実験の例示的な結果を表す。

【図 18】ストレプトアビジン捕捉による BTK 占有率アッセイの用量設定実験の結果を示す。

【図 19】ストレプトアビジン捕捉による BTK 占有率アッセイの用量設定実験の結果を示す。

【図 20】S I 2 4 0 0 M S D S E C T O R I M A G E R プレートを示す。

【図 21】例示的なプローブ化合物 I - 1、I - 2、I - 3、I - 4 及び I - 5 を示す。

【図 22】ストレプトアビジン捕捉による BTK 占有率アッセイのためのプローブ最適化実験のための、例示的なプローブ化合物 I - 1、I - 2、I - 3、I - 4 及び I - 5 の例示的な結果を表す。

【図 23】総 BLK の定量に関し試験した各種捕捉抗体 / 検出抗体対のシグナルの生データを示す。1 つ目の表は MSD 高結合プレートについての表である。2 つ目の表は MSD 標準プレートについての表である。

【図 24】総 BLK の定量に関し試験したそれぞれの捕捉抗体 / 検出抗体対の、バックグラウンドに対するシグナルを示す。1 つ目の表は MSD 高結合プレートについての表である。2 つ目の表は MSD 標準プレートについての表である。

【図 25】総 BLK の定量に関し試験した各種捕捉抗体 / 検出抗体対の用量漸増実験 (dose titration) の、シグナルの生データを示す。

【図 26】総 BLK の定量に関し試験したそれぞれの捕捉抗体 / 検出抗体対の用量漸増実験の、バックグラウンドに対するシグナルを示す。

【図 27】1 μg / mL 捕捉抗体及び 0.5 μg / mL 検出抗体を用い、組み換え型 BLK タンパク質のシグナル値のプロットを示す。

【図 28】ストレプトアビジン捕捉 BLK 占有率アッセイ (A) 及び ITK 占有率アッセイ (B) のためのプローブの用量設定実験の結果を示す。

【図 29】ストレプトアビジン捕捉 ITK 占有率アッセイ (A) 及び ITK 阻害率 (%)

(B) の薬剤用量設定実験の結果を示す。

【図30】PBM C溶解物を用い、ストレプトアビジン捕捉ITK占有率アッセイの薬剤用量設定実験の結果を示す。結果はITK阻害率(%)として表す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本明細書では、TECファミリーキナーゼ阻害剤の投与を含む治療と組み合わせて使用するためのコンパニオン診断法及びキットが記載される。いくつかの実施形態では、提供されるコンパニオン診断法は、TECキナーゼファミリーの1種以上の阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイを包含する。したがって、本明細書では、TECキナーゼファミリーのキナーゼ阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイが記載される。本明細書では更に、TECキナーゼファミリーの不可逆的キナーゼ阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイが記載される。本明細書では更に、TECキナーゼファミリーの可逆的キナーゼ阻害剤に関するタンパク質占有率アッセイが記載される。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、TECキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、BTK、ITK、B MX、TXK、TEC、又はこれらの任意の組み合わせの阻害剤である。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、TECキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、構造的に相同な1種以上のキナーゼの阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、TECキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、構造的に相同な1種以上のチロシンキナーゼの阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、TECキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、EGFRファミリーのキナーゼの阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、TECキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、HER1(EGFR、Er b B 1)、HER2/c-neu(Er b B 2)、HER3(Er b B 3)及びHER4(Er b B 4)、又はJAK3の阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、TECキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、SRCファミリーチロシンキナーゼの阻害剤でもある。いくつかの実施形態では、TECキナーゼファミリー阻害剤は、TECキナーゼファミリーの1種以上のキナーゼの阻害剤であり、Bリンパ球キナーゼ(BLK)の阻害剤でもある。本明細書では、提供されるタンパク質占有率アッセイに使用するための例示的な試薬及びプローブが更に記載される。

【0047】

本明細書における特定の実施形態では、タンパク質占有率アッセイはELISAプロープアッセイである。いくつかの実施形態では、ELISAプロープアッセイは、TECファミリーキナーゼ阻害剤の結合していないTECファミリーキナーゼの相対量を定量するための、プレートベースの電気化学発光アッセイである。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤は不可逆的TECファミリーキナーゼ阻害剤である。例えば、いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤は、TECファミリーキナーゼの活性部位に結合し、システィン残基によりジスルフィド結合を形成する。いくつかの実施形態では、アッセイは、TECファミリーキナーゼ阻害剤の結合していない遊離のTECファミリーキナーゼに対し活性プローブを結合させることを包含する。いくつかの実施形態では、活性プローブは、リンカー(例えば、長鎖リンカー)により検出可能な標識(例えば、ビオチン)を付加したTECファミリーキナーゼ阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤BTK阻害剤。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤は不可逆的BTK阻害剤である。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤はイブルチニブである。いくつかの実施形態では、プローブは化合物I-5であり、長鎖リンカーによりビオチンに連結されているイブルチニブからなる。プローブによるサンプル標識は、製剤により占有されていないBTKの検出を可能にする。いくつかの実施形態では、プローブは、ストレプトアビジンコートプローブ

10

20

30

40

50

レートにより捕捉された TEC ファミリーキナーゼと複合体形成する。いくつかの実施形態では、複合体を形成していない過剰なプローブは、ストレプトアビシンとの結合に関し、プローブ標識された BTK と競合する。

【 0048 】

本明細書では、TEC キナーゼファミリーの阻害剤の有効性を決定するための方法も記載される。本明細書は、TEC キナーゼファミリーの 1 種以上のメンバーの阻害により、疾患を有する患者に治療効果がもたらされる疾患を含む、TEC キナーゼファミリーの 1 種以上のメンバーの活性と関連する疾患の治療における診断、予測、並びに治療レジメンの決定及び修正においてタンパク質占有率アッセイを使用するための方法を更に記載する。いくつかの実施形態では、患者 (patent) は、例えば、癌、自己免疫障害、及び / 又は炎症性疾患など、TEC ファミリーキナーゼの異常な活性化と関連する疾患又は障害を有するとして診断される。

10

【 0049 】

本明細書では、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤による治療が有効である疾患又は病状を診断、予測、及びモニタリングするための診断検査が更に開示される。本明細書では、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤療法に対するレスポンダーを識別するため、治療レジメンを決定するため、及び TEC ファミリーキナーゼ阻害剤療法に対する耐性を検出するための、診断検査も開示される。

20

【 0050 】

特定の用語

別途記載のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、請求される主題の属する技術分野の者により一般に理解される意味と同様の意味を持つ。本明細書に記載の用語について複数の定義が存在する場合、用語の節に記載のものが優先される。URL 又はその他のこののような識別子若しくはアドレスに対し参照がなされた場合、このような識別子は変化し得るものであり、インターネット上の個々の情報は掲載された後に非掲載とされ得るもの、インターネットを検索すれば等価な情報を発見できることは理解されたい。それらに対する参照は、このような情報の可用性及び公共への普及度の証拠となる。

30

【 0051 】

前述の一般的な記述及び以降の詳細な記載は例示的なものであり、単に説明的なものであり、請求されるあらゆる主題を制限するものではないことは理解されるであろう。別途記載のない限り、本出願では、単数形の使用には、複数形が含まれる。本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用するとき、単数冠詞「a」、「an」、及び「the」には、文脈上明記されない限り複数形も含む。別途記載のない限り、「又は」の使用は「及び / 又は」を意味する。更に、用語「含む (including)」並びにその他の形態「include」、「includes」及び「included」は制限するものではない。

30

【 0052 】

本明細書で使用される節見出しは、単に構成目的のものであり、記載される主題を制限するものとして解釈されるものではない。特許、特許出願、記事、書籍、マニュアル、及び論文が挙げられるがこれらに限定されない、本願に引用される全ての文書、又は文書の一部は、あらゆる目的のため、参照によりその全体が明示的に本明細書に援用される。

40

【 0053 】

標準的な化学用語に関する定義は、Carey and Sundberg 「ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY 4TH ED.」 Vols. A (2000) 及び B (2001) (Plenum Press, New York) などの参考書に見ることができる。別途記載のない限り、当該技術の範囲内の、マススペクトロスコピー、NMR、HPLC、タンパク質化学、生化学、組み換えDNA法及び薬理学の従来法が採用される。別途定義のない限り、本明細書に記載の、分析化学、有機合成化学、並びに薬学及び製薬化学と組み合わせて採用される専門用語、並びにこれらの実験手順及び技術は、当該技術分野において既知のものである。化学合成、化学分析、医薬品、製剤、

50

及び送達、並びに患者の治療には標準的な技術を使用できる。組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、並びに組織培養及び形質転換（例えば、電気穿孔法、リポフェクション法）には標準的な技術を使用できる。反応及び精製法は、例えば、製造元の仕様によるキットを使用して、又は当該技術分野において一般的に実施される通りに、若しくは本明細書に記載される通りに実施できる。前出の技術及び手法は、一般的に、当業者に周知の従来法により、並びに本願明細書を通して引用及び議論される各種一般的な及びより専門的な参考において記載される通りに、実施することができる。

【0054】

本明細書に記載の方法及び組成物は、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコル、細胞株、コンストラクト、及び試薬に限定されないこと、並びにそのため変更可能であることは理解されるであろう。本明細書で使用される専門用語は、具体的な実施形態を記載するという目的でのみ使用されるものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ制限される本明細書に記載の方法及び組成物の範囲を制限することを意図するものではないことも理解されるであろう。

10

【0055】

本明細書に記載の方法、組成物、及び化合物と関連させて使用され、本明細書において言及される全ての出版物及び特許は、例えば、本出願において記載される構成及び方法論を記載及び開示する目的のため、参照によりその全体が援用される。本明細書で述べる開示は、本出願の出願日よりも先に開示されているという意味合いでのみ提供される。本明細書では、本発明者らによる本明細書における記載は、先行技術の効力により、又は任意のその他の理由から、係る開示が先行するものとして認められないことを承認するものと解釈されない。

20

【0056】

「アルキル」は、不飽和基を含有せず、1～15個の炭素原子（例えば、C₁～C₁₅アルキル）を有する、単に炭素及び水素原子からなる線状又は分岐状炭化水素鎖基を意味する。特定の実施形態では、アルキルは1～13個の炭素原子から構成される（例えば、C₁～C₁₃アルキル）。特定の実施形態では、アルキルは1～8個の炭素原子から構成される（例えば、C₁～C₈アルキル）。他の実施形態では、アルキルは5～15個の炭素原子から構成される（例えば、C₅～C₁₅アルキル）。他の実施形態では、アルキルは5～8個の炭素原子から構成される（例えば、C₅～C₈アルキル）。アルキルは、例えば、メチル(Me)、エチル(Et)、n-プロピル、1-メチルエチル(イソ-プロピル)、n-ブチル、n-ペンチル、1,1-ジメチルエチル(t-ブチル)、3-メチルヘキシル、2-メチルヘキシル及び同様物などの分子の他の部分と一緒に結合している。本明細書において別途特に記載のない限り、アルキル基は、次の置換基、ハロ、シアノ、ニトロ、オキソ、チオキソ、トリメチルシラニル、-OR^a、-SR^a、-OC(O)-R^a、-N(R^a)₂、-C(O)R^a、-C(O)OR^a、-C(O)N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)OR^a、-N(R^a)C(O)R^a、-N(R^a)S(O)_tR^a（式中、tは1又は2である）、-S(O)_tOR^a（式中、tは1又は2である）及び-S(O)_tN(R^a)₂（式中、tは1又は2である）のうちの1つ以上により場合により置換されており、ここで、各R^aは、独立して水素、アルキル、フルオロアルキル、カルボシクリル、カルボシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール又はヘテロアリールアルキルである。

30

【0057】

アルキル基は、1～6個の炭素原子を有する「低級アルキル」にもなり得る。

40

【0058】

本明細書で使用するとき、C₁～C_xは、C₁～C₂、C₁～C₃…C₁～C_xを包含する。

【0059】

「アリール」は、環の炭素原子から水素原子を除去することにより单環芳香族又は多環炭化水素環系から誘導される基を意味する。单環芳香族又は多環炭化水素環系は、水素と

50

、6～18個の炭素原子とのみを含有し、環系における少なくとも1つの環は完全に不飽和であり、すなわち、Hückel理論に従い、環式、非局在化($4n+2$) - 電子系を含有する。アリール基としては、フェニル、フルオレニル、及びナフチルなどが挙げられるがこれに限定されない。本明細書において別途特に記載のない限り、用語「アリール」又は接頭辞「ar-」は、(「アラルキル」におけるものなど)は、独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、フルオロアルキル、シアノ、ニトロ、場合により置換されたアリール、場合により置換されたアラルキル、場合により置換されたアラルケニル、場合により置換されたアラルキニル、場合により置換されたカルボシクリル、場合により置換されたヘテロシクリル、場合により置換されたヘテロシクリルアルキル、場合により置換されたヘテロアリール、場合により置換されたヘテロアリールアルキル、 $-R^b-OR^a$ 、 $-R^b-O\text{C}(O)-R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-C(O)R^a$ 、 $-R^b-C(O)OR^a$ 、 $-R^b-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (式中、 t は1又は2である)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$ (式中、 t は1又は2である)及び $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (式中、 t は1又は2である)から選択された1つ以上の置換基により場合により置換されたアリール基を包含すること意味し、ここで、各 R^a は、独立して、水素、アルキル、フルオロアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール(場合により、1つ以上のハロ基により置換されている)、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール又はヘテロアリールアルキルであり、各 R^b は、独立して、直接結合であるか、あるいは線状又は分岐状アルキレン又はアルケニレン鎖であり、かつ R^c は線状又は分岐状アルキレン又はアルケニレン鎖であり、上記置換基のそれぞれは、別途記載のない限り未置換である。

【0060】

「炭素環」は、単に炭素及び水素原子からなり、3～15個の炭素原子を有する縮合又は架橋環系を包含する安定な非芳香族单環式又は多環式炭化水素基を意味する。特定の実施形態では、炭素環は3～10個の炭素原子を含む。他の実施形態では、炭素環は5～7個の炭素原子を含む。炭素環は一重結合により分子の残りの部分に結合する。炭素環は、場合により飽和(すなわち、一重C-C結合のみを含有する)又は不飽和(すなわち、1つ以上の二重結合又は三重結合を含有する)である。完全飽和炭素環基は、「シクロアルキル」とも呼ばれる。单環式シクロアルキルの例としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが挙げられる。不飽和カルボシクリルは、「シクロアルケニル」とも呼ばれる。单環式シクロアルケニルの例としては、例えば、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、及びシクロオクテニルが挙げられる。多環状炭素基としては、例えば、アダマンチル、ノルボルニル(すなわち、ビシクロ[2.2.1]ヘプタニル)、ノルボルネニル、デカリニル、7,7-ジメチル-ビシクロ[2.2.1]ヘプタニル及び同様物などが挙げられる。本明細書において別途記載のない限り、用語「カルボシクリル」は、独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、フルオロアルキル、オキソ、チオキソ、シアノ、ニトロ、場合により置換されたアリール、場合により置換されたアラルキル、場合により置換されたアラルケニル、場合により置換されたアラルキニル、場合により置換されたカルボシクリル、場合により置換されたカルボシクリルアルキル、場合により置換されたヘテロシクリル、場合により置換されたヘテロシクリルアルキル、場合により置換されたヘテロアリール、場合により置換されたヘテロアリールアルキル、 $-R^b-OR^a$ 、 $-R^b-SR^a$ 、 $-R^b-O\text{C}(O)-R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-C(O)R^a$ 、 $-R^b-C(O)OR^a$ 、 $-R^b-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (式中、 t は1又は2である)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$ (式中、 t は1又は2である)及び $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (式中、 t は1又は2である)から選択される1つ以上の置換基により場合により置換された

10

20

30

40

50

カルボシクリル基を包含することを意味し、各 R^a は、独立して、水素、アルキル、フルオロアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール又はヘテロアリールアルキルであり、各 R^b は、独立して、直接結合であるか、あるいは線状又は分岐状アルキレン又はアルケニレン鎖であり、かつ R^c は線状又は分岐状アルキレン又はアルケニレン鎖であり、上記置換基のそれぞれは別途記載のない限り未置換である。

【0061】

「ハロ」又は「ハロゲン」は、プロモ、クロロ、フルオロ又はヨード置換基を意味する。

【0062】

用語「ハロアルキル」、「ハロアルケニル」、「ハロアルキニル」及び「ハロアルコキシ」には、少なくとも 1 つの水素がハロゲン原子により置き換えられているアルキル、アルケニル、アルキニル及びアルコキシ構造が含まれる。2 つ以上の水素原子がハロゲン原子により置き換えられている特定の実施形態では、ハロゲン原子は全て互いに同一である。2 つ以上の水素原子がハロゲン原子により置き換えられている他の実施形態では、ハロゲン原子は全て互いに同一ではない。

【0063】

本明細書で使用するとき、用語「非芳香族複素環」、「ヘテロシクロアルキル」又は「ヘテロ脂環式環」は、環を形成する 1 つ以上の原子がヘテロ原子である非芳香族環を意味する。「非芳香族複素環」又は「ヘテロシクロアルキル」基は、窒素、酸素及び硫黄から選択される少なくとも 1 つのヘテロ原子を含有するシクロアルキル基を意味する。基はアリール又はヘテロアリールとともに縮合されてもよい。ヘテロシクロアルキル環は、3、4、5、6、7、8、9、又は 9 超の原子により形成され得る。ヘテロシクロアルキル環は場合により置換され得る。特定の実施形態では、非芳香族複素環は、例えば、オキソ及びチオ含有基などの 1 つ以上のカルボニル又はチオカルボニル基を含有する。ヘテロシクロアルキルの例としては、ラクタム、ラクトン、環式イミド、環式チオイミド、環式カルバマート、テトラヒドロチオピラン、4H-ピラン、テトラヒドロピラン、ピペリジン、1,3ジオキシン、1,3-ジオキサン、1,4ジオキシン、1,4-ジオキサン、ピペラジン、1,3-オキサチアン、1,4-オキサチイン、1,4-オキサチアン、テトラヒドロ-1,4-チアジン、2H-1,2-オキサジン、マレイミド、スクシンイミド、バルビツール酸、チオバルビツール酸、ジオキソピペラジン、ヒダントイン、ジヒドロウラシル、モルホリン、トリオキサン、ヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジン、テトラヒドロチオフェン、テトラヒドロフラン、ピロリン、ピロリジン、ピロリドン、ピロリジオン(pyrrolidine)、ピラゾリン、ピラゾリジン、イミダゾリン、イミダゾリジン、1,3-ジオキソール、1,3-ジオキソラン、1,3-ジチオール、1,3-ジチオラン、イソオキサゾリン、イソオキサゾリジン、オキサゾリン、オキサゾリジン、オキサゾリジノン、チアゾリン、チアゾリジン、及び 1,3-オキサチオランが挙げられるがこれに限定されない。ヘテロシクロアルキル基の具体例は、非芳香族複素環とも呼ばれ、

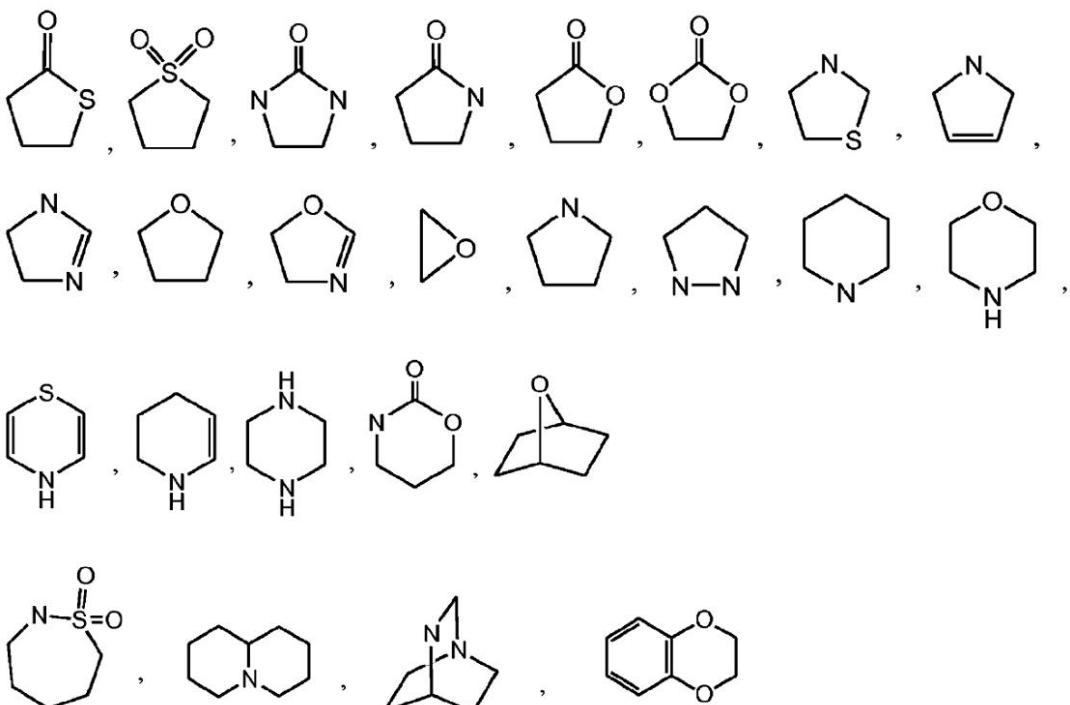
【0064】

10

20

30

【化 7】



及び同様物を包含する。用語ヘテロ脂環式環は、単糖、二糖及びオリゴ糖が挙げられるがこれらに限定されない、炭化水素を形成する全ての環も包含する。構造に応じ、ヘテロシクロアルキル基はモノラジカル又はジラジカル（すなわち、ヘテロシクロアルキレン基）になり得る。

【 0 0 6 5 】

「ヘテロアリール」は、2～17個の炭素原子を含む3～18員芳香環基と、窒素、酸素及び硫黄から選択される1～6個のヘテロ原子とに由来する基を意味する。本明細書で使用するとき、ヘテロアリール基は、単環式、二環式、三環式、又は四環式環系であり、環系における少なくとも1つの環は完全に不飽和であり、すなわち、Hückel理論に従って環状、非局在化($4n + 2$) - 電子系を含む。ヘテロアリールは、縮合又は架橋環系を包含する。ヘテロアリール基中のヘテロ原子(1つ以上)は、場合により酸化される。存在する場合、1つ以上の窒素原子は場合により四級化される。ヘテロアリールは、環(1つ以上)の任意の原子を介し、分子の残りの部分に結合する。ヘテロアリールの例としては、アゼピニル、アクリジニル、ベンゾイミダゾリル(benzimidazolyl)、ベンゾインドリル(benzindolyl)、1,3-ベンゾジオキソリル、ベンゾフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾ[d]チアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾ[b][1,4]ジオキセピニル、ベンゾ[b][1,4]オキサジニル、1,4-ベンゾジオキサン二ル、ベンゾナフトフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾジオキソリル、ベンゾジオキシニル、ベンゾピラニル、ベンゾピラノニル、ベンゾフラニル、ベンゾフラノニル、ベンゾチエニル(ベンゾチオフェニル)、ベンゾチエノ[3,2-d]ピリミジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾ[4,6]イミダゾ[1,2-a]ピリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、シクロペンタ[d]ピリミジニル、6,7-ジヒドロ-5H-シクロ펜타[4,5]チエノ[2,3-d]ピリミジニル、5,6-ジヒドロベンゾ[h]キナゾリニル、5,6-ジヒドロベンzo[h]シンノリニル、6,7-ジヒドロ-5H-ベンzo[6,7]シクロヘプタ[1,2-c]ピリダジニル、ジベンゾフラニル、ジベンゾチオフェニル、フラニル、フラノニル、フロ[3,2-c]ピリジニル、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ[d]ピリミジニル、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ[d]ピリジニル、イソチアゾリル、イミダゾリル、インダゾリル、インドリル、インダゾリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、イソキノリル、インド

リジニル、イソオキサゾリル、5, 8 - メタノ - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロキナゾリニル、ナフチリジニル、1, 6 - ナフチリジノニル、オキサジアゾリル、2 - オキソアゼピニル、オキサゾリル、オキシラニル、5, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 10a - オクタヒドロベンゾ[*h*]キナゾリニル、1 - フェニル - 1H - ピロリル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、フタラジニル、ブテリジニル、ブリニル、ピロリル、ピラゾリル、ピラゾロ[3, 4 - d]ピリミジニル、ピリジル、ピリド[3, 2 - d]ピリミジニル、ピリド[3, 4 - d]ピリミジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピロリル、キナゾリニル、キノキサリニル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロキナゾリニル、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロベンゾ[4, 5]チエノ[2, 3 - d]ピリミジニル、6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 5H - シクロヘプタ[4, 5]チエノ[2, 3 - d]ピリミジニル、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロピリド[4, 5 - c]ピリダジニル、チアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニル、チエノ[2, 3 - d]ピリミジニル、チエノ[3, 2 - d]ピリミジニル、チエノ[2, 3 - c]ピリジニル(pridinyl)、及びチオフェニル(すなわち、チエニル)が挙げられるがこれに限定されない。本明細書において別途特に記載のない限り、用語「ヘテロアリール」は、場合により、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、フルオロアルキル、ハロアルケニル、ハロアルキニル、オキソ、チオキソ、シアノ、ニトロ、場合により置換されたアリール、場合により置換されたアラルキル、場合により置換されたアラルケニル、場合により置換されたアラルキニル、場合により置換されたカルボシクリル、場合により置換されたカルボシクリルアルキル、場合により置換されたヘテロシクリル、場合により置換されたヘテロシクリルアルキル、場合により置換されたヘテロアリール、場合により置換されたヘテロアリールアルキル、-R^b-OR^a、-R^b-SR^a、-R^b-OC(O)-R^a、-R^b-N(R^a)₂、-R^b-C(O)R^a、-R^b-C(O)OR^a、-R^b-C(O)N(R^a)₂、-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)₂、-R^b-N(R^a)C(O)OR^a、-R^b-N(R^a)C(O)R^a、-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a(式中、tは1又は2である)、-R^b-S(O)_tOR^a(式中、tは1又は2である)及び-R^b-S(O)_tN(R^a)₂(式中、tは1又は2である)から選択された1つ以上の置換基により場合により置換された上記の通りのヘテロアリール基を包含すること意味し、ここで、各R^aは、独立して、水素、アルキル、フルオロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルキルアルキル、ヘテロアリール又はヘテロアリールアルキルであり、各R^bは、独立して、直接結合であるか、あるいは線状又は分岐状アルキレン又はアルケニレン鎖であり、かつR^cは線状又は分岐状アルキレン又はアルケニレン鎖であり、上記置換基のそれぞれは、別途記載のない限り未置換である。

【0066】

「スルファニル」は、-S-基を意味する。

【0067】

「スルフィニル」は、-S(=O)-基を意味する。

【0068】

「スルホニル」は、-S(=O)₂-基を意味する。

【0069】

「アミノ」は、-NH₂基を意味する。

【0070】

「シアノ」は、-CN基を意味する。

【0071】

「ニトロ」は、-NO₂基を意味する。

【0072】

「オキサ」は、-O-基を意味する。

【0073】

10

20

30

40

50

「オキソ」は、=O基を意味する。

【0074】

「アルコキシ」基は、(アルキル)O-基を意味し、ここでアルキルは上記の通りのものである。

【0075】

「アリールオキシ」基は、(アリール)O-基を意味し、ここでアリールは上記の通りのものである。

【0076】

本明細書で使用するとき、用語「ヘテロアルキル」「ヘテロアルケニル」及び「ヘテロアルキニル」には、1つ以上の骨格鎖原子がヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、硫黄、ケイ素、リン、又はこれらの組み合わせである、場合により置換されたアルキル、アルケニル及びアルキニル基が包含される。ヘテロ原子(1つ以上)は、ヘテロアルキル基の任意の内側の部分、又はヘテロアルキル基が分子の残部と結合している部分に配置されてよい。例としては、-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-N(CH₃)₂、-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂、-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-OCH₃、及び-CH=CH-N(CH₃)₂が挙げられるがこれに限定されない。加えて、例えば、-CH₂-NH-OCH₃及び-CH₂-O-Si(CH₃)₃などのように2個までのヘテロ原子が連続してもよい。

10

20

30

40

50

【0077】

用語「ヘテロ原子」は、炭素又は水素以外の原子を意味する。ヘテロ原子は、典型的には、独立して、酸素、硫黄、窒素、ケイ素及びリンから選択されるものの、これらの原子に限定されない。2つ以上のヘテロ原子が存在する実施形態において、2つ以上のヘテロ原子は全て互いに同一であってよく、あるいは2つ以上のヘテロ原子の幾つか又は全てが互いに異なるものであってよい。

【0078】

用語「結合」又は「一重結合」は、原子が結合により連結されるとき、2つの原子又は2つの部分の間の化学結合が、より大きな部分構造の一部としてみなされることを意味する。

【0079】

用語「部分」は、分子の特定のセグメント又は官能基を意味する。化学的部分は、多くの場合、分子に埋め込まれた又は分子に付加される化学物質として認識される。

【0080】

「カルボキシ」は、-C(O)OH基を意味する。

【0081】

本明細書で使用するとき、置換基「R」は、それそのもので、かつ数表記をせずとも、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール(環炭素を介して結合される)及び非芳香族複素環(環炭素を介して結合される)から選択される置換基を意味する。

【0082】

「アミド」は、式-C(O)NHR又は-NHC(O)Rを有する化学的部分であり、式中、Rはアルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール(環炭素を介して結合される)及びヘテロ脂環式環(環炭素を介して結合される)から選択される。アミド部分は、プロドラッグを形成する結合を、アミノ酸又はペプチド分子及び本明細書に記載の化合物間に形成することもできる。本明細書に記載の化合物上の任意のアミン又はカルボキシル側鎖をアミド化することもできる。このようなアミドを作製するための手順及び具体的な基は当業者に既知であり、Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999などの、参照により

全体が本明細書に援用される参照文献において、容易に見ることができる。

【0083】

用語「エステル」は、式 - COOR の化学的部分を意味し、式中、R はアルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール（環炭素を介して結合される）及びヘテロ脂環式環（環炭素を介して結合される）から選択される。本明細書に記載の化合物上の任意のヒドロキシ又はカルボキシル側鎖をエステル化することもできる。このようなエステルを作製するための手順及び具体的な基は当業者に既知であり、Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999などの、参考により全体が本明細書に援用される参照文献において、容易に見ることができる。10

【0084】

本明細書で使用するとき、用語「環」は、任意の共有結合により閉鎖された構造を意味する。環としては、例えば、炭素環（例えば、アリール及びシクロアルキル）、複素環（例えば、ヘテロアリール及び非芳香族複素環）、芳香族（例えば、アリール及びヘテロアリール）、並びに非芳香族（例えば、シクロアルキル及び非芳香族複素環）が挙げられる。環は場合により置換され得る。環は単環式又は多環式であってよい。

