

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-502152

(P2014-502152A)

(43) 公表日 平成26年1月30日 (2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 U	4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-538981 (P2013-538981)
(86) (22) 出願日 平成23年11月14日 (2011.11.14)
(85) 翻訳文提出日 平成25年7月10日 (2013.7.10)
(86) 国際出願番号 PCT/US2011/060647
(87) 国際公開番号 W02012/065181
(87) 国際公開日 平成24年5月18日 (2012.5.18)
(31) 優先権主張番号 61/413,199
(32) 優先日 平成22年11月12日 (2010.11.12)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507183952
ダナ ファーバー キャンサー インステ
イテュート, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
2 1 5 - 5 4 5 O, ボストン ブルックラ
イン アヴェニュー 4 5 0

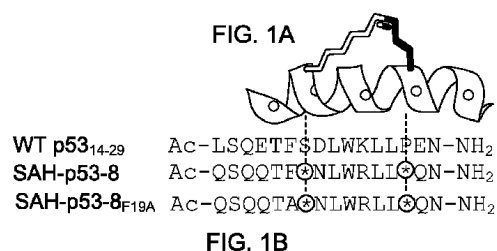
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療及び診断

(57) 【要約】

細胞における p 5 3 - 依存性の転写活性を増大する組成物及び方法。

【選択図】 図 1 A 及び図 1 B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

方法が：

p 5 3（例えば、機能的 p 5 3）をコードするか又は発現する細胞を得ること；

細胞中で H D M X が発現されているか否かを確認すること；及び

H D M X が発現されている場合に、細胞を H D M X 調節剤と接触させること、それによって、細胞中の p 5 3 活性を増大させることを含んでなる、細胞中の p 5 3 活性を増大する方法。

【請求項 2】

H D M X 調節剤が：

10

p 5 3 の転写活性ドメインと少なくとも 3 0 % の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド；又は

p 5 3 の転写活性ドメインと少なくとも 3 0 % の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、このペプチドの相互作用面にあるアミノ酸は保存されている；又は

p 5 3 の転写活性ドメインと少なくとも 3 0 % の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にある 1 つ又はそれ以上のアミノ酸は、ペプチドの相互作用面を変化させない同類アミノ酸で置換されている；又は

配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列、

を含んでいる、ここで、ペプチドは内部架橋剤によって架橋されている、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

p 5 3 がヒト p 5 3 である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

H D M X 調節剤が、図 1 C に示される架橋されたペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

H D M X 調節剤が S A H - p 5 3 - 8 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

細胞を H D M 2 調節剤と接触させることを更に含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

H D M 2 調節剤が N u t l i n - 3 である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

H D M X が発現されているか否かを確認する工程が、H D M X 及び／又は p 5 3 - H M D X 複合体の存在を検出することを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

細胞中で H D M 2 が発現されているか否かを確認すること；及び

H D M 2 が発現されている場合に、細胞を H D M 2 調節剤と接触させることを更に含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 0】

40

H D M 2 調節剤が N u t l i n - 3 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

H D M X 調節剤及び H D M 2 調節剤の用量が、相乗的用量又は相加的用量である、請求項 6 又は 9 又は 1 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

細胞がインビトロにある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

細胞が対象内にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

対象が、癌を有している対象である、請求項 1 3 に記載の方法。

50

【請求項 15】

方法が：

HDM2 調節剤（例えば、Nutlin-3）による処置によって p53 活性が実質的に増大しない細胞を得ること；及び

細胞をHDMX調節剤と接触させること、それによって細胞中の p53 活性を増大させることを含んでなる、細胞中の p53 活性を増大する方法

【請求項 16】

HDMX調節剤が：

p53 の転写活性ドメインと少なくとも 30% の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド；又は

p53 の転写活性ドメインと少なくとも 30% の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にあるアミノ酸は保存されている；又は

p53 の転写活性ドメインと少なくとも 30% の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にある 1 つ又はそれ以上のアミノ酸は、ペプチドの相互作用面を破壊しない同類アミノ酸で置換されている；又は

配列番号 22 に記載のアミノ酸配列、
を含んでいる、ここで、ペプチドは内部架橋剤によって架橋されている、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

p53 がヒト p53 である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

HDMX調節剤が、図 1C に示される架橋されているペプチドである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

