

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-532561  
(P2008-532561A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/34</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/34		2 G 0 4 5
<b>G O 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/50	Z	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/15	Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2008-516423 (P2008-516423)  
 (86) (22) 出願日 平成17年9月21日 (2005.9.21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年5月22日 (2007.5.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2005/004207  
 (87) 国際公開番号 W02007/135471  
 (87) 国際公開日 平成19年11月29日 (2007.11.29)  
 (31) 優先権主張番号 60/611,964  
 (32) 優先日 平成16年9月22日 (2004.9.22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

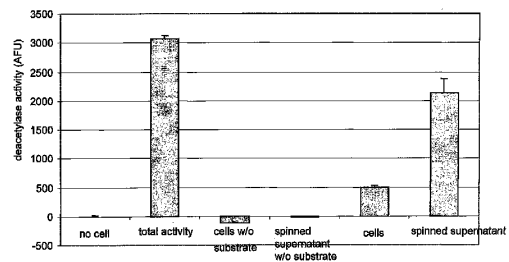
(71) 出願人 500301027  
 メチルジーン インコーポレイテッド  
 カナダ エイチ4エス 2エイ1 ケベック  
 タ サンローラン フレデリック バン  
 タン 7220  
 (74) 代理人 100102842  
 弁理士 葛和 清司  
 (72) 発明者 リ, ツオメイ  
 カナダ国 エイチ9エイチ 3エックス3  
 、ケベック州、カークランド、オリオール  
 ストリート 22  
 (72) 発明者 ベスターマン, ジェフリー エム.  
 カナダ国 エイチ9エックス 3ブイ3、  
 ケベック州、ペ ドゥルフェ、グレイ ク  
 レッセント 51

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストンデアセチラーゼのホールセル酵素アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質デアセチラーゼについての酵素アッセイに関する。より特定的には、本発明は、ホールセルを利用する、かかるアッセイに関する。本発明は、哺乳動物の体から直接的に採取されたホールセルにおける、タンパク質デアセチラーゼ活性のレベルの評価を可能にする、アッセイを提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

エキソビボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、全タンパク質デアセチラーゼ活性を評価するための以下の含む方法：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、細胞透過性の、該タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーに対する pan-基質またはアイソタイプ特異的基質とを、接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；および、

該検出可能なレポーター分子を定量する工程

## 【請求項 2】

検出可能なレポーター分子の量が、タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、S i r - 2 ファミリーである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

エキソビボで、ホールセル由来の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類または 2 種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的活性を評価するための方法であって、

ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類または 2 種類以上のアイソタイプは、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供し、

以下の含む方法：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、細胞透過性の、該タンパク質デアセチラーゼファミリーに対する pan-基質、または、細胞透過性の、該タンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的阻害剤とを接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該細胞の第 1 のアリコートと、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する 1 種類もしくは 2 種類以上のタンパク質デアセチラーゼのアイソタイプ特異的阻害剤とを接触させる工程；

該全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する 1 種類もしくは 2 種類以上のタンパク質デアセチラーゼのアイソタイプ特異的阻害剤と接触させられない、該ホールセルの第 2 のアリコートを提供する工程；

該第 1 のアリコートおよび第 2 のアリコート中の、該検出可能なレポーター分子を定量する工程；ならびに、

該第 1 のアリコートおよび第 2 のアリコート中の、該検出可能なレポーター分子を比較する工程

## 【請求項 6】

検出可能なレポーター分子の量が、タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類若しくは 2 種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

10

20

30

40

50

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、S i r - 2 ファミリーである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

ホールセルが、検出可能なレポーター分子を定量する前に、1 種類もしくは 2 種類以上のアイソタイプを発現する遺伝子もしくは遺伝子群によって形質移入されている、請求項 5 に記載の方法

【請求項 10】

エキソピボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的活性を評価するための以下を含む方法：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルを、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させる工程であって、ここで、該 1 種類もしくは 2 種類以上のタンパク質デアセチラーゼによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；および、

該検出可能なレポーター分子を定量する工程

【請求項 11】

検出可能なレポーター分子の量が、タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、S i r - 2 ファミリーである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

エキソピボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、pan - 阻害剤候補の活性を評価するための以下を含む方法：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、細胞透過性の、該タンパク質デアセチラーゼファミリーに対する pan - 基質またはアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーによる該基質の脱アセチル化が、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該細胞の第 1 のアリコートと、該タンパク質デアセチラーゼファミリーの pan - 阻害剤候補とを接触させる工程；

該タンパク質デアセチラーゼファミリーの pan - 阻害剤候補と接触させられない、該細胞の第 2 のアリコートを提供する工程；

該第 1 のアリコートおよび該第 2 のアリコート中の、該検出可能なレポーター分子を定量する工程；および、

該第 1 のアリコートおよび該第 2 のアリコート中の、検出可能なレポーター分子の量を比較する工程

を包含する、方法。

【請求項 15】

検出可能なレポーター分子の量が、タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定される、請求項 13 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 17】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、S i r - 2 ファミリーである、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 18】

エキソピボで、ホールセル由来の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、阻害剤候補のアイソタイプ特異的活性を評価するための方法であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーの該 1 種類もしくは 2 種類以上のアイソタイプは、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供し；

以下を含む方法：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、細胞透過性の該タンパク質デアセチラーゼファミリーに対する pan-基質、または、細胞透過性の該タンパク質デアセチラーゼファミリーの該 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的阻害剤とを接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該ホールセルの第 1 のアリコートと、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する該 1 種類もしくは 2 種類以上のタンパク質デアセチラーゼのアイソタイプ特異的阻害剤候補とを、

接触させる工程；  
全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する該 1 種類もしくは 2 種類以上のタンパク質デアセチラーゼのアイソタイプ特異的阻害剤候補と接触させられない、該細胞の第 2 のアリコートを提供する工程；

該第 1 のアリコートおよび第 2 のアリコート中の、該検出可能なレポーター分子を定量する工程；ならびに、

各々のアリコートについての、該検出可能なレポーター分子の量を比較する工程

## 【請求項 19】

検出可能なレポーター分子の量が、タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定される、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 20】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 21】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、S i r - 2 ファミリーである、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 22】

インピボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、pan-阻害剤の効力を評価するための以下を含む方法：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、該タンパク質デアセチラーゼファミリーに対する pan-基質、またはアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該レポーター分子を定量する工程；

該哺乳動物に、該 pan-阻害剤を投与する工程；

該哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、該 pan-基質またはアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程；

該レポーター分子を定量する工程；および、

10

20

30

40

50

該pan-阻害剤の投与前の該哺乳動物由来の該ホールセル中の該レポーター分子の量と、該pan-阻害剤の投与後の該ホールセル中の該レポーター分子の量とを比較する工程を包含する、方法。

【請求項 2 3】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、S i r - 2 ファミリーである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

インビボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの、アイソタイプ特異的阻害剤の、効力を評価するための以下を含む方法；

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程であって、ここで、該 1 種類もしくは 2 種類以上のタンパク質デアセチラーゼによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該レポーター分子を定量する工程；

該哺乳動物に、該アイソタイプ特異的阻害剤を投与する工程；

該哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、アイソタイプ特異的基質とを接触させる工程；

該レポーター分子を定量する工程；および、

該アイソタイプ特異的阻害剤の投与後の該ホールセル由来の該レポーター分子の量と、該アイソタイプ特異的阻害剤の投与前の該哺乳動物由来の該ホールセル中の該レポーター分子の量とを、比較する工程

【請求項 2 6】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、S i r - 2 ファミリーである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

インビボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、pan-アクチベーターの効力を評価するための以下を含む：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、該タンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質またはアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該レポーター分子を定量する工程；

該哺乳動物に、該pan-アクチベーターを投与する工程；

該哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、該pan-基質またはアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程；

該レポーター分子を定量する工程；および

該pan-アクチベーターの投与前の該哺乳動物由来のホールセル中の該レポーター分子の量と、該pan-アクチベーターの投与後の該ホールセル中の該レポーター分子の量とを、比較する工程

【請求項 2 9】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーである、請求項 2 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 30】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、Sir-2ファミリーである、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 31】

インビボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの、アイソタイプ特異的アクチベーターの効力を評価するための以下を含む方法であって：

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、タンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程であって、ここで、該 1 種類もしくは 2 種類以上のタンパク質デアセチラーゼによる、該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該レポーター分子を定量する工程；

該哺乳動物に、該アイソタイプ特異的アクチベーターを投与する工程；

該哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと該アイソタイプ特異的基質とを接触させる工程；

該レポーター分子を定量する工程；および

該アイソタイプ特異的アクチベーターの投与後の該ホールセル中由来の該レポーター分子の量と、該アイソタイプ特異的アクチベーターの投与前の、該哺乳動物由来のホールセル中の該レポーター分子の量とを比較する工程

## 【請求項 32】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) ファミリーである、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 33】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、Sir-2ファミリーである、請求 30 に記載の方法。

## 【請求項 34】

インビボで、哺乳動物の全タンパク質デアセチラーゼまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、pan-阻害剤の効力を評価するための以下を含む方法：

該哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質を投与する工程であって、ここで、該pan-基質またはアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の、該検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；

該哺乳動物に、該タンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-阻害剤を投与する工程；

該哺乳動物に、該pan-基質またはアイソタイプ特異的基質を投与する工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の、該検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；および、

該pan-阻害剤の投与前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、該pan-阻害剤の投与後の体液中の該検出可能なレポーター分子の量とを、比較する工程

## 【請求項 35】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) ファミリーである、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 36】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、Sir-2ファミリーである、請求 33 に記載の方法。

## 【請求項 37】

インビボで、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的阻害剤の効力を評価するための以下を含む方法：

哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの 1 種類もしくは

10

20

30

40

50

2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質を投与する工程であって、ここで、該アイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の、該検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；

該哺乳動物に、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの該1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的阻害剤を投与する工程；

該哺乳動物に、該アイソタイプ特異的基質を投与する工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；および、

該アイソタイプ特異的阻害剤の投与前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、該アイソタイプ特異的阻害剤の投与後の体液中の該検出可能なレポーター分子の量とを比較する工程

を包含する、方法。

【請求項38】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、Sir-2ファミリーである、請求36に記載の方法。

【請求項40】

インビボで、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、全活性のpan-アクチベーターの効力を評価するための以下を含む方法：

該哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質またはアイソタイプ特異的基質を投与する工程であって、ここで、該pan-基質またはアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の該検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；

該哺乳動物に、該タンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーターを投与する工程；

該哺乳動物に、該pan-基質または該アイソタイプ特異的基質を投与する工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の、該検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；および

該pan-アクチベーターの投与前に得られた体液中の該検出可能なレポーター分子の量と、該pan-アクチベーターの投与後の体液中の該検出可能なレポーター分子の量とを、比較する工程

【請求項41】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである、請求項39に記載の方法。

【請求項42】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、Sir-2ファミリーである、請求39に記載の方法。

【請求項43】

インビボで、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーターの効力を評価するための以下を含む方法：

該哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質を投与する工程であって、ここで、該アイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する

10

20

30

40

50

、工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の該検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；

該哺乳動物に、該タンパク質デアセチラーゼファミリーの該1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的アクチベーターを、投与する工程；

該哺乳動物に、該アイソタイプ特異的基質を投与する工程；

該哺乳動物から体液を得る工程；

該体液中の、該検出可能なレポーター分子の量を決定する工程；および、

該アイソタイプ特異的アクチベーターの投与前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、該アイソタイプ特異的アクチベーターの投与後の体液中の検出可能なレポーター分子の量とを比較する工程

を包含する、方法。

【請求項44】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

タンパク質デアセチラーゼファミリーが、Sir-2ファミリーである、請求42に記載の方法。

【請求項46】

エキソピボで、ホールセル中の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-アクチベーター候補の活性を評価するための以下を含む方法；

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、細胞透過性の該タンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソザイム特異的基質とを接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該細胞の第1のアリコートと、該タンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーター候補とを接触させる工程；

該タンパク質デアセチラーゼファミリーの該pan-アクチベーター候補と接触させられない、該細胞の第2のアリコートを提供する工程；

該第1のアリコートおよび第2のアリコート中の該検出可能なレポーター分子を定量する工程；ならびに、

該第1のアリコートおよび第2のアリコート中の該検出可能なレポーター分子の量を比較する工程

【請求項47】

エキソピボで、ホールセル中の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーター候補の活性を評価するための以下を含む方法；

哺乳動物由来のホールセルを提供する工程；

該ホールセルと、細胞透過性の、該タンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質またはアイソタイプ特異的基質とを接触させる工程であって、ここで、該タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる該基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する、工程；

該細胞の第1のアリコートと、該タンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的アクチベーター候補とを接触させる工程；

該タンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、該アイソタイプ特異的アクチベーター候補と接触させられない、該細胞の第2のアリコートを、提供する工程；

該第1のアリコートおよび第2のアリコート中の、該検出可能なレポーター分子を定量す

10

20

30

40

50

る工程；ならびに、

該第1のアリコートおよび第2のアリコート中の、該検出可能なレポーター分子の量を比較する工程

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の背景

関連出願

本願は、2004年9月22日に出願された、米国仮出願第60/611,964号の利益を主張し、この米国仮出願第60/611,964号は、本明細書において、その全体が参考として援用される。

10

【0002】

本発明の分野

本発明は、タンパク質デアセチラーゼについての酵素アッセイに関する。より具体的には、本発明は、初代(primary)の、無処置の、ホールセル(whole cell)を利用するようなアッセイに関する。

【背景技術】

【0003】

関連技術の要約

ヒストンデアセチラーゼは、哺乳動物細胞の遺伝子調節において、重要な役割を果たす。以下の文献：GrayおよびEkstrom、*Expr. Cell. Res.* 262: 75-83 (2001); Zhouら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10572-10577 (2001); Kaoら、*J. Biol. Chem.* 277: 187-193 (2002)、ならびに、Gaoら、*J. Biol. Chem.* 277: 25748-25755 (2002)は、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーに、11のメンバーが存在することを教示する。遺伝子発現に關与するデアセチラーゼの別のファミリーは、Sir-2ファミリーである。上記のGrayおよびEkstromは、ヒトのSir-2ファミリーに、7個のメンバーが存在することを教示する。

20

【0004】

転写におけるHDACの役割、およびその疾患(癌など)への関連は、最近になって探求されてきている。以下の文献：Minnucciら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11295-11300 (1997); Hassigら、*Chem. Biol.* 4: 783-789 (1998); Grignaniら、*Nature* 391: 815-818 (1998)およびSiddiqueら、*Oncogene* 16: 2283-2285 (1998)は、HDACの阻害剤が、種々のヒトの疾患における転写治療のために、有用であり得ることを示唆する。