【0085】

本明細書で使用するとき、用語「環系」は、1つ以上の環を意味する。

【0086】

用語「員環」は、任意の環構造を抱持し得る。用語「員」は、環を構成する骨格原子の数を示すことを意味する。したがって、例えば、シクロヘキシル、ピリジン、ピラン及びチオピランは6員環であり、シクロペンチル、ピロール、フラン、及びチオフェンは5員環である。

【0087】

用語「縮合」は、2つ以上の環が1つ以上の結合を共有している構造を指す。

【0088】

用語「場合により置換された」又は「置換された」は、参考された基が、(1つ以上)個別に、かつ独立して、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロ脂環式環、ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アルキルチオ、アリールチオ、アルキルスルホキシド、アリールスルホキシド、アルキルスルホン、アリールスルホン、シアノ、ハロ、アシリル、ニトロ、ハロアルキル、フルオロアルキル、一及び二置換アミノ基を含むアミノ、及びそれらの保護誘導体から選択される、1つ以上の追加の基により置換され得ることを意味する。例えば、場合により置換基は L_sR_s であってよく、式中、各 L_s は、独立して、結合、-O-、-C(=O)-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-、S(=O)₂NH-、-NH₂、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-(置換又は未置換 C₁~C₆ アルキル)、又は -(置換又は未置換 C₂~C₆ アルケニル) から選択され、各 R_s は、独立して、H、(置換又は未置換 C₁~C₄ アルキル)、(置換又は未置換 C₃~C₆ シクロアルキル)、ヘテロアリール、又はヘテロアルキルから選択される。上記置換基の保護誘導体を形成し得る保護基は当業者に既知であり、上掲 Greene and Wutsなどを参考することにより見ることもできる。30

【0089】

用語「標的」は、タンパク質モジュレータが相互作用することのできる生物学的分子を意味する。標的の非限定期例としては、細胞周期制御因子、転写因子、翻訳開始因子、サイクリン、受容体、細胞シグナル伝達タンパク質、配位子、酵素、及びキナーゼなどのタンパク質が挙げられる。

【0090】

本明細書で使用するとき、用語「薬剤」は、タンパク質モジュレータを指す。タンパク質モジュレータの非限定期例としては、キナーゼ阻害剤、キナーゼ拮抗剤、及びキナーゼ刺

10

20

30

40

50

激剤が挙げられる。例えば、薬剤は BTK 阻害剤であり得る。別の例では、薬剤は BMK 拮抗剤であり得る。

【0091】

用語「製剤」は、標的と相互作用する化合物を指す。いくつかの例では、製剤は薬剤と同一である。他の例では、製剤は薬剤に類似する。別の例では、製剤は薬剤とは異なる。

【0092】

用語「プローブ」は、標的を検出するための化合物又は分子を指す。いくつかの例では、プローブは製剤、リンカー、標識、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの例では、プローブは製剤を含む。他の例では、プローブは製剤及びリンカーを含む。別の例では、プローブは製剤及び標識を含む。別の例では、プローブは標識を含む。いくつかの例では、プローブは標識及びリンカーを含む。いくつかの例では、プローブは製剤、リンカー及び標識を含む。いくつかの例では、製剤にはリンカーが付加されている。別の例では、標識にはリンカーが付加されている。いくつかの実施形態では、製剤にはリンカーより標識が付加されている。あるいは、製剤には標識が付加されている。

10

【0093】

用語「未占有の標的」は、薬剤が結合していない標的を指す。

【0094】

本明細書で使用するとき、用語「薬剤により占有されている標的」又は「薬剤により結合されている標的」は、1つ以上の薬剤が結合している標的を指す。結合には、共有、非共有、イオン、水素、ジスルフィド、又はファンデルワールスが挙げられるがこれらに限定されない、任意の種類の結合が含まれる。結合には、親水性又は疎水性相互作用も含まれ得る。

20

【0095】

用語「プローブの結合している標的」又は「プローブの結合しているキナーゼ」は、1つ以上のプローブが結合している標的、又はキナーゼを指す。結合には、共有、非共有、イオン、水素、ジスルフィド、ファンデルワールスが挙げられるがこれらに限定されない、任意の種類の結合が含まれる。結合には、親水性又は疎水性相互作用も含まれ得る。いくつかの例では、「プローブの結合している標的」は、プローブが付加されており、薬剤により占有されている標識を含む。他の例では、「プローブの結合している標的」は、プローブが付加されており、占有していない標識を含む。

30

【0096】

「処理サンプル」は、1つ以上の薬剤が投与されているサンプルを指す。本明細書で使用するとき、患者由来の処理サンプルとは、サンプルが、1つ以上の薬剤（例えば、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤）の投与を受けた患者に由来することを意味する。

【0097】

「未処理サンプル」は、薬剤が投与されていないサンプルを指す。本明細書で使用するとき、患者由来の未処理サンプルとは、サンプルが、1つ以上の薬剤（例えば、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤）の投与を受けていない患者に由来することを意味する。

【0098】

タンパク質占有率アッセイ

本明細書では、標的（例えば、標的プロテインキナーゼ）に対するタンパク質モジュレータ（例えば、阻害剤）の有効性を決定するための方法が開示される。いくつかの実施形態では、標的キナーゼ（例えば、TEC ファミリーキナーゼ又は相同キナーゼ）に対する TEC ファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、(a) TEC ファミリーキナーゼを含むサンプルをプローブと接触させて、プローブの結合している標的キナーゼを形成させることと、(b) サンプル中の、プローブの結合している標的キナーゼの量を検出することと、(c) プローブの結合している標的キナーゼの量に基づき、TEC ファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、工程 (a) の前にサンプルを TEC ファミリーキナーゼ阻害剤と接触させる（例えば、サンプルをプローブと組み合わせ

40

50

る)ことを更に含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的キナーゼの量を検出することは、化合物、試薬又は緩衝剤を投与して、プローブの結合しているキナーゼを検出することを含む。いくつかの実施形態では、化合物、試薬又は緩衝剤は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、検出抗体緩衝液、読み取り緩衝液、洗浄緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的キナーゼの存在又は非存在を検出することは、プローブの結合している標的キナーゼの量を定量することを含む。いくつかの実施形態では、定量する工程は、蛍光、免疫蛍光、化学発光、又は電気化学発光を含む。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定することは、TECファミリーキナーゼ阻害剤による標的キナーゼの占有率を決定することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的キナーゼの量は、TECファミリーキナーゼ阻害剤の有効性と逆相関する。例えば、図8及び10に示される通り、薬剤処理されたサンプル(例えば、プローブと接触させる前に薬剤と接触させたサンプル)をプローブと接触させた後、検出される、プローブの結合している標的キナーゼ(例えば、未占有の標的キナーゼ)の量が増加した場合、薬剤の有効性は減少する。別の例では、薬剤処理されたサンプルをプローブと接触させた後、検出される、プローブの結合している標的キナーゼの量(例えば、未占有の標的キナーゼ)が減少した場合、薬剤の有効性は増加する。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的キナーゼの量は、薬剤の有効性と直接相関する。例えば、図9に示す通り、未処理サンプル(例えば、プローブと接触させる前に薬剤と接触させていないサンプル)をプローブと接触させた後、検出される、プローブの結合している標的キナーゼの量が増加した場合、薬剤の有効性も増加する。別の例では、未処理サンプル(例えば、プローブと接触させる前に薬剤と接触させていないサンプル)をプローブと接触させた後、検出される、プローブの結合している標的キナーゼの量が減少した場合、薬剤の有効性は減少する。いくつかの実施形態では、標的キナーゼの少なくとも約50%に薬剤が結合したとき、薬剤は有効であるものとして決定される。あるいは、標的キナーゼの少なくとも約60%に薬剤が結合したとき、薬剤は有効であるものとして決定される。いくつかの実施形態では、標的の少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、又は99%に薬剤が結合したとき、薬剤は有効であるものとして決定される。

【0099】

いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼを投与された患者から得られたサンプルに対し、アッセイが実施される。いくつかの実施形態では、サンプルは、TECファミリーキナーゼ阻害剤の投与の約1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間又は2週間超後に得られる。

【0100】

いくつかの実施形態では、プローブは製剤及び標識を含む。いくつかの例では、製剤は標識と融合している。他の例では、製剤には標識が付加されている。別の例では、製剤にはリンカーにより標識が付加されている。いくつかの実施形態では、製剤及び薬剤は本質的に同一である。いくつかの実施形態では、プローブは標識を含む。いくつかの実施形態では、プローブは標識及びリンカーを含む。いくつかの実施形態では、製剤及び薬剤は少なくとも約20%同一、少なくとも約30%同一、少なくとも約40%同一、少なくとも約50%同一、少なくとも約60%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、又は少なくとも約95%同一である。他の実施形態では、製剤及び薬剤は異なる。いくつかの実施形態では、製剤及び薬剤は少なくとも約5%異なり、少なくとも約10%異なり、少なくとも約20%異なり、少なくとも約30%異なり、少なくとも約40%異なり、少なくとも約50%異なり、少なくとも約60%異なり、少なくとも約70%異なり、少なくとも約80%異なり、少なくとも約90%異なり、又は少なくとも約95%異なる。

【0101】

10

20

30

40

50

標的

本明細書では、標的キナーゼ（例えば、T E C ファミリーキナーゼ又はチロシンキナーゼ相同体）に対する T E C ファミリーキナーゼ阻害剤の有効性を決定するための方法、アッセイ及びシステムが開示される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、細胞周期制御因子、受容体、配位子、転写調節因子、転写開始因子、酵素、細胞シグナル伝達タンパク質、及びその他のプロテインキナーゼなどが挙げられるがこれらに限定されない、その他の標的タンパク質のために構成することができる。特定の実施形態では、標的キナーゼはチロシンキナーゼである。特定の実施形態では、標的キナーゼは、セリン／スレオニンキナーゼである。

【0102】

いくつかの実施形態では、標的キナーゼは非受容体型チロシンキナーゼの T E C ファミリーのメンバーである。T E C キナーゼファミリーは、T E C 、B M X (X 染色体上の骨髓キナーゼ ; E t k とも呼ばれる) 、B T K (ブルトン型チロシンキナーゼ) 、I T K (I L - 2 誘導性 T 細胞キナーゼ ; E m t としても既知) 、及び R 1 k (静止期リンパ球キナーゼ ; T X K とも表記) を含む。いくつかの例では、標的キナーゼは B T K である。他の例では、標的キナーゼは I T K である。他の例では、標的キナーゼは T X K である。他の例では、標的キナーゼは B M X である。他の例では、標的キナーゼは T E C である。

【0103】

いくつかの実施形態では、標的キナーゼは、上皮増殖因子受容体 (E G F R) のメンバーである。いくつかの実施形態では、標的キナーゼは、H E R 1 (E G F R 、E r b B 1) 、H E R 2 / c - n e u (E r b B 2) 、H E R 3 (E r b B 3) 及び H E R 4 (E r b B 4) 、又は J A K 3 である。

【0104】

いくつかの実施形態では、標的キナーゼは S R C キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、標的キナーゼは B L K である。

【0105】

方法及び組成物における使用のための追加の例示的な標的キナーゼとしては、A b 1 、活性型 C d c 4 2 関連キナーゼ 1 (A C K 1) 、A k t / P K B 、A b 1 関連遺伝子 (A r g) 、アボトーシスシグナル調節キナーゼ (A s k - 1) 、オーロラ A 、オーロラ B 、オーロラ C 、A x 1 、カルシウム / カルモジュリン依存性キナーゼ - I (C a M K I) 、カルシウム / カルモジュリン依存性キナーゼ I I (C a M K I I) 、C a M K I I 、C a M K I I I 、カゼインキナーゼ (C K 、C K 1 1 、C K 1 2 、C K 1 3) 、サイクリン依存性キナーゼ (C d k) 、サイクリン依存性プロテインキナーゼ - 9 / サイクリン T 1 (C D K 9 / サイクリン T 1) 、カゼインキナーゼ 2 2 (C K 2 2) 、C h k 、c - k i t 、c d c 様キナーゼ 2 (C L K 2) 、C o t 1 、C 末端 c - S r c キナーゼ (C s k) 、細胞死関連プロテインキナーゼ - 1 (D A P K 1) 、ダブルコルチソニン及び C A M キナーゼ様 2 (D C A M K L 2) 、ジスコイジンドメイン受容体 1 及び 2 (D D R 1 及び D D R 2) 、E p h 受容体、接着斑キナーゼ (F A K) 、F e r 、線維芽細胞増殖因子受容体 (F G F R) 、F g r 、F n s 様チロシンキナーゼ (F l t) 、F m s 様チロシンキナーゼ 4 (F l t 4) 、F m s / C S F - 1 R 、F y n 、G タンパク質共役型受容体キナーゼ (G R K s) 、G タンパク質共役型受容体キナーゼ - 7 (G R K 7) 、グリコーゲン合成酵素キナーゼ (G S K) 、造血細胞キナーゼ (H c k) 、ホメオドメイン相互作用プロテインキナーゼ - 1 (H I P K 1) 、H I P K 2 、H I P K 3 、インスリン様増殖因子 (I G F) 、I K B キナーゼ (I K K) 、インスリン受容体、I L - 1 受容体関連キナーゼ (I R A K) 、ストレス活性化プロテインキナーゼ 1 (S A P K) 、キナーゼ挿入ドメイン含有受容体 (K D R) 、c - K i t 、L c k 、L I M キナーゼ (L I M K) 、リンパ球配向キナーゼ (Lymphocyte-oriented kinase) (L O K) 、L y n 、M A P K / E r k 、M A P K 活性化プロテインキナーゼ (M A P K A P K 又は M K) 、M A P キナーゼ / E r k キナーゼ (M E K) 、母性胚性ロイシンジッパーキナーゼ (M E L K) 、M e t 、M e r 、M i s s h a p e n / N I K 関連キナーゼ (M I N K) 、マイトイジ

10

20

30

40

50

エン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (M K K)、混合系統キナーゼ (Mixed lineage kinase) - 1 (M L K 1)、筋ジストロフィーキナーゼ関連 C d c 4 2 結合キナーゼ (M R C K)、マイトジエン及びストレス活性化プロテインキナーゼ 1 (M S K 1)、哺乳類 S T E 2 0 様キナーゼ (M S T)、哺乳類 S T E 2 0 様プロテインキナーゼ 3 (M S T 3)、ラバマイシンの標的 (m T O R、F R A P、R A F T)、m T o r / F K B P 1 2 、N I M A - 関連プロテインキナーゼ 3 (N E K 3)、N E K 9 、P 2 1 活性化キナーゼ (P A K)、P A K 3 、P A R - 1 キナーゼ、血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R)、P I (3 , 4 , 5) P 3 依存性キナーゼ 1 (P D K 1)、ホスホリラーゼキナーゼ (P h K)、ホスファチジルイノシトール (P I) 3 キナーゼ、p o l o 様キナーゼ 1 (P L K 1)、P I M キナーゼ、プロテインキナーゼ C 、P K D 2 、c G M P 依存性プロテインキナーゼ 1 (P K G 1)、二本鎖 R N A 活性化プロテインキナーゼ (P K R)、P 3 8 調節 / 活性化プロテインキナーゼ (P R A K)、プロテインチロシンキナーゼ - 5 (P T K 5)、プロリンリッチキナーゼ (P y k) 2 、R a f キナーゼ (R a f - 1 、A - R a f 、B - R a f)、R e t 、受容体共役型セリン / スレオニンキナーゼ 2 (R I P K 2)、R o n 、R o s 、R s e (B r t 、B Y K 、D t k 、E t k 3 、S k y 、T i f 、又はs e a 関連受容体チロシンキナーゼ)、リボソームタンパク質 S 6 キナーゼ - 4 (R s k 4)、P 7 0 S 6 キナーゼ、S A P K 、血清及びグルココルチコイド誘導キナーゼ (S G K)、c - S r c 、S y k 、T G F - 活性化キナーゼ (T A K 1)、サウザンド・アンド・ワン (thousand and one) アミノ酸プロテインキナーゼ - 1 (T A O 1)、I g 及びE G F 相同ドメインを有するチロシンキナーゼ - 2 (T i e 2 / T E K)、T o u s l e d 様キナーゼ (T L K s)、T r k 、精巣特異的セリンキナーゼ (T S S K)、U n c - 5 1 様キナーゼ 2 (U L K 2)、U L K 3 、ワクシニア関連キナーゼ - 2 、W e e 、Y e s 、Z A P - 7 0 、及びジッパー相互作用プロテインキナーゼ (Z I P K)が挙げられるがこれに限定されない。
10
20
30

【0106】

薬剤

本明細書では、標的にに対する薬剤の有効性を決定するための方法、アッセイ及びシステムが開示される。本明細書で開示される好適な薬剤はタンパク質モジュレータを含む。タンパク質モジュレータは、タンパク質阻害剤、タンパク質拮抗剤、及びタンパク質刺激剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤はタンパク質阻害剤である。タンパク質阻害剤の例としては、プロテインキナーゼ阻害剤が挙げられるがこれに限定されない。

【0107】

いくつかの実施形態では、薬剤はプロテインキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロテインキナーゼ阻害剤はチロシンキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、ダサチニブ、イマチニブ、ニロチニブ、スニチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブのいずれかである。

【0108】

いくつかの実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、B T K 阻害剤である。いくつかの実施形態では、B T K 阻害剤は可逆的 B T K 阻害剤である。いくつかの実施形態では、可逆的 B T K 阻害剤はL F M - A 1 3 又はテレイン酸である。いくつかの実施形態では、B T K 阻害剤は不可逆的 B T K 阻害剤である。不可逆的 B T K 阻害剤の例としては、イブルチニブ、A V L - 2 9 1 、A V L - 1 0 1 、A V L - 2 9 2 、又はO N O - W G - 3 0 7 が挙げられる。いくつかの実施形態では、不可逆的 B T K 阻害剤はイブルチニブである。いくつかの例では、B T K 阻害剤はR N 4 8 6 である。いくつかの実施形態では、薬剤はI T K 阻害剤である。いくつかの例では、I T K 阻害剤はC T A 0 5 6 である。いくつかの実施形態では、薬剤はT E C キナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤はT X K 阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤はB M X 阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤はB L K 阻害剤である。

【0109】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、薬剤はキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤はチロシンキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤は受容体チロシンキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤は非受容体型チロシンキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤はセリン／スレオニンキナーゼを阻害する。

【0110】

いくつかの例では、キナーゼはA G C キナーゼファミリーのメンバーである。他の例では、キナーゼはC a M キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、キナーゼはT K キナーゼファミリーのメンバーである。あるいは、キナーゼは、C K I キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、キナーゼは、C M G C キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの例では、キナーゼは、S T E キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、キナーゼは、S T K キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの例では、キナーゼはT K L キナーゼファミリーのメンバーである。

10

【0111】

タンパク質占有率アッセイキット

本明細書において、リンカー、標識、製剤、又はこれらの任意の組み合わせを含むタンパク質占有率アッセイキットが開示される。一態様は、リンカー及び標識を含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、リンカーは、標識を製剤に付加し得るものであり、製剤はタンパク質モジュレータである。別の態様は、製剤、リンカー及び標識を含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、リンカーは、製剤と標識とに付加することにより製剤を標識に付加させ得るものである。いくつかの実施形態は、プローブを含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、プローブは標識に付加されている製剤を含む。いくつかの実施形態は、プローブを含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、プローブはリンカーに付加されている製剤を含む。

20

【0112】

いくつかの実施形態は、製剤及び固体支持体を含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、製剤は固体支持体に付着している。別の実施形態は、標識及び固体支持体を含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、標識は固体支持体に付着している。別の実施形態は、プローブ及び固体支持体を含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、プローブは、製剤、リンカー、標識、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態は、標的（例えば、タンパク質）及び固体支持体を含むタンパク質占有率アッセイキットであり、ここで、標的は固体支持体に付着している。

30

【0113】

いくつかの態様では、本明細書で開示される任意のキットは更に標識を含む。いくつかの態様では、本明細書で開示される任意のキットは更にリンカーを含む。いくつかの態様では、本明細書で開示される任意のキットは更に製剤を含む。いくつかの態様では、本明細書で開示される任意のキットは更に複数のリンカーを含み、ここで、リンカーは別のリンカー、製剤、標識、又はこれらの任意の組み合わせに付加され得るものである。いくつかの態様では、本明細書で開示される任意のキットは更にプローブを含む。いくつかの態様では、プローブは製剤、リンカー、標識、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、本明細書で開示される任意のキットは更に標的（例えば、タンパク質）を含む。製剤、リンカー、標識、プローブ、固体支持体、及び標的の例示的な実施形態は本明細書に開示される。本明細書では、プローブ又は標的を固体支持体に付着させるための例示的な方法が更に開示される。

40

【0114】

プローブ

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は、プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブは製剤及び標識を含む。いくつかの実施形態では、製剤及び標識は付加されている。他の実施形態では、プローブは製剤及びリンカーを含む。いくつかの実施形態では、製剤及びリンカーは付加されている。別の実施形態

50

では、プローブは製剤、リンカー及び標識を含む。いくつかの実施形態では、製剤、リンカー及び／又は標識は互いに付加されている。いくつかの実施形態では、プローブは標識を含む。別の実施形態では、プローブは標識及びリンカーを含む。いくつかの実施形態では、標識及びリンカーは付加されている。いくつかの実施形態では、付加は化学的方法、酵素による方法、又は架橋による方法によるものである。いくつかの実施形態では、プローブを固体支持体に付着させる。製剤、リンカー、標識、及び固体支持体の例示的な実施形態が本明細書に開示される。

【0115】

製剤

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は製剤を含む。好適な製剤はタンパク質モジュレータ（例えば、阻害剤、拮抗剤、及び刺激剤）を含む。いくつかの実施形態では、製剤は薬剤である。本明細書で開示される好適な製剤はタンパク質モジュレータを含む。タンパク質モジュレータは、タンパク質阻害剤、タンパク質拮抗剤、及びタンパク質刺激剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤はタンパク質阻害剤である。タンパク質阻害剤の例としては、プロテインキナーゼ阻害剤が挙げられるがこれに限定されない。

10

【0116】

いくつかの実施形態では、薬剤はプロテインキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロテインキナーゼ阻害剤はチロシンキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、ダサチニブ、イマチニブ、ニロチニブ、スニチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブのいずれかである。

20

【0117】

いくつかの実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、T E C ファミリーキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、B T K 阻害剤である。いくつかの実施形態では、B T K 阻害剤は可逆的B T K 阻害剤である。いくつかの実施形態では、可逆的B T K 阻害剤はL F M - A 1 3 又はテレイン酸である。いくつかの実施形態では、B T K 阻害剤は不可逆的B T K 阻害剤である。不可逆的B T K 阻害剤の例としては、イブルチニブ、A V L - 2 9 1、A V L - 1 0 1、A V L - 2 9 2、又はO N O - W G - 3 0 7 が挙げられる。いくつかの実施形態では、不可逆的B T K 阻害剤はイブルチニブである。いくつかの例では、B T K 阻害剤はR N 4 8 6 である。いくつかの実施形態では、製剤はI T K 阻害剤である。いくつかの例では、I T K 阻害剤はC T A 0 5 6 である。いくつかの実施形態では、薬剤はT E C キナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤はT X K 阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤はB M X 阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤はB L K 阻害剤である。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、薬剤はキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤はチロシンキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤は受容体チロシンキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤は非受容体型チロシンキナーゼを阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤はセリン／スレオニンキナーゼを阻害する。

40

【0119】

いくつかの例では、キナーゼはA G C キナーゼファミリーのメンバーである。他の例では、キナーゼはC a M キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、キナーゼはT K キナーゼファミリーのメンバーである。あるいは、キナーゼは、C K I キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、キナーゼは、C M G C キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの例では、キナーゼは、S T E キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、キナーゼは、S T K キナーゼファミリーのメンバーである。いくつかの例では、キナーゼはT K L キナーゼファミリーのメンバーである。

【0120】

リンカー

50

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物はリンカーを含む。好適なリンカーは、本明細書で開示される標識及び／又は製剤に付加され得る任意の化学的又は生物学的化合物を含む。リンカーが標識及び製剤の両方に付加される場合、好適なリンカーは、標識及び製剤を十分に分離させ得るものである。好適なリンカーは、製剤の標的（例えば、タンパク質）結合能に著しく干渉しない。好適なリンカーは、標識の被検出能に著しく干渉しない。いくつかの実施形態では、リンカーは剛体である。他の実施形態では、リンカーは可動性である。別の実施形態では、リンカーは半剛体である。いくつかの実施形態では、リンカーはタンパク質分解に安定性である（例えば、タンパク質切断に耐性を示す）。別の実施形態では、リンカーはタンパク質分解に不安定性である（例えば、タンパク質切断を受けやすい）。いくつかの実施形態では、リンカーはらせん状である。いくつかの実施形態では、リンカーはらせん状ではない。いくつかの実施形態では、リンカーはコイル状である。いくつかの実施形態では、リンカーは - ストランド化されている。いくつかの実施形態では、リンカーはターン構造を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは単一鎖である。いくつかの実施形態では、リンカーは長鎖である。いくつかの実施形態では、リンカーは短鎖である。いくつかの実施形態では、リンカーは少なくとも約 5 残基、少なくとも約 10 残基、少なくとも約 15 残基、少なくとも約 20 残基、少なくとも約 25 残基、少なくとも約 30 残基、又は少なくとも約 40 残基からなる。

10

【0121】

リンカーの例としては、ヒドラゾン、ジスルフィド、チオエーテル、及びペプチドリンカーが挙げられるがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーはプロリン残基を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、アルギニン、フェニルアラニン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、リンカーはヘテロ二官能性架橋剤である。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性架橋剤は Sulfo-SMCC である。

20

【0122】

標識

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は標識を含む。例示的な標識としては、当該技術分野において周知の、化学的、生化学的、生物学的、比色的、酵素的、蛍光、発光標識、化学発光標識、及び電気化学発光標識が挙げられるがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、標識は、染料、光架橋剤、細胞毒性化合物、薬剤、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、抗体又は抗体断片、生体材料、ナノ粒子、スピニン標識、フルオロフォア、金属含有部分、放射活性部分、新規官能基、他の分子と共有結合的又は非共有結合的相互作用する基、光ケージド部分、化学線励起性部分、配位子、光異性化部分、ビオチン、ビオチン類似体、重原子を取り込んでいる部分、化学分解性基、光分解性基、酸化還元活性剤、同位体標識部分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、高電子密度基、磁性基、挿入基（intercalating group）、発色団、エネルギー移動剤、生物活性物質、検出可能な標識、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される。

30

【0123】

いくつかの実施形態では、標識は化学標識である。化学標識の例としては、ビオチン及び放射性同位体（例えば、ヨウ素、炭素、リン酸、水素）が挙げられるがこれに限定されない。

40

【0124】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は生物学的な標識を含む。いくつかの実施形態では、生物学的な標識は、生体直交型アジド修飾アミノ酸、糖、及びその他の化合物が挙げられるがこれらに限定されない代謝標識を含む。

【0125】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は酵素標識

50

を含む。酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、アルカリホスファターゼ（A P）、グルコースオキシダーゼ、及び - ガラクトシダーゼが挙げられるがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、酵素標識はルシフェラーゼである。

【0126】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は蛍光標識を含む。いくつかの実施形態では、蛍光標識は、有機染料（例えば、F I T C）、生物学的フルオロフォア（例えば、緑色蛍光タンパク質）、又は量子ドットである。蛍光標識の比限定的な一覧としては、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、D y L i g h t F l u o r s、フルオレセイン、ローダミン（テトラメチルローダミンイソチオシアネート、T R I T C）、クマリン、L u c i f e r Y e l l o w、及びB O D I P Y 10
が挙げられる。いくつかの実施形態では、標識はフルオロフォアである。例示的なフルオロフォアとしては、インドカルボシアニン（C 3）、インドジカルボシアニン（C 5）、C y 3、C y 3 . 5、C y 5、C y 5 . 5、C y 7、テキサスレッド、パシフィックブルー、オレゴングリーン488、A l e x a F l u o r（登録商標）- 355、A l e x a F l u o r 488、A l e x a F l u o r 532、A l e x a F l u o r 546、A l e x a F l u o r - 555、A l e x a F l u o r 568、A l e x a F l u o r 594、A l e x a F l u o r 647、A l e x a F l u o r 660、A l e x a F l u o r 680、J O E、L i s s a m i n e、ローダミングリーン、B O D I P Y、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、カルボキシフルオレセイン（F A M）、フィリコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン（d 20
ローダミン）、カルボキシテトラメチルローダミン（T A M R A）、カルボキシ-X-ローダミン（R O X（商標））、L I Z（商標）、V I C（商標）、N E D（商標）、P E T（商標）、S Y B R、P i c o G r e e n、R i b o G r e e n 及び同様物などが挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光標識は、緑色蛍光タンパク質（G F P）、赤色蛍光タンパク質（R F P）、黄色蛍光タンパク質、フィコビリントンパク質（例えば、アロフィコシアニン、フィコシアニン、フィリコエリトリン、及びフィコエリトロシアニン）である。

【0127】

固体支持体

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は固体支持体を含む。固体支持体は、プローブ又は抗体を付着させることのできる任意の固体プラットフォームを含む。いくつかの実施形態では、固体支持体は、ビーズ、プレート、及びアレイを含む。いくつかの実施形態では、固体支持体はプレートに付着しているビーズを含む。例えば、図11Bに示す通り、ストレプトアビジンビーズがプレートに付着している。いくつかの実施形態では、固体支持体はプレートを含む。別の実施形態では、固体支持体はプレートに付着している抗体を含む。例えば、図11Aに示す通り、抗B T K抗体がプレートに付着している。

【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物はビーズを含む。ビーズの例としては、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、D y n a b e a d s（登録商標）、M A C S（登録商標）マイクロビーズ、抗体複合ビーズ（例えば、抗免疫グロブリンマイクロビーズ）、プロテインA複合ビーズ、プロテインG複合ビーズ、プロテインA / G複合ビーズ、プロテインL複合ビーズ、オリゴd T複合ビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、及びB c M a g（商標）カルボキシ末端化磁気ビーズが挙げられるがこれらに限定されない。

【0129】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物はプレートを含む。例示的なプレートとしては、M S D マルチアレイプレート、M S D M u l t i - S p o t（登録商標）プレート、マイクロプレート、P r o t e O nマイクロプレート 50

、AlphaPlate、DELFI Aプレート、IsoPlate、及びLumaPlateが挙げられるがこれに限定されない。

【0130】

製剤、リンカー及び／又は標識を付加させるための方法

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、キット、及び組成物は、製剤、リンカー、標識、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、製剤、リンカー、及び／又は標識は付加されている。製剤、リンカー、及び／又は標識を付加させるための方法としては、化学標識及び酵素標識が挙げられるがこれらに限定されない。