HDMX調節剤が、SAH-p53-8 である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

細胞をHDM2調節剤と接触させることを更に含んでいる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

HDM2 調節剤がNutlin-3 である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

HDMX調節剤及びHDM2調節剤の用量が、相乗的用量又は相加的用量である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

方法が：

p53（例えば、機能的 p53）をコードするか又は発現する細胞を得ること；

細胞をHDMX調節剤及びHDM2調節剤と接触させること、ここで、HDM2 調節剤は図 1C に示されるステーブル状に架橋されたペプチドではない、それによって細胞中の p53 活性を増大させることを含んでなる、細胞中の p53 活性を増大する方法。

【請求項 24】

HDMX調節剤が：

p53 の転写活性ドメインと少なくとも 30% の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド；又は

p53 の転写活性ドメインと少なくとも 30% の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にあるアミノ酸は保存されている；又は

p53 の転写活性ドメインと少なくとも 30% の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にある 1 つ又はそれ以上のアミノ酸は、ペプチドの相互作用面を破壊しない同類アミノ酸で置換されている；又は

配列番号 22 に記載のアミノ酸配列、

10

20

30

40

50

を含んでなる、ここで、ペプチドは内部架橋剤によって架橋されている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

p 53 がヒト p 53 である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

HDMX 調節剤が、図 1C に示される架橋されているペプチドである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

HDMX 調節剤が SAH-p 53-8 である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

HDM2 調節剤が Nutlin-3 である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

HDMX 調節剤及び HDM2 調節剤の用量が、相乗的用量又は相加的用量である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

細胞がインビトロにある、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 31】

細胞が対象中にある、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 32】

対象が癌を有している対象である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 33】

方法が：

対象由来の異常増殖細胞又は癌細胞を含んでいるか又はそれから得られる生体試料中で機能的 p 53 がコードされているか又は発現することができるか否かを検出すること；

機能的 p 53 がコードされているか又は発現することができる場合は、試料中の HDM2、若しくは HDMX、又は両方のレベルを検出すること；

(i) HDM2 調節剤を含む組成物の治療有効量を投与することを含んでいる治療；

(ii) HDMX 調節剤を含む組成物の治療有効量を投与することを含んでいる治療；及び

(iii) HDM2 調節剤及び HDMX 調節剤を含む組成物の治療有効量を投与することを含んでいる治療；

よりなる群から治療を選択すること；

ここで、試料中の HDM2 のレベルが HDMX のレベルより実質的に大きい場合は治療

(i) が選択され、試料中の HDMX のレベルが HDM2 のレベルより実質的に大きい場合は治療 (ii) が選択され、そして試料中の HDM2 と HDMX のレベルがほぼ等しい場合は治療 (iii) が選択され、それによって対象における癌に対する治療を選択すること；及び、

治療 (i)、(ii)、又は (iii) に従って治療を対象に投与すること、ここで、治療を選択する工程、及び治療を投与する工程は、同時に又は異なった時点に独立して又は同じ当事者によって実施される；を含んでなる、対象における癌に対する治療を選択する方法。

【請求項 34】

(i) の HDM2 調節剤が、図 1C に示されるステーブル状に架橋されたペプチドではない、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

HDM2 が発現されていて且つ HDMX が発現されていない場合に、治療 (i) が選択される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

HDMX が発現されていて且つ HDM2 が発現されていない場合に、治療 (ii) が選択される、請求項 33 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

治療（i i i）が、HDM2阻害剤及びHDMX阻害剤を同時に又は別々に投与することを含んでなる、請求項33に記載の方法。

【請求項 38】

HDMXのレベルを検出する工程が、p53-HMDX複合体の存在を検出することを含んでなる、請求項33に記載の方法。

【請求項 39】

HDMX調節剤が：

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド；又は

10

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にあるアミノ酸は保存されている；又は

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にあるアミノ酸は、ペプチドの相互作用面の結合活性を破壊しない同類アミノ酸で置換されている；

