

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-520795

(P2005-520795A)

(43) 公表日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/47</b>	C O 7 K 14/47	2 G O 4 5
<b>A61K 31/365</b>	A 6 1 K 31/365	2 G O 5 4
<b>A61K 31/404</b>	A 6 1 K 31/404	4 C O 7 1
<b>A61K 31/4184</b>	A 6 1 K 31/4184	4 C O 8 4
<b>A61K 31/4188</b>	A 6 1 K 31/4188	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-551316 (P2003-551316)	(71) 出願人	504172359
(86) (22) 出願日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		コンフォーマ・セラピューティクス・コー ポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月27日 (2004.7.27)		CONFORMA THERAPEUTI CS CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/039993		アメリカ合衆国92121カリフォルニア 州サンディエゴ、スウィート240、タウ ン・センター・ドライブ9393番
(87) 国際公開番号	W02003/050295	(74) 代理人	100068526
(87) 国際公開日	平成15年6月19日 (2003.6.19)		弁理士 田村 恭生
(31) 優先権主張番号	60/340,762	(74) 代理人	100098925
(32) 優先日	平成13年12月12日 (2001.12.12)		弁理士 上田 敏夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100126778
			弁理士 品川 永敏
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 HSP90阻害活性を有するプリン類似体

## (57) 【要約】

レセプターまたはリガンドとしてのHSP90に適用するリガンド結合アッセイおよびそれに有用な試薬、ならびにHSP90モジュレーターのアッセイ方法およびそれにより同定して得られた生成物の使用方法を説明し、クレームする。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

高親和性形のHSP90をモジュレート(修飾)する方法であって、該高親和性形とHSP90モジュレーターを接触させることにより該高親和性形のHSP90を修飾することを含む方法。

**【請求項 2】**

低親和性形のHSP90より該高親和性形のHSP90に対して選択的である請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

低親和性形のHSP90より該高親和性形のHSP90に対し少なくとも2倍より選択的である請求項2記載の方法。

10

**【請求項 4】**

低親和性形のHSP90より該高親和性形のHSP90に対し少なくとも10倍より選択的である請求項2記載の方法。

**【請求項 5】**

低親和性形のHSP90より該高親和性形のHSP90に対し少なくとも50倍より選択的である請求項2記載の方法。

**【請求項 6】**

低親和性形のHSP90より該高親和性形のHSP90に対し少なくとも100倍より選択的である請求項2記載の方法。

**【請求項 7】**

低親和性形のHSP90より該高親和性形のHSP90に対し少なくとも500倍より選択的である請求項2記載の方法。

20

**【請求項 8】**

低親和性形のHSP90より該高親和性形のHSP90に対し約30倍～500倍より選択的である請求項2記載の方法。

**【請求項 9】**

in vitro法、所望により高処理量(スループット)スクリーニング法である請求項1または2記載の方法。

**【請求項 10】**

in vivo法である請求項1または2記載の方法。

30

**【請求項 11】**

該in vivo法が腫瘍または癌細胞と該モジュレーターを接触させることを含む請求項10記載の方法。

**【請求項 12】**

正常細胞も該モジュレーターと接触させるが、該モジュレーターが該癌または腫瘍細胞に対し比較的より選択的である請求項11記載の方法。

**【請求項 13】**

該選択性が、該癌または腫瘍細胞に対して医薬的に有効であるが、該正常細胞に対しては有効でない量で投与することにより達成される請求項12記載の方法。

**【請求項 14】**

該選択性がさらに投与計画を用いて提供される請求項13記載の方法。

40

**【請求項 15】**

該モジュレーターがHSP90インヒビターまたはアンタゴニストである請求項11記載の方法。

**【請求項 16】**

該モジュレーターがHSP90アクチベーター、アゴニスト、または部分的アゴニストである請求項11記載の方法。

**【請求項 17】**

さらにHSP90を含む試料に対するHSP90リガンドの親和性を測定することにより高親和性HSP90の存在を評価することを含む診断法である請求項1記載の方法。

50

- 【請求項 18】  
HSP90介在性疾患の治療または予防に用いる請求項1記載の方法。
- 【請求項 19】  
該HSP90介在性疾患が癌である請求項18記載の方法。
- 【請求項 20】  
高親和性形のHSP90を特異的に修飾することによりHSP90クライアントタンパク質を分解する方法。
- 【請求項 21】  
該 *in vivo*法が癌の治療または予防法である請求項10記載の方法。
- 【請求項 23】  
該HSP90が組換えHSP90である請求項17記載の方法。 10
- 【請求項 24】  
該HSP90が腫瘍または癌細胞から単離または精製された形で存在する請求項17記載の方法。
- 【請求項 25】  
該腫瘍または癌細胞が熱ショックを与えられている請求項24記載の方法。
- 【請求項 26】  
該HSP90が別の化合物と結合している請求項17記載の方法。
- 【請求項 27】  
該別の化合物がビス-ANSである請求項26記載の方法。 20
- 【請求項 28】  
該別の化合物がHSP90クライアントタンパク質またはコシャペロン (co-chaperone) である請求項26記載の方法。
- 【請求項 29】  
該モジュレーターがプリンもしくはプリン類似体、アンサマイシン、ラディシコール、ゼアラノール (zearalanol)、ATP類似体、インドール、シャルコン、およびベンゾイミダゾールからなる群から選ばれるメンバーである請求項1～8のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 30】  
該高親和性HSP90が哺乳動物細胞または哺乳動物細胞溶解物中に存在する請求項1～8のいずれかに記載の方法。 30
- 【請求項 31】  
哺乳動物細胞がヒトのものである請求項30記載の方法。
- 【請求項 32】  
該高親和性HSP90が溶解物の形で存在する請求項30記載の方法。
- 【請求項 33】  
癌または腫瘍細胞中にみいだされる高親和性形のHSP90を提供し、該HSP90形を所定の化合物と接触させ、該化合物の該HSP90形を修飾する能力を測定または評価することを含むHSP90モジュレーターのスクリーニング方法。
- 【請求項 34】  
*in vitro*法である請求項33記載の方法。 40
- 【請求項 35】  
*in vitro*法、所望により高処理量スクリーニング法である請求項33記載の方法。
- 【請求項 36】  
*in vivo*法である請求項33記載の方法。
- 【請求項 37】  
該形が全細胞もしくは組織、細胞溶解物中に提供されるか、または該全細胞、組織または細胞溶解物から単離もしくは精製される請求項33記載の方法。
- 【請求項 38】  
該全細胞、組織または細胞溶解物が腫瘍性もしくは癌性である請求項37記載の方法。
- 【請求項 39】 50

該能力を低親和性HSP90形の能力と比較することを含む請求項33記載の方法。

【請求項40】

該モジュレーターがHSP90インヒビタまたはアンタゴニストである請求項33～39のいずれかに記載の方法。

【請求項41】

該モジュレーターがHSP90アクチベーターまたはアゴニストである請求項33～39記載の方法。

【請求項42】

該モジュレーターがプリンもしくはプリン類似体、アンサマイシン、ラディシコール、ゼアラノール、ATP類似体、インドール、シャルコン、およびベンゾイミダゾールからなる群から選ばれるメンバーである請求項33記載の方法。

10

【請求項43】

請求項1～8のいずれかに記載の方法に従って医薬的有効量の化合物またはその医薬的に許容される塩を対象に投与することを含むHSP90介在性疾患の治療または予防方法。

【請求項44】

請求項1～8のいずれかに記載の方法に従って確認された医薬的有効量の化合物またはその医薬的に許容される塩を対象に投与することを含むHSP90介在性疾患の治療または予防方法。

【請求項45】

該疾患が癌または腫瘍である請求項43または44に記載の治療または予防方法。

20

【請求項46】

該癌または腫瘍がメラノーマ、もしくは乳・肺・前立腺癌または腫瘍から選ばれる請求項45記載の治療または予防方法。

【請求項47】

該対象の細胞が過剰なレベルのHer-2転写物またはタンパク質を発現する請求項43または44記載の治療または予防方法。

【請求項48】

該対象の細胞が過剰なレベルのHSP90クライアントタンパク質を発現する請求項43または44記載の治療または予防方法。

【請求項49】

該疾患がウイルス感染症である請求項43または44記載の治療または予防方法。

30

【請求項50】

該投与が経口または局所的である請求項43または44記載の治療または予防方法。

【請求項51】

該投与が非経口的である請求項43または44記載の治療または予防方法。

【請求項52】

該投与がin situである請求項43または44記載の治療または予防方法。

【請求項53】

該対象が哺乳動物である請求項43または44記載の治療または予防方法。

【請求項54】

該哺乳動物がヒトである請求項53記載の方法。

40

【請求項55】

該治療が化学療法投与計画の一部である請求項43記載の方法。

【請求項56】

放射性同位元素、抗体、組換え産物、小分子、抗腫瘍薬、ヘルセプチン、タキソール、タキサンおよびタキサン誘導体、グリベック、アルキル化剤、抗代謝薬；エピドフィロトキシシン；抗腫瘍酵素；トポイソメラーゼインヒビター；プロカルバジン；ミトキサントロン；プラチナ配位錯体；生物反応修飾物質/成長阻害剤；ホルモン性/抗ホルモン性治療剤および造血成長因子、アントラサイクリン薬、ビンカ薬、マイトマイシン、プレオマイシン、細胞毒性ヌクレオシド、テボチロン、ジスコデルモリド、プテリジン薬、ジイネン、

50

ポドフィロトキシン、カルミノマイシン、ダウノルピシン、アミノプテリン、メトトレキセート、メトプテリン、ジクロロメトトレキセート、マイトマイシンC、ポルフィロマイシン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド、ポドフィロトキシン、ポド-フィロトキシン誘導体、エトポシド、エトポシドホスフェートもしくはテニポシド、メルファラン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ラウロシジン、ビンデシン、ラウロシン、パクリタキセル、エストラムスチン、カルボプラチン、シクロフォスファミド、ブレオマイシン、ゲムシタビン、イフォサミド、メルファラン、ヘキサメチルメラミン、チオテパ、シタラビン、イダトレキセート、トリメトレキセート、ダカルバジン、L-アスパラギナーゼ、カンプトテシン、CPT-11、トポテカン、アラ-C、ピカルタミド、フルタミド、ロイプロリド、ピリドベンゾインドール誘導体、インターフェロン、およびインターロイキンからなる群から選ばれる、医薬的有効量の1またはそれ以上の化合物またはその医薬的に許容される塩を投与することをさらに含む請求項55記載の方法。

10

【請求項 57】

HSP90モジュレーターに高親和性の結合を示す腫瘍または癌細胞から得られる精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 58】

該構造が約30nMまたはそれ以下の17-AAG IC50値を有する請求項57記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 59】

該構造が約10nMまたはそれ以下の17-AAG IC50値を有する請求項57記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

20

【請求項 60】

該構造が一部熱ショックにより生成される請求項57記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 61】

メラノーマ、乳癌、または肺癌細胞中にみいだされる請求項57記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 62】

該腫瘍または癌細胞にみられるより少なくとも1%より純粋な請求項57記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

30

【請求項 63】

該腫瘍または癌細胞にみられるより少なくとも10%より純粋な請求項57記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 64】

該腫瘍または癌細胞にみられるより少なくとも50%より純粋な請求項63記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 65】

該腫瘍または癌細胞にみられるより少なくとも90%より純粋な請求項64記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

40

【請求項 66】

該腫瘍または癌細胞にみられるより少なくとも95%より純粋な請求項65記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 67】

該腫瘍または癌細胞にみられるより少なくとも99%より純粋な請求項66記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 68】

該腫瘍または癌細胞にみられるより少なくとも99.9%より純粋な請求項66記載の精製または単離されたHSP90調製物または複合体。

【請求項 69】

50

(a)請求項57～68のいずれかに記載のHSP90調製物または複合体、および(b)該HSP90と結合する化合物からなる群から選ばれる1またはそれ以上のメンバーを含む診断キット。

【請求項70】

HSP90の該調製物が全細胞の形である請求項69記載の診断キット。

【請求項71】

HSP90アクチベーターおよびHSP90インヒビターからなる群から選ばれる1またはそれ以上のメンバーをさらに含む請求項69記載の診断キット。

【請求項72】

17-AAGに対する比較的低い結合親和性を有する別個の構造中にHSP90の第二調製物をさらに含む請求項69記載の診断キット。

10

【請求項73】

所望によりさらに樹脂、溶解用緩衝液、標識HSP90リガンド、およびプロトコールからなる群から選ばれる1またはそれ以上のメンバーを含む、臨床使用するための請求項69記載の診断キット。

【請求項74】

該標識HSP90リガンドがビオチンと結合したゲルダナマイシンである請求項69記載の診断キット。

【請求項75】

所定の化合物と腫瘍または癌細胞にみいだされる特定の形のHSP90との結合を測定するアッセイ。

20

【請求項76】

競合結合アッセイである請求項75記載のアッセイ。

【請求項77】

該競合結合アッセイがさらに該所定の化合物との結合に競合する標識HSP90リガンドメンバーを使用する請求項76記載のアッセイ。

【請求項78】

該HSP90リガンドメンバーがビオチン化されている請求項77記載のアッセイ。

【請求項79】

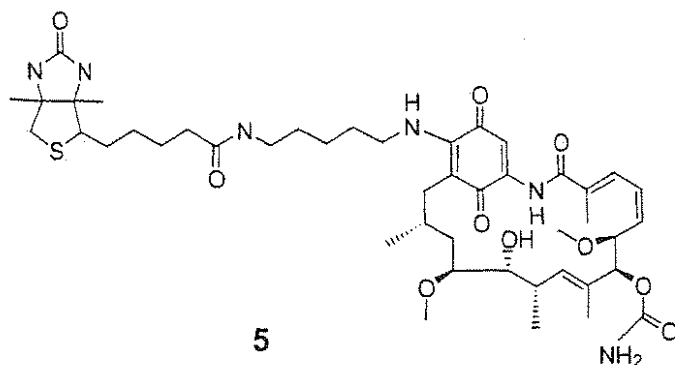
該HSP90リガンドメンバーがプリンまたはプリン類似体、アンサマイシン、ラディシコール、ゼアララノール、ATP類似体、インドール、シャルコン、およびベンゾイミダゾールからなる群から選ばれる請求項78記載のアッセイ。

30

【請求項80】

該HSP90リガンドが以下の構造：

【化1】



40

で示されるアンサマイシンである請求項78または79記載のアッセイ。

【請求項81】

該アッセイがさらにアビジンまたはストレプトアビジン成分を使用する請求項80記載のアッセイ。

50

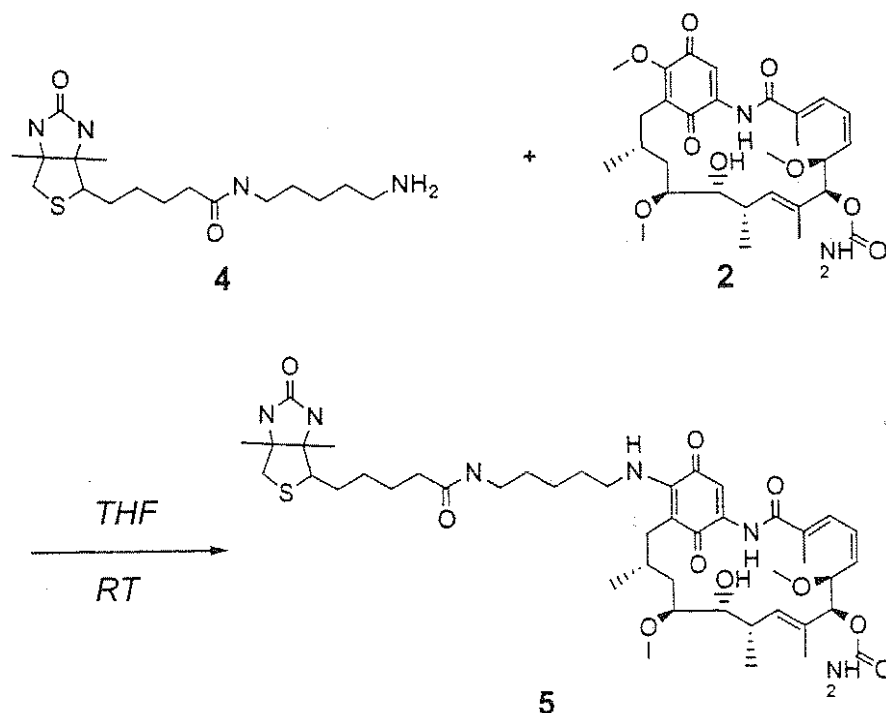
## 【請求項 8 2】

アビジンまたはストレプトアビジンが固体支持体と結合している請求項81記載のアッセイ。

## 【請求項 8 3】

下記反応式：

## 【化 2】



10

20

を含む請求項80記載のビオチン化アンサマイシンの製造方法。

## 【請求項 8 4】

所定の化合物のHSP90との結合能を評価する方法であって、あるまたはその他の該HSP90リガンドメンバーおよび該化合物の所定メンバーが該HSP90メンバーと複合体を形成し、  
該固体支持体上に保持されるに十分な条件下で、固体支持体上に一緒にHSP90メンバー、HSP90リガンドメンバー、および化合物の所定メンバー（該メンバーの1つは標識を含む）を供給し、