【0131】

いくつかの実施形態では、標識をリンカー及び／又は製剤に付加させるための方法は、化学標識による手法を含む。いくつかの実施形態では、化学標識による手法は、化学的反応基を含む。一般的な反応基としては、FITCを含むアミン反応性イソチオシアネート誘導体、NHS-フルオレセイン又はNHS-ローダミンなどのアミン反応性スクシンイミジルエステル、及びフルオレセイン-5-マレイimidなどのスルフヒドリル反応性マレイimid活性化蛍光物質が挙げられるがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、これらの反応性染料のいずれかと、別の分子との反応により、フルオロフォアと、リンカー及び／又は製剤との間に安定な共有結合が形成される。いくつかの実施形態では、反応基はイソチオシアネートである。いくつかの実施形態では、標識は、リシン側鎖の一級アミンを介して製剤に付加されている。いくつかの実施形態では、化学標識は、NHS-エステル化法を含む。

【0132】

いくつかの実施形態では、標識をリンカー及び／又は製剤に付加させる方法は、酵素標識及び親和標識を含む。酵素標識としては、アシルキャリアータンパク質／ホスホパンテイントランスフェラーゼ(ACP/PPTase)、Qタグ／トランスグルタミナーゼ(TGase)(Lin, C. W. and Ting, A. Y. Transglutaminase-catalyzed site-specific conjugation of small-molecule probes to proteins in vitro and on the surface of living cells. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 4542~4543), ビオチン受容体ペプチド／ビオチンリガーゼ(AP/BirA)(Chen, I., et al., Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. Nat. Meth. 2005, 2, 99~104)、ファルネシル化モチーフ／タンパク質ファルネシルトランスフェラーゼ(PFTase)(Duckworth, B. P., et al., Selective labeling of proteins by using protein farnesyl transferase. ChemBioChem 2007, 8, 98~105)、アルデヒドタグ／ホルミルグリシン生成酵素(Carrico, I. S., et al., Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. Nat. Chem. Biol. 2007, 3, 321~322)、ヒトO⁶-アルキルグアニントランスフェラーゼ(hAGT)(Keppeler, A., et al., A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. Nat. Biotechnol. 2003, 21, 86~89; Keppeler, A., et al., Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 9955~9959)、及び変異型原核生物デハロゲナーゼ(HaloTag(商標))法(Los, G., et al., HaloTag(商標) te

10

20

30

40

50

chnology : cell imaging and protein analysis. Cell Notes 2006, 14, 10~14)を挙げることができるがこれらに限定されない。親和標識としては、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を利用する非共有結合法(Miller, L.W., et al., Methotrexate conjugates: a molecular *in vivo* protein tag. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004, 43, 1672~1675; Miller, L.W., et al., *In vivo* protein labeling with trimethoprim conjugates: a flexible chemical tag. *Nat. Meth.* 2005, 2, 255~257)及びFK506結合タンパク質12(FKBP12(F36V))のPhe36Val変異体(Marks, K.M., Braun, P.D., Nolan, G.P., A general approach for chemical labeling and rapid, spatially controlled protein inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 9982~9987)、並びに金属キレート法を挙げることができるがこれらに限定されない。

【0133】

いくつかの実施形態では、標識、リンカー及び/又は製剤の付加には架橋剤を使用する。いくつかの実施形態では、架橋剤はグルタルアルデヒドである。いくつかの実施形態では、グルタルアルデヒドはアミン基と反応して、数種類の経路のうちのいずれかにより架橋を生成する。いくつかの実施形態では、還元条件下で、グルタルアルデヒドの両端のアルデヒドがアミンと連結され、二級アミン結合が形成される。

【0134】

いくつかの実施形態では、標識、リンカー、及び/又は製剤の付加は、過ヨウ素酸塩活性化後の還元的アミノ化を含む。例えば、過ヨウ素酸塩(priodate)活性化後の還元的アミノ化を用い、HRP及びその他の糖タンパク質をリンカー及び/又は製剤に対し複合させる。いくつかの例では、過ヨウ素酸によるグリコシル化酵素の処理により、糖のcis-ジオール基の酸化が生じ(特に、糖タンパク質、多糖類において一般的であるシアル酸)、アルデヒド基が形成される。いくつかの例では、これらのアルデヒド基は、穏やかな還元剤のシアノ水素化ホウ素の存在下で、加えた抗体又はその他の分子の一級アミンと反応する。

【0135】

いくつかの実施形態では、Sulfo-SMCC又はその他のヘテロ二官能性架橋剤を使用して、標識をリンカー及び/又は製剤に複合させる。例えば、Sulfo-SMCCを使用して、酵素を薬剤に複合させる。いくつかの実施形態では、第1工程で酵素を活性化させかつ精製し、次に第2工程で薬剤に複合させる。いくつかの実施形態では、架橋の指向性は、1つの特定の方向に限定される(例えば、酵素上のアミンは抗体上のスルフヒドリル基に指向する)。

【0136】

いくつかの実施形態では、連結は、リンカーと、標識及び/又は製剤との間で形成される。本明細書で使用するとき、用語「連結」は、リンカーの官能基と別の分子(例えば、標識、製剤)との間の化学反応から形成される結合又は化学部分を指す。いくつかの実施形態では、このような結合としては、限定するものではないが共有結合及び非共有結合が挙げられるのに対し、このような化学部分としては、限定するものではないが、エステル、炭酸塩、イミン、リン酸エステル、ヒドラゾン、アセタール、オルトエステル、ペプチド結合、及びオリゴヌクレオチド結合が挙げられる。加水分解に安定な結合は、その結合が、水中で実質的に安定であり、かつ有用なpH値にて(限定するものではないが、長期間、更に、恐らくは無期限に、生理的条件下で)、水と反応しないことを意味する。加水分解に不安定である又は分解可能な結合は、その結合が、水又は水性溶液(例えば、血液)中で分解可能であることを意味する。他の実施形態では、酵素学的に不安定である又は

分解可能な結合は、その結合が1つ以上の酵素により分解されることを意味する。例えば、PEG及び関連するポリマーは、ポリマー主鎖中、又はポリマー主鎖とポリマー分子の1つ以上の末端官能基との間の結合基中に分解可能な結合を含む。このような分解可能な結合としては、限定するものではないが、PEGカルボン酸又は活性型PEGカルボン酸と、生物活性物質のアルコール基との反応により形成されるエステル結合が挙げられ、このようなエステル基は、一般的に、生理的条件下で加水分解され生物活性物質を放出する。その他の加水分解により分解可能な結合としては、限定するものではないが、カーボネート結合、アミン及びアルデヒドの反応により生じるイミン結合、アルコールとリン酸基との反応により形成されるリン酸エステル結合、ヒドラジドとアルデヒドとの反応生成物であるヒドラゾン結合、アルデヒドとアルコールとの反応生成物であるアセタール結合、ギ酸塩とアルコールとの反応生成物であるオルトエステル結合、PEGなどのポリマーの末端及びペプチドのカルボキシル基などを含むがこれらに限定されないアミン基により形成されるペプチド結合、並びにポリマーの末端及びオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基などを含むがこれらに限定されないホスホラミダイト基により形成されるオリゴヌクレオチド結合が挙げられる。

10

【0137】

プローブ又は標的(例えば、タンパク質)を固体支持体に付着させる方法

いくつかの実施形態では、プローブ又は標的(例えば、タンパク質)を固体支持体に付着させるための方法としては、化学的及び/又は酵素学的方法が挙げられる。本明細書におけるいくつかの実施形態では、化学的方法が開示される。本明細書におけるいくつかの実施形態では、酵素学的方法が開示される。いくつかの実施形態では、プローブ又は標的を固体支持体に付着させるための方法は、固体支持体を、プローブ又は標的によりコートすることを含む。マイクロプレートを抗体によりコートするための方法は当該技術分野において周知であり、かつコート緩衝液に抗体を希釈し、希釈した抗体をマイクロプレートにおけるウェルに加えることを含み得る。未結合の抗体は、プレートを洗浄緩衝液で洗浄することにより除去することができる。

20

【0138】

TECファミリーキナーゼプローブ化合物

本明細書に記載のTECファミリーキナーゼプローブ化合物は、TECファミリーキナーゼ阻害剤を含む部分、リンカー部分、及び検出可能な標識から構成される。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤は不可逆的TECファミリーキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼ阻害剤はBtk阻害剤である。いくつかの実施形態では、Btk阻害剤は不可逆的阻害剤である。別の実施形態では、Btkの不可逆的阻害剤は、BtkのATP結合ポケットの非触媒残基に結合する。更なる実施形態では、非触媒残基はシスティン残基である。いくつかの実施形態では、Btkプローブは、Btkの少なくとも1つの非触媒残基と共有結合を形成する。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼプローブ化合物は、不可逆的Btk阻害剤の誘導体である。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼプローブ化合物はイブルチニブの誘導体である。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼプローブ化合物はイブルチニブの誘導体である。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼプローブ化合物は、リンカーにより標識が付加されたイブルチニブからなる。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼプローブ化合物は、AVL-292、AVL-291、AVL-101、CNX-774、又はONO-WG-307の誘導体である。いくつかの実施形態では、TECファミリーキナーゼプローブ化合物は、リンカーにより標識が付加されたAVL-292、AVL-291、AVL-101、CNX-774、又はONO-WG-307からなる。

30

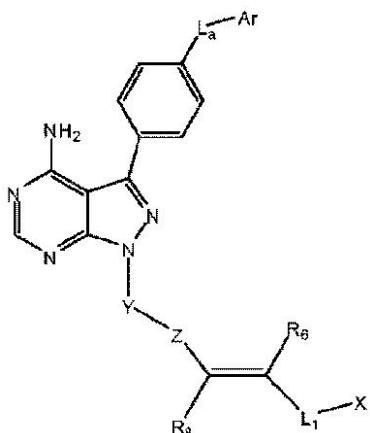
【0139】

一態様は、式(I)のTECファミリーキナーゼプローブである

40

【0140】

【化 8】



式(I)

(式中、

 L_a は、 CH_2 、 O 、 NH 又は S であり、

Ar は、 場合により置換されたアリールであるか、 又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

Y は、 場合により置換されたアルキル、 場合により置換されたヘテロアルキル、 場合により置換されたシクロアルキル、 場合により置換されたヘテロシクロアルキル、 場合により置換されたアリールであるか、 又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

Z は、 $C(O)$ 、 $OC(O)$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(S)$ 、 $S(O)_n$ 、 $OS(O)_n$ 、 $NHS(O)_n$ であり、 式中、 n は 1 又は 2 であり、 R_6 及び R_8 は、 独立して、 H 、 場合により置換されたアルキル、 又は場合により置換されたヘテロアルキルから選択され、 L_1 は、 結合、 場合により置換されたアルキル、 場合により置換されたヘテロアルキル、 場合により置換されたシクロアルキル、 場合により置換されたヘテロシクロアルキル、 場合により置換されたアリール、 場合により置換されたヘテロアリール、 場合により置換されたアミド部分、 場合によりケトン部分、 場合により置換されたカルバマート部分、 及び場合によりエステル部分、 又はこれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、 かつ X は検出可能な標識である)。

【0141】

いくつかの実施形態では、 L_a は、 CH_2 、 O 、 又は NH である。他の実施形態では、 L_a は、 O 又は NH である。いくつかの実施形態では、 L_a は O である。いくつかの実施形態では、 Ar は、 置換又は未置換アリールである。いくつかの実施形態では、 Ar は 6 員アリールである。いくつかの他の実施形態では、 Ar はフェニルである。いくつかの実施形態では、 Z は、 $C(=O)$ 、 $OC(=O)$ 、 $NHC(=O)$ 、 $S(=O)_x$ 、 $OS(=O)_2$ 、 又は $NHS(=O)_2$ である。いくつかの実施形態では、 Z は、 $C(=O)$ 、 $NHC(=O)$ 、 又は $S(=O)_2$ である。いくつかの実施形態では、 Z は $C(=O)$ である。いくつかの実施形態では、 Z は $NHC(=O)$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、 アルキル、 ヘテロアルキル、 シクロアルキル、 及びヘテロシクロアルキルから選択される、 場合により置換された基である。いくつかの実施形態では、 Y は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、 4、 5、 6 又は 7 員シクロアルキル、 及び 4、 5、 6 又は 7 員ヘテロシクロアルキルから選択される、 場合により置換された基である。いくつかの実施形態では、 Y は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、 5 又は 6 員シクロアルキル、 及び 1 又は 2 個の N 原子を含有する 5 又は 6 員ヘテロシクロアルキルから選択される、 場合により置換された基である。いくつかの実施形態では、 Y は 5 又は 6 員シクロアルキル、 あるいは 1 又は 2 個の N 原子を含有する 5 又は 6 員ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 Y はピロリジン環である。いくつかの実施形態では、 Y はピペリジン環である。いくつかの実施形態では、 R_6 及び R_8 は、 独立して、

20

30

40

50

H、未置換C₁～C₄アルキル、置換されたC₁～C₄アルキル、未置換C₁～C₄ヘテロアルキル、及び置換されたC₁～C₄ヘテロアルキルから選択される。いくつかの実施形態では、R₆及びR₈はそれぞれHである。

【0142】

いくつかの実施形態では、L₁は、結合、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリール、場合により置換されたヘテロアリール、場合により置換されたアミド部分、場合によりケトン部分、場合により置換されたカルバマート部分、及び場合によりエステル部分、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、L₁は、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリール、場合により置換されたヘテロアリール、場合により置換されたアミド部分、場合によりケトン部分、場合により置換されたカルバマート部分、及び場合によりエステル部分、から選択される、少なくとも2つの基の任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、L₁は、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリール、場合により置換されたヘテロアリール、場合により置換されたアミド部分、場合によりケトン部分、場合により置換されたカルバマート部分、及び場合によりエステル部分から選択される、少なくとも3つの基の任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、L₁は、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリール、場合により置換されたヘテロアリール、場合により置換されたアミド部分、場合によりケトン部分、場合により置換されたカルバマート部分、及び場合によりエステル部分、から選択される、少なくとも4つの基の任意の組み合わせから選択される。

10

20

30

【0143】

いくつかの実施形態では、Xは、染料、光架橋剤、細胞毒性化合物、薬剤、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、抗体又は抗体断片、生体材料、ナノ粒子、スピニン標識、フルオロフォア、金属含有部分、放射活性部分、新規官能基、他の分子と共有結合的又は非共有結合的相互作用する基、光ケージド部分、化学線励起性部分、配位子、光異性化部分、ビオチン、ビオチン類似体、重原子を取り込んでいる部分、化学分解性基、光分解性基、酸化還元活性剤、同位体標識部分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、高電子密度基、磁性基、挿入基(intercalating group)、発色団、エネルギー移動剤、生物活性物質、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される検出可能な標識である。いくつかの実施形態では、Xはフルオロフォアである。いくつかの実施形態では、Xはビオチンである。いくつかの実施形態では、Xはビオチン類似体である。

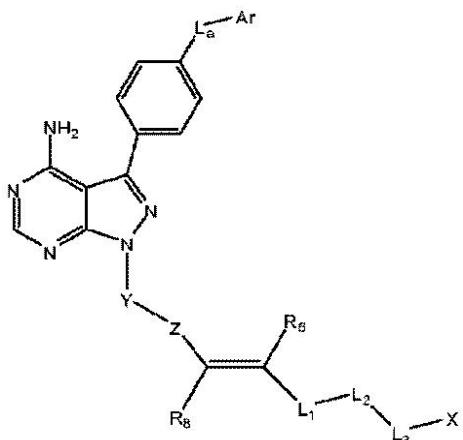
【0144】

別の実施形態は、式(I1)のTECファミリーキナーゼプローブである

【0145】

40

【化9】



式(I-I)

(式中、

 L_a は、 CH_2 、O、NH又はSであり、

Arは、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

Yは、場合により置換されたアルキル、場合により置換されたヘテロアルキル、場合により置換されたシクロアルキル、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、場合により置換されたアリールであるか、又は場合により置換されたヘテロアリールであり、

Zは、C(O)、OC(O)、NHC(O)、C(S)、S(O)_n、OS(O)_n、NHS(O)_nであり、式中、nは1又は2であり、R₆及びR₈は、独立して、H、場合により置換されたアルキル、又は場合により置換されたヘテロアルキルから選択され、 L_1 は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、 L_2 は、結合、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、又は-N(H)C(O)(CH₂)_mC(O)N(H)-であり、式中、mは2~6であり、 L_3 は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、かつ

Xは検出可能な標識である)。

【0146】

いくつかの実施形態では、 L_a は、 CH_2 、O、又はNHである。他の実施形態では、 L_a は、O又はNHである。いくつかの実施形態では、 L_a はOである。いくつかの実施形態では、Arは、置換又は未置換アリールである。いくつかの実施形態では、Arは6員アリールである。いくつかの他の実施形態では、Arはフェニルである。いくつかの実施形態では、Zは、C(=O)、OC(=O)、NHC(=O)、S(=O)_x、OS(=O)₂、又はNHS(=O)₂である。いくつかの実施形態では、Zは、C(=O)、NHC(=O)、又はS(=O)₂である。いくつかの実施形態では、ZはC(=O)である。いくつかの実施形態では、ZはNHC(=O)である。いくつかの実施形態では、Yは、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、及びヘテロシクロアルキルから選択される、場合により置換された基である。いくつかの実施形態では、Yは、C₁~C₆アルキル、C₁~C₆ヘテロアルキル、4、5、6又は7員シクロアルキル、及び4、5、6又は7員ヘテロシクロアルキルから選択される、場合により置換された基である。いくつかの実施形態では、Yは、C₁~C₆アルキル、C₁~C₆ヘテロアルキル、5又は6員シクロアルキル、及び1又は2個のN原子を含有する5又は6員ヘテロシクロアルキルから選択される、場合により置換された基である。いくつかの実施形態では、Yは5又は6員シクロアルキル、あるいは1又は2個のN原子を含有する5又は6員ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、Yはピロリジン環である。いくつかの実施形態

では、Yはピペリジン環である。いくつかの実施形態では、R₆及びR₈は、独立して、H、未置換C₁～C₄アルキル、置換されたC₁～C₄アルキル、未置換C₁～C₄ヘテロアルキル、及び置換されたC₁～C₄ヘテロアルキルから選択される。いくつかの実施形態では、R₆及びR₈はそれぞれHである。

【0147】

いくつかの実施形態では、L₁は、場合により置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、L₁は、場合により置換されたヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、L₂は結合である。いくつかの実施形態では、L₂は、場合により置換されたヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、L₂は、場合により置換されたピペラジンである。いくつかの実施形態では、L₂は、場合により置換されたピペリジンである。いくつかの実施形態では、L₂は、-N(H)C(O)(CH₂)₂C(O)N(H)-である。いくつかの実施形態では、L₂は、-N(H)C(O)(CH₂)₃C(O)N(H)-である。いくつかの実施形態では、L₂は、-N(H)C(O)(CH₂)₄C(O)N(H)-である。いくつかの実施形態では、L₂は、-N(H)C(O)(CH₂)₅C(O)N(H)-である。いくつかの実施形態では、L₂は、-N(H)C(O)(CH₂)₆C(O)N(H)-である。いくつかの実施形態では、L₃は、場合により置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、L₃は、場合により置換されたヘテロアルキルである。

10

【0148】

いくつかの実施形態では、Xは、染料、光架橋剤、細胞毒性化合物、薬剤、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、抗体又は抗体断片、生体材料、ナノ粒子、スピニ標識、フルオロフォア、金属含有部分、放射活性部分、新規官能基、他の分子と共有結合的又は非共有結合的相互作用する基、光ケージド部分、化学線励起性部分、配位子、光異性化部分、ビオチン、ビオチン類似体、重原子を取り込んでいる部分、化学分解性基、光分解性基、酸化還元活性剤、同位体標識部分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、高電子密度基、磁性基、挿入基(intercalating group)、発色団、エネルギー移動剤、生物活性物質、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される検出可能な標識である。いくつかの実施形態では、Xはフルオロフォアである。いくつかの実施形態では、Xはビオチンである。いくつかの実施形態では、Xはビオチン類似体である。

20

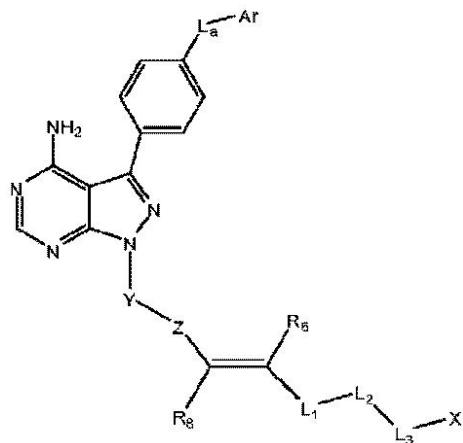
【0149】

30

別の実施形態は、式(III)のTECファミリーキナーゼプローブである

【0150】

【化10】



40

式(III)

(式中、

L_aはOであり、

Arは場合により置換されたフェニルであり、

Yは、場合により置換されたシクロアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテ

50

ロシクロアルキルであり、

Z は $C(=O)$ 又は $NHC(=O)$ であり、

R_6 及び R_8 は、独立して、 H 、場合により置換されたアルキル、又は場合により置換されたヘテロアルキルから選択され、

L_1 は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、

L_2 は、結合、場合により置換されたヘテロシクロアルキル、又は $-N(H)C(=O)(CH_2)_mC(=O)N(H)-$ であり、式中、 m は 2 ~ 6 であり、

L_3 は、場合により置換されたアルキルであるか、又は場合により置換されたヘテロアルキルであり、かつ

10

X は

【0151】

【化11】



である)。

【0152】

いくつかの実施形態では、 Z は $C(=O)$ である。いくつかの実施形態では、 Z は $NHC(=O)$ である。いくつかの実施形態では、 Y は場合により置換されたシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 Y は場合により置換されたヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 Y は 5 又は 6 員シクロアルキル、あるいは 1 又は 2 個の N 原子を含有する 5 又は 6 員ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 Y はシクロヘキシル環である。いくつかの実施形態では、 Y はピロリジン環である。いくつかの実施形態では、 Y はピペリジン環である。いくつかの実施形態では、 R_6 及び R_8 は、独立して、 H 、未置換 C_1 ~ C_4 アルキル、置換された C_1 ~ C_4 アルキル、未置換 C_1 ~ C_4 ヘテロアルキル、及び置換された C_1 ~ C_4 ヘテロアルキルから選択される。いくつかの実施形態では、 R_6 及び R_8 はそれぞれ H である。

20

【0153】

いくつかの実施形態では、 L_1 は、場合により置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 L_1 は、場合により置換されたヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、 L_2 は結合である。いくつかの実施形態では、 L_2 は、場合により置換されたヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 L_2 は、場合により置換されたピペラジンである。いくつかの実施形態では、 L_2 は、場合により置換されたピペリジンである。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 $-N(H)C(=O)(CH_2)_2C(=O)N(H)-$ である。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 $-N(H)C(=O)(CH_2)_3C(O)N(H)-$ である。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 $-N(H)C(=O)(CH_2)_4C(O)N(H)-$ である。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 $-N(H)C(=O)(CH_2)_5C(O)N(H)-$ である。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 $-N(H)C(=O)(CH_2)_6C(O)N(H)-$ である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、場合により置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 L_3 は、場合により置換されたヘテロアルキルである。

30

【0154】

いくつかの実施形態では、プローブは、リンカーによりイブルチニブに付加されたビオチンを含む(すなわち、ビオチン化イブルチニブ)。いくつかの実施形態では、プローブは、次の I - 1 ~ I - 5 から選択される。

40

【0155】

【表1】

I-1		
I-2		10
I-3		20
I-4		30
I-5		40

検出方法

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、標的（例えば、標的キナーゼ）の検出を含む。いくつかの例では、標的はプローブの結合している標的である。いくつかの例では、プローブの結合している標的は、薬剤に占有されている標的である。他の例では、プローブの結合している標的は、未占有の標的である。

【0157】

いくつかの実施形態では、標的の検出は、サンプルと抗体を接触させることを含む。いくつかの実施形態では、抗体は標識化抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は電気化学発光タグにより標識される。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス（ビピリジン）ルテニウム（II）二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム（II）トリス・ビピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、標識化抗体はSULFO-TAG標識化抗体である。いくつかの実施形態では、標識化抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は一次抗体として使用される。別の実施形態では、抗体は二次抗体として使用される。

10

【0158】

いくつかの実施形態では、標的の検出は化学発光、発光、蛍光、免疫蛍光、熱量測定、又は電気化学発光法を含む。いくつかの実施形態では、標的の検出は蛍光検出装置を含む。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置は励起光源を含む。いくつかの実施形態では、光源はレーザー、光ダイオード、又はランプである。いくつかの実施形態では、ランプはキセノンアーク又は水銀である。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置はフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置はフィルターを含む。いくつかの実施形態では、フィルターは特定の波長を分離して異なるフルオロフォアを励起する。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置は、出力を記録する検出器を含む。いくつかの実施形態では、出力は電子信号である。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置は蛍光顕微鏡である。いくつかの実施形態では、蛍光顕微鏡は、局在している蛍光を検出する。いくつかの実施形態では、検出は二次元及び/又は三次元で行われる。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置は蛍光スキャナーである。いくつかの実施形態では、蛍光スキャナーはマイクロアレイリーダーである。いくつかの実施形態では、マイクロアレイリーダーは、局在している蛍光を二次元で検出する。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置は分光蛍光光度計である。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置はマイクロプレートリーダーである。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置は平均蛍光を記録する。いくつかの実施形態では、蛍光検出装置はフローサイトメーターである。いくつかの実施形態では、フローサイトメーターは、サンプル集団中の個々の細胞の蛍光を解析する。

20

【0159】

いくつかの実施形態では、標的の検出はマイクロプレートリーダーの使用を含む。いくつかの例では、マイクロプレートリーダーはxMark（商標）マイクロプレート吸光分光光度計、iMarkマイクロプレート吸光度リーダー、EnSpire（登録商標）マルチモードプレートリーダー、EnVisionマルチラベルプレートリーダー、VICTOR Xマルチラベルプレートリーダーである。Fluoroskan Ascent

30

FLマイクロプレート蛍光光度計及び照度計、Fluoroskan Ascentマイクロプレート蛍光光度計、Luminoskan Ascentマイクロプレート照度計、Multiskan EXマイクロプレート光度計、Multiskan FCマイクロプレート光度計、及びMultiskan GOマイクロプレート光度計。いくつかの例では、マイクロプレートリーダーは、吸光度、蛍光、発光、時間分解蛍光、及び光散乱を検出する。いくつかの実施形態では、マイクロプレートリーダーは、動的光散乱を検出する。別の方法としては、マイクロプレートリーダーは、静的光散乱を検出する。

40

【0160】

いくつかの実施形態では、標的の検出はマイクロプレートイメージャーの使用を含む。いくつかの例では、マイクロプレートイメージャーは、ViewLux uHTSマイク

50

ロプレートイメージヤー及びBioReadマイクロプレートイメージングシステムを含む。
。

【0161】

いくつかの実施形態では、コンピューター系システムは、本明細書に記載のタンパク質占有率を決定するための検出方法において採用される。いくつかの実施形態では、コンピューター系システムは、マルチウェルプレートアッセイなどのデバイス又は装置から得られるデータ及びシグナルを分析するデジタル処理装置を含む。いくつかの実施形態では、本明細書では、本明細書に記載のタンパク質占有率を決定するための検出方法を実施するための、デジタル処理デバイスによる実行可能な命令を含む、コンピュータープログラムによりコードされたコンピューター読み取り可能な記録媒体が提供される。

10

【0162】

更なる実施形態では、デジタル処理デバイスは、装置の機能を遂行する1つ以上のハードウェア、中央処理装置(CPU)を含む。尚更なる実施形態では、デジタル処理デバイスは、実行可能な命令を実行するよう構成されたオペレーティングシステムを更に含む。いくつかの実施形態では、デジタル処理デバイスは、場合によりコンピューターネットワークに接続する。更なる実施形態では、デジタル処理デバイスは、場合により、ワールド・ワイド・ウェブにアクセスさせるなどしてインターネットに接続する。尚更なる実施形態では、デジタル処理デバイスは、場合により、クラウド・コンピューティングインフラに接続する。他の実施形態では、デジタル処理デバイスは、場合により、インターネットに接続する。他の実施形態では、デジタル処理デバイスは、場合により、データ記憶装置に接続する。

20

【0163】

いくつかの実施形態では、本明細書では、標的キナーゼのタンパク質占有率を決定するための分析系が提供され、システムは(a)本明細書に記載の通りの標的キナーゼ及びプローブを含む患者サンプルを含むプローブELISAアッセイと、(b)タンパク質占有率を決定するためのプローブの結合している標的キナーゼを検出するための分析装置と、(c)実行可能な命令を実施するよう構成されたオペレーティングシステム、及びメモリを含むデジタル処理デバイスと、(d)(i)標的占有率の閾値のデータベース、(ii)分析装置から信号データを受信するよう構成されたソフトウェアモジュール、及び(iii)信号データに対してアルゴリズムを適用してサンプル中の標的キナーゼの占有率の度合いを特定するソフトウェアモジュールを含む、標的占有率のアプリケーションを作成する実行可能な命令を含み、デジタル処理デバイスに提供されたコンピュータープログラムと、を含む。

30

【0164】

応用

薬剤の探索及び検証

本明細書で開示されるアッセイ及びシステムは、いずれも薬剤の探索及び検証において有用であり得る。本明細書では、(a)標的を含むサンプルをプローブと接触させて、プローブの結合している標的を形成させることと、(b)プローブの結合している標的存在又は非存在を検出することと、(c)プローブの結合している標的存在又は非存在に基づき、薬剤による標的の占有率を決定することにより、薬剤を検証することと、を含む、薬剤を検証するための方法が提供される。

40

【0165】

本明細書では、a)標的を含むサンプルをプローブと組み合わせることと、b)プローブの結合している標的存在又は非存在を検出することと、c)プローブの結合している標的存在又は非存在に基づき、薬剤による標的の占有率を決定することと、を含む、標的の占有率を決定するための方法が更に提供される。

【0166】

いくつかの実施形態では、方法は、工程(a)のサンプルをプローブと接触させることより前に、標的を捕捉することを更に含む。いくつかの実施形態では、標的是抗体により

50

捕捉される。いくつかの実施形態では、抗体は抗標的抗体である。いくつかの実施形態では、抗体を固体支持体に付着させる。いくつかの実施形態では、固体支持体はマイクロプレートである。いくつかの実施形態では、マイクロプレートはM S Dマイクロプレートである。

【0167】

いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合している標的を一次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤は、抗体、ビーズ、染料、又はフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤は抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は抗B T K抗体である。いくつかの実施形態では、方法は、検出剤を二次検出剤と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態では、二次検出剤は、抗体、ビーズ、染料、又はフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態では、一次検出剤は標識されている。いくつかの実施形態では、二次検出剤は標識されている。いくつかの実施形態では、標識は電気化学発光タグである。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス(ビピリジン)ルテニウム(II)二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン, N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、標識はS U L F O - T A Gである。