を含んでなる、ここで、ペプチドは内部架橋剤によって架橋されている、請求項33に記載の方法。

【請求項 40】

p53がヒトp53である、請求項39に記載の方法。

20

【請求項 41】

HDMX調節剤が、図1Cに示される架橋されているペプチドである、請求項33に記載の方法。

【請求項 42】

HDMX調節剤が、SAH-p53-8である、請求項33に記載の方法。

【請求項 43】

HDM2調節剤が、Nutlin-3である、請求項33に記載の方法。

【請求項 44】

治療（i i i）におけるHDMX調節剤及びHDM2調節剤の用量が、相乗的用量又は相加的用量である、請求項33に記載の方法。

30

【請求項 45】

1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を含んでなる、組成物。

【請求項 46】

1つ又はそれ以上のHDMX調節剤が、

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド；又は

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にあるアミノ酸は保存されている；

又は

40

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にある1つ又はそれ以上のアミノ酸はペプチド相互作用面の結合活性を破壊しない同類アミノ酸で置換されている；

を含んでなる、ここで、ペプチドは内部架橋剤によって架橋されている、請求項45に記載の組成物。

【請求項 47】

p53がヒトp53である、請求項46に記載の組成物。

【請求項 48】

1つ又はそれ以上のHDMX調節剤が、図1Cに示される架橋されているペプチドである、請求項45に記載の組成物。

50

【請求項 49】

1つ又はそれ以上のHDMX調節剤が、SAH-p53-8である、請求項45に記載の組成物。

【請求項 50】

1つ又はそれ以上のHDM2調節剤が、Nutlin-3である、請求項45に記載の組成物。

【請求項 51】

p53及びHDMXからなる、単離されたタンパク質複合体。

【請求項 52】

請求項51に記載の単離されたタンパク質複合体と特異的に結合する、抗体。

10

【請求項 53】

癌の診断に又は治療有効性を観察するために、請求項51に記載の単離されたタンパク質複合体を使用する方法。

【請求項 54】

対象における癌を治療するためのオーダーメイドの治療方法を開発するために、請求項51に記載の単離されたタンパク質複合体を使用する方法。

【請求項 55】

p53並びに1つ又はそれ以上のHDMX、HDM2、及び／又はp53-HMDX複合体を検出するための組成物；及び

1つ又はそれ以上のp53並びに1つ又はそれ以上のHDMX、HDM2、及び／又はp53-HMDX複合体の検出に基づいて、癌を有する対象の癌を治療するためのオーダーメイドの治療計画を開発するための使用説明書；
を含んでなる、キット。

20

【請求項 56】

1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤；1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤の投与に適している1つ又はそれ以上の器具；並びに1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を如何に投与すべきかを提供する使用説明書を含んでなる、キット。

【請求項 57】

請求項55に記載のキット及び請求項56に記載のキットを含んでなる、複合キット。

30

【請求項 58】

方法が、少なくとも1用量の放射線治療の前に、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を対象に投与することを含んでなる、放射線治療を受ける予定になっている対象を治療する方法。

【請求項 59】

方法が、少なくとも1用量の放射線治療の前に、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を対象に投与すること及び対象を放射線治療に曝露することを含んでなる、癌を有する対象を治療する方法。

【請求項 60】

1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を、対象の腸に経口など、局所的に投与する、請求項58～59の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 61】

1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤が全身投与される、請求項58～59の何れか一項に記載の方法。

【請求項 62】

HDMX調節剤が：

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド；又は

p53の転写活性ドメインと少なくとも60%の同一性を有しているアミノ酸配列を含

50

んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にあるアミノ酸は保存されている；又は

p 5 3 の転写活性ドメインと少なくとも 6 0 % の同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいるペプチド、ここで、ペプチドの相互作用面にある 1 つ又はそれ以上のアミノ酸は、ペプチドの相互作用面の結合活性を破壊しない同類アミノ酸で置換されている；を含有してなる、ここで、ペプチドは内部架橋剤によって架橋されている、請求項 5 8 ～ 5 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

p 5 3 がヒト p 5 3 である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

H D M X 調節剤が、図 1 C に示される架橋されているペプチドである、請求項 5 8 ～ 5 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

H D M X 調節剤が、S A H - p 5 3 - 8 である、請求項 5 8 ～ 5 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

H D M 2 調節剤が、N u t l i n - 3 である、請求項 5 8 ～ 5 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

H D M X 調節剤及び H D M 2 調節剤の用量が、相乗的用量又は相加的用量である、請求項 5 8 ～ 5 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

H D M 2 調節剤が、図 1 C に示される架橋されているペプチドではない、請求項 5 8 ～ 5 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

アミノ酸配列：X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - X a a ₅ - P h e ₆ - X a a ₇ - X a a ₈ - X a a ₉ - T r p ₁₀ - X a a ₁₁ - X a a ₁₂ - L e u ₁₃ - X a a ₁₄ - X a a ₁₅ - X a a ₁₆ (配列番号 2 2) (式中の、