30

該固体支持体上で複合体を形成していないかまたは該支持体と結合していないメンバーを除去し、

該化合物の所定メンバーの該HSP90メンバーとの結合能の尺度として該固体支持体における該標識の存在をアッセイする工程を含む方法。

## 【請求項 8 5】

該HSP90メンバーが該固体支持体と結合しており、該HSP90リガンドメンバーが標識されている請求項84記載の方法。

40

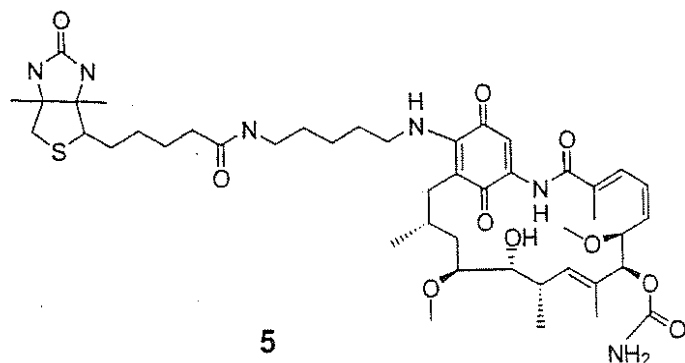
## 【請求項 8 6】

該HSP90メンバーがアンサマイシンおよびプリンからなる群から選ばれる請求項85記載の方法。

## 【請求項 8 7】

該HSP90リガンドメンバーがビオチン化されており、式5：

## 【化 3】



10

で示される構造を含み、また、実際に該標識がさらに該構造と結合したアビジンまたはストレプトアビジン成分を含む請求項86記載の方法。

## 【請求項 8 8】

該固体支持体が高処理量スクリーニングに適したマルチウェルプレートである請求項84記載の方法。

## 【請求項 8 9】

該マルチプレートが複数個のウェルを有し、該プレート上の2またはそれ以上の該複数個のウェル間に異なる濃度の1またはそれ以上の該メンバーが存在する請求項88記載の方法。

20

## 【請求項 9 0】

該標識が励起可能な蛍光または化学ルミネッセント分子を含み、工程(c)が所望により該標識を検出するための分光蛍光光度計または照度計の使用を含む請求項77に記載の方法。

## 【請求項 9 1】

該励起可能な蛍光または化学ルミネッセント分子が、所望により、ストレプトアビジンと結合した、波長485nmのエネルギーで励起可能であり、波長580nmの放射を生じるフィコエリスリンである請求項90記載の方法。

30

## 【請求項 9 2】

標識アンサマイシンを含む組成物。

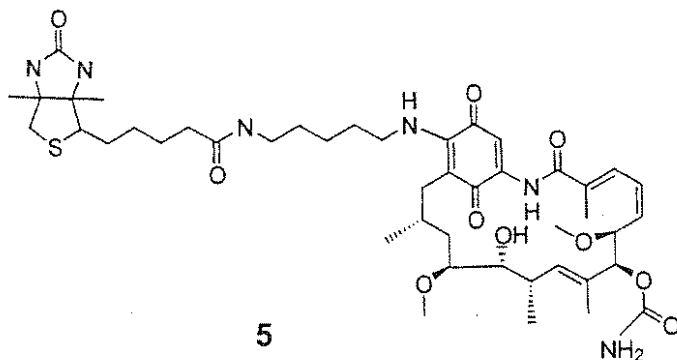
## 【請求項 9 3】

該標識アンサマイシンがビオチン化アンサマイシンである請求項92記載の組成物。

## 【請求項 9 4】

該ビオチン化アンサマイシンが式：

## 【化 4】



40

を包含する請求項93記載の組成物。

## 【請求項 9 5】

50

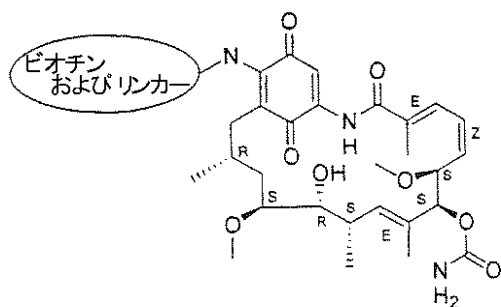


所望により固体支持体と結合したHSP90と結合したビオチン化アンサマイシンを含む複合体。

【請求項 9 6】

該ビオチン化アンサマイシンが構造：

【化 5】



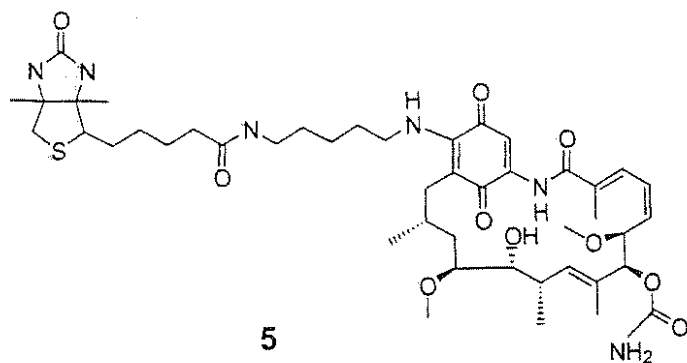
10

を有する請求項95記載の複合体。

【請求項 9 7】

該ビオチン化アンサマイシンが式：

【化 6】



5

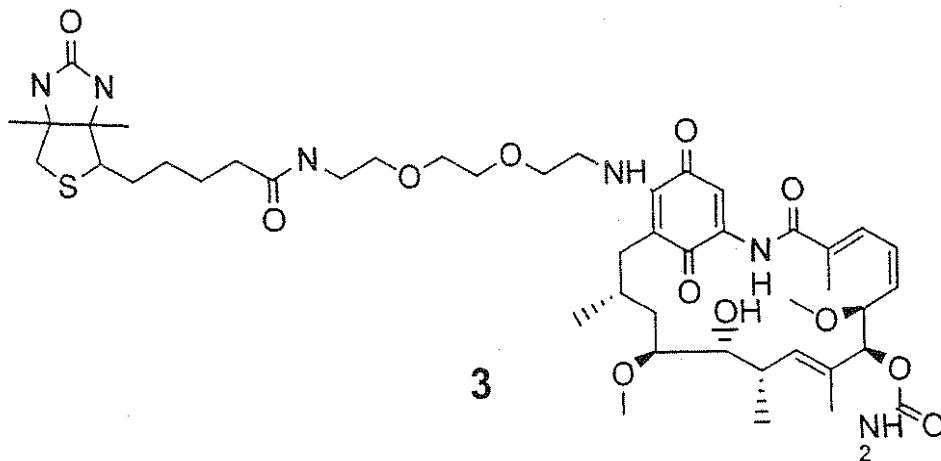
20

を包含する請求項95記載の複合体。

【請求項 9 8】

式 3：

【化 7】



3

40

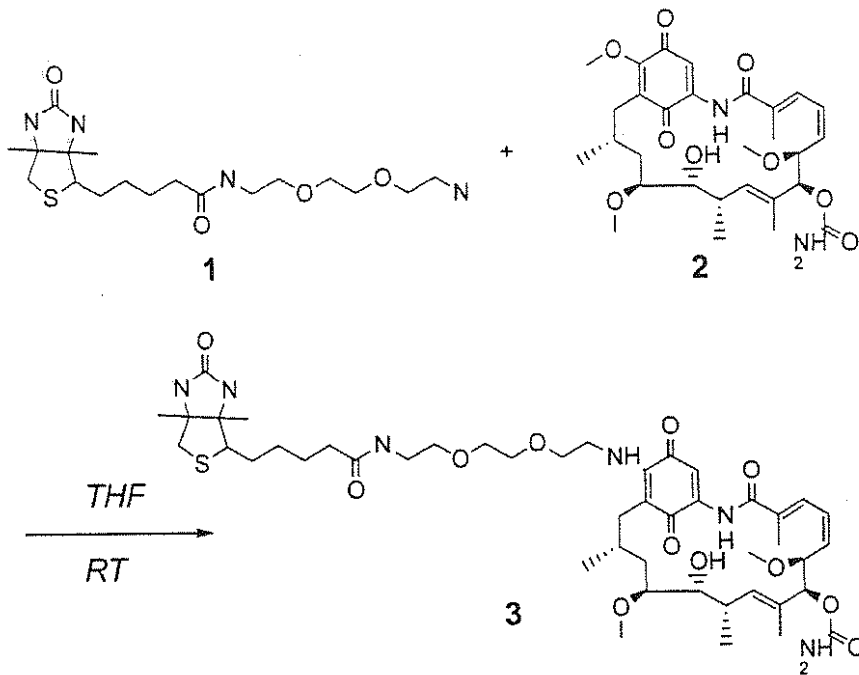
で示される化合物。

【請求項 9 9】

50

下記反応：

【化 8】



10

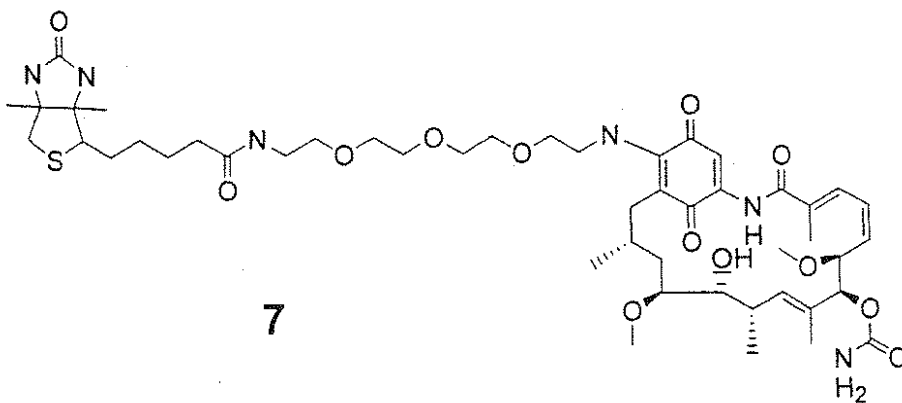
20

を包含する請求項98記載のビオチン化アンサマイシンの製造方法。

【請求項 1 0 0】

式 7：

【化 9】



30

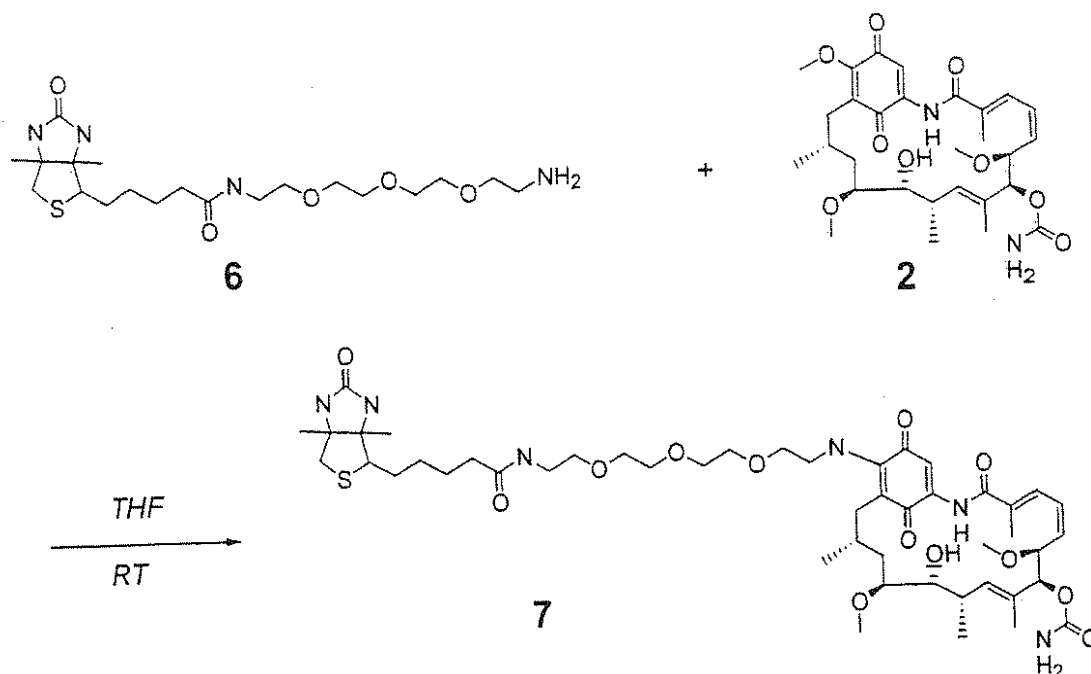
で示される化合物。

【請求項 1 0 1】

下記反応式：

40

## 【化 10】



10

20

を包含する請求項100記載のビオチン化アンサマイシンの製造方法。

## 【請求項 102】

哺乳動物細胞の部分または細胞溶解物である請求項92-98、または100のいずれかに記載の化合物、組成物、または複合体。

## 【請求項 103】

該細胞または細胞溶解物がヒトのものである請求項102記載の化合物または複合体。

## 【請求項 104】

該HSP90が癌または腫瘍細胞、または癌または腫瘍細胞溶解物中にある請求項95記載の複合体。

30

## 【請求項 105】

マイクロタイター皿、ウェル、プレート、ビーズ、または他の固体支持体上に存在する請求項95記載の複合体。

## 【請求項 106】

マイクロタイター皿、ウェル、プレート、ビーズ、または他の固体支持体上に存在する請求項95記載の複合体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、一般に、リガンド結合および結合親和性を評価するためのアッセイ、より具体的には熱ショックタンパク質90(「HSP90」)結合アッセイに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

以下の説明には、本発明を理解するのに有用と思われる情報が含まれる。本明細書に記載のあらゆる情報が、先行技術であるか、本発明に関連があるか、または具体的もしくは暗に参照しているあらゆる刊行物が先行技術であることを承認しない。

## 【0003】

17-アリルアミノ-ゲルダナマイシン(17-AAG)は、合成ゲルダナマイシン類似体(GDM)である。両分子はアンサマイシンとして知られる抗生物質分子の広いクラスに属する。微生物

40

50

物の *Streptomyces hygroscopicus* から最初に単離された GDM は、最初はある種のキナーゼの強力な阻害剤として同定され、後にキナーゼの分解を促進することにより、具体的には、「分子シャペロン」、例えば熱ショックタンパク質 90 (HSP90) を標的とすることにより作用することが示された。次いで、種々の他のアンサマイシンが多かれ少なかれそのような活性を示し、最も有望なものに 17-AAG があり、現在 National Cancer Institute (NCI) により集中的に臨床試験が行われている。例えば、Federal Register, 66(129): 35443-35444; Erlichman ら、Proc. AACR (2001), 42, 要約 4474 参照。

#### 【 0 0 0 4 】

HSP90 は、シグナル伝達、細胞周期制御、および転写調節に關与するキータンパク質を含む広範囲のタンパク質のホールディング、活性化、および構築に關与する遍在性シャペロンタンパク質である。HSP90 シャペロンタンパク質は、例えば、Raf-1、EGFR、v-Src ファミリーキナーゼ、Cdk4、および ErbB-2 を含むステロイドホルモンレセプターおよびタンパク質キナーゼのような重要なシグナリングタンパク質と関連すると研究者が報告している (Buchner J., 1999, TIBS, 24:136-141; Stepanova, L. ら、1996, Genes Dev. 10:1491-502; Dai, K. ら、1996, J. Biol. Chem. 271:22030-4)。研究はさらに、ある種のコシャペロン (co-chaperone)、例えば、Hsp70、p60/Hop/Stil、Hip、Bag1、HSP40/Hdj2/Hsj1、イムノフィリン、p23、および p50 がその機能において HSP90 を補助するかも知れないことを示唆している (例えば、Caplan, A., 1999, Trends in Cell Biol., 9: 262-68 参照)。

#### 【 0 0 0 5 】

アンサマイシン抗生物質、例えばヘルビマイシン A (HA)、ゲルダナマイシン (GM)、および 17-AAG は、HSP90 の N 末端ポケットと堅く結合することによりその抗癌効果を発揮すると考えられる (Stebbins, C. ら、1997, Cell, 89: 239-250)。このポケットは高度に保存されており、DNA ギラーゼの ATP 結合部位と弱い相同性を有する (Stebbins, C. ら、上記; Grenert, J. P. ら、1997, J. Biol. Chem., 272: 23843-50)。さらに、ATP および ADP は共に、このポケットと低親和性に結合し、弱い ATP アーゼ活性を有することが示されている (Proromou, C. ら、1997, Cell, 90: 65-75; Panaretou, B. ら、1998, EMBO J., 17: 4829-36)。in vitro および in vivo 試験は、この N 末端ポケットをアンサマイシンおよび他の HSP90 阻害剤 (インヒビター) が占有すると HSP90 機能が変化し、タンパク質のホールディングを阻害することを示した。より高濃度でアンサマイシンおよび他の HSP90 阻害剤は、タンパク質基質の HSP90 への結合を妨げることが示された (Scheibel, T. H. ら、1999, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96: 1297-302; Schulte, T. W. ら、1995, J. Biol. Chem. 270: 24585-8; Whitesell, L. ら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91: 8324-8328)。アンサマイシンが、シャペロン関連タンパク質基質の ATP 依存性放出を阻害することも立証されている (Schneider, C., L. ら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93: 14536-41; Sepp-Lorenzino ら、1995, J. Biol. Chem. 270:16580-16587)。いずれにおいても、該基質はプロテオソーム中でユビキチン依存性プロセスにより分解する (Schneider, C., L., 上記; Sepp-Lorenzino, L. ら、1995, J. Biol. Chem., 270: 16580-16587; Whitesell, L. ら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8324-8328)。