【0168】

いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、サンプルを固体支持体と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、固体支持体はビーズを含む。いくつかの実施形態では、ビーズはストレプトアビジンビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズは磁気ビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズは標識化ビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズは標識化ストレプトアビジンビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズは電気化学発光タグにより標識されている。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス(ビピリジン)ルテニウム(II)二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン, N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、ビーズはS U L F O - T A Gビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズはS U L F O - T A Gストレプトアビジンビーズである。

【0169】

いくつかの実施形態では、ビーズはプローブと相互作用する。いくつかの実施形態では、プローブは標識を含む。いくつかの実施形態では、標識はビオチンを含む。いくつかの実施形態では、ビーズはビオチンと相互作用する。いくつかの実施形態では、ビーズはプローブの結合している標的と複合体を形成する。いくつかの実施形態では、ビーズはプローブと複合させる。

【0170】

いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、プローブの結合している標的又はそれらの一部を検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、ビーズ又はそれらの一部を検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、標識化ビーズを検出することを含む。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、電気化学発光タグを検出することを含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、トリス(ビピリジン)ルテニウム(II)二塩化物を含む。いくつかの実施形態では、電気化学発光タグは、ルテニウム(II)トリス-ビピリジン, N-ヒドロキシスクシンイミドである。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することは、S U L F O - T A Gを検出することを含む。いくつかの実施形態では、検出する工程は、発光を含む。いくつかの実施形態では、検出する工程は、電気化学発光を含む。

【0171】

いくつかの実施形態では、方法は、プローブの結合している標的の精製を更に含む。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態では、プローブの結合している標的は未占有の標的である。いくつかの実施形態では、プローブの結合している標的は製剤により占有されている標的である。別の実施形態では、プローブの結合している標的の精製は、プローブの結合していない標的からのプローブの結合している標的の磁気分離を含む。

【0172】

いくつかの実施形態では、サンプルは、前処理されたサンプルであり、ここで、前処理されたサンプルは、プローブと接触させる前に薬剤と接触させている。いくつかの実施形態では、サンプルは未処理サンプルであり、ここで、サンプルは、標識と接触させる前に薬剤と接触させていない。

【0173】

いくつかの実施形態では、プローブは製剤を含む。いくつかの実施形態では、プローブは製剤及びリンカーを含む。いくつかの実施形態では、プローブは標識を含む。いくつかの実施形態では、プローブは標識及びリンカーを含む。いくつかの実施形態では、製剤はBTK阻害剤である。いくつかの実施形態では、BTK阻害剤は可逆的BTK阻害剤である。いくつかの実施形態では、BTK阻害剤は不可逆的BTK阻害剤である。いくつかの実施形態では、BTK阻害剤は選択的共有BTK阻害剤(selective, covalent BTK inhibitor)である。いくつかの実施形態では、BTK阻害剤は、ブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)のシステイン残基と共有結合を形成する。いくつかの実施形態では、システイン残基はシステイン481である。いくつかの実施形態では、BTK阻害剤は、LFM-A13、AVL-291、AVL-101、AVL-292、及びONO-WG-307を含むリストから選択される。いくつかの実施形態では、BTK阻害剤はイブルチニブである。いくつかの実施形態では、製剤はITK阻害剤である。いくつかの実施形態では、製剤はB MXキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、製剤はTECキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、製剤はBLK阻害剤である。

10

20

30

30

【0174】

いくつかの実施形態では、製剤は薬剤と同一である。例えば、薬剤及び製剤は、いずれもBTK阻害剤(例えば、イブルチニブ、AVL-292、ONO-WG-307)であり得る。いくつかの実施形態では、製剤は薬剤と同様である。例えば、製剤はBTK阻害剤であってよく、かつ製剤はBTK阻害剤の塩誘導体であり得る。いくつかの実施形態では、製剤は薬剤とは異なる。例えば、薬剤はイブルチニブであってよく、かつ製剤はAVL-292であってよい。

【0175】

いくつかの実施形態では、標的は受容体である。いくつかの実施形態では、標的は配位子である。いくつかの実施形態では、標的はキナーゼである。いくつかの実施形態では、キナーゼはBTKである。いくつかの例では、キナーゼはITKである。他の実施形態では、キナーゼはB MX又はBLKである。いくつかの例では、キナーゼはTEC又はTXKである。いくつかの実施形態では、キナーゼはHER1、HER2、HER3、又はHER4である。あるいは、キナーゼはJAK3である。

【0176】

いくつかの実施形態では、薬剤を検証することは、標的にに対する薬剤の有効性を決定することを含む。いくつかの実施形態では、薬剤による標的の占有率を決定することは、プローブの結合している標的の存在又は非存在を定量することを含む。いくつかの実施形態では、標的の占有率が少なくとも約50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、又は99%であるときに薬剤は有効である。

40

【0177】

診断

任意の方法、アッセイ及びシステムを使用して、対象者の治療法及び全体的なヘルスケアマネジメントについての情報を提供でき、治療レジメンを決定するための方法についての情報を提供する。いくつかの実施形態は、(a)標的を含むサンプルをプローブと組み合わせることと、(b)プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することと

50

、(c)プローブの結合している標的の存在又は非存在に基づき治療レジメンを決定することと、を含む、治療レジメンを決定するための方法である。

【0178】

本明細書は、(a)標的を含むサンプルをプローブと組み合わせることと、(b)プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することと、(c)プローブの結合している標的の存在又は非存在に基づき被検製剤の有効性を決定することと、を含む、被検製剤の有効性を決定するための方法が更に開示される。

【0179】

本明細書では、(a)標的を含むサンプルをプローブと組み合わせることと、(b)プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することと、(c)プローブの結合している標的の存在又は非存在に基づき薬剤のレスポンダーを識別することと、を含む、薬剤のレスポンダーを特定するための方法を更に開示する。

10

【0180】

本明細書では、(a)標的を含むサンプルをプローブと組み合わせることと、(b)プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することと、(c)プローブの結合している標的の存在又は非存在に基づきキナーゼモジュレータを識別することと、を含む、キナーゼモジュレータを特定するための方法が更に開示される。

【0181】

本明細書では、(a)標的を含むサンプルをプローブと組み合わせることと、(b)プローブの結合している標的の存在又は非存在を検出することと、(c)プローブの結合している標的の存在又は非存在に基づき薬剤耐性を決定することと、を含む、薬剤耐性を決定するための方法が更に開示される。

20

【0182】

サンプル

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される方法、アッセイ、及びシステムは、標的を含むサンプルをプローブと接触させることを含む。本明細書で開示される任意の方法、アッセイ、及びシステムで使用される好適なサンプルは、限定するものではないが、全血サンプル、末梢血サンプル、リンパ液サンプル、組織サンプル、腫瘍生検サンプル、骨髄サンプル、又はその他の体液サンプルを含む。いくつかの実施形態では、サンプルは、全血サンプル、末梢血サンプル、リンパ液サンプル、組織サンプル、腫瘍生検サンプル、骨髄サンプル、又はその他の体液サンプルに由来する1種以上の細胞型、又はそれらの溶解物を含むサンプルである。体液の例としては、なすりつけ標本、痰、生検、分泌物、脳脊髄液、胆汁、血液、リンパ液、唾液、及び尿が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、提供される方法に使用するより前に、サンプルの細胞がサンプルのその他の成分から単離される。いくつかの実施形態では、提供される方法に使用するより前に、サンプルの特定の細胞型が、サンプルのその他の細胞型から単離される。例えば、いくつかの実施形態では、提供される方法に使用するより前に、血液サンプルの末梢血单核細胞(PBMC、例えば、リンパ球、単球及びマクロファージ)が、血液サンプルのその他の細胞型から単離される。例えば、いくつかの実施形態では、提供される方法に使用するより前に、サンプルのリンパ球(例えば、B細胞、T細胞又はNK細胞)が、サンプルのその他の細胞型から単離される。例えば、いくつかの実施形態では、提供される方法に使用するより前に、サンプルのB細胞が、サンプルのその他の細胞型から単離される。いくつかの実施形態では、提供される方法に使用するより前に、サンプルの細胞が可溶化される。例えば、いくつかの実施形態では、提供される方法に使用するより前に、癌細胞がサンプルの正常な細胞から単離される。

30

【0183】

本明細書で開示されるサンプルは、いずれも、集団としてアッセイされ得る、又は亜集団へと分類され得る複雑な細胞集団からなる。このような細胞及び無細胞サンプルは、遠心分離、水篩、密度勾配分離、アフェレーシス、親和性による選別、パニング、FACS、濾過、Hypaqueによる遠心分離などにより分離され得る。特定の細胞型に関し識

40

50

別されるマーカーに特異的な抗体を使用することにより、相対的に均質な細胞集団を得ることができる。あるいは、不均質な細胞集団が使用され得る。

【0184】

得られたサンプルは、直ちに使用でき、凍結でき、又は短期間適切な培養培地で維持できる。本発明の方法に従って使用するため1つ以上の細胞を単離するための方法は、当該技術分野で周知の標準法及びプロトコルに従って実施される。

【0185】

いくつかの実施形態では、サンプルは対象者から得られる。このような対象者は、ヒトとすることができ、又は乳牛、ニワトリ、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ又はヤギなどの家畜とすることができます。いくつかの実施形態では、本発明で使用される細胞は患者から採取される。動物（例えば、ヒト）由来のサンプルとしては、例えば、全血、汗、涙、唾液、耳漏（ear flow）、痰、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、膣分泌液、脳脊髄液、脳液、腹水、乳汁、呼吸器、消化器又は泌尿管生殖管からの液体の分泌、組織又は器官（例えば、肺）の洗浄液、又は乳房、肺、腸、肌、子宮頸部、前立腺、脾臓、心臓、肝臓及び胃などの器官から摘出された組織が挙げられる。10

【0186】

血液サンプルを得るために、当該技術分野において既知の任意の技術、例えば、注射器又はその他の真空式吸引デバイスを使用できる。サンプルは、場合により前処理でき、又は濃縮前に処理することができる。前処理工程の例としては、安定剤、防腐剤、定着液、溶解剤、希釈剤、薬剤、抗アポトーシス剤、抗凝固剤、抗血栓剤、磁性調節剤、緩衝剤、浸透圧調節剤、pH調節剤、及び／又は架橋剤などの試薬の添加が挙げられる。例えば、血液サンプルを得るとき、富化前に、抗凝固剤及び／又は安定剤などの防腐剤をサンプルに加えることができる。20

【0187】

血液サンプルなどのサンプルは、サンプルの得られた時点から1週間、6日間、5日間、4日間、3日間、2日間、1日、12時間、6時間、3時間、2時間、又は1時間以内に本明細書に開示されるいづれかの方法、アッセイ、及びシステム下で分析できる。

【0188】

いくつかの実施形態では、サンプルは、サンプル中の1種以上の細胞又は成分を選択的に可溶化する酵素又は化合物と組み合わせることができる。例えば、血液サンプルでは、血小板及び／又は脱核された赤血球細胞が選択的に可溶化されて、有核細胞富化サンプルが生成される。続いて、当該技術分野において既知の方法を使用して、サンプルから対象とする細胞を分離することができる。30

【0189】

対照者由来のサンプル（例えば、血液サンプル）を得るとき、量は、選別される対象者の体格及び状態に応じ変更することができる。いくつかの実施形態では、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1mLまでのサンプルが得られる。いくつかの実施形態では、1～50、2～40、3～30、又は4～20mLのサンプルが得られる。いくつかの実施形態では、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100mL超のサンプルが得られる。40

【0190】

疾患及び徵候

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるサンプルは、いざれも、疾患又は徵候に罹患している対象者から得られる。いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるサンプルは、いざれも、TECファミリーキナーゼにより介在される疾患又は徵候に罹患している対象者から得られる。いくつかの実施形態では、サンプルは、自己免疫疾患、炎症性障害、又は癌などの増殖性疾患に罹患している対象者に由来する。いくつかの実施形態では、癌は固体腫瘍である。

【0191】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、サンプルは癌に罹患している対象者由来のものである。癌としては、肉腫、細胞腫、及び血液系の癌が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、血液癌は白血病、リンパ腫、又は骨髄腫である。

【0192】

いくつかの実施形態では、癌は肉腫である。肉腫は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管、又はその他の結合組織若しくは支持組織の癌である。肉腫としては、骨癌、線維肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、両側性前庭神経鞘腫、骨肉腫、軟部肉腫（例えば、胞状軟部肉腫、血管肉腫、葉状囊胞性肉腫（cystosarcoma phyllodes）、皮膚線維肉腫、類腱腫、類上皮肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、血管外皮腫、血管肉腫、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、リンパ肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、及び滑膜肉腫）が挙げられるがこれに限定されない。

10

【0193】

いくつかの実施形態では、癌は細胞腫である。細胞腫は、上皮細胞から発生する癌である。上皮細胞は、体表を覆い、ホルモンを产生し、腺を形成する細胞である。非限定例として、細胞腫としては、乳癌、膵癌、肺癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、腎癌、膀胱癌、胃癌、前立腺癌、肝癌、卵巣癌、脳癌、腔癌、外陰癌、子宮癌、口腔癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、皮膚癌、輸卵管の癌、頭頸部癌、消化管間葉性癌、腺癌、皮膚黒色腫又は眼球内黒色腫、肛門領域の癌、小腸の癌、内分泌腺系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、尿道の癌、腎孟の癌、尿管の癌、子宮内膜の癌、頸部の癌、脳下垂体の癌、中枢神経系（CNS）の腫瘍、原発性CNSリンパ腫、脳幹神経膠腫、及び脊髄の軸の腫瘍が挙げられる。いくつかの例では、癌は、基底細胞癌、扁平上皮癌、黒色腫、非黒色腫、又は光線性（日光性）角化症などの皮膚癌である。いくつかの実施形態では、癌は膵臓、結腸癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、甲状腺癌、膀胱癌、又は近位若しくは遠位胆管癌である。いくつかの実施形態では、癌は乳癌である。

20

【0194】

いくつかの例では、癌は肺癌である。肺癌は、気管から分岐して肺（気管支）又は肺の小型空気囊（肺胞）に分布する気道で生じ得る。肺癌としては、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌、及び中皮腫が挙げられる。NSCLCの例としては、扁平上皮細胞癌、腺癌、及び大細胞癌が挙げられる。いくつかの実施形態では、中皮腫は、肺及び胸腔（胸膜）内膜、又は腹部（腹膜）内膜の癌性腫瘍である。いくつかの例では、癌は神経膠芽腫などの脳癌である。

30

【0195】

いくつかの実施形態では、癌は中枢神経系（CNS）腫瘍である。CNS腫瘍は、神経膠腫又は非神経膠腫として分類することができる。いくつかの例では、神経膠腫は、悪性神経膠腫、高悪性度神経膠腫、びまん性内在性橋膠腫である。神経膠腫の例としては、星状細胞腫、乏突起神経膠腫（又は乏突起神経膠腫と星状細胞腫の要素の混在）、及び上衣腫が挙げられる。星状細胞腫としては、低悪性度星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形神経膠芽腫、毛様細胞性星状細胞腫、多形黄色星状膠細胞腫、及び上衣下巨細胞性星状細胞腫が挙げられるがこれに限定されない。乏突起神経膠腫としては、低悪性度乏突起神経膠腫（又は乏突起星細胞腫）及び退形成乏突起膠腫が挙げられる。非神経膠腫としては、髓膜腫、下垂体腺腫、原発性CNSリンパ腫、及び髓芽腫が挙げられる。いくつかの例では、癌は髓膜腫である。

40

【0196】

いくつかの例では、癌は白血病である。いくつかの例では、白血病は、急性リンパ球性白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、前駆Bリンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、急性前骨髄球性白血病（APL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、又は急性単球性白血病（AMoL）である。追加の種類の白血病としては、有毛細胞白血病、慢性骨髄単球性白血病、及び若年性骨髄単球性白血病が挙げられるがこれに限定されない。

50

【0197】

いくつかの例では、癌はリンパ腫である。いくつかの例では、リンパ腫はホジキンリンパ腫である。他の例では、リンパ腫は非ホジキンリンパ腫（NHL）である。いくつかの実施形態では、リンパ腫はB細胞NHLである。B細胞NHLの非限定的なリストには、バーキットリンパ腫（例えば、地域性バーキットリンパ腫及び散発性バーキットリンパ腫）、皮膚B細胞リンパ腫、皮膚辺縁帯リンパ腫（MZL）、びまん性大細胞型リンパ腫（DLBCL）、びまん性混合型小細胞及び大細胞型リンパ腫、びまん性小切れ込み核細胞、びまん性小リンパ球性リンパ腫、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性小切れ込み核細胞（グレード1）、濾胞性混合型小切れ込み核細胞及び大細胞（グレード2）、濾胞性大細胞（グレード3）、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、血管内リンパ腫、大細胞型免疫芽球性リンパ腫、大細胞型リンパ腫（LCL）、リンパ芽球性リンパ腫、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病（CLL）／小リンパ球性リンパ腫（SLL）、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫・粘膜内リンパ組織（MALT）リンパ腫、縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾臓周辺帯B細胞リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性（lymphoplasmocytic）リンパ腫、有毛細胞白血病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、前駆体B細胞リンパ芽球性リンパ腫、原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫、及びAIDS関連リンパ腫が含まれる。更なる非ホジキンリンパ腫が本発明の範囲内で想到され、当業者には明らかである。

10

20

30

40

【0198】

いくつかの実施形態では、癌はT細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、T細胞リンパ腫は、節外性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）、セザリー症候群、菌状息肉症、未分化大細胞リンパ腫、又は血管免疫芽球性T細胞リンパ腫である。

【0199】

いくつかの実施形態では、対象者は、自己免疫疾患、例えば、炎症性腸疾患、関節炎、狼瘡、関節リウマチ、乾癬性関節炎、変形性関節症、スチル病、若年性関節炎、糖尿病、重症筋無力症、橋本病、Ord's甲状腺炎、グレーブス病シェーグレン症候群、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、急性散在性脳脊髄炎、アジソン病、眼球クローヌス・ミオクローヌス運動失調、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、自己免疫性肝炎、セリアック病、グッドパスチャー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、視神經炎、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、ライター症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎、温式自己免疫性溶血性貧血、ウェゲナー肉芽腫症、乾癬、汎発性脱毛症、ベーチェット病、慢性疲労、自律神経障害、子宮内膜症、間質性膀胱炎、神経性筋強直症、強皮症、又は外陰部痛に罹患している。

【0200】

他の実施形態では、対象者は、異種免疫状態又は疾患、例えば、移植片対宿主病、移植、輸血、即時型過敏反応、過敏症、I型過敏症、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、又はアトピー性皮膚炎に罹患している。

【0201】

いくつかの実施形態では、対象者は、炎症性疾患、例えば、ぜんそく、虫垂炎、眼瞼炎、細気管支炎、気管支炎、滑液包炎、子宮頸管炎、胆管炎、胆囊炎、大腸炎、結膜炎、膀胱炎、涙腺炎、皮膚炎、皮膚筋炎、脳炎、心内膜炎、子宮内膜炎、腸炎、小腸結腸炎、上顎炎、精巣上体炎、筋膜炎、結合織炎、胃炎、胃腸炎、肝炎、化膿性汗腺炎、喉頭炎、乳腺炎、髄膜炎、脊髓炎、心筋炎、筋炎、腎炎、卵巣炎、精巣炎、骨炎、耳炎、脾炎、耳下腺炎、心膜炎、腹膜炎、咽頭炎、胸膜炎、静脈炎、肺炎、肺炎、直腸炎、前立腺炎、腎盂腎炎、鼻炎、卵管炎、副鼻腔炎、口内炎、滑膜炎、腱炎、扁桃炎、ブドウ膜炎、膣炎、血管炎、又は外陰炎を有する。

【0202】

50

更なる実施形態では、対象者は、血栓塞栓性疾患、例えば、心筋梗塞、狭心症、血管形成後再閉塞、血管形成後再狭窄、大動脈冠状動脈バイパス後再閉塞、大動脈冠状動脈バイパス後再狭窄、脳卒中、一過性虚血、末梢動脈閉塞性疾患、肺塞栓症、又は深部静脈血栓症に罹患している。

【0203】

いくつかの実施形態では、対象者は、疾患又は病状を治療するための1種以上の治療剤を投与され、又は投与を受けている。いくつかの実施形態では、対象者は、疾患又は病状を治療するためのBTK阻害剤を投与され、又は投与を受けている。いくつかの実施形態では、対象者は、疾患又は病状を治療するためのBTK阻害剤に加えて1種以上の治療剤が投与され、又は投与を受けている。

10

【0204】

いくつかの実施形態では、対象者は、癌を治療するための1種以上の化学療法剤が投与され、又は投与を受けている。いくつかの実施形態では、対象者は、癌を治療するためのBTK阻害剤を投与され、又は投与を受けている。いくつかの実施形態では、対象者は、癌を治療するためのBTK阻害剤に加え、1種以上の化学療法剤が投与され、又は投与を受けている。いくつかの実施形態では、BTK阻害剤はイブルチニブである。

【0205】

方法、アッセイ及びシステムのその他の特徴

本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムのその他の特徴が本明細書において開示される。本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムの有効性は、現在のタンパク質占有率に関する方法、アッセイ、及びシステム（例えば、ゲル系のアッセイ）にほぼ匹敵する。いくつかの実施形態では、方法、アッセイ、及びシステムの有効性は、現在のタンパク質占有率法よりも良好である。いくつかの例では、方法、アッセイ、及びシステムは、現在のタンパク質占有率法と比較した場合に改良されている特異性を提供する。例えば、プローブにより標識した陰性対照Junkat溶解物のシグナルが、試験した全ての溶解物のバックグラウンド程度であったとき、アッセイは、良好な特異性を提供する。いくつかの例では、特異性は、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、又は99%である。

20

【0206】

いくつかの例では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、改良されている感度を提供する。いくつかの例では、改良されている感度は、必要とされるサンプル量から判定できる。いくつかの例では、方法、アッセイ、及びシステムにより、従来の方法と比較して、可溶化液の使用量を、少なくとも約1/2、少なくとも約1/3、少なくとも約1/4、少なくとも約1/5、少なくとも約1/6、少なくとも約1/7、少なくとも約1/8、少なくとも約1/9、又は少なくとも約1/10に減少させることができる。いくつかの実施形態では、従来の方法と比較して、約1/2～1/10、約1/3～1/7、約1/3～1/6の可溶化液が使用される。例えば、本アッセイの改良された感度により、可溶化液の使用をウェスタンプロット／ELISAと比較して1/3～1/5として、貴重なサンプルを保存することができる。

30

【0207】

本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは直接的なものである。本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、従来の方法（例えば、ウェスタンプロット）よりも迅速である。本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、約10時間未満、約8時間未満、約7時間未満、約6時間未満、約5時間未満、約4時間未満で完了できる。好ましくは、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、約2～7時間未満、約3～6時間未満、約3～5時間未満で完了できる。

40

【0208】

本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、スループットの向上のためにも提供される。いくつかの実施形態では、スループットは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくと

50

も約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%増加される。

【0209】

本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、より均一な試験条件の提供のためにも提供される。例えば、プレートベースのアッセイにおいて、単一のゲルにおけるよりもたくさんのサンプルに対しアッセイをなすことができる。したがって、单一プレート上のサンプルは、複数のゲル上のサンプルよりも一様な試験条件を有することになる。更に、複数プレートベースのアッセイの均一性は、複数ゲルの均一性よりも良好である。いくつかの例では、試験条件の均一性は、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも約90%向上する。10

【0210】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムにより、従来の方法（例えば、ゲルベースのフォーマット）よりもプローブの使用量を減少させることができる。いくつかの実施形態では、従来の方法（例えば、ゲルベースのフォーマット）と比較して、プローブの使用量を少なくとも約1/10、1/20、1/30、1/40、1/50、1/60、1/70未満に減少させることができる。例えば、本アッセイでは、ゲルベースのフォーマットと比較してプローブの必要量が1/40となることから、試薬が節約される。20

【0211】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは大型のシグナルウインドウを提供する。一部の実施形態では、大型のシグナルウインドウは、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、200:1、300:1、400:1、500:1、600:1、700:1、800:1、900:1、1000:1でウェル当たり9μgの溶解物を含む。20

【0212】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは良好な再現性を提供する。いくつかの実施形態では、再現性は、約10% CV未満、約8% CV未満、約6% CV未満、約5% CV未満、約4% CV未満、約3% CV未満である。好ましくは、再現性は約4~6% CV未満である。30

【0213】

本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムを最適化するための手法及び提案としては、セクターでのプレートのイメージング、セクターへの1回の通電、及びサンプル中への気泡の混入の回避、抗体の検出及び緩衝液の読み取りが挙げられるがこれに限定されない。本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムを最適化するための更なる方法は、暗所での抗体ストックの検出を維持することを含む。しかしながら、希釈液を遮光する必要はない。更に、約25μL程度の少量を加えるときには、ウェル底部の隅に加える。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、ブロッキング、サンプルのインキュベート、インキュベートした抗体の検出中、プレートを振盪することを含む。最適化するためには、アッセイに洗浄緩衝液又は読み取り緩衝液を長時間残したままにしてはならない。しかしながら、追加の時間が必要とされる場合には、サンプル又は検出抗体は残したままにする。好ましくは、サンプルの取り扱いにはポリプロビレンプレート及びチューブが使用される。好ましくは、サンプル取り扱いに関してはポリスチレンは回避すべきである。いくつかの実施形態では、プローブと接触させるより前に、サンプルをボルテックスし、及び/又は遠心分離することができる。サンプルのボルテックス及び/又は遠心分離により、サンプル中の何らかの残渣を確実に除去できる。いくつかの例では、プレートは4℃で一晩ブロッキングできる。いくつかの例では、プレートは室温で1時間ブロッキングできる。一晩ブロッキングする場合、プレートに対しアッセイを行う前に、プレートを室温に平衡化させる。40

【0214】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、プレートの一部を使用することを含む。いくつかの例では、プレートの一部を使用するための指示書が提供され得る。いくつかの例では、本明細書で開示される方法、アッセイ、及びシステムは、プレートの包装を開封する前に、プレートを室温へと平衡化させることを含む。S I 2 4 0 0 M S D S E C T O R I M A G E R に関しては、M S D プレートは 2 4 セクターに分割する ($2 \times 2 = 4$ ウェル / セクター - 図 2 0 を参照されたい)。セクターには一度だけ通電でき、プレートの一部を使用するときには、サンプルはセクターに割り当てる必要がある。いくつかの例では、全ての試薬の用量は、使用するプレート部分をもとに調整される。いくつかの例では、使用しないセクターはプレートシールで覆い、アッセイ工程中に乾燥を維持する必要がある。いくつかの例では、プレートシールはプレートの読み取り前に外す必要がある。

10

【実施例】

【0 2 1 5】

実施例 1 . 抗タンパク質抗体コートプレートとストレプトアビジンコートプレートのアッセイフォーマットの比較

既存のゲルベースの B T K 占有率アッセイを、プレートベースの電気化学発光アッセイに変更して、アッセイのスループットを増加させることを試験の目的とした。アッセイの目的は、以降「薬剤」又はイブルチニブとして参考する共有結合阻害剤(イブルチニブ)の結合していない B T K の相対量を定量することである。この薬剤は B T K の活性部位に結合し、システイン残基によりジスルフィド結合を形成する。以降「プローブ」として参考とする化合物 I - 5 は、長鎖リンカーによりビオチンに連結されているイブルチニブからなる。ゲル系アッセイにおいて、プローブは蛍光レポーターにより標識される。プローブにより標識されたサンプルを標識することで、製剤により占有されていない B T K を検出できる。2つの有望なアッセイフォーマットを図 1 1 に示す。

20

【0 2 1 6】

実験 1

本実験では、感度、特異性、レンジに関しアッセイフォーマットを試験し、最も好適な抗 B T K 抗体を決定した。

【0 2 1 7】

サンプル

30

陽性対照 : D O H H 2 細胞溶解物 (1 m g / m L) のアリコートを 1 μ M イブルチニブで阻害し、次にプローブ (1 μ M) で標識した。

【0 2 1 8】

陰性対照 : プローブ (1 μ M) により標識した未処理 D O H H 2 及び J u r k a t 細胞溶解物 (1 m g / m L) と、未処理 D O H H 2 細胞溶解物

【0 2 1 9】

使用した材料 :

標準ストレプトアビジンプレート (5 パック) カタログ番号 L 1 5 S A - 2 ; 読み取り緩衝液 T (5 0 m L) 、カタログ番号 R 9 2 T C - 3 ; S U L F O - T A G ヤギ抗マウス (5 0 μ g) 、カタログ番号 R 3 2 A C - 5 ; S U L F O - T A G ヤギ抗ウサギ (5 0 μ g) 、カタログ番号 R 3 2 A B - 5 ; S U L F O - T A G ストレプトアビジン (5 0 u g) 、カタログ番号 R 3 2 A D - 5 ; M S D 標準プレート、カタログ番号 L 1 5 X A - 3 ; M S D B l o c k e r A 、カタログ番号 R 9 3 A A - 2 ; プロテアーゼ阻害剤カクテル (例えは、T h e r m o / P i e r c e H a l t (商標) プロテアーゼ阻害剤カクテル E D T A 不含、カタログ番号 8 7 7 8 5 、又は R o c h e C o m p l e t e M i n i P r o t e a s e i n h i b i t o r t a b l e t 、カタログ番号 1 8 3 6 1 7 0) ; B T K 発現細胞株 (D O H H 2) 由来の陽性対照可溶化液 ; 陰性対照可溶化液 (J u r k a t) ; イブルチニブ (P C I) ; プローブ化合物 I - 5 (ビオチン化プローブ)

40

【0 2 2 0】

B T K 抗体 :

50

次の抗体を試験した：

【0221】

【表2】

	種	カタログ番号	供給元	緩衝液	濃度
a-BTK	マウス	611116	BD	BSA、グリセロール、アジド	250 μg/mL
a-BTK	マウス	611117	BD	BSA、グリセロール、アジド	250 μg/mL
a-BTK	ウサギ	SAB4502936	Sigma	不明	1mg/mL

【0222】

10

溶液：

プロッキング溶液：3% (w/v) MSD Blocker A / 1x Tris 洗浄緩衝液：3g Blocker A + 100mL 1x Tris 洗浄緩衝液4で最大14日間保管する。PBS-Tでプロッキング溶液も調製できる。

洗浄緩衝液：1x MSD Tris 洗浄緩衝液：50mL 10x Tris 洗浄緩衝液 + 450mL H2O (150mM NaCl / 50mM Tris-HCl (pH 7.5) / 0.02% Tween-20) 洗浄緩衝液としてはPBS-Tも使用できる。

捕捉抗体希釈緩衝液：PBS (Ca2+及びMg2+不含有)

