

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-509844
(P2006-509844A)

(43) 公表日 平成18年3月23日(2006.3.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C O 3 1
A 6 1 K 31/18 (2006.01)	A 6 1 K 31/18	4 C O 3 6
A 6 1 K 31/428 (2006.01)	A 6 1 K 31/428	4 C O 5 5
A 6 1 K 31/433 (2006.01)	A 6 1 K 31/433	4 C O 6 3
A 6 1 K 31/4425 (2006.01)	A 6 1 K 31/4425	4 C O 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-510334 (P2005-510334)	(71) 出願人	501161745
(86) (22) 出願日	平成15年11月26日 (2003.11.26)		インスティトゥート オブ ヴァイロロジ
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月20日 (2005.7.20)		ー
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/037783		スロヴァキア共和国 8 4 2 4 6 プラ
(87) 国際公開番号	W02004/048544		ティスラーヴァ ドゥブラフスカ セスタ
(87) 国際公開日	平成16年6月10日 (2004.6.10)		9 スロヴァック アカデミー オブ
(31) 優先権主張番号	60/429, 089		サイエンシース
(32) 優先日	平成14年11月26日 (2002.11.26)	(71) 出願人	505191009
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スプラン, クラウディオ
(31) 優先権主張番号	60/489, 473		SUPURAN, Claudiu
(32) 優先日	平成15年7月22日 (2003.7.22)		イタリア国 1-50122 フロレンチ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		エ ヴィーア デ チェルキ 6
(31) 優先権主張番号	60/515, 104		
(32) 優先日	平成15年10月28日 (2003.10.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CA-IX特異的阻害剤

(57) 【要約】

MNタンパク質を異常発現する脊椎動物の腫瘍発生前/腫瘍細胞の増殖を阻害するための治療法を開示する。化合物、好ましくは膜不透過性化合物であって、MNタンパク質/ポリペプチドの酵素活性を阻害し、腫瘍発生前/腫瘍性疾患の患者の治療に有用なものを判別するためのスクリーニングアッセイを提供する。さらに、正の電荷を帯び、膜不透過性の複素環式スルホンアミドCA阻害剤であって、膜結合性の炭酸脱水酵素CA-IXに対する親和性が高い化合物を調製する方法を開示している。好ましいCA-IX特異的阻害剤は、芳香環式および複素環式スルホンアミド類であり、好ましくは膜不透過性である。特に好ましいCA-IX特異的阻害剤は、そのような芳香環式および複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類である。本発明に従うCA-IX特異的阻害剤は、腫瘍発生前/腫瘍疾患の診断/予後診断、ならびに、前癌性細胞、腫瘍および/もしくは転移の検出などを目的とする画像法にも使用することができる。CA-IX特異的阻害剤は、放射線治療用に放射性同位元素で標識する、または結合を形成することができる。CA-IX特異的阻害剤は、従来から使用されている治療用抗癌剤、癌関連経路に対するその他の別異の阻害剤、生体還元性薬物、または各治療法の効果を増強するための放射線治療と組み合わせることができる。CA-IX特異的阻害剤は、CA-IX特異的抗体、好ましくはモノクローナル抗体または生物学的に活性な抗体フラグメント、より好ましくは、ヒト型化した、または完全にヒト型のCA-IX特異的モノクローナル抗体もしくはそのようなモノクローナル抗体の生物学的に活性なフラグメントと組み合わせることもできる。さらにまた、CA-IX特異的阻害剤は、細胞表面にCA-IXを発現する腫瘍発生前/腫瘍細胞に標的送達をするためのベクターと組み合わせ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

MN/CA-IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる前癌性もしくは癌性疾患を有する哺乳類を治療する方法であって、治療有効量の化合物を該哺乳類に投与することを含み、該化合物は、以下の工程を含むスクリーニングアッセイにおいてMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断された、有機分子および無機分子よりなる群から選択される化合物であることを特徴とする方法：

a) 化合物の一連の希釈液、ならびに、MN/CA-IXタンパク質もしくはMN/CA-IXタンパク質の炭酸脱水酵素ドメインを含有するフラグメントの一連の希釈液を調製し；

b) 前記化合物の希釈液を、前記MN/CA-IXタンパク質もしくは該MN/CA-IXタンパク質のフラグメントの希釈液と混合して、20 で10分間プレインキュベートし； 10

c) 反応容器内において、前記化合物の希釈液と前記MN/CA-IXタンパク質もしくはタンパク質のフラグメントの希釈液との混合物をプレインキュベートしたものを、飽和CO₂溶液、0.2mMのフェノールレッド、0.1MのNa₂SO₄、および10mMのHepes緩衝液（pH7.5）から実質的になる基質と、20 で10～100秒かけて混合し；

d) 同時に、ストップフロー分光光度計を用いて、反応容器の内容物について吸収極大波長557nmにおける吸光度を測定し；さらに、

e) 前記化合物の阻害定数K_iを求め；

このとき、該阻害定数K_iが約50nM未満の場合に、該化合物はMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断され；さらに、該化合物は、アセタゾラミド、エトクスゾラミド、メタゾラミドおよびシアナートよりなる群から選択されたものではない。 20

【請求項 2】

前記哺乳類がヒトであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記化合物の阻害定数K_iが約35nM未満であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記化合物の阻害定数K_iが約10nM未満であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記化合物が有機化合物であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記化合物が無機化合物であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 7】

前記有機化合物が芳香環式化合物であることを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記有機化合物が、芳香環式スルホンアミドまたは複素環式スルホンアミドであることを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

前記芳香環式スルホンアミドが、置換芳香環式スルホンアミドであり、スルホンアミド部位が環構造に結合している芳香環構造を有し、さらに、ハロゲン基、ニトロ基、およびアルキルラジカルが1～4個の炭素原子を含むアルキルアミノ基よりなる群から独立して選択される1個またはそれ以上の置換基を有することを特徴とする請求項 8 記載の方法。 40

【請求項 10】

前記化合物が、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される1種類の炭酸脱水酵素の酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

前記化合物が、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される少なくとも2種類の炭酸脱水酵素の酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 12】

前記化合物が、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される炭酸脱水酵素のそれぞれの酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項13】

前記化合物が、CA-II酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項14】

CA-II酵素活性に対する前記化合物の阻害が、以下の工程を含む方法によって試験されることを特徴とする請求項13記載の方法：

- a) 化合物の一連の希釈液およびCA-IIの一連の希釈液を調製し；
- b) 前記化合物の希釈液をCA-IIの希釈液と混合して、20℃で10分間プレインキュベートし；
- c) 前記化合物と前記CA-IIとの混合物をプレインキュベートしたものを、反応容器内の無水アセトニトリル中に4-ニトロフェニルアセタートを含む基質溶液(pH7.4)に、25℃において1~3分間かけて加え；
- d) 同時に、分光光度計を用いて、前記反応容器の内容物について、吸収極大波長400nmにおける吸光度を測定し；さらに、
- e) 前記化合物の阻害定数 K_i を求める。

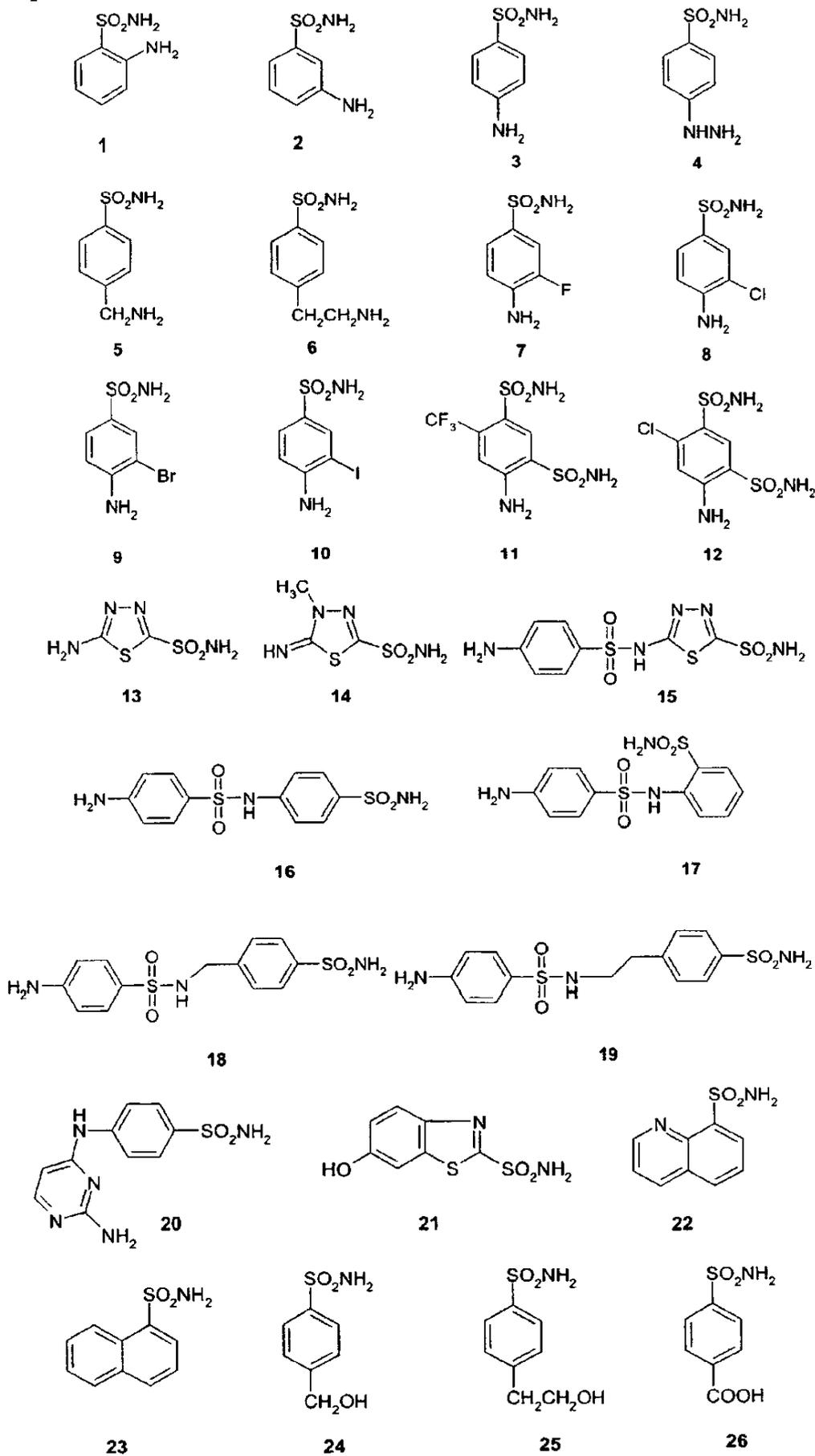
10

【請求項15】

前記芳香環式スルホンアミドまたは複素環式スルホンアミドが、以下の化合物よりなる群から選択されることを特徴とする請求項8記載の方法：

20

【化 1】



10

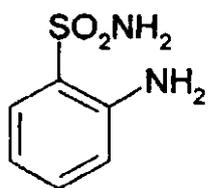
20

30

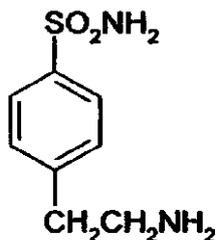
40

前記化合物が、以下の化合物よりなる群から選択される芳香環式スルホンアミドであることを特徴とする請求項 8 記載の方法：

【化 2】

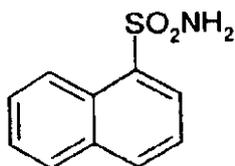


1

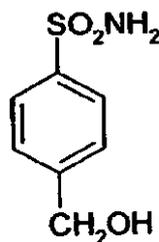


6

10

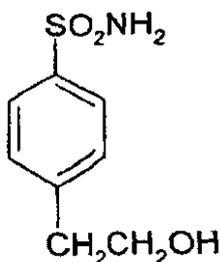


23

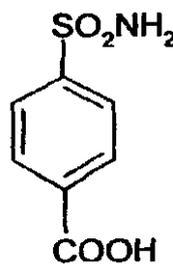


24

20



25



26

30

【請求項 17】

前記芳香環式スルホンアミドの芳香環内の少なくとも 1 個の炭素原子にハロゲン原子が結合していることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 18】

前記化合物が複素環式スルホンアミドであることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 19】

前記複素環式化合物が置換複素環式スルホンアミドであり、該置換複素環式スルホンアミドは、環構造に結合しているスルホンアミド部位を有し、さらに、ハロゲン基、ニトロ基、およびアルキルラジカルが 1 ~ 4 個の炭素原子を有するアルキルアミノ基よりなる群から独立して選択される 1 個またはそれ以上の置換基を有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

40

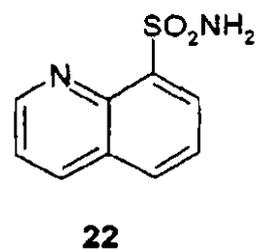
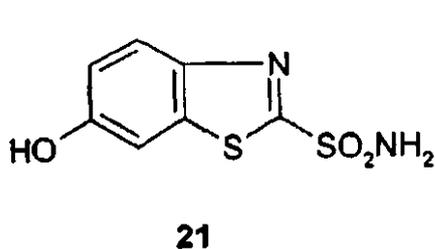
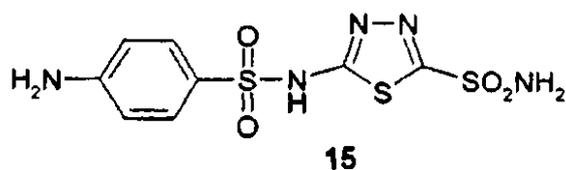
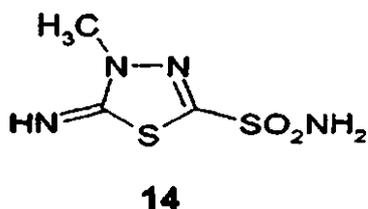
【請求項 20】

前記複素環式スルホンアミドがハロゲン化されていることを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】

前記化合物が、以下の化合物よりなる群から選択される複素環式スルホンアミドであることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【化 3】



10

【請求項 2 2】

MN/CA-IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる前癌性もしくは癌性疾患を有する哺乳類を治療する方法であって、膜不透過性化合物を含有する組成物の治療有効量を該哺乳類に投与することを含み、該膜不透過性化合物は、以下の工程を含むスクリーニングアッセイにおいてMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断された、有機分子および無機分子よりなる群から選択される化合物であることを特徴とする方法：

20

a) 化合物の一連の希釈液、ならびに、MN/CA-IXタンパク質もしくはMN/CA-IXタンパク質の炭酸脱水酵素ドメインを含有するフラグメントの一連の希釈液を調製し；

b) 前記化合物の希釈液を、前記MN/CA-IXタンパク質もしくは該MN/CA-IXタンパク質のフラグメントの希釈液と混合して、20 で10分間プレインキュベートし；

c) 反応容器内において、前記化合物の希釈液と前記MN/CA-IXタンパク質もしくはタンパク質のフラグメントの希釈液との混合物をプレインキュベートしたものを、飽和CO₂溶液、0.2mMのフェノールレッド、0.1MのNa₂SO₄、および10mMのHepes緩衝液（pH7.5）から実質的になる基質と、20 で10～100秒かけて混合し；

30

d) 同時に、ストップフロー分光光度計を用いて、反応容器の内容物について吸収極大波長557nmにおける吸光度を測定し；さらに、

e) 前記膜不透過性化合物の阻害定数K_iを求め；

このとき、該阻害定数K_iが約50nM未満の場合に、該膜不透過性化合物はMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断される。

【請求項 2 3】

前記哺乳類がヒトであることを特徴とする請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記膜不透過性化合物の阻害定数K_iが約35nM未満であることを特徴とする請求項 2 2 記載の方法。

40

【請求項 2 5】

前記膜不透過性化合物の阻害定数K_iが約10nM未満であることを特徴とする請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記膜不透過性化合物が有機化合物であることを特徴とする請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記膜不透過性化合物が無機化合物であることを特徴とする請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記膜不透過性有機化合物が芳香環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体または複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項 2 6 記載の方法

50

。

【請求項 29】

前記膜不透過性化合物が、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される1種類の炭酸脱水酵素の酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項28記載の方法。

【請求項 30】

前記膜不透過性化合物が、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される少なくとも2種類の炭酸脱水酵素の酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項28記載の方法。

【請求項 31】

前記膜不透過性化合物が、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される炭酸脱水酵素のそれぞれの酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項28記載の方法。

【請求項 32】

前記膜不透過性化合物が、CA-IV酵素活性に対するよりも、MN/CA-IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項28記載の方法。

【請求項 33】

CA-IV酵素活性に対する前記膜不透過性化合物の阻害が、以下の工程を含む方法によって試験されることを特徴とする請求項32記載の方法：

- a) 膜不透過性化合物の一連の希釈液およびCA-IVの一連の希釈液を調製し；
- b) 前記膜不透過性化合物の希釈液をCA-IVの希釈液と混合して、20℃で10分間プレインキュベートし；
- c) 前記化合物と前記CA-IVとの混合物をプレインキュベートしたものを、反応容器内の無水アセトニトリル中に4-ニトロフェニルアセタートを含む基質溶液(pH7.4)に、25℃において1~3分間かけて加え；
- d) 同時に、分光光度計を用いて、前記反応容器の内容物について、吸収極大波長400nmにおける吸光度を測定し；さらに
- e) 前記化合物の阻害定数 K_i を求める。

【請求項 34】

前記膜不透過性化合物が芳香環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項28記載の方法。

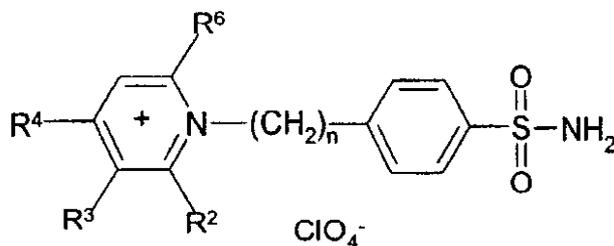
【請求項 35】

前記膜不透過性化合物が、スルファニルアミド、ホモスルファニルアミドおよび4-アミノエチルベンゼンスルホンアミドよりなる群から選択される芳香環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項34記載の方法。

【請求項 36】

前記芳香環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体が、以下の一般式で表されることを特徴とする請求項34記載の方法：

【化 4】



ここで、 n は0、1または2であり；

R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_6 は、水素、1~12個の炭素原子を含むアルキル部位およびアリール部位よりなる群からそれぞれ独立して選択される。

【請求項 37】

R2は、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、tert - ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R3は、水素およびメチルよりなる群から選択され；

R4は、水素、メチルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R6は、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピルおよびフェニルよりなる群から選択されることを特徴とする請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

R3は水素であり；

R4およびR6はフェニルであり；

n が 0 であるとき、R2は、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；さらに、

n が 1 または 2 であるとき、R2は、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、tert - ブチルおよびフェニルよりなる群から選択されることを特徴とする請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

R3は水素であり；

R4はフェニルであり；

n が 0 であるとき、R2およびR6は同一であって、メチル、エチル、n - プロピルおよびイソプロピルよりなる群から選択され；さらに、

n が 1 または 2 であるとき、R2およびR6は同一であって、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピルおよびフェニルよりなる群から選択されることを特徴とする請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 0】

R2、R3、R4およびR6がメチルであることを特徴とする請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 1】

n が 0、1 もしくは 2 であるとき、R2、R4およびR6はメチルであり、R3は水素である；か、あるいは、

n が 1 もしくは 2 であるとき、R2はイソプロピルであり、R3は水素であり、R4はメチルであり、さらに、R6はメチルもしくはイソプロピルである；か、あるいは、

n が 2 であるとき、R2およびR6はフェニルであり、R3およびR4は水素であることを特徴とする請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 2】

n が 2 であるとき、R2およびR6はメチルであり、R3は水素であり、R4はフェニルである；か、あるいは、

n が 2 であるとき、R2およびR6はエチルであり、R3は水素であり、R4はフェニルである；か、あるいは、

n が 2 であるとき、R2、R3、R4およびR6はメチルであることを特徴とする請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 3】

前記膜不透過性化合物が、複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項 2 8 記載の方法。

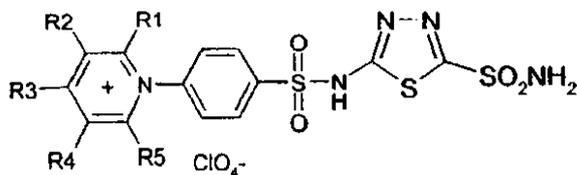
【請求項 4 4】

前記膜不透過性化合物が、アミノベンゾールアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

前記複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体が、以下の一般式で表されることを特徴とする請求項 4 3 記載の方法：

【化5】



ここで、R1、R2、R3、R4およびR5は、水素、1～12個の炭素原子を含むアルキル部位およびアリール部位よりなる群からそれぞれ独立して選択される。

【請求項46】

10

R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチル、tert-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R2は、水素およびメチルよりなる群から選択され；

R3は、水素、メチル、n-ノニルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R4は水素であり；さらに、

R5は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチル、tert-ブチル、n-ノニルおよびフェニルよりなる群から選択されることを特徴とする請求項45記載の方法。

【請求項47】

20

R2およびR4は水素であり；

R3はメチルであり；さらに、

R1およびR5は同一であって、メチル、イソプロピルおよびtert-ブチルよりなる群から選択されることを特徴とする請求項46記載の方法。

【請求項48】

R2およびR4は水素であり；

R3はフェニルであり；さらに、

R1およびR5は同一であって、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択されることを特徴とする請求項46記載の方法。

【請求項49】

30

R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピルおよびn-ブチルよりなる群から選択され；

R2およびR4は水素であり；

R3およびR5はフェニルであることを特徴とする請求項46記載の方法。

【請求項50】

R2およびR4は水素であり、R3は水素またはメチルであり、ならびに、R1およびR5はフェニルである；か、あるいは、

R1、R2およびR5はメチルであり、R3はフェニルであり、ならびに、R4は水素である；か、あるいは、

R1はメチルであり、R2およびR4は水素であり、ならびに、R3およびR5はn-ノニルであることを特徴とする請求項46記載の方法。

40

【請求項51】

R1はメチルもしくはイソプロピルであり、R3およびR5はメチルであり、ならびに、R2およびR4は水素である；か、あるいは、

R1およびR5は同一であって、メチルもしくはエチルであり、R2およびR4は水素であり、ならびに、R3はフェニルである；か、あるいは、

R1、R2、R3およびR5はメチルであり、ならびにR4は水素であることを特徴とする請求項46記載の方法。

【請求項52】

腫瘍細胞がMN/CA-IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる腫瘍を有する患者において腫瘍の増殖を阻害する方法であって、化合物を含有する組成物の治療有効

50

量を該患者に投与することを含み、該化合物は、以下の工程を含むスクリーニングアッセイにおいてMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断された、有機分子および無機分子よりなる群から選択される化合物であることを特徴とする方法：

a) 化合物の一連の希釈液、ならびに、MN/CA-IXタンパク質もしくはMN/CA-IXタンパク質の炭酸脱水酵素ドメインを含有するフラグメントの一連の希釈液を調製し；

b) 前記化合物の希釈液を、前記MN/CA-IXタンパク質もしくは該MN/CA-IXタンパク質のフラグメントの希釈液と混合して、20℃で10分間プレインキュベートし；

c) 反応容器内において、前記化合物の希釈液と前記MN/CA-IXタンパク質もしくはタンパク質のフラグメントの希釈液との混合物をプレインキュベートしたものを、飽和CO₂溶液、0.2mMのフェノールレッド、0.1MのNa₂SO₄、および10mMのHepes緩衝液(pH7.5)から実質的になる基質と、20℃で10~100秒かけて混合し；

d) 同時に、ストップフロー分光光度計を用いて、反応容器の内容物について吸収極大波長557nmにおける吸光度を測定し；さらに、

e) 前記化合物の阻害定数K_iを求め；

このとき、該阻害定数K_iが約50nM未満の場合に、該化合物はMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断され；さらに、該化合物は、アセタゾラミド、エトクスゾラミド、メタゾラミドおよびシアナートよりなる群から選択されたものではない。

10

【請求項53】

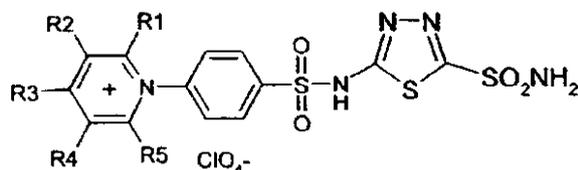
前記患者がヒトであることを特徴とする請求項52記載の方法。

【請求項54】

以下の一般式で表される、複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体：

20

【化6】



ここで、R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチル、tert-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；

30

R2は、水素およびメチルよりなる群から選択され；

R3は、水素、メチル、n-ノニルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R4は水素であり；さらに、

R5はメチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチル、tert-ブチル、n-ノニルおよびフェニルよりなる群から選択されるが、ただし、

R2およびR4が水素であって、R3およびR5がメチルである場合には、R1はメチルではなく；さらに、

R2およびR4が水素であって、R3がフェニルであり、R5がメチルである場合には、R1はメチルではなく；さらに、

R2およびR4が水素であって、R3およびR5がフェニルである場合には、R1はフェニルではない。

40

【請求項55】

R2およびR4は水素であり；

R3はメチルであり；さらに、

R1およびR5は同一であって、イソプロピルおよびtert-ブチルよりなる群から選択されることを特徴とする請求項54記載の複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体。

【請求項56】

R2およびR4は水素であり；

R3はフェニルであり；さらに、

R1およびR5は同一であって、エチル、イソプロピル、n-プロピルおよびn-ブチルよ

50

りなる群から選択されることを特徴とする請求項54記載の複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体。

【請求項57】

R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチルおよびtert-ブチルよりなる群から選択され；

R2およびR4は水素であり；さらに、

R3およびR5はフェニルであることを特徴とする請求項54記載の複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体。

【請求項58】

R1はイソプロピルであり、R3およびR5はメチルであり、ならびにR2およびR4は水素である；か、あるいは、

R2およびR4は水素であり、R3は水素もしくはメチルであり、ならびに、R1およびR5はフェニルである；か、あるいは、

R1、R2およびR5はメチルであり、R3はフェニルであり、ならびに、R4は水素である；か、あるいは、

R1、R2、R3およびR5はメチルであり、ならびに、R4は水素である；か、あるいは、

R1はメチルであり、R3およびR5はn-ノニルであり、ならびに、R2およびR4は水素であることを特徴とする請求項54記載の複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体。

【請求項59】

前記化合物を前記哺乳類に投与する前に、該化合物に放射性同位元素を結合させることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項60】

前記哺乳類に、放射線を照射しおよび/または従来の抗癌剤、化学療法剤、癌関連経路に対する様々な阻害剤、生体還元性薬物、CA-IX特異的抗体、およびCA-IX特異的抗体の生物学的に活性なフラグメントよりなる群から選択される1種またはそれ以上の化合物の生理学的に許容される製剤の治療的有効量を投与することをさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項61】

前記CA-IX特異的抗体および/またはCA-IX特異的抗体のフラグメントがヒト型化されているか、または完全にヒト型であることを特徴とする請求項60記載の方法。

【請求項62】

前記CA-IX特異的抗体および/またはCA-IX特異的抗体のフラグメントが、細胞毒性物質に結合していることを特徴とする請求項60記載の方法。

【請求項63】

MN/CA-IXタンパク質もしくはMN/CA-IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる前癌性または癌性疾患を有する哺乳類を治療する方法であって、強力なCA-IX特異的阻害剤に結合したベクターを含む生理学的に許容される製剤の治療有効量を前記哺乳類に投与することを含み、前記ベクターが、前癌性もしくは癌性のCA-IX発現細胞では存在しないかまたは突然変異している野生型遺伝子を発現し、さらに該野生型遺伝子の産物が該細胞内において抗癌効果を有するか；あるいは、前記ベクターが細胞毒性タンパク質を発現する遺伝子を含むことを特徴とする方法。

