【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成23年11月17日(2011.11.17)

【公表番号】特表2010-539933(P2010-539933A)
【公表日】平成22年12月24日(2010.12.24)
【年通号数】公開・登録公報2010-051
【出願番号】特願2010-526974(P2010-526974)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｑ　1/02　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　37/06　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　3/10　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　9/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　25/00　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　7/08　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/47　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/50　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/15　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｑ　1/02　ＺＮＡ
Ａ６１Ｋ　45/00
Ａ６１Ｋ　37/02
Ａ６１Ｐ　35/00
Ａ６１Ｐ　35/02
Ａ６１Ｐ　37/06
Ａ６１Ｐ　3/10
Ａ６１Ｐ　9/00
Ａ６１Ｐ　25/00
Ｃ０７Ｋ　7/08
Ｃ０７Ｋ　14/47
Ｇ０１Ｎ　33/50　Ｚ
Ｇ０１Ｎ　33/15　Ｚ

【手続補正書】
【提出日】平成23年9月26日(2011.9.26)
【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】
方法が、
ａ）ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを、当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節するのに適している条件下で化合物と接触させること；及び
ｂ）化合物による当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性の調節を検出すること

（ここにおいて、化合物は当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド中の活性部位と相互作用する）：
を含有してなる、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法。
【請求項２】
方法が、
ａ）ＢＡＸポリペプチドを、当該ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するのに適している条件下で化合物と接触させること；及び
ｂ）当該化合物による当該ＢＡＸポリペプチドの活性化を検出すること（ここにおいて、当該化合物は配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する）：
を含有してなる、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する化合物を同定する方法。
【請求項３】
方法が、
ａ）ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位の三次元構造を用いて、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド相互作用テンプレートを形成すること；及び
ｂ）当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド相互作用テンプレートを使用して、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド候補化合物を選択すること（ここにおいて、当該候補化合物は当該活性部位に結合する）：
を含有してなる、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの候補化合物を同定する方法。
【請求項４】
方法が、
ａ）ＢＡＸポリペプチドの活性部位の三次元構造を提供すること；
ｂ）当該活性部位と化合物の間の結合相互作用をシミュレートすること；及び
ｃ）当該化合物が、当該活性部位の配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７よりなる群から選ばれるアミノ酸残基と結合するか否かを確認すること（ここにおいて、活性部位の当該アミノ酸残基に結合する化合物は候補化合物である）：
を含有してなる、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する候補化合物を同定する方法。
【請求項５】
方法が、
ａ）標的ポリペプチドを、共有結合架橋可能部分を含有しているＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドと培養すること；
ｂ）当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドを当該標的ポリペプチドに架橋すること；及び
ｃ）当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドの当該標的ポリペプチドに対する相互作用部位を同定すること：
を含有してなる、標的ポリペプチド上の活性部位を同定する方法。

【請求項６】
方法が、
ａ）ＭＴＳＬ誘導体化ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドをＢＡＸに接触させること；及び
ｂ）ＮＭＲ分析を実施し、それによってＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドとＢＡＸの間の結合相互作用を確認すること：
を含有してなる、ＢＡＸ－ＢＨ３結合相互作用を確認する方法。
【請求項７】
ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドが共有結合架橋可能部分を含有してなる、ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド
【請求項８】
ＢＨ３ポリペプチドを含有してなる組成物であって、当該ＢＨ３ポリペプチドが、本質的に図７、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を包含している、組成物。
【請求項９】
ＢＡＸα－螺旋９ＳＡＨＢポリペプチドを含有してなる組成物であって、当該ポリペプチドは図１６ｂに記載のアミノ酸配列と４０％又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有しているか、又はその同類置換を含んでなる、組成物。
【請求項１０】
常磁性標識を有するＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドを含有してなる組成物。
【請求項１１】
配列番号１３に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はその同類置換を含有してなる、単離したポリペプチド。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【発明の名称】ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを調節する方法及び組成物
【技術分野】
【０００１】
（関連出願）
本出願は、２００７年９月２６日出願の米国仮特許出願第６０／９９５，５４５号及び２００８年４月１４日出願の同第６１／１２４，２２１号の優先権を主張する。上記出願の全ての教示は参照して本出願に組み込まれている。
【０００２】
（米国政府の権利の陳述）
本発明の資金援助は一部分米国国立衛生研究所に属する、国立心肺血液研究所（National Heart Lung and Blood Institute）の壁内研究プログラム（Intramural Reserach Program）からの支援によってなされた。従って、米国政府は本発明における及び本発明に対する幾らかの権利を有している。
【背景技術】
【０００３】
ＢＣＬ－２ファミリータンパク質相互作用は、アポトーシス、身体から損傷した又は不要な細胞を取り除くように意図された組織的な一連の事象、及び正常な発達並びに生命体の恒常性に重要な過程を調節する（Adams, J. M., and Cory, S. (1998), Science 281, 1322-1326; Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004), Cell 116, 205-219）。ＢＣＬ－２のようなマルチドメイン抗アポトーシスタンパク質は細胞死を防ぐのに対して、ＢＡＸのようなマルチドメインプロアポトーシスタンパク質はミトコンドリア損傷を介する細胞死への経路を構成する。マルチドメインアポトーシスタンパク質は、４つ以下のＢＣＬ－２相同（ＢＨ）ドメイン内で配列保存を提示するが、プロアポトーシスタンパク質の「

ＢＨ－３オンリー」サブセットは第３番目のＢＨドメインに対してのみ相同性を提示する。ＢＨ－３オンリータンパク質は、マルチドメインメンバーに細胞損傷の信号を送る体制にある、細胞内に置かれている死の歩哨として機能する。アポトーシス刺激の特質及び細胞状況によって、ＢＨ－３オンリータンパク質の死の信号はアンチアポトーシスタンパク質によって中和されるか又は、ミトコンドリア致死因子ＢＡＸ及びＢＡＫに直接的又は間接的に送達されるかの何れかである。活性化されると、これらのプロアポトーシスマルチドメインメンバーは、不可逆的に死のプログラムを実行する、カスパーゼを活性化するミトコンドリアの因子を放出可能にする、ミトコンドリア外膜の透過性上昇を誘発する（Green, D.R. (2005). Cell 121, 671-674）。

【０００４】

構造研究は、ＢＨ３リガンドの、アンチアポトーシスマルチドメインメンバーのＢＨ１、ＢＨ２及びＢＨ３ドメインを並列させて形成した疎水性溝への挿入を明らかにしている（Day, C.L., et al. (2005), J Biol Chem 280, 4738-4744; Denisov, A.Y., (2003), J Biol Chem 278, 21124-21128; Liu, X., et al. (2003), Immunity 19, 341-352）。最近の研究がＢＨ３ドメインのみを含むメンバー（ＢＨ３－オンリーメンバー）のそれらのアンチアポトーシスパートナーに対する結合特異性及びそれらの選択性のための構造基盤を明らかにした（Certo, M., Moore, et Al. (2006), Cancer Cell 9, 351-365; Chen, L., et al. (2005); Mol Cell 17, 393-403）。

ＢＨ３－オンリータンパク質はそれらの直接相互作用を介してアンチアポトーシスタンパク質に拮抗して、それによりＢＡＸ／ＢＡＫのアンチアポトーシス阻害を減少し、そして／或はＢＡＸ／ＢＡＫの直接活性化を可能にする結合型ＢＨ３－オンリーメンバーを競合的に置き換える。アンチアポトーシスタンパク質をそれらのプロアポトーシス活性（例えば、ＢＡＤ）のみに影響を及ぼすようにしむけるＢＨ３－オンリータンパク質はそれ故、「感作因子（sensitizers）」（Letai A., et al. (2002), Cancer Cell 2, 183-192）又は「抑制因子（derepressors）」（Kuwana, T., et al. (2005), Mol Cell 17, 525-535）と呼ばれている。

最近の酵母ツーハイブリッド法、免疫沈降法、及び生化学的研究は、ＢＡＸの活性化における、ＢＩＤ及びＢＩＭを含む、選択されたＢＨ３－オンリーメンバーの役割を立証している（Cartron, P.F., et al. Mol Cell 16, 807-818 (2004); Harada, H., et al. PNAS U S A 101, 15313-15317 (2004); Marani, M., et al. Mol Cell Biol 22, 3577-3589 (2002); Walensky, L.D., et al. Mol Cell 24, 199-210 (2006); Wang K., et al. Genes Dev 10, 2859-2869 (1996)）。

しかしながら、これらの「活性化因子(activator)」ＢＨ３－オンリータンパク質のＢＨ３ドメインと天然のＢＡＸタンパク質との間の直接結合親和性を測定できないこと、及びインビトロでＢＡＸの活性化を誘発するために活性化ＢＨ３ペプチドの５０マイクロモル以下を投与する必要があること（Kuwana, T., et al., (2005). Mol Cell 17,525-535; Kuwana, T., et al. (2002). Cell 111, 331-342）が、ＢＨ３が介在する直接ＢＡＸ／ＢＡＫ活性化経路の存在に関して不確実なものにしている。

実際に、このような相互作用を裏付ける結合及び構造データの欠如が、ＢＩＭ ＢＨ３のような、推定活性化因子ペプチドのプロアポトーシス能力が、今までに検討した全てのアンチアポトーシスタンパク質を効果的に中和するそれらの能力に代わりに反映しているかもしれないという仮説をもたらしている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明は、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質上の新規な調節部位を標的にしてＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド（例えば、ＢＡＸ）の活性を調節する方法、キット及び組成物を目的としている。本発明の方法及び化合物は、ＢＣＬ－２ファミリーの１つ又はそれ以上のポリペプチドの脱制御を特徴とする疾患を治療及び／又は予防するために有用である。その疾患は、早期細胞死（例えば、糖尿病、神経変性疾患、心臓発作、卒中）、又は病

的細胞生存（例えば、自己免疫疾患、癌）の状態を包含する。更に本発明の方法及び化合物は、過剰細胞増殖又は過剰細胞死（例えば、アポトーシス）に関連する非－ＢＣＬ－２関連疾患の治療においても有用である。本発明は、少なくとも一部分は、化合物に結合するとＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのアポトーシス活性を修正する、ＢＡＸのようなＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド上の新規な活性部位の同定に基づいている。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

第一の態様では、本発明はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法を目的としている。この方法は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを、そのポリペプチド中の活性部位に結合する化合物に接触させること、及びポリペプチドの調節された活性を検出すること、それによってＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド調節因子を同定することを含む。

【０００７】

更なる態様では、本発明は、ＢＡＸのような、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのアポトーシス活性を活性化又は阻害する化合物を同定する方法を目的としている。この方法は、例えば、ＢＡＸポリペプチドを、ＢＡＸ活性部位の、Ｇｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７を含む１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合するとＢＡＸを調節する（例えば、活性化する）化合物に接触させること、及びＢＡＸの生物活性の活性化又は阻害を検出すること、それによってＢＡＸの活性化因子又は阻害因子を同定することを含む。

【０００８】

更に別の態様では、本発明はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの候補調節因子を同定する方法を目的としている。この方法は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性化部位の三次元構造（例えば、相互作用テンプレート）の使用すること、及び化合物群からＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの候補調節因子を選択するためにこの三次元構造を用いることを必要とする。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合すると化合物は候補調節因子として同定される。

【０００９】

更なる態様では、本発明は、ＢＡＸのような、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのアポトーシス活性を活性化又は阻害する候補化合物を同定する方法を目的としている。例えば方法は、ＢＡＸポリペプチドの活性部位の三次元構造を提供すること；活性部位と化合物の間の結合相互作用をシミュレートすること；化合物が活性部位の、Ｇｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７を含む１つ又はそれ以上のＢＡＸ残基と結合するか否かを確認すること；を包含している。化合物が活性部位の１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合可能ならば化合物は候補化合物として同定される。

【００１０】

更に別の態様では、本発明は個人におけるＢＣＬ－２に関連する疾患を治療又は予防する方法を目的としている。この方法はそれを必要としている個人に、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合してそのアポトーシス又はその他の疾患関連活性を活性化又は阻害する化合物の薬理学的有効用量を投与することを包含している。

【００１１】
更に別の実施態様では、本発明は、ＢＡＸポリペプチドのアポトーシス活性を活性化又は阻害することによる、個人における脱制御アポトーシスの疾患（例えば、過剰増殖性疾患、糖尿病）を治療又は予防する方法を目的としている。この方法は、ＢＡＸ活性部位の、Ｇｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７を含む１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合してＢＡＸポリペプチドのアポトーシス活性を活性化又は阻害するＢＨ３ポリペプチド、又はその化学類似薬の薬理学的有効用量を、それを必要とする個人に投与することを必要とする。
【００１２】
別の態様では、本発明は、個人におけるＢＣＬ－２関連疾患を治療又は予防するための化合物を目的としている。この化合物は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合するとＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する。
【００１３】
更なる態様では、本発明は、個人における脱制御アポトーシスの疾患（例えば、過剰増殖性疾患、糖尿病）を治療又は予防する化合物を目的としている。この化合物は、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７を含む１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合すると、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化又は阻害するＢＨ３ポリペプチド又はその化学類似薬である。
【００１４】
更に別の態様では、本発明は、図８で表されるアミノ酸配列を伴うＢＩＭ ＢＨ３ポリペプチドを有する組成物を目的としている。更に別の態様では、本発明は、配列番号３に記載のアミノ酸配列と少なくとも４０％同一であり；相互作用残基Ｉｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｉｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３、又はそれらの保存アミノ酸置換を包含している；アミノ酸配列を伴う、ＢＩＭ ＢＨ３ポリペプチドを有する組成物を目的としている。更に別の態様では、本発明は、ＢＩＤ、ＰＵＭＡ、及び／又はＢＡＸのＢＨ３ドメインのような、ＢＡＸ上の活性部位に結合する代替えＢＨ３に４０％同一性を有する組成物を目的としている。
【００１５】
別の態様では、本発明は、別のＢＣＬ－２ファミリーメンバーにおける相同調節部位を同定するために、その配列及びＢＡＸ活性化部位の三次元構造を使用することを目的としている。例えば、ポリペプチド配列の三次元構造相似性又は合致に基づいて、ＢＡＸ活性化部位に相同する領域を同定して、次いで相互作用化合物のＢＣＬ－２ポリペプチドのアポトーシス活性を調節する能力について試験することがことができる。
【００１６】
別の態様では、本発明は、１つ又はそれ以上の架橋可能な部分を包含しているＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド及びそれを使用する方法を目的としている。例えば、架橋可能なＢＨ３ ＳＡＨＢを標的ポリペプチド上の活性部位を同定する方法において使用することができる。この方法は、標的ポリペプチドを、共有架橋可能部位を含んでいるＢＨ３ ＳＡ

ＨＢポリペプチドと共に培養すること、及びＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドを標的ポリペプチドに架橋すること、及びＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドの標的ポリペプチドに対する相互作用部位を同定することを含んでいる。

【００１７】

更に別の態様では、本発明は、上記化合物の何れかと使用説明書を含んでいるキットを目的としている。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】図１は、アポトーシス及びそれらの保存的ＢＣＬ－２相同（ＢＨ）ドメインの調節に関与するＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのうちの幾つかを説明している。

【図２】図２は、多数のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのＢＨ３ドメインのアミノ酸配列及び配置を説明している（表示順に、それぞれ、配列番号１５～３４）。

【図３】図３ａは、螺旋α１～α９を示すＢＡＸ構造を表すリボン図である。ＢＩＭ ＳＡＨＢ結合の影響を受けるＢＡＸ残基のＣ$^{\alpha}$原子を灰色の球体で示している。右図の表示は左図の表示を１８０度回転させていて、ＢＩＭ ＳＡＨＢの影響を受ける残基の殆どがタンパク質構造の一方の面にあることを示している。タンパク質構造の全てのリボン図は、ＭＯＬＭＯＬを用いて作成した。 図３ｂは、ＢＩＭ ＳＡＨＢ滴定での^{15}Ｎ－標識ＢＡＸにおける骨格アミドの化学シフト変化を記録している。化学シフト変化をＢＡＸの残基番号の機能としてプロットしている。有意な骨格アミド化学シフト変化（＞０．０１ｐｐｍ）を有する残基をオレンジ色に着色している。

【図４】図４ａは、ＢＡＸ結合部位を説明する表面図である。溶媒で露光した結合部位の残基が示されている。黄色の陰影は、疎水性残基Ｍ２０、Ａ２４、Ｌ２７，Ｉ３１、Ｉ１３３、Ｍ１３７、及びＬ１４１の側鎖を示している。赤及び青の陰影は、正電荷残基（Ｋ２１、Ｒ１３４）及び負電荷残基（Ｅ１３１）の側鎖をそれぞれ示している。緑色の陰影は、親水性残基（Ｑ２８、Ｑ３２）の側鎖を示している。 図４ｂは、ＢＩＭ ＳＡＨＢ－ＢＡＸ相互作用のＮＭＲ分析がＢＨ３が介在するＢＡＸ活性化のための新しい部位を明らかにしている。ＢＩＭ ＳＡＨＢは、ＢＡＸを、アンチアポトーシスタンパク質に対して同定されている標準的なＢＨ３結合部位とは異なる構造位置に組み込む。

【図５】図５は、ＢＩＭ ＳＡＨＢ相互作用部位を含有している残基（黄色で強調されている）及び立体構造変化による影響を受ける追加の残基（赤色で強調されている）、及び／又はＢＩＭ ＳＡＨＢ結合による別の相互作用を説明している全長のＢＡＸアミノ酸配列の一態様を説明している。

【図６Ａ－Ｄ】図６は、新規なＢＡＸ結合部位にあるＢＩＭ ＳＡＨＢの幾何学的配置である。 （ａ）ＢＩＭ ＳＡＨＢを、システイン残基をペプチドのＮ－又はＣ－末端の何れかに位置付けて、導入されたチオール基をＭＴＳＬと反応させてニトロキシドスピン標識に組み込ませて生成した常磁性に標識化した誘導体に変異させた（表示順に、それぞれ、配列番号３５～３７）。 （ｂ）ＢＡＸの交差ピーク強度比（ＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{W147C-MTSL}$［I_{ox}/I_{red}］／ＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{A164C-MTSL}$［I_{ox}/I_{red}］）対それぞれのＭＴＳＬ標識によって最大に影響を与えられている重要なＢＡＸ残基の残基数の比較プロットである。 （ｃ）ＢＡＸα１残基（例えば、Ｓｅｒ１６）は、ＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{(A164C-MTSL)}$の酸化形態（赤）及び還元形態（黒）を比較するＰＲＥ実験の影響を受ける（上図）のに対して、ＢＡＸα６残基（例えば、Ｄ１４２）は対応するＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{(W147C-MTSL)}$実験に影響を及ぼす（下図）ということを、相関スペクトルが明らかにしている。 （ｄ）ＰＲＥで得られた右から左方向に配置したＮ－末端からＣ－末端を用いて、α螺旋１と６に関してＢＩＭ ＳＡＨＢを約９０度に配列させた両方のＭＴＳＬ組み込み部位からの分子間距離を用いて作成された計算構造。

【図６Ｅ】（ｅ）ＢＡＸ及びＢＩＭ ＢＨ３上の新規な相互作用部位の間の複合体の計算構造。

【図７】図７は、ＢＡＸ、ＢＡＫ及びＢＣＬ－ｗのα１及びα６ドメインを説明している

。
【図８－１】図８は、多数のＢＩＭ ＳＡＨＢポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号３及び３８～８６）。
【図８－２】図８は、多数のＢＩＭ ＳＡＨＢポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号３及び３８～８６）。
【図９】図９は、多数のＢＩＤ ＳＡＨＢポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号４及び８７～９６）。
【図１０】図１０は、多数のＰＵＭＡ ＳＡＨＢポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号５及び９７～１０８）。
【図１１】図１１は、架橋アッセイで用いることができる多数のＢＩＭ、ＢＩＤ及びＰＵＭＡ ＳＡＨＢ誘導体を説明している。ＵはＢｐａであるが、その他の公知の架橋可能部分の何れもを示すことができる（表示順に、それぞれ、配列番号１０９～１４８）。
【図１２Ａ－Ｂ】ＢＩＭ ＳＡＨＢはインビトロでＢＡＸのオリゴマー化を直接開始して、ＢＡＸの機能的な放出活性を誘発する。 （ａ）単量体ＢＡＸのＢＩＭ ＳＡＨＢによる所定比での処理は、室温で１５分間培養した後の単量体－オリゴマー状態のサイズ排除クロマトグラフィーによるモニタリングに反映されているように、用量反応性のＢＡＸオリゴマー化を誘発した。 （ｂ）対応する比のＢＩＭ ＳＡＨＢ－ＢＡＸ混合物を６Ａ７抗体と共に培養した後、免疫沈降を行って、リガンドが誘発したＢＡＸのＮ－末端エピトープ（残基１２～２４）の露出、活性により観察されるＢＡＸにおける構造変化の兆候を評価した。
【図１２Ｃ－Ｄ】免疫沈降したＢＡＸの量は、ＢＩＭ ＳＡＨＢ－ＢＡＸの比に従って増大した。 ＢＩＭ ＳＡＨＢによるＢＡＸの特異的で強力な機能的活性化を更に、（ｃ）インビトロＦＩＴＣ－デキストランリポソーム放出アッセイ、及び（ｄ）ミトコンドリアチトクロームｃ放出によって明らかにする。
【図１３Ａ－Ｂ】ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸ活性化の特異性：点突然変異生成。 （ａ）その相互作用面をＢＡＸで突然変異させたＢＩＭ ＳＡＨＢ化合物のパネル（表示順に、それぞれ、配列番号３５、５５、６１及び６３）。 ＢＩＭ ＳＡＨＢの点突然変異生成は、（ｂ）野生型ＢＡＸをオリゴマー化して（ｃ）ＢＡＸが介在するチトクロームｃ放出を誘発する、その能力を無効にする。 （ｄ）ＢＡＸ Ｋ２１Ｅ及びＲ１３４Ｅ突然変異生成は、ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸのオルゴマー化を減弱する。
【図１３Ｃ－Ｄ】ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸ活性化の特異性：点突然変異生成。 （ａ）その相互作用面をＢＡＸで突然変異させたＢＩＭ ＳＡＨＢ化合物のパネル（表示順に、それぞれ、配列番号３５、５５、６１及び６３）。 ＢＩＭ ＳＡＨＢの点突然変異生成は、（ｂ）野生型ＢＡＸをオリゴマー化して（ｃ）ＢＡＸが介在するチトクロームｃ放出を誘発する、その能力を無効にする。 （ｄ）ＢＡＸ Ｋ２１Ｅ及びＲ１３４Ｅ突然変異生成は、ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸのオルゴマー化を減弱する。
【図１４Ａ－Ｃ】ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発したＢＡＸ活性化の特異性：連結スキャン 異なったｉ、ｉ＋４連結位置を有するＢＩＭ ＳＡＨＢ化合物のパネルを用いて、ＢＩＭ ＳＡＨＢの疎水性相互作用面に位置している連結だけがＢＡＸのオリゴマー化及びＢＡＸが介在するチトクロームｃ放出を妨害することを明らかにする。選択性は、ＢＡＸを活性化するためのＢＩＭ $SAHB_A$のように同一の連結位置を有しているにも関わらず、ＢＡＤ $SAHB_A$の無能力によっても協調される（表示順に、それぞれ、配列番号６９、７２、７４、３５、７６及び１４９）。
【図１４Ｄ】ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発したＢＡＸ活性化の特異性：連結スキャン 異なったｉ、ｉ＋４連結位置を有するＢＩＭ ＳＡＨＢ化合物のパネルを用いて、ＢＩＭ ＳＡＨＢの疎水性相互作用面に位置している連結だけがＢＡＸのオリゴマー化及びＢＡＸが介在するチトクロームｃ放出を妨害することを明らかにする。選択性は、ＢＡＸを活性化するためのＢＩＭ $SAHB_A$のように同一の連結位置を有しているにも関わらず、ＢＡＤ $SAHB_A$の無能力によっても協調される（表示順に、それぞれ、配列番号６９、７２、７４、３５、７６及び１４９）。

【図１５】図１５は、ＢＡＸ相互作用部位の突然変異が、ＢＡＸのオリゴマー化（ａ）、ＢＡＸが介在するチトクロームｃ放出（ｂ）、及びＢＡＸが再構成したＢａｘ－／－Ｂａｋ－／－マウス胚線維芽細胞のＢＩＭ ＳＡＨＢ及びスタウロスポリンの両方が誘発するアポトーシスを妨害することを説明している。
【図１６】図１６は、（ａ）ＢＡＸ ＢＨ３ ＳＡＨＢ（表示順に、それぞれ、配列番号１２及び１５０～１５５）及び（ｂ）ＢＡＸ螺旋９ＳＡＨＢ（表示順に、それぞれ、配列番号１４及び１５６～１６３）の例を説明している。
【図１７】図１７は、生理学的標的の共有結合捕獲のための多機能性ＳＡＨＢ化合物の化学設計を図示している。
【図１８】図１８は、（ａ）光解離性カルベン生成官能性及び（ｂ）光解離性ニトレン生成官能性で誘導体化したＳＡＨＢを説明している。
【図１９】ＢＩＭ ＳＡＨＢに結合するとＢＡＸ側鎖のＮＭＲ化学シフトは変化する。ＢＡＸのスペクトルを、等モルのＢＩＭ ＳＡＨＢの存在下及び非存在下で、それぞれ、赤及び青で着色してある。 （ａ）グルタミンのNH_2側鎖について交差ピークを示している$^{1}H-^{15}N$ ＨＳＱＣスペクトルのサブセット。Ｇｌｎ ２８、Ｇｌｎ３２、及びＧｌｎ５２について有意な差を観察できる。 （ｂ）$^{1}H-^{13}C$ ＣＴ－ＨＳＱＣスペクトルのイソロイシンの$C_{\gamma 2}$メチル基の領域。Ｉｌｅ３１－$C^{\gamma 2}-H_3$及びＩｌｅ１３３－$C^{\gamma 2}-H_3$について顕著な変化が見られる。
【図２０Ａ－１】図２０は、新規なＢＡＸ相互作用部位を結合するためのＢＩＭ ＢＨ３（配列番号３）、ＰＵＭＡ ＢＨ３（配列番号５）、及びＢＡＸＢＨ３（配列番号１６４）ドメイン中のコンセンサス配列（ｂ）の同定を含んでいる、（ａ）ＢＩＭ、ＢＩＤ、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、及びＢＣＬ－２のような、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのＢＨ３領域中のアミノ酸配列を説明していて、高度に保存されたアミノ酸は強調されている。
【図２０Ａ－２】図２０は、新規なＢＡＸ相互作用部位を結合するためのＢＩＭ ＢＨ３（配列番号３）、ＰＵＭＡ ＢＨ３（配列番号５）、及びＢＡＸＢＨ３（配列番号１６４）ドメイン中のコンセンサス配列（ｂ）の同定を含んでいる、（ａ）ＢＩＭ、ＢＩＤ、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、及びＢＣＬ－２のような、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのＢＨ３領域中のアミノ酸配列を説明していて、高度に保存されたアミノ酸は強調されている。
【図２０Ｂ】図２０は、新規なＢＡＸ相互作用部位を結合するためのＢＩＭ ＢＨ３（配列番号３）、ＰＵＭＡ ＢＨ３（配列番号５）、及びＢＡＸＢＨ３（配列番号１６４）ドメイン中のコンセンサス配列（ｂ）の同定を含んでいる、（ａ）ＢＩＭ、ＢＩＤ、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、及びＢＣＬ－２のような、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのＢＨ３領域中のアミノ酸配列を説明していて、高度に保存されたアミノ酸は強調されている。
【発明を実施するための形態】
【００１９】
Ｉ．定義
本明細書で用いられている用語「ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド」は、僅か１つから４つもの数の保存的ＢＣＬ－２相同ドメイン（ＢＨ１、ＢＨ２、ＢＨ３及び／又はＢＨ４）を有するタンパク質の進化的保存ファミリーを示す。このＢＨドメインはアルファ螺旋断片であって、ＢＣＬ－２ファミリーのアンチアポトーシス及びプロアポトーシスポリペプチドの両方に含まれる。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドは、ＢＣＬ－２、ＢＣＬ－Ｘ１、ＢＣＬ－ｗ、ＭＣＬ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３、ＣＥＤ－９、ＢＡＸ、ＢＡＫ、ＢＯＫ／ＭＴＤ、ＢＩＤ ＢＡＤ、ＢＩＫ／ＮＢＫ、ＢＬＫ ＨＲＫ ＢＩＭ／ＢＯＤ、ＢＮＩＰ３、ＮＩＸ、ＮＯＸＡ、ＰＵＭＡ、ＢＭＦ ＡＮＤ ＥＧＬ－１、及びウィルス性同族体を包含する。
【００２０】
用語「活性部位」は、その形状、アミノ酸含量及び帯電電位の結果として、様々な共有及び／又は非共有結合力によって、他の薬剤（これらに制限されないが、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、分子、化合物、抗生物質又は薬剤を含む）と有利に相互作用又は結合する、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの領域を示す。「活性部位」は疎水性パッ

チ及び、ヒト炭化水素が連結されているＢＩＭ ＢＨ３（配列番号３）のようなものであって、ＢＡＸのアルファ螺旋１及び６の並置に形成される、ＢＣＬ－２ドメインの安定化アルファ螺旋を結合できる荷電した親水性残基の周辺を包含する。活性部位は、α１－α２ループ及びＢＡＸの螺旋４由来のアミノ酸残基を更に包含する。

一態様では、活性部位は配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する２つ又はそれ以上のアミノ酸を包含する。

【００２１】

用語「ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド変異体」は、少なくとも１つのアミノ酸の付加、欠失又は置換によって参照のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドとは異なっているポリペプチドを示す。幾つかのアミノ酸は、下記のようにポリペプチドの活性の本質を変えずに、幅広く類似の特性を備えた他のものに変える（同類置換）ことができるということが当該技術分野で知られている。従って、本明細書で用いられているようなＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド変異体は、プロアポトーシス又はアンチアポトーシス活性を有するポリペプチドを包含する。

用語「変異体」は、タンパク質又はそれの他の何れかの機能ドメイン内にある、参照ＢＣＬ-２相同ドメインと少なくとも３０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を示す。より詳細には、用語「変異体」は、これに限定されないが、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する少なくとも２つのＢＡＸアミノ酸残基の相対的構造座標を含む三次元構造によって特徴付けられる活性部位を含有しているＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを包含し、何れの場合も、これらの残基の保存骨格原子からの＋／－標準偏差は最高１．１オングストローム、より好ましくは最高１．０オングストローム、そして最も好ましくは最高０．５オングストロームである。

【００２２】

「ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド変異体」は更に、ＢＣＬ－２相同ドメイン（例えば、ＢＨ３ドメイン）のアミノ酸配列と少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上類似しているアミノ酸配列を含有している、ポリペプチド又はその生物学的に活性な断片を包含する。

好ましい態様では、ＢＣＬ－２相同ドメインは、ＢＩＭ（配列番号２）のＬｅｕ９２、Ｇｌｙ９６及びＡｓｐ９７に対応するアミノ酸残基のような、１つ又はそれ以上の保存アミノ酸残基又はその同類置換を含有している。

【００２３】

用語「疎水性パッチ」は、疎水性部分に結合する活性部位の部分を示す。一態様では、疎水性パッチは１つ、２つ、３つ又はそれ以上の疎水性アミノ酸残基を含む。

ある特定の態様では、疎水性領域は配列番号１に記載の配列のＡｌａ２４、Ｍｅｔ２０、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｉｌｅ３１、Ｉｌｅ１３３、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１に対応するアミノ酸残基を含んでいる。

【００２４】

用語「荷電した／親水性の周辺」は、荷電した或は親水性の部分と結合する活性部位の部分を示す。一態様では、荷電した／親水性のパッチは、疎水性パッチを取り囲む１つ、２つ、３つ又はそれ以上の荷電した／親水性のアミノ酸残基を含有している。

ある特定の態様では、荷電した／親水性の周辺は配列番号１に記載の配列のＬｙｓ２１，Ｇｌｕ２８、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｇｌｎ５２、Ｇｌｕ１７、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ａｓｐ１４２、Ａｒｇ１４５、Ａｒｇ１４７に対応するアミノ酸残基を含有している。

【００２５】

用語「疎水性アミノ酸」は、相対的に水に不溶である荷電していない、非極性側鎖を有する天然又は非天然のアミノ酸又はその模倣物の何れかを意味する。天然由来の疎水性アミノ酸の例は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンである。

【００２６】

用語「親水性アミノ酸」は、相対的に水に可溶である荷電していない、極性の側鎖を有する天然又は非天然のアミノ酸又はその模倣物の何れかを意味する。天然由来の親水性アミノ酸の例は、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、及びシステインである。

【００２７】

用語「負電荷のアミノ酸」は、正常の生理的条件下で負に帯電する側鎖を有する天然又は非天然のアミノ酸又はその模倣物の何れかを包含する。負電荷の天然由来アミノ酸の例はアスパラギン酸及びグルタミン酸である。

【００２８】

用語「正電荷のアミノ酸」は、正常の生理的条件下で正に帯電する側鎖を有する天然又は非天然のアミノ酸又はその模倣物の何れかを包含する。正電荷の天然由来アミノ酸の例はアルギニン、リジン及びヒスチジンである。

【００２９】

用語「アンチアポトーシスポリペプチド」は、１つ又はそれ以上のアミノ酸相同ドメイン、ＢＨ１、ＢＨ２、ＢＨ３、及び／又はＢＨ４を有していて、アポトーシスを軽減又は阻害して細胞の生存を促進することを特徴としているＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを示す。「アンチアポトーシスポリペプチド」は更に、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド内のアンチアポトーシスＢＣＬ－２相同ドメインにアミノ酸配列が少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上類似しているようなタンパク質、又はその生物学的活性断片を包含する。

好ましい態様では、ＢＣＬ－２相同ドメインは、Ｂｃｌ－２（配列番号８）のＬｅｕ９７、Ｇｌｙ１０１及びＡｓｐ１０２に対応するアミノ酸残基のような、１つ又はそれ以上の保存的アミノ酸残基を含有している；アンチアポトーシスポリペプチドはＢＣＬ－２、ＢＣＬ－Ｘ１、ＢＣＬ－ｗ、ＭＣＬ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス性同族体を包含する。

【００３０】

用語「プロアポトーシスポリペプチド」は、ＢＨ１、ＢＨ２、及び／又はＢＨ３を包含する１つ又はそれ以上のアミノ酸相同ドメインを有していてアポトーシスを活性化して細胞死を促進することを特徴としているＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを示す。「プロアポトーシスポリペプチド」は更に、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド内のプロアポトーシスＢＣＬ－２相同ドメインにアミノ酸配列が少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上類似しているようなタンパク質、又はその生物学的活性断片を包含する。プロアポトーシスポリペプチドは、ＢＩＭ（配列番号２）のＬｅｕ９２、Ｇｌｙ９６及びＡｓｐ９７又はＢＩＭ（配列番号１）のＬｅｕ６３、Ａｌａ６７及びＡｓｐ６８に対応するアミノ酸残基のような、１つ又はそれ以上の保存的アミノ酸残基を有していると同定することができる

。プロアポトーシスポリペプチドは、ＢＡＸ、ＢＡＫ、ＢＯＫ／ＭＴＤ、ＢＩＤ ＢＡＤ、ＢＩＫ／ＮＢＫ、ＢＬＫ ＨＲＫ、ＢＩＭ／ＢＯＤ、ＢＮＩＰ３、ＮＩＸ、ＮＯＸＡ、ＰＵＭＡ、ＢＭＦ ＡＮＤ ＥＧＬ－１を包含する。

