

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6049260号
(P6049260)

(45) 発行日 平成28年12月21日(2016.12.21)

(24) 登録日 平成28年12月2日(2016.12.2)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00

請求項の数 8 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-531031 (P2011-531031)	(73) 特許権者	510084149
(86) (22) 出願日	平成21年10月9日 (2009.10.9)		ダナ ファーバー キャンサー インステ
(65) 公表番号	特表2012-505403 (P2012-505403A)		イテュート インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成24年3月1日 (2012.3.1)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/005568		2 2 1 5 - 5 4 5 0 ボストン ブルック
(87) 国際公開番号	W02010/042225		リン アベニュー 4 5 0
(87) 国際公開日	平成22年4月15日 (2010.4.15)	(74) 代理人	100189131
審査請求日	平成24年10月9日 (2012.10.9)		弁理士 佐伯 拓郎
(31) 優先権主張番号	61/136,906	(74) 代理人	100102668
(32) 優先日	平成20年10月10日 (2008.10.10)		弁理士 佐伯 憲生
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100147289
前置審査			弁理士 佐伯 裕子
		(74) 代理人	100158872
			弁理士 牛山 直子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロアポトーシス BAX 及び BCL-2 ポリペプチドの化学モジュレータ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

方法が、

a) 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、化合物を、当該 BAX ポリペプチドの α 1 螺旋；α 2 螺旋；α 1 - α 2 の間のループ；α 6 螺旋；並びに α 4 螺旋、α 5 螺旋、及び α 8 螺旋の選択残基；の 1 つ又はそれ以上の結合部位と接触させること；

b) 当該化合物が、配列番号 1 に記載の BAX ポリペプチドのアミノ酸配列の G l u 1 7、G l n 1 8、M e t 2 0、L y s 2 1、T h r 2 2、A l a 2 4、L e u 2 5、L e u 2 7、G l n 2 8、G l y 2 9、I l e 3 1、G l n 3 2、A s p 3 3、A r g 3 4、A l a 3 5、G l y 3 6、A r g 3 7、M e t 3 8、G l y 3 9、G l y 4 0、G l u 4 1、A l a 4 2、L e u 4 7、A s p 4 8、P r o 4 9、V a l 5 0、P r o 5 1、G l n 5 2、A s p 5 3、A l a 5 4、S e r 5 5、T h r 5 6、L y s 5 7、L y s 5 8、L e u 5 9、S e r 6 0、G l u 6 1、L y s 6 4、A r g 8 9、P h e 9 2、P h e 9 3、L e u 1 2 2、L e u 1 2 5、T h r 1 2 7、L y s 1 2 8、V a l 1 2 9、P r o 1 3 0、G l u 1 3 1、L e u 1 3 2、I l e 1 3 3、A r g 1 3 4、T h r 1 3 5、M e t 1 3 7、G l y 1 3 8、T r p 1 3 9、L e u 1 4 1、A s p 1 4 2、P h e 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 6、A r g 1 4 7、L e u 1 4 9、G l y 1 5 0、G l y 1 5 6、G l y 1 5 7、T r p 1 5 8、A s p 1 5 9、L e u 1 6 1、L e u 1 6 2 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ことを確認すること；及び

10

20

c) 当該化合物による当該 B A X ポリペプチドの活性化を検出すること：
を含有してなり、

ここで、当該化合物と B A X ポリペプチドの結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝；上部近傍ループ；下部近傍ループ；又はこれらの組み合わせ；の場所で起こる、

B A X 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 2】

化合物の結合が、B A X ポリペプチドの 1 又はそれ以上の該アミノ酸残基の N M R スペクトルのシフトを引き起こす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

方法が、前記 a)、b) 及び c) の前に、さらに

d) B A X ポリペプチドの結合部位の三次元構造を提供すること（ここで、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1 - \alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の 1 つ又はそれ以上を含有している）；及び

e) 当該結合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（ここで、化合物と B A X ポリペプチドの結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる）；

を含有してなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 a) の化合物が、表 1 の化合物、又は表 1 の化合物の結合親和性、活性、溶解性、又はその他の薬理学的特性を改善する誘導体から選択される化合物である、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (c) の検出が、

(A) B A X ポリペプチドのオリゴマー化；抗体による B A X ポリペプチド配座異性体の検出；ミトコンドリアチトクロム c 放出；リポソーム放出；細胞死；ミトコンドリア又は細胞の形態；ミトコンドリアのカルシウム流出；ミトコンドリアの膜貫通の定量；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提供すること、並びに、

(B) 最適化されたタンパク質発現及び精製条件、並びにモノマー、ダイマー又はオリゴマーの配座異性体及びそれらの種を安定化するポリペプチド変異体の作出により、B A X ポリペプチドの収率及び安定性を最大化するように調製された B A X ポリペプチドタンパク質をアッセイに使用すること、

を含有してなる、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

当該化合物が、B A X ポリペプチドの結合部位における配列番号 1 に記載の配列の L y s 2 1 に対応するアミノ酸残基と結合する、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

当該化合物が、B A X ポリペプチドの結合部位における配列番号 1 に記載の配列の M e t 2 0、L y s 2 1、A l a 2 4、G l n 2 8、G l n 3 2、G l u 1 3 1、A r g 1 3 4、M e t 1 3 7、L e u 1 4 1、A s p 1 4 2 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、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

当該化合物が、B A X ポリペプチドの結合部位における配列番号 1 に記載の配列の G l u 1 7、M e t 2 0、L y s 2 1、T h r 2 2、A l a 2 4、L e u 2 5、L e u 2 7、G l n 2 8、G l y 2 9、I l e 3 1、G l n 3 2、A s p 3 3、L e u 4 7、A s p 4 8、P r o 4 9、V a l 5 0、P r o 5 1、G l n 5 2、A s p 5 3、T h r 5 6、A r g 8 9、P h e 9 2、P h e 9 3、P r o 1 3 0、G l u 1 3 1、I l e 1 3 3、A r g 1 3 4、T h r 1 3 5、M e t 1 3 7、G l y 1 3 8、T r p 1 3 9、L e u 1 4 1、A

10

20

30

40

50

s p 1 4 2、P h e 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 6 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、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2008年10月10日に出願された、米国仮特許出願第61/136,906号の優先権を主張する。前記特許出願の開示はその全てが参照により本明細書に取り込まれている。

【背景技術】

10

【0002】

プログラム細胞死又はアポトーシスは、多細胞生物の正常な発育及びホメオスタシスに対する必須の生理的過程である (Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, Science 267, 1456-1462.; Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development, Cell 88, 347-354)。アポトーシスは更に、細胞増殖を制御して、異常な、紛れ込んでいる、機能不全な、或いは有害な細胞を除去するための防御機構として機能する。アポトーシスの脱制御は、細胞増殖と細胞死の間のバランスを変えてしまい、癌 (Adams, J. M., and Cory, S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, Oncogene 26, 1324-1337)、自己免疫 (Krammer, P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system, Nature 407, 789-795)、神経変性疾患 (Yuan, J., and Yankner, B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system, Nature 407, 802-809)、及び心臓血管疾患 (Kang, P. M., and Izumo, S. (2003) Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases, Trends Mol Med 9, 177-182) などの多すぎる或いは少なすぎる細胞死を特徴とする多種の疾患の一因となる。過去20年に渡るアポトーシスシグナル経路の集中的な研究は、その相互作用が細胞の生死の間の微妙なバランス保持する、プロアポトーシスとアンチアポトーシスのシグナル伝達ネットワークとして、BCL-2タンパク質ファミリーを同定した (Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points, Cell 116, 205-219; Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, Nat Rev Mol Cell Biol 9, 47-59)。生化学及び遺伝子の研究は、BCL-2タンパク質ファミリーのアポトーシス細胞死に関する「引き返し限界点」を調節する重要な役割を明らかにした。

20

30

【0003】

BCL-2ファミリーメンバーは、進化的に保存されていて、タンパク質相互作用を介してアポトーシスを調節するプロ及びアンチアポトーシスメンバーを含有している (Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, Nat Rev Mol Cell Biol 9, 47-59) (図1)。BCL-X_L及びBCL-2などのアンチアポトーシスタンパク質は、プロアポトーシスタンパク質を阻害して細胞死を防ぎ、4つのBCL-2相同ドメイン (BH-1~4) を共有している (図2)。BAX及びBAKなどのマルチドメインプロアポトーシスタンパク質は3つの保存ドメイン (BH1~3) を共有して、活性化すると、ミトコンドリアに不可逆的な損傷を負わせる (Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, Science (New York, N.Y. 292, 727-730; Green, D. R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead, Cell 121, 671-674)。プロアポトーシスタンパク質のサブグループは保存BH3ドメインのみを共有している。これらの「BH3-オンリー」プロアポトーシスタンパク質は、細胞全体に位置していて、生理的なストレス或いは細胞傷害の条件下でマルチドメインメンバーへ死のシグナルを送達する態勢にあ

40

50

る、死のメッセンジャーとして機能する (Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., and Korsmeyer, S. J. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics, *Cancer Cell* 2, 183-192; Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function, *Mol Cell* 17, 393-403)。アポトーシス刺激及び細胞状況の特質に応じて、BH3-オンリータンパク質の死のシグナルは、アンチアポトーシスタンパク質によって中和されるか、或いはミトコンドリア致死因子 BAX 及び BAK へ直接送達されることになる。BAX 及び BAK はミトコンドリア外膜の透過性上昇を誘発する細胞死への道を示す (Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science* 292, 727-730)。ミトコンドリア外膜が透過性になると、多数のミトコンドリア因子がサイトゾル内に放出される。これらアポトーシス因子の1つである、チトクロム C は、アポトソームと呼ばれるサイトゾル複合体の重要な因子であり (Riedl, S. J., and Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 405-413)、これはカスパーゼ-9 を活性化して、死のプログラムの不可逆的執行をもたらす (Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 91, 479-489; Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell* 94, 481-490)。

【0004】

リンパ腫の染色体分断点 t(14;18) にあるタンパク質 BCL-2 の発見は、癌細胞が細胞死に耐えるために利用していること、すなわち、BCL-2 活着タンパク質の過剰発現及び致死因子タンパク質 BAX/BAK の隔離という戦略を明らかにした。BCL-2 のファミリーメンバーは、細胞生存又は細胞死を決定する岐路で作動するので、BCL-2 ファミリータンパク質活性を調節する標的薬剤の開発は、無秩序な細胞生存又は早期細胞死の疾患における細胞死を、それぞれ治療的に誘発又は阻害する可能性をもたらさだろう。我々は以前に、BCL-2 ファミリーの天然ペプチド断片を、細胞内の BCL-2 ファミリーメンバーを選択的に同定して標的にできる、BCL-2 の安定化した α -螺旋ドメイン (Stabilized Alpha-Helices of BCL-2 domains ; SAHBs) と呼ばれる、薬理学的構成要素に変換する、「炭化水素架橋」と呼ばれる新規な技術を開発して利用した (Walensky, L. D., Kung, A. L., Escher, I., Malia, T. J., Barbuto, S., Wright, R. D., Wagner, G., Verdine, G. L., and Korsmeyer, S. J. (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix, *Science* (New York, N.Y. 305, 1466-1470))。我々は、劇的に増強された α -螺旋構造、タンパク分解安定性、細胞透過性、及び強力で選択的な標的結合親和性を含む、固有の生物物理学的特性を有する SAHB を開発した。この化合物の離散サブセットは、必須ミトコンドリア致死因子タンパク質 BAX と結合する際立った能力を明らかにした (Walensky, L. D., Pitter, K., Morash, J., Oh, K. J., Barbuto, S., Fisher, J., Smith, E., Verdine, G. L., & Korsmeyer, S. J. (2006) *Molecular Cell* 24, 199-210)。

【0005】

この発見が、NMR 分光法を用いて架橋 BIM-BH3 ペプチドと BAX の間の相互作用に関する構造的基盤の検討を促進させた。この検討を進める中で、その直接活性化のための BAX の明白な結合部位を初めて同定した (Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E. H.-Y.

10

20

30

40

50

、Tjandra, N., Walensky, L.D. (2008) Nature、印刷中)。BAXの活性化を誘発するメカニズムは細胞死分野の長年に渡る謎であって激しい議論の主題であった。BAX上のこの相互作用部位の位置は予測できないものであった。そしてBCL-2ファミリータンパク質についての新規な相互作用メカニズム、及びBAXが直接関与する細胞死を調節するための新規な治療標的の両方を明確にしている。新規部位の遮断がBAX誘発細胞死を効果的に抑制する一方で、リガンド関与はBAX介在アポトーシスを誘発できる。

【0006】

従って、BAX活性化部位の同定は、無秩序な細胞生存又は病的な細胞死によって特徴づけられるヒトの疾患におけるアポトーシスをそれぞれ活性化又は阻害する薬剤の開発に対して重要な意味を有している。BAXは3つの公知の同種プロアポトーシスマルチドメインBCL-2ファミリーメンバーのうちの1つにすぎないので、BAXの直接誘発部位の暗示するものをプロアポトーシスBAK及びBOKへ同様に拡張できるだろう。

【発明の概要】

【0007】

一態様では、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提供し、その方法は：

a) 当該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；

を含有してなり、

ここで、化合物は、当該BCL-2ファミリーポリペプチドの $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している結合部位と相互作用し；

ここで、化合物の結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる。

【0008】

別の態様では、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化合物を同定する方法を提供し、その方法は：

a) 当該BAXポリペプチドの結合部位（ここで結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している）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；
を含有してなり、

ここで、当該化合物は、配列番号1に記載の配列のGlu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147、Leu149、Gly150、Gly156、Gly157、Trp158、Asp159、Leu161、又はLeu162に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合し、そして

ここで、化合物の結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか

10

20

30

40

50

、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる。

【0009】

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モジュレータを同定する方法を提供し、方法は：

a. 当該BCL-2ファミリーポリペプチドの結合部位の三次元構造を用いて（ここで、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している）、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用いて、当該BCL-2ファミリーポリペプチド候補モジュレータを選択すること（ここで、当該候補モジュレータは当該結合部位に結合する）；

を含有してなり、

ここで、候補モジュレータの結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる。

【0010】

別の態様では、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候補化合物を同定する方法を提供し、方法は：

a. BAXポリペプチドの結合部位の三次元構造を提供すること（ここで、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している）；

b. 当該結合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（ここで、化合物の結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる）；及び

c. 当該化合物が、当該結合部位にある配列番号1に記載の配列のGlu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147、Leu149、Gly150、Gly156、Gly157、Trp158、Asp159、Leu161、又はLeu162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（ここで、結合部位の当該アミノ酸残基と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。

【0011】

一態様では、本発明は、対象における疾患を治療する方法を提供し、方法は、治療を必要とする当該対象に、上記方法の何れか1つによって同定された化合物の、当該対象が当該疾患を治療されるような、有効量を投与することを含有してなる。

【0012】

別の態様では、本発明は、対象における疾患を治療する方法を提供し（ここで、対象は当該疾患の治療を必要としていると確認されている）、方法は、BCL-2ファミリーポリペプチド又はBAXの結合部位と結合する、請求項1～4の何れか一項に記載の方法によって同定された化合物（ここで、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の

10

20

30

40

50

間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有していて、当該化合物はBCL-2ファミリーポリペプチド又はBAXを調節する)の、当該対象が当該疾患を治療されるような、有効量を投与することを含有してなる。

【0013】

ある特定の態様では、本発明は、対象における癌又は腫瘍を治療する方法を提供し(ここで、対象は当該疾患の治療を必要としていると確認されている)、方法は、BCL-2ファミリーポリペプチドと結合する化合物の有効量を当該対象に投与することを含有してなる(ここで、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有していて、当該化合物はBAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化し、当該化合物は配列番号1に記載の配列のアミノ酸残基Glu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147、Leu149、Gly150、Gly156、Gly157、Trp158、Asp159、Leu161、又はLeu162の1つ又はそれ以上と結合し、結合部位は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる)。

【0014】

一態様では、本発明は、BCL-2関連疾患を治療するための組成物を提供し、ここで当該組成物は：

BCL-2ファミリーポリペプチドの結合部位と結合する化合物(ここで、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有していて、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、化合物は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で結合部位と相互作用する)；及び

有機化合物、ポリペプチド及び核酸又はそれらの組み合わせから選ばれる第2化合物：を含有してなる(ここで、組成物はBCL-2ファミリーポリペプチドの結合部位と結合する)。

【0015】

上記のような組成物及び使用説明書を含有してなるキットも本発明によって意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、BCL-2ファミリータンパク質の3つの異なった種類がどのようにしてアポトーシスを調節するために相互作用しているかを図示している。

【図2】図2は、選択したBCL-2ファミリーメンバーのリストを示し、それらの保存BCL-2相同(BH)ドメインを強調している。

【図3】図3は、アンチアポトーシスBCL-2ファミリーメンバーのBH3結合ポケットを図示している。

【図4】図4は、BAXの直接活性化で始まり、BAX介在ミトコンドリア損傷に終わる、一連の事象を説明している。

【図5】図5は、NMR分析で確認した、BAX上の新たに同定されたBH3相互作用部位の位置を明示している。重要なことは、BIM S A H Bが、アンチアポトーシスタンパク質に対して同定されて図3に示されている標準的なBH3結合部位とは異なっている構造位置でBAXを取り込むことである。

【図6】図6は、BIM S A H B-BAX相互作用のNMR分析によって確認した、BAX上の新規なBH3相互作用部位のトポグラフィー（A）及びBAX結合部位におけるBIM BH3の位置付けのトポグラフィー（B）を明示している。

【図7】図7は、BAX上の新規なBH3結合部位の残基を強調した、BAXのアミノ酸配列を示す（A）。BAXのリボン図（B）及び表面図（C）において、BIM BH3相互作用に参与するBAX残基を強調している。

10

【図8】図8は、BAX活性化因子BH3ペプチド、及び炭化水素架橋誘導体の配列を列挙している。

【図9】図9は、新規な相互作用部位の仮想スクリーンから同定した分子が、いかに水平な疎水性の溝（A）、上部近傍ループ領域（B）、及び下部近傍ループ領域（C）を修飾するかを示している。

【図10】図10は、BAX上の新規なBH3結合部位又はその隣接部位におけるリガンド相互作用に関連している残基を強調してある、BAXのアミノ酸配列を示す（A）。BAXのリボン図（B）及び表面図（C）において、リガンド相互作用に参与するBAX残基を強調している。

【図11】図11は、仮想スクリーンによって同定された化合物が新規な相互作用部位でのBAX結合に対して、効果的且つ用量依存的にFITC-S A H Bと競合することを明らかにしている、競合的蛍光偏光結合アッセイを示している。

20

【図12A】図12Aは、BIM S A H Bなどの、直接BAX活性化化合物を適用して、BAXのそのモノマーからオリゴマー状態への変換をサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によってモニタリングすることを含むBAXオリゴマー形成アッセイを示している。

【図12B】図12Bは、仮想スクリーンにより同定された化合物が、如何にこのBAXオリゴマー形成アッセイによって検出されるようなBAXオリゴマー形成を誘発するかを示している。

【図13】図13は、仮想スクリーンにより同定された化合物が、如何に動的光散乱を用いるBAXモノマーのそのオリゴマーへの変換によって検出されるような、BAXオリゴマー形成を誘発するかを示している。

30

【図14】図14は、仮想スクリーンにより同定された化合物が、如何にELISAアッセイによって検出されるような、 $Bax^{-1}-Bak^{-1}$ -ミトコンドリアからの組み換えBAX介在チトクロムC放出を誘発するかを示している。

【図15】図15は、同定された化合物5285738（A）及び5258079（B）が、如何にDKO MEFsではなく、BAXが再構築した $Bax^{-1}-Bak^{-1}$ -マウス胚線維芽細胞（DKO MEF）における用量依存性アポトーシスを選択的に誘発するかを示している。

【発明を実施するための形態】

40

【0017】

I. 定義

本明細書で用いられる用語「BCL-2ファミリーポリペプチド」は、わずか1つから4つもの数の保存性BCL-2相同ドメイン（BH1、BH2、BH3及び／又はBH4）を有しているタンパク質の進化的に保存されているファミリーを示す。BHドメインはα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存在している。BCL-2ファミリーポリペプチドは、BCL-2、BCL-XL、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、P

50

UMA、BMF、EGL-1、及び、これに限定されないが、M11L及びE1B-19Kを包含する、ウィルス性同族体を包含する。

【0018】

用語「活性部位」は、その形状、アミノ酸含量、及び荷電電位の結果として、他の化学物質（これに限定されないが、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、分子、核酸、化合物、抗生物質又は薬剤、又はこれらの組み合わせを包含する）と、多種の共有及び／又は非共有結合力によって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、ヒト炭化水素架橋BIMBH3（配列番号3）などの、BCL-2ドメインの安定化α螺旋を結合できる荷電した親水性残基の周辺によって囲まれ、そしてBAXのα螺旋1及び6の並列によって形成される疎水性の溝を包含する。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、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146に対応する2つ又はそれ以上のアミノ酸を含有する。

10

【0019】

用語「結合部位」は、その形状、アミノ酸含量、及び荷電電位の結果として、他の化学物質（これに限定されないが、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、分子、核酸、化合物、抗生物質又は薬剤を包含する）と、多種の共有及び／又は非共有結合力によって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。「結合部位」は、配列番号1に記載の配列のGlu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147、Leu149、Gly150、Gly156、Gly157、Trp158、Asp159、Leu161、Leu162に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸を含有する。

20

30

【0020】

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。幾つかのアミノ酸を、本明細書の以下に記載されているように、ポリペプチドの活性の本質を変えずに、ほぼ同一の特性を有している別のものに変えることができる（同類置換）ということは当該技術分野でよく理解されている。従って、本明細書で用いられるBCL-2ファミリーポリペプチド変異体は、プロー又はアンチアポトーシス活性を有しているポリペプチドを包含する。

40

用語「変異体」は、タンパク質にある参照BCL-2相同ドメイン又はそれらの別の何れかの機能的ドメインと少なくとも30%アミノ酸配列同一性を有してい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、1) 配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、A

50

s p 1 4 2、P h e 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 6 に対応する、少なくとも2つのBAXアミノ酸残基の相対構造座標を含有している三次元構造によって特徴付けられる活性部位；又は2) 配列番号1に記載の配列のG l u 1 7、G l n 1 8、M e t 2 0、L y s 2 1、T h r 2 2、A l a 2 4、L e u 2 5、L e u 2 7、G l n 2 8、G l y 2 9、I l e 3 1、G l n 3 2、A s p 3 3、A r g 3 4、A l a 3 5、G l y 3 6、A r g 3 7、M e t 3 8、G l y 3 9、G l y 4 0、G l u 4 1、A l a 4 2、L e u 4 7、A s p 4 8、P r o 4 9、V a l 5 0、P r o 5 1、G l n 5 2、A s p 5 3、A l a 5 4、S e r 5 5、T h r 5 6、L y s 5 7、L y s 5 8、L e u 5 9、S e r 6 0、G l u 6 1、L y s 6 4、A r g 8 9、P h e 9 2、P h e 9 3、L e u 1 2 2、L e u 1 2 5、T h r 1 2 7、L y s 1 2 8、V a l 1 2 9、P r o 1 3 0、G l u 1 3 1、L e u 1 3 2、I l e 1 3 3、A r g 1 3 4、T h r 1 3 5、M e t 1 3 7、G l y 1 3 8、T r p 1 3 9、L e u 1 4 1、A s p 1 4 2、P h e 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 6、A r g 1 4 7、L e u 1 4 9、G l y 1 5 0、G l y 1 5 6、G l y 1 5 7、T r p 1 5 8、A s p 1 5 9、L e u 1 6 1、L e u 1 6 2 に対応する、少なくとも1つのBAXアミノ酸残基の相対構造座標を含有している三次元構造によって特徴付けられる活性部位：の何れかを含有している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+/-a 標準偏差は、1. 1 オングストローム未満、より好ましくは1. 0 オングストローム未満、そして最も好ましくは0. 5 オングストローム未満である。

【0021】

「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、それらのポリペプチド、又はそれらの生物学的に活性な断片を包含する。

【0022】

本明細書で用いられる用語「荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝」は、図6及び10Aに示されているような、BAX上のBIMBH3相互作用部位の全て又は一部を含む、BAX上のリガンド相互作用の領域を示す。

【0023】

本明細書で用いる用語「上部近傍ループ」は、図10Bに示されているような、α1-α2ループに近接して位置して、水平な疎水性の溝の中間点から上に伸長している残基を包含しているリガンド相互作用部位の部分を示す。

【0024】

本明細書で用いる用語「下部近傍ループ」は、図10Bに示されているような、α1-α2ループに近接して位置して、水平な疎水性の溝の中間点から下に伸長している残基を包含しているリガンド相互作用部位の部分を示す。

【0025】

本明細書で用いる用語「α1-α2の間のループ」は、BAXのα螺旋1とα螺旋2の間に位置している残基を示す。

【0026】

用語「疎水性パッチ」は、疎水性部分を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、2、3個又はそれ以上の疎水性アミノ酸残基を含有している。ある特定の態様では、疎水性ポケットは、配列番号1に記載の配列のM e t 2 0、A l a 2 4、L e u 2 5、L e u 2 7、G l y 2 9、I l e 3 1、L e u 4 7、V a l 5 0、P h e 9 2、P h e 9 3、I l e 1 3 3、A r g 1 3 4、M e t 1 3 7、G l y 1 3 8、T r p 1 3 9、L e u 1 4 1、P h e 1 4 3 に対応するアミノ酸残基を含有している。

【0027】

用語「荷電／親水性パッチ」は、荷電しているか或い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／親水性パッチは、1、2、3個又はそれ以上の荷電

しているか或いは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／親水性パッチは、配列番号1に記載の配列のG l u 1 7、L y s 2 1、T h r 2 2、G l n 2 8、G l n 3 2、A s p 3 3、A s p 4 8、G l n 5 2、A s p 5 3、T h r 5 6、A r g 8 9、G l u 1 3 1、A r g 1 3 4、T h r 1 3 5、A s p 1 4 2、A r g 1 4 5、G l u 1 4 6、A r g 1 4 7に対応するアミノ酸残基を含有している。

【0028】

用語「疎水性アミノ酸」は、相対的に水に不溶性である、非荷電で非極性の側鎖を有している天然又は非天然のアミノ酸又はそれらの類似物の何れかを意味する。天然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。

10

【0029】

用語「親水性アミノ酸」は、相対的に水溶性である、非荷電で極性の側鎖を有している天然又は非天然のアミノ酸又はそれらの類似物の何れかを意味する。天然の親水性アミノ酸の例は、セリン、スレオニン、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。

【0030】

用語「負に荷電したアミノ酸」は、通常の生理学的条件下で負に荷電する側鎖を有している天然の又は非天然のアミノ酸又はそれらの類似物の何れかを包含する。負に荷電している天然の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。

【0031】

用語「正に荷電したアミノ酸」は、通常の生理学的条件下で正に荷電する側鎖を有している天然の又は非天然のアミノ酸又はそれらの類似物の何れかを包含する。正に荷電している天然の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。

20

【0032】

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、B H 1、B H 2、B H 3、及び／又はB H 4を有することによって特徴付けられ、そしてアポトーシスを減弱若しくは阻害して細胞の生存を促進する、B C L－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、B C L－2ファミリーポリペプチド内のアンチアポトーシスB C L－2相同ドメインと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、タンパク質、又はそれらの生物学的に活性な断片を包含する。好ましい実施態様では、B C L－2相同ドメインは、B c l－2（配列番号8）のL e u 9 7、G l y 1 0 1及びA s p 1 0 2に対応するアミノ酸残基などの、1つ又はそれ以上の保存アミノ酸残基を含有し：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、B C L－2、B C L－X L、B C L－w、M C L－1、A 1／B F L－1、B C L－B、B O O／D I V A、N r－1 3又はC E D－9を包含する。

30

【0033】

用語「プロ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、B H 1、B H 2、及び／又はB H 3を有することによって特徴付けられ、そしてアポトーシスを活性化して細胞死を促進する、B C L－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、B C L－2ファミリーポリペプチド内のプロアポトーシスB C L－2相同ドメインと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、タンパク質、又はそれらの生物学的に活性な断片を包含する。好ましい実施態様では、B C L－2相同ドメインは、B A X（配列番号1）のL e u 9 2、G l y 9 6及びA s p 9 7に対応するアミノ酸残基などの、1つ又はそれ以上の保存アミノ酸残基を含有する。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、B A X、B A K、B O K／M T D、B I D B A D、B I K／N B K、B L K、H R K、B I M／B O D、B N I P 3、N I X、N O X A、P U M A、B M F及びE G L－1を包含する。

40

【0034】

50

本明細書で用いられる用語「アポトーシス」は、エンドヌクレアーゼ活性、染色体移動、細胞核内の辺縁趨向、アポトーシス小体の形成、ミトコンドリアの膨張、ミトコンドリア稜の拡大、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に関連していても関連していなくてもよい、デオキシリボ核酸（DNA）の断片化、クロマチンの凝縮などの、容易に観察可能な形態学的及び生化学的な変化によって特徴づけられる細胞死の選択的形態を誘導する、生化学的事象の制御されたネットワークを示す。

【0035】

用語「化合物」は、化学物質、ポリペプチド、核酸又はそれらの組み合わせ、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）の混合物又は合成的組み合わせ、それらの塩及び溶媒和物、等を示すよう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。「モジュレータ」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。

10

【0036】

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と結合することが見出され、それによりBCL-2ファミリーポリペプチドの活性を調節すると考えられる、化学物質、ポリペプチド、核酸又はそれらの組み合わせ、又は化学化合物及び／又はポリペプチド及び／又は核酸の混合物又は合成的組み合わせ、それらの塩及び溶媒和物、等を示すように本明細書で用いられている。

20

【0037】

化合物に関連して本明細書で用いられている用語「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の活性、又は生化学的経路を制御するBCL-2ファミリーメンバーに関連するタンパク質-タンパク質相互作用（例えば、小胞体ストレス応答、グルコース刺激性インスリン分泌）の活性化又は阻害を示す。アンチアポトーシス、プロアポトーシス及びその他の生化学的活性（例えば、小胞体ストレス応答、グルコース刺激性インスリン分泌）の両方をアッセイ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。

