

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6663852号  
(P6663852)

(45) 発行日 令和2年3月13日 (2020.3.13)

(24) 登録日 令和2年2月19日 (2020.2.19)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

G O 1 N 33/48 (2006.01)

G O 1 N 33/53 (2006.01)

C O 7 K 7/04 (2006.01)

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06 Z N A

G O 1 N 33/48 A

G O 1 N 33/53 D

C O 7 K 7/04

C O 7 K 14/47

請求項の数 10 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-543983 (P2016-543983)  
 (86) (22) 出願日 平成26年9月18日 (2014.9.18)  
 (65) 公表番号 特表2016-536005 (P2016-536005A)  
 (43) 公表日 平成28年11月24日 (2016.11.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/056284  
 (87) 国際公開番号 W02015/042249  
 (87) 国際公開日 平成27年3月26日 (2015.3.26)  
 審査請求日 平成29年9月19日 (2017.9.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/879,869  
 (32) 優先日 平成25年9月19日 (2013.9.19)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 399052796  
 ダイナ ファーバー キャンサー インス  
 ティテュート、インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2  
 2 1 5, ボストン, ブルックライン ア  
 ベニュー 4 5 0  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B H 3 プロファイリングの方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化学療法剤に対するがん細胞の感受性を予測する方法であって、

a) がん細胞の試験細胞集団を透過化するステップであって、該試験集団の該がん細胞が懸濁物中にある、ステップ；b) 該試験細胞集団の透過化した細胞を B H 3 ドメインペプチドと接触させるステップ；c) 該透過化した細胞を固定するステップ；d) 該試験細胞集団における B H 3 ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア外膜透過化の量を測定するステップ；およびe) 該 B H 3 ドメインペプチドと接触していない該がん細胞の対照細胞集団に対して、該試験細胞集団における B H 3 ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア外膜透過化の前記量を比較するステップ

を含み、ミトコンドリア外膜透過化が、( i ) 固定し透過化した該細胞を、ミトコンドリア膜間スペースからの分子について染色すること、および ( i i ) ミトコンドリア膜間スペースからの該分子についての該染色を検出することによってミトコンドリア膜間スペースからの該分子の放出を測定することによって判定され、

該対照細胞集団と比較した該試験細胞集団におけるミトコンドリア外膜透過化の増大は、該がん細胞が化学療法剤に感受性であることを示す、方法。

【請求項 2】

ミトコンドリア膜間スペースから放出される前記分子が、チトクロム c、S M A C / D i a b l o、O m i、アデニル酸キナーゼ - 2 またはアポトーシス誘導因子からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試験細胞集団をチトクロム c または S M A C / D i a b l o に対する抗体と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試験細胞集団を細胞内または細胞外マーカーに対する抗体と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 B H 3 ドメインペプチドが、B I D、B I M、B A D、B I K、N O X A、P U M A、B M F、または H R K ポリペプチドの B H 3 ドメインに由来する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

化学療法剤に対するがん細胞の感受性を予測する単細胞の方法であって、

a) がん細胞の試験細胞集団を透過化するステップであって、該試験集団の該がん細胞が固体表面上に固定化されている、ステップ；

b) 該試験細胞集団の透過化した細胞を B H 3 ドメインペプチドと接触させるステップ；

c) 該透過化した細胞を固定するステップ；

d) 該試験細胞集団における B H 3 ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア外膜透過化の量を測定するステップ；および

e) 該 B H 3 ドメインペプチドと接触していない該がん細胞の対照細胞集団に対して、該試験細胞集団における B H 3 ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア外膜透過化の前記量を比較するステップ

を含み、ミトコンドリア外膜透過化が、( i ) 固定し透過化した該細胞を、ミトコンドリア膜間スペースからの分子およびミトコンドリアマーカーについて染色すること、および ( i i ) 顕微鏡により該染色を検出して、ミトコンドリア膜間スペースからの該分子および該ミトコンドリアマーカーを該がん細胞において位置特定することによってミトコンドリア膜間スペースからの該分子の放出を測定することによって判定され、

該対照細胞集団と比較した該試験細胞集団におけるミトコンドリア外膜透過化の増大は、該がん細胞が化学療法剤に感受性であることを示す、  
方法。

【請求項 7】

前記固体表面が、ポリアミンまたはポリリシンで被覆されている、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記試験細胞集団を核染色で対比染色するステップをさらに含む、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ミトコンドリア膜間スペースから放出される前記分子が、チトクロム c、S M A C / D i a b l o、O m i、アデニル酸キナーゼ - 2 またはアポトーシス誘導因子からなる群から選択される、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ミトコンドリアマーカーが、M n S O D である、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

## 関連出願

本出願は、その内容全体が参考として本明細書に援用される2013年9月19日に出願された米国仮特許出願第61/879,869号に対して35 U.S.C. § 119(e)の下における利益を主張する。

## 【0002】

## 発明の分野

本発明は、一般に、BH3ドメインペプチドのパネルに対する細胞の感受性のパターンを判定することによって細胞の化学的感受性を判定する改良法に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

## 発明の背景

アポトーシスと呼ばれるプログラム細胞死は、すべての多細胞生物内の組織恒常性の発達および維持において欠かせない役割を果たす(Raff、Nature、356巻:397~400頁、1992年)。線虫からヒトまでの遺伝子および分子の分析により、細胞自殺のアポトーシス経路が高度に保存されていることが示された(HengartnerおよびHorvitz、Cell、76巻:1107~1114頁、1994年)。正常な発達および維持にとって必須であることに加えて、アポトーシスは、ウイルス感染に対する防御およびがんの出現の防止において重要である。

## 【0004】

複数の細胞内の場所から発する多様な固有の死のシグナルはすべて、ミトコンドリアからのチトクロムcの放出を誘導してApaf-1を活性化し、エフェクターカスパーゼ活性化をもたらす。BCL-2ファミリー中のタンパク質は、プログラム細胞死への関与の主要な制御因子であり、かつミトコンドリアにおける死のシグナルの実行体である。このファミリーのメンバーは、アポトーシス促進性および抗アポトーシスタンパク質の両方を含み、BCL-2相同性(BH)1~4ドメインと呼ばれる最大で4つの保存領域において相同性を共有する(AdamsおよびCory、1998年)。このファミリーは、3つの主なサブクラスに分けることができる。BCL-2およびBCL-X<sub>L</sub>を含む抗アポトーシスタンパク質はすべて、「マルチドメイン」であり、4つすべてのBHドメイン全体にわたって相同性を共有する。しかし、アポトーシス促進性タンパク質は、さらに細分することができ、これらとしては、BH1~3ドメイン内で配列相同性を有するマルチドメインタンパク質、例えば、BAXおよびBAKなどがある。より遠縁の「BH3オンリー」タンパク質は、これまですべてアポトーシス促進性であり、これらのアポトーシス機能に必要とされる両親媒性ヘリックスBH3領域内で配列相同性を共有する(Chittendenら、1995年; O'Connorら、1998年; Wangら、1996年; Zhaら、1997年)。

## 【0005】

マルチドメインアポトーシス促進性タンパク質、例えば、BAXおよびBAKなどは、死のシグナルを受け取ると、ミトコンドリア機能障害の実行に参加する。生細胞内で、これらのタンパク質は、モノマーとして存在する。しかし、様々な死の刺激に応答して、サイトゾル内に位置するかまたは膜に緩く付着した不活性なBAXは、ホモオリゴマー化多量体としてミトコンドリア外膜中に深く挿入する(Eskesら、2000年; Grossら、1998年; Wolterら、1997年)。不活性なBAKは、ミトコンドリアに存在し、そこでこれは、ホモオリゴマー化を含む、死のシグナルに応答したアロステリックコンホメーション変化も起こす(Griffithsら、1999年; Weiら、2000年)。BAXおよびBAKの両方を欠失した細胞は、細胞内の複数の位置から発する多種多様な死の刺激に対して耐性がある(Weiら、2001年)。