【請求項64】

前記ベクターが、MN/CA-IXプロモーターもしくはMN/CA-IXプロモーターのフラグメントを含み、ここで、該プロモーターもしくはプロモーターのフラグメントは、1または複数の低酸素応答配列を含み、該プロモーターもしくはプロモーターのフラグメントは、前記野生型遺伝子または細胞毒性タンパク質を発現する前記遺伝子に対して、機能発揮できるように連結していることを特徴とする請求項63記載の方法。

【請求項65】

前記強力なCA-IX特異的阻害剤が、以下の工程を含むスクリーニングアッセイにおいてCA-IX酵素活性を阻害すると判断された化合物であることを特徴とする請求項63記載の方

法：

a) 化合物の一連の希釈液、ならびに、MN/CA-IXタンパク質もしくはMN/CA-IXタンパク質の炭酸脱水酵素ドメインを含有するフラグメントの一連の希釈液を調製し；

b) 前記化合物の希釈液を、前記MN/CA-IXタンパク質もしくは該MN/CA-IXタンパク質のフラグメントの希釈液と混合して、20 で10分間プレインキュベートし；

c) 反応容器内において、前記化合物の希釈液と前記MN/CA-IXタンパク質もしくはタンパク質のフラグメントの希釈液との混合物をプレインキュベートしたものを、飽和CO₂溶液、0.2mMのフェノールレッド、0.1MのNa₂SO₄、および10mMのHepes緩衝液（pH7.5）から実質的になる基質と、20 で10～100秒かけて混合し；

d) 同時に、ストップフロー分光光度計を用いて、反応容器の内容物について吸収極大波長557nmにおける吸光度を測定し；さらに、

e) 前記化合物の阻害定数K_iを求め；

このとき、該阻害定数K_iが約50nM未満の場合に、前記化合物はMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断される。

【請求項66】

前記MN/CA-IXの強力な阻害剤は、アセタゾラミド、エトクスゾラミド、メタゾラミドおよびシアナートよりなる群から選択されたものではないことを特徴とする請求項65記載の方法。

【請求項67】

前癌状態あるいは癌に対する診断または診断および予後診断の方法であって、哺乳類サンプルに、標識または可視化手段に結合したCA-IX特異的阻害剤を接触させ、さらに該サンプル中の細胞上の該標識または該可視化手段を検出または検出および定量することにより、該サンプル中の細胞への該CA-IX特異的阻害剤の結合を検出または検出および定量する工程を含み、前記サンプルの検出または検出および定量のレベルが、対照サンプルにおけるものよりも高かった場合に、前記サンプル内にCA-IXを過剰発現する前癌細胞あるいは癌細胞の存在が示唆されることを特徴とする方法。

【請求項68】

低酸素条件下で活性化されたCA-IXを検出または検出および定量し、そのようなサンプルを採取した哺乳類は予後が良くないと考えられ、さらに、そのような低酸素状態の存在を考慮して、前記哺乳類に対する治療判断がなされることを特徴とする請求項67記載の方法。

【請求項69】

患者の体内でCA-IXを発現する腫瘍および/または転移を画像化する方法であって、造影化剤に結合させたCA-IX特異的抗体を該患者に投与することを含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療遺伝学の一般的分野、ならびに、化学、生化学工学および腫瘍学の分野に関する。さらに特定すると、本発明は、有機化合物および無機化合物、特に、芳香環式および複素環式スルホンアミド類を使用し、オンコプロテイン（現在では、MNタンパク質、MN/CA-IXイソ酵素（アイソザイム）、MN/G250タンパク質、あるいは単にMN/CAまたはCA-IXまたはMNと称されている）の炭酸脱水酵素活性を特異的に阻害することにより、腫瘍発生前および/または腫瘍性疾患を治療することに関する。本発明は、MN/CA-IXを過剰発現することによって特徴付けられる腫瘍発生前および/または腫瘍性疾患に対して、細胞膜不透過性のMN/CA-IX阻害剤、好ましくは芳香環式および複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導體類を投与することによって治療する方法にも関する。さらに本発明は、開示されている強力なCA-IX特異的阻害剤を使用した造影法を含む、腫瘍発生前/腫瘍性疾患のための診断/予後診断法、ならびに、該阻害剤に結合（conjugated）したベクターを用いた遺伝子治療に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明の発明者であるシルビア・パストレコヴァ (Silvia Pastrekova) 博士およびヤロミール・パストレック (Jaromir Pastorek) 博士は、ヤン・ザバダ (Jan Zavada) 博士と共に (「ザバダ (Zavada) ら」と称する)、元々MNという名が付けられていた癌関連細胞表面タンパク質MN/CA-IXを発見した (参考文献番号72、123) (特許文献1)。特許文献2および特許文献3は、MN遺伝子およびタンパク質の発見、ならびに、MN遺伝子の発現と腫瘍形成性との間の強固な関連性の発見により、癌および前癌状態に対する診断/予後診断ならびに治療のための方法の開発に至ったことについて開示している。さらにザバダ (Zavada) らは、特許文献4にMN/CA-IXタンパク質およびMN/CA9遺伝子の詳細について開示している。

10

【0003】

ザバダ (Zavada) らは、MN cDNAおよび遺伝子をクローニング、シーケンスし、MNが、二酸化炭素を重炭酸塩と陽子に転換する反応を可逆的に触媒する酵素である炭酸脱水酵素ファミリーに属することを明らかにした (参考文献番号66、72)。MNタンパク質 (炭酸脱水酵素IX、CA-IXと改名) は、N-末端プロテオグリカン様領域および触媒活性炭酸脱水酵素ドメインを含む細胞外部分で構成されている。該タンパク質は、1個の膜透過領域および短い細胞質内尾部によって原形質膜に繋ぎ止められている。

【0004】

CA-IXの発現は、正常組織においてはごくわずかの組織に限定されている (参考文献番号74) が、腫瘍とは密接な関係がある (参考文献番号123)。発現は、イン・ビトロ (in vitro) においては細胞密度によっても制限され (参考文献番号52)、また、イン・ビトロ (in vitro) およびイン・ビボ (in vivo) においては腫瘍の低酸素症によっても強く誘導される (参考文献番号121)。CA-IX値を予後が良いことの指標として記述している医学文献が多数存在する。CA-IXに関連する研究はすべて、CA-IXが診断および/または予後診断の腫瘍マーカーとして、ならびに治療標的として有用であるというザバダ (Zavada) らが最初にたてた仮説 (特許文献1) を支持するために行われたにすぎない。

20

【0005】

MN/CA-IXは、CA類に特徴的なN-末端プロテオグリカン様ドメイン、活性の高いCA触媒ドメイン、1個の膜透過領域、および短い細胞質内尾部を有する (参考文献番号66、72、74、116)。CA-IXは、子宮頸管、卵巣、腎臓、肺、食道、乳房、結腸、子宮内膜、膀胱、結腸直腸、前立腺、ヒトのその他の腫瘍に由来する多数の癌において異所性発現をすることに関して特に興味を持たれており、これは、正常組織においては、胃腸管上皮などに発現が制限されていることとは対照的である (参考文献番号8、11、21、35、41、48、50、51、56、66、72、74、86、110、111、113、116、121、122)。

30

【0006】

1997年発行の非特許文献1は、G250抗原がMN/CA-IXと同一物であることを報告しているが、これは、ザバダ (Zavada) らがMN/CA-IXを発見し、シーケンスを行って (参考文献番号73、123) から何年も後のことであった。(非特許文献2および非特許文献3も参照) 非特許文献1には、「配列分析およびデータベース検索により、G250抗原は、子宮頸管腫瘍において確認されたMNヒト腫瘍関連抗原 (非特許文献2) と同一物であることが明らかになった」と記載されている。

40

【0007】

MN/CA9およびMN/CA-IX - 配列の類似性

図1A~Cは、1522塩基対 (bps) からなるMN/CA9 cDNA配列の全長 (配列番号1) および459個のアミノ酸から構成されるMN/CA-IXアミノ酸 (aa) 配列の全長 (配列番号2) を示す。図2A~Fは、10,898bpからなるMN/CA9のゲノム配列 (配列番号3) を示す。

【0008】

DNASISおよびPROSIS (ファルマシア・ソフトウェア・パッケージズ (Pharmacia Software packages) 社) を利用してMN cDNA配列のコンピュータ分析を行った。GenBank、EMB

50

L、Protein Identification ResourceおよびSWISS-PROTデータベースについて、配列の類似性の可能性を調査した。さらに、MNと類似した配列を有するタンパク質の検索についても、FastAプログラムを用いてMIPSデータベースについて行った（参考文献番号75）。

【0009】

シグナルペプチドとCAドメインとの間に存在するプロテオグリカン様ドメイン（アミノ酸番号53～111；配列番号4）は、ヒトのプロテオグリカンアグリカンの大きな凝集塊のケラタン硫酸接着ドメインと顕著な相同性を示した（同一性38%、可能性44%）（参考文献番号28）。

【0010】

CAドメイン（アミノ酸番号135～391；配列番号5）は、265個のアミノ酸から構成されており、ヒトCA-VIアイソザイムとのアミノ酸同一性は38.9%であった（参考文献番号5）。MN/CA-IXとその他のアイソザイム類との相同性は以下の通りであった：CA-IIとは35.2%（アミノ酸重複数261個）（参考文献番号63）、CA-Iとは31.8%（アミノ酸重複数261個）（参考文献番号7）、CA-IVとは31.6%（アミノ酸重複数266個）（参考文献番号65）、CA-IIIとは30.5%（アミノ酸重複数259個）（参考文献番号55）。

10

【0011】

CAドメインのほかに、MN/CA-IXは、N-末端伸長部およびC-末端伸長部を有するが、これらは他のCAアイソザイムには存在していない。膜透過領域（膜透過固定部）および細胞質内尾部を有するC-末端部分のアミノ酸配列は、既知の如何なるタンパク質配列ともはっきりした相同性を示さなかった。

20

【0012】

MN遺伝子（MN/CA9またはCA9）は、ヒトゲノム由来の新規の配列であることが明らかになった。MN/CA9のcDNA配列と別異のCAアイソエンザイムをコードしているcDNA配列との間の配列全体の相同性は48～50%であり、当業者の判断では低いとみなされる。故に、MN/CA9のcDNA配列は、如何なるCAのcDNA配列とも近似していない。

【0013】

MNタンパク質を一定量以上発現する正常組織は非常に少ないことがわかっている。そのようなMN発現性正常組織としては、ヒト消化管粘膜および胆嚢上皮、ならびに消化管のその他いくつかの正常組織が挙げられる。矛盾しているようではあるが、MN遺伝子の発現は、正常状態でMNを発現している組織（例えば、消化管粘膜など）においては、腫瘍およびその他の腫瘍発生前/腫瘍性疾患においては消失または減少することがわかっている。

30

【0014】

CA-IXおよび低酸素症

CA-IXの発現と腫瘍内低酸素症（微小電極によって測定、または低酸素症マーカー物質であるピモニダゾール（pimonidazole）の取込によって検出、あるいは壊死の程度によって評価）との間には強い関係があることが子宮頸管、乳房、頭および首、膀胱ならびに非小細胞性肺癌（NSCLC）において示されている（参考文献番号8、11、21、35、48、56、111、122）。さらに、NSCLCおよび乳癌においては、血管形成、アポトーシス阻害および細胞-細胞間接着破壊に関与しているタンパク質の型とCA-IXとの間に相関関係が観察されており、該酵素の強い関与が、臨床転帰が良くないことの一因であると考えられる（参考文献番号8）。低酸素症は、腫瘍の浸潤を助長させる細胞外環境の酸性化に関係しており、そのような過程の中において、CA-IXは、その触媒活性を介して作用するものと考えられる（参考文献番号86）。従って、特異的阻害剤を用いてMN/CA-IXを阻害することは、CA-IXを発現している癌の治療に対して新規な方法を確立するものである。

40

【0015】

CAI類

非特許文献4においては、CA阻害剤（CAI）の基本型であるアセタゾラミドは、別異の細胞毒性物質と組み合わせることによって抗癌治療における調節物質として作用することが報告されており、そのような細胞毒性物質としては、アルキル化剤；ヌクレオシドアナログ類；プラチナ誘導体類、ならびに、いくつかの腎腫瘍細胞系（Caki-1、Caki-2、ACHN

50

およびA-498) に対して腫瘍転移を抑制し、浸潤能を低下させるようなその他の物質などが挙げられる。そのような研究においては、CAIは、ひとつまたはそれ以上のCAアイソザイム類を過剰発現する腫瘍の制御に使用できることが示されている。アセタゾラミド(単独または組み合わせ)の抗癌効果は、CA阻害後に生じた腫瘍内環境の酸性化によるものであるという仮説が立てられた(参考文献番号20)が、このとき、該薬物のその他の作用機構については除外されていない。非特許文献5は、臨床的に使用されている2つの強力なスルホンアミドCAI類、すなわちメタゾラミドおよびエトクスゾラミドを用いてヒトリンパ腫細胞の細胞培養系を処理した場合にイン・ビトロ(in vitro)増殖阻害が起こったことは、CA阻害の結果、ヌクレオチド合成のための重炭酸塩(HCO_3^- はカルバモイルリン酸合成酵素IIの基質である)の蓄えが減少したからではないかという仮説を記載している(参考文献番号20)。 10

【0016】

臨床薬物または診断薬として使用されている古典的な6種のCAI類(アセタゾラミド、メタゾラミド、エトクスゾラミド、ジクロロフェナミド、ドルゾラミドおよびジクロロフェナミド)は、全てある程度の腫瘍増殖阻害特性を示す(参考文献番号18、78、101、102)。

【0017】

本発明の発明者であるクラウディア・スプラン(Claudia Supuran)博士とアンドレア・スコツァファヴァ(Andrea Scozzafava)博士は、スルホンアミドCAI類のいくつかのクラスについての構造およびイン・ビトロ(in vitro)抗腫瘍活性について報告しており、重要な生理学的役割を有することが既知である古典的なアイソザイム類(CA-I、CA-IIおよびCA-IVなど)に対して、nMレベルで阻害剤として作用することを示した。これらの化合物は、ある種の白血病、非小細胞性肺癌、卵巣、メラノーマ、結腸、CNS、腎臓、前立腺および乳癌の細胞系に対して強力な細胞増殖阻害作用を発揮することも示されており、 GI_{50} 値は10~75nMの場合があった(参考文献番号77、91、92、100)。 20

【0018】

非特許文献6は、3種類の古典的なスルホンアミド薬物類(アセタゾラミド、エトクスゾラミドおよびメトクスゾラミド)がnMレベルの K_i 値でCA-IX炭酸脱水酵素活性を阻害したことを報告している(参考文献番号116)。しかしながら、本発明以前においては、CA-IX(単独または他のCAアイソザイムとの比較において)に対するスルホンアミド阻害に関する体系的な構造活性相関研究は行われていない。 30

【0019】

ある種の芳香環式/複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類は、CA-IIおよびCA-IVに対してnMレベルで親和性を示したが、より重要な点は、イン・ビボ(in vivo)においてそれらが原形質膜を通過することができなかったことである(参考文献番号17)。

【0020】

非特許文献7は、アセタゾラミドなどの古典的阻害剤に加えて、膜不透過性のスルホンアミド阻害剤類を用い、アデノーマ重炭酸塩類転送因子の抑制制御とCA-IIとの間の機能上および物理的関係について調査しており、これらの生理学的過程における細胞質基質関連アイソザイムの関与と膜関連アイソザイムの関与とを明確に区別することができた(参考文献番号85)。 40

【0021】

CA類

炭酸脱水酵素(CA類)は、生理学的に非常に重要な亜鉛金属酵素をコードしている遺伝子群からなる大きなファミリーを形成している。二酸化炭素の水和に関する可逆的触媒として、これらの酵素は、呼吸、石灰化、酸塩基平衡、骨吸収、房水の生成、髄液、唾液および胃酸を含む多様な生物学的過程に関与している(非特許文献8)。CA類は、生物に広く分布している。ヒトを含む高等脊椎動物においては、14種類の別異のCAアイソザイムまたはCA関連タンパク質(CARP)について文献に記載されており、細胞レベル下での局在お 50

よび組織分布が非常に異なっている（参考文献番号40、93、95、94、102）。基本的には、数種のサイトゾル型（CA-I~III、CA-VII）、4種の膜結合アイソザイム（CA-IV、CA-IX、CA-XIIおよびCA-XIV）、1種類のミトコンドリア型（CA-V）、ならびに分泌されたCAアイソザイムであるCA-VIが存在する（参考文献番号40、93、94、95、102）。

【0022】

いくつかの腫瘍細胞においては、ある種の膜関連CAアイソザイム類（例えば、CA-IXおよびCA-XIIなど）のみを主に発現することが示されている（参考文献番号2、67、68、78、87、93、95）。稀に、ある種のアイソエンザイムが核に局在していることが報告されている（参考文献番号64、69、70）。現在のところ、細胞に局在しているその他のアイソザイム類はほとんど知られていない。

10

【0023】

CA類およびCA関連タンパク質は、組織分布、レベル、ならびに推定もしくは確認された生物学的作用が非常に広範にわたっている（参考文献番号105）。いくつかのCA類は、ほぼ全ての組織において発現されており（CA-II）、その他のCA類の発現はより限定的である（例えば、CA-VIおよびCA-VIIは唾液腺で発現される）（参考文献番号32、69、71）。CA類およびCA関連タンパク質は、動的特性および阻害剤に対する感受性も異なっている（参考文献番号82）。

【0024】

臨床に使用される上述のスルホンアミド類の大多数は、全身作用性の阻害剤であり、標的組織臓器内に存在する多数の別異のCAアイソザイム類（現在のところ、ヒトにおいては14個のイソ型が知られている）を阻害することによって、所望しない副作用を引き起こす。（参考文献番号93、94、95、102）。故に、そのような副作用を回避することを目的として、新規のスルホンアミド類を設計・合成しようとする試みに関して、近年、多くの報告がなされている（参考文献番号13、17、42、62、80、99、100）。すくなくとも4種類のCAアイソザイム（CA-IV、CA-IX、CA-XIIおよびCA-XIV）は細胞膜に参与しており、一般的に、酵素活性部位は細胞外に向いている（参考文献番号93、94、95、102）。これらのアイソザイムのうちのいくつかは、生理学に重要な役割を果たしていることが示されているが（例えば、目、肺、および腎臓内に存在するCA-IVおよびXII、消化管粘膜および多数の腫瘍細胞内に存在するCA-IXなど）（参考文献番号3、18、22、29、49、67、68、83、93、94、95、102）、CA-XIVなどのその他のアイソザイム類の作用については現在のところよくわかっていない（参考文献番号93、95）。これらのアイソザイム類が細胞外に存在していることから、膜不透過性のCA阻害剤（CAI類）を設計することができるならば、膜関連性のCA類のみが影響を受けることになる。

20

30

【0025】

歴史的観点から見ると、CAI類を膜不透過性にしようとする最初の試みは、ポリマー類（例えば、ポリエチレングリコール、アミノエチルデキストランまたはデキストランなど）に芳香環式/複素環式スルホンアミド類を結合させることであった（参考文献番号39、60、107）。そのようにして調製された分子量が3.5~99kDaの範囲の化合物は、分子量が大きいために確かに膜不透過性を示し、また、腎および肺に関する数例の生理学的実験に使用したところ、イン・ビボ（in vivo）においてCA-IVのみを選択的に阻害し、サイトゾル性アイソザイム類（主にCA-II）は阻害しなかった（参考文献番号39、60、107）。そのような化合物は分子量が大きいため、イン・ビボ（in vivo）において強力なアレルギー反応を誘発したので、薬物/診断用材料として開発することはできなかった（参考文献番号39、60、93、95、107）。膜不透過性にするための第二の試みは、高極性、塩様化合物を使用することであった。生理学的実験においては、スルホンアミドのうちのQAS（スルファニルアミド四級アンモニウム塩）のみが最近まで使用されており、多様な節足動物（例えば、カニ（カリネクテス・サピドゥス（Callinectes sapidus）など）および魚類において、細胞外CA類のみを阻害することが報告されている（参考文献番号57）。QASの重大な欠点は、高等脊椎動物において毒性が高いことである（参考文献番号57）。

40

【0026】

50

炭酸脱水酵素の酵素活性（CA-IXのそれも含む）は、スルホンアミド阻害剤によって効果的に阻止することができる。そのような事実は、ある種のCAイソ型の過度の活性が原因であるような疾患（例えば、緑内障におけるCA-IIなど）の治療に利用されてきた。スルホンアミド類はイン・ビトロ（*in vitro*）においては腫瘍細胞の増殖および浸潤を阻止し、イン・ビボ（*in vivo*）においては腫瘍の増殖を阻害するという経験的に見出された事実があるが、そのようなスルホンアミド類の標的は確認されていない。しかしながら、スルホンアミド類は、細胞レベル下の別異のコンパートメントに局在しており、多岐にわたる生物学的役割を担っている多様なCAアイソザイム（現在、ヒトでは14種類が既知である）を無差別に阻害することはできる。このような選択性の欠如は、多数のCAイソ型が同時に阻害され、所望しない副作用が生じることから、これらの化合物の臨床上的利用価値を低下させ、また、抗癌治療においてCA-IXに対してスルホンアミドを投与した場合の重大な欠点でもある。

10

20

30

40

50

【0027】

従って、当該分野においては、膜不透過性の強力なCA-IX阻害剤に対する要求があり、そのような阻害剤はCA-IXに対して二重の選択性を有することになる。本発明者らは、これまでも本明細書に記載している数種の膜不透過性分子を調製し、それらについて記載しているが、それらには、CA-I、CA-IIおよびCA-IVを阻害する能力についてのみが特記されている。その他については、網膜色素沈着上皮または筋肉内において、膜不透過性物質によって細胞外CAを選択的に阻害することによる影響について研究が行われている（参考文献番号34、120）が、これらの物質がCA-IXを阻害する能力については調べられていない。CA-IXは、数少ない細胞外炭酸脱水酵素のうちのひとつであることから、CA-IXの膜不透過性選択的阻害剤は該酵素に対して二重の選択性を有し、さらに、CAの非特異的阻害に伴う副作用を回避する。

【特許文献1】ザバダ（Zavada）ら、米国特許第5,387,676号

【特許文献2】ザバダ（Zavada）ら、国際公開W093/18152号

【非特許文献1】ウエムラ（Uemura）ら、*J. Urology*, 157(4):377(要約1475)（1997年4月16日）（参考文献番号112）

【非特許文献2】パストレック（Pastorek）ら、*Oncogene*, 9:2788-2888(1994)（参考文献番号72）

【非特許文献3】オパヴスキ（Opavsky）ら、*Genomics*, 33:480-487(1996)（参考文献番号66）

【非特許文献4】テイチャー（Teicher）ら、*Anticancer Research*, 13:1549-1556(1993)（参考文献番号106）

【非特許文献5】チェグウィッデン（Chegwidden）ら、「癌における炭酸脱水酵素アイソザイム類の役割（The Roles of carbonic anhydrase isozymes in cancer）」、遺伝子ファミリー：DNA、RNA、酵素およびタンパク質の研究（Gene Families: Studies of DNA, RNA, Enzymes and Proteins）より、シェ（Xue）ら編、ワールド・サイエンティフィック（World Scientific）社、シンガポール、pp.157-169(2001)（参考文献番号20）

【非特許文献6】ウイング（Wingo）ら、*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 288:666-669(2001)（参考文献番号116）

【非特許文献7】スターリング（Sterling）ら、*Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, 283:C1522-C1529(2002)（参考文献番号85）

【非特許文献8】ドッジソン（Dodgson）ら、「炭酸脱水酵素（The Carbonic Anhydrases）」、プレナム・プレス（Plenum Press）社、ニューヨーク・ロンドン、pp398(1991)（参考文献番号27）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0028】

発明者らは、他のCAイソ型からCA-IXを区別している特徴を利用することにより、CAI類の選択性の欠如という問題に取り組んだ。まず始めに、CA-IXは、原形質膜タンパク質が

集積したものであり、活性部位が細胞外部に向かって露出している。この点については、いくつかのCA類（CA-IV、CA-XIIおよびCA-XIV）と同様であるが、その他全てのイソ型とは異なっている。これらの膜結合性アイソザイムの中では、触媒性ドメインのアミノ酸配列において、CA-IXはいくつかの相異点があり、このことが活性部位のくぼみの立体配置、さらにスルホンアミド類との相互作用に影響していると考えられる。さらに、他のCAイソ型とは異なり、CA-IXは予後が良くない腫瘍の低酸素領域に多く発現している。

【課題を解決するための手段】

【0029】

発明者らは、一連の芳香環式および複素環式化合物を用いてCA-IXの阻害プロファイルの評価を行い、それらの化合物のうちいくつかは、広く分布しているイソ型であるCA-I、CA-IIおよびCA-IVよりもCA-IXを効率的に阻害することを見出した。芳香環式および複素環式化合物において、nMレベルでCA-IXを阻害する化合物がいくつか検出された。この知見は、それらの化合物の物理化学的特性（例えば、電荷、大きさおよび生物学的還元性など）を変化させてCA-IXの特徴的な特性に適合させることにより、CA-IX特異的阻害剤を設計するためには非常に有望である。

【0030】

発明者らは、CA-IXを強力に阻害する、よりかさ高い化合物のうちいくつかは、CA-I、CA-IIおよびCA-IVの阻害剤としては非常に弱いことを発見したが、これは、調査したその他のアイソザイムの活性部位のくぼみよりもCA-IXのそれが大きいという事実由来すると考えられる。本明細書に開示されており、腫瘍関連性イソ型であるCA-IXの選択的阻害に基づくスクリーニングで確認されたそのような型の化合物は、特に好ましいCA-IX特異的阻害剤であると考えられ、新規な抗癌治療および本発明に従う診断/予後診断法に使用することができる。

【0031】

発明者らは、CA-IXは、細胞の浸潤能を高めるために重要と考えられているE-カドヘリンを介した細胞-細胞接着を減弱させることができることを示した（参考文献番号103）。さらに、CA-IXは、低酸素状態においては細胞外のpHの酸性化に寄与しているが、酸素正常状態では寄与していないこともわかった（未発表データ）。後者の結果は、低酸素状態では、CA-IXの発現レベルおよび酵素活性の両方が促進制御されていること、すなわち、低酸素状態によってCA-IXのCA触媒活性が活性化されることを示唆している。これは非常に重要な知見である。なぜならば、腫瘍内の低酸素状態は、腫瘍細胞の攻撃性の増強および治療効果の低下に関して臨床的に有意な因子だからである。通常、低酸素状態は、細胞外の微小環境の酸性化に付随して生じ、そのことによって腫瘍の浸潤および転移が促進される。この現象において、CA-IXは、二酸化炭素の水和を触媒して重炭酸イオン類および陽子を生成させることによって関与していると考えられ、生成した重炭酸イオン類は細胞内部に輸送され、陽子は細胞外のpHを酸性化する。故に、CA-IXの触媒活性を阻害することによって細胞外の酸性化を阻止することは、直接的な抗癌作用であると考えられ、あるいは、従来から使用されており、取込みがpH依存性であるような化学療法剤の効果を調節するものと考えられる。

本発明は、（1）癌関連、低酸素状態誘導性のMN/CA-IXを選択的に標的とするある種の炭酸脱水酵素阻害剤（CAI類）、好ましくはスルホンアミド類を認識すること；（2）そのようなCAI類、好ましくはスルホンアミド類を先導化合物としてMN/CA-IX特異的阻害剤の設計および合成に使用すること；（3）MN/CA-IXを介した腫瘍微小環境の酸性化を阻害することに基づく抗癌治療に該MN/CA-IX特異的阻害剤を使用すること；（4）造影法（シンチグラフィなど）を含む診断/予後診断法、ならびに遺伝子治療にMN/CA-IX特異的な強力阻害剤を使用することに関する。特に、本発明は、抗癌特性を有する薬物の開発にCA-IX特異的阻害剤を使用すること、ならびに、CA-IX発現、特にCA-IXの過剰発現によって特徴付けられる腫瘍発生前および腫瘍性疾患に対して従来から行われている化学療法を調節することに関する。