【0038】

本明細書で用いられる用語「相互作用する」又は「結合する」は、化合物又はそれらの部分と、BCL-2ファミリーポリペプチド又はそれらの部分の活性部位との間の近接の状態を示す。相互作用は、化合物上の1つ又はそれ以上の部分と、活性部位領域のアミノ酸上の1つ又はそれ以上の部分との間にある。結合は、非共有（ここで、並置が、水素結合、又はファン・デル・ワールス若しくは静電的相互作用によってエネルギー的に有利である）であっても、共有であってもよい。

30

【0039】

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の活性、或いはタンパク質-タンパク質相互作用に基づくその他の定義された生化学的な活性の増大を示す。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と結合して、その化合物を欠如している対照と比較したときに、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1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍又はそれ以上増大するだろう。別の実施態様では、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と結合して、その化合物を欠如している対照と比較したときに、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1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍又はそれ以上増大するだろう。アンチアポトーシス及びプロアポトーシスの活性の活性化を評価するアッセイ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。

40

【0040】

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

50

ロアポトーシスの活性、又はタンパク質-タンパク質相互作用に基づく別に定義された生化学的活性を減少又は遮断することを示す。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化を抑制するか或いは活性を減少するだろう。従って、この化合物はプロアポトーシス活性の効果を阻害又は減少するだろう。従って、プロアポトーシス活性、例えば、細胞死が、化合物が存在していない対照の細胞集団と比較すると、阻害剤が存在している細胞の集団において、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%又はそれ未満に少なくなるだろう。

【0041】

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又は結合部位と結合して、アンチアポトーシス活性を抑制又は阻害するだろう。従って、アンチアポトーシス活性、例えば、細胞の生存が、化合物が存在していない対照の細胞集団と比較すると、阻害剤が存在している細胞の集団において、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%又はそれ未満に少なくなるだろう。

【0042】

本明細書で用いられている用語「BH3 SAHB」は、安定化した α 螺旋を形成するために炭化水素架橋されている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が本明細書に記載されている。BH3 SAHBを作る方法は当該技術分野において公知であって、2004年11月5日に

【0043】

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。一実施態様では、BIM BH3ポリペプチドは、配列番号3に記載の配列（図8）と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Leu152、Gly156、及びAsp157に対応するアミノ酸残基又はこれらの同類置換の1つ又はそれ以上を包含している。好ましい実施態様では、BIM BH3ポリペプチドは配列番号3のアミノ酸配列又はそれらのSAHB誘導体（図8）を有している。

【0044】

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。一実施態様では、BID BH3ポリペプチドは、配列番号5に記載の配列（図8）と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4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これらの同類置換の1つ又はそれ以上を包含している。好ましい実施態様では、BID BH3ポリペプチドは配列番号5のアミノ酸配列又はそれらのSAHB誘導体（図8）を有している。

【0045】

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。一実施態様では、PUMA BH3ポリペプチドは、配列番号7に記載の配列（図8）と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Leu141、Ala145、及びAsp146に対応するアミノ酸残基又はこれらの同類置換の1つ又はそれ以上を包含している。好ましい実施態様では、PUMA BH3ポリペプチドは配列番号7のアミノ酸配列又はそれらのSAHB誘導体（図8）を有している。

【0046】

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。一実施態様では、BAX BH3ポリペプチドは、配列番号8に記載の配列（図8）と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、Gly67、及びAsp68に対応するアミノ酸残基又はこれらの同類置換の1つ又はそれ以上を包含している。好ましい実施態様では、BAX BH3ポリペプチドは配列番号8のアミノ酸配列又はそれらのSAHB誘導体（図8）を有している。

【0047】

本明細書で用いられる用語「BAX活性化BH3コンセンサスポリペプチド」は、新規な相互作用部位におけるBAX結合のためのコンセンサス配列を含有しているポリペプチドを示す。一実施態様では、BAX活性化BH3コンセンサスポリペプチドは、配列番号9に記載の配列（図8）と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又はそれらのSAHB誘導体を有している。

【0048】

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、意図する薬理学的、治療的又は予防的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改善をもたらす、又は疾患の進行を防ぎ、或いは疾患の退縮をもたらす。

例えば、無秩序又は過剰な細胞生存又は増殖の治療に関しては、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%まで、腫瘍成長の速度を減少し、腫瘍の大きさを減少し、転移の数を減少し、腫瘍進行の時間を増大し、或いは生存時間を増大する治療薬物の量を示すことが好ましい。

例えば、増大する細胞死に関連する疾患、例えば、虚血の治療に関しては、治療有効量は、治療を行わなかった場合に起こるであろう組織及び／又は細胞の損傷を阻止又は制限する治療薬剤の量を示すことが好ましい。治療薬剤は、組織及び／又は細胞損傷を、本発明の治療薬剤の投与なしで起こる損傷と比較すると、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%まで減少する。

【0049】

疾患（例えば、過剰増殖性疾患、過剰な細胞生存又は増殖）に関連して本明細書で用いられる用語「治療する」、及び「治療すること」は、動物における病的細胞（例えば、過剰増殖性又は腫瘍性細胞）の発生の減少を示す。阻止は完全、例えば対象における病的細胞の皆無、であってよい。阻止は、対象における病的細胞の発生を、本発明なしで発生するより少なくするような、部分的であってもよい。ある実施態様では、このような用語は、1つ又はそれ以上の治療薬の投与によって：（1）癌細胞集団の安定化、減少又は除去、（2）寛解期間の増大、（3）癌の再発率の減少、（4）癌の再発時間の増大、及び（6）患者の生存率の増大：の1つ、2つ、3つ又はそれ以上もたらすことを示す。

【0050】

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る用語「治療する」、及び「治療すること」は、動物において組織及び／又は細胞損傷の発生を減少することを示す。阻止は完全、例えば、対象に組織損傷が皆無であってよい。阻止は、対

10

20

30

40

50

象における組織損傷が、治療薬無しで発生するものよりも少ないように、部分的であってもよい。

【0051】

本明細書で用いられる用語「BCL-2 関連疾患」は、無秩序な BCL-2 ファミリーメンバーに関連している疾患を示す。BCL-2 関連疾患は、過剰な細胞生存及び／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と関連している。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。

【0052】

本明細書で用いられる「過剰増殖性疾患」は、癌、腫瘍性成長、過形成性或いは増殖性成長、又は異常な細胞生育或いは生存の病的状態を意味して、固形癌、非固形癌、及び白血病で見られるような、異常な細胞増殖又は蓄積の何れかを包含する。

10

【0053】

本明細書で用いられる用語「抗癌剤」及び「抗癌薬」は、癌のような過剰増殖性疾患の治療で用いられている、何れかの治療薬（例えば、化学療法化合物及び／又は分子治療化合物）、アンチセンス治療薬、核酸治療薬（例えば RNAi）、放射線治療薬を示す。一実施態様では、本発明は、抗癌剤と、本明細書に記載されているように BCL-2 ファミリーペプチドの活性部位に結合する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対象にしている。

【0054】

本明細書で用いられる用語「構造座標」は、分子又は分子複合体中の別の原子に対する原子の空間関係に対応しているデカルト座標を示す。構造座標は、X線結晶学的技法又は NMR 技法を用いて得ることができ、或いは分子置換分析又はホモロジーモデリングを用いて導くことができる。多種のソフトウェアプログラムが、分子又は分子複合体の三次元表示を得るための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についての構造座標は当該技術分野において公知であって、公的に入手できる。

20

【0055】

用語「相互作用テンプレート」は、分子又は分子複合体中の別の原子に対する原子の空間関係に対応しているデカルト座標を用いて構築された三次元モデルを示す。構造座標は、X線結晶学的技法又は NMR 技法を用いて得ることができ、或いは分子置換分析又はホモロジーモデリングを用いて導くことができる。多種のソフトウェアプログラムが、分子又は分子複合体の三次元表示を得るための構造座標セットのグラフ表示を可能にしている。BCL-2 ファミリーポリペプチドの構造座標は、当該技術分野において公知であって、例えば、Protein Data Bank (“PDB”) (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://www.rcsb.org>)に見出すことができる。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. 1lx1)、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を包含する。

30

【0056】

相互作用テンプレートは、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有している BAX ポリペプチドのものが好ましく、ここで、BAX ポリペプチドの活性部位は溶媒に感受性であって、モジュレータ、例えば活性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促進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／構造アラインメントを別の BCL-2 ファミリーポリペプチドと比較して作成し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、当業者が別の BCL-2 ファミリーポリペプチドの対応する活性部位を同定して、ポリペプチドのモジュレータを設計／スクリーニングすることを可能にする。

40

【0057】

50

アミノ酸の位置、例えば、配列番号1に記載の配列のA1a149に関して本明細書で用いられている、用語「に対応している」は、第1ポリペプチドと参照ポリペプチドの配列が相同性又は別のアルゴリズム（例えば、構造比較）によって整列しているときに、参照ポリペプチド配列、例えばBAKの所定のアミノ酸と整列される第1ポリペプチド配列、例えばBAXのアミノ酸を示す。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、このバージョン用のデフォルトパラメータを有するBLASTPバージョン2.2.2を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1ポリペプチド配列及び第2ポリペプチド配列の構造比較によっても同定できる。このような構造比較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。例えば、Petros et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644; 83-94 (2004) and Suzuki et al., *Cell*. 103; 645-654 (2000) は、BCL-2ファミリーメンバーの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。

10

【0058】

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、限定されないで、ペプチド中に見出される20個の通常天然アミノ酸（例えば、A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、V（1文字略号として知られている））、更に有機合成又はその他の代謝経路で製造される天然又は非天然のアミノ酸のD-及びL-異性体の両方を包含する。

【0059】

「非-必須」アミノ酸残基は、そのBAX結合能力を無効或いは実質的に変えることなくポリペプチド（例えばBIMBH3）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配列から変えたときに、BAX活性部位又は結合部位に対するポリペプチドの結合活性の無効又は実質的な減少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あって本明細書に記載されている方法によって容易に確認できる。本明細書で用いる用語「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。

20

【0060】

「同類アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基又はその化学的に類似する残基で置換されるということである。例えば、類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは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）、酸性の側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、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）、β分岐側鎖（例えば、スレオニン、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）を有するアミノ酸を包含する。その他の同類アミノ酸置換は、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場合のように、アミノ酸側鎖ファミリーを越えて生じることもある。従って、BH3ドメインポリペプチド中の予想される非必須アミノ酸残基を、例えば、同一側鎖ファミリー又はファミリーを越える同族体（例えば、アスパラギンをアスパラギン酸へ、グルタミンをグルタミン酸へ）由来の別のアミノ酸残基と置換することが好ましい。更に、コードされる配列における単一アミノ酸又はアミノ酸の数パーセントを変更、付加又は欠失する個々の置換、削除又は付加も同類置換」と考えられる。

30

40

【0061】

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」又は「同一パーセント」は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて測定して、又は目視検査によって、比較又は最大一致整列したときに、同一であるか或いは特定のパーセント同一であるヌクレオチド又はアミノ酸を有している2つ又はそれ以上の配列又は副配列を示す。

【0062】

50

2つ又はそれ以上のポリペプチド配列に関連している用語「相同」又は「相同パーセント」は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて測定して、又は目視検査によって、比較又は最大一致整列したときに同一であるか、又は特定のパーセント同一であるアミノ酸残基、或いはその同類置換を有している2つ又はそれ以上の配列又は副配列を示す。例としては、第1領域のアミノ酸配列が、第1領域中に含有されてい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、又は以下で検討するような、当該技術分野で公知のコンピューター相同プログラムによって整列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て、第2の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第2領域と、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、或いはさらに95%も同一である場合に、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相同であると考えられる。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1つ又はそれ以上の保存アミノ酸残基を包含していることが好ましい。

10

【0063】

II. 詳細な説明

一態様では、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有機分子を同定する方法を提供し、方法は：

a) 当該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；

20

を含有してなり、

ここで、化合物は、当該BCL-2ファミリーポリペプチドの $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ 間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している結合部位と相互作用し、

ここで、化合物の結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる。

【0064】

第2の態様では、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有機分子化合物を同定する方法を提供し、その方法は：

30

a) 当該BAXポリペプチドの結合部位（ここで、結合部位は $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している）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；
を含有してなり、

ここで、当該化合物は、配列番号1に記載の配列のGlu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147、Leu149、Gly150、Gly156、Gly157、Trp158、Asp159、Leu161、Leu162に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合し、そして

40

50

ここで、化合物の結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる。

【0065】

第3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有機分子モジュレータを同定する方法を提供し、方法は：

a) 当該BCL-2ファミリーポリペプチドの結合部位の三次元構造を用いて（ここで、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している）、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用いて当該BCL-2ファミリーポリペプチド候補モジュレータを選択すること（ここで、当該候補モジュレータは当該結合部位に結合する）：

を含有してなり、

ここで、候補モジュレータの結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる。

【0066】

第4の態様では、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候補有機分子化合物を同定する方法を提供し、方法は：

a) BAXポリペプチドの結合部位の三次元構造を提供すること（ここで、当該結合部位は $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ の間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有している）；

b) 当該結合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（ここで、化合物の結合部位との相互作用は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で起こる）；及び

c) 当該化合物が、当該結合部位の配列番号1に記載の配列のGlu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147、Leu149、Gly150、Gly156、Gly157、Trp158、Asp159、Leu161、Leu162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（ここで、結合部位の当該アミノ酸残基と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。

【0067】

ある特定の実施態様では、当該化合物は有機化合物である。別の実施態様では、当該化合物は表1から選ばれ、そして表1の化合物の誘導体を更に含有してもよく、ここで当該誘導体は結合親和性、活性、溶解度又はその他の薬理学的特性を改善する。

【0068】

一実施態様では、当該BCL-2ファミリーポリペプチドはプロアポトーシスポリペプチドである。

【0069】

10

20

30

40

50

更なる実施態様では、当該プロアポトーシスポリペプチドはBAXである。別の更なる実施態様では、当該プロアポトーシスポリペプチドはBOK又はBAKである。

【0070】

ある特定の実施態様では、当該BCL-2ファミリーポリペプチドはアンチアポトーシスポリペプチドである。更なる実施態様では、当該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/Div a、Nr-13、Ced-9、ウィルス性同族体、M11L、及びE1B-19Kよりなる群から選ばれる。

【0071】

別の実施態様では、当該活性は、プロアポトーシス活性又はアンチアポトーシス活性である。別の実施態様では、当該調節は当該プロアポトーシス活性の活性化又は阻害である。別の実施態様では、調節は当該アンチアポトーシス活性の活性化又は阻害である。

【0072】

一実施態様では、工程(b)の検出は、

(A) BCL-2ポリペプチドのオリゴマー化、BCL-2ポリペプチド配座異性体の抗体による検出、ミトコンドリアチトクロムCの放出、リポソームの放出、細胞死、ミトコンドリア又は細胞の形態、ミトコンドリアカルシウムの流動、ミトコンドリア膜貫通の定量、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、及び

(B) 収率及び最適化タンパク質発現及び精製条件に渡る安定性を最大にして、モノマー、ダイマー又はオリゴマー配座異性体を安定化するポリペプチド突然変異体及び種を生成するために特に製造されたBCL-2ポリペプチドタンパク質を使用すること、を含有してなる。

【0073】

ある特定の実施態様では、当該化合物は、結合部位において、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。

【0074】

別の実施態様では、当該化合物は、結合部位において、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と結合する。

【0075】

別の実施態様では、当該化合物は、結合部位において、配列番号1に記載の配列のLys21に対応するアミノ酸残基と結合する。

【0076】

ある特定の実施態様では、当該化合物は、結合部位において、配列番号1に記載の配列のGlu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Th

r 1 3 5、M e t 1 3 7、G l y 1 3 8、T r p 1 3 9、L e u 1 4 1、A s p 1 4 2、P h e 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 6、A r g 1 4 7、L e u 1 4 9、G l y 1 5 0、G l y 1 5 6、G l y 1 5 7、T r p 1 5 8、A s p 1 5 9、L e u 1 6 1、L e u 1 6 2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。

【0077】

一実施態様では、当該化合物は更に有機化合物、ポリペプチド、核酸又はそれらの組み合わせを含有する。

【0078】

更なる実施態様では、当該化合物は、表1中の第2の化合物と結合している表1の化合物を含有するか、又は表1に列挙される化合物若しくはそれらの化学サブ成分の組み合わせ、及びそれらの誘導体を含有する。

10

【0079】

別の実施態様では、当該第2の化合物は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で結合部位と相互作用する。

【0080】

ある特定の実施態様では、当該化合物は更にBIMポリペプチドを含有する。

【0081】

別の実施態様では、当該化合物は更にBIM BH3ペプチド（配列番号3）又はそれらのSAHB誘導体を含有する。

20

【0082】

別の実施態様では、当該化合物は更に、配列番号3に記載の配列と30%又はそれ以上同一のアミノ酸配列を含有して、そして配列番号2に記載の配列のI l e 1 4 8、L 1 5 2、A r g 1 5 3、A r g 1 5 4、G l y 1 5 6、A s p 1 5、G l u 1 5 8、又はA s n 1 6 0に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類天然又は非天然アミノ酸置換を含有する。

【0083】

別の実施態様では、当該化合物は、更に配列番号2に記載の配列のI l e 1 4 8、A l a 1 4 9、L 1 5 2、A r g 1 5 3、A r g 1 5 4、I l e 1 5 5、G l y 1 5 6、A s p 1 5 7、G l u 1 5 8、A s n 1 6 0、A l a 1 6 1、又はT y r 1 6 3に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類天然又は非天然アミノ酸置換を含有する。

30

【0084】

一実施態様では、当該化合物は更にBIDポリペプチドを含有する。

【0085】

別の実施態様では、当該化合物は更にBID BH3ペプチド（配列番号5）又はそれらのSAHB誘導体を含有する。

【0086】

更に別の実施態様では、当該化合物は更にPUMAポリペプチドを含有する。

【0087】

ある特定の実施態様では、当該化合物は更にPUMA BH3ペプチド（配列番号7）又はそれらのSAHB誘導体を含有する。

40

【0088】

別の実施態様では、当該化合物は更にBAXポリペプチドを含有する。

【0089】

ある特定の実施態様では、当該化合物は更にBAX BH3ペプチド（配列番号8）又はそれらのSAHB誘導体を含有する。

【0090】

一実施態様では、当該化合物は更に、これに限定されないが、BID、BAD、BIK/NBK、BLK、HRK、BIM/BOD、BNIP3、NIX、NOXA、PUMA、BMF及びEGL-1又はこれらのBH3領域を含有している、BH3-オンリータン

50

パク質の群から選ばれるポリペプチドを含有する。

【0091】

一実施態様では、当該化合物は更に、BCL-2、BCL-XL、BCL-w、Bcl-B、MCL-1、A1/BFL-1、BOO/DIVA、NR-13、CED-9、ウィルス性同族体、M11L、及びE1B-19Kよりなる群から選ばれるポリペプチドを含有する。

【0092】

別の実施態様では、当該化合物は更に、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する。

【0093】

別の実施態様では、当該化合物は更に、配列番号3に記載の配列と30%同一のBH3領域ポリペプチドを含有していて、そして配列番号2に記載の配列のLeu152、Gly156、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する。

【0094】

ある特定の実施態様では、当該化合物は更に、配列番号5に記載の配列と30%同一のBH3領域ポリペプチドを含有していて、そして配列番号4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する。

【0095】

別の実施態様では、当該化合物は更に、配列番号7に記載の配列と30%同一のBH3領域ポリペプチドを含有していて、そして配列番号6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する。

【0096】

ある特定の実施態様では、当該化合物は更に、配列番号8に記載の配列と30%同一のBH3領域ポリペプチドを含有していて、そして配列番号1に記載の配列のLeu63、Gly67及びAsp68に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類置換を含有する。

【0097】

一実施態様では、当該化合物は更に、配列番号9において同定されるようなBAX活性部位へ結合するBH3のコンセンサス配列と30%同一であるポリペプチド及びそれらの同類置換を含有する。

【0098】

一実施態様では、当該化合物は<1mMの親和性で当該結合部位と結合する。

【0099】

別の態様では、本発明は対象における疾患を治療する方法を提供し、方法は、当該対象が当該疾患を治療されるように、上記の方法によって同定された化合物の有効量を、それを必要としている当該対象に投与することを含有してなる。

【0100】

別の態様では、本発明は対象における疾患を治療する方法を提供し、ここにおいて、対象は当該疾患を治療する必要があると確認されていて、

方法は、BCL-2ファミリーポリペプチド又はBAXの結合部位と結合する、特許請求の範囲第1～4項の何れか一項に記載の方法によって同定された化合物（ここにおいて、当該結合部位は、 α 1螺旋、 α 2螺旋、 α 1- α 2間のループ、 α 6螺旋、並びに α 4、 α 5及び α 8螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有していて、当該化合物はBCL-2ファミリーポリペプチド又はBAXを調節する）の有効量を、当該対象が当該疾患の治療を受けられるように、当該対象に投与することを含有してなる。

【0101】

一実施態様では、当該疾患は細胞増殖又はアポトーシス遮断の障害である。

【0102】

別の実施態様では、当該細胞増殖又はアポトーシス遮断の疾患は癌又は自己免疫疾患である。

10

20

30

40

50

【0103】

更なる実施態様では、当該癌は固形癌、白血病、及びリンパ腫よりなる群から選ばれる。更なる実施態様では、当該癌は化学療法耐性の癌である。更に別の実施態様では、当該化学療法耐性癌は、A B T-7 3 7、A B T-2 6 3、オバトクラックス (obatoclax)、又はその他のB C L-2 生存タンパク質阻害因子に耐性である。

【0104】

一実施態様では、当該疾患は細胞消失の障害である。

【0105】

別の実施態様では、化合物はB A X活性を阻害する。

【0106】

ある特定の実施態様では、当該細胞消失障害は神経変性、心臓発作、又は脳卒中である。

【0107】

別の態様では、本発明は対象における癌又は腫瘍を治療する方法を提供し、ここにおいて、対象は当該疾患を治療する必要があると確認されていて、

方法は、B C L-2 ファミリーポリペプチドの結合部位と結合する化合物の有効量を当該対象へ投与することを含有してなる（ここにおいて、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ 間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有していて、当該化合物はB A Xポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化し、ここにおいて当該化合物は配列番号1に記載の配列のG l u 1 7、G l n 1 8、M e t 2 0、L y s 2 1、T h r 2 2、A l a 2 4、L e u 2 5、L e u 2 7、G l n 2 8、G l y 2 9、I l e 3 1、G l n 3 2、A s p 3 3、A r g 3 4、A l a 3 5、G l y 3 6、A r g 3 7、M e t 3 8、G l y 3 9、G l y 4 0、G l u 4 1、A l a 4 2、L e u 4 7、A s p 4 8、P r o 4 9、V a l 5 0、P r o 5 1、G l n 5 2、A s p 5 3、A l a 5 4、S e r 5 5、T h r 5 6、L y s 5 7、L y s 5 8、L e u 5 9、S e r 6 0、G l u 6 1、L y s 6 4、A r g 8 9、P h e 9 2、P h e 9 3、L e u 1 2 2、L e u 1 2 5、T h r 1 2 7、L y s 1 2 8、V a l 1 2 9、P r o 1 3 0、G l u 1 3 1、L e u 1 3 2、I l e 1 3 3、A r g 1 3 4、T h r 1 3 5、M e t 1 3 7、G l y 1 3 8、T r p 1 3 9、L e u 1 4 1、A s p 1 4 2、P h e 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 6、A r g 1 4 7、L e u 1 4 9、G l y 1 5 0、G l y 1 5 6、G l y 1 5 7、T r p 1 5 8、A s p 1 5 9、L e u 1 6 1、L e u 1 6 2の1つ又はそれ以上と結合し、ここにおいて結合部位は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所に生じる）。

【0108】

別の態様では、本発明はB C L-2 関連疾患を治療するための組成物を提供し、ここにおいて、当該組成物は：

B C L-2 ファミリーポリペプチドの結合部位と結合する化合物（ここにおいて、当該結合部位は、 $\alpha 1$ 螺旋、 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 1-\alpha 2$ 間のループ、 $\alpha 6$ 螺旋、並びに $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 及び $\alpha 8$ 螺旋の選択残基の内の1つ又はそれ以上を含有していて、ここにおいて、当該化合物はB C L-2 ファミリーポリペプチドの活性を調節し、ここにおいて、当該化合物は、荷電した親水性残基の周辺を有しているか、又は有していない水平な疎水性の溝、上部近傍ループ、下部近傍ループ、或いはこれらの組み合わせの場所で結合部位と相互作用する）；及び

有機化合物、ポリペプチド及び核酸又はそれらの組み合わせから選ばれる第2化合物：からなっている含有している（ここにおいて、組成物は当該B C L-2 ファミリーポリペプチドの結合部位と結合する）。

【0109】

一実施態様では、当該化合物は有機化合物である。

【0110】

別の実施態様では、当該化合物は表 1 中の化合物から選ばれる。

【0111】

ある特定の実施態様では、当該化合物は表 1 中の化合物から選ばれる化合物の組み合わせから誘導される。

【0112】

別の実施態様では、当該第 2 化合物は有機化合物である。

【0113】

ある特定の実施態様では、当該第 2 化合物はポリペプチドである。

【0114】

別の実施態様では、当該第 2 化合物は、BIM、BID、BAX、PUMA、BAK 及び BOK よりなる群から選ばれる。 10

【0115】

一実施態様では、当該 BCL-2 ファミリーポリペプチドはプロアポトーシスポリペプチドである。

【0116】

更なる実施態様では、当該プロアポトーシスポリペプチドは BAX である。

【0117】

更なる実施態様では、当該プロアポトーシスポリペプチドは BOK 又は BAK である。

【0118】

別の実施態様では、当該 BCL-2 ファミリーポリペプチドはアンチアポトーシスポリペプチドである。 20

【0119】

更なる実施態様では、当該アンチアポトーシスポリペプチドは、BCL-2、BCL-XL、BCL-w、BCL-B、MCL-1、Bfl-1/A1、BOO/DIVA、NRR-13、CED-9、又はウィルス性同族体（例えば、M11L、E1B-19K 等）よりなる群から選ばれる。

【0120】

別の実施態様では、当該調節はプロアポトーシス活性の活性化又は阻害である。

【0121】

別の実施態様では、当該調節はアンチアポトーシス活性の活性化又は阻害である。 30

【0122】

別の実施態様では、当該組成物は、結合部位において、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 から選ばれる 1 つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合する。

【0123】

別の実施態様では、当該化合物は、結合部位において、配列番号 1 に記載の配列の Met20、Lys21、Ala24、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Met137、Leu141、Asp142 から選ばれる 1 つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合する。 40

【0124】

別の実施態様では、当該化合物は、結合部位において、配列番号 1 に記載の配列の Lys21 に対応するアミノ酸残基と結合する。

【0125】

一実施態様では、当該化合物は、結合部位において、配列番号 1 に記載の配列の Glu17、Gln18、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、L 50

Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Arg34、Ala35、Gly36、Arg37、Met38、Gly39、Gly40、Glu41、Ala42、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Ala54、Ser55、Thr56、Lys57、Lys58、Leu59、Ser60、Glu61、Lys64、Arg89、Phe92、Phe93、Leu122、Leu125、Thr127、Lys128、Val129、Pro130、Glu131、Leu132、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147、Leu149、Gly150、Gly156、Gly157、Trp158、Asp159、Leu161、Leu162から

10

選ばれる1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合する。

【0126】

ある特定の実施態様では、当該第2化合物はBIMポリペプチドである。

【0127】

別の実施態様では、当該第2化合物はBIM BH3ポリペプチド又はそれらのSAHB誘導体である。

【0128】

別の実施態様では、当該第2化合物は配列番号3に記載の配列と30%又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有するアミノ酸であって、配列番号2に記載の配列のIle148、L152、Arg153、Arg154、Gly156、Asp157、Glu158、或いはAsn160に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類の天然又は非天然のアミノ酸置換を含有している。

20

【0129】

別の実施態様では、当該第2化合物は配列番号2のアミノ酸残基Ile148、Ala149、L152、Arg153、Arg154、Ile155、Gly156、Asp157、Glu158、Asn160、Ala161、又はTyr163を含有するアミノ酸である。

【0130】

別の実施態様では、当該第2化合物はBIDポリペプチドである。

【0131】

ある特定の実施態様では、当該第2化合物はBID BH3ペプチド又はそれらのSAHB誘導体である。

30

【0132】

ある特定の実施態様では、当該第2化合物はPUMAポリペプチドである。

【0133】

更なる実施態様では、当該第2化合物はPUMA BH3ペプチド又はそれらのSAHB誘導体である。

【0134】

別の実施態様では、当該第2化合物はBAXポリペプチドである。

【0135】

更なる実施態様では、当該第2化合物はBAX BH3ペプチド又はそれらのSAHB誘導体である。

40

【0136】

一実施態様では、当該第2化合物は、これに限定されないが、BID、BAD、BIK/NBK、BLK、HRK、BIM/BOD、BNIP3、NIX、NOXA、PUMA、BMF及びEGL-1又はこれらのBH3領域を含有している、BH3-オンリータンパク質の群から選ばれる。

【0137】

別の実施態様では、当該第2化合物は、BCL-2、BCL-XL、BCL-w、BCL-B、MCL-1、Bfl-1/A1、BOO/DIVA、NR-13、CED-9、

50

又はウィルス性同族体（例えば、M11L、及びE1B-19K等）よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有している。

【0138】

別の実施態様では、当該第2化合物は、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いる。

【0139】

一態様では、本発明は、請求項56に記載の組成物及び使用説明書を含有してなるキットを提供する。

【0140】

III. BCL-2ファミリー機能の構造洞察

タンパク質のBCL-2ファミリーは、細胞死に対する感受性を制御するチェック及びバランスをもたらすプロ及びアンチのアポトーシスポリペプチドの両方を包含している。この経路の脱制御を、多くの癌を含む、広範囲のヒトの疾患の発症機序において確認している。