30

【0005】

治療的処置のための、HDAC阻害剤の開発の試みが進むにつれて、かかる阻害剤の活性を決定するためのアッセイが必要となる。Lechnerら(*Biochim. Biophys. Acta* 1296: 181-188 (1996))は、トリチル化され、アセチル化された、ヒストンの、基質としての使用を教示する。Tauntonら(*Science* 272: 408-411 (1996))は、トリチル化され、アセチル化された、ヒストンに由来する合成ペプチドの、基質としての使用を教示する。これらのアッセイは、標準化することが困難であることが判明した。

40

【0006】

より最近になって、非アイソトープのアッセイが、開発されてきた。HeltwegおよびJung(*Journal of Biomolecular Screening* 8: 89-95 (2003))は、HDAC阻害剤であるトリコスタチンAの存在下または非存在下において、蛍光化合物MAL(Boc-LysAc-AMC)、および部分的に精製されたラット肝臓HDACを使用する、アッセイを記載する。また、Heltweg Bら(*Analytical Biochemistry* (2003))は、いくつかの組み替えHDACアイソタイプのための同じ低分子基質およびその誘導体の、インビトロでの使用を開示する。Wegenerら(*Chemistry & Biology* 10: 61-68 (2003))は、脱アセチル化された場合、トリプシンのための基質となり、次いで、発色団を放出する、アセチル化されたリシンを有する蛍光発生HDAC基質の使用を開示する。同様に、Biomol(Plymouth Meeting, Ph

50

iladelphia) は、インビトロでの HDAC 活性をモニタリングできる、いくつかの蛍光活性キット (「HDAC Fluorescent Activity/Drug Discovery Kit」)、または、インビトロでの Sirt1、Sirt2、もしくは Sirt3 の活性を、特にモニタリング出来るキットを開示する。インビトロで、組み替え酵素を使用することによって、スラミンの阻害活性、ならびにリスベラトロール (resverstrol) のアクチベーター活性を、サーチュイン類に対してモニタリングすることが出来、TSA の阻害活性を、抽出物中の HDAC 類または組み替え HDAC アイソタイプに対して、モニタリングすることが出来る。不都合なことに、これらのアッセイ、および同様のアッセイは全て、細胞抽出物の形成を必要とし、細胞抽出物の形成は、時間を要し、抽出手順からアーチファクトを生じ得る。

【0007】

「HDAC Fluorescent Activity/Drug Discovery Kit」(Biomol) は、培養 HeLa 完全細胞または培養ジャーカット完全細胞を使用するアッセイを開示し、このアッセイは、蛍光レポーター分子を生成する未開示のアセチル化 HDAC (クラス I / II) pan-基質を使用し、細胞が培養されるウェル中で、蛍光 HDAC 切断生成物を測定する。しかし、方法は、以下を測定できない：1) ホールセルの成分における、所与のクラス I / II HDAC 阻害剤の効力およびアイソタイプ特異性；2) ホールセルの成分におけるサーチュイン阻害剤の効力およびアイソタイプ特異性；ならびに、3) 哺乳動物、または HDAC クラス I / II 阻害剤もしくはサーチュイン阻害剤で処置される哺乳動物から採取される初代細胞由来の HDAC 活性。特に、後者のシナリオの場合、哺乳動物から採取される初代のホールセルは、培養に感受性でないかもしれず、かかる培養細胞は、その哺乳動物の体内における細胞中の HDAC の実際の活性を、反映していないかもしれない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、以下：1) ホールセルの成分における HDAC 阻害剤またはサーチュイン阻害剤のアイソタイプ選択性、および 2) 哺乳動物の体から直接的に採取されたホールセルにおけるタンパク質デアセチラーゼ活性のレベルの評価を可能にする、アッセイの必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の簡単な要約

本発明は、哺乳動物の体から直接的に採取されたか、または体液から採取された、初代の未処置のホールセルにおける、タンパク質デアセチラーゼ活性のレベルの評価を可能とする、アッセイを提供する。

【0010】

第一の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーの、全タンパク質デアセチラーゼ活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、この細胞を、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーに対する pan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と、接触させる。ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、この検出可能なレポーター分子の量を測定する。好ましい態様において、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその 1 種類もしくは 2 種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して、この検出可能なレポーター分子の量を測定する。

【0011】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) ファミリーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sirt2 ファミリーである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

第二の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセル由来の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的活性を評価するための方法を提供し、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のアイソタイプは、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する。本発明のこの局面による方法において、哺乳動物由来のホールセルを提供し、この細胞を、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するpan-基質、または、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、この1種類もしくは2種類以上のタンパク質デアセチラーゼによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この細胞の第1のアリコートは、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する1種類もしくは2種類以上のタンパク質デアセチラーゼの、アイソタイプ特異的阻害剤と、さらに接触させ、その細胞の第2のアリコートは、接触させない。次いで、上記の検出可能なレポーター分子の量を、第1および第2のアリコートについて測定し、各々のアリコートについてのタンパク質デアセチラーゼ活性の量を測定する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量は、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定する。

10

## 【 0 0 1 3 】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

20

## 【 0 0 1 4 】

第3の局面において、本発明は、エキソピボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、特定のアイソタイプの活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上の特定のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによるこの基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成し、この検出可能なレポーター分子の量の測定をもたらす。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量は、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定する。

30

## 【 0 0 1 5 】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

## 【 0 0 1 6 】

第4の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-阻害剤候補の活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この細胞の第1のアリコートは、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-阻害剤候補と、さらに接触させ、この細胞の第2のアリコートは、接触させない。次いで、この検出可能なレポーター分子の量を、この第1および第2のアリコートについて測定し、各々のアリコートについてのタンパク質デアセチラーゼ活性の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量は、このタンパク質デアセチラーゼファ

40

50

ミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定する。

【0017】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

【0018】

第5の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセル由来の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの阻害剤候補のアイソタイプ特異的活性を評価するための方法を提供し、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のアイソタイプは、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、または、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによるこの基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートは、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供するこのタンパク質デアセチラーゼのアイソタイプ特異的阻害剤候補と、さらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、接触させない。次いで、この検出可能なレポーター分子の量を、この第1および第1のアリコートについて測定し、各々のアリコートについてのこの検出可能なレポーター分子の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量は、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定する。

10

20

【0019】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

【0020】

第6の局面において、本発明は、インピボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーのpan-阻害剤の効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、このレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、既知の活性に対して標準化する。次に、この哺乳動物に、このpan-阻害剤を投与する。好適な期間の後で、再び、この哺乳動物からホールセルを採取し、これらの細胞を、上記のpan-基質と接触させる。次に、上記のレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、既知の活性に対して標準化する。次いで、このpan-阻害剤投与後のレポーター分子の量と、このpan-阻害剤投与前のレポーター分子の量とを、比較する。このpan-阻害剤の投与後の、このレポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。

30

40

【0021】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

【0022】

第7の局面において、本発明は、インピボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーの、アイソタイプ特異的阻害剤の効力および特異性を評価するための方法を

50

提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによるこの基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、この検出可能なレポーター分子の量を、決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーの既知の活性に対して、標準化する。次に、この哺乳動物に、このアイソタイプ特異的阻害剤を投与する。好適な期間の後で、再び、この哺乳動物からホールセルを採取し、これらの細胞を、上記のアイソタイプ特異的基質と接触させる。次に、上記のレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの既知の活性に対して、標準化する。次いで、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後のレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与前のレポーター分子の量とを比較する。このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後の、レポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。

10

**【0023】**

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

**【0024】**

第8の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定することによって、インビボで、哺乳動物の全タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-阻害剤の効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、この哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このpan-基質またはアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物由来の体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-阻害剤を投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のpan-基質を投与する。この哺乳動物由来の体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、このpan-阻害剤の投与の前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、このpan-阻害剤投与後の体液中のこの検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このpan-阻害剤の投与後の、このレポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。

20

30

**【0025】**

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

**【0026】**

第9の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定することによる、インビボでの、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的阻害剤の効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、この哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物由来の体液を得、この体液中の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的阻害剤を投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のアイソタイプ特異的基質を投与する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与の前に得られた体液中の

40

50

検出可能なレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後の体液中のこの検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後の、このレポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

【0027】

第10の局面において、本発明は、インビボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-アクチベーターの効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、このレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、既知の活性に対して標準化する。次に、この哺乳動物に、このpan-アクチベーターを投与する。好適な期間の後で、再び、この哺乳動物からホールセルを採取し、上記のpan-基質と接触させる。次に、上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、既知の活性に対して標準化する。次いで、このpan-アクチベーターの投与後の上記のレポーター分子の量と、このpan-アクチベーターの投与前のこのレポーター分子の量とを比較する。このpan-アクチベーターの投与後の、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

【0028】

第11の局面において、本発明は、インビボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーターの、効力および特異性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによるこの基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、このレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーの既知の活性に対して、標準化する。次に、この哺乳動物に、このアイソタイプ特異的アクチベーターを投与する。好適な期間の後に、再び、この哺乳動物から、ホールセルを採取し、これらの細胞を、上記のアイソタイプ特異的基質と接触させる。次に、検出可能なレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーの既知の活性に対して、標準化する。次いで、このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与後のこのレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与前のこのレポーター分子の量とを、比較する。このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与後の、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

【0029】

第12の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定する

ことによって、インビボで、哺乳動物の全タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-アクチベーターの、効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法において、この哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するpan-基質、あるいはアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このpan-基質あるいはアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーターを投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のpan-基質またはアイソタイプ特異的基質を投与する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、このpan-アクチベーターの投与前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、このpan-アクチベーターの投与後の体液中の検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このpan-アクチベーターの投与後の、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

10

**【0030】**

第13の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定することによって、インビボで、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーターの、効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、この哺乳動物に、細胞透過性の、タンパク質デアセチラーゼに対するアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的アクチベーターを投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のアイソタイプ特異的基質を投与する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与の前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与後の体液中の検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与後の、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

20

30

**【0031】**

第14の局面において、本発明は、エキソビボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-アクチベーター候補の活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートは、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーター候補とさらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、接触させない。次いで、これら第1および第2のアリコートについて、検出可能なレポーター分子の量を測定し、各々のアリコートについてのタンパク質デアセチラーゼ活性の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについて

40

50

の、コントロール標準物質に対して測定する。

【0032】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

【0033】

第15の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセルにおいて、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーター候補の活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートは、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的アクチベーター候補と、さらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、接触させない。次いで、これら第1および第2のアリコートについて、上記の検出可能なレポーター分子の量を測定し、各々のアリコートについてのタンパク質デアセチラーゼ活性の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定する。

10

20

【0034】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、タンパク質デアセチラーゼについての酵素アッセイに関する。より具体的には、本発明は、ホールセル(whole cell)を利用する、かかるアッセイに関する。本発明は、哺乳動物の体内から直接的に採取されたホールセル、または体液中のホールセルにおける、タンパク質デアセチラーゼ活性のレベルの評価を可能とするアッセイを提供する。

30

【0036】

第1の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、全タンパク質デアセチラーゼ活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と、接触させる。ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、この検出可能なレポーター分子の量を、測定する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して、測定する。

40

【0037】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

【0038】

「タンパク質デアセチラーゼファミリー」とは、タンパク質のアミノ酸残基の塩基性側

50

鎖から、アセチル基を取り除く能力を有する、関連するタンパク質の群である。用語「哺乳動物」とは、特に、ヒトを含む。「ホールセル (whole cell)」とは、独立して存在するか、または組織もしくは腫瘍の一部として存在する、未処置の細胞である。「細胞透過性のpan-基質」とは、細胞に浸透する分子であり、それらのネイティブな形態においては、検出可能なレポーター分子を生成しないが、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーによる切断後に、検出可能なレポーター分子を生成する分子である。「細胞透過性のアイソタイプ特異的阻害剤」とは、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーであるが、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの全てのメンバーよりは少ないメンバーを阻害する、タンパク質デアセチラーゼ阻害剤、またはその塩である。例えば、例において記載される、化合物2、およびその塩（本明細書において化合物6として言及される）は、HDAC-1、HDAC-2、およびHDAC-3に特異的である。「検出可能なレポーター分子」とは、アッセイにおいて測定可能なシグナルを生じる分子である。この分子の性質は、この分子が測定可能である限りは、重要でない。好ましい検出可能なレポーター分子として、比色分子 (colorimetric molecule)、蛍光分子、FRET検出可能分子、酵素、放射性標識、および化学発光分子が挙げられるが、これらに限定されない。「タンパク質デアセチラーゼコントロール標準物質」とは、既知レベルのタンパク質デアセチラーゼ活性を有するサンプルである。HDACファミリーおよびSir2ファミリーは、このようなことが文献において公知であるファミリーである。

10

#### 【0039】

20

上記のホールセルを、細胞透過性の、pan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と、単独で接触させても、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて接触させてもよい。本明細書において使用される場合、用語「薬学的に受容可能」とは、そのアッセイの有効性を妨げず、生物学的な系（細胞、組織、または生物など）と適合性である物質を指す。本明細書において使用される場合、用語「キャリア」とは、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤、脂質、または薬学的処方物における用途について当該分野において周知の他の物質を包含する。これらのキャリア、賦形剤、希釈剤などの特徴は、特定の適用のための投与の経路に依存することが、理解される。これらの物質を含有する、薬学的に受容可能な処方物の調製は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、A. Gennaro編、Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990において記載される。

30

#### 【0040】

第2の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセル由来の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的活性を評価するための方法を提供し、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のアイソタイプは、全タンパク質デアセチラーゼ活性の大部分を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーについてのpan-基質、または細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と、接触させ、ここで、これら1種類もしくは2種類以上のタンパク質デアセチラーゼによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートは、全デアセチラーゼ活性の大部分を提供する1種類もしくは2種類以上のタンパク質デアセチラーゼの、アイソタイプ特異的阻害剤と、さらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、この阻害剤と接触させない。次いで、これら第1および第2のアリコートについて、上記の検出可能なレポーター分子の量を測定し、各々のアリコートについてのタンパク質デアセチラーゼ活性の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を、タンパク質デアセチラーゼのコントロール標準物質に対して測定する。