【0032】

ひとつの側面から見ると、本発明は、前癌性または癌性疾患を有する哺乳類を治療する方法に関し、該疾患は、MN/CA-IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられ、該方法は、治療有効量の組成物を該哺乳類に投与することを含み、このとき、該組成物は、有機分子および無機分子よりなる群から選択され、次のようなスクリーニングアッセイにおいてMN/CA-IXの酵素活性の強力な阻害剤であることが確認された化合物を含む：

a) 化合物の一連の希釈液、ならびに、MN/CA-IXタンパク質もしくはMN/CA-IXタンパク質の炭酸脱水酵素ドメインを含有するフラグメントの一連の希釈液を調製し；

b) 前記化合物の希釈液を、前記MN/CA-IXタンパク質もしくは該MN/CA-IXタンパク質のフラグメントの希釈液と混合して、20 で10分間プレインキュベートし；

c) 反応容器内において、前記化合物の希釈液と前記MN/CA-IXタンパク質もしくはタンパク質のフラグメントの希釈液との混合物をプレインキュベートしたものを、飽和CO₂溶液、0.2mMのフェノールレッド、0.1MのNa₂SO₄、および10mMのHepes緩衝液(pH7.5)から実質的になる基質と、20 で10~100秒かけて混合し；

d) 同時に、ストップフロー分光光度計を用いて、反応容器の内容物について吸収極大波長557nmにおける吸光度を測定し；さらに、

e) 前記化合物の阻害定数K_iを求め；

このとき、該阻害定数K_iが約50nM未満の場合に、該化合物はMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断され；さらに、該化合物は、アセタゾラミド、エトクスゾラミド、メタゾラミドおよびシアナートよりなる群から選択されたものではない。前記哺乳類は、好ましくはヒトであり、K_iは、好ましくは約35nM未満、より好ましくは約25nM未満、さらに好ましくは約10nM未満である。

【0033】

そのような方法は、前癌状態および/もしくは癌を治療する、または、哺乳類患者体内における前癌および/もしくは癌細胞の増殖を阻害する方法としても利用することができる。このとき、該腫瘍発生前および腫瘍状態は、MN/CA-IXの過剰発現によって特徴付けられる。前記の方法は、MN/CA-IXを過剰発現している腫瘍発生前または腫瘍性哺乳類細胞の増殖を阻害することにも利用することができる。このとき、該細胞に本発明に従うCA-IX特異的阻害剤を接触させることを含む。

【0034】

本発明に従うCA-IX特異的阻害剤は、治療効果を発揮する量を投与することができ、好ましくは、生理学的に許容される非毒性液体ビヒクルに分散させる。腫瘍発生前/腫瘍性疾患の部位または型(例えば、充実性腫瘍、非充実性(non-solid)腫瘍または転移など)に応じて、別異の投与経路を選択することが好ましい。一般的には、腸管外投与が好ましく、そのことにより、全身性処置による所望しない副作用、例えば、胃腸管粘膜に阻害剤が結合することによって引き起こされるものなどを回避することができる。一般的には、腫瘍発生前/腫瘍性疾患の内部またはその近傍に注入することが好ましい。例えば、そのような注入法としては、静脈内、腹膜内、直腸内、皮下、筋肉内、眼窩内、被膜内、脊髄内、胸骨内、髄内、損傷部内、皮内、その他の注入経路などが挙げられる。他の投与形式、例えば、坐剤または局所投与なども標的疾患に合わせて使用することができる。製剤は、投与経路に適した既知の基準に従って設計することができる。

【0035】

前記CA-IX特異的阻害剤は、好ましくは有機性であり、より好ましくは芳香環式もしくは複素環式であり、さらに好ましくは、芳香環式スルホンアミドもしくは複素環式スルホンアミドである。前記芳香環式スルホンアミドは、置換された芳香環式スルホンアミドであり、該芳香環式スルホンアミドは芳香環構造を含み、該環構造にはスルホンアミド部位を有し、さらに、ハロゲン基、ニトロ基およびアルキルアミノ基よりなる群から独立して選択される1個またはそれ以上の置換基を有し、このとき、該アルキルアミノ基のアルキルラジカルは1~4個の炭素原子を含む。

【0036】

本発明に従う好ましいCA-IX特異的阻害剤は、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から

選択される炭酸脱水酵素の酵素活性よりもMN/CA-IX酵素活性をより強く阻害する。より好ましくは、CA-IX特異的阻害剤は、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される少なくとも2種類の炭酸脱水酵素の酵素活性よりも、MN/CA-IX酵素活性をより強く阻害する。さらに好ましくは、CA-IX特異的阻害剤は、CA-I、CA-IIおよびCA-IVを含む群の炭酸脱水酵素の個々の酵素活性よりもMN/CA-IX酵素活性をより強く阻害する。

【0037】

しかしながら、サイトゾル性のCA-IIは特に豊富かつ顕著なCAであることから、重要な点は、本発明に従うCA-IX特異的阻害剤が膜不透過性ではない場合には、そのような阻害剤は、CA-IIの酵素活性阻害剤としてよりもMN/CA-IXのより強力な酵素活性阻害剤になり得ることである。以下の工程を含む方法は、CA-IIの酵素活性を阻害する化合物の K_i を決定するために使用することができるスクリーニングアッセイの例である：

10

a) 化合物の一連の希釈液およびCA-IIの一連の希釈液を調製し；

b) 前記化合物の希釈液をCA-IIの希釈液と混合して、20℃で10分間プレインキュベートし；

c) 前記化合物と前記CA-IIとの混合物をプレインキュベートしたものを、反応容器内の無水アセトニトリル中の4-ニトロフェニルアセタートから実質的になる基質溶液に、25℃において1～3分間かけて加え；

d) 同時に、分光光度計を用いて、前記反応容器の内容物について、吸収極大波長400nmにおける吸光度を測定し；さらに、

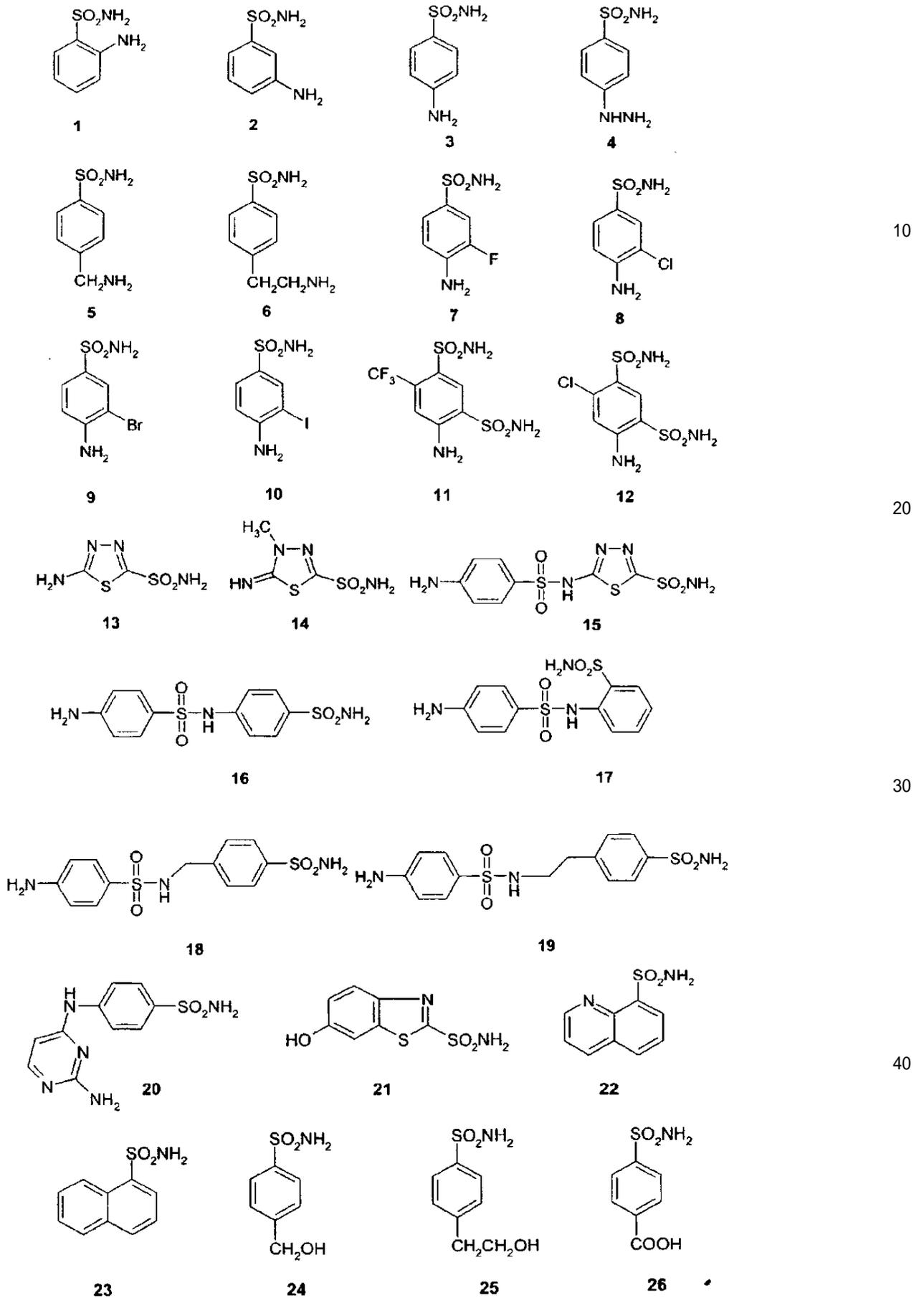
e) 前記化合物の阻害定数 K_i を求める。

20

【0038】

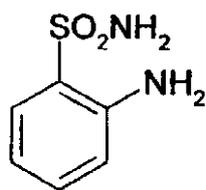
本発明に従う芳香環式スルホンアミドまたは複素環式スルホンアミドCA-IX特異的阻害剤の好ましい例は、次の化合物よりなる群から選択される：

【化 1】

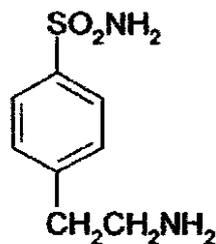


芳香環式スルホンアミドCA-IX特異的阻害剤の好ましい例は、次の化合物よりなる群から選択される。

【化2】

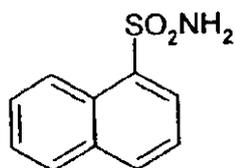


1

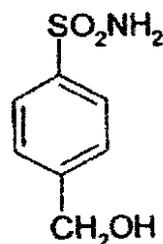


6

10

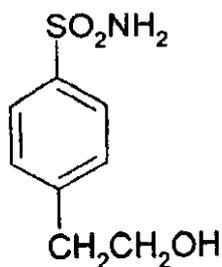


23

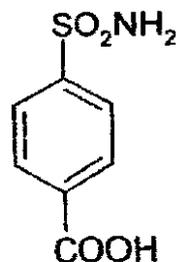


24

20



25



26

30

【0040】

好ましい芳香環式スルホンアミドCA-IX特異的阻害剤は、該芳香環式スルホンアミドの芳香環の少なくとも1個の炭素原子にハロゲン原子が結合しているものである。

【0041】

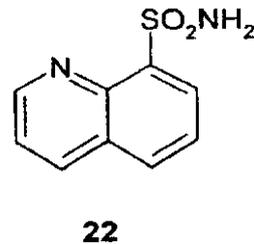
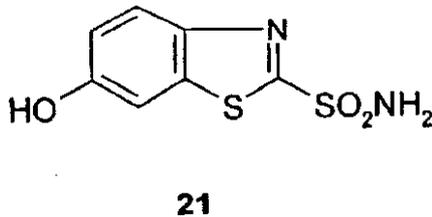
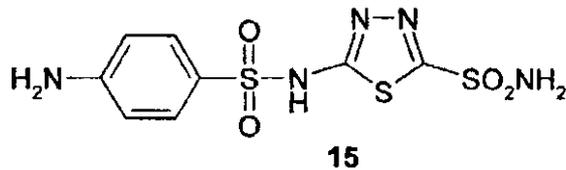
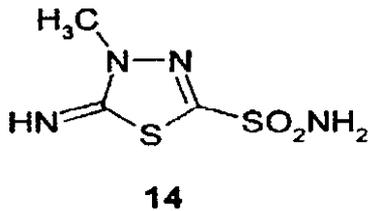
好ましい複素環式スルホンアミドCA-IX特異的阻害剤は、置換基を有する複素環式スルホンアミド類であり、置換基を有する該複素環式スルホンアミドは、該環構造に結合しているスルホンアミド部位を有し、さらに、ハロゲン基、ニトロ基およびアルキルアミノ基よりなる群からそれぞれ独立して選択される1個またはそれ以上の置換基を追有する複素環式環構造をとっており、ここで、該アルキルアミノ基のアルキルラジカルは1~4個の炭素原子を含む。好ましい複素環式スルホンアミドCA-IX特異的阻害剤はハロゲン化されている。

40

【0042】

さらに好ましい複素環式スルホンアミドCA-IX特異的阻害剤は、次の化合物よりなる群から選択される：

【化3】



10

【0043】

さらに、MN/CA-IXタンパク質の過剰発現によって特徴付けられる腫瘍発生前または腫瘍性疾患を有する哺乳類を治療する好ましい方法は、該哺乳類に膜不透過性のCA-IX特異的阻害剤を投与することを含む。そのような膜不透過性CA-IX特異的阻害剤の治療有効量は、膜不透過性化合物を含む組成物として投与することができ、ここで、該膜不透過性阻害剤化合物は有機分子および無機分子よりなる群から選択され、次のようなスクリーニングアッセイにおいてMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であることが確認されたものを含有する：

20

- a) 化合物の一連の希釈液、ならびに、MN/CA-IXタンパク質もしくはMN/CA-IXタンパク質の炭酸脱水酵素ドメインを含有するフラグメントの一連の希釈液を調製し；
- b) 前記化合物の希釈液を、前記MN/CA-IXタンパク質もしくは該MN/CA-IXタンパク質のフラグメントの希釈液と混合して、20 で10分間プレインキュベートし；
- c) 反応容器内において、前記化合物の希釈液と前記MN/CA-IXタンパク質もしくはタンパク質のフラグメントの希釈液との混合物をプレインキュベートしたものを、飽和CO₂溶液、0.2mMのフェノールレッド、0.1MのNa₂SO₄、および10mMのHepes緩衝液（pH7.5）から実質的になる基質と、20 で10～100秒かけて混合し；
- d) 同時に、ストップフロー分光光度計を用いて、反応容器の内容物について吸収極大波長557nmにおける吸光度を測定し；さらに、
- e) 前記膜不透過性化合物の阻害定数K_iを求め；

30

このとき、該阻害定数K_iが約50nM未満の場合に、該膜不透過性化合物はMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断される。前記哺乳類は、好ましくはヒトであり、K_iは、好ましくは約35nM未満、より好ましくは約25nM未満、さらに好ましくは約10nM未満である。

40

【0044】

そのような膜不透過性CA-IX特異的阻害剤化合物は、好ましくは有機性であり、より好ましくは、芳香環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体または複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体である。そのような膜不透過性CA-IX特異的阻害剤は、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される炭酸脱水酵素の酵素活性よりも、MN/CA-IX酵素活性をより強く阻害することが好ましく、さらに、CA-I、CA-IIおよびCA-IVよりなる群から選択される少なくとも2種の炭酸脱水酵素の酵素活性よりもMN/CA-IXの酵素活性をより強く阻害することが好ましい。さらにまた、前記膜不透過性CA-IX特異的阻害剤は、CA-I、CA-IIおよびCA-IVを含む群内の各炭酸脱水酵素の酵素活性よりもMN/CA-IXの酵素活性をより強く阻害することが好ましい。CA-IXおよびCA-IVは膜結合性CA類であるので、膜不透過

50

性CA-IX特異的阻害剤が、CA-IV酵素活性よりもCA-IX酵素活性をより強力に阻害する阻害剤であることが特に重要である。

【0045】

以下の工程を含む方法は、CA-IV酵素活性を阻害する化合物の K_i を求めるのに使用することができるスクリーニングアッセイの例である：

a) 膜不透過性化合物の一連の希釈液およびCA-IVの一連の希釈液を調製し；

b) 前記膜不透過性化合物の希釈液をCA-IVの希釈液と混合して、20℃で10分間プレインキュベートし；

c) 前記化合物と前記CA-IVとの混合物をプレインキュベートしたものを、反応容器内の無水アセトニトリル中の4-ニトロフェニルアセタートから実質的になる基質溶液に、25℃において1～3分間かけて加え；

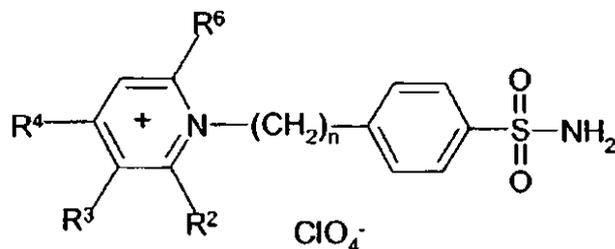
d) 同時に、分光光度計を用いて、前記反応容器の内容物について、吸収極大波長400nmにおける吸光度を測定し；さらに

e) 前記膜不透過性化合物の阻害定数 K_i を求める。

【0046】

好ましい膜不透過性CA-IX特異的阻害剤化合物は、芳香環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類であり、スルファニルアミド、ホモスルファニルアミドおよび4-アミノエチルベンゼンスルホンアミドよりなる群から選択される。芳香環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類のうちで好ましいものは、以下の一般式を有し：

【化4】



【0047】

ここで、

nは0、1または2であり；

R2、R3、R4およびR6は、水素、炭素数が1～12であるアルキル部位、およびアリアル部位よりなる群からそれぞれ独立して選択される。さらに好ましくは、そのような化合物は、R2は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R3は、水素およびメチルよりなる群から選択され；

R4は、水素、メチルおよびフェニルよりなる群から選択され；さらに、

R6は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルおよびフェニルよりなる群から選択される。またさらに好ましくは、そのような化合物は、

R3は水素であり；

R4およびR6はフェニルであり；

nが0の場合には、R2は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；さらに、

nが1または2の場合には、R2は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択される。その他の好ましい化合物としては、

R3が水素であり；

R4はフェニルであり；さらに、

nが0の場合にはR2とR6は同じ置換基であって、メチル、エチル、n-プロピルおよびイソプロピルよりなる群から選択され；さらに、

nが1または2の場合にはR2とR6は同じ置換基であって、メチル、エチル、n-プロピル

10

20

30

40

50

およびイソプロピルよりなる群から選択される。その他の好ましい化合物としては、R2、R3、R4およびR6がメチルであるものが挙げられる。さらに好ましいCA-IX特異的阻害剤化合物は、

nが0、1または2の場合には、R2、R4およびR6はメチルであり、R3は水素であり；あるいは、

nが1または2の場合には、R2はイソプロピルであり、R3は水素であり、R4はメチルであり、R6はメチルもしくはイソプロピルであり；あるいは、

nが1または2の場合には、R2およびR6はフェニルであり、R3およびR4は水素である。

【0048】

さらに好ましいそのような化合物としては、

nが2の場合に、R2およびR6はメチルであり、R3は水素であり、R4はフェニルであり；あるいは、

nが2の場合に、R2およびR6はエチルであり、R3は水素であり、R4はフェニルであり；あるいは、

nが2の場合に、R2、R3、R4およびR6はメチルである。

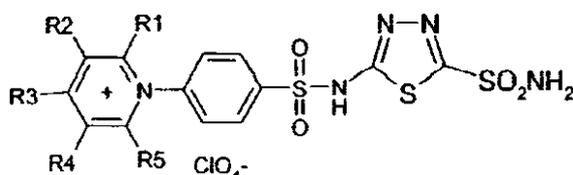
【0049】

前記CA-IX特異的阻害剤が、複素環式スルホンアミド類の膜不透過性ピリジニウム誘導体である場合には、好ましい化合物は、アミノベンゾールアミドのピリジニウム誘導体である。

【0050】

複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体であるCA-IX特異的阻害剤のうちの好ましいものは、次のような一般式で表される：

【化5】



【0051】

ここで、R1、R2、R3、R4およびR5は、水素、炭素数が1～12であるアルキル部位およびアリール部位よりなる群からそれぞれ独立して選択される。さらに好ましい化合物においては、

R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチル、tert-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R2は、水素およびメチルよりなる群から選択され；

R3は、水素、メチル、n-ノニルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R4は、水素およびメチルよりなる群から選択され；さらに、

R5は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチル、tert-ブチル、n-ノニルおよびフェニルよりなる群から選択される。さらに好ましい化合物においては、

R2およびR4は水素であり；

R3はメチルであり；さらに、

R1およびR5は、同じ置換基であって、メチル、イソプロピルおよびtert-ブチルよりなる群から選択される。またさらに好ましい化合物においては、

R2およびR4は水素であり；

R3はフェニルであり；さらに、

R1およびR5は、同じ置換基であって、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピル、n-ブチルおよびフェニルよりなる群から選択される。さらに好ましい化合物においては、

R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n-プロピルおよびn-ブチルよりなる群から選

10

20

30

40

50

択され；

R2およびR4は水素であり；さらに、

R3およびR5はフェニルである。その他の好ましい化合物においては、

R2およびR4は水素であり、R3は水素またはメチルであり、R1およびR5はフェニルである；
あるいは、

R1、R2およびR5はメチルであり、R3はフェニルであり、R4は水素である；あるいは、

R1およびR4はメチルであり、R2は水素であり、R3およびR5はn - ノニルである。

【0052】

さらなる好ましい化合物においては、

R1はメチルまたはイソプロピルであり、R3およびR5はメチルであり、R2およびR4は水素である；あるいは、

R1およびR5は同じ置換基であって、メチルまたはエチルであり、R2およびR4は水素であり、R3はフェニルである；あるいは、

R1、R2、R3およびR5はメチルであり、R4は水素である。

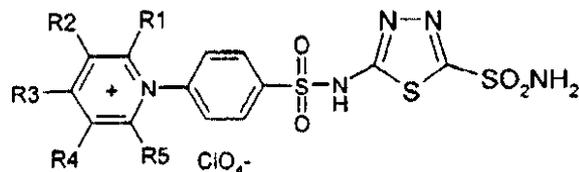
【0053】

別の観点から見ると、本発明は、腫瘍を有する患者の体内において腫瘍の増殖を阻害する方法に関し、そのような腫瘍の細胞は、MN/CA-IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる。そのような方法としては、化合物を含む組成物の治療有効量を該患者に投与することを含み、ここで、該化合物は、有機分子および無機分子よりなる群から選択され、MN/CA-IXに関して上述したように、飽和CO₂溶液を用いたスクリーニングアッセイにおいてMN/CA-IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断されたものである。

【0054】

さらに本発明は、本明細書に開示している多様な方法において、CA-IX特異的阻害剤として有用な新規化合物に関する。そのような新規化合物は、複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体を含み、次のような一般式を有する：

【化6】



【0055】

ここで、R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n - プロピル、n - ブチル、tert - ブチルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R2は、水素およびメチルよりなる群から選択され；

R3は、水素、メチル、n - ノニルおよびフェニルよりなる群から選択され；

R4は、水素およびメチルよりなる群から選択され；さらに

R5は、メチル、エチル、イソプロピル、n - プロピル、n - ブチル、tert - ブチル、n - ノニルおよびフェニルよりなる群から選択されるが、例外的に次のような場合がある

R2およびR4が水素であって、R3およびR5がメチルである場合には、R1はメチルではない；
さらに、

R2およびR4が水素であって、R3がフェニルであって、R5がメチルである場合には、R1はメチルではない；さらに、

R2およびR4が水素であって、R3およびR5がフェニルである場合には、R1はフェニルではない。複素環式スルホンアミド類の好ましいピリジニウム誘導体類としては、

R2およびR4は水素であり；

R3はメチルであり；さらに、

R1およびR5は同じ置換基であって、イソプロピルおよびtert - ブチルよりなる群から選択されるものであり、ならびに、

10

20

30

40

50

R2およびR4は水素であり；

R3はフェニルであり；さらに、

R1およびR5は同じ置換基であって、エチル、イソプロピル、n - プロピルおよびn - ブチルよりなる群から選択されるのもであり；ならびにさらに好ましくは、

R1は、メチル、エチル、イソプロピル、n - プロピル、n - ブチルおよびtert - ブチルよりなる群から選択され；

R2およびR4は水素であり；

R3およびR5はフェニルであるものが挙げられる。複素環式スルホンアミド類のさらに好ましいピリジニウム誘導體類としては、

R1はイソプロピルであり、R3およびR5はメチルであり、R2およびR4は水素であるもの；あるいは、

R2およびR4は水素であり、R3は水素またはメチルであり、R1およびR5はフェニルであるもの；あるいは、

R1、R2およびR5はメチルであり、R3はフェニルであり、R4は水素であるもの；あるいは、

R1、R2、R3およびR5はメチルであり、R4は水素であるもの；あるいは、

R1およびR4はメチルであり、R2は水素であり、R3およびR5はn - ノニルであるものが挙げられる。

【0056】

本発明の別の治療側面から見ると、CA-IX特異的阻害剤は、投与に際して放射性同位元素と結合させることができる。また、CA-IX特異的阻害剤は、放射線および/もしくは、次に挙げている化合物のうち1種またはそれ以上を含有する生理学的に許容される製剤と同時ならびに/または連続して投与することができ、そのような化合物としては、従来から使用されている抗癌剤、化学療法剤、癌関連経路に対する別異の阻害剤、生体還元性薬剤、生物学的に活性なCA-IX特異的抗体およびCA-IX特異的抗体のフラグメントなどが挙げられる。好ましくは、該CA-IX特異的抗体およびCA-IX特異的抗体のフラグメントは、ヒト型化されたもの、または完全にヒト型であり、細胞毒性の対象に結合することができる。

【0057】

別の治療側面から見ると、本発明は、腫瘍発生前または腫瘍性疾患の哺乳類を治療する方法に関し、ここで、そのような疾患は、MN/CA-IXタンパク質が過剰発現していることによって特徴付けられ、そのような方法は、強力なCA-IX特異的阻害剤に結合したベクターを含有する生理学的に許容される製剤の治療有効量を該哺乳類に投与することを含む。該ベクターは、CA-IX発現細胞（すなわち、腫瘍発生前または腫瘍性の細胞）に欠損している、または突然変異を起こしている野生型遺伝子を発現し、ここで、該野生型遺伝子の生成物は、該細胞内において抗癌活性を発揮するものであり、あるいは、該ベクターは、細胞毒性タンパク質を発現する遺伝子を含む。野生型遺伝子の例としては、腎細胞腫瘍においてCA-IXの本質的な発現に直接関与していることが知られているフォンヒッペル - リンダウ遺伝子などが挙げられる。

【0058】

好ましくは、前記ベクターは、MN/CA-IXプロモーターまたはMN/CA-IXプロモーターフラグメントを有しており、ここで、該プロモーターまたはプロモーターフラグメントは、1種またはそれ以上の低酸素症応答配列(hypoxia response element) (HRE)を含み、さらに、該プロモーターまたはプロモーターフラグメントは、前記野生型遺伝子または細胞毒性タンパク質を発現する遺伝子に、機能発揮できるように連結されている。好ましくは、ベクターに結合したCA-IX特異的阻害剤は、上述のCO₂飽和アッセイにおいて測定されたK₁が約50nM未満であり、より好ましくは、約35nM未満であり、さらに好ましくは約25nM未満であり、またさらに好ましくは約10nM未満である。好ましくは、そのような強力なCA-IX阻害剤は、アセタゾラミド、エトクスゾラミド、メタゾラミドおよびシアナートよりなる群から選択されるものではない。

【0059】

さらに別の側面から見ると、本発明は、腫瘍発生前または腫瘍状態の診断、ならびに診断および予後診断の方法に関する。例えば、そのような方法は、哺乳類サンプルに、標識もしくは可視化手段に結合したCA-IX特異的阻害剤を接触させ、次に、該サンプル内の細胞上の標識もしくは可視化手段を検出または検出・定量することにより、サンプル内の細胞に対するCA-IX特異的抗体の結合を検出または検出・定量するが、このとき、検出または検出・定量のレベルが対照サンプル以上であることが、サンプル内においてCA-IXを過剰発現している腫瘍発生前または腫瘍性細胞の指標になる。