【0141】

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生存の重要な制御因子である。タンパク質BCL-2、BCL-XL、Bcl-w、BFL1/A1及びMCL-1は死の拮抗薬であり、一方BAX、BAK、BAD、BCL-XS、BID、BIM、及びBIKは死の作動薬の例である (Kroemer et al., Nature Med. 6:614-20 (1997))。

【0142】

BCL-2ファミリーは、全てが α 螺旋断片を含んでいる、BH1、BH2、BH3、及びBH4と呼ばれる保存「BCL-2同族体」(BH)が最大4つまで存在していることによって定義される (Chittenden et al. 1995 EMBO 14:5589; Wang et al. 1996 Gene Dev. 10:2859)。BCL-2及びBCL-XLなどの、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表示する。プロアポトーシスタンパク質は、BH1、BH2、及びBH3ドメイン中に相同性を有している、「マルチドメイン」メンバー（例えば、BAK、BAX、BOK）、及びBH3両親媒性 α 螺旋断片のみに配列相同性を含有している、「BH3ドメインオンリー」メンバー（例えば、BID、BAD、BIM、BIK、NOXA、PUMA）に分けられる。BCL-2ファミリーメンバーは、ホモ及びヘテロダイマーを形成する能力を有していて、これは競合的結合及びプロ及びアンチアポトーシスタンパク質レベルの間の比率が死亡刺激への感受性に影響しているということを示唆している。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、過剰なプログラム細胞死から細胞を保護するように機能する。ある特定の細胞型では、細胞膜で受け取った死亡シグナルはミトコンドリア経路を介してアポトーシスを誘発する。ミトコンドリアのアポトーシス経路は、内因性細胞ストレス及びシグナル経路によっても活性化される。ミトコンドリアは、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、シトクロムcを隔離することによって細胞死の管理者として働くことができ、重大な下流のタンパク分解事象をもたらす。BCL-2/BCL-XL及びBAK/BAXなどの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制御されたそれらの活性によって、ミトコンドリア膜で保護者及び死刑執行人の2つの役割をはたす。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シグナルを、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へ送達する。BID及びBIMなどの、選択BH3オンリーメンバーは「活性化因子」と呼ばれ (Letai, A., et al. Cancer Cell 2, 183-192 (2002))、プロ及びアンチアポトーシスタンパク質の両方と相互作用する固有の能力を有している (Walensky Mol Cell 2006)。カスパーゼ8の活性化により、BIDが開裂して、切断された付加体、tBIDがシトクロムcの放出及びBCL-2ファミリータンパク質の関与を介するミトコンドリアアポトーシスを誘発する。

10

20

30

40

50

【0143】

欠失及び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 α 螺旋BH3断片が死のドメインとして機能して、それによって、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。構造検討は、BH3螺旋がBH1、2及び3ドメインの界面によって形成される疎水性の溝に挿入することにより、アンチアポトーシスタンパク質と相互作用することを明らかにしている。tBID及びBIMは、結合して、アンチアポトーシスタンパク質（例えば、BCL-2及びBCL-X_L）によって隔離することができ、そして直接又は間接的にプロアポトーシスタンパク質BAX及びBAKの活性化を誘発して、シトクロムc放出及びミトコンドリアのアポトーシスプログラムを誘導することができる。

10

【0144】

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番目のメンバーで、BID及びBIM SAHBなどの、活性化因子SAHBリガンドによっても拘束される。BOKは、卵巣cDNAライブラリーからクローン化されて、卵巣、子宮、及び睾丸に高度に発現することが見出された。その後、BOK mRNA種は、心臓、腎臓、肝臓、結腸、肺、腸、甲状腺、副腎、脾臓、及び骨髄を包含する、組織の広範分布、及び選択癌細胞株において同定されている。

【0145】

BCL-2生物学の大躍進は、BCL-2ファミリータンパク質の最初のX線及びNMR構造が報告された10年前に、Abbott LaboratoriesのFesikと共同研究者によって達成された（Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L., and Fesik, S. W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, *Nature* 381, 335-341）。BCL-X_Lの構造は、8つの α 螺旋からなり、その内の2つ（螺旋5及び6）は、ジフテリア及びコリシンの細孔形成毒素の膜内挿入ドメインの中央疎水性核レミネセント（reminescent）を形成する（Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L., and Fesik, S. W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, *Nature* 381, 335-341）。この構造相同性は、BCL-2ファミリーメンバーのリポソーム及びミトコンドリア系における細孔形成の能力を明らかにする研究の基礎をもたらした（Nouraini, S., Six, E., Matsuyama, S., Krajewski, S., and Reed, J. C. (2000) The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L), *Mol Cell Biol* 20, 1604-1615; Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14681-14686）。続いて、BCL-X_Lと複合したBAK BH3ペプチドの構造が、プロ及びアンチアポトーシスBCL-2ファミリーメンバー間のタンパク質-タンパク質相互作用のパラダイム（プロアポトーシス α 螺旋BH3ドメインが、アンチアポトーシスタンパク質のBH1～3ドメイン（BH1： α 4- α 5螺旋の部分；BH2： α 7- α 8の部分；BH3： α 2の部分）の並置によって形成された疎水性の溝に挿入する）を明らかにした（図3）。

20

30

40

【0146】

この構造パラダイムは、BH3オンリーペプチドと複合した、BCL-2（Petros, A. M., Nettesheim, D. G., Wang, Y., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E. D., Zhang, H., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (2000) Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies, *Protein Sci* 9, 2528-2534）、BCL-w（Denisov, A. Y., Chen, G., Sprules, T., Moldoveanu, T., Beauparlant, P., and Gehring, K. (2006)

50

Structural model of the BCL-w-BID peptide complex and its interactions with phospholipid micelles, *Biochemistry* 45, 2250-2256)、MCL-1 (Day, C. L., Chen, L., Richardson, S. J., Harrison, P. J., Huang, D. C., and Hinds, M. G. (2005) Solution structure of pro-survival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands, *J Biol Chem* 280, 4738-4744) 及び BFL-1/A1 (Smits, C., Czabotar, P. E., Hinds, M. G., and Day, C. L. (2008) Structural plasticity underpins promiscuous binding of the pro-survival protein A1, *Structure* 16, 818-829) の引き続く NMR 構造において確認されて、BCL-2 タンパク質間の伝達が疎水性の溝と BH3 死の螺旋間に形成されたホモ及びヘテロ複合体のネットワークを介していることを示唆した。ヘテロ結合への優先性は、アンチアポトーシス溝と結合パートナーの BH3 ペプチドのアミノ酸組成の個々の相違によって決まる。

10

【0147】

BH3 ペプチドとのアンチアポトーシス複合体の構造決定は、BCL-2 ファミリーメンバーの機能へ重要な機能的洞察をもたらして、BCL-2 が制御するアポトーシス経路の有望な薬理的モジュレータの開発を誘導した (Walensky, L. D., et al. (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix, *Science* (New York, N.Y. 305, 1466-1470; Oltersdorf, T., et al. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature* 435, 677-681; Nguyen, M., et al. (2007) Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19512-195) 。例えば、小分子 ABT-737 のような選択的な BCL-2 阻害剤はアンチアポトーシス BCL-2/BCL-X_L の疎水性の溝を標的として、選択腫瘍内のアポトーシスを再活性化する (Oltersdorf, T., et al. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature* 435, 677-681) 。

20

【0148】

際立って、プロアポトーシス BAX (Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, *Cell* 103, 645-654) 及び BH3 オンリー BID (McDonnell, J. M., et al. (1999) Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for a proapoptotic agonists and antagonists, *Cell* 96, 625-634; Chou, J. J., et al. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling, *Cell* 96, 615-624) の NMR 構造が、アンチアポトーシスタンパク質との構造類似性を明らかにした。BAX 及び BID は、同様に、それぞれ、6 又は 7 の両親媒性螺旋に囲まれている 2 つの中央核螺旋を有している。BAX 及び BID の N 末端に、別の重要な構造類似性が明らかになった。 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の間の非構造ループ (BH3) も、BCL-2 (Petros, A. M., et al. (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein Bcl-2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3012-3017) 及び BCL-X_L (Muchmore, S. W., et al. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, *Nature* 381, 335-341) などの選択アンチアポトーシスタンパク質に存在している。

30

40

【0149】

これらのタンパク質のループ領域は、一次配列及び長さの点で異なっていて、それらのアポトーシス機能を調整すると仮定される。実際に、BCL-X_L/BCL-2 ループのリン酸化 (Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W. S. (1997) Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function, *The Journal of biological chemistry* 272, 11671-11673) は、細胞状況に応じてアンチアポトーシス機能を阻害して、カスパーゼ 8 が介在する BCL-2 ループの開裂が、恐らくその BH3 死のドメインを曝露することにより、タンパク質を強力なプロアポトーシスタンパク質に変換する (Cheng, E. H., Kirsch, et al. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases, *Science* 278, 1966-1968) 。細胞質性 BAX 及び BID のプロアポトーシスループ領域

50

は、それぞれカルパイン及びカスパーゼ 8 によって酵素開裂を受けて、増大したミトコンドリア標的化及びプロアポトーシス活性を示す切断型形態を生じる (Li, H., et al. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94, 491-501; Cartron, P. F., et al. (2004) The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein, *J Biol Chem* 279, 11503-11512; Wood, D. E., et al. (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis, *Oncogene* 17, 1069-1078)。

【0150】

マルチドメインのプロ及びアンチアポトーシスタンパク質は、疎水性残基が豊富で、ミトコンドリア外膜標的化及び挿入のアンカーとして機能する C-末端膜貫通領域を含有している (Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, *Cell* 103, 645-654)。プロアポトーシス BAX は、BAX がミトコンドリアに配置されると膜貫通領域として機能すると推測されている、C-末端 $\alpha 9$ 螺旋を含有している。モノマー BAX において、 $\alpha 9$ は相補的疎水性相互作用を介して BAX の疎水性溝を取り込んで、疎水性溝への接近とその BH3 ドメインの露出の両方を不可能にする (Sattler, M., et al. (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis, *Science* 275, 983-986)。正常細胞において、BAK はミトコンドリア外膜に構造的に限局しているが、BAX はサイトゾル中に不活性モノマーとして存在している (Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, *Cell* 103, 645-654; Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations, *J Biol Chem* 273, 10777-10788)。

【0151】

アポトーシス刺激を受け取って、BAX は、そのミトコンドリアへの転移、ホモオリゴマー化、及びミトコンドリア外膜内での孔形成をもたらし、構造変化を受けると考えられている (Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations, *J Biol Chem* 273, 10777-10788; Soane, L., and Fiskum, G. (2005) Inhibition of mitochondrial neural cell death pathways by protein transduction of Bcl-2 family proteins, *J Bioenerg Biomembr* 37, 179-190; Tan, Y. J., Beerheide, W., and Ting, A. E. (1999) Biophysical characterization of the oligomeric state of Bax and its complex formation with Bcl-XL, *Biochem Biophys Res Commun* 255, 334-339)。

過去の研究は、その溝からの C-末端膜貫通領域の放出が転移及び膜固定に必要であろうということを示唆している (Schinzel, A., Kaufmann, T., Schuler, M., Martinlbo, J., Grubb, D., and Borner, C. (2004) Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Prol68, *J Cell Biol* 164, 1021-1032)。

更に、モノクローナル抗体 6A7 によって検出されるような、N-末端領域での構造変化が BAX の構造的に活性化された形態を選択的に検出する (Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations, *J Biol Chem* 273, 10777-10783; Yethon, J. A., Epand, R. F., Leber, B., Epand, R. M., and Andrews, D. W. (2003) Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis, *J Biol Chem* 278, 48935-48941)。

【0152】

この N-末端エピトープの露出が、ミトコンドリア標的化及び $\alpha 9$ 放出の要件であると考えられている (Schinzel, A., Kaufmann, T., Schuler, M., Martinlbo, J., Grubb, D., and Borner, C. (2004) Conformational control of Bax localization and apoptot

ic activity by Prol68, J Cell Biol 164, 1021-1032)。

BAX/BAKが介在するアポトーシス誘導について多くのモデルが提案されているが、BAX/BAK活性化についての明白な分子の誘引メカニズムはまだ分かっていない。Walensky 及び共同研究者らは現在、その活性化を誘発するプロアポトーシスBAX上の新規なBH3相互作用部位を同定している (Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E. H.-Y. Tjandra, N. and Walensky, L.D. BAX activation is initiated at a novel interaction site. Nature, in press, 2008)。注目すべきは、この新規な相互作用部位が、アンチアポトーシスタンパク質について同定されたBH3相互作用部位と比べると、BCL-2ファミリータンパク質の異なった地理的領域に位置していることである (図5)。

10

BH3螺旋との複合体におけるアンチアポトーシス溝の構造を解明することが、癌治療のための生存タンパク質の標的阻害剤をもたらすのとまさに同様に、BAX上のBH3相互作用部位の解明及びそれらの活性化連続体に従ってBAX/BAK構造を定義付けることが、ヒトの疾患においてアポトーシスを調節する新規な薬理学的好機をもたらすだろう。

【0153】

IV. その活性化を誘発するBAX上の新規な相互作用部位

BAX活性化の起因現象を調べるために、BAXのBH3リガンドBIM SAHBとの相互作用を検討した。BIM SAHBは、天然の死ドメインの α 螺旋特性を反復してBAXに直接結合することが先に明らかにされている (Walensky, L. D., et al. (2006) A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX, Mol Cell 24, 199-210)。BAXと結合しているBIM SAHBを、核磁気共鳴 (NMR) 分光法を用いて観察した。BAXの $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 相関スペクトルと比較して、BIM SAHBの付加は、選択NMRの交差ピークを拡大及びシフトして、BAXの結合及び非結合の構造間の速い移行を示唆した。NMRスペクトルの全般的な特徴は、BIM SAHB結合上の $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 間のループ残基における有意な変化を除いて、かなり似ていた。BIM SAHB滴定したBAXの化学シフト摂動解読は、BAX残基の離れたサブセットにおける相互作用を明らかにした。 $\alpha 1$ 及び $\alpha 6$ 螺旋に局在している残基に、更に $\alpha 1$ $\alpha 2$ 間の可変ループの残基にも、最も大きい変化が観察された。有意な変化は、Q28、Q32及びQ52の側鎖 NH_2 についても観察された。

20

30

【0154】

BAX構造 (Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, Cell 103, 645-654) においては、 $\alpha 1$ 及び $\alpha 6$ 螺旋は互いに近接して位置していて、BIM SAHB結合によって影響を受ける残基は、タンパク質構造の片側にあるこれらの螺旋の並置にある異なった位置に局在していた。注目すべきは、タンパク質のカルボキシ末端側の残基はこれらの条件下でBIM SAB滴定によって影響を受けなかったので、新規結合部位を、アンチアポトーシスタンパク質の標準的なBH3結合部位から正反対の面に置いた (図5)。従って、BAX上のBIM SAHBの結合部位を、親水性及び荷電した残基の縁で囲まれた疎水性割れ目を螺旋間分岐形成して、2つの螺旋 $\alpha 1$ 及び $\alpha 6$ によって定義した (図6)。

40

【0155】

BAX上の新規相互作用部位の構造的に定義されたトポグラフィーを用い、コンピューターによるスクリーニングを実施して、BAX上の新規な結合溝を組み込むと予測される一連の小分子を同定した。次いで同定された分子を、競合的蛍光偏光、BAXオリゴマー化、チトクロムc放出、及び細胞に基づくアポトーシス誘導アッセイを含む、一連の生化学アッセイに付してそれらの機能的活性を立証した。

【0156】

V. コンピュータによる薬物設計

結合部位の同定は、BAX及び対応する結合部位を有するその他のBCL-2ファミリ

50

ーポリペプチドを調節することが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、BAXの三次元コンピュータ処理相互作用テンプレートを当業者が作成できて、BAX活性部位に特異的な活性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。別の実施態様では、当業者は、BAX結合部位を、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利用することができる。次いでこの情報を、別のBCL-2ファミリーポリペプチドを調節できる化合物を同定／開発するために用いることができる。

【0157】

BCL-2ポリペプチドの三次元構造及び特異的に結合する部位の確認は、BCL-2ファミリーポリペプチド活性のモジュレータとして作用できる薬剤の合理的な同定及び／又は設計に不可欠である。これは、標的化合物への所望の阻害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がそのような薬剤を同定する唯一の方法である、従来の薬剤アッセイ技術より有利である。必然的に、このような従来のスクリーニング方法は、費用がかかり、時間がかかり、そして同定された薬物の標的タンパク質に対する作用機序を明確にしない。このような三次元構造を用いて、研究者は想定される結合部位を同定し、次いでこれらの結合部位と相互作用する薬剤を同定或いは設計する。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。この方法では、所望の活性についてスクリーニングすべき薬剤の数を大幅に減少させるばかりでなく、標的化合物に対する作用の機序もよりよく理解される。

【0158】

BAX結合部位の同定を、BCL-2ファミリーポリペプチドの結合部位の1つ又はそれ以上の領域全部又は一部分と結合できる化合物についての小分子をコンピュータでスクリーニングするデータベースに用いることができるということが目論まれている。この方法の一実施態様では、同定された化合物の結合部位の領域に対する質又は適合を、形状相補性によるか或いは推定相互作用エネルギーによるかの何れかで評価することができる (Meng et al., J. Comp. Chem. 13:505-524, 1992)。

【0159】

更なる実施態様では、本発明の方法に従って分析できる可能性のあるモジュレータを、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方法の何れかをを用いて得ることができる。一実施態様では、可能性のあるモジュレータは最初に、本明細書に記載されているか或い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。可能性のあるモジュレータが同定されて、それらの構造が確認されると、本明細書に記載されているBAX結合部位の構造情報を用いるコンピューター分析によって更なる最適化を実施することができる。別の実施態様では、可能性のあるモジュレータは最初に、BCL-2ファミリー結合部位の構造座標から作成された相互作用テンプレートをを用いるスクリーニングで同定されて、更に付加的なコンピュータ分析によって最適化される。あるいは、更なる最適化を、本明細書に記載の方法を用いて、可能性のあるモジュレータとBCL-2ファミリー結合部位の共一複合体のNMR構造座標を確認することによって実施することができる。

【0160】

本発明の方法で用いることができる多種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、生物学的ライブラリー；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方法；1ビーズ1化合物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ライブラリー方法を包含する。生物学的ライブラリー方法は、ペプチドライブラリーに限定されているのに対して、その他の4つの方法は、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー又は小分子ライブラリーに適用可能である (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145)。

【0161】

好ましい実施態様では、化合物のライブラリーはデジタルライブラリーである。結合部位にフィットする候補について公知三次元構造の小分子のデータベースをスキャンできる

データベース検索プログラムを用いて結合相互作用を実行する。適切なプログラムは、C A T A L Y S T (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA)、U N I T Y (Tripos Inc., St Louis, MO)、F L E X X (Rarey et al., J. Mol. Biol. 261: 470- 489 (1996))、C H E M - 3 - D B S (Oxford Molecular Group, Oxford, UK)、D O C K (Kuntz et al., J. Mol. Biol. 161: 269-288 (1982))、及びM A C C S - 3 - D (MDL Information Systems Inc., San Leandro, CA) 及びL U D I (Boehm, J. Comp. Aid. Mol. Des. 6:61-78 (1992))、C A V E A T (Bartlett et al. in “Molecular Recognition in Chemical and Biological Problems”, special publication of The Royal Chem. Soc., 78:182-196 (1989)) 及びM C S S (Miranker et al. Proteins 11: 29-34 (1991))、G L I D E (Schrodinger LLC, New York, NY)、及びP H A S E (Schrodinger LLC, New York, NY)を包含する。

10

【0162】

更に、分子ライブラリーの合成方法の例は当該技術分野、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; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; 及びGallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233に見出すことができる。

【0163】

化合物のライブラリーは、溶液中（例えば、Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421)、又はビーズ (Lam (1991) Nature 354:82-84)、チップ (Fodor (1993) Nature 364:555-556)、バクテリア (Ladner 米国特許第 5, 223, 409号)、孢子 (Ladner 米国特許第 5, 223, 409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865-1869) 又はファージ上 (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) に存在してよい。

20

【0164】

その実際の合成の前に、化合物の可能性のあるモジュレータの効果を更に分析して、B A X活性部位の構造座標を用いるコンピュータモデリング技術によって試験することができる。コンピュータモデリングが相互作用を示したら次に、この分子を化学技術分野の当業者に公知の標準的な方法を用いて合成し、次いで本明細書に記載されているアッセイを用いて、B C L - 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ことができる。

30

【0165】

B C L - 2ファミリーポリペプチドのモジュレータ又はその他の結合化合物は、化学物質又は断片を個々の結合部位と結合するそれらの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手段によって、コンピュータ的に評価して設計することができる。本発明の方法の別の実施態様では、可能性のあるモジュレータ化合物をB C L - 2ファミリーポリペプチドの結合部位と、より特定のにはA X結合部位と、結合するそれらの能力について試験することができる。このプロセスは、例えば、B A X結合部位の構造座標に基づくコンピューター画面上の結合部位の、目視検査を包含できる。次いで、選択された化合物又は化学部分を、本明細書で定義したような結合部位の個々の領域内に、多種の方向に並べるか、又はドッキングさせることができる。ドッキングは、Quanta and SYBYLなどのソフトウェアを用い、続いてCHARMM and AMBER などの、標準分子力学力場によるエネルギー最小化及び分子力学によって行うことができる。

40

【0166】

ある実施態様では、本発明は、B C L - 2ファミリーポリペプチドの構造座標を電子記憶媒体に入力して、ポリペプチドの三次元コンピューターモデルを作り出すことを包含している。一実施態様では、B C L - 2ファミリーポリペプチドの完全構造座標を入力する

50

。それに替わる実施態様では、断片、又は完全構造座標未満であるが、結合部位をを包含している断片を入力する。構造座標は当該技術分野で公知であるようなものか或いは相同性モデリングに基づいていてよい。例えば、公知の B C L-2 ファミリー構造座標は、B A X (PDB ID No. 1f16)、B A K (PDB ID No. 2ims)、B C L-2 (PDB ID No. 1g5m)、B C L-X L (PDB ID No. 1lx1)、本発明に関連するものに加えて：B I M B H 3-B A X (PDB ID NO.2k7w) を、更に当該技術分野で公知の別のものも包含する。多くの公知の B C L-2 ファミリーポリペプチドについての構造座標は、P r o t e i n D a t a B a n k (“ P D B ”) (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://www.rcsb.org>) から入手できる。

【0167】

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相同性モデリング技術と共に使用できるということを提供する。相同性モデリングは、1つ又はそれ以上の関連タンパク質分子、分子複合体又はそれらの部分（すなわち、結合部位）の構造座標を用いる未知構造のモデルを構築することを包含する。相同性モデリングは、その三次元構造を解明するタンパク質の共通又は相同部分を、公知分子中の相同構造成分の三次元構造に、特に関連（すなわち、相同性）構造座標を用いて、一致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、相同第2構造成分、及び／又は相同3次折畳みを用いて確認できる。相同性モデリングは、三次元構造の部分又は全てを、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と置き換えて、再構築することを包含できる。

【0168】

同様な方法が当業者に公知である (Greer, 1985, Science 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>)。相同性モデリングに用いることができるコンピュータープログラムは、Quanta and the homology module in the Insight II modeling package (Accelrys, Inc., San Diego, CA) 又は M O D E L L E R (Rockefeller University, www.iucr.ac.uk/sinris-top/logical/prg-modeller.html, Sali's Modeller also from Accelrys, Inc., San Diego, CA) を包含する。

【0169】

相互作用テンプレートが作成されると、B C L-2 ファミリーポリペプチドの結合部位に結合する化合物を同定することができる。化合物又は化学物質を選択する過程でも用いることができるように特定化したコンピュータープログラムは：

1. Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144, USAから入手できる S Y B Y L、
2. Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144, USAから入手できる U N I T Y、
3. Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144, USAから入手できる F l e x X、
4. G R I D (Goodford, P. J., "A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules", J. Med. Chem., 28, pp. 849-857 (1985)、G R I Dは Oxford University, Oxford, UK. から入手できる)、
5. M C S S (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)、M C S Sは Molecular Simulations, Burlington, Mass. から入手できる)、
6. A U T O D O C K (Goodsell, D. S. and A. J. Olsen, "Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing", Proteins: Structure. Function, and Genetics, 8, pp. 195-202 (1990)、A U T O D O C Kは Scripps Research Institute, La Jolla, Calif. から入手できる)、

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

を包含する。

【0170】

適切な化合物又は化学部分が選択されると、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、B A X / B I M - B H 3 の N M R 結合検討の構造座標と関連してコンピューター画面上に表示された三次元画像上で化合物又は部分の互いの関連性の目視検査によって進行できる。次いでこれに続いて Q u a n t a 又は S Y B Y L などのソフトウェアを用いて手動モデル構築を行うことができる。

10

【0171】

当業者が個々の化合物又は化学物質を関連付けるのに役立つその他の有用なプログラムは :

1. C A V E A T (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)、C A V E A T は the University of California, Berkeley, Calif. から入手できる) 、

2. M A C C S - 3 D (MDL Information Systems, San Leandro, Calif.) のような 3 D データベース (この分野は Martin, Y. C., "3D Database Searching in Drug Design", J. Med. Chem., 35, pp. 2145-2154 (1992) で概説されている) 、

20

3. H O O K (Molecular Simulations, Burlington, Mass. から入手できる) :
を包含する。

【0172】

別の実施態様では、B C L - 2 ファミリーポリペプチドのモジュレータは、空の活性部位又は随意に公知モジュレータ (複数も) のある部分 (複数も) を含有しているものの何れかを用いて、全体的に又は「デノボ」で設計することができる。これらの方法で役立つプログラムは :

1. L U D I (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)、L U D I は Biosym Technologies, San Diego, Calif. から入手できる) 、

30

2. L E G E N D (Nishibata, Y. and A. Itai, Tetrahedron, 47, p. 8985 (1991)、L E G E N D は Molecular Simulations, Burlington, Mass. から入手できる) 、

3. L e a p F r o g (Tripos Associates, St. Louis, Mo. から入手できる) :
を包含する。

【0173】

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。

40

【0174】

上記の方法によって化合物が設計又は選択されると、化合物が B C L - 2 ファミリーポリペプチドを調節する効率をコンピュータによる評価によって試験及び最適化することができる。効果的な B C L - 2 ファミリーポリペプチドのモジュレータは、その結合状態及び遊離状態の間のエネルギーにおける相対的に小さな相違 (結合の小さい変形エネルギー) を好ましくは示すべきである。

【0175】

B C L - 2 ファミリーポリペプチドのモジュレータとして設計された或い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的相互作用を好まし

50

くは欠如させるように、コンピュータによって最適化できる。このような非相補的（例えば、静電的）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、モジュレータと酵素間の静電的相互作用の合計が、モジュレータがBCL-2ファミリーポリペプチドに結合したとき、結合のエンタルピーに対して中性の或いは有利な寄与をもたらすことが好ましい。

【0176】

化合物変形エネルギー及び静電的相互作用を評価する特異的なコンピュータソフトウェアは当該技術分野において入手可能である。このような用途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 Francisco) ; QUANTA/CHARMM (Molecular Simulations, Inc., Burlington, Mass.) ; 及び Insight II/Discover (Biosym Technologies Inc., San Diego, Calif.) : を包含する。これらのプログラムは、例えば、シリコングラフィックス (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。

【0177】

BCL-2ファミリーポリペプチドモジュレータが、本明細書に記載のようにして、最適に選択又は設計されると、その次に、その結合特性を改善又は修正するために、相互作用によってもたらされる情報及び修飾しやすい領域を同定する特異的テンプレートを再び用いて、その原子又は側鎖基の幾つかに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、元の基と殆ど同じ大きさ、形、疎水性及び電荷を有しているであろう。もちろん、構造を変化させることが当該技術分野で知られている成分を避けなければならないことは当然である。このように置換した化合物は、次いで、上で詳述されているのと同様な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に適合する能力について分析してもよい。

【0178】

ある特定の実施態様では、モジュレータは、0.2 mM、0.1 mM未満、750 μ M未満、500 μ M未満、250 μ M未満、100 μ M未満、50 μ M未満、500 nM未満、250 nM未満、50 nM未満、30 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、3 nM未満、1 nM未満、又は0.5 nM未満の、BCL-2ファミリーポリペプチドに対するK_dを有している。

【0179】

設計されたモジュレータは更に、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アッセイを用いて評価することができる。

【0180】

V I . 断片型薬剤の設計

断片型薬剤の発見（創薬）も、BAXの新規活性部位又はその他のBCL-2ポリペプチド上の対応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。これらの構造手法は公知であって、これらの用途の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)、「SHAPE S NMR」(Fejzo J, Lepre CA, Peng JW, Bemis GW, Ajay, Murcko MA, Moore JM., Chem Biol. 1999 Oct;6(10):755-69)、「Fragments of Active Structures」(www.stromix.com; Nienaber, V. L., et al., Nat. 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り自己選択を許容する; Congreve, M. S., et al., Angew. Chem., Int. Ed., 2003, 42, 4479-4482)、及びその他の断片型NMR及びX線結晶学的方法（例えば、Congreve et al., J. Med. Chem., 2008, 51 (13), 3661-3680; Klagesa, J., Colesb, M., Kessler, H. NMR-based screening: a powerful tool in fragment-based drug discovery in Explo

iting Chemical Diversity for Drug Discovery, 2006, ed. Bartlett, P.A. and Entzeroth, M. RSC Publishing, Cambridge, UK; Erlanson, D.A., Wells, J.A., and Braisted, A.C. TETHERING: Fragment-Based Drug Discovery, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2004, 33, 199-223; Zartler ER and Shapiro MJ, Fragonomics: fragment-based drug discovery, Curr Opin Chem Biol, 2005, 9(4):366-70) は市販されている。