40

#### 【0041】

50

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

【0042】

「アイソタイプ特異的活性」とは、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーであるが、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの全てのメンバーよりは少ないメンバーを阻害する、タンパク質デアセチラーゼ活性である。例えば、例において記載される化合物2または化合物6は、HDAC-1、HDAC-2、およびHDAC-3に特異的である。特定の他のアイソタイプ特異的活性として、あるタンパク質デアセチラーゼ活性の単一のメンバー（例えば、HDAC-1）に特異的な阻害剤が挙げられる。天然に、または、これらの細胞が1種類もしくは2種類以上のアイソタイプによって形質移入されており、そのアイソタイプを過剰発現するために、その1種類もしくは2種類以上のアイソタイプが、全タンパク質デアセチラーゼの大部分を提供する。用語「第1のアリコート」および「第2のアリコート」は、便宜上使用され、どのアリコートが、時間的に最初に調製されるかは、意味しない。全ての他の定義は、上記の通りである。

10

【0043】

第3の局面において、本発明は、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーの、1種類もしくは2種類以上の特定のアイソタイプの活性を、評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と、接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成し、この検出可能なレポーター分子の量の測定をもたらす。

20

【0044】

好ましい態様において、上記の検出可能なレポーター分子の量を、タンパク質デアセチラーゼのコントロール標準物質に対して測定する。

【0045】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

30

【0046】

「アイソタイプ特異的基質」とは、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーであるが、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの全てのメンバーよりは少ないメンバーに対する、基質である。特定の他のアイソタイプ特異的基質として、あるタンパク質デアセチラーゼ活性の単一のメンバー（例えば、HDAC-1）に特異的な基質が挙げられる。全ての他の定義は、上記の通りである。

【0047】

第4の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセルにおいて、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-阻害剤候補の活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートを、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-阻害剤候補と、さらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、このpan-阻害剤候補とは接触させない。次いで、これら第1および第2のアリコートについて、上記の検出可能なレポーター分子の量を測定し、各々のアリコートについてのこの検出可能なレポーター分子の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を

40

50

、このタンパク質デアセチラーゼまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについてのコントロール標準物質に対して測定する。

【0048】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

【0049】

「pan-阻害剤候補」とは、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの全てのメンバーを阻害する能力について試験されるべき、タンパク質デアセチラーゼの阻害剤である。「pan-基質」とは、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの全てのメンバーについての基質である。全ての他の定義は、上記の通りである。

10

【0050】

第5の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセル由来の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの阻害剤候補の、アイソタイプ特異的活性を評価するための方法を提供し、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のアイソタイプは、全タンパク質デアセチラーゼ活性の大部分を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-阻害剤、または細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するアイソタイプ特異的基質と、接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによるこの基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートは、全タンパク質デアセチラーゼ活性の大部分を提供するこのタンパク質デアセチラーゼのアイソタイプ特異的阻害剤候補と、さらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、この阻害剤候補と接触させない。次いで、これら第1および第2のアリコートについて、上記の検出可能なレポーター分子の量を測定し、各々のアリコートについてのこの検出可能なレポーター分子の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を、タンパク質デアセチラーゼコントロール標準物質に対して測定する。

20

【0051】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

30

【0052】

「阻害剤候補のアイソタイプ特異的活性」とは、あるタンパク質脱アセチル化の阻害剤が、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーであるが、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの全てのメンバーより少ないメンバーについて、特異的であるか否かの決定である。全ての他の定義は、上記の通りである。

【0053】

第6の局面において、本発明は、インピボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-阻害剤の効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、このレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、既知の活性に対して、標準化する。次に、この哺乳動物に、上記のpan-阻害剤を投与する。好適な期間の後で、再び、ホールセルをこの哺乳動物から採取し、これらの細胞を、上記のpan-基質またはアイソタイプ特異的

40

50

基質と接触させる。次に、上記のレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、既知の活性に対して、標準化する。次いで、このpan-阻害剤の投与後のこのレポーター分子の量と、このpan-阻害剤の投与前のこのレポーター分子の量とを、比較する。このpan-阻害剤の投与後での、このレポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、この阻害剤の投与の前にこの哺乳動物から採取されたホールセルを、貯蔵し、この検出可能なレポーター分子の処理前および処理後のレベルについてのアッセイを、同時に、またはほぼ同時に行う。

【0054】

特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

10

【0055】

pan-阻害剤の投与は、任意の受容可能な経路によるものであってよく、そのような経路として、経口経路、非経口経路、舌下経路、静脈内経路、眼内経路、局所経路、鼻内経路、脳室内経路、小胞内経路、および直腸内経路が挙げられるが、これらに限定されない。体液として、血液、血漿、痰、尿、および脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい態様において、上記の検出可能なレポーター分子の各々の定量化を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの既知の活性に対して、標準化する。特定の好ましい態様において、上記のpan-阻害剤の投与の前に得られた体液を、保存し、投与の前

20

【0056】

第7の局面において、本発明は、インビボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的阻害剤の効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、上記のタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、このレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのこのメンバーの既知の活性に対して、標準化する。次に、この哺乳動物に、上記のアイソタイプ特異的阻害剤を投与する。好適な期間の後で、再び、この哺乳動物からホールセルを取得し、上記のアイソタイプ特異的基質と接触させる。次に、上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのこのメンバーの既知の活性に対して、標準化する。次いで、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後のこのレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与前のこのレポーター分子の量とを、比較する。このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後での、このレポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。

30

【0057】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーである。特定の好ましい態様において、上記のタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーである。

40

【0058】

アイソタイプ特異的阻害剤の投与は、任意の受容可能な経路によるものであってよく、そのような経路として、経口経路、非経口経路、舌下経路、静脈内経路、眼内経路、局所経路、鼻内経路、脳室内経路、小胞内経路、および直腸内経路が挙げられるが、これらに限定されない。体液として、血液、血漿、痰、尿、および脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい態様において、上記の検出可能なレポーター分子の各

50

々の定量化を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの既知の活性に対して、標準化する。特定の好ましい態様において、上記のアイソタイプ特異的阻害剤の投与の前に得られた体液を、保存し、投与の前後に得られた体液中の上記の検出可能なレポーター分子の定量化を、同時に行っても、またはほぼ同時に行ってもよい。

【0059】

全ての他の定義は、上記の通りである。

【0060】

第8の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定することによって、インビボで、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの全活性の、pan-阻害剤の効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法において、上記の哺乳動物に、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このpan-基質またはアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物から体液を得、この体液中のこの検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-阻害剤を投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のpan-基質またはアイソタイプ特異的基質を投与する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、このpan-阻害剤の投与の前に得られた体液中の、この検出可能なレポーター分子の量と、このpan-阻害剤の投与後の体液中の、この検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このpan-阻害剤の投与後での、この検出可能なレポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。

【0061】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

【0062】

pan-基質またはアイソタイプ特異的基質およびpan-阻害剤の投与は、任意の受容可能な経路によるものであってよく、そのような経路として、経口経路、非経口経路、舌下経路、静脈内経路、眼内経路、局所経路、鼻内経路、脳室内経路、小胞内経路、および直腸内経路が挙げられるが、これらに限定されない。体液として、血液、血漿、痰、尿、および脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい態様において、上記の検出可能なレポーター分子の各々の定量化を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの既知の活性に対して、標準化する。特定の好ましい態様において、上記のpan-阻害剤の投与の前に得られた体液を、保存し、投与の前後に得られた体液中の上記の検出可能なレポーター分子の定量化を、同時に行っても、またはほぼ同時に行ってもよい。

【0063】

全ての他の定義は、上記の通りである。

【0064】

第9の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定することによって、インビボで、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的阻害剤の効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法において、哺乳動物に、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的阻害剤を投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のアイソタイプ特異的基質を投与する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター

一分子の量を決定する。次いで、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与の前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後の体液中の検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このアイソタイプ特異的阻害剤の投与後での、このレポーター分子の量の有意な減少を、効力の尺度として取り入れる。

【0065】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

【0066】

上記のアイソタイプ特異的基質およびアイソタイプ特異的阻害剤の投与は、任意の受容可能な経路によるものであってよく、そのような経路として、経口経路、非経口経路、舌下経路、静脈内経路、眼内経路、局所経路、鼻内経路、脳室内経路、小胞内経路、および直腸内経路が挙げられるが、これらに限定されない。体液として、血液、血漿、痰、尿、および脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい態様において、上記の検出可能なレポーター分子の各々の定量化を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの既知の活性に対して、標準化する。特定の好ましい態様において、アイソタイプ特異的阻害剤の投与の前に得られた体液を保存し、投与の前後に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の定量化を、同時に行っても、またはほぼ同時に行ってもよい。この検出可能なレポーター分子は、細胞から体液中へと拡散することが出来る。

10

【0067】

全ての他の定義は、上記の通りである。

20

【0068】

第10の局面において、本発明は、インビボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-アクチベーターの効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法において、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質に接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、このレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、既知の活性に対して、標準化する。次に、この哺乳動物に、上記のpan-アクチベーターを投与する。好適な期間の後で、再び、この哺乳動物からホールセルを採取し、これらの細胞を、上記のpan-基質またはアイソタイプ特異的基質と接触させる。次に、上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、既知の活性に対して、標準化する。次いで、このpan-アクチベーターの投与後のこのレポーター分子の量と、このpan-阻害剤の投与前のこのレポーター分子の量とを、比較する。このpan-アクチベーターの投与後での、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。あるタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーターとは、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの全てのメンバーを活性化する分子である。

30

40

【0069】

上記のpan-アクチベーターの投与は、任意の受容可能な経路によるものであってよく、そのような経路として、経口経路、非経口経路、舌下経路、静脈内経路、眼内経路、局所経路、鼻内経路、脳室内経路、小胞内経路、および直腸内経路が挙げられるが、これらに限定されない。体液として、血液、血漿、痰、尿、および脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい態様において、上記の検出可能なレポーター分子の各

50

々の定量化を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの既知の活性に対して、標準化する。特定の好ましい態様において、上記のpan-アクチベーターの投与の前に得られた体液を保存し、投与の前後に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の定量化を、同時に行っても、またはほぼ同時に行ってもよい。この検出可能なレポーター分子は、細胞から体液中へと拡散することが出来る。

【0070】

全ての他の定義は、上記の通りである。

【0071】

第11の局面において、本発明は、インピボで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーについてのアイソタイプ特異的アクチベーターの効力および特異性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供する。これらの細胞を、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーに対するアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼによるこの基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。次いで、このレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーのメンバーの、既知の活性に対して標準化する。次に、この哺乳動物に、上記のアイソタイプ特異的アクチベーターを投与する。好適な期間の後で、再び、この哺乳動物からホールセルを採取し、上記のアイソタイプ特異的基質と接触させる。次に、上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。好ましい態様において、この量を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、既知の活性に対して標準化する。次いで、このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与後のこのレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与前のこのレポーター分子の量とを、比較する。このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与後での、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

【0072】

あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーターとは、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの、1種類もしくは2種類以上のメンバーであるが、全てのメンバーではないメンバーの、活性および/または量を増大させる分子である。全ての他の定義は、上記の通りである。

【0073】

上記のアイソタイプ特異的アクチベーターの投与は、任意の受容可能な経路によるものであってよく、そのような経路として、経口経路、非経口経路、舌下経路、静脈内経路、眼内経路、局所経路、鼻内経路、脳室内経路、小胞内経路、および直腸内経路が挙げられるが、これらに限定されない。体液として、血液、血漿、痰、尿、および脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい態様において、上記の検出可能なレポーター分子の各々の定量化を、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーの既知の活性に対して、標準化する。特定の好ましい態様において、アイソタイプ特異的アクチベーターの投与の前に得られた体液を保存し、投与の前後に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の定量化を、同時に行っても、またはほぼ同時に行ってもよい。この検出可能なレポーター分子は、細胞から体液中へと拡散することが出来る。

【0074】

すべての他の定義は、上記のとおりである。

【0075】

第12の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定することによって、インピボで、哺乳動物の、全タンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、pan-アクチベーターの効力を評価するため

10

20

30

40

50

の方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物に、細胞透過性の、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このpan-基質またはアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーターを投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のpan-基質またはアイソタイプ特異的基質を投与する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、このpan-アクチベーターの投与の前に得られた体液中の検出可能なレポーター分子の量と、このpan-アクチベーター投与後の体液中のこの検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このpan-アクチベーターの投与後での、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、Sir2ファミリーのメンバーである。

10

【0076】

全ての定義は、上記の通りである。

【0077】

第13の局面において、本発明は、体液中の検出可能なレポーター分子の量を測定することによって、インビボで、哺乳動物における、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーターの効力を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物に、細胞透過性の、タンパク質デアセチラーゼに対するアイソタイプ特異的基質を投与し、ここで、このアイソタイプ特異的基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、この哺乳動物に、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的アクチベーターを投与し、好適な期間の後で、この哺乳動物に、上記のアイソタイプ特異的基質を投与する。この哺乳動物から体液を得、この体液中の上記の検出可能なレポーター分子の量を決定する。次いで、このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与の前に得られた体液中の、検出可能なレポーター分子の量と、このアイソタイプ特異的アクチベーター投与後の体液中の、この検出可能なレポーター分子の量とを、比較する。このアイソタイプ特異的アクチベーターの投与後での、このレポーター分子の量の有意な増加を、効力の尺度として取り入れる。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)ファミリーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼファミリーは、Sir2ファミリーである。

20

30

【0078】

全ての定義は、上記の通りである。

【0079】

第14の局面において、本発明は、エキソビボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーター候補の活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、そのタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートは、このタンパク質デアセチラーゼファミリーのpan-アクチベーター候補と、さらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、このpan-アクチベーター候補と接触させない。次いで、これら第1および第2のアリコートについて、上記の検出可能なレポーター分子の量を測定し、各々のアリコートについてのタンパク質デアセチラーゼ活性の量を比較する。

40

50

## 【 0 0 8 0 】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、S i r 2 ファミリーのメンバーである。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定する。

## 【 0 0 8 1 】

全ての定義は、上記の通りである。

## 【 0 0 8 2 】

第15の局面において、本発明は、エキソピボで、ホールセルにおける、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーの、アイソタイプ特異的アクチベーター候補の活性を評価するための方法を提供する。本発明のこの局面による方法においては、哺乳動物由来のホールセルを提供し、これらの細胞を、細胞透過性の、このタンパク質デアセチラーゼファミリーに対するpan-基質、またはアイソタイプ特異的基質と接触させ、ここで、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーによる、この基質の脱アセチル化は、検出可能なレポーター分子を生成する。これらの細胞の第1のアリコートは、このタンパク質デアセチラーゼファミリーの1種類もしくは2種類以上のメンバーのアイソタイプ特異的アクチベーター候補と、さらに接触させ、これらの細胞の第2のアリコートは、このアクチベーター候補と接触させない。次いで、これら第1および第2のアリコートについて、上記の検出可能なレポーター分子の量を測定し、各々のアリコートについての、タンパク質デアセチラーゼ活性の量を比較する。好ましい態様において、この検出可能なレポーター分子の量を、このタンパク質デアセチラーゼファミリーまたはその1種類もしくは2種類以上のメンバーについての、コントロール標準物質に対して測定する。