BH3オンリー分子は、このファミリーの第3のサブセットを構成し、これらとしては、BID、NOXA、PUMA、BIK、BIM、およびBADがある(KelekarおよびThompson、1998年)。これらのタンパク質は、突然変異分析により、これらの死の活性のためにアポトーシス促進性のメンバーにおいて必要とされることが示

10

20

30

40

50

された両親媒性 ヘリックス B H 3 領域のみにおいて配列相同性を共有する。さらに、B H 3 オンリータンパク質は、「マルチドメイン」B C L - 2 ファミリーメンバーへの結合を実際に行うためにこのドメインを必要とする。酵母ツーハイブリッド、界面活性剤可溶化細胞溶解物からの免疫共沈降、および *in - vitro* プルダウン実験を含めた複数の結合アッセイは、個々の B H 3 オンリー分子がマルチドメイン B C L - 2 メンバーについていくらかの選択性を提示することを示す (B o y d ら、1995 年; O ' C o n n o r ら、1998 年; O d a ら、2000 年; W a n g ら、1996 年; Y a n g ら、1995 年)。B I D タンパク質は、アポトーシス促進性 B A X および B A K ならびに抗アポトーシス B C L - 2 および B C L - X<sub>L</sub> に結合する (W a n g ら、1996 年; W e i ら、2000 年)。対照的に、B A D、およびインタクトな分子としての N O X A は、抗アポトーシス性のメンバーへの優先的結合を提示する (B o y d ら、1995 年; O ' C o n n o r ら、1998 年; O d a ら、2000 年; Y a n g ら、1995 年)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】R a f f、N a t u r e、356 巻: 397~400 頁、1992 年

【非特許文献 2】H e n g a r t n e r および H o r v i t z、C e l l、76 巻: 1107~1114 頁、1994 年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0007】

様々な態様では、本発明は、試験細胞集団を B H 3 ドメインペプチドと接触させるステップ; 試験細胞集団における B H 3 ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア外膜透過化の量を測定するステップ; および治療剤と接触していない対照細胞集団に対して、試験細胞集団における B H 3 ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア外膜透過化の量を比較するステップによって、治療剤に対するがん細胞の感受性を予測する方法を提供する。対照細胞集団と比較した試験細胞集団におけるミトコンドリア膜透過化の増大は、細胞が治療剤に対して感受性であることを示す。任意選択で、細胞は、前記 B H 3 ドメインペプチドと接触する前に透過化される。

【0008】

30

ミトコンドリア外膜透過化は、例えば、i) 電位差測定用色素もしくは放射測定用色素の発光、または ii) ミトコンドリア膜間スペースからの分子の放出を測定することによって判定される。

【0009】

一部の実施形態において、透過化された細胞には、電位差測定用色素、例えば、J C - 1 またはジヒドロロダミン 123 などが用いられる。他の実施形態において、透過化された細胞には、チトクロム C もしくは S M A C / D i a b l o に対する抗体、O m i、アデニル酸キナーゼ - 2、またはアポトーシス誘導因子が用いられる。

【0010】

任意選択で、本方法は、透過化された前記細胞を細胞内または細胞外マーカーに対する抗体と接触させるステップをさらに含む。

40

【0011】

一部の態様では、ミトコンドリア外膜透過化を測定する前に、細胞集団は固定される。例えば、細胞集団は、固体表面上に固定される。

【0012】

B H 3 ドメインペプチドは、B I D、B I M、B A D、B I K、N O X A、P U M A、B M F、または H R K ポリペプチドの B H 3 ドメインに由来する。

【0013】

別段の定義のない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に

50

記載のものと同様の、または等価な方法および材料を本発明の実行または試験で使用する  
ことができるが、以下に適切な方法および材料を説明する。本明細書で述べられるすべての  
の刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれて  
いる。矛盾する場合、定義を含めて本明細書を優先させる。さらに、材料、方法、および  
実施例は単なる例示であり、限定することは意図されていない。

#### 【 0 0 1 4 】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、および特許請求の範囲から明らか  
となる。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

#### ( 項目 1 )

治療剤に対するがん細胞の感受性を予測する方法であって、

a ) 試験細胞集団を B H 3 ドメインペプチドと接触させるステップ ;

b ) 該試験細胞集団における B H 3 ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア  
外膜透過化の量を測定するステップ ; および

c ) 該治療剤と接触していない対照細胞集団に対して、該試験細胞集団における B H 3  
ドメインペプチドにより誘導されたミトコンドリア外膜透過化の前記量を比較するステッ  
プ

を含み、該対照細胞集団と比較した該試験細胞集団におけるミトコンドリア膜透過化の増  
大は、該細胞が該治療剤に感受性であることを示す、方法。

#### ( 項目 2 )

前記細胞が、前記 B H 3 ドメインペプチドと接触する前に透過化される、項目 1 に記載  
の方法。

#### ( 項目 3 )

前記ミトコンドリア外膜透過化が、 i ) 電位差測定用色素の発光または i i ) ミトコン  
ドリア膜間スペースからの分子の放出を測定することによって判定される、項目 1 または  
2 に記載の方法。

#### ( 項目 4 )

透過化された前記細胞を電位差測定用色素と接触させるステップをさらに含む、項目 2  
に記載の方法。

#### ( 項目 5 )

前記電位差測定用色素が、 J C - 1 またはジヒドロローダミン 1 2 3 である、項目 4 に  
記載の方法。

#### ( 項目 6 )

透過化された前記細胞をチトクロム C または S M A C / D i a b l o に対する抗体と接  
触させるステップをさらに含む、項目 2 に記載の方法。

#### ( 項目 7 )

透過化された前記細胞を細胞内または細胞外マーカーに対する抗体と接触させるステッ  
プをさらに含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

#### ( 項目 8 )

ミトコンドリア外膜透過化を測定する前に、前記細胞集団を固定するステップをさらに  
含む、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

#### ( 項目 9 )

前記細胞集団が、固体表面上に固定される、項目 1 に記載の方法。

#### ( 項目 1 0 )

前記 B H 3 ドメインペプチドが、 B I D、B I M、B A D、B I K、N O X A、P U M  
A、B M F、または H R K ポリペプチドの B H 3 ドメインに由来する、項目 1 から 9 のい  
ずれか一項に記載の方法。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 1 5 】

【 図 1 】 図 1 は、 i B H 3 が、個々の亜集団のプロファイルを混合集団で再現することが

10

20

30

40

50

できることを実証する一連の棒グラフである。個々に（図 1 A に示した非混合）または複合混合物として（図 1 B に示した混合）プロファイルされた試料は、同じプロファイルを生じる。

#### 【 0 0 1 6 】

【図 2 A】図 2 は、どのように i B H 3 が細胞集団を規定し、プロファイリングに対する細胞応答を測定するかを示す一連のパネルである。代表的な F A C S データは、図 1 における混合試料内の亜集団の単離を実証する。

【図 2 B】図 2 は、どのように i B H 3 が細胞集団を規定し、プロファイリングに対する細胞応答を測定するかを示す一連のパネルである。代表的な F A C S データは、図 1 における混合試料内の亜集団の単離を実証する。

【図 2 C】図 2 は、どのように i B H 3 が細胞集団を規定し、プロファイリングに対する細胞応答を測定するかを示す一連のパネルである。代表的な F A C S データは、図 1 における混合試料内の亜集団の単離を実証する。

【図 2 D】図 2 は、どのように i B H 3 が細胞集団を規定し、プロファイリングに対する細胞応答を測定するかを示す一連のパネルである。代表的な F A C S データは、図 1 における混合試料内の亜集団の単離を実証する。

【図 2 E】図 2 は、どのように i B H 3 が細胞集団を規定し、プロファイリングに対する細胞応答を測定するかを示す一連のパネルである。代表的な F A C S データは、図 1 における混合試料内の亜集団の単離を実証する。

【図 2 F】図 2 は、どのように i B H 3 が細胞集団を規定し、プロファイリングに対する細胞応答を測定するかを示す一連のパネルである。代表的な F A C S データは、図 1 における混合試料内の亜集団の単離を実証する。