【００３１】

本明細書で用いられる用語「アポトーシス」は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）の分解、エンドヌクレアーゼ活性に不随していてもいなくてもよいクロマチンの凝縮、染色体移動、細胞核における辺縁趨向、アポトーシス小体の形成、ミトコンドリアの膨張、ミトコンドリアクリスタの拡張、ミトコンドリア透過性転移孔の開口及び／又はミトコンドリアプロトン勾配の消失のような、容易に観察できる形態学的かつ生化学的変化を特徴とする細胞死の選択的形成をもたらす生化学的事象の調整されたネットワークを示す。

【００３２】

用語「化合物」は、化学物質、ポリペプチド又はその組合わせ、又は化学化合物及び／又はポリペプチド、及び／又は核酸（例えば、ＤＮＡ及び／又はＲＮＡ誘導体）の混合物、それらの塩及び溶媒和物などを示すために本明細書で用いられている。好ましくは、本発明の化合物はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する。「調節因子」はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する化合物である。

【００３３】

用語「候補化合物」は、本発明の方法で試験されて、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合することが見出され、それによってＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節すると信じられている、化学物質、ポリペプチド又はその組合わせ、又は化合物及び／又はポリペプチド、及び／又は核酸の混合物、それらの塩及び溶媒和物などを示すために本明細書で用いられている。

【００３４】

化合物を参照して本発明で用いられる用語「調節する」は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのアンチアポトーシス又はプロアポトーシス活性、又は生化学的経路（例えば、変性タンパク質の応答、グルコース刺激インスリン分泌）を調整するＢＣＬ－２ファにリーメンバーの別のタンパク質－タンパク質相互作用を活性化又は阻害することを示す。

アンチアポトーシス、プロアポトーシスの両方及びその他の生化学的活性（例えば、変性タンパク質の応答、グルコース刺激インスリン分泌）を分析する方法は当該技術分野で周知であって、本明細書に記載されている。

【００３５】

本明細書で用いられている用語「相互作用する」又は「結合する」は、化合物又はその部分と、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド又はその部分の活性部位の間の、近接状態を示す。相互作用は化合物上の１つ又はそれ以上の部分と活性部位のアミノ酸上の１つ又はそれ以上の部位との間である。結合は非共有（ここで、並置は、水素結合、又はファンデルワールス若しくは静電気相互作用によればエネルギー的に有利である）であるか、又は共有であってよい。例えば、ＢＩＭ ＳＡＨＢのＩｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ｉｌｕ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｌａ１６１を含む疎水性アミノ酸残基はＢＡＸのＭｅｔ２０、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１及びＭｅｔ１３７を含む疎水性アミノ酸からなる疎水性の溝と結合するか又は相互作用する。同様に、ＢＩＭ ＳＡＨＢのＡｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ａｓｐ１５７及びＧｌｕ１５８のような荷電したアミノ酸残基は、ＢＡＸのＧｌｕ１３１、Ａｓｐ１４２、Ａｒｇ１３４及びＬｙｓ２１を含む荷電したアミノ酸残基と結合するか又は相互作用する。Ｎ１６０のような親水性ＢＩＭ ＳＡＨＢ残基は、Ｇｌｎ３２を含む親水性ＢＡＸ残基と結合するか又は相互作用する。

【００３６】

用語「活性化する」は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのアンチアポトーシス又はプロアポトーシス活性、又はタンパク質－タンパク質相互作用に基づいて別に定義された生化学的活性の増加を示す。プロアポトーシス活性を活性化する化合物はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合して、その化合物がないコントロールと比較すると

、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのプロアポトーシス活性を２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍又はそれ以上増加する。

別の態様では、アンチアポトーシス活性を活性化する化合物はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合して、その化合物がないコントロールと比較すると、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのアンチアポトーシス（生存）活性を２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍又はそれ以上増加する。アンチアポトーシス又はプロアポトーシス活性の活性化を評価する試験は当該技術分野において公知であって、本明細書に記載されている。

【００３７】

用語「阻害する」は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのアンチアポトーシス又はプロアポトーシス活性、又はタンパク質－タンパク質相互作用に基づいて別に定義された生化学的活性の減少又は阻止を示す。例えば、プロアポトーシス活性を阻害する化合物はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合して、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を阻止又は減少するであろう。従って、この化合物はプロアポトーシス活性を阻害又は減少するであろう。従って、プロアポトーシス活性、例えば細胞死が、その化合物が存在していないコントロール細胞集団と比較すると、阻害剤が存在している細胞集団において７５％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％以下又はそれ以下になるであろう。

【００３８】

アンチアポトーシス活性を阻害する化合物は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合して、アンチアポトーシス活性を阻止又は阻害するであろう。従って、アンチアポトーシス活性、例えば細胞生存率が、この化合物が存在していないコントロール細胞集団と比較すると、阻害剤が存在している細胞集団において７５％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％以下又はそれ以下になるであろう。

【００３９】

本明細書で用いられている用語「ＢＨ３　ＳＡＨＢ」は、安定化アルファ螺旋を形成できるように炭化水素が連結されているＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのＢＣＬ－２相同ドメイン３を示す。多くのＢＨ３ドメインのアミノ酸配列は本明細書に記載されている（例えば、図２）ようなものである。ＢＨ３　ＳＡＨＢを作成する方法は当該技術分野で公知であって、２００４年１１月５日に出願された米国特許公開第ＵＳ２００５／０２５０６８０号に記載され、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。

【００４０】

本明細書で用いられている用語「ＢＩＭ　ＢＨ３ポリペプチド」は、ＢＩＭのＢＣＬ－２相同ドメイン３を有しているポリペプチドを示す。一態様では、ＢＩＭ　ＢＨ３ポリペプチドは、配列番号３に記載の配列に；及び／又は図８に示されているようなアミノ酸配列に３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有していて、配列番号２に記載の配列のＬｅｕ９２、Ｇｌｙ　９６及びＡｓｐ９７；又は配列番号９に記載の配列のＬｅｕ１５２、Ｇｌｙ１５６及びＡｓｐ１５７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその同類置換を含んでいてもよい。好ましい態様では、ＢＩＭ　ＢＨ３ポリペプチドは配列番号３に記載のアミノ酸配列を有している。

【００４１】

本明細書で用いられている用語「ＢＩＤ　ＢＨ３ポリペプチド」は、ＢＩＤのＢＣＬ－２相同ドメイン３を有しているポリペプチドを示す。一態様では、ＢＩＤ　ＢＨ３ポリペプチドは、配列番号４に記載の配列に；及び／又は図９に示されているようなアミノ酸配列に３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有していて、配列番号６に記載の配列のＬｅｕ９０、Ｇｌｙ９４及びＡｓｐ９５に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその同類置換を含んでいてもよい。好ましい態様では、ＢＩＤ　ＢＨ３ポリペプチドは配列番号４に記載のアミノ酸配列を有している。

【００４２】
本明細書で用いられている用語「ＰＵＭＡ　ＢＨ３ポリペプチド」は、ＰＵＭＡのＢＣＬ－２相同ドメイン３を有しているポリペプチドを示す。一態様では、ＰＵＭＡ　ＢＨ３ポリペプチドは、配列番号５に記載の配列に；及び／又は図１０に示されているようなアミノ酸配列に３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有していて、配列番号７に記載の配列のＬｅｕ１４１、Ａｌａ１４５及びＡｓｐ１４６に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその同類置換を含んでいてもよい。好ましい態様では、ＰＵＭＡ　ＢＨ３ポリペプチドは配列番号５に記載のアミノ酸配列を有している。
【００４３】
本明細書で用いられている用語「ＢＡＸ　ＢＨ３ポリペプチド」は、ＢＡＸのＢＣＬ－２相同ドメイン３を有しているポリペプチドを示す。一態様では、ＢＡＸ　ＢＨ３ポリペプチドは、配列番号１２に記載の配列に；及び／又は図１６ａに示されているようなアミノ酸配列に３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有していて、配列番号１に記載の配列のＬｅｕ６３、Ａｌａ６７及びＡｓｐ６８に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその同類置換を含んでいてもよい。好ましい態様では、ＢＡＸ　ＢＨ３ポリペプチドは配列番号１２に記載のアミノ酸配列を有している。
【００４４】
本明細書で用いられている用語「ＢＨ３コンセンサス配列」は、配列番号１３の及び図２０ｂに示されているようなアミノ酸コンセンサス配列、又はその同類置換を有しているポリペプチドを示す。一般に、ＢＨ３ポリペプチドは配列番号１３に記載のアミノ酸コンセンサス配列を有していて、それはＢＩＭ、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ　ＢＨ３アミノ酸配列に少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上同一である。好ましい態様では、ＢＨ３ポリペプチドは配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含有している。更に好ましい態様では、ＢＨ３ポリペプチドはアルファ螺旋構造を形成するために炭化水素が連結されている。
【００４５】
本明細書で用いられている用語「ＢＡＸα－螺旋９ポリペプチドは、ＢＡＸの螺旋９を有しているポリペプチドを示す。一態様では、ＢＡＸα－螺旋９ポリペプチドは、図１６ｂに示されているようなアミノ酸配列に３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有している。
【００４６】
用語「薬理学的有効量」、「治療有効量」、「薬理学的有効用量」又は単に「有効量」は、意図した薬理学的、治療又は予防の結果を生じるのに有効な薬剤の量を示す。薬理学的有効量は、疾患の１つ又はそれ以上の症状の緩和をもたらし、又は疾患の進展を阻止し、或は疾患の退行をもたらす。例えば、疾患又は過剰な細胞生存或は増殖の治療については、治療有効量は、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも１００％、腫瘍生育速度を減少し、腫瘍量を減少し、転移の数を減少し、腫瘍の進展時間を延長し、又は生存期間を延長する治療剤の量を示すことが好ましい。
【００４７】
例えば、細胞死が増大する疾患、例えば虚血の治療に関しては、治療有効量は、治療を施さなかったら生じ得る組織及び／又は細胞の損傷を阻止又は制限する治療剤の量を示すことが好ましい。治療剤は、本発明の治療剤の投与を行わずに生じる損傷に比べると、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少

なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも１００％、組織及び／又は細胞の損傷を減少する。

【００４８】

本明細書で疾患（例えば、過剰増殖性疾患、過剰な細胞生存或は増殖）に関連して本明細書で用いられている用語「治療する」、及び「治療すること」は、動物おける病的細胞（例えば、過剰増殖性又は腫瘍性細胞）の発生の減少を示す。予防は、対象において病的細胞の完全な、例えば全体的欠損であってよい。予防は、対象において病的細胞の発生が、本発明を用いずに発生するであろうものより少ないというように、不完全であってもよい。ある態様では、このような用語は、１つ又はそれ以上の治療（１）癌細胞集団の安定化、減少又は除去、（２）寛解期間の延長、（３）癌の再発率の減少、（４）癌の再発までの期間の延長、及び（６）患者の生存率の増大；の投与後の１つ、２つ、３つ又はそれ以上の結果を示す。

【００４９】

増大した細胞死に関連する疾患、例えば、虚血に関して本明細書で用いられている用語「治療する」、及び「治療すること」は、動物における組織及び／又は細胞の損傷の発生の減少を示す。予防は、例えば、対象における組織損傷の完全な、例えば全体的非存在であってよい。予防は、対象において組織損傷の発生が、治療剤なしで発生するであろうものより少ないというように、不完全であってもよい。

【００５０】

本明細書で用いられている「ＢＣＬ－２関連疾患」は、脱制御されたＢＣＬ－２ファミリーメンバーに関連する疾患を示す。ＢＣＬ－２関連疾患は過剰な細胞の生存及び／又は増殖、例えば、癌、又は過剰な細胞死、例えば、アルツハイマー病、に関連している。ＢＣＬ－２関連疾患は本明細書に記載されているようなものを包含する。

【００５１】

本明細書で用いられている「過剰増殖性疾患」は、癌、腫瘍性成長、過形成性又は増殖性生育、又は異常細胞発達の病的状態を意味して、固形腫瘍、非固形腫瘍、及び白血病に見られるような、異常な細胞増殖又は蓄積を包含する。

【００５２】

本明細書で用いられる「抗癌剤」及び「抗腫瘍薬」は、癌のような過剰増殖疾患の治療に用いられる、何れかの治療剤（例えば、化学療法化合物及び／又は分子療法化合物）、アンチセンス治療薬、核酸治療薬（例えばＲＮＡｉ）、放射線療法剤を示す。一態様では、本発明は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの、本明細書に記載されているような、活性部位に結合する抗癌剤及び化合物の有効用量を投与することを含有してなる、ＢＣＬ－２関連疾患を治療する方法を目的としている。

【００５３】

本明細書で用いられている用語「構造座標」は、分子又は分子複合体における、他の分子に対する分子の空間関係に対応するデカルト座標を示す。構造座標は、Ｘ線結晶学技術又はＮＭＲ技術を用いて得ることができるか、又は分子置換分析又はホモロジーモデリングを用いて導き出すことができる。多種のソフトウェアプログラムは、分子又は分子複合体の三次元表示を得るために、構造座標セットのグラフ表示を可能にしている。ＢＣＬ－２ファミリーメンバーの構造座標は当該技術分野で公知であって、公的に入手できる。

【００５４】

用語「相互作用テンプレート」は、分子又は分子複合体における、他の分子に対する分子の空間関係に対応するデカルト座標を用いて構築された三次元モデルである。Ｘ線結晶学技術又はＮＭＲ技術を用いて得ることができるか、又は分子置換分析又はホモロジーモデリングを用いて導き出すことができる。多種のソフトウェアプログラムは、分子又は分子複合体の三次元表示を得るために、構造座標セットのグラフ表示を可能にしている。Ｂ

ＣＬ－２ファミリーポリペプチドの構造座標は当該技術分野で公知であって、例えば、Protein Data Bank（「ＰＤＢ」）（Research Collaboratory for Structural Bioinfomatics; http://www.rcsb.org）から入手できる。例えば、公知のＢＣＬ－２ファミリー構造座標は、ＢＡＸ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．１ｆ１６）、ＢＡＫ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．２ｉｍｓ）、ＢＣＬ－２（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．１ｇ５ｍ）、ＢＩＭ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．２ｐｑｋ）及びＢＣＬ－ＸＬ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．１１ｘ１）、本発明に関連するものに加えて：ＢＩＭ ＢＨ３－ＢＡＸ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．２ｋ７ｗ）、更に当該技術分野で公知のその他のものも包含する。

【００５５】

相互作用テンプレートは、配列番号１に示されているアミノ酸配列を有するＢＡＸポリペプチドのものが好ましく、そこではＢＡＸポリペプチドの活性部位が溶媒に感受性であって、調節因子、例えば活性化因子との相互作用に使用可能である。ＢＡＸのこの三次元形態は、活性部位に結合する化合物の同定を容易にするために用いられる。本明細書で用いられる「相互作用テンプレート」は、ＢＡＸの配列／構造整合を別のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドと比較することによって作成されたテンプレートを包含する。保存及び非保存残基の同定は、当業者が、他のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド中の対応する活性部位を同定すること、及びポリペプチドの調節因子を設計／スクリーニングすることを可能にする。

【００５６】

本明細書でアミノ酸の位置、例えば配列番号１に記載の配列のＡｌａ１４９、に関して用いられているような、用語「～に対応する」は、第一ポリペプチドと参照ポリペプチドの配列を相同性又は別のアリゴリズム（例えば構造比較）によってアラインメントするときに、参照ポリペプチド配列、例えばＢＡＫ、中の所定のアミノ酸と一致する第一ポリペプチド配列、例えばＢＡＸ、中のアミノ酸を示す。例えば、配列番号２に記載の配列のＬｅｕ９２は、配列番号６に記載の配列のＬｅｕ９０及び配列番号７に記載の配列のＬｅｕ１４１に対応する。同様に、配列番号２に記載の配列のＧｌｙ９６は配列番号６に記載の配列のＧｌｙ９４及び配列番号７に記載の配列のＡｌａ１４５に対応する。このアラインメントは、この目的のためにデザインされたソフトウェア、例えばＢＬＡＳＴＰ バージョン２．２．２をこのバージョン用のデフォルトパラメータと共に用いて、当業者によって実行される。対応するアミノ酸は、第一ポリペプチド配列と第二ポリペプチド配列の構造比較によっても特定することができる。このような構造比較は当該技術分野で公知であって本明細書に記載されている。例えば、Petros et al. Biochimica et Biophysica Acta 1644;83-94 (2004) 及び Suzuki et al., Cell. 103:645-654 (2000) は、ＢＣＬ－２ファミリーメンバー中のＢＣＬ－２相同ドメイン間の構造アラインメントを説明している。

【００５７】

用語「アミノ酸」は、アミノ基とカルボキシル基の両方を含有している分子を示す。適切なアミノ酸は、これに限定されないが、ペプチド中に見出される２０の一般的な天然由来アミノ酸（例えば、Ａ、Ｒ、Ｎ、Ｃ、Ｄ、Ｑ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｋ、Ｍ、Ｆ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｗ、Ｙ、Ｖ（１文字略語として知られているような）、更に有機合成又は他の代謝経路によって生産される天然由来及び非天然由来のアミノ酸のＤ－及びＬ－異性体の両方を包含する。

【００５８】

「非－必須」アミノ酸残基は、そのＢＡＸ結合能を消失若しくは実質的に変化させることなく、ポリペプチド（例えば、ＢＩＭ ＢＨ３）の野生型配列から変えることができる残基である。「必須」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型から変えると、ポリペプチドのＢＡＸ活性部位への結合活性の消失又は実質的な消失をもたらす残基である。ＢＨ３ドメインの必須及び非－必須アミノ酸残基は、当該技術分野で公知で本明細書に記載されている方法によって容易に確認することができる。本明細書で用いられている用語「必須」アミノ酸残基は、必須アミノ酸の同類置換を包含する。一般に、「必須」アミノ酸残基

はＢＨ３ポリペプチドの相互作用面（ＢＡＸと相互作用する残基）で見出される。
【００５９】
「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換わっていることである。例えば、類似の側鎖を有しているアミノ酸残基のファミリーが当該技術分野において定義されている。これらのファミリーは塩基性側鎖（例えば、リジン、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）、非荷電の極性側鎖（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）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（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）を含んでいるアミノ酸を包含する。その他の保存アミノ酸置換は、ペプチドの電荷を修正するためにアスパラギンをアスパラギン酸に置換するときのように、アミノ酸側鎖ファミリー全体にわたって生じてもよい。従って、ＢＨ３ドメインポリペプチドにおける予測される非－必須アミノ酸残基を、例えば、同じ側鎖ファミリー又はファミリー全体にわたる同族（例えば、アスパラギンをアスパラギン酸に、グルタミンをグルタミン酸に）由来の別のアミノ酸残基で置き換えることが好ましい。更に、コードされる配列中の単一アミノ酸又はアミノ酸の僅かな部分を修正、付加又は抹消するそれぞれの置換、削除又は付加も「同類置換」と考えられる。
【００６０】
２つ又はそれ以上の核酸又はポリペプチド配列に関連している用語「同一の」又は「パーセント同一の」は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの１つを用いるか、又は目視検査によって測定するように、最大一致について比較及びアラインメントしたときに、同一であるか、又は特定の割合の同一であるヌクレオチド又はアミノ酸を有する、２つ又はそれ以上の配列又は部分配列を示す。
【００６１】
２つ又はそれ以上のポリペプチドに関連している「類似」又は「パーセント類似」は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの１つを用いるか、又は目視検査によって測定するように、最大一致について比較及びアラインメントしたときに、同一であるか、又は特定の割合の同一であるアミノ酸残基又はその同類置換を有する、２つ又はそれ以上の配列又は部分配列を示す。例を挙げると、以下で検討されているように、第１領域中に含まれる数と等しい数のアミノ酸の何れかの配列と比較したとき、又は当該技術分野で公知のコンピューター同一性プログラムによってアラインメントされているアンチアポトーシスＢＣＬ－２ファミリーメンバータンパク質のアラインメントと比較したときに、第２アンチアポトーシスＢＣＬ－２ファミリーメンバータンパク質の領域と第１領域のアミノ酸配列が、少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、９０％、又は９５％も同一又は同類置換されていならば、第１タンパク質領域は、アンチアポトーシスＢＣＬ－２ファミリーメンバータンパク質の領域と類似していると考えられ得る。第１タンパク質及び第２タンパク質のポリペプチド領域が、例えば図２で示されているように、１つ又はそれ以上の保存的アミノ酸を包含していることが好ましい。
【００６２】
ＩＩ．説明
本発明は、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質上の新規な調節部位を標的にすることによってＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する方法、キット及び組成物を目的としている。本発明の方法及び化合物は、ＢＣＬ－２ファミリーの１つ又はそれ以上のポリペプチドの脱制御を特徴とする疾患（例えば、過剰増殖疾患）を治療又は予防するのに有用である。更に、本発明の方法及び化合物は、過剰な細胞増殖又は生存、又は過剰な細胞死（例えば、アポトーシス）に関連する、ＢＣＬ－２に関連していない疾患の治療においても有用である。本発明は、少なくともその一部が、化合物が結合すると、ＢＡＸポリペプチドのアポトーシス活性を修正する、ＢＡＸポリペプチド上の活性部位の同定に基づいている。少なくとも一部は、この活性部位の同一性及び位置は、炭化水素が連結されて

いる活性化因子であるＢＨ３ペプチドの活性部位への特異的結合活性によって明らかにされた。この活性部位の封鎖はＢＡＸが誘発する細胞死を抑制するのに対して、リガンドの関与がＢＡＸ介在アポトーシスを誘発する。

【００６３】

第１の態様では、本発明はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法を目的としている。この方法は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドをポリペプチドの活性部位に結合する化合物と接触させること、及びポリペプチドの調節された活性を検出すること、それによりＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの調節因子を同定することを含んでいる。

【００６４】

ＢＡＸの活性部位に対応する活性部位を有しているＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドは何れも、本明細書に記載されているように、本発明の実施に有用である。ＢＡＸ活性部位に対応する非－ＢＡＸ ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位は、ＢＡＸと試験分子の間のアミノ酸配列アラインメントによって、構造比較によって、又はこれらの組合わせによって同定できる。そのような方法は当業者に公知であり、本明細書に記載されている。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドは、プロアポトーシス又はアンチアポトーシスＢＣＬ－２ファミリーメンバーの何れであってもよい。適切なプロアポトーシスポリペプチドは、これに限定されないが、ＢＡＸ、ＢＯＫ及びＢＡＫを包含する。適切なアンチアポトーシスポリペプチドは、これに限定されないが、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘｌ、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス性同族体を包含する。方法は細胞中で又は無細胞系で実施することができる。細胞中で実施するときは、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを、内因性核酸によって又は細胞に外から加えた（例えば、形質転換された）核酸によってコードすることができる。

【００６５】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位は、ＢＩＭ ＢＨ３、ＢＩＤ ＢＨ３、ＰＵＭＡ ＢＨ３、ＢＡＸ ＢＨ３、又はＢＣＬ－２ドメインのその他の安定化アルファ螺旋（すなわち、ＳＡＨＢ）を結合可能な接合部分であって、ＢＡＸのアルファ螺旋１及び６の並置によって形成される。活性部位は、疎水性パッチ及び荷電アミノ酸の周囲を包含する。

好ましい態様では、活性部位は、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応するアミノ酸を包含する。

【００６６】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを調節する化合物は、ポリペプチドの活性部位に結合する、有機化合物又はポリペプチド又はそれらの組合わせであってよい。化合物は、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する活性部位の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその他の隣接残基と結合することが好ましい。

【００６７】

活性部位に結合して構造を変えるその他の隣接残基は、配列番号１に記載の配列の６、

７、９、１４、１８、２１、２３、２６、３４－３５、３６、４０－４２、４４－４６、５７、６３、７１、８３－８６、１０８、１１８、１２１、１２６、１３２、１３６、及び１４４に対応するアミノ酸残基を包含する。

一態様では、化合物はＢＨ３領域のポリペプチドである。適切なＢＨ３領域のポリペプチドは、ＢＨ３領域を含有する何れかのＢＣＬ－２ポリペプチド由来であってよい（例えば、図１及び図２）。例えば、適切なＢＨ３領域のポリペプチドは、Ｂｉｍ、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｌｋ、Ｈｒｋ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｂｎｉｐ３、Ｎｉｘ、Ｎｏｘａ、Ｐｕｍａ、Ｂｍｆ又はＥｇｌ－１、又はＢＨ３ドメインを含有している別の何れかのＢＣＬ－２ポリペプチドに由来していてよい。

【００６８】

一態様では、化合物は、配列番号３に記載の配列に９５％同一のアミノ酸配列を有しているＢＨ３領域のポリペプチドであって、配列番号９に記載の配列のＡｒｇ１５３に対応するアミノ酸残基、又はその同類置換を有している。

【００６９】

更なる態様では、化合物は配列番号９に記載の配列のＩｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｉｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３に対応するアミノ酸残基を有している。

好ましい態様では、適切なＢＨ３領域のポリペプチドはプロアポトーシスタンパク質ＢＩＭ（配列番号２、配列番号９）又はＢＩＤ（配列番号６）又はＰＵＭＡ（配列番号７、配列番号１０）又はＢＡＸ（配列番号１）由来である。

【００７０】

更により好ましい態様では、化合物はＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢ ポリペプチド（図８及び配列番号３）、ＢＩＤ ＢＨ３ ＳＡＨＢ ポリペプチド（図９及び配列番号４）、ＰＵＭＡ ＢＨ３ ＳＡＨＢ ポリペプチド（図１０及び配列番号５）、又はＢＡＸ ＢＨ３ ＳＡＨＢ（図１６及び配列番号１２）である。ＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢ ポリペプチドは安定化したアルファ螺旋構造を有するように炭化水素が連結されている。ＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢを作成する方法は当該技術分野で公知であって、２００４年１１月５日に出願された米国特許出願公開第ＵＳ２００５／０２５０６８０号に記載されており、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。

【００７１】

本発明のこの態様は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性の変化（例えば、調節）を検出することを含んでいる。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドは一般にプロアポトーシス活性又はアンチアポトーシス活性の何れかを有しているが、生理学的に重要な別の生化学的経路のタンパク質相互作用にも関与している（Danial, N.N., et al. Nature 424(6951), 952-956 (2003)., Zinkel, S.S., et al. Cell 122(4), 579-591 (2005)）。

一態様では、この調節はプロアポトーシス活性を対象にしている。プロアポトーシスの調節は、活性化（例えば、アポトーシスの増大、細胞死）又は阻害（アポトーシスの減少、細胞生存）の何れであってもよい。

別の態様では、調節はアンチアポトーシス活性を対象にしている。アンチアポトーシスの調節は、活性化（細胞生存の増大、アポトーシスの減少）又は阻害（アポトーシスの増大、細胞死）の何れであってもよい。

調節された活性は、これに限定されないが、二量化、オリゴマー形成又は立体構造状態の変更、１つの細胞内コンパートメントから別のコンパートメントへの転座、ミトコンドリアのチトクロームｃ放出、細胞死、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアのカルシウム取り込み、ミトコンドリアの膜貫通定量、及びカスパーゼ３活性又はアネキシンＶ結合の定量を含む、当該技術分野で公知であって本明細書に記載されている多くの方法によって検出することができる

【００７２】

更なる態様では、本発明はＢＡＸポリペプチドのアポトーシス活性を活性化又は阻害す

る化合物を同定する方法を目的としている。方法は、ＢＡＸポリペプチドを、ＢＡＸ活性部位のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７の１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合するとＢＡＸを活性化又は阻害する化合物と接触させること、及びＢＡＸのプロアポトーシス活性の活性化又は阻害を検出すること、それによってＢＡＸ調節因子を同定することを含んでいる。

【００７３】

更に別の態様では、本発明はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの候補調節因子を同定する方法を目的としている。この方法は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位の３次元構造（例えば、相互作用テンプレート）を用いること、及び化合物群からＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの候補調節物質を選択するために三次元構造を利用することを必要としている。本明細書に記載されているＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合すると、化合物は候補調節物質として同定される。

【００７４】

本明細書に記載されているような、ＢＡＸ活性部位に対応する活性部位を有するＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドは何れも本発明のこの態様を実施するのに有用である。ＢＡＸ活性部位に対応するＢＡＸではないＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位は、ＢＡＸと試験分子との間のアミノ酸配列のアラインメントによって、構造比較によって、又はこれらの組合わせによって同定できる。このような方法は当業者に公知であって、本明細書に記載されている。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドはプロアポトーシス又はアンチアポトーシスファミリーメンバーの何れかであってよい。適切なプロアポトーシスポリペプチドは、これに限定されないが、ＢＡＸ、ＢＯＫ及びＢＡＫを包含する。適切なアンチアポトーシスポリペプチドは、これに限定されないが、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス性同族体を包含する。

【００７５】

一態様では、三次元構造はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの全長からなっている。別の態様では、三次元構造は活性部位を含んでいるＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの断片からなっている。

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位は、荷電した疎水性の残基の周辺で囲まれている中心となる疎水性表面を含んでいて、ＢＩＭ ＢＨ３、ＢＩＤ ＢＨ３、ＰＵＭＡ ＢＨ３、ＢＡＸ ＢＨ３、又はＢＣＬ－２ドメインの別の安定化されたアルファ螺旋と結合でき、そしてＢＡＸのアルファ螺旋１及び６の並置によって形成されている。活性部位は、疎水性パッチ及び荷電した疎水性のアミノ酸の周辺の両方を有している。

好ましい態様では、活性部位は、これに限定されないが、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｎ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応するアミノ酸を包含する。

別の態様では、活性部位は配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応するアミノ酸残基を包含する。

【００７６】

候補調節物質は、ポリペプチドの活性部位に結合する、有機化合物又はポリペプチド、又はこれらの組合わせの何れであってもよい。候補調節物質が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応する活性部位の１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合することが好ましい。

別の態様では、候補調節物質は、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合する。

一態様では、候補調節物質はＢＨ３領域ポリペプチドである。適切なＢＨ３領域ポリペプチドは、ＢＨ３領域を発現するＢＣＬ－２ポリペプチドの何れかから誘導することができる（例えば、図１又は２）。例えば、適切なＢＨ３領域ポリペプチドは、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｌｋ、Ｈｒｋ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｂｎｉｐ３、Ｎｉｘ、Ｎｏｘａ、Ｐｕｍａ、Ｂｍｆ又はＥｇｌ－１、又はＢＨ３ドメインを含有するＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの何れかから誘導することができる。

【００７７】

ある態様では、このポリペプチドは、図１、２、８、９、１０、１６ａ、又は２０で図解されているようなものよりなる群から選ばれるＢＨ３ドメインの、少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、５０個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有している。

一態様では、化合物は、配列番号３又は図１、２、８、９、１０、１６ａ、又は２０に例示されているＢＨ３領域と９５％同一のアミノ酸配列を有しているＢＨ３領域ポリペプチドであって、配列番号９に記載の配列のＬｅｕ５２及びＡｓｐ１５７に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を有している。

更なる態様では、候補調節物質は、配列番号９に記載の配列のＩｌｅ１４８、Ｌ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｌｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３に対応するアミノ酸残基を有している。

【００７８】

好ましい態様では、適切なＢＨ３領域ポリペプチドはプロアポトーシスタンパク質ＢＩＭ（配列番号２、配列番号９）又はＢＩＤ（配列番号６）、ＰＵＭＡ（配列番号７、配列番号１０）から誘導される。

更により好ましい態様では、化合物は、ＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（配列番号３）、ＢＩＤ ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（配列番号４）又はＰＵＭＡ ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（配列番号５）又はＢＡＸ ＢＨ３ ＳＡＨＢ（配列番号１２）である。ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドは、安定化されたアルファ螺旋構造を有するように、炭化水素が連結されている。ＢＨ３ ＳＡＨＢを作成する方法は当該技術分野で公知であって、２００４年１１月５日に出願された、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／０２５０６８０号に記載されており、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。

【００７９】

この態様の更なる実施態様では、候補化合物が実際にＢＣＬ－２ファミリーメンバーを調節するか否かを確認するために、候補化合物を生物学的分析で試験することができる。適切な生物学的分析は当該技術分野で公知であって、本明細書に記載されており、これに限定されないが、二量化、オリゴマー形成又は立体構造状態の変更の確認、又は１つの細胞内コンパートメントから別のコンパートメントへの転座、ミトコンドリアのチトクロー

ムｃ放出、細胞死、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアのカルシウム取り込み、ミトコンドリアの膜貫通定量、及びカスパーゼ３活性又はアネキシンＶ結合の定量を含む。

【００８０】

更なる態様では、本発明は、ＢＡＸポリペプチドのアポトーシス活性を調節する（例えば、活性化する）候補化合物を同定する方法を目的としている。この方法は、ＢＡＸポリペプチドの活性部位三次元構造を提供すること、活性部位と化合物の間の結合相互作用をシミュレートすること、及び化合物が、活性部位の、これに限定されないが、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７を含有する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合するか否かを確認することを含んでいる。活性部位の１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合できる場合に、化合物は候補化合物として同定される。

【００８１】

更に別の態様では、本発明は、個人においてＢＣＬ－２関連疾患を治療又は予防する方法を目的としている。この方法は、治療が必要な個人に、上記態様の何れかによって同定された化合物の薬理学的有効用量を投与することを含んでいる。

【００８２】

更に別の態様では、本発明は、個人においてＢＣＬ－２関連疾患を治療又は予防する方法を目的としている。この方法は、治療が必要な個人に、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する化合物の薬理学的有効用量を投与することを含んでいる。

【００８３】

ＢＣＬ－２関連疾患は、１つ又はそれ以上のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの脱制御に起因していると考えられる疾患の何れかである。ＢＣＬ－２関連疾患は、癌又は自己免疫疾患のような、細胞増殖又はアポトーシス遮断疾患を包含する。ＢＣＬ－２に関連する癌の例は、これに限定されないが、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫を包含する。一態様では、疾患は化学療法抵抗性の癌である。より好ましい態様では、化学療法抵抗性の癌はＡＢＴ－７３７又はＡＢＴ－２６３（Abbott; Abbott Park, Illinois から入手できる）に対して抵抗性がある。

【００８４】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位は、幾つかの親水性アミノ酸で囲まれた疎水性残基の核を含有し、そしてＢＩＭ ＢＨ３で安定化されたＢＣＬ－２ドメイン（すなわちＢＩＭ ＳＡＨＢ）のアルファ螺旋を結合できる面であって、ＢＡＸ（図４）のアルファ螺旋１及び６の並置によって形成される。活性部位は疎水性パッチ及び荷電した親水性アミノ酸残基周辺の両方を有している。

好ましい態様では、活性部位は配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸を有している。

別の態様では、活性部位は、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応するアミノ酸残基を有している。

【００８５】

活性部位は、本明細書に記載されている、ＢＡＸ活性部位に対応する活性部位を有しているＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの何れかの上にあり得る。ＢＡＸではないＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのＢＡＸ活性部位に対応する活性部位は、ＢＡＸと試験分子の間のアミノ酸配列アラインメントによって、構造比較によって、又はこれらの組合わせによって同定することができる。そのような方法は、当業者に公知であって、本明細書に記載されている。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドは、ＢＣＬ－２ファミリーのプロアポトーシス又はアンチアポトーシスメンバーの何れであってもよい。適切なプロアポトーシスポリペプチドは、これに限定されないが、ＢＡＸ、ＢＯＫ及びＢＡＫを包含する。適切なアンチアポトーシスポリペプチドは、これに限定されないが、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス性同族体を包含する。