## 【 0 0 8 3 】

特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) ファミリーのメンバーである。特定の好ましい態様において、このタンパク質デアセチラーゼは、S i r 2 ファミリーのメンバーである。

## 【 0 0 8 4 】

全ての定義は、上記の通りである。

## 【 0 0 8 5 】

以下の例は、本発明の特定の特に好ましい態様を、さらに説明することを意図され、本発明の範囲を限定することは、決して意図されない。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 8 6 】

例1 : Boc-Lys(Ac)-AMCを基質として使用する、ヒト293T細胞の細胞内および細胞外のデアセチラーゼ活性

新たにトリプシン処理された細胞 (293T) を、96ウェルの黒色のCoster E1A/RIAプレート (Corning Inc., Corning, New York) 中へ分注した。低分子基質であるBoc-Lys(Ac)-AMC (Bachem Biosciences Inc., King of Prussia, Philadelphia) を、300  $\mu$ Mの最終濃度で、細胞懸濁液に加えた。細胞を、37のインキュベーター内に、5% CO<sub>2</sub> 下で、示された時間にわたって静置した。必要であれば、上清を回収し、スピニング (spinning) に供した。新たに調製したFluor-de-Lys (登録商標) 発色液 (developer) (Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia)、ならびに、アッセイ緩衝液 (25 mM Tris, HCl pH 8.0、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>) 中1  $\mu$ MのTSA (Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia) および1%のNP-40を、上清または細胞ペレットに添加することによって、反応を停止した。蛍光を、15分間37で発色させ、蛍光光度計 (SPECTRAMAX GeminiXS, Molecular Devices, Sunnyvale, California) において、360 nmの励起波長、470 nmの発光、およ

10

20

30

40

50

び435nmのカットオフで、読み取った。図1に示すように、有意な細胞内および細胞外のデアセチラーゼ活性が検出され得た。このことは、Boc-Lys(Ac)-AMCが、細胞を透過し得、生成された生成物(Boc-Lys-AMC)は、培養培地中へと拡散し得、その後に蛍光を発色することによって検出され得たことを示す。対照的に、添加される基質が存在しない場合、培養細胞からの上清または細胞ペレットのいずれも、HDA C活性を有さない。このアッセイのフローチャートを、図2に示す。

【0087】

例2：基質Boc-LysAc-AMCは、インビトロでのサーチュイン類に対する好ましい基質ではない

ヒトSirT1、2、3の組み替え酵素を、Biomol (Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia) から購入した。Biomolの使用者の手引きにおいて示されるように、または例1において記載するように、各々のサーチュイン類の5単位を、アッセイ緩衝液(50mM Tris-Cl, pH8.0、137mM NaCl、2.7mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mg/ml BSA、500μM NAD<sup>+</sup>)中で、Fluor-de-Lys-SirT1基質(60μM)、Fluor-de-Lys-SirT2基質(SirT2については200μM、SirT3については30μM)、またはBoc-Lys(Ac)-AMC基質(200μM)とともに、45分間インキュベートし、その後、反応を停止させて読み取った。図3に示すように、組み替えSirT1酵素に対しては、Fluor-de-Lys-SirT1基質が、Boc-Lys(Ac)-AMCより好ましい基質であるが、一方、SirT2酵素およびSirT3酵素の両方に対しては、Fluor-de-Lys-SirT2基質がより好ましい基質である。

【0088】

例3：Boc-Lys(Ac)-AMCを使用しての、ヒトの癌細胞および正常細胞における、ホールセル活性

新たにトリプシン処理された細胞を、96ウェルの黒色のCoster E1A/RIAプレート(Corning Inc., Corning, New York)中へ分配した。低分子基質であるBoc-Lys(Ac)-AMC(Bachem Biosciences Inc., King of Prussia, Philadelphia)を、300μMの最終濃度で、細胞懸濁液に加えた。細胞を、37°Cのインキュベーター内に、5%CO<sub>2</sub>下で、90分間静置した。新たに調製したFluor-de-Lys(登録商標)発色液(Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia)、ならびにアッセイ緩衝液(25mM Tris, HCl pH8.0、137mM NaCl、2.7mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>)中1μMのTSA(Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia)および1%のNP-40を添加することによって、反応を停止させた。1%のNP-40の存在下において、細胞外HDA C活性および細胞内HDA C活性の両方を、培養細胞中で一緒に測定した。蛍光を、37°Cで15分間発色させ、蛍光光度計(SPECTRAMAX GeminiXS, Molecular Devices, Sunnyvale, California)において、360nmの励起波長、470nmの発光、および435nmのカットオフで、読み取った。本発明者らが試験した細胞株(HCT116、A549、Du145、HMEC、293Tなど)において、全HDA C活性は、細胞数の関数であった(図4を参照のこと)。

【0089】

例4：ヒト癌細胞株におけるデアセチラーゼ活性に対する、Boc-LysAc-AMC基質濃度の効果

細胞を、トリプシン処理し、トリパンブルー除去によって計数した。生きている細胞(4×10<sup>4</sup>個のA549細胞、または1×10<sup>5</sup>個のHCT116細胞、または5×10<sup>4</sup>個のDu145細胞)を、96ウェルプレートの各々のウェルに分注した。HDA Cの低分子基質であるBoc-Lys(Ac)-AMCを、広範囲の最終濃度で、細胞懸濁液中へ添加し、細胞とともに、90分間37°Cでインキュベートし、その後反応を停止させ、蛍光を発色させて読み取った。図5に示すように、ホールセルデアセチラーゼ活性に対する基質濃度の効果を測定した。Boc-Lys(Ac)-AMCのK<sub>m</sub>は、150μM~220μMの範囲にわたった。

【0090】

10

20

30

40

50

例 5 : Boc-Lys(Ac)-AMCを基質として使用しての、未処置の癌細胞における、HDAC のpan-阻害剤またはアイソタイプ特異的阻害剤の活性

ヒト癌細胞株 (A549、Du145およびHCT116、293T、Jurkat-T、Panc1) を、種々の濃度のHDAC阻害剤を用いて、示された期間にわたって処置し、その後、酵素の基質であるBoc-Lys(Ac)-AMCを、培養細胞中へ添加した。阻害剤は、pan-クラスI / II阻害剤 (SAHA、LAQ-824)、または、MS-275もしくは化合物2などの、アイソタイプ特異的クラスI阻害剤 (HD1、2、3に対するもの) であり得た。未処置の細胞におけるHDAC酵素アッセイを、例3において記載するように行った。図6および表1に示すように、酵素阻害の用量-応答曲線を分析することによって、ホールセルにおいて全HDAC活性の50%を阻害する濃度 (IC50) を決定した。しかし、以下の表1においてまた示すように、293T細胞において、化合物2は、用量依存的な様式においてHDAC活性を阻害するが、一方で、CDK阻害剤 (Kim K Sら、J Med Chem. 45(18): 3905-3927 (2002)において記載される化合物4) またはタキソールは、このアッセイを使用する場合、ホールセルにおけるHDAC活性に対して効果を有さなかった。

10

【0091】

【表1】

表1 : 種々のヒト癌細胞における、HDAC阻害剤または他の化学治療剤のホールセルデアセチラーゼのIC50

20

	IC50 (uM)					
	A549	Du145	HCT116	293T	Jurkat T	Panc-1
化合物2	0.4	0.6	0.4	0.5	0.2	0.2
SAHA	0.5	0.6	3	2	0.7	1
MS-275	0.4	0.3	3	2	0.3	0.5
LAQ-824	0.02	0.05	0.06	0.04	0.04	nd
タキソール				>50		
化合物4				>50		

30

結果は、少なくとも2回の独立した実験からの平均IC50である

細胞を阻害剤とともに16時間プレインキュベートし、その後、反応を停止し、読み取った

化合物4は、BMSからのCDK2阻害剤である

【0092】

例6 : サーチュイン特異的基質を使用しての、ヒト癌細胞における、基質濃度の関数としての、ホールセルでのサーチュインデアセチラーゼ活性

40

培養細胞 (HCT116) を、トリプシン処理し、トリパンブルー除去法によって計数した。生きている細胞 ( $2 \times 10^5$  個) を、96ウェルプレートの各々のウェルへ分注する。サーチュインの低分子基質であるFluor-de-Lys-SirT1基質またはFluor-de-Lys-SirT2基質 (Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia) を、種々の濃度において、培養細胞に添加し、示される期間にわたってインキュベートし、その後、Biomolの使用者の手引きに示されるように、反応を停止させ、読み取った。本発明者らは、Fluor-de-Lys-SirT1基質またはFluor-de-Lys-SirT2基質の両方 (Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia) が、サーチュインに対する細胞透過性の基質として使用され得ることを見出した。HCT116細胞において、Fluor-de-Lys-SirT1基質またはFluor-de-Lys-SirT2のKmが、各々、139.0  $\mu$ Mまたは195.5  $\mu$ Mとなることを決定した (図7a)。別個に、本発明者らは、ホールセル中でのFluor-de-Lys-SirT1基質またはFluor-de-Lys-SirT2のいずれかの

50

濃度を固定し、ホールセルサーチュイン活性に対する、外因性のNAD+濃度の効果を分析した(図7b)。本発明者らは、外因性のNAD+は、ホールセルサーチュイン活性に対して効果を有さないことを見出した。このことは、細胞内のNAD+が、ホールセルのサーチュイン活性がその最大値に到達するために充分であることを示唆する。組み替えサーチュインを使用するインビトロでの反応と異なり、ニコチンアミドは、反応を失活(ench)させるには無効であり、蛍光シグナルは、インキュベーション中に、細胞の要因によって発色する。従って、読み取りは、停止後速やかに行った。

## 【0093】

例7：TSAではなくスラミンによる、インビトロでのサーチュイン酵素活性の用量依存的特異的阻害

スラミンを、種々の濃度において、組み替えサーチュイン1~3(Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia)ならびにサーチュインの基質(Fluor-de-Lys-SirT1またはFluor-de-Lys-SirT2)とともに、例2において記載する設定において、45分間インキュベートした。Biomolの使用者の手引きにおいて示されるように、反応を読み取った。表2に示すように、スラミンは、Sirt1、Sirt2、およびSirt3酵素を、インビトロで、用量依存的な様式において、阻害する。しかし、10μMの用量までのTSAは、インビトロで、10μMまでのSirt1またはSirt2のいずれの活性も阻害しなかった。

## 【0094】

## 【表2】

表2：組み替えサーチュインに対するスラミンおよびTSAのIC50

	IC50 (uM)		
	Sirt1	Sirt2	Sirt3
(基質)	FldSirt1	FldSirt2	FldSirt2
スラミン	3	14	575
TSA	>10	>10	nd

nd: 決定されなかった

## 【0095】

例8：TSAではなくスラミンが、ホールセルでのサーチュイン活性を、用量依存的様式において阻害し得た

培養HCT116細胞を、計数し、96ウェルプレートの各々のウェルへ分注した。スラミンまたはTSAを、種々の濃度で、細胞とともに1.5時間インキュベートし、その後、Biomol(Plymouth Meeting, Philadelphia)製のサーチュインの基質(Fluor-de-Lys-SirT1、500μM)を添加した。サーチュインの基質(Fluor-de-Lys-SirT1、500μM)またはHDACの基質であるBoc-Lys(Ac)-AMC(300μM)の添加後、細胞を追加の2時間さらにインキュベートした。例3および例6において記載するように、反応を停止させ、読み取った。図8に示すように、スラミンはホールセルでのSirt1活性を用量依存的な様式において阻害するが、TSAは阻害しなかった。しかし、ホールセルでBoc-Lys(Ac)-AMCが基質として使用される場合、TSAは、ホールセルでのHDAC活性を阻害することが出来た。この観察は、TSAがインビトロでクラスIII(サーチュイン類)を阻害できないという、例7における本発明者らの知見と一致した。また、本発明者らの例3における知見と一致して、本発明者らは、Boc-Lys(Ac)-AMCが、ホールセルにおけるクラスIおよびクラスIIのHDAC活性をモニターするために使用され得ることを示す。

## 【 0 0 9 6 】

例 9：リスベラトロールによる、インビトロでの、サーチュイン酵素活性の用量依存的な特異的活性化

リスベラトロールを、組み替えサーチュイン 1 ~ 3 (Biomol, Plymouth Meeting, Philadelphia) ならびにサーチュインの基質 (Fluor-de-Lys-SirT1またはFluor-de-Lys-SirT2) とともに、45分間インキュベートした。例 3 において記載するように、反応を読み取る。表 3 に示すように、リスベラトロールは、インビトロで、用量依存的な様式において、Sirt1 酵素を活性化し得る。

## 【 0 0 9 7 】

## 【表 3】

表 3：インビトロでサーチュイン類を活性化するためのリスベラトロールの EC50 ( $\mu$ M)

	EC50 ( $\mu$ M)		
	Sirt1	Sirt2	Sirt3
(基質)	FldSirt1	FldSirt2	FldSirt2
リスベラトロール	45	912	>2000

10

20

## 【 0 0 9 8 】

例 10：リスベラトロールによる、ヒト HCT 116 細胞における、サーチュイン酵素活性の用量依存的な特異的活性化

ヒト HCT 116 細胞を、種々の濃度でのリスベラトロールとともに、1.5時間プレインキュベートし、その後、サーチュイン基質 (Fluor-de-Lys-SirT1) を添加し、次いで追加の2時間さらにインキュベートした。反応を読み取り、結果を図 9 に示す。本発明者らは、リスベラトロールが、ホールセルでのサーチュイン (Sirt1) 活性を、用量依存的な様式において活性化し得ることを示す。