【0181】

V I I . B C L - 2 ファミリーペプチドの調節及び化合物の結合を評価するインビトロアッセイ

コンピュータモデリングに基づいて B C L - 2 ファミリーポリペプチドの結合部位に結合することが見出された、化合物の能力確認は、直接結合を試験することによって、B C L - 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。B C L - 2 ファミリーポリペプチドと結合する試験化合物の能力の確認は、例えば、B C L - 2 ファミリーポリペプチドの、可能性のあるモジュレータへの結合を複合体中の標識化された B C L - 2 ファミリーポリペプチドを検出することにより確認できるように、B C L - 2 ファミリーポリペプチド又は化合物を放射性同位体又は酵素標識と結合させることによって実施することができる。例えば、化合物を、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、又は ^3H で、直接又は間接的の何れかに標識して、そして放射放出の直接カウントによって又はシンチレーションカウントによって放射性同位体を検出することができる。あるいは、化合物を、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、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、そして適切な基質から生成物への変換を確認することによって、酵素標識を検出することができる。更なる例として、化合物を、フルオレセインなどの蛍光標識で標識化して、そしてリガンドと B C L - 2 ファミリーポリペプチドの間の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。また、標的 B C L - 2 ファミリーポリペプチドに結合している化合物を、S A R b y N M R (Shukers, S. B., et al., Science, 1996, 274, 1531-1534) を含む、当該技術分野で公知の各種の確立された手法を用いて、複合体の N M R 又は X 線結晶学によって分析することができる。

【0182】

別の実施態様では、B C L - 2 ファミリーポリペプチドへ結合するモジュレータの能力の確認は、下流事象（例えば、ポリペプチドの構造変化、アポトーシス、ミトコンドリアチトクロム c の放出、等）の誘発を検出することによって、或いはその他の B C L - 2 ファミリーが調節する細胞応答を検出することによって確認することができる。

【0183】

別の実施態様では、アッセイは、B C L - 2 ファミリータンパク質又は結合部位を含有しているそれらの生物学的活性部分を試験化合物と接触させて、B C L - 2 ファミリータンパク質又はその生物学的活性部分の活性を調節する、試験化合物の能力を確認する、無細胞アッセイである。B C L - 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の確認は、例えば、B C L - 2 ファミリータンパク質が、別の B C L - 2 ファミリー標的分子と結合する能力を確認（例えば、炭化水素架橋 B I M B H 3 ポリペプチドに結合している B A X をモニターする競合結合アッセイ）することによって達成できる。

【0184】

B C L - 2 ファミリータンパク質の標的分子と結合する能力の確認は、リアルタイム生体分子相互作用分析 (real-time Biomolecular interaction Analysis (BIA)) などの技術を用いても達成できる。Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 and Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705。本明細書で用いられる「B I A」は、何れの反応体（例えば、B L A 核）も標識化することなく、リアルタイムに生体特異相互作用を検討する技術である。表面プラズモン共鳴 (S P R) の光学現象の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。

【0185】

代わりの実施態様では、B C L - 2 ファミリータンパク質の活性を調節する試験化合物

の能力の確認は、下流 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によって達成できる。例えば、適切な標的に対するエフェクター分子の活性を確認することができて、或いはエフェクターの適切な標的への結合を前記のようにして確認できる。

【0186】

更に別の実施態様では、無細胞アッセイは、BCL-2 ファミリータンパク質（例えば、BAX）又は結合部位を含有しているそれらの生物活性部分を、BCL-2 ファミリータンパク質（例えば、炭化水素架橋 BIM BH3 ポリペプチド）と結合する公知化合物と接触させてアッセイ試料を形成し、そして 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を確認する、ここで、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の確認は、優先的に BCL-2 ファミリータンパク質と結合するか又はその活性を調節して、公知化合物を置き換える、試験化合物の能力を確認することを含有している。

【0187】

本発明の上記アッセイ方法の2つ以上の実施態様では、一方の或いは両方のタンパク質の非複合体形態からの複合体形態の分離を促進するために、更にはアッセイの自動化に適合するためにも、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固定化することが望ましい。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での BCL-2 ファミリータンパク質の標的分子との相互作用は、反応体を含有するのに適している何れかの容器の中で実施することができる。そ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。一実施態様では、一方又は両方のタンパク質がマトリックスと結合できるようにするドメインを付加する融合タンパク質が提供される。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を、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させることができ、次いでこれを試験化合物と、或いは試験化合物及び非吸着標的タンパク質又は BCL-2 ファミリータンパク質の何れか一方と、組合わせて、混合物を複合体形成を誘導する条件下で（例えば、塩及び pH に対する生理学的条件で）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非結合成分の何れも除去し、ビーズの場合は、マトリックスを固定化して、複合体を直接又は間接的に、例えば、上記のようにして、確認する。あるいは、複合体をマトリックスから解離して、BCL-2 ファミリーの結合又は活性のレベルを標準的な技術を用いて確認することができる。

【0188】

タンパク質をマトリックス上に固定化するその他の技術も本発明のアッセイで 사용할ことができる。例えば、BCL-2 ファミリータンパク質又は BCL-2 ファミリー標的分子の何れかを、ビオチンとストレプトアビジンの抱合体を用い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 Chemicals, Rockford, Ill.）を用いて製造して、ストレプトアビジンをコーティングした96ウェルプレート（Pierce Chemicals）のウェルに固定化することができる。あるいは、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のその標的分子との結合を妨げない抗体をプレートのウェルに誘導体化することができ、非結合標的又は BCL-2 ファミリータンパク質を抗体抱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述べたものに加えて、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、さらに BCL-2 ファミリータンパク質又は標的分子に関連している酵素活性の検出に依存している酵素結合アッセイを包含する。例えば、マイクロタイタープレートアッセイ設計を用いて、標的 BCL-2 ファミリーポリペプチドの活性化した又は阻害された配座異性体を認識する特定化された抗体を、マ

イクロタイタープレート上にコーティングして、化合物が誘導した標的 B C L-2 ファミリーポリペプチドの変化を捕捉し、次いで、迅速で精度の高い検出のために、蛍光色素分子又は酵素の何れかと共役している第 2 B C L-2 ファミリー抗体を適用して検出するか、あるいは蛍光色素分子又は酵素と共役している第 2 抗体によって認識することができる（すなわち、「サンドイッチ」E L I S A アッセイ）。

【0189】

当該技術分野で公知であるか、或いは本明細書に記載されている多種のアッセイを用いて、B C L-2 ファミリーポリペプチドの結合部位に結合する化合物が、インビトロ又はインビボで腫瘍細胞数を阻害することを明らかにできる。このようなアッセイでは、癌細胞株の細胞又は患者由来の細胞を、目的の化合物の存在下及び非存在下で用いることができる。細胞が無秩序な B C L-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レジメンの、癌細胞の数を減少する或いはそれらの増殖を阻害する能力は、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方法によって評価することができる。

10

【0190】

本発明は、1つ又はそれ以上の B C L-2 ファミリータンパク質の結合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「スクリーニングアッセイとも称する）を提供する。重要なことは、これらのアッセイは、コンピュータを利用したスクリーニングによって同定された化合物を試験及び検証するために用いられるばかりでなく、網羅的なライブラリーからコンピュータを用いない、経験的な化合物をスクリーニングすることにも用いることができる。

20

【0191】

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確認することができる。B C L-2 ファミリーポリペプチド又は B H ドメインを含有しているポリペプチド（例えば、B A X、等）は、蛍光標識された B H 3 含有ポリペプチド又はそれらの断片（例えば、B I D、B A D、B A K、B A X、等）などの基質、又はそれらの炭化水素架橋誘導体の存在下に、種々の濃度（例えば、1 nM、10 nM、100 nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM、及び 10 mM）の候補化合物に曝露できる。次いで、候補化合物のそれぞれの濃度の効果を分析して、種々の濃度における候補化合物の B C L-2 ファミリーポリペプチド結合活性に対する効果を確認し、これを候補化合物の K_i を算定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、B C L-2 タイプの活性を調節することができる。B C L-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直接結合アッセイを実施して、結合相互作用についての K_d を決定することもできる。候補化合物は、例えば、構造特異的抗体又は H S Q C NMR 分析によって測定されるような B C L-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（S E C）による分析で観察されるような B C L-2 ファミリータンパク質（例えば B A X）オリゴマー化状態の変化、リポソームからの蛍光色素又はタンパク質共役蛍光色素が誘発する放出、及び／又は精製ミトコンドリアからのチトクロム c 放出を誘発する用量反応性の効果を測定することによって、インビトロでの生物学的活性についてスクリーニングすることもできる。細胞透過性スクリーニングアッセイも想定されて、そこでは蛍光的に又はその他で標識された候補化合物を、無傷細胞に適用し、次いでこれを、顕微鏡又は（Walensky et al Science 2004, Walensky et al Mol Cell 2006）に記載されているような F A C S 分析によって、或いはハイスループット細胞蛍光性検出によって、細胞蛍光性についてアッセイする。

30

40

【0192】

本発明の化合物、医薬組成物、又はレジメンは、ヒトで使用する前に、所望の治療又は予防の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、そこでは患者の組織試料（例えば、癌細胞）を培養液中で生育させ、そして本発明の化合物に曝露させるか、それともこれに接触させて、組織試料上のそ

50

のような化合物の効果を観察する。組織試料は、生検又は患者から血液／骨髄を採取することによって得られる。この試験は一人一人の患者にとって治療的に最も効果がある治療法（例えば、予防又は治療剤）の同定を可能にする。

【0193】

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、或いは複数の候補化合物を用いて実施できる。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るか、或いは単一の候補化合物を有するそれぞれの反応を用いて平行反応を実行できる。試験化合物又は薬剤は、当該技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法の多数の手段の何れかを用いて得ることができる。

【0194】

好ましい実施態様では、細胞に基づいたアッセイは、化合物がBC L-2ファミリーポリペプチドの活性も調節するか否かを確認するために、BC L-2ファミリーポリペプチドの結合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、又はその他の方法を用いて同定された）化合物に対して実施する。

【0195】

一実施態様では、アッセイは、BC L-2ファミリータンパク質又はそれらの生物学的活性部分を発現する細胞を候補化合物と接触させて、結合部位に結合してBC L-2タイプの活性を調節する候補化合物の能力を確認する（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し、そして別の場合はアポトーシスを減少する）細胞に基づくアッセイである。試験化合物の細胞内のBC L-2タイプの活性を調節する能力を確認することは、例えば、ミトコンドリアからのチトクロムcの放出又はその他の関連する生理学的情報（例えば、アネキシンV結合、MTTアッセイ、カスパーゼ活性アッセイ、TUNELアッセイ）をモニタリングすることによって達成できる。例えば、特異的且つ直接的なBAX介在アポトーシスについての化合物の誘導をアッセイするために、報告され本明細書に記載されているようにして（参考、Gavathiotis et al. 2008, Nature、印刷中）、遺伝子的にBAX／BAKが欠失している細胞（陰性対照細胞）の化合物への応答を、トランスフェクション又はレトロウィルス感染によってBAXが置き換わっている同じ細胞（試験細胞）と比較する。

【0196】

BC L-2ポリペプチドの結合部位に結合することが見出されている化合物のインビトロ抗腫瘍活性は、腫瘍細胞を殺す化合物の能力を測定することによってアッセイできる。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）；p170レベルが上昇しているヒト結腸腫瘍（HCTVM）；低トポII活性を有するヒト結腸腫瘍（HCTVP）；P388ネズミリンパ白血球細胞；及びヒト結腸癌細胞株（Moser）、及び当該技術分野で公知の他多くのもの：を包含する。

【0197】

腫瘍阻害アッセイは、例えば、Kelly, et al., U.S. Pat. No. 5,166,208,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。細胞をプレート（例えば96ウェル平底プレート）に24時間付着させた後、細胞を連続希釈濃度のBC L-2ファミリーモジュレータ化合物と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％が殺生されか生育が阻害された化合物の濃度（IC50）を確認する。

【0198】

VIII. 化合物のインビボ試験

本発明の化合物がインビボで腫瘍の形成を阻害することも明らかにすることができる。本発明の化合物、組成物、及びレジメンを、ヒトで用いる前に、適切な動物モデル系で試験することができる。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はどれでも用いることができる。手順の幾つかの態様を変えることができ、当該態

10

20

30

40

50

様は、これに限定されないが、治療モダリティ（例えば、予防及び／又は治療薬剤）投与についての一時的な治療計画（ここではこのような治療モダリティが別々に又は混合剤として投与される）、及び治療モダリティの投与頻度を包含する。

【0199】

本発明のBCL-2ファミリーモジュレータ化合物のインビボ抗腫瘍活性を、非処置担癌動物と比較した、哺乳動物（例えば、マウス）中の腫瘍細胞の減少及び結果として生じる生存時間の増大によってアッセイできる。例えば、CDF1マウスにP388ネズミリンパ性白血病細胞、エールリッヒ腫瘍細胞、B16メラノーマ細胞、又はMeth-A線維肉腫細胞の懸濁液を腹腔内投与する。次いで、投与されたマウスの幾つかを本発明のBCL-2ファミリーモジュレータ化合物で腹腔内処理して、別のマウスを食塩水又は対照化合物（例えば、小分子のエナンチオマー、ペプチドのアミノ酸突然変異体）で処理する。次いで化合物のインビボ活性を、食塩処置群の平均生存時間に対する処置群の平均生存時間の比 $\times 100$ である、 $\%T/C$ 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; Warnick-Pickle, et al., J. Antibiot. 34(11):1402-7 (1981); 及びPandley et al., 前記。

【0200】

腫瘍形成及び転移拡散を含む、過剰増殖性疾患の膨大な数の動物モデルが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 Edition, Isselbacher et al., eds., McGraw-Hill, New York, p. 1814のChapter 317, “Principals of Neoplasia,” 及びLovejoy et al., 1997, J. Pathol. 181:130-135を参照されたい）。過剰増殖性疾患は、癌及び自己免疫疾患などの細胞増殖又はアポトーシス遮断疾患を包含する。BCL-2関連癌の例は、これに限定されないが、固形癌、白血病、及びリンパ腫を包含する。一実施態様では、疾患は化学療法耐性の癌である。より好ましい実施態様では、化学療法耐性の癌は、ABT-737又はABT-263（Abbott, Abbott Park, Illinois から入手できる）或いはオバトクラックス（obatoclax, Gemin X から入手できる）に耐性である。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細胞枯渴SCIDマウスにおける肺癌転移の確立（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. Pharmacol. Ther. Supp 12:45-47）及び腺腫様ポリープ性腫瘍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, 1996, Breast Cancer Res. Treat. 39:7-20）；前立腺癌については、化学的に誘導したトランスジェニック齧歯モデル、及びヒト異種移植片モデル（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）；そして造血器腫瘍については、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。更に、これに限定されないが、p53欠失マウスモデル（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）を含む、多くの型の癌に適用できる一般的な動物モデルが記載されている。

【0201】

例えば、本発明の化合物を試験動物に投与でき、一態様では、試験動物がある種の癌を発症しやすく、その試験動物は続いて、腫瘍形成の発生率の減少について、化合物を投与

していない動物と比較して試験される。あるいは、癌を有している試験動物（例えば、悪性の、腫瘍性の、又は形質転換された細胞を導入して、或いは発癌性物質を投与して腫瘍が誘発されている動物）に化合物を投与し、続いて化合物を投与していない動物と比較して、腫瘍退縮について試験動物の腫瘍を検査することができる。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９５％、又は少なくとも１００％まで、腫瘍の進行時間を延ばすか或いは生存時間を増大する場合に、過剰増殖性疾患の治療に有効であると考えられる。同様に、治療有効量の投与が、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９５％、又は少なくとも１００％まで、腫瘍生育速度を減少し、腫瘍量を減少し、転移の数を減少する場合に、本発明の化合物は、過剰増殖性疾患の治療に有効であると考えられる。このような結果を、当業者、例えば、腫瘍学者、癌生物学者は確認することができる。

10

【０２０２】

更に、当業者に公知の何れのアッセイも、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、或いはそれらの１つ又はそれ以上の症状に対する予防的及び／又は治療的有用性を評価するために用いることができる。

20

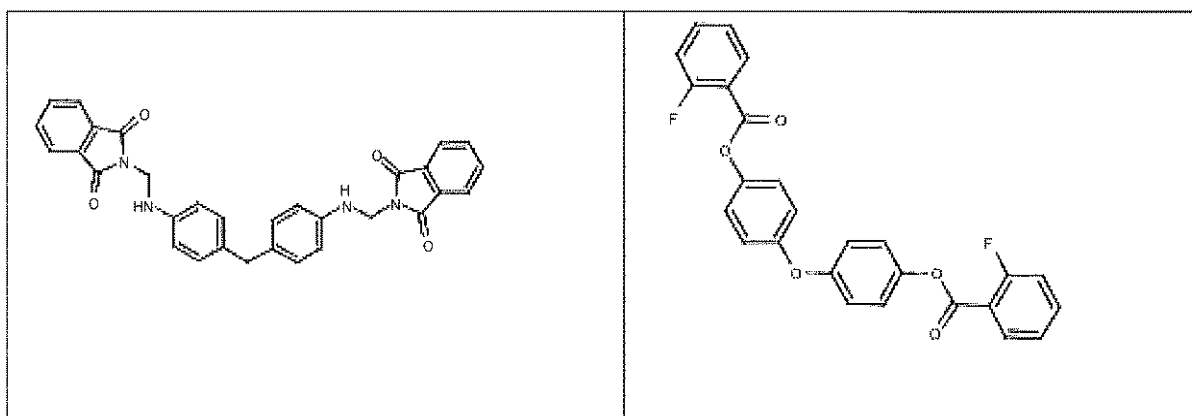
【０２０３】

IX. 本明細書に記載されているコンピュータによるスクリーニングで同定された化合物

以下の表１の化合物は、本明細書に記載されているように、BAX上の新規なBH3相互作用部位の構造座標を用いるコンピュータスクリーニングで同定された。

【０２０４】

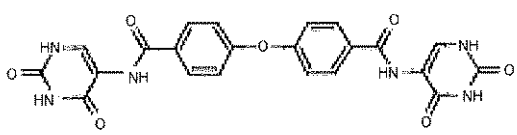
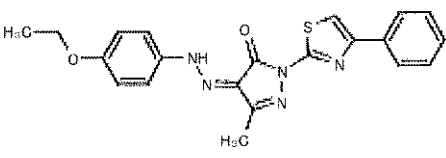
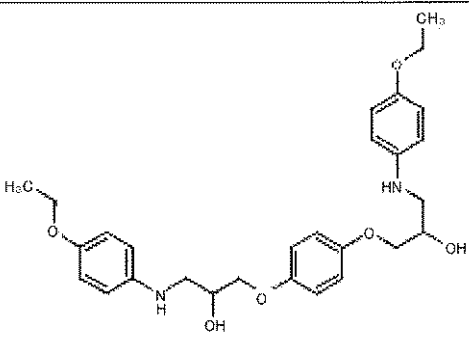
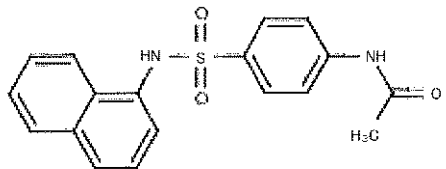
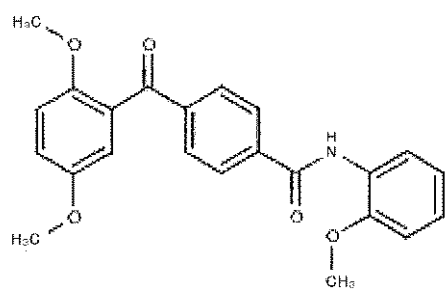
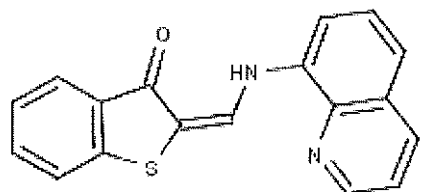
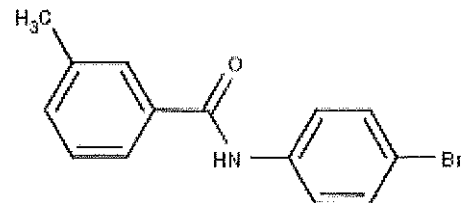
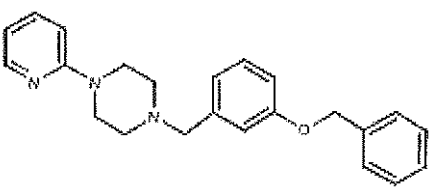
表 1



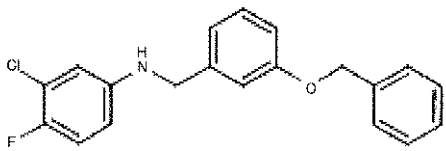
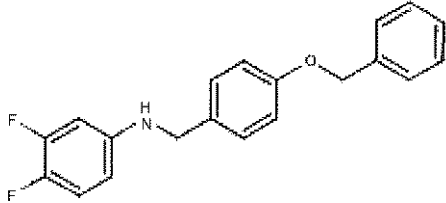
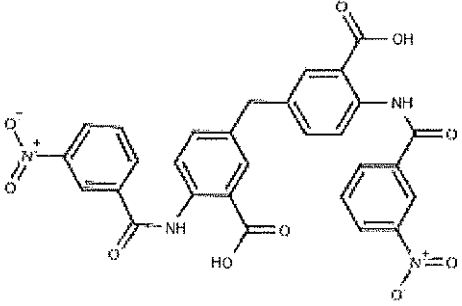
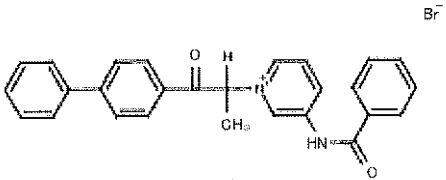
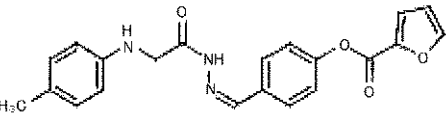
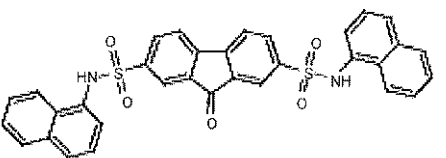
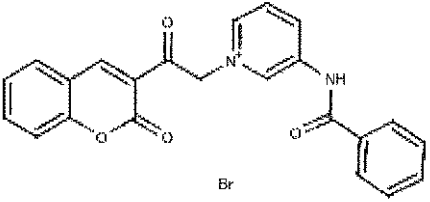
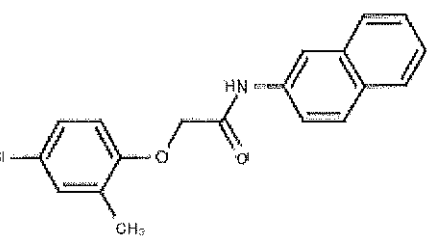
30

40

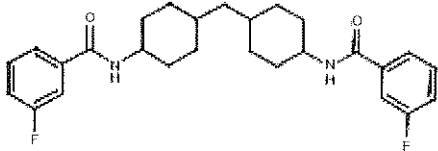
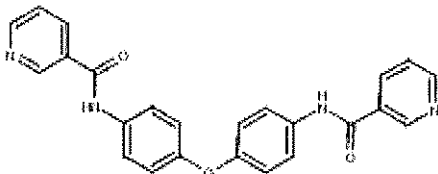
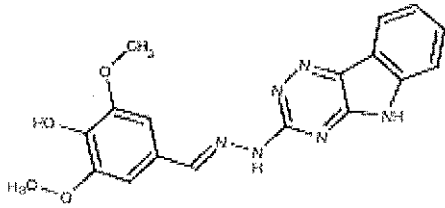
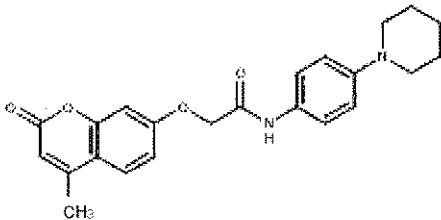
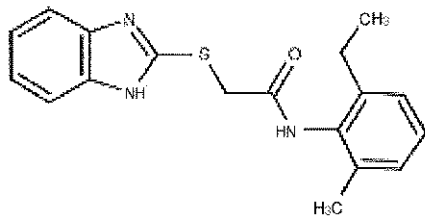
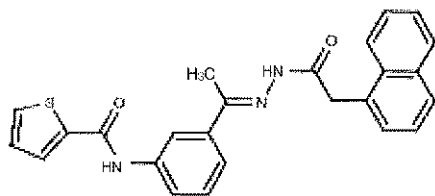
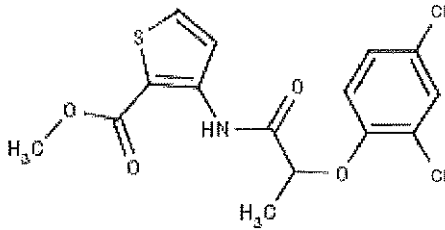
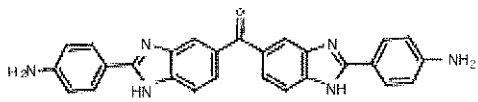
【０２０５】

		10
		20
		30
		40

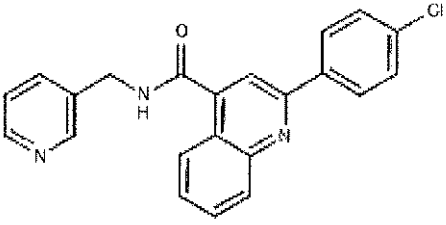
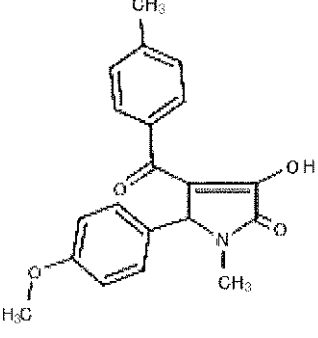
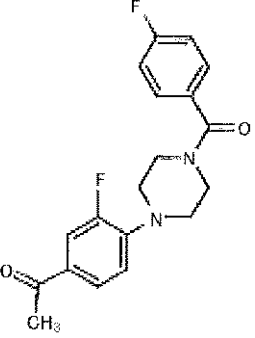
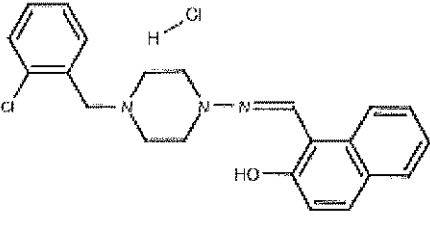
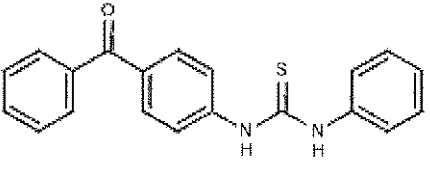
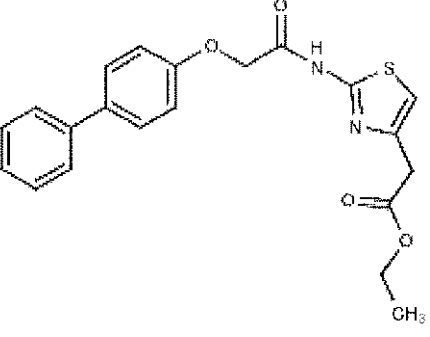
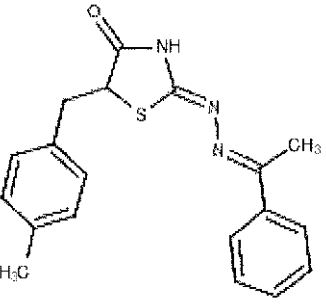
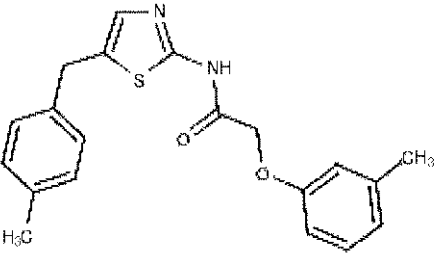
【 0 2 0 6 】

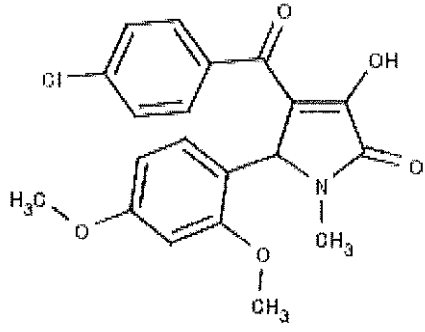
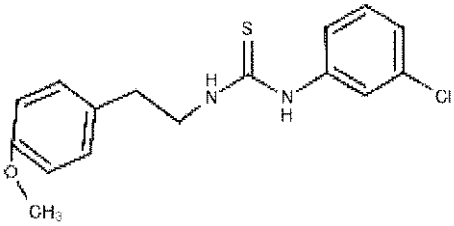
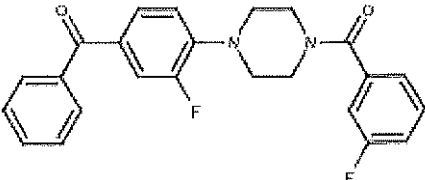
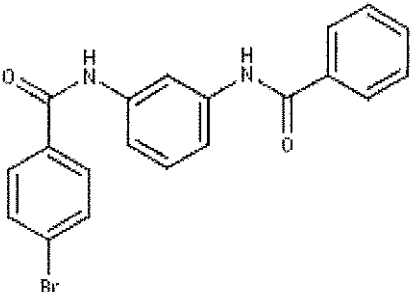
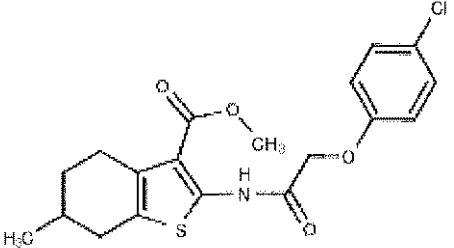
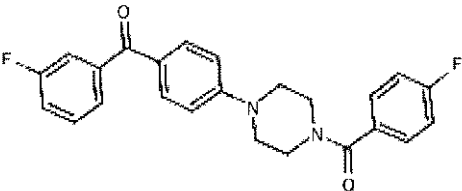
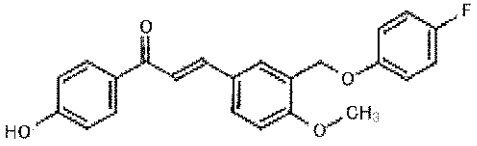
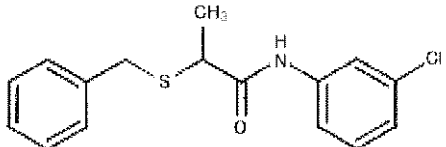
		10
		20
		30
		40