【0060】

そのような方法は、低酸素状態によって活性化されたCA-IXを検出および検出・定量することにより、診断および予後診断に関して特に重要である。CA-IXの過剰発現を併発する低酸素症は、サンプルの採取元である哺乳類の予後が良くないことを示唆しており、そのような哺乳類の治療は、低酸素状態であるという観点に立って決定される。一般的に、低酸素症マーカーとしてのMN/CA-IXは、治療方針の決定に有用である。例えば、腫瘍がMN/CA-IXを異常に高レベルで発現していることがわかっている癌患者は、ある種の化学療法および放射線療法の対象ではなく、低酸素症選択的化学療法の対象である。

10

【0061】

ブラウン (Brown), J.M. は、参考文献16の157ページに次のように指摘している：「充実性腫瘍は、正常組織よりもかなり酸素が少ない。このことにより、放射線療法および抗癌剤による化学療法に対して抵抗性を示すことになり、また、腫瘍の転移が起こりやすくなる。」ブラウン (Brown) は、癌治療において腫瘍の低酸素症を如何に利用すべきかを説明している。癌治療に対して腫瘍低酸素症を利用するためのひとつの方法は、ブラウン (Brown) らによって呈示されており (参考文献番号16)、低酸素状態においてのみ毒性を発揮する薬物を使用することである。そのような方法において使用することができる薬物の例および好ましいものとしては、ティラパザミン (tirapazamine) およびミトザントローム (mitozantrome) のジ - N - オキシドアナログであるAQ4Nなどが挙げられる。

20

【0062】

ブラウン (Brown) によって提唱された第二番目の低酸素症利用法 (参考文献番号16) は、HIF-1の選択的誘導を利用するために開発された遺伝子治療法である。ブラウン (Brown) は、腫瘍特異的送達系を開発できることを指摘しているが、このとき、HIF-1に対する応答性が高いプロモーターは、低酸素状態においては条件付きで致死遺伝子の発現を活性化するが、酸素量が正常な状態においてはしない。MN/CA-IXプロモーターは、低酸素症に対する応答性が高い、まさにそのようなプロモーターであり、さらに、MN/CA-IXプロモーターフラグメントは1個またはそれ以上のHREを有する。「低酸素症応答性プロモーター (すなわち、MN/CA-IXプロモーター) の制御下において、正常な状態ではヒトの体内で検出されない酵素が発現することにより、非毒性のプロドラッグが腫瘍内部で毒性薬物に転換される。」(ブラウン (Brown)、参考文献番号16、160ページ) ブラウン (Brown) による、バクテリア由来のシトシンデアミナーゼを利用した例 (この酵素は、非毒性の5 - フルオロシトシンを抗癌剤である5 - フルオロウラシル (5-FU) に転換する) がトリン (Trinh) らによって引用されている (参考文献番号109)。

30

【0063】

ラットクリフ (Ratcliffe) らは、米国特許第5,942,434号および第6,265,390号において、低酸素状態において抗癌剤が如何に活性化されたかを説明している (参考文献番号119) が、薬物活性化系 (薬物を活性化する酵素は、低酸素状態において顕著に増加する) を利用することにより、治療効果が増強された。

40

【0064】

さらに本発明は、患者の体内でCA-IXを発現している腫瘍および/または転移組織を画像化する方法に関し、造影剤に結合させたCA-IX特異的阻害剤を患者に投与することを含む。好ましい画像法は、シンチグラフィである。

【0065】

本発明に従うアッセイは、診断および/または予後診断の両方に利用でき、すなわち、

50

診断 / 予後診断である。本明細書において使用している「診断 / 予後診断」とは、臨床情
況に鑑みて、個別にまたは累積的に以下の過程を包含する：疾患の存在の判断、疾患の性
質の判断、ある疾患と別の疾患との区別、病状から導かれる結果の予測、症例の性質およ
び症状から示唆される疾患からの回復の見込みの判断、患者の病状のモニタリング、疾患
の再燃に関する患者のモニタリング、および / または、患者に適した治療方法の決定。本
発明に従う診断 / 予後診断法は、例えば、腫瘍性または腫瘍発生前疾患の存在に関する集
団スクリーニング、腫瘍性疾患を発症するリスクの判断、腫瘍性および / もしくは腫瘍発
生前疾患の存在に関する診断、腫瘍性疾患の患者の病状のモニタリング、ならびに / また
は腫瘍性疾患の経過の予後に関する判断などに有用である。

【 0 0 6 6 】

本発明は、次のような多様な腫瘍発生前 / 腫瘍性疾患の存在に関する治療およびスクリ
ーニングに有用である：乳癌、結腸直腸癌、尿管癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸管癌、子宮
内膜癌、扁平上皮細胞癌および腺扁平上皮癌；頭部および頸部癌；中胚葉性腫瘍（神経芽
細胞腫および網膜芽腫など）；肉腫（骨肉腫およびユーイング肉腫など）；ならびにメラ
ノーマなど。特に興味深いのは、卵巣癌、子宮癌、子宮頸管癌、膣癌、外陰癌および子宮
内膜癌などを含む婦人科系の癌であり、とりわけ関心があるのは、卵巣癌、子宮癌、子宮
頸管癌および子宮内膜癌である。同様に興味深いのは、乳癌、胃腸管癌、食道を含む腹部
の癌、結腸癌、腎臓癌、前立腺癌、肝癌、膀胱を含む尿管癌、肺癌ならびに頭部および頸
部の癌である。婦人科系の癌で特に興味深いのは、子宮頸管、子宮内膜および卵巣の腫瘍
であり、中でも特に興味深いのは、子宮頸管扁平上皮細胞癌、腺扁平上皮細胞癌、腺癌、
ならびに婦人科系の腫瘍発生前状態（例えば、子宮頸管組織の異形成およびコンジローム
など）などである。

10

20

【 0 0 6 7 】

本発明は、宿主から採取したばかりの細胞群内などに悪性腫瘍または悪性腫瘍発生前の
細胞が存在している可能性を評価するための方法および組成物を提供する。そのようなア
ッセイを利用することにより、腫瘍の検出、それらの増殖の定量化、ならびに疾患の診断
および予後診断の一助とすることが可能になる。そのようなアッセイを利用することによ
り、癌の転移を検出することができ、さらに、手術、癌の化学療法および / もしくは放射
線療法後に全ての腫瘍組織が消失している、または除去されていることを確認することも
できる。さらに、そのようなアッセイを利用して癌の化学療法および腫瘍の再発をモニタ
ーすることもできる。

30

【 0 0 6 8 】

MN抗原の存在は、既に確立された多数の診断アッセイを利用して検出および / または定
量することができる。当業者であれば、従来から行われている任意のイムノアッセイフォ
ーマットを改変することにより、本明細書に開示されているようなMN抗原を検出および /
または定量することができる。本発明に従うイムノアッセイは、本発明に従う強力なCA-IX
特異的阻害剤を含む試験キットを包含しており、ここで該阻害剤は、適切に標識されて
いる、および / もしくは、当該分野において既知の可視化手段に結合されている。そのよ
うな試験キットは、固相フォーマット様式にすることができるが、それらに限定されるわ
けではなく、液相フォーマット様式にすることもでき、さらに、免疫組織化学的アッセイ
、ELISA、粒子アッセイ、放射計もしくは蛍光計アッセイ（例えば、増幅させていないも
の、またはアビジン / ビオチン法などを用いて増幅させたものについて行う）、その他の
アッセイフォーマット様式にすることもできる。

40

【 0 0 6 9 】

本発明に従うCA-IX特異的阻害剤の例示化合物は、MN/CA-IXを発現しない非トランスフ
ェクト細胞と比較して、構造的にMN/CA-IXを発現するトランスフェクト細胞の方を治療す
ることが示された。CA-IX特異的阻害剤の例示化合物は、低酸素状態での細胞培養内に存
在するMN/CA-IXによって誘導される細胞外pHの酸性化を阻害することが示された。

【 0 0 7 0 】

さらに、標識したスルホンアミド類などのような、CA-IX特異的阻害剤を標識した例示

50

化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアナート（FITC）に結合したものなど）は、低酸素状態のみにおいて、MN/CA-IXトランスフェクト細胞の表面に結合し（酸素正常状態では生じない）、対照細胞には結合しないことが示された。これらの実験により、本明細書に記載しているスルホンアミド化合物などのようなCA-IX特異的阻害剤は、腫瘍内微小環境に特徴的な条件下においてMN/CA-IXを特異的に標的にし得ることが確認された。

【0071】

本発明に従うCA-IX特異的阻害剤は、腫瘍発生前および腫瘍状態の診断および予後診断に使用することができ、さらに、患者の状態を判断することができ、さらに、治療的に、従来から使用されている治療法とは独立して、もしくは別の組み合わせで、腫瘍発生前ならびに/または腫瘍の治療をすることができる。CA-IX特異的阻害剤は、癌研究にも使用

10

【0072】

腫瘍発生前および/もしくは腫瘍の治療に限定すると、本発明に従うCA-IX特異的阻害剤を用いることにより、CA-IX活性を阻止して癌の拡大および/もしくは進行を妨げることができる。CA-IX特異的阻害剤は、放射線治療用に放射性同位元素と結合させることができる。CA-IX特異的阻害剤は、CA-IX特異的抗体、および従来から使用されている多様な治療薬、例えば、癌関連経路に対する別異の阻害剤、生体還元性薬物、および/もしくは放射線治療剤などと組み合わせることができ、このとき、本発明に従うCA-IX特異的阻害剤を用いた治療方法を独立して組み合わせることにより、全体的な治療効果が増すと考えられる。特に、本発明に従うCA-IX特異的阻害剤は、MN/CA-IX特異的抗体および/もしくは

20

【0073】

さらに、本発明に従うCA-IX特異的阻害剤は、遺伝子治療（例えば、野生型のフォンヒッペル-リングウ遺伝子）を目的として、または、細胞毒性タンパク質を効率的に発現させることを目的として、CA-IXを特異的に発現する細胞に標的送達するためのベクターに結合させることができ、ここで、好ましくは該ベクターは、MN/CA-IXの低酸素症応答配列（HRE）もしくはその他の遺伝子のHREを含むMN/CA-IXプロモーターまたはMN/CA-IXプロモーターフラグメントを有しており、より好ましくは、CA-IXプロモーターもしくはCA-IXプロモーターフラグメントは、1個またはそれ以上のHREを含んでおり、該HREは、MN/CA-IXおよび/もしくは他の遺伝子ならびに/または、好ましい関係内で遺伝子操作されたHREコンセンサス配列である。

30

【0074】

特に、本発明に従うCA-IX特異的阻害剤は、CA-IX、好ましくは低酸素状態において活性化されたCA-IXに結合させることにより、診断/予後診断に使用して腫瘍発生前および/または腫瘍細胞を検出することができ、このとき、該CA-IX特異的阻害剤は、標識または何らかの可視化手段に結合している。そのような検出、特に低酸素状態およびCA-IXの過剰発現の検出は、有効な治療選択を決定する場合、ならびに、治療効果および疾患の進行の予後を予測する場合に役立つ。さらに、CA-IX特異的阻害剤を標識した、または適切な可視化手段に結合した場合には、CA-IXを発現する腫瘍および/または転移の画像化に役立つ。

40

【0075】

本発明に従うCA-IX特異的阻害剤は、基礎的および前臨床研究にも有用である。例えば、CA-IX特異的阻害剤を用いることにより、CA-IX酵素活性の制御に関する研究、腫瘍の増殖および代謝におけるCA-IXの役割に関する研究、ならびに、薬剤、放射線、阻害剤およ

50

びその他の治療法による治療に対する応答におけるCA-IXの役割に関する研究を行うことができる。

【0076】

さらに、膜結合性炭酸脱水酵素であるCA-IXに対して高い親和性を有しており、正の電荷を帯び、膜不透過性である複素環式スルホンアミドCA阻害剤の調製法についても開示している。特に好ましいCA-IX特異的阻害剤は、そのような芳香環式および複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類である。スルホンアミド類の好ましいピリジニウム誘導体類の一般的な構造は、化合物の芳香環式または複素環式スルホンアミド部分の「尾部」にピリジニウム部分が結合した形で表わすことができる。

【0077】

さらに、脊椎動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはヒト由来の腫瘍発生前または腫瘍性細胞であって、MNタンパク質を異常発現するものの増殖を阻害するために有用な化合物に関するスクリーニングアッセイも提供される。そのようなスクリーニングアッセイは、該化合物によってMNの酵素活性を阻害する試験を含む。本明細書において提供される追加アッセイでは、該化合物の細胞膜不透過性について試験を行う。

【0078】

本明細書に開示している本発明の側面については、以下に詳細に記載する。

【参考文献】

【0079】

参考文献

The following references are cited throughout the application by numbers in italics keyed to the list below:

1. Abbate et al., J. Med. Chem., **45**: 3583-3587 (2002).
2. Abbate et al., J. Enz. Inhib. Med. Chem., **18**: 303-308 (2003a).
3. Abbate et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., **13**: In Press (2003b). 10
4. Abdine et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., **61**: 695-701 (1978).
5. Aldred et al., Biochemistry, **30**: 569-575 (1991).
6. Balaban et al., "Pyrylium Salts: Syntheses, Reactions and Physical Properties," In Advances in Heterocyclic Chemistry, Katritzky, A.R., Ed., Academic Press, New York, pp. 8-360 (1982).
7. Barlow et al., Nucl. Acids Res., **15**: 2386 (1987).
8. Bartosova et al., J. Pathol., **197**: 314-321 (2002). 20
9. Bayer, A., Ber. Dtsch. Chem. Ges., **43**: 2337-2349 (1910).
10. Bayer and Piccard, Liebigs Ann. Chem., **384**: 208-223 (1911).
11. Beasley et al., Cancer Res., **61**: 5262-5267 (2001).
12. Behravan et al., Eur. J. Biochem., **190**: 351-357 (1990).
13. Borrás et al., Bioorg. Med. Chem., **7**: 2397-2406 (1999).
14. Briganti et al., Biochemistry, **36**: 10384-10392 (1997).
15. Briganti et al., Inorg. Chim. Acta.: 275-276, 295-300 (1998).
16. Brown, J.M., "Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies," Molecular Medicine Today, **6**: 157-162 (April 2000). 30
17. Casini et al., J. Med. Chem., **43**: 4884-4892 (2000).
18. Casini et al., Curr. Cancer Drug Targets, **2**: 55-75 (2002).
19. a) Casini et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., **13**: 841-845 (2003)
b) Casini et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., **13**: 2763-2769 (2003).

20. Chegwiddden et al., "The Roles of carbonic anhydrase isozymes in cancer," Gene Families: Studies of DNA, RNA, Enzymes and Proteins, Xue et al., Eds., World Scientific, Singapore, pp. 157-169 (2001).
21. Chia et al., J. Clin. Oncol., 19: 3660-3668 (2001).
22. Chirica et al., Biochim. Biophys. Acta, 1544: 55-63 (2001).
23. Clare and Supuran, Eur. J. Med. Chem.: 32: 311-319 (1997).
24. Clare and Supuran, Eur. J. Med. Chem., 34: 463-474 (1999).
25. Cuthbert et al., J. Physiol., 551 (Pt.1) 79-92, (2003). 10
26. Dinculescu and Balaban, Rev. Roum. Chem., 25: 1505-1528 (1980).
27. Dodgson et al., The Carbonic Anhydrases, Plenum Press, New York-London, pp. 398 (1991).
28. Doege et al., J. Biol. Chem., 266: 894-902 (1991).
29. Elleby et al., Eur. J. Biochem., 268: 1613-1619 (2001).
30. Ferraroni et al., Biochemistry, 41: 6237-6244 (2002a).
31. Ferraroni et al., Inorg. Chim. Acta, 339: 135-144 (2002b). 20
32. Fleming et al., J. Clin. Invest., 96: 2907-2913 (1995).
33. Franchi et al., J. Enz. Inhib. Med. Chem., 18: 333-338 (2003).
34. Geers and Gros, Physiol. Rev. 80:681-715 (2000).
35. Giatromanolaki et al., Cancer Res., 61: 7992-7998 (2001).
36. Gomaa, Z.S., Biomed. Chromatogr., 7: 134-135 (1993).
37. Gruneberg et al., Angew. Chem. Int. Ed., 40: 389-393 (2001).
38. Hakansson et al., J. Mol. Biol., 227: 1192-1204 (1992).
39. Heming et al., J. Appl. Physiol., 61: 1849-1856 (1986). 30
40. Hewett-Emmett, D., "Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families," In The Carbonic Anhydrases – New Horizons, Chegwiddden et al., Eds., Birkhauser Verlag: Basel, Switzerland, pp. 29-78 (2000).
41. Höckel and Vaupel, J. Natl. Cancer Inst., 93: 266-276 (2001).
42. Ilies et al., Bioorg. Med. Chem., 8: 2145-2155 (2000).
43. Ilies et al., J. Med. Chem., 46: 2187-2196 (2003).
44. Khalifah, R.G., J. Biol. Chem., 246: 2561-2573 (1971). 40
45. Khalifah et al., Biochemistry, 16: 2241-2247 (1977).
46. Kim et al., J. Am. Chem. Soc., 122: 12125-12134 (2000).

47. Kim et al., J. Am. Chem. Soc., **123**: 9620-9627 (2001).
48. Koukourakis et al., Clin. Cancer Res., **7**: 3399-3403 (2001).
49. Krungkrai et al., Int. J. Parasitol., **31**: 661-668 (2001).
50. Liao et al., Am. J. Pathol., **145**: 598-609 (1994).
51. Liao et al., Cancer Res., **57**: 2827-2831 (1997).
52. Lieskovska et al., Neoplasma, **46**: 17-24 (1999).
53. Lindskog and Coleman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **70**: 2505-2508 (1964).
54. Lindskog et al., "Structure-function relations in human carbonic anhydrase II as studied by site-directed mutagenesis," in Carbonic anhydrase – From biochemistry and genetics to physiology and clinical medicine, Botre et al., Eds., VCH, Weinheim, pp. 1-13 (1991)]. 10
55. Lloyd et al., Genes. Dev., **1**: 594-602 (1987).
56. Loncaster et al., Cancer Res., **61**: 6394-6399 (2001).
57. Maren, T.H., Physiol. Rev., **47**: 595-781 (1967).
58. Maren, T.H., "Benzolamide – a renal carbonic anhydrase inhibitor," In Orphan Drugs, Karch, T.E., Ed., M. Dekker, New York, pp. 89-115 (1982). 20
59. Maren et al., Mol. Pharmacol., **44**: 901-906 (1993).
60. Maren et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., **280**: 98-104 (1997).
61. Mendelsohn and Lippman, "Growth Factors," pp. 114-133, IN: DeVita et al. (eds.), Cancer: Principles and Practice of Oncology (4th Ed.; Lippincott; Philadelphia, 1993).
62. Mincione et al., Eur. J. Pharm. Sci., **9**: 185-199 (1999). 30
63. Montgomery et al., Nucl. Acids. Res., **15**: 4687 (1987).
64. Mori et al., Gastroenterol., **105**: 820-826 (1993).
65. Okuyama et al., PNAS (USA) **89**: 1315-1319 (1992).
66. Opavsky et al., Genomics, **33**: 480-487 (1996).
67. Owa and Nagasu, Exp. Opin. Ther. Patents, **10**: 1725-1740 (2000).
68. Owa et al., J. Med. Chem., **42**: 3789-3799 (1999).
69. Parkkila et al., Gut, **35**: 646-650 (1994).
70. Parkkila et al., Histochem. J., **27**: 133-138 (1995). 40
71. Parkkila et al., Hepatology, **24**: 104 (1996).
72. Pastorek et al., Oncogene, **9**: 2788-2888 (1994).

73. Pastorekova et al., Virology, **187**: 620-626 (1992).
74. Pastorekova et al., Gastroenterology, **112**: 398-408 (1997).
75. Pearson and Lipman, PNAS (USA), **85**: 2444 (1988).
76. Pocker and Stone, Biochemistry, **6**: 668-678 (1967).
77. Scozzafava and Supuran, Bioorg. Med. Chem. Lett., **10**: 117-1120 (2000).
78. Scozzafava et al., Curr. Med. Chem., **10**: 925-953 (2003).
79. Scozzafava et al., J. Med. Chem., **42**: 2641-2650 (1999).
80. Scozzafava et al., J. Med. Chem., **42**: 3690-3700 (1999) 10
81. Scozzafava et al., J. Med. Chem., **43**: 292-300 (2000).
82. Sly and Hu, Annu. Rev. Biochem., **64**: 375-401 (1995).
83. Smith and Ferry, FEMS Microbiol. Rev., **24**: 335-366 (2000).
84. Steiner et al., Eur. J. Biochem., **59**: 253-259 (1975).
85. Sterling et al., Am. J. Physiol.-Cell Physiol., **283**: C1522-C1529 (2002).
86. Stubbs et al., Mol. Med. Today, **6**: 15-19 (2000).
87. Supuran, C.T., Opin. Investig. Drugs, **12**: 283-287 (2003). 20
88. Supuran and Clare, Eur. J. Med. Chem., **30**: 687-696 (1995).
89. Supuran and Clare, Eur. J. Med. Chem., **33**: 489-500 (1998).
90. Supuran and Clare, Eur. J. Med. Chem., **34**: 41-50 (1999).
91. Supuran and Scozzafava, Enzyme Inhib., **15**: 597-610 (2000a).
92. Supuran and Scozzafava, Eur. J. Med. Chem., **35**: 867-874 (2000b).
93. Supuran and Scozzafava, Exp. Opin. Ther. Patents, **10**: 575-600 (2000c).
94. Supuran and Scozzafava, Curr. Med. Chem.- Imm., Endoc. Metab. Agents, **1**: 61-97 (2001). 30
95. Supuran and Scozzafava, Exp. Opin. Ther. Patents, **12**: 217-242 (2002).
96. Supuran et al., Eur. J. Med. Chem., **33**: 577-594 (1998a).
97. Supuran et al., Eur. J. Med. Chem., **33**: 739-752 (1998b).
98. Supuran et al., J. Enz. Inhib., **15**: 381-401 (2000a).
99. Supuran et al., J. Med. Chem., **35**: 309-321 (2000b).
100. Supuran et al., Bioorg. Med. Chem., **9**: 703-714 (2001a).
101. Supuran et al., Curr. Med. Chem.- Imm., Endoc. Metab. Agents, **1**: 61-97 (2001b) 40
102. Supuran et al., Med. Res. Rev., **23**: 146-189 (2003).

103. Svastova et al., Experimental Cell Research, **290**: 332-345, (2003).
104. Symington, J. Biol. Chem., **267**: 25744 (1992).
105. Tashian, R. E., Adv. in Genetics, **30**: 321-356 (1992)..
106. Teicher et al., Anticancer Research, **13**: 1549-1556 (1993).
107. Tinker et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., **218**: 600-607 (1981).
108. Toma and Balaban, Tetrahedron, Suppl. **7**: 27-34 (1966).
109. Trinh et al., Cancer Res., **55**: 4808-4812 (1995).
110. Turner, et al., Hum. Pathol., **28**: 740-744 (1997). 10
111. Turner et al., Br. J. Cancer, **86**: 1276-1282 (2002).
112. Uemura et al. [J. Urology, **1571** (4 Supp.): 377 (Abstract 1475) (April 16, 1997)]
113. Vermylen et al., Eur. Respir. J., **14**: 806-811 (1999);
114. Vullo et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., **13**: 1005-1009 (2003a).
115. Vullo et al. J. Enz. Inhib. Med. Chem., **18**: 403-406 (2003b).
116. Wingo et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., **288**: 666-669 (2001). 20
117. Winum et al., J. Med. Chem., **46**: 2197-2204 (2003).
118. Wistrand and Lindqvist, "Design of carbonic anhydrase inhibitors and the relationship between the pharmacodynamics and pharmacokinetics of acetazolamide," In Carbonic Anhydrase – From Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine, Botrè et al., Eds., VCH, Weinheim, pp. 352-378 (1991).
119. Workman and Stafford, Cancer and Metastasis Reviews, **12**: 73-82 (1993) 30
120. Wu et al., J. Membr. Biol. **162**: 31-38 (1998).
121. Wykoff et al., Cancer Research, **60**: 7075-7083 (2000).
122. Wykoff et al., Am. J. Pathol., **158**: 1011-1019 (2001).
123. Zavada et al., Int. J. Cancer, **54**: 268-274 (1993).