## 【 0 0 9 9 】

例 11：Boc-Lys(Ac)-AMC を基質として使用しての、白血球細胞のホールセル HDAC 活性

全血 (ヒトまたはマウス) を、2500 rpm で、10分間、外界温度で、Sorvall RT-7遠心機 (Mandel Scientific Co., Guelph, Ontario) において遠心した。血漿を除去し、パフィーコート (buffy coat) を回収した。5倍容積の赤血球溶解緩衝液 (EL: Qiagen Canada Inc., Mississauga, Ontario) を、パフィーコートに添加した。パフィーコートを、氷上で20分間インキュベートし、その後、400g で10分間4で遠心した。上清を除去し、パフィーコートを EL 緩衝液で2回洗浄し、再遠心した。パフィーコートを、RPMI 培地中に再懸濁し、細胞 (白血球細胞) をトリパンプルー除去法によって計数した。白血球細胞を、10%ウシ胎児血清添加 RPMI 中で、96ウェルディッシュ中に播種した。HDAC の低分子基質である Boc-Lys(ac)-AMC を、細胞懸濁液に添加し、細胞とともに、90分間37でインキュベートし、その後、反応を停止させ、蛍光を発色させて読み取った。図 10 に示すように、ヒト白血球細胞のホールセルでの HDAC 活性は、細胞数の関数であった。

30

40

## 【 0 1 0 0 】

例 12：Boc-LyAc-AMC を基質として使用する、ヒト白血球細胞における、ホールセルでの HDAC 活性 (クラス I またはクラス II) のエキソピボでの阻害

ヒトのドナーから単離されたヒト白血球細胞 (パフィーコート) を、10%ウシ胎児血清添加 RPMI 中で、96ウェルディッシュ中に播種した。広範囲の希釈率での HDAC 阻害剤を、細胞とともに、16時間、37で、5%CO<sub>2</sub> 下でインキュベートした。HDAC の低分子基質である Boc-Lys(Ac)-AMC を、細胞懸濁液中に添加して、細胞とともに

50

90分間インキュベートし、その後、反応を停止させ、蛍光を発色させて読み取った。pan-阻害剤(図11a; LAQ-824)と、HDAC1~3に対するアイソタイプ特異的阻害剤(図11b; 化合物2)との両方が、用量依存的阻害を示した。図11cは、インビトロで同じ低分子基質Boc-Lys(Ac)-AMCを使用する場合の、組み替えHDAC酵素に対する、これらの阻害剤のIC50(μMにおいて)を示す。全HDAC活性の70%が、このアイソタイプ特異的阻害剤によって阻害され、このことは、HDAC1~3が、ヒト由来の白血球細胞におけるこの活性のほとんどを提供することを示す。

#### 【0101】

例13:白血球細胞を使用しての、ホールセルでのサーチイン活性

db/dbマウス(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)由来の血液を、ヘパリン処置試験管(heparin tube)中に回収した。5倍容積の赤血球溶解緩衝液(EL, Qiagen Canada Inc, Mississauga, Ontario)を用いて、赤血球を溶解した。遠心(400×g、5分間)によって白血球細胞を回収し、洗浄し、RPMI(+10% FBS)中に再懸濁し、次いで計数した。4×10<sup>5</sup>個の細胞を、200μMのFluor-de-Lys Sirt1(BioMol, Plymouth Meeting, Philadelphia)とともに、96ウェルディッシュの各々のウェルに分注し、90分間インキュベートした。1×Developer II(BioMol, Plymouth Meeting, Philadelphia)および1%のNP40を補充した、1倍容積のアッセイ緩衝液(50mM Tris-Cl pH8.0、137mM NaCl、2.7mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>)を用いて、反応を停止させた。先の実験において、本発明者らは、ニコチンアミドがこの反応を失活させるのに無効であること、および、アッセイのインキュベーション中に細胞の要因によって蛍光が発色することを見出しており、従って、読み取りは、停止後速やかに行った。結果を、図12に示す。

#### 【0102】

例14:サーチイン特異的基質を使用しての、白血球細胞におけるホールセルでのサーチイン活性のエキソピボ調節

マウスの血液を、ヘパリン処理試験管中に回収した。5倍容積の赤血球溶解緩衝液(EL, Qiagen Canada Inc, Mississauga, Ontario)を用いて、赤血球を溶解した。遠心(400×g、5分間)によって白血球細胞を回収し、洗浄し、RPMI(+10% FBS)中に再懸濁し、次いで計数した。4×10<sup>5</sup>個の細胞を、96ウェルディッシュの各々のウェルに分注し、種々の用量のスラミン、および200μMのFluor-de-Lys Sirt1(BioMol, Plymouth Meeting, Philadelphia)とともに、インキュベートした。90分間のインキュベーションの後に、1×Developer II(BioMol, Plymouth Meeting, Philadelphia)および1%のNP40を補充した、1倍容積のアッセイ緩衝液(50mM Tris-Cl pH8.0、137mM NaCl、2.7mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>)を用いて反応を停止させた。図13に示すように、スラミンは、ホールセルの(whole)白血球細胞において、Sirt1酵素を阻害した。

#### 【0103】

例15:インピボでの、化合物2を用いて処置された動物の白血球細胞におけるHDAC活性の時間依存的阻害

CD-1マウス(各群につき5個体)を、ビヒクル(生理食塩水中、40:60の比での、PEG400:0.2N HCl)または化合物2のいずれかを、90mg/kgでの経口投与による、示された期間についての単一用量で用いて、処置した。各々の群の動物についての血液を、同じ時点で採取するように計画し、4で一晩保存した。個々の動物由来の白血球細胞を単離した。例11において記載するように、Boc-Lys(Ac)-AMCを使用して、HDAC酵素アッセイを行った。結果を、図14に示す。

#### 【0104】

例16:マウスおよびヒトにおける、HDAC阻害剤の血漿濃度

CD-1マウス(各群につき3~4個体)を、化合物2の90mg/kgでの単一用量で、経口で処置した。血液を、用量後の示された時点で回収した。マウスの血液中の化合物2の血漿濃度を、HPLC-MS/MSを使用して決定した。API2000質量分析機(App

10

20

30

40

50

lied Biosystems /MDS Sciex Concord, ON, Canada) と組み合わせた Agilent\_1100 HPLC システム (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) で、アッセイを行った。ThermoHypersil の、50×2.1 mm、3m の、AQUASIL C18 カラム (Thermo Electron, WALTHAM, MA, USA) を使用した。均一溶媒比 45 : 55 での、移動相 A (水および 0.1% のギ酸) ならびに B (メタノールおよび 0.1% のギ酸) を、300 mL / 分の流速で流した。サンプル注入は、5 μL であった。正の多重反応モニタリング (MRM) スキャンモードを利用した。Analyst (登録商標) プログラム (Applied Biosystems /MDS Sciex Concord, ON, Canada) を使用して、データを分析した。マウスの血漿中のタンパク質を沈殿させ、その後、乾燥するまで蒸発させ、0.1% のギ酸水溶液で再構成した。表 4 に示すように、マウスにおいて、化合物 2 の血漿蓄積の時間経過は、化合物 2 による HDAC 酵素阻害の時間経過と相関する (図 13 において示す)。同様の方法を使用して、医薬品開発業務委託機関における、GLP 条件下での第 1 期研究における患者において、化合物 6 の血漿濃度を検出した (図 19)。

10

【0105】

【表 4】

表 4 : インビボでの、化合物 2 を経口で処置されたマウス由来の血漿中での、化合物 2 の時間依存的蓄積を示す

経口用量後の時間	マウスの番号	血漿濃度	平均
2 時間	1	3.35	2.3
	2	2.45	
	3	1.78	
	4	1.61	
8 時間	5	0.107	0.21
	6	0.188	
	7	0.328	
24 時間	9	0.0263	0.015
	10	0.0175	
	11	0.00972	
	12	0.00842	

20

30

40

マウスは、化合物 2 を、90 mg / kg での単一用量与えられた

【0106】

例 17 : インビボでの、ホールセルでの HDAC 活性の用量依存的阻害

CD-1 マウス (各群につき 5 個体) を、ビヒクル (生理食塩水中、40 : 60 の比での、PEG 400 : 0.2N HCl)、または化合物 2、または化合物 2 の不活性アナログ (類似の分子量を有する) のいずれかで処置した。化合物を、経口で、示される単

50

一用量で、マウスに投与した。各々の群の動物についての血液を収集し、4 で一晚保存した。個々の動物由来の白血球細胞を単離した。Boc-Lys (Ac)-AMCを使用して、H D A C 酵素アッセイを行った。化合物 2 は、マウス白血球細胞における H D A C 活性を、用量依存的な様式において阻害したが、化合物 2 の不活性なアナログは阻害しなかった ( 図 1 5 a ) 。

#### 【 0 1 0 7 】

例 1 8 : 用量および時間に依存的な、インビボでのヒストンアセチル化の誘導

C D - 1 ヌードマウス ( 各群につき 3 個体 ) を、ビヒクル ( 生理食塩水中、4 0 : 6 0 の比での、P E G 4 0 0 : 0 . 2 N H C l ) または化合物 2 ( 6 0 m g / k g もしくは 9 0 m g / k g での遊離塩基 ) のいずれかを用いて、経口投与により 4 時間にわたって処 10  
置した。各々の群由来の血液をプールし、白血球細胞を単離した。白血球細胞 ( 少なくとも  $2 \times 10^7$  個 ) を、氷冷溶解緩衝液 ( 1 0 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 、 1 . 5 m M M g C l <sub>2</sub> 、 5 m M K C l 、 0 . 5 % N P - 4 0 、 1 2 u M D T T 、 5 m M 酪酸ナトリウム、および新たに調製されたプロテアーゼ阻害剤 ) 中で溶解した。細胞を、氷上で 1 0 分間インキュベートし、IEC Micromax 遠心機 ( Fisher Scientific Ltd. , Nepean, Ontario ) において、2 0 0 0 r p m で 1 5 分間 4 で遠心した。ペレットを、冷たい溶解緩衝液で 1 回洗浄し、冷たい濃硫酸 ( 最終濃度 0 . 4 M ) を細胞ペレットに加え、再懸濁されたペレットを、氷上で、少なくとも 1 時間インキュベートし、その後、 1 5 0 0 0 r p m で 5 分間 4 で遠心した。上清を、1 5 m l のポリプロピレンの F a l c o n チューブ ( Becton Dickinson Laboratories, Franklin Lakes, New Jersey ) に移 20  
し、アセトン ( 1 0 x 上清の容積 ) を加えた。アセトンを加えた上清を、- 2 0 で一晚インキュベートし、2 0 0 0 r p m で 5 分間 4 での遠心によって、ヒストンを回収した。酸抽出したヒストンを、空気乾燥し、水中に再懸濁し、BioRad タンパク質アッセイ ( B i o - R a d Laboratories (Canada) Ltd. , Mississauga, Ontario ) を使用することによって、タンパク質濃度を決定した。

#### 【 0 1 0 8 】

白血球細胞由来のヒストンを、S D S - P A G E と、その後の抗アセチル化 H 4 ヒストン抗体および抗ヒストン H 4 抗体を使用するウェスタンブロッティングとによって、分析した。各々の群についての H 4 ヒストンのアセチル化を、ビヒクル処理された群の H 4 ヒストンのアセチル化に対して正規化した。血中の化合物 2 による H D A C 活性の酵素阻害 30  
は、そのヒストンアセチル化の誘導と相関した ( 図 1 5 b ) 。重要なことに、化合物 2 が白血球細胞における酵素活性の 5 0 % を阻害し得る用量 ( 6 0 m g / k g ) は、インビボで有意な抗腫瘍活性をもたらす用量とほぼ同じであった ( 図 1 6 ) 。マウスにおいて、化合物 2 による H D A C の酵素阻害は、その抗腫瘍活性と相関した ( 以下を参照のこと ) 。

#### 【 0 1 0 9 】

例 1 9 : ヌードマウスの A 4 3 1 ヒト類表皮癌異種移植モデルにおける、化合物 2 の用量依存的抗腫瘍活性

ヒト A 4 3 1 腫瘍を有する C D - 1 ヌードマウス ( 各群につき 8 個体 ) を、生理食塩水のみ、または食塩水中 4 0 : 6 0 の比での P E G 4 0 0 : 0 . 2 N H C l 中の化合物 2 の種々の用量のいずれかを用いて、毎日、経口投与によって処理した。簡単に述べると、 40  
A 4 3 1 細胞 ( 2 0 0 万個 ) を、動物の側腹部において皮下注射し、固形腫瘍を形成させた。腫瘍フラグメントを、ヌードマウスにおいて、それらの使用の前に最低 3 回継代した。腫瘍フラグメント ( 約 3 0 m g ) を、C D 1 のメスのヌードマウス ( 6 ~ 8 週齢、Charles River Laboratories, Wilmington, MA より ) に、全身麻酔下で、小さい外科切開を通して皮下移植した。腫瘍の大きさが約  $1 0 0 \text{ mm}^3$  に達した場合、レシピエント動物を、生理食塩水または H D A C 阻害剤を用いて、経口投与によって処置した。腫瘍の容積および動物の総体重を、2 週間まで、週 2 回モニタリングした。各々の実験群は、少なくとも 8 個体の動物を含んだ。Student T 検定を使用して、データセットにおける数値の間の統計学的有意差を分析した。腫瘍の容積を、2 週間にわたりモニタリングした。これらの結果を、図 1 6 に示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 1 0 】

例 2 0 : 健常志願者由来の白血球細胞におけるホールセル H D A C 活性

3 個体の志願者から新たに抽出 ( draw ) されたヒト血液を分析した。単離された白血球細胞 ( 8 0 0 , 0 0 0 個の細胞 ) における H D A C 活性を、例 1 1 において記載するように、Boc-Lys(AC)-AMCを使用して分析した。志願者番号 3 由来の白血球細胞を使用して、2 回の独立した分析を行い、この方法の処理上の誤差を示した。この処理上の誤差は、非常に小さかった ( 図 1 7 ) 。

## 【 0 1 1 1 】

例 2 1 : 化合物 6 を用いて処置された患者からの、ホールセル H D A C 活性およびヒストンアセチル化の時間経過

0 時間の時点で、3 個体の患者を化合物 6 (  $12 \text{ mg} / \text{m}^2$  ) を用いて処置し、処置後の示された時点で、患者から血液サンプルを回収した。単離された白血球細胞 ( 8 0 0 , 0 0 0 個の細胞 ) のホールセル H D A C 活性を、例 1 1 において記載するように、Boc-Lys(AC)-AMCを使用して分析した。図 1 8 において、3 個体の個々の患者の白血球細胞における、H D A C 酵素阻害の時間経過を示す。これらの患者の血液において、化合物 6 による H D A C 酵素阻害は、化合物 6 の薬物動態と関連していた。これら 3 個体の患者における化合物 6 の血漿濃度の時間依存性を、図 1 9 に示す。処置後の最初の 2 4 時間で血中における薬物暴露がより著しく蓄積された患者番号 0 0 1 および患者番号 0 0 3 は、同じ期間中にはるかに低い程度の薬物暴露を有した患者番号 0 0 2 よりも、白血球細胞における H D A C 酵素活性のより劇的な低下を示した。本発明者らはさらに、患者由来の白血球における酵素阻害が、化合物 6 によるヒストンアセチル化の誘導と、著しく関連することを示した。