X a a ₁ は L e u 又は G l n であるか、又は欠失している；

X a a ₂ は S e r であるか、又は欠失している；

X a a ₃ は G l n であるか、又は欠失している；

X a a ₄ は G l u 又は G l n 又は A l a であり；

X a a ₅ は T h r 又は A l a であり；

P h e ₆ は P h e 又はその同類置換であり；

X a a ₇ は S e r であり；

X a a ₈ は A s p 又は A s n であるか、或いは A s p 及び G l u 以外のアミノ酸であり；

X a a ₉ は L e u であり；

T r p ₁₀ は T r p 又はその同類置換であり；

X a a ₁₁ は L y s 又は正に荷電しているアミノ酸であり；

X a a ₁₂ は L e u 又は L y s 又は A l a であり；

L e u ₁₃ は L e u 又はその同類置換であり；

X a a ₁₄ は P r o であるか、又は欠失している；

X a a ₁₅ は G l u 又は G l n 又は A l a、又は A s p 及び G l u 以外のアミノ酸であるか、或いは欠失している；

X a a ₁₆ は A s n であるか、又は欠失している)

ここで、該アミノ酸配列の 2 つ、3 つ、又は 6 つのアミノ酸分離されている少なくとも 2 つのアミノ酸の側鎖が内部架橋に置き換えられている、

該アミノ酸配列の少なくとも 6 連続アミノ酸を含んでなる、内部架橋されているポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 70】

X a a₁ が L e u であるか、又は欠失している；

X a a₂ が S e r であるか、又は欠失している；

X a a₃ が G l n であるか、又は欠失している；

X a a₄ が G l u であり；

X a a₅ が T h r であり；

P h e₆ が P h e であり；

X a a₇ が S e r であり；

X a a₈ が A s p であり；

X a a₉ が L e u であり；

T r p₁₀ が T r p であり；

X a a₁₁ が L y s であり；

X a a₁₂ が L e u であり；

L e u₁₃ が L e u であり；

X a a₁₄ が P r o であるか、又は欠失している；

X a a₁₅ が G l u であるか、又は欠失している；

X a a₁₆ は A s n であるか、又は欠失している、

ここで、P h e₆、T r p₁₀ 及び／又は L e u₁₃ のうちの 1 つ、2 つ及び／又は 3 つが、ペプチドの結合面と H D M X の間の相互作用を変化させない、同類アミノ酸置換で置換されており；及び／又は P h e₆、T r p₁₀ 及び／又は L e u₁₃ に対応する残基以外のアミノ酸が配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の配列と少なくとも 30 %（例えば、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、又は 100 %）同一である、

請求項 69 に記載の内部架橋されているペプチド。

【請求項 71】

アミノ酸配列が、配列番号 10 に記載の配列である、請求項 69 又は 70 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 72】

内部架橋に置き換えられている側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸が、表 1 に示されているステープル状の架橋から選ばれる、請求項 69～71 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 73】

内部架橋に置き換えられている側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸が、表 1 に示されている縫合状の架橋から選ばれる、請求項 69～71 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 74】

内部架橋に置き換えられている側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸が、表 1 に示されている 2 つ又はそれ以上のステープル状の架橋を含んでいる、請求項 72 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 75】

内部架橋に置き換えられている側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸が、表 1 に示されている少なくとも 1 つのステープル状の架橋及び少なくとも 1 つの縫合状の架橋を含んでいる、請求項 72 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 76】

内部架橋に置き換えられている側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸が、X a a₇ と X a a₁₄ の間に位置している、請求項 69～75 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 77】

内部架橋に置き換えられている側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸が 1 つ又はそれ以上のステープル状の架橋を含んでいて、ここで少なくとも 2 つのアミノ酸は 6 つのアミノ酸分離している、請求項 69～76 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 78】

内部架橋が、配列番号 2 ～ 21 に示されている位置に位置している、請求項 69 ～ 77 に記載の架橋されているペプチド。

【請求項 79】

請求項 69 ～ 78 に記載の架橋されたペプチドを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 80】

請求項 69 ～ 78 に記載の架橋されたペプチド及び 1 つ又はそれ以上の HDM2 調節剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 81】