【 0 2 0 7 】

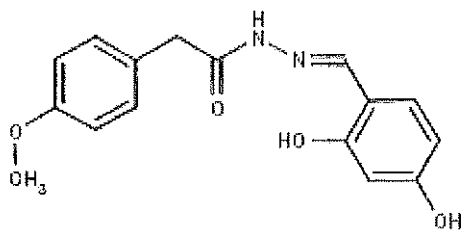
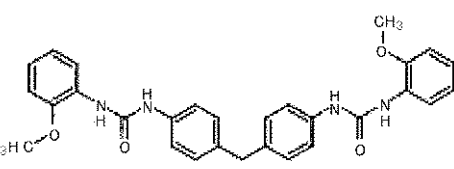
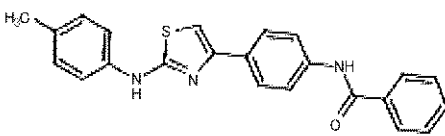
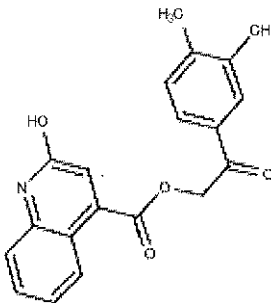
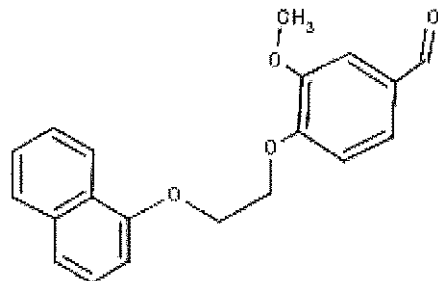
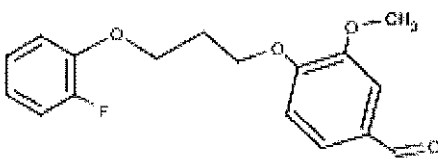
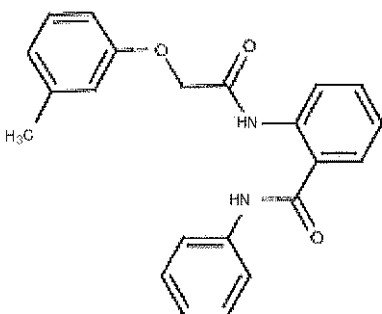
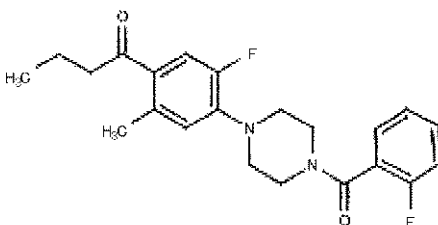
		10
		20
		30
		40

【 0 2 0 8 】

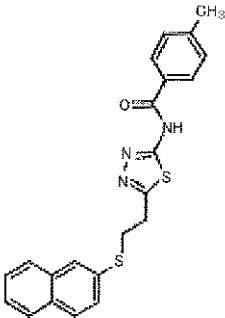
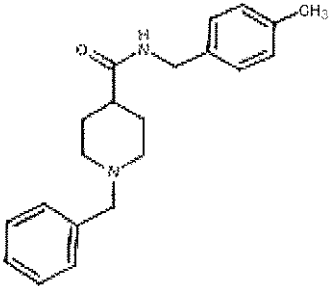
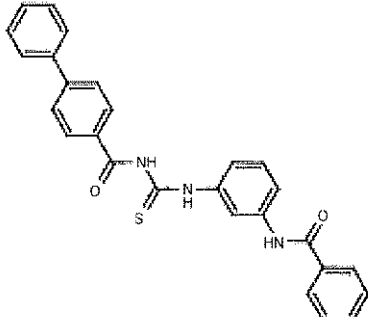
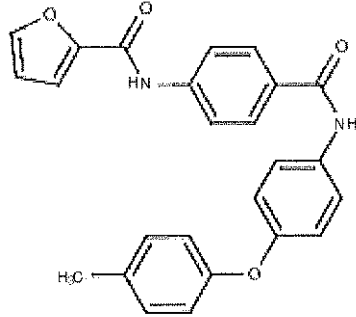
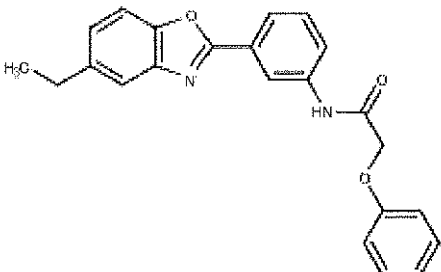
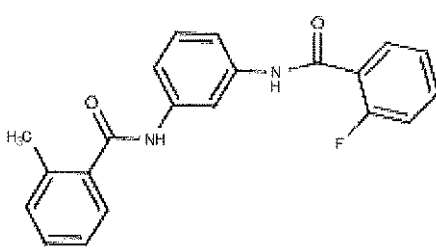
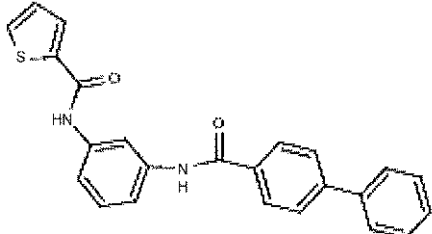
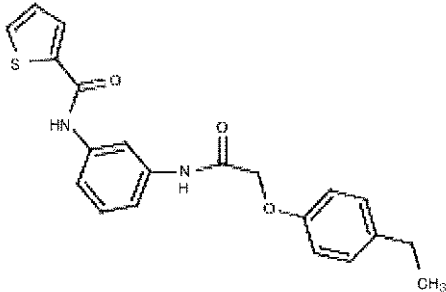
		10
		20
		30
		40

		10
		20
		30
		40

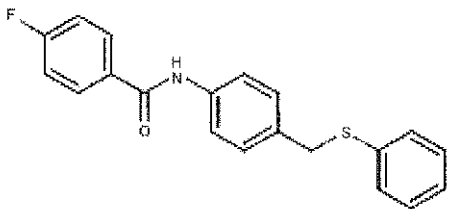
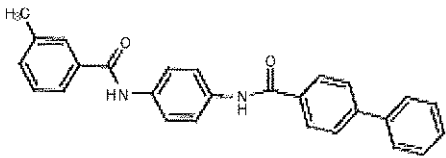
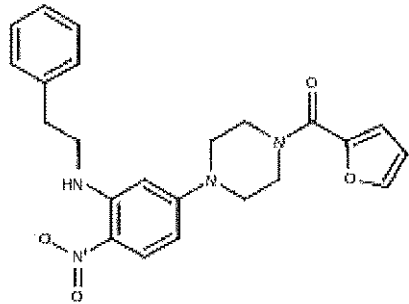
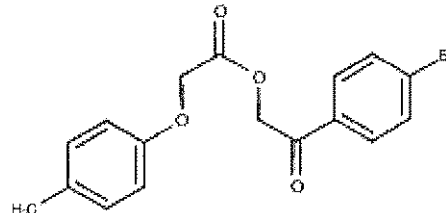
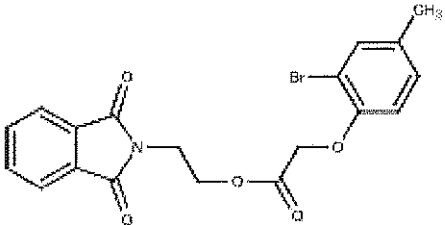
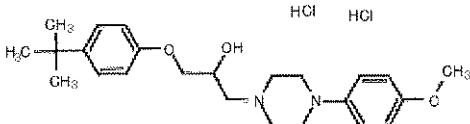
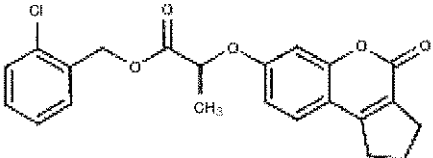
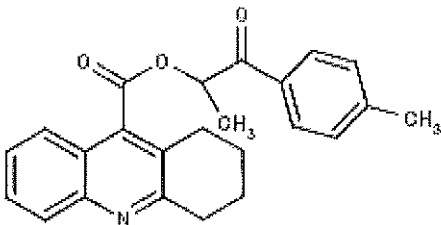
【 0 2 1 0 】

		10
		20
		30
		40

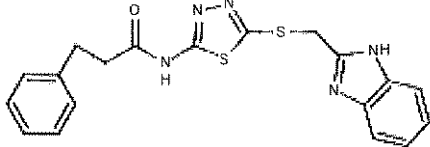
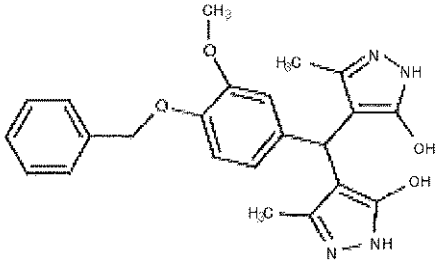
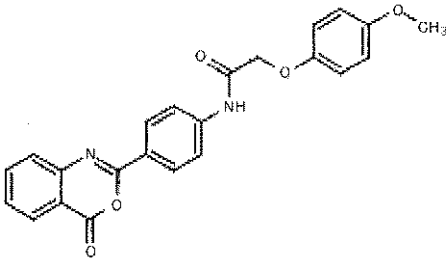
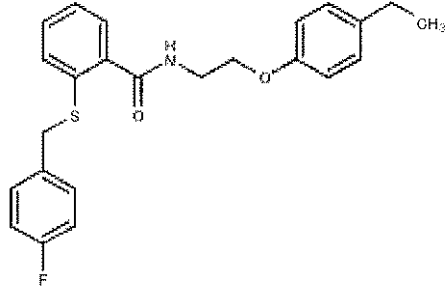
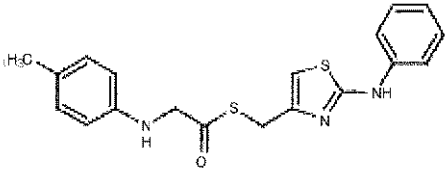
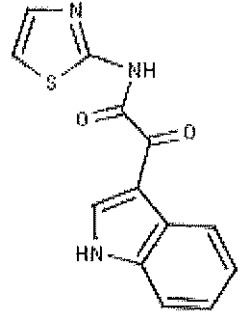
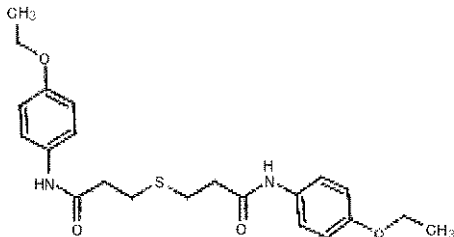
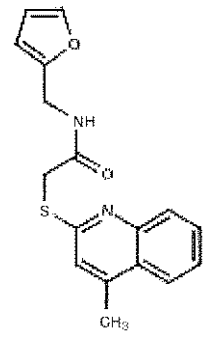
【 0 2 1 1 】

		10
		20
		30
		40

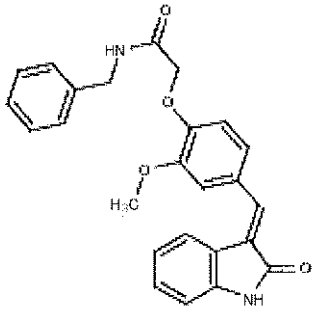
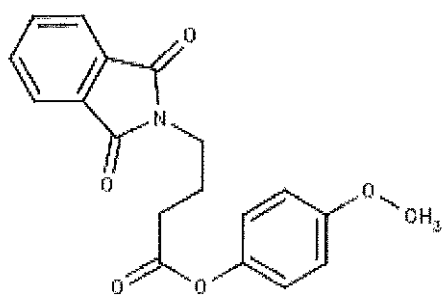
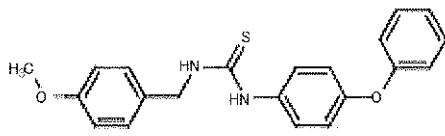
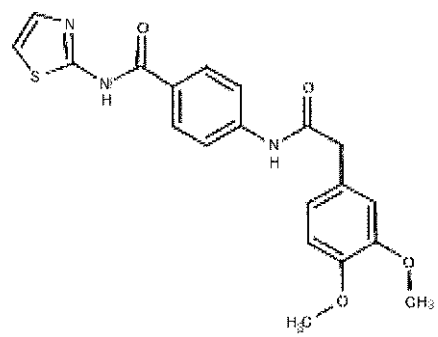
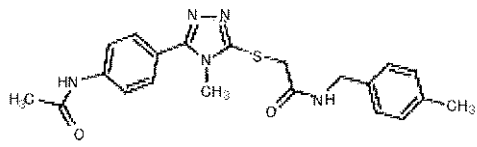
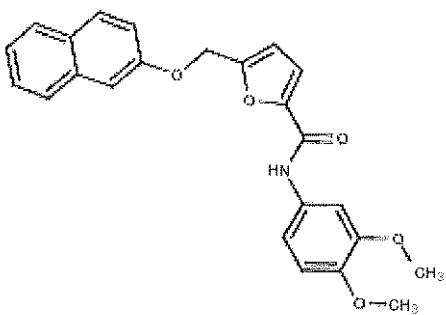
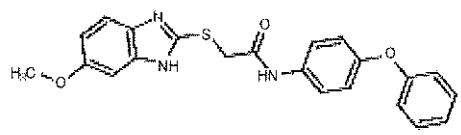
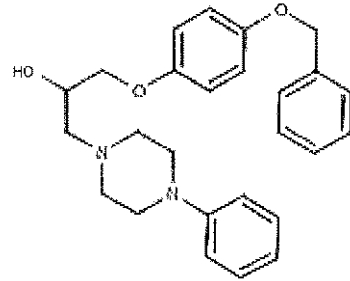
【 0 2 1 2 】

		10
		20
		30
		40

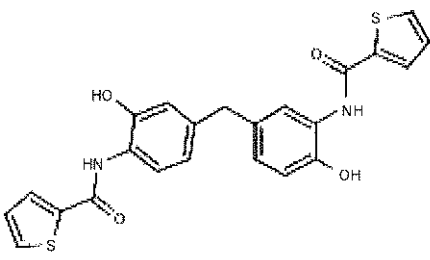
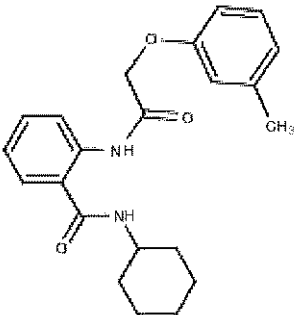
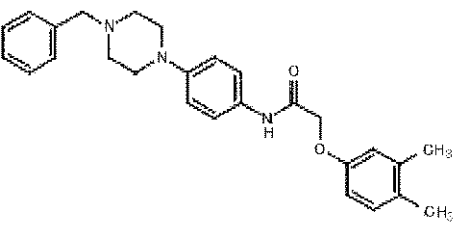
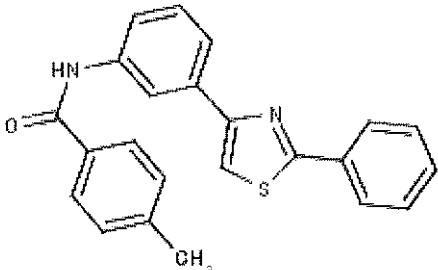
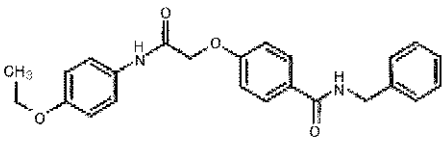
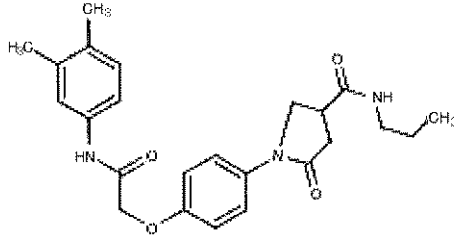
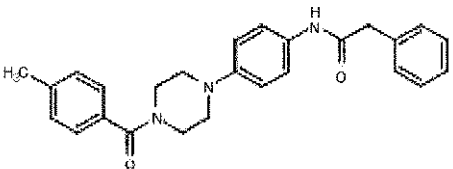
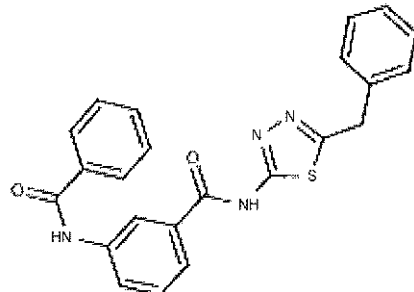
【 0 2 1 3 】

		10
		20
		30
		40

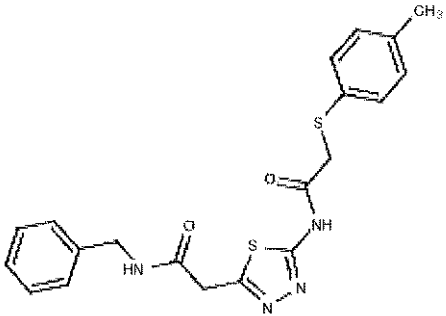
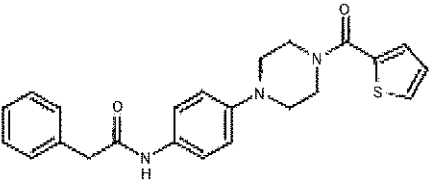
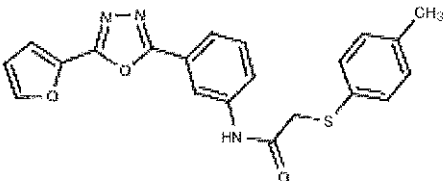
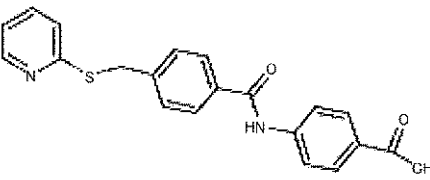
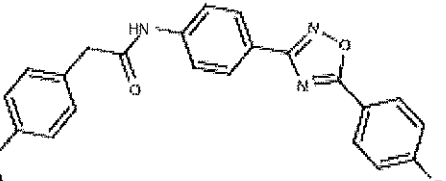
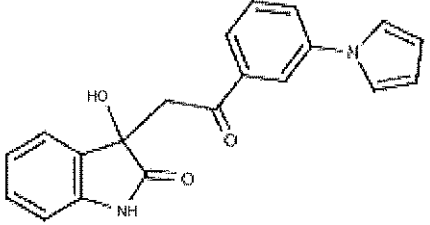
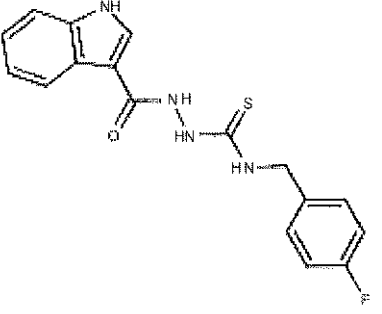
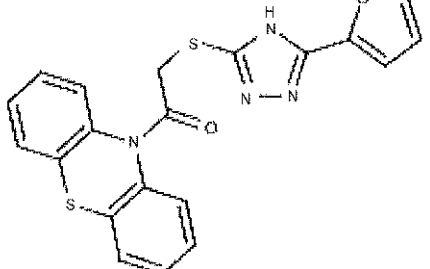
【 0 2 1 4 】

		10
		20
		30
		40

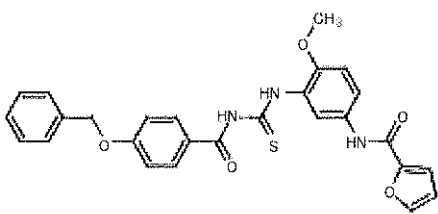
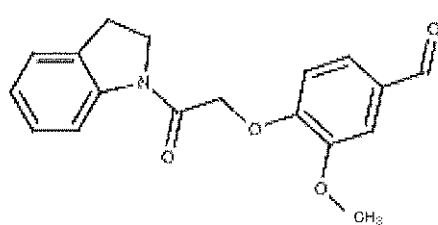
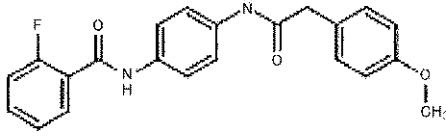
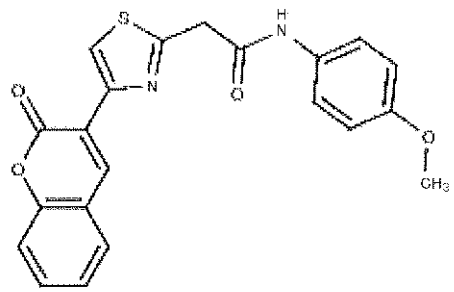
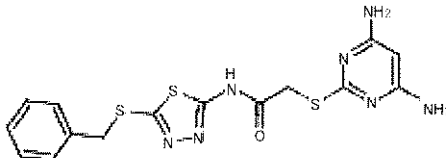
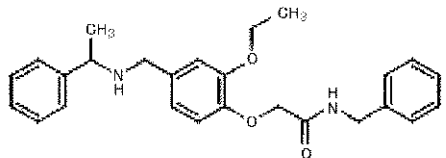
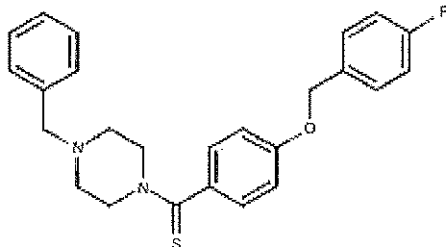
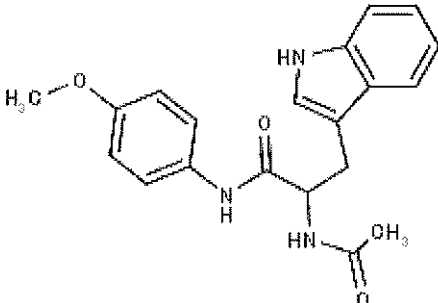
【 0 2 1 5 】

		10
		20
		30
		40

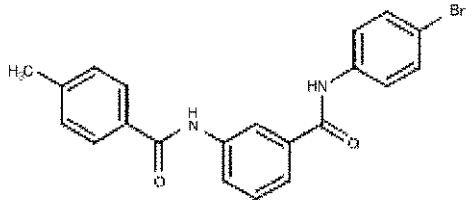
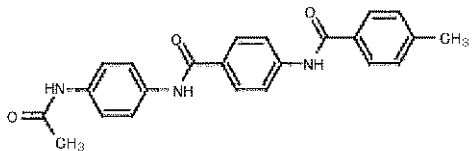
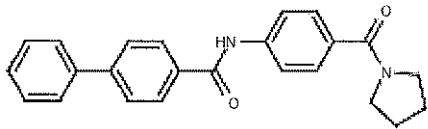
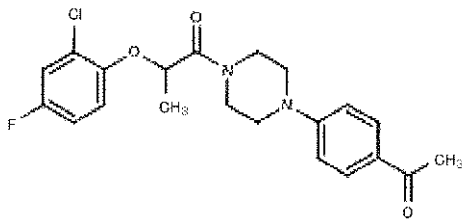
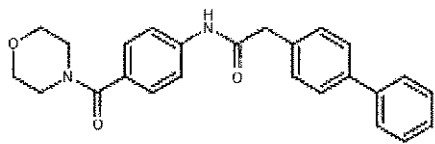
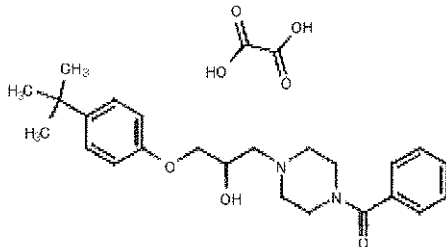
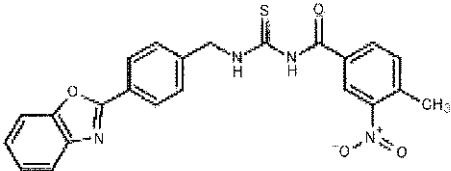
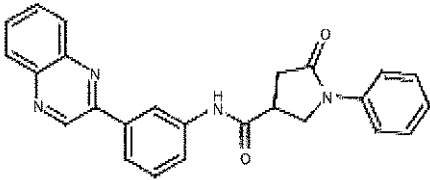
【 0 2 1 6 】

		10
		20
		30
		40

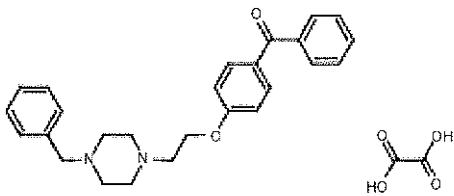
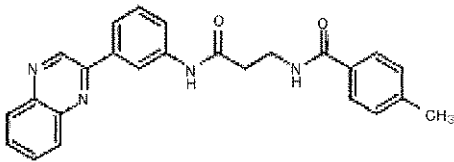
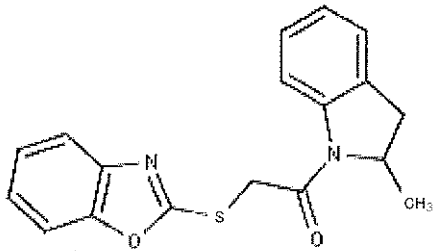
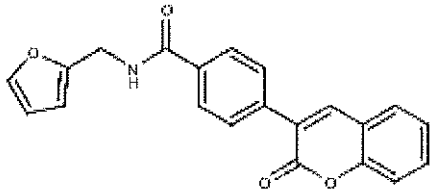
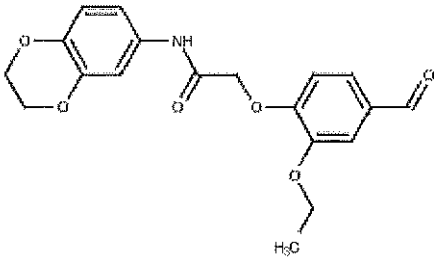
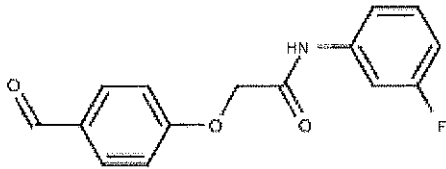
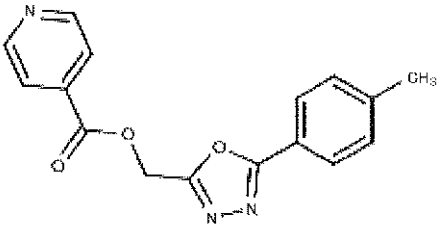
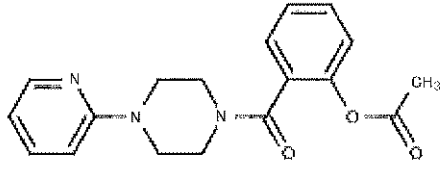
【 0 2 1 7 】

		10
		20
		30
		40

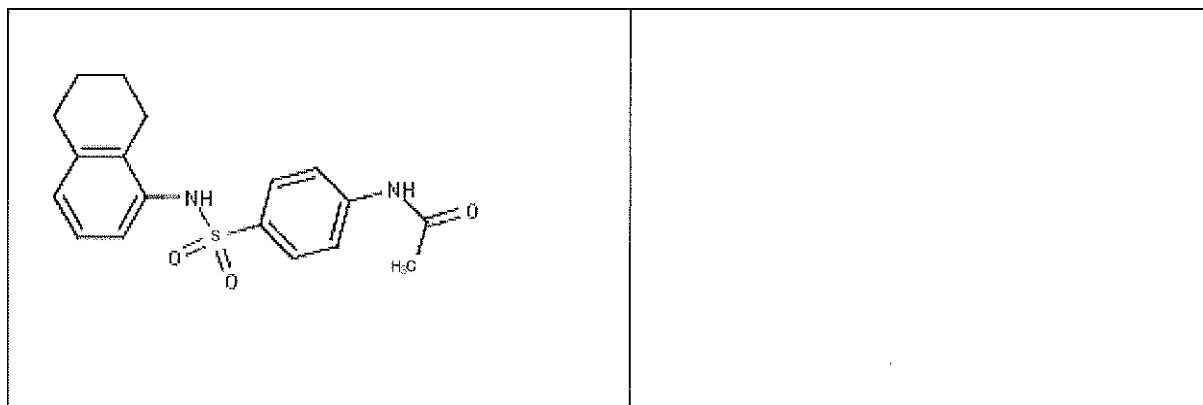
【 0 2 1 8 】

		10
		20
		30
		40

【 0 2 1 9 】

		10
		20
		30
		40

【 0 2 2 0 】



10

【0221】

X. 治療方法

本発明の薬剤は、細胞死シグナルが下方制御されていて、病的細胞が細胞死の傾向を不適切に軽減している（これを本明細書では「減少したアポトーシス状態」と言う）細胞を治療するのに有用である。本発明は更に、薬剤の治療有効量を対象に投与して、ウィルスに感染しているか或いは自己抗体を発現している細胞などのある特定のタイプの細胞にアポトーシスを導入することが望ましい、アポトーシス関連疾患を治療する方法を提供する。通常は、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、等を含む動物であってよく、典型的には哺乳動物であって、特定の実施態様ではヒトである。別の特定の実施態様では、非ヒト哺乳動物が対象である。