検出抗体希釈緩衝液：1% MSD Blocker A / 1x Tris 洗浄緩衝液 : 10mL プロッキング溶液 + 20mL 1x Tris 洗浄緩衝液又は10mL プロッキング溶液 + 20mL PBS-T

読み取り緩衝液：1x MSD 読み取り緩衝液 T : プレート当たり5mL 4x 読み取り緩衝液 T + 15mL H2O ; 2x MSD 読み取り緩衝液 T : プレート当たり10mL 4x 読み取り緩衝液 T + 10mL H2O

細胞溶解物：複数回凍結融解させた細胞ペレットをPBS+プロテアーゼ阻害剤に再懸濁することにより溶解物を調製した。PCI及びプローブ標識反応をPBS-T + 1% BSA (アッセイ緩衝液)で実施した。溶解物をアッセイ緩衝液+プロテアーゼ阻害剤で希釈した。

【0223】

30

フォーマット1：ストレプトアビジン検出

図11Aは、ストレプトアビジン検出アッセイ(例えば、アッセイフォーマット1)の概略図である。簡潔に述べると、方法は、標的(例えば、BTKキナーゼ)を含む、薬剤処理されたサンプルを、抗BTK抗体コートプレートと接触させることを含み、BTKキナーゼは抗BTK抗体により捕捉される。抗BTK抗体により捕捉されたBTKキナーゼは、薬剤により占有されたBTKキナーゼと、未占有のBTKキナーゼとを含む。捕捉されたBTKキナーゼをプローブと接触させる。プローブは、未占有のBTKキナーゼに結合する製剤を含む。この実施例では、プローブは、薬剤により占有されたBTKキナーゼに結合できない。プローブを、未占有のBTKキナーゼと結合させて、プローブの結合しているBTKキナーゼを検出する。この実施例では、プローブは、プローブの結合しているBTKキナーゼを検出可能な標識を含む。プローブの結合しているBTKキナーゼは、標識化ビーズ(例えば、SULFO-TAGストレプトアビジン)を加えることにより検出する。プローブの結合しているキナーゼの量は、電気化学発光により定量する。プローブの結合しているキナーゼの定量により、BTKキナーゼの占有率及び薬剤の有効性を決定できる。より詳細なプロトコルが本明細書で開示される。

40

【0224】

プロトコル - アッセイフォーマット1

1. MSD標準プレートを、各ウェル30μLの抗BTK捕捉抗体溶液(PBSで2μg/mLに希釈)でコートする。抗体溶液をウェル底部の隅に配置した後、プレートを軽く叩き、各ウェルの底部全体に確実に均一に分散させる。粘着性プレートシールでシール

50

し、4で一晩インキュベートする。プレートは振盪させない。

2. プレートを軽く叩いて中身を除去し、ウェル当たり $150\text{ }\mu\text{L}$ のブロッキング溶液(3% [w/v] Blocker A)を加える。シールし、室温で1時間以上振盪しながらインキュベートする。

3. 各ウェル $150\text{ }\mu\text{L}$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを1回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

4. プレートのレイアウトに従い、 $30\text{ }\mu\text{L}$ の溶解物を加える。溶解物の溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし、室温で $300\sim500\text{ rpm}$ で1時間振盪させる。

5. 各ウェル $150\text{ }\mu\text{L}$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。10

6. プレートのレイアウトに従い、各ウェルに、1% (w/v) Blocker Aで $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したSULFO-TAGストレプトアビシンを $25\text{ }\mu\text{L}$ 加える。プレートをシールし、室温で $300\sim500\text{ rpm}$ で30~60分間振盪させる。

7. ウェル当たり $150\text{ }\mu\text{L}$ 以上の $1\times$ Tris洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

8. 各ウェルに $150\text{ }\mu\text{L}$ の $1\times$ 読み取り緩衝液T(H₂Oに希釈)を加える。気泡の混入は避ける・読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピッティングを用いる。プレートをS12400で読み取る。20

【0225】

プレートのレイアウト及び結果を図12に示す。

全3種の被検捕捉抗体に関し、陽性対照(DOHH2+プローブ)のシグナルを溶解物の濃度により定量する。抗BTK捕捉抗体BD611116及びBD611117を使用したときに最も高いシグナルが得られた。抗BTK捕捉抗体BD611116及びBD611117は同等であった。

【0226】

抗BTK捕捉抗体BD611116を使用したところ、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 陽性対照可溶化液では、陽性対照(DOHH2+プローブ)の最大シグナル:バックグラウンド比125:1が得られた。

【0227】

試験した全てのDOHH2(プローブ非添加)溶解物濃度でバックグラウンドが低かったことから、溶解物タンパク質に対するSULFO-TAGストレプトアビシンの非特異的な結合はなかったことが示唆される。30

【0228】

抗BTK捕捉抗体のBD611116(図13Aを参照されたい)及びBD611117(図13Bを参照されたい)を使用したときには、陽性対照(DOHH2+プローブ)溶解物のシグナルは、陰性対照(DOHH2+PCI+プローブ)及び(Jurkat+プローブ)と区別することができるが、Sigma抗BTKを捕捉抗体として使用したときには区別できないことから、Sigma抗BTKはプローブにより標識した細胞溶解物のその他のタンパク質に結合し得ることが示唆される。陽性対照:陰性対照の具体的な比率を表1に示す。40

【0229】

【表3】

表1. 陽性対照：陰性対照の具体的な比率

割合	DOHH2+プローブ:プローブ+PCI			割合	DOHH2+プローブ:プローブ+PCI		
	捕捉抗体				捕捉抗体		
溶解物 ug/ml	BD11116	BD1117	Sigma	溶解物 ug/ml	BD11116	BD1117	Sigma
1000	2. 45	2. 53	1. 21	1000	2. 58	2. 73	1. 08
500	2. 61	2. 36	1. 04	500	2. 97	2. 57	1. 04
250	3. 04	2. 55	0. 97	250	3. 54	2. 94	0. 97
125	3. 48	2. 96	1. 06	125	4. 19	3. 58	1. 04
62. 5	3. 76	2. 83	1. 02	62. 5	4. 39	3. 42	1. 01
31. 25	3. 25	2. 52	1. 05	31. 25	3. 44	2. 78	1. 05
15. 63	2. 60	2. 22	0. 94	15. 63	2. 87	2. 44	1. 00
0	0. 96	0. 97	1. 06	0	0. 96	1. 13	0. 96

【0230】

以降の実験ではSigma抗BTK抗体は使用しなかった。

【0231】

フォーマット2：ストレプトアビジン捕捉

図11B及び14Aは、ストレプトアビジンコートしたプレートアッセイ（例えば、アッセイフォーマット2）の概略図を示す。簡潔に述べると、方法は、MSD標準ストレプトアビジンプレートをプローブでブロッキングすること、又はプローブの結合しているプレートを提供することを含む。この実施例では、プローブは、標識及び製剤を含み、この標識（例えば、ビオチン）がストレプトアビジンにより捕捉され、プローブがプレートに付加される。標的（例えば、BTK）を含むサンプルをプレートに適用する。標的は製剤（例えば、BTK阻害剤などの薬剤）を介しプローブに結合し又は付加され、プローブの結合している化合物を形成する。プローブの結合している標的は、抗標的（例えば、抗BTK）抗体などの一次検出剤により検出できる。一次検出試薬を標識し、続いて直接検出できる。図11Bに示す通り、一次検出試薬をSULFO-TAGと複合させて、標識付加一次検出試薬を生成する。しかしながら、図14Aに示す通り、一次検出試薬は未標識としてもよい。方法には、図14Aに示す通り、二次検出剤（例えば、抗種抗体）の付加を更に含ませることができる。二次検出剤は標識し（例えば、SULFO-TAG抗種抗体）、続いて検出できる。SULFO標識付加検出剤は、プローブの結合しているキナーゼの定量を可能にする電気化学発光により検出できる。プローブの結合しているキナーゼの定量により、BTKキナーゼの占有率及び薬剤の有効性を決定できる。より詳細なプロトコルが本明細書で開示される。

10

20

30

40

50

【0232】

プロトコル・アッセイフォーマット2

1. MSD標準ストレプトアビジンプレートの各ウェルに、150 μLのブロッキング溶液(3% [w/v] Blocker A)を加える。シールし、室温で1時間以上振盪しながらインキュベートするか、又は4℃で一晩ブロッキングする。

2. 各ウェル150 μL以上の洗浄緩衝液を用いプレートを1回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

3. プレートのレイアウトに従い、30 μLの溶解物を加える。溶解物の溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし、室温で300~500 rpmで1時間振盪させる。

4. 各ウェル150 μL以上の洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

5. プレートのレイアウトに従い、各ウェルに、1% (w/v) Blocker Aで0.5 μg/mLに希釈した抗BTK抗体を25 μL加える。シールし室温で1時間振盪する。

6. 各ウェル 150 μL 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。プレートのレイアウトに従い、各ウェルに、1% (w/v) Blocker Aで1 μg/mL に希釈したSULFO-TAG複合抗種抗体を25 μL 加える。プレートをシールし室温で1時間振盪する。

7. ウェル当たり 150 μL 以上の1×Trips 洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

8. 各ウェルに 150 μL の 1×読み取り緩衝液 T (H₂O に希釈) を加える。気泡の混入は避ける - 読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピベッティングを用いる。プレートを SIZ2400 で読み取る。

【0233】

10

結果

プレートのレイアウト及び結果を図 14B ~ C に示す。

【0234】

抗 BTK の BD611116 及び BD611117 を検出抗体として使用したとき、陽性対照 (DOHH2 + プローブ) のシグナルは、62 μg/mL 溶解物までは溶解物濃度により定量され、これ以上の溶解物濃度では、過剰に存在するプローブが、プローブにより標識した BTK と、ストレプトアビシン表面に関し競合することに起因し、フック効果が生じている可能性がある。サンプル中最終プローブ濃度を > 62 nM としたときにフックが生じる。

【0235】

20

抗 BTK 検出抗体 BD611116 を使用したところ、0.06 μg/μL 陽性対照可溶化液では、陽性対照 (DOHH2 + プローブ) の最大シグナル : バックグラウンド比 240 : 1 が得られた。

【0236】

抗 BTK の BD611116 及び BD611117 を検出抗体として使用したとき、試験した全ての DOHH2 (プローブ非添加) 溶解物濃度でバックグラウンドは低かったことから、溶解物のタンパク質に対するこれらの抗体の非特異的結合はなかったことが示唆される。対照的に、Sigma 抗 BTK 抗体では、試験した全ての条件で高いバックグラウンドシグナルが生じた。

【0237】

30

抗 BTK 検出抗体の BD611116 (図 15A を参照されたい) 及び BD611117 (図 15B を参照されたい) を使用したときには、陽性対照 (DOHH2 + プローブ) 溶解物のシグナルは、陰性対照 (DOHH2 + PCl + プローブ) 及び (Jurkat + プローブ) と区別することができるが、Sigma 抗 BTK を検出抗体として使用したときには区別できないことから、Sigma 抗 BTK はプローブにより標識した細胞溶解物のその他のタンパク質に結合し得ることが示唆される。陽性対照 : 陰性対照の具体的な比率を表 2 に示す。

【0238】

40

【表4】

表 2. 陽性対照 : 陰性対照の具体的な比率

溶解物 ug/ml	DOHH2+プローブ: プローブ + PCl 検出抗体			溶解物 ug/ml	DOHH2+プローブ: Jurkat+プローブ 検出抗体		
	BD11116	BD11117	Sigma		BD11116	BD11117	Sigma
62.5	21.8	21.2	1.0	62.5	28.5	31.2	1.0
31.3	31.5	25.7	1.0	31.3	47.1	33.8	1.0
15.6	19.5	12.0	1.0	15.6	24.7	14.6	1.0
0.0	0.9	0.9	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0

【0239】

以降の実験では Sigma 抗 BTK 抗体は使用しなかった。

50

【0240】

陰性対照のシグナルは $1 \mu M$ プローブのみのウェルからのシグナルと同程度である。

【0241】

抗 BTK 検出抗体 BD611116 及び BD611117 は同程度であった。

【0242】

図16は、アッセイフォーマット1(ストレプトアビジン検出法)及びアッセイフォーマット2(ストレプトアビジン捕捉法)の比較を示す。図16に示す通り、アッセイフォーマット2では、アッセイフォーマットと比べ良好な感度及び良好な特異性が提供される。

【0243】

実験2 - プローブ濃度の最適化

10

更なる最適化にはアッセイフォーマット2(例えば、ストレプトアビジンコートしたプレートによるストレプトアビジン捕捉法 - 図14Aを参照されたい)を使用した。プローブ濃度 $> 62 nM$ 及び溶解物濃度 $> 62 \mu g / mL$ でフック効果が観察されたことから、チェッカーボード実験を実施して、フック効果が過剰なプローブに関係するのか又は過剰なタンパク質濃度に関係するのかを判定した。プレートの結合能が飽和すれば、複合体を形成していない過剰なプローブは、ストレプトアビジン表面に対する結合に関し、BTK結合プローブと競合し得る。

【0244】

目的 :

20

必要とされる最適プローブ濃度を決定する

様々なプローブ : 溶解物比を比較する

【0245】

サンプル

陽性対照 : アッセイ緩衝液を用い $1 mg / mL$ DOHH2 溶解物を調製する。

陰性対照 : $1 \mu M$ PClにより $1 mg / mL$ DOHH2 溶解物のアリコートを処理し、BTKに PClが最大限に結合するよう過剰量の PClを含有させる。

【0246】

DOHH2のみ、及びDOHH2 + PCl溶解物を、アッセイ緩衝液により 100、50、25、12.5、6.25 及び 3.12 $\mu g / mL$ に希釈する。

30

【0247】

プローブを 10000、2500、625、156、39、9 及び $2 nM$ ($100 \times$ 濃度) に希釈する。

【0248】

96ウェルポリプロピレンプレートにおいて、 $1 \mu L$ $100 \times$ プローブを $100 \mu L$ 希釈溶解物に加え、インキュベートする。

【0249】

プロトコル

1. MSD 標準ストレプトアビジンプレートを、ウェル当たり $150 \mu L$ の 3% Blocker A により室温で 1 時間又は 4 で一晩ブロックングする。

40

2. 各ウェル $150 \mu L$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 1 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

3. プレートのレイアウトに従い、 $50 \mu L$ の溶解物を加える。溶解物の溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし、室温で $300 \sim 500 rpm$ で 1 時間振盪させる。

4. 各ウェル $150 \mu L$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

5. 各ウェルに、 $1\% (w/v)$ Blocker A で $0.5 \mu g / mL$ に希釈した抗 BTK 抗体 BD611117 を $25 \mu L$ 加える。シールし室温で 1 時間振盪する。

6. 各ウェル $150 \mu L$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 3 回洗浄する。プレートを

50

軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

7. 各ウェルに、1% (w/v) Blocker Aで1 μg/mLに希釈したSULFO-TAG複合抗マウス抗体を25 μL加える。プレートをシールし室温で1時間振盪する。

8. ウェル当たり150 μL以上の1×Tris洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

9. 各ウェルに150 μLの2×読み取り緩衝液T (H₂Oに希釈)を加える。気泡の混入は避ける - 読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピベッティングを用いる。プレートをSIZ2400で読み取る。

【0250】

10

結果：

最適化実験の結果を図17に示す。

【0251】

プローブ濃度25 nMまでの陰性対照 (DOHH2 + 1 μM PCl) サンプルに関しては、バックグラウンドは低い。

【0252】

プローブ濃度25 nMを超えるとバックグラウンドは上昇する。この現象に関する1つの可能性のある説明には、プローブのみのときにゲルベースアッセイ及び/又はシグナル寄与で見られる通り、溶解物中の、同様にプローブにより高プローブ濃度で標識されたその他のタンパク質に由来するシグナルが寄与するというものがある。

20

【0253】

過剰なプローブが存在するとき、陽性対照 (未処理DOHH2) に関し、プローブ濃度を25 nMまで増加させるに伴いシグナルは増加し、この濃度を超えると、シグナルは減少するか又はプラトーに達する。

【0254】

最終プローブ濃度は25 nMが推奨される。

【0255】

30

実験3：薬剤滴定による阻害

目的：一連のPCl滴定と、それに続いて最終プローブ濃度25 nMでプローブを用いることによる溶解物の標識により、阻害実験を実施する。

【0256】

サンプル：

陽性対照：アッセイ緩衝液中1 mg/mL DOHH2溶解物

陰性対照：アッセイ緩衝液中1 mg/mL Jurkat溶解物

溶解物を、アッセイ緩衝液で300、150、及び75 μg/mLに希釈する。

【0257】

40

PClの希釈系列を調製する。100×PCl濃度は、100、25、6.25、1.56、0.39、0.09及び0.02 μMである。

【0258】

ポリプロピレンプレート中で、DOHH2溶解物をPClにより処理する（例えば、100 μL溶解物 + 1 μL 100×PCl溶液）。

【0259】

PCl阻害剤にプローブを加えて、全てのサンプルを最終濃度25 nM (2 μL 1.25 μMプローブストック + 100 μLサンプル) とし、振盪しながらインキュベートする。

【0260】

40

プロトコル：

1. MSD標準ストレプトアビジンプレートを、ウェル当たり150 μLの3% Blocker Aにより室温で1時間又は4度で一晩ブロッキングする。

2. 各ウェル150 μL以上の洗浄緩衝液を用いプレートを1回洗浄する。プレートを

50

軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

3. プレートのレイアウトに従い、 $30\text{ }\mu\text{L}$ の溶解物を加える。溶解物の溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし室温で1時間振盪する。

4. 各ウェル $150\text{ }\mu\text{L}$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

5. 各ウェルに、1% (w/v) Blocker Aで $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ に希釈した抗BTK抗体BD611117を $25\text{ }\mu\text{L}$ 加える。シールし室温で1時間振盪する。

6. 各ウェル $150\text{ }\mu\text{L}$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。各ウェルに、1% (w/v) Blocker Aで $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ に希釈したSULFO-TAG複合抗マウス抗体を $25\text{ }\mu\text{L}$ 加える。プレートをシールし室温で1時間振盪する。
10

7. ウェル当たり $150\text{ }\mu\text{L}$ 以上の $1\times$ Tris洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

8. ウェル当たり $150\text{ }\mu\text{L}$ の $1\times$ 読み取り緩衝液T (H₂Oに希釈) を加える。気泡の混入は避ける - 読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピペッティングを用いる。プレートをS12400で読み取る。

【0261】

結果：

結果を図18～19に示す。

【0262】

プローブで標識した陰性対照Jurrkat溶解物のシグナルは、試験した全ての条件に関し、バックグラウンド程度に留まった。

【0263】

一連のPCI滴定で処理した後 25 nM プローブで標識した陽性対照DOHH2溶解物に関しては、用量依存性のシグナル減少が観察された。

【0264】

PCI阻害プロファイルは、試験した全3種のDOHH2溶解物濃度(300、150及び $75\text{ }\mu\text{g/mL}$)に関し同等であり、参照のゲルベースアッセイに対し同等であった。

【0265】

アッセイでは、試験した全ての溶解物濃度で大型のシグナルウインドウを提供する。

【0266】

【表5】

表3. 0 : 1000 nM PCIのシグナル比

DOHH2溶解物		シグナルウインドウ
ug/ウェル		ug/mL
9	300	108
4.5	150	45
2.25	75	23

【0267】

アッセイの再現性は非常に良好であり、平均CV%は<5%であった。本アッセイは、高い特異性(陰性対照とは良好に区別される)、感度(ウェスタンプロット法と比較して溶解物の使用が少ない($50\text{ }\mu\text{g}$ に対して $0.6\text{ }\mu\text{g}$))及び効率(必要とされるプローブがゲルベースフォーマットよりも少ない($2.5\text{ }\mu\text{M}$ に対して 25 nM))を可能にした。

【0268】

実施例2. タンパク質占有率アッセイプロトコル

代替的なタンパク質占有率アッセイプロトコルを提供する。

10

20

30

40

50

1. 最終濃度 25 nM となるよう、アッセイ緩衝液中サンプルにプローブを加え (2 μL の 1.25 μM プローブストック + 100 μL サンプル)、振盪しながらインキュベートする。

2. MSD 標準ストレプトアビジンプレートを、ウェル当たり 150 μL の 3% Blocker A により室温で 1 時間又は 4 時間で一晩ブロッキングする。

3. 各ウェル 150 μL 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 1 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

4. 各ウェルに 30 μL の溶解物を加える。溶解物の溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし室温で 1 時間振盪する。

5. 各ウェル 150 μL 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。10

6. 各ウェルに、1% (w/v) Blocker A で 0.5 μg/mL に希釈した抗 BTK 抗体 BD611117 又は BD611116 を 25 μL 加える。シールし室温で 1 時間振盪する。

7. 各ウェル 150 μL 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。各ウェルに、1% (w/v) Blocker A で 1 μg/mL に希釈した SULFO-TAG 複合抗マウス抗体を 25 μL 加える。プレートをシールし室温で 1 時間振盪する。

8. ウェル当たり 150 μL 以上の 1×Tri-S 洗浄緩衝液を用いプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。20

9. 各ウェルに 150 μL の 1×読み取り緩衝液 T (H2O に希釈) を加える。気泡の混入は避ける - 読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピペッティングを用いる。プレートを SIZ2400 で読み取る。

【0269】

必要に応じて、次のパラメーターを更に最適化できる（例えば、抗 BTK 検出抗体の濃度、MSD SULFO-TAG 抗マウス二次検出抗体の濃度、又は 1 回のインキュベーション工程において抗 BTK 検出抗体と MSD SULFO-TAG 抗マウス二次検出抗体を組み合わせること）。

【0270】

実施例 3. 選択されたビオチン化プローブの抗タンパク質抗体コートプレート及びストレプトアビジンコートプレートアッセイフォーマットにおける比較30

抗タンパク質抗体コートプレート又はストレプトアビジンコートプレートアッセイフォーマットのいずれかを使用し、選択されたビオチン化プローブを、標的占有率アッセイにおける使用に関し試験した。次のプローブを試験した：

化合物 I - 1, MW = 808.01 (合計 80 mg)

化合物 I - 2, MW = 793.38 (合計 60 mg)

化合物 I - 3, MW = 780.98 (合計 32 mg)

化合物 I - 4, MW = 766.95 (合計 27 mg)

化合物 I - 5, MW = 1097.37 (合計 24 mg)

試験したプローブの構造を図 21 に示す。40

【0271】

プローブの原液 (5 mM 及び 10 mM) は次の通りに調製した。化合物 I - 1、I - 2、I - 3、及び I - 4 に関しては、プローブ 2 又は 4 mg を 500 μL DMSO に加え、化合物 I - 5 に関しては、12 又は 24 mg を 2.2 mL DMSO に加え、100 μL に分注した。50×プローブアッセイに関しては、アッセイ当日に新しく調製した： 1 μL の 5 mM プローブを 39 μL PBS に加えた。

【0272】

アッセイには次の試薬を採用した： BTK 抗体： BD Biosciences 611117；二次抗体：ヤギ抗マウス HRP、Santa Cruz、SC-2302；ストレプトアビジン - HRP、Thermo、カタログ番号 21130、0.5 mL、1 -

step Ultra TMB - E L I S A Substrate、Thermo、カタログ番号34028、250mL；停止液：0.16M H₂SO₄、Thermo、カタログ番号N600、55mL；ストレプトアビジンコートプレート：Thermo、カタログ番号15500、5枚；D O H H 2 対照溶解物；洗浄緩衝液：0.05% P B S T；1% B S A。

【0273】

- 以降のプロトコルに従い検量線を作成した。
- 1) 50×プローブを50 μL 溶解物に加え(1ug / μl)、37で1時間インキュベートする。
 - 2) ストレプトアビジンコートプレートを1% B S Aにより室温で1時間プロッキングし、P B S Tで3回洗浄する。10
 - 3) サンプルを氷上に移し10分間反応を停止させた後、室温に戻す。
 - 4) プローブ標識したD O H H 2 溶解物の希釈系列を調製する。1% B S Aを用いて500μLとし、1ug、0.5ug、0.25ug、125ng、62.5ng、31.25ng、15.6ng / μLの順に調製する。
 - 5) プローブ処理した溶解物100μLを各ウェルに三つ組で加える。
 - 6) 室温で2時間インキュベートする。
 - 7) P B S Tで7回洗浄する。
 - 8) 二次抗体 - H R Pを加え、室温で1時間インキュベートする。
 - 9) 200μL P B S Tで5回洗浄する。20
 - 10) 100μL T M Bを加え、室温で15分間インキュベートする。
 - 11) 50μL 停止液を加える。
 - 12) 450nmで読み取る。

【0274】

- プロトコルフォーマット1：(ストレプトアビジンコートプレート)
- 1) 最終用量(500μL)になるよう、溶解物をP B Sにより所望の濃度に希釈する。
 - 2) ビオチン化プローブ(最終濃度2.5μM)を溶解物に加え、37で1時間置く。
 - 3) ストレプトアビジンプレートを1% B S Aで室温で1時間プロッキングし、P B S Tで3回洗浄する。30
 - 4) サンプルを氷上に移し10分間反応を停止させた後、室温に戻す。
 - 5) 100uL処理溶解物(三つ組)をストレプトアビジンプレートに加え、室温で2時間静置する。
 - 6) 200μL P B S Tで5回洗浄する。
 - 7) 100μL二次抗体 - H R Pを加え、室温で1時間インキュベートする。
 - 8) 200μL P B S Tで3回洗浄する。
 - 9) 100μL T M Bを加え、室温で10分間インキュベートする。
 - 10) 50μL停止液を加える。
 - 11) 450nmで読み取る。40

【0275】

- プロトコルフォーマット2：(B T K抗体をコートしたプレート)
- 1) 96ウェルプレートを、100μL抗B T K(1:1000 P B S)で4で一晩コートする。
 - 2) プレートをP B S Tで5回洗浄する。
 - 3) プレートを固定して、室温で1時間プロッキングし、P B S Tで3回洗浄する。
 - 4) 最終用量(500μL)になるよう、溶解物をP B Sにより所望の濃度に希釈する。
 - 5) ビオチン化プローブ(最終濃度2.5μM)を溶解物に加え、37で1時間置く。

6) サンプルを氷上に移し 10 分間反応を停止させた後、室温に戻す。

7) 100 μL 处理溶解物（三つ組）をストレプトアビジンプレートに加え、室温で 2 時間静置する。

8) 200 μL P B S T で 5 回洗浄する。

9) ストレプトアビジン - H R P を加え、固定して室温で 1 時間インキュベートする。

10) 200 μL P B S T で 3 回洗浄する。

11) 100 μL T M B を加え、室温で 15 分間インキュベートする。

12) 50 μL 停止液を加える。

13) 450 nm で読み取る。

【0276】

10

結果：

高及び低プローブ濃度ストレプトアビジンアッセイに関し、各種プローブを比較する占有率アッセイから得られた結果を、図 22 に示す。データは、アッセイに使用したプローブの中では、化合物 I - 5 が、B T K に対する結合に関し最も高いシグナルを示したことを見出す。

【0277】

実施例 4 . 化合物 I - 5 及び親化合物イブルチニブのキナーゼ阻害剤活性の比較

N a n o s y n により実施された標準キナーゼ阻害アッセイを用い、化合物 I - 5 の T E C ファミリーキナーゼ及び相同性チロシンキナーゼ阻害能を生体外でアッセイした。次の表 4 に従い以降のキナーゼをアッセイした。

20

【0278】

【表 6】

表 4.