【００８６】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを調節する化合物は、そのタンパク質の活性部位に結合する、有機化合物、ポリペプチド又はそれらの組合わせ、又は化学化合物及び／又はポリペプチド及び／又は核酸（例えば、ＤＮＡ及び／又はＲＮＡ誘導体）の混合物、それらの塩及び溶媒和物、等の何れであってもよい。

好ましくは、化合物は活性部位の１つ又はそれ以上のアミン酸残基に結合する。

より好ましい態様では、活性部位は、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応するアミノ酸残基を包含する。

【００８７】

一態様では、化合物はＢＨ３領域ポリペプチド（例えば、図１、２）である。適切なＢＨ３領域ポリペプチドは、ＢＨ３領域を含んでいるＢＣＬ－２ポリペプチドから誘導できる。例えば、適切なＢＨ３領域ポリペプチドはＢｉｍ、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｌｋ、Ｈｒｋ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｂｎｉｐ３、Ｎｉｘ、Ｎｏｘａ、Ｐｕｍａ、Ｂｍｆ又はＥｇ１－１、若しくはＢＨ３ドメインを含有しているその他の何れかのＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドから誘導できる。

【００８８】

ある態様では、ＢＨ３ドメインポリペプチドは、図１、２、８、９、１０、１６ａ、又は２０で説明されているものからなる群より選ばれるが、これに限定されない、ＢＨ３ドメインの少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、５０個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有している。

【００８９】

一態様では、化合物は、配列番号３又は図１、２、８、９、１０、１６ａ、又は２０で説明されているものと９５％同一のアミノ酸配列を有しているＢＨ３領域ポリペプチドであって、配列番号９に記載の配列のＬｅｕ１５２及びＡｓｐ１５７に対応しているアミノ酸残基又はその同類置換を有している。

【００９０】

更なる態様では、化合物は、配列番号９に記載の配列のＩｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｌｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３に対応するアミノ酸残基を有している。

好ましい態様では、適切なＢＨ３領域ポリペプチドはプロアポトーシスタンパク質ＢＩＭ（配列番号２、配列番号９）又はＢＩＤ（配列番号６）又はＰＵＭＡ（配列番号７、配

列番号１０）から誘導される。
更により好ましい態様では、化合物は、ＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（配列番号３）、ＢＩＤ ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（配列番号４）、ＰＵＭＡ ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（配列番号５）又はＢＡＸ ＢＨ３ ＳＡＨＢ（配列番号１２）である。
【００９１】
ＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドは、安定化されたアルファ螺旋構造を有するように、炭化水素が連結されている。ＢＨ３ ＳＡＨＢを作成する方法は当該技術分野で公知であって、２００４年１１月５日に出願された、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／０２５０６８０号に記載されており、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。
【００９２】
化合物のＢＣＬ－２ポリペプチドへの活性部位への結合は、ＢＣＬ－２活性（例えば、プロアポトーシス又はアンチアポトーシス活性）の調節をもたらす。
一態様では、調節はプロアポトーシス活性の活性化（例えば、アポトーシスの増大、細胞死）又は阻害（アポトーシスの減少、細胞生存）の何れかである。
別の態様では、調節はアンチアポトーシス活性の活性化（例えば、細胞生存の増大、アポトーシスの減少）又は阻害（例えば、アポトーシス、細胞死の増大）の何れかである。
【００９３】
更なる態様では、本発明は、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化することによって、個人における過剰増殖性疾患（例えば、癌、化学療法抵抗性の癌）を治療又は予防する方法を目的としている。この方法はこれを必要としている個人に、ＢＡＸ活性部位の配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合して、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するＢＨ３ポリペプチドの薬理学的有効用量を投与することを必要としている。
【００９４】
別の態様では、本発明は、個人におけるＢＣＬ－２関連疾患を治療又は予防するための化合物を目的としている。この化合物は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合するとＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する。
【００９５】
更なる態様では、本発明は、個人における過剰増殖性疾患（例えば、癌、化学療法抵抗性の癌）を治療又は予防するための化合物を目的としている。この化合物は配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、に対応するアミノ酸残基と結合するとＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するＢＨ３ポリペプチドである。
別の態様では、この化合物は配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応するアミノ酸残基と結合するとＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するＢＨ３ポリペプチドである。
【００９６】

別の態様では、本発明は、１つ又はそれ以上の常磁性標識を包含するＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（図６）及びその使用方法を目的としている。本発明は、ＢＡＸの活性部位、又は別のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドのそのような活性部位、と結合するＳＡＨＢの幾何学的配置及び構造的相互作用の詳細を確認する常磁性緩和促進（ＰＲＥ）ＮＭＲ実験のためにＭＴＳＬ誘導体化されたＳＡＨＢを作成する適切な方法を提供する。ＭＴＳＬ標識をＳＡＨＢペプチド内に置換されているシステイン残基と反応させ、それによって当該技術分野で公知の方法で行う、ＰＲＥ ＮＭＲ実験用のニトロキシドスピン標識を組み込む。例えば、この方法は、ＭＴＳＬ誘導体化されたＳＡＨＢポリペプチドをＢＡＸと培養した後に、ＰＲＥによるＮＭＲ分析によってＢＡＸ部位（図６）にあるＢＩＭ ＳＡＨＢの幾何学的配置を確認する。

【００９７】

別の態様では、本発明は、１つ又はそれ以上の架橋部分を包含しているＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチド（図１１、１７、及び１８）及びその使用方法を目的としている。本発明は、ＢＨ３ペプチドの光活性可能な又は架橋可能な誘導体又はその模倣体（例えば、図１１、１７、及び１８）の標的部位への直接共有結合性相互作用、次いで、例えば、タンパク質分解、断片精製、及び分析に基づく質量分析法による、相互作用部位の同定を介する、ＢＡＸではないＢＣＬ－２ファミリー及び非ＢＣＬ－２ファミリーメンバー中の類似活性部位を同定するための新規で、代替え的で、適切な方法を提供する。例えば、この方法は、標的ポリペプチドを共有結合架橋が可能な部分を含んでいるＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドと共に培養すること、ＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドを標的ポリペプチドに架橋すること、そしてＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドの標的ポリペプチドへの相互作用部位を同定することを包含する。

【００９８】

一態様では、架橋可能な部分はベンゾフェノンである。適切なＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドは、ＢＩＭ、ＢＩＤ、ＰＵＭＡ、及びＢＡＸを包含する。多数のＢＨ３ ＳＡＨＢポリペプチドのアミノ酸配列及びベンゾフェノンの位置は図１１に表示されている。

【００９９】

更に別の態様では、本発明は上記の何れかの化合物及び使用説明書を含有しているキットを目的としている。

【０１００】

ＩＩＩ．ペプチドのＢＣＬ－２ファミリー

タンパク質のＢＣＬ－２ファミリーは、細胞死に対する感受性に影響を与える抑制及び平衡をもたらすプロアポトーシス及びアンチアポトーシスポリペプチド（図１）の両方を包含する。この経路の脱制御が、多くの癌を含む、多種のヒト疾患の発症において立証されている。

【０１０１】

進化的に保存されたＢＣＬ－２ファミリーのメンバーは、アポトーシス細胞死及び細胞生存の重要な調節因子である。タンパク質ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－ｘＬ、Ｂｃｌ－ｗ、Ｂｆｌ１／Ａ１、Ｂｃｌ－Ｂ及びＭｃｌ－１は細胞死の拮抗薬であるのに対して、Ｂａｘ、Ｂａｋ、Ｂａｄ、Ｂｃｌ－ｘｓ、Ｂｉｄ、Ｂｉｍ及びＢｉｋは細胞死の作動薬である（Kroemer et al., Nature Med. 6:61420 (1997)）。

【０１０２】

ＢＣＬ－２ファミリーは、全てがアルファ螺旋セグメントを含んでいる、ＢＨ１、ＢＨ２、ＢＨ３及びＢＨ４で表される、４つまでの保存「ＢＣＬ－２相同」（ＢＨ）ドメインの存在によって定義される（Chittenden et al. 1995 EMBO 14:5589; Wang et al. 1996 Genes Dev. 10:2859）（図１）。ＢＣＬ－２及びＢＣＬ－ＸＬのような、アンチアポトーシスタンパク質は、全てのＢＨドメインにおいて配列保存を提示する。プロアポトーシスタンパク質は、ＢＨ１、ＢＨ２、及びＢＨ３ドメインに相同性を有する、「マルチドメイン」メンバー（例えば、ＢＡＫ、ＢＡＸ、ＢＯＫ）と、ＢＨ３両親媒性アルファ螺旋セグメントにだけ配列相同性を含有する、「ＢＨ３ドメインオンリー」メンバー（例えば、Ｂ

ＩＤ、ＢＡＤ、ＢＩＭ、ＢＩＫ、ＮＯＸＡ、ＰＵＭＡ）に分かれる。
ＢＣＬ－２ファミリーメンバーは、競合結合及びプロアポトーシス及びアンチアポトーシスタンパク質濃度間の比率が細胞死刺激に対する感受性を決定するということを示唆する、ホモ－及びヘテロ－二量体を形成する能力を有している。
アンチアポトーシスタンパク質は、プロアポトーシス過剰、すなわち、過剰にプログラムされた細胞死、から細胞を保護する機能を有している。
ある特定の細胞型では、細胞膜で受信した細胞死信号が、ミトコンドリア経路を介してアポトーシスを誘発する。ミトコンドリアは、致命的な下流のタンパク質分解事象を統制する、カスパーゼ９を活性化する細胞質複合体の重要な成分である、チトクロームｃを隔離することによって細胞死の管理物質として機能できる。
【０１０３】
ＢＣＬ－２／ＢＣＬ－ＸＬ及びＢＡＫ／ＢＡＸのようなマルチドメインタンパク質は、ＢＣＬ－２ファミリーの上流ＢＨ３オンリーメンバーによって更に調節されるそれらの活性をもって、ミトコンドリア膜で監視及び死刑執行と対決する役割を果たす。例えば、ＢＩＤは、プロアポトーシスタンパク質の「ＢＨ３ドメイン－オンリー」サブセットのメンバーであって、細胞膜で受け取った死の信号をミトコンドリア膜のエフェクタープロアポトーシスタンパク質に伝達する。ＢＩＤ及びＢＩＭのような、精選したＢＨ３－オンリーメンバーは「活性化因子」と呼ばれていて（Letai, A., et al. Cancer Cell 2, 183-192 (2002)）、プロアポトーシスとアンチアポトーシスの両方と相互作用するという固有の能力を有している（Walensky Mol Cell 2006）。カスパーゼ８の活性化によって、ＢＩＤが開裂して切断された付加物、ｔＢＩＤがチトクロームｃの放出及びＢＣＬ－２ファミリータンパク質の関与によるミトコンドリアアポトーシスを誘発する。
【０１０４】
欠失突然変異誘発試験は、プロアポトーシスファミリーメンバーの両親媒性アルファ螺旋ＢＨ３セグメントが死のドメインとして機能することにより、マルチドメインのアポトーシスタンパク質と相互作用する重要な構造モチーフを示すことを確認した。ＢＨ３螺旋が、ＢＨ１、２及び３の境界面により形成される疎水性溝に挿入することによってアンチアポトーシスタンパク質と相互作用することを、構造研究が明らかにした。ｔＢＩＤとＢＩＭはアンチアポトーシスタンパク質（例えば、ＢＣＬ－２及びＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$）によって結合され及び隔離でき、チトクロームｃの放出及びミトコンドリアアポトーシスのプログラムを誘導する、プロアポトーシスタンパク質ＢＡＸ及びＢＡＫの活性化を誘発する。
【０１０５】
ＢＣＬ－２関連卵巣キラー（ＢＯＫ）はプロアポトーシスマルチドメインサブグループの第３のメンバーであって、ＢＩＤ及びＢＩＭ ＳＡＨＢのような、ＳＡＨＢリガンドによっても結合される。ＢＯＫは卵巣ｃＤＮＡのライブラリーからクローン化されて、卵巣、子宮及び睾丸中で高度に発現されることが見出された。ＢＯＫｍＲＮＡ種はその後、心臓、脾臓、肝臓、結腸、肺、腸、甲状腺、副腎、膵臓及び骨髄を包含する、広く分布した組織中及び特定の癌細胞株中で同定されている。
【０１０６】
ＢＣＬ－２ファミリータンパク質（ＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$）の最初のＸ線及びＮＭＲ構造は１９９６年に報告された。ＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$は、８個のアルファ螺旋から成っていて、そのうちの２個は孔形成ジフテリア毒素及びコリシンの膜内挿入ドメインに類似した中心疎水性核を形成する。この構造類似性が、ＢＣＬ－２ファミリーメンバーが、核螺旋５及び６に基づく活性である、リポソーム及びミトコンドリアシステムにおける孔形成を調節できるという実験的な確認を導いた。
【０１０７】
プロアポトーシス側の、ＢＨ３－オンリーＢＩＤ及びマルチドメインプロアポトーシスＢＡＸのＮＭＲ構造が、細胞死の促進及び阻止の間の類似点を明らかにした（図３、７）。ＢＩＤ及びＢＡＸは、それぞれが６個又は７個の両親媒性螺旋で囲まれている２つの中心角螺旋を同様に保持している。ＢＩＤ及びＢＡＸのアミノ末端部位は、ＢＣＬ－２及び

ＢＣＬ－X_Lのようなアンチアポトーシスタンパク質を選択するように、非構造のループを含有している。

【０１０８】

ＢＣＬ－X_L、ＢＣＬ－２、ＢＩＤ、ＢＡＸ、ＢＣＬ－ｗ、ＭＣＬ－１、ＢＡＸを包含する、多くのＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの構造は、当該技術分野で公知であって容易に利用できる。例えば、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチは、Protein Data Bank ("PDB")(Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; http://www.rcsb.org) から入手できる。例えば、公知のＢＣＬ－２ファミリーの構造座標は、ＢＡＸ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．１ｆ１６）、ＢＡＫ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．２ｉｍｓ）、ＢＣＬ－２（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．１ｇ５ｍ）、ＢＣＬ－ＸＬ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．１ｌｘｌ）、本発明に関連するもに加えて；ＢＩＭ ＢＨ３－ＢＡＸ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．２ｋ７ｗ）、更に当該技術分野で公知の別のものを包含する。

【０１０９】

ＩＶ．ＢＣＬ－２の活性部位

本発明は、少なくともその一部が、ＢＩＭ ＳＡＨＢ（図８）のような、炭化水素を連結して構造的に強化した「活性化因子」ＢＨ３ポリペプチドがＢＡＸのプロアポトーシス活性の活性化をもたらすＢＡＸポリペプチド上の活性部位に結合するという発見に基づいている。本研究は、ＢＩＭ ＳＡＨＢとの分子相互作用及びそれによるこのポリペプチドの活性化に関連するＢＡＸポリペプチドの領域の同定を可能にして、それによりＢＡＸ及び対応する活性部位を有するその他の何れかのＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド（又は別の分類のポリペプチド）の別の特異的な調節因子を同定する方法をもたらす、構造情報を提供している。

【０１１０】

ＢＡＸと共複合しているＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢのＮＭＲ構造分析は、ＢＡＸアルファ螺旋１及び６（図３及び４）の並置によって形成されるＢＡＸの活性部位を明らかにした。ＢＩＭ ＳＡＨＢと複合しているＢＡＸポリペプチド（図６）のＮＭＲデータは、ＢＩＭ ＢＨ３の結合及びＢＡＸの活性化に寄与する疎水性パッチと荷電した親水性残基の周辺の両方から成っていることを示す。疎水性パッチは、これに限定されないが、アミノ酸残基、Ａｌａ２４、Ｍｅｔ２０、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｉｌｅ３１、Ｉｌｅ１３３、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１から成り、一方荷電した親水性領域は、これに限定されないが、配列番号１に記載の配列のＬｙｓ２１、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｇｌｎ５２、Ｇｌｕ１７、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ａｓｐ１４２、Ａｒｇ１４５、Ａｒｇ１４７から成っている。これらの疎水性アミノ酸は、ＢＩＭ ＳＡＨＢの疎水性アミノ酸残基Ｉｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ｌｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、及びＰｈｅ１５９と順に結合し、そして荷電した親水性アミノ酸残基はＢＩＭ ＳＡＨＢの荷電した親水性アミノ酸残基のＡｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、及びＴｙｒ１６３と結合する。

【０１１１】

本発明のポリペプチドは安定化した（例えば、架橋した）アルファ螺旋ドメインを有していてよい。ポリペプチドは炭化水素連結していることが好ましい。炭化水素連結は米国特許出願公開第２００５／０２５０６８０号に記載されており、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。

【０１１２】

本明細書で用いられる用語「炭化水素連結（stapling）」は、そのポリペプチドの未変性二次構造を構造的に用いるのに役立つ少なくとも２つの改変されたアミノ酸を有するポリペプチドを安定に架橋する方法を示す。炭化水素連結は、ポリペプチドが、その未変性アルファ螺旋構造を保持するために、アルファ螺旋二次構造を有しやすくする。この二次構造は、ポリペプチドのタンパク質分解開裂及び熱に対する耐性を増大し、そして疎水性を増大させることもできる。従って、本明細書に記載の炭化水素を連結した（架橋した）ポリペプチド（例えば、ＢＨ３ ＳＡＨＢ）は対応する炭化水素非連結（非架橋）ポリペ

プチドと比較して改善された生物活性を有している。例えば、架橋したポリペプチドは、ＢＡＸの活性部位と相互作用が可能な、ＢＩＭ ＢＨ３ポリペプチドのアルファ螺旋ドメインを包含できる。

【０１１３】

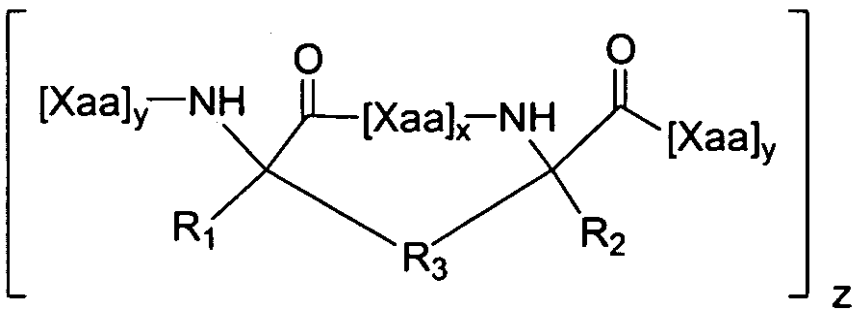
炭化水素連結ポリペプチドは２つの非天然アミノ酸の間に１つ又はそれ以上の繋鎖（tether)（連鎖）を包含し、この繋鎖はポリペプチドのアルファ螺旋二次構造を有意に強化する。一般に、この繋鎖は螺旋の１巻き又は２巻きの長さ（約３．４個又は約７個のアミノ酸）にまたがっている。従って、ｉ番目とｉ＋３番目；ｉ番目とｉ＋４番目；又はｉ番目とｉ＋７番目に位置しているアミノ酸は、化学修飾及び架橋のための理想的な候補である。従って、例えば、配列．．．Ｘ１、Ｘ２、Ｘ３、Ｘ４、Ｘ５、Ｘ６、Ｘ７、Ｘ８、Ｘ９．．．を有しているペプチドにおいては、Ｘ１とＸ４の間、又はＸ１とＸ５の間、又はＸ１とＸ８の間の架橋は、Ｘａ２とＸ５の間、又はＸ２とＸ６の間、又はＸ２とＸ９の間の架橋等のように有用である。複数架橋（例えば、２、３、４又はそれ以上）の使用も意図されている。複数架橋の使用はペプチドの安定化及び最適化、特にペプチド長の増大において非常に効果的である。従って、本発明は、配列を更に安定化するか、又は構造安定性、タンパク質分解耐性、酸安定性、熱安定性、及びより長いポリペプチド伸長の生物活性増強を促進するかの何れかのために、ポリペプチド内に１つ以上の架橋を組み込むことを包含している。炭化水素を連結する方法は、２００４年１１月５日に出願された、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／０２５０６８０号に十分に記載されており、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。

【０１１４】

一態様では、ＳＡＨＢポリペプチドは式（Ｉ）を有している。

【０１１５】

【化１】



【０１１６】

式中の、それぞれのR_1及びR_2は独立して、Ｈ、又はC_1～C_{10}アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、又はヘテロシクリルアルキルである。

R_3は、アルキル、アルケニル、アルキニル；又は［R_4--Ｋ--R_4］であり、それぞれは０～６個のR_5で置換されている。

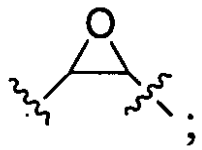
R_4は、アルキル、アルケニル、又はアルキニルである。

R_5は、ハロ、アルキル、OR_6、$N(R_6)_2$、SR_6、SOR_6、SO_2R_6、CO_2R_6、R_6、蛍光部分、又は放射線同位元素である。

Ｋは、Ｏ、Ｓ、ＳＯ、SO_2、ＣＯ、CO_2、$CONR_6$、又は

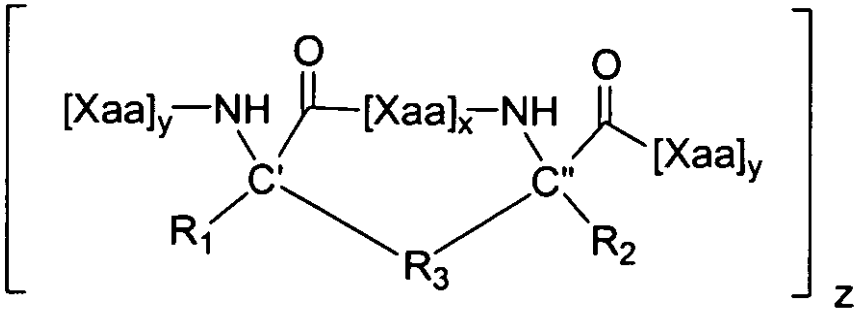
【０１１７】

【化２】



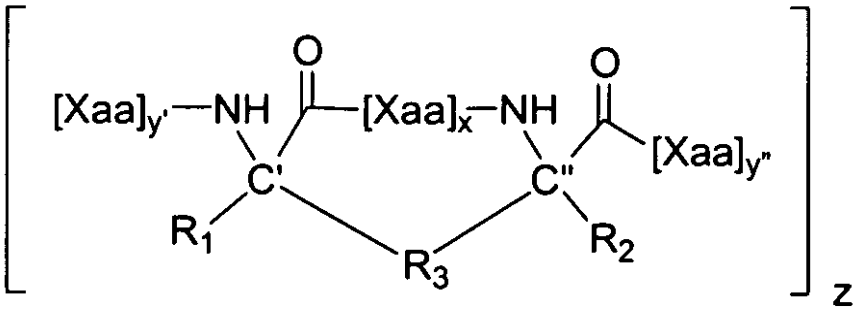
【０１１８】
である。
Ｒ$_{6}$は、Ｈ、アルキル、又は治療剤である。
ｎは、１～４の整数である。
ｘは、２～１０の整数である。
ｚは、１～１０（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０）の整数である。
そしてそれぞれのＸａａは、独立してアミノ酸である。
ＳＡＡＢポリペプチドは本明細書に記載のアミノ酸配列を包含していてもよい。
【０１１９】
繋鎖は、アルキル、アルケニル、又はアルキニル部分（例えば、Ｃ$_{5}$、Ｃ$_{8}$又はＣ$_{11}$アルキル又はＣ$_{5}$、Ｃ$_{8}$又はＣ$_{11}$アルケニル、又はＣ$_{5}$、Ｃ$_{8}$又はＣ$_{11}$アルキニル）を包含していてよい。繋鎖アミノ酸はアルファ二置換（例えば、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$又はメチル）されていてもよい。
ある場合は、ｘが２、３、又は６である。
ある場合は、それぞれのｙが独立して３と１５の間の整数である。
ある場合は、それぞれのｙが独立して１と１５の間の整数である。
ある場合は、Ｒ$_{1}$及びＲ$_{2}$がそれぞれ独立してＨ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルである。
ある場合は、Ｒ$_{1}$及びＲ$_{2}$がそれぞれ独立してＣ$_{1}$～Ｃ$_{3}$のアルキルである。
ある場合は、Ｒ$_{1}$及びＲ$_{2}$のうち少なくとも１つがメチルである。例えば、Ｒ$_{1}$及びＲ$_{2}$の両方がメチルである。
【０１２０】
ある場合は、Ｒ$_{3}$がアルキル（例えば、Ｃ$_{8}$アルキル）であり、そしてｘが３である。
ある場合は、Ｒ$_{3}$がＣ$_{11}$アルキルであり、そしてｘが６である。
ある場合は、Ｒ$_{3}$がアルケニル（例えば、Ｃ$_{8}$アルケニル）であり、そしてｘが３である。
ある場合は、ｘが６であり、そしてＲ$_{3}$がＣ$_{11}$アルケニルである。
ある場合は、Ｒ$_{3}$が直鎖アルキル、アルケニル、又はアルキニルである。
ある場合は、Ｒ$_{3}$が--ＣＨ$_{2}$--ＣＨ$_{2}$--ＣＨ$_{2}$--ＣＨ＝ＣＨ--ＣＨ$_{2}$--ＣＨ$_{2}$--ＣＨ$_{2}$--である。
ある特定の実施態様では、２つのアルファ、アルファ－二置換立体中心が、Ｒ配置又はＳ配置（例えば、ｉ番目とｉ＋４番目が架橋）の両方であるか、又は一方の立体中心がＲで、他方がＳ（例えば、ｉ番目とｉ＋７番目が架橋）である。
従って、式（Ｉ）を次のように表現する場合、
【０１２１】

【化３】

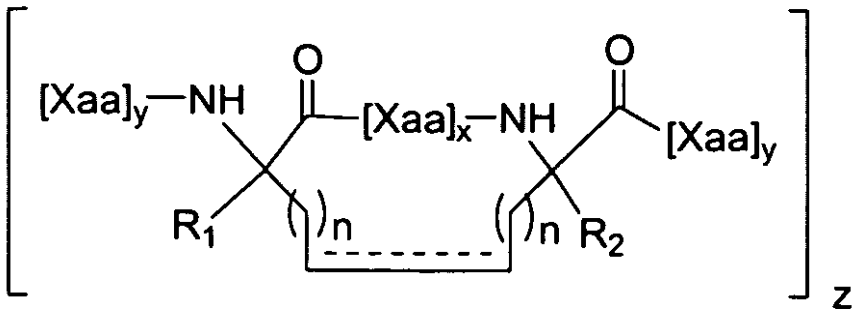


【０１２２】
Ｃ’及びＣ”二置換立体中心は、例えばｘが３のときは、両方がＲ配置でもよく、又はこれらは両方がＳ配置でもよい。ｘが６の場合は、Ｃ’二置換立体中心がＲ配置で、Ｃ”二置換立体中心がＳ配置である。$Ｒ_3$の二重結合はＥ又はＺの立体化学配置であってよい。
【０１２３】
ある場合は、$Ｒ_3$が［$Ｒ_4$--Ｋ--$Ｒ_4$］であり、そして$Ｒ_4$が直鎖アルキル、アルケニル、又はアルキニルである。
【０１２４】
ある場合は、ＳＡＨＢポリペプチドはＢＨ３ドメインの少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４５、５０個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有することができる。
それぞれの［Ｘａａ］ｙは、それぞれにＢＨ３ドメインの少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有することができるペプチドである。
［Ｘａａ］ｘは、ＢＨ３ドメインの酸の３又は６個の連続したアミノ酸を含有することができる。
【０１２５】
ＳＡＨＢポリペプチドはＢＨ３ドメインの酸の少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有することができ、ここではアミノ酸２個、３個又は６個分離れている２つのアミノ酸が、$Ｒ_3$を介して結合しているアミノ酸置換によって置き換わっている。従って、少なくとも２つのアミノ酸を繋鎖アミノ酸又は繋鎖アミノ酸置換によって置き換えることができる。
従って、式（Ｉ）を次のように表現する場合、
【０１２６】

【化４】

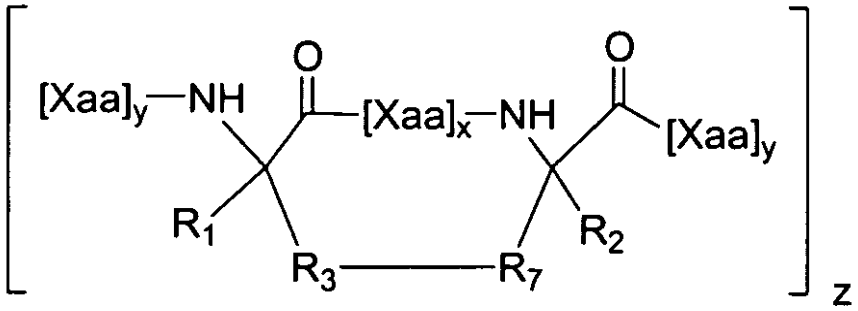


【０１２７】
［Ｘａａ］ｙ’及び［Ｘａａ］ｙ”はそれぞれ、同一又は異なったＢＨ３ドメイン由来の連続ポリペプチド配列を含有することができる。
【０１２８】
本発明は、ＢＨ３ドメインの１０個（１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０個又はそれ以上）の連続したアミノ酸を含有している架橋ポリペプチドを特徴としていて、ここではアミノ酸２個、３個又は６個分離れている２つのアミノ酸のアルファ炭素がR_3を介して結合していて、２つのアルファ炭素のうちの一つがR_1で置換されていて他方がR_2で置換され、そしてそれぞれがペプチド結合を介して更なるアミノ酸と結合している。
【０１２９】
別の態様では、ＳＡＨＢポリペプチドは式（ＩＩ）を有している。
【０１３０】
【化５】



【０１３１】
式中の、それぞれのR_1及びR_2は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、又はヘテロシクリルアルキルである。
それぞれのｎは独立して、１～１５の整数である。
ｘは２、３、又は６である。
それぞれのｙは独立して、０～１００の整数である。
ｚは、１～１０の整数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０）である。
それぞれのＸａａは、独立してアミノ酸である。
【０１３２】
改変したポリペプチドはアルファ螺旋を形成して、本明細書に開示されているアミノ酸配列に３０％又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を有しうる。

【０１３３】
更に別の態様では、本発明のＳＡＨＢポリペプチドは式（ＩＩＩ）を有している。
【０１３４】
【化６】



【０１３５】
式中の、それぞれのR_1及びR_2は独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、又はヘテロシクリルアルキルである。
R_3は、アルキル、アルケニル、アルキニル、［R_4--Ｋ--R_4］ｎ、又は天然のアミノ酸側鎖であり、これらのそれぞれは０～６個のR_5で置換されている。
R_4は、アルキル、アルケニル、又はアルキニルである。
R_5は、ハロ、アルキル、OR_6、$N(R_6)_2$、SR_6、SOR_6、SO_2R_6、CO_2R_6、R_6、蛍光部分、又は放射線同位元素である。
Ｋは、Ｏ、Ｓ、SO_2、ＣＯ、$CONR_6$、又は
【０１３６】
【化７】



【０１３７】
である。
R_6は、Ｈ、アルキル、又は治療薬剤である。
R_7は、アルキル、アルケニル、アルキニル、［R_4--Ｋ--R_4］ｎ、又は天然のアミノ酸側鎖であり、これらのそれぞれは０～６個のR_5で置換されている。
ｎは、１～４の整数である。
ｘは、２～１０の整数である。
それぞれのｙは独立して、０～１００の整数である。
ｚは、１～１０の整数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０）である。
そして、それぞれのＸａａは、独立してアミノ酸である。
【０１３８】
このポリペプチドはアルファ螺旋を形成して、本明細書に開示されているアミノ酸配列に約３０％又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有している。
【０１３９】
炭化水素の繋鎖は記載されているが、別の繋鎖も想定される。例えば、繋鎖は、１つ又

はそれ以上のエーテル、チオエーテル、エステル、アミン、又はアミド残基を包含してよい。ある場合は、天然のアミノ酸側鎖を繋鎖に組み込むことができる。例えば、繋鎖を、セリンのヒドロキシル、システインのチオール、リジンの１級アミン、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸の酸、又はアスパラギン若しくはグルタミンのアミドのような、官能基と結合させることができる。従って、２つの非天然のアミノ酸を結合して作られる繋鎖を用いるよりもむしろ、天然のアミノ酸を用いて繋鎖を作ることが可能である。単一の非天然のアミノ酸を天然のアミノ酸と共に用いることもできる。

【０１４０】

繋鎖の長さを変えることも更に想定される。例えば、二次アルファ螺旋構造に対して比較的高度の制約を与えることが望ましい場合には、より短い繋鎖が用いられ、一方ある場合は、二次アルファ螺旋構造に対してあまり制約を与えないことが望ましいので、より長い繋鎖が望ましい。

【０１４１】

また、主にアルファ螺旋の単一面にある繋鎖を提供するために、ｉ番目のアミノ酸からｉ＋３、ｉ＋４、及びｉ＋７番目のアミノ酸を架橋する繋鎖の例が記載されているが、繋鎖は多数のアミノ酸の組合わせの何れかを架橋するように合成することができ、多数の繋鎖を導入するために組み合わせて用いることもできる。

【０１４２】

当業者に理解できるように、本明細書に記載されている化合物を合成する方法は当業者にとっては明らかである。また、各種の合成工程を、望ましい化合物を得るために代替えの並びで又は順序で実施することができる。本明細書に記載されている化合物の合成に有用な、合成化学変換及び基を保護する方法論（保護及び脱保護）は当該技術分野において公知であって、例えば、R. Larock. Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); 及び L. Paquette ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)、及びこれらの続編に記載されているようなものを包含する。

【０１４３】

Ｖ．薬物設計

この活性部位の同定は、ＢＡＸ及び対応する活性部位を有する別のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを調節可能な化合物の開発及び同定を支援する。例えば、この情報を用いて、三次元でコンピュータ処理されたＢＡＸの相互作用テンプレートを、当業者が作成でき、そしてＢＡＸの活性部位に特異的な活性化因子及び阻害因子を設計するために用いることができる。

別の態様では、当業者は、別のＢＣＬ－２ファミリーメンバーの対応する活性部位を同定するために、ＢＡＸの活性部位を適用することができる。そして、この情報を、別のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを調節可能な化合物を同定／開発するために用いることができる。

【０１４４】

ＢＣＬ－２ポリペプチドの三次元構造及び具体的にはその活性部位の確認は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド活性の調節因子として作用可能な薬剤の合理的な同定及び／又は設計に重要である。これは、このような薬剤を同定する唯一の方法が、標的化合物に対する望ましい阻害活性効果を有する薬剤が同定されるまで数千の試験化合物をスクリーニングすることである、従来の薬物試験技術よりも有利である。このような従来のスクリーニング方法は必然的に、高価で、時間がかかり、そして同定された薬剤の標的化合物に対する作用機序を解明していない。

このような三次元構造を用いて、研究者は推定活性部位を同定し、次いでこれらの結合部位と相互作用する薬剤を同定又は設計する。次いで、これらの薬剤を標的分子に対する調節効果についてスクリーニングする。