#### 【 0 0 1 7 】

【図 3】図 3 は、顕微鏡観察によって測定されたペプチド処置にตอบสนองしたチトクロム c の喪失を示す一連の蛍光顕微鏡像である。細胞は、これらの核の D A P I 染色によって位置特定され、ミトコンドリアは、核に隣接するミトコンドリアマーカー（M n S O D）の染色によって位置特定され、チトクロム c 染色は、ミトコンドリアマーカー染色の領域と関連する。不活性な対照ペプチドは、M n S O D 染色の領域内でチトクロム c 染色を示し、一方、B I M ペプチドは、M n S O D 染色のすべての領域からのチトクロム c のほとんど全ての喪失を引き起こす。

#### 【 0 0 1 8 】

【図 4】図 4 は、m i B H 3 プロファイルの公知のプロファイルとの相関を示す一連の棒グラフである。S u D H L 4 細胞株の m i B H 3 プロファイル（図 4 A）は、B H 3 ペプチドにตอบสนองしたチトクロム c チャネルと M n S O D チャネルとの間の相関の喪失を示す。チトクロム c の放出および B I M、B A D、P U M A、および B M F ペプチドについての相関の喪失は、図 4 B に示した他の B H 3 プロファイリング法によって測定されたチトクロム c の喪失と一致する。

#### 【 0 0 1 9 】

【図 5】図 5 は、予め作製された凍結プレートが新たに調製したプレートと同様であることを示すグラフである。応答細胞（M D A - M B - 2 3 1）は、凍結したプレートおよび新たに調製したプレートの両方においてペプチド処置（B A D）に対して同等の応答を示す。非応答細胞（S u D H L 1 0）は、非特異的なノイズを試験するのに使用され、凍結プレートは、新たに調製したプレートと等価な応答を生じる。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【 0 0 2 0 】

##### 発明の詳細な説明

本発明は、ミトコンドリア外膜透過化を測定する改良法の発見に部分的に基づく。これらの改良法は、その内容全体が参照により組み込まれている U S 2 0 0 8 / 0 1 9 9 8 9 0 に記載されるような B H 3 プロファイリングにおいて有用である。

#### 【 0 0 2 1 】

### B H 3 プロファイリング

様々な方法において、薬剤に対する細胞の感受性が判定される。細胞感受性は、細胞または細胞の要素（例えば、ミトコンドリア）を B H 3 ドメインペプチドと接触させることによって判定される。細胞は、アポトーシスが検出される場合、薬剤に対して感受性である。あるいは、細胞感受性は、細胞の試験 B H 3 プロファイルを提供し、そのプロファイルががん細胞 B H 3 プロファイルと比較することによって判定される。試験プロファイルと対照プロファイルとの類似性は、細胞が薬剤に感受性であることを示す。B H 3 プロファイルは、細胞の B H 3 ペプチドに対する感受性のパターンである。感受性は、アポトーシスによって示される。がん細胞 B H 3 プロファイルは、特定の薬剤薬剤に対する応答性またはその欠如が分かっているがん細胞内の B H 3 ペプチドに対する感受性のパターンである。任意選択で、試験 B H 3 プロファイルは、1つを超えるがん細胞 B H 3 プロファイルと比較される。したがって、試験 B H 3 プロファイルを対照 B H 3 プロファイルの感受性と比較することによって、薬剤薬剤に対する感受性が判定される。

10

#### 【 0 0 2 2 】

細胞または細胞の要素は、がん細胞またはがん性と疑われる細胞である。細胞が透過化されると、B H 3 ペプチドのミトコンドリアへの接近が可能になる。細胞は、当技術分野で公知の方法によって透過化され、例えば、細胞は、細胞をジギトニンと接触させることによって透過化される。

#### 【 0 0 2 3 】

細胞が透過化された後、その細胞は、B H 3 ペプチドまたは試験薬剤で処置される。細胞が処置された後、ミトコンドリア外膜透過化が測定される。外膜透過化は、いくつかの方法、例えば、ミトコンドリア膜電位の喪失による外膜透過化によって測定される。ミトコンドリア膜電位の喪失は、例えば、処置される細胞を電位差測定用色素または放射測定用色素で処置することによって測定される。

20

#### 【 0 0 2 4 】

あるいは、外膜透過化は、ミトコンドリア膜間スペースからの分子の放出を測定することによって判定される。測定することができる分子の例としては、チトクロム c および S M A C / D i a b l o、O m i、アデニル酸キナーゼ - 2 ( a d e n y l a t e k n a s e - 2 )、またはアポトーシス誘導因子 ( A I F ) がある。任意選択で、細胞は、外膜透過化を測定する前に固定される。細胞は、ホルムアルデヒドなどのアルデヒドを使用することなどによって、当技術分野で公知の方法によって固定される。

30

#### 【 0 0 2 5 】

ミトコンドリア外膜透過化は、単細胞レベルもしくは多細胞レベルで、または細胞の集団全体にわたって測定することができる。さらに、本明細書に開示の方法のいくつかは、細胞の亜集団をアッセイすることを可能にする。

#### 【 0 0 2 6 】

電位差測定用色素の例としては、緑色蛍光性 J C - 1 プローブ ( 5 , 5 ' , 6 , 6 ' - テトラクロロ - 1 , 1 ' , 3 , 3 ' - テトラエチルベンゾイミダゾリルカルボシアニンヨウ化物 ) またはジヒドロローダミン 1 2 3 がある。

#### 【 0 0 2 7 】

J C - 1 は、低い膜濃度でモノマーとして存在する。しかし、J C - 1 は、より高いミトコンドリア電位の条件下でミトコンドリアのマトリックス内で蓄積した。これらのより高い濃度で、J C - 1 は、赤色蛍光性「J凝集体」を形成する。モノマーとして、色素は、527 nm の吸収 / 発光極大を有し、一方、高い膜電位で、発光極大は、590 nm である。したがって、このシアニン色素の発光の比率測定をミトコンドリア膜電位の敏感な尺度として使用することができる。この色素は、核または細胞質の参照値の測定を必要としない色素濃度の二重測定を可能にする。単離ミトコンドリアを使用する試験は、モノマー J C - 1 からの 527 nm の発光は、46 ~ 182 mV の範囲の膜 M 電位とともにほぼ直線的に増大し、一方、590 nm の J 凝集体の発光は、140 mV より負の M 値に対して感受性がより低く、140 ~ 182 mV の範囲内の電位値に強く感受性であることを示

40

50

した (D i l l i s a ら、1995 年)。フルオレセインおよびテトラメチルローダミンのために設計された光学フィルターを、それぞれモノマーおよび凝集体形態を別個に可視化するのに使用することができる。あるいは、両形態は、標準的なフルオレセインロングパス光学フィルターセットを使用して同時に観察することができる。

ジヒドロローダミン 123 は、酸化によって蛍光レーザー色素ローダミン 123 (R 123) に変換することができる無荷電非蛍光剤である。

#### 【0028】

ミトコンドリア膜間スペースからの分子の放出は、当技術分野で公知の方法によって、例えば、測定される分子に対する抗体、すなわち、チトクロム C または S M A C / D i a b l o に対する抗体を使用することによって測定することができる。検出は、例えば、E 10  
L L I S A、F A C S、免疫プロット、免疫蛍光、または免疫組織化学検査によるものでありうる。

#### 【0029】

ミトコンドリアのスペースから放出された分子を測定することに加えて、他の細胞内および細胞外マーカーを測定することができる。これは、細胞の亜集団間を区別する可能とする。