## 【 0 1 1 2 】

図 2 0 において、患者のヒストンアセチル化の誘導の時間依存性を分析した。0 時間の時点で、患者を、化合物 6 (  $12 \text{ mg} / \text{m}^2$  ) を用いて処置し、処置後の示された時点で、患者から血液サンプルを回収した。白血球細胞を単離し、ヒストンを、例 1 8 において示すように抽出した。単離されたヒストンに対して E L I S A を使用して、ヒストン H 3 アセチル化を分析した ( 以下を参照のこと ) 。インビボで化合物 6 を用いて処置された患者由来の白血球細胞における、化合物 6 によるホールセル酵素活性の阻害 ( 図 1 8 ) は、ヒストンアセチル化の誘導 ( 図 2 0 ) 、および化合物 6 の血漿蓄積 ( 図 1 9 ) と、著しく相

## 【 0 1 1 3 】

例 2 2 : 精製されたヒストンに対するサンドウィッチ E L I S A による、ヒストンアセチル化の検出

( 例 1 8 において記載されるように ) インビボで化合物 6 を用いて処置された患者の白血球細胞から単離されたヒストン (  $6 \mu \text{g}$  ) を使用して、ヒストンアセチル化を分析した。簡単に述べると、 $1 \mu \text{g} / \text{ml}$  での抗ヒストン ( H 1 1 - 4 ) 抗体 ( Roche, Laval, Quebec ) を使用して、黒色プレート ( Nunc437111 プレート、VWR, Ville Mont-Royal, Quebec ) を、2 2 で 2 時間にわたって被覆した。被覆されたプレートを、P B S で 2 回洗浄し、( P B S 中 0 . 1 % の T r i t o n X - 1 0 0 および 1 % のウシ血清アルブミン ) を用いて、2 2 で 4 0 分間ブロッキングした。一次抗体は、1 : 5 0 0 希釈でのウサギのポリクローナル抗アセチル - H 3 ( Upstate, Waltham, MA ) 抗体、または、1 : 2 5 0 0 希釈でのウサギのポリクローナル抗 H 3 抗体 ( Abcam, Cambridge, MA ) のいずれかを、単離されたヒストン ( ブロッキング溶液中に  $6 \mu \text{g}$  ) とともに使用した。プレートを、一次抗体およびヒストンとともに、2 2 で 4 5 分間インキュベートし、その後ブロッキング溶液 ( 上記を参照のこと ) を使用して 3 回洗浄した。二次抗体は、ブロッキング溶液中 1 : 8 0 0 0 希釈におけるヤギのポリクローナル抗ウサギ H R P 抗体 ( Sigma, St-Louis, MO ) を使用し、2 2 で 4 5 分間インキュベートした。その後、プレートを、ブロッキング緩衝液を用いて 2 回洗浄し、P B S を用いて 2 回洗浄した。5 0  $\mu \text{M}$  の Amplex-Red ( Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario ) と 2 0 0  $\mu \text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を加えることに

10

20

30

40

50

よって、反応を発色させ、30分間暗所でインキュベートした。蛍光光度計 (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices) で、550 nm の励起波長、および 610 nm の発光波長、ならびに 590 nm のカットオフで、蛍光を読み取った。化合物 6 を用いて処置された 3 個体の患者から単離されたヒストンのヒストンアセチル化を、図 20 に示す。

【0114】

例 23 : 細胞透過性基質を使用する比色アッセイによって測定される、ヒト癌細胞におけるホルセル HDAC 活性

HCT 116 細胞を、トリプシン処理し、計数した。細胞を、96 ウェルの Costar 黒色プレート (E1A/RIA) において、それらの培養培地中に播種し、Biovision (Mountain View, California) 製の「比色 HDAC 活性アッセイキット」を使用して、ホルセル HDAC 酵素アッセイを行った。HDAC 比色基質 (Boc-Lys(Ac)-pNA) を、細胞懸濁液中に、300  $\mu$ M の最終濃度で添加した。プレートを、90 分間、37 °C で、5% CO<sub>2</sub> 下でインキュベートした。反応を停止させる前に、405 nm での OD を読み取ってバックグラウンドを得た。「リジン発色液 (Lysine developer)」（キット中）を添加することによって反応を停止させ、プレートを、37 °C で 30 分間インキュベートし、その後、SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, California) で、405 nm での OD を読み取った。図 21 において、本発明者らは、Boc-Lys(Ac)-pNA を基質として使用した場合のホルセル HDAC 活性を、細胞数の関数として示す。従って、HDAC 酵素によって基質からどのような種類の受容体分子が生成されるかに関わりなく、細胞透過性の基質を使用して、ホルセル HDAC 活性を測定することが出来る。

10

20

【0115】

例 24 : HDAC - 1 アイソタイプまたは HDAC - 6 アイソタイプを優位に過剰発現する細胞における、HDAC 阻害剤のアイソタイプ特異性および効力をモニタリングする

293T 細胞に、ヒト HDAC - 1 または HDAC - 6 をコードするレンチウイルスを感染させた。ピューロマイシンに対して細胞を選択し、抗生物質耐性の集団を得た。細胞を、96 ウェルプレートに播種し、低分子基質 (Boc-Lys(Ac)-AMC) とともにインキュベートし、その後、反応を停止させて読み取った。これらの細胞における HDAC - 1 または HDAC - 6 の発現レベルを、免疫プロットングによって分析した。図 22 a に示すように、293T 細胞における HDAC - 1 または HDAC - 6 の過剰発現は、全体の HDAC 活性を有意に増大させ、293T 細胞における HDAC - 1 または HDAC - 6 の過剰発現を、ウェスタンプロットによって確認した (図 22 b)。表 5 に示すように、本発明者らは、これらの細胞株を使用して、いくつかの HDAC 阻害剤のアイソタイプ選択性および効力をプロファイルする。インビトロでの酵素選択性と、細胞における選択性との間に、一般的な相関関係が存在する。例えば、化合物 2 または MS - 275 は、どちらもインビトロでクラス I の HDAC 阻害剤であり、また、HDAC 1 を過剰発現する細胞においても強力な阻害剤であるが、HDAC - 6 を過剰発現する細胞においては阻害剤でない。しかし、クラス I / II の HDAC の pan-阻害剤である SAHA は、細胞において、HDAC - 1 および HDAC - 6 の両方を阻害することが出来る。本発明者らはまた、インビトロで HDAC - 6 選択性を示す化合物 5 が、ホルセルにおいて HDAC - 6 選択性を示すことを例証する。従って、本発明者らは、クラス I / II の酵素に対する pan-基質を使用して、1 種類または数種類の HDAC アイソタイプが豊富に存在する細胞集団において、pan-阻害剤またはアイソタイプ選択的阻害剤の効力およびアイソタイプ特異的阻害活性を分析することが出来た。

30

40

【0116】

## 【表 5】

表 5 : HDAC1 または HDAC6 を過剰発現するヒト 293T 細胞における、ホールセルデアセチラーゼの IC50 ( $\mu$  M)、ならびに、インビトロでの組み替え HDAC1 または HDAC6 に対するそれらの IC50

	細胞における IC50 ( $\mu$ M)		インビトロでの IC50 ( $\mu$ M)	
	293T-HD1	293T-HD6	HD1	HD6
SAHA	4	5	0.1	0.1
MS-275	4	>100	0.4	>20
化合物 2	0.5	>100	0.1	>20
化合物 5	21	3	0.5	0.02

結果は、少なくとも 3 回の独立したアッセイからの平均である

## 【 0 1 1 7 】

例 2 5 : 体液を使用するデアセチラーゼ活性の評価

C D - 1 マウスの血液を、ヘパリン処理試験管に回収し、Coulter カウンター (Beckman Coulter, Ville St.Laurent, Quebec) によって細胞を計数した。1 . 6  $\times$  1 0 <sup>6</sup> 個の白血球細胞を含有する全血の量を一定分割 (aliquot) し、容積を、R P M I (+ 1 0 % F B S) で 2 0 0  $\mu$  l まで増量 (bring up) した。Boc-Ac-Lys-AMC を、3 0 0  $\mu$  M の最終濃度で添加した。種々の長さの時間 (amount of time) の後で、この混合物をスピンド (4 0 0  $\times$  g で 5 分間)、その上清 (血清) のうち 5 0  $\mu$  l を、9 6 ウェルプレートに移した。等量の発色液混合物を添加し、1 5 分間のインキュベーション後に読み取ることによって (例 3 において記載するように)、上清中に存在する脱アセチル化産物 Boc-Lys-AMC の量を検出した。その結果を、図 2 3 に示す。この知見は、基質 Boc-Lys(Ac)-AMC が透過性であり細胞内へ入るのみならず、その脱アセチル化産物である Boc-Lys-AMC もまた、透過性であり細胞から出てくるといふ、例 1 における本発明者らの観察と一致した。従って、初代細胞における全 H D A C 活性は、動物が H D A C 基質とエキソビボで接触させられた場合、体液中において容易にモニタリング出来た。

## 【 0 1 1 8 】

例 1 6 : 体液を使用する、インビボでの、タンパク質デアセチラーゼ活性の評価

C D - 1 マウス (各群につき 6 個体) またはラット (各群につき 6 個体) を、細胞透過性の pan-基質を 1 ~ 1 0 0 m g / k g で用いて、単一の静脈内投与によって処置する。マウス (またはラット) のうち 3 個体を、次いで、あるタンパク質デアセチラーゼファミリーの pan-阻害剤を用いて処置する。その後の時点で、血液を採取し、血漿を分離し、検出可能なレポーター分子の量について分析する。阻害剤によって処置されたマウス由来の血漿中のレポーター分子の量と、未処置のマウスの血漿中の量とを比較する。

## 【 0 1 1 9 】

等価物

当業者は、本明細書において記載される本発明の特定の態様の、多数の等価物を、理解するか、または慣用的な実験のみを用いて確認することができる。かかる等価物は、付随する特許請求の範囲によって、包含されることを意図される。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 1 2 0 】

【 図 1 】 培養 2 9 3 T 細胞における細胞内 H D A C 活性および細胞外 H D A C 活性を示す

10

20

30

40

50

【図2】代表的な細胞透過性基質に対する検出可能なレポーター分子の生成についてのスキームを示す。

【図3】3種類の基質に対する、組み替えSirt1、Sirt2、およびSirt3の基質優先度を示す。

【図4】培養ヒト癌細胞および培養正常細胞における細胞数の関数としての、ホールセルHDAC活性を示す。

【図5】ヒト癌細胞株におけるHDACのホールセル活性に対する、基質濃度の効果を示す。

【図6】SAHA、化合物2、およびLAQ-824による、ヒト癌細胞におけるホールセルHDAC活性の阻害を示す。

【図7】図7aは、サーチュイン特異的基質が細胞透過性であること、およびヒト癌細胞におけるサーチュインホールセル活性に対する基質の濃度の効果を示す。図7bは、外因性NAD+が、ヒト癌細胞におけるホールセルサーチュイン活性に対して効果を及ぼさないことを示す。

【0121】

【図8】スラミンはヒト癌細胞におけるSirt1活性を阻害し得るが、TSAは阻害し得ないことを示す。

【図9】リスベラトロールが、ヒト癌細胞におけるSirt1活性を活性化し得ることを示す。

【図10】ヒト白血球細胞の細胞数の関数としてのホールセルHDAC活性を示す。

【図11】ヒト白血球細胞におけるホールセルHDAC活性の、HDAC阻害剤(化合物2およびLAQ-824)による用量依存的阻害;ならびに、これらのアイソタイプ酵素の阻害活性を示す。

【図12】Sirt1特異的基質を使用し、糖尿病マウス由来のマウスの血液中での、ホールセルSirt1活性を示す。

【図13】サーチュイン阻害剤であるスラミンによる、マウス白血球細胞におけるホールセルSirt1活性の、用量依存的阻害を示す。

【図14】化合物2を用いて処置されたマウス由来の白血球細胞におけるHDAC酵素活性の、時間依存的阻害を示す。

【図15】化合物2を用いて処置されたマウス由来の白血球細胞における、ホールセルHDAC活性およびヒストンアセチル化の、用量依存的阻害を示す。

【0122】

【図16】図16は、マウスのA431異種移植モデルにおける、化合物2の用量依存的な抗腫瘍活性を示す。

【図17】3個体の健常ヒト志願者由来の白血球細胞におけるホールセルHDAC活性、およびこのアッセイの処理上の誤差を示す。

【図18】化合物6を用いて経口で処置された3個体の癌患者由来の、ホールセルHDAC活性の時間経過を示す。

【図19】HDAC阻害剤を用いて経口で処置された3個体の癌患者由来の血液における、化合物6の血漿蓄積の時間経過を示す。

【図20】化合物6を用いて経口で処置された3個体の癌患者由来の白血球細胞における、ヒストンアセチル化の誘導の時間経過を示す。

【図21】比色アッセイを使用した、細胞数の関数としての、HCT116細胞のホールセルHDAC活性を示す。

【図22】HDAC-1またはHDAC-6のいずれかを過剰発現する293T細胞におけるホールセルHDAC活性、および、これらの細胞における、HDAC-1またはHDAC-6の発現レベルを示す。