20

【0222】

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発現又は活性（例えば、外因性又は内因性アポトーシス経路の異常）に関連する疾患に罹る危険性がある（又は罹りやすい）か或いは疾患を有している対象を治療する、予防的及び治療的な両方法を提供する。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傾向を、治す、癒す、軽減する、和らげる、変える、改善する、改良する、改める又はこれに影響を及ぼす目的で、疾患、疾患の症状又は疾患になりやすい傾向を有する患者に治療薬剤を適用若しくは投与する、又は疾患、疾患の症状又は疾患になりやすい傾向を有する患者由来の単離組織若しくは細胞株に治療薬剤を適用又は投与することであると定義される。治療薬剤は、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、及びこれらの組み合わせを包含する。

30

【0223】

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の過度な又は少ない発現）によって、又は異常な活性を示す1つ又はそれ以上のBCL-2ファミリーメンバーの存在によって引き起こされうる。そのため、本発明は、疾患症状の改善をもたらすであろう、BCL-2ファミリーメンバーのレベル及び／又は活性を減少させること、又はBCL-2ファミリーメンバーのレベル及び／又は活性を増大させることに関する。例えば、BCL-2などの抗アポトーシスタンパク質の過剰レベルによって維持されている腫瘍を、アポトーシス遮断を回避してBAX介在アポトーシスを直接誘発するために、BAX活性化モジュレータ化合物を用いて治療することができる。

40

【0224】

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。本明細書で用いる用語「癌」、「過剰増殖性」及び「腫瘍性」は、自律的増殖能及び細胞死欠損を有している細胞、すなわち、急速増殖型の細胞生育及び／又はアポトーシス遮断によって特徴付けられる異常な状態又は疾患を示す。過剰増殖性及び腫瘍性疾患状態を病的状態（すなわち、疾患状態を特徴としているか或いは疾患状態に相当している）に分類

50

でき、あるいは非病的状態（すなわち、正常から逸脱しているが疾患状態に結びつかない）に分類できる。この用語は、病理組織学的タイプ又は侵襲性の段階に関わりなく、全てのタイプの、癌性生育又は腫瘍形成過程、転移組織又は悪性に形質転換した細胞、組織或いは器官を包含するように意図されている。「病的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍の生育によって特徴付けられる病期に生じる。非病的過剰増殖性細胞の例は、創傷修復に関連している細胞の増殖を包含する。

【0225】

細胞の増殖及び／又は分化の障害の例は、癌、例えば、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、又は転移性疾患を包含する。化合物は、乳癌、卵巣癌、結腸癌、肺癌、このような癌の転移などを制御する新規な治療薬剤として作用できる。転移性腫瘍は、胸部、肺、肝臓、結腸及び卵巣に由来するものを包含するが、これに限定されない、複数の原発腫瘍タイプに起因している。

10

【0226】

癌又は腫瘍性疾患の例は、これに限定されないが、線維肉腫、筋肉種、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、リンパ管内皮肉腫、滑液肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、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、頭頸部の癌、皮膚癌、脳腫瘍、扁平上皮癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛腫、精上皮癌、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、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、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、又はカポシ肉腫を包含する。

20

【0227】

増殖障害の例は、造血器腫瘍性疾患を包含する。本明細書で用いる用語「造血腫瘍性疾患」は、造血器由来の、例えば、骨髄、リンパ又は赤血球系由来の、過形成性／腫瘍性細胞、又はこ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球性白血病から生ずる。骨髄疾患の更なる例は、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./Hematol. 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、B系ALL及びT系ALLを包含している急性リンパ芽球性白血病（ALL）、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）及びヴァルデンス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その変腫、末梢T細胞リンパ腫、成人性T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、大型顆粒リンパ球白血病（LGF）、ホジキン病及びリード・シュテルンベルク病を包含する。

30

【0228】

胸部の細胞増殖及び／又は分化障害の例は、これに限定されないが、例えば、上皮過形成、硬化性腺症、小管乳頭腫を包含する増殖性胸部疾患；腫瘍、例えば、線維腺腫、葉状腫瘍、肉腫などの間質性腫瘍、及び大管乳頭腫などの上皮腫瘍；非浸潤性乳管癌（ページット病を包含する）及び上皮内小葉癌を包含する上皮内（非侵襲性）癌、及びこれに限定されないが、浸潤性腺癌、浸潤性小葉癌、髄様癌、膠様（粘液性）癌、管状腺癌、及び侵襲性乳頭癌を包含する侵襲性（浸潤性）癌、及び混合型悪性腫瘍を包含する。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。

40

【0229】

肺の細胞増殖及び／又は分化障害の例は、これに限定されないが、気管支カルチノイド、混合型腫瘍、及び転移型腫瘍などの、腫瘍随伴症候群、細気管支肺胞腫瘍、神経内分泌腫瘍を包含する気管支癌；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、炎症性胸水浸出、非炎症性胸水浸出、気胸、及び胸膜腫瘍を包含する、胸膜の病変を含ん

50

でいる。

【0230】

結腸の細胞増殖及び／又は分化障害の例は、これに限定されないが、非腫瘍性ポリープ、腺腫、家族性症候群、結腸直腸発癌、結腸直腸癌、及びカルチノイド腫瘍を包含する。

【0231】

肝臓の細胞増殖及び／又は分化障害の例は、これに限定されないが、結節性過形成、腺腫、及び肝臓の原発性癌及び転移性腫瘍を包含する、悪性腫瘍を包含する。

【0232】

卵巣の細胞増殖及び／又は分化障害の例は、これに限定されないが、体腔上皮の腫瘍、漿液腫瘍、粘液腫瘍、子宮内膜性腫瘍、透明細胞腺癌、嚢胞腺線維腫、ブレンナー腫瘍、表面上皮腫瘍などの卵巣腫瘍；成熟（良性）奇形腫、単胚葉性奇形種、未熟悪性奇形種、未分化胚細胞腫、卵黄嚢腫瘍、絨毛腫などの胚細胞腫瘍；顆粒膜－卵胞膜細胞腫瘍、卵胞膜線維腫、セルトリ間質細胞腫瘍、門（h i l l）細胞腫瘍、及び性腺芽腫などの、性索間質腫瘍；及びクルケンベルグ腫瘍などの転移性腫瘍を包含する。

【0233】

本明細書に記載されている化合物は、過剰活性な細胞死又は病理学的損傷による細胞死によって特徴付けられる疾患を治療又は予防するために用いることもできる。早期又は不要な細胞死、及び／又は不要又は過剰な細胞増殖によって特徴付けられる疾患のいくつかの例は、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／再生不良性、又は富細胞性／過形成性の疾患を包含する。いくつかの例は、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、骨髓異形成を包含する血液疾患を包含する。

【0234】

アポトーシスを減少するように作用する本発明の化合物は、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は、ウィルス感染、例えば、ヒト免疫不全ウィルス（H I V）による感染に関連している感染、と関連している細胞死を引き起こすような疾患を治療するために用いることができる。各種の神経障害は、神経細胞の特定の集合が徐々に失われることを特徴としているので、感染症の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（A L S）、網膜色素変性症、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性の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見られる。更に、多くの血液疾患は、血液細胞の減少した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、及び骨髓異形成症候群を包含する。骨髓異形成症候群及び再生不良性貧血のいくつかの形態などの、血液細胞産生の障害は、骨髓内での増大した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、間質細胞或いは造血生存因子の後天的欠乏、又は毒素及び免疫応答のメディエータの直接的作用に起因しているだろう。細胞死に関連している2つの一般的な疾患は心筋梗塞及び脳卒中である。両疾患において、血流の急速な損失事象で引き起こされた虚血の中央領域内の細胞が、壊死の結果として急速に死亡すると考えられる。しかしながら、虚血中央帯の外側に存在している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すると見られる。本発明のアンチアポトーシス化合物は、好ましくない細胞死に関連しているこのような疾患の全てを治療するために用いることができる。

【0235】

本明細書に記載されている化合物で治療できる免疫疾患のいくつかの例は、これに限定されないが、臓器移植拒絶、関節炎、狼瘡、I B D、クローン病、喘息、多発性硬化症、糖尿病等を包含する。

【0236】

本明細書に記載されているポリペプチドで治療できる神経疾患のいくつかの例は、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、蕁麻疹及び難聴を伴う家族性アミロイド腎症、マックル・ウェルズ症候群、特発性骨髄腫；マクログロブリン血症関連骨髄腫、家族性アミロイド多発性神経障害、家族性アミロイド心筋症、単独心アミロイド、全身性老人性アミロイドーシス、成人発症型糖尿病、インスリノーマ、単独心房性アミロイド、甲状腺の髓様癌、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、家族性アミロイド性多発性神経障害、スクレピー、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、ウシ海綿状脳炎、プリオン媒介疾患、及びハンチントン病を包含する。

【0237】

本明細書に記載されているポリペプチドによって治療できる内分泌疾患のいくつかの例は、これに限定されないが、糖尿病、甲状腺機能亢進症、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。

【0238】

本発明の化合物及び方法で治療又は予防できる心血管疾患（例えば、炎症性疾患）は、これに限定されないが、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中、血栓症、動脈瘤、心不全、虚血性心疾患、狭心症、突然心臓死、高血圧性心疾患；動脈硬化症、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などの、非冠状血管疾患；又は血管形成後の再狭窄、シャント、ステント、合成又は天然切除の移植片、留置カテーテル、弁又は他の移植可能デバイスの留置などの、介入手順（「手術による血管外傷」）に関連する心血管疾患を包含する。好ましい心血管疾患はアテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、動脈瘤、及び卒中を包含する。

【0239】

XI. モジュレータの投与

一実施態様では、本発明の化合物は、本明細書に開示されている疾患の予防、治療、及び／又は管理のための単独療法として投与される。

【0240】

本発明の一態様は、患者（例えば、ヒト患者）の癌を予防、治療、及び／又は管理する方法に関し、その方法は、予防的に有効なレジメン又は治療的に有効なレジメンを患者に投与することを含有してなり、レジメンは本発明の化合物又は本発明の組成物を患者に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／又は治療のレジメンで用いられる本発明の化合物の量は、化合物の現在処方されている用量に、さらに本明細書に開示されている方法で評価されているものに基づくことができる。

【0241】

この態様の一実施態様では、患者は別の治療を受けたか或いは受けている。この態様の別の実施態様では、患者は、癌の予防、治療、及び／又は管理のための治療を未だ受けていない。

【0242】

医師は、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、腹部診察、皮膚観察）、視覚法（例えば、大腸内視鏡検査、気管支鏡検査、内視鏡検査）、パップスメア分析（子宮頸癌）、便グアヤク分析、血液検査（例えば、全血球計算（CBC）試験）、肝機能検査を包含する血液化学試験、前立腺特異抗原（PSA）試験、癌胎児抗原（CEA）試験、癌抗原（CA）-125試験、 α -フェトプロテイン（AFP）、染色体分析、骨髄分析（例えば、血液系悪性腫瘍の場合）、組織学、細胞学、唾液分析及び画像検査法（例えば、コンピュータ断層撮影法（CT）、核磁気共鳴映像法（MRI）、超音波、X線画像、乳房撮影画像、骨のスキアン）を包含する、通常の癌スクリーニング方法の何れかを用いて患者を診断することができる。

【0243】

本発明の別の態様は、患者（例えば、ヒト患者）の固形癌を予防、治療、及び／又は管理する方法に関し、その方法はそれを必要としている患者に予防的に有効なレジメン又は治療的に有効なレジメンを投与することを含有してなり、レジメンは本発明の化合物又は組成物を患者に投与することを含有していて、ここで患者は固形癌を有していると診断されていて、患者は癌の嵩を縮小する初期の治療を受けている。

【0244】

本発明の別の態様は、癌を予防、治療、及び／又は管理する方法に関し、その方法はそれを必要としている患者に予防的に有効なレジメン又は治療的に有効なレジメンを投与することを含有し、レジメンは本発明の化合物（上記のような）、又はそれら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。ある実施態様では、以前の治療は、例えば、化学療法、放射免疫治療、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、標的療法又はこれらの何れかの組み合わせである。

10

【0245】

ある実施態様では、患者における以前の治療が失敗している。ある実施態様では、本発明の化合物を投与することを含有している治療的に有効なレジメンを、患者が以前の治療を受けた直後に患者に投与する。例えば、ある特定の実施態様では、以前の治療の結果は、患者に本発明の化合物を投与する前には不明であってもよい。

【0246】

本発明の別の態様は、患者（例えば、ヒト患者）の癌を予防、治療、及び／又は管理する方法に関し、その方法はそれを必要としている患者に予防的に有効なレジメン又は治療的に有効なレジメンを投与することを含有してなり、そのレジメンは本発明の化合物又は組成物を患者に投与することを含有していて、そこで、本発明の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渡る無毒性量（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るようなNOAELは、ヒト臨床試験に対する最大推奨開始用量の決定に有用である。例えば、NOAELはヒト等価用量を決定するため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、体表面積で正規化した用量（すなわち、 mg/m^2 ）に基づいて実行される。ある特定の実施態様では、NOAELは、マウス、ハムスター、ラット、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）、マイクロプタ又はミニプタで確認される。NOAELの使用及びヒト等価用量を決定するためのそれらの外挿についての検討は、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。

20

30

【0247】

ある特定の実施態様では、レジメンは、予防的に有効なレジメン又は治療的に有効なレジメンを投与することを含有してなり、ここではレジメンが患者における癌細胞集団の減少をもたらす。一実施態様では、このレジメンを受けている患者を、このレジメンが患者における癌細胞集団の減少をもたらしているか否かを確認するためにモニタリングする。

40

【0248】

一般に、癌細胞集団のモニタリングは、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り実施できる。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。このモニタリングステップは一般に、患者がレジメンを受けた少なくとも1、2、4、6、8、10、12、14、15、16、18、20、又は30日後に実施される。

【0249】

ある実施態様では、試料は血液試料であってよく、ここでは単位容量（例えば、1 mL）当たり又はその他の測定単位（例えば、組織学的分析の場合は単位区域当たり）の癌細胞

50

胞の数又は量を定量する。ある特定の実施態様では、癌細胞集団を全血液細胞に対するパーセンテージとして決定することができる。

【0250】

別の実施態様では、患者から抽出される試料は組織試料（例えば、疑わしい癌性組織から抽出する生検）であって、ここでは癌細胞の数又は量は、例えば、組織の単位重量当たりの癌細胞の数又は量に基づいて測定される

【0251】

抽出された試料中の癌細胞の数又は量を、参照サンプル中で測定した癌細胞の数又は量と比較して、レジメン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。一実施態様では、参照サンプルは治療を受けている患者から抽出した試料であり、そこでは、患者由来の試料はより早い時点（例えば、基準参照サンプルとして、レジメンを受ける前、又はレジメンを受けている間の早期時点で）に抽出される。別の実施態様では、参照サンプルは健常、非癌患者から抽出される。

【0252】

別の実施態様では、抽出試料中の癌細胞集団を所定の参照範囲と比較することができる。特定の実施態様では、所定の参照範囲は、治療を受けている患者と同じタイプの癌を患っている患者の集団（複数も）から得られた癌細胞の数又は量に基づいている。

【0253】

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、又はパーセンテージが参照サンプルと比較して、癌細胞集団の減少が非常に小さいと判断される場合には、次いで、医師は、治療レジメンを調節する多くの選択肢を有する。例えば、次いで、医師は、投与する本発明の化合物又は組成物の用量、投与の頻度、投与期間、又はこれらのあらゆる組み合わせ、の何れかを増やすことができる。特定の実施態様では、この決定がなされた後に、本発明の化合物又は組成物の第2有効量を患者に投与することができる。

【0254】

別の実施態様では、レジメンは、本発明の化合物又は組成物を投与することを含有してなり、ここでレジメンは癌細胞の数、量、又はパーセンテージの減少、及び患者における癌細胞の数、量、又はパーセンテージの減少をもたらす。

【0255】

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用いられる本発明の化合物の量は、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て当該技術分野で公知の方法で評価されている用量に基づいて用いることができる。頻度及び用量は、投与される特定の化合物、癌疾患の重症度、投与経路、更に患者の年齢、身体、体重、応答及び過去の病歴に基づく、各患者に対する特異的な因子に従っても変化する。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は、例えば本明細書に開示されているか或いは当業者に公知の動物モデルなどの、動物モデルに化合物を投与することによって決定することができる。更に、インビトロアッセイを、最適な用量範囲の確認を支援するために随意に利用することができる。

【0256】

ある実施態様では、予防及び／又は治療レジメンは、ある特定程度の治療効果を達成できるように、患者に投与する用量を滴定することを含有してなる。このような程度は患者における癌細胞集団の減少を包含する。

【0257】

ある特定の実施態様では、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、参照サンプルと比較して、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に見出された癌細胞の数又は量の減少を達成するように調節される。ここで、参照サンプルは治療を受けている患者から抽出された試料であり、そこでは試料はより早い時点で患者から抽出される。一実施態様では、参照サンプルは予防及び／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。特定の実施態様では、試験試料中の癌細胞の数又は量は、参照サンプル中よりも、少なくとも2%、5%、10%、1

10

20

30

40

50

5 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %又は99 %少ない。

【0258】

ある実施態様では、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、所定の参照範囲内に入っている癌細胞の数又は量に達するように調節される。これらの実施態様では、試験試料中の癌細胞の数又は量を所定の参照範囲と比較する。

【0259】

別の実施態様では、予防及び／又は治療レジメンにおける化合物の用量は、参照サンプル（ここで、参照サンプルは健常で、癌に冒されていない患者から抽出された試料である）と比較して、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に見出される癌細胞の数又は量の減少をもたらすように調節される。特定の実施態様では、試験試料中の癌細胞の数又は量は、参照サンプル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。

【0260】

固形癌を有しているある特定のヒト患者の治療では、腫瘍の疑いのある部位から複数の組織試料を抽出することは実施不可能であるかもしれない。このような実施態様では、ヒト患者用の予防及び／又は治療レジメンにおける本発明の化合物の用量は、動物モデルにおいて癌集団の減少に有効であるそれらの動物モデルでの用量から外挿される。その動物モデルでは、予防及び／又は治療レジメンは、参照サンプルと比較したときに、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に見出される癌細胞の数又は量の減少をもたらすように調節される。参照サンプルは、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。特定の実施態様では、試験試料中の癌細胞の数又は量は、参照サンプル中よりも、少なくとも2 %、5 %、10 %、15 %、20 %、30 %、40 %、50 %又は60 %少ない。動物における癌細胞の数又は量を減少するのに有効な用量を、体表面積について正規化して（例えば、 mg/m^2 ）、等価ヒト用量をもたらすことができる。

【0261】

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れらの医薬組成物の患者への単回投与又は複数回投与（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20回、又はそれ以上の投与）を含有してなる。

【0262】

一実施態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物又はそれらの医薬組成物の複数回投与による投与を含有してなる。複数回投与によって投与する場合は、化合物又は医薬組成物を、症状を予防、治療、及び／又は管理するのに十分なある頻度で及びある量で投与する。一実施態様では、投与の頻度は、1日1回からおよそ8週間に1回までに及ぶ。別の実施態様では、投与の頻度は、およそ1週間に1回からおよそ6週間に1回までに及ぶ。別の実施態様では、投与の頻度は、およそ3週間に1回からおよそ4週間に1回までに及ぶ。

【0263】

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、対象の体重に対して、 $0.01 \sim 500 \text{ mg}/\text{kg}$ の範囲、より一般的には、 $0.1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 100 \text{ mg}/\text{kg}$ の範囲である。一実施態様では、対象に投与される用量は、対象の体重に対して、 $0.1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 50 \text{ mg}/\text{kg}$ 、又は $1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 50 \text{ mg}/\text{kg}$ の範囲で、より好ましくは、患者の体重に対して、 $0.1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 25 \text{ mg}/\text{kg}$ 、又は $1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 25 \text{ mg}/\text{kg}$ の範囲である。

【0264】

特定の実施態様では、患者における癌を予防、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、患者の体重に対して $500 \text{ mg}/\text{kg}$ 又はそれ以下、好ましくは、 $250 \text{ mg}/\text{kg}$ 又はそれ以下、 $100 \text{ mg}/\text{kg}$ 又はそれ以下、 $95 \text{ mg}/\text{kg}$ 又はそれ以下、 $90 \text{ mg}/\text{kg}$ 又はそれ以下、 $85 \text{ mg}/\text{kg}$ 又はそれ以下、8

0 mg/kg 又はそれ以下、75 mg/kg 又はそれ以下、70 mg/kg 又はそれ以下、65 mg/kg 又はそれ以下、60 mg/kg 又はそれ以下、55 mg/kg 又はそれ以下、50 mg/kg 又はそれ以下、45 mg/kg 又はそれ以下、40 mg/kg 又はそれ以下、35 mg/kg 又はそれ以下、30 mg/kg 又はそれ以下、25 mg/kg 又はそれ以下、20 mg/kg 又はそれ以下、15 mg/kg 又はそれ以下、10 mg/kg 又はそれ以下、5 mg/kg 又はそれ以下、2.5 mg/kg 又はそれ以下、2 mg/kg 又はそれ以下、1.5 mg/kg 又はそれ以下、又は 1 mg/kg 又はそれ以下である。

【0265】

別の特定の実施態様では、患者における癌を予防、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、0.1～50 mg、0.1 mg～20 mg、0.1 mg～15 mg、0.1 mg～12 mg、0.1 mg～10 mg、0.1 mg～8 mg、0.1 mg～7 mg、0.1 mg～5 mg、0.1 mg～2.5 mg、0.25 mg～20 mg、0.25 mg～15 mg、0.25 mg～12 mg、0.25 mg～10 mg、0.25 mg～8 mg、0.25 mg～7 mg、0.25 mg～5 mg、0.5 mg～2.5 mg、1 mg～20 mg、1 mg～15 mg、1 mg～12 mg、1 mg～10 mg、1 mg～8 mg、1 mg～7 mg、1 mg～5 mg、又は 1 mg～2.5 mg の単位用量である。

【0266】

特定の実施態様では、患者における癌を予防、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、対象の体重に対して、0.01～10 g/m² の範囲、そしてより一般的には、0.1 g/m²～7.5 g/m² の範囲である。一実施態様では、対象に投与される用量は、対象の体表面積に対して、0.5 g/m²～5 g/m²、又は 1 g/m²～5 g/m² の範囲である。

【0267】

別の実施態様では、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なり、そこでは有効量の用量が、本発明の化合物の、少なくとも0.1 µg/ml、少なくとも0.5 µg/ml、少なくとも1 µg/ml、少なくとも2 µg/ml、少なくとも5 µg/ml、少なくとも6 µg/ml、少なくとも10 µg/ml、少なくとも15 µg/ml、少なくとも20 µg/ml、少なくとも25 µg/ml、少なくとも50 µg/ml、少なくとも100 µg/ml、少なくとも125 µg/ml、少なくとも150 µg/ml、少なくとも175 µg/ml、少なくとも200 µg/ml、少なくとも225 µg/ml、少なくとも250 µg/ml、少なくとも275 µg/ml、少なくとも300 µg/ml、少なくとも325 µg/ml、少なくとも350 µg/ml、少なくとも375 µg/ml、又は少なくとも400 µg/ml の血漿濃度を達成する。

【0268】

別の実施態様では、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用量を患者に投与することを含有してなり、そこでは複数の用量が、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ヶ月に渡り、本発明の化合物の、少なくとも0.1 µg/ml、少なくとも0.5 µg/ml、少なくとも1 µg/ml、少なくとも2 µg/ml、少なくとも5 µg/ml、少なくとも6 µg/ml、少なくとも10 µg/ml、少なくとも15 µg/ml、少なくとも20 µg/ml、少なくとも25 µg/ml、少なくとも50 µg/ml、少なくとも100 µg/ml、少なくとも125 µg/ml、少なくとも150 µg/ml、少なくとも175 µg/ml、少なくとも200 µg/ml、少なくとも225 µg/ml、少なくとも250 µg/ml、少なくとも275 µg/ml、少なくとも300 µg/ml、少なくとも325 µg/ml、少なくとも350 µg/ml、少なくとも375 µg/ml、又は少なくとも400 µg/ml の血漿濃度を保持する。

【0269】

ある実施態様では、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法と組み合わせて投与することを含有してなる。併用療法で用いられる1つ又はそれ以上の追加抗癌治療法の用量が、癌を予防、治療、及び／又は管理するために用いられてきた、或いは現在用いられているそれよりも低いことが好ましい。癌を予防、治療、及び／又は管理するために現在用いられている1つ又はそれ以上の追加抗癌治療法の推奨用量は、これに限定されないが、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) (これはその全てが、参照により本明細書に取り込まれている) を包含する、当該技術分野の何れかの参考文献から入手することができる。

10

【0270】

本発明の化合物及び1つ又はそれ以上の追加抗癌治療法は、別々に、同時に、又は連続して投与することができる。多くの実施態様では、本発明の化合物と追加の抗癌治療法は、少なくとも5分おいて、少なくとも30分おいて、少なくとも1時間おいて、約1時間おいて、約1～約2時間おいて、約2時間～約3時間おいて、約3時間～約4時間おいて、約4時間～約5時間おいて、約5時間～約6時間おいて、約6時間～約7時間おいて、約7時間～約8時間おいて、約8時間～約9時間おいて、約9時間～約10時間おいて、約10時間～約11時間おいて、約11時間～約12時間おいて、約12時間～18時間おいて、18時間～24時間おいて、24時間～36時間おいて、36時間～48時間おいて、48時間～52時間おいて、52時間～60時間おいて、60時間～72時間おいて、72時間～84時間おいて、84時間～96時間おいて、又は96時間～120時間おいて投与する。好ましい実施態様では、2つ又はそれ以上の抗癌治療法を同じ診察時の内に投与する。

20

【0271】

ある特定の実施態様では、本発明の化合物及び追加の抗癌治療法を周期的に投与する。周期治療は、1つの抗癌治療法をある期間投与して、続いて第2の抗癌治療法をある期間投与して、この順次投与を繰り返すこと、すなわち、一方又は両方の抗癌治療法に対する耐性の進展を減少するため、一方又は両方の抗癌治療法の副作用を無効に又は減少するため、そして／又は治療薬の有効性を改善するための周期を包含する。

30

【0272】

好ましい実施態様では、抗癌治療法を別の組成物で対象に同時に投与する。本発明の併用抗癌治療法は同一又は異なった投与経路で対象に投与されてもよい。

【0273】

特定の実施態様では、周期治療は、ある期間第1抗癌治療法を投与して、それに続いてある期間第2の抗癌治療法を投与して、随意に、それに続いて第3の抗癌治療法を投与してなど、そしてこの連続投与を繰り返して、すなわち、1つの抗癌治療法の耐性の進展を減少するため、1つの抗癌治療法の副作用を無効に又は減少するため、そして／又は抗癌治療法の効果を改善するための周期を包含する。

【0274】

本発明の化合物と追加の抗癌治療法を対象に同時に投与する場合の、用語「同時に」は、全く同時点での抗癌治療法の投与に限定されるのではなく、むしろ、これらが共に作用できるように（例えば、これらを別の方法で投与した場合より増大した利益を相乗的にもたらすように）これらを順に及びある時間間隔以内に対象に投与することを意味している。例えば、抗癌治療法を同時に又は異なった時点で何れかの順序で順次投与できるが、しかし、同時点に投与しない場合は、望ましい治療効果（好ましくは相乗的な様式に）をもたらすように、十分に近い時点に投与すべきである。本発明の併用抗癌治療法は、あらゆる適切な経路によってあらゆる適切な形態で、別々に投与することができる。併用抗癌治療法の構成成分を同じ医薬組成物中で投与しない場合は、これらを、それを必要としている対象に何れかの順序で投与できると理解できる。

40

50

【0275】

例えば、本発明の化合物を、それを必要としている対象に、追加の抗癌治療法の投与前（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、それと同時に、又はそれに続いて（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。

【0276】

多様な実施態様では、抗癌治療法を、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～2時間離して、2時間～3時間離して、3時間～4時間離して、4時間～5時間離して、5時間～6時間離して、6時間～7時間離して、7時間～8時間離して、8時間～9時間離して、9時間～10時間離して、10時間～11時間離して、11時間～12時間離して、24時間まで離して、又は48時間まで離して投与する。一実施態様では、抗癌治療法を同じ外来診察時に投与する。別の実施態様では、本発明の併用抗癌治療法を1分～24時間離して投与する。

【0277】

X I I . 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く、当該対象は、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、家禽、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモットなどの、非ヒト動物を包含する動物であることが好ましく、哺乳動物であることがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【0278】

癌の予防、治療、及び／又は管理に有効であろう予防及び／又は治療のレジメンに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を基にすることができる。あるいは、化合物を当該技術分野の知見及び本明細書の教示に基づき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（エアゾル）の形態にすることができる。投与の一般的な経路は、これに限定されないが、経口、局所、非経口、舌下、直腸内、膣内、眼内、皮内、腫瘍内、脳内、髄腔内、及び鼻腔内を包含できる。非経口投与は、皮下注射、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸膜内、胸骨内注射又は輸液手法を包含する。特定の実施態様では、組成物を非経口で投与する。より特定の実施態様では、組成物を静脈内に投与する。本発明の医薬組成物は、対象へ組成物を投与すると本発明の化合物が生体に吸収され利用されるように製剤化できる。組成物は1つ又はそれ以上の用量単位の形態を取ることができ、そこで、例えば、錠剤は単一用量単位であってよく、エアゾル形態の本発明の化合物の容器は複数の用量単位を保持することができる。

【0279】

医薬組成物の調製で用いられる物質は、用いられる量において毒性を示さないものでよい。医薬組成物中の有効成分（複数も）の最適な用量は多くの因子によって決まるということは当業者にとって明白なことであろう。関連のある因子は、これに限定されないが、対象の種類（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種類、多剤レジメンの1部としての組成物の使用、本発明の化合物の特定の形態、投与方法、及び用いられる組成物を包含する。