#### 【0030】

B H 3 プロファイリングは、固体表面上に細胞を固定化することによって単細胞レベルで達成することができる。任意選択で、固体表面は、ポリアミンまたはポリリシンで被覆されている。固定化された細胞は、上述したように透過化される。次いで細胞を、B H 3 20  
ペプチドおよび/または試験薬剤と接触させる。細胞が 45 ~ 90 分などの所定の時間にわたって処置された後、細胞は、固定され、当技術分野で公知の方法によってさらに透過化される。例えば、細胞は、ホルムアルデヒドで固定され、メタノールまたはトリトン x - 100 を用いてさらに透過化される。外膜透過化は、ミトコンドリア膜間スペースからの分子およびミトコンドリアマーカーの細胞内染色によって判定される。測定することができる分子の例としては、チトクロム c、S M A C / D i a b l o、O m i、アデニル酸キナーゼ - 2、またはアポトーシス誘導因子 (A I F) がある。ミトコンドリアマーカーには、M n S O D が含まれる。染色された細胞は、D A P I などの核染色剤で対比染色することができる。任意選択で、他の細胞内および細胞外マーカーを測定することができる。細胞の分析は、核を位置特定するために、顕微鏡を使用して手作業で達成してもよいし、30  
または例えば、C e l l p r o f i l e r などのソフトウェアを使用することによって自動化してもよい。細胞は、がんを有することが分かっている、またはがんを有すると疑われる対象に由来する。対象は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物は、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシである。対象は、がんを有すると以前に診断されており、場合によりがんの処置をすでに受けている。あるいは、対象は、がんを有すると以前に診断されていない。

#### 【0031】

薬剤は、化学療法剤などの治療剤である。例えば、このような治療剤は、増感剤 B H 3 ドメインの模倣体、または抗アポトーシスタンパク質のアンタゴニストである。アポトーシス、すなわち、細胞死は、公知の方法によって同定される。例えば、アポトーシスの特性は、細胞収縮を含み、その表面上に泡様ブレブを発達させ、その核中のクロマチン (D 40  
N A およびタンパク質) を分解させ、チトクロム c を放出し、ミトコンドリア膜電位を喪失してそのミトコンドリアを破壊し、壊れて小さい、膜で包まれた断片になり、または通常形質膜内に隠れているホスファチジルセリンが細胞の表面上に露出することである。

#### 【0032】

B H 3 ペプチドと接触していない細胞と比較した、B H 3 ペプチドと接触した細胞のアポトーシスのレベルの差異は、統計的に有意である。統計的に有意とは、変化が偶然だけによって起こるように予期されうるものより大きいことを意味する。統計的有意性は、当技術分野で公知の方法によって判定される。例えば、統計的有意性は、p 値によって判定される。p 値は、実験中の群間の差異が偶然によって起こった確率の尺度である。(P ( 50



z z 測定値))。例えば、0.01のp値は、その結果が偶然によって起こる機会が100回中に1回あることを意味する。p値が低いほど、群間の差異が処置によって引き起こされた可能性が高い。p値が0.05であるか、またはそれ未満である場合、変化は、統計的に有意である。好ましくは、p値は、0.04、0.03、0.02、0.01、0.005、0.001、またはそれ未満である。

#### 【0033】

本発明は、がんを有する1つまたは複数の対象から採取したBH3増感剤ペプチドに対するミトコンドリアの感受性のパターンのプロファイルも含む。

#### 【0034】

BH3ドメインペプチド

10

BH3ドメインペプチドは、長さが195アミノ酸未満、例えば、長さが150、100、75、50、35、25、または15アミノ酸未満であるか、またはそれと等しい。例えば、BH3ペプチドは、表1に示した配列番号1～13の配列を含む。

#### 【表1】

表1

	アミノ酸配列	配列番号
BID	EDIIRNIARHLAQVGDSMDR	1
BIM	MRPEIWIAQELRRIGDEFNA	2
BID突然変異体	EDIIRNIARHAAQVGASMDR	3
BAD	LWAAQRYGRELRRMSDEFEGSFKGL	4
BIK	MEGSDALALRLACIGDEMDV	5
NOXA A	AELPPEFAAQLRKIGDKVYC	6
NOXA B	PADLKDECAQLRRIGDKVNL	7
HRK	SSAAQLTAARLKALGDELHQ	8
BNIP	VVEGEKEVEALKKSADWVSD	9
PUMA	EQWAREIGAQLRRMADDLNA	10
BMF	HQAEVQIARKLQLIADQFHR	11
huBAD	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	12
BAD突然変異体	LWAAQRYGREARRMSDEFEGSFKGL	13

20

30

#### 【0035】

BH3ドメインペプチドには、配列NH<sub>2</sub>-XXXXXXXXXIAXXLXXXXGXDXXX-  
X-COOH(配列番号14)またはNH<sub>2</sub>-XXXXXXXXXXXXLXXXXDXDX-  
X-COOH(配列番号15)を含む(全体的または部分的に)ペプチドがある。本明細書において使用するとき、Xは、任意のアミノ酸でありうる。あるいは、BH3ドメインペプチドは、配列番号14または配列番号15の少なくとも5、6、7、8、9、15、  
またはそれ超のアミノ酸を含む。

40

#### 【0036】

任意選択で、BH3ドメインペプチドは、形質導入ドメインに結合されている。形質導入ドメイン化合物は、その中に存在するペプチドを所望の細胞の移動先に方向付ける。したがって、形質導入ドメインは、形質膜を越えてペプチドを方向付けることができ、例えば、細胞の外側から形質膜を通して細胞質内に方向付けることができる。代替的または追加的に、形質導入ドメインは、ペプチドを、細胞内の所望の位置、例えば、核、リボソーム、ER、ミトコンドリア、リソソーム、またはペルオキシソームに方向付けることができる。

#### 【0037】

50

一部の実施形態では、形質導入ドメインは、公知の膜転移配列に由来する。あるいは、形質導入ドメインは、膜取り込みを促進することが公知である化合物、例えば、ポリエチレングリコール、コレステロール部分、オクタン酸、およびデカン酸などである。

#### 【0038】

例えば、輸送ペプチドは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)1 TATタンパク質に由来する配列を含みうる。このタンパク質は、例えば、米国特許第5,804,604号および同第5,674,980号に記載されており、それぞれ参照により本明細書に組み込まれている。BH3ドメインペプチドは、TATタンパク質を構成する86アミノ酸全体の一部またはすべてに連結される。例えば、細胞内への取り込みを呈する86より少ないアミノ酸を有するTATタンパク質の機能的に有効な断片または部分を使用することができる。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれているVivesら、J. Biol. Chem.、272巻(25号):16010~17頁(1997年)を参照されたい。細胞内への侵入および取り込みを媒介する領域を含むTATペプチドは、公知の技法を使用してさらに定義することができる。例えば、Frankedら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、86巻:7397~7401頁(1989年)を参照されたい。転移配列の他の源としては、例えば、VP22(例えば、WO97/05265; ElliottおよびO'Hare、Cell、88巻:223~233頁(1997年)に記載された)、Drosophila Antennapedia(Antp)ホメオティック転写因子、HSV、ポリアルギニン、ポリリシン、または非ウイルスタンパク質(Jacksonら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、89巻:10691~10695頁(1992年))がある。

#### 【0039】

形質導入ドメインは、BH3ドメインペプチドのN末端またはC末端に連結される場合がある。2個のプロリン残基のヒンジを、形質導入ドメインとBH3ドメインペプチドとの間に付加して、完全融合ペプチドを創製してもよい。任意選択で、形質導入ドメインは、形質導入ドメインが、細胞または細胞の要素内に侵入するとBH3ドメインペプチドから放出されるような方法で、BH3ドメインペプチドに連結される。

#### 【0040】

形質導入ドメインは、転移タンパク質中に存在する単一の(すなわち、連続的な)アミノ酸配列でありうる。あるいは、これは、タンパク質中に存在するが、天然に存在するタンパク質中で、他のアミノ酸配列によって分離されている2つまたはそれ超のアミノ酸配列でありうる。

#### 【0041】

天然に存在する転移タンパク質のアミノ酸配列を、例えば、天然に存在するタンパク質中に存在する少なくとも1つのアミノ酸の付加、欠失、および/または置換によって改変して、改変タンパク質を生成することができる。安定性が増大または低下した改変転移タンパク質は、公知の技法を使用して生成することができる。一部の実施形態では、転移タンパク質またはペプチドは、天然に存在するタンパク質またはその部分のものと同一ではないが実質的に同様であるアミノ酸配列を含む。さらに、コレステロールまたは他の脂質誘導体を転移タンパク質に付加して、膜溶解性が増大した修飾タンパク質を生成することができる。