この方法においては、望ましい活性についてスクリーニングする薬剤の数が非常に減少するばかりではなく、標的化合物に対する作用機序もより良く理解される。

【０１４５】

ＢＡＸ活性部位の同定をＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位の１つ又はそれ以上の領域に、全体が又は一部が結合することができる化合物について、小分子データベースをコンピューター的にスクリーニングするために用いられることが意図されている。この方法の一態様では、活性部位の領域について同定された化合物の量又は適合度は形の相補性又は推定される相互作用エネルギーの何れかによって判定することができる（Meng et al., J. Comp. Chem. 13:505-524, 1992）。

【０１４６】

更なる態様では、本発明の方法によって分析され得る可能性がある調節因子は、当該技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー方法における多数の手法の何れかを用いて得ることができる。

一態様では、可能性がある調節因子は最初に、本明細書に記載の又は当該技術分野で公知のインビトロアッセイを用いてプロアポトーシス又はアンチアポトーシス活性について同定する。可能性がある調節因子が同定されて、それらの構造が確認されたら、本明細書に記載のＢＡＸ活性部位の構造情報を用いるコンピューター的な分析によって更に最適化を実施できる。

別の態様では、可能性がある調節因子は最初に、ＢＣＬ－２ファミリー活性部位の構造座標から開発された相互作用テンプレートを用いるスクリーンで同定されて、更なるコンピュータ的な分析で最適化に付される。

また、本明細書に記載されている方法を用いる、可能性がある調節因子とＢＣＬ－２ファミリー活性部位の共複合体のＮＭＲ構造座標を確認することによって更なる最適化を実施することができる。

【０１４７】

本発明の方法で用いることができる多数のコンビナトリアルライブラリーは、これに限定されないが、生物製剤ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相又は液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；’ワンビーズワンコンパウンド’ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する。生物製剤ライブラリー手法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他の４つの手法はペプチド、非ペプチドオリゴマー又は化合物の小分子ライブラリーに適用できる（Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145）。

【０１４８】

好ましい態様では、化合物のライブラリーはデジタルのライブラリーである。結合相互作用を、公知三次元構造の小分子のデータベースを活性部位に適合する候補物についてスキャンが可能なデータベース検索プログラムを用いて実行する。適切なソフトウェアプログラムは、CATALYST (Molecular Simulations Inc. San Diego, CA)、UNITY (Tripos Inc., St Louis, MO)、FLEXX (Rarey et al., J. Mol. Biol. 261:470-489 (1996))、CHEM-3-DBS (Oxford Molecular Group, Oxford, UK)、DOCK (Kuntz et al., J. Mol. Biol 161:269-288 (1982)) 及び MACCS-3-D (MDL Information Systems Inc., San Leandro, CA) 及び LUDI (Boehm, J. Comp. Aid. Mol. Des. 6:61-78 (1992))、CAVEAT (Bartlett et al., in "Molecular Recognition in Chemical and Biological Problems", special publication of The Royal Chem. Soc. 78:182-196 (1989)) 及び MCSS (Miranker et al. Proteins 11:29-34 (1991)) を包含する。

【０１４９】

更に、分子ライブラリーの合成方法の例は当該技術分野において、例えば、DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:11422; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al. (1993) Science 261:1303; Carrell et al. (1994). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; 及び Gallo

p et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233 に見出すことができる。

【０１５０】

化合物のライブラリーは、溶液中に（例えば、Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421）、又はビーズ上に（Lam (1991) Nature 354:82-84）、チップ上に（Fodor (1993) Nature 364:555-556）、細菌上に（Ladner 米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子上に（Ladner 米国特許第５，２２３，４０９号）、プラスミド上に（Cull et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865-1869）又はファージ上に（Scott and smith (1990) Science 249:386-390; Devlin (1990) Science 249:404-406; Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310; Ladner 上記参照）に存在しうる。

【０１５１】

化合物の可能性のある調節因子の効果を、その実際の合成及び試験の前に、ＢＡＸ活性部位の構造座標を用いるコンピューターモデリング技術の使用によって更に分析できる。コンピューターモデリングが相互作用を示唆したなら、次いで化合物を、化学分野の当業者に公知の標準的な方法を用いて合成し、次いで本明細書に示されている分析法を用いてＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節するその能力を試験する。

【０１５２】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの調節因子又はその他の結合化合物を、化学物質又は断片を、個々の活性部位と結合する能力についてスクリーニングして選択する一連の工程の方法によって、コンピューター的に評価及び設計することができる。

本発明の方法の別の態様では、可能性のある調節因子化合物を、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位と、より特定的にはＢＡＸ活性部位と結合するそれらの能力について試験することができる。この工程は、例えばＢＡＸ活性部位の構造座標に基づくコンピュータースクリーン上の活性部位の目視検査を含むことができる。選択された化合物又は化学的部分を次ぎに、本明細書で定義された活性部位の個々の領域内に、多種の方向にアラインメントするか、又は結合することができる。結合は、Quanta and SYBYL のようなソフトウェア、次いでCHARMM and AMBER のような、標準分子力学力場によるエネルギー最小化及び分子動力学を用いて実施できる。

【０１５３】

ある態様では、本発明は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの構造座標を電子記憶媒体へ入力して、ポリペプチドの三次元コンピュータモデルを作成することを含んでいる。

一態様では、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの完全な構造座標を入力する。

別の態様では、断片の、又は完全な構造座標より少ないが、活性部位を含んでいる構造座標を入力する。

構造座標は当該技術分野で公知であるか、又はホモロジーモデリングに基づいている。例えば、公知のＢＣＬ－２ファミリー構造座標は、ＢＡＸ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．ｌｆ１６）、ＢＡＫ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．２ｉｍｓ）、ＢＣＬ－２（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．ｌｇ５ｍ）、及びＢＣＬ－ＸＬ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．１１ｘ１）、本発明に関連するものに加えて：ＢＩＭ ＢＨ３－ＢＡＸ（ＰＤＢ ＩＤ Ｎｏ．２ｋ７ｗ）、更に当該技術分野で公知のその他のものも包含する。。多くの公知のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの構造座標は、Protein Data Bank（「ＰＤＢ］）（Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; http://www.rcsb.org）から入手できる。

【０１５４】

本発明は更に、分子又は分子複合体の未知三次元構造を確認するために、本発明の構造座標を標準的なホモロジーモデリング技術と共に使用できることを提供する。ホモロジーモデリングは、１つ又はそれ以上の関連するタンパク質分子、分子複合体又はそれらの部分（すなわち、活性部位）の構造座標を用いて未知の構造のモデルを構築することを含んでいる。ホモロジーモデリングは、三次元構造を解明すべきタンパク質の共通の又は相同の部分を、公知分子の相同構造成分の三次元構造に、特に関連する（すなわち、相同する）構造座標を用いて、適合させることによって実施できる。相同性は、アミノ酸配列同一

性、相同の二次元構造成分、及び／又は第三の相同性折り畳み的構造を用いて確認することができる。ホモロジーモデリングは、アミノ酸残基（又は別の成分）を解明すべき関連構造のそれらによって置き換えた三次元構造の再構築部分又は全てを含むことができる。

【０１５５】

同様な方法は当業者に公知である（Greer, 1985, Sceience 228, 1055; Bundell et al 1988, Eur. J. Biochem. 172, 513; Knighton et al., 1992, Science 258:130-135, http://biochem.vt.edu/courses/modeling/homology.htm）。ホモロジーモデリングで用いることができるコンピュータプログラムは、Quanta and the homology module in the Insight II modeling package (Accelrys, Inc., San Diego, CA) 又はMODELLER (Rockefeller University, www.iucr.ac:uk/sinris-top/logical/prg-modeller.html, Sali's Modeller も Accelrys, Inc., San Diego, CA から入手できる)を包含する。

【０１５６】

相互作用テンプレートが作成されると、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する化合物を同定できる。化合物又は化学物質を選択する工程で用いることもできる特定化されたコンピュータプログラムは、

１．ＳＹＢＹＬ Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144, USA から入手できる。

２．ＵＮＩＴＹ Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144, USA から入手できる。

３．ＦｌｅｘＸ Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144, USA から入手できる。

４．ＧＲＩＤ (Goodford, P. J., "A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules", J. Med. Chem., 28, pp. 849-857(1985))。 GRID は Oxford University, Oxford, UK. から入手できる。

５．ＭＣＳＳ (Miranker, A. and M. Karplus, "Functionality Maps of Binding Sites: A Multiple Copy Simultaneous Search Method." Proteins: Structure. Function and Genetics, 11, pp. 29-34 (1991))。 MCSS は Molecular Simulations, Burlington, Mass. から入手できる。

６．ＡＵＴＯＤＯＣＫ (Goodsell, D.S. and A.J. Olsen, "Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing", Proteins: Structure. Function and Genetis, 8, pp. 195-202 (1990))。AUTODOCK は Scripps Research Institute, La Jolla, Calif. から入手できる。

７．ＤＯＣＫ (Kuntz, I.D. et al., "A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions", J. Mol. Biol., 161, pp. 269-288(1982))。DOCK は University of California, San Francisco, Calif. から入手できる。

【０１５７】

適切な化合物又は化学部分が選択されたら、これらを単一の化合物又は阻害剤に組み立てることができる。組み立ては、コンピュータスクリーン上に表示されている三次元構造画像上で、ＢＡＸ／ＢＩＭ－ＢＨ３ ＮＭＲ結合試験の構造座標に関する、化合物又は部分の互いの関係を目視検査することによって進行する。次いで、Quanta 又は SYBL のようなソフトウェアを用いる手入力モデル構築を行うことができる。

【０１５８】

個々の化合物又は化学物質に関連して当業者を支援するその他の有用なプログラムは以下のものを包含する。

１．ＣＡＶＥＡＴ (Bartlett, P.A. et al, "CAVEAT: A program to Facilitate the Structure-Derived Design of Biologically Active Molecules". In "Molecular Recognition in Chemical and Biological Problems", Special Pub., Royal Chem. Soc., 78, pp. 182-196(1989))。 CAVEAT は University of California, Berkeley, Calif. から入手できる。

２．MACCS-3D (MDL Information Systems, San Lendro, Calif.) のような３Ｄデータベースシステム。 この分野は、Martin, Y.C., "3D Database Searching in Drug Design", J. Med. Chem., 35, PP. 2145-2154 (1992) に概説されている。

３．HOOK (Molecular Simulations, Burlington, Mass. から入手できる)。

【０１５９】

別の態様では、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの調節因子は、公知調節因子(複数でも)の活性部位が無いもの又はある部分(複数でも)を任意に含んでいるものの何れかを用いて、総体的に又は「デノボ」で設計できる。これらの方法を支援するプログラムは以下のものを包含する。

１．ＬＵＤＩ (Bohm, H.-J., "The Computer Program LUDI: A New Method for the De Novo Design of Enzyme Inhibitors", J. Comp. Aid. Molec. Design, 6, pp. 61-78 (1992))。LUDI は Biosym Technologies, San Diego, Calif. から入手できる。

２．ＬＥＧＥＮＤ (Nishibata, Y. and A. Itai, Tetrahedron, 47, p. 8985 (1991))。 LEGEND は Molecular Simulations, Burlington, Mass. から入手できる。

３．ＬｅａｐＦｒｏｇ (Tripos Associates, St. Louis, MO から入手できる)。

【０１６０】

その他の分子モデリング技術も本発明に従って利用することができる。例えば、Cohen, N.C. et al., "Molecular Modeling software and Methods for Medicinal Chemistry", J. Med. Chem., 33, pp. 883-894 (1990) を参照されたい。Navia, M.A. and M.A. Murcko, "The Use of Structural Information in Drug Design", Current Opinions in Structural Biology, 2, pp. 202-210 (1992) も参照されたい。

【０１６１】

上記の方法によって化合物が設計され又は選択されると、化合物がＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを調節する効果をコンピューター的評価によって試験して最適化することができる。効果的ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの調節因子は、その結合状態と自由状態の間で比較的僅かな相違（すなわち、小さい結合の変形エネルギー）を好ましくは示さなければならない。

【０１６２】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの調節因子として設計又は選択された化合物を更に、その結合状態において標的タンパク質との反発静電相互作用をなるべく無くすようにコンピュータ的に最適化することができる。このような非相補的な（例えば、静電気的な）相互作用は、反発電荷－電荷、双極子－双極子及び電荷－双極子相互作用を包含する。特に、調節因子がＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドに結合したときの調節因子と酵素の間の全ての静電的相互作用を合わせたものが、結合エンタルピーに中程度に又は有利に寄与することが好ましい。

【０１６３】

化合物の変形エネルギー及び静電的相互作用を評価するための特定のコンピュータソフトウェアは当該技術分野で入手できる。そのような使用のために設計されたプログラムの例は、Gaussian 92, revision C (M.J. Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburgh, Pa.); AMBER, version 4.0 (P.A. Kollman, University of California at San Fransisco); QUANTA/CHARMM (Molecular Simulations, Inc., Burlington, Mass.); 及び InsightII/Disover (Biosysm Technologies Inc., San Diego, Calif.) を包含する。これらのプログラムは、例えば、Silicon Graphics ワークステーション、ＩＲＩＳ ４Ｄ／３５ 又はＩＢＭ ＲＩＳＣ／６０００ワークステーションモデル５５０を用いて、実行することができる。その他のハードウェアシステム及びソフトウェアパッケージは当業者に公知であろう。

【０１６４】

更に、断片による創薬をＢＡＸの活性部位と相互作用する化合物を同定するために用いることができる。これらの方法は公知であって、それらを使用するためのコンピュータツール、例えば、"SAR by NMR" (Shukers, S. B., et al., Science, 1996, 274, 1531-1534)、"Fragments of Active Structures" (www.stromix.com; Nienaber, V.L., et al., N

at. Biotechnol., 2000, 18, 1105-1108)、及び "Dynamic Combinatorial X-ray Crystallography" (例えば、自己集合性断片のタンパク質分子による自主的選択を許容；Congreve, M.S. et al., Angew. Chem., Int. Ed., 2003, 42, 4479-4482) は市販されている。

【０１６５】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド調節因子が、本明細書に記載されているように、最適に選択又は設計されると、修飾しやすい領域を同定するための相互作用並びに選択性テンプレートによってもたらされる情報を再び用いて、その結合特性を改善若しくは修正するために、その原子又は側基のいくつかにおいて置換を行うことができる。一般に、最初の置換は同類置換である。すなわち、置換基は、元の基とほぼ同じ大きさ、形、疎水性及び電荷を有しているであろう。勿論、当然のことながら、構造を変えることが当該技術分野で知られている成分は避けるべきである。このように置換された化学物質を次いで、上で詳細に記載されたものと同じコンピュータ方法によってＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドへ適合する効果を試験できる。

【０１６６】

ある特定の態様では、調節因子は、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドに対して、０．２ｍＭ未満の、０．１ｍＭ未満の、７５０μＭ未満の、５００μＭ未満の、２５０μＭ未満の、１００μＭ未満の、５０μＭ未満の、５００ｎＭ未満の、２５０ｎＭ未満の、５０ｎＭ未満の、３０ｎＭ未満の、２０ｎＭ未満の、１０ｎＭ未満の、５ｎＭ未満の、３ｎＭ未満の、１ｎＭ未満の、又は０．５ｎＭ未満のＫｄを有している。

【０１６７】

設計された調節因子を、当該技術分野で公知で本明細書に記載されているインビトロ又はインビボ試験を用いて更に評価することができる。

【０１６８】

ＩＶ．ＢＣＬ－２ファミリーペプチド調節及び化合物結合を評価するインビトロアッセイ

コンピューターモデリング、ライブラリーのスクリーニング、及び／又は断片による創薬によって、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合することが見出された、化合物の能力判定を、直接結合を試験することによってＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド相互作用について更に評価することができる。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドに結合する試験化合物の能力判定は、例えば、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの可能性のある調節因子への結合を、複合体中の標識化ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを検出して確認できるように、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド又は化合物を放射性同位元素又は酵素標識と結合させることによって遂行することができる。例えば、化合物を^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、又は^{3}Ｈと、直接的に又は間接的にの何れかに結合させて、放射線放出を直接カウントするか、又はシンチレーションカウントによって放射性同位元素を検出することができる。また、化合物を、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、又はルシフェラーゼで、酵素標識して、適切な基質の産生物への変換を測定して酵素標識を検出することができる。更なる例としては、化合物を蛍光で標識して、リガンドとＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの間の結合相互作用を、蛍光偏光アッセイを用いて定量することができる。結合を、本明細書に記載のようにして、HSQC NMR によっても測定することができる。

【０１６９】

別の態様では、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドに結合する調節因子の能力判定を、下流事象（例えば、構造、オリゴマー形成状態、又はポリペプチドの細胞内局在における変化、アポトーシス、ミトコンドリアのチトクロームｃ放出、など）の誘発を検出して、又は別のＢＣＬ－２ファミリーで制御された細胞応答を検出して確認することができる。

【０１７０】

もう一つの態様では、このアッセイが、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質又は活性部位を含有しているその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させて、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質又はその生物学的に活性な部分の活性を試験化合物が調節する能力を確認する、細胞を用いないアッセイである。ＢＣＬ－２ファミリータンパク質の活性を調節す

る試験化合物の能力判定は、例えば、試験化合物の存在下で、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質の別のＢＣＬ－２ファミリー標的分子に結合する（例えば、炭化水素連結ＢＩＭ ＢＨ３ポリペプチドへのＢＡＸの結合）能力を判定することによって達成できる。

【０１７１】

標的分子に結合するＢＣＬ－２ファミリータンパク質の能力判定は、リアルタイムの Biomelecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 及び Szabo et al., (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705) のような技術を用いて達成することもできる。本明細書で用いられている「ＢＩＡ」は、反応体（例えば、ＢＬＡ核）の何れも標識化しないで、リアルタイムで生体特異相互作用を検討するための技術である。表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光学現象変化を生体分子間のリアルタイム反応の指標として用いることができる。

【０１７２】

他の態様では、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質の活性を調節する試験化合物の能力判定は、下流のＢＣＬ－２ファミリー標的分子の活性を調節するＢＣＬ－２ファミリータンパク質の能力を確認することとによって達成できる。例えば、エフェクター分子の適切な標的に対する活性を確認できるか、又は既述のように適切な標的とのエフェクターの結合を確認できる。

【０１７３】

更に別の態様では、細胞を用いないアッセイは、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質（例えば、ＢＡＸ）又は活性部位を含有しているその生物学的に活性な部分を、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質（例えば、炭化水素連結ＢＩＭ ＢＨ３ポリペプチド）を結合する公知の化合物と接触させて分析試料を形成すること、及びＢＣＬ－２ファミリータンパク質と相互作用する試験化合物の能力を判定することを含んでいる。ここにおいて、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質と相互作用する試験化合物の能力判定は、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質と優先的に結合するか又はその活性を調節して、及び公知化合物を置き換える試験化合物の能力判定を含んでいる。

【０１７４】

本発明の上記アッセイ方法の１つ以上の態様では、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド又はその標的分子の何れかを、一方又は両方のタンパク質の複合していない形態から複合形態を分離するために、更にアッセイの自動化に順応させるためにも、固定化することが望ましくてもよい。試験化合物のＢＣＬ－２ファミリータンパク質への結合、又は候補化合物の存在下又は非存在下におけるＢＣＬ－２ファミリータンパク質の標的分子との相互作用は、反応物を入れるのに適している何れかの容器中で実施できる。このような容器の例は、マイクロタイタープレート、試験管、及び微小遠心管を包含する。

一態様では、一方又は両方のタンパク質がマトリックスに結合できるようにするドメインを追加する融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／ＢＣＬ－２ファミリー融合タンパク質、又はグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, Mo.）又はグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着できて、これは次いで、試験化合物と、又は試験化合物及び非吸着標的化合物又はＢＣＬ－２ファミリータンパク質の何れかと結合し、そして複合体形成を促進する条件下で（例えば、塩及びｐＨに関する生理学的条件で）混合物を培養する。培養に続いて、ビーズ又はマイクロタイタープレートのウェルを洗浄して結合しなかった成分を除去し、ビーズの場合はマトリックスに固定化された複合体を、例えば上記のように、直接的又は間接的の何れかで検出する。また、複合体をマトリックスから解離してＢＣＬ－２ファミリータンパク質の結合又は活性を標準的な技術を用いて確認することができる。

【０１７５】

本発明のアッセイにおいて、タンパク質をマトリックスに固定化するために別の技術を用いることもできる。例えば、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質又はＢＣＬ－２ファミリーの標的分子の何れかを、ビオチンとストレプトアビジンの結合を利用して固定化するこ

とができる。ビオチン化ＢＣＬ－２ファミリータンパク質又は標的分子を、ビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）から当該技術分野で周知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemical, Rockford,Ill）を用いて生産して、ストレプトアビジンでコートした９６ウェルのプレート（Pierce Chemical）のウェル中に固定化することができる。

また、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質又は標的分子と反応するが、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質とその標的分子の結合を妨げない抗体を、プレートのウェルに誘導体化して、結合しなかった標的又はＢＣＬ－２ファミリータンパク質を、抗体結合によってウェル中に捕捉することができる。このような複合体を検出する方法は、ＧＳＴ固定化複合体について上で記載したものに加えて、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質又は標的分子と反応する抗体を用いる複合体の免疫検出を、更にＢＣＬ－２ファミリータンパク質又は標的分子の酵素活性を検出することによる酵素結合アッセイ法も包含する。

【０１７６】

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する化合物は、当該技術分野で公知の、又は本明細書に記載の多数のアッセイを用いると、インビトロ又はインビボで腫瘍細胞数を抑制することを明らかにすることができる。このようなアッセイは、目的の化合物の存在下又は非存在下で、腫瘍細胞株又は患者由来の細胞を用いることができる。細胞は脱制御のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド経路を有していることが好ましい。本発明の化合物又は療法（regimen)の、腫瘍細胞数を減少するか又はそれらの増殖を阻害する能力は、当該技術分野で公知の及び本明細書に記載されている方法によって評価することができる。

【０１７７】

本発明は、１つ又はそれ以上のＢＣＬ－２ファミリータンパク質の活性部位に結合してその活性を調節する化合物を同定する方法（本明細書では「スクリーニングアッセイ」とも示す）を提供する。

【０１７８】

本明細書に記載されているポリペプチドの結合親和性は、例えば、滴定結合アッセイを用いて測定することができる。ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド又はＢＨドメインを含有しているポリペプチド（例えば、ＢＡＸ、等）を、蛍光標識されたＢＨ３含有ポリペプチド又はそれらの断片（例えば、ＢＩＤ、ＢＡＤ、ＢＡＫ、ＢＡＸ、等）のような基質の存在下に、種々の濃度（例えば１ｎＭ、１０ｎＭ、１００ｎＭ、１μＭ、１０μＭ、１００μＭ、１ｍＭ、及び１０ｍＭ）の候補化合物（すなわち、ポリペプチド、小分子）に曝すことができる。次いで、候補化合物のそれぞれの濃度の効果を分析して、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド結合活性に対する、各種濃度における候補化合物の効果を決定し、これを候補化合物のＫｉを計算するために用いることができる。候補化合物は、競合様式又は非競合様式において、ＢＣＬ－２タイプの活性を調節できる。ＢＣＬ－２ファミリータンパク質と蛍光標識された候補化合物の間で、結合相互作用に対するＫｄを決定するために、直接結合アッセイを実施することもできる。

候補化合物を、インビトロでの生物活性を、例えば、構造特異的抗体（例えば、ＢＡＸ６Ａ７抗体、図１２ｂ）によって又はＨＳＱＣ ＮＭＲ分析によって測定されるようなＢＣＬ－２ファミリータンパク質の構造変化、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）による分析（図１２ａ、１３ｂ、１３ｄ）又は動的光散乱によって観察されるようなＢＣＬ－２ファミリータンパク質（例えば、ＢＡＸ）のオリゴマー化状態の変化、リポソームからフルオロフォア又はタンパク質結合フルオロフォア誘発放出、及び／又は精製されたミトコンドリアからのチトクロームｃ放出（図１２ｃ、１２ｄ）を誘発する用量反応性の効果を測定することによって、スクリーニングすることもできる。

細胞浸透性スクリーニングアッセイも想定され、そこでは蛍光又は別の物で標識された候補化合物を無傷細胞に適用して、次いで顕微鏡又はハイスループット細胞蛍光発光検出によって細胞の蛍光発光についてアッセイする。

【０１７９】

本発明の化合物、医薬組成物、又は治療法を、ヒトで使用する前に、望ましい治療又は予防活性についてインビトロで、次いでインビボで試験することが好ましい。例えば、特定の化合物の投与が有効か否かを確認するために用いることができるアッセイは、細胞培養アッセイを包含し、ここでは患者の組織サンプル（例えば、癌細胞）を培養液中で生育させ、本発明の化合物に曝すか又は接触させて、組織サンプルに対するこのような化合物の効果を観察する。組織サンプルは生検によって得られるか又は患者から取り出した血液／骨髄である。この試験は、個々の患者に対する治療的に最も効果のある治療（例えば、予防または治療剤）の同定を可能にする。

【０１８０】

本明細書に記載されているアッセイは、個々の候補化合物を用いて実施でき、また複数の候補化合物を用いても実施できる。複数の候補化合物を用いてアッセイを実施する場合は、候補化合物の混合物を用いて実施でき、或は単一の候補化合物を有するそれぞれの反応によって反応を平行させることもできる。試験化合物又は薬物は、当該技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー方法における多数の手法の何れかを用いて得られる。

【０１８１】

好ましい態様では、細胞によるアッセイは、化合物がＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性も調節できるか否かを確認するために、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合することが知られている（例えば、コンピュータモデリング、直接結合アッセイ、ＮＭＲ、又は別の方法で同定された）化合物について実施される。

【０１８２】

一態様では、アッセイは、ＢＣＬ－２ファミリータンパク質又はその生物活性部分を発現する細胞を候補化合物と接触させて、候補化合物の活性部位に結合してＢＣＬ－２ファミリータンパク質の活性を調節する能力を判定する（例えば、内因性又は外因性の細胞死経路を介して、ある場合はアポトーシスを増大する、ある場合はアポトーシスを減少する）、細胞によるアッセイである。試験化合物が細胞内でＢＣＬ－２タイプの活性を調節する能力判定は、例えば、ミトコンドリアからチトクロームｃの放出、又は別の関連する生理学的読み出し情報（例えば、アネキシンＶ染色、ＭＴＴアッセイ、カスパーゼ活性のアッセイ、ＴＵＮＥＬアッセイ、ミトコンドリア膜電位の変化）を観察することによって実施することができる。

【０１８３】

ＢＣＬ－２ポリペプチドの活性部位に結合することが見出された化合物のインビトロでの抗腫瘍活性は、その化合物が腫瘍細胞を殺す能力を測定することによってアッセイすることができる。細胞株の例は、ヒト肺（Ａ５４９）；低トポＩＩ活性を有する耐性ヒト肺（Ａ５４９－ＶＰ）；ネズミメラノーマ（Ｂ１６）；ヒト結腸腫瘍（ＨＣＴ１１６）；上昇したｐ１７０れべるを有するヒト結腸腫瘍（ＨＣＴＶＭ）；低トポＩＩ活性を有するヒト結腸腫瘍（ＨＣＴＶＭ）；Ｐ３８８ネズミリンパ球性白血病；及びヒト結腸癌腫細胞株（Moser）、及び当該技術分野で公知のその他の多数を包含する。

【０１８４】

腫瘍阻害アッセイは、例えば、Kelly, et al., 米国特許第５，１６６，２０８号、及び Pandley, et al., J. Antibiot. 3(11):1389-401 (1981) に記載されている。

あるアッセイでは、細胞を標準的な条件下で２４時間生育させることができる。その後、細胞をプレート（例えば、９６ウェルの平底プレート）に付着させて、連続的に濃度を希釈したＢＣＬ－２ファミリー調節剤と７２時間培養することができる。これらのデータから、細胞の５０％が殺されたか又は生育阻止された化合物の濃度（ＩＣ５０）を決定する。

【０１８５】

ＶＩＩ．化合物のインビボ試験

本発明の化合物は、インビボにおける腫瘍形成を阻害することも明らかにできる。本発明の化合物、医薬組成物、及び療法を、ヒトでの使用前に適切な動物モデル系で試験できる。このような動物モデル系は、これに限定されないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウ

シ、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、等を包含する。当該技術分野で周知の動物系のどれでも使用できる。手順のうちの幾つかの実施態様を変ることができ、当該態様は、これに限定されないが、治療モダリティー（例えば、予防及び／又は治療薬物）を投与する一時的な治療計画（そのような治療モダリティーが、別々に又は混合物として投与される）、及び治療モダリティーの投与回数を包含する。

【０１８６】

本発明のＢＣＬ－２ファミリー調節化合物のインビボ抗腫瘍活性は、治療していない担癌動物と比較して、哺乳動物（例えば、マウス）における腫瘍細胞の減少及び結果として現れる生存時間の増大によってアッセイすることができる。例えば、ＣＤＦＩマウスにｐ３８８マウスリンパ球性白血病細胞、エールリッヒ癌細胞、Ｂ１６メラノーマ細胞、又はＭｅｔｈ－Ａ繊維肉腫細胞の懸濁液を腹腔内投与する。注射投与されたマウスの一部は次ぎに、本発明のＢＣＬ－２ファミリー調節化合物で腹腔内へ処理され、その他のマウスは食塩水で処理される。次いで、化合物のインビボ活性を％Ｔ／Ｃ（食塩水治療群の平均生存時間に対する治療群の平均生存時間の比×１００）の観点から確認する。Yokoi, et al., 米国特許第４，５８４，３７７号； Kelly, et al., 米国特許第５，１５５，２０８号； Warnic-Pickle, et al., J. Antibiot. 34(11):1402-7 (1981); 及び Pandley, et al., 上記参照。

【０１８７】

腫瘍形成及び転移核酸を含む、過剰増殖性疾患の多数の動物モデルは当該技術分野で公知であって本明細書に記載されている（Chapter 317, "Principals of Neoplasia," in Harrison's; Principals of Internal Medicine, 13th Eddition, Isselbacher et al., eds., McGraw-Hill, New York, p. 1814、及び Lovejoy et al., 1997, J. Pathol. 181:130-135 を参照されたい）。過剰増殖疾患は、癌及び自己免疫疾患のような、細胞増殖又はアポトーシス遮断疾患を包含する。ＢＣＬ－２に関連する癌は、これに限定されないが、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫を包含する。

【０１８８】

一態様では、この疾患は化学療法抵抗性の癌である。更に好ましい態様では、化学療法抵抗性の癌はＡＢＴ－７３７（Abbott; abbott Park, Illinois から入手できる）に対して耐性である。

特定の例は、肺癌については、腫瘍小結節のラットへの移植（Wang et al., 1997, Ann. Thorac. Surg. 64:216-219）又はＮＫ細胞が枯渇しているＳＣＩＤマウスへの肺癌転移の確立（Yono and Sone, 1997, Gan to Kagaku Ryoho 24:489-494）；結腸癌については、ヒト結腸癌細胞のヌードマウスへの結腸癌移植（Gutman and Fidler, 1995, World J. Surg. 19:226-234）ヒト潰瘍性結腸炎のワタボウシタマリンモデル（Warren, 1996, Aliment. Phrmacol. Ther. Supp. 12:45-47）及び大腸腺腫癌抑制因子の突然変異を有するマウスモデル（Polakis, 1997, Biochim. Biophys. Acta 1332:F127-F147）；乳癌については、乳癌のｋａｎ遺伝子（kansgenic）モデル（Dankort and Muller, 1996, Cancer Treat. Res. 83:71-88; Amundadittir et al., 1996, Breast Cancer Res. Treat. 39:119-135）及びラットにおける腫瘍の化学作用による誘発（Russo and Russo, 5 1996, Breast Cancer Res. Treat. 39:7-20）；前立腺癌については、化学的に誘発した遺伝子組み換え齧歯動物モデル、及びヒト異種移植モデル（Royal et al., 1996, Semin. Oncol. 23:35-40）；泌尿生殖器癌については、ラット及びマウスにおける誘発された膀胱腫瘍（Oyasu, 1995, Food Chem. Toxicol. 33:747-755）及びヒト移行上皮癌のヌードラットへの異種移植（Jarrett et al., 1995, J. Endourol. 9:1-7）；及び造血細胞の癌については動物における移植された同種骨髄（Appelbaum, 1997, Leukemia 11 Suppl.4):S15-S17）を包含する。

【０１８９】

更に、多くの癌タイプに適用可能な一般的な動物モデルが述べられていて、これに限定されないが、ｐ５３欠損マウスモデル（Donehower, 1996, Semin. Cancer Biol. 7:269-278）、Ｍｉｎマウス（Shoemaker et al., 1997, Biochem. Biophys. Acta, 1332:F25-F48

）、及びラット１５における腫瘍に対する免疫応答（Frey, 1997, Methods, 12:173-188）を含んでいる。

【０１９０】

例えば、本発明の化合物を試験動物（一態様では、試験動物はあるタイプの癌を進展しやすい）に投与されて、試験動物はその後、化合物を投与されていない動物と比較した腫瘍形成の発生率の減少について検査される。

あるいは、化合物を腫瘍を有している動物（例えば、悪性、腫瘍性、又は形質転換細胞の導入によって、又は発癌物質の投与によって腫瘍が誘発されている動物）に投与でき、その後試験動物の腫瘍を、化合物を投与されていない動物と比較して、腫瘍の退縮について検査する。

本発明の化合物は、治療有効量を投与したときに、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも１００％腫瘍進行時間を増大するか又は生存日数を増大するならば、過剰増殖性疾患の治療に有効であると考えられる。

【０１９１】

同様に、本発明の化合物は、治療有効量を投与したときに、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも１００％腫瘍の生育を減少し、腫瘍量を減少し、転移の数を減少するならば、過剰増殖性疾患の治療に有効であると考えられる。

このような結果は、当業者、例えば、癌専門医によって確認できる。

【０１９２】

更に、当業者に公知のアッセイの何れも、本明細書に開示されている化合物又は医薬組成物の、過剰な細胞増殖又は細胞死に関連する疾患又はそれらの１つ又はそれ以上の症状に対して予防及び／又は治療の有用性を評価するために用いることができる。

【０１９３】

ＶＩＩＩ．治療方法

本発明の薬剤は、細胞死のシグナルが下方調節されている細胞を治療するのに有用である。この冒された細胞は細胞死に対して不適切に低下した性向を有していて、これを本明細書では「減少したアポトーシス状態」であると言う。

本発明は更に、ウィルスに感染した細胞又は自己抗体を発現する細胞のような、ある特定なタイプの細胞にアポトーシスを誘発することが望ましい、アポトーシス関連疾患を治療する薬剤の治療有効量を対象に投与する方法を提供する。

一般的に、この薬剤は投与前に実質的に精製されている。対象は、これに限定されないが、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどを含む動物であってよく、典型的には哺乳類、そして特定の態様ではヒトである。別の特定な態様では、ヒトではない哺乳類が対象である。

【０１９４】

本発明は、異常な（例えば、不十分な又は過剰な）ＢＣＬ－２ファミリーメンバーの発現又は活性（例えば、外因性又は内因性のアポトーシス経路の異常）に関連する疾患を起こす危険性があるか（又は、罹りやすい）又はこの疾患を有する対象を処置する、予防及び治療的方法の両方を提供する。

本明細書で用いられる用語「治療」は、疾患、疾患の症状又は疾患になりやすい素因を回復する、治癒する、軽減する、緩和する、改める、治療する、改善する、良くする又は影響を与えることを目的として、治療薬を患者に適用又は投与すること、又は疾患、疾患