略号

本明細書においては以下の略号を使用している：

- a a - アミノ酸
- AAZ - アセタゾラミド 40
- ATCC - アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection)
- bp - 塩基対
- BRL - ベセスダ研究所 (Bethesda Research Laboratories)
- BRZ - プリンゾラミド
- BSA - ウシ血清アルブミン
- CA - 炭酸脱水酵素
- CAI - 炭酸脱水酵素阻害剤
- CAM - 細胞接着分子
- CARP - 炭酸脱水酵素関連タンパク質 50

Ci - キュリー	
cm - センチメートル	
CNS - 中枢神経系	
cpm - カウント / 分	
C-末端 - カルボキシ末端	
- 摂氏温度	
DCP - ジクロロフェナミド	
DEAE - ジエチルアミノエチル	
DMEM - ダルベッコ変形イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle medium)	
ds - 二重らせんの	10
DZA - ドルゾラミド	
EDTA - エチレンジアミン四酢酸	
EZA - エトクスゾラミド	
F - 繊維芽細胞	
FCS - ウシ胎仔血清	
FITC - フルオレセインイソチオシアナート	
H - HeLa細胞	
IC - 細胞内	
kb - キロベース	
kbp - キロベース対	20
kdまたはkDa - キロダルトン	
K ₁ - 阻害定数	
KS - ケラタン硫酸	
LTR - 長末端反復	
M - モル濃度	
mA - ミリアンペア	
MAb - モノクローナル抗体	
ME - メルカプトエタノール	
MEM - 最小必須培地	
min. - 分	30
mg - ミリグラム	
ml - ミリリットル	
mM - ミリモル濃度	
MMC - マイトマイシンC	
mmol - ミリモル	
MZA - メタゾラミド	
N - 正常濃度	
NEG - ネガティブ、負、マイナス	
ng - ナノグラム	
nm - ナノメートル	40
nM - ナノモル濃度	
nt - ヌクレオチド	
N-末端 - アミノ末端	
ODN - オリゴデオキシヌクレオチド	
ORF - オープンリーディングフレーム	
PA - プロテインA	
PBS - リン酸緩衝生理食塩水	
PCR - ポリメラーゼ連鎖反応	
PG - プロテオグリカン	
pI - 等電点	50

PMA - フォルボール12 - ミリステート13 - アセテート	
POS - ポジティブ、正、プラス	
Py - ピリミジン	
QAS - スルホニルアミド4級アンモニウム塩	
QSAR - 定量的構造活性相関	
RACE - cDNA末端の迅速増幅	
RCC - 腎細胞癌	
RIA - ラジオイムノアッセイ	
RIP - 放射免疫沈降	
RIPA - 放射免疫沈降アッセイ	10
RNP - リボヌクレアーゼ保護アッセイ	
RT-PCT - 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応	
SAC - 黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) 細胞	
SAR - 構造活性相関	
sc - 皮下	
SDS - ドデシル硫酸ナトリウム	
SDS-PAGE - ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動	
SINE - 短い散在反復配列	
SP - シグナルペプチド	
SP-RIA - 固相ラジオイムノアッセイ	20
TBE - Tris - ホウ酸 / EDTA電気泳動緩衝液	
TC - 組織培養	
TCA - トリクロロ酢酸	
TC培地 - 組織培養培地	
tk - チミジンキナーゼ	
TM - 膜貫通	
Tris - tris(ヒドロキシメチル)アミノメタン	
μCi - マイクロキュリー	
μg - マイクログラム	
μl - マイクロリットル	30
μM - マイクロモル濃度	

細胞系

BL21 (DE3) - リンズコッグ (Lindskog) らのグループによって記載されている大腸菌 (Escherichia coli) 株 (CA-I, II発現用) (リンズコッグ (Lindskog) ら、「部位特異的突然変異誘発によって実験を行ったヒト炭酸脱水酵素IIの構造活性相関 (Structure-function relations in human carbonic anhydrase II as studied by site-directed mutagenesis)」、「炭酸脱水酵素 - 生化学および遺伝学から生理学および臨床薬物まで (Carbonic anhydrase-From biochemistry and genetics to physiology and clinical medicine)」より (ボトレ (Botre) ら編、VCH、ワインハイム、pp.1-13(1991))	
BL21-GOLD (DE3) - CA-IXの発現用に使用した大腸菌 (Escherichia coli) 株 (ストラタジェン (Stratagene) 社)	40

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列記号

本明細書においては、以下の記号を用いてヌクレオチドを表記する：

塩基

記号	意味
A	アデニン
C	シトシン
G	グアニン
T	チミン
U	ウラシル

I	イノシン
M	A または C
R	A または G
W	A または T / U
S	C または G
Y	C または T / U
K	G または T / U
V	A または C または G
H	A または C または T / U
D	A または G または T / U
B	C または G または T / U
N / X	A または C または T / U

10

アミノ酸は20個あり、それらは、隣接する3個のヌクレオチドの別異の配列(トリプレットコードまたはコドン)によって特定され、特定の順序で連結されることにより、特徴的なタンパク質を形成する。本明細書においては、3文字または1文字協定を用いてそのようなアミノ酸を特定し、以下のように取り決める(例えば、図1参照)：

アミノ酸名	3文字略号	1文字略号
アラニン	A l a	A
アルギニン	A r g	R
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
システイン	C y s	C
グルタミン酸	G l u	E
グルタミン	G l n	Q
グリシン	G l y	G
ヒスチジン	H i s	H
イソロイシン	I l e	I
ロイシン	L e u	L
リシン	L y s	K
メチオニン	M e t	M
フェニルアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
セリン	S e r	S
スレオニン	T h r	T
トリプトファン	T r p	W
チロシン	T y r	Y
バリン	V a l	V
未知のもの、その他		X

20

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0080】

40

本発明に従う新規な方法は、MNタンパク質の酵素活性を阻害する化合物を用い、MNタンパク質を過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む。そのような化合物は、有機性または無機性であり、好ましくは有機性であり、より好ましくはスルホンアミド類である。さらに好ましくは、該化合物は、芳香環式もしくは複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類である。スルホンアミド類のこのような好ましいピリジニウム誘導体類は、次の3つの点において、他の化合物よりも副作用がすくない傾向を有する：分子量が小さい、膜不透過性である、および腫瘍関連MN/CA-IXタンパク質の酵素活性に対して特異的な強力な阻害剤である。

【0081】

新規癌治療の開発を目的として、標的としてオンコプロテインを使用することは、当業

50

者においては従来から考えられていたことである（例えば、メンデルゾーン（Mendelsohn）およびリップマン（Lippman）、参考文献番号61などを参照）。しかしながら、MNの使用は新規である。他の腫瘍関連分子（例えば、増殖因子およびそれらのレセプターなど）と比較して、MNは、腫瘍発生前／腫瘍性組織内と正常組織内における発現が異なるという特徴的な性質を有しており、それらの組織は、解剖学的な差異によって区別することができる。

【0082】

本発明に従うスルホンアミド類のピリジニウム誘導体類は、以下に記載しているように、例えば、ピリリウム塩と芳香環式もしくは複素環式スルホンアミド反応試薬との間に結合を形成することによって調製することができる。スルホンアミド化合物のピリジニウム塩を構成している芳香環式もしくは複素環式スルホンアミド部分は、「頭部」と称され、ピリジニウム部分は「尾部」と称される。

10

【0083】

当業者であれば、その他の多様な様式の結合によっても、ピリジニウム部分にスルホンアミド部分を結合させることができることは自明である。さらに、本明細書に開示している方法に加え、別の方法を用いて本発明に従うピリジニウム誘導体類を調製することもできる。

【0084】

本明細書において使用している「癌（様）」および「腫瘍（様）」という語は同じ意味であり、「前癌」および「腫瘍発生前」という語も同じ意味を有する。

20

【0085】

本明細書において使用している「芳香環式」とは、スルホンアミド構造に対して使用する場合には、「追加の複素環を有しない、芳香環を含む」という意味である。「複素環式」とは、スルホンアミド構造に対して使用する場合には、「追加の芳香環を有するまたは有しない複素環を含む」という意味である。

【0086】

本明細書において使用している「アルキル」とは、単独または組み合わせて、炭素数が1～12個、好ましくは1～6個、より好ましくは1～4個であるような、直鎖または分岐鎖アルキルラジカルをさす。そのようなラジカル類の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソアミル、ヘキシル、デシルなどが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

30

【0087】

「アリール」という語は、単独または組み合わせにおいて、フェニルまたはナフチルラジカルを意味し、次の群から選択される1個またはそれ以上の置換基を追有する：アルキル、アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、ハロアルキル、カルボキシ、アルコキシカルボニル、シクロアルコキシ、ヘテロシクロアルキル、アミド、モノおよびジアルキル置換アミノ、モノおよびジアルキル置換アミドなど。アリール化合物の例としては、フェニル、p-トリル、4-メトキシフェニル、4-(tert-ブトキシ)フェニル、3-メチル-4-メトキシフェニル、4-フルオロフェニル、4-クロロフェニル、3-ニトロフェニル、3-アミノフェニル、3-アセトアミドフェニル、4-アセトアミドフェニル、2-メチル-3-アセトアミドフェニル、2-メチル-3-アミノフェニル、3-メチル-4-アミノフェニル、2-アミノ-3-メチルフェニル、2,4-ジメチル-3-アミノフェニル、4-ヒドロキシフェニル、3-メチル-4-ヒドロキシフェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、3-アミノ-1-ナフチル、2-メチル-3-アミノ-1-ナフチル、6-アミノ-2-ナフチル、4,6-ジメトキシ-2-ナフチルなどが挙げられる。

40

【0088】

本発明に従う好ましいスルホンアミド類は、芳香環式および複素環式スルホンアミド類である。これらの代表的な群に属するスルホンアミド類の構造は、図4の1～26に示して

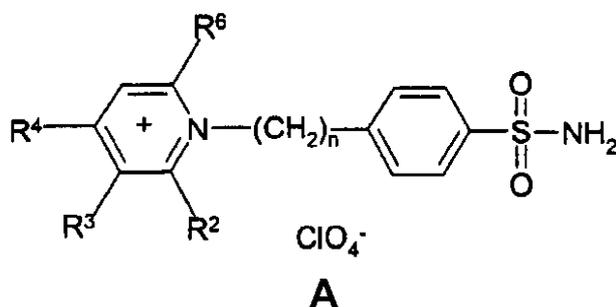
50

いる。

【0089】

本発明に従うより好ましいスルホンアミド類は、芳香環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類であり、以下に示す一般式(A)で表される。

【化7】



10

【0090】

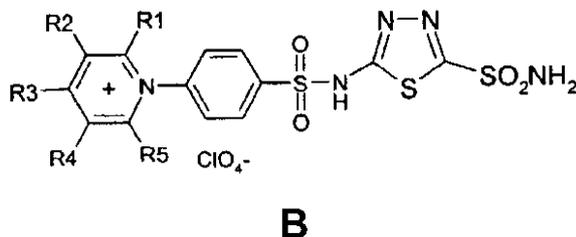
ここで、nは0、1または2であり；R2、R3、R4およびR6は、水素、アルキル類およびアリール類からそれぞれ独立して選択される。27~70で表されるこれらの群に属するスルホンアミド類の構造は、一般式(A)の誘導体として表2に示している。

【0091】

上記化合物とは別に、本発明に従うより好ましいスルホンアミド類は、複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類であり、以下に示す一般式(B)を有し、ここで、該複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体は、以下の一般式で表される；

20

【化8】



30

【0092】

ここで、R1、R2、R3、R4およびR5は、水素、アルキル類およびアリール類からそれぞれ独立して選択される。71~91で表されるこれらのスルホンアミド類の代表的な構造は、一般式(B)の誘導体として表3に示している。

【0093】

式(A)および(B)で表される化合物群のうちの代表的なスルホンアミド誘導体類は、CA-IX阻害活性を有し、MN関連腫瘍の治療において、抗癌剤として治療上有用である可能性がある。

【0094】

さらに、確認されたスルホンアミド類の生物学的活性は、イン・ビトロ(in vitro)において、MNタンパク質の炭酸脱水酵素活性に対する阻害により、また、MN関連腫瘍細胞(HeLa)および対照細胞の細胞形態および増殖特性に及ぼす影響により試験する(参考文献番号104)。HeLa細胞を注入されたヌードマウスを用いてイン・ビボ(in vivo)スクリーニング試験を行う。

40

【0095】

CA-IXに対する代表的なスルホンアミド阻害剤

実施例1においては、腫瘍関連アイソザイムであるCA-IXの阻害に関して、1~26のスルホンアミド類(図4A~Bに示す)について調べた。化合物1~6、11~12、20および26は市販されているが、7~10(参考文献番号43)、13~19(参考文献番号24、90、97)お

50

よび21~25(参考文献番号79)については既報に従って調製した。臨床的に使用されている6個の化合物についてもアッセイを行った。実施例2の化合物(芳香環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類)に関しては、スルファニルアミドであるホモスルファニルアミドまたは4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホンアミドと2,6-ジ-, 2,4,6-トリ-または2,3,4,6-テトラ置換ピリリウム塩とを反応させることにより、本明細書において実験を行ったピリジニウム塩27~70が得られた(一般的なバイエル-ピカード合成による)(参考文献番号9,10,97)。

【0096】

実施例3に記載しているように、正の電荷を帯びた一連のスルホンアミド類(本明細書においては化合物71~91と称する)は、アミノベンゾールアミド(5-(4-アミノベンゼンスルホニルアミノ)-1,3,4-チアジアゾール-2-スルホンアミド)にトリ/テトラ置換ピリリウム塩(以下に記載しているように、ピリジニウム環にアルキル-, アリール-, または、アルキルおよびアリール基を組み合わせたものを有する)を反応させることによって得られた。これらの化合物のうちの3個(71,75および87)については、別の文献に記載されているが(参考文献番号25,85)、この系列のその他全ての化合物は新規である。

10

【0097】

CA-IXに対する複素環式スルホンアミド阻害剤：アミノベンゾールアミドのピリジニウム誘導体類の合成

化学：アミノベンゾールアミド(5-(4-アミノベンゼンスルホニルアミノ)-1,3,4-チアジアゾール-2-スルホンアミド)(参考文献番号97)に2,6-ジ-, 2,4,6-トリ-もしくは2,3,4,6-テトラ置換ピリリウム塩を反応させるにあたっては、求核剤を用いたそのような誘導体類の一般的な合成法に従うことにより(図5のスキーム1に示す)、本明細書において実験を行ったピリジニウム塩71~91が得られた(参考文献番号6,26,108)。

20

【0098】

化合物の調製：アミノ-スルホンアミド類とピリリウム塩との反応(参考文献番号23,88,89)によって調製された正の電荷を帯びた多数のスルホンアミド類については、本発明者らが最近報告しており、一般的には古典的なアイソザイムであるCA-I, IIおよびIVの阻害剤としての試験を行った(参考文献番号81,96,97,98)。正の電荷を帯びたいくつかの誘導体類を含む数種の系統のCA阻害剤に関するQSAR実験に基づき(参考文献番号23,88,89)、CA阻害活性の増強は、分子内に存在する複素環/芳香環上の正の電荷の増加、ならびに阻害分子の「長さ」(すなわち、酵素のZn(II)イオン、スルホンアミドの窒素原子および阻害剤の長軸を貫通する方向に広がっているような分子)と相関していることが明らかになった(参考文献番号23,88,89)。この結果を検証することは興味あることと考えたので、正の電荷を帯びた長いスルホンアミドCAI類を設計した。従って、ピリリウム塩との反応に適し、既に強力かつ分子が長いCAI(すなわち、アミノベンゾールアミド)に、置換されたピリジニウム部位を結合させることを考えた(参考文献番号97)。勿論、この化合物はアイソザイムI, IIおよびIVに対しては非常に強力なCAIとして作用する(阻害定数はnMレベルの小さい値である。以下の記述を参照)。既に示されているように(参考文献番号81,96,97,98)、ピリジニウム環の置換パターンは、この型のスルホンアミドCAI類の生物学的活性には重要である。従って、スキーム1(図5)に記載した反応により、2,4,6-トリアルキルピリジニウム-; 2,6-ジアルキル-4-フェニルピリジニウム-; 2-アルキル-4,6-ジフェニルピリジニウム-; 2,4,6-トリフェニルピリジニウム-, ならびに多様な2,6-ジ置換ピリジニウム-および2,3,5,6-テトラ置換ピリジニウム-アミノベンゾールアミドなどの一連の多数のアミノベンゾールアミド誘導体類を調製した。

30

40

【0099】

見かけ上単純であるが、ピリリウム塩とアミンとの反応によってピリジニウム塩を導く反応は、実は複雑な過程をたどる(図6のスキーム2)ことが、バラバン(Balaban)ら

50

とカトリスキー (Katrizky) らのグループによる詳細な分光学的および速度論的データから確認された (参考文献番号 6、26、108)。従って、ピリリウム陽イオン上への一級アミンRNH₂の求核的攻撃は、一般的に 位で生じてIV型の間体が生成し (図6に示されている)、塩基の存在下で脱プロトン化することによって2-アミノ-テトラデヒドロピラン誘導体類Vが生成する。多くの場合、塩基性が十分であれば、脱プロトン化はアミン自身によって促進される (このことが、本方法に従ってピリジニウム塩を調製する場合に、ピリリウム:アミンのモル比が1:2において、多くの場合に反応が進行する理由である) か、またはトリエチルアミンなどの触媒を外部から反応混合物に加えることによって促進する (参考文献番号 6、26、108)。誘導体Vは、一般的に不安定であり、ケトジエンアミン類VIとの互変異性体であるが、この化合物VIは、ピリリウム類からピリジニウム類への転換の際の重要な中間体である (参考文献番号 6、26、108)。酸性溶媒中では、全反応過程の律速段階において、ケトジエンアミン類VIは対応するピリジニウム類塩VIIに転換するが、別異の構造を有するピニログ性アミド類などのようなその他の生成物も単離される (参考文献番号 6、26、108)。ピリリウム環の2-および/または6-位がメチルで置換されている場合、反応がさらに複雑化し、ピリジニウム塩類VIIに加えて、アニリン類VIIIの生成を伴う同時環化が起こる可能性がある (参考文献番号 6、26、108)。アミンから弱い求核性または塩基性を有するピリジニウム塩への転換を行う場合には、上述したこれらの同時反応は一般的に重要である。この現象は、アミノベンゾールアミドの場合に生じる。実際、多様な条件下 (低分子量アルコール類 (メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール)、DMF、塩化メチレン、アセトニトリルなどの多様な溶媒; 反応試薬のモル数の変更; 反応温度は25~150 ; 反応時間は15分~48時間、など) で行ったアミノベンゾールアミドと数種類のピリリウム塩との反応においては、未反応の原料が単離されたのみであった。ピリジニウム塩III (図5に図示) が生成した唯一の条件は次のようなものであった: 溶媒としては無水酢酸の存在下で無水メタノールを使用し、中間体IVの脱プロトン化に対する触媒としてトリエチルアミンを使用。無水酢酸は、縮合反応中に生成した水と反応する役割を有する。実際、この水は、ピリリウム陽イオンとの反応の場合には、アミノベンゾールアミドとの競合求核剤として作用し、その結果、ピリジニウム塩の収率が劇的に低下した。トリエチルアミン (および水捕獲剤としての無水酢酸の存在下において) を添加し、酢酸存在下で2~5時間還流させることにより、ピリジニウム環への環化 (律速段階) が達成された。収率は、特に2-メチル-含有誘導体類の場合には、常に良好とはいえなかった。

【0100】

MNタンパク質および/またはポリペプチドの調製

本明細書において使用している「MN/CA-IX」および「MN/CA-9」とは、MNと同義である。また、G250は、MNタンパク質/ポリペプチドをさすものと考えられている (参考文献番号112)。

【0101】

ザヴァダ (Zavada) らによるW0 93/18152および/またはW0 95/34650は、図1A~1Cに示しているMN cDNA配列 (配列番号1)、同じく図1A~1Cに示しているMNアミノ酸配列 (配列番号2)、ならびに図2A~2Fに示しているMNゲノム配列 (配列番号3) を開示している。MN遺伝子は、11個のエクソンと10個のイントロンで構成されている。

【0102】

図1A~1Cに示しているMNタンパク質の最初の37個のアミノ酸がMNシグナルペプチド (配列番号6) と推定されている。MNタンパク質は、細胞外ドメイン (図1A~1Cのアミノ酸番号38~414: 配列番号7)、膜貫通ドメイン (アミノ酸番号415~434: 配列番号8) および細胞内ドメイン (アミノ酸番号435~459: 配列番号9) を有する。細胞外ドメインは、プロテオグリカン様ドメイン (アミノ酸番号53~111: 配列番号4) および炭酸脱水酵素 (CA) ドメイン (アミノ酸番号135~391: 配列番号5) を含む。

【0103】

本明細書において使用している「MNタンパク質および/またはポリペプチド」 (MNタン

パク質/ポリペプチド)とは、MN遺伝子またはそれらのフラグメントによってコードされているタンパク質および/またはポリペプチドを意味するものと定義される。本発明に従う好ましいMNタンパク質の例としては、図1に示している推定アミノ酸配列を有するものである。好ましいMNタンパク質/ポリペプチドとは、図1に示すMNタンパク質と実質的に相同性を有するタンパク質および/またはポリペプチドである。例えば、MNタンパク質/ポリペプチドと実質的に相同なそのようなタンパク質/ポリペプチドとは、MN特異的抗体、好ましくはMabM75またはそれと同等のモノクローナル抗体と反応するものである。M75 Mabを分泌するVU-M75ハイブリドーマは、HB11128として1992年9月17日にATCCに寄託されている。

【0104】

「ポリペプチド」または「ペプチド」は、ペプチド結合によって共有結合しているアミノ酸鎖であり、本明細書においては、50個未満のアミノ酸から構成されているものと考えている。本明細書において使用している「タンパク質」とは、50個以上のアミノ酸から構成されているポリペプチドであると定義する。ポリペプチドという語には、ペプチドおよびオリゴペプチドを含む。

【0105】

イン・ビボ (in vivo) において腫瘍性細胞から産生されるタンパク質もしくはポリペプチドは、細胞培養中の腫瘍細胞によって、または形質転換された細胞によって産生されたタンパク質もしくはポリペプチドとは配列が改変されている可能性があることは明らかである。従って、アミノ酸置換、伸長、欠失、切断およびそれらの組み合わせなどを含む多様なアミノ酸配列を含むMNタンパク質/ポリペプチドは、本発明の範ちゅうに含まれる。体液内に存在するタンパク質は、タンパク質分解過程などの分解過程に組み込まれやすいことは明らかであり、従って、著しく切断されているMNタンパク質およびMNポリペプチドが血清などの体液中に見出される。本明細書において使用している「MN抗原」という語は、MNタンパク質および/またはポリペプチドを包含する。

【0106】

さらに、MNタンパク質およびポリペプチドのアミノ酸配列は、遺伝的手法によっても変化させることができることは明らかである。1個またはそれ以上のアミノ酸を欠失または置換させることができる。そのようなアミノ酸の変化は、タンパク質またはポリペプチドの生物学的活性に何ら変化をもたらすことはなく、本発明の範ちゅうに含まれるタンパク質またはポリペプチド、さらにMNムテインが得られる。

【0107】

本発明に従うMNタンパク質およびポリペプチドは、本発明に従う多様な方法によって調製することができ、そのような方法としては、例えば、組み換え、合成、またはその他の生物学的な方法、すなわち、長いタンパク質およびポリペプチドの酵素的および/もしくは化学的な解裂などが挙げられる。MNタンパク質を調製するための好ましい方法は組み換え法である。組み換えによってMNタンパク質を調製するための特に好ましい方法を以下に記載する。図1に示すMNタンパク質またはそれらのフラグメントを調製するための代表的な方法は、材料および方法の項に例示しているような適切な発現ベクター内にMN cDNAの全長または適切なフラグメントを挿入することである。

【0108】

MN遺伝子

図1A～Cには、ザヴァダ (Zavada) らによるWO 95/34650に記載されている単離されたMN cDNAクローンの全長 (配列番号1) のヌクレオチド配列を表示している。図2A～Fは、完全なMN ゲノム配列 (配列番号3) を表示している。

【0109】

図1に示すMN cDNAのORFは、459個のアミノ酸から構成され、計算上の分子量が49.7kdであるタンパク質をコードする能力を有する。MN/CA-IXタンパク質の全体的なアミノ酸組成はやや酸性であり、予測pI値は4.3である。二次元電気泳動とそれに続いて行ったイムノプロットにより、CGL3細胞由来の天然MN/CA-IXタンパク質を分析したところ、コンピュ

10

20

30

40

50

ータ予測と一致することが示され、MN/CA-IXは、pIが4.7~6.3であるようないくつかの等電型を示す酸性タンパク質であった。

【0110】

CAドメインはアンカレッジインデペンデントの誘導に必須であるが、TMアンカーおよびIC尾部はそのような生物学的効果に対して必ずしも必要ではない。MNタンパク質は、形質転換した細胞内の原形質膜を乱すこともでき、そのような細胞が固体支持体に結合する際に寄与すると考えられる。データから、細胞増殖、接着および細胞内連通の制御にMNが関与していることが証明された。

【0111】

酵素スクリーニングアッセイ

本明細書におけるアッセイは、MNタンパク質の酵素活性を阻害する化合物をスクリーニングするためのものである。そのようなアッセイにおいては、該化合物に該MNタンパク質、ならびに飽和CO₂および4-ニトロフェニルアセテートよりなる群から選択される基質、好ましくは飽和CO₂を加えてインキュベートし、該化合物の阻害定数K_iを計算したが、このとき、MNタンパク質の該酵素活性は、ストップフロー分光光度計を用い、インジケータのpH変化によって測定した。

【0112】

代表的な複素環式および芳香環式スルホンアミド類についてのMNタンパク質阻害に関するスクリーニング：実施例1から、アイソザイムCA-IXの阻害プロファイルは、古典的なアイソザイムであるCA-IおよびII(サイトゾル性)およびCA-IV(膜結合性)のそれとは非常に異なっていることがわかった。以下に特徴的な特性を記載する：(i)実施例1で調べた32個のスルホンアミドは全てCA-IX阻害剤として作用し、阻害定数は14~285nMであった(表1のデータからわかるように、他の3個のアイソザイムに対する親和性は、より広範囲にばらついていた)。これらのデータに基づき、CA-IXは、CA-IIと同様にスルホンアミド要求性CAであり、現在までのところ、スルホンアミド類の薬理学的効果の主因であると考えられている(参考文献番号22、29、83、93、94、95、102)。さらに、CA-IXと、臨床的に使用されている阻害剤が開発されている他のアイソザイムとの間にはその他多数の差異が観察された；(ii)CA-I、IIおよびIVに対しては、一般的に、複素環式スルホンアミド類と比較した場合に、芳香環式スルホンアミド類は弱い阻害剤として作用する(芳香環式化合物として1~6またはDCP、と複素環式化合物として15、21、AAZ、MZA、EZA、DZAまたはBRZとを比較した)。CA-IXの場合には、芳香環式化合物(例えば、1、6、11、12、17、18、22~26)および複素環式化合物(例えば、14、15、21、および臨床的に使用されているスルホンアミド類のうちジクロロフェナミドを除く化合物)はほぼ同程度の阻害定数(14~50nM)を有していたので、そのような明確な区別をすることは困難であった；(iii)オルタニルアミド誘導體類(1、17、22など)は、CA-IXに対する非常に強力な阻害剤であったが(K_i値の範囲は20~33nM)、CA-I、IIおよびIVに対しては、弱いもしくは中の弱程度の阻害剤であった；(iv)1,3-ベンゼン-ジスルホンアミド誘導體類(11、12、DCP)は、CA-IXに対する強力な阻害剤であったが(K_i値の範囲は24~50nM)、それらの化合物のCA-I、IIおよびIVに対する阻害プロファイルは特に強力ではなかった；(v)メタニルアミド(2)、スルファニルアミド(3)および4-ヒドラジノ-ベンゼンスルホンアミド(4)のCA-IX阻害データは、CA-IIのそれと非常に類似していたが、ホモスルファニルアミド(5)および4-アミノエチル-ベンゼンスルホンアミド(6)は、CA-IIに対してよりもCA-IXに対して阻害剤として強く作用した；(vi)ハロゲンスルファニルアミド類(7~10)は、CA-IIに対してよりもCA-IXに対する阻害作用が弱かったが、この挙動に関する説明はわかっていない；(vii)調べた化合物中最も強力なCA-II阻害剤であった4-アミノベンゾールアミド15(K_i値は2nM)は、CA-IXに対する最も強力な阻害剤ではなかった(K_i値は38nM)。調査した化合物中で最も強力なCA-IX阻害剤は、エトクスゾラミドフェノール(21)であった(K_i値は14nM)。興味深いことに、21およびEZAは、CA-IIに対する親和性が等しいが、CA-IXに対する親和性は若干異なっており、エトキシ誘導體よりもフェノールの方がより活性が高かった；(viii)臨床使用されている化

10

20

30

40

50

合物中では、最も強力な阻害剤はアセタゾラミドであり、続いてメタゾラミド、エトクスゾラミド、プリンゾラミドであった。最も無効なく（しかし、アイソザイム IX を多少は阻害する）化合物は、ジクロロフェナミドおよびドルゾラミドであった；（ix）スルホンアミド類 20 および 22～26 は非常に良好な CA-IX 阻害剤として作用し、 K_i 値の範囲は 16～32nM であり、臨床使用されている上述の CAI よりもわずかに有効であり、調べた限りでは、最も強力な CA-IX 阻害剤に含まれる。従って、そのような化合物は、抗腫瘍剤として使用する、より強力かつ特異的な CA-IX 阻害剤を得るための先導分子として使用することができると考えた。

【0113】

MNタンパク質を阻害するための芳香環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類のうち 10
 の代表的な化合物のスクリーニング：スルホンアミド類の膜不透過性ピリジニウム誘導
 体類について、CA-IXの酵素活性を阻害する能力を調べた実施例 2 から、表 2 に示すよう
 な以下の結論を得た：（i）ピリジニウム環の与えられた置換パターンにおいては、4 -
 アミノエチル - ベンゼンスルホンアミド誘導体類 55～70 は、対応するホモスルファニルア
 ミド誘導体類 39～54 よりも活性であり、該 39～54 は、対応するスルファニルアミド誘導体
 類 27～38 よりも活性であった。このような挙動は、調査した他の 3 個のアイソザイムに関
 しても観察された（参考文献番号 96）；（ii）ピリジニウム環にかさ高い置換基（主にフ
 ェニル類、tert - ブチル類、n - ブチル、n - プロピルまたはイソプロピルなど）を有す
 るいくつかの誘導体類（34～37、51 および 67 など）は、無効性が高い CA-IX 阻害剤であり
 、阻害定数は > 500nM であった；（iii）27、30～33、44 および 60 を含む他の群の化合物は 20
 、腫瘍関連アイソザイム IX に対して緩和な阻害力を示し、 K_i 値の範囲は 160～450nM であ
 った。これらの化合物の大多数はスルファニルアミド誘導体類であり（44 と 60 を除く）、ピ
 リジニウム環の置換パターンは（27 を除いて）、4 位に少なくとも 1 個のフェニル基、ま
 たは、2 および 4 位に 2 個のフェニル基を有していた。上述のスルファニルアミド類と同
 様の置換パターンを有する、対応するホモスルファニルアミド類および 4 - アミノエチル
 ベンゼンスルホンアミド類がより強力な CA-IX 阻害剤であったことは特記すべきである（
 以下の文章を参照）；（iv）38、45～50、52、53、61、63～66、68 および 69 を含む第三の
 群の誘導体類は、良好な CA-IX 阻害特性を示し、 K_i 値の範囲は 64～135nM であった。上述し
 たように、テトラメチル - ピリジニウム - 置換誘導体 38 を除いては、これらの化合物の大
 多数は 4 - フェニル - ピリジニウムまたは 2, 4 - ジフェニルピリジニウム部位を有して 30
 いるが、一般的に、6 位の置換基に関しては多様性に富んでいる（アルキル類またはフェ
 ニルも許容される）。この型の CA-IX 阻害剤に関する最も興味深い知見は、ホモスルファ
 ニルアミドおよび 4 - アミノエチルベンゼンスルホンアミド（52～53 および 68～69）の 2
 , 4, 6 - トリフェニル - ピリジニウム - 誘導体類および 2, 6 - ジフェニル - ピリジニ
 ウム誘導体類は、効果的にアイソザイム IX を阻害したが、アイソザイム I, II および IV に
 対しては非常に弱い阻害剤としてしか作用しなかったという事実から導かれた（表 2）。
 端的に述べると、このことは、hCA-IX 活性化部位が、調査した他のアイソザイム特に CA-I
 I, I および IV のそれらよりも大きいという事実由来のもと考えられる；（v）誘導
 体類の最後の群（28～29、39～43、54、55～59、62 および 70）は、非常に良好な CA-IX 阻
 害特性を示し、これらの化合物の K_i 値の範囲は 6～54nM であり、臨床で使用されている阻 40
 害剤アセタゾラミド、メタゾラミド、ジクロロフェナミドおよびインディスラムと同様で
 あり、これらの化合物の阻害データを比較のために示しておく。3 個の誘導体 58、59 およ
 び 70 は、阻害定数が < 10nM を示し、これまでに報告された中で最も強力な CA-IX 阻害剤で
 あったことは特記すべきである。それらの化合物が膜不透過性であることと関連して（参
 考文献番号 96、85）、イン・ビボ（in vivo）において、選択的に CA-IX を阻害する初めての
 の化合物であると考えられる。従って、ピリジニウム環における最良の置換パターンは、
 小さいアルキル類（39～41、54、55 および 70）または 2, 6 - ジアルキル - 4 - フェニル
 - ピリジニウム部位（上述の 62 を除く全ての化合物、62 は 2 - メチル - 4, 6 - ジフェニ
 ルピリジニウム環を有する）を有するものである；（vi）ピリジニウム環の置換基の数に
 ついては、この系統の CAI の活性に対する重要度は低いと考えられるが、それは、ジ - 50