標的	供給元	カタログ番号	ロット	[酵素], nM	[ATP], μM	インキュベート時間(時間)
BLK	BPS	40401	111102	0. 4	20	1
BMX	BPS	40402	111031-5	1. 82	75	1
BTK	Millipore	14552	D7HN091U	0. 95	20	1
ITK	Carna	08-181	10CBS-1259E	1	50	3
JAK3	INVITROGEN	PV3855	716673	2	2	3
LCK	INVITROGEN	P3043	850070F	0. 4	50	1
SRC	INVITROGEN	P3044	26726B	3	25	1
TEC	Millipore	14-801	D8PN044U	4. 6	12	1

30

【0279】

12 p t (3 倍希釈) 用量反応フォーマットを使用して、化合物を 1 つ組で試験した。最大濃度は 10 mM 又は 1 mM とした。

【0280】

結果を表 5 に示す。データは、プローブの化合物 I - 5 が T E C ファミリーキナーゼ阻害に関し示した IC50 プロファイルが、親化合物のイブルチニブと類似することを示す。

40

【0281】

【表 7】

表 5

化合物ID	BLK IC50(μM)	BMX IC50(μM)	ITK IC50(μM)	JAK3 IC50(μM)	LCK IC50(μM)	SRC IC50(μM)	TEC IC50(μM)	BTK IC50(μM)
スタウロスボリン	0. 00213	0. 0128	0. 00569	0. 000825	0. 00227	0. 00662	0. 0129	0. 0189
イブルチニブ	0. 000362	0. 00109	0. 0623	0. 0849	0. 00745	0. 0242	0. 000643	0. 000248
化合物I-5	0. 00427	0. 00557	0. 198	4. 87	0. 00692	0. 0363	0. 00229	0. 00102
化合物I-5	0. 00366	0. 00442	0. 187	5. 34	0. 00599	0. 0338	0. 00171	0. 000755

【0282】

50

実施例5. 総BLKタンパク質アッセイの開発

本実験では、臨床サンプル中の総BLKをMSDプラットフォームで定量するためのサンドウィッチャイムノアッセイ法を開発するために、抗BLK抗体を選別する方法を示すことを目的とした。

【0283】

選別にはMSD ELISA Conversion pack I(カタログ番号K15A01-1)を使用した。このキットには、96ウェル高結合プレート、96ウェル標準プレート、SULFO-TAG(商標)NHS Ester(150nmole)、4 Spin Columns、SULFO-TAG標識ストレプトアビシン(50μg)、SULFO-TAG標識抗マウス抗体(50μg)、SULFO-TAG標識抗ウサギ抗体(50μg)、Blocker Aキット(1L)、ブロッキング剤B(2g)、読み取り緩衝液T 4X(200mL)が含まれる。

【0284】

次のBLK抗体を試験した。

【0285】

【表8】

表6

カタログ番号	供給元	標的	種応答性	宿主種	説明	組成	試験したアッセイ法	濃度
AF2679	R & D	BLK	H, M, Rt	ヤギ	BLK親和精製ヤギ ポリクローナル抗体	PBS溶液から 凍結乾燥	WB	1mg/mL
TA300020	Origene	BLK	H, M	ウサギ	精製BLKウサギ ポリクローナル抗体	アジ化ナトリウム 添加PBS	WB	0.25mg/mL
H00000640-M02	Novus Biologicals	BLK	H, M, Rt	マウス	IgG精製マウス	PBS	WB、ELISA	
ab37830	Abcam	BLK	H, M	ウサギ	精製ウサギ ポリクローナル	アジ化ナトリウム 添加PBS	WB、ELISA、 IHC	0.25mg/mL

【0286】

溶液 :

ブロッキング溶液 : 1x PBS中3%(w/v) MSD Blocker A : 3g Blocker A + 100mL PBS 4で最大14日間保管する。

洗浄緩衝液 : PBS-T (PBS+0.05% Tween-20)

捕捉抗体希釈緩衝液 : PBS (Ca2+及びMg2+不含有)

捕捉抗体 : 捕捉抗体希釈緩衝液で各抗体の4μg/mL溶液1mLを調製する。

検出抗体希釈緩衝液 : 1x PBS中1% MSD Blocker A : 10mLブロッキング溶液 + 20mL 1x PBS

検出抗体 : 1% MSD Blocker A / 1x PBSで、各抗体の2μg/mL溶液1~2mLを調製する。

SULFO-TAG標識二次抗体 : それぞれ1μg/mLの抗マウス及び抗ウサギSULFO-TAG抗体の、1% MSD Blocker A / 1x PBSを3mL調製する。

読み取り緩衝液 : 1x MSD読み取り緩衝液T : プレート毎に5mL 4x読み取り緩衝液T + 15mL H2Oを反転混和し、ボルテックス処理はしない。

標準法 : 1% Blocker Aを用い、組み換え型BLKの10μg/mL原液を調製する。次に、検量線用に以降の希釈液を調製する。それぞれの希釈には新しいチップを使用する。それぞれの希釈後に十分にボルテックスする。

【0287】

方法 :

実験1

目的 : 更なるアッセイ構築のための好適な抗体対を特定するために抗体を選別する。

【0288】

プロトコル :

10

20

30

40

50

1. M S D 高結合プレート及び標準プレートのそれぞれを、プレートレイアウトの通りにウェル当たり $25 \mu L$ の捕捉抗体溶液 ($4 \mu g / mL$) で溶液コートする (工程 1)。ウェルの隅に抗体溶液を加え、プレートを優しく叩いて液体を均一に分散させ、プレートをシールし、振盪はせずに 4 度で一晩インキュベートする。

2. 翌日、プレートの中身を除去し、ウェル当たり $150 \mu L$ のプロッキング溶液 (3% [w/v] Blocker A) を加える。シールし、室温で 1 時間以上振盪しながらインキュベートする。

3. ウェル当たり $150 \mu L$ 以上の PBS-T によりプレートを 1 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

4. プレートレイアウトに従い、 $25 \mu L$ の希釈した組み換えタンパク質を加える (工程 2)。溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし、室温で $300 \sim 500 rpm$ で 1 ~ 2 時間振盪させる。10

5. ウェル当たり $150 \mu L$ 以上の PBS-T によりプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

6. プレートレイアウトに従い、 $25 \mu L$ 検出抗体溶液を加える (工程 3)。抗体溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし、室温で $300 \sim 500 rpm$ で 1 時間振盪させる。15

7. ウェル当たり $150 \mu L$ 以上の PBS-T によりプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

8. $25 \mu L$ の SULFO-TAG 抗種検出抗体を $1 \mu g / mL$ 検出抗体希釈液に希釈し、工程 3 のプレートレイアウトに従い加える。プレートをシールし、室温で $300 \sim 500 rpm$ で 30 分間振盪させる。20

9. ウェル当たり $150 \mu L$ 以上の PBS-T によりプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

10. ウェル当たり $150 \mu L$ の $1 \times$ 読み取り緩衝液 T (H₂O に希釈) を加える。気泡の混入は避ける - 読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピッティングを用いる。プレートを S I 2 4 0 0 で直接読み取る。

【0289】

結果 :

それぞれの抗体対の生シグナルを図 23 に示す。それぞれの抗体対のバックグラウンドに対するシグナル (S/B) を図 24 に示す。H 0 0 0 0 0 6 4 0 - M 0 2 で最も高い S/B 比が観察された。BLK 用の 4 種の抗体対に関し、タンパク質濃度に伴う、シグナル及び S/B の良好な定量が観察された。総 BLK アッセイを更に最適化するために、抗体対 (捕捉用として AF 2 6 7 9、及び検出用として H 0 0 0 0 0 6 4 0 - M 0 2) 及び最も高い S/B 比を有する配向 (orientation) を選別した。標準プレートでは、同様の抗体対、高 S/B 比が観察された。30

【0290】

実験 2

目的 :

1) 捕捉抗体として AF 2 6 7 9、及び検出抗体として H 0 0 0 0 0 6 4 0 - M 0 2 を使用し、BLK アッセイのためのアッセイ条件を構築する。40

2) BLK の発現について、陽性 (DOHH2) 及び陰性 (Jurrkat) 細胞溶解物を試験する。

【0291】

製造元の指示書に従い、抗体を SULFO-TAG (商標) NHS Ester に複合させる。

【0292】

プロトコル :

1. M S D 標準プレートを、プレートレイアウトの通りにウェル当たり $25 \mu L$ の捕捉抗体溶液 ($4 \mu g / mL$) で溶液コートする。ウェルの隅に抗体溶液を加え、プレートを50

優しく叩いて液体を均一に分散させ、プレートをシールし、振盪はせずに4で一晩インキュベートする。2.翌日、プレートの中身を除去し、ウェル当たり $150\mu\text{L}$ のプロッキング溶液(5%[w/v]Blocker A)を加える。シールし、室温で1時間以上振盪しながらインキュベートする。

3.ウェル当たり $150\mu\text{L}$ 以上のPBS-Tによりプレートを1回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

4.プレートレイアウトに従い、 $25\mu\text{L}$ の希釈した組み換えタンパク質を加える。溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし、室温で $300\sim500\text{rpm}$ で1~2時間振盪させる。

5.ウェル当たり $150\mu\text{L}$ 以上のPBS-Tによりプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。10

6.プレートレイアウトに従い $25\mu\text{L}$ 検出抗体溶液を加える。抗体溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし、室温で $300\sim500\text{rpm}$ で1時間振盪させる。10

7.ウェル当たり $150\mu\text{L}$ 以上のPBS-Tによりプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

8.プレート2の各ウェルに $1\times$ 読み取り緩衝液T(H₂Oに希釈) $150\mu\text{L}$ を加える。気泡の混入は避ける-読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピペッティングを用いる。プレートをS12400で直接読み取る。

9. $25\mu\text{L}$ のSULFO-TAG抗種検出抗体を $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 検出抗体希釈液に希釈し、プレートレイアウトに従いプレート1に加える。プレートをシールし、室温で $300\sim500\text{rpm}$ で30分間振盪させる。20

10.ウェル当たり $150\mu\text{L}$ 以上のPBS-Tによりプレート1を3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

11.ウェル当たり $150\mu\text{L}$ の $1\times$ 読み取り緩衝液T(H₂Oに希釈)を加える。気泡の混入は避ける-読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピペッティングを用いる。プレートをS12400で直接読み取る。

【0293】

結果:

アッセイの生シグナルを図25に示す。本アッセイのバックグラウンドに対するシグナル(S/B)を図26に示す。BLKアッセイは、タンパク質濃度に伴うシグナル定量を示す。 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 捕捉抗体及び $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 検出抗体を使用して、組み換え型BLKタンパク質のシグナル値を図27にプロットする。細胞溶解物中のBLKに関し、陽性対陰性比を以降の表に示す。30

【0294】

【表9】

表7

捕捉 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.5	1	2
$10\mu\text{g}$	1.49	1.52	1.91
$5\mu\text{g}$	1.35	1.27	1.45
$2.5\mu\text{g}$	1.05	1.15	1.17
検出 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1		

【0295】

$1\mu\text{g}/\text{mL}$ 捕捉抗体(AF2679、R&D)及び $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ (H00000640-MO2、Novus Biologicals)検出抗体を用いるBLKアッセイでは、最大46倍までのシグナルウインドウを観察した。アッセイのダイナミックレンジ40

50

ジは 3 . 5 l o g までであることが明らかであることが分かる。一部最適化した条件を使用した細胞溶解物では、B L K に関して約 2 倍の P / N 比が観察された。

【 0 2 9 6 】

実施例 6 : I T K 及び B L K タンパク質占有率アッセイ

M S D ストレプトアビジンプレートでの I T K 及び B L K 占有率アッセイに必要とされるプローブを最適化すること、及び溶解物の薬剤処理を用いアッセイ性能を実証することをこの実験の目的とした。アッセイの目的は、以降「薬剤」として参照する共有結合阻害剤の結合していない I T K 及び B L K の相対量を定量することである。「プローブ」は、長鎖リンカーによりビオチンに結合させた薬剤からなる。プローブによるサンプル標識は、製剤により占有されない I T K 及び B L K の検出を可能にする。B T K についてこれまでに首尾よく使用されてきたアッセイフォーマットは、ストレプトアビジンプレート上で、プローブ標識されたタンパク質を補足し、抗タンパク質抗体を使用し検出を行うものである。I T K 及び B L K 占有率アッセイと類似のフォーマットを試験した。

10

【 0 2 9 7 】

材料 :

標準ストレプトアビジンプレート(5 パック)カタログ番号 L 1 5 S A - 2 、読み取り緩衝液 T (5 0 m L) カタログ番号 R 9 2 T C - 3 、S U L F O - T A G ヤギ抗マウス (5 0 μ g) カタログ番号 R 3 2 A C - 5 、S U L F O - T A G ヤギ抗ウサギ (5 0 μ g) カタログ番号 R 3 2 A B - 5 、S U L F O - T A G ストレプトアビシン (5 0 μ g) カタログ番号 R 3 2 A D - 5 、M S D B l o c k e r A カタログ番号 R 9 3 A A - 2 、プロテアーゼ阻害剤カクテル(例えば、Thermo / Pierce H a l t (商標)プロテアーゼ阻害剤カクテル E D T A 不含カタログ番号 8 7 7 8 5 又は Ro c h e C o m p l e t e M i n i P r o t e a s e i n h i b i t o r t a b l e t 、カタログ番号 1 8 3 6 1 7 0) 、I T K 及び B L K 発現細胞株由来の陽性対照溶解物細胞株 (D O H H 2 及び J U R K A T) 、陰性対照溶解物 (T H P - 1 細胞) 、B L K 、I T K 阻害薬剤イブルチニブ「P C I 」; ビオチン化プローブ化合物 I - 5 「プローブ」。

20

【 0 2 9 8 】

溶液 :

プロッキング溶液 : 3 % (w / v) M S D B l o c k e r A / 1 x T r i s 洗浄緩衝液 : 3 g B l o c k e r A + 1 0 0 m L 1 x T r i s 洗浄緩衝液 4 で最大 1 4 日間保管する。P B S - T でプロッキング溶液も調製できる。

30

洗浄緩衝液 : 1 x M S D T r i s 洗浄緩衝液 : 5 0 m L 1 0 x T r i s 洗浄緩衝液 + 4 5 0 m L H 2 O (1 5 0 m M N a C l / 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5) / 0 . 0 2 % T w e e n - 2 0) 洗浄緩衝液としては P B S - T も使用できる。

検出抗体希釈緩衝液 : 1 % M S D B l o c k e r A / 1 x T r i s 洗浄緩衝液 : 1 0 m L プロッキング溶液 + 2 0 m L 1 x T r i s 洗浄緩衝液又は 1 0 m L プロッキング溶液 + 2 0 m L P B S - T

読み取り緩衝液 : 1 x M S D 読み取り緩衝液 T : プレート毎に 5 m L 4 x 読み取り緩衝液 T + 1 5 m L H 2 O

40

細胞溶解物 : 複数回凍結融解させた細胞ペレットを P B S + プロテアーゼ阻害剤に再懸濁することにより溶解物を調製した。

アッセイ緩衝液 : 1 % b l o c k e r / T r i s 洗浄緩衝液 + プロテアーゼ阻害剤

【 0 2 9 9 】

実験 1 - プローブ濃度の最適化

目的 : 必要とされる最適プローブ濃度を決定し、異なるプローブ : 溶解物比で比較する

【 0 3 0 0 】

サンプル :

陽性対照 : D O H H 2 及び J u r k a t 細胞溶解物

陰性対照 : 1 u M P C I で処理した D O H H 2 及び J u r k a t 細胞

50

【0301】

D O H H 2 のみ、及び D O H H 2 + P C I 溶解物を、アッセイ緩衝液により 6 0 0 ; 3 0 0 ; 1 5 0 ; 7 5 ; 3 7 . 5 ; 1 8 . 7 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈する。

【0302】

プローブを、6 0 0 0 ; 1 5 0 0 ; 3 7 5 ; 9 3 . 8 ; 2 3 . 4 ; 5 . 9 、及び 1 . 5 n M (5 0 \times 濃度) に希釈する。

【0303】

9 6 ウエルポリプロピレンプレートにおいて、1 μL 1 0 0 \times プローブを 5 0 μL 希釈溶解物に加え、インキュベートする。

【0304】

プロトコル :

1) B l o c k M S D プレートを、9 0 0 r p m で振盪しながら室温で 1 ~ 3 時間、
1 5 0 μL 3 % B l o c k e r A でブロッキングする。

2) 9 6 ウエルポリプロピレンプレートにおいて、5 0 μL 用量で、定量したタンパク質溶解物と定量したプローブとを、振盪しながら 1 時間インキュベートする。

3) M S D プレートを洗浄緩衝液で 2 回洗浄する。

4) それぞれのプレートレイアウトの通りにプローブ溶解混合物 3 0 μL を M S D プレートに移し、1 時間インキュベートする。

5) プレートを 1 5 0 μL 洗浄緩衝液で 3 回洗浄する。

6) 1 % B l o c k e r A で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した 2 5 μL の抗 B L K 又は抗 I T K 抗体を加える。9 0 0 r p m で振盪しながら室温で 2 時間インキュベートする。

7) プレートを 1 5 0 μL 洗浄緩衝液で 3 回洗浄する。

8) 1 % B l o c k e r A で 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した 2 5 μL S U L F O - T A G 標識抗ウサギ抗体を加える。9 0 0 r p m で振盪しながら室温で 1 時間インキュベートする。

9) プレートを M S D 洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、1 5 0 μL 1 \times 読み取り緩衝液を加え、s e c t o r イメージャーで直接読み取る。

【0305】

結果 :

B L K 及び I T K プローブアッセイの結果を図 2 8 に示す。B T K 及び I T K アッセイの両方に關し、シグナルは、使用した溶解物中のタンパク質濃度により定量されることが観察された。陽性対照の溶解物に關しては、プローブ濃度の増加に伴いシグナルは増加し、約 3 0 n M 超でプラトーに達する。陰性対照(細胞溶解物 + 薬剤)サンプルに關しては、1 2 0 n M プローブでも上昇は非常に僅かであり、バックグラウンドシグナルは低い。以降の実験に關してはプローブ濃度は 5 0 n M が推奨された。

【0306】

実験 2 : 薬剤による阻害を定量するシリーズ (Series)

目的 : 一連の薬剤を定量し、次に溶解物を 5 0 n M プローブで標識して、阻害実験を実施する

【0307】

サンプル :

陽性対照 : D O H H 2 及び J u r k a t 溶解物 (アッセイ緩衝液中 1 m g / m L)

陰性対照 : T H P - 1 溶解物 (アッセイ緩衝液中 1 m g / m L)

【0308】

溶解物を、アッセイ緩衝液で 5 0 0 、 2 5 0 及び 1 2 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈する。

【0309】

P C I の希釈系列を調製する。1 0 0 \times P C I 濃度は、1 0 0 、 2 5 、 6 . 2 5 、 1 . 5 6 、 0 . 3 9 、 0 . 0 9 μM とする; ポリプロピレンプレートにおいて、溶解物を P C I により 1 時間処理する(例えば、1 0 0 μL 溶解物 + 1 μL 1 0 0 \times P C I 溶液); P C I 阻害後に全てのサンプルにプローブを加え、最終濃度 5 0 n M とし、振盪しな

10

20

30

40

50

がら室温で1時間インキュベートする。

【0310】

プロトコル：

1) MSD 標準ストレプトアビジンプレートを、ウェル当たり $150 \mu\text{L}$ の 3% Blocker A により室温で1時間又は4で一晩ブロッキングする。

2) 各ウェル $150 \mu\text{L}$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを1回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

3) プレートのレイアウトに従いプローブ標識溶解物 $30 \mu\text{L}$ を加える。溶解物の溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし室温で1時間振盪する。

4) 各ウェル $150 \mu\text{L}$ 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

5) 各ウェルに、1% (w/v) Blocker A で $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した抗ITK抗体を $25 \mu\text{L}$ 加える。シールし、900 rpmで振盪しながら室温で2時間インキュベートする。

6) 各ウェルに、1% (w/v) Blocker A で $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した SULFO-TAG複合抗種抗体を $25 \mu\text{L}$ 加える。プレートをシールし室温で1時間振盪する。

7) ウェル当たり $150 \mu\text{L}$ 以上の $1 \times$ Trips 洗浄緩衝液を用いプレートを3回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

8) ウェル当たり $150 \mu\text{L}$ の $1 \times$ 読み取り緩衝液 T (H₂O に希釈) を加える。気泡の混入は避ける - 読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピッティングを用いる。プレートを SII2400 で読み取る。

【0311】

結果：

ITKプローブアッセイの結果を、以下の図29及び表8に示す。全ての薬剤濃度において、観察された陰性対照細胞株DOHH2のシグナルはバックグラウンド程度であった。薬剤処理陽性対照のJurkat細胞溶解物は、薬剤濃度の増加に伴いシグナルの低下を示した。阻害率(%)は使用した溶解物濃度と関連しなかった。アッセイの再現性は非常に良好であり、平均CV%は<5%であった。

【0312】

【表10】

表8

薬剤(nM)	ITKアッセイ(Jurkat溶解物)					
	$500 \mu\text{g}/\text{mL}$		$250 \mu\text{g}/\text{mL}$		$125 \mu\text{g}/\text{mL}$	
平均シグナル	%CV	平均シグナル	%CV	平均シグナル	%CV	
未処理	1805	0.63	1098	3.5	596	2.1
DMSO	1721.5	4.15	1217	0.2	581.5	1.1
1.0	1720.5	4.81	1107	1.1	662	1.3
3.9	1696	0.67	814.5	2.0	422	2.3
15.6	1158	1.34	589	1.2	324	1.7
62.5	433.5	2.12	240	2.4	167.5	0.4
250	180.5	1.96	135.5	2.6	129	1.1
1000	155	0.00	134	2.1	135.5	13.0

【0313】

実験3：PBM C溶解物におけるITK阻害の反復性

目的：一連の薬剤を定量し、次に溶解物を 50nM プローブで標識して、阻害実験を実施する。

【0314】

サンプル：

10

20

30

40

50

陽性対照：D O H H 2、J u r k a t 及びP B M C 溶解物（アッセイ緩衝液中 1 m g / m L）

陰性対照：T H P - 1 溶解物（アッセイ緩衝液中 1 m g / m L）

【0315】

溶解物を、アッセイ緩衝液で 500 ; 250 及び 125 μg / m L に希釈する。

【0316】

P C I の希釈系列を調製する。100 × P C I 濃度は、100、25、6.25、1.56、0.39、0.09 μM とする；ポリプロピレンプレートにおいて、溶解物を P C I により 1 時間処理する（例えば、100 μL 溶解物 + 1 μL 100 × P C I 溶液）；P C I 阻害後に全てのサンプルにプローブを加え、最終濃度 50 nM とし、振盪しながら室温で 1 時間インキュベートする。10

【0317】

プロトコル：

1) M S D 標準ストレプトアビジンプレートを、ウェル当たり 150 μL の 3% B l o c k e r A により室温で 1 時間又は 4 で一晩ブロッキングする。

2) 各ウェル 150 μL 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 1 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。

3) プレートのレイアウトに従いプローブ標識溶解物 30 μL を加える。溶解物の溶液をウェル底部の隅に配置する。プレートをシールし室温で 1 時間振盪する。

4) 各ウェル 150 μL 以上の洗浄緩衝液を用いプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。20

5) 各ウェルに、1% (w/v) B l o c k e r A で 2 μg / mL に希釈した抗 I T K 抗体を 25 μL 加える。シールし、900 rpm で振盪しながら室温で 2 時間インキュベートする。

6) プレートを 150 μL 洗浄緩衝液で 3 回洗浄する。

7) 各ウェルに、1% (w/v) B l o c k e r A で 2 μg / mL に希釈した S U L F O - T A G 複合抗種抗体を 25 μL 加える。プレートをシールし室温で 1 時間振盪する。

8) ウェル当たり 150 μL 以上の 1 × T r i s 洗浄緩衝液を用いプレートを 3 回洗浄する。プレートを軽く叩いて中身を除去し、乾燥させる。30

9) ウェル当たり 150 μL の 1 × 読み取り緩衝液 T (H 2 O に希釈) を加える。気泡の混入は避ける - 読み取り緩衝液を加えるときにはリバースピペッティングを用いる。プレートを S I 2 4 0 0 で読み取る。

【0318】

結果：

I T K プローブアッセイの結果を、以下の図 30 及び表 9 に示す。P B M C 溶解物では用量依存性の I T K シグナルの減少が観察されたことから、薬剤による P B M C 溶解物における I T K 阻害が示唆される。I T K アッセイの再現性は非常に良好であり、こちらも C V % < 5 % であった。

【0319】

10

20

30

40

【表11】

表9

薬剤(nM)	ITK 阻害率(PBMC溶解物)		
	平均シグナル	%CV	%阻害率
未処理	998	5	
DMSO	889	3	11
0. 98	925	3	7
3. 91	889	1	11
15. 63	832	1	17
62. 50	384	1	62
250	139	3	86
1000	106	5	89

10

【0320】

実施例7：ITKタンパク質占有率アッセイ

20

電気化学的刺激に基づくELISA SULFO-TAG ITKプローブアッセイを使用して、イブルチニブの結合していないITKの相対量を定量することもできるであろう。イブルチニブは、ITKの活性部位に結合し、システイン残基(ITK-Cys442)とのジスルフィド結合を形成する。化合物I-5は、長鎖リンカーによりビオチンに結合しているイブルチニブからなるプローブである。回収したタンパク質溶解物を化合物I-5により標識する。プローブによるサンプル標識は、薬剤により占有されないITKの検出を可能にする。ITKと複合しているプローブ(及び複合していないプローブ)をストレプトアビシン(SA)プレートにより捕捉し、次にマウス抗ITK(BD番号550503)及びSULFO-TAG複合抗マウス抗体(MSD、カタログ番号R32AC-5)とともにインキュベートする。各ウェルにおいて電極で電気化学的な刺激を開始し、SULFO-TAG標識を発光させ、シグナルを測定する。より大きいシグナルはサンプルのITK部位がより未占有であることと相関する一方、より小さいシグナルはITK部位がよりイブルチニブにより占有されていることと相関する。

30

【0321】

ITK占有率のベースラインは、添加前第1サイクル第1日目のサンプルに設定し、規定の時点でのITK占有率はベースラインの値をもとに算出した。この割合を薬力学的な結果として利用し、異なる投与量の患者コホート間で比較した。イブルチニブ投与コホートと、ITK占有率との間の関係を定義した。

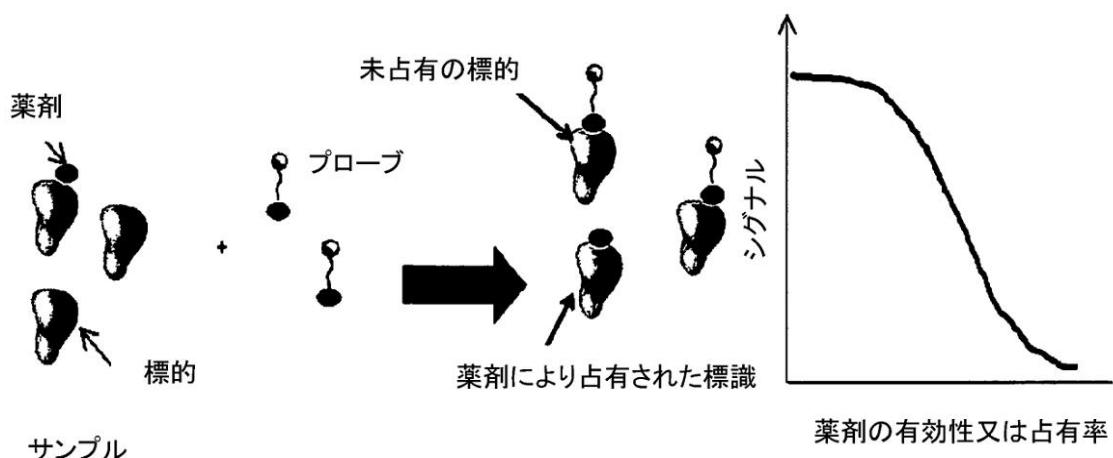
30

【0322】

イブルチニブの第II相臨床試験下のCLL患者におけるITK占有率を決定した。サンプルは、イブルチニブ投与の直前、及び連日経口投与(420mg/day)の8日後に試験した。PBMCを回収し、4回凍結融解し溶解させた。最後の融解後、細胞を4で16,000gで10分間遠心分離し、不溶性材料をペレット化した。タンパク質溶解物にプロテアーゼ阻害剤を添加し、タンパク質溶解物を薬剤のビオチン化誘導体、化合物I-5、により室温で1時間標識し、ブロッキング溶液で1時間ブロッキングしたストレプトアビシンコートプレート(MSD、カタログ番号L15SA-2)に入れた。インキュベートの1時間後、プレートを3回洗浄し、続いてマウス抗ITK(BD番号550503)で更に1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、SULFO-TAG複合抗マウス抗体(MSD、カタログ番号R32AC-5)により1時間インキュベートし、洗浄し、製造元の指示書に従いS12400で3分間読み取りした。40及び80%ITK間のデータにより、生体外で得られたものに類似する、イブルチニブによる共有結合が明らかとなった。

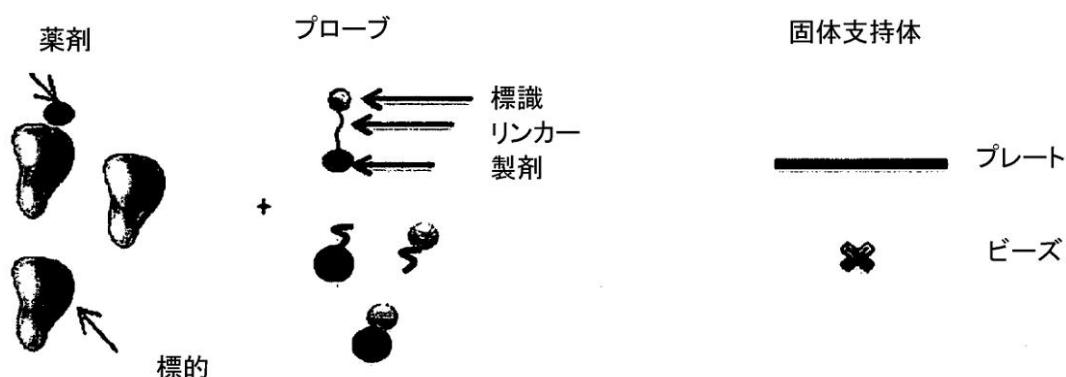
40

【図 1】



薬剤の占有率が高くなるほどプローブの結合は低くなる

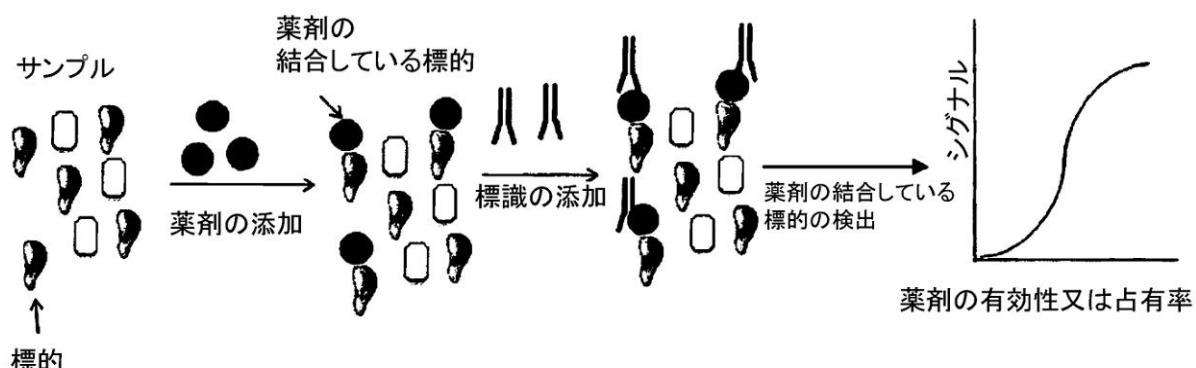
【図 2】



キットの構成成分:

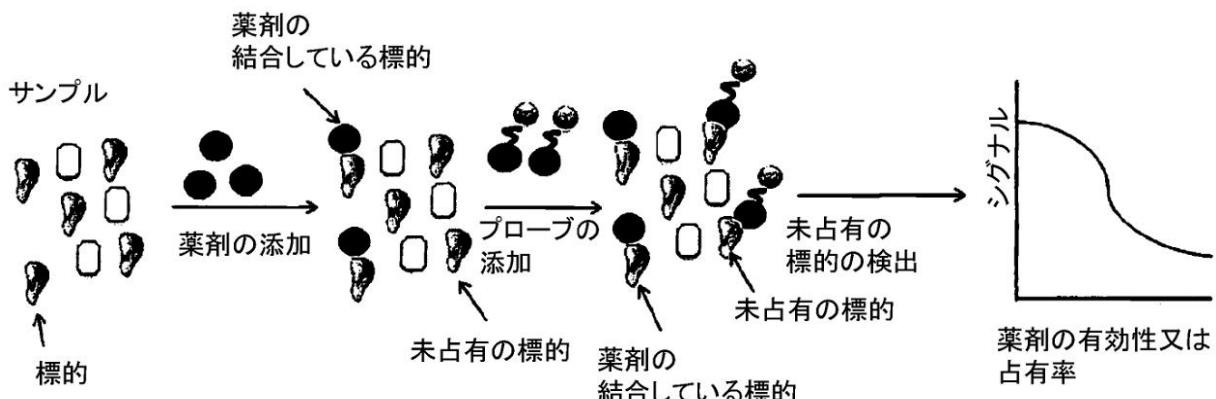
1. 薬剤(任意選択的)
2. 標的(任意選択的)
3. プローブ=製剤、リンカー、標識、又はこれらの組み合わせ
4. 固体支持体(任意選択的)