#### 【 0 0 0 6 】

この基質の不安定化は腫瘍および非形質転換細胞などに生じ、シグナリング調節物質のサブセット、例えば Raf (Schulte, T. W. ら、1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 655-9; Schulte, T. W. ら、1995, J. Biol. Chem. 270:24585-8)、核ステロイドレセプター (Segnitz, B., および U. Gehring. 1997, J. Biol. Chem. 272: 18694-18701; Smith, D. F. ら、1995, Mol. Cell. Biol. 15: 6804-12)、v-src (Whitesell, L. ら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91: 8324-8328)、およびある種の貫膜チロシンキナーゼ (Sepp-Lorenzino, L. ら、1995, J. Biol. Chem. 270:16580-16587)、例えば EGFR レセプター (EGFR) および Her2/Neu (Hartmann, F. ら、1997, Int. J. Cancer 70: 221-9; Miller, P. ら、1994, Cancer Res. 54: 2724-2730; Mimnaugh, E. G. ら、1996, J. Biol. Chem. 271:22796-801; Schnur, R. ら、1995, J. Med. Chem. 38: 3806-3812)、CDK4、および突然変異体 p53. (Erlichman ら、Proc. AACR (2001), 42, 要約 4474) に対して特に有効であることが示

10

20

30

40

50

されている。これらタンパク質のアンサマイシン誘発性損失は、ある種の調節経路の選択的崩壊をもたらし、そのように処理した細胞の細胞周期の特定の期での増殖停止(Muise-H eimericks、R. C.ら、1998、J. Biol. Chem. 273: 29864-72)、およびアポプトーシス、および/または分化(Vasilevskaya、A.ら、1999、Cancer Res.、59: 3935-40)をもたらす。すなわち、アンサマイシンおよびHSP90リガンドは、一般に、多くの種類の癌および増殖性疾患の治療および/または予防に大いに期待できる。

#### 【0007】

抗癌および抗腫瘍作用に加え、HSP90阻害剤は、抗炎症剤、抗感染性疾患剤、自己免疫治療剤、虚血治療剤、および神経再生を促進するのに有用な薬剤としての使用を含む広範囲の他の有用性にも関与していた(例えば、Rosenら、W002/09696; PCT/US01/23640; Degrancoら、W099/51223; PCT/US99/07242; Gold、米国特許6,210,974 B1参照)。限定されるものではないが、強皮症、多発性筋炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎、肝硬変、ケロイド形成、間質性腎炎、および肺繊維症を含む繊維形成誘導性障害も治療可能であるかもしれないことが文献に報告されている(Strehlow、W0 02/02123; PCT/US01/20578)。さらなるHSP90調節、モジュレーターおよびその使用は、PCT/US98/09805、PCT/US00/09512、PCT/US01/09512、PCT/US01/23640、PCT/US01/46303、PCT/US01/46304、PCT/US02/06518、PCT/US02/29715、PCT/US02/35069、PCT/US02/35938、60/293,246、60/371,668、60/331,893、60/335,391、06/128,593、60/337,919、60/340,762、60/355,275、60/367,055、および60/359,484に記載されている。

#### 【0008】

最近、Nicchittaら、W0 01/72779 (PCT/US01/09512)は、HSP90が熱ショックおよび/またはフルオロフォアのビス-ANSによる結合によって種々のコンフォメーション(構造)をとりうることを明らかにした。具体的には、Nicchittaらは、この誘導された構造が正常細胞に優勢な異なる形のHSP90よりある種のHSP90リガンドにより高い親和性を示すことを明らかにした。

#### 【0009】

HSP90リガンドの同定および評価における基本工程は、そのHSP90に対する結合親和性を好都合にアッセイできることである。種々の非同位体法(例えば比色分析的、酵素的、および濃度測定的)は、健康および廃棄上の理由で同位体法より好ましい他の状況において十分な感度を提供し、Chiosisら、Chemistry and Biology 8: 289-299 (2001)は、最近、HSP90リガンドの能力を評価するための方法を記載した。しかしながら、Chiosisの方法は、ゲルを操作し、プロットし、次いで抗体でプローブする必要がある観点から煩雑で時間がかかる。Chiosisアッセイは、さらに高処理量(スループット)スクリーニングを好都合に支持するその能力に制限がある。さらに、Chiosisらは正常、健康細胞に特徴的な標準形のHSP90を用いたようである。

#### 【0010】

したがって、HSP90と結合する化合物の高処理量スクリーニングおよび評価を容易にするには、別の、好ましくは単純化されたアッセイが必要である。臨床試験を裏づけるための異常細胞、例えば癌または腫瘍細胞にみられるものにより酷似するか、よく似たHSP90の形も必要である。

(発明の要約)

#### 【0011】

本発明は、HSP90リガンドを同定および/または評価するのに好都合な結合アッセイおよび試薬を特徴とする。次に、それにより同定されたリガンドを用いて種々のHSP90介在性疾患を治療または予防することができる。

#### 【0012】

第一の局面において、本発明は、必ずではないが好ましくは競合結合アッセイであるアッセイを特徴とする。該アッセイは、実際にHSP90との複合体形において第二HSP90リガンドにより多かれ少なかれ置換されるか、または該リガンドと置換する、標識された第一HSP90リガンドを特徴とする。第二リガンドは標識されていなくても、第一リガンドと別の

10

20

30

40

50

標識がなされていてもよい。少なくとも1のリガンドは、好ましくは予めHSP90リガンドであることが知られており、HSP90に対するそのリガンド能は好ましくは実質的に標識の存在に影響されない。第二リガンドも標識されている態様において、HSP90に対するその結合能も、好ましくは実質的にそれに結合する標識の存在による影響を受けない。標識の存在をアッセイすることにより固体支持体マトリックス上のHSP90:リガンド複合体の保持と検出を可能にすることによりアッセイを好都合に簡素化することができよう。当業者が理解するであろうように、そのような系は高処理量スクリーニングに十分役立ち、種々の構造をとりうる。ラベルの存在または非存在の相対量はリガンド結合能を決定する。これは、所定の化合物が適切なリガンドであるか否かを決定する診断的、定量的アプローチ、そして/または1またはそれ以上の所定のリガンドに対する正確なおよび/または相対的結合親和性を決定するために計画した定量的アプローチであり得る。 10

#### 【0013】

標識は種々の形をとりうる。それらはリガンドに、また、特定の態様に応じてHSP90(レセプター)にも直接または間接的に結合することができよう。直接アプローチの例は、例えば蛍光(fluor)、色素、酵素、または放射性同位元素がリガンドまたはレセプターに共有結合し、標識をもたらすものである。間接アプローチの例は、既知のコントロールリガンドまたはレセプターがビオチン化されたビオチン:アビジンまたはビオチン:ストレプトアビジン結合であり、別個のアビジン/ストレプトアビジン成分は、技術的に別の分子上にあるがビオチン化合物の近くに取り込まれ、標識を提供する。標識は、放射性、蛍光的、比色分析的、酵素的、濃度測定的、および/またはあるリガンドもしくはリガンド:レセプター複合体を別のリガンドもしくはリガンド:レセプター複合体と区別することができる他のあらゆるものであり得る。そのような検出法を実施もしくは助ける種々の装置が当該分野でよく知られており、これには例えば分光蛍光光度計、分光光度計、質量分析計および光散乱装置、濃度計、蛍光発色セルソーター(FACS)、適切なカラーフィルターを有するカメラおよびデジタルもしくは非デジタル画像装置、シンチレーションカウンター、照度計などが含まれる。 20

#### 【0014】

固体支持体マトリックスを利用する態様において、該成分メンバーの1つであるリガンドまたはレセプターは、対応する結合メンバー(どちらのメンバーが付着するかに応じて、レセプターまたはリガンド)と複合体を形成する時でもそれが付着を維持するように固体支持体と付着させる。付着および的確な固体支持体組成物および構造は当該分野でよく知られた技術にしたがって変化し得る。ある態様の類似の例には、抗体分子を、固体支持体に固定し、抗原のスクリーニングに用いる(または反対もある)酵素免疫測定法(ELISA)がある。 30

#### 【0015】

コントロール(既知)リガンドおよびレセプター(HSP90)両方が同じ標識で標識される可能性があり、複合体は、検出装置もしくは手段を閾値標識強度で調製し、および/または非複合体化、標識および付着/結合成分により提供される基礎強度を引くことにより非複合体と区別される。適切な陽性および/または陰性コントロールはこれを容易にし、本発明のアッセイ法に含めてよい。 40

#### 【0016】

コントロール(標準/既知)HSP90リガンドは、このましくはHSP90のN末端ATP結合ポケットに結合するものであり(Stebbins, C.ら、1997, Cell, 89:239-250)、これには限定されるものではないがアンサマイシンやプリンのような分子が含まれる。第一の例には例えばゲルダナマイシンが含まれ、第二の例には例えばPU3が含まれる(例えばChiosisら、上記)。当業者は、ゲルダナマイシンおよびPU3の代わりに置き換えることができる多くの他のアンサマイシンおよびプリンが存在することを理解するであろう。

#### 【0017】

本発明のアッセイは個々の成分すべてが生細胞の外部に存在するin vitroアッセイであり得る。あるいはまた、該アッセイは、レセプターおよびリガンドが生細胞と接触するか 50

、または生細胞中に本質的に存在する *in vivo* でなされ得る。当該分野でよく知られているように細胞は、種々の固体支持体マトリックスに付着させることもできる。したがって、溶解物中に存在するかまたは精製される HSP90 分子または複合体を単離することができる。

#### 【0018】

別の局面において、本発明は、HSP90 と結合する所定の化合物の能力を評価する方法を特徴とする。該方法は、固体支持体上で3つのメンバー (HSP90、既知 HSP90 リガンド、および第二の考えられる HSP90 リガンド) を、1またはそれ以上のレセプター：リガンド複合体が形成され、その上に保持されるように接触させることを特徴とする。固体支持体上の保持は、例えば該メンバーの1つ、例えば少なくとも1の他のメンバーにより結合させることができるが、複合体を形成することができるように該支持体に付着または結合している HSP90 メンバーによりもたらされる。非結合 (非付着) および非複合体化成分を支持体から好都合に洗浄除去し、支持体上の複合体のみおよび付着/結合部分のみを残し、次いで標識の存在を評価することができる。存在する標識の量は、特定の HSP90 リガンドの善し悪しを決定する。種々の既知および未知 HSP90 リガンド間の比較および序列的ランキングもいくつかの態様のために検討される。特許請求の範囲 (クレーム) は1つのメンバーを列挙するが、そのようなメンバーの均質なポピュレーションがその中に存在しうること、および検出した標識は固体支持体上に保持されるポピュレーションの標識された種の総数を代表することは明らかである。さらに、クレームの用語「除去する」は必ずしも完全に100% 除去することを意味しない。

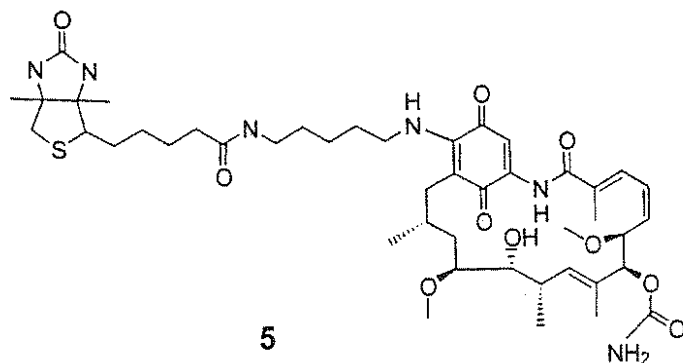
10

20

#### 【0019】

ある好ましい態様において、HSP90 メンバーを固体支持体と結合/付着させ、HSP90 コントロールリガンドメンバーを標識し、リガンドの能力 (所定の化合物) を試験または評価すべき化合物を他から区別することができるように別に標識するかまたは標識しない。いくつかの好ましい態様においてコントロール HSP90 リガンドメンバーはビオチン化され、式5：

#### 【化1】



30

[ ここで、該標識は実際にはさらに該構造に静電的に結合した独立したアビジンまたはストレプトアビジン部分を含む。 ]

40

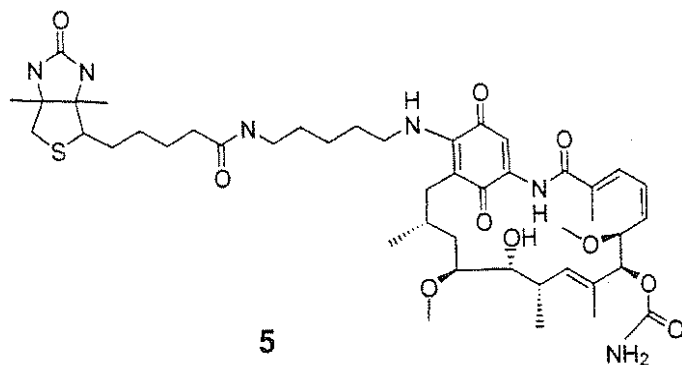
で示される構造を含む。

#### 【0020】

ある態様において、固体支持体は高処理量スクリーニングに適したマルチウェルプレートである。高処理量スクリーニング目的または非高処理量スクリーニング目的で当業者が利用できる固体支持体の種々の組成物および構造が存在する。マルチウェルプレートを有するある態様において、プレート上の2またはそれ以上の異なるウェル間に異なる濃度の1またはそれ以上の結合メンバーがある。

#### 【0021】

## 【化 2】



10

で示されるものにより提供される。

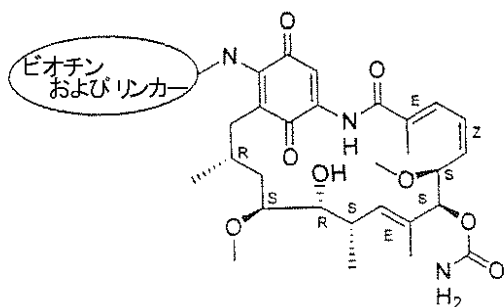
## 【0022】

当業者は、ビオチン標識は、特定のリガンドまたはレセプター上の異なる位置に生じうることを認識するであろう。上記リガンド、ゲルダナマイシンは炭素17位でビオチン化を示し、他の誘導体を分子上のこの特定の位置で作ることもでき、例えばプリンはゲルダナマイシン上のこの位置に1-ピレンブチルアミン(Pierce Biochemical)を反応させることによりビオチンの代わりに用いることができる。他の「直接」および「間接」標識を、このおよび他の位置に同様に結合することができる。さらに、標識は、基礎リガンド、ここではゲルダナマイシン、から当該分野で知られた種々の異なるリンカーにより分離することができよう。ゲルダナマイシン/ビオチンの態様では、これは以下のごとく説明される。

20

## 【0023】

## 【化 3】



30

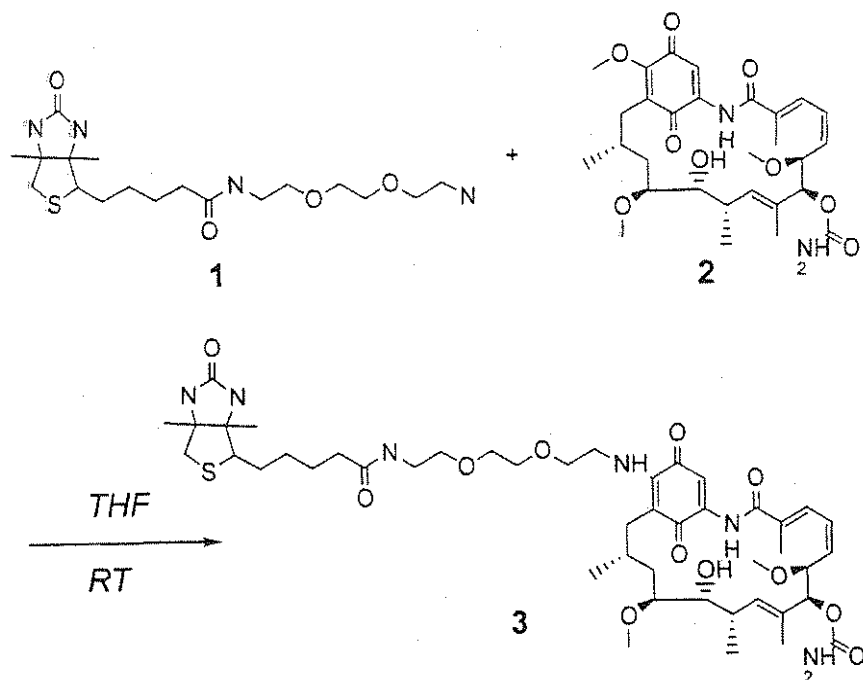
## 【0024】

別の局面において、本発明は先の革新的アッセイ方法に有用なビオチン化ゲルダナマイシン誘導体の種々の製造方法の特徴とする。ある態様は、そのような試薬を合成するための下記式の特徴とする。