トリ - またはテトラ - 置換誘導体類が良好な阻害力を示したからである。一方、上に詳述したように、これらの群の性質は、(ベンゼンスルホンアミド部位と置換ピリジニウム環との間のリンカーと共に) CA阻害特性に影響を及ぼす最も重要なパラメーターである；(vii) これらの阻害剤に対する親和性に関してhCA-IXと最も類似しているのはhCA-IIであり、hCA-IXとの相同性は33%であったが(パストレック(Pastorek)ら、(1994)、同上)、アイソザイムIおよびIVの親和性は異なっていた。

【0114】

MNタンパク質を阻害するための複素環式スルホンアミド類のピリジニウム誘導体類のうちの代表的な化合物のスクリーニングおよび他のCAアイソザイムに対する阻害との比較：

アイソザイムI - 表3のデータからわかるように、本明細書に報告されている全ての誘導体類71~91は、一般的にこの型の阻害剤に対して最も「抵抗性」である該アイソザイムに対し、非常に有効なCAIとして作用した(参考文献番号30、31、100、102)。確かに、アミノベンゾールアミドはかなり強力なCA-I阻害剤である(K_i 値は6 nM)が、阻害剤71~91の阻害定数は3~12nMの範囲を示し、臨床的に使用されているスルホンアミドCAIとは対照的であった(それらの K_i 値は30~1200nMの範囲であり、阻害剤としての有効性は低い)(表3)。従って、ピリジニウム部位の置換によってかさ高い基(i-Pr、t-Bu、n-Pr、n-Bu、Phなど)を複数有する誘導体類(例えば、73、74、77、78、82、84、85など)は、アミノベンゾールアミドと比較すると阻害活性が低下しており、 K_i 値は7~12nMの範囲であった(アミノベンゾールアミドのhCA-Iに対する K_i 値は6 nM)。残りの化合物については、CA-Iの阻害に関しては、アミノベンゾールアミドより有効であり、 K_i 値は3~5 nMの範囲であった。最も強力なCA-I阻害剤は75および89~91であり(K_i 値は3 nM)、それらは全て、ピリジニウム環の置換により、アルキル部位または4-Phのいずれか、ならびにその他のアルキル部位を有している。臨床的に使用されているCAIのアイソザイムIに対する阻害定数はもっと大きいことから、これらは、これまで報告されたもののうちで最も強力なCA-I阻害剤であると考えられる(表3)。

【0115】

アイソザイムII - アミノベンゾールアミドは非常に強力なCA-II阻害剤であり、その阻害定数は約2 nMである。74、77、78、82~88などのいくつかの新規な阻害剤は、アミノベンゾールアミドと比較すると弱いCA-II阻害剤であり、 K_i 値は3.13~5.96nMの範囲であった(しかしながら、これらの化合物は全て強力な阻害剤として作用し、臨床的に使用されているCAIであるアセタゾラミド、メタゾラミド、ジクロロフェナミドまたはインジスラムよりも有効であった - 表3参照)。ピリジニウム環の置換パターンはこれらの化合物の活性に関する主要決定因子であった：上述した活性の低い全ての誘導体類は、ピリジニウム環の主として2 - または6 - 位に少なくとも2個のかさ高い/長い脂肪族基(n-Pr、t-Bu、n-BuおよびPh)を有している。誘導体類71~91の中で最も強力なCA-II阻害剤は、ピリジニウム環の置換基として4-Meまたは4-Ph部位と共に、2, 6 - 位により小さな置換基(Me、Etなど)を有するか、あるいは、脂肪族基のみを有しており(71~73、75、76、79~81、89~91など)、 K_i 値は0.20~1.61nMの範囲であった(従って、最良の阻害剤においては、アミノベンゾールアミドと比較して、阻害力が10倍増加していた)。イソプロピル置換化合物(73、79)はCA-II阻害剤として活性であったが、CA-Iに対する活性はそれほど高くなかったことに言及しておく。

【0116】

アイソザイムIV - 大多数のスルホンアミド類において、CA-IVに対する阻害活性は、CA-I(感受性が低い)に対するそれとCA-II(スルホンアミド類に対する親和性が非常に高い)に対するそれとの中間であった。この傾向は、本実験において調べたスルホンアミド類、アミノベンゾールアミドの誘導体についても観察された。従って、親化合物のスルホンアミド(図5に示す)は、強力なCA-IV阻害剤であり、 K_i 値は約5 nMであった。一般式(B)の新規誘導体であって、ピリジニウム環にかさ高い置換基を有する化合物(74、77、78、82、84~88、90など)は、アミノベンゾールアミドよりも効果が低く、 K_i 値は5.2~10.3nMの範囲であり、一方、上述したその他の置換パターンを有する化合物は、もう少し

10

20

30

40

50

強力なCA-IV阻害剤であり、 K_i 値は2.0~4.7nMの範囲であった。

【0117】

アイソザイムIX - 上述したアイソザイム類と比較すると、このアイソザイムに対するアミノベンゾールアミドの阻害活性は弱かった (K_i 値は38nM)。このアイソザイムのX線による結晶構造は未報告であるため、この時点では、この挙動を説明することは困難である。本明細書に記載している一般式(B)の新規誘導体を用いて有望な結果が得られたが、それは、該誘導体のうちのいくつかはCA-IXに対して非常に高い親和性を示し、その K_i 値が3~9nMであったことである(誘導体71、72、75、76および89)。そのような誘導体の全てがピリジニウム環の2-および6-位に脂肪族部位(Me、Etおよび*i*-Pr)を有し、さらに、4-Meもしくは4-Phであった。四置換化合物は1個のみであり(89)、メチル基のみを有している。最も強力なCA-IX阻害剤(これまで報告されたものの中で最も強力)は71であり、該酵素の阻害活性に関しては、ベンゾールアミドの約13倍であった。新規誘導体類の別の群(73、74、77、79、80、81、83、86~88、90、91)は、有効なCA-IX阻害を示し、 K_i 値は12~35nMの範囲であったことから、アミノベンゾールアミドより有効性が高かった。これらの化合物は、先に述べた化合物よりもややかさ高い基を有している。繰り返すが、効力が低かった阻害剤(K_i が40~43nMの範囲)は、ピリジニウム環にかさ高い置換基を複数有し(78、84、85など)、そのような化合物は、ピリジニウム環の2-および6-位に2個の*n*-Bu、または1個のPhおよび*n*-Bu/*t*-Buを有する。従って、SARがこの型のCAIである:最も強力なCA-IX阻害剤は、ピリジニウム環の置換基として分子量およびかさ小さい脂肪族部位のみを有しており、または置換基として4-Phまでは許容されるが、2,6-位の置換基は、やはり分子量およびかさ小さい脂肪族部位でなければならない。この特別な場合においては、四置換誘導体類と比較して、2,4,6-三置換ピリジニウム誘導体類の方がより有効なCA-IX阻害であった。

10

20

【0118】

CA-IXに対する複素環式スルホンアミド阻害剤の膜不透過性:実施例3の表4のデータからわかるように、ヒト赤血球(アイソザイムIおよびIIを高濃度で含有する。すなわち、hCA-Iを150 μ M、hCA-IIを20 μ M。しかし、膜結合性のCA-IVまたはCA-IXは含有しない(参考文献番号118))にミリモル濃度の別異のスルホンアミド阻害剤(アセタゾラミドまたはメタゾラミドなど)を加えてインキュベートしたところ、短時間(30分間)のインキュベート後に、赤血球中に存在する2種のアイソザイムは阻害剤と飽和したが、ベンゾールアミドまたはアミノベンゾールアミドの場合には、同様の効果が得られるまでにやや長い時間(60分間)を要した(表4)。これは明らかに、最初の3種の阻害剤に関しては、膜を介して拡散する能力が高かったからであり、一方、第二のスルホンアミド群であるベンゾールアミド/アミノベンゾールアミド(pK_a 値は3.2)(参考文献番号58)は、実験を行ったpH(7.4)においては、主に(ジ)アニオンとして存在し、拡散性が低下しており、膜の透過により時間がかかったからだと考えられる。発明者らによって合成された別の陽イオン性スルホンアミド類(71、76、89、91など)は、同様の条件下においては、赤血球細胞内でごくわずしか検出されず、このことは、おそらく、該化合物が陽イオン性物質であるために膜を透過することができなかったことを示している。1時間(データは示していないがそれ以上の長時間)インキュベートした後も、細胞溶解物中の化合物の検出に使用した3種類のアッセイによって示されたように、そのような陽イオン性スルホンアミド類は赤血球細胞内に痕跡量しか存在していなかった。これらの結果は互いに良く相関していた(表4)。このことは、膜不透過性を獲得するために提起された方法が、一般式(B)(上掲)を有する正の電荷を帯びたスルホンアミドCAIを設計するにあたって首尾良く機能したことを示している。ごく少量のスルホンアミドが検出された理由は、ごく微量の膜が細胞溶解物に混入していたからだと考えられる。

30

40

【0119】

CA-IXに対する膜不透過性スルホンアミド阻害剤の設計

多数のX線結晶構造が利用可能な(単独、または阻害剤と活性剤とのコンプレックスとして)hCA-II(参考文献番号1、2、14、15、19a、19b、37、38)とは全く異なり、現在

50

のところ、アイソザイム IX の X 線結晶構造は得られていない。これら 2 種類のアイソザイムの活性部位残基および hCA-II の構造を調べることは、上記の阻害データおよび CA-IX 特異的阻害剤に関する関連性を説明する一助になるはずである。

【0120】

まず始めに、これら 2 種類のアイソザイムの亜鉛リガンドおよび陽イオン輸送残基は同一であった（参考文献番号 33、43、72、100、101、102、114、115、117）。重要な差異は、131 番目のアミノ酸によってもたらされており、hCA-II では Phe であるが、hCA-IX では Val であった。131 番の Phe は、スルホンアミド阻害剤が hCA-II に結合するために非常に重要であることがわかっており（参考文献番号 2、46、47）、多くの場合において、このかさ高い側鎖は、阻害剤の芳香環の結合空間を狭め、あるいは、内部に存在する基との積み重ね相互作用に参与している（最新の実施例については、参考文献番号 2、46、47 を参照）。従って、hCA-IX 内のかさの小さいそのような残基（すなわち、バリン）は、積み重ね相互作用に参与することができず、結果的に、hCA-IX の活性部位は hCA-II のそれよりも大きいという事実が導かれた。第二に重要と考えられる残基は 132 番であり、hCA-II では Gly、hCA-IX では Asp である。この残基は、hCA-II の活性部位の入り口の親水性半分の縁に存在しており（hCA-IX においても同様だと考えられる）、発明者らが最近示したように（参考文献番号 19b）、長い分子を有する阻害剤との相互作用に重要である。132 番の Gly の CONH 部位を含む強力な水素結合により、このアイソザイムと p - アミノエチルベンゼンスルホンアミド由来の阻害剤とのコンプレックスが安定化することが示された（参考文献番号 19b）。hCA-IX の場合、活性部位の入り口の該当する位置にアスパラギン酸が存在することは、次のことを意味する；（i）COOH 部位はより多くの供与原子を有するので、活性部位内部に結合した阻害剤の極性部位とのより強力な相互作用が可能である；（ii）この残基は、立体構造が可変性であり、阻害剤との相互作用において微細調整が可能である。従って、これらの阻害剤のうちで、アイソザイム II に対する親和性と比較して、より強力な hCA-IX 阻害作用を示すもの（例えば、46 ~ 50、52、53、55、58、62 および 68 ~ 70 など）については、上述した 2 つの活性部位残基の相互作用の差を理由に説明することができた。

10

20

【0121】

MN 特異的阻害剤の治療応用

本発明に従う MN 特異的阻害剤は、有機性および/もしくは無機性、好ましくは有機性であり、また、上に概説したように、単独で、または他の化学療法剤と組み合わせて腫瘍および/もしくは腫瘍発生前疾患の治療に使用することができる。

30

【0122】

MN 特異的阻害剤は、好ましくは、生理的に許容され、非毒性の液性ビヒクルに分散することにより、その治療有効量を投与することができる。

【0123】

材料および方法

一般法 - 融点：加熱プレート顕微鏡（補正なし）；IR スペクトル：KBr 錠法、400 ~ 4000 cm^{-1} 、Perkin-Elmer 16PC FTIR スペクトロメーター； ^1H -NMR スペクトル：Varian 300CXP 装置（化学シフトは、 Me_4Si を標準物質とし、相対的値で表した）；元素分析：Carlo Erba Instrument CHNS Elemental Analyzer, Model 1106。全ての反応は、0.25mm のプレコートシリカゲルプレート（E.メルク（Merck）社）を用いた薄層クロマトグラフィー（TLC）によってモニターした。ピリリウム塩は文献（参考文献番号 6、26、108）の記載に従い、一般的に、オレフィン（またはそれらの前駆体）のビスアシル化によって調製したが、アミノベンゾールアミドに関してはより早い時期に文献に記載されていた（参考文献番号 97）。標準物質として使用したその他のスルホンアミド類は購入可能であった。

40

【0124】

化合物 71 ~ 91（アミノベンゾールアミドのピリジニウム誘導体類）の調製に関する一般的方法

5 ml の無水メタノール中に 2.9mM のアミノベンゾールアミド（参考文献番号 97）および 2.9mM のピリリウム塩（図 5 に図示）を懸濁させ、14.5mM のトリエチルアミンと 5.8mM の無

50

水酢酸との攪拌混合物中に加えた。5分間攪拌した後、反応混合物中にさらに10mlのメタノールを加え、これを加熱して15分間還流させた。次に、14.5mMの無水酢酸を加え、さらに2～5時間加熱を続けた。無水酢酸の役割は、ピリリウム塩と芳香環式アミンとの間の縮合反応中に生成した水と反応することであり、一般式(B)(上述)で表されるピリジニウム塩の生成を平衡化するためである。アミノベンゾールアミドの場合には、この方法が、許容できる収量のピリジニウム塩が得られる唯一の方法であるが、これはおそらく、アミン基上のスルファモイルアミノチアジアゾール部位が脱活性化されることによるものであり、これらの反応試薬に対する該部位の求核性が低下し、反応性が消失する。沈殿したピリジニウム塩は、濃アンモニア溶液で処理することによって精製し(また、この操作により、未反応のピリリウム塩が酸性溶媒に可溶性の対応するピリジンに転換する)、過塩素酸を用いて再沈殿させ、さらに、2～5%のHClO₄を加えた水から再結晶させた。

【0125】

CA-IXの触媒性ドメインの精製

hCA-IXの触媒性ドメインのcDNA(パストレック(Pastorek)らの記載(参考文献番号72)に従って単離した)は、PCRおよびベクター-pCAL-n-FLAG(ストラタジーン(Stratagene)社から購入)用の特異的プライマーを用いて増幅させた。得られた構築体は、pCAL-n-FLAGベクターに挿入し、大腸菌(*Escherichia coli*)株BL21-GOLD(DE3)(ストラタジーン(Stratagene)社から購入)内でクローニング、発現させた。ウイング(Wingo)らの記載(参考文献番号116)に従い、4Mの尿素および2%のTriton X-100を含む緩衝溶液(pH8)中でバクテリア細胞を溶解し、ホモジネートした。可溶性タンパク質および膜関連タンパク質、ならびにその他の細胞残渣を除去することを目的として、得られたホモジネートを十分に遠心分離した。残留尿素およびTriton X-100を除去することを目的として、水中でのホモジネーションおよび遠心分離を繰り返すことによって、得られたペレットを洗浄した。精製したCA-IX含有部は、6Mの塩酸グアニジンで変性させ、次に、100mMのMES(pH6)、500mMのL-アルギニン、2mMのZnCl₂、2mMのEDTA、2mMの還元グルタチオン、1mMの酸化グルタチオンを含む溶液ですばやく希釈することによって活性型に戻した。活性型CA-IXは、10mMのHEPES(pH7.5)、10mMのTris-塩酸、100mMのNa₂SO₄および1mMのZnCl₂を含む溶液中で十分に透析した。タンパク質量は分光光度計を用いた測定により、また活性はCO₂を基質とするストップフロー測定(参考文献番号44)によって求めた。追加として、スルホンアミドアフィニティークロマトグラフィーによってタンパク質をさらに精製し(参考文献番号44)、酵素量は分光光度計を用いた測定により、活性はCO₂を基質とするストップフロー測定(参考文献番号44)によって求めた(参考文献番号44)。

【0126】

CA-I、IIおよびIVの精製

リンズコック(Lindskog)らの研究グループによって記載されているプラスミドpACA/hCA-IおよびpACA/hCA-IIを用い(参考文献番号54)、大腸菌(*Escherichia coli*)株BL21(DE3)内でヒトCA-IおよびCA-IIのcDNAを発現させた。細胞増殖の条件については参考文献番号12に記載されており、酵素は、カリファー(Khalifah)らの方法(参考文献番号45)に従ってアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。酵素濃度は280nmにおいて分光光度測定することによって求めたが、このとき、モル吸光度は、CA-Iに対しては49mM⁻¹・cm⁻¹、CA-IIに対しては54mM⁻¹・cm⁻¹であり、また、CA-Iに対してはMr=28.85kDaであり、CA-IIに対してはMr=29.3kDaであった(参考文献番号53、84)。CA-IVは、マレン(Maren)らの記載に従い、ウシ肺マイクロソームから単離し、エトクスゾラミドを用いた滴定によって濃度を求めた(参考文献番号59)。

【0127】

酵素アッセイ

CAの炭酸ヒドラーゼ活性のアッセイ

SX.18MV-R Applied Photophysicsストップフロー装置を用いてCAの炭酸ヒドラーゼ活性を調べた(参考文献番号44)。ポーカー(Poker)およびストーン(Stone)の分光光度法(参考文献番号76)のストップフロー変数を採用し、上述したSX.18MV-R Applied Photop

ysicsストップフロー装置を使用した（参考文献番号43）。指示薬としてフェノールレッド（濃度0.2mM）を使用し、吸収極大を557nmに設定し、緩衝液として10mMのHEPES（pH7.5）、0.1Mの Na_2SO_4 （イオン強度を一定に保つため）を用い、10～100秒間の間、CAを触媒とする二酸化炭素の水和反応の経過を記録した。基質として、20 において CO_2 を飽和させた水溶液を使用した（参考文献番号44）。阻害剤のストック溶液（1mM）は、10～20%（v/v）のDMSO（この程度の濃度では阻害作用はない）を加えた蒸留脱イオン水で調製し、その後、蒸留脱イオン水を用いて0.01Mに希釈した。阻害剤と酵素溶液の混合物は、アッセイ前に室温で10分間プレインキュベートすることによってE-Iコンプレックスを形成させた。各阻害剤濃度において3回実験を行い、文献に報告している値は、それらの結果の平均値である。

10

【0128】

CAのエステラーゼ活性のアッセイ

別異のCAアイソザイムによって触媒される4-ニトロフェニルアセタートの加水分解の初期速度は、IBMコンパチブルPCを配備したCary3装置を使用し、400nmにおいて分光光度計を用いてモニターした（参考文献番号76）。基質溶液は、無水アセトニトリルで調製し、基質濃度は $2 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-6} \text{M}$ とし、25 で行った。文献（参考文献番号76）に報告されているように、実験条件（pH7.40）下においては、加水分解によって生成した4-ニトロフェノートのモル吸光係数 としては $18,400 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ を用いた。観察された速度から非酵素性加水分解速度を常に差し引いた。阻害剤の各濃度について3回実験を行い、文献に報告した値は各結果の平均値である。阻害剤のストック溶液（1～3mM）は、10～20%（v/v）のDMSO（この程度の濃度では阻害作用はない）を加えた蒸留脱イオン水で調製し、その後、蒸留脱イオン水を用いて0.01Mに希釈した。阻害剤と酵素溶液の混合物は、アッセイ前に室温で10分間プレインキュベートすることによってE-Iコンプレックスを形成させた。阻害定数 K_i は、参考文献番号44、76の記載に従って求めた。

20

【0129】

膜透過性アッセイ：イクス・ビボ（ex vivo）における赤血球細胞の透過

Tris緩衝液（pH7.40、5mM）を用い、用時単離したヒト赤血球細胞（10ml）を数回十分に洗浄し、10分間遠心分離した後、2mMのスルホンアミド阻害剤25mlを加えて処理した。インキュベーションは、37 において穏やかに攪拌しながら30～120分間行った。30、60または120分間インキュベーションを行った後、赤血球を再度10分間遠心分離し、上清を傾捨し、上記緩衝液10mlを用いて細胞を3回洗浄することにより、結合していない阻害剤を除去した（参考文献番号81、96、98）。次に、25mlの蒸留水中で細胞を溶解させ、遠心分離して膜およびその他の不溶性不純物を除去した。得られた溶液を100 で5分間加熱し（CAを変性させるため）、3種類の方法により、各サンプル中に存在していると考えられるスルホンアミド類をアッセイした：HPLC法（参考文献番号36）；分光光度法（参考文献番号4）；酵素法（参考文献番号76）。

30

【0130】

HPLC：発明者らは、ゴマ（Gomma）の方法（参考文献番号36）の変法を開発したが、それは次のようなものであった：分離には市販の5 μm のBondapak C-18カラムを使用し、移動相はアセトニトリル-メタノール-リン酸緩衝液（pH7.4）=10：2：88（v/v/v）を流速3ml/分で流し、内部標準として0.3mg/mlのスルファジアジン（シグマ（Sigma）社）を用いた。保持時間は、アセタゾラミド=12.69分、スルファジアジン=4.55分、ベンゾールアミド=10.54分、アミノベンゾールアミド=12.32分、71=3.15分、76=4.41分、89=3.54分および91=4.24分。溶出液については、吸光度（アセタゾラミドに対しては254nm、その他のスルホンアミド類の場合には270～310nmの範囲）を連続的にモニターした。

40

【0131】

分光光度：アブディン（Abdine）らのpH誘導性分光光度アッセイの変法（参考文献番号4）を使用し、例えば、アセタゾラミドに対しては260および292nm、スルファニルアミドに対しては225および265nmなどにおいて測定を行った。各阻害剤の標準液は、膜透過実験

50

において使用した緩衝液と同じ液を用いて調製した。

【0132】

酵素法：上述したように（参考文献番号76）、溶解物中に存在するスルホンアミドの量は、エステラーゼ法を用いて測定したhCA-II阻害に基づいて評価した。各スルホンアミドに対して、純粋なスルホンアミド化合物を用いて事前に標準阻害曲線を作成し、これを用いて溶解物中に存在する阻害剤の量を求めた。上記3つの方法によって得られた結果は、実験誤差の許容範囲内で良く一致したことを特記しておく。

【0133】

統計分析：値は、±測定の標準偏差で表した。統計的有意差は、 $p < 0.05$ を有意差ありとする非対t検定によって判断した。

10

【0134】

以下の実施例は例示のためのものであり、如何なる意味においても本発明を制限するためのものではない。

【実施例】

【0135】

実施例1：芳香環式および複素環式スルホンアミド類を用いた腫瘍関連アイソザイムIXの阻害

腫瘍関連膜貫通炭酸脱水酵素IX（CA-IX）を阻害することに関しては、臨床的に使用されている6種類の化合物を含む一連の芳香環式および複素環式スルホンアミド類を用いて研究されてきた。臨床的に使用されている化合物としては、アセタゾラミド、メタゾラミド、エトクスゾラミド、ジクロロフェナミド、ドルゾラミドおよびプリンゾラミドが挙げられる。比較のために、生理学的に関連のあるアイソザイムIおよびII（サイトゾル型）ならびにIV（膜結合型）に対する阻害データも提供されている。

20

【0136】

化学：腫瘍関連アイソザイムCA-IXに対する阻害作用を研究した1～26の型のスルホンアミド類については図4A～Bに示す。化合物1～6、11～12、20および26は市販されているが、7～10（参考文献番号43）、13～19（参考文献番号24、79、90、97）および21～25（参考文献番号79）は報告に従って調製した。臨床的に使用されている6種類の化合物についてもアッセイを行ったが、そのようなデータに関しては文献に記載されてはいなかった。

30

【0137】

CA阻害データ：上述の化合物1～26および臨床的に使用されている6種類の化合物を用いて得られた4種類のCAアイソザイム、すなわち、CA-I、II、IVおよびIXに対する阻害データ（参考文献番号44、72、116）を表1に示す。

【表 1】

表1: スルホンアミド類1~26および臨床的に使用されている阻害剤を用いて行った
CA-I, II, IVおよびIXに対する阻害データ

阻害剤	K _i * (nM)			
	hAC I ^a	hCA II ^a	bCA IV ^b	hCA IX ^c
1	45400	295	1310	33
2	25000	240	2200	238
3	28000	300	3000	294
4	78500	320	3215	305
5	25000	170	2800	103
6	21000	160	2450	33
7	8300	60	180	245
8	9800	110	320	264
9	6500	40	66	269
10	6000	70	125	285
11	5800	63	154	24
12	8400	75	160	39
13	8600	60	540	41
14	9300	19	355	30
15	6	2	5	38
16	164	46	129	34
17	185	50	144	20
18	109	33	72	31
19	95	30	72	24
20	690	12	154	16
21	55	8	17	14
22	21000	125	415	32
23	23000	133	438	30
24	24000	125	560	21
25	18000	110	450	22
26	135	40	86	26
AAZ	250	12	70	25
MZA	50	14	36	27
EZA	25	8	13	34
DCP	1200	38	380	50
DZA	50000	9	43	52
BRZ	-	3	45	37

a: ヒトクロニンギアイソザイム、エステラーゼアッセイ法(参考文献番号76)

b: ウシ肺マイクロソームから単離、エステラーゼアッセイ法(参考文献番号76)

c: ヒトクロニンギアイソザイム、CO₂ヒドラーゼアッセイ法(参考文献番号44、72、116)