#### 【0042】

BH3ドメインペプチドおよび形質導入ドメインは、当技術分野で公知の任意の適切な様式で化学的カップリングによって連結することができる。多くの公知の化学架橋法は非特異的であり、すなわちこれらは、カップリングのポイントを輸送ポリペプチドまたはカーゴ巨大分子上の任意の特定の部位に方向付けない。結果として、非特異的な架橋剤を使用すると、機能的な部位が攻撃され、または活性部位を立体的に遮断され、コンジュゲートしたタンパク質が生物学的に不活性になる場合がある。

#### 【0043】

カップリング特異性を増大させる一方法は、架橋されるポリペプチドの一方または両方

10

20

30

40

50

において1回のみまたは数回見つかる官能基に直接化学的カップリングすることである。例えば、多くのタンパク質では、チオール基を含有する唯一のタンパク質アミノ酸であるシステインは、数回のみ見出される。また、例えば、ポリペプチドがリシン残基を含有しない場合、一級アミンに特異的な架橋試薬は、そのポリペプチドのアミノ末端に選択的となる。カップリング特異性を増大させるこの手法の利用に成功するには、ポリペプチドが、分子の生物活性を喪失することなく変更されうる、分子の範囲内の適度に稀有な反応性の残基を有することを必要とする。

#### 【0044】

システイン残基は、ポリペプチド配列の部分においてこれらが見出される場合、そうしなければ架橋反応での参加が生物活性を妨げる可能性があるとき、置き換えられうる。システイン残基が置き換えられる場合、典型的にはポリペプチドフォールディングの変化が生じることを最小限にすることが望ましい。ポリペプチドフォールディングの変化は、置き換えがシステインと化学的かつ立体的に同様であるとき最小限になる。これらの理由で、セリンは、システインの置き換えとして好適である。以下の実施例で実証されるように、システイン残基は、架橋目的でポリペプチドのアミノ酸配列中に導入することができる。システイン残基が導入されるとき、アミノまたはカルボキシ末端における、またはその付近での導入が好適である。目的のポリペプチドが化学合成によって生成されても、組換えDNAの発現によって生成されても、従来法がこのようなアミノ酸配列改変に利用可能である。

#### 【0045】

2つの構成要素のカップリングは、カップリング剤またはコンジュゲート剤を介して達成することができる。利用することができるいくつかの分子間架橋試薬がある。例えば、MeansおよびFeeney、CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS、Holden-Day、1974年、39～43頁を参照されたい。これらの試薬の中では、例えば、J-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)またはN,N'-(1,3-フェニレン)ビスマレイミド(ともに、スルフヒドリル基に対して高度に特異的であり、非可逆性連結を形成する); N,N'-エチレン-ビス-(ヨードアセトアミド)または6～11個の炭素メチレン橋を有する他のこのような試薬(スルフヒドリル基に対して相対的に特異的); および1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(アミノおよびチロシン基と非可逆性連結を形成する)である。この目的に有用な他の架橋試薬としては、p,p'-ジフルオロ-m,m'-ジニトロジフェニルスルホン(アミノおよびフェノール基と非可逆性架橋を形成する); アジブイミド酸ジメチル(アミノ基に対して特異的である); フェノール-1,4-ジスルホニルクロリド(主にアミノ基と反応する); ヘキサメチレンジイソシアネートもしくはジイソチオシアネート、またはアゾフェニル-p-ジイソシアネート(主にアミノ基と反応する); グルタルアルデヒド(いくつかの異なる側鎖と反応する)ならびにジスジアゾベンジジン(主にチロシンおよびヒスチジンと反応する)がある。

#### 【0046】

架橋試薬は、ホモ二官能性、すなわち、同じ反応を受ける2つの官能基を有するものでありうる。好適なホモ二官能性架橋試薬は、ビスマレイミドヘキサン(「BMH」)である。BMHは、2つのマレイミド官能基を含有し、これは、穏やかな条件(pH 6.5～7.7)下でスルフヒドリル含有化合物と特異的に反応する。2つのマレイミド基は、炭化水素鎖によって接続されている。したがって、BMHは、システイン残基を含有するポリペプチドの非可逆性架橋に有用である。

#### 【0047】

架橋試薬は、ヘテロ二官能性であってもよい。ヘテロ二官能性架橋剤は、2つの異なる官能基、例えば、それぞれ遊離アミンおよびチオールを有する2つのタンパク質を架橋する、アミン反応基およびチオール反応基を有する。ヘテロ二官能性架橋剤の例は、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(「SMCC」)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(「M

B S」)、およびスクシンイミド4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(「SMPB」)、MBSの拡張鎖類似体である。これらの架橋剤のスクシンイミジル基は、一級アミンと反応し、チオール反応性マレイミドは、システイン残基のチオールと共有結合を形成する。

#### 【0048】

架橋試薬は、水中で低溶解性を有することが多い。スルホネート基などの親水性成分を架橋試薬に添加して、その水溶性を改善することができる。スルホ-MBSおよびスルホ-SMCCは、水溶性のために修飾された架橋試薬の例である。

#### 【0049】

多くの架橋試薬は、細胞条件下で本質的に切断不可能であるコンジュゲートを生じる。しかし、いくつかの架橋試薬は、細胞条件下で切断可能なジスルフィドなどの共有結合を含有する。例えば、トラウト試薬、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(「DSP」)、およびN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(「SPDP」)は、周知の切断可能架橋剤である。切断可能架橋試薬を使用すると、標的細胞内への送達後に輸送ポリペプチドからカーゴ部分を分離することが可能になる。直接のジスルフィド連結も有用でありうる。

#### 【0050】

上記に論じたものを含めた多数の架橋試薬が市販されている。これらを使用するための詳細な指示書は、市販の供給業者から直ちに利用可能である。タンパク質架橋およびコンジュゲート調製についての一般的な参考文献は、Wong、CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING、CRC Press(1991年)である。

#### 【0051】

化学架橋は、スペーサーアームの使用を含みうる。スペーサーアームは、分子内の柔軟性をもたらし、またはコンジュゲート部分間の分子内距離を調整し、それによって生物活性を保存することに役立ちうる。スペーサーアームは、スペーサーアミノ酸、例えば、プロリンを含むポリペプチド部分の形態でありうる。あるいは、スペーサーアームは、「長鎖SPDP」(Pierce Chem. Co.、Rockford、IL.、カタログ番号21651H)などにおける架橋試薬の一部でありうる。

#### 【0052】

BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、L-アミノ酸のポリマー、D-アミノ酸のポリマー、または両方の組合せでありうる。例えば、様々な実施形態では、ペプチドは、Dレトロ-インベルソペプチドである。用語「レトロ-インベルソ異性体」は、配列の方向が逆転され、各アミノ酸残基の対掌性が反転されている直鎖ペプチドの異性体を指す。例えば、Jamesonら、Nature、368巻、744~746頁(1994年); Bradyら、Nature、368巻、692~693頁(1994年)を参照されたい。D-鏡像異性体と逆合成とを組み合わせることの正味の結果は、各アミド結合中のカルボニル基およびアミノ基の位置が交換され、一方、各アルファ炭素における側鎖基の位置が保存されることである。別段に具体的に述べられていない限り、本発明の任意の所与のL-アミノ酸配列は、対応する天然L-アミノ酸配列の配列の逆を合成することによって、Dレトロ-インベルソペプチドにされうると想定される。

#### 【0053】

あるいは、BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、環状ペプチドである。環状ペプチドは、当技術分野で公知の方法によって調製される。例えば、大環状化は、ペプチドのN末端とC末端との間、側鎖とN末端もしくはC末端との間[例えば、pH8.5で $K_3Fe(CN)_6$ を用いて](Samsonら、Endocrinology、137巻:5182~5185頁(1996年))、または2つのアミノ酸側鎖間でアミド結合を形成することによって達成されることが多い。例えば、DeGrado、Adv Protein Chem、39巻:51~124頁(1988年)を