## 【0025】



【化 4】

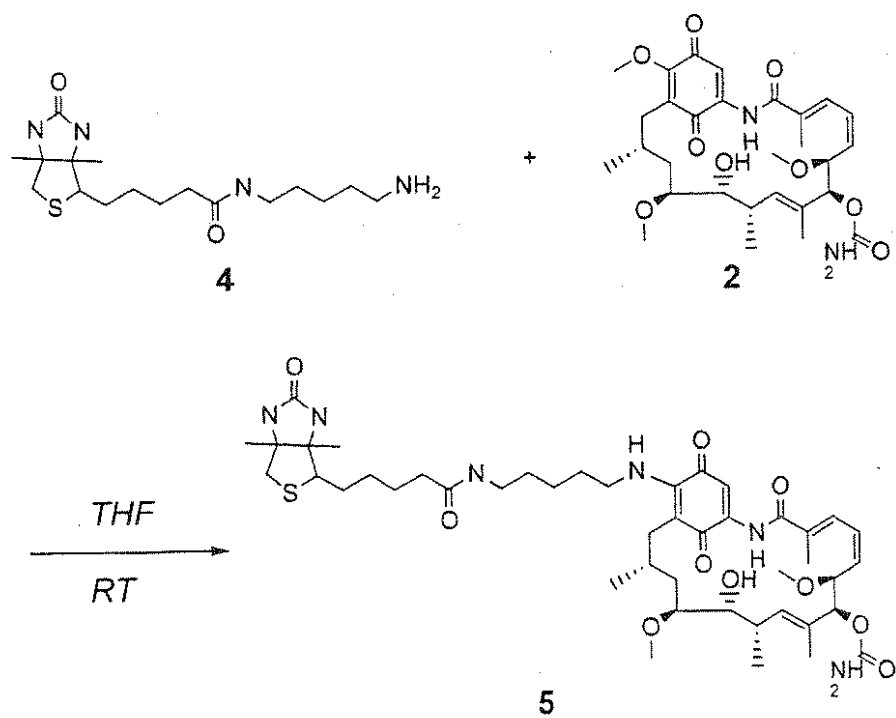


【 0 0 2 6 】

別の態様は下記合成反応式を特徴とする。

【 0 0 2 7 】

【化 5】

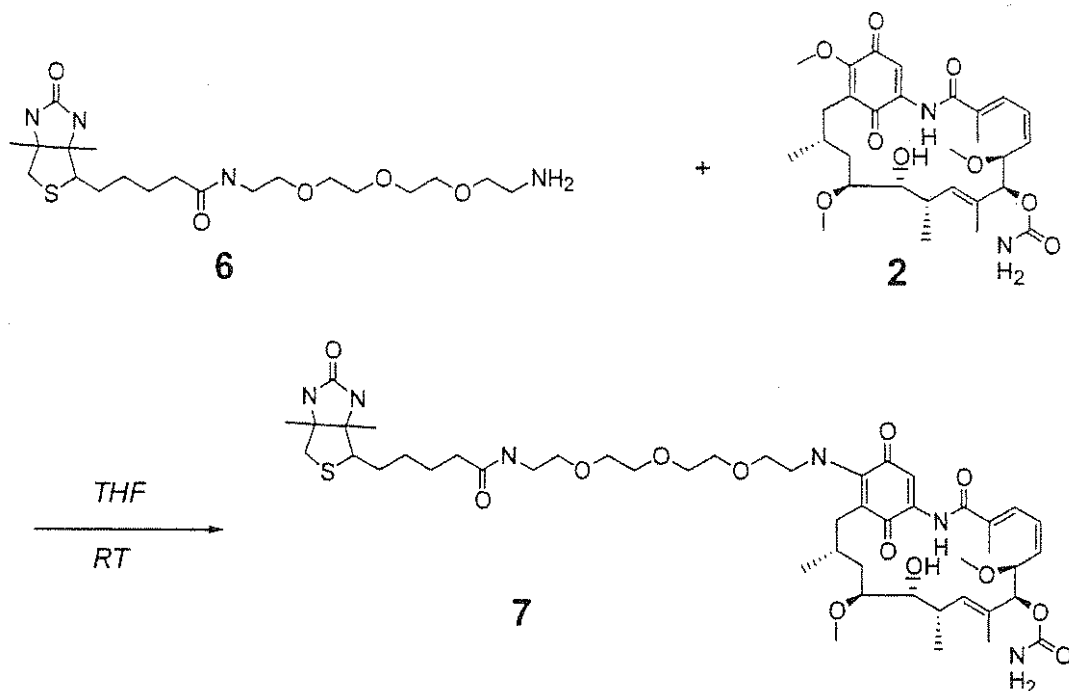


【 0 0 2 8 】

さらに別の態様は下記合成反応式を特徴とする。

【 0 0 2 9 】

## 【化6】



10

20

30

40

50

## 【0030】

別の局面において、本発明は腫瘍または癌細胞にみられるHSP90の精製、単離、または擬似構造、調製物、または複合体を特徴とする。出願人は、例えば腫瘍細胞、癌細胞、またはその溶解物中にみられるHSP90構造または複合体は、正常細胞中にみられるHSP90構造、熱ショック正常細胞が生成する構造、および正常細胞HSP90とNicchittaが報告したビス-ANSとの結合により生成される構造より既知のHSP90モジュレーター、17-アリルアミノゲルダナマイシン(17-AAG)に対して比較的高親和性を示す。具体的には、出願人はある種の腫瘍および癌細胞構造が熱ショック構造より約5x良好に、またHSP90/ビス-ANS構造より約10x良好に、モジュレーターによりそのATP結合部位に結合することをみいだした。これは、HSP90、特に異常細胞中に存在するHSP90構造の高親和性モジュレーターをより容易に同定する能力に置き換えられる。当業者は、正常細胞に対する作用を最小限にしたままで優先的にそれら細胞および細胞種を効果的に標的化するというような細胞種に対するそのような化合物の有効量をタイトレートすることができる。ある態様において、異常細胞はメラノーマ、乳癌、または肺癌細胞である。ある態様において、高親和性構造は、異常細胞中に存在する状態に対して約0.01%~99.9%に精製される。ある態様において、該構造は粗細胞溶解物として存在する。ある態様において、HSP90は、組換えHSP90である(すなわち、組換えDNA技術を用いて細胞株に導入されている)。癌、腫瘍、または組換え細胞から単離もしくは精製されたHSP90を特徴とするある態様において、該細胞は熱ショックも受けている。ある態様において、HSP90は、全部の複合体がHSP90モジュレーターとより容易にもしくは強く結合するように別の化合物と共有または非共有結合している。そのような「さらなる」化合物は当該分野で知られた1またはそれ以上のHSP90クライアントタンパク質またはコシャペロンタンパク質の形をとり、例えば、他の細胞もしくは細胞株、または同じ株から得るかまたは精製した生化学的抽出物を用いて供給される。ある態様において、そのような複合体および構造は固体支持体、例えばマイクロタイター皿、ウェルもしくはプレート、樹脂製ビーズ、または当該分野で知られた他の固体支持体上に存在する。

## 【0031】

本発明のスクリーニングアッセイは、インヒビターもしくはアクチベーター、アンタゴニストもしくはアゴニストの形をとり得るHSP90モジュレーターのアッセイに用いることができる。そのようなモジュレーターは、あらゆる形を想定することができ、例えば小分子、ペプチド、サイクリック、有機、無機などであり得る。HSP90結合または調節活性を

スクリーニングすることができる化合物の特に好ましいタイプには、プリンまたはプリン類似体、アンサマイシン、ラディシコール、ゼアララノール、ATP類似体、インドール、シャルコン、およびベンゾイミダゾールが含まれ、これら化合物タイプは当該分野でよく知られている。ある態様において、該アッセイは、例えばHSP90モジュレーターが溶解物または精製形で生細胞の外側に提供される *in vitro* アッセイである。他のアッセイは、単離されるか組織または多細胞宿主生物中に存在したままである、例えば生細胞を用いる *in vivo* アッセイである。

#### 【0032】

別の局面において、本発明は、HSP90の高親和性形を調節する医薬的有効量の化合物またはその医薬的に許容される塩を対象に投与することによりHSP90介在性疾患を治療または予防する方法を特徴とする。好ましい物質は、正常細胞にみられる低親和性形より高親和性形に対して選択的であり、あらゆる先の局面のスクリーニング法にしたがって同定することができる。ある好ましい態様において、治療または予防すべきものは腫瘍または癌である。他の態様において、それはウイルスまたは細菌感染である。さらに他の態様において、それを用いて虚血または他の障害を治療または処置する。ある癌細胞、例えばある種の乳癌細胞は、過剰レベルのHer-2転写物またはタンパク質を発現することが知られており、本発明のある方法の態様において標的にされる。治療または予防方法には、例えば経口、非経口、局所、または *in situ* 投与形式が含まれ得る。治療対象は好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスまたはラット、最も好ましくはヒトである。ある態様は、放射性同位元素、抗体、組換え産物、小分子、抗腫瘍薬、ヘルセプチン、タキソール、タキサンおよびタキサン誘導体、グリベック、アルキル化剤、抗代謝薬；エピドフィロトキシン；抗腫瘍酵素；トポイソメラーゼインヒビター；プロカルバジン；ミトキサントロン；プラチナ配位錯体；生物反応修飾物質/成長阻害剤；ホルモン性/抗ホルモン性治療剤および造血成長因子、アントラサイクリン薬、ビンカ薬、マイトマイシン、ブレオマイシン、細胞毒性ヌクレオシド、テポチロン、ジスコデルモリド、プテリジン薬、ジイネン、ポドフィロトキシン、カルミノマイシン、ダウノルビシン、アミノプテリン、メトトレキセート、メトプテリン、ジクロロメトトレキセート、マイトマイシンC、ポルフィロマイシン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、ゲムシタピン、シトシンアラビノシド、ポドフィロトキシン、ポド-フィロトキシン誘導体、エトポシド、エトポシドホスフェートもしくはテニポシド、メルファラン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ラウロシジン、ビンデシン、ラウロシン、パクリタキセル、エストラムスチン、カルボプラチン、シクロフォスファミド、ブレオマイシン、ゲムシタピン、イフォサミド、メルファラン、ヘキサメチルメラミン、チオテパ、シタラビン、イダトレキセート、トリメトレキセート、ダカルバジン、L-アスパラギナーゼ、カンプトテシン、CPT-11、トポテカン、アラ-C、ピカルタミド、フルタミド、ロイプロリド、ピリドベンゾインドール誘導体、インターフェロン、およびインターロイキンからなる群から選ばれる1またはそれ以上のメンバーの投与をさらに含む併用法または化学療法投与計画を特徴とする。

#### 【0033】

別の局面において、本発明は、上記HSP90の単離、精製、または模擬調製物、および(b) 20nM以下、好ましくは約10nMのIC<sub>50</sub>でHSP90と結合する化合物からなる群から選ばれる1またはそれ以上のメンバーを含む診断用キットを特徴とする。該キットは、全細胞、細胞溶解物、または精製抽出物の形をとりうるHSP90の単離、精製、または模擬調製物を含むことができる。さらに、既知のHSP90アクチベーター、インヒビター、アンタゴニスト、および/またはアゴニストを提供することができる。低親和性形のHSP90を、例えば陰性コントロールとして用いるために提供することもできる。さらに、該キットは、樹脂、ビーズ、溶解用緩衝液、標識HSP90リガンド、およびプロトコールからなる群から選ばれる1またはそれ以上のメンバーを特徴とし得る。ある態様において、HSP90リガンドは、例えば本明細書に記載のビオチン-ゲルダナマイシン複合体で標識される。

#### 【0034】

当業者は、適切であれば、上記の本発明の種々の態様および局面を組み合わせることが

できることを認識するであろう。

【0035】

本発明のアッセイ法および試薬は、例えばChiosisら(上記)に記載の、既存のHSP90結合アッセイより時間、労力、および/または物質を節約し、さらに種々の病状、より詳細には罹患細胞と関連する高親和性形のHSP90と結合するリガンドの高処理量スクリーニングおよび同定を促進する。これは将来の臨床試験における優れた有用性を预言する。本発明の他の利点、局面、および態様は、以下の図、詳細な説明、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

(図面の簡単な説明)

【0036】

図1は、HSP90に対するゲルダナマイシンおよびビオチン化ゲルダナマイシンの競合結合を示す。

【0037】

図2は、HSP90に対する17-アリルアミノゲルダナマイシン(17-AAG)およびビオチン化ゲルダナマイシンの競合結合を示す。

【0038】

図3は、HSP90に対する遊離ゲルダナマイシン、17-AAG、およびビオチン化ゲルダナマイシンの競合結合を示す。

図4は、17-AAG(CF7)は、本明細書に記載の方法を用いて測定すると、正常細胞(繊維芽細胞、RPTEC)または精製HSP90単独より腫瘍細胞(BT474)由来のHSP90でより高い明白な結合親和性を有することを示す。

【0039】

図5は、17-AAG(CF7)は、正常細胞、熱ショックHSP90、またはピス-ANS処理HSP90より特異的高Her2発現細胞、SKOV-3、SKBR-3、およびN87由来のHSP90でより高い明白な結合親和性を有することを示す。

【0040】

図6は、本発明のある種のアッセイ態様で用いた種々の被検化合物の結果を示す。用いた細胞株はMCF7であった。示したモジュレーターの合成および使用は、米国特許出願60/367,055および/またはPCT/US02/29715に記載されている。

(発明の詳細な説明)

定義

【0041】

「医薬的に許容される塩」は、例えば、塩を形成することができる官能性、例えば酸または塩基官能性を有する本発明の適切な局面のあらゆる化合物で製造することができよう。医薬的に許容される塩は有機酸および塩基または無機酸および塩基から誘導することができよう。1またはそれ以上の塩基性官能基、例えばアミノまたはアルキルアミノを含む本発明化合物は、医薬的に許容される有機酸および無機酸と医薬的に許容される塩を形成することができる。これら塩は、本発明化合物の最終的単離および精製時に反応系内で、または遊離塩基の形の精製された本発明化合物と適切な有機酸または無機酸と別個に反応させ、次いで形成された塩を単離することにより製造することができる。適切な酸の例には、塩化水素酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸、1,2 エタンスルホン酸(エジシレート)、ガラクトシル-d-グルコン酸などが含まれる。シュウ酸のような他の酸はそれ自身医薬的に許容されるものではないが、本発明化合物およびその医薬的に許容される酸付加塩を得る際の間mediateとして有用な塩の製造において用いることができよう。例えば、Bergeら、「Pharmaceutical Salts」、J. Pharm. Sci. 66: 1-19(1977)参照。

【0042】

1またはそれ以上の酸性官能基を含む本発明化合物は、医薬的に許容される塩基と医薬

10

20

30

40

50

的に許容される塩を形成することができる。これらの場合に用語「医薬的に許容される塩」は、本発明化合物の比較的無毒性の無機および有機塩基付加塩を表す。同様に、これら塩は、該化合物の最終的単離および精製時に反応系内で、または遊離酸の形の精製化合物を適切な塩基、例えば医薬的に許容される金属カチオンの水酸化物、カーボネート、またはピカーボネートと、またはアンモニアもしくは医薬的に許容される有機第1、第2、または第3アミンと別個に反応させることにより製造することができる。代表的アルカリまたはアルカリ土類塩には、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウム塩などが含まれる。用いることができる該塩基のいくつかの代表例には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化コリン、炭酸ナトリウムなどが含まれる。塩基付加塩を形成するのに有用な代表的有機アミンには、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが含まれる。例えば、Bergeら、上記参照。

10

#### 【0043】

「医薬組成物」は、1またはそれ以上の本明細書に記載の化合物、またはその医薬的に許容される塩と他の化学成分、例えば医薬的に許容される担体および/または賦形剤の混合物を表す。医薬組成物の目的は化合物の生物への投与を容易にすることである。

#### 【0044】

本明細書で用いている用語「医薬的に許容される担体」は、ある器官または身体の部分から別の器官または身体の部分へ対象薬剤を運ぶかまたは輸送するのに関与する、医薬的に許容される物質、組成物またはビークル、例えば液体または固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、または封入物質を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性であるという意味で「許容される」ものでなければならず、患者に有害であってはならない。医薬的に許容される担体として用いることができる物質のいくつかの例には、(1)糖、例えば、乳糖、グルコース、およびショ糖；(2)デンプン、例えばコーンスターチおよびジャガイモデンプン；(3)セルロースおよびその誘導体、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、およびセルロースアセテート；(4)粉末トラガカント；(5)麦芽；(6)ゼラチン；(7)タルク；(8)賦形剤、例えばココアバターおよび坐剤用ワックス；(9)油、例えばピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油；(10)グリコール、例えばプロピレングリコール；(11)ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール；(12)エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；(13)寒天；(14)緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；(15)アルギン酸；(16)発熱物質不含水；(17)等張生理食塩水；(18)リンゲル溶液；(19)エチルアルコール；(20)リン酸緩衝溶液；および(21)医薬製剤に用いられる他の無毒性適合物質が含まれる。医薬的に許容される担体は、生物に重大な刺激をもたらすべきでなく、投与した化合物の生物活性および特性を排除しない。

20

30

#### 【0045】

「賦形剤」は、化合物の投与をさらに促進する医薬組成物に加える不活性物質を表す。賦形剤の例には、限定されるものではないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖およびデンプン類、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、およびポリエチレングリコールが含まれる。