の症状或は疾患になりやすい素因を有する患者由来の分離組織又は細胞株に治療薬を適用又は投与することであると定義される。

治療薬は、これに限定されないが、小分子、ペプチド、抗体、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、その他の核酸組成物、及びこれらの組合わせを包含する。

【０１９５】

ＢＣＬ－２タイプの疾患は、少なくともその一部が、１つ又はそれ以上のＢＣＬ－２ファミリーメンバーの異常なレベル（例えば、ＢＣＬ－２の過剰又は過小発現）に、又は異常活性を示す１つ又はそれ以上のＢＣＬ－２ファミリーメンバーの存在に起因している。このように、本発明は、疾患症状の改善をもたらす、ＢＣＬ－２ファミリーメンバーのレベル及び／又は活性の減少、又はＢＣＬ－２ファミリーメンバーのレベル及び／又は活性の増大を目的としている。例えば、ＢＣＬ－２のようなアンチアポトーシスタンパク質の過剰なレベルにより維持されている癌を、アポトーシス障害を克服又は回避してＢＡＸが介在するアポトーシスを直接誘発するために、ＢＡＸ活性化調節因子化合物を用いて治療することができる。

【０１９６】

本発明の化合物を癌及び腫瘍性疾患を治療及び予防するために用いることができる。本明細書で用いられる用語「癌」、「過剰増殖」及び「腫瘍性」は、自立的増殖能及び細胞死不全、すなわち、急速に増殖する細胞増殖及び／又はアポトーシス障害を特徴とする異常な状態又は様相、を有する細胞を示す。過剰増殖及び腫瘍性病態は、病的なもの、すなわち病状を特徴としているか又は構成している、に分類できるか、或は非病的なもの、すなわち正常値から離れているが病状とは関連していない、に分類できる。この用語は、病理組織学的なタイプ又は侵襲の状態に関わらず、癌性増殖又は発癌過程、転移性組織、又は悪性形質転換した細胞、組織、又は器官の全てのタイプを包含する。

「病的な過剰増殖」細胞は、悪性腫瘍増殖を特徴とする病態で生じる。非病的過剰増殖細胞は創傷修復に関連している細胞の増殖を包含する。

【０１９７】

細胞の増殖及び／又は分化障害の例は、癌、例えば、癌腫、肉腫、又は転移性疾患を包含する。化合物は、新規な治療薬として、乳癌、卵巣癌、結腸癌、肺癌、このような癌の転移等を制御する働きをする。転移性の腫瘍は、これに限定されないが、胸部、肺、肝臓、結腸及び卵巣起源のものを包含する、多数の原発腫瘍タイプに起因している。

【０１９８】

癌又は腫瘍性疾患の例は、これに限定されないが、繊維肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胃癌、食道癌、直腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、頭頚部癌、皮膚癌、脳腫瘍、扁平上皮癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、ウイルムス腫瘍、子宮頚癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、随芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、又はカポジ肉腫を包含する。

【０１９９】

増殖障害の例は、造血系腫瘍疾患を包含する。本明細書で用いられる用語「造血系腫瘍疾患」は、過形成性／腫瘍性の造血系起源の細胞、例えば、骨髄、リンパ又は赤血球系統に起因する細胞またはそれらの前駆細胞、に関連する疾患を包含する。好ましくは、この疾患は低分化急性白血病、例えば、赤芽球性白血病及び急性巨核芽球性白血病に起因している。骨髄性疾患の更なる例は、これに限定されないが、急性前骨髄性白血病（ＡＰＭＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）及び慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）（Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol./Hemotol. 11:267-97 に概説されている）を包含し；リンパ性悪性腫瘍は、これに限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ；これはＢ－系列のＡＬＬ及びＴ－系列のＡＬＬを包含する）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、前リンパ

球性白血病（ＰＬＬ）、有毛細胞白血病（ＨＬＬ）及びヴァルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ）を包含する。悪性リンパ腫の更なる形態は、これに限定されないが、非ホジキンリンパ腫及びこれの変種、末梢Ｔ細胞リンパ腫、成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫（ＡＴＬ）、皮膚Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）、大型顆粒リンパ球白血病（ＬＧＦ）、ホジキン病及びリードーステンベルグ病を包含する。

【０２００】

胸部の細胞増殖／分化異常の例は、これに限定されないが、例えば上皮過形成、硬化性腺症、及び細管乳頭腫を包含する増殖性胸部疾患；腫瘍、例えば繊維腺腫、葉状腫瘍、及び肉腫のような腫瘍、及び大管乳頭腫のような上皮腫瘍；非浸潤性乳管癌（ページェット病を含む）及び上皮内小葉癌を含む上皮内癌、及びこれに限定されないが、浸潤性腺管癌、浸潤性、浸潤性小葉癌、随様癌、コロイド性（粘液性）癌、管状腺癌、侵襲性乳頭癌を包含する侵襲性（浸潤性）癌、及び種々の悪性新生物を包含する。男性胸部の疾患は、これに限定されないが、女性化乳房及び癌を包含する。

【０２０１】

肺の細胞増殖／分化異常の例は、これに限定されないが、気管支カルチノイド、種々の腫瘍、及び転移性腫瘍のような、腫瘍随伴性症状、細気管支肺胞上皮癌を含む気管支癌；炎症性胸水、非炎症性胸水、気胸、及び胸膜癌（単発性線維性腫瘍（胸膜線維腫）及び悪性中皮腫を包含する）を含む胸膜の病変を包含する。

【０２０２】

結腸の細胞増殖／分化異常の例は、これに限定されないが、非腫瘍性のポリープ、アデノーマ、家族性症候群、結腸直腸の発癌、結腸直腸癌、及びカルチノイド腫瘍を包含する。

【０２０３】

肝臓の細胞増殖／分化異常の例は、これに限定されないが、結節性過形成、アデノーマ、及び肝臓の原発性腫瘍及び転移性の腫瘍を含む、悪性腫瘍を包含する。

【０２０４】

卵巣の細胞増殖／分化異常の例は、これに限定されないが、体腔上皮の腫瘍、漿液腫瘍、粘液性腫瘍、類内膜腺癌、透明細胞腺癌、 嚢胞腺線維腫、ブレンナー腫瘍、表面上皮腫瘍のような卵巣腫瘍；成熟型（良性）奇形腫、単胚葉性奇形種、未熟型悪性奇形種、未分化胚細胞腫、内胚葉洞腫瘍、絨毛腫のような胚細胞腫瘍；顆粒膜－卵胞膜細胞腫瘍、莢膜細胞腫・線維腫、セルトリ間質細胞腫瘍、門細胞腫、及び性腺芽腫のような、性索間質腫瘍；及びクルケンゲルグ腫瘍のような転移性腫瘍を包含する。

【０２０５】

本明細書に記載されている化合物を、過剰活性な細胞死又は生理学的損傷等に起因する細胞死を特徴とする疾患を治療又は予防するためにも用いることができる。時期尚早の又は不要な細胞死及び／又は不要又は過剰な細胞増殖に特徴付けられる疾患の幾つかの例は、これに限定されないが、虚血性、低細胞性／形成不全、無細胞性／無形成性、又は富細胞性／過形成性の疾患を包含する。幾つかの例は、これに限定されないが、ファンコニー貧血、再生不良性貧血、サラセミア、先天性好中球減少症、骨髄形成異常を含む、血液障害を包含する。

【０２０６】

アポトーシスを減少するように働く本発明の化合物を、望ましくないレベルの細胞死に関連している疾患を治療するために用いることができる。従って、本発明のアンチアポトーシス化合物を、ウィルス感染、例えば、ヒト免疫不全ウィルス（ＨＩＶ）による感染に関連する感染、に関連する細胞死をもたらすような疾患を治療するために用いることができる。多くの種類の神経疾患は、ニューロンの特異的集合が徐々に失われることによって特徴付けられるので、感染によるアンチアポトーシスペプチドをこれらの疾患の治療に用いることができる。このような疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、網膜色素変性、脊髄性筋萎縮症、及び小脳変性症の各種形態を包含する。

これらの疾患における細胞消失は炎症応答を誘発しないので、アポトーシスが細胞死のメカニズムであると思われる。更に、多くの血液病は、減少した血液細胞の産生に関連している。これらの疾患は、慢性疾患に関連している貧血、再生不良性貧血、慢性好中球減少症、及び骨髄異形成症候群を包含する。骨髄異形成症候群及び再生不良性貧血の幾つかの形態のような、血液細胞産生の障害は、増大した骨髄内のアポトーシス細胞死に関連している。

これらの疾患は、アポトーシスを促進する遺伝子の活性化、間質細胞又は造血生存因子の後天性欠乏症、毒素及び免疫応答メディエータの直接作用に起因しているだろう。細胞死に関連する２つの一般的な疾患は心筋梗塞と脳卒中である。両方の疾患において、血流の急性損失の場合に生じる、虚血の中心部にある細胞が、壊死の結果として急速に死亡すると思われる。しかしながら、虚血領域の中心部以外では、細胞はより長期に渡って死亡して、形態学的にアポトーシスによって死亡したと思われる。本発明のアンチアポトーシス化合物は、望ましくない細胞死に関連するこのような全ての疾患を治療するために用いることができる。

【０２０７】

本明細書に記載されているポリペプチドを用いて治療できる免疫疾患の幾つかの例は、これに限定されないが、組織移植拒絶、関節炎、狼瘡、ＩＢＤ、クローン病、喘息、多発性硬化症、糖尿病等を包含する。

【０２０８】

本明細書に記載されているポリペプチドを用いて治療できる神経疾患の幾つかの例は、これに限定されないが、アルツハイマー病、ダウン症候群、オランダ型遺伝性脳出血アミロイドーシス、反応性アミロイドーシス、難聴及び蕁麻疹を伴う家族性アミロイドーシス腎症、マックル・ウェルズ症候群、突発性骨髄症、マクログロブリン血症関連骨髄症、家族性アミロイド多発神経障害、家族性アミロイド心筋症、単独心アミロイドーシス、全身性老人性アミロイドーシス、成人発症の糖尿病、インスリノーマ、心房性アミロイドーシス、甲状腺の髄様癌、家族性アミロイドーシス、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、アミロイド性多発神経炎、スクレイピー、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候群、ウシ海綿状脳症、プリオン病、及びハンチントン病を包含する。

【０２０９】

本明細書に記載されているポリペプチドを用いて治療できる内分泌疾患の幾つかの例は、これに限定されないが、糖尿病、甲状腺機能低下症、下垂体機能低下症、副甲状腺機能低下症、性腺機能低下症等を包含する。

【０２１０】

本発明の化合物及び方法で治療又は予防できる心臓血管疾患（例えば、炎症性疾患）の例は、これに限定されないが、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞、脳卒中、血栓症、動脈瘤、心不全、虚血性心臓疾患、狭心症、突然心臓死、高血圧性心臓疾患；動脈硬化、小血管疾患、腎症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高脂血症、黄色腫症、喘息、高血圧、肺気腫及び慢性肺疾患のような、非冠状血管疾患；血管形成、シャント、ステント、合成又は天然の切除移植片、貯留カテーテル、弁又はその他の埋め込み可能デバイスの留置後の再狭窄のような、介入手順（「処置上の血管障害」）に関連する心臓血管疾患を包含する。望ましい心臓血管疾患はアテローム性動脈硬化、心筋梗塞、動脈瘤、及び脳卒中を包含する。

【０２１１】

ＩＸ．調節因子の投与

一態様では、本発明の化合物は癌の予防、治療、及び／又は管理のための単独療法として投与される。

【０２１２】

本発明の一態様は、患者（特にヒト患者）において癌を予防、治療、及び／又は管理する方法に関連していて、その方法は患者に予防に有効な療法又は治療に有効な療法を投与

することを含有してなり、療法は患者に本発明の化合物又は組成物を投与することを含有していて、ここで患者は癌であると診断されている。癌の予防、治療、及び／又は管理に有効であろう、予防及び／又は治療レジメンにおいて用いられる、本発明化合物の量は、化合物の現在処方されている用量に、更に本明細書に開示されている方法によって決定される用量に基づいている。

【０２１３】

この態様の一実施態様では、患者は別の治療方法を受けていたか或は受けている。

この態様の別の実施態様では、患者は未だ、癌を予防、治療、及び／又は管理する治療を受けていない。

【０２１４】

医師は一般的な癌スクリーニング方法を用いて患者を診断することができ、この方法は、これに限定されないが、身体検査（例えば、前立腺検査、乳房検査、リンパ節検査、腹部検査、皮膚観察）、視覚法（例えば、大腸内視鏡検査法、気管支鏡検査法、内視鏡検査法）、子宮頸部細胞診（子宮頸癌）、検便、血液試験（例えば、全血球数（ＣＢＣ）試験）、血液化学試験（肝機能試験、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）試験、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）試験、癌抗原（ＣＡ）－１２５試験、アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）試験を含む）、染色体分析、骨髄分析（例えば、血液系の悪性腫瘍の場合）、組織学、細胞学、唾液分析及び画像方法（例えば、コンピューター断層撮影法（ＣＴ）、核磁気共鳴映像法（ＭＲＩ）、超音波、Ｘ腺画像、マンモグラフ画像、骨のスキャン）を包含する。

【０２１５】

本発明の別の態様は、患者（例えば、ヒト患者）における固形腫瘍を予防、治療、及び／又は管理する方法に関し、方法は、それを必要としている患者に予防有効療法又は治療有効療法を投与することを含有し、療法は患者に本発明の化合物又は組成物を投与することを含有していて、ここで患者は固形腫瘍があると診断されていて、患者は腫瘍の嵩を減少する初期の治療を受けている。

【０２１６】

本発明の別の態様は、患者（例えば、ヒト患者）における癌を予防、治療、及び／又は管理する方法に関し、方法は、それを必要としている患者に予防有効療法又は治療有効療法を投与することを含有し、療法は患者に本発明の化合物（上記のような）又はその薬学的に許容される塩を投与することを含有していて、ここで患者は別の治療を受けている。

ある態様では、事前の治療は、例えば、化学療法、放射免疫療法、毒素療法、プロドラッグ活性化酵素療法、抗体療法、手術療法、免疫療法、放射線療法、標的療法及びこれらの何れかの組合わせである。

【０２１７】

ある態様では、患者における事前治療は失敗している。

ある態様では、本発明の化合物を投与することを含有している治療有効療法を、患者が事前治療を受けた直後に投与する。例えば、ある特定の態様では、事前治療の結果は、患者が本発明の化合物を投与される前は未知であってよい。

【０２１８】

本発明の別の態様は、患者（例えば、ヒト患者）における癌を予防、治療、及び／又は管理する方法に関し、方法は、それを必要としている患者に予防有効療法又は治療有効療法を投与することを含有し、療法は患者に本発明の化合物又は組成物を投与することを含有し、ここでは化合物又は組成物は、３ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、９ヶ月、１年、２年、３年、４年又はそれ以上の期間にわたる無毒性量（ＮＯＡＥＬ）のヒト等価用量（ＨＥＤ）より低い用量で投与される。

動物実験で確認されたＮＯＡＥＬは、ヒト臨床試験において最大推奨開始用量の決定に有用である。例えば、ＮＯＡＥＬをヒト等価用量の決定に外挿することができる。一般に、このような種の間の外挿は、体表面積（即ち、ｍｇ／ｍ^2）で正規化されている用量に基づいて実施される。

特定の態様では、ＮＯＡＥＬは、マウス、ハムスター、フェレット、モルモット、ウサ

ギ、イヌ、霊長類、霊長類（サル、マーモセット、リスザル、ヒヒ）、マイクロブタ（micropig）又はミニブタで決定される。

ＮＯＡＥＬの使用及びヒト等価用量を決定するためのその外挿についての検討については、Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology, July 2005 を参照されたい。

【０２１９】

ある特定の態様では、療法は予防有効療法及び／又は治療有効療法を投与することを含有していて、そこでは療法が患者における癌細胞集団の減少をもたらす。一態様では、療法を受けている患者を、療法が患者の癌細胞集団の減少をもたらしているか否かを判定するためにモニターする。

【０２２０】

通常、癌細胞集団のモニターは患者から抽出した試料中の癌細胞の数又は量を検出することによって行われる。試料中の癌細胞の数又は量を検出する方法は当該技術分野で公知である。このモニター段階は通常、患者が療法を受け始めて、少なくとも１、２、４、６、８、１０、１２、１４、１５、１６、１８、２０、又は３０日後に実施される。

【０２２１】

ある態様では、試料は血液試料であってよく、そこでは容量単位当たり（例えば、１ｍＬ）又は別の測定単位（例えば、組織学的分析における単位分野当たり）の癌細胞数又は量を定量する。ある特定の態様では、癌細胞集団を全血液細胞のパーセントとして測定できる。

【０２２２】

別の態様では、患者から抽出する試料は組織試料（例えば、疑わしい癌組織からの生検試料）であって、そこでは、例えば、組織の重量単位当たりの癌細胞の数又は量に基づいて、癌細胞の数又は量を測定することができる。

【０２２３】

抽出試料中の癌細胞の数又は量を対照試料中で測定された癌細胞の数又は量と比較して、療法の有効性及び治療を受けている癌の改善を評価することができる。一態様では、対照試料は治療を受けている患者から抽出された試料であって、そこでは患者から抽出された試料はそれより前の時点（例えば、基準対照試料として、療法を受ける前、又は治療を受ける期間の前の時点）に抽出される。別の態様では、対照試料は健常で癌に罹っていない患者から抽出される。

【０２２４】

別の態様では、抽出試料中の癌細胞集団を、所定の対照範囲と比較することができる。特定の態様では、所定の対照範囲は、治療を受けている患者として同じタイプの癌に罹っている患者集団から得た癌細胞の数又は量に基づいている。

【０２２５】

治療を受けている患者から抽出した試料中の癌細胞の数、量、又は割合の対照試料との比較に基づく、癌細胞集団の減少が非常に少ないと判断された場合、医師は治療レジメンを調整する多数の選択肢を有する。例えば、医師は次いで、投与する本発明の化合物又は組成物の用量、投与回数、投与期間の何れか又はこれらの組合わせの何れかを増大することができる。特定の態様では、判定がなされた後に、本発明の化合物又は組成物の第二有効量を患者に投与することができる。

【０２２６】

別の態様では、療法は本発明の化合物又は組成物を投与することを含有していて、そこでは療法が癌細胞の数、量、又は割合の減少、及び患者における癌細胞の数、量、又は割合の減少をもたらす。

【０２２７】

癌の予防、治療、及び／又は管理に有効であろう予防及び／又は治療レジメンで用いら

れる本発明の化合物の量は、現在処方されている、或は更に本明細書に開示されていて当該技術分野で公知の方法で評価された化合物の用量を基にすることができる。回数及び用量は、投与する特定の化合物、癌疾患の重症度、投与経路、更に、患者の年齢、身体、体重、既往歴に基づく、各患者に特異的な因子によっても変更することができる。例えば、癌の治療、予防、及び／又は管理に有効であろう本発明の化合物の用量を、化合物を、例えば本明細書に開示されているか、又は当該技術分野で公知の動物モデルのような、動物モデルに投与して決定することができる。更に、インビトロのアッセイを最適な用量範囲の確定を支援するために随意に用いることができる。

【０２２８】

ある態様では、予防及び／又は治療レジメンは、治療有効性の特定な成果を達成するように、患者に投与する用量を増量することを含有している。このような成果は患者における癌細胞集団の減少を包含する。

【０２２９】

ある特定の態様では、予防及び／又は治療レジメンにおける本発明の化合物の用量は、予防及び／又は治療レジメンを受けた後の患者から抽出した試験試料中に見出される癌細胞の数又は量の、対照試料と比較した、減少をもたらすように調節される。ここで、対照試料は治療を受けている患者から抽出されて、この試料はそれより前の時点に患者から抽出される。一態様では、対照試料は、予防及び／又は治療レジメンを受ける前に、同じ患者から抽出された試料である。

特定の態様では、試験試料中の癌細胞の数又は量は、対照試料中よりも、少なくとも２％、５％、１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又は９９％少ない。

【０２３０】

ある態様では、予防及び／又は治療レジメンにおける本発明の化合物の用量は、所定の対照範囲内に入る癌細胞の数又は量をもたらすように調節される。これらの態様では、試験試料中にある癌細胞の数又は量を、所定対照範囲と比較する。

【０２３１】

別の態様では、予防及び／又は治療レジメンにおける本発明の化合物の用量は、予防及び／又は治療レジメンを受けた後の患者から抽出した試験試料中に見出される癌細胞の数又は量の、対照試料と比較した、減少をもたらすように調節され、そこでは対照試料は健常で癌に罹っていない患者から抽出された試料である。

特定の態様では、試験試料中の癌細胞の数又は量は、対照試料中の癌細胞の数又は量の、少なくとも６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１５％、１０％、５％、又は２％以内である。

【０２３２】

固形癌を有している特定のヒト患者の治療において、腫瘍が疑われる部位から複数の組織試料を抽出することは実行不可能かもしれない。これらの態様では、ヒト患者に対する予防及び／又は治療レジメンにおける本発明の化合物の用量は、動物モデルにおける癌細胞集団を減少するのに有効な動物モデルにおける用量から外挿される。動物モデルにおいては、予防及び／又は治療レジメンは、予防及び／又は治療レジメンを受けた後の動物から抽出した試験試料中に見出される癌細胞の数又は量の対照試料と比較した、減少をもたらすように調節される。対照試料は、予防及び／又は治療レジメンを受ける前の同じ動物から抽出した試料であってよい。

特定の態様では、試験試料中の癌細胞の数又は量は、対照試料中よりも、少なくとも２％、５％、１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、又は６０％少ない。

動物において癌細胞の数又は量を減少するのに有効な用量を、等価ヒト用量をもたらすために、体表面積（例えば、ｍｇ／ｍ^2）に対して正規化することができる。

【０２３３】

本明細書に開示されている予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物又はその医薬組成物を患者に、単回投与法又は反復投与法（例えば、１、２、３、４、５、６、７、

８、１０、１５、２０回、又はそれ以上の投与）で投与することを含有している。
【０２３４】
一態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物又はその医薬組成物を患者に、反復投与法で投与することを含有している。反復投与法で投与する場合は、化合物又は医薬組成物を疾患を予防、治療、及び／又は管理するのに十分な頻度及び量で投与する。
一態様では、投与の頻度は、１日１回から８週間に１回までの範囲である。別の態様では、投与の頻度は、１週間に１回から６週間に１回までの範囲である。別の態様では、投与の頻度は、３週間に１回から４週間に１回までの範囲である。
【０２３５】
一般に、癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、対象の体重の、０．０１～５００ｍｇ／ｋｇの範囲、より典型的には０．１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの範囲である。一態様では、対象に投与される用量は、対象の体重の、０．１ｍｇ／ｋｇ～５０ｍｇ／ｋｇ、又は１ｍｇ／ｋｇ～５０ｍｇ／ｋｇの範囲、より好ましくは、対象の体重の、０．１ｍｇ／ｋｇ～２５ｍｇ／ｋｇ、又は１ｍｇ／ｋｇ～２５ｍｇ／ｋｇの範囲である。
【０２３６】
特定の態様では、患者の癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、患者の体重の、５００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、好ましくは２５０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、１００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、９５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、９０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、８５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、８０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、７５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、７０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、６５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、６０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、５５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、５０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、４５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、４０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、３５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、３０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、２５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、２０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、１５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、１０ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、２．５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、２ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、１．５ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下、又は１ｍｇ／ｋｇ又はそれ以下である。
【０２３７】
別の特定の態様では、患者の癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、０．１～５０ｍｇ、０．１ｍｇ～２０ｍｇ、０．１ｍｇ～１５ｍｇ、０．１ｍｇ～１２ｍｇ、０．１ｍｇ～１０ｍｇ、０．１ｍｇ～８ｍｇ、０．１ｍｇ～７ｍｇ、０．１ｍｇ～５ｍｇ、０．１ｍｇ～２．５ｍｇ、０．２５ｍｇ～２０ｍｇ、０．２５ｍｇ～１５ｍｇ、０．２５ｍｇ～１２ｍｇ、０．２５ｍｇ～１０ｍｇ、０．２５ｍｇ～８ｍｇ、０．２５ｍｇ～７ｍｇ、０．２５ｍｇ～５ｍｇ、０．５ｍｇ～２．５ｍｇ、１ｍｇ～２０ｍｇ、１ｍｇ～１５ｍｇ、１ｍｇ～１２ｍｇ、１ｍｇ～１０ｍｇ、１ｍｇ～８ｍｇ、１ｍｇ～７ｍｇ、１ｍｇ～５ｍｇ、又は１ｍｇ～２．５ｍｇの単位用量である。
【０２３８】
特定の態様では、患者の癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、患者の体表面積の、０．０１～１０ｇ／ｍ^{2}の範囲、そしてより典型的には、０．１ｇ／ｍ^2～７．５ｇ／ｍ^{2}の範囲である。一態様では、対象に投与する用量は、対象の体表面積の、０．５ｇ／ｍ^2～５ｇ／ｍ^2、又は１ｇ／ｍ^2～５ｇ／ｍ^{2}の　範囲である。
【０２３９】
別の態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物の有効量の１つ又はそれ以上の用量を患者に投与することを含有していて、そこでは有効量の用量は、本発明の化合物の少なくとも０．１μｇ／ｍＬ、少なくとも０．５μｇ／ｍＬ、少なくとも１μｇ／ｍＬ、少なくとも２μｇ／ｍＬ、少なくとも５μｇ／ｍＬ、少なくとも６μｇ／ｍＬ、少なくとも１０μｇ／ｍＬ、少なくとも１５μｇ／ｍＬ、少なくとも２０μｇ／ｍＬ、少

なくとも２５μｇ／ｍＬ、少なくとも５０μｇ／ｍＬ、少なくとも１００μｇ／ｍＬ、少なくとも１２５μｇ／ｍＬ、少なくとも１５０μｇ／ｍＬ、少なくとも１７５μｇ／ｍＬ、少なくとも２００μｇ／ｍＬ、少なくとも２２５μｇ／ｍＬ、少なくとも２５０μｇ／ｍＬ、少なくとも２７５μｇ／ｍＬ、少なくとも３００μｇ／ｍＬ、少なくとも３２５μｇ／ｍＬ、少なくとも３５０μｇ／ｍＬ、少なくとも３７５μｇ／ｍＬ、又は少なくとも４００μｇ／ｍＬの血漿濃度をもたらす。

【０２４０】

別の態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物の有効量の複数の用量を患者に投与することを含有していて、そこでは複数の用量は本発明化合物の血漿濃度を、少なくとも０．１μｇ／ｍＬ、少なくとも０．５μｇ／ｍＬ、少なくとも１μｇ／ｍＬ、少なくとも２μｇ／ｍＬ、少なくとも５μｇ／ｍＬ、少なくとも６μｇ／ｍＬ、少なくとも１０μｇ／ｍＬ、少なくとも１５μｇ／ｍＬ、少なくとも２０μｇ／ｍＬ、少なくとも２５μｇ／ｍＬ、少なくとも５０μｇ／ｍＬ、少なくとも１００μｇ／ｍＬ、少なくとも１２５μｇ／ｍＬ、少なくとも１５０μｇ／ｍＬ、少なくとも１７５μｇ／ｍＬ、少なくとも２００μｇ／ｍＬ、少なくとも２２５μｇ／ｍＬ、少なくとも２５０μｇ／ｍＬ、少なくとも２７５μｇ／ｍＬ、少なくとも３００μｇ／ｍＬ、少なくとも３２５μｇ／ｍＬ、少なくとも３５０μｇ／ｍＬ、少なくとも３７５μｇ／ｍＬ、又は少なくとも４００μｇ／ｍＬに、少なくとも１日、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月、７ヶ月、８ヶ月、９ヶ月、１０ヶ月、１１ヶ月、１２ヶ月、１５ヶ月、１８ヶ月、２４ヶ月、又は３６ヶ月に渡って保持する。

【０２４１】

ある態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物を１つ又はそれ以上の追加の抗癌治療薬と組み合わせて投与することを含有している。併用治療で用いられる１つ又はそれ以上の追加の抗癌治療薬の用量が、癌を予防、治療、及び／又は管理するために用いられたか現在用いられている用量より低いことが好ましい。

癌の予防、治療、及び／又は管理のために現在用いられている１つ又はそれ以上の追加の抗癌治療薬の推奨される用量は、Hardman et al., eds., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics, 10th ed., Mc-Graw-Hill, New York, 2001; Physician's Desk Reference (60th ed., 2006) を含むが、これに限定されない、当該技術分野の参考書の何れかから入手できる。

【０２４２】

本発明の化合物及び１つ又はそれ以上の追加の抗癌治療薬は、別々に、同時に、又は連続して投与することができる。

様々な態様では、本発明の化合物と追加の抗癌治療薬は、５分未満離して、３０分未満離して、１時間未満離して、約１時間離して、約１時間～約２時間離して、約２時間～約３時間離して、約３時間～約４時間離して、約４時間～約５時間離して、約５時間～約６時間離して、約６時間～約７時間離して、約７時間～約８時間離して、約８時間～約９時間離して、約９時間～約１０時間離して、約１０時間～約１１時間離して、約１１時間～約１２時間離して、約１２時間～１８時間離して、１８時間～２４時間離して、２４時間～３６時間離して、３６時間～４８時間離して、４８時間～５２時間離して、５２時間～６０時間離して、６０時間～７２時間離して、７２時間～８４時間離して、８４時間～９６時間離して、又は９６時間～１２０時間離して投与される。

好ましい態様では、２つ又はそれ以上の抗癌治療薬を同じ外来診察日の内に投与する。

【０２４３】

ある特定の態様では、本発明の化合物と追加の抗癌治療薬を循環的に投与する。循環治療は、１つの抗癌治療薬を一期間投与し、次いで第二の抗癌治療薬を一期間投与して、この連続投与を繰り返すことすなわち、１つ又は両方の抗癌治療薬に対する耐性の進展を減少するために、１つ又は両方の抗癌治療薬の副作用を阻止又は減少するために、そして／又は治療薬の有効性を高めるために循環、を含んでいる。

【０２４４】

好ましい態様では、抗癌治療薬を対象に、別の組成物で同時に投与する。本発明の併用される抗癌治療薬を対象に、同じ又は異なった投与経路で投与してもよい。

【０２４５】

特定の態様では、循環治療は、第一の抗癌治療薬を一期間投与し、次いで第二の抗癌治療薬を一期間投与し、随意に、その後第三の抗癌治療薬などを一期間投与して、この連続投与を繰り返すことすなわち、１つの抗癌治療薬に対する耐性の進展を減少するために、１つの抗癌治療薬の副作用を阻止又は減少するために、そして／又は治療薬の有効性を高めるために、循環を含んでいる。

【０２４６】

本発明の化合物と追加の抗癌治療薬を同時に投与するときの、用語「同時に」は全く同時期での抗癌治療薬の投与に限定されず、むしろ、対象にこれらを順に、これらが一緒に作用できるような（例えば、これらを別に投与した場合よりも増強された効果をもたらすために相乗的に）ある時間間隔内に投与することを意味している。

例えば、抗癌治療薬を、同時に、又は異なった時点に何れかの順序で連続的に投与することができる；しかしながら、同じ時期に投与しない場合でも、望ましい治療効果、好ましくは相乗的な方法をもたらすために、十分に接近した時間内に投与すべきである。

本発明の組合わせ抗癌治療薬を、適切な形態でそして適合する投与経路で、別々に投与することができる。組合わせ抗癌治療薬の成分を同じ医薬組成物中で投与しない場合は、これを必要としている対象に何れの順序でも投与できるということは認識できる。

例えば、本発明の化合物を、これを必要としている対象に、追加の抗癌治療薬投与の前（例えば、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間、又は１２週間前）に、同時に、又はその後に（例えば、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間、又は１２週間後）に投与することができる。

様々な態様では、抗癌治療薬は、１分離して、１０分離して、３０分離して、１時間未満離して、１時間離して、１時間から２時間離して、２時間から３時間離して、３時間から４時間離して、４時間から５時間離して、５時間から６時間離して、６時間から７時間離して、７時間から８時間離して、８時間から９時間離して、９時間から１０時間離して、１０時間から１１時間離して、１１時間から１２時間離して、２４時間未満離して又は４８時間未満離して投与される。

一態様では、抗癌治療薬を同じ外来診察日の内に投与する。別の態様では、本発明の組合わせ抗癌治療薬を１分から２４時間離して投与する。

【０２４７】

Ｘ．製剤

本発明は家畜及び／又はヒトへの投与に適している組成物（例えば、医薬組成物）を提供する。本発明の医薬組成物は組成物を対象に投与することを可能にする何れの形態であってもよい。当該対象は、好ましくは、これに限定されないが、ヒト、哺乳動物、又はウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモットなどのような非ヒト動物を含む、動物であり、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトである。

【０２４８】

癌の予防、治療、及び／又は管理において有効であろう予防及び／又は治療レジメンにおいて用いられる本発明の化合物の製剤は、現在入手可能な製剤に基づくことができる。

また、当該技術分野における知識及び本明細書の教示に基づいて、この化合物を再製剤化することができる。

例えば、化合物を固体、液体又は気体（エアゾール）の形態にすることができる。

典型的な投与経路は、これに限定されないが、経口、局所、非経口、舌下、膣内、眼内、皮内、腫瘍内、脳内、鞘内、及び経鼻を包含する。非経口投与は、皮下注射、静脈内、

筋肉内、腹腔内、胸腹膜内、胸骨内注射又は輸液技術を包含する。特定の態様では、組成物を非経口で投与する。更に特定な態様では、組成物を静脈内に投与する。

本発明の医薬組成物を、対象へ組成物を投与することによって、本発明の化合物がバイオアベイラブルになるように製剤化することができる。

組成物を１つ又はそれ以上の投与単位の形態にすることができ、そこでは、例えば、錠剤が単一投与単位であって、エアゾール形態の本発明化合物の容器は複数の投与単位を保持することができる。

【０２４９】

医薬組成物の調製に用いられる原料は用いられる量では非毒性である。医薬組成物中の有効成分（複数でも）の最適な用量は多数の因子によって決定されるということは、当業者にとって明らかであろう。関連因子は、これに限定されないが、対象のタイプ（例えば、ヒト）、対象の健康全般、対象が治療を必要としている癌のタイプ、多剤療法の一環としての組成物の使用、本発明化合物の特定の形態、投与様式、及び用いられる組成物を包含する。

【０２５０】

薬学的に許容される担体又は賦形剤は、組成物を、例えば錠剤又は粉末形態にするために、粉末状物質であってよい。組成物が、例えば経口用シロップ又は注射液であるために、担体（複数でも）は液体であってよい。更に、例えば、吸入投与に有用なエアゾールを提供するために、担体（複数でも）は気体であってよい。

【０２５１】

用語「担体」は、それと共に本発明の化合物を投与する、希釈剤、アジュバント又は賦形剤を示す。このような医薬用担体は水、及びピーナツオイル、大豆油、ミネラルオイル、ゴマ油等のような、石油、動物、植物又は合成起源のようなものを含む油類のような、液体であってよい。担体は生理食塩水、アラビアゴム、ゼラチン、デンプン糊、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素等であってよい。更に、助剤、安定化剤、増粘剤、滑沢剤及び着色剤を用いることができる。

一態様では、対象に投与するときは、本発明の化合物及び薬学的に許容される担体は殺菌されている。本発明の化合物を静脈内に投与するときは、水が好ましい担体である。生理食塩溶液及び水性デキストロース及びグリセリン溶液も、液体担体として、特に注射溶液として使用することができる。