【図 3】



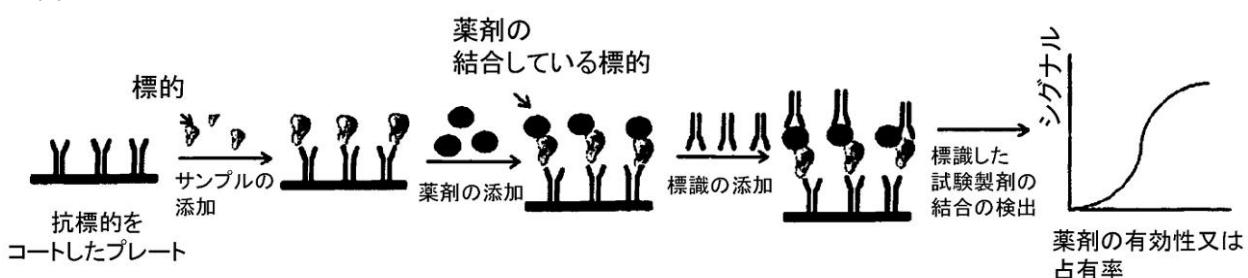
薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度に直接的に相関する(例えば、シグナル強度が強くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

【図4】



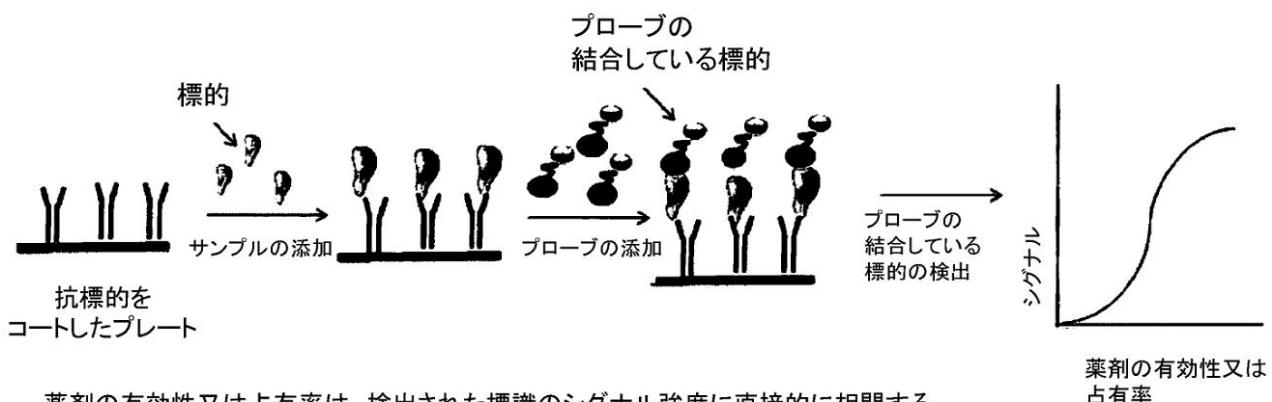
薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度と逆相関する
(例えば、シグナル強度が高くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

【図5】



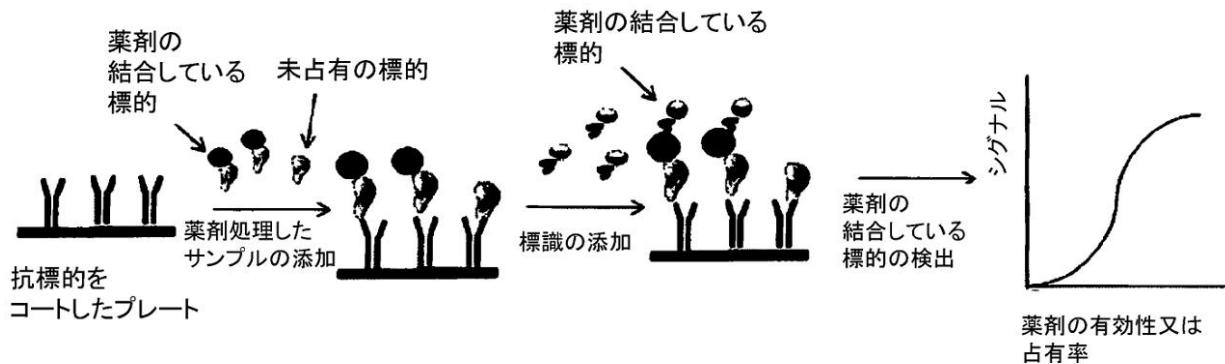
薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度に直接的に相関する
(例えば、シグナル強度が強くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

【図6】



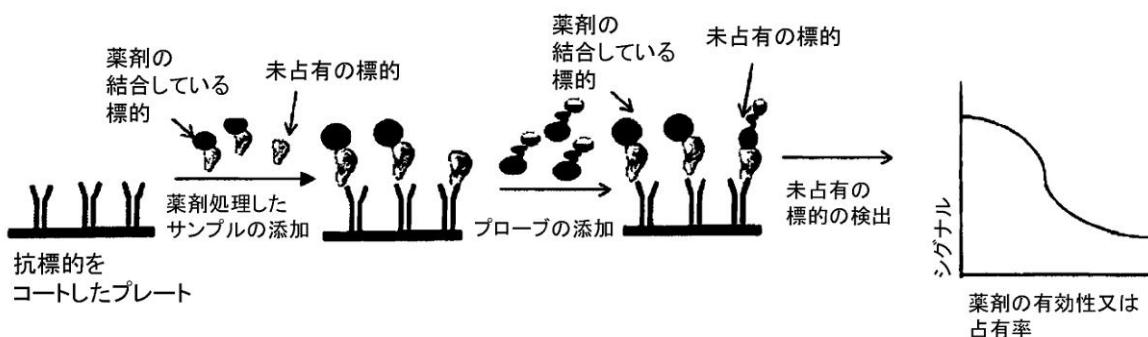
薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度に直接的に相関する
(例えば、シグナル強度が強くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

【図7】



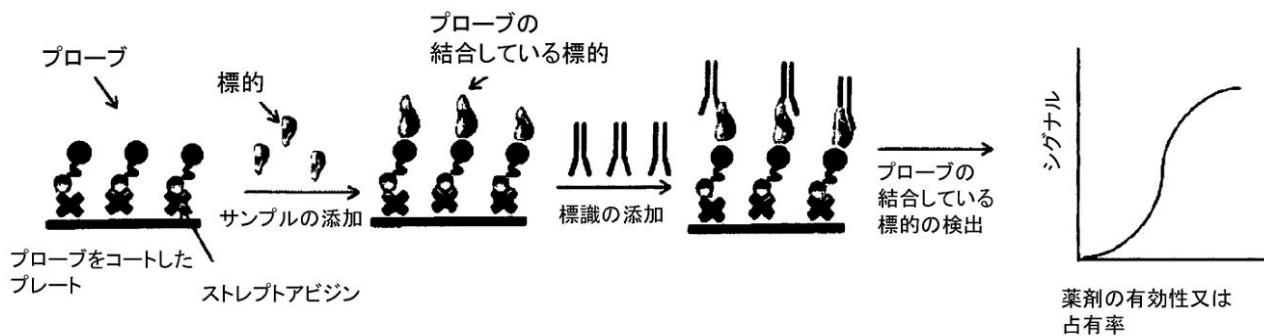
薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度に直接的に相関する
(例えば、シグナル強度が強くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

【図8】



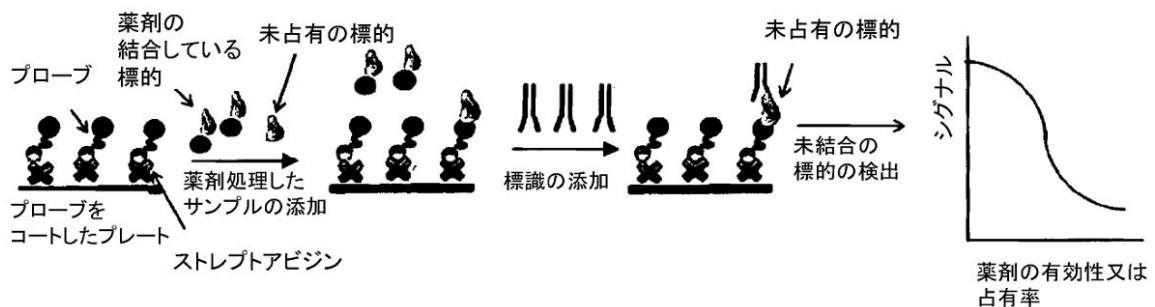
薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度に逆相関する(例えば、シグナル強度が強くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

【図9】



薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度に直接的に相関する(例えば、シグナル強度が強くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

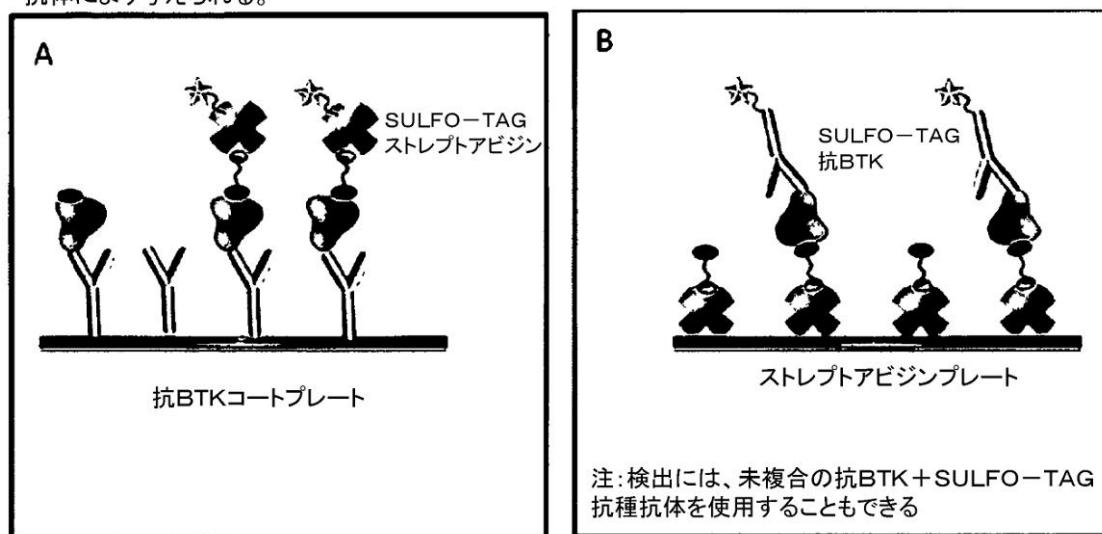
【図10】



薬剤の有効性又は占有率は、検出された標識のシグナル強度と逆相関する(例えば、シグナル強度が強くなるほど薬剤の有効性は高くなる)

【図11】

2つの有望なアッセイフォーマットを以下に示す。これらのアッセイの特異性は、好適な抗BTK抗体により与えられる。



【図12】

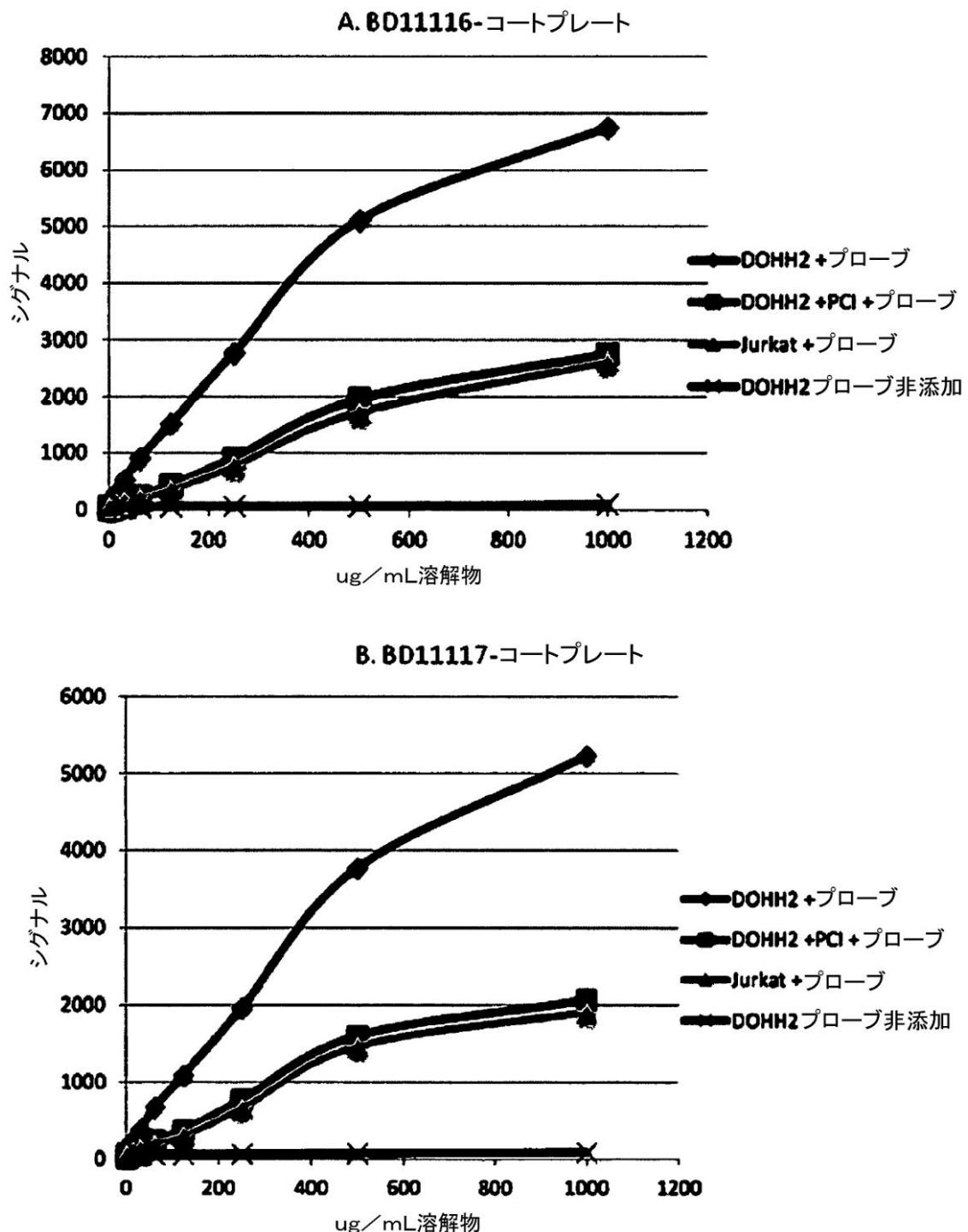
A. プレートレイアウト

溶解物 ug/mL ug／ウェル	DOHH2		Jurkat	DOHH2		DOHH2		Jurkat	DOHH2		DOHH2	
	プローブ	+PCI+プローブ	◆プローブ 非添加	プローブ	+PCI+プローブ	◆プローブ 非添加	プローブ	+PCI+プローブ	◆プローブ 非添加	プローブ	+PCI+プローブ	◆プローブ 非添加
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
抗BTK	BD Cat # 611116		BD Cat # 611117		Sigma							
	1uM プローブのみ		1uM プローブのみ		1uM プローブのみ							

B. プレート結果

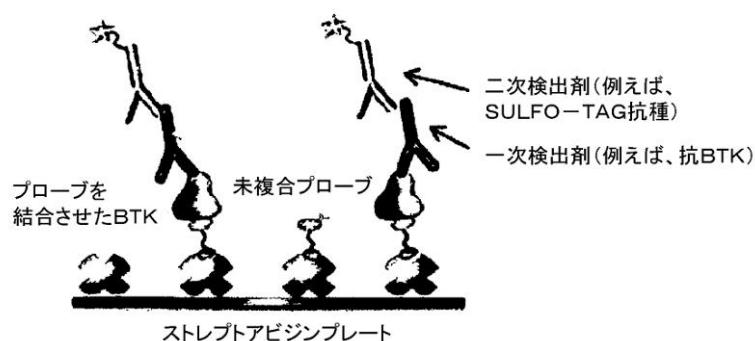
A	DOHH2		Jurkat	DOHH2		DOHH2		Jurkat	DOHH2		DOHH2	
	+プローブ	+PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	プローブ	+PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	プローブ	+PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6756	2756	2615	98	5225	2065	1912	88	2463	2043	2286	98
B	5112	1957	1723	69	3771	1598	1456	75	1565	1510	1500	73
C	2772	912	782	67	1959	769	666	66	662	683	683	66
D	1514	435	361	65	1088	368	304	60	318	301	307	62
E	914	243	208	52	673	238	197	55	192	189	191	63
F	526	152	153	52	378	150	136	59	133	127	127	58
G	307	118	107	1493	242	109	99	769	90	96	90	1097
H	54	56	56	1701	59	61	52	1125	55	52	57	1067
	BD11116 捕捉		BD11117 捕捉		Sigma 捕捉							
対照	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性

【図 13】



(四 1 4)

A. アッセイ概略



B. プレートレイアウト

溶解物		DOHH2		Jurkat		DOHH2		Jurkat		DOHH2		Jurkat		DOHH2			
ug/mL	ug／ウェル	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	
1000	30	A				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
500	15	B															
250	7.5	C															
125	3.75	D															
62.5	1.875	E															
31.25	0.9375	F															
15.625	0.46875	G															
0	0	H															
抗BTK		BD Cat # 611116				BD Cat # 611117				Sigma							
抗種		SULFO-TAG抗マウス				SULFO-TAG抗ウサギ											
1 uM プローブのみ						1 uM プローブのみ								1 uM プローブのみ			

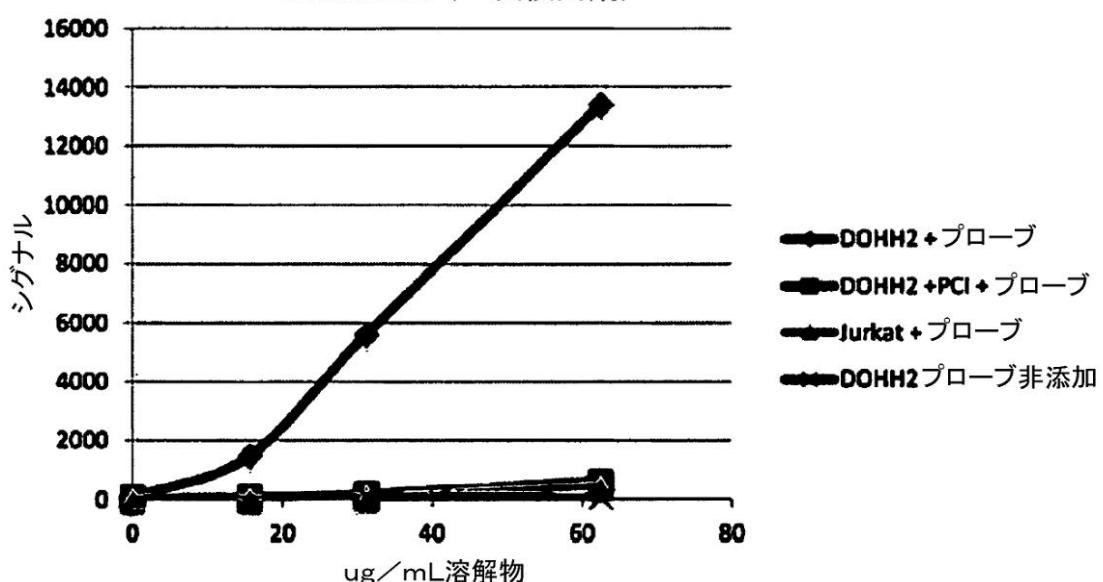
c. プレート結果

シグナル

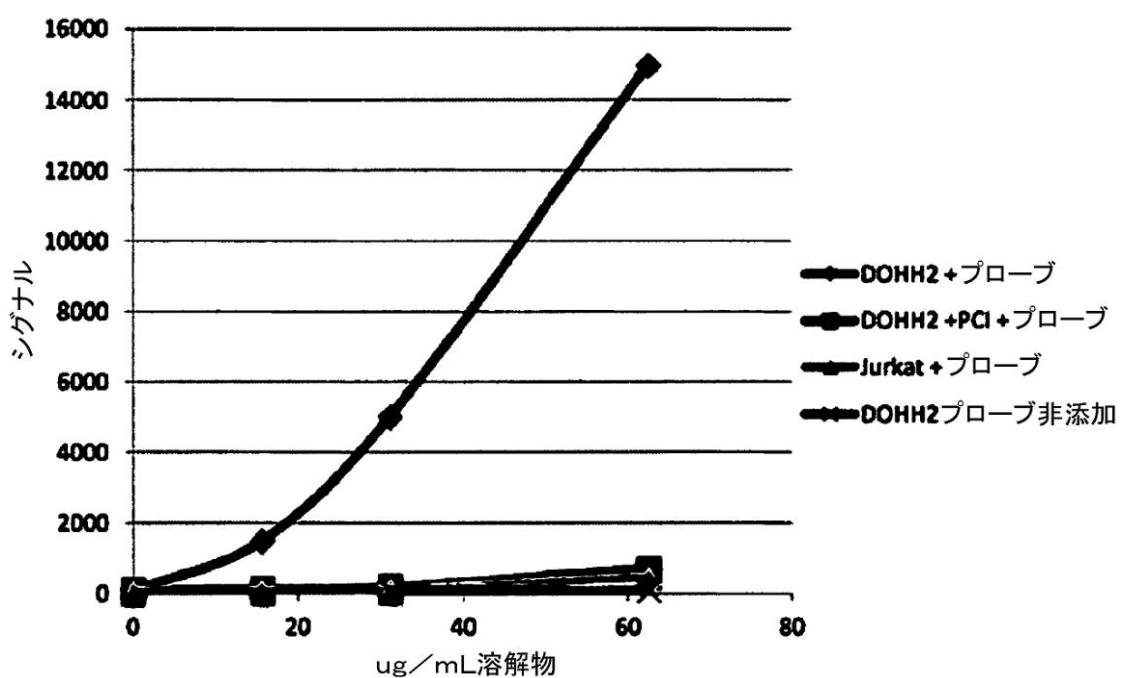
溶解物		DOHH2		Jurkat	DOHH2		DOHH2		Jurkat	DOHH2		DOHH2		Jurkat	DOHH2		
ug/mL	ug/ウェル	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加	プローブ	PCI+プローブ	+プローブ	プローブ非添加
1000	30	A	2831	602	484	68	3326	794	693	132	3849	3761	4571	2075			
500	15	B	3205	613	482	64	4077	770	614	119	3240	3014	3361	1796			
250	7.5	C	3860	605	495	64	3206	770	608	109	2581	2683	2825	1659			
125	3.75	D	4051	574	479	57	4458	717	574	100	2475	2451	2599	1707			
62.5	1.875	E	13414	614	471	56	15004	709	481	95	2395	2392	2321	1608			
31.25	0.9375	F	5601	178	119	62	5033	196	149	92	1963	1893	2050	2003			
15.625	0.46875	G	1482	76	60	500	1502	125	103	541	1927	1913	1875	3292			
0	0	H	56	63	58	727	90	101	91	531	1863	1857	1795	3224			
a-BTK 対照		BD11116 検出				BD11117 検出				Sigma検出							
		陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性				

【図 15】

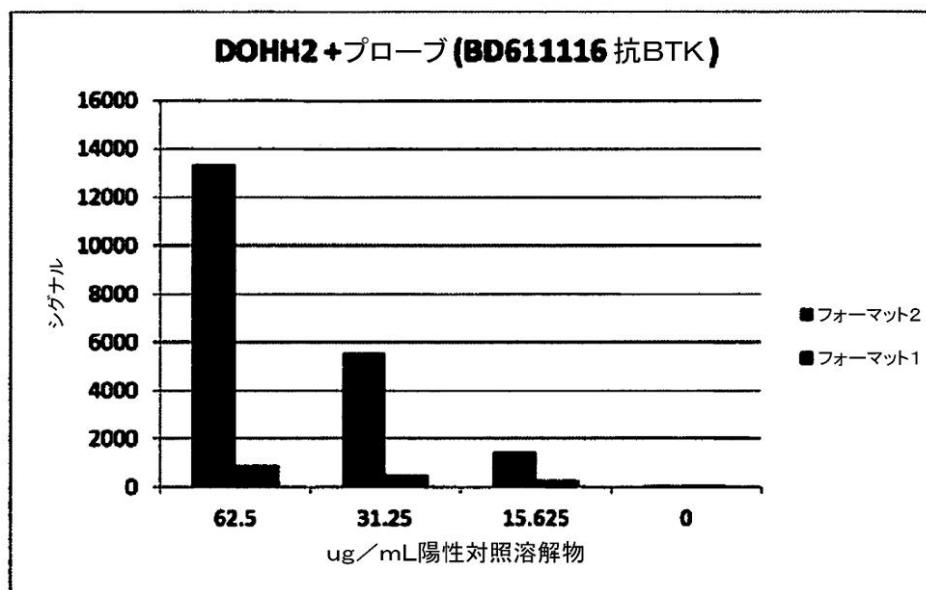
A. BD11116(一次検出剤)



B. BD11117(一次検出剤)



【図16】



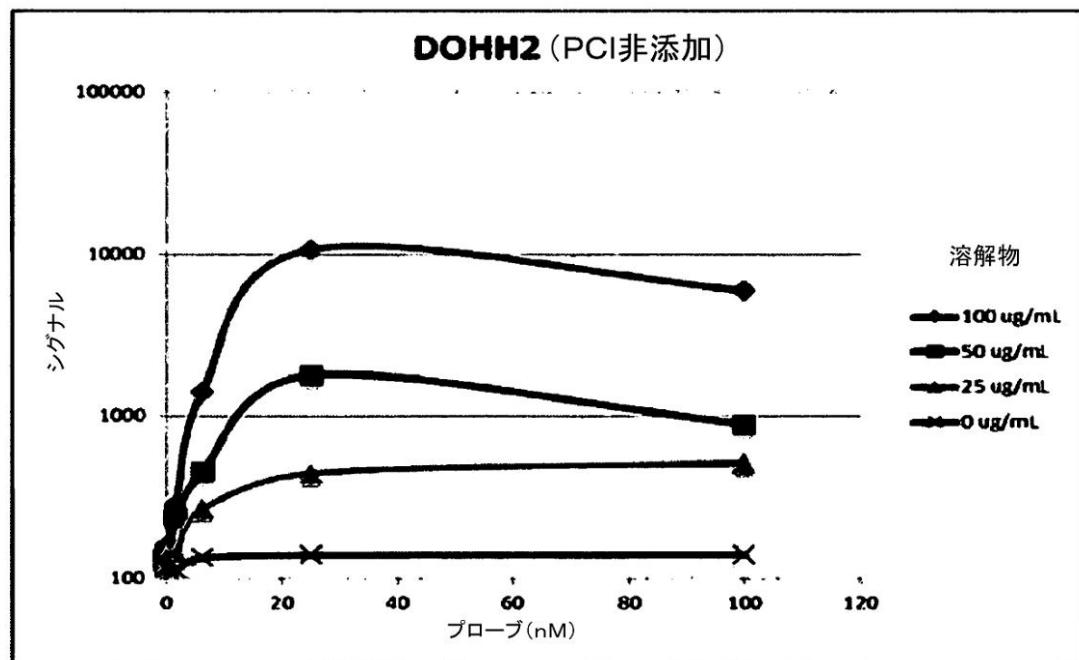
溶解物	シグナル: バックグラウンド (DOHH2 + プローブ)						
	フォーマット1		フォーマット2				
ug/mL	ug/ウェル	BD611116	BD611117	Sigma	BD611116	BD611117	Sigma
62.5	1.875	16.9	11.4	3.5	239.5	166.7	1.3
31.25	0.9375	9.7	6.4	2.4	100.0	55.9	1.1
15.625	0.46875	5.7	4.1	1.6	26.5	16.7	1.0
0	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

【図17】

実験2の結果

シグナル

プローブ(nM)	DOHH2						DOHH2+PCI						ug/mL 溶解物	
	500	250	125	63	33		500	250	125	63	33			
100	A	5981	895	520	723	397	382	732	523	505	427	417	379	
25	B	10743	1799	449	308	211	355	187	169	161	129	174	141	
6.25	C	1426	457	269	179	163	130	144	131	127	129	122	114	
1.563	D	285	240	144	131	130	133	139	140	124	128	110	110	
0.391	E	164	143	126	132	132	127	141	131	133	126	121	115	
0.098	F	149	135	141	131	131	123	134	139	125	124	120	110	
0.024	G	153	141	130	126	128	129	144	135	132	133	120	115	
0	H	141	140	135	114	120	116	130	125	130	122	111	120	