1 つ又はそれ以上の HDM2 調節剤が Nutlin-3 を含んでなる、請求項 80 に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は 2011 年 11 月 11 日に提出された米国仮特許出願第 61/413,199 号の優先権を主張し、この出願の全てが、そのまま参照により本明細書に明確に取り込まれている。

【0002】

(連邦支援研究又は開発)

20

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) から与えられた助成金第 5P01CA29625 号、国立衛生研究所から与えられた助成金第 1K22CA128886 号による政府支援によってなされた。政府は本発明のある特定の権利を有している。

【0003】

(技術分野)

本開示は、癌の治療及び診断のための組成物及び方法に関連している。

【背景技術】

【0004】

「ゲノムの番人」として、p53 は、老化様現象の停止及びアポトーシスプログラムの導入のように、防御機構を活性化して、遺伝的に変異しているクロンの出現を阻止して欠損細胞の複製を阻止する (Lane, Nature, 358:15-16 (1992); Vogelstein et al., Nature, 408:307-310 (2000))。癌細胞は p53 活性を破壊する多くの分子戦略を採用して病的生存優位性を達成している (例えば、Baker et al., Science, 244:217-221 (1989); Honda et al., FEBS Lett., 420:25-27 (1997); Momand et al., Cell, 69:1237-1245 (1992); Moll et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:4407-4411 (1995) を参照されたい)。

30

【0005】

p53 活性の回復は癌治療のための 1 つの戦略である (例えば、Brown et al., Nat. Rev. Cancer, 9:862-873 (2009) を参照されたい)。例えば、E3 ユビキチンリガーゼ HDM2 の N-末端表面上の疎水性裂溝 (Toledo and Wahl, Nat. Rev. Cancer, 6:909-923 (2006); Marine and Dyer, J. Cell. Sci., 120:371-378 (2007); Bartel et al., Int. J. Cancer, 117:469-475 (2005); Shvarts et al., Genomics, 43:34-42 (1997); Danov i et al., Mol. Cell. Biol., 24:5835-5843 (2004)) が、p53 転写促進ドメインの両親媒性 α 螺旋に直接結合する (Kussie et al., Science, 274:948-953 (1996)) ことを明らかにすることなど、p53-HDM2 結合界面の結晶構造を確認することは、このような戦略の開発に寄与した。その結果、HDM2 の p53-結合ポケットを標的とする小分子及びペプチドが開発された (例えば、Bernal et al., J. Am. Chem. Soc., 129:2456-2457 (2007); Grasberger et al., J. Med. Chem., 48:909-912 (2005); Koblisch et al., Mol. Cancer Ther., 5:160-169 (2006); Kritzer et al., J. Am. Chem. Soc., 126:946

40

50

8-9469 (2004); Shangary et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 105:3933-3938 (2008); Vassilev et al., Science, 303:844-848 (2004); Yin et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 44:2704-2707 (2005)を参照されたい)。このような薬剤の1つはMDM2阻害剤、Nutlin-3である(Vassilev et al., Science, 303:844-848 (2004))。p53(例えば、野生型p53)を発現するある特定の腫瘍に、MDM2を標的とするこれらの薬剤を用いることがp53レベルに治療的な急増を引き起こすことが示されている。具体的には、Nutlin-3は他の治療薬が存在していないときにある特定の腫瘍においてアポトーシスを引き起こせることが示されている(例えば、Drakos et al., Clin. Cancer Res., 13:3380-3387 (2007); Tabe et al., Clin. Cancer Res., 15:933-942 (2009)を参照されたい)。しかしながら、このような効果は全ての腫瘍タイプで生じない。特に、ある特定の腫瘍は、MDM2-標的治療に対して耐性があるか又は他のものより耐性がある。E3ユビキチンリガーゼHDMXのHDM2との同時発現はMDM2標的薬剤の有効性を減少させる可能性がある(例えば、Hu et al., Cancer Res., J. Biol. Chem., 281:33030-33035 (2006); Patton et al., Cancer Res., 66:3169-3176 (2006); Wade et al., J. Biol. Chem., 281:33036-33044 (2006)を参照されたい)。