【図23】HDAC基質と接触させられたマウス全血から単離された血清由来のHDAC活性の検出を示す。

10

20

30

40

【 図 1 】

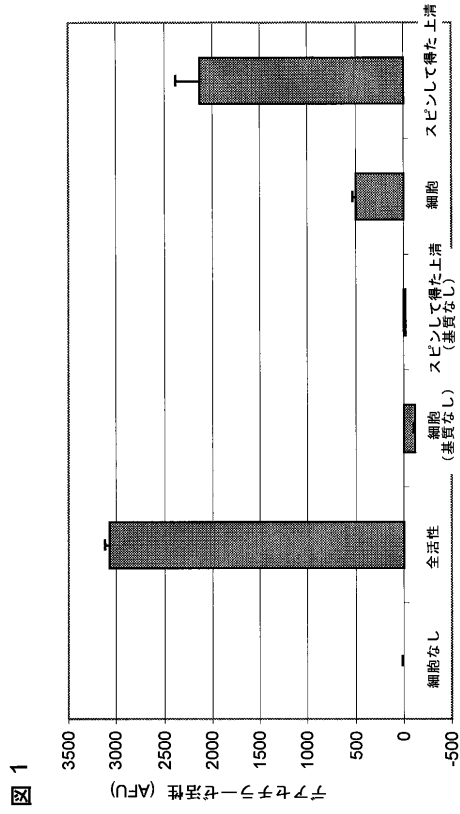


図 1

【 図 2 】

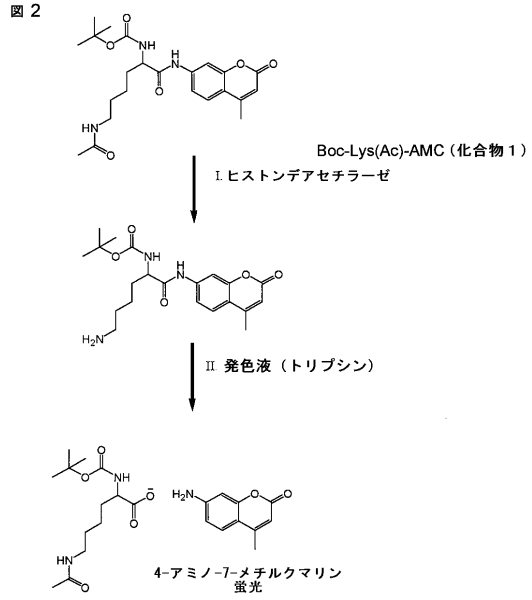


図 2

【 図 3 】

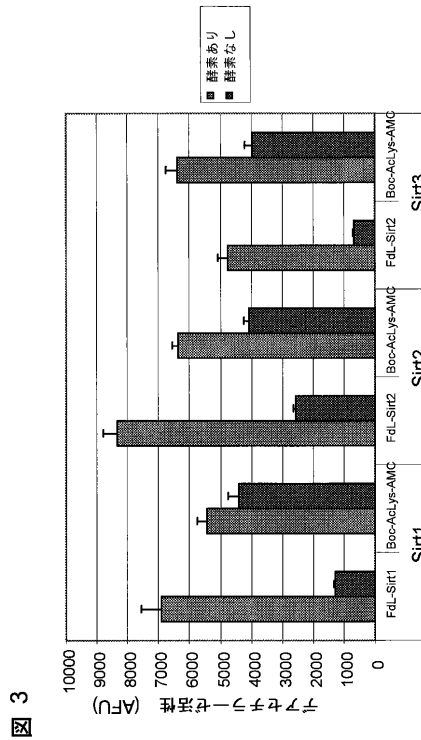


図 3

【 図 4 】

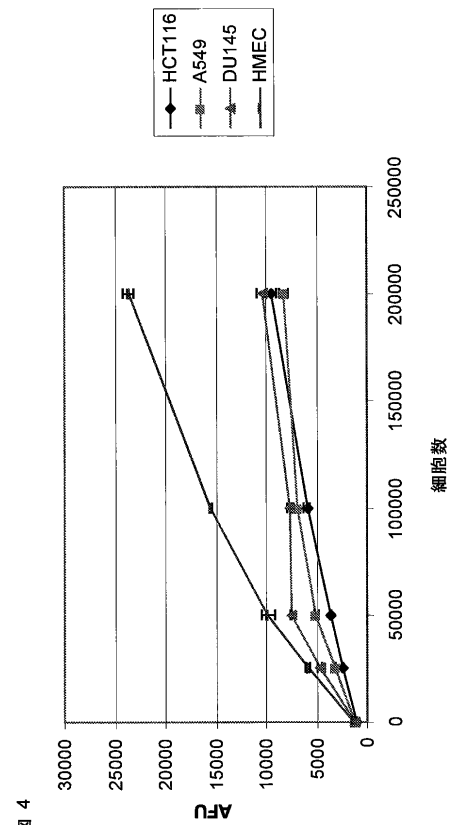


図 4

【 図 5 】

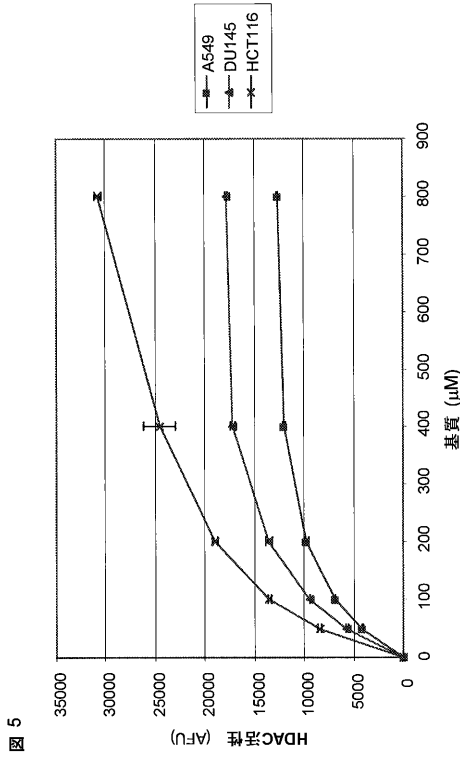


図 5

【 図 6 】

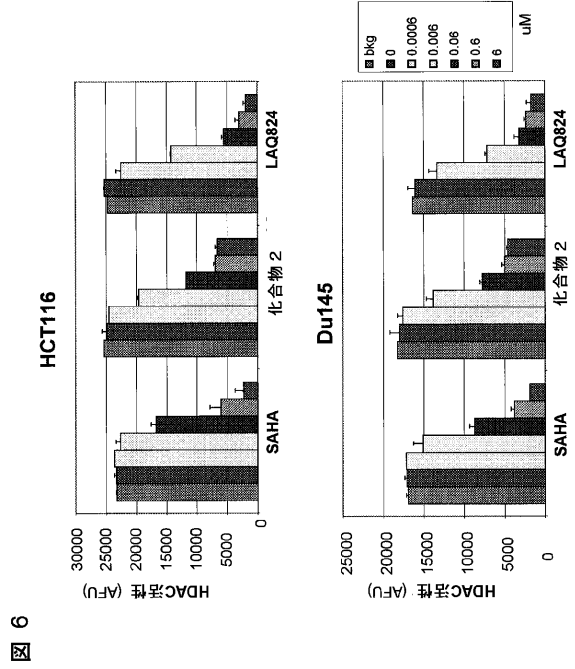


図 6

【 図 7 】

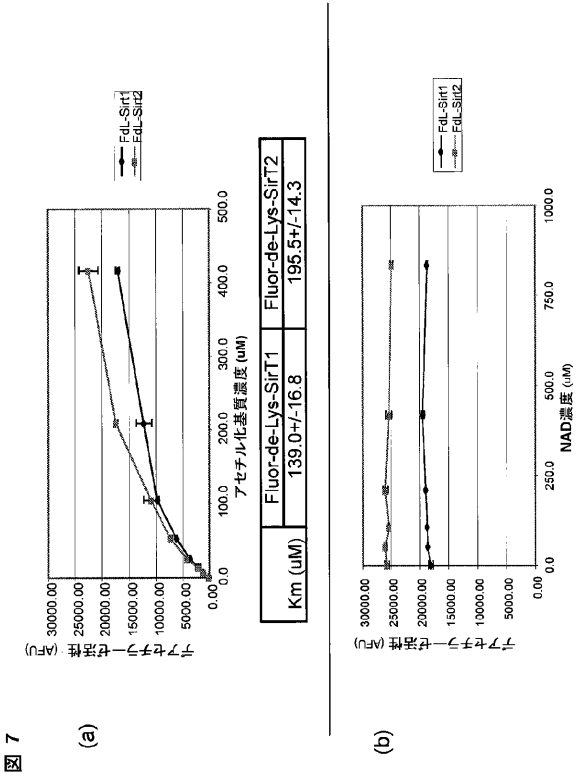


図 7

【 図 8 】

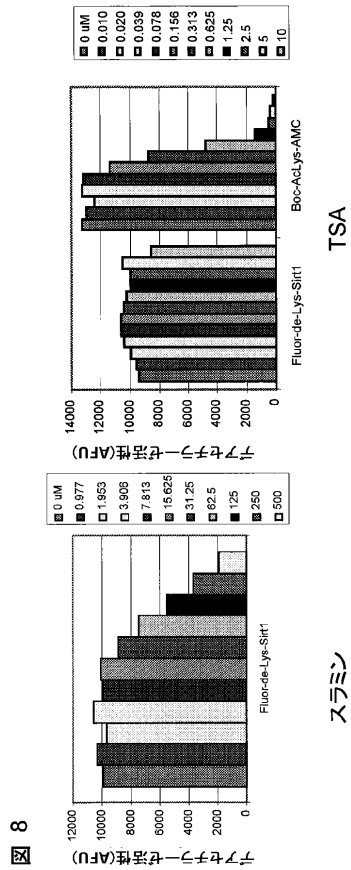


図 8

TSA

スラムミン

【 図 9 】

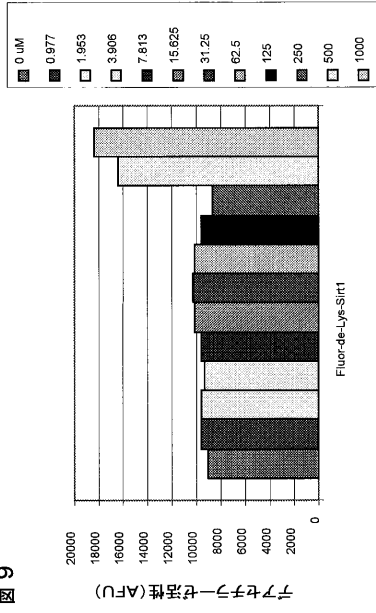


図 9

【 図 10 】

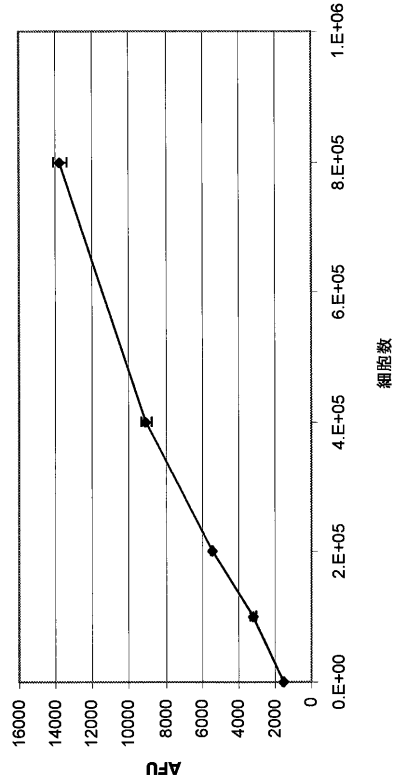


図 10

【 図 11 】

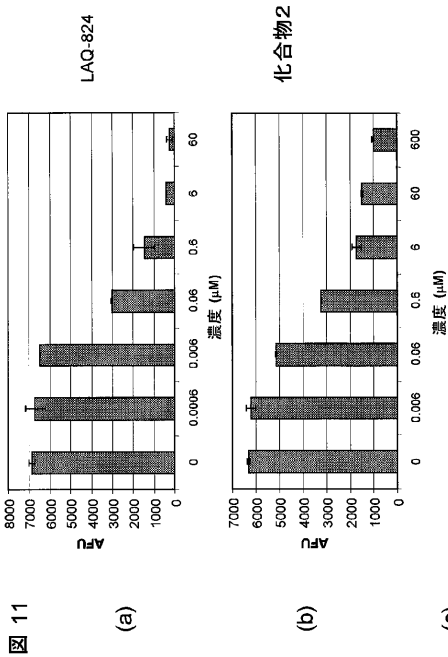


図 11

【 図 12 】

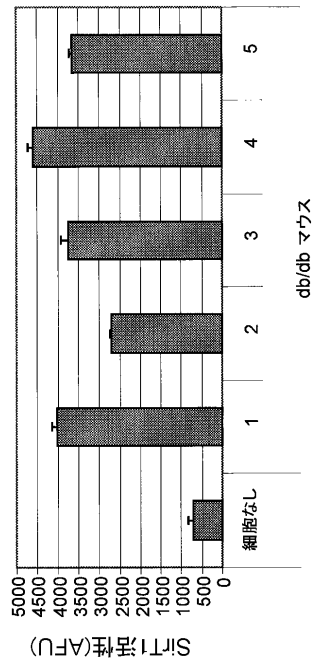


図 12

化合物2 LAQ-824	IC50 (μM)									
	HD1	HD2	HD3	HD4	HD5	HD6	HD7	HD8		
化合物2	0.15 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.21	2.4 $\pm$ 1.2	>10	>10	>10	>10	>10		
LAQ-824	0.004	0.009	0.01 $\pm$ 0.004	0.02	0.02 $\pm$ 0.000	0.04 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.007	0.7 $\pm$ 0.3		

複数の実験からの結果が存在する場合、標準偏差も示されている

【 図 1 3 】

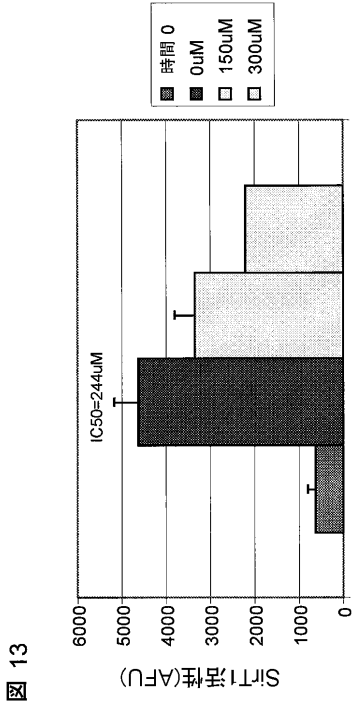


図 13

【 図 1 4 】

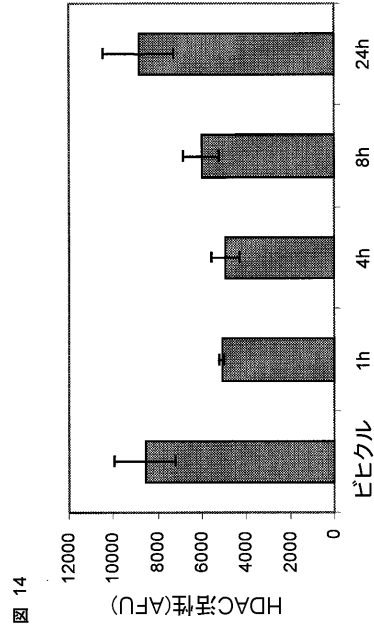


図 14

【 図 1 5 】

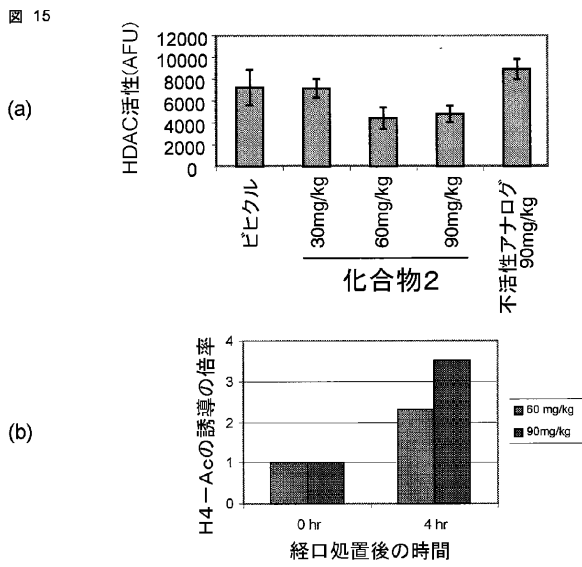


図 15

(a)