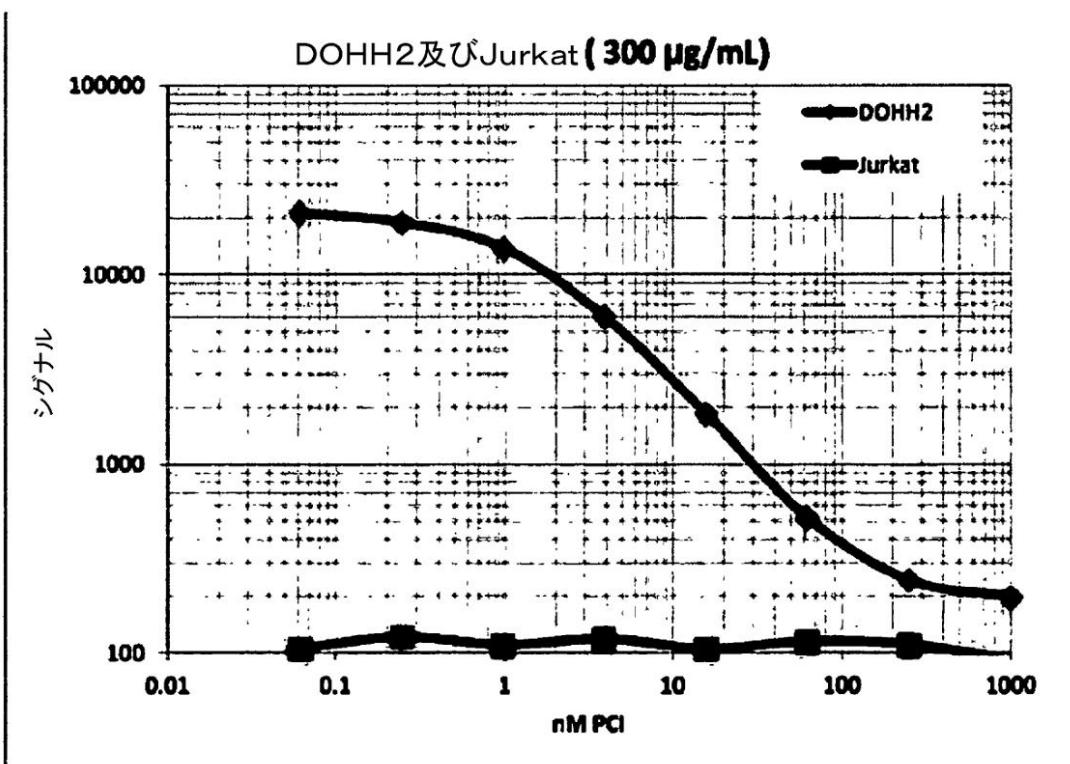
【図18】

実験3の結果

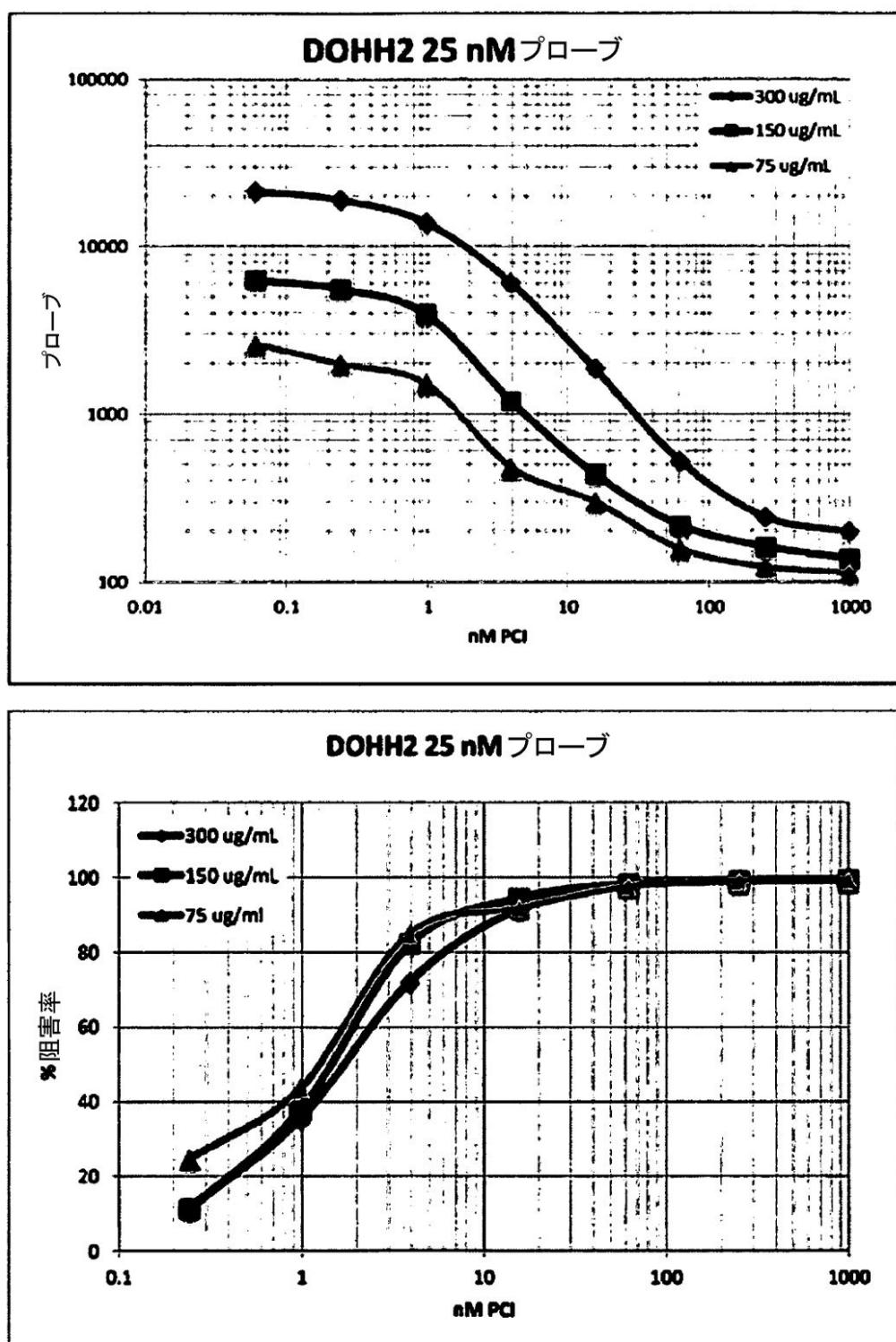
シグナル

PCI nM	DOHH2 + 25 nM プローブ			Jurkat			
	300 ug/mL	150 ug/mL	75 ug/mL	300 ug/mL	150 ug/mL	75 ug/mL	
1000	200	195	135	140	105	120	92 95 87 85 96 75
250	249	238	162	162	117	129	111 100 87 85 81 83
62.5	533	508	218	215	164	149	115 99 84 92 84 85
15.63	1904	1799	457	418	299	301	105 123 99 108 79 86
3.91	6333	5734	1212	1171	510	452	119 106 116 105 89 87
0.98	14386	13251	4104	3770	1652	1370	110 103 95 98 102 104
0.24	19283	18511	5644	5457	2059	1903	122 116 97 105 91 89
0	21299	21320	6648	5835	2540	2655	105 101 107 104 85 88

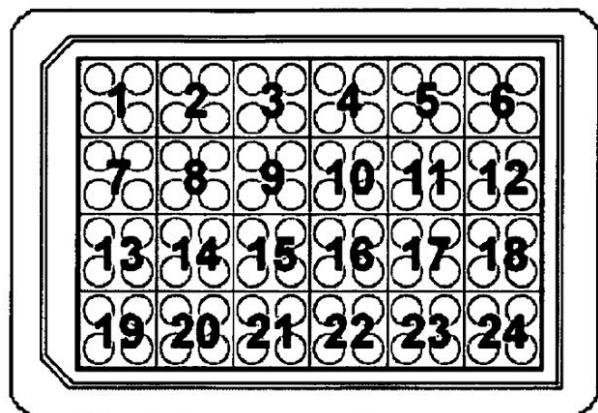
PCI nM	DOHH2 + 25 nM プローブ					
	300 ug/mL		150 ug/mL		75 ug/mL	
	平均シグナル	%CV	平均シグナル	%CV	平均シグナル	%CV
1000	197.5	1.8	137.5	2.6	113.0	8.8
250	243.5	3.2	162.0	0.0	123.0	6.9
62.5	520.5	3.4	216.5	1.0	156.5	6.8
15.63	1851.5	4.0	437.5	6.3	300.0	0.5
3.91	6033.5	7.0	1191.5	2.4	481.0	8.5
0.98	13818.5	5.8	3937.0	6.0	1511.0	13.2
0.24	18897.0	2.9	5555.5	2.3	1981.0	5.6
0.00	21309.5	0.1	6241.5	9.2	2597.5	3.1



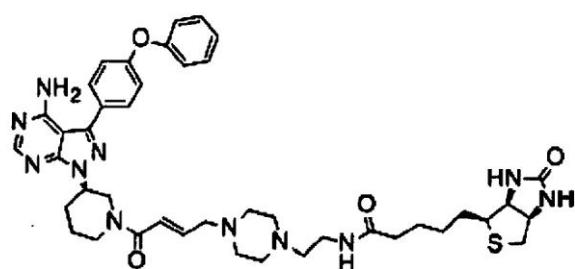
【図19】



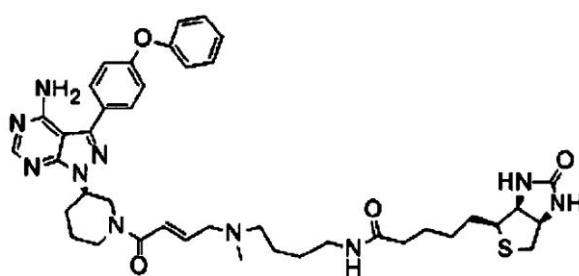
【図 2 0】



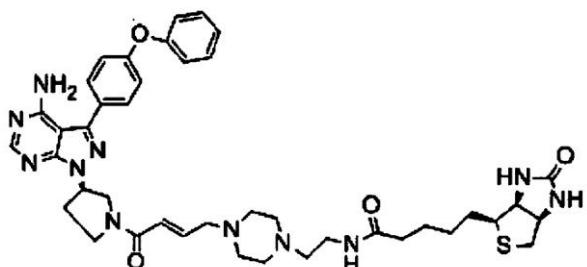
【図 2 1】



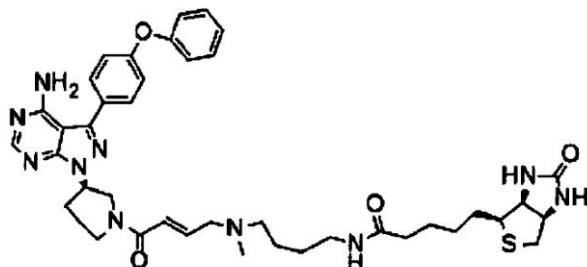
I-1



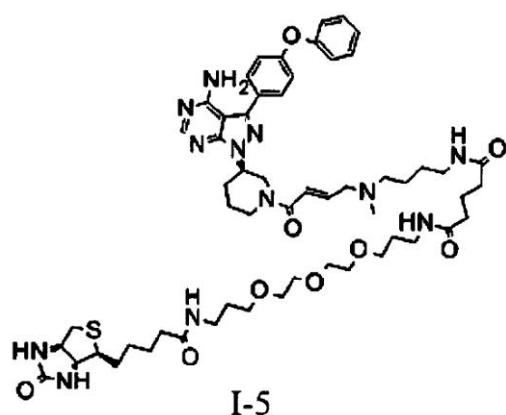
I-2



I-3



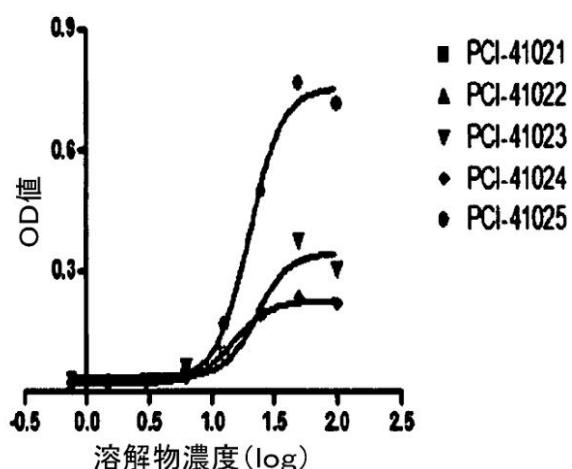
I-4



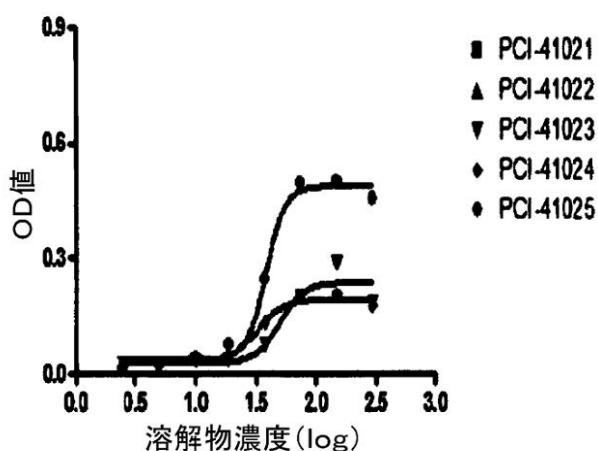
I-5

【図22】

ELISAプローブアッセイ試験－5－高プローブ



ELISAプローブアッセイ試験－5－低プローブ



【図23】

高結合プレート	1	2	3	4	5	6	7
検出	H00000640-M02	TA300020	ab37830	TA300020	ab37830	H00000640-M02	H00000640-M02
BLK							
A	22542	19665	16452	869637	883322	386557	30515
B	6101	6220	4561	878666	882760	380578	13478
C	1880	3584	2384	918974	919245	388094	10437
D	958	3089	1945	856288	904215	392825	9930
E	767	3057	1946	878888	895960	373442	10341
F	709	2925	1835	884969	898635	393484	10086
G	726	2995	1809	900005	898054	379030	10436
H	714	2695	1664	878428	887059	381092	10164
捕捉抗体 (4µg/ml)	AF2679			H00000640-M02		TA300020	ab37830
二次抗体	抗マウス	抗ウサギ			抗マウス		

標準	1	2	3	4	5	6	7
検出	H00000640-M02	TA300020	ab37830	TA300020	ab37830	H00000640-M02	H00000640-M02
BLK							
A	79754	70951	67410	980116	976332	821410	51642
B	20502	15013	13437	977669	973078	820543	18130
C	5858	4587	4421	974775	969697	760037	10510
D	2955	3108	2961	980337	975937	753261	9616
E	2186	2803	2591	980252	975122	743406	9620
F	2196	2724	2489	976511	974068	740798	9453
G	2038	2770	2466	952588	954001	750603	9775
H	1972	2857	2594	955273	953753	774825	10052
捕捉抗体 (4µg/ml)	AF2679			H00000640-M02		TA300020	ab37830
二次抗体	抗マウス	抗ウサギ			抗マウス		

〔 四 24 〕

高結合プレート

検出	H00000640-M02	TA300020	ab37830	TA300020	ab37830	H00000640-M02	H00000640-M02
BLK							
A	31.6	7.3	9.9	1.0	10	1.0	3.0
B	8.5	2.3	2.7	1.0	10	1.0	1.3
C	2.6	1.3	1.4	1.0	10	1.0	1.0
D	1.3	1.1	1.2	1.0	10	1.0	1.0
E	1.1	1.1	1.2	1.0	10	1.0	1.0
F	1.0	1.1	1.1	1.0	10	1.0	1.0
G	1.0	1.1	1.1	1.0	10	1.0	1.0
H	1	1	1	1	1	1	1
捕捉抗体 (4µg/ml)	AF2679			H00000640-M02		TA300020	ab37830
二次抗体	抗マウス	抗ウサギ				抗マウス	

標準

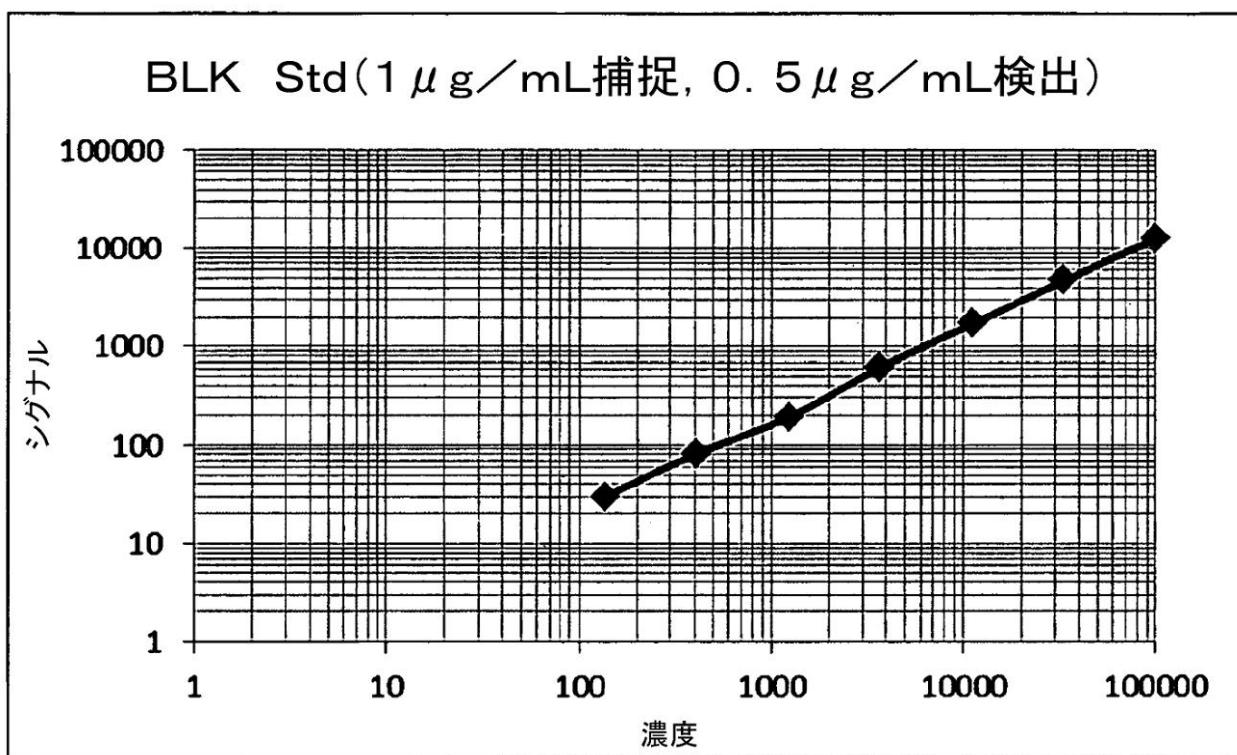
検出	H00000640-M02	TA300020	ab37830	TA300020	ab37830	H00000640-M02	H00000640-M02
BLK							
A	40.4	24.8	26.0	1.0	10	1.1	5.1
B	10.4	5.3	5.2	1.0	10	1.1	1.8
C	3.0	1.6	1.7	1.0	10	1.0	1.0
D	1.5	1.1	1.1	1.0	10	1.0	1.0
E	1.1	1.0	1.0	1.0	10	1.0	1.0
F	1.1	1.0	1.0	1.0	10	1.0	0.9
G	1.0	1.0	1.0	1.0	10	1.0	1.0
H	1	1	1	1	1	1	1
捕捉抗体 (4µg/ml)	AF2679			H00000640-M02		TA300020	ab37830
二次抗体	抗マウス	抗ウサギ				抗マウス	

【図25】

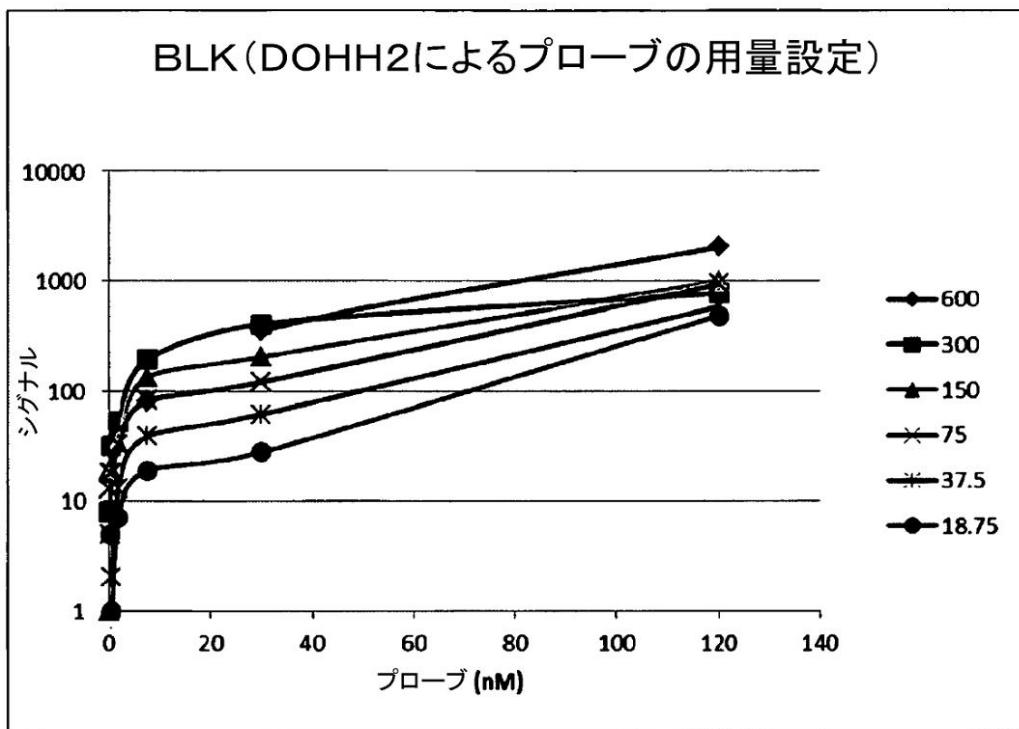
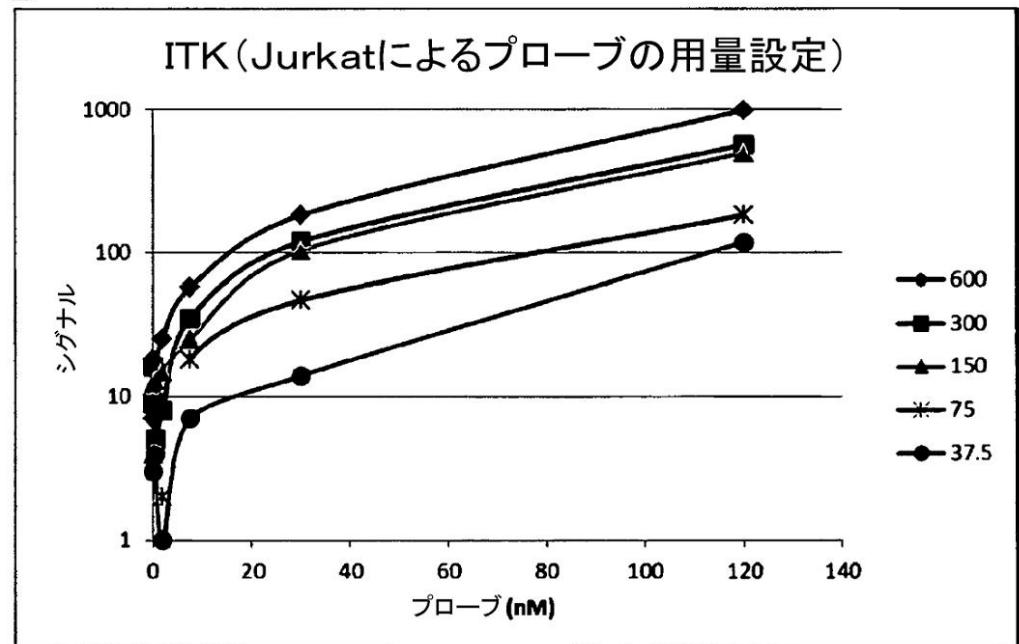
【図26】

捕捉	0.5μg/ml			1μg/ml			2μg/ml		
	34.1	23.1	13.5	46.3	28.1	16.4	42.3	37.8	24.1
100000	12.8	8.4	5.6	17.8	12.1	7.0	18.3	16.8	10.2
33333	5.1	3.9	2.6	7.1	4.8	3.2	6.6	6.2	4.1
11111	2.3	2.0	1.6	3.2	2.3	1.8	2.9	2.8	2.1
3704	1.4	1.3	1.1	1.7	1.4	1.3	1.6	1.7	1.4
1235	1.2	1.2	1.3	1.3	1.1	1.2	1.2	1.3	1.1
412	1.1	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0	0.9	1.1	1.0
137	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2
検出(μg/ml)									

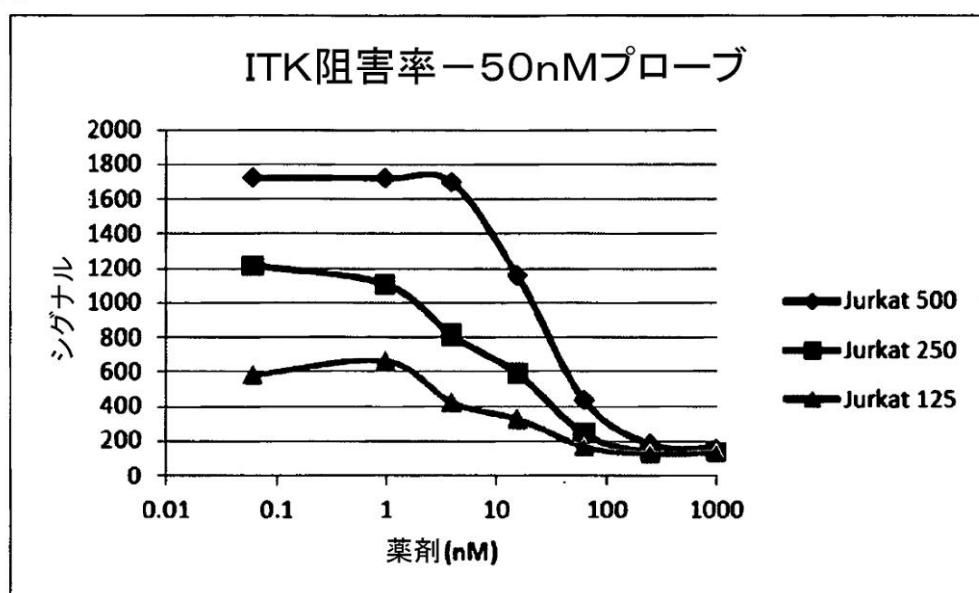
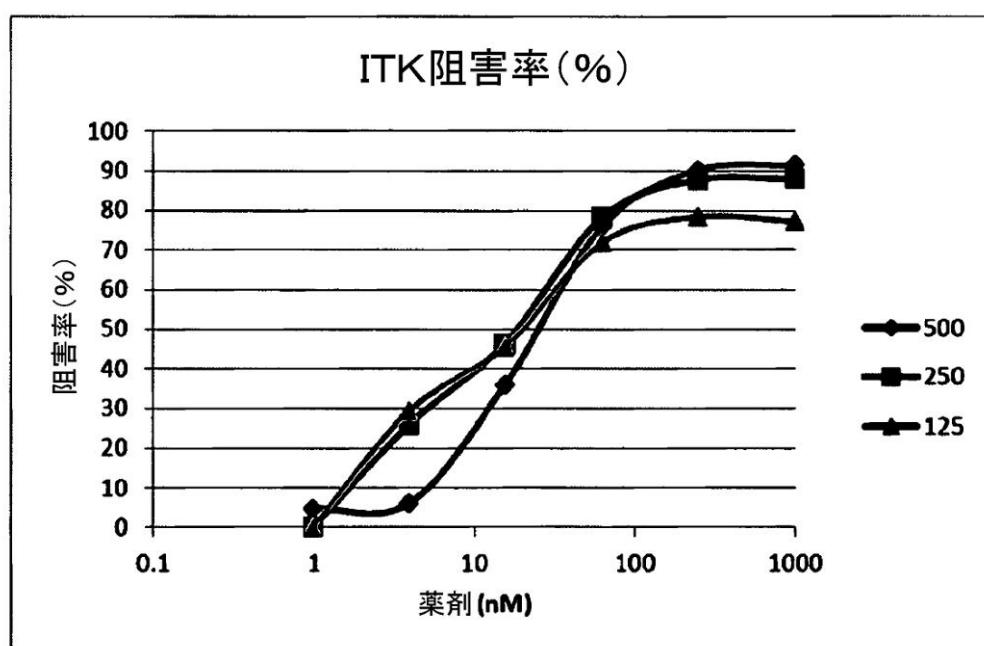
【図27】



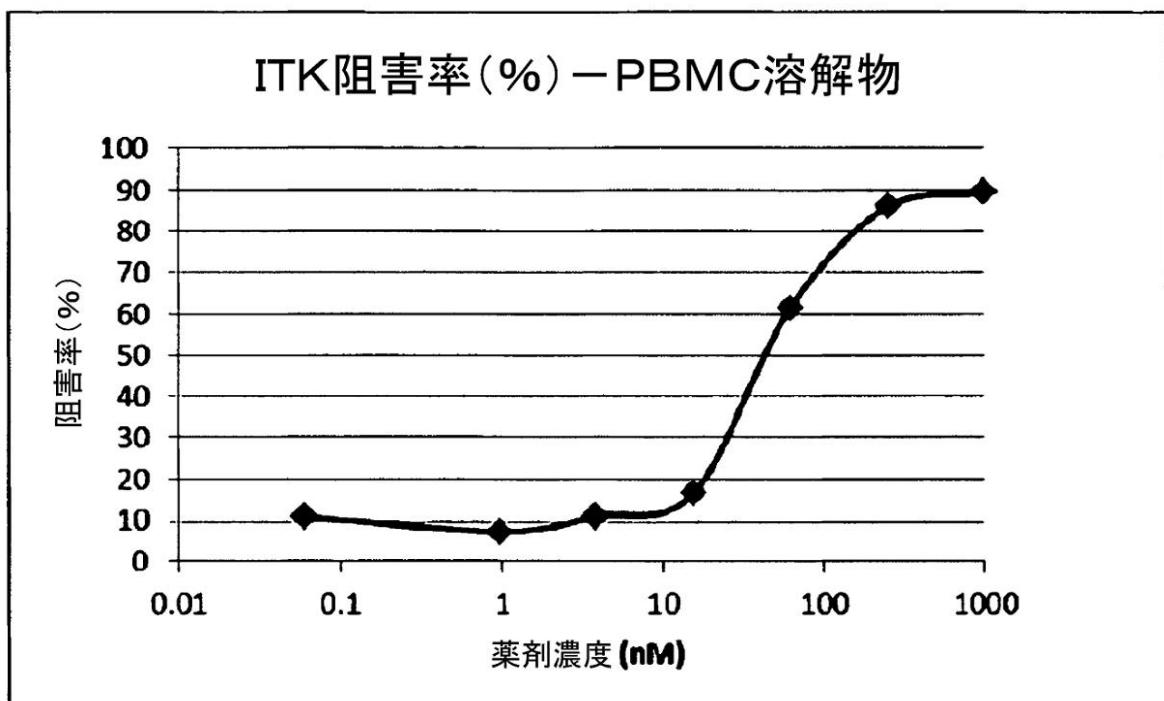
【図28】

A**B**

【図29】

A**B**

【図30】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2013/064688
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D403/12 A61K31/506 G01N33/68 G01N33/532 ADD.		
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) G01N A61K C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BEILSTEIN Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TJEERD BARF ET AL: "Irreversible Protein Kinase Inhibitors: Balancing the Benefits and Risks", <i>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY</i> , vol. 55, no. 14, 26 July 2012 (2012-07-26), , pages 6243-6262, XP055096173, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm3003203 page 6255 - page 6256; figures 17,18 ----- -/-/	1,8-12, 20-23, 26-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 20 January 2014		Date of mailing of the international search report 24/01/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/064688

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAN LOU ET AL: "Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: Approaches to Potent and Selective Inhibition, Preclinical and Clinical Evaluation for Inflammatory Diseases and B Cell Malignancies", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 55, no. 10, 24 May 2012 (2012-05-24), pages 4539-4550, XP055080230, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm300035p page 13080; figure 1 -----	1,8-12, 20-23, 26-32
X	L. A. HONIGBERG ET AL: "The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 29, 6 July 2010 (2010-07-06), pages 13075-13080, XP55080251, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1004594107 page 4543 -----	1,8-12, 20-23, 26-32
X	WO 2010/123870 A1 (AVILA THERAPEUTICS INC [US]; SINGH JUSWINDER [US]; GHOSH SHOMIR [US];) 28 October 2010 (2010-10-28) the whole document page 119 - page 124 -----	1,2, 4-13, 15-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2013/064688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010123870 A1	28-10-2010	AU 2010239444 A1 CA 2759655 A1 CN 102448462 A EP 2421538 A1 JP 2012524123 A KR 20120007055 A SG 175291 A1 US 2010016296 A1 US 2011224432 A1 US 2013065892 A1 WO 2010123870 A1	17-11-2011 28-10-2010 09-05-2012 29-02-2012 11-10-2012 19-01-2012 28-11-2011 21-01-2010 15-09-2011 14-03-2013 28-10-2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ27 QS32 QS33 QX02
4C086 AA01 AA10 BC50 GA07 GA08 GA12 NA20 ZB26 ZB27 ZC20