参照されたい。

【0054】

BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、最新のクローニング技法を使用して容易に調製され、または固体状態法もしくは部位特異的変異誘発によって合成される場合がある。ドメインBH3ペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、ポリペプチドのドミナントネガティブ形態を含みうる。一実施形態では、天然のBH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、標準的なタンパク質精製技法を使用して適切な精製スキームによって細胞または組織源から単離することができる。別の実施形態では、BH3ドメインポリペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、組換えDNA技法によって生成される。組換え発現の代わりに、BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、標準的なペプチド合成技法を使用して化学的に合成することができる。

10

【0055】

様々な実施形態では、BH3ペプチドは、その二次構造、例えば、ヘリックス構造を維持する。ヘリックス安定化の方法は、当技術分野で公知である。

【0056】

好ましくは、BH3ペプチドは、安定なペプチドである。「安定な」とは、ペプチドが、製造を可能にするのに十分な、かつ本明細書で詳述する目的に有用であるように十分な時間にわたって化合物の完全性を維持する安定性を有することを意味する。例えば、ペプチドは、極性のおよび/または不安定な架橋を使用して共有結合的に安定化される(Phelanら、1997年、J. Am. Chem. Soc.、119巻:455頁; Leucら、2003年、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、100巻:11273頁; Brackenら、1994年、J. Am. Chem. Soc.、116巻:6432頁; Yanら、2004年、Bioorg. Med. Chem.、14巻:1403頁)。あるいは、ペプチドは、 $\alpha,\beta$ -二置換非天然アミノ酸含有アルキルつなぎ鎖を使用したメタセシスベースの手法を使用して安定化される(Schafmeisterら、2000年、J. Am. Chem. Soc.、122巻:5891頁; Blackwellら、1994年、Angew. Chem. Int. Ed.、37巻:3281頁)。好ましくは、ペプチドは、炭化水素ステープリングを使用して安定化される。ステーブルペプチドは、これらの形状、したがってこれらの活性が回復および/または維持されるように化学的に補強、または「ステーブルされた」ペプチドである。少なくとも2つの修飾アミノ酸を有するポリペプチドを安定に架橋すること(「炭化水素ステープリング」と呼ばれるプロセス)は、そのポリペプチドの天然の二次構造を立体配置的に授けるのに役立つ。例えば、アルファヘリックス二次構造をとりやすい性質があるポリペプチドを架橋すると、ポリペプチドをその天然アルファヘリックスコンホメーションに拘束することができる。拘束された二次構造は、タンパク質分解的切断に対するポリペプチドの耐性を増大させ、疎水性も増大させることができる。ステーブルBH3ペプチドは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれているWO05044839A2に記載されたように生成される。あるいは、BH3ペプチドは、環状ペプチドである。環状ペプチドは、当技術分野で公知の方法によって調製される。例えば、大環状化は、ペプチドのN末端とC末端との間、側鎖とN末端もしくはC末端との間[例えば、pH8.5で $K_3Fe(CN)_6$ を用いて](Samsonら、Endocrinology、137巻:5182~5185頁(1996年))、または2つのアミノ酸側鎖間でアミド結合を形成することによって達成されることが多い。例えば、DeGrado、Adv. Protein Chem.、39巻:51~124頁(1988年)を参照されたい。

20

30

40

【0057】

「単離」もしくは「精製」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、BH3ドメインペプチドが由来する細胞または組織源に由来する細胞材料もしくは他の夾雑タンパク質を実質的に含まず、または化学合成されるとき、化学的前駆体または他の化学物質を実

50

質的に含まない。「細胞材料を実質的に含まない」という言い回しは、タンパク質が、細胞（これからそのタンパク質が単離または組換え産生される）の細胞要素から分離されているBH3ペプチドおよび／または形質導入ドメインペプチドの調製物を含む。一実施形態では、「細胞材料を実質的に含まない」という言い回しは、約30%未満（乾燥重量による）の非BH3ドメインペプチドおよび／または非形質導入ドメインペプチド（「夾雑タンパク質」とも本明細書で呼ばれる）、より好ましくは約20%未満の非BH3ペプチドおよび／または非形質導入ドメインペプチド、さらにより好ましくは約10%未満の非BH3ペプチドおよび／または非形質導入ドメインペプチド、最も好ましくは約5%未満の非BH3ドメインペプチドおよび／または非形質導入ドメインペプチドを有するBH3ドメインペプチドおよび／または形質導入ドメインペプチドの調製物を含む。BH3ドメインペプチドおよび／もしくは形質導入ドメインペプチドまたはその生物学的に活性な部分が組換え産生されるとき、これはまた、好ましくは、培地を実質的に含まない、すなわち、培地は、タンパク質調製物の体積の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満を占める。

【0058】

「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言い回しは、タンパク質が、タンパク質の合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質から分離されているBH3ドメインペプチドおよび／または形質導入ドメインペプチドの調製物を含む。一実施形態では、「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言い回しは、約30%未満（乾燥重量による）の化学的前駆体または非BH3ドメインペプチドおよび／もしくは非形質導入ドメインペプチド化学物質、より好ましくは約20%未満の化学的前駆体または非BH3ドメインペプチドおよび／もしくは非形質導入ドメインペプチド化学物質、さらにより好ましくは約10%未満の化学的前駆体または非BH3ドメインペプチド化学物質、最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体または非BH3ドメインペプチドおよび／もしくは非形質導入ドメインペプチド化学物質を有するBH3ドメインペプチドおよび／または形質導入ドメインペプチドの調製物を含む。

【0059】

用語「生物学的に等価な」は、本発明の組成物が同じアポトーシス調節作用、すなわち、チトクロムCの放出またはBAKオリゴマー化の一部またはすべてを実際に行うことができることを意味することが意図されているが、ヒト、ラット、もしくはマウス起源のcDNAライブラリーから特定されるか、または組換え発現症状から産生される配列から演繹されるBH3ドメインポリペプチドと必ずしも同じ程度である必要はない。

【0060】

パーセント保存は、2つの残基が保存的置換（PAM250残基重み表中で0.3超またはそれに等しい対数オッズ値を有すると定義される）を示す位置のパーセンテージに同一の残基のパーセンテージを加えることによって、上方アライメントから計算される。保存は、同一性比較について上記に示した配列を基準とする。この要件を満たす保存的アミノ酸変化は、R - K；E - D、Y - F、L - M；V - I、Q - Hである。

【0061】

BH3ドメインペプチドは、ハイブリッドまたは改変形態がBH3ドメインペプチドの生物活性を保持する限り、融合タンパク質およびBH3ドメインペプチド断片を含めたBH3ドメインペプチドのハイブリッドおよび改変形態、ならびにある特定のアミノ酸が欠失し、または置き換えられたハイブリッドおよび改変形態、ならびに1つまたは複数のアミノ酸が修飾アミノ酸または異常アミノ酸に変更されている場合などの修飾、ならびにグリコシル化などの修飾を含むように意図されたBH3ドメインペプチドの誘導体も含むことができる。生物活性を保持するとは、細胞死がBH3ポリペプチドによって誘導されることを意味するが、ヒトまたはマウスについて同定され、例えば、組換えで産生させることができる天然に存在するBH3ドメインポリペプチドのものと必ずしも同じレベルの効力である必要はない。用語の誘導されるおよび刺激されるは、本明細書全体にわたって互換的に使用されている。

## 【0062】

好適なバリエーションは、1つまたは複数の予測される非必須アミノ酸残基で行われる保存的アミノ酸置換を有するものである。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられている置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝状側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸がある。したがって、BH3ドメインペプチド中の予測される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸残基と置き換えられる。あるいは、別の実施形態では、変異は、飽和変異誘発などによって、BH3コード配列のすべてまたは一部に沿ってランダムに導入することができ、結果として生じる変異体をスクリーニングして活性を保持する変異体を同定することができる。