40

#### 【0046】

「医薬的有効量」は、治療および/または予防効果をもたらすことができる量を意味する。治療および/または予防効果を得るための本発明に従って投与する化合物の特定用量は、もちろん例えば投与する特定の化合物、投与経路、治療する病状、および治療する個体を含む症例を取り囲む特定の環境により決定されるであろう。典型的な1日用量(単回または分割した用量で投与される)は、本発明の活性化合物を約0.01mg/kg～約50-100mg/kg体重の用量レベルで含むであろう。好ましい1日用量は、一般に約0.05mg/kg～約20mg/kg、理想的には約0.1mg/kg～約10mg/kgであろう。クリアランス速度および半減期および最高耐量(MTD)のような因子をさらに決定しなければならないが、当業者は標準的方法を用

50

いてこれらを決定することができる。

【0047】

ある方法の態様において、好ましい治療効果は、増殖性疾患、例えば乳癌に特徴的な細胞の増殖をある程度まで阻害する。治療効果は、通常、細胞増殖または細胞塊のサイズ以外の、1またはそれ以上の症状もある程度軽減するであろう(軽減しなくてもよい)。治療効果には、例えば、1またはそれ以上の1)細胞数の減少;2)細胞サイズの減少;3)例えば癌転移の場合に、周辺臓器への細胞浸潤の阻害(すなわち、ある程度遅くする、好ましくは止める);4)細胞増殖のある程度の阻害;および/または5)該疾患に関連した1またはそれ以上の症状のある程度の軽減を含むことができよう。

【0048】

本発明のある方法の態様において、本発明化合物の「 $IC_{50}$ 」値は増殖性疾患を示す細胞、例えば乳癌細胞より正常細胞で大きくなりうる。該値は用いるアッセイに依存する。

【0049】

「標準」により陽性または陰性コントロールを意味する。HER-2発現レベルとの関連において陰性コントロールは、例えば正常細胞と関連するHER-2タンパク質の量を有する試料である。陰性コントロールはHER-2タンパク質を含まない試料も含んでよい。反対に、陽性コントロールは、好ましくは増殖性疾患、例えば乳癌にみられる過剰発現と関連する量のHER-2タンパク質を含む。コントロールは細胞または組織試料由来であるか、またはその他に固定化もしくはその他の精製リガンド(またはリガンドなし)を含んでいてよい。ある態様において、1またはそれ以上のコントロールは診断用「ディップスティック」の形であってよい。

【0050】

「選択的に標的化する(targeting)」により、例えば比較的低または正常Her-2レベルとは反対に高いレベルの細胞の場合に、あるタイプの細胞に対して別のものに対するより影響がかなり大きいことを意味する。

【0051】

本発明は、ある局面において、そのようなアッセイで有用なHSP90リガンドおよび試薬を同定および/または評価するためのアッセイを特徴とする。ある局面において、HSP90を既知HSP90リガンド、例えばアンサマイシン、例えばゲルダナマイシンまたは17-AAGと接触させる。該リガンドはそのHSP90との結合を検出できるように「標識」される。アッセイ中、標識リガンドのHSP90と結合し、または結合したままでいる能力は、HSP90結合能を有すると推測されるか、またはその能力をスクリーニングする所定の化合物が同時に存在することにより競合する可能性がある。所定の化合物の結合能および親和性は、競合リガンドにより示されるシグナルの量に基づく。標識は、好ましくは固体支持体、例えばマルチウェル皿またはプレート上で検出され、その検出は当該分野でよく知られた種々の市販の検出装置を用いて助けることができよう。

【0052】

ある態様において、本発明は、標識が励起および測定可能な蛍光分子またはフルオル(fluor)、例えばフィコエリスリンであるアッセイを特徴とする。ある態様において、ストレプトアビジン-フィコエリスリン分子を、コントロールHSP90リガンドの役割を果たすビオチン化ゲルダナマイシン化合物と結合させる(ゲルダナマイシンはHSP90と結合することが知られている)。これら分子の別のものとの結合(複合体形成)能は、HSP90結合能を試験する所定の化合物(おおよその程度に)を置換するか、または該化合物で置換され得る所定の非標識または別に標識した化合物を用いて精査される。このようにして、結合能および親和性は残存するリガンド標識の作用として測定することができる。アッセイをいかに構成するかに応じて所定の結合親和性の化合物に対する標識の正または逆相関があるかもしれない。複合体が固体支持体マトリックス、例えばマルチウェルプレートに張り付くかまたは生じる態様において、標識複合体の量は、所定の化合物によるHSP90の結合能を示すために検出および/またはHSP90に対する親和性を測定することができる。

【0053】

10

20

30

40

50

本発明の別の局面は、その有用性が前記局面に照らして明らかである標識、例えばビオチン化HSP90リガンドを特徴とする。さらに別の局面において、本発明はHSP90：標識リガンド複合体を特徴とする。

#### 【0054】

特定の実施例のいくつかおよび使用可能な種々のアッセイ成分および方法論の詳細を以下に示す。当業者は、過度な実験をすることなく種々の可能性を用いることができる。

#### アンサマイシン

#### 【0055】

記載した種々のアンサマイシンはHSP90の官能基と結合し、それを阻害することが知られている。本明細書で用いている用語「アンサマイシン」は当該分野でよく知られており、芳香族環の反対端を架橋する種々の長さおよび構造の脂肪族環およびその還元等価物を特徴とする広いクラスの構造を表す。この広いクラス内にはベンゾキノアンサマイシンが含まれる。本明細書で用いている「ベンゾキノアンサマイシン」は、芳香族環構造としてベンゾキノンを有し、これには該分子のベンゾキノン部分上にアルコキシ部分、好ましくは、好ましくは求核原子で置換することができる17位にメトキシを有する当該分野で知られたあらゆるベンゾキノアンサマイシンが含まれる。反応の結果は「ベンゾキノアンサマイシン誘導体」の形成である。本発明のアンサマイシンおよびベンゾキノアンサマイシンは合成、天然、または2つの組み合わせ、すなわち半合成であってよい。本発明の方法に有用な典型的ベンゾキノアンサマイシンおよびその製造方法には、限定されるものではないが、米国特許3,595,955 (ゲルダナマイシンの製造方法を記載)、4,261,989、5,387,584、および5,932,566に記載のものが含まれる。ゲルダナマイシンは、例えばC N Biosciences (Merck KGaA, Darmstadt, Germanyの関連会社で、San Diego, California, USAに本社がある)からも市販されている(cat. no. 345805)。Streptomyces hygroscopicus (ATCC 55256)の培養液由来の4,5-ジヒドロゲルダナマイシンおよびそのヒドロキノンの生化学的精製は、国際出願PCT/US92/10189(Pfizer Inc.に譲渡、W093/14215:1993年7月22日公開、発明者:Cullenら)に記載されており、ゲルダナマイシンの触媒的水素添加による4,5-ジヒドロゲルダナマイシンの別の合成方法も知られている。例えば、Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Chemistry of the Ansamycin Antibiotics, 33 1976, p.278参照。出願人は、最近、同時係属出願60/367,055およびPCT/US02/29715において多くの他のアンサマイシンタイプの化合物の製造について記載した。

#### HSP90

#### 【0056】

HSP90タンパク質は天然に高度に保存された遍在性の細胞タンパク質である。本明細書で用いている用語「HSP90」または「HSP90メンバー」は、限定されるものではないが以下のものを含む。NCBI受託番号P07900およびXM004515 (それぞれ、ヒト および HSP90)、P11499(マウス)、AAB2369(ラット)、P46633(チャイニーズハムスター)、JC1468 (ニワトリ)、AAF69019 (ニクパエ)、AAC21566 (ゼブラフィッシュ)、AAD30275 (サーモン)、002075 (ブタ)、NP015084 (酵母)、およびCAC29071(カエル)。さらに、定義には天然に存在するか、または人工のそのようなタンパク質のあらゆる変化が含まれる。すべてが本発明の方法、アッセイおよびリガンドに関連して、すなわち種々のHSP90リガンドの結合親和性の同定および/または定量、および臨床試験用の新規薬剤候補を同定および/またはそれに優先順位を付けるのに多少の有用性を持つものと予想される。本発明のある局面は、癌および腫瘍細胞が正常細胞よりより感受性形のHSP90を有するという出願人の発見を利用する。リガンドは癌または腫瘍細胞にみられるHSP90と、該タンパク質自身は同じアミノ酸コンスティツエンシー(constituency)を有するにも関わらずはるかに強く結合する。本発明を限定することなく、これは、該細胞中に存在する該タンパク質の異なる三次または四次構造の結果であると考えられ、おそらくHSP90と結合し、そのようにふるまわせるコシヤペロンタンパク質またはクライアントタンパク質により生じる。

#### 【0057】

標識および固体支持体、および高処理量スクリーニングに関する以下の考察の項は、大

部分を米国特許6,203,989、6,153,442、6,096,508、5,846,537、および5,585,241から借用している。そこおよび以下に記載の方法は、本発明の新規で自明でない特徴の促進に同化し、適合し、そして/またはそれを満たす。

標識および標識付け

#### 【0058】

ビオチン：(ストレプト)アビジン標識。本発明の好ましい態様では、ビオチンに対して天然の高親和性ストレプトアビジンを利用する。ストレプトアビジンは、卵白にみられる67キロダルトン(kD)の糖タンパク質で、ビオチンに対して極めて高結合親和性 (K. sub. d=10. sup. -15M) を有するアビジンに関連している。アビジンはそれぞれが1個のビオチン分子と結合することができる4個のサブユニットからなる。ストレプトアビジンはStreptomyces avidiniiが産生し、アビジンと重要な構造およびアミノ酸組成、ならびにビオチンに対する高親和性と安定性を共有する。また、ストレプトアビジンはグリコシル化されておらず、アビジンより非特異結合が少ないと報告されており、ほとんどのビオチンベースの適用に2つの優れた選択となっている。

#### 【0059】

B-複合体ビタミンのメンバーであるビオチンは、天然にみられ、アミノ酸および脂肪酸の分解、糖新生、および脂肪酸合成に必須である。ビオチンとアビジンおよびストレプトアビジンのビオチン結合部位の結合相互作用は、タンパク質内部にビオチンを覆い隠す表面ポリペプチドループのオーダリングと共に、ビオチンとアビジン間の非共有水素結合およびファンデルワールス相互作用の結果である。ビオチンは予め化学的または酵素的にカップリングしており、標的認識との干渉を最小化するやり方で生体分子を広範囲にプローブし、ゲルダナマイシンに関する本明細書に記載の結果はさらにこれをいかに行ってよいかの例を示す。

#### 【0060】

ストレプトアビジンまたはアビジンを蛍光タグで標識するための試薬は市販されている。例えば、試薬、5(6)-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシニミドエステル (FLUOS)、7-アミノ-4-エチル-クマリン-3-酢酸-N'-ヒドロキシスクシニミドエステル (AMCA、活性化)、およびフルオレセインイソチオシアネート (FITC)はBoehringer Mannheim, Indianapolis, Indから入手できる。タンパク質を蛍光標識で蛍光標識する方法、および蛍光標識の検出方法は、Howard, G., Labeling Proteins with Fluorochromes, 「Methods in Nonradioactive Detection」中, G. Howard, Ed., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. 1993, pp.39-68に記載されている(この内容は本明細書の一部を構成する。)。さらに、種々の市販の標識ストレプトアビジンおよびアビジン分子がある。例には、ストレプトアビジン-金、ストレプトアビジン-フルオロクローム、ストレプトアビジン-AMCA、ストレプトアビジン-フルオレセイン、ストレプトアビジン-フィコエリスリン (STPE)、ストレプトアビジン-スルホルホダミン(sulforhodamine)101、アビジン-FITC、およびアビジン-テキサスレッドRTMが含まれ、これらはBoehringer Mannheim, Indianapolis, Ind. から市販されている。本発明の方法および試薬におけるストレプトアビジン-フィコエリスリンの使用の実施例を以下に示す。

#### 【0061】

別の標識系。出願人は、他の標識または標識複合体を用いて結合および/または非結合標識の量に関連する検出可能なシグナルを生じさせることができることを予期する。標識は、シグナルを生じるかまたはシグナルを生じるように誘導され得るあらゆる分子であり得、例えば、蛍光剤、放射性標識、酵素、化学ルミネッセンス剤(chemiluminescer)、または光線感作物質であってよい。すなわち、標識態様に応じてシグナルは、場合に応じて酵素活性、ルミネッセンス、光吸収、または放射能を検出することにより検出および/または測定することができる。前記のごとく、非放射性適用が好ましいが、特許請求の範囲に具体的に記載していない放射性適用は特許請求の範囲から除外すべきではない。

#### 【0062】

使用できる特定の標識は、典型的には例えば、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、

10

20

30

40

50



グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(「G6PDH」)およびホースラディッシュパーオキシダーゼ;色素;蛍光剤、例えばフルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド、およびフルオレスカミン;化学ルミネッセンス剤、例えばイソルミノール;増感剤;補酵素;酵素基質;放射性標識、例えば sup. 125I、sup. 131I、sup. 14C、sup. 3 H、sup. 57Co、およびsup. 75Se;粒子、例えばラテックスまたは炭素粒子;金属ゾル;クリスタライト;リボソーム;細胞などが含まれ、これはさらに色素、触媒または他の検出可能な基で標識してよい。他の適切な酵素および補助酵素は、Litmanら、米国特許4,275,149、19-28欄、およびBoguslaskiら、米国特許4,318,980、10-14欄に開示されており、適切な蛍光剤および化学ルミネッセンス剤はLitmanら、米国特許4,275,149、30および31欄に開示されている。これらの内容は本明細書の一部を構成する。

10

#### 【0063】

用いる標識は直接シグナルを生じることができよう。あるいはまた、該標識は信号を間接的に生じ、さらなる試薬および/または物理的刺激、例えば電磁エネルギーによる衝撃または化学基質または補助因子の添加を必要とすることがある。蛍光剤の場合は、例えばこれらは紫外線および可視光線を吸収することができ、光吸収はこれら分子にエネルギーを伝達し、それらを励起エネルギー状態に高め、次いで吸収されたエネルギーは第二波長で光を放射する。反対に、シグナルを直接生じる標識には、例えば放射性同位元素および色素が含まれる。

#### 【0064】

20

シグナルを生じるのに他の試薬成分を必要とする標識の例には、例えば基質および補酵素(酵素標識用)、酵素生成物、触媒、アクチベーター、補助因子、インヒビター、スカベンジャー、金属イオンと反応する基質、およびシグナルを生じる物質と結合するのに必要な特異的結合基質が含まれる。適切な標識系に関するさらなる考察は、Ullmanら、米国特許5,185,243、11-13欄にみることができる。この内容は本明細書の一部を構成する。

固体支持体および高処理量スクリーニング

#### 【0065】

本発明の固体支持体には、多くの形、例えばストリップ、ロッド、プレート、ウェル、粒子、またはビーズのいずれかを有することができる多孔性または非多孔性の水に不溶性の物質を含むことができる。種々の適切な支持体がUllmanら、米国特許5,185,243、10-11欄、Kurnら、米国特許4,868,104、6欄、21-42行、およびMilburnら、米国特許4,959,303、6欄、14-31行に開示されている。これらの内容は本明細書の一部を構成する。

30

#### 【0066】

固体支持体表面は、親水性、または例えば無機粉末、例えばシリカ、硫酸マグネシウム、およびアルミナ;天然の重合物質、特にセルロース系物質、およびセルロース由来の物質、例えば線維を含む紙(ペーパー)、例えばフィルターペーパー、クロマトグラフィー用ペーパーなど;合成もしくは修飾天然ポリマー、例えばニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、架橋デキストラン、アガロース、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)など(それ自身でまたは他の物質と組み合わせて使用);ガラス、セラミクス、金属などを加えることにより親水性にすることができるものであり得る。本発明のメンバーのそのような支持体との結合は、例えば「Immobilized Enzymes」、Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978)およびCuatrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970)に記載しているような、文献中の一般に利用可能なよく知られた技術により達成することができよう。

40

#### 【0067】

好ましい固体支持体には、化学および生物分子の合成および分析用の親和性マトリックスもしくは支持体として用いるあらゆる物質、例えば限定されるものではないがポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ナイロン、ガラス、デキストラン、キチン、

50

砂、軽石、ポリテトラフルオロエチレン、アガロース、ポリサッカライド、デンドリマー、バッキーボール、ポリアクリルアミド、Kieselguhr-ポリアクリルアミド非共有合成物、ポリスチレン-ポリアクリルアミド共有合成物、ポリスチレン-PEG[ポリエチレングリコール]合成物、シリコン、ゴム、および固相合成、アフィニティ分離および精製、ハイブリダイゼーション反応、イムノアッセイおよび他のそのような適用のために支持体として用いる他の物質が含まれる。そのような支持体の物質は微粒子であるか、または連続表面、例えばマイクロタイター皿またはウェル、ガラススライド、生物粒子もしくは生物分子の結合に適合した表面を有するシリコンチップ、ニトロセルロースシート、ナイロンメッシュ、または他のそのような物質の形であってよい。