適切な医薬用担体は、デンプン、ブドウ糖、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、粉スキムミルク、グリセリン、プロピレングリコール、水、エタノール等のような賦形剤も包含する。この組成物は、所望により、少量の湿潤又は乳化剤、又はｐＨ緩衝剤を含有することができる。

【０２５２】

組成物は経口投与用であってよく、そしてそのような場合は、組成物は固体又は液体の形態が好ましく、半固体、半液体、懸濁液及びゲルの形態は、本明細書で固体又は液体の何れかであると考えられている形態内に包含される。

【０２５３】

経口投与用の固体組成物として、組成物を粉剤、顆粒剤、圧縮錠剤、丸剤、カプセル、チューインガム、水剤、又は同様の形態に製剤化することができる。このような固体組成物は一般に１つ又はそれ以上の不活性希釈剤を含有している。更に、１つ又はそれ以上の以下のものが存在していてよい：エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、微結晶セルロース、又はゼラチンのような結合剤；デンプン、乳糖又はデキストリンのような賦形剤；アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、プリモゲル（Primogel）、コーンスターチ等のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム又はステロテックス（Sterotex）のような滑沢剤；コロイド状シリコンジオキシドのような流動促進剤；ショ糖又はサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、サリチル酸メチル又はオレンジ香味剤のような着香料；及び着色剤。

【０２５４】
医薬組成物がカプセルの形態、例えば、ゼラチンカプセル、である場合は、上記の種類の物質に加えて、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン又は脂肪油のような液体の担体を含有することができる。
【０２５５】
医薬組成物を液体の形態、例えば、エリキシル、シロップ、溶液、乳液又は懸濁液、であってよい。液体は経口投与用に又は注射による送達用に有用である。
経口投与を意図する場合は、組成物は１つ又はそれ以上の甘味剤、保存剤、染料／着色剤及び風味増強剤を含有することができる。
注射投与用の組成物では、１つ又はそれ以上の界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定化剤及び等張剤も含有することができる。
【０２５６】
本発明の液体組成物は、これらが溶液、懸濁液又は他の同様の形態であろうとなかろうと、１つ又はそれ以上の以下のものを含有することもできる：注射用蒸留水、食塩水溶液、好ましくは生理食塩溶液、リンゲル液、等張食塩水、溶媒又は懸濁化剤として働く合成モノ又はジグリセリドのような固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、シクロデキストリン、プロピレングリコール又はその他の溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩のような緩衝剤；及び塩化ナトリウム又はデキストロースのような張力調節剤。
非経口用組成物を、ガラス、プラスチック又は別の材料で作られたアンプル、使い捨て注射器又は複数回投与用バイアルに封入することができる。生理食塩水が好ましいアジュバントである。注射用組成物は滅菌されていることが好ましい。
【０２５７】
医薬組成物は、適切な用量が得られるように本発明の化合物の有効量を含有している。医薬組成物は、それらの個々の疾患に対して現在処方されているように、化合物の公知の有効量を含有することができる。
【０２５８】
一般的に、有効量は組成物の重量に対して本発明の化合物が少なくとも０．０１％である。経口投与を意図する場合は、この量は組成物の重量に対して０．１％と８０％の間で変化しうる。好ましい経口用組成物は組成物の重量に対して本発明の化合物を４％と５０％の間で含有することができる。本発明の好ましい組成物は、非経口用量単位が本発明の化合物を０．０１％と２％の間の重量％含有するように調製される。
【０２５９】
本発明の化合物は何れかの便利な経路によって、例えば、点滴又はボーラス注入によって、上皮層又は皮膚粘膜層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜等）を介する吸着によって、投与することができる。投与は全身又は局所であってよい。様々な送達システム、例えば、微小粒子、マイクロカプセル、カプセル等が知られていて、本発明の化合物を投与するために有用である。
ある特定の態様では、本発明の１つ以上の化合物を対象に投与する。投与の方法は、これに限定されないが、経口投与及び非経口投与（非経口投与は、これに限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下を包含する）、鼻腔内、硬膜外、舌下、鼻腔内、脳内、脳室内、鞘内、膣内、経皮、直腸内、吸入による、耳、鼻、眼又は皮膚に局所的に投与することを包含する。好ましい投与様式は医師の裁量に委ねられ、そして一部は病状の部位（癌、癌性腫瘍又は前癌状態の部位のような）によって決まるだろう。
【０２６０】
一態様では、本発明の化合物を非経口で投与する。特定の態様では本発明の化合物を静脈内に投与する。
【０２６１】
特定の態様では、１つ又はそれ以上の本発明の化合物を治療を必要とする領域（例えば

、腫瘍又は虚血症状の位置）に局所的に投与する。これは例えば、そして限定するのではないが、手術中の局所注入；局所塗布、例えば手術後に創傷包帯と一緒に；注射により；カテーテル手段により；座薬手段により；又は移植手段によって実施でき、移植片は、シラスティーック（sialastic）膜のような膜を含む多孔性、無孔性又はゲル状の物質、又は繊維である。

一態様では、癌、腫瘍、又は前癌組織の部位（又は先の部位）に直接注射することによって投与することができる。

【０２６２】

例えば、吸入器又はネブライザーを用いて、そしてエアゾル化剤を用いるか、あるいはフッ化炭素又は合成肺表面活性剤中でかん流することによって製剤化して、経肺投与も利用することができる。

ある特定の態様では、トリグリセリドのような既存の結合剤及び担体を用いて、本発明の化合物を坐薬として製剤化することができる。

【０２６３】

更に別の態様では、本発明の化合物を放出制御システムで送達することができる。

一態様では、ポンプを用いることができる（Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald et al., Surgery 1980, 88:507; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 1989, 321:574 を参照されたい）。

別の態様では、高分子材料を用いることができる（Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, FL, 1974; Controlled Drug Bioavaiability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 1983, 23, 61 を参照されたい；Levy et al., Science 1985, 228, 190; During et al., Ann. Neurol. 1989, 25, 351; Howard et al., J. Neurosurg., 1989, 71, 105 も参照されたい）。

更に別の態様では、放出制御システムを本発明の化合物の標的、例えば脳、の近傍に取り付けることによって、全身投与用量のほんの僅かだけが必要となる（Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, 1984, pp. 115-138 を参照されたい）。Langer（Science 1990, 249, 1527-1533）による概説中で検討されている、別の放出制御システムを用いることができる。

【０２６４】

別の態様では、高分子材料を、本発明の化合物の制御放出又は持続放出を達成するためにもちいることができる（例えば、米国特許第５，６７９，３７７号；米国特許第５，９１６，５９７号；米国特許第５，９２１，０１５号；米国特許第５，９８９，４６３号；米国特許第５，１２８，３２６号；ＰＣＴ公開第ＷＯ９９／１５１５４号公報；及びＰＣＴ公開第ＷＯ９９／２０２５３号公報を参照されたい）。持続放出製剤で用いられる高分子の例は、これに限定されないが、ポリ（２－ヒドロキシメタクリル酸エチル）、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－ｃｏ－酢酸ビニル）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（ＰＬＧ）、ポリ無水物、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリアクチド（ＰＬＡ）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）、及びポリオルトエステルを包含する。

好ましい態様では、持続放出製剤で用いられる重合体は、不活性で、浸出されうる不純物がなく、保存上安定で、無菌で、そして生物分解性である。

【０２６５】

固体、液体又は気体形態であろうとも、本発明の組成物は追加の活性薬剤を含有することができる。追加の活性薬物は、これに限定されないが、追加の予防用薬剤、追加の治療用薬剤、制吐剤、造血コロニー刺激因子、アジュバント療法剤、ワクチン又はその他の免疫刺激剤、抗体／抗体断片を含む薬剤、抗鬱剤及び鎮静薬を含んでいるものの中から選択される。

例えば特定の態様では、医薬組成物は本発明の化合物、追加の抗癌剤、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含有している。

【０２６６】

本発明は、本発明の医薬組成物の１つ又はそれ以上の成分を入れた１つ又はそれ以上の容器を含有している医薬包装物又はキットも提供する。このような容器は、医薬品又は生物学的製剤の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知書を随意に含んでいてよく、この通知書はヒトへ投与するための製造、使用及び販売の当局による認可を示している。

【０２６７】

以下の実施例は、単に本発明の多数の実施態様を説明するために示されており、決して本発明を限定するように意図されていない。

【実施例】

【０２６８】

実施例１．機能的活性化を誘発するＢＡＸ上のＢＨ３相互作用部位の同定

ＢＣＬ－２ドメイン又はヒトＢＩＭ ＢＨ３（ＢＩＭ ＳＡＢ$_{A1}$）の２１アミノ酸断片に対応するＳＡＨＢの安定化したアルファ螺旋は、水溶液中で８０％のアルファ－ヘリシティを示し、２４ｎＭの親和性[3]でプロアポトーシスＢＡＸと結合し、そして既に記載されている（Walensky, L.D., et al. Mol Cell 24(2), 199-210 (2006)）ようにして調製した。アルファ螺旋のＮ－アセチル化及びＣ－アミド化２０－ｍｅｒ（図８）ＢＩＭ ＳＡＨＢ誘導体（ＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{A2}$）及びその他の類縁体を構造研究のために調製した。ＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{A2}$は、水溶液中０．５ｍＭ以下の濃度で、ＢＡＸと１：１の安定な複合体を形成した。ＢＩＭ ＳＡＨＢｓの円二色性スペクトルは、これらの組み換えペプチドが天然のＢＨ３ドメインのアルファ螺旋構造を繰り返すことを明らかにした。

【０２６９】

ＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{A2}$及び^{1}Ｈ－^{15}Ｎ－ＢＡＸを用いる異種核単一量子相関（ＨＳＱＣ）滴定は、アルファ螺旋１のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、及びアルファ螺旋６のＰｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７を含む、ＢＡＸ残基の離散したサブセットの化学シフトを明らかにした。Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、及びＧｌｎ５２の側鎖NH_2に関して有意な変化も観察された。ＢＩＭ ＳＡＨＢ$_{A2}$との複合体中のＢＡＸの^{1}Ｈ－^{13}Ｃ相関スペクトルも実施して、Ｌｅｕ２７－$C^{\delta 1}$－H_3及び$C^{\delta 2}$－H_3、並びにＩｌｅ３１－$C^{\delta 2}$－H_3及びＩｌｅ１３３－$C^{\delta 2}$－H_3を含む同じ領域に位置する疎水性残基の側鎖に関して^{1}Ｈ－^{13}Ｃ共鳴の顕著な変化が観察された。

【０２７０】

上記の残基は、Ｇｌｕ１７、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ａｓｐ４８、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ａｓｐ１４２、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７を含有する荷電した親水性残基の周辺で囲まれている、Ｍｅｔ２０、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｌｅｕ４７、Ｖａｌ５０、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ｐｈｅ１４３を含む残基からなる疎水性パッチを形成しているＢＡＸの表面のアルファ螺旋１と６の交差点に共局在化している（図３、４ａ）。

【０２７１】

ＢＡＸ構造内で、アルファ１及びアルファ６螺旋は互いに隣接して位置していて、上で挙げた残基は、タンパク質構造の片側にあるこれらの螺旋に並置した離れた位置に局在している（図３、４ｂ）。反対の面にある残基はどれも、これらの条件下でＢＩＭ ＳＡＨＢ滴定による影響を受けない（図３、４ｂ）。従って、これらの構造データは、アンチア

ポトーシスタンパク質について報告されている標準的なＢＨ３結合部位（Muchmore et al. Nature 381 (6580), 335-341 (1996); Sattler, M. et al. Science 275(5302), 983-986 (1994)）とは異なっている位置である、新規な結合部位を明らかにしている（図４ｂ）。

【０２７２】

ＢＡＸの相互作用部位にＢＩＭ ＳＡＨＢをアラインメントするために、我々は常磁性緩和増強（ＰＲＥ）ＮＭＲ実験を実施した。これはＮＭＲ条件下で複合体の寿命に適合するタイムスケール上で実施することができる。メタンチオスルホン酸（ＭＴＳＬ）誘導体化ＢＩＭ ＳＡＨＢ化合物（図６ａ）を用いて酸化状態で、ニトロキシド還元後にこれを繰り返して、^{1}Ｈ－^{15}Ｎ－ＢＡＸ ＨＳＱＣスペクトルを得た。注目すべきは、ＢＩＭ ＳＡＨＢとの複合体中のＢＡＸ、及びＭＴＳＬ標識化誘導体の化学シフト摂動マップが、ＢＡＸ１及び６、及びα１－α２ループの一貫性のある変化を明らかにした。ＢＡＸα１残基の強度が酸化されたＣ－末端標識の存在下で圧倒的に減少するのに対して、ＢＡＸα６残基の強度は酸化されたＮ－末端標識の存在下で圧倒的に減少する（図６ｂ）。

【０２７３】

例として、ＢＩＭ ＳＡＨＢ（Ａ１６４Ｃ－ＭＴＳＬ）はＳｅｒ１６（α１）の著名な信号抑制を引き起こしたがＡｓｐ１４２（α６）に対する影響を本質的に有していなかったのに対して、ＢＩＭ ＳＡＨＢ（Ｗ－１４７Ｃ－ＭＴＳＬ）はＳｅｒ１６（α１）に対する影響を有していなかったが、Ａｓｐ１４２（α６）信号を減少した（図６下の図）。ＰＲＥの程度が、ニトロキシド標識と影響を受けたＢＡＸ残基の間の距離と相関する（Battiste, J.L. & Wagner, G. Biochemistry 39(18),5355-5365(2000)）ので、ＰＲＥ由来の拘束及び化学シフト摂動データを用いる構造計算を実施して、新規なＢＡＸ部位におけるＢＩＭ ＳＡＨＢの方向を明確にした。

【０２７４】

実際に、計算した構造を収束して、ＢＩＭ ＳＡＨＢ垂直面を、右から左に向いているＮからＣ末端方向性をもってＢＡＸ螺旋α１及びα６に設置した（図６ｄ）。そしてＢＩＭ ＢＨ３とＢＡＸの間の主要な相互作用を確定した（図６ｅ）。ＢＩＭ ＳＡＨＢの疎水性残基Ｉｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ｉｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、及びＰｈｅ１５９はＢＡＸの疎水性の溝を嵌め込むのに対して、ＢＩＭ ＳＡＨＢの荷電した親水性残基Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、及びＴｙｒ１６３はＢＡＸ上の荷電した親水性の相補的残基と相互作用する。

【０２７５】

ＢＩＭ ＢＨ３のアンチアポトーシスタンパク質との安定な抑制性相互作用とは対照的に、ＢＡＸ活性化相互作用はＢＡＸの構造変化及びオリゴマー化を含む強力な一連の事象を誘発する。特に興味深いのは、ＢＡＸのα１α２ループ中の残基のＮＭＲ共鳴がＢＩＭ ＳＡＨＢ結合によって有意にシフトした。単量体ＢＡＸでは、ループの中心がα６螺旋の残基Ｉｌｅ１３３及びＭｅｔ１３７と弱く結合している（Suzuki & Tjandra, Cell 103(4), 645-654 (2000)）。ループ残基中で観察される変化は、ＢＩＭ ＳＡＨＢ結合によるループ構造の開状態へのシフトによって容易に説明できる。リガンド関与によるループの移動がＢＡＸの構造変化を開始できるので、我々は溶液中でＢＩＭ ＳＡＨＢ結合が直接ＢＡＸを活性化できるのか否かを検討した。

【０２７６】

ＢＡＸの単量体からオリゴマーへの変換をサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって、そしてＢＡＸ活性化に関連している構造変化を選択的に検出する（Hsu & Youle, The Journal of biological chemistry 272 (21); 13829-13834 (1997)）、埋没しているそのＮ末端残基の露出を６Ａ７抗体を用いて、両方を観察した。４倍モル過剰のＢＩＭ ＳＡＨＢを用いて培養後僅か１５分後に完全な変換を達成して、ＢＩＭ ＳＡＨＢがＢＡＸのオリゴマー化を室温で用量依存的に誘発することを見出した（図１２ａ）。このＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するオリゴマー化は、６Ａ７抗体によって確認されたように、ＢＡＸのＮ－末端エピトープの露出と関連付けられた（図１２ｂ）。従って、ＮＭＲで観察した

ＢＯＭ ＳＡＨＢ－ＢＡＸ複合体の一時的な安定性は、生化学的に検出した相互作用が誘発するＢＡＸの構造変化及びオリゴマー化と関連付けられる。

【０２７７】

ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸのオリゴマー化のＳＥＣによる検出が、ＢＡＸのその放出活性についての機能的な活性化を反映しているということを確認するために、相関的リポソーム及びミトコンドリアアッセイを実施した。その他の因子の非存在下で機能的なＢＡＸの活性化を直接誘発するＢＩＭ ＳＡＨＢの能力を明確に探索するリポソームアッセイで、ＢＩＭ ＳＡＨＢとＢＡＸの組合わせは、封入されているＦＩＴＣデキストランのリポソーム放出を用量反応的に生じた（図１２ｃ、上の図）。ＢＩＭ ＳＡＨＢ活性の特異性を、ＢＩＭ ＳＡＨＢ Ｒ１５３Ｄ突然変異生成による活性破棄によって、又はアンチアポトーシスＢＣＬ－X_LΔＣの付加によって確認した（図１２ｃ、下の図）。同様に、Ａｌｂ－ｃｒｅ^{POS}Ｂａｘ$^{flox/-}$Ｂａｋ$^{-/-}$マウスから調製したＢＡＸ／ＢＡＫ二重欠損マウスの肝ミトコンドリアを用いるミトコンドリア放出アッセイで、ＢＩＭ ＳＡＨＢはＢＡＸ介在チトクロームｃ放出を用量反応的に誘発した（図１２ｄ）。従って、リガンドが誘発するＢＡＸ活性化を測定する４つの異なったインビトロアッセイにおいて、ＢＩＭ ＳＡＨＢは直接的にそして用量反応的にＢＡＸを誘発した。

【０２７８】

ＢＩＭ ＳＡＨＢのＢＡＸとの相互作用の特異性を確認するために、ＢＩＭ ＢＨ３ ＳＡＨＢ結合表面に幾つかの点突然変異を作りだし（図１３ａ）、次いでインビトロのＢＡＸオリゴマー化アッセイ及びミトコンドリアのチトクロームｃ放出アッセイを実施してＢＡＸの機能的な活性化を試験した。それぞれの場合で、相互作用表面に沿った逆極性（Ｒ１５３Ｄ、Ｄ１５７Ｒ）及び疎水性で荷電した（Ｉ１５５Ｅ）突然変異はリガンドが誘発する野生型ＢＡＸのオリゴマー化（図１３ｂ）及びＢＡＸ介在のチトクロームｃ放出（図１３ｃ）を無効にした。ＢＡＸ相互作用部位の特異性を立証するために、ＢＡＸ残基Ｋ２１及びＲ１３４を、これらがＢＩＭ ＳＡＨＢ結合による明確なＮＭＲの化学シフトを示すかについて試験した。単一の逆極性突然変異Ｋ２１及びＲ１３４Ｅを包含している組み換えＢＡＸを作出し、次いでＢＩＭ ＳＡＨＢ誘発ＢＡＸオリゴマー化アッセイを行い、これがＢＩＭ ＳＡＨＢ誘発ＢＡＸ Ｋ２１Ｅ及びＢＡＸＲ１３４Ｄ活性化の有意な欠損を明らかにした（図１３ｄ）。総合すれば、これらの突然変異生成試験は、ＢＩＭ ＢＨ３－ＢＡＸ相互作用の優れた特異性を強調し、そして新規な結合部位の関与をＢＡＸ活性化を開始する誘発メカニズムに関係付けている。

【０２７９】

ＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸの活性化の特異性が新規な部位における相互作用であることを明らかにして関連付けを行うために、次ぎに「連結精査（ステイプルスキャン）」を実施した。ＢＨ３コア配列中のアミノ酸の対を架橋ノルロイシン様側鎖で効果的に置換するステイプルスキャンを実施して、どの残基がＢＩＭ ＢＨ３とＢＡＸの間の機能的な相互作用に必須であるかについて、そして更にＢＩＭ ＢＨ３螺旋のどちらの面がＢＡＸ関与に必須であるかについて同時に取り組んだ（図１４ａ）。Ｗ１４７、Ａ１４９、Ｅ１５１、Ｒ１５３、Ｒ１５４、Ｅ１５８、又はＹ１６２位置の非天然アミノ酸の置換はＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸのオリゴマー化（図１４ｂ）又はＢＡＸが介在するチトクロームｃの放出（図１４ｃ、ｄ）を中断しなかった。実際に、ＢＡＸ上の疎水性接触部位に向いていない表面の螺旋の長さにそって配置された炭化水素の連結はＢＩＭ ＳＡＨＢ類縁体とＢＡＸの間の機能的な相互作用を中断しなかった。しかしながら、Ｉ１４８及びより高度に保存されているＬ１５２を置き換え、ＢＩＭ ＢＨ３螺旋上のＢＡＸに対して疎水性接触表面に位置している連結位置（図１４ａ）は、ＢＡＸのオリゴマー化（図１４ｂ）及びＢＡＸが介在するチトクロームｃの放出（図１３ｃ、ｄ）を顕著に減少し、結果は、ＢＩＭ $SAHB_C$による^{15}Ｎ－ＢＡＸのＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発する化学シフト摂動が殆ど無くなるのと一致していた。更に、ＢＩＭ $SAHB_A$として同じ連結位置を有しているが、それ以外は異なったアミノ酸配列を有している、ＢＡＤ $SAHB_A$は、結合せず、又はＢＡＸのオリゴマー化（図１４ｂ）、或はＢＡＸが介在するチトクロー

ムｃの放出（図１４ｃ、ｄ）を行わなかった。
【０２８０】
α１－α６相互作用部位におけるＢＡＸ Ｋ２１Ｅ突然変異生成の影響を試験するために、オリゴマー化アッセイ（図１３ｄ、１５ａ）によって測定されるＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するBAX_{K21E}活性化の減少も、ＢＩＭ ＳＡＨＢに応答する鈍化したBAX_{K21E}が介在すするチトクロームｃ放出（図１５ｂ）に反映していることを明らかにした。新規なＢＡＸ結合部位内の単一点突然変異が細胞状況においてＢＡＸを活性化する能力に影響を及ぼすかを確認するために、野生型又はBAX_{K21E}の何れかを用いて、レトロウィルスによって$Bax^{-/-}Bak^{-/-}$マウス胚繊維芽細胞（ＤＫＯ ＭＥＦｓ）を再構築して、ＢＩＭ ＳＡＨＢに応答するアポトーシスの誘導を観察した。アネキシンＶ結合によって定量したように、ＢＩＭ ＳＡＨＢはＢＡＸが再構築したＭＥＦの時間依存的なアポトーシスを誘導したのに対して、新規なＢＡＸ結合部位内の単一Ｋ２１Ｅ点突然変異はＢＩＭ ＳＡＨＢが誘発するアポトーシスを減少した（図１５ｃ）。このBAX_{K21E}が介在するアポトーシスの減少は、オリゴマー化及びチトクロームｃ放出の両方のアッセイ（図１５ａ、１５ｂ）においてＢＩＭ ＳＡＨＢによるBAX_{K21E}の低下した活性と関連している。特異性の更なる測定として、リポソームにおいてそのＢＡＸ活性化能力、ＢＡＸオリゴマー化、及びチトクロームｃ放出アッセイを消去する（それぞれ図１２ｃの下図、１３ｂ、１３ｃ）ＢＩＭ ＳＡＨＢのＲ１５３Ｄ突然変異生成が、同様に細胞状況においてＢＩＭ ＳＡＨＢが誘導するＢＡＸ及びBAX_{K21E}の活性化を無くしたことを見出した（図１５ｃ）。
【０２８１】
新規なＢＡＸ活性化部位の広範な生理学的影響を調べるために、ＢＡＸ及びBAX_{K21E}で再構築したＤＫＯ ＭＥＦｓの、ＢＩＭを包含し、内因性ＢＨ３オンリータンパク質を介して作用することが知られている一般的な刺激剤である、スタウロスポリン（ＳＴＳ）に対するアポトーシス応答を試験した。Ｋ２１Ｅ突然変異生成は、時間をかけてアネキシンＶ結合を観察すると、ＳＴＳ－誘導アポトーシスを低下した。BAX_{K21E}の減少した活性は、細胞下分画ウェスタン分析及び間接免疫蛍光分析によって検出したように、低下したチトクロームｃ放出にも反映した。BAX_{K21E}で再構築したＤＫＯ ＭＥＦｓのＳＴＳに対する鈍化した応答はオリゴマー化（図１５ａ）、チトクロームｃ放出（図１５ｂ）、及び細胞に基づいたアポトーシスアッセイ（図１５ｃ）におけるＢＩＭ ＳＡＨＢによるBAX_{K21E}の低下した活性化と一様に一致している。従って、ＭＥＦの検討は、直接ＢＡＸ活性化の機構的関連を、新規なＢＨ３相互作用部位における単一アミノ酸突然変異形成によってＢＡＸが介在するアポトーシスが低下する細胞状況に広げている。まとめると、インビトロ及び細胞による突然変異形成実験は、ＢＩＭ ＢＨ３－ＢＡＸ相互作用の優れた特異性を強調し、そして新規な結合部位の関与をＢＡＸ活性化を開始する誘発メカニズムに関係付けている。
【０２８２】
ＢＩＭ ＳＡＨＢが細胞中のＢＡＸを特異的に標的としているかを確認するために、細胞透過性ＢＩＭ $SAHB_{A1}$化合物の蛍光イソチオシアネート（ＦＩＴＣ）誘導体化類縁体をジャーカットＴ細胞（Jurkat T-cell）に加えて細胞の取り込みをＦＡＣＳ分析によって記録した。ＢＩＭ $SAHB_{A1}$が１８時間の培養によってジャーカットＴ細胞に用量依存的なアポトーシス誘導を誘発したのに対して、ＢＩＭ $SAHB_{A1}$（ＲＩ５３Ｄ）は効果がなかった。ＢＩＭ ＳＡＨＢが細胞質ＢＡＸと相互作用することを実証するために、ジャーカットＴ細胞をＦＩＴＣ－ＢＩＭ $SAHB_{A1}$化合物と４時間培養した後、１％ＣＨＡＰＳ中で細胞溶解して、抗ＦＩＴＣ抗体でＳＡＨＢの免疫沈降を行った。実際に、ＦＩＴＣ－ＢＩＭ $SAHB_{A1}$は、ジャーカットＴ細胞の細胞質からＢＡＸを共免疫沈降することができた。従って、ＢＩＭ ＳＡＨＢは無傷細胞を貫通できて、細胞中の細胞質ＢＡＸを刺激してアポトーシスを受けるようにできる。
【０２８３】
実施例２．（ＮＭＲ）分光法を用いるＢＯＫ及びＢＡＫの高分解溶液構造の確認

本発明は一部分は、ＢＡＸの活性結合部位の同定に基づいているが、それらの全体的な高度な三次元構造が保存できるのであれば、その他のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドに対応する活性結合部位が存在していることを意図している。

ＢＡＸ活性部位に対応するこれらの非ＢＡＸ ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド活性部位は、ＢＡＸと試験ポリペプチドの間でアミノ酸配列のアラインメントによって、構造比較によって、又はこれらの組合わせによって同定することができる。このような方法は、当業者にとって公知であって本明細書に記載されている。本発明は、ＢＨ３ペプチド又はその模倣剤の光活性可能で架橋可能な誘導体の標的部位に対する直接共有結合性相互作用、次いで、例えばタンパク質分解、断片精製、質量分析による相互作用部位の同定を介する、非ＢＡＸ ＢＣＬ－２ファミリー及び非ＢＣＬ-２ファミリーメンバーにおける対応する相同性活性部位を同定する方法を提供する。その構造が解明されていないＢＣＬ－２ポリペプチドにおいて部位を直接同定するために、本発明は、ＢＯＫ及びＢＡＫを含む別のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド及びＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$の高分解溶液構造を作成することを意図している。このような構造を以下に記載した方法によって決定することができる。

【０２８４】

ヒトの全長ＢＯＫ及びＢＡＫｃＤＮＡをｐＴＹＢ１ベクター中にサブクローニングしてキチン結合融合タンパク質を作成して、その後キチン親和性クロマトグラフィー、ＤＴＴによるキチン分解、及びゲルろ過によるＦＰＬＣ精製を行うことができる。次いで、形質転換した大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞を３７℃で生育して、ＬＢ培地（非標識化タンパク質用に）、又はそれぞれ均一な^{15}Ｎ－標識化又は^{15}Ｎ、^{13}Ｃ－標識化タンパク質を得るために、^{15}Ｎ－$ＮＨ_{4}$ＣＬ（１ｇ／ｌ）と^{13}Ｃ－グルコース（２ｇ／ｌ）で又は^{15}Ｎ－$ＮＨ_{4}$ＣＬ（１ｇ／ｌ）だけで置換したＭ９－最小培地の何れかにおいて１ｍＭのＩＰＴＧを誘導した。細胞を^{15}Ｎ－$ＮＨ_{4}$ＣＬ及び^{13}Ｃ－グルコースで補完した７５％$Ｄ_{2}Ｏ$中で生育させることによって、重水素化、均一^{15}Ｎ^{13}Ｃ－標識化タンパク質を作成できる。次いでＮＭＲ試料（０．５～１ｍＭ）を$Ｄ_{2}Ｏ$又は$Ｈ_{2}Ｏ$／$Ｄ_{2}Ｏ$（９：１）中の１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９：１）中で作成する。

【０２８５】

ＮＭＲスペクトルを２５℃で、ｚ－シールド勾配及び三重共鳴 CyroProbe を備えた、Bruker Advance の６００ＭＨｚ、７００ＭＨｚ、又は８００ＭＨｚ スペクトロメータ上で記録した。化学シフトの帰属は標準的な技術を用いて行った。^{1}Ｈ、^{13}Ｃ、^{15}Ｎ共鳴の骨格帰属については、以下の三重共鳴３Ｄ実験を記録した：$Ｈ_{2}Ｏ$中の均一^{15}Ｎ、^{13}Ｃ標識化タンパク質上のＨＮＣＯ、ＨＮＣＡＣＯ、ＨＮＣＡ、ＨＮＣＯＣＡ、ＨＮＣＡＣＢ及びＣＢＣＡ（ＣＯ）ＮＨ。側鎖の帰属は以下の標準３Ｄ実験を用いて実施した：^{1}Ｈ^{15}Ｎ ＴＯＣＳＹ－ＨＳＱＣ、Ｃ（ＣＯ）ＮＨ－ＴＯＣＳＹ、Ｈ（ＣＣＯ）ＮＨ－ＴＯＣＳＹ及びＨＣＣＨ－ＴＯＣＳＹ。何れの不明確な帰属も、$Ｄ_{2}Ｏ$中の均一^{15}Ｎ、^{13}Ｃ－標識化タンパク質上の３Ｄ ^{13}Ｃ分解［^{1}Ｈ－^{1}Ｈ］ＮＯＥＳＹ実験の分析によって更に確認することができる。芳香族側鎖^{1}Ｈ及び^{13}Ｃの共鳴は２Ｄ ＨＭＱＣと３Ｄ ^{13}Ｃ分解［^{1}Ｈ－^{1}Ｈ］ＮＯＥＳＹを組み合わせて帰属できる。構造抑制は、^{13}Ｃ分解（１００又は１２０分混合時間）及び^{15}Ｎ分解（１２０分混合時間）［^{1}Ｈ－^{1}Ｈ］ＮＯＥＳＹ実験に由来する。

【０２８６】

ＮＭＲのデータセットをＮＭＲＰｉｐｅ（Delaglio, et al. (1995) NMRPipe J Biomol NMR 6(3), 277-293）スペクトル分析及びＮＭＲ Ｖｉｅｗ（Johnson, B.A. (2004) Methods Mol. Biol 278, 313-352）ソフトウェアパッケージで処理する。骨格のψ及びΨのねじれ角抑制をプログラムＴＡＬＯＳ（Comilescu, G., et al. (1999) J Biomol NMR 13(3) 289-302)を用いて、$^{13}Ｃ_{α}$$_{β}$化学シフトから計算する。$３Ｊ_{ＮＨＨα}$結合定数を、既述（Kuboniwa, H. et al. (1994) J Biomol NMR 4(6), 871-878）のようにＨＭＱＣ－Ｊ実験から測定する。残余双極子カップリング（ＲＤＣｓ）をフィラメント状ファージＰｆ１を加えたＮＭＲ試料の緩衝液中で測定する（Bax, A., Kontaxis, et al. (2001) Methods Enzymol 339, 127-174）。ＮＯＥの帰属を、プログラムＣＹＡＮＡ２．１．４（Gunte

rt, P. (2004) Methods Mol Biol 278, 353-378）のＣＡＮＤＩＤモジュールを用いて自動化モードで実施する。初期の帰属を、ＣＹＡＮＡ及びＮＭＲ Ｖｉｅｗ について一連の手動及び自動化ＮＯＥ帰属を繰り返して補強する。ＮＯＥで観察可能な帰属が９９％済んだら、ＣＹＡＮＡによる構造を、$^{3}J_{NH}$Δ結合定数に対する疑似ポテンシャルを組み込むように適合されているＩＶＭダイナミック、二次$^{13}C_{\alpha\beta}$化学シフト、及びねじれ角測定可能な構造データベースを利用する、Xplor-NIH 2.12 で更に改良する（Schwieters, et al. (2003) J Magn Reson 160(1), 65-73）。

【０２８７】

水素結合の距離制限は、$^{13}C_{\alpha\beta}$二次化学シフトの分析及び特徴的なＨΔ（ｉ）－ＮＨ（ｉ＋３、ｉ＋４）ＮＯＥに基づく螺旋領域に組み込まれている。実験的拘束と最も一致している１００の最もエネルギーが低い構造を、タンパク質の局部形状、静電気、及び充填の質を改善するために、続いて系統立てられた溶媒中で精製する（Spronk, C.A., et al. (2002) J Biomol NMR 22(3), 281-289）。最終構造群は、実験的拘束に対して最も低いエネルギー、及び次のプログラムで測定した対掌性及び立体化学が全体的に最も良い値を有している２５の構造から成っている：WHATCHECK（Hooft, R.W., et al., (1996) Nature 381 (6580), 272）及び PROCHECK-NMR (Laskowski, R.A. et al. (1996) J Biomol NMR 8(4), 477-486)。(2002) Palo Alto, CA, USA PYMOL (DeLano, W.L.D.S., (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Palo Alto, CA, USA) 及び MOLMOL(Koradi, R. et al. (1996) J Mol Graph 14(1), 51-55, 29-32)。

【０２８８】

実施例３．ＮＭＲ分光法による、調節因子のＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫとの相互作用についての構造的基礎、及び誘導された構造変化の、定義及び比較

ＢＨ３ポ-リペプチド及びその模倣薬と、多数のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの間の更なる結合相互作用が、本発明で意図されている。以下の方法も、ＢＨ３ポリペプチド及びその模倣化学化合物とＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドとの結合相互作用を試験及び最適化するのに適用できる。