10

## 【0063】

本明細書に記載のBH3ドメインペプチドに対する抗体との交差反応性によって単離されうる、あるいはゲノムDNA、mRNA、またはcDNAを含めたコードヌクレオチド配列が、ゲノムもしくはサブゲノムヌクレオチド配列の相補配列または本明細書のBH3ドメインペプチドのcDNAあるいはその断片とのハイブリダイゼーションによって単離されうる任意のBH3ドメインペプチドも実質的に相同の意味の中に含まれる。

20

## 【0064】

全細胞を使用してBH3プロファイリングを実施するためのキットも本発明内に含まれる。キットは、ミトコンドリア用バッファー（mitochondrial buffer）中に染色要素を含有するマルチウェルプレート、および分析のためにプレート中に細胞を懸濁させ、分注するためのミトコンドリア用バッファーのチューブからなる。マルチウェルプレートの各ウェルは、その最終濃度の2倍でJC-1色素、オリゴマイシン、2-メルカプトエタノール、ジギトニン、およびペプチドまたは低分子の混合物を含有し、任意選択で、プレートおよび懸濁バッファーチューブを、懸濁バッファーチューブとともに後に使用するために凍結させることができる。使用するために、プレートおよびバッファーチューブは解凍され、室温にされる。細胞は、バッファー中に懸濁され、プレートのウェル中に分注され、545nmで励起した590nmのJC-1赤色蛍光を使用して蛍光プレートリーダーで分析される。

30

## 【0065】

本発明を以下の非限定例においてさらに例示する。

## 【実施例】

## 【0066】

## （実施例1）

i BH3：FACSによる保持されたチトクロムcの直接測定によるBH3プロファイリング

40

i BH3は、以前のBH3プロファイリングのためのプロトコールに、重要な固定ステップを加えたものである。これにより、複雑な臨床試料中のサブセットを区別するのに、シグナルがより良好になり、試料安定性が増大し、染色が改善された。一次組織または細胞培養物を単細胞懸濁物に解離させ、細胞表面マーカーについて任意選択で染色し、DTMBミトコンドリア用バッファー中に懸濁させる（蛍光光度計またはFACSによる全細胞内のBH3プロファイリング。Methods、2013年4月20日。印刷前の電子出版）。次いで懸濁した細胞をジギトニン（透過化剤）を補充したDTMBおよびペプチドまたは低分子（試料チューブまたはプレート中に準備し、凍結させることができる）を含有するウェルに添加し、これによって、分子またはペプチドをミトコンドリアに接近

50

させ、透過化されたミトコンドリア外かつ細胞外にチトクロム c を自由に拡散させる。細胞を、短いアルデヒド固定、その後のトリス / グリシンバッファで中和の前にしばらくペプチド / 低分子に曝露する。次いで、抗チトクロム c 抗体を、サポニン、ウシ胎児血清、およびウシ血清アルブミンを含む濃縮物として各ウェルに添加して、細胞によって保持されたチトクロム c を染色する。細胞内標的に対する他の抗体を、この時添加することができる。細胞を、FACSによって分析してペプチドまたは低分子による擾乱後のチトクロム c の単細胞測定をすることによって、診断上の応答シグネチャーをもたらす（図 1 : i B H 3 は、混合集団における個々の亜集団のプロファイルを忠実に再現する）。個々に（非混合）または複合混合物（混合）としてプロファイルされた試料は、同じプロファイルを生じる。亜集団を区別するこの能力は、細胞内であっても細胞外であっても任意の抗原またはシグナルに適用することができる。

10

#### 【 0 0 6 7 】

これは、試料内の亜集団を分析することができるので、E L I S A に基づく B H 3 プロファイリングに対する改善であり、細胞外および細胞内マーカーの両方を使用してプロファイリングすることができる唯一の方法である。さらにこれは、ハイスループット形式でこの分析を実施することができ、電位差測定用色素を使用する生ミトコンドリア電位測定の時間感度を伴うことなく、予め作製された凍結試験プレートに使用することができる。

#### 【 0 0 6 8 】

##### （実施例 2）

M i c r o B H 3 : 免疫蛍光顕微鏡観察による単細胞 B H 3 プロファイリング

20

M i c r o B H 3 ( m i B H 3 ) は、B H 3 ペプチドのミトコンドリア効果の測定が、顕微鏡観察により個々の細胞に対してなされる B H 3 プロファイリング法である。これを達成するために、細胞は、ポリアミンまたはポリリシン被覆表面上に固定化され、ミトコンドリア用バッファ中の低濃度のジギトニンで処置されて、形質膜が透過化され、細胞の擾乱を伴うことなくミトコンドリアへの接近が認められる。固定された濃度の B H 3 ペプチドまたは化学化合物が、固定された時間、通常 4 5 ~ 9 0 分にわたって添加された後、チトクロム C、および M n S O D などのミトコンドリアマーカーの細胞内染色のために、ホルムアルデヒドで固定され、メタノールおよび / またはトリトン x - 1 0 0 によって透過化される。染色された細胞は、D A P I などの核染色剤で対比染色され、蛍光像が核、ミトコンドリア、およびチトクロム c のチャンネルにおいて得られる。C e l l p r o f i l e r などのソフトウェアを使用して自動分析が実施されて、核が位置特定され、ミトコンドリアを有する核に隣接する領域が画定され、次いでチトクロム c の存在がミトコンドリアの位置と相関付けられる。位置特定の喪失は、チトクロム c の喪失、およびペプチドまたは化合物に対する反応を示す。この方法は、単細胞レベルで、B H 3 ペプチドまたは化合物に対する細胞の応答を可能にし、これらのアポトーシス傾向またはプライミングを判定する。電位感受性蛍光色素を使用してミトコンドリアの完全性を分析する以前の方法は、インタクトな、透過化されていない細胞を使用し、B H 3 ペプチドは細胞浸透性でないのでこれに使用することができない。電位感受性で処置された透過化細胞は、形状を変化させ、必要な時間的経過にわたって焦点を保つことが困難であり、タイミングに敏感である。この方法による固定された細胞は、固定ステップで直ちに停止させることができ、取得から数週間後に分析したり、必要に応じて直ちに再分析したりすることができる。

30

40

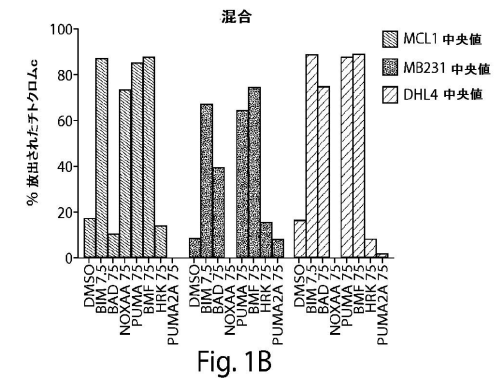
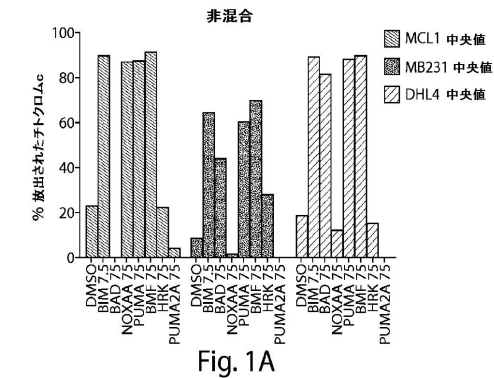
#### 【 0 0 6 9 】

##### 他の実施形態

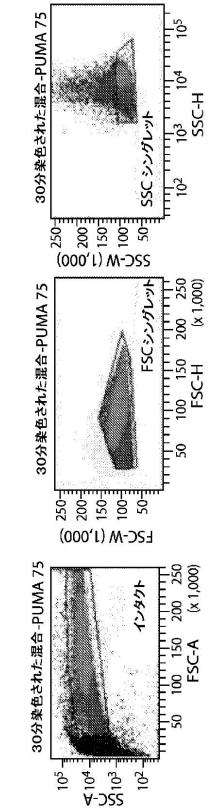
本発明をその詳細な説明と併せて記載してきたが、上記の説明は、例示であり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定しないことが意図されている。他の態様、利点、および改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。