【0006】

p53の動態を調節するHDMXの役割が記述されていて(例えば、Danovi et al., Mol. Cell. Biol., 24:5835-5843 (2004); Laurie et al., Nature, 444:61-66 (2006); Ramos et al., Cancer Res., 61:1839-1842 (2001); Wade et al., J. Biol. Chem., 281:33036-33044 (2006); Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 104:12365-12370 (2007)を参照されたい)、HDMXを標的にするいくつかの薬剤に関してインビトロの予備的報告が入手可能である(例えば、Harker et al., Bioorg. Med. Chem., 17:2038-2046 (2009); Hayashi et al., Bioorg. Med. Chem., 17:7884-7893 (2009); Hu et al., Cancer Res., 67:8810-8817 (2007); Kallen et al., J. Biol. Chem., 284:8812-8821 (2009); Li et al., J. Am. Chem. Soc., 130:13546-13548 (2008); Michel et al., J. Am. Chem. Soc., 131:6356-6357 (2009); Pazgier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106:4665-4670 (2009); Reed et al., J. Biol. Chem., 285:10786-10796 (2010)を参照されたい。)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

癌は米国において相変わらず主要な死亡率及び死亡数の要因の1つである。改善された癌治療が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、対象の癌を診断、予測、及び／又は治療する組成物及び方法を提供する。

【0009】

ある態様では、本開示は、細胞におけるp53活性を増大する方法を提供する。このような方法は、p53(例えば、機能的p53)をコード又は発現する細胞を得ること又は供給すること、細胞中でHDMXが発現されているか否かを確認すること、そしてHDMXが発現されている場合は、細胞をHDMX調節剤と接触させること、それによって細胞におけるp53活性を増大させることを包含できる。ある実施態様では、HDMX調節剤は、p53の転写促進ドメインと同一性を有しているペプチド(例えば、架橋されていない(non-cross-linked)及び架橋されている(cross-linked)ペプチド)を包含する。ある例では、ペプチドは、p53転写促進ドメインの相互作用面に存在するアミノ酸に対応するアミノ酸に関してp53転写促進ドメインとの同一性の第1レベル、及び他の全てのアミノ酸(例えば、相互作用面の外にあるもの)に関してp53転写促進ドメインとの同一性の第2レベルを有することができる。例えば、p53転写促進ドメインの相互作用面上のそれに対応しているペプチド中のアミノ酸は、保存されていてもよく、或いはp53転写促進ドメインの相互作用面にあるアミノ酸の同類置換であってもよく、そして相互作

用面のもの以外のアミノ酸は、ペプチドの相互作用面の外にあるそれらアミノ酸と、少なくとも又は約30%、少なくとも又は約40%、少なくとも又は約50%、少なくとも又は約60%、少なくとも又は約70%、少なくとも又は約80%、少なくとも又は約90%、少なくとも又は約95%、少なくとも又は約98%、少なくとも又は約99%、又は100%の同一性を有することができる。ある態様では、ペプチドは1つ又はそれ以上の内部架橋剤 (internal crosslinker) によって架橋されていてもよい。ある実施態様では p 5 3 はヒト p 5 3 である。ある実施態様では、HDMX 調節剤は図 1 C に示した架橋されたペプチドであってよい。ある実施態様では、HDMX 調節剤は図 1 C に示した、SAH-p 5 3-8 であってよい。

【0010】

10

上に開示した方法は更に、細胞を1つ又はそれ以上のHDM2 調節剤と接触させることを包含できる。例示的HDM2 調節剤は、その類縁体、改変体、改良体、及び誘導体を含む、Nutlin-3 (例えば、Nutlin-3a) を包含できる。

【0011】

ある実施態様では、HDMXが発現されているか否かを確認する工程はHDMX及び／又はp 5 3-HDMX複合体の存在を検出することを含むことができる。方法は更に、HDM2が細胞内で発現されているか否かを確認すること、そしてHDM2が発現されている場合は、細胞をHDM2 調節剤 (例えば、Nutlin-3) と接触させることを任意に含むこともできる。ある実施態様では、細胞又は対象に投与されるHDMX 調節剤とHDM2 調節剤の用量は相乗的又は相加的である。ある実施態様では、細胞はインビトロである。或いは又は更に、細胞は対象 (例えば、癌を有する対象) 内にあってよい。