【０２８９】

^{1}H, ^{15}N－ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫタンパク質の発現及び精製を実施例２に記載したようにして実施した。ＮＭＲ滴定のために、ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫとＳＡＨＢの１：１複合体を、D_2O又はH_2O／D_2O（９：１）中の２０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液中で、ＳＡＨＢ濃度を０．５ｍＭまで徐々に増大して作成した。ＳＡＨＢの相互作用部位を同定するために、ＳＡＨＢペプチドの添加による骨格アミドの化学シフト摂動を、それぞれ一連の^{1}H-^{15}N ＨＳＱＣ及びデータセットの処理、及びＮＭＲＰｉｐｅ スペクトル分析及びＮＭＲｖｉｅｗ ソフトウェアパッケージを用いる化学シフトの測定の後に行う。ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫの全体的の構造変化を同定するために、骨格アミドを観察して、実施例２に記述するように実施して化学シフトの帰属を行うことができる。ＳＡＨＢ複合体について構造計算を容易にするために、^{1}H－ＮＭＲ ２Ｄ ＴＯＣＳＹ 及び ＮＥＯＳＹ実験がＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫに化学シフトを誘導する個々のＳＡＨＢに対して溶液構造をもたらす。分子間ＮＯＥを、非標識化ＳＡＨＢと結合している均一^{15}N, ^{13}C標識化ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫの試料について実施される、ＮＯＥＳＹ及び３Ｄ^{13}C－編集、^{12}C－選択ＮＯＥＳＹ実験から得ることができる。更に、ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ－ＳＡＨＢ複合体の構造精密化に対する距離情報は、選択部位に位置しているランタニド－ＤＯＴＡキレートで誘導体化したＳＨＡＢを用いるか（Vlasie, M.D. et al. (2007) Chemistry 13(6), 1715-1723）(Battiste, J.L. et al. (2000) Biochemistry 39(18), 5355-5365) 又は実施例１に記載され、図６に明らかにされているＭＴＳＬ－標識化ＳＡＨＢを用いて実施するＨＳＱＣ実験からもたらされるであろう。

【０２９０】

例えば、ＳＡＨＢに結合したＤＯＴＡキレートは、ランタニドの活性化によって、ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫタンパク質の近接^{1}H－ＮＭＲ共鳴の緩和及び線幅拡張を２５Åまでの距離依存的に増強する。常磁性緩和増強（ＰＲＥ）測定結果を、既述（Battiste, J.L.

et al. (2000) Bichemistry 39(18), 5355-5365）のようにして距離制限に変換する。ＳＡＨＢ－タンパク質複合体の構造計算を実施例１及び２に記載のようにして実施する。ＳＡＨＢの結合が検出可能な分子間ＮＯＥをもたらさなかった場合は、構造モデルを、ＨＡＤＤＯＣＫ ｖ２．０（Dominguez, C. et al. (2003) Ｊ Am Chem Soc 125(7),1731-1737）を用い、デフォルトパラメータ及び^{15}Ｎ ＨＳＱＣ ＮＭＲ試験で確認した一連の明確な制限及び不明確な制限を使って、計算することができる。

【０２９１】

最初に、複合体の５００の構造を個々の構造の剛体結合によって作出する。その後、最もエネルギーの低い１００の構造を、セミフレキシブルな焼き鈍し法（semi-flexible simulated annealing）で、続いて系統立てられた溶媒中で完全にフレキシブルな精製で、精製する。系統だった溶媒中でのファミリーの精製がもたらした最もエネルギーが低い２０の構造を、抑制妨害、水素結合の数、疎水性接触、境界面における標準偏差、及びＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ－ＳＡＨＢ相互作用のフレキシブルな境界面に渡る全エネルギーのような幾つかの質的因子を解析するためにＨＡＤＤＯＣＫ内部スクリプトを用いて分析する。

【０２９２】

特異的なＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ構造領域のＳＡＨＢ結合による運動の変化を確認するために、既述（Farrow, N.A. et al. (1994) Biochemistry 33(19), 5984-6003）のようにして、Ｔ１、Ｔ２及び^{1}Ｈ－^{15}Ｎ異核ＮＯＥデータを測定することによって、緩和分析を実施する。Ｔ１縦軸回復遅延を１１、６５、１５０、２４６、３６３、５２３、７５８及び１１４２分に設定する。Ｔ２横軸回復遅延をそれぞれ、２１．６、４３．２、６４．８、８６．４、１０８．０、１５１．１、１９４．３、及び２３７．５に設定する。ＣＰＭＧ配列の繰り返し率を５５０μｓに設定する。^{1}Ｈ－^{15}Ｎ ＮＯＥを、３秒の^{1}Ｈ飽和時間を用いて補正する。それぞれの場合に、誤差を２つの（Ｔ１、Ｔ２及びＮＯＥ）実験の標準偏差として測定する。データをソフトウエアパッケージＮＭＲ Ｖｉｅｗ（Johnson, B.A. (2004) Methods Mol Biol 278, 313-352）を用いて分析できる。

【０２９３】

上記の手法を、新規調節因子の、ＢＣＬ－２及びＢＣＬ－$Ｘ_{L}$のような、アンチアポトーシスタンパク質との相互作用の構造的基礎を分析するために同様に適用することができる。

【０２９４】

実施例４．構造的洞察に基づく化合物のＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫへの結合親和性及び選択性の精密化

ＳＡＨＢリガンドとＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫとの側鎖の相互作用の比較分析は、結合親和性を増大して化合物の選択性を進化させるために、ＳＡＨＢ化合物への更なる天然及び非天然アミノ酸修飾の設計を可能にする。このようなＮＭＲ手法による構造－活性関連（Shuker, S.B. et al. (1966) Science 274(2592), 1531-1534）は分離したアンチアポトーシスタンパク質の別々のサブグループの間で識別される小分子の開発を成功裏に促進している（Oltersdorf, T. et al. (2005) Nature 435(7042), 677-681; Bruncko, M. et al. (2007) J Med Chem 50(4),641-662; Wendt, M.D. et al. (2006) J Med Chem 49(3), 1165-1181）。

【０２９５】

コンピュータモデリング及びドッキング戦略は、上の実施例３で述べたように、相互作用面における更なる好ましい接触点を保証する有利な状況を確定するために、個々の天然及び／又は非天然残基のＳＡＨＢ化合物への置換をシミュレーションするために用いることができるだろう。反対に、ＳＡＨＢ化合物に所望の特異的なプロファイルを組み込むために、特徴のある相補的相互作用を分離することができる。これらの構造分析によって設計された、ＳＡＨＢを、化合物の改良を達成して立証するために、合成して前記実施例に概説されている一連の実験を繰り返す。

【０２９６】

実施例５．ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドオリゴマーの活性化因子／阻害因子の作成、構造的特徴、及び機能評価

ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ及びその他のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性形態は、ヘテロ及びホモ二量化による高次構造を含んでいると考えられる。例えば、ＢＡＸ及びＢＡＫオリゴマーはミトコンドリア膜中で同定され、そしてミトコンドリアから必須のアポトーシス因子を放出するポア形成に関与していると考えられている。本明細書に記載されているＳＡＨＢはＢＡＸを活性化してこのような高次で機能的なオリゴマーを形成するので、オリゴマーを作成して構造的に特徴付けるために、溶媒中で又は再結晶によってこのような構造を作成するためにＳＡＨＢを用いることができる。このオリゴマーはミトコンドリアアポトーシスを誘導するために機能的に必要であるので、このようなオリゴマーポアの活性化又は阻害は治療的に有益であろう。ＢＡＸのような、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドにＳＡＨＢ化合物を、リガンド比の勾配により、並びに各種の塩及び当該技術分野で公知のその他の条件を用いて、添加することによって、区別されるＢＡＸ構造異性体及びオリゴマーを作成でき、ＮＭＲ分析（本明細書で記載されているような）又は当該技術分野で公知のＸ線結晶解析法を使用するために安定化することができる。例えば、０．５：１～４：１のＢＩＭ：ＢＡＸ溶液を用いて、高度に精製されたＢＡＸオリゴマーが作成され、高純度に単離されている。

【０２９７】

ＢＡＸ又は他のＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの機能的な活性化又は阻害は、以下に記載されているように単量体－オリゴマー状態の観察によるサイズ排除クロマトグラフィーを用いて（図１２ａ）、以下に記載されているように６Ａ７抗体が介在する活性化ＢＡＸの確認（図１２ｂ）、以下に記載されていて既に報告されている（Walensky et al. Mol Cell 24(2), 199-210 (2006))ようにリポソームアッセイ（図１２ｃ）、脂質単分子層上にＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドが作ったポアを通過する電流のモニタリング（VDAC and Bax ex, J Biol Chem 2000, 275(16) 12321; Bax and Bcl-2 ex, Science 1997, 277, pg.370 参照）、又は以下に記載されていて既に報告されている（Walensky et al. Mol Cell 24(2), 199-210 (2006)）ようにミトコンドリアのチトクロームｃ放出（図１２ｄ、１３ｃ）を用いて分析できる。

【０２９８】

また、構造データを、オリゴマー化及び／又はポア活性を増強又は阻害し、それによりＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド自身のオリゴマーポア形成の直接調整を介してアポトーシスを調節する分子を、本明細書に記載されていて当該技術分野で知られているように、設計又はスクリーニングするために用いることができる。例えば、ＢＡＸ ＢＨドメイン１、２、及び３の合流によって形成された疎水性の溝に結合するＢＡＸα螺旋９（図１６ｂ）を模倣したＳＡＨＢのような、（ａ）非常に高い親和性を有する新規な活性化部位を標的とする（例えば、ミリストイル誘導体）か又は（ｂ）この結合相互作用を、ＢＡＸの構造変化を阻害するか又はＢＡＸのホモ－オリゴマー化部位を阻害する更なる部分と組み合わせる、又は（ｃ）異なったオリゴマー化部位のバインダーＳＡＨＢとの併用治療において活性化部位のバインダーを利用する、ＳＡＨＢ類縁体を生成することは、ＢＡＸの活性化過程を妨げて、それにより治療に有用であるＢＡＸが介在するミトコンドリアのアポトーシスを阻害するだろう。

【０２９９】

このような個々の及び併用の治療を評価する方法は、上述の、ＳＥＣに基づく、リポソーム、チトクロームｃ放出、及び脂質単分子層電流モニタリングアッセイを包含する。

実際に、ミリストイル化ＢＩＤ ＳＡＨＢ化合物は、ミリストイル化していない化合物よりも高い親和性でＢＡＸと結合して、α螺旋含量を同程度に保持し、ＢＩＤ ＳＡＨＢが誘発するＢＡＸのオリゴマー化及びＢＡＸが介在するチトクロームｃの放出を阻害する。

【０３００】

標準的なカップリング条件を用いて、ペプチドのアミノ末端をミリスチン酸でキャッピ

ングすることによってミリストイル化誘導体を製造した。

【０３０１】

実施例６．化合物のアポトーシスを活性化するか又は阻害する能力の評価

ＢＣＬ－２ファミリープロアポトーシスポリペプチドの活性化は、ミトコンドリア外膜透過性上昇（ＭＯＭＰ）、及び末端カスパーゼの活性化をもたらす、チトクロームｃ及びＳｍａｃ／Ｄｉａｂｌｏを含む、主要なアポトーシスタンパク質の放出を引き起こす（Green, D.R. (2005) Cell 121(5), 671-674）。以下のアッセイを、多数の活性部位結合化合物、又は得られるＢＣＬ－２ポリペプチドオリゴマーのアポトーシスを調節する能力を試験するために用いることができる。

【０３０２】

ミトコンドリア放出アッセイ：

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド相互作用のミトコンドリアのアポトーシスの誘発に対する活性化／阻害を試験するために、チトクロームｃ放出アッセイを用いる。このアッセイは、Ｂａｋ$^{-/-}$マウス又はＡｌｂ－ｃｒｅ^{ＰＯＳ}Ｂａｘ$^{ｆｌｏｘ/-}$Ｂａｋ$^{-/-}$マウス由来のマウス肝臓ミトコンドリア、添加の組み換えＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド、例えば、ＢＡＸ、ＢＡＫ、又はＢＯＫ（５０ｎＭ）をＳＡＨＢの漸増量（５０～５００ｎＭ）と又はこれ無しで、及びチトクロームｃのＥＬＩＳＡによる読み出しを使用する。陰性対照は、組み換えタンパク質のみ、化合物のみ、賦形剤処理、点突然変異ＳＡＨＢ、及びＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$ΔＣのような、アンチアポトーシスタンパク質を用いる障害物を包含する。

【０３０３】

Ｃ末端を、可溶性がより高いＢＡＸ Ｃ末端で置換したＢＡＫキメラ体も意図している。さらに別の態様では、ＢＡＫの活性化を評価するミトコンドリア試験を、内因性のＢＡＫを含んでいるがＢＡＸ及びＢＯＫを欠損している野生型マウスの肝臓ミトコンドリアで実施する。別の態様では、ＢＯＫの活性化を評価するミトコンドリア試験を、組み換えＢＯＫ又は内因性ＢＯＫを含んでいるがＢＡＸ及びＢＡＫを欠損しているマウスミトコンドリアを用いて（すなわち、Ａｌｂ－ｃｒｅ^{ＰＯＳ}Ｂａｘ$^{ｆｌｏｘ/-}$Ｂａｋ$^{-/-}$マウス由来のＢＡＸ／ＢＡＫ$_{-ｎｕｌｌ}$ミトコンドリアを用いて）実施する。

【０３０４】

リポソーム放出アッセイ：

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの調節を確認するために用いることができる別のアッセイは、ミトコンドリアを模倣しているがＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ誘発放出に必須の成分のみを包含している、リポソーム放出アッセイである。ミトコンドリア外膜接触部位（ＯＭＣＴベシクル）（Ardail, D. et al. (1990) Bio Chem 265(31), 18797-18802; Lutter, M. et al. (2000) Nat Cell Biol 2(10), 754-761）の脂質成分を複写したリポソームを、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ウシ肝臓ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）、コレステロール、及びカルジオリピン（Avanti Polar Lipids）の重量比４１：２２：９：８：２０混合物を用い、既述（Oh, K.J. et al. (2005) Biol Chem 280(1), 753-767）のようにして作成する。

直径１０ｎｍの大きな単層ベシクル（ＬＵＶ）を、ＦＩＴＣ－標識化デキストラン－１０ｋＤ（Sigma）を混入した、２０ｍＭのＨＥＰＥＳ及び１５０ｍＭのＫＣＬ（ｐＨ７）中で、押し出し方法（Szoka, F. et al. (1980) Biochim Biophys Acta 601(3), 559-571）によって作成して、記述（Oh, K. (2005) J Biol Chem 280(1), 753-767）のようにしてゲルろ過によって精製する。ベシクルのリン酸含量を測定して脂質含量を確認する（Bottcher, C.J.F. et al. (1961) Anal Chim Acta 24, 203-204)。蛍光発光アッセイは既報（Kuwana, T. et al. (2002) Cell 111(3), 331-342; Terrones, O., et al. (2004) J Biol Chem 279(29), 30081-30091）を適用する。

【０３０５】

ＬＵＶからＦＩＴＣ－標識化デキストラン－１０ｋＤの放出を、FluoroMax-2 蛍光分光計（ＳＰＥＸ）を用い、恒温１ｃｍ路長石英キュベット中、３７℃で撹拌を続けて、監視する。励起及び放射波長はそれぞれ、４８８ｎｍ及び５２５ｎｍである（スリット、２ｎｍ）。蛍光マーカーの放出量は、式：［（F_t－F_0）／（F_{100}－F_0）×１００］（ここで、F_tはｔ時に測定した試薬で処理したＬＵＶの蛍光発光であり、F_0は試薬を添加する前の１～２分にわたるＬＵＶ懸濁液の平均蛍光発光であり、そしてF_{100}はトリトンＸ－１００（最終濃度、０．６６ｍＭ）の添加によってＬＵＶが完全に崩壊した後の最終１～２分にわたる平均蛍光発光値である）に従って百分率で定量化する。実験は、脂質濃度１０μｇ／ｍｌ、１５ｎＭのＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ、２５～２００ｎＭのＳＡＨＢを単独で又は組み合わせて、及びＢＣＬ－X_LΔＣ又はその他のアンチアポトーシス遮断剤（１００～８００ｎＭ）を用いて実施する。

【０３０６】

オリゴマー化アッセイ：

単量体のＢＡＸ（３８μＭ）を含有している２００μＬの溶液（２０ｍＭのＨｅｐｅｓ／ＫＯＨ、ｐＨ７．２～７．４、１５０ｍＭのＫＣｌ）に、ＢＩＭ ＳＡＨＢを、０．５：１、１：１、２：１及び４：１のＢＩＭ ＳＡＨＢ：ＢＡＸ比で、添加した。この混合物及びＢＡＸ単量体のみの試料を２２℃で１５分間培養し、次いでＳＤ７５カラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）による分析を行った。クロマトグラムはそれぞれ～１１．５分及び～６．５分における単量体とオリゴマーのピークを示す。タンパク質標準品（GE Healthcare）を用いてゲルろ過ピークの分子量を較正した。時間依存性分析のために、ＢＩＭ ＳＡＨＢを単量体のＢＡＸに１：１の比で添加して、２２℃で３０、６０、及び９０分間培養した後に混合物をＳＥＣで分析した。比較の基準値として、ＢＡＸ単量体のみを０時間及び上記の時点で分析した。

【０３０７】

構造変化アッセイ：

単量体のＢＡＸ（９μＭ）を含有している２０μＬのＰＢＳ溶液に、ＢＩＭ ＳＡＨＢを、０．５：１、１：１、２：１及び４：１のＢＩＭ ＳＡＨＢ：ＢＡＸ比で、添加した。この混合物（１０μＬ）及びＢＡＸ単量体試料（１０μＬ）を２２℃で１５分間培養し、次いで１５μＬの６Ａ７抗ＢＡＸ抗体を含有しているＢＳＡの３％ＰＢＳ溶液（２５０μＬ）に加えて４℃で１時間培養した。さらに、それぞれの入力試料（１０％）の１μＬを、５０μＬのＳＤＳ－試料緩衝液と混合して、試料を横断するＢＡＸ濃度の基準値を測定した。精製前のセファロースビーズ（５０μＬ）をＢＩＭ ＳＡＨＢ：ＢＡＸ及びＢＡＸ単量体溶液に添加して４℃でさらに２時間培養した。セファロースビーズを遠心分離し、ＢＳＡの３％ＰＢＳ溶液１ｍＬで３回洗浄し、５０μＬのＳＤＳ－試料緩衝液中に再懸濁して９５℃で２分間煮沸した。入力した試料及び免疫沈降試料のそれぞれ１０μＬを分析に用いた。試料を、ＰＶＤＦ膜上にブロットした、１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥビス－トリスゲル上で分離して、ウサギポリクローナルＮ２０抗ＢＡＸ抗体（Santa Cruz Biotechnology）及び化学発光による検出（PerkinElmer）を用いてウェスタン分析を実施した。

【０３０８】

細胞に基づくアポトーシスの検討：

ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの調節を確認するための更に別の手法は細胞に基づく検討である。化合物を、複数の骨髄腫、白血病、リンパ腫、肉腫、網膜芽腫、及び乳腺、前立腺、結腸、肺、腎臓、甲状腺、及び副腎の癌を示している腫瘍細胞株のパネルに対してスクリーニングする。多くのこのような細胞株はＤＮＡマイクロアレイ発現プロファイリング（Mitsiades, C.S. et al. (2004) Cancer Cell 5(3),211-230）によって特徴付けられている。それらの適切な培地中の癌細胞は９６ウェルフォーマットに固定され化合物の連続希釈に曝される。癌細胞の生存能力に対する化合物治療の効果を、製造会社（Roche）のプロトコールに従って、１２～４８時間にＭＴＴアッセイで測定して、ＥＬＩＳＡマイクロプレートリーダー（Biorad）によって定量化する。IC_{50}値はＰｒｉｓｍソフトウェア（Graphpad)を用いる非線形回復分析によって決定する。このアッセイにおい

て阻害活性を示す化合物を、次いでアネキシンＶ結合及びＦＡＣＳ分析によって、対応する癌細胞への長時間に渡る特異的アポトーシス誘導を評価する。

【０３０９】

培養した癌細胞（０．５～１×１０^{5}個）を化合物とＭＴＴアッセイで有効であると観察された濃度で２４時間培養する。次いで細胞を洗浄して、製造会社（BD Bioscience）のプロトコールに従いヨウ化プロピジウム（０．５μｇ／ｍＬ）及びＦＩＴＣ標識アネキシンＶで染色する。アポトーシスの誘導を、ＦＡＣＳ及びＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Tree Star）を用いるデータ分析によって定量化する。化合物がアポトーシスの遺伝経路を介して機能していることを確認するために、点突然変異によって作出した不活性ＳＡＨＢ類縁体を陰性対照として用いる。更に、カスパーゼ３阻害剤Ｚ－ＤＥＶＤ－ＦＭＫ（BD Biosciences）のような、カスパーゼ阻害剤を用いて、ＳＡＨＢ誘導アポトーシスがカスパーゼの不活性化によって回復することを確認する。これらの細胞に基づく検討の目標は、癌細胞アポトーシスの再活性化におけるＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫの直接関与の寄与メカニズムを検討する根拠として、特定の化合物を感受性癌細胞株と一致させることである。

【０３１０】

化合物に感受性の癌細胞株へのＳＡＨＢの効果の、リアルタイムな生理学的読み出しは更に、ミトコンドリア形態の微視的評価（Scorrano, L. et al. (2002) Dev Cell 2(1), 55-67）、ミトコンドリアのカルシウム摂取の落射蛍光画像（Scorrano, L. et al. (2003) Science 300(5616), 135-139)、ミトコンドリア呼吸及び膜電位変化の測定（Li, H. et al. (1998) osis. Cell 94(4), 491-501; Scorrano, L. et al. (2002) Dev Cell 2(1), 55-67）、間接免疫蛍光法による細胞内チトクロームｃの局在化の追跡（Yin, X. et al. (1999) Nature 400(6747), 886-891）、細胞分画及びウェスタン分析によるチトクロームｃ放出の定量（Kim, H. (2006) Nat Cell Biol 8, 1348-1358）及び／又は蛍光発生基質を用いるエフェクターカスパーゼ３活性の定量（Wei, M.C. et al. (2001) Science 292(5517), 727-730）を包含する。

【０３１１】

ＳＡＨＢ化合物の作用のin situでの標的の同一性を確認するために、ＦＩＴＣ－ＳＡＨＢで処理した細胞からの抽出物を用いる、免疫共沈降法を実施することができる。例えば、ＦＩＴＣ－ＢＩＤ ＳＡＨＢでのジャーカット細胞の処理に続く、抽出物の抗－ＦＩＴＣ免疫沈降は、ウェスタン分析によって（Walensky et al. (2006) Mol Cell, 24, 199-210）、及び電気泳動バンドの同定に基づく質量分析によって、相互作用タンパク質ＢＩＤ ＳＡＨＢ及びＢＡＸを同定した。

【０３１２】

実施例７．インビトロ及びｉｎ ｓｉｔｕで、タンパク質標的を光活性可能な共有結合捕獲するためのＳＡＨＢの誘導体化。

ＢＩＭ ＳＡＨＢのようなＳＡＨＢを、新規で別の活性部位で、ＢＡＸのようなＢＣＬ－２ポリペプチドを標的とする選択的架橋試薬に変換した。最初に、離れた位置にベンゾフェノン（Ｂｐａ）部分を含有しているＦＩＴＣ－ＢＡＤ ＢＨ３化合物のパネルを作成した（図１１）。Ｂｐａ置換がアポトーシス結合活性を妨害したかを確認するために、化合物をＧＳＴ－ＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$ΔＣを用いるＦＰＡ試験に付して、高親和性結合活性の完全な保持をパネル全体で観察した。３５０ｎｍの光に暴露して共有架橋する能力を、ＧＳＴ－ＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$ΔＣ及び２倍モル過剰のＦＩＴＣ－ＢＡＤ $ＢＨ３_{Ｂｐａ}$を用いて、インビトロで試験した。クーマシー染色により及び蛍光ゲル画像によって検出したような適切な分子量の架橋付加物を観察した。誘導体化されたＢＨ３によるＧＳＴ－ＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$ΔＣの共有結合捕獲は時間依存性であって、１３５分までにほぼ飽和状態を達成した。ＦＩＴＣ－ＢＡＤ $ＢＨ３_{Ｂｐａ}$－ＧＳＴ－ＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$ΔＣ複合体の正確な質量を反応混合物のＭＡＬＤＩ－ＭＳ分析によって確認した。対応するＦＩＴＣ－ＢＡＤ $ＳＡＨＢ_{Ｂｐａ}$化合物も作成した。これもＧＳＴ－ＢＣＬ－$Ｘ_{Ｌ}$ΔＣを共有結合で捕捉したが、結合していないＦＩＴＣ－ＢＡＤ $ＢＨ３_{Ｂｐａ}$よりも非常に早い動態であった。架橋した種のタンパク質分解、それに続く質量分析は、ＦＩＴＣ－ＢＡＤ $ＳＡＨＢ_{Ｂｐａ}$によって標

的にされているＧＳＴ－ＢＣＬ－X_LΔＣ断片のアミノ酸配列を同定した。
【０３１３】
新規な活性部位にアクセスするために、上記（図１１）のような光活性可能なように架橋できる部分を含有するように、ＢＩＭ、ＢＩＤ、及びＰＵＭＡ ＳＡＨＢを作出した。実際に、全てのＢＩＭ ＳＡＨＢは、３５０ｎｍの光に露光して用量及び時間依存手法によって標的化して共有結合作出したＢＡＸを誘導体化する。現実に、ＢＡＸ単量体分子量の真上に移動する二重項の種が、これらのＳＡＨＢ試薬に曝すことによる、別の結合手法の存在、及びそれによる異なったＢＡＸ移動を強調することが確認された。ＢＩＭ ＳＡＨＢ：ＢＡＸの異なった比を用いて架橋実験を実施したときに、ＢＩＭ ＳＡＨＢ化合物を含有している高次ＢＡＸオリゴマーの架橋及び安定化が捕捉され、新規な活性部位に接近するためのＢＩＭ ＳＡＨＢ誘導体の相互作用の有用性を強調し、そしてその活性化からもたらされるＢＡＸの生理学的オリゴマーも捕捉された。
【０３１４】
細胞内におけるＳＡＨＢ活性を捕捉して明確にするために、上記の誘導体化したＳＡＨＢを培養細胞に加えて、時限の培養時間後に、氷上で１時間以内３５０ｎｍの光を照射した後、細胞溶解及び抗ＦＩＴＣ免疫沈降を行った。免疫沈降物を電気泳動して、クーマシー及び銀染色、蛍光ゲル画像化、及びアポトーシスタンパク質に対するウェスタンブロッティングによって分析した。検出物の特異性を確認するための陰性対照実験は、（１）Ｂｐａを混入していない対応するＦＩＴＣ－ＳＡＨＢ化合物、（２）非照射試料、及び（３）点突然変異ＦＩＴＣ－ＳＡＨＢ Ｂｐａ化合物を包含した。特異的で分離した電気泳動のバンドを切り取って、質量分析で同定した。免疫沈降物を電気泳動して、クーマシー及び銀染色、蛍光ゲル画像化、及びアポトーシス及びその他のタンパク質に対するウェスタンブロッティングによって分析した。
【０３１５】
共有結合複合体の抗ＦＩＴＣプルダウンを見据えた検索的戦略を達成するために、多官能性の手段をＳＡＨＢ化合物に化学的に融合した。この設計は、細胞処理、in situでの結合及び照射工程で用いるために、アルキン含有カルボン酸（４－ペンチン酸）でのＳＡＨＢの初期キャッピングを包含した。細胞溶解（共有結合捕捉に引き続く）により、架橋したＳＡＨＢ化合物のＮ－末端プロパルギル基が、銅の存在下でアジド含有多官能性リンカーでの選択的な環付加を受ける（すなわち、「クリック化学」、Saghatelian, A., et al. Proc Natl Acad Sci U S A 101(27), 10000-10005 (2004); Rabuka, D., et al. J Am Chem Soc 128(37), 12078-12079(2006); Speers, A.E., et al. J Am Chem Soc 125(16), 4686-4687 (2003); Speers, A.E., et al. Chem. Biol 11(4), 535-546 (2004)）。
【０３１６】
アジド官能性に加えて、ストレプトアビジンを捕獲するためのビオチン部分、検出するための蛍光色素分子、及びプロテオーム解析のためにストレプトアビジンビーズから付加したＳＡＨＢ－タンパク質複合体の穏やかな放出を確認するプロテアーゼ確認部位を含有するように設計した（Adam, G.C., et al. Mol Cell Proteomics. 1(10), 828-835 (2002)）（図１７）。放出した蛍光色素標識ＳＡＨＢ－タンパク質複合体を、分子量を確認するためにＭＡＬＤＩ－ＭＳ及びＬＣ－ＭＳ技術によって分析し、その後トリプシン又はリシルエンドペプチダーゼで消化して、高分解能質量分析を用いるタンパク質同定のために断片を産生した。上で定義した構造的アプローチを補足する、この方法の更なる利点は、タンデム質量分析（ＭＳ－ＭＳ）又はＭＳｎ分析による配列確認のための蛍光色素標識断片を用いる標的タンパク質上のＳＡＨＢ相互作用の部位を同定することを可能にすることである。
【０３１７】
従って、癌及びその他の疾患を滅亡させるためにアポトーシス経路を最大限に活用するために、癌における細胞死をプロアポトーシス剤が如何に特異的に再活性化するかを注意深く詳細に分析することが必要である。合成による挑戦は、共有結合捕獲部分を小分子に包含すること、及びその結果として化合物の活性を修正するという付随するリスクと関連

しているので、小分子についてのin situでの作用メカニズムは明確な方法では殆ど明らかにされていない。細胞透過性ＳＡＨＢの重要な利点は、広範囲の化学官能基とそれらが容易に誘導体化することである。共有結合を捕獲するための多官能性ＳＡＨＢの作出において、これらアポトーシス化合物の細胞間標的が明確になるので、それにより特異的なＢＨ３死ドメイン及びその経路が治療目的のアポトーシスを再活性又は阻害するために如何に利用できるかを確認できる。

【０３１８】

ＳＡＨＢをin situでの架橋可能試薬に変換するその他の代替え戦略は、アミノ末端を光解離性カルベン又はニトレン生成官能性に誘導体化することを包含する。最初に、ＳＡＨＢを、ストレプトアビジンを親和性捕獲のためにビオチン化リジン含有しているアミノ末端β－Ａｌａリンカー配列で合成した。次いでこのアミノ末端を、ｐ－［（３－トリフルオロメチル）ジアジリン－３－イル］安息香酸のカルボン酸又はニトレン生成付加物、４－アジド－２，３，５，６－テトラフルオロ安息香酸によって保護する（Yan, M., et al. Bioconjug Chem 5(2), 151-157 (1994)）（図１８）。光解離性ＳＡＨＢに曝した癌細胞またはその他の細胞を３０Ｗの不可視光線（ジアジリンの光分解のために）又はＵＶ照明（アジドの光分解のために）の何れかで処理し、その後、培養、細胞分解、及びビオチン化ＳＡＨＢ－タンパク質複合体のストレプトアビジンビーズによる標的捕獲を行う。結合活性を無効にすることが知られているＳＡＨＢ点突然変異を用いて対照実験を平行して実施した。溶出したＳＡＨＢ－タンパク質複合体を、変性ゲル電気泳動で分離して、ＳＡＨＢ分画に存在するがＳＡＨＢ点突然変異のレーンには存在しないバンドを質量分析によるタンパク質同定に付した。

【０３１９】

実施例８．ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫの活性化を欠損しているマウスモデルにおいて、ＳＡＨＢはＢＨ３によるプロアポトーシス活性を選択的に修復する。

新規な活性部位を介するＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ調節を詳しく分析して得られた知識を、ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫの直接関与によるアポトーシスの再活性化又は阻害による癌又はその他の疾患のための標的治療を開発するために適用することができる。そのためには、ＢＩＭ ＳＡＨＢのような、強力で特異的なＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫ介在プロアポトーシス活性を伴うＳＡＨＢを、インビボでの治療効果について試験した。例えば、「ＢＨ３置換」によるアポトーシス再活性を試験した。

【０３２０】

ＳＡＨＢ化合物の活性及び選択性を評価するために、ＢＨ３置換を、ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫを活性化する対応ＢＨ３オンリータンパク質（複数も）を除去したものに由来する疾患モデルで実施した。例えば、Ｂｉｍ$^{-/-}$マウスの臓器中で見出されたリンパ球浸潤において、アポトーシスを再活性化するＢＩＭ ＳＡＨＢの能力を試験した。年齢及び性別を一致させたＢｉｍ$^{-/-}$及び野生型マウスの試験群を賦形剤（２．５％のＤＭＳＯ／Ｄ５Ｗ）又はＢＩＭ ＳＡＨＢ（１０ｍｇ/ｋｇ）の何れかで毎日、５～７日間治療し、その後、安楽死させ、組織を摘出し、病理組織学的に評価し、そして免疫組織化学検査を行った。腎臓、肺、及び肝臓の明確なＢ－系列リンパ球浸潤を詳細に観察した。賦形剤及びＢＩＭ ＳＡＨＢで処理した野生型動物の組織構造は両群において正常であったのに対して、リンパ球浸潤の明確な兆候がＢｉｍ$^{-/-}$マウスの臓器で明らかであった。特筆すべきは、ＢＩＭ ＳＡＨＢで処理したＢｉｍ$^{-/-}$マウスがリンパ球浸潤において核片貧食マクロファージ（tingible-body macrophages）の顕著な流入を示した。Ｂ２２０＋細胞の断片が免疫組織化学によってマクロファージ内で明白であって、湿潤の至る所に散在している細胞は活性化カスパーゼ３に対して陽性であって；ＴＵＮＥＬ－陽性も観察された。賦形剤で処理したＢｉｍ$^{-/-}$マウスの臓器にはこれらの結果は見られず、ＢＩＭ ＳＡＨＢがＢｉｍ$^{-/-}$臓器内の病的湿潤のアポトーシスを開始することを示唆している。これらの検討を拡張するために、照射した（４５０ｃＧｙ）雌性Ｒａｇ２$^{-/-}$ｇａｍｍａ（ｃ）$^{-/-}$マウス（１０～１２週齢）を、統計分析のための広く一様な群（ｎ＝１０）を作るために、Ｂｉｍ$^{-/-}$マウス由来の骨髄細胞２×１０^{6}個で再構築した。再構築

した動物は、致命的な糸球体硬化を伴って、元のＢｉｍ－／－マウスと同様の自己免疫現象を発現する。

【０３２１】

例えば、この試験デザインは、移植１２週間後に、賦形剤、ＢＩＭ ＳＡＨＢ（３、１０ｍｇ／ｋｇ）、又は陰性対照ＳＡＨＢ（例えば、突然変異ＳＡＨＢ又はＢＡＤ ＳＡＨＢのような異なったＳＡＨＢ；３、１０ｍｇ／ｋｇ）の何れかで毎日７日間処理する５群を含んでいた。試験の０、４、及び７日目に、全血球計数、末梢血リンパ球のＦＡＣＳ分析、セリンＢＵＮ／クレアチン、及び臓器体積に対する脾臓及び腎臓の超音波測定及びＲＦモードのエコー輝度測定（Ｖｅｖｏ７７０、（光学音速に対する脾臓及び腎臓の超音波測定）を実施した。８日目に、動物を屠殺して、病理組織学的及び免疫組織化学的に分析した（例えば、腎臓浸潤の高倍率視野当たりのＴＵＮＥＬ－及び活性化カスパーゼ－３－陽性細胞）。リンパ球計数（ＣＢＣ）、リンパ球サブセット（ＦＡＣＳ）、腎機能（ＢＵＮ／クレアチン）、脾臓及び腎臓の体積（超音波）及びＲＦモードの後方散乱スペクトル（アポトーシスの超音波証明）のデータを検査して、必要により、処理群を越えて分散を安定化するために数学的に変換した。分散の反復測定分析を、０、４、及び７日目に測定した血液及び画像パラメータに用いて、そしてモデル内の差異を処理群間の基準値からの変化を評価するために用いられるだろう。例えば、８日目に屠殺して得られた、臓器浸潤の病理組織学的分析を、３群比較のためのクラスカル・ワイリス(Kruskal-Wallis)検定及びＢＩＭ ＳＡＨＢ処理動物と対照を比較するためのウィルコクソンの順位和検定を用いて群間で評価する。群当たり１０匹の動物で、ウィルコクソンの順位和検定は、０．１０の片側有意水準を試験して、群間の標準偏差を１つ検定するために８０％の検出力を有している。