【0068】

用いる物質は特定の態様メンバーおよびアッセイ試薬と互換性であるべきであり、用いる特定メンバーの同一性および性質に依存するであろう。表面(通常、固体)は、(単に例示目的で)プラスチック、例えばポリプロピレンまたはポリスチレン；セラミック；シリコン；(融解)シリカ、石英、またはガラス(例えば顕微鏡用ガラススライドまたはガラスカバースリップの厚さであり得る)；ペーパー、例えばフィルターペーパー；ジアゾ化セルロース；ニトロセルロースフィルター；ナイロン膜；またはポリアクリルアミドもしくは他のタイプのゲルパッド、例えば例えばあらゆる種々のルチーの、常套的方法により湿ゲルを乾燥させることにより製造されるフィルムを含む高多孔質固体であるエアロゲルでできたエアロパッドもしくはエアロビーズを含むあらゆる種々の有機または無機物質またはその組み合わせであり得る。光透過性の基質は、アッセイを行う方法が光検出法を含む時に有用である。好ましい態様において、該表面は、マルチウェル、例えば組織培養皿、例えば24-、96-、256-、384-、864-、または1536-ウェルプレート(例えば、修飾プレート、例えばComing Costarプレート)のプラスチック表面である。アンカーは、表面と直接結合(associated)、例えば結合(bound)させるか、またはあるタイプの表面、例えば順に、マイクロタイター皿中のプラスチック「ウェル」内の第二表面と接触して置かれるガラスと結合させることができる。該表面の形はこの場合もやはり重要ではない。例えば、その形は平面、例えば正方形、長方形、または円；曲面；または三次元表面、例えばビーズ、粒子、ストランド、沈殿物、チューブ、球などであり得る。

【0069】

該表面は、空間的に分離し、アドレス可能なまたは特定可能な領域を持ちうる。各領域は、アンカーまたは結合部位のセットを含む。該領域をいかに分離するか、その物理特性、およびそのある別のものに対する相対的方向は、ある態様では重要でなく、他の態様では重要である。ある態様において、該領域は、液体の通過に抵抗性のあらゆる物理的バリアーにより互いに分離することができる。例えば、好ましい態様において、該領域は、マルチウェル(例えば組織培養)皿、例えば24-、96-、256-、384-、864-、または1536-ウェルプレートのウェルであり得る。あるいはまた、表面、例えばガラス表面は、例えば864または1536の分離した浅いウェルを持つようエッチングすることができる。あるいはまた、表面は、仕切りやウェルを持たない領域、例えば平面、例えばプラスチック、ガラス、または紙片を含むことができ、個々の領域はさらに分離した領域を線引きする構造(例えばプラスチックやガラスのようなもの)をかぶせることにより規定することができる。所望により、表面は、個々の領域を線引きする前に、すでにアンカーもしくはリンカーと結合したアンカーの1またはそれ以上のアレイを含むことができる。別の態様において、各領域内のアンカーのアレイを、アンカーが無い表面上の余白によるか、または化学的境界、例えばワックスもしくはシリコンにより互いに分離し、小滴の広がりを防ぐことができる。さらに別の態様において、該領域は、例えば、Beattieら(1995). Clin. Chem. 4,700-706に開示のフロースルーアッセイ用に設計されたチューブまたは流体チャンネルと定義することができる。チューブはあらゆるサイズであり得、例えばキャピラリーまたはより穴の広いチューブは液体が流れるのを可能にするか、またはゲル、例えばアガロースまたはポリアクリルアミドで部分的または完全に充填することができ、これを通して化合物を例えば電気泳動により輸送(通過、貫流、ポンプで通す)することができる。

10

20

30

40

50

## 【0070】

本発明のアッセイ方法は、固体支持体、例えばELISA用のマルチウェルプレート中、または高密度またはチップアレイアッセイ用のあらゆる固体支持体上で好都合に行うことができる。例えば、ELISAタイプの形式では、リガンドまたはレセプター分子を固体支持体、例えば96ウェルプレートのウェルに付着させる。対応する補足物(場合に応じてレセプターまたはリガンド)をウェルに加え、インキュベートする。あるいはまた、複合体を最初に形成し、次いで固体支持体に付着させ、別のリガンドまたは所定の化合物と後で競合させる。本発明のさらに別の変更において、少なくともその1つが知られており、標識されている複数のリガンドをHSP90存在下で一緒に混合し、できるだけ非複合体化および非付着種(固体支持体態様において)を除去する。次に、標識量を検出装置を用いて評価する。非複合体化および非付着種の除去は、洗浄工程およびある態様では遠心分離により行うことができる。非結合リガンド/レセプターを洗浄除去し、次いで標識複合体の存在を検出する。多くの変化がありうる。

10

## 【0071】

本発明の種々の態様に関連して使用できる検出用ハードウェア装置は当該分野でよく知られており、限定されるものではないが、例えば濃度計、質量分析器、蛍光光度計、シンチレーションカウンター、分光光度計、照度計、カメラ、および他の画像もしくは検出装置が含まれる。

(HSP90結合および下流効果を測定するアッセイ)

## 【0072】

本明細書に記載の革新に加え、HSP90に対する本発明化合物の効果を試験するために、種々の *in vitro* および *in vivo* アッセイが利用可能である。HSP90競合結合アッセイおよび機能アッセイは、本発明化合物に置き換えて当該分野で知られているように行うことができる。Chiosisら、Chemistry & Biology 8: 289-299(2001)は、これを行うことができる知られた方法のいくつかを記載している。例えば、HSP90の競合結合阻害剤としてのゲルダナマイシンまたは17-AAGを用いる競合結合アッセイを用いて、目的の化合物または他の競合阻害剤をゲルまたは固体マトリックス上に固定化し、HSP90を他の阻害剤とブレインキュベーションし、ブレインキュベーションした混合物をゲルまたはマトリックスに通し、次いでゲルまたはマトリックスに結合しているかまたは結合していないHSP90の量を測定することにより本発明化合物の相対HSP90親和性を決定することができる。

20

30

## 【0073】

下流効果は、例えばRaf1およびHer2を含む種々のステロイドレセプターおよびシグナリングタンパク質の機能および安定性に対するHSP90阻害の既知の効果に基づいて評価することもできる。本発明化合物は、これら分子の用量依存的分解を誘導し、これを標準的技術を用いて測定することができる。HSP90の阻害は、HSP90および同時に測定可能な関連シヤペロンタンパク質の上方調節ももたらす。種々の癌細胞系に対する抗増殖活性は、HSP90阻害に関連した形態学および機能的分化同様に測定することもできる。例えば、

このように、タンパク質濃度を測定し、細胞内および液体試料中のタンパク質レベルを測定または予測するための、多くの異なるタイプの方法が当該分野で知られている。間接技術には、例えばポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いる核酸ハイブリダイゼーションおよび増幅が含まれる。これら技術は当業者に知られており、例えば、Sambrook、Fritsch & Maniatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Second Edition(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY、1994に記載されており、例えば、米国特許4,699,877、4,918,162、4,968,603、および5,846,749において患者試料中のHer-2/neuの定量、検出、および相対活性に応用されている。用いることができる2つの一般技術の簡単な説明を以下に示す。

40

## 【0074】

細胞がHER-2を過剰発現するか、または上昇したレベルを含むかの決定は、よく知られた抗体技術、例えばイムノブロットティング、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット

50

イング、免疫沈降、酵素免疫測定法(ELISA)、およびHER-2に対する抗体を用いる派生技術を用いて決定することができる。例として、乳癌細胞におけるHER-2発現は、免疫組織化学アッセイ、例えばDako Hercep(登録商標)試験(Dako Corp.、Carpinteria、CA)を用いて決定することができる。Hercep(登録商標)試験は、腫瘍組織標本におけるHER-2の過剰発現を検出するために設計した抗体染色アッセイである。この特定のアッセイは、HER-2発現を4つのレベル：0、1、2、および3にランク付けし、レベル3はHER-2発現の最高レベルを表す。例えば、Press、M.ら、(2000)、Modern Pathology 13: 225Aに記載のAutomated Cellular Imaging System(ACIS)を用いることにより厳密な定量を向上させることができる。

#### 【0075】

抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル)は種々の商品供給業者から購入することができるか、またはHarlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、2ndEd ; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.(1988)に記載のごとくよく知られた方法を用いて製造することができる。

#### 【0076】

HER-2タンパク質の過剰発現とそれをコードする遺伝子の増幅の間に高い相関が報告されているので、HER-2過剰発現を核酸レベルで測定することもできる。これを試験する1つの方法はRT-PCRを用いることによる。HER-2のゲノムおよびcDNA配列が知られている。特異的DNAプライマーを、よく知られた標準技術を用いて得ることができ、次いでこれを用いて細胞中にすでに存在する鋳型を増幅することができる。この例はKurokawa、Hら、Cancer Res. 60: 5887-5894(2000)に記載されている。PCRは、正常細胞と異常細胞、例えば癌性細胞および非癌性細胞の間のように定量的差が観察されるように標準化することができる。例えばデンストメトリーを用いるよく知られた方法を用いて、PCRを用いて増幅された核酸レベルを定量および/または比較することができる。

#### 【0077】

同様に、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)アッセイおよび他のアッセイ、例えばノーザンおよび/またはサザンブロッティングを用いることができる。これらはHER-2遺伝子またはmRNAと上記PCRプライマーに対するものと同じかまたは同様の方法で設計することができる対応する核酸プローブとの核酸ハイブリダイゼーションを利用する。例えば、Mitchell MSおよびPress MF.、1999、Semin.Oncol.,Suppl. 12: 108-16参照。FISHでは、この核酸プローブを、好ましくはハイブリダイゼーションと干渉しない、蛍光分子、例えばフルオレセインおよび/またはローダミンと結合させ、次いでハイブリダイゼーション後の蛍光を測定することができる。例えば、Kurokawa、Hら、Cancer Res. 60: 5887-5894(2000)参照(配列、5'-FAM-核酸-TAMRA-p-3'配列を有する特異的核酸プローブについて記載)。上記のACISベースのアプローチを用いてアッセイをより定量的にすることができる(de la Torre-Bueno、J.ら、2000、Modern Pathology 13: 221A)。

#### 【0078】

免疫および核酸検出法は、HSP90およびHer-2以外のタンパク質(それにもかかわらず、該タンパク質はHSP90阻害に応じて影響を受ける)に向けることもできる。

(医薬組成物、投薬、および投与方法)

#### 【0079】

次に、本発明のアッセイを用いて有望と確認された化合物を医薬組成物に製剤化し、次いで対象に投与することができる。

#### 【0080】

当業者は、例えばGoodman and Gilman's、The Pharmacological Basis of Therapeutics、最新版; Pergamon Press;およびRemington's Pharmaceutical Sciences(最新版) Mack Publishing Co.、Easton、Paに記載のような本発明の化合物および方法を用いることができる製剤技術および投与技術をよく知っている。

#### 【0081】

本発明の方法に用いる化合物は、標準的薬務に従って単独または医薬組成物中で医薬的

10

20

30

40

50

に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と組み合わせて投与することができよう。該化合物は、経口的に、または静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、直腸内、および局所投与経路を含む非経口的に投与することができる。

【0082】

例えば、本発明の治療用組成物または医薬組成物は、治療を要する領域に局所投与することができる。これは、例えば、限定されるものではないが、外科手術時の局所注入、局所適用、例えばクリーム、軟膏、注射、カテーテル、またはインプラント(該インプラントは、シアラスティック(sialastic)膜のような膜、または繊維を含む多孔性、非多孔性、またはゲル状物質から作られた)により達成することができよう。投与は、腫瘍または新生物性もしくは前新生物性組織の部位(または元の部位)に直接投与することもできる。

10

【0083】

さらに、本発明化合物または組成物は、小胞、例えばリポソームを用いて送達することができる(例えば、Langer、1990、Science、249: 1527-1533; Treatら、1989、Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer、Lopez-BernsteinおよびFidler(eds.)、Liss、N. Y.、pp.353-365参照)。

【0084】

本発明の方法に用いる化合物および医薬組成物は、制御放出系を用いて送達することもできる。ある態様ではポンプを用いてよい(Sefton、1987、CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwaldら、1980、Surgery、88: 507; Saudekら、1989、N. Engl. J. Med.、321: 574参照)。さらに、制御放出系は、治療標的の近傍に置くことができる(Goodson、1984、Medical Applications of Controlled Release、Vol.2、pp.115-138参照)。

20

【0085】

本発明の方法に用いる医薬組成物は、活性成分を、経口使用に適した形、例えば錠剤、トローチ、ローゼンジー錠、水性もしくは油性サスペンション剤、分散可能粉末もしくは顆粒剤、エマルジョン剤、硬もしくは軟カプセル剤、またはシロップ剤もしくはエリキシル剤として含むこともできる。経口使用を意図した組成物は、医薬組成物を製造するための当該分野で知られたあらゆる方法に従って製造してよく、そのような組成物は、医薬的に洗練された味のよい製剤を提供するため、甘味料、香味料、着色料、および保存料からなる群から選ばれる1またはそれ以上の物質を含んでよい。錠剤は、錠剤の製造に適した無毒性の医薬的に許容される賦形剤と混合した活性成分を含む。これら賦形剤は、例えば不活性希釈剤、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、リン酸カルシウム、もしくはリン酸ナトリウム; 顆粒化剤および崩壊剤、例えば微晶質セルロース、ナトリウムクロスカルセロース、コーンスターチ、またはアルギン酸; 結合剤、例えばデンプン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、もしくはアカシア、および潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、もしくはタルクであってよい。錠剤は、コートされていなくても、または薬剤の味を隠すかまたは消化管中の分解および吸収を遅らせて長期にわたる持続作用をもたらすための知られた技術によりコートすることができよう。例えば、味を隠すための水溶性物質、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはヒドロキシプロピルセルロース、または時間遅延物質、例えばエチルセルロース、またはセルロースアセテートブチレートを適切に用いることができよう。

30

40

【0086】

経口使用のための製剤は、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、またはカオリンと混合している硬ゼラチンカプセル剤、または活性成分が水溶性担体、例えばポリエチレングリコールもしくは油状媒質、例えばピーナッツ油、水性パラフィン、もしくはオリーブ油と混合している軟ゼラチンカプセル剤として存在してもよい。

【0087】

水性サスペンション剤は、水性サスペンション剤を製造するのに適した賦形剤と混合した活性物質を含む。そのような賦形剤には、懸濁化剤、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナ

50

トリウム、ポリビニルピロリドン、ガムトラガカントおよびガムアカシアがあり、分散剤または湿潤剤は天然のホスファチド、例えばレシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸、例えばポリオキシエチレンステアレートとの縮合生成物、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪酸アルコール、例えばヘプタデカエチレン-オキシセタノールとの縮合生成物、またはエチレンオキシドと脂肪酸から誘導した部分エステル、およびヘキシトール、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレエートとの縮合生成物、またはエチレンオキシドと脂肪酸から誘導した部分エステル、およびヘキシトール無水物、例えばポリエチレンソルビタンモノオレエートとの縮合生成物であってよい。水性サスペンション剤は、1またはそれ以上の保存料、例えばエチルまたはn-プロピル p-ヒドロキシベンゾエート、1またはそれ以上の着色料、1またはそれ以上の香料、および1またはそれ以上の甘味料、例えばショ糖、サッカリン、もしくはアスパルテムを含んでいてもよい。

10

【0088】

油状サスペンション剤は、植物油、例えばラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、ココナツ油、または鉱油、例えば液体パラフィンに活性成分を懸濁することにより製剤化することができよう。油状サスペンション剤は、増粘剤、例えば密蝟、硬パラフィン、またはセチルアルコールを含んでいてよい。上記したような甘味料および香料を加えて味のよい経口用製剤を得てよい。これら組成物は、抗酸化剤、例えばブチル化ヒドロキシアニソールまたは -トコフェロールを加えることにより保存することができよう。

【0089】

水を加えることにより水性サスペンションを製造するのに適した分散可能な粉末剤および顆粒剤は、分散剤もしくは湿潤剤、懸濁化剤、および1またはそれ以上の保存料と混合した活性成分を提供する。適切な分散剤もしくは湿潤剤、および懸濁化剤は上記のものにより例示される。さらなる賦形剤、例えば甘味料、香料、および着色料も存在してよい。これら組成物は、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸を加えることにより保存することができよう。

20

【0090】

本発明の方法に用いる化合物および医薬組成物は油中水エマルジョン剤の形であってもよい。油相は、植物油、例えばオリーブ油もしくはラッカセイ油、または鉱油、例えば液体パラフィン、またはこれらの混合物であってよい。適切な乳化剤は、天然のホスファチド、例えばダイズレシチン、および脂肪酸から誘導されたエステルまたは部分エステル、およびヘキシトール無水物、例えばソルビタンモノオレエート、および該部分エステルと、エチルオキシド、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートとの縮合生成物であってよい。エマルジョン剤は、甘味料、香料、保存料、および抗酸化剤も含んでいてよい。

30

【0091】

シロップ剤およびエリキシル剤は、甘味料、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、またはショ糖を用いて製剤化してよい。そのような製剤は、緩和薬、保存料、香料および着色料、および抗酸化剤も含んでいてよい。

【0092】

医薬組成物は、無菌注射可能水性溶液の形であってよい。用いることができる許容されるピークルおよび溶媒の中には水、リンゲル溶液、および等張性塩化ナトリウム溶液がある。

40

【0093】

無菌注射可能製剤は、活性成分が油状相に溶解している、無菌注射可能油中水ミクロエマルジョン剤であってもよい。例えば、活性成分は最初にダイズ油とレシチンの混合物に溶解してよい。次に、油状溶液を水とグリセロールの混合物に導入し、加工してミクロエマルジョン剤を形成する。