本報告は、臨床的に使用されている6種類の化合物(アセタゾラミド、メタゾラミド、エトクスゾラミド、ジクロロフェナミド、ドルゾラミドおよびプリンゾラミド)を含む一連の芳香環式および複素環式スルホンアミド類を用いて行った腫瘍関連膜貫通アイソザイムCA-IXに対する初めての阻害実験の結果である。比較のために、生理学的に関連のあるアイソザイムIおよびII(サイトゾル型)ならびにIV(膜結合型)に対する阻害データも提供する。これらのスルホンアミド類に関しては、CA-IXに対する非常に興味深い阻害プロファイルが観察され、このことは、抗腫瘍剤として使用できるCA-IX特異的阻害剤の有効な設計に対する創見を約束するものである。nMレベルでCA-IXを阻害する化合物がいくつか検出されているが、それらには、芳香環式のスルホンアミド類(例えば、オルタニルアミド、ホモスルファニルアミド、4-カルボキシ-ベンゼンスルホンアミド、1-ナフタレン-スルホンアミドおよび1,3-ベンゼンジスルホンアミドの誘導体類など)も複素環式スルホンアミド類(例えば、1,3,4-チアジアゾール-2-スルホンアミド、ベンゾチアジアゾール-2-スルホンアミドなど)も含まれている。

10

20

30

40

【0139】

実施例2：腫瘍関連アイソザイムIXを標的とする初めての選択的かつ膜不透過性阻害剤

これまで、このような型の膜不透過性のCAIを用いたCA-IX阻害実験は報告されていない。従って、発明者らは、一般式(A)で表されるピリジニウム誘導体類のうちのいくつかについて、発明者らが最近クローニング、精製した腫瘍関連アイソザイムIX(参考文献番号33、43、114、115、117)の触媒性ドメインとの相互作用、ならびに、サイトゾル性で生理学的に関連のあるアイソザイムCA-I、II、および膜結合性アイソザイムCA-IVとの相互作用(参考文献番号88、96)について調査することにした。

【0140】

腫瘍関連膜貫通炭酸脱水酵素IX(CA-IX)アイソザイムに対する阻害については、スルファニルアミド、ホモスルファニルアミドおよび4-アミノエチル-ベンゼンスルホンアミドのピリジニウム誘導体類であって正の電荷を帯びた一連の化合物を用いて実験を行った。比較のために、生理学的に関連のあるアイソザイムIおよびII(サイトゾル型)ならびにIV(膜結合型)に対する阻害データも得た。阻害剤が膜不透過性であり、臨床的に関連のあるアイソザイムIXに対する親和性が高いことから、本報告はCA-IXを選択的に標的とする阻害剤に関する初めての報告である。

【0141】

CA阻害

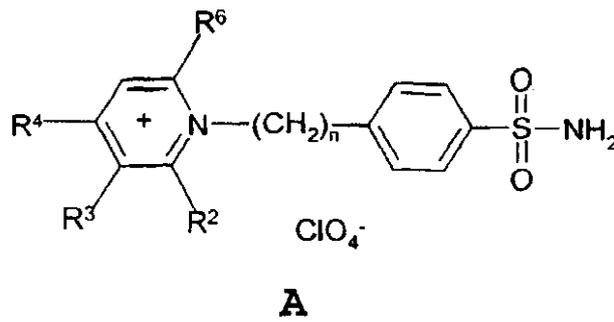
表2のデータは、化合物27~70の大多数が有効なCA-IX阻害剤として作用することをはっきりと示しており、このアイソザイムに対する化合物の親和性は、サイトゾル性アイソザイムCA-IおよびII、ならびに膜関連アイソザイムCA-IVに対する親和性と比較するとかなり異なっていた。

【0142】

スルファニルアミド類、ホモスルファニルアミド類およびp-アミノエチルベンゼンスルホンアミド類の一連のピリジニウム置換誘導体類においては、多数の有効なhCA-IX阻害剤が検出された。低nMレベルでCA-IXを阻害する阻害剤のうちのいくつかは初めて報告されたものである。これらの化合物は、その塩様の性質から、膜不透過性であり、また、hCA-IXは、臨床予後の良くない多くの腫瘍の細胞の外側に存在していることから、この型の化合物は、生理学的に重要な役割を果たすことが知られているサイトゾル性CAに影響を与えることなく、腫瘍関連CAアイソザイムを特異的に標的にする。従って、この型の化合物は、CA阻害に基づく新規な抗癌治療の基礎を築くものと考えられる。

【表 2 - 1】

表2：ピリジニウム塩27～70を用いて行ったアイソザイムhCA-I、hCA-II、bCA-IVおよびhCA-IXの阻害



化合物	R ²	R ³	R ⁴	R ⁶	K _i [*]			
					hCA I ^a (μM)	hCA II ^a (nM)	bCA IV ^b (nM)	hCA IX ^c (nM)
27	Me	H	Me	Me	10	150	290	165
28	Me	H	Ph	Me	7	60	211	48
29	Et	H	Ph	Et	6	60	182	43
30	<i>n</i> -Pr	H	Ph	<i>n</i> -Pr	10	120	194	178
31	<i>i</i> -Pr	H	Ph	<i>i</i> -Pr	5	50	90	160
32	Me	H	Ph	Ph	40	210	852	280
33	Et	H	Ph	Ph	43	400	1300	450
34	<i>n</i> -Pr	H	Ph	Ph	140	580	1483	>500
35	<i>i</i> -Pr	H	Ph	Ph	125	440	2102	>500
36	<i>n</i> -Bu	H	Ph	Ph	305	620	2155	>500
37	Ph	H	Ph	Ph	290	510	2500	>500
38	Me	Me	Me	Me	5	40	61	72
39	Me	H	Me	Me	7	50	92	38
40	<i>i</i> -Pr	H	Me	Me	6	50	80	42
41	<i>i</i> -Pr	H	Me	<i>i</i> -Pr	11	80	144	54
42	Me	H	Ph	Me	4	20	70	26
43	Et	H	Ph	Et	2	21	52	29
44	<i>n</i> -Pr	H	Ph	<i>n</i> -Pr	24	90	163	230
45	<i>i</i> -Pr	H	Ph	<i>i</i> -Pr	12	61	101	100
46	Me	H	Ph	Ph	32	121	161	64
47	Et	H	Ph	Ph	42	314	983	79

10

20

30

40

【表 2 - 2】

(表2、続き)

48	<i>n</i> -Pr	H	Ph	Ph	130	390	1260	85	
49	<i>i</i> -Pr	H	Ph	Ph	112	370	1214	80	
50	<i>n</i> -Bu	H	Ph	Ph	300	595	2104	135	
51	<i>t</i> -Bu	H	Ph	Ph	110	321	1070	>500	
52	Ph	H	Ph	Ph	280	472	1956	120	
53	Ph	H	H	Ph	280	493	1954	106	10
54	Me	Me	Me	Me	3	30	51	35	
55	Me	H	Me	Me	4	21	60	14	
56	<i>i</i> -Pr	H	Me	Me	2	15	32	31	
57	<i>i</i> -Pr	H	Me	<i>i</i> -Pr	3	20	70	49	
58	Me	H	Ph	Me	1	8	20	6	
59	Et	H	Ph	Et	1	9	21	8	
60	<i>n</i> -Pr	H	Ph	<i>n</i> -Pr	7	42	82	205	20
61	<i>i</i> -Pr	H	Ph	<i>i</i> -Pr	6	21	70	89	
62	Me	H	Ph	Ph	18	103	144	37	
63	Et	H	Ph	Ph	40	220	761	70	
64	<i>n</i> -Pr	H	Ph	Ph	112	270	1055	84	
65	<i>i</i> -Pr	H	Ph	Ph	94	350	864	78	
66	<i>n</i> -Bu	H	Ph	Ph	290	544	2008	120	
67	<i>t</i> -Bu	H	Ph	Ph	92	275	1000	>500	
68	Ph	H	Ph	Ph	270	419	1830	95	30
69	Ph	H	H	Ph	265	420	1905	81	
70	Me	Me	Me	Me	2	10	21	8	
アセタゾラミド					0.25	12	70	25	
メタゾラミド					0.05	14	36	27	
ジクロロイミド					1.2	38	380	50	
インジスラン					0.03	15	65	24	

40

a : ヒト(クローニング)アイソザイム、b : ウシ肺マイクロソーム由来、c : ヒトの触媒性ドメイン、クローニングアイソザイム

* : 3種類の別異の方法によって求めた値と文献値との誤差範囲は±10%

化合物27~38においてはn=0 ; 39~54においてはn=1、55~70においてはn=2

実施例 3 : ヒト腫瘍関連アイソザイム IX を標的とする選択的、膜不透過性の複素環式スルホンアミド阻害剤の設計

アミノベンゾールアミド (5 - (4 - アミノベンゼンスルホニルアミノ) - 1 , 3 , 4 - チアジアゾール - 2 - スルホンアミド) と、ピリジニウム環にアルキル - 、アリール -

50

またはアルキルおよびアリール基の組み合わせを有するトリ - / テトラ - 置換ピリリウム塩とを反応させることによって、正の電荷を帯びた一連のスルホンアミド類が得られた。これらの新規化合物は、塩様の性質を有することから膜不透過性であり、生理学的に関連のある4種の炭酸脱水酵素(CA、EC 4.2.1.1)アイソザイム類、すなわち、サイトゾル性のhCA-IおよびII、膜結合性のbCA-IVならびに膜結合性腫瘍関連アイソザイムhCA-IXに対する阻害作用をアッセイした。これら新規誘導体は、腫瘍関連アイソザイムCA-IXに対する親和性が高く、膜不透過性であることから、腫瘍関連アイソザイムのみを選択的に阻害し、サイトゾル性のアイソザイムは阻害しないような(新規誘導体はサイトゾル性アイソザイムに対しても高い阻害作用を有しているが)興味深いCA阻害剤候補となり得る。

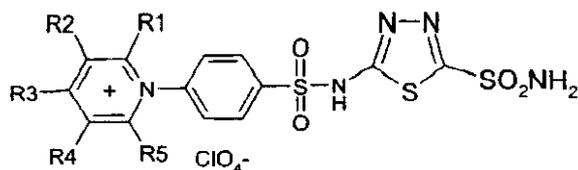
【0143】

結果

CA阻害：化合物71~91を用いたアイソザイムI、II、IVおよびIXに対する阻害データを表3に示す。

【表 3 - 1】

表3：ピリジニウム塩71～91を用いて行ったアイソザイムhCA-I、hCA-II、bCA-IVおよびhCA-IXの阻害

**B**

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	K _i [*] (nM)			
						hCA I ^a	hCA II ^a	bCA IV ^b	hCA IX ^c
71	Me	H	Me	H	Me	4	0.26	2.1	3
72	<i>i</i> -Pr	H	Me	H	Me	4	0.39	3.0	5
73	<i>i</i> -Pr	H	Me	H	<i>i</i> -Pr	7	1.54	4.7	16
74	<i>t</i> -Bu	H	Me	H	<i>t</i> -Bu	11	3.13	9.4	34
75	Me	H	Ph	H	Me	3	0.20	2.0	6
76	Et	H	Ph	H	Et	4	0.21	2.3	9
77	<i>n</i> -Pr	H	Ph	H	<i>n</i> -Pr	9	3.45	8.1	35
78	<i>n</i> -Bu	H	Ph	H	<i>n</i> -Bu	10	4.62	10.3	40
79	<i>i</i> -Pr	H	Ph	H	<i>i</i> -Pr	5	1.61	4.1	30
80	Me	H	Ph	H	Ph	4	1.21	3.0	24
81	Et	H	Ph	H	Ph	5	1.14	3.8	29
82	<i>n</i> -Pr	H	Ph	H	Ph	8	3.90	6.0	40
83	<i>i</i> -Pr	H	Ph	H	Ph	6	3.74	4.5	32
84	<i>n</i> -Bu	H	Ph	H	Ph	8	4.95	8.4	45
85	<i>t</i> -Bu	H	Ph	H	Ph	12	4.11	7.0	43
86	Ph	H	Me	H	Ph	6	4.78	5.8	12
87	Ph	H	Ph	H	Ph	5	5.96	5.6	12
88	Ph	H	H	H	Ph	5	4.93	5.4	16
89	Me	Me	Me	H	Me	3	0.30	2.4	5
90	Me	Me	Ph	H	Me	3	1.24	5.2	15
91	Me	R ³ ,R ⁵ =(CH ₂) ₉ ;			Me	3	1.37	4.6	12
		R ⁴ =Me							

10

20

30

40

【表 3 - 2】

(表3、続き)

アミハ ^o ソ ^o ールアミド ^o	6	2.04	5.1	38
アセタゾラミド	250	12	70	25
メタゾラミド	50	14	36	27
ジクロロフェニド	1200	38	380	50
インジスラン	30	15	65	24

10

a: ヒト(クローニング)アイソザイム、エステラーゼアッセイ法(参考文献番号76)

b: ウシ肺ミクロソーム由来、エステラーゼアッセイ法(参考文献番号76)

c: ヒトの触媒性ドメイン、クローニングアイソザイム、CO₂ヒドラーゼアッセイ法
(参考文献番号44)

*: 3種類の別異の方法によって求めた値と文献値との誤差範囲は±10%

20

イクス・ビボ (ex vivo) における赤血球の透過：ヒト赤血球にミリモル濃度の阻害剤溶液を加えて30～60分間インキュベートした後の赤血球中のスルホンアミド類の濃度を表4に示す(そのような実験においては、古典的なスルホンアミド類および正の電荷を帯びたスルホンアミド類を使用した)(参考文献番号4、12、36、45、53、54、58、59、84、116、118)。

【表4】

表4： スルホンアミド溶液(5 mMのTris緩衝液(pH7.4)中に2 mMのスルホンアミドが存在)に10mlの血液を接触させて30分および60分経過した後の赤血球細胞中のスルホンアミドCA阻害剤のレベル(μM)。スルホンアミドの濃度は3種類の方法で測定した：HPLC、分光分析(ES)および酵素法(EI)－詳細については実験の項を参照

阻害剤	[スルホンアミド], μM^*					
	HPLC ^a	t = 30分 ES ^b	EI ^c	HPLC ^a	t = 60分 ES ^b	EI ^c
AAZ	136	139	140	160	167	163
MZA	170	169	165	168	168	167
ペンゾールアミド	110	108	112	148	146	149
アミノペンゾールアミド	125	127	122	154	156	158
71	0.3	0.5	0.5	0.4	0.5	0.3
76	1.0	1.1	1.0	1.1	1.2	1.1
89	0.3	0.2	0.5	0.3	0.6	0.4
91	0.4	0.3	0.5	0.3	0.6	0.5

*3回の測定から求められた標準偏差は<5%：aはHPLC法(参考文献番号36)、
bは分光分析法(参考文献番号4)、cは酵素法(参考文献番号76)

【0144】

本実験で報告している新規化合物については、標準的な化学的および物理学的方法によって特性付けを行い(元素分析(理論値との誤差は $\pm 0.4\%$ 以内)、IRおよびNMR)、それによって構造を確定し(詳細については、材料および方法の項、ならびに以下の表5を参照)、アイソザイムhCA-I、hCA-II、bCA-IVおよびhCA-IXに対する阻害を調べた。

10

20

30

【表5】

表5：実施例3に記載されている化合物に関する元素分析データ

番号	化学式	元素分析データ(計算値/測定値)		
		% C	% H	% N
71	$C_{16}H_{18}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	35.59/35.32	3.36/3.62	12.97/12.93
72	$C_{18}H_{22}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	38.06/37.95	3.90/4.16	12.33/12.18
73	$C_{20}H_{26}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	40.30/39.99	4.40/4.54	11.75/11.63
74	$C_{22}H_{30}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	42.34/42.56	4.84/4.76	11.22/11.03
75	$C_{21}H_{20}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	41.89/42.02	3.35/3.03	11.63/11.48
76	$C_{23}H_{24}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	43.84/43.88	3.84/3.62	11.11/10.95
77	$C_{25}H_{28}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	45.62/45.60	4.29/4.36	10.64/10.50
78	$C_{27}H_{32}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	47.26/47.45	4.70/4.89	10.21/10.14
79	$C_{25}H_{28}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	45.62/45.49	4.29/4.18	10.64/10.61
80	$C_{26}H_{22}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	47.02/46.79	3.34/3.33	10.55/10.23
81	$C_{27}H_{24}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	47.82/47.73	3.57/3.73	10.33/10.40
82	$C_{28}H_{26}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	48.59/48.83	3.79/3.91	10.12/10.24
83	$C_{28}H_{26}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	48.59/48.27	3.79/3.82	10.12/10.05
84	$C_{29}H_{28}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	49.32/49.59	4.00/4.23	9.92/9.67
85	$C_{29}H_{28}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	49.32/49.16	4.00/3.94	9.92/9.71
86	$C_{26}H_{22}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	47.02/47.25	3.34/3.18	10.55/10.46
87	$C_{31}H_{24}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	51.27/51.50	3.33/3.60	9.64/9.67
88	$C_{25}H_{20}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	46.19/46.28	3.10/2.95	10.77/10.67
89	$C_{17}H_{20}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	36.86/36.72	3.64/3.53	12.64/12.45
90	$C_{22}H_{22}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	42.89/42.70	3.60/3.84	11.37/11.15
91	$C_{24}H_{32}N_5O_4S_3^+ ClO_4^-$	44.34/44.57	4.96/4.99	10.77/10.51

10

20

30

【0145】

結論

発明者らは、正の電荷を帯び、膜不透過性のスルホンアミドCA阻害剤であって、サイトゾル性アイソザイムCA-IおよびCA-II、ならびに膜結合性のCA-IVおよびCA-IXに対する親和性が高い化合物の調製に関する一般的方法を報告している。そのような化合物は、アミノベンゾールアミド（それ自身が非常に強力なCA阻害剤である）に置換ピリジニウム部位を結合させることによって得た。イクス・ビボ（ex vivo）実験から、本明細書に報告している新規分類の阻害剤は、膜結合性アイソザイムとサイトゾル性アイソザイムとを識別することが示された。これらの化合物のうちのいくつかは、腫瘍関連アイソザイムCA-IXに対して低nMレベルの親和性を有することと相関して、本報告は、イン・ビボ（in vivo）において腫瘍関連CA-IXのみを標的とし、一方、サイトゾル性アイソザイムには影響を与えないという選択的阻害の基礎を呈示している。

40

【0146】

50

化合物71~91の特性付け(調製に関しては、材料および方法の項を参照)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,4,6-トリメチル-ピリジニウムパークロラート71:白色結晶、融点>300;IR(KBr法)、 cm^{-1} :(斜体文字で示したバンドは陰イオン由来):595,625,664,787,803,884,915,1100,1150,1190,1200,1285,1360,1495,1604,3065; $^1\text{H-NMR}$ (D_2O)、ppm:3.08(s,6H,2,6-Me₂);3.11(s,3H,4-Me),7.30-8.06(m,AA'BB',4H,フェニレン由来のArH);9.05(s,2H,ArH,ピリジニウム由来の3,5-H);この溶媒中では、溶媒とのプロトン交換が非常に迅速なため、スルホンアミドプロトンは観察されなかった。元素分析 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2-イソプロピル-4,6-ジメチルピリジニウムパークロラート72:無色結晶、融点290~1;IR(KBr法)、 cm^{-1} :625,680,720,1100,1165,1330,1640,3020,3235; $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm:1.50(d,6H,イソプロピル由来の2Me);2.80(s,3H,6-Me);2.90(s,3H,4-Me);3.49(ヘブテット、1H,イソプロピル由来のCH);7.25-8.43(m,AA'BB',4H,1,4-フェニレン由来のArH);7.98(s,2H,ArH,ピリジニウム由来の3,5-H)。元素分析 $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,6-ジイソプロピル-4-メチルピリジニウムパークロラート73:黄褐色結晶、融点278~9;IR(KBr法)、 cm^{-1} :625,685,820,1100,1165,1340,1635,3030,3250; $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm:1.51(d,12H,2-イソプロピル由来の4Me);2.83(s,3H,4-Me);3.42(ヘブテット、2H,2-イソプロピル由来の2CH);7.31-8.51(m,AA'BB',4H,1,4-フェニレン由来のArH);8.05(s,2H,ArH,ピリジニウム由来の3,5-H)。元素分析 $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,6-ジメチル-4-フェニルピリジニウムパークロラート75:白色結晶、融点>300;IR(KBr法)、 cm^{-1} :625,690,770,1100,1170,1330,1635,3030,3260,3330; $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm:2.62(s,6H,2,6-Me₂);8.10-9.12(m,11H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4-Ph由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,6-ジエチル-4-フェニルピリジニウムパークロラート76:黄褐色結晶、融点267~8;IR(KBr法)、 cm^{-1} :625,695,765,1100,1180,1340,1630,3040,3270,3360; $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm:1.43(t,6H,エチル由来の2Me);2.82(q,4H,Et由来の2CH₂);7.68-8.87(m,11H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4-Ph由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,6-ジ-n-プロピル-4-フェニルピリジニウムパークロラート77:無色結晶、融点235~7;IR(KBr法)、 cm^{-1} :625,695,770,1100,1180,1340,1630,3050,3220,3315; $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm:1.06(t,6H,プロピル由来の2Me);1.73(ゼクステット、4H,n-プロピル由来の2CH₂());2.84(t,4H,n-プロピル由来の2CH₂());7.55-8.71(m,11H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4-Ph由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,6-ジイソプロピル-4-フェニルピリジニウムパークロラート79:白色結晶、融点278~9;IR(KBr法)、 cm^{-1} :625,690,765,1100,1180,1340,1625,3040,3270,3315; $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm:1.45(d,12H,イソプロピル由来の4Me);2.95(ヘブテット、2H,イソプロピル由来の2CH);7.92-8.97(m,11H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4-Ph由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2-メチル-4,6-ジフェニルピリジニウムパークロラ

10

20

30

40

50

ート80：白色結晶、融点298~99；IR (KBr法)、 cm^{-1} ：625,710,770,1100,1170,1345,1625,3040,3245,3350； $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm：2.75(s,3H,2-Me)；7.53-8.70(m,16H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4,6- Ph_2 由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2-エチル-4,6-ジフェニルピリジニウムパークロラート81：白色結晶、融点245~5；IR (KBr法)、 cm^{-1} ：625,700,770,1100,1180,1340,1620,3040,3250,3350； $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm：1.52(t,3H,エチル由来のMe)；2.97(q,2H, C_2H_5)；7.40-8.57(m,16H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4,6- Ph_2 由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

10

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2-n-プロピル-4,6-ジフェニルピリジニウムパークロラート82：白色結晶、融点214~5；IR (KBr法)、 cm^{-1} ：625,700,770,1100,1180,1340,1620,3030,3270,3350； $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm：1.03(t,3H,プロピル由来のMe)；1.95(ゼクステッド,2H,n-プロピル由来の- CH_2)；2.88(t,2H,n-プロピル由来の- CH_2)；7.39-8.55(m,16H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4,6- Ph_2 由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2-イソプロピル-4,6-ジフェニルピリジニウムパークロラート83：白色結晶、融点186~8；IR (KBr法)、 cm^{-1} ：625,700,770,1100,1170,1340,1620,3040,3250,3360； $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm：1.51(d,6H,イソプロピル由来の2Me)；2.50-3.27(m,1H,イソプロピル由来のCH)；7.32-8.54(m,16H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4,6- Ph_2 由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

20

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2-n-ブチル-4,6-ジフェニルピリジニウムパークロラート84：白色結晶、融点241~3；IR (KBr法)、 cm^{-1} ：625,710,770,1100,1180,1335,1625,3040,3260,3345； $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm：0.93(t,3H,ブチル由来のMe)；1.12-2.14(m,4H,n-ブチル由来の $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$)；2.96(t,3H,n-ブチル由来の- CH_2)；7.21-8.50(m,16H,1,4-フェニレン、ピリジニウムおよび4,6- Ph_2 由来のArH)。元素分析 $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

30

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2-tert-ブチル-4,6-ジフェニルピリジニウムパークロラート85：白色結晶、融点203~5；IR (KBr法)、 cm^{-1} ：625,705,765,1100,1160,1310,1620,3060,3250,3270； $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm：1.91(s,9H,t-Bu)；6.80-8.74(m,16H,1,4-フェニレンおよび4,6- Ph_2 由来のArH、ならびにピリジニウム由来の3,5-H)。元素分析 $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,4,6-トリフェニルピリジニウムパークロラート87：淡黄色結晶、融点>300；IR (KBr法)、 cm^{-1} (斜体文字で示したバンドは陰イオン由来)：625,635,703,785,896,1100,1150,1204,1355,1410,1520,1600,3065； $^1\text{H-NMR}$ (D_2O)、ppm：7.50-8.60(m,19H,1ArH,3Ph+ C_6H_4)；9.27(s,2H,ArH,ピリジニウム由来の3,5-H)；この溶媒中では、溶媒とのプロトン交換が非常に迅速なため、スルホンアミドプロトンは観察されなかった。元素分 $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

40

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,6-ジフェニルピリジニウムパークロラート88：黄色結晶、融点218~20；IR (KBr法)、 cm^{-1} ：625,705,765,1100,1160,1335,1615,3050,3260； $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、ppm：6.75-8.43(m,17H,1,4-フェニレン、2,6- Ph_2 由来のArHならびにピリジニウム由来の3,4,5-H)。元素分析 $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C,H,N)

1-N-[5-スルファモイル-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-(アミノスルホニル-4-フェニル)]-2,3,4,6-テトラメチルピリジニウムパークロラート

50

89：黄褐色結晶、融点 > 300 ; IR (KBr法)、 cm^{-1} : 625, 800, 1100, 1165, 1330, 1630, 3030, 3305 ; $^1\text{H-NMR}$ (TFA)、 δ 、ppm : 2.62(s, 3H, 4-Me); 2.74(s, 3H, 3-Me); 2.88(s, 6H, 2, 6-(Me)₂); 7.21-8.50(m, AA'BB', 4H, 1, 4 - フェニレン由来のArH); 7.93(s, 1H, ArH, ピリジニウム由来の5-H)。元素分析 $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3^+\text{ClO}_4^-$ (C, H, N)

以下に示す本発明の実施態様は例示および説明を目的とするものである。これらは本発明を網羅するためのものでも範囲を制限するためのものでもなく、上述の狭義に基づいて多様な変形および変更が可能なのは明らかである。実施態様は、本発明の原理を説明することを目的として選択、記述したものであり、本発明の実用化については、当業者であれば、特定の使用目的に添うように多様な実施態様および多様な変形を活用することによって可能である。

10

【0147】

本明細書中に引用した全ての参考文献を参照として本明細書中に取り入れておく。

【図面の簡単な説明】**【0148】**

【図1】 図1 A ~ C は、MN/CA-IXの全長のcDNA (配列番号1) を表す。また、該cDNAによってコードされている推定アミノ酸配列 (配列番号2) も示す。

【図2】 図2 A ~ F は、10,898bpからなるMN/CA-9の完全ゲノム配列 (配列番号3) を示す。塩基数は次の通りである：Aは2654個、Cは2739個、Gは2645個、Tは、2859個。11個のエクソンを大文字で示しているが、エクソン1は、RNase保護アッセイにより、アミノ酸番号3507から始まっていると考えられる。

20

【図3】 ヒトMN/CA9遺伝子のエクソン-イントロン地図を示す。エクソン (番号を付け、斜線を付けた枠)、Alu繰り返しエレメント (中空枠囲み)、およびLTR-関連配列 (番号を付けていない一番最初の位置にある斑点を付けた囲み) の位置ならびに大きさは、表示のスケールに合わせている。個々のMN/CA-IXタンパク質ドメインに対応するエクソンは、PG (プロテオグリカン様ドメイン)、CA (炭酸脱水酵素ドメイン)、TM (膜貫通アンカー) およびIC (細胞質内尾部) と名前を付けている破線枠内に存在している。地図の下部のアミノ酸配列並びは、MN/CAタンパク質のPG領域 (アミノ酸番号53~111) (配列番号4) とヒトアグリカン (アミノ酸番号781~839) (配列番号5) との間の相同性を示す。