【0280】

薬学的に許容される担体又は賦形剤は、組成物を、例えば、錠剤又は粉末の形態にするために、微粒子でもよい。組成物を、例えば、経口用シロップ又は注射液とするために、担体（複数も）は液体でもよい。また、担体（複数も）は、例えば、吸入投与に有用なエアゾル組成物を提供するために、気体でもよい。

【0281】

用語「担体」は、これと共に本発明の化合物を投与する、希釈剤、補助剤又は賦形剤を示す。このような製薬用の担体は、水及び、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの、石油、動物、植物又は合成由来のものを包含する、油などの、液体でよい。担体は、生理食塩水、アラビア・ゴム、ゼラチン、澱粉糊、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素等でよい。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。一実施態様では、対象に投与するとき、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、水は好ましい担体である。生理食塩溶液並びに水性ブドウ糖及びグリセロール溶液も、特に注射溶液のための、液体担体として利用できる。適切な製薬用の担体は、澱粉、ブドウ糖、乳糖、蔗糖、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、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等も包含する。この組成物は、所望により、少量の湿潤或いは乳化剤、又はpH緩衝剤も含有することができる。

10

【0282】

組成物は、経口投与を意図としてよく、そしてそのような場合、組成物は固体又は液体の形態が好ましく、ここで、半固体状、半液体状、懸濁液及びゲル形態は、本明細書で液体又は固体の何れかと考えられている形態内に包含される。

【0283】

経口投与のための固形組成物として、組成物を粉末剤、顆粒剤、圧縮錠剤、丸剤、カプセル、チューインガム、ウエハース又は同様の形態に製剤化することができる。このような固形組成物は一般に、1つ又はそれ以上の不活性希釈剤を含有している。さらに、以下のものの1つ又はそれ以上が存在していてもよい：エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、微結晶性セルロース、又はゼラチンなどの結合剤；澱粉、乳糖又はデキストリンなどの賦形剤；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）などの滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；蔗糖又はサッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、サリチル酸メチル又はオレンジエッセンスなどの着色料；及び着色剤。

20

【0284】

医薬組成物が、カプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形態である場合は、上記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などの液体の担体を含有できる。

30

【0285】

医薬組成物は、液体の形態、例えば、エリキシル剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁液であってよい。液体は経口投与に、或いは注射による送達に有用である。経口投与を意図としたときは、組成物は1つ又はそれ以上の甘味剤、保存剤、染料／着色料、及び香味料を含有できる。注射によって投与するための組成物では、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包含できる。

【0286】

本発明の液体組成物は、それらが溶液、懸濁液又はその他の類似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も包含できる：注射用蒸留水、食塩溶液、好ましくは生理食塩水、リンゲル溶液、等張食塩水、溶媒又は懸濁媒体として働く合成モノー又はジグリセリドなどの固定油、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などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤；及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張力を調節する試薬。非経口組成物は、ガラス、プラスチック又はその他の素材で作られたアンプル、使い捨て注射筒、又は複数回投与用バイアルに封入できる。生理食塩水は好ましい補助剤である。注射用組成物は滅菌されていることが好ましい。

40

50

【0287】

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有効量を含有できる。

【0288】

一般に有効量は、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0.1重量%と80重量%の間で変化してよい。好ましい経口組成物は、組成物の4重量%と50重量%の間の本発明化合物を含有できる。本発明の好ましい組成物は、非経口用量単位が0.01重量%と2重量%の間の本発明化合物を含有できるように調製される。

10

【0289】

本発明の組成物は適当な何れの経路によっても、例えば、点滴又はボーラス注射によって、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）を介する吸収によって、投与できる。投与は全身的又は局所的であってよい。多様な送達システム、例えば、微小粒子、マイクロカプセル、カプセル等は公知であって、本発明の化合物を投与するために有用である。ある特定の実施態様では、本発明の1つ以上の化合物を対象に投与する。投与方法は、これに限定されないが、経口投与及び非経口投与；これに限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下を包含する非経口投与；鼻腔内、硬膜外、舌下、鼻腔内、脳内、心室内、髄腔内、腔内、経皮、直腸内；耳、鼻、眼、又は皮膚へ吸入、又は局所的によって、を包含できる。投与の好ましい方法は、医師の裁量に委ねられ、一部は疾患の部位（癌、癌性腫瘍又は前癌疾患の部位など）によって決まる。

20

【0290】

一実施態様では、本発明の化合物を非経口投与する。特定の実施態様では本発明の化合物を静脈内投与する。

【0291】

特定の実施態様では、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、腫瘍又は虚血疾患の場所）に局所的に投与することが望ましい。これは、例えば、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併用して、；注射によって；カテーテルの手段によって；坐薬の手段によって；又は移植の手段によって、実施でき。移植片は、シラスティック（silastic）膜などの膜又は繊維を包含している、多孔質の、無孔の、又はゲル状の材質である。一実施態様では、癌、癌性腫瘍、又は前癌組織の部位（又は以前の部位）に直接注射することによって投与できる。

30

【0292】

肺内投与も、例えば、吸入器又はネブライザー、及びエアロゾル化剤による製剤を用いて、又はフッ化炭素又は合成肺表面活性剤中でのかん流を介して、利用できる。ある特定の実施態様では、本発明の化合物を、トリグリセリドなどの従来の結合剤及び担体を用いて、坐薬として製剤化できる。

【0293】

更に別の実施態様では、本発明の化合物を放出制御システムで送達できる。一実施態様では、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）。別の実施態様では、ポリマー物質を用いることができる

40

(Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, FL, 1974; Controlled Drug Bioavailability, 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)。更に別の実施態様では、放出制御システムを本発明化合物の標的、例えば、脳に近接して設置し、それによって全身投与用量

50

のごく一部のみを必要とすることができる（例えば、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) による総説で説明されているその他の放出制御システムを用いることができる。

【0294】

別の実施態様では、本発明化合物の制御放出又は持続放出を達成するために、ポリマー物質を用いることができる（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5,912,015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；及びPCT公開第WO99/20253号を参照されたい）。持続放出性製剤で用いられるポリマーの例は、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-*c o*-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）、ポリラクチド（PLA）、ポリ（ラクチド-*c o*-グリコリド）（PLGA）、及びポリオルトエステルを包含する。好ましい実施態様では、持続放出性製剤で用いられるポリマーは、不活性で、滲出性不純物がなく、保存上安定で、無菌で、そして生物分解性である。

10

【0295】

固形、液体又は気体形態であろうとなかろうと、本発明の組成物は、これに限定されないが、追加の予防剤、追加の治療剤、制吐剤、造血コロニー刺激因子、補助治療剤、ワクチン又はその他の免疫刺激剤、抗体／抗体断片からなる薬剤、抗鬱剤及び鎮痛剤を包含するものから選ばれる、追加の活性薬を包含できる。例えば、特定の実施態様では、医薬組成物は、本発明の化合物、追加の抗癌薬、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。

20

【0296】

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充填した1つ又はそれ以上の容器を含有している医薬パック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行政機関によって規定された形式の通知書をこのような容器に随意に添付することができ、この通知書は、ヒトへの投与についての製造、使用又は販売に対する当局の認可を表示している。

30

以下の実施例は、本発明の多くの態様の説明として提供されていて、決して本発明を限定することを意図していない。

【実施例】

【0297】

実施例1：コンピュータによるスクリーニング (In silico screen)

以下の市販ライブラリーから多種のコンピュータ内 (In silico) ライブラリーを作成した：ACB Blocks、Asinex、Chembridge、Maybridge、Microsource、NCI、Peakdale、Zinc データベースから取り出したFDA承認薬 (zinc.docking.org)。このIn silico ライブラリーをmol2フォーマットに変換して、Qikprop を用いて薬様特性、AMDE特性、及び適切な官能基についての検索条件を追加した。分子は、3Dの全原子構造に変換して、最大4種の立体異性体、pH7.0及びpH2.0に対するイオン化状態、異なった互変異体及び対掌体を作成して、Ligprep及びMacromodelを用いてそれらの配置を最適化した。In silicoでの3D分子のデータベースは合計およそ750,000化合物となった。平均BAX閉ループ構造及び平均BAX開ループ構造を用い GROMACS ソフトウェアによってドッキング用のBAX構造を作成した。この2つの構造を、Maestro を用いてドッキングに適したフォーマットに作成して、それらのイオン化状態及び水素結合衝突を荷電した残基で確認した。BIMSAHB結合部位の中心、20 Å以内にドッキングするリガンド、及び供給された座標から12 Åに拘束されるそれらの直径中央点を示す座標からBAX構造に対する受容体グリッドを作成した。更なる位置的、水素結合或いは疎水性

40

50

拘束は含めていない。それぞれのBAX構造についての小分子データベースを伴う標準精度モード（SPVS）のGrideを用いてドッキングを実施した。5員及び6員環の反転、各リガンドに対してエネルギーを最小にする最適400ポーズの保持、そして倍率0.9までリガンドの非極性原子のファンデルワールス半径の拡張を可能にする、柔軟なドッキングを実行した。それぞれのBAX構造モデルに対するGlidescore関数に基づいてランク付けした上位20,000ヒットを選択して、特別精度ドッキングモード（XPVS）を用いてBAX構造に対して再度ドッキングさせた。それぞれのドッキング算出からの上位1000ヒットをBAX構造に対してGlideポーズビューアーで可視化し、主要なBAX結合部位残基とのそれらの相互作用について分析して、それらの好ましい水素結合、疎水接触及び分子特性に基づいて選択して、表1に列挙して図9に描写している同定化合物を誘導した。Quickprop、Ligprep、Macromodel、Maesto、GlideはSchrodinger Suite 2006の部分である。

10

【0298】

実施例2：BAXと直接結合して活性化するSAHBの合成

既述の手法を用いて、BIM、BID、PUMA、及びBAXのBH3ドメインに対応する炭化水素架橋ペプチド及びにそれらの突然変異体並びにFITC- β Ala誘導体を合成し、精製して、特性を明らかにした。そのようなSAHBの組成物の例は図8に列挙されている（Walensky, L. D., et al. (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix, Science (New York, N.Y. 305, 1466-1470; Walensky, L. D., et al. (2006) A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX, Mol Cell 24, 199-210; Bird, G.H., Bernal, F., Pitter, K., and Walensky, L.D. Synthesis and biophysical characterization of stabilized alpha-helices of BCL-2 domains. Methods in Enzymology, 446: 369-386, 2008)。

20

【0299】

実施例3：NMR分析及び生物学的試験に適しているBAXの製造

BAXモジュレータを同定して試験するための本明細書に記載のNMR分析及び生物学的アッセイについて、十分に安定で純粋なBAXのモノマー及びその他の配座異性体種のタンパク質発現及び精製を最適化するために必要に応じて、BAXの組成物及び産生方法を、先行報告（Walensky, L. D., et al. (2006) A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX, Mol Cell 24, 199-210; Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, Cell 103, 645-654) から変更した。ヒトBAXをコードする全長のcDNA (aal~192) をpTYB1プラスミド (New England Biolabs) 内にクローン化して、制限酵素認識部位NdeI及びSapIを用いてキチンタンパク質のN-末端で融合した。P168G、K21E、E69K、L45C、M137C、及びこれらの組み合わせを包含する、BAXcDNAの点突然変異をQuikChange II部位特異的突然変異キット (Stratagene, CA) を利用して引き起こした。突然変異及びそれらの関連オープンリーディングフレームをDNA配列分析によって確認した。大腸菌BL21 (DE3) 細胞中の新鮮な形質転換体を、製造会社 (New Brunswick, NJ) のプロトコールに従って、OD: 0.8~1.0のフラスコを用いてL培地 (Luria Broth (LB) 培地) 中で、又はOD: 1.4の5L発酵槽を用いて富栄養LB培地 (3.5gのKH₂PO₄、5.0gのK₂HPO₄、3.5gの(NH₄)₂HPO₄、30gのグルコース、3.5gのトリプトファン、5.0gの酵母エキス) 中で生育させる。細胞を37℃で生育させて、1mMにIPTGで4時間30℃で発現の誘導を実行した。4℃で25分間5000rpmで遠心分離して細胞を採取し、次いで20mMのトリスHCl (pH7.6)、500mMのNaCl、1mMのEDTA、及びロッシュ (Roche) プロテアーゼ阻害カクテル (50mL緩衝液/ペレット25g) を含有している冷却した溶解緩衝液中に再懸濁した。細胞をファルコン (Falcon) 試験管中に分注して-80℃に冷凍する。

30

40

【0300】

解凍した時点で、細胞を超音波で破壊して、4℃で1時間45,000rpmで超遠心

50

分離してペレットから分離した。上澄液を、キチンビーズ (New England Biolabs) を含有して、4℃で溶解緩衝液中であらかじめ平衡化した、使い捨てグラビティカラム (Bio-Rad) 上に取り込んだ。ビーズを溶解緩衝液の20総容積で、次いで50 mMのDTTを含有している溶解緩衝液の追加の3総容積で洗浄した。カラムは上部と底に蓋をし、次いでキチンビーズを4℃で1晩放置して、キチン融合タンパク質を開裂させた。溶解緩衝液の少なくとも10総容積でカラムからBAXを溶出した。BAXタンパク質を、10-kDaカットオフセントリコン (Centricon) スピン濃縮器 (Millipore) を用いて、0.5 mLまで濃縮し、次いでゲルろ過緩衝液 (20 mMのHepes、150 mMのKCl、pH 7.0) にて4℃であらかじめ平衡化したゲルろ過カラム (Superdex 75、10/300 GL、GE Healthcare Life Sciences) に付した。流速0.25 mL/minで0.5 mL間隔に分画して、注入試料容量<0.25 mLの分離は最大のBAXモノマーを得た。BAXモノマーを含有している分画を~12 mL容量の緩衝液で溶出し、プールし、次いで10-kDaカットオフセントリコンスピン濃縮器 (Millipore) を用いて濃縮して、直ちに機能アッセイに用いた。

10

【0301】

実施例4：NMR分光法及びその他の構造手法によるBAXのモジュレータ同定

NMRによるスクリーニングは、50~100 μM濃度の化合物の非存在下及び存在下で、25~50 μM濃度の均一に¹³Cで標識化BAXの¹H-¹³Cでフィルター処理した1D実験を記録して実行した。1.0~0.2 p.p.m.の間の領域におけるAla、Val、Leu、Ile又はThrのメチル基の化学共鳴の変化から、結合を確認した。試験化合物の結合モードを、分子の滴定を実施し、化合物の非存在下又は存在下におけるBAXの¹H、¹⁵N-HSQC又は¹H、¹³C HSQC実験を記録することにより、そしてそれぞれにBAX骨格アミド又は側鎖メチル基の化学シフトを、モニタリングすることによって特定化する。加重平均化学シフト差Δは、

20

【0302】

【数1】

$$\sqrt{\{(\Delta H)^2 + (\Delta N/5)^2\}}/2$$

30

【0303】

としてp.p.m.で計算して、BAXの残基数の関数としてプロットする。誘導したΔが0.1 p.p.m.より大きいときに、リガンド滴定による有意な化学シフト変化が考慮される。均一に標識した¹⁵N又は¹⁵N/¹³C標識化BAXサンプルは、同位体標識を実現するためのその後の修正を除いて、上記のように製造及び精製する。形質転換した大腸菌BL21 (DE3) 細胞を、37℃で生育して、LB培地 (非標識タンパク質用に)、又はそれぞれに均一な¹⁵N-標識タンパク質又は¹⁵N、¹³C標識タンパク質を得るための¹³Cグルコース (2 g/l) を有するか有していない¹⁵N-NH₄Cl (1 g/l) で置換したM9最小培地の何れか中に1 mMのIPTGで誘導する。BAXのNMRサンプルは、H₂O/D₂O (9:1) 中の20 mMの酢酸ナトリウム、50 mMのNaCl緩衝液 (pH 6.0) 中で調製する。試験化合物のストックは、例えば、10 mM濃度にDMSO中で調製する。NMR実験は、NMR Pipe スペクトル分析パッケージで処理して、及び化学シフト変化は、NMR View ソフトウェアで測定する。NMRスペクトルは、例えば、z-遮蔽勾配、三重共鳴凍結プローブを搭載したBruker Avance 600 MHzで30℃で記録する。

40

【0304】

BAX相互作用化合物の結合特性を同定及び特徴付けする更なる構造アプローチは、上に記載及び参照されるように、NMRによるSAR、SHAPE NMR、及びNMR

50

及びX線結晶学を用いるその他の断片に基づく薬剤発見手段を包含する。

【0305】

実施例5：競合的蛍光偏光結合アッセイ

蛍光化したBIM SAHB (25 nM) を結合緩衝液 (140 mMのNaCl、50 mMのトリスHCl (pH 7.4)) 中、室温で、BIM SAHB (1 µM) の存在下又は非存在下で、組み換え野生型BAX又はその突然変異誘導体 (100 nM) と共に培養して、FITC-BIM SAHBのBAXとの結合及び競合的阻害に関する基準FPA値を確立した (図11)。試験化合物のBAX結合能力を評価するために、50 µMから始める連続希釈液をFITC-BIM SAHB (25 nM) 及びBAX (100 nM) に加えて、POLARstar OPTIMAマイクロプレートリーダー (BMG Labtech) を用いて経時的に蛍光偏光を測定して、FITC-BIM SAHB/BAX結合の競合的阻害剤を同定した。Prismソフトウェア4.0(Graphpad)を用いる非線形回帰分析によってIC₅₀値を確定した。BAX結合活性を有する化合物を同定するためのライブラリーの実験的スクリーニングにもこのアッセイを利用することができる。

10

【0306】

実施例6：オリゴマー化アッセイ

BIM SAHBをBAXモノマー (38 µM) を含有している200 µLの溶液 (20 mMのHepes/KOH、pH 7.2~7.4、150 mMのKCl) にBIM SAHBとBAXの比を0.5:1、1:1、2:1及び4:1にして加えた。混合物及びBAXモノマー単独のサンプルを、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) による分析に付した (図12A)。クロマトグラムは、モノマーとオリゴマーのピークをそれぞれ、~11.5分及び~6.5分を示す。ゲルろ過ピークの分子量を調整するために、タンパク質標準品 (GE Healthcare) を用いた。時間依存分析のために、BIM SAHBをBAXモノマーに1:1の比で加えて、22℃で30、60、90分間培養した後、混合物をSECで分析した。比較のための基準として、BAXモノマー単独を0時点及び上記の時点で分析した。in silicoスクリーニングにより同定した試験化合物をこのBAXオリゴマー化アッセイで評価して、選択した化合物について示されているように、そのモノマーからそのオリゴマー形態へのBAXの分子が誘発する変換を観察した (図12B)。BAXオリゴマー化のハイスループット検出に用いた別法は、動的光散乱 (DLS) 分析 (Wyatt Technology) を含んでいる (図13)。SEC又はDLS読み出しを用いるオリゴマー化アッセイを、BAXのオリゴマー化を直接調節する (すなわち、活性化又は阻害する) 化合物を同定するためのライブラリーの実験的スクリーニングにも用いることができる。

20

30

【0307】

実施例7：構造変化アッセイ

BAXモノマー (9 µM) を含有している20 µLのPBS溶液に、BIM SAHB:BAXの比が0.5:1、1:1及び4:1にて、BIM SAHBを加えた。混合物 (10 µL) 及びBAXモノマーサンプル (10 µL) を22℃で15分間培養して、次いで15 µLの6A7抗BAX抗体を含有しているBSAの3% PBS溶液 (250 µL) に加えて、4℃で1時間培養した。加えて、各注入サンプル (10%) の1 µLを50 µLのSDS-サンプル緩衝液と混合して、試料にわたるBAXレベルの基準値を測定した。あらかじめ浄化してあるセファロースビーズ (50 µL) をBIM SAHB:BAX及びBAXモノマー溶液に加えて4℃で更に2時間培養した。セファロースビーズを遠沈し、BSAの3% PBS溶液1 mLで3回洗浄し、50 µLのSDS-サンプル緩衝液に再懸濁して、95℃で2分間煮沸した。それぞれの注入及び免疫沈降サンプルの10 µLを分析に用いた。サンプルを12%のSDS-PAGE Bis-Trisゲル上で分離し、PVD F膜上にプロットして、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。試験化合物のBAX構造変化を誘発する能力を、このアッセイを用いて評価する。また、このアプローチを、BAX構造変化を直接調節する (すなわち、活性化又

40

50

は阻害する) 化合物を同定するためのライブラリーの実験的スクリーニングに用いることができる。

【0308】

実施例8：架橋結合アッセイ

BAX (10 nM) を、10 μM から始める試験化合物の連続希釈液に加えて、100 nM の BIM S A H B の存在下又は非存在下で、室温で1時間培養した。続いて、1 mM の BMH (Pierce) を加えて、更に30分間培養した。ゲル負荷緩衝液で反応を停止させて、サンプルを電気泳動及びN20抗BAX抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用いるウェスタン分析で分析して、BAXオリゴマー形態の存在又は非存在を確認した。BIM S A H B の非存在では、アッセイは、BAXのオリゴマー化を誘導する化合物を同定する。BIM S A H B の存在下で実施した場合は、BIM S A H B 誘導BAXオリゴマー化と相乗作用するか或いは阻止する化合物を同定することができる。

10

【0309】

実施例8：リポソーム放出アッセイ

BAX、試験リガンド、及び脂質ベシクル以外の因子の非存在下で、プロアポトーシスBAXの機能的放出活性を直接活性化する試験リガンドの能力を測定するために、リポソーム放出アッセイを用いる。ミトコンドリア外膜接触部位 (OMCTベシクル) (Ardail et al., 1990; Lutter et al., 2000) と類似している脂質組成を有する大きい単層ベシクル (LUVs) を作出して、既述 (Oh et al., 2005; Oh et al., 2006, Pitter et al., 2008) の様にしてFITC標識化デキストランに封入した。蛍光発光アッセイを行って、報告されている (Oh et al., 2005; Pitter et al., 2008) 様にして、FITCの放出を定量した。実験は、10 mg/ml の脂質濃度、15~50 nM の BAX、及びBAX活性化ペプチド又は試験化合物の連続希釈液を用いて実施した。陰性対照検討は、BAX単独、化合物単独、対照化合物 (例えば、小分子のエナンチオマー、ペプチドのアミノ酸変異体)、及び既述 (Walensky et al, 2006, Gavathiotis et al, 2008) の様な、アンチアポトーシスBCL-XLがリガンド誘発BAX活性を阻止する能力を試験することを包含する。このようなりポソーム放出アッセイは、BAX介在放出を誘発する化合物を同定して、且つハイスループットで実施できる。BIM S A H B の存在下で実施する場合は、BIM S A H B 誘発、BAX介在リポソーム放出と相乗作用するか或いはこれを阻止する化合物を同定できる。このアッセイは、BAX介在リポソーム放出を直接調節する (活性化又は阻害する) 化合物を同定するためのライブラリーの実験的スクリーニングにも用いることができる。

20

30

【0310】

実施例9：チトクロムc放出アッセイ

ミトコンドリアのチトクロムc放出アッセイを、オルガネラに関連するプロアポトーシスBAXの機能的放出活性を直接活性化する試験リガンドの能力を測定するために用いる (図14)。Bax-/-/ Bak-/-ミトコンドリア (0.5 mg/ml) を単離して、記載 (Pitter, K., Bernal, F., LaBelle, J.L., and Walensky, L.D. Dissection of the BCL-2 family signaling network using stabilized alpha-helices of BCL-2 domains. Methods in Enzymology, 446: 387-408, 2008) の様にして放出アッセイを実施した。ミトコンドリアをBAX単独 (50 nM)、試験化合物単独 (例えば、25 μM からの連続希釈液)、及び組み合わせ (50 nM BAX + 試験化合物の連続希釈液) と共に、BIM S A H B (250 nM) の存在下又は非存在下で、培養した。40分後に、ペレット及び上澄画分を単離して、比色ELISAアッセイ (R & D Systems) を用いてチトクロムcを定量した。放出可能なミトコンドリアプールから、上澄液中へ放出されたチトクロムcのパーセント (%cyt oc s u p) を以下の式に従って計算した: %cyt oc = [cyt oc s u p - cyt oc b a c k g r] / (cyt oc t o t a l - cyt oc b a c k g r) * 100 (式中のbackground releaseはベシクル処理 (1% DM SO) サンプルの上澄液中で検出されたチトクロムcを示し、そしてtotal releaseは1%トリトン-X100で処理したサンプル中で測定されたチトクロムcを示す。BIM

40

50

S A H Bの非存在下で、アッセイは、B A Xが介在するチトクロム c 放出を誘発する化合物を同定する。B I M S A H Bの存在下で実施する場合、B I M S A H B誘発、B A X介在チトクロム c 放出と相乗作用するか或いはこれを阻止する化合物を同定できる。このアッセイは、B A X介在チトクロム c 放出を直接調節する（活性化又は阻害する）化合物を同定するためのライブラリーの実験的スクリーニングにも用いることができる。

【0311】

実施例10：試験リガンドによるB A X介在アポトーシスの誘発を検出する細胞アッセイ
B a x^{-/-} B a k^{-/-} D K O M E FをS V 4 0で形質転換して、10%ウシ胎仔血清を補完したダルベコ改変イーグル培地中で、標準的な培養条件及び手法に従って、保持した。B A X及びその突然変異体のD K O細胞内への再構築を、既述（Cheng, E. H., et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. Mol Cell 8, 705-711 (2001); Kim, H., et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. Nat Cell Biol 8, 1348-1358 (2006)）の様に、B A X-I R E S-G F Pのレトロウィルス形質導入によって達成し、次いでG F P感受性細胞に対してM o F l oソートを行った。B A Xタンパク質の発現を抗B A Xウェスタン分析で確認した。B A X再構築M E F及び対照B a x^{-/-} B a k^{-/-} D K O M E Fを一連の濃度の試験化合物に曝露して、製造会社のプロトコールに従ってアネキシン-V-C y 3（BioVision, Mountain View, CA）染色により、次いで、FACS Caliber（BD Bioscience, San Jose, CA）及びCel l Q u e s t e r又はFlowJoソフトウェアを用いるフローサイトメリ分析によって、細胞死を定量した（図15）。試験化合物によるB A X介在細胞死の阻害をモニターするために、スタウロスポリン（例えば、1 μ M）又はB I M S A H B（例えば、10 μ M）の存在下で同一の実験を、次いで上記のようにアネキシン-V分析を実施した。このアッセイは、細胞状況におけるB A X介在アポトーシス誘発を直接調節する（すなわち、活性化又は阻害する）化合物を同定するためのライブラリーの実験的スクリーニングに用いることもできる。

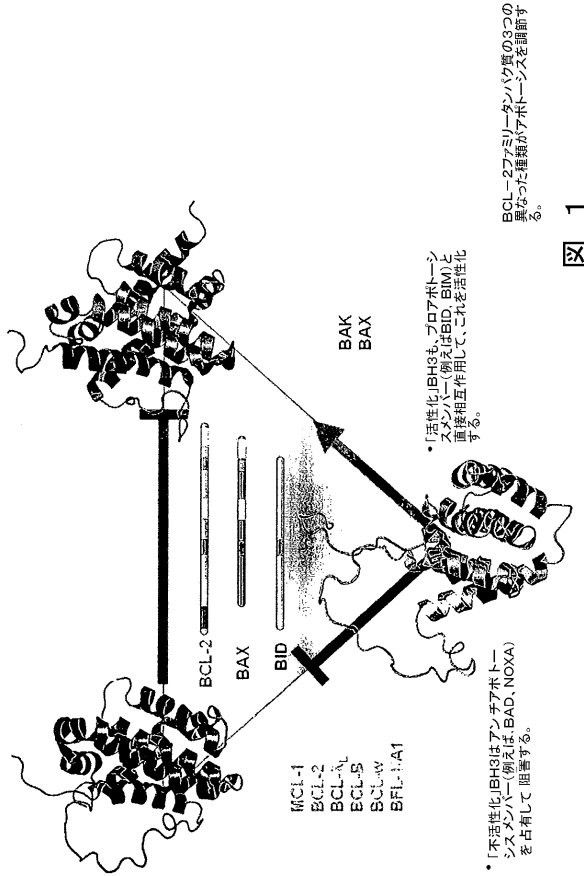
【0312】

本願を通して引用されている全ての参照文献（文献参照、登録特許、公開特許出願、及び同時係属特許出願を含む）は参照により、それらの全てが本明細書に明確に取り込まれている。別段に特定しない限り、全ての本明細書で用いられている技術及び科学用語は、当業者に一般に知られている意味に従っている。

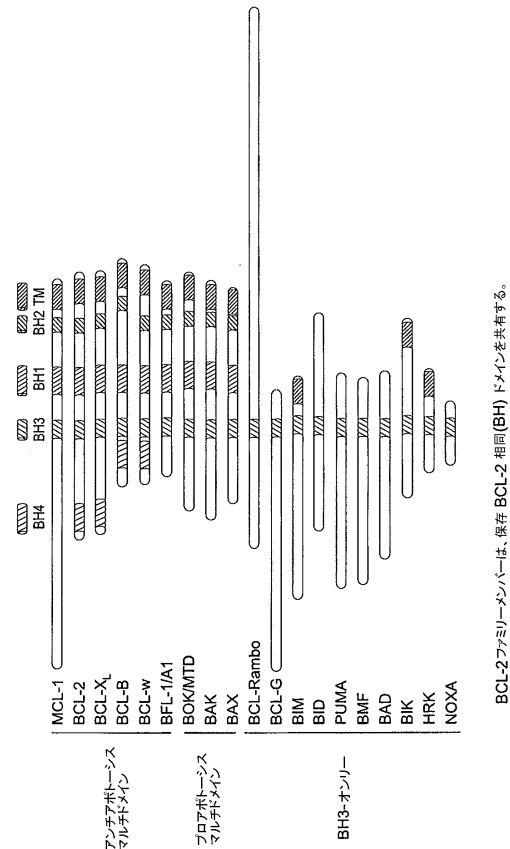
【0313】

当業者は、本明細書に記載されている本発明の特定の実施態様の多数の均等物を、認識されるだろう、或いは通常の実験以上のものを用いずに確認できるだろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図されている。