【0094】

注射可能溶液剤またはミクロエマルジョン剤は、局所ボーラス注射により患者の血流に導入することができよう。あるいはまた、本化合物の一定の循環濃度が維持されるように

50

溶液剤またはマイクロエマルジョン剤を投与することが好都合なことがある。そのような一定濃度を維持するために、連続的静脈送達装置を用いてよい。そのような装置の例にはDe ltec CADD-PLUS(登録商標)モデル5400静脈内用ポンプがある。

【0095】

医薬組成物は、筋肉内および皮下投与用の無菌注射可能水性または油脂性サスペンション剤の形であってよい。このサスペンション剤は、上記のそれら適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用い知られた方法に従って製剤化することができよう。無菌注射可能製剤は、無菌の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌注射可能溶液またはサスペンション(例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液のような)であってよい。さらに、無菌不揮発油を常套的に溶媒または懸濁化媒質として用いる。この目的には、合成モノ-またはジグリセリドを含むあらゆる無刺激性不揮発油を用いてよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射可能剤の製造に用途がある。

10

【0096】

本発明の方法に用いる本発明化合物は、薬剤の直腸内投与用の坐剤の形で投与することもできよう。これら坐剤は、該阻害剤と通常の温度で固体であるが直腸内温度で液体であり、直腸内で溶けて薬物を放出するであろう適切な非刺激性賦形剤と混合することにより製造することができる。そのような物質には、ココアバター、グリセリンゼラチン、水素化植物油、種々の分子量のポリエチレングリコールとポリエチレングリコールの脂肪酸エステル混合物が含まれる。

【0097】

局所使用には、本発明の化合物または組成物を含むクリーム剤、軟膏、ゼリー剤、溶液剤、またはサスペンション剤などを用いることができる。本明細書で用いている局所適用には洗口液およびうがい薬を含むことができる。

20

【0098】

本発明の方法に用いる化合物は、適切な鼻内ピークルおよび送達装置の局所使用を介して経鼻形で、または当業者によく知られた経皮的皮膚パッチの形を用いる経皮経路で投与することができる。経皮送達系の形で投与するには、もちろん、投薬は投薬計画を通して間欠的より連続的であろう。

【0099】

本発明の方法、化合物、および組成物は、治療する病状に対して特に有用であるように選んだ他のよく知られた治療剤と組み合わせて用いてもよい。例えば、本発明化合物は、知られた抗癌剤および細胞毒性剤と組み合わせると有用かもしれない。さらに、本発明の方法および化合物は、細胞表面増殖因子レセプターと核シグナル開始細胞増殖を結びつけるシグナリング経路の部分の他の阻害剤と組み合わせても有用かもしれない。

30

【0100】

本発明の方法は、限定されるものではないが、VEGFレセプター、アンギオスタチン、およびエンドスタチンを標的とするリボザイムおよびアンチセンスを含むVEGFレセプター阻害剤を含む、血管形成を阻害することにより腫瘍細胞の増殖および侵襲性を阻害する他の薬剤を用いても有用かもしれない。

【0101】

本発明の化合物および方法と組み合わせて用いることができる抗新生物薬の例には、一般に、適切なアルキル化剤、代謝拮抗薬；エピドフィロトキシン；抗新生物酵素；トポイソメラーゼ阻害剤；プロカルバジン；メトキサントロン；プラチナ配位複合体；生物反応修飾物質および成長阻害剤；ホルモン/抗ホルモン性治療剤、および造血成長因子が含まれる。抗新生物薬の典型的なクラスには、アントラサイクリンファミリーの薬剤、ビンカ薬、マイトマイシン、プレオマイシン、細胞毒性ヌクレオシド、エポチロン、ジスコデルモリド、プテリジンファミリーの薬剤、ジイネン、およびポドフィロトキシンが含まれる。それらクラスの特に有用なメンバーには、例えば、カルミノマイシン、ダウノルピシン、アミノプテリン、メトトレキセート、メトプテリン、ジクロロメトトレキセート、マイトマイシンC、ボルフィロマジン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、ゲムシタ

40

50

ビン、シトシンアラビノシド、ポドフィロトキシンもしくはポドフィロトキシン誘導体、例えば、エトポシド、リン酸エトポシドまたはテニポシド、メルファラン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ラウロシジン、ビンデシン、ラウロシン、パクリタキセルなどが含まれる。他の有用な抗新生物薬には、エストラムスチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、プレオマイシン、ゲムシタピン、イフォサミド、メルファラン、ヘキサメチルメラミン、チオテパ、シタラビン、イダトレキセート、トリメトレキセート、ダカルバジン、L-アスパラギナーゼ、カンプトテシン、CPT-11、トポテカン、アラ-C、ピカルタミド、フルタミド、ロイプロリド、ピリドベンゾインドール誘導体、インターフェロン、およびインターロイキンが含まれる。

#### 【0102】

10

本発明化合物または組成物をヒト対象に投与するとき、1日用量は、通常担当医師が決定し、用量は一般に個々の患者の年齢、体重、および反応、ならびに患者の症状の重症度に従って変化するであろう。

#### 【0103】

ある典型的適用において、適切な用量の化合物を、癌、例えば肺癌の治療を受ける哺乳動物に投与する。投与は、典型的には約0.01mg/kg体重～約100mg/kg体重/日(単回または分割用量で投与)、より好ましくは、少なくとも約0.1mg/kg体重/日で行う。特定の治療用量には、例えば、化合物約0.01mg～約1000mg、好ましくは例えば約1mg～約1000mgを含む。製剤の単位用量中の活性化合物の量は、特定の適用に従って約0.1mg～1000mg、好ましくは約1mg～300mg、より好ましくは10mg～200mgで変化または調節してよい。投与する量は、用いる化合物の特定の $IC_{50}$ 値、および健康、体重、および年齢のような因子を考慮した担当医師の判断に応じて変化するであろう。該化合物が単一の活性成分でない組み合わせ適用では、より少ない量の化合物を投与してまだ治療または予防効果がある可能性があるかもしれない。

20

#### 【0104】

好ましくは、医薬製剤は単位剤形である。そのような形では、製剤が適切な量の活性成分、例えば所望の目的を達成するための有効量を含む単位用量に小さく分割される。

#### 【0105】

用いる実際の用量は、患者の要求および治療すべき病状の重症度に応じて変えてよい。特定の状況のための適切な用量の決定は当該分野の技術の範囲内である。一般に、治療(処置)は、化合物の最適用量以下のより低用量で開始される。したがって、用量はその環境下で最適効果に達するまで小量ずつ増加させる。便宜上、総1日用量を分割し、所望により1日の間に部分に分けて投与してよい。

30

#### 【0106】

本発明の方法に用いる本発明の化合物および組成物の投与量および投与頻度、ならびに適用可能であれば他の化学療法剤および/または放射線療法は、患者の年齢、病状、および大きさ、ならびに治療すべき疾患の重症度といったような因子を考慮して担当臨床医(医師)の判断で調節されよう。

#### 【0107】

化学療法剤および/または放射線療法は、当該分野でよく知られた治療プロトコールに従って投与することができる。化学療法剤および/または放射線療法の投与は、治療すべき疾患、および該疾患に対する化学療法剤および/または放射線療法の知られた効果に応じて変化させることができる。また、熟練臨床医の知識にしたがって、治療プロトコール(例えば、投与量および投与回数)を患者に対して投与した治療薬(すなわち、抗新生物薬または放射線)の観察された効果を考慮し、投与した治療薬に対する該疾患の観察された反応を考慮して変化させることができる。

40

#### 【0108】

また、一般に、本発明化合物は化学療法剤と同じ医薬組成物で投与する必要はなく、異なる物理化学的特性のため異なる経路で投与することができよう。例えば、化合物/組成物はその良好な血液レベルをもたらす、維持するために経口投与してよいが、化学療法剤

50



は静脈内投与してよい。可能であれば同じ医薬組成物での投与方法および投与の妥当性は、十分に熟練臨床医の知識内である。初回投与は当該分野で知られた確立されたプロトコールに従って行うことができ、次いで観察された効果に基づいて熟練臨床医が用量、投与方法、および投与回数を修正することができる。

【0109】

化合物(および適切であれば化学療法および/または放射線)の特定の選択は、担当臨床医の診断、および患者の病状および適切な治療プロトコールの判定によって決まるであろう。

【0110】

本発明の化合物/組成物(および適切であれば化学療法剤および/または放射線)は同時に(例えば、同時に、実質的に同時に、または同じ治療プロトコール内で)、または増殖性疾患の性状、患者の病状、および該化合物/組成物と共に(すなわち単一の治療プロトコール内で)投与する化学療法剤および/または放射線の実際の選択に応じて連続的に投与することができる。

10

【0111】

組み合わせ適用および使用において、該化合物/組成物および化学療法剤および/または放射線を同時、または実質的に同時に投与しない場合は該化合物/組成物、および化学療法剤および/または放射線の最初の投与順序は重要でないかもしれない。すなわち、本発明の化合物/組成物を最初に投与し、次いで化学療法剤および/または放射線を投与するか、または化学療法剤および/または放射線を最初に投与し、次いで本発明の化合物/組成物を投与することができる。この交互投与を単一の治療プロトコールの間に反復してよい。治療プロトコール中の各療法剤の投与の順序および投与の反復回数の決定は、治療する疾患および患者の病状を評価後の熟練臨床医の知識の範囲内である。例えば、化学療法剤および/または放射線を最初に投与し(細胞毒性薬であれば特に)、次いで本発明の化合物/組成物の投与による処置を継続し、次いで好都合と判断したら化学療法剤および/または放射線の投与を行う(以下、治療プロトコールが完結するまで同様)。

20

【0112】

すなわち、経験および知識にしたがって、担当医師は、治療の進行につれて個々の患者の必要性にしたがって化合物/組成物を投与するための各プロトコールを修飾することができる。

30

【0113】

担当臨床医は、治療が投与した用量で有効であるかの判定において、患者の一般的な健康問題、およびより明確な徴候、例えば疾患関連症状の軽快、腫瘍増殖の阻害、腫瘍の実際の収縮、または転移阻害を考慮するであろう。腫瘍のサイズは標準的方法、例えば放射線学的研究、例えばCATまたはMRIスキャンにより測定することができ、逐次測定を用いて腫瘍の増殖が遅延しているかまたは逆転しているか否かを判定することができる。疾患関連症状、例えば痛みの軽減、および全体的病状の改善を用いて治療効果の判定を助けることもできる。

【実施例】

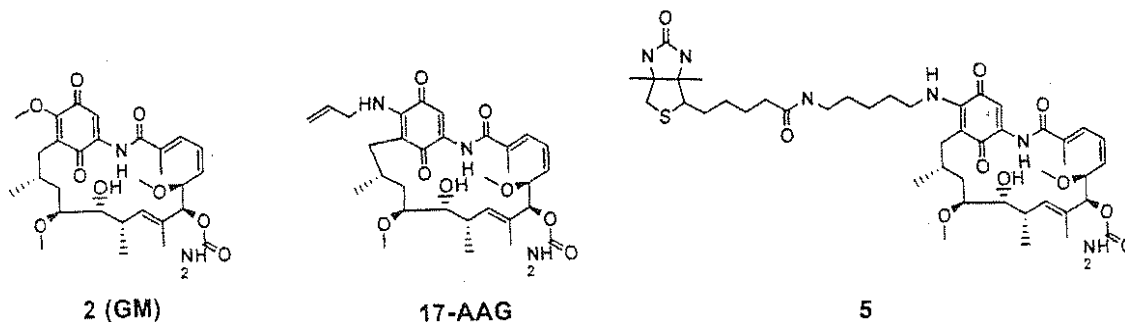
【0114】

以下の実施例は、単に例示であって、限定を目的とするものではない。実施例1-3は、式/化合物5のピオチン化ゲルダナマイシンの別の製造方法を示す。実施例4は、そのような化合物が他のHSP90リガンド、例えば他のアンサマイシン、例えば2GMおよび17-AAGを用いる競合結合アッセイに有用であることを示す。2GM、17-AAG、およびピオチン化ゲルダナマイシンのある態様を以下に構造的に例示する。

40

【0115】

## 【化7】



10

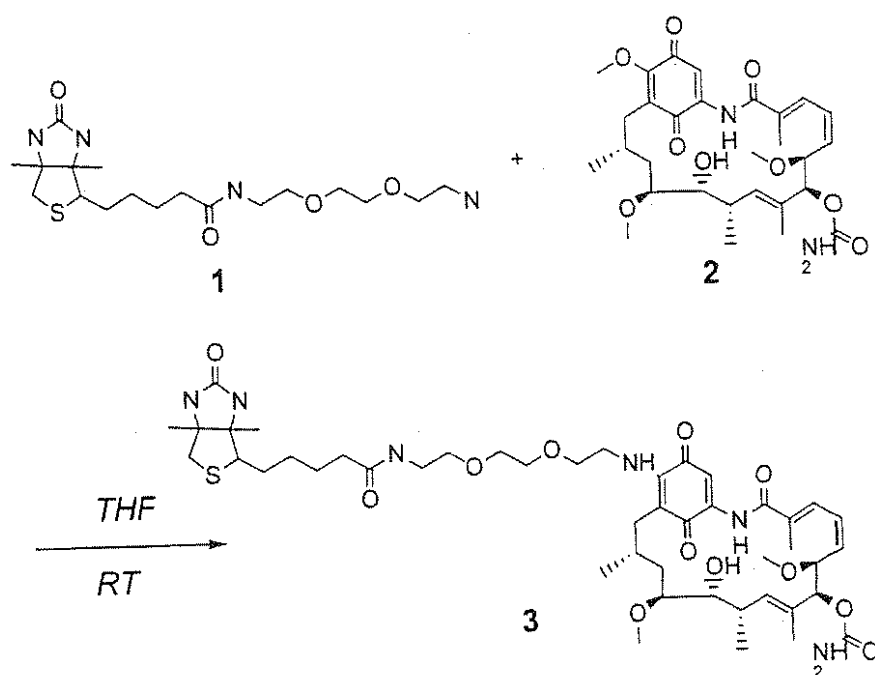
## 実施例1

HSP90を用いる競合結合試験に有用なビオチン化アンサマイシンの合成

## 【0116】

この実施例は、反応式：

## 【化8】



20

30

[ 式中、化合物番号は対応する構造の下に示し、合成の詳細は以下のごとくである。 ]  
に従う。

## 【0117】

15:1 THF-H<sub>2</sub>O 3mL中の(+)-ビオチニル-3,6-ジオキサオクタンジアミン1、50mg(0.134mmol)に、ゲルダナマイシン2、29.9(0.053mmol)を室温で加えた。反応物を一夜攪拌し、水(50mL)で反応を止め、EtOAc 2x50mLで抽出した。EtOAc抽出物を混合し、H<sub>2</sub>O 2x50mL、塩水1x50mLで洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、次いでシリカゲルフラッシュクロマトグラフィで精製して収率71%で88mg(0.095mmol)の3を得た。MP 113-117 °C。MS 926 (M+Na)。

40

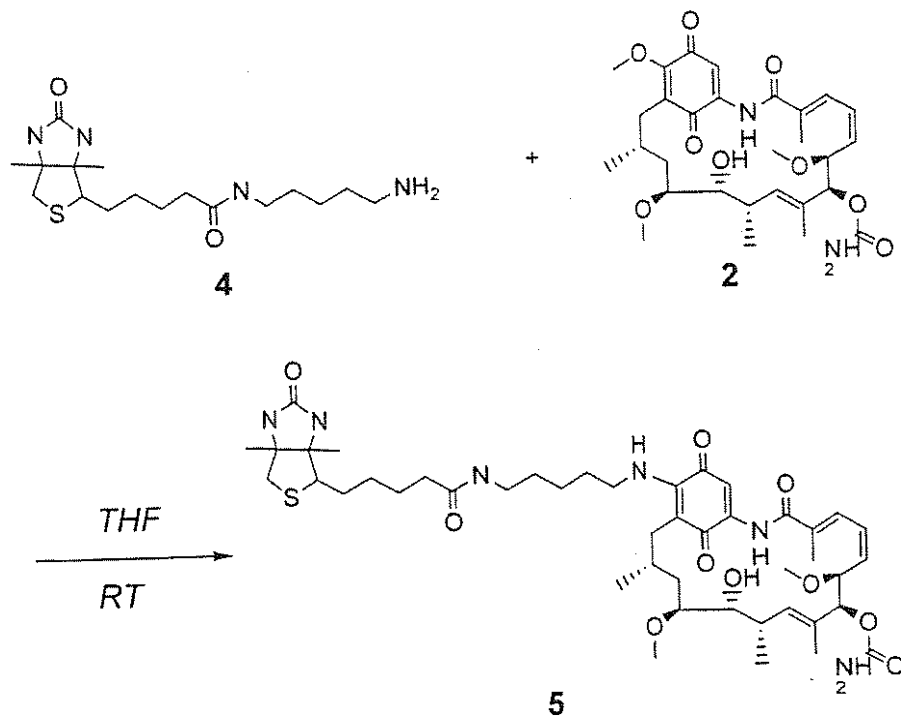
## 実施例2

HSP90を用いる競合結合試験に有用なビオチン化アンサマイシンの合成

## 【0118】

この実施例は、反応式：

## 【化 9】



10

20

[ 式中、化合物番号は対応する構造の下に示し、合成の詳細は以下のごとくである。 ]  
に従う。

## 【 0 1 1 9 】

15:1 THF-H<sub>2</sub>O 3mL中の5-(ビオチンアミド)ペンチルアミン4、50mg(0.152mmol)に、ゲルダナマイシン2、28mg(0.050mmol)を室温で加えた。反応物を一夜攪拌し、水(50mL)で反応を止め、EtOAc 2x50mLで抽出した。EtOAc抽出物を混合し、H<sub>2</sub>O 2x50mL、塩水1x50mLで洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、次いでシリカゲルフラッシュクロマトグラフィで精製して収率75%で100mg(0.114mmol)の5を得た。MP 143-147 °C。MS 880(M+Na)。