20

【0012】

別の態様では、本開示は、HDM2 調節剤 (例えば、Nutlin-3) による治療でp 5 3 活性が実質的に増大しない細胞を得ること又は提供すること；そしてこの細胞をHDMX 調節剤と接触させること、それによって細胞中のp 5 3 活性を増大することを包含する、細胞中のp 5 3 活性を増大する方法を提供する。ある実施態様では、HDMX 調節剤は本明細書に記載されているペプチドを包含できる。ある実施態様では、p 5 3 は、ヒトp 5 3 である。ある実施態様では、HDMX 調節剤は図 1 C に示した架橋されたペプチドであってよい。ある実施態様では、HDMX 調節剤はSAH-p 5 3-8 であってよい。方法は、細胞をHDM2 調節剤 (例えば、Nutlin-3) と接触させることを任意に含んでいてもよい。ある実施態様では、細胞又は対象を、相乗的又は相加的であるHDMX 調節剤及びHDM2 調節剤の用量と接触させる (例えば、処置する) ことができる。

30

【0013】

更なる態様では、本開示は、p 5 3 (例えば、機能的p 5 3) をコードするか (例えば、遺伝子的にコードする) 又は発現する細胞を得ること又は提供すること、この細胞をHDMX 調節剤及びHDM2 調節剤と接触させること (ここで、HDM2 調節剤は図 1 C に示したステープル状に架橋された(stapled)ペプチドではない)、それによって、細胞においてp 5 3 活性を増大することを含んでいる、細胞中のp 5 3 活性を増大する方法を提供する。ある実施態様では、HDMX 調節剤は本明細書に記載されているペプチドを包含できる。ある態様では、p 5 3 は、ヒトp 5 3 である。ある実施態様では、HDMX 調節剤は図 1 C に示した架橋されているペプチドであってよい。ある実施態様では、HDMX 調節剤はSAH-p 5 3-8 であってよい。ある実施態様では、HDM2 調節剤はNutlin-3 であってよい。ある実施態様では、HDMX 調節剤及びHDM2 調節剤の用量は相乗的又は相加的用量である。ある実施態様では、細胞はインビトロである。或いは、ある例では、細胞は対象 (例えば、癌を有する対象) にある。

40

【0014】

ある態様では、本開示は対象の癌を治療する方法を含んでいる。これらの方法は、対象由来の異常増殖細胞又は癌細胞を含むか又はこれらから得られる生体試料において、機能的p 5 3 をコードしているか (例えば、遺伝子的にコードしている) 又は発現できるか否かを検出すること、機能的p 5 3 をコードしているか又は発現できる場合は、試料にお

50

るHDM2、若しくはHDMX、又は両方のレベルを検出すること、以下よりなる群から治療を選択すること：

(i) HDM2調節剤を含有している組成物の治療有効量を投与することを含む治療；

(ii) HDMX調節剤を含有している組成物の治療有効量を投与することを含む治療；及び

(iii) HDM2調節剤及びHDMX調節剤を含有している組成物の治療有効量を投与することを含む治療

(ここで、試料においてHDM2のレベルがHDMXのレベルより実質的に高い場合は治療(i)が選ばれ、試料においてHDMXのレベルがHDM2のレベルより実質的に高い場合は治療(ii)が選ばれ、そして試料においてHDM2とHDMXのレベルがほぼ等しい場合は治療(iii)が選ばれる)、それによって、対象における癌の治療が選ばれること、そして治療(i)、(ii)、又は(iii)に従って対象を治療すること(ここで、治療の選択及び治療段階の投与は同時点又は別の時点に独立して又は同じ当事者によって行われる)を含むことができる。このような方法のある例では、(i)のHDM2調節剤は図1Cに示したステーブル状に架橋されたペプチドではない。ある実施態様では、HDM2が発現されてHDMXが発現されない場合に治療(i)が選ばれる。ある実施態様では、HDMXが発現されてHDM2が発現されない場合に治療(ii)が選ばれる。ある実施態様では、治療(iii)は、HDM2阻害剤及びHDMX阻害剤を同時に又は別々に投与することを含む。ある例では、HDMXのレベルを検出するステップは、p53-HDMX複合体の存在を検出することを含んでいる。ある実施態様では、HDMX調節剤は本明細書に記載されているペプチドを包含できる。ある実施態様では、ペプチドは1つ又はそれ以上の内部架橋剤によって架橋されていてもよい。ある実施態様では、p53は、ヒトp53である。ある実施態様では、HDMX調節剤は、図1Cに示したステーブル状に架橋されたペプチドであってよい。ある実施態様では、HDMX調節剤はSAH-p53-8であってよい。ある実施態様では、HDM2調節剤はNutlin-3である。ある実施態様では、治療(iii)で用いられるか又は投与されるHDMX調節剤及びHDM2調節剤の用量は相乗的用量又は相加的用量である。

【0015】

別の態様では、本開示は、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を含有している組成物を提供する。ある実施態様では、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤は本明細書に記載されているペプチドを包含できる。ある実施態様では、ペプチドは1つ又はそれ以上の内部架橋剤で架橋されていてもよい。ある実施態様では、p53は、ヒトp53である。ある実施態様では、HDMX調節剤は図1Cに示した架橋されたペプチドであってよい。ある実施態様では、HDMX調節剤はSAH-p53-8である。ある実施態様では、HDM2調節剤はNutlin-3である。

【0016】

別の態様では、本開示は更に、p53とHDMXからなる単離されたタンパク質複合体、並びにこの単離されたタンパク質複合体と特異的に結合する抗体及び／又は抗体断片を提供する。ある実施態様では、本開示は、この単離されたタンパク質複合体を、癌診断に及び／又は治療効果を観察するために用いる方法；並びに／又は対象における癌を治療するためのオーダーメイド治療方法を開発するために用いる方法を提供する。

【0017】

ある態様では、本開示は、p53並びにHDMX、HDM2、及び／又はp53-HDMX複合体の1つ又はそれ以上のを検出するための組成物；並びに1つ又はそれ以上のp53及びHDMX、HDM2、及び／又はp53-HDMX複合体の1つ又はそれ以上の検出に基づく癌を有する対象における癌治療のためのオーダーメイド治療計画を開発するための使用説明書を包含しているキットを提供する。ある実施態様では、本開示は1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤；1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤の投与に適している1つ又はそれ以上のデバイス；1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又は

それ以上のHDM2調節剤どのように投与すべきかを提供する使用説明書を含んでいるキットを提供する。p53並びに1つ又はそれ以上のHDMX、HDM2、及び／又はp53-HDMX複合体を検出するための組成物；及び1つ又はそれ以上のp53並びに1つ又はそれ以上のHDMX、HDM2、及び／又はp53-HDMX複合体並びに1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤の検出に基づく癌を有する対象における癌治療のためのオーダーメイド治療計画を開発するための使用説明書；1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤の投与に適している1つ又はそれ以上のデバイス；並びに1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤をどのようにして投与すべきかを提供する使用説明書を包含しているキットも提供される。

10

【0018】

ある態様では、本開示は、放射線治療を受ける予定になっている対象を治療する方法を提供する。このような方法は、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を少なくとも1用量の放射線治療の前に対象に投与することを包含できる。

【0019】

ある態様では、本開示は、癌を有する対象を治療する方法を提供する。これらの方法は、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を少なくとも1用量の放射線治療の前に対象に投与し、そして対象を放射線治療に曝すことを包含できる。ある実施態様では、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を対象の腸に局所的に投与する。ある実施態様では、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を全身投与する。ある実施態様では、HDMX調節剤は、p53の転写促進ドメインと少なくとも60%同一性を有するアミノ酸配列を有しているペプチド、p53の転写促進ドメインと少なくとも60%同一性を有するアミノ酸配列を有しているペプチド（ここで、ペプチドの相互作用面上のアミノ酸は保存されている）、及びp53の転写促進ドメインと少なくとも60%同一性を有するアミノ酸配列を有しているペプチド（ここで、ペプチドの相互作用面上の1つ又はそれ以上のアミノ酸は、ペプチドの相互作用面を変化させない保存アミノ酸で置換されている）を包含できる。ある実施態様では、ペプチドは1つ又はそれ以上の内部架橋剤で架橋されていてもよい。ある実施態様では、p53は、ヒトp53である。ある実施態様では、HDMX調節剤は図1Cに示した架橋されたペプチドであってよい。ある実施態様では、HDMX調節剤はSAH-p53-8であってよい。ある実施態様では、HDM2調節剤はNutlin-3である。ある実施態様では、HDMX調節剤及びHDM2調節剤の用量は相乗的用量又は相加的用量である。ある実施態様では、HDM2調節剤は図1Cに示した架橋されたペプチドではない。

20

30

【0020】

ある態様では、本開示は、アミノ酸配列、Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Phe₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Trp₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Leu₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆（配列番号22）（ここで：Xaa₁はLeu又はGln、又は欠失している；Xaa₂はSer又は欠失している；Xaa₃はGln又