【図4】 図4 A ~ B は、実施例1において試験した26個の別異のスルホンアミド化合物の化学式を示す。

30

【図5】 実施例3の化合物71~91の一般的な合成経路を示す (スキーム1)。

【図6】 実施例3に記載しているピリリウム塩とアミンとの反応の経路を示す (スキーム2)。

【 図 1 】

1 ACA GTC AGC CGC ATG GCT M A P L C P S P W L P L 12
 13 L I P A P A P G L T V Q L L S 28
 49 TTG ATC CCG GGC CCT GCT CCA GGC CTC ACT GTG CAA CTG CTG CTG TCA 96
 29 L L L L M P V H P Q R L P R M Q 44
 97 CTG CTG CTT CTG ATG COT GTC CAT CCC CAG AGG TTG CCC CGG ATG CAG 144
 45 E D S P L G G S S G E D D P L 60
 145 GAG GAT TCC CCC TTG GGA GGA GGC TCT TCT GGG GAA GAT GAC CCA CTG 192
 61 G E E L P S E E D S P R E E D 76
 193 GGC GAG GAG GAT CTG CCC AGT GAA GAT TCA CCC AGA GAG GAG GAT 240
 77 P F G E E D L P G E E D L P G E 92
 241 CCA CCC GGA GAG GAG GAT CTA CCT GGA GAG GAG GAT CTA CCT GGA GAG 288
 93 E D L P E V K P K S E E E G S L 108
 289 GAG GAT CTA CCT GAA GTT ANG CCT AAA TCA GAA GAA GAG GGC TCC CTG 336
 109 K L E D L P T V E A P G D P Q E 124
 337 AAG TTA GAG GAT CTA CCT ACT GTT GAG GCT CCT GGA GAT CCT CAA GAA 384
 125 E Q N N A H R D K E G D D Q S H 140
 385 CCC CAG AAT AAT GCC CAC AGG GAC AHA GAA GGG GAT GAC CAG AGT CAT 432
 141 W R Y G G D P P W R V S P A C 156
 433 TGG CAG TAT GGA GGC GAC CCG CCC TGG CCC CGG GTG TCC CCA GCC TGC 480
 157 A G R F O S P V D I R P Q L A A 172
 481 GCG GGC CGC TTC CAG TCC CCG GTG GAT ATC CGC CCC CAG CTC GCC GCC 528

FIG._1A

1 ggatcctggt gactgtgac ctaccocca accctgtgct ctctgtgaa tgagctgtgt
 61 ccactcaggt taaatggt taaggcggg agtccatcc atccctaat ctcaagtaat caggaccta
 121 aaccctggg aggcctcag agtccatcc atccctaat ctcaagtaat caggaccta
 241 tttctctgg ctccctcca ctatctcga ctccctcca ctccctcca ctccctcca
 301 taaatggt gactgtgac ctaccocca accctgtgct ctctgtgaa tgagctgtgt
 361 aaagaaga gactcaga taattatgt taaatggt gactgtgac ctaccocca
 421 aaatcaga tcaaacca gaggccca atccctgct gactgtgac ctaccocca
 481 ctatcagt taactcttt gattcacta gattcacta gattcacta gattcacta
 541 aagtctaat taactctcca acattcagg gattcacta gattcacta gattcacta
 601 tttctctgg ctccctcca ctatctcga ctccctcca ctccctcca ctccctcca
 661 ttaaaactt gccctagg ctatctcga ctccctcca ctccctcca ctccctcca
 721 taattatgt gactgtgac ctaccocca accctgtgct ctctgtgaa tgagctgtgt
 781 ggttaagg atgcactgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 841 ttgactgg cttatctgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 901 ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt
 961 gtagtagc ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt
 1021 tttctctgg ctccctcca ctatctcga ctccctcca ctccctcca ctccctcca
 1081 ttgtttgt ttgtttgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1141 ctgactgt gactcaga taattatgt taaatggt gactgtgac ctaccocca
 1201 ccgactgt caactttt gactcaga taattatgt taaatggt gactgtgac
 1261 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1321 gtagtagc ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt ttgtttgt
 1381 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1441 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1501 ttgtttgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1561 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1621 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1681 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1741 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1801 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1861 taattatgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt taactcgt
 1921 tttctctgg ctccctcca ctatctcga ctccctcca ctccctcca ctccctcca

FIG._1

FIG._1C

FIG._1A

FIG._1B

FIG._1C

349 V M L S A K Q L H T L S D T L W 364
 1057 GTG ATG CTG AGT AAG CAG CTC CAC ACC CTC TCT GAC ACC ACC CTG TGG 1104
 365 G P G D S R L Q L N F R A T Q P 380
 1105 GGA CCT GGT GAC TCT CCG CTA CAG CTG AAC TTC CGA GCG ACG CAG CCT 1152
 381 L N G R V I E A S F P A G V D S 396
 1153 TTG AAT GGG CGA GTG APT GAG GCC TCC TTC CCT GCT GGA GTG GAC AGC 1200
 397 S P R A A E P V Q L N S C L A A 412
 1201 APT CCT CGG GCT GCT CCA GTC CRG CTG AAT TCC TGC CTG GCT GCT 1248
 413 G D I L A L V F G L L F A V T S 428
 1249 GGT GAC ATC CTA CTG GTT TTT GGC CTC CTT TTT GCT GTC ACC AGC 1296
 429 V A F L V Q M R R Q H R R R G T K 444
 1297 GCG TTT GTG CAG ATG AGA AGG CAG CAC AGA AGG GAC ACC AA 1344
 445 G G V S Y R P A E V A E T G A * 460
 1345 GGG GGT GTG AGC TAC CGC CCA GCA GAG GTA GCC GAG ACT GGA GCC TAG 1392
 1393 AGG CTG GAT CTT GGA GAA TGT GAG AAG CCA GCC AGA GGC ATC TGA GGG 1440
 1441 GGA GCC GGT AAC TGT CCT GTC CTG CTC APT ATG CCA CTT TTT AAC 1488
 1489 TCC CAA GAA APT TTT TAA AAT AAA TAT TTA TAA T 1522

FIG._2A

FIG._1B

173 F C P A L R P L E L L G F O L P 188
 529 TTC TGC CCG GCC CTG CGC CCC CTG GAA CTC CTG GGC TTC CAG CTC CCG 576
 189 P L P E L R L R N N G H S V O L 204
 577 CCG CTC CCA GAA CTG CGC CTG CGC AAC AAT GGC CAC AGT GTG CAA CTG 624
 205 T L P P G L E M A L G P G R E Y 220
 625 ACC CTG CCT CTT GGG CTA GAG ATG GCT CTG GGT CCC CGG CGG GAG TAC 672
 221 R A L Q L H L H W G A A G R P G 236
 673 CCG GCT CTG CAG CTG CAT CTG CAC TGG GGG GCT GCA GGT CGT CCG GGC 720
 237 S E H T V E G H R F P A E I H V 252
 721 TCG GAG CAC ACT GTG GAA GGC CAC CGT TTC CCT GCC GAG ATC CAC GTG 768
 253 V H L S T A F A R V D E A L G R 284
 769 GTT CAC CTC AGC ACC GCC TTT GCC AGA GTT GAC GGC GGC TTC GGG GGC 316
 269 P G G L A V L A A F L E E G P E 284
 817 CCG GGA GGC CTG GTC GTG TCC TCT CGG TTG GAA GAA ATC GCT 300
 285 E N S A Y E Q L L S R L E E I A 312
 865 GAA AAC ACT GCT TAT GAG CTG CTG TCT CGT TGG GAA GAA ATC GCT 316
 301 E G A G S T Q V P G L D I S A L 316
 913 GAG GAA GGC TCA GAG ACT CAG GTC CCA GGA CTG GAC ATA TCT GCA CTC 360
 317 L P S D F S R Y F O Y E G S L T 380
 961 CTG CCC TCT GAC TTC AGC CGC TAC TTC CAA TAT GAG GGG TCT CTG ACT 1008
 333 T P P C A Q G V I W T V F N Q T 348
 1009 ACA CCG CCC TGT GCC CAG GGT GTC ATC TGG ACT GTG TTT AAC CAG ACA 1056

1981 tgcacatttc ctttttaactg ttttaaaaa aadtatgac ttctctcag aggtgagca
 2041 tttttttttt agatcaataa taactctctt caacagatta tctctttat
 2101 taataaaga taattttct taacagat taactataa taactataa gattatata
 2161 ttgtctgagc gcaatctctt acactataa tccacagat ttggtgagc aggtgagca
 2221 ttgcaaatg gctactctt atattcttt ttaacagat ttggtgagc aggtgagca
 2281 tatgagata ttgacaggt ttgctctac tcaactagtt gttcagctt gttcagctt
 2341 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2401 acacagcag agtcaaatg tcaactagc gttcagctt gttcagctt gttcagctt
 2461 gttcaaatg ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2521 ttgcaaatg ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2581 ttgcaaatg ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2641 ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2701 taattttt gttcagctt gttcagctt gttcagctt gttcagctt gttcagctt
 2761 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2821 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2881 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 2941 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3001 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3061 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3121 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3181 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3241 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3301 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3361 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3421 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3481 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3541 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3601 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3661 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3721 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3781 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3841 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt
 3901 gttgagcgt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt ttgtttttt gttcagctt

FIG._2B

5941 CGGAGGCGCT GGCCGCTGTC GCCCCTTTC TGGAGGTAAC agatcctggg caccctccac
 6001 tcccgctttt cccatccat gctctctcg gactctatg tggagcaga gaccctccac
 6061 agcaagctc actcagggcc ctgctgaca aactcattca cgcactgttt gttcattaa
 6121 caccactgt aaccagcag ccagccccc acagagatc tgaactgta gttccttgc
 6181 tcaagatgc ccaacagca tggggagcc tcaatgaca gacacatga aggacatag
 6241 taagatggt gttcagcag aggtgacac taaagcctt cactgtaga aaagaaaag
 6301 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6361 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6421 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6481 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6541 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6601 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6661 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6721 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6781 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6841 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6901 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 6961 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7021 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7081 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7141 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7201 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7261 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7321 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7381 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7441 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7501 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7561 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7621 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7681 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7741 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga
 7801 aggtgtcat tgaagcaga acagatgag caaagctca gaatgtagc catbtggga

FIG._2D

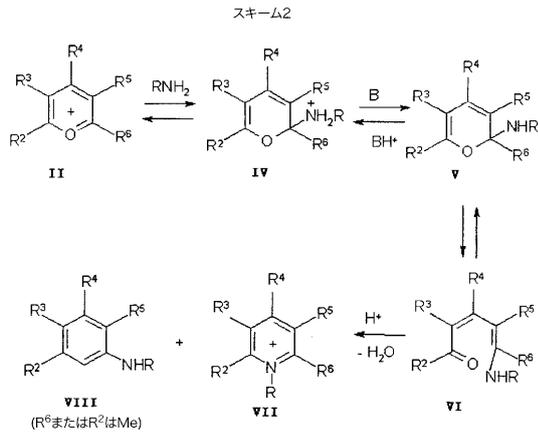
3961 catcaattc caaatccag ttccagagc ttctgactc cctccaccat cccagccta
 4021 gctctgttc caactcagaa gtagggaga ctgtactcc cacagaacc cccagccta
 4081 tccatacca atactccat cccactctc gtaggtgaa agggacagat ttgagagaa
 4141 taataaagg ttgcaaaag gtagggaga gctgtatgag atggacaga agggagagc
 4201 tggagagag aagggatga gaactgaga tggagaaa aatgtaga caagagaaa
 4261 aataggtgg aagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4321 gtaggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4381 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4441 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4501 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4561 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4621 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4681 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4741 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4801 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4861 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4921 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 4981 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5041 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5101 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5161 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5221 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5281 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5341 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5401 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5461 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5521 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5581 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5641 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5701 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5761 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5821 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag
 5881 aataggtgg tagagagag tagagagtt tggagagag aaaaagaa agttggag

FIG._2C

7921 gactctctc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccag caaaaccag aatgagaca
 7981 gaaaccag acaaaact ggtgttga aatgcaag gtaactcag gaaactcag gaaactcag
 8041 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8101 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8161 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8221 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8281 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8341 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8401 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8461 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8521 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8581 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8641 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8701 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8761 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8821 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8881 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 8941 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9001 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9061 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9121 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9181 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9241 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9301 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9361 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9421 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9481 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9541 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9601 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9661 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9721 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9781 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag
 9841 gtttttga gactctctc ttttaataa gatacaata ttttaactt gaaactcag

FIG._2E

【 図 6 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成17年11月16日(2005.11.16)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

哺乳類サンプルにおいて前癌細胞あるいは癌細胞を検出する方法であって、哺乳類サンプルに、標識または可視化手段に結合したMN/CA IX特異的阻害剤を接触させ、さらに該サンプル中の細胞上の前記標識または可視化手段を検出または検出および定量することにより、該サンプル中の細胞へのMN/CA IX特異的阻害剤の結合を検出または検出および定量する工程を含み、前記サンプルでの検出または検出および定量のレベルが対照サンプルにおけるものよりも高かった場合に、該サンプル中に前癌細胞あるいは癌細胞が存在することが示唆されることを特徴とする方法。

【 請求項 2 】

低酸素条件によって活性化されたMN/CA IXタンパク質またはポリペプチドを検出または検出および定量し、低酸素条件の存在が、前記サンプルを提供した哺乳類は予後がよくないことを示唆し、さらに該哺乳類に対する治療判断をするのに有用な情報となることを特徴とする請求項1記載の方法。

【 請求項 3 】

前記MN/CA IX特異的阻害剤が有機化合物であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【 請求項 4 】

前記MN/CA IX特異的阻害剤が、芳香族スルホンアミドまたは複素環式スルホンアミドであ

ることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記 MN/CA IX 特異的阻害剤が、CA I、CA II および CA IV よりなる群から選択される 1 種類の炭酸脱水酵素の酵素活性に対するよりも、MN/CA IX 酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

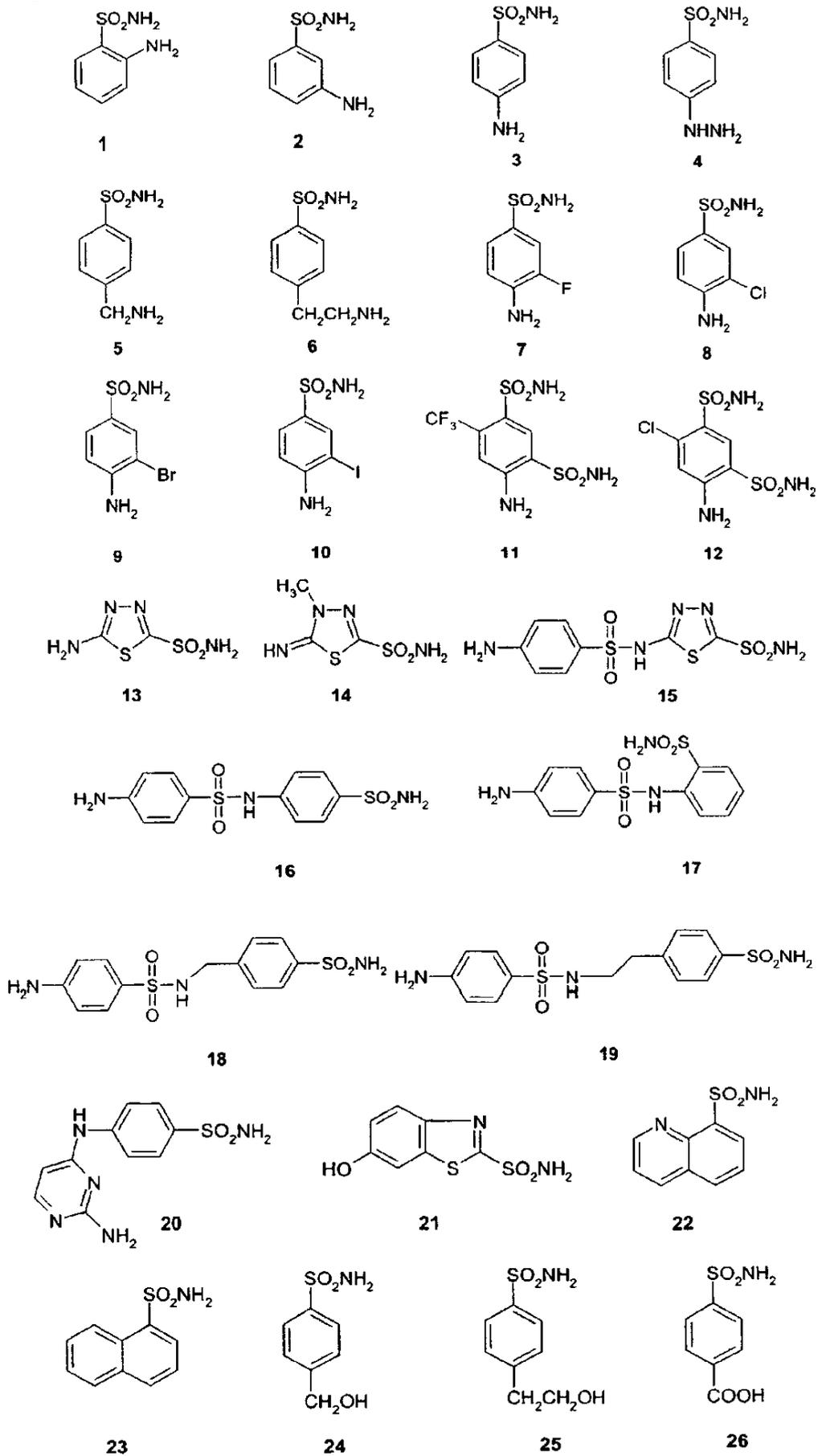
【請求項 6】

前記 MN/CA IX 特異的阻害剤が、CA I、CA II および CA IV よりなる群から選択される炭酸脱水酵素のそれぞれの酵素活性に対するよりも、MN/CA IX 酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記 MN/CA IX 特異的阻害剤が、以下の化合物よりなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載の方法：

【化 1】



【請求項 8】

前記MN/CA IX特異的阻害剤が、化合物の阻害定数 K_1 を特定する工程を含みかつ該阻害定数 K_1 が50nM未満の場合に該化合物はMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断されるスクリーニングアッセイにおいてMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断された有機分子および無機分子よりなる群から選択される膜不透過性化合物であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項9】

前記膜不透過性有機化合物が、芳香族スルホンアミドのピリジニウム誘導体または複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項8記載の方法。

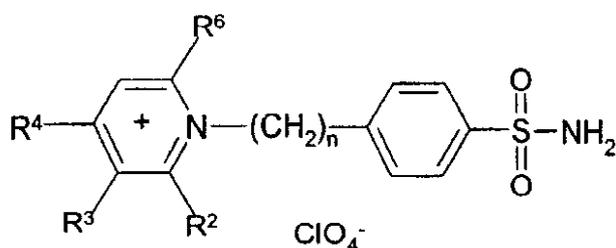
【請求項10】

前記膜不透過性化合物が、CA IV酵素活性に対するよりも、MN/CA IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項11】

前記芳香族スルホンアミドのピリジニウム誘導体が、以下の一般式で表されることを特徴とする請求項9記載の方法：

【化2】



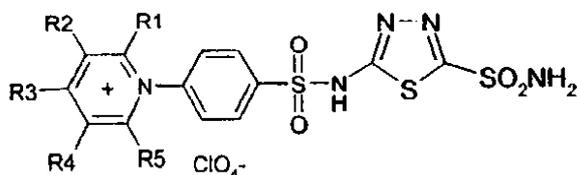
ここで、 n は0、1または2であり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、および R^6 は、水素、 $C_1 - C_{12}$ アルキル基およびアリール基よりなる群からそれぞれ独立して選択される。

【請求項12】

前記複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体が、以下の一般式で表されることを特徴とする請求項9記載の方法：

【化3】



ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は、水素、 $C_1 - C_{12}$ アルキル基およびアリール基よりなる群からそれぞれ独立して選択される。

【請求項13】

造影化剤に結合させたMN/CA IX特異的阻害剤を含有することを特徴とする、患者の体内でMN/CA IXタンパク質またはポリペプチドを発現する腫瘍および/または転移を画像化するための組成物。

【請求項14】

低酸素条件によって活性化されたMN/CA IXタンパク質またはポリペプチドが検出または検出および定量され、低酸素条件の存在が、前記患者は予後がよくないことを示唆し、さらに該患者に対する治療判断をするのに有用な情報となることを特徴とする請求項13記載の組成物。

【請求項15】

前記MN/CA IX特異的阻害剤が有機化合物であることを特徴とする請求項13記載の組成物。

【請求項16】

前記MN/CA IX特異的阻害剤が、芳香族スルホンアミドまたは複素環式スルホンアミドであることを特徴とする請求項13記載の組成物。

【請求項17】

前記MN/CA IX特異的阻害剤が、膜不透過性の芳香族スルホンアミドのピリジニウム誘導体、または膜不透過性の複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項13記載の組成物。

【請求項18】

化合物の阻害定数 K_1 を特定する工程を含みかつ該阻害定数 K_1 が50nM未満の場合に該化合物はMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断されるスクリーニングアッセイにおいてMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断された有機分子および無機分子よりなる群から選択される膜不透過性化合物を含有することを特徴とする、哺乳類においてMN/CA IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる前癌性もしくは癌性疾患を治療するための組成物。

【請求項19】

前記膜不透過性有機化合物が、芳香族スルホンアミドのピリジニウム誘導体または複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体であることを特徴とする請求項18記載の組成物。

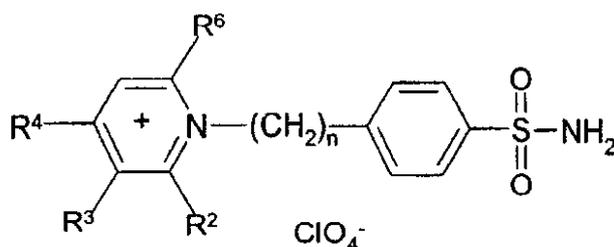
【請求項20】

前記膜不透過性化合物が、CA IV酵素活性に対するよりも、MN/CA IX酵素活性に対してより強力な阻害剤であることを特徴とする請求項18記載の組成物。

【請求項21】

前記芳香族スルホンアミドのピリジニウム誘導体が、以下の一般式で表されることを特徴とする請求項19記載の組成物：

【化4】



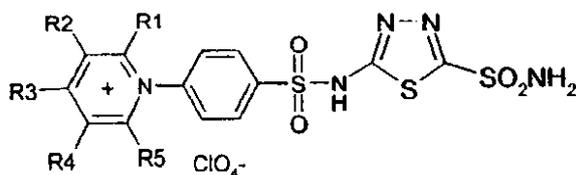
ここで、 n は0、1または2であり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、および R^6 は、水素、 $C_1 - C_{12}$ アルキル基およびアリール基よりなる群からそれぞれ独立して選択される。

【請求項22】

前記複素環式スルホンアミドのピリジニウム誘導体が、以下の一般式で表されることを特徴とする請求項19記載の組成物：

【化5】



ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は、水素、 $C_1 - C_{12}$ アルキル基およびアリール基よりなる群からそれぞれ独立して選択される。

【請求項23】

化合物の阻害定数 K_1 を特定する工程を含みかつ該阻害定数 K_1 が50nM未満の場合に該化合物はMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断されるスクリーニングアッセイにおいてMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断された、アセタゾラミド、エトクスゾラミ

ド、メタゾラミドおよびシアナート以外の有機および無機分子よりなる群から選択される化合物を含有することを特徴とする、腫瘍細胞がMN/CA IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる腫瘍を有する患者において腫瘍増殖を阻害するための組成物。

【請求項 2 4】

前記化合物が放射性同位元素に結合していることを特徴とする請求項 2 3 記載の組成物。

【請求項 2 5】

従来の抗癌剤、化学療法剤、癌関連経路に対する様々な阻害剤、生体還元性薬物、CA IX 特異的抗体、およびCA IX特異的抗体の生物学的に活性なフラグメントよりなる群から選択される 1 種またはそれ以上の腫瘍増殖を阻害するための化合物と併用されることを特徴とする請求項 2 3 記載の組成物。

【請求項 2 6】

以下の工程を含むスクリーニングアッセイにおいてMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断された、アセタゾラミド、エトクスゾラミド、メタゾラミドおよびシアナート以外の有機分子よりなる群から選択される化合物を含有することを特徴とする、哺乳類においてMN/CA IXタンパク質を過剰発現することによって特徴付けられる前癌性もしくは癌性疾患を治療するための組成物：

a) 化合物の一連の希釈液、ならびに、MN/CA IXタンパク質もしくはMN/CA IXタンパク質の炭酸脱水酵素ドメインを含むフラグメントの一連の希釈液を調製し；

b) 前記化合物の希釈液を、前記MN/CA IXタンパク質もしくはMN/CA IXタンパク質のフラグメントの希釈液と混合して、20 で10分間プレインキュベートし；

c) 反応容器内において、前記化合物の希釈液と前記MN/CA IXタンパク質もしくはタンパク質のフラグメントの希釈液との混合物をプレインキュベートしたものを、飽和CO₂溶液、0.2mMのフェノールレッド、0.1MのNa₂SO₄、および10mMのHepes緩衝液(pH7.5)から実質的になる基質と、20 で10~100秒かけて混合し；

d) 同時に、ストップフロー分光光度計を用いて、反応容器の内容物について吸収極大波長557nmにおける吸光度を測定し；さらに、

e) 前記化合物の阻害定数K_iを求める；

ここで、阻害定数K_iが約50nM未満の場合に、該化合物はMN/CA IX酵素活性の強力な阻害剤であると判断される。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/37783
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 31/18, 31/4439 US CL : 417/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 417/12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN/CAS, structure search and word search with cancer and MN/CA IX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,034,099 (PAMUKCU et al.) 07 March 2000 (07.03.2000) whole document.	1-69
<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:		
"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 23 June 2004 (23.06.2004)		Date of mailing of the international search report 16 JUL 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris</i> Richard S. Raymond Telephone No. 571/272-1600

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 K 31/4439 (2006.01)	A 6 1 K 31/4439	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/47 (2006.01)	A 6 1 K 31/47	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/505 (2006.01)	A 6 1 K 31/505	4 C 2 0 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	4 H 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 D 213/20 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 215/36 (2006.01)	C 0 7 D 213/20	
C 0 7 D 239/48 (2006.01)	C 0 7 D 215/36	C S P
C 0 7 D 277/76 (2006.01)	C 0 7 D 239/48	
C 0 7 D 417/12 (2006.01)	C 0 7 D 277/76	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	C 0 7 D 417/12	
C 0 7 D 285/12 (2006.01)	A 6 1 K 43/00	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 D 285/12	
	C 0 7 K 14/47	

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

(71) 出願人 505191010

スコツツァファーヴァ, アンドレア

SCOZZAFAVA, Andrea

イタリア国 I - 5 0 1 3 4 フロレンチェ ヴィーア ジー セガート 3

(74) 代理人 100073184

弁理士 柳田 征史

(74) 代理人 100090468

弁理士 佐久間 剛

(72) 発明者 スプラン, クラウディオ

イタリア国 I - 5 0 1 2 2 フロレンチェ ヴィーア デ チェルキ 6

(72) 発明者 スコツツァファーヴァ, アンドレア

イタリア国 I - 5 0 1 3 4 フロレンチェ ヴィーア ジー セガート 3

(72) 発明者 パストレコヴァ, シルヴィア

スロヴァキア共和国 8 4 1 0 7 ブラティスラーヴァ ノヴォヴェスカ 1 8

(72) 発明者 パストレック, ヤロミール

スロヴァキア共和国 8 4 1 0 7 ブラティスラーヴァ ノヴォヴェスカ 1 8

F ターム(参考) 4C031 AA01 HA07

4C036 AD08 AD20 AD21

4C055 AA11 BA03 BA06 BA08 CA01 CA02 CA06 DA01 DA06 DA08

GA01

4C063 AA01 BB07 CC67 DD12 EE01

4C084 AA13 AA17 DC32 MA31 MA66 NA14 ZB261 ZC201 ZC611 ZC781

4C085 AA13 AA26 EE01 GG01

4C086	AA01	AA02	BC17	BC28	BC42	BC84	GA10	MA04	MA16	MA31
	MA66	NA14	ZB26	ZC20	ZC61	ZC78				
4C206	AA01	AA02	JA14	MA04	MA36	MA51	MA86	NA14	ZB26	ZC20
	ZC61	ZC78								
4H045	AA30	BA10	CA40	DA55	EA28					

【要約の続き】

て遺伝子治療に使用することもできる。