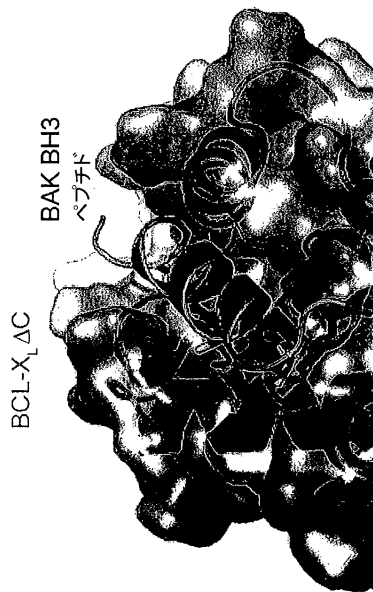
【図 1】



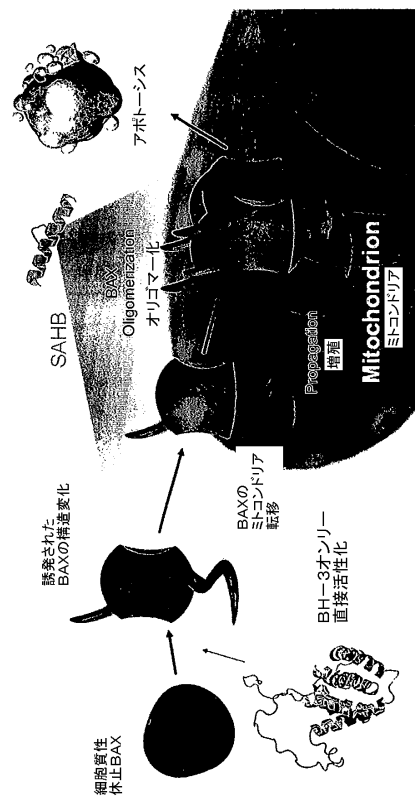
【図 2】



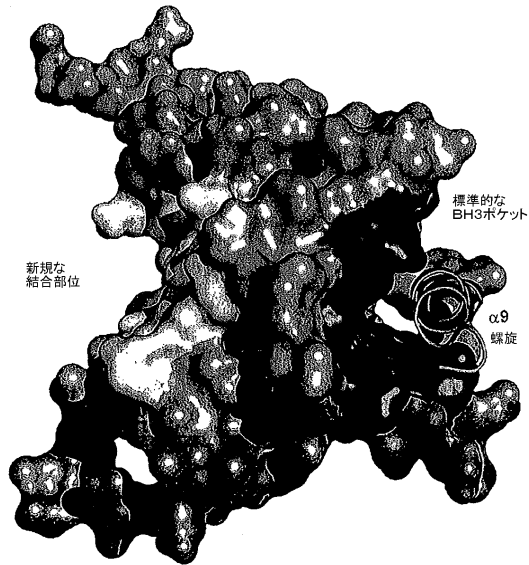
【図 3】



【図 4】



【図 5】

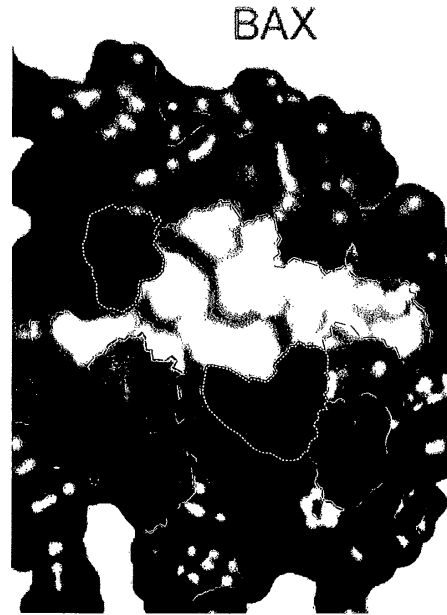


BIM SAHB-BAX相互作用のNMR分析は、BH3が介在するBAX活性化についての新たな結合部位を明らかにした。
BIM SAHBは、BAXを、アンチアポトーシスタンパク質について同定されている標準的BH3結合部位と異なる構造位置で取り込む。

図 5

【図 6 A】

図 6A



BAX上の新規なBH3相互作用部位を描いている表面図。結合部位を溶媒に暴露した残基を表示する。

□ 疎水性残基の側鎖(M20、A24、L27、I31、I133、M137及びL141)を指示する

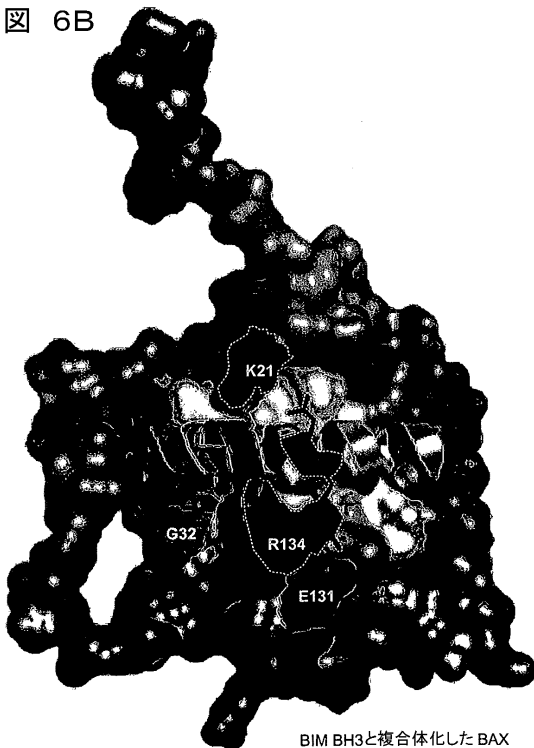
■ 正に荷電した残基の側鎖(K21、R134)を指示する

■ 負に荷電した残基の側鎖(E131)を指示する

■ 親水性残基の側鎖(Q28、Q32)を指示する

【図 6 B】

図 6B



BAX結合部位でのBIM BH3の幾何学的配置
C～N末端は、BIM BH3残基の取り込みで:

■ N160 (緑),
■ D157 (赤), 及び
■ R153 (青)

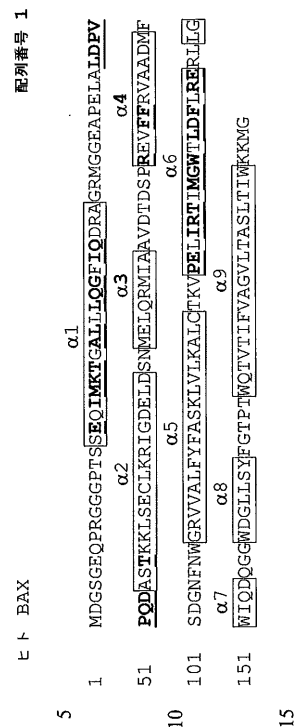
相補的極性で:

■ (Gln32, 緑)
■ 正荷電残基 (Arg134, 青)
■ 負荷電残基 (Glu131, 赤)

右～左に位置付けられている。

【図 7 A】

図 7A



BAXのアミノ酸配列

□ 強調表示した残基が、α螺旋1～9を画定する。
BAXの新規なBH3結合部位の残基は太字及び下線を付している。

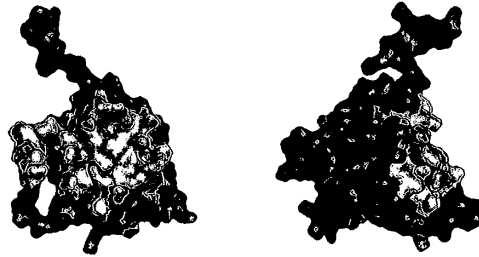
【図 7 B C】

図 7B



BAXのリボン図
---B1M BH3相互作用に関与する残基を概説する。

図 7C



BAXの表面図
---B1M BH3相互作用に関与する残基を概説する。

【図 8 - 2】

ヒト BID 配列番号 4
MDEVNNGSSRLRDECIINLLVFGFTQSCSDNSFRRELDALGHGELPVLAPQWEGYDEL
30 QTDGRRSSHSRLGRIEADSEQEDIIRNIARHLAQVGDSDMSRISPPGLVNGLAQLR
NISRSEEDRNRLATALEQLQAYPRDMEKEKTMVLVALLAKKVASHTPSLLLRDVF
HTTVNFINQLRTVYVSLARNGMD
BID BH3: 77ESQEDIIRNIARHLAQVGDEMDSRIS101 配列番号 5
35
BID SAHBs:
BID SAHBA1 DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHBA2 ESQEDIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHBA3 DIIR*IAIR*IAQVGDDEBDRSI
40 BID SAHBA4 ESQEDIIR*IAIR*IAQVGDDEBDRSI
ヒト PUMA-α 配列番号 6
MARARQEGSSPEVPEGLARDGPRPFLGLRVPSAVSGCLCEPGLAALPAAPTLLPAA
YLCAPTAPAVTAALGSGRWPGPRSRPRPDGPQPSLSLAEOHLESPPVPSAPGA
45 LAGPTQAAPGVGEEQWAREIGAQRRLDNLNAQYERRRQEQORHRPSFWRVL
YNLIMGLPLPRGHRAPEMEPN

【図 8 - 1】

ヒト B1M_{EL} 配列番号 2
MAKQPSDVSSCEDREGRLQPAERPPQLRPGATSLQTEPQGNPEGHGEGDSCPH
5 GSPQGLAPPASPFPATRSPLTFMRSSLLSRSSSGYFSFDTRSPAPMSCDKST
QTPSPQCAFNHLYLSAMASMRQAEPADMRPEIWAQELRRIGDEFNAYYARRVFLNN
YQAEDHPRMVLRLRLRYIVLVWRMH
BIM BH3: 145EIWAQELRLRIGDEFNAYYARR¹⁶⁴ 配列番号 3
10
BIM SAHBs:
BIM SAHBA1 IWIWAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHBA2 EIWAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHBA3 I*IAQ*LRRIIGDEFNAYYARR
15 BIM SAHB4 EI*IAQ*LRRIIGDEFNAYYA
BIM SAHB5 IW*AQE*RRIGDEFNAYYARR
BIM SAHB6 EIW*AQE*RRIGDEFNAYYA
BIM SAHB7 IWI*QEL*RRIGDEFNAYYARR
BIM SAHB8 IWI*QEL*RRIGDEFNAYYA
20 BIM SAHB9 IWIWAQELRRIGD*FNA*YARR
BIM SAHB10 EIWAQELRRIGD*FNA*YA
BIM SAHB11 IWI*ELR*IGDEFNAYYARR
BIM SAHB12 EIWA*ELR*IGDEFNAYYA
BIM SAHB13 IWIWAQELRRIGDEF*AYY*RR
25 BIM SAHB14 EIWAQELRRIGDEF*AYY*
BIM SAHB15 EIWAQELRRIGDEF*AYY*

【図 8 - 3】

PUMA BH3: 129EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYERR¹⁵⁶ 配列番号 7
PUMA SAHBs:
PUMA SAHBA1 QWAREIGLOAR*BAD*LNAAQY
PUMA SAHBA2 EQWAREIGLOAR*BAD*LNAAQY
PUMA SAHBA3 EQWAREIGLOAR*BAD*LNAAQY
5 PUMA SAHBA4 QW*REI*IQARRBADDLNAQY
PUMA SAHBA5 EQW*REI*IQARRBADDLNAQY
ヒト BAX 配列番号 1
MDGSGEQPRGGGTSSEQIMKTGALLQGFQDRAGRMGGEAPELALDPVPQDASTK
10 KLSECLRRIGDELDNSMELQRMIAAVDTPSPREVFRVAADMFSDGNFNWGRVVALF
YFASKLVKALCKVPELIRITIMGTWTLFLRERLLGWIQDQGGWGLLSYFGTPTWQ
TVTIFVAGVLTASLTIWKKMG
BAX BH3: 52QDASTKKLSECLKRIIGDELDNSMELQ⁷⁸ 配列番号 8
15
BAX SAHBs:
BAX SAHBA QDASTKKLSECLK*IGD*LDNS
BAX SAHBA QDASTK*LSE*LKRIIGDELDNS
BAX SAHBA QDASTKK*SEC*KRIIGDELDNS
20 BAX SAHBA QDASTKKL*ECL*RIIGDELDNS

【図 8 - 4】

図 8-4

BAX 活性化因子 BH3 コンセンサス
I/L A/S/G X X L K/R R I/M/V D D/E L/F N/D A/S X Y/M

配列番号 9

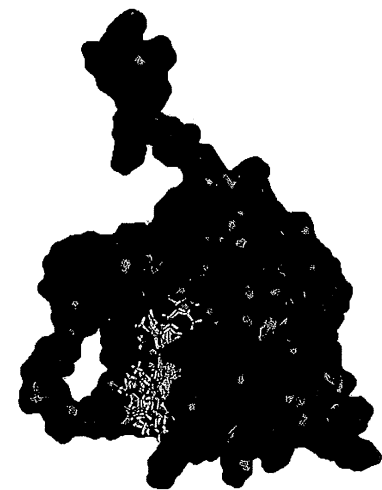
α螺旋相互作用面でのBIM、PUMA及びBAX BH3ドメイン中の
保存残基に由来する。

BIM BH3 EIWIRQELRRIGDEENAVARR
PUMA BH3 EQWAREIRQLRRMAPDLNAQYER
BAX BH3 QDASTKKLSECLRRIGDELDNNELQOR

☐ アミノ酸同一性
☐ 保存変化

BAX活性化因子BH3-オンリータンパク質、それらのBH3ドメインペプチド、
非水素結合相互作用の例のアミノ酸配列、及びBAX活性化因子BH3コンセン
サス配列

【図 9 C】

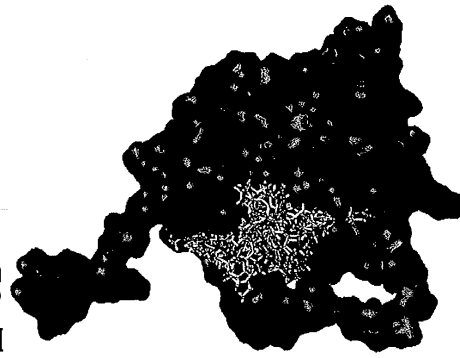


仮想スクリーンにより同定した分子は、新規なBAX活性化部位を
下部近傍ループ領域で修飾する。

図 9C

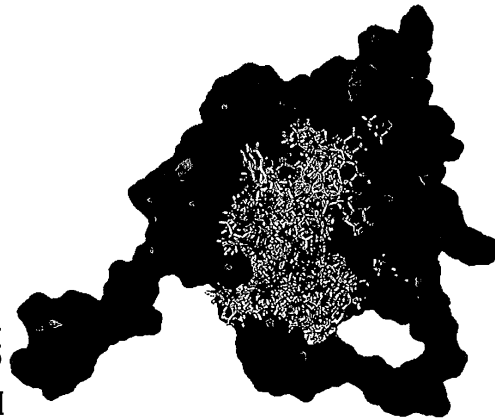
【図 9 A B】

図 9B



仮想スクリーンにより同定した分子は、新規なBAX活性化部位を
上部近傍ループ領域で修飾する。

図 9A



仮想スクリーンにより同定した分子は、新規なBAX活性化部位を
水平な疎水性溝に沿って修飾する。

【図 10 A】

α1
1 MDGSGEQPRGGPTSSEQIMKTGALLQGFIQDRGRMGGEAPELALDPV
α2 α3 α4
51 PDASTKKLSECLEKRGDELDNNELQRMIAVDTDSPREVFFVADMF
α5 α6
101 SDGNFNWGRVVAFYFASKLVKALCTKVPELIRTINGWTLDFLRERLG
α7 α8 α9
151 WIODGGNDGLISFGTPWQVTTFVAGVLTASLTIMKKMG

BAXのアミノ酸配列

☐ 強調表示した残基が、α螺旋1~9を画定する。
BAXの新しいBH3結合部位で、又はその隣接部位でのリガンド相互作用
に關与する残基は太字及び下線を付けている。

図 10A

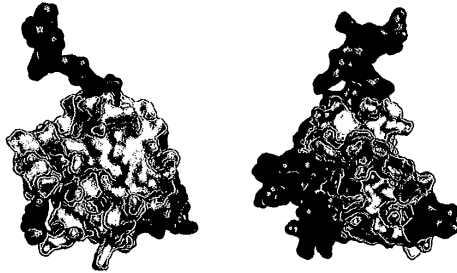
【図 10 B C】

図 10B



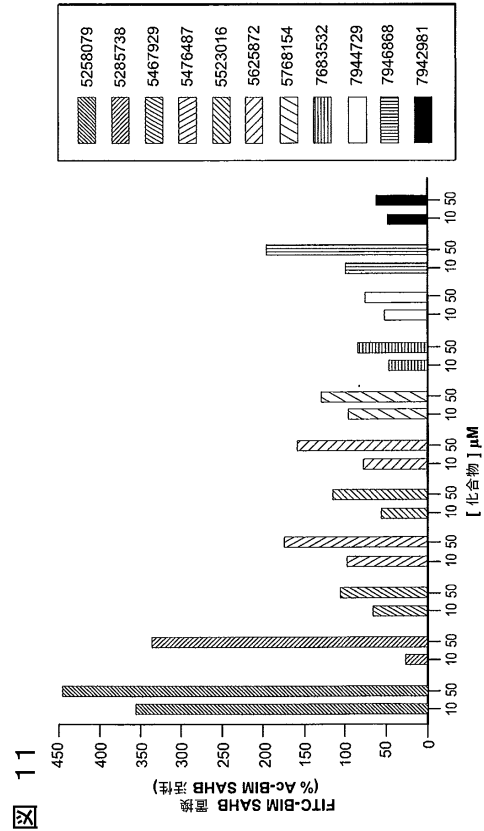
BAXのリボン図
—— リガンド相互作用に関与する残基を概説する。

図 10C



BAXの表面図
—— リガンド相互作用に関与する残基を概説する。

【図 11】

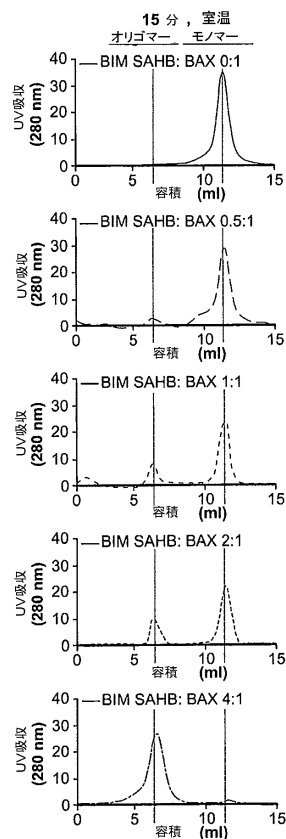


試験化合物が、Ac-BIM SAHB結合物(即ち、100%置換)を基準として、BAX結合に対するFITC-BIM SAHBと効率的な置換率を示す。この置換率FPAが示されている。いくつかの例では、試験分子は、Ac-BIM SAHBより一層高くBAXについて結合性を示し、それは化合物値>100%に反映されている。

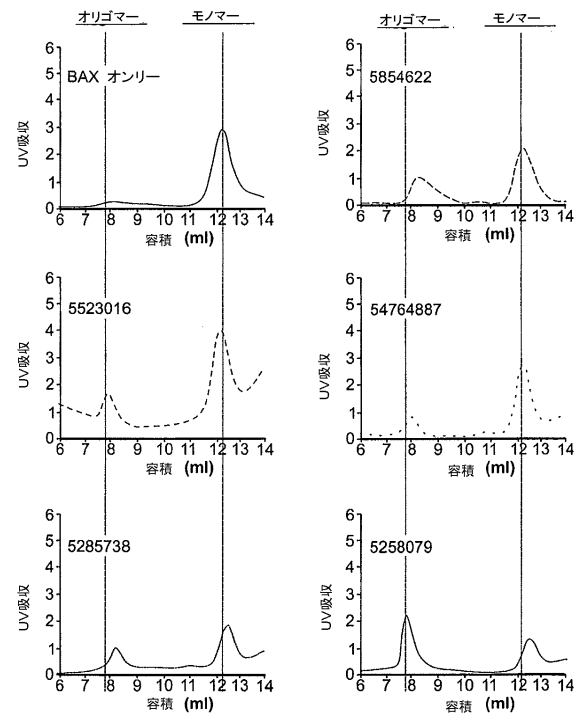
【図 12 A】

図 12A

サイズ排除クロマトグラフィーに基づくモノマー-オリゴマー状態のモニタリングにより実証されるように、BIM SAHBは、インビトロでのBAXオリゴマー化を直接開始する。



【図 12 B】



サイズ排除クロマトグラフィーを用いるBAXモノマーのそのオリゴマー形態への変換により検出されるように、試験化合物は、BAXオリゴマー化を誘発する。

図 12B

【図 13】

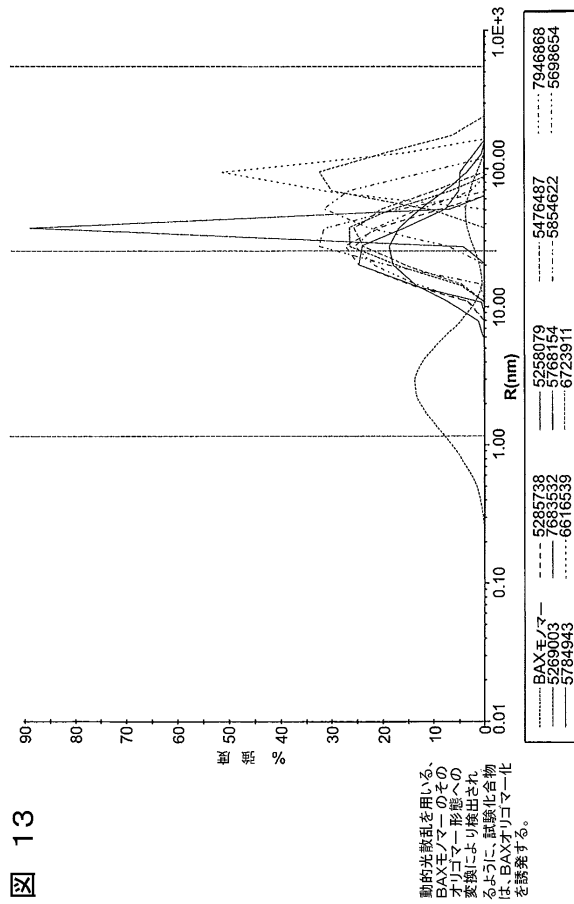


図 13

【図 14】

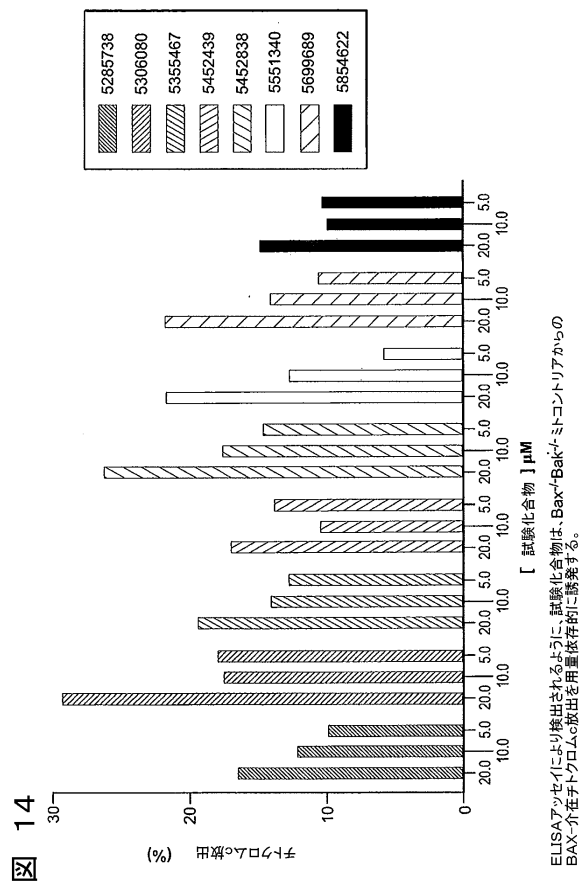


図 14

【図 15】

試験リガンドは、BAX依存性アポトーシスを誘発する。化合物5285738 (A) 及び 5268079 (B) は、DKO MEF中ではなく、BAX再構築 Bax^{-/-}Bak^{-/-}マウス胚線維芽細胞 (DKO MEF) 中に用量依存性アポトーシスを選択的に誘発する。

図 15A

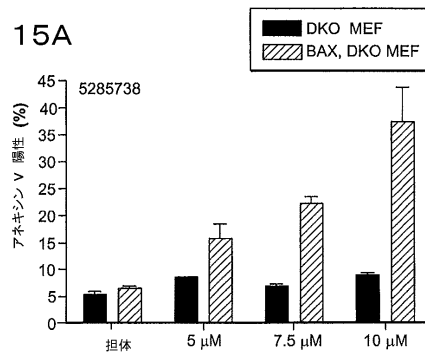
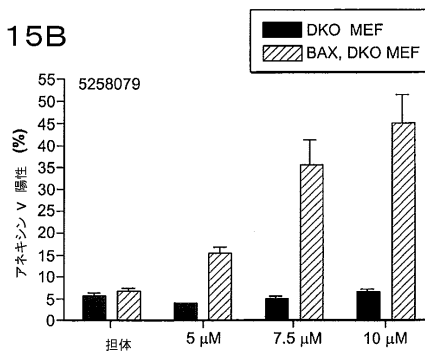


図 15B



【配列表】

0006049260000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/04 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 15/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 7/02 (2006.01)
 A 6 1 P 9/12 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 7/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/06 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4035 (2006.01)
 A 6 1 K 31/235 (2006.01)
 A 6 1 K 31/506 (2006.01)
 A 6 1 K 31/427 (2006.01)
 A 6 1 K 31/138 (2006.01)
 A 6 1 K 31/18 (2006.01)
 A 6 1 K 31/167 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4709 (2006.01)
 A 6 1 K 31/496 (2006.01)
 A 6 1 K 31/192 (2006.01)
 A 6 1 K 31/44 (2006.01)
 A 6 1 K 31/341 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4433 (2006.01)
 A 6 1 K 31/166 (2006.01)
 A 6 1 K 31/444 (2006.01)
 A 6 1 K 31/53 (2006.01)
 A 6 1 K 31/453 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4184 (2006.01)
 A 6 1 K 31/381 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4015 (2006.01)
 A 6 1 K 31/495 (2006.01)
 A 6 1 K 31/17 (2006.01)
 A 6 1 K 31/426 (2006.01)
 A 6 1 K 31/121 (2006.01)
 A 6 1 K 31/175 (2006.01)
 A 6 1 K 31/47 (2006.01)
 A 6 1 K 31/433 (2006.01)

F I

A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 35/04
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 7/02
 A 6 1 P 9/12
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 3/06
 A 6 1 K 31/4035
 A 6 1 K 31/235
 A 6 1 K 31/506
 A 6 1 K 31/427
 A 6 1 K 31/138
 A 6 1 K 31/18
 A 6 1 K 31/167
 A 6 1 K 31/4709
 A 6 1 K 31/496
 A 6 1 K 31/192
 A 6 1 K 31/44
 A 6 1 K 31/341
 A 6 1 K 31/4433
 A 6 1 K 31/166
 A 6 1 K 31/444
 A 6 1 K 31/53
 A 6 1 K 31/453
 A 6 1 K 31/4184
 A 6 1 K 31/381
 A 6 1 K 31/4015
 A 6 1 K 31/495
 A 6 1 K 31/17
 A 6 1 K 31/426
 A 6 1 K 31/121
 A 6 1 K 31/175
 A 6 1 K 31/47

1 0 1

A 6 1 K	31/445	(2006.01)	A 6 1 K	31/433	
A 6 1 K	31/424	(2006.01)	A 6 1 K	31/445	
A 6 1 K	31/4525	(2006.01)	A 6 1 K	31/424	
A 6 1 K	31/222	(2006.01)	A 6 1 K	31/4525	
A 6 1 K	31/473	(2006.01)	A 6 1 K	31/222	
A 6 1 K	31/4178	(2006.01)	A 6 1 K	31/473	
A 6 1 K	31/536	(2006.01)	A 6 1 K	31/4178	
A 6 1 K	31/4196	(2006.01)	A 6 1 K	31/536	
A 6 1 K	31/4245	(2006.01)	A 6 1 K	31/4196	
A 6 1 K	31/4402	(2006.01)	A 6 1 K	31/4245	
A 6 1 K	31/404	(2006.01)	A 6 1 K	31/4402	
A 6 1 K	31/5415	(2006.01)	A 6 1 K	31/404	
A 6 1 K	31/165	(2006.01)	A 6 1 K	31/5415	
A 6 1 K	31/423	(2006.01)	A 6 1 K	31/165	
A 6 1 K	31/498	(2006.01)	A 6 1 K	31/423	
A 6 1 K	31/37	(2006.01)	A 6 1 K	31/498	
A 6 1 K	31/357	(2006.01)	A 6 1 K	31/37	
A 6 1 K	31/4439	(2006.01)	A 6 1 K	31/357	
A 6 1 K	31/11	(2006.01)	A 6 1 K	31/4439	
A 6 1 K	31/40	(2006.01)	A 6 1 K	31/11	
A 6 1 K	31/136	(2006.01)	A 6 1 K	31/40	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/136	
A 6 1 K	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
			A 6 1 K	31/16	

(72)発明者 ローレン ディー. ワレンスキー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02467 チェスナット・ヒル グッドナフ・ロード
 9

(72)発明者 エウリビデス ガヴァチオティス
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115 ボストン ビニー・ストリート 44

審査官 櫃本 研太郎

(56)参考文献 特表2003-515319 (JP, A)
 特表2003-507474 (JP, A)
 Loren D. Walensky et al., A Stapled BID BH3 Helix Directly Binds and Activates BAX, Molecular Cell, 2006年10月20日, Vol.24, No.2, P.199-210

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G01N 33/48-33/98
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 MEDLINE/BIOSIS (STN)