30

## 実施例3

HSP90を用いる競合結合試験に有用なビオチン化アンサマイシンの合成

## 【 0 1 2 0 】

この実施例は、反応式：

20

【 0 1 2 1 】

30

ビオチン化アンサマイシンを用いるHSP90結合アッセイ

精製天然HSP90を96ウェルプレートに37℃で1hrインキュベーションすることによりコートした。コートされていないHSP90を除去し、ウェルを1xPBS(リン酸緩衝生理食塩水)緩衝液で洗浄した。次に、化合物5(ピオチン化ゲルダナマイシン)をウェルに加え、さらに反応を37℃で1hrインキュベーションした。ウェルを1xPBSで2回洗浄し、次いで20ug/ml ストレプトアビジン-フィコエリスリンを加え、37℃で1hrインキュベーションした。ウェルを再度1xPBSで2回洗浄した。次に、蛍光をGemini分光蛍光光度計(Molecular Devices)にて励起485nmおよび放射580nmを用いて測定した。

## 40

【 0 1 2 4 】

50

## 【0125】

図2. 17-アリルアミノゲルダナマイシン(17-AAG)によるビオチン化-GM(化合物5)結合の競合。96ウェルプレート上をコートした天然Hsp90を、増加する濃度の、0nM(B4)、100nM(C4)、300nM(D4)、1000nM(E4)、3000nM(F4)、10,000nM(G4)、および100,000nM(閉ダイアモンド)の17-AAGとプレインキュベーションし、次いで5を加えた。5の結合を、ストレプトアビジン-フィコエリスリン(励起：485nm、放射：510-650nm)の蛍光を測定することにより検出した。いかなるHSP90も存在しないバックグラウンド蛍光(A4)は最小であった。増加する濃度の17-AAGは580nmのピーク蛍光を阻害する。

## 【0126】

図3. ゲルダナマイシン(GM)および17-アリルアミノゲルダナマイシン(17-AAG)によるビオチン化-GM(化合物5)結合の競合。96ウェルプレート上をコートした天然Hsp90を、増加する濃度の、0~100,000nMのGMまたは17-AAGとプレインキュベーションし、次いで5を加えた。5の結合を、ストレプトアビジン-フィコエリスリン(励起：485nm、放射：580nm)の蛍光を測定することにより検出した。いかなるHSP90も存在しない(HSP90なし)バックグラウンド蛍光は最小であった。増加する濃度のGMまたは17-AAGは580nmのピーク蛍光を阻害する。

## 実施例5

## 【0127】

腫瘍細胞株から得たHSP90は既知のHSP90モジュレーターとより強く結合する。

## 【0128】

溶解用緩衝液(20mM Hepes、pH7.3、1mM EDTA、5mM MgCl<sub>2</sub>、100mM KCl)を用いて調製した精製天然HSP90タンパク質(Stressgen)または細胞溶解物を、CF7 (17-AAG)または被検化合物の存在下または非存在下で4、15分間インキュベーションした。次に、ビオチン-ゲルダナマイシン(ビオチン-GM)を先に記載したように該混合物に加え、反応物をさらに4で1hr回転させながらインキュベーションした。次に、BioMag(登録商標)ストレプトアビジン磁気ビーズを混合物に加え、反応物を4でさらに1hr回転させることによりインキュベーションした。チューブを磁気ラック上におき、非結合上清を除去した。磁気ビーズを溶解用緩衝液で3回洗浄し、洗浄液を捨てた。SDS-PAGE試料用緩衝液をビーズに加え、95で5minボイルした。試料を10% SDSタンパク質ゲル(Novex)、次いで抗HSP90モノクローナル抗体(Stressgen SPA-830)を用いるウエスタンブロットで分析した。ウエスタンブロットにおけるバンドをBio-rad Fluor-S Imagerを用いて定量し、CF7または被検化合物の結合阻害%を計算した。報告したIC<sub>50</sub>は最大結合阻害の半分を生じるのに必要な化合物の濃度である。熱ショックHSP90を利用する実験では、精製HSP90天然タンパク質を50で15minインキュベーションした。ビス-ANS処理HSP90を用いる実験では、精製HSP90タンパク質をビスANS (Molecular Probes)と共に37で30minインキュベーションした。結果を図4-6に示す。

## 【0129】

前記実施例は本発明の種々の局面および態様を単に例示するものであって、限定するものではない。本明細書に記載のすべての文献は、本発明の属する技術分野の水準を示す。使用した試薬は、本発明のそれら新規試薬以外は市販されており、そして/または過度な努力なしに当業者が容易に合成するかまたは得ることができる。いずれの文献も先行技術であると認めるものではないが、各文献の開示は、その全体が個々に本明細書の一部を構成するのと同じ程度に本明細書の一部を構成する。

## 【0130】

当業者は、本発明が対象を実施し、記載した目的および利点ならびにその中の固有のものを得るために十分適合していることを容易に理解するであろう。記載した方法および組成物は好ましい態様を示し、例示であって、本発明の範囲を限定することを意図しない。ある種の修飾および他の使用を当業者が思いつくであろうし、特許請求の範囲に定義した本発明の精神内に含まれる。

## 【0131】

10

20

30

40

50

本発明の範囲と精神から離れることなく本発明に種々の置換および修飾を行ってよいことは当業者に容易にわかるであろう。すなわち、そのようなさらなる態様は本発明の範囲および以下の特許請求の範囲内である。

【0132】

本明細書に例示した本発明は、本明細書に具体的に開示していないあらゆる要素、限定なしに適切に実施することができよう。すなわち、例えば用語「含む(包含する)」、「実質的に～からなる」、「および「～からなる」は、トランジションフレーズとしてそれぞれ異なる意味を持つが、そのような各フレーズは本発明の種々の局面または態様を示すためにその他のものの代わりに用いてよい。用いている用語および表現は、説明の用語として用いており、限定ではなく、示し、記載した特徴のあらゆる等価物、またはその部分を除外するような用語および表現の使用を意図するものではない。本発明の範囲内で種々の修飾が可能であると認識される。すなわち、本発明を好ましい態様により具体的に開示したが、当業者は本明細書に記載した概念の所望の特徴、修飾、および変化を行ってよく、そのような修飾および変化は明細書および添付の特許請求の範囲に定義した本発明の範囲内にあると考えられると理解すべきである。

10

【0133】

さらに、本発明の特徴および局面はマーカッシュグループまたは代替りの他のグループ分けにより説明されている場合は、当業者は、本発明はマーカッシュグループまたは他のグループのあらゆる個々のメンバーもしくはメンバーのサブグループについてはそれによっても説明され、個々のメンバーが適切にもしくは但し書きにより除外されていると認識するであろう。

20

【0134】

他の態様は以下の特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】 HSP90に対するゲルダナマイシンおよびビオチン化ゲルダナマイシンの競合結合を示す。

【図2】 HSP90に対する17-アリルアミノゲルダナマイシン(17-AAG)およびビオチン化ゲルダナマイシンの競合結合を示す。

【図3】 HSP90に対する遊離ゲルダナマイシン、17-AAG、およびビオチン化ゲルダナマイシンの競合結合を示す。

30

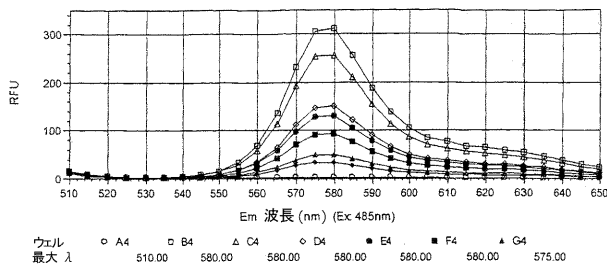
【図4】 17-AAG(CF7)は、本明細書に記載の方法を用いて測定すると、正常細胞(繊維芽細胞、RPTEC)または精製HSP90単独より腫瘍細胞(BT474)由来のHSP90でより高い明白な結合親和性を有することを示す。

【図5】 17-AAG(CF7)は、正常細胞、熱ショックHSP90、またはピス-ANS処理HSP90より特異的高Her2発現細胞、SKOV-3、SKBR-3、およびN87由来のHSP90でより高い明白な結合親和性を有することを示す。

【図6】 本発明のある種のアッセイ態様で用いた種々の被検化合物の結果を示す。

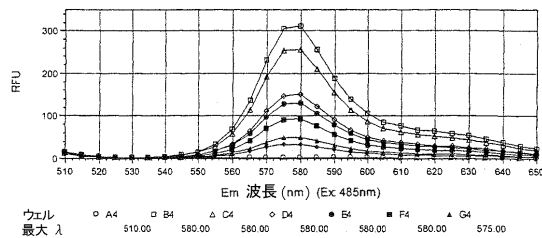
【 図 1 】

Figure 1



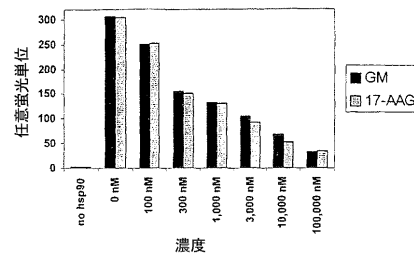
【 図 2 】

Figure 2



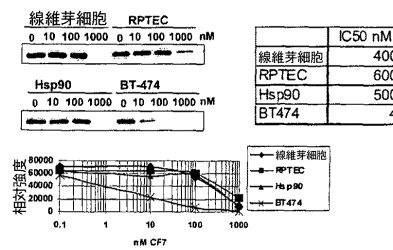
【 図 3 】

Figure 3



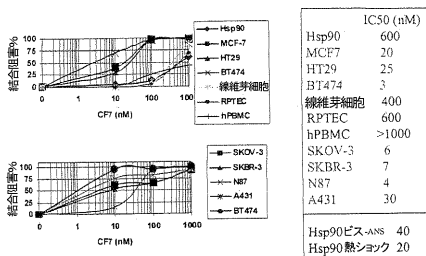
【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5

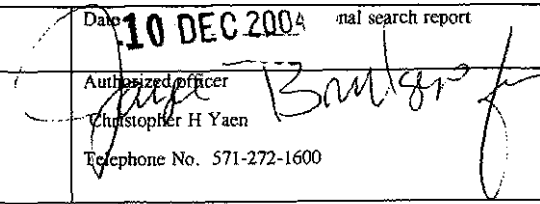


【 図 6 】

Figure 6

lysate	hsp90	比	EC	構造
IC50	IC50		番号	
nM	nM			
20	700	35	EC1	
30	2000	67	EC3	
15	1000	67	EC20	
50	4500	90	EC21	
10	1000	100	EC23	
8	2000	250	EC24	
9	1500	167	EC26	
4	2000	500	EC60	

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/39993										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 35/00, 38/00; C12Q 1/70 US CL : 424/115; 514/2; 435/5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/115; 514/2; 435/5  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) Please See Continuation Sheet												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X --- A</td> <td>KELLAND, L.R. et al. DT-Diaphorase Expression and Tumor Cell Sensitivity to 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin, An Inhibitor of Heat Shock Protein 90. J. Natl. Cancer Inst. 17 November 1999, Vol. 91, No. 22, pages 1940-1949, entire document.</td> <td>1-15, 18-21, 24, 26, 29, 30, 31 ----- 16-17, 23, 25, 27-28, 32 1-9, 30 ----- 10-21, 23-29, 31</td> </tr> <tr> <td>X --- A</td> <td>MARCU, M.G. et al. The Heat Shock Protein 90 Antagonist Novobiocin Interacts with a Previously Unrecognized ATP-Binding Domain in the Carboxyl Terminus of the Chaperone. J. Biol. Chem. 24 November 2000, Vol. 275, No. 47, pages 37181-37186, entire document.</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X --- A	KELLAND, L.R. et al. DT-Diaphorase Expression and Tumor Cell Sensitivity to 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin, An Inhibitor of Heat Shock Protein 90. J. Natl. Cancer Inst. 17 November 1999, Vol. 91, No. 22, pages 1940-1949, entire document.	1-15, 18-21, 24, 26, 29, 30, 31 ----- 16-17, 23, 25, 27-28, 32 1-9, 30 ----- 10-21, 23-29, 31	X --- A	MARCU, M.G. et al. The Heat Shock Protein 90 Antagonist Novobiocin Interacts with a Previously Unrecognized ATP-Binding Domain in the Carboxyl Terminus of the Chaperone. J. Biol. Chem. 24 November 2000, Vol. 275, No. 47, pages 37181-37186, entire document.		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X --- A	KELLAND, L.R. et al. DT-Diaphorase Expression and Tumor Cell Sensitivity to 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin, An Inhibitor of Heat Shock Protein 90. J. Natl. Cancer Inst. 17 November 1999, Vol. 91, No. 22, pages 1940-1949, entire document.	1-15, 18-21, 24, 26, 29, 30, 31 ----- 16-17, 23, 25, 27-28, 32 1-9, 30 ----- 10-21, 23-29, 31										
X --- A	MARCU, M.G. et al. The Heat Shock Protein 90 Antagonist Novobiocin Interacts with a Previously Unrecognized ATP-Binding Domain in the Carboxyl Terminus of the Chaperone. J. Biol. Chem. 24 November 2000, Vol. 275, No. 47, pages 37181-37186, entire document.											
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"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)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"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)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"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 17 November 2004 (17.11.2004)		Date <b>10 DEC 2004</b> nal search report										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  Christopher H. Yaen Telephone No. 571-272-1600										



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US02/39993

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claim Nos.: 22  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claim 22 is missing from the claim set.
3. ☐ Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-21-, 23-32

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/39993

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-21, 23-32, drawn to a method of modulating a high affinity form of HSP90.

Group II, claim(s) 33-42, drawn to a method of screening for HSP90 modulators.

Group III, claim(s) 43-56, drawn to a method of treating or preventing an HSP90-mediated disease.

Group IV, claim(s) 57-68, drawn to a purified or isolated preparation or complex of HSP90 taken from a tumor cell.

Group V, claim(s) 69-74, drawn to diagnostic kit comprising one or more members selected from HSP90 complex or preparation, and a compound that binds to HSP90.

Group VI, claim(s) 75-82, drawn to an assay that measures the binding of a compound to a particular form of HSP90.

Group VII, claim(s) 83, drawn to method of making a biotinylated ansamycin.

Group VIII, claim(s) 84-91, drawn to a method of evaluating the ability of a compound to bind to HSP90.

Group IX, claim(s) 92-94 and 102-103, drawn to a composition comprising a labeled ansamycin.

Group X, claim(s) 95-97, 102-106, drawn to a complex comprising a biotinylated ansamycin bound to an HSP90.

Group XI, claim(s) 98, 102-103, drawn to a compound of formula 3.

Group XII, claim(s) 99, drawn to a method of making the biotinylated ansamycin of formula 3.

Group XIII, claim(s) 100, drawn to a compound of formula 7.

Group XIV, claim(s) 101, drawn to a method of making the biotinylated ansamycin of formula 7.

The inventions listed as Groups I-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature linking groups I-XIV appears to be a method of modulating HSP90 by contacting HSP90 with a modulator. However, Kelland LR *et al* teach the modulation of HSP90 with a modulator termed 17-AAG (see abstract).

Therefore, the technical feature linking the inventions of groups I-XIV do not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2 as it does not define a contribution over the prior art.

lease See Continuation Sheet

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US02/39993

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

WEST, PUBMED, STN DATABASE (medline, cancerlit, biosis, confsci, scisearch, embase, caplus, uspatfull, pctfull, dissabs)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/52	A 6 1 K 31/52	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7076	A 6 1 K 31/7076	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 D 495/04	C 0 7 D 495/04	1 0 3
C 0 7 K 1/113	C 0 7 K 1/113	
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	U
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 3

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

(72)発明者 アディーラ・カマル

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、ナンバー 7 8、ジェネシー 8 1 4 8 番

(72)発明者 フランシス・ジェイ・バローズ

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州サンディエゴ、ナンバー・エム 1 1 4、リージェンツ  
・ロード 9 2 4 5 番

(72)発明者 リン・ジャン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サンディエゴ、ブリケリア・ストリート 1 2 4 5 5 番

(72)発明者 マーカス・エフ・ボーム

アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州サンディエゴ、ナンバー 4 イー、ラモント・ストリー  
ト 3 8 3 3 番

F ターム(参考) 2G045 BA11 BB50 CB01 DA36

2G054 AA06 AB04 CA23 EA01

4C071 AA01 BB01 CC02 CC21 DD06 EE12 FF04 GG06 HH08 JJ05

LL01

4C084 AA17 MA52 MA55 NA14 ZA01 ZA36 ZB02 ZB11 ZB26 ZB35

4C086 AA01 BC13 BC39 CA01 CB07 CB28 EA18 MA01 MA04 MA52

MA55 NA14 ZA01 ZA36 ZB02 ZB11 ZB26 ZB35

4H045 AA10 AA20 AA30 BA50 BA51 CA41 EA28 EA50 FA10