(b)

【 図 1 6 】

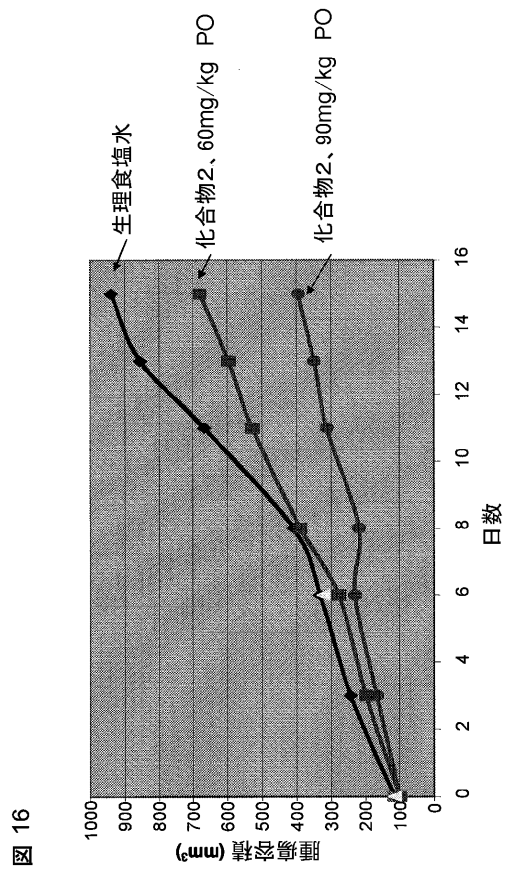
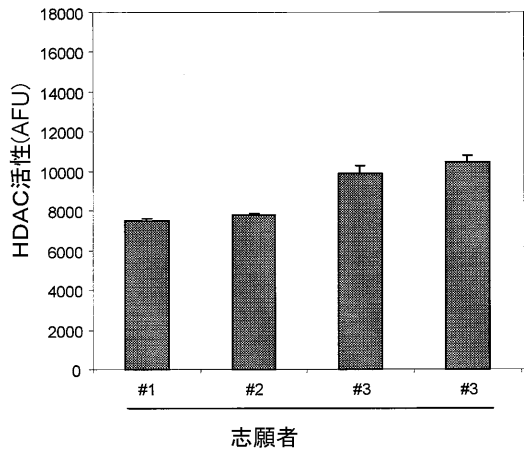


図 16

【 図 1 7 】

図 17



【 図 1 8 】

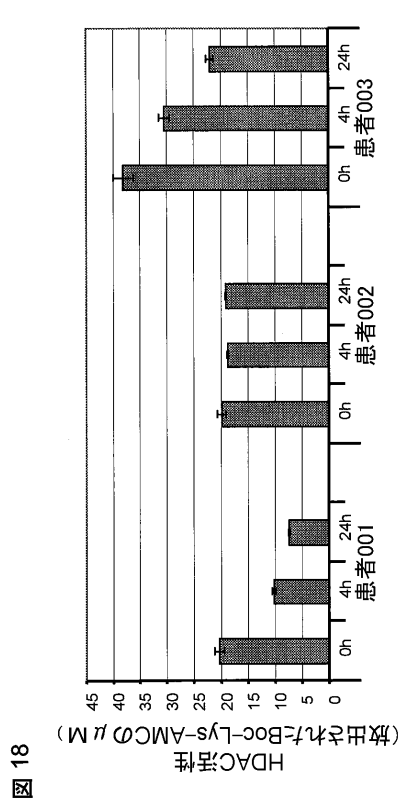


図 18

【 図 1 9 】

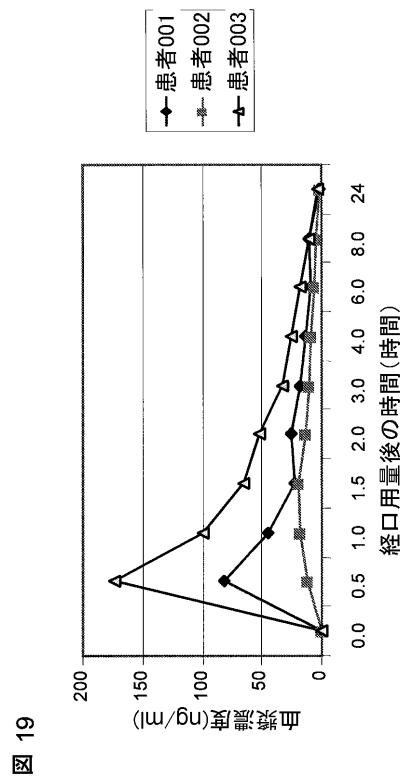


図 19

【 図 2 0 】

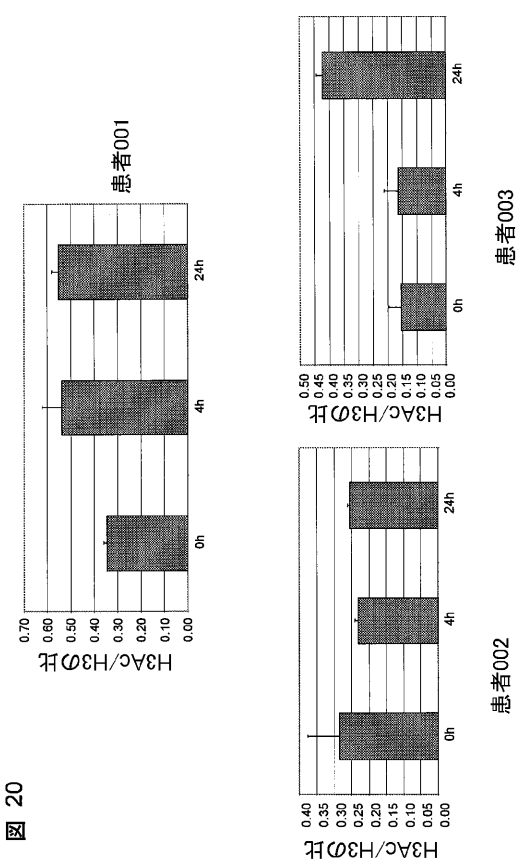


図 20

【 図 2 1 】

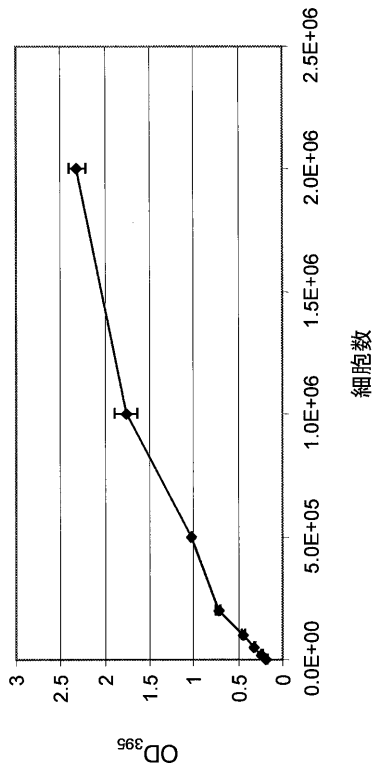


図 21

【 図 2 3 】

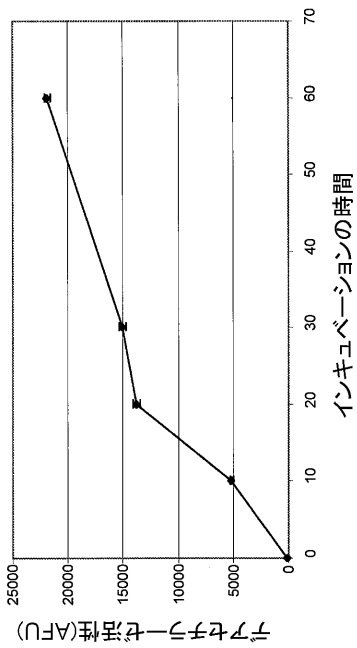


図 23

【 図 2 2 】

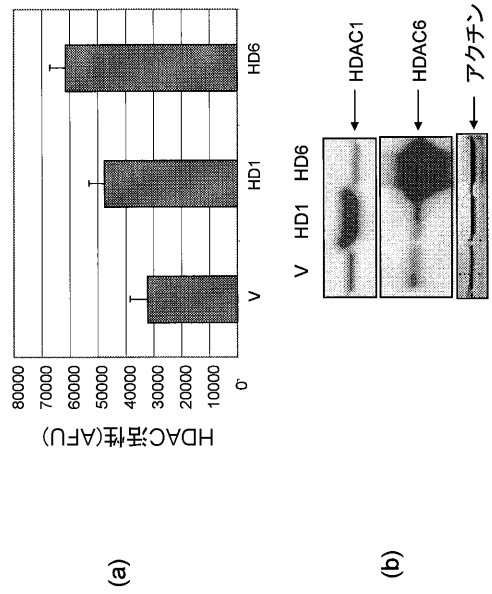


図 22

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2005/004207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12Q 1/34</i> (2006.01), <i>C12Q 1/00</i> (2006.01), <i>C12Q 1/02</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC (2006.01): <i>C12Q 1/34</i> , <i>C12Q 1/00</i> , <i>C12Q 1/02</i>		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent Database, Delphion, Pubmed (NCBI), Scopus, Internet; Keywords: histone, deacetylase, HDAC, sirtuin, assay, vivo, cell based, substrate, fluor de lys, boc lys ac, isotype specific		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOWITZ, K.T. ET AL. Small molecule activators of sirtuins extend <i>Saccharomyces cerevisiae</i> lifespan. Nature, September 2003, Vol. 425, pages 191-196, ISSN: 0028-0836.	1-4, 46
Y	see whole document including supplemental Figures 2 and 3	10-13, 22-30
X	WOOD, J. G. ET AL. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature, August 2004, Vol. 430, pages 686-707, ISSN: 0028-0836.	1-4, 46
Y	see whole document including supplementary methods	10-13, 22-30
X	YEUNG, F. ET AL. Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. The EMBO Journal, 2004 [published online 20 May 2004], Vol. 23, No. 12, pages 2369-2380, ISSN: 0261-4189. see whole document	1-4, 14-17, 46
Y		5-13, 18-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
21 August 2007 (21-08-2007)	18 September 2007 (18-09-2007)	
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Authorized officer  Katrina Campsall 819- 956-9874	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2005/004207

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	RUIJTER, A. J. M. ET AL. The novel histone deacetylase inhibitor BL1521 inhibits proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma cells. <i>Biochemical Pharmacology</i> , October 2004, Vol. 68, pages 1279-1288, ISSN: 0006-2952.	1-4, 14-17, 46
P, Y	see whole document	5-13, 18-27
Y	SIRT1 Fluorescent Activity Assay/Drug Discovery Kit - AK-555. Datasheet. Biomol Research Laboratories, Inc, 2003 [retrieved August 2007 from the Internet: <URL: <a href="http://web.archive.org/web/20040608143432/www.biomol.com/?tabId=115&amp;productId=1806">http://web.archive.org/web/20040608143432/www.biomol.com/?tabId=115&amp;productId=1806</a> >. see whole document	10-13
Y	CA 2408385 A1 (METHYLGENE, INC.) 24 September 2001. see whole document especially pages 56-58	5-9, 18-21, 25-27
Y	ITO, K. ET AL. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences, USA</i> , 25 June 2002, Vol. 99, No. 13, pages 8921-8926, ISSN: 0027-8424. see whole document	22-30
P, Y	SANDERSON, L. ET AL. Plasma pharmacokinetics and metabolism of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A after intraperitoneal administration to mice. <i>The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics</i> , October 2004, Vol. 32, No. 10, pages 1132-1138, ISSN: 0090-9556. see whole document	22-30

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/IB2005/004207**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

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

1.  Claim Nos. : **22-45**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :  
  
Although claims 22-45 encompass a method of treatment of the human/animal body which this Authority is not obliged to search under Rule 39.1(iv) of the PCT, the search has been carried out based on the alleged effects of the compounds referred to therein.
2.  Claim Nos. :  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3.  Claim Nos. :  
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

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

- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/IB2005/004207

<u>Patent Document Cited in Search Report</u>	<u>Publication Date</u>	<u>Patent Family Member(s)</u>	<u>Publication Date</u>
CA 2408385A1	24-09-2001	AU 2001298014A1	29-01-2003
		CA 2434601A1	12-09-2002
		DE 10295684T0	20-11-2003
		DE 10295684T5	14-10-2004
		EP 1438404A2	21-07-2004
		GB 0316313D0	13-08-2003
		GB 2389365A	10-12-2003
		JP 2004520421T	08-07-2004
		JP 2004533850T	11-11-2004
		US 2002061860A1	23-05-2002
		US 2002137162A1	26-09-2002
		US 2003148970A1	07-08-2003
		US 2003152557A1	14-08-2003
		US 2004266718A1	30-12-2004
		WO 02069947A2	12-09-2002
		WO 02069947A3	09-10-2003
		WO 03006652A2	23-01-2003
		WO 03006652A3	13-05-2004

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ボンフィス, クレール

カナダ国 エイチ 2 シー 2 エイチ 9、ケベック州、モンレアル、サン ユベール 1 0 6 2 9

Fターム(参考) 2G045 AA29 CB17 DA20

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ30 QR58 QX02