【０３２２】

Ｂｉｍ－／－及びＢｉｍ－／－Ｂｉｄ－／－表現型の比較分析及びそれらの細胞アポトーシス耐性プロファイル（ＭＥＦｓ、脾臓細胞、胸腺細胞）に基づいて、遺伝子組み換えノックアウトモデルが、ＢＩＤ、ＢＩＭ、及びＰＵＭＡ ＳＡＨＢの単独での又は組み合わせての効果を評価するための異なった疾患のバックグラウンドを提供するであろうことが考慮される。更に、ＢＨ３－オンリー遺伝子型の単独及び組合わせに由来する骨髄を用いる再構築の検討において、形態学的及び免疫表現型的に異なったリンパ増殖が観察され、これもＳＡＨＢの有効性試験のための遺伝子型特異的疾患モデルとして役立つ。

【０３２３】

更に別の方法では、ＳＡＨＢの有効性試験を、特定のＳＡＨＢ感受性細胞株に対応するマウス異種移植モデルを用いても実施できる。目的のＳＡＨＢ感受性癌細胞株を、既述（Armstrong, S.A., et al. Cancer Cell 3(2), 173-183 (2003)）のようにして安定なルシフェラーゼ発現（ｐＭＭＰ－ＬｕｃＮｅｏ）を達成するためにレトロウィルスで形質導入される。転写及び移植された腫瘍の生育の成功をスクリーニングするために、ＳＣＩＤベージュマウス（６～８週齢の雌、Jackson Laboratory）に３００ｃＧｙを全身照射（Gammacell 40, Atomic Energy of Canada, LTD）して、３時間後に尾静脈に癌細胞（すなわち、０．５×１０^{6}、１．０×１０^{6}、２．５×１０^{6}、又は５×１０^{6}注射細胞）を注射する。隔日にインビボで腫瘍画像を得るために、マウスを吸入イソフルランで麻酔して、同時にＤ－ルシフェリンの腹腔内注射（６０ｍｇ／ｋｇ）で処理する。Xenogen In Vivo Imaging System を用いて光子の放出を画像化（２分露光）して、Xenogen's Living Image Software を用いて光子流量（光子／秒）の積分によって全身の生物発光を定量する。

【０３２４】

癌発生の経時変化は、増大する生物発光の監視、及び病気と見られる動物の剖検で確認した癌の診断によって確認する。着実な異種移植を達成するための最適な細胞投与量は、それぞれの選択した細胞株によって決まる。これらの４種の細胞投与量での長期にわたる検討のためには、１群あたり７匹の動物を検討すべきである。この実験デザインは、投与群間の平均発光レベルの標準偏差が、所定の用量レベルで処理された動物内の標準偏差の７０％であると考えられるので、全般に０．０５の有意レベルで試験して、実際に発光に

差があることを確認するために８０％の検出力を提供する。この実験デザインについての統計的計算は nQueryAdvisor5.0 を用いて実施する。

【０３２５】

異種移植検討は、６群のマウス（ｎ＝１０）を、賦形剤のみ、ＳＡＨＢの低用量及び高用量（３～３０ｍｇ／ｋｇ）、又はＳＡＨＢ突然変異対照の低用量及び高用量で処理して試験できる。実験１日目に開始して（１４～１６の範囲のｌｎ［全身発光］で）、マウスは１日１回尾静脈内注射を受け、次いで試験の期間中、腫瘍の毎日の生育及び生存を追跡するために隔日に画像化する。１群当たり１０匹の動物を用いると、０．０５％の名目有意差で試験して、治療群の３０％と比較して、定時点までに９０％の動物が病死する対照群を区別するのに８０％の能力を有する。

【０３２６】

実験マウスの生存分布をカプラン・マイヤー（Kaplan-Meier）法を用いて確認して、ログランク検定を用いて比較する。処置に失敗したマウスの割合を比較するためにフィッシャーの直接確立検定を用い、そこで処置の失敗を進行又は死亡と定義して、成功を安定した疾患又は軽減と定義する。死亡したマウスの全身解剖を、腫瘍部位の組織学的評価と共に実施した。特定のＳＡＨＢによる処置応答が観察されるときは、処置に対する用量反応を評価するために、異なった濃度の用量で１０匹のマウス群を用いて実験を繰り返す。賦形剤又はＳＡＨＢの処置用量の何れかで処置する、２つの追加群を、ＴＵＮＥＬ及び活性化カスパーゼ－３免疫組織化学的染色による評価のために特定の処置日に動物を安楽死させて腫瘍組織を採取することによって、プロアポトーシス活性を評価する薬力学研究のために用いる。

【０３２７】

実施例９．ＢＡＸ／ＢＡＫ／ＢＯＫの直接活性化による、化学療法抵抗性及び／又は難治性の癌又はその他の病的細胞におけるアポトーシスの再活性化。

多くの癌細胞及びそれらの再発性／化学療法抵抗性変異株は、ＢＣＬ－２ファミリーのアンチアポトーシスメンバーを大量に過剰発現することによって、細胞不死に達する。ＢＨ３模倣薬及び小分子を用いる、アンチアポトーシス阻害は、アポトーシス阻止を克服する１つの方法である。しかしながら、ＢＨ３模倣薬又は小分子が、ＭＣＬ－１の過剰発現（Van Delft et al, Cancer Cell. 2006 Nov; 10(5):389-99; Konopleva et al, Cancer Cell. 2006 Nov; 10(5):375-88; Deng et al, Cancer Cell. 2007 Aug; 12(2):171-85）のような、特異的なアンチアポトーシス阻止を標的にできない特異的なプロファイルを有しているときは、直接的なＢＡＸ調節が、治療効果のためのこのようなアポトーシス阻止を避けるか、又はこれと協調させることができる。実際に、ＢＩＤ及びＢＩＭ ＳＡＨＢは、ＢＡＸ／ＢＡＫと直接結合して活性化して、そしてアンチアポトーシス標的を阻害するという二重の能力を有しているので、ＭＣＬ－１過剰発現或は化学療法抵抗性癌細胞のアポトーシスを再活性化することにおいて、ＡＢＴ－７３７－又はＢＡＤ ＳＡＨＢのような、その他のＢＨ３模倣薬よりもかなり有効である。例えば、ＭＣＬ－１及びＡ１を過剰発現するファイファー（Pfeiffer）リンパ腫細胞株は、ＡＢＴ－７３７に耐性であるが、ＢＩＭ ＳＡＨＢによって強殺される。

【０３２８】

従って、ＭＣＬ－１及びＡ１のようなアンチアポトーシスタンパク質を過剰発現する癌又はその他の疾患の細胞、又はＢＩＭのような、活性化因子ＢＨ３－オンリータンパク質を、ＢＩＭ欠損マウスモデルよりも、例えばマントル細胞リンパ腫（Tagawa et al Oncogene. 2005 Feb 17; 24(8):1348-58; Mestre-Escorihuela, Blood. 2007 Jan 1; 109(1):271-80）中で、特異的に下方調節する癌又は疾患性細胞の何れかは、ＢＩＭ ＳＡＨＢ又はそれらの誘導体及び模倣薬が、新規なＢＡＸ活性化部位の直接関与によりアポトーシスを再活性化して、それにより治療目的のためのそして前記アポトーシス阻害に関係のないアポトーシスを誘発するために理想的な適するものである。

【０３２９】

本発明の態様を示せば、以下のとおりとなる。

（１）　方法が、
　ａ）ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを、当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節するのに適している条件下で化合物と接触させること；及び
　ｂ）化合物による当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性の調節を検出すること（ここにおいて、化合物は当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド中の活性部位と相互作用する）：
を含有してなる、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法。
【０３３０】
（２）　当該化合物が有機化合物である、前記（１）に記載の方法。
（３）　当該化合物がポリペプチドである、前記（１）に記載の方法。
（４）　当該化合物が、有機化合物、ポリペプチド、核酸又はこれらの組合わせである、前記（１）に記載の方法。
（５）　当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドがプロアポトーシスポリペプチドである、前記（１）～（４）の何れか一項に記載の方法。
（６）　当該プロアポトーシスポリペプチドがＢＡＸである、前記（５）に記載の方法。
（７）　当該プロアポトーシスポリペプチドがＢＯＫ又はＢＡＫである、前記（５）に記載の方法。
（８）　当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドがアンチアポトーシスポリペプチドである、前記（１）～（４）の何れか一項に記載の方法。
（９）　当該アンチアポトーシスポリペプチドが、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＭＣＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれる、前記（８）に記載の方法。
【０３３１】
（１０）　当該活性がプロアポトーシス活性である、前記（１）に記載の方法。
（１１）　当該活性がアンチアポトーシス活性である、前記（１）に記載の方法。
（１２）　当該活性の調節が、当該プロアポトーシス活性の活性化である、前記（１）に記載の方法。
（１３）　当該活性の調節が、当該プロアポトーシス活性の阻害である、前記（１）に記載の方法。
（１４）　当該活性の調節が、当該アンチアポトーシス活性の活性化である、前記（１）に記載の方法。
（１５）　当該活性の調節が、当該アンチアポトーシス活性の阻害である、前記（１）に記載の方法。
（１６）　工程（ｂ）の検出が、二量化、オリゴマー化又は立体構造状態の変化、及び／又は１つの細胞内コンパートメントから別のコンパートメントへの転座の検出、ミトコンドリアチトクロームｃの放出、リポソームの放出、細胞死、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアのカルシウム摂取、ミトコンドリアの膜透過性定量、及びカスパーゼ３活性又はアネキシンＶ結合の定量よりなる群から選ばれるアッセイを用いて実施される、前記（１）～（１５）のいずれか一項に記載の方法。
（１７）　当該活性部位が、ＢＡＸのアルファ螺旋１及びアルファ螺旋６を含有してなる、前記（１）～（１６）の何れか一項に記載の方法。
（１８）　活性部位が、ＢＡＸのα１－α２ループ及び螺旋４由来のアミノ酸残基を更に含有してなる、前記（１７）に記載の方法。
【０３３２】
（１９）　当該化合物が配列番号１に記載の配列のＬｙｓ２１に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（１）～（１８）の何れか一項に記載の方法。
（２０）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、

Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（１）～（１８）の何れか一項に記載の方法。

（２１）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（１）～（１８）の何れか一項に記載の方法。

（２２）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（１）～（１８）の何れか一項に記載の方法。

【０３３３】

（２３）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列と４０％又はそれ以上同一のアミノ酸配列、又は図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を含有していて、そして配列番号９に記載の配列のＬｅｕ１５２及びＡｓｐ１５７に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

（２４）　当該化合物が、配列番号９に記載の配列のＩｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｉｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基又はそれらの同類置換を包含している、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

（２５）　当該化合物が、配列番号１３に記載の配列のコンセンサスアミノ酸配列、又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

【０３３４】

（２６）　当該化合物が、ＢＩＭポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

（２７）　当該化合物が、ＢＩＭ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（２６）に記載の方法。

（２８）　当該化合物が、ＢＩＤポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

（２９）　当該化合物が、ＢＩＤ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（２８）に記載の方法。

（３０）　当該化合物が、ＰＵＭＡポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

（３１）　当該化合物が、ＰＵＭＡ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（３０）に記載の方法。

（３２）　当該化合物が、ＢＡＸポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

（３３）　当該化合物が、ＢＡＸ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（３２）に記載の方法。

【０３３５】

（３４）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列と４０％同一であって、配列番号９に記載の配列のＬｅｕ９２、Ｇｌｙ９６及びＡｓｐ９７に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を含有してなる、ＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。

（３５）　当該化合物が、配列番号４に記載の配列と４０％同一であって、配列番号６に記載の配列のＬｅｕ９０、Ｇｌｙ９４及びＡｓｐ９５に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を含有してなる、ＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１）～（２２）の何れか

一項に記載の方法。
（３６）　当該化合物が、配列番号５に記載の配列と４０％同一であって、配列番号７に記載の配列のＬｅｕ１４１、Ａｌａ１４５及びＡｓｐ１４６に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を含有してなる、ＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。
（３７）　当該化合物が、配列番号１２に記載の配列と４０％同一であって、配列番号１に記載の配列のＬｅｕ６３、Ｇｌｙ６７及びＡｓｐ６８に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を含有してなる、ＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。
（３８）　当該化合物が、＜１ｍＭの親和性で当該活性部位に結合する、前記（１）～（３７）の何れか一項に記載の方法。
【０３３６】
（３９）　当該化合物が、配列番号３に記載のアミノ酸配列又は図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。
（４０）　当該化合物が、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｌｋ、Ｈｒｋ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｂｎｉｐ３、Ｎｉｘ、Ｎｏｘａ、Ｐｕｍａ、Ｂｍｆ及びＥｇｌ－１よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのＢＩＭ領域を含有してなる、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。
（４１）　当該化合物が、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。
（４２）　当該化合物が、ＢＡＸ、ＢＡＫ及びＢＯＫよりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記（１）～（２２）の何れか一項に記載の方法。
（４３）　当該方法が、当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトされた細胞を使用する、前記（１）～（４２）の何れか一項に記載の方法。
【０３３７】
（４４）　方法が、
ａ）ＢＡＸポリペプチドを、当該ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するのに適している条件下で化合物と接触させること；及び
ｂ）当該化合物による当該ＢＡＸポリペプチドの活性化を検出すること（ここにおいて、当該化合物は配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する）：
を含有してなる、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する化合物を同定する方法。
【０３３８】
（４５）　方法が、
ａ．当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位の三次元構造を用いて、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド相互作用テンプレートを形成すること；及び
ｂ．当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド相互作用テンプレートを使用して、当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチド候補化合物を選択すること（ここにおいて、当該候補化合物は当該活性部位に結合する）：
を含有してなる、ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの候補化合物を同定する方法。

【０３３９】
（４６）　方法が、
ａ．ＢＡＸポリペプチドの活性部位の三次元構造を提供すること；
ｂ．当該活性部位と化合物の間の結合相互作用をシミュレートすること；及び
ｃ．当該化合物が、当該活性部位の配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、及びＡｒｇ１４７よりなる群から選ばれるアミン酸残基と結合するか否かを確認すること（ここにおいて、活性部位の当該アミノ酸残基に結合する当該化合物は当該候補化合物である）：
を含有してなる、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する候補化合物を同定する方法。
【０３４０】
（４７）　当該候補化合物が有機化合物である、前記（４５）又は（４６）に記載の方法。
（４８）　当該候補化合物がポリペプチドである、前記（４５）又は（４６）に記載の方法。
（４９）　当該候補化合物が有機化合物、ポリペプチド、核酸又はそれらの組合わせである、前記（４５）又は（４６）に記載の方法。

（５０）　当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドがプロアポトーシスポリペプチドである、前記（４５）に記載の方法。
（５１）　当該プロアポトーシスポリペプチドがＢＡＸである、前記（５０）に記載の方法。
（５２）　当該プロアポトーシスポリペプチドがＢＯＫ又はＢＡＫである、前記（５０）に記載の方法。
（５３）　当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドがアンチアポトーシスポリペプチドである、前記（４５）に記載の方法。
（５４）　当該アンチアポトーシスポリペプチドが、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれる、前記（５３）に記載の方法。
【０３４１】
（５５）　当該候補化合物が、プロアポトーシス活性の活性化因子である、前記（４５）に記載の方法。
（５６）　当該候補化合物が、プロアポトーシス活性の阻害因子である、前記（４５）に記載の方法。
（５７）　当該候補化合物が、アンチアポトーシス活性の活性化因子である、前記（４５）に記載の方法。
（５８）　当該候補化合物が、アンチアポトーシス活性の阻害因子である、前記（４５）に記載の方法。
（５９）　当該候補化合物を生物学的アッセイで試験することを更に含有してなる、前記（４５）～（５８）の何れか一項に記載の方法。
（６０）　当該生物学的アッセイが、二量化、オリゴマー化又は立体構造状態の変化、及び／又は１つの細胞コンパートメントから別のコンパートメントへの転座の検出、ミトコンドリアのチトクロームｃ放出、リポソーム放出、細胞死、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアのカルシウム摂取、ミトコンドリアの膜透過性定量、カスパーゼ３活性又はアネキシン結合性の定量よりなる群から選ばれる、前記（５９）に記載の方法。

（６１）　当該活性部位が、ＢＡＸのアルファ螺旋１及びアルファ螺旋６を含有してなる、前記（４５）～（６０）の何れか一項に記載の方法。
（６２）　活性部位が、ＢＡＸのα１－α２ループ及び螺旋４由来のアミノ酸残基を更に含有している、前記（６１）に記載の方法。
【０３４２】
（６３）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＬｙｓ２１に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（４５）～（６２）の何れか一項に記載の方法。
（６４）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（４５）～（６２）の何れか一項に記載の方法。
（６５）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（４５）～（６２）の何れか一項に記載の方法。
（６６）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（４５）～（６２）の何れか一項に記載の方法。
【０３４３】
（６７）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列と４０％又はそれ以上同一のアミノ酸配列、又は図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を含有していて、そして配列番号９に記載の配列のＬｅｕ１５２及びＡｓｐ１５７に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（６８）　当該化合物が、配列番号９に記載の配列のＩｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｉｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（６９）　当該化合物が、配列番号１３に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（７０）　当該化合物が、ＢＩＭポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（７１）　当該化合物が、ＢＩＭ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（７０）に記載の方法。
（７２）　当該化合物が、ＢＩＤポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（７３）　当該化合物が、ＢＩＤ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（７２）に記載の方法。
（７４）　当該化合物が、ＰＵＭＡポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（７５）　当該化合物が、ＰＵＭＡ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（７４）に記載の方法。
（７６）　当該化合物が、ＢＡＸポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（７７）　当該化合物が、ＢＡＸ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（７６）に

記載の方法。
【０３４４】
（７８）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列と４０％同一で、配列番号２に記載の配列のＬｅｕ９２、Ｇｌｙ９６及びＡｓｐ９７に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（７９）　当該化合物が、配列番号４に記載の配列と４０％同一で、配列番号６に記載の配列のＬｅｕ９０、Ｇｌｙ９４及びＡｓｐ９５に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有していなＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（８０）　当該化合物が、配列番号５に記載の配列と４０％同一で、配列番号７に記載の配列のＬｅｕ１４１、Ａｌａ１４５及びＡｓｐ１４６に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（８１）　当該化合物が、配列番号１２に記載の配列と４０％同一で、配列番号１に記載の配列のＬｅｕ６３、Ｇｌｙ６７及びＡｓｐ６８に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（８２）　当該化合物が、＜１ｍＭの親和性で当該活性部位に結合する、前記（４５）～（８１）の何れか一項に記載の方法。
【０３４５】
（８３）　当該化合物が、配列番号３に記載のアミノ酸配列、又は図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（８４）　当該化合物が、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｌｋ、Ｈｒｋ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｂｎｉｐ３、Ｎｉｘ、Ｎｏｘａ、Ｐｕｍａ、Ｂｍｆ及びＥｇｌ－１よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのＢＩＭ領域を含有してなる、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（８５）　当該化合物が、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（８６）　当該化合物が、ＢＡＸ、ＢＡＫ及びＢＯＫよりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記（４５）～（６６）の何れか一項に記載の方法。
（８７）
当該方法が、当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトされた細胞を使用する、前記（４５）～（８６）の何れか一項に記載の方法。
【０３４６】
（８８）
ａ．標的ポリペプチドを、共有結合架橋可能部分を含有しているＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドと培養すること；
ｂ．当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドを当該標的ポリペプチドに架橋すること；及び
ｃ．当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドの当該標的ポリペプチドに対する相互作用部位を同定すること：
を含有してなる、標的ポリペプチド上の活性部位を同定する方法。
【０３４７】
（８９）
ａ．ＭＴＳＬ誘導体化ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドをＢＡＸに接触させること；及び
ｂ．ＮＭＲ分析を実施し、それによってＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドとＢＡＸの間の結合相互作用を確認すること：

を含有してなる、ＢＡＸ－ＢＨ３結合相互作用を確認する方法。
【０３４８】
（９０）　治療を必要としている対象に、前記（１）～（８７）の何れか一項に記載の方法で同定された化合物の有効量を投与することを含有してなる、対象における疾患を治療する方法。
（９１）　当該疾患が、異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患である、前記（９０）に記載の方法。
（９２）　当該異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患が癌又は自己免疫疾患である、前記（９１）に記載の方法。
（９３）　当該癌が、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫よりなる群から選ばれる、前記（９２）に記載の方法。
（９４）　当該癌が、化学療法抵抗性の癌である、前記（９２）に記載の方法。
（９５）　当該化学療法抵抗性の癌が、ＡＢＴ－７３７又はＡＢＴ－２６３に耐性である、前記（９４）に記載の方法。
【０３４９】
（９６）　ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドを、当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する化合物で調節することによって、疾患を治療する方法。
（９７）　当該疾患が、異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患である、前記（９６）に記載の方法。
（９８）　当該異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患が癌又は自己免疫疾患である、前記（９７）に記載の方法。
（９９）　当該癌が、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫よりなる群から選ばれる、前記（９８）に記載の方法。
（１００）　当該癌が、化学療法抵抗性の癌である、前記（９８）に記載の方法。
（１０１）　当該化学療法抵抗性の癌が、ＡＢＴ－７３７又はＡＢＴ－２６３に耐性である、前記（１００）に記載の方法。
【０３５０】
（１０２）　当該化合物が有機化合物である、前記（９６）～（１０１）の何れか一項に記載の方法。
（１０３）　当該化合物がポリペプチドである、前記（９６）～（１０１）の何れか一項に記載の方法。
（１０４）　当該化合物が、有機化合物、ポリペプチド、核酸又はこれらの組合わせである、前記（９６）～（１０１）の何れか一項に記載の方法。
（１０５）　当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドが、プロアポトーシスポリペプチドである、前記（９６）～（１０４）の何れか一項に記載の方法。
（１０６）　当該プロアポトーシスポリペプチドが、ＢＡＸである、前記（１０５）に記載の方法。
（１０７）　当該プロアポトーシスポリペプチドが、ＢＯＫ又はＢＡＫである、前記（１０５）に記載の方法。
（１０８）　当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドが、アンチアポトーシスポリペプチドである、前記（９６）～（１０４）の何れか一項に記載の方法。
（１０９）　当該アンチアポトーシスポリペプチドが、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれる、前記（１０８）に記載の方法。
【０３５１】
（１１０）　当該化合物が、プロアポトーシス活性を活性化する、前記（９６）～（１０４）の何れか一項に記載の方法。
（１１１）　当該化合物が、プロアポトーシス活性を阻害する、前記（９６）～（１０４）の何れか一項に記載の方法。

（１１２）　当該化合物が、アンチアポトーシス活性を活性化する、前記（９６）～（１０４）の何れか一項に記載の方法。
（１１３）　当該化合物が、アンチアポトーシス活性を阻害する、前記（９６）～（１０４）の何れか一項に記載の方法。
（１１４）　当該活性部位が、ＢＡＸのアルファ螺旋１及びアルファ螺旋６を含有してなる、前記（９６）～（１１３）の何れか一項に記載の方法。
（１１５）　活性部位が、ＢＡＸのα１－α２ループ及び螺旋４由来のアミノ酸残基を更に包含している、前記（１１４）に記載の方法。
【０３５２】
（１１６）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＬｙｓ２１に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（９６）～（１１５）の何れか一項に記載の方法。
（１１７）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（９６）～（１１５）の何れか一項に記載の方法。
（１１８）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（９６）～（１１５）の何れか一項に記載の方法。
（１１９）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（９６）～（１１５）の何れか一項に記載の方法。
【０３５３】
（１２０）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列と４０％又はそれ以上同一のアミノ酸配列、又は図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を含有していて、そして配列番号９に記載の配列のＬｅｕ１５２及びＡｓｐ１５７に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１２１）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列のＩｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｉｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１２２）　当該化合物が、配列番号１３に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１２３）　当該化合物が、ＢＩＭポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１２４）　当該化合物が、ＢＩＭ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１２３）に記載の方法。
（１２５）　当該化合物が、ＢＩＤポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１２６）　当該化合物が、ＢＩＤ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１２５）に記載の方法。
（１２７）　当該化合物が、ＰＵＭＡポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１２８）　当該化合物が、ＰＵＭＡ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１２

７）に記載の方法。
（１２９）　当該化合物が、ＢＡＸポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３０）　当該化合物が、ＢＡＸ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１２９）に記載の方法。
【０３５４】
（１３１）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列と４０％同一で、配列番号９に記載の配列のＬｅｕ９２、Ｇｌｙ９６及びＡｓｐ９７に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３２）　当該化合物が、配列番号４に記載の配列と４０％同一で、配列番号６に記載の配列のＬｅｕ９０、Ｇｌｙ９４及びＡｓｐ９５に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３３）　当該化合物が、配列番号５に記載の配列と４０％同一で、配列番号７に記載の配列のＬｅｕ１４１、Ａｌａ１４５及びＡｓｐ１４６に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３４）　当該化合物が、配列番号１２に記載の配列と４０％同一で、配列番号１に記載の配列のＬｅｕ６３、Ｇｌｙ６７及びＡｓｐ６８に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３５）　当該化合物が、＜１ｍＭの親和性で当該活性部位に結合する、前記（９６）～（１３４）の何れか一項に記載の方法。
【０３５５】
（１３６）　当該化合物が、配列番号３に記載のアミノ酸配列、又は図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３７）　当該化合物が、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｌｋ、Ｈｒｋ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｂｎｉｐ３、Ｎｉｘ、Ｎｏｘａ、Ｐｕｍａ、Ｂｍｆ及びＥｇｌ－１よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのＢＩＭ領域を含有してなる、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３８）　当該化合物が、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
（１３９）　当該化合物が、ＢＡＸ、ＢＡＫ及びＢＯＫよりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記（９６）～（１１９）の何れか一項に記載の方法。
【０３５６】
（１４０）　治療を必要としている患者に、ＢＡＸポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する化合物を投与することを含有してなる腫瘍を治療する方法（ここにおいて、当該化合物は配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７の１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合し、当該化合物はＢＨ３ポリペプチド又はその模倣薬である）。
【０３５７】

（１４１）　ＢＣＬ－２に関連する疾患を治療する化合物であって、当該化合物はＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性を調節して、当該ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する、化合物。
（１４２）　当該疾患が、異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患である、前記（１４１）に記載の化合物。
（１４３）　当該異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患が癌又は自己免疫疾患である、前記（１４２）に記載の化合物。
（１４４）　当該癌が、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫よりなる群から選ばれる、前記（１４３）に記載の化合物。
（１４５）　当該癌が、化学療法抵抗性の癌である、前記（１４３）に記載の化合物。
【０３５８】
（１４６）　当該化合物が有機化合物である、前記（１４１）～（１４５）の何れか一項に記載の化合物。
（１４７）　当該化合物がポリペプチドである、前記（１４１）～（１４５）の何れか一項に記載の化合物。
（１４８）　当該化合物が有機化合物、ポリペプチド、核酸又はこれらの組合わせである、前記（１４１）～（１４５）の何れか一項に記載の化合物。
（１４９）　当該活性部位が、ＢＡＸのアルファ螺旋１及びアルファ螺旋６を含有してなる、前記（１４１）～（１４８）の何れか一項に記載の化合物。
（１５０）　当該活性部位が、ＢＡＸのα１－α２ループ及び螺旋４由来のアミノ酸残基を更に包含してなる、前記（１４９）に記載の化合物。
【０３５９】
（１５１）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＬｙｓ２１に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（１４１）～（１５０）の何れか一項に記載の化合物。
（１５２）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＧｌｕ１７、Ｍｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ｔｈｒ２２、Ａｌａ２４、Ｌｅｕ２５、Ｌｅｕ２７、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｙ２９、Ｉｌｅ３１、Ｇｌｎ３２、Ａｓｐ３３、Ｌｅｕ４７、Ａｓｐ４８、Ｐｒｏ４９、Ｖａｌ５０、Ｐｒｏ５１、Ｇｌｎ５２、Ａｓｐ５３、Ｔｈｒ５６、Ａｒｇ８９、Ｐｈｅ９２、Ｐｈｅ９３、Ｐｒｏ１３０、Ｇｌｕ１３１、Ｉｌｅ１３３、Ａｒｇ１３４、Ｔｈｒ１３５、Ｍｅｔ１３７、Ｇｌｙ１３８、Ｔｒｐ１３９、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２、Ｐｈｅ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４６、Ａｒｇ１４７に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（１４１）～（１５０）の何れか一項に記載の化合物。
（１５３）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記（１４１）～（１５０）の何れか一項に記載の化合物。
（１５４）　当該化合物が、配列番号１に記載の配列のＭｅｔ２０、Ｌｙｓ２１、Ａｌａ２４、Ｇｌｎ２８、Ｇｌｎ３２、Ｇｌｕ１３１、Ａｒｇ１３４、Ｍｅｔ１３７、Ｌｅｕ１４１、Ａｓｐ１４２に対応するアミノ酸残基に結合する、前記（１４１）～（１５０）の何れか一項に記載の化合物。
【０３６０】
（１５５）　当該化合物が、図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列と４０％又はそれ以上同一であり、そして配列番号９に記載の配列のＬｅｕ１５２及びＡｓｐ１５７に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１５６）　当該化合物が、配列番号９に記載の配列のＩｌｅ１４８、Ａｌａ１４９、Ｌｅｕ１５２、Ａｒｇ１５３、Ａｒｇ１５４、Ｉｌｅ１５５、Ｇｌｙ１５６、Ａｓｐ１５７、Ｇｌｕ１５８、Ａｓｎ１６０、Ａｌａ１６１、Ｔｙｒ１６３に対応する１つ又はそれ以上のアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。

（１５７）　当該化合物が、配列番号１３に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はそれらの同類置換を含有してなる、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１５８）　当該化合物が、ＢＩＭポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１５９）　当該化合物が、ＢＩＭ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１５８）に記載の化合物。
（１６０）　当該化合物が、ＢＩＤポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１６１）　当該化合物が、ＢＩＤ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１６０）に記載の化合物。
（１６２）　当該化合物が、ＰＵＭＡポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１６３）　当該化合物が、ＰＵＭＡ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１６２）に記載の化合物。
（１６４）　当該化合物が、ＢＡＸポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１６５）　当該化合物が、ＢＡＸ　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドである、前記（１６４）に記載の化合物。
【０３６１】
（１６６）　当該化合物が、配列番号３に記載の配列と４０％同一で、配列番号２に記載の配列のＬｅｕ９２、Ｇｌｙ９６及びＡｓｐ９７に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１６７）　当該化合物が、配列番号４に記載の配列と４０％同一で、配列番号６に記載の配列のＬｅｕ９０、Ｇｌｙ９４及びＡｓｐ９５に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１６８）　当該化合物が、配列番号５に記載の配列と４０％同一で、配列番号７に記載の配列のＬｅｕ１４１、Ａｌａ１４５及びＡｓｐ１４６に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１６９）　当該化合物が、配列番号１２に記載の配列と４０％同一で、配列番号１に記載の配列のＬｅｕ６３、Ｇｌｙ６７及びＡｓｐ６８に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるＢＨ３領域ポリペプチドである、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１７０）　当該化合物が、＜１ｍＭの親和性で当該活性部位に結合する、前記（１４１）～（１６９）の何れか一項に記載の化合物。
【０３６２】
（１７１）　当該化合物が、配列番号３に記載のアミノ酸配列、又は図８、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１７２）　当該化合物が、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｂｉｋ／Ｎｂｋ、Ｂｌｋ、Ｈｒｋ、Ｂｉｍ／Ｂｏｄ、Ｂｎｉｐ３、Ｎｉｘ、Ｎｏｘａ、Ｐｕｍａ、Ｂｍｆ及びＥｇｌ－１よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのＢＩＭ領域を含有してなる、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１７３）　当該化合物が、ＢＣＬ－２、Ｂｃｌ－Ｘ１、Ｂｃｌ－ｗ、Ｍｃｌ－１、ＢＣＬ－Ｂ、Ａ１／ＢＦＬ－１、ＢＯＯ／ＤＩＶＡ、Ｎｒ－１３又はＣＥＤ－９、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
（１７４）　当該化合物が、ＢＡＸ、ＢＡＫ及びＢＯＫよりなる群から選ばれるポリペプ

チドである、前記（１４１）～（１５４）の何れか一項に記載の化合物。
【０３６３】
（１７５）　ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドが共有結合架橋可能部分を含有してなる、ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド
（１７６）　当該共有結合架橋可能部分がベンゾフェノンである、前記（１７５）に記載のＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド。
（１７７）　当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドが、ＢＩＭポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１７５）又は（１７６）に記載のＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド。
（１７８）　当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドが、ＢＩＤポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１７５）又は（１７６）に記載のＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド。
（１７９）　当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドが、ＰＵＭＡポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１７５）又は（１７６）に記載のＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド。
（１８０）　当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドが、ＢＡＸポリペプチドのＢＨ３領域である、前記（１７５）又は（１７６）に記載のＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド。
（１８１）　当該ＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドが、図１１に記載のポリペプチドからなる群から選ばれる、前記（１７５）又は（１７６）に記載のＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチド。
【０３６４】
（１８２）　ＢＨ３ポリペプチドを含有してなる組成物であって、当該ＢＨ３ポリペプチドが、本質的に図７、９、１０又は１６ａに記載のアミノ酸配列を包含している、組成物。
（１８３）　ＢＡＸα－螺旋９ＳＡＨＢポリペプチドを含有してなる組成物であって、当該ポリペプチドは図１６ｂに記載のアミノ酸配列と４０％又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有しているか、又はその同類置換を含んでなる、組成物。
（１８４）　常磁性標識を有するＢＨ３　ＳＡＨＢポリペプチドを含有してなる組成物。
【０３６５】
（１８５）　治療を必要としている対象に、当該対象が疾患を治療されるように、前記（１）～（８７）の何れか一項に記載の方法で同定された化合物及びＢＡＸα－螺旋９ＳＡＨＢポリペプチド（配列番号１４）の有効量を投与することを含有してなる、対象における疾患を治療する方法。
（１８６）　当該ＢＡＸα－螺旋９ＳＡＨＢポリペプチドが図１６ｂに記載のアミノ酸配列と４０％又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有しているか、又はその同類置換を含んでなる、前記（１８５）に記載の方法。
【０３６６】
（１８７）　ＢＣＬ－２ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する化合物及び使用説明書を含有してなる、キット。
（１８８）　配列番号１３に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はその同類置換を含有してなる、単離したポリペプチド。
（１８９）　当該ポリペプチドが炭化水素を連結している、前記（１８８）に記載のポリペプチド。
（１９０）　前記（１８９）に記載のポリペプチドを含有してなる、組成物。