【図 1】



【図 2 A】

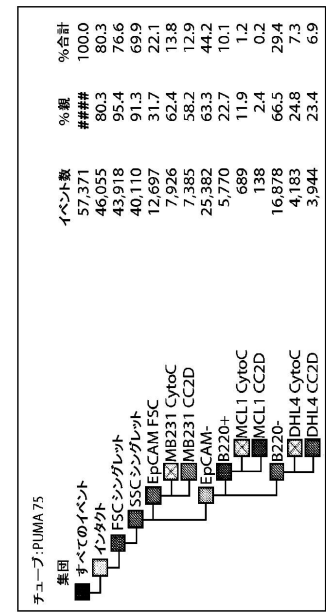


【図 2 B】

実験名: 20120826-JR-iH3-30min-Singles		2012年8月26日 3:05:45PM		実験日		OPI: 059eccc9e7d6-499b-a7f2f4edf22b...		GUID:	
サンプル名: 30分染色した混合		PUMA 75		CytoC APC-A		CytoC APC-A		CytoC APC-A	
グループ名:		PUMA 75		平均		中央値		標準偏差	
イベント数		% 観		平均		中央値		標準偏差	
すべてのイベント		#####		5,928		1,884		1,704	
インタクト		#####		6,442		2,167		1,710	
FSC シングル		#####		6,523		2,174		1,718	
SSC シングル		#####		6,566		2,006		1,502	
EPCAM FSC		#####		15,201		12,237		10,153	
MB231 CytoC		#####		21,380		18,834		9,231	
MB231 CC2D		#####		21,715		1,479		630	
EPCAM -		#####		1,915		1,794		611	
B220 +		#####		1,994		3,298		1,514	
MCL1 CytoC		#####		4,026		1,397		563	
MCL1 CC2D		#####		6,468		2,761		978	
DHL4 CytoC		#####		1,910		3,898		1,166	
DHL4 CC2D		#####		3,733		2,570		1,166	

Fig. 2-2

【図 2 C】



【図 2 D】

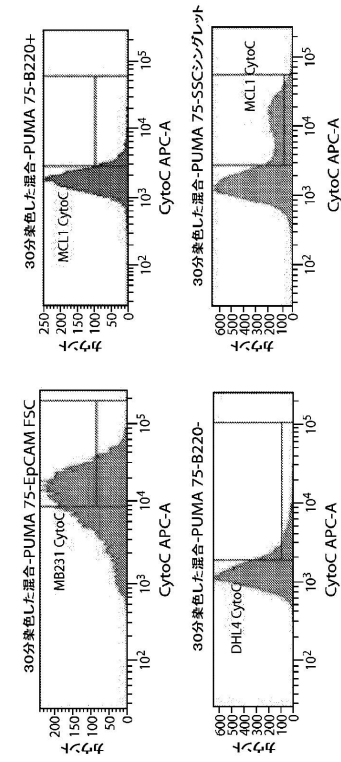


Fig. 2-4

【図 2 E】

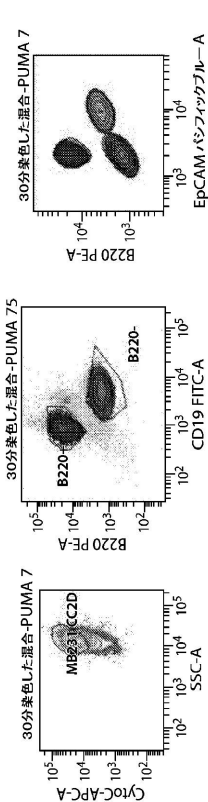


Fig. 2-5

【図 2 F】

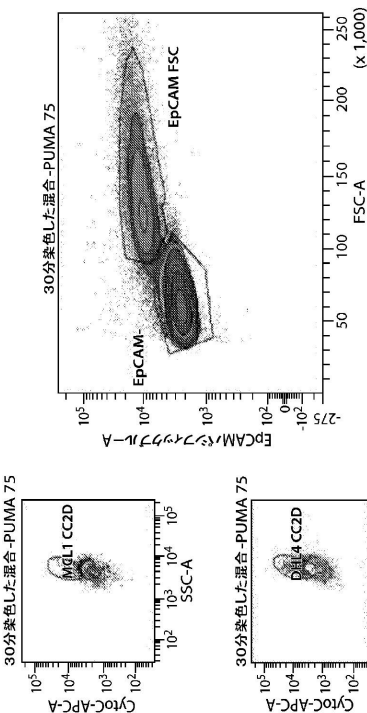


Fig. 2-6

【図 3】

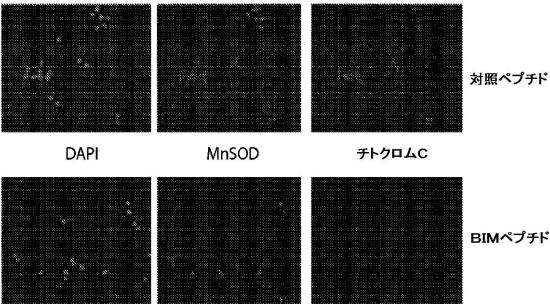


Fig. 3

【 図 4 】

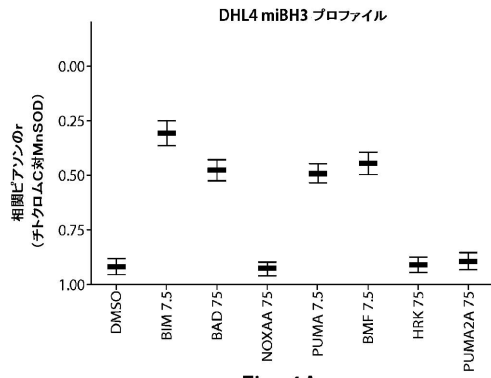


Fig. 4A

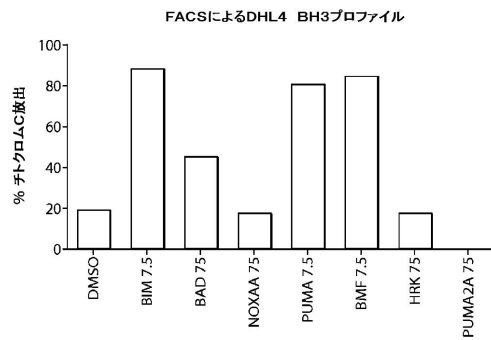


Fig. 4B

【 図 5 】

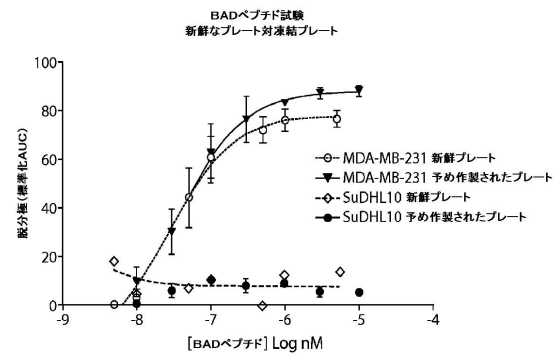


Fig. 5

【 配列表 】

0006663852000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 0 7 K 7/08 (2006.01) C 0 7 K 7/08

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ライアン, ジェレミー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 5, サマビル, ブロードウェイ 4 4 9, ユ  
 ニット 2

(72)発明者 レタイ, アントニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 5 2, メドフィールド, パイン ストリート 1  
 3 7

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 特表2 0 0 9 - 5 3 2 0 3 3 ( J P , A )  
 国際公開第2 0 0 6 / 0 9 9 6 6 7 ( W O , A 1 )  
 Cytometry Part A, 2006年, 69A, p.515-523  
 J. Cell Biol., 1999年, Vol.144, No.5, p.891-901  
 Methods, 2013年3月, Vol.61, p.138-145

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 4 8

G 0 1 N 3 3 / 5 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

W P I D S / W P I X ( S T N )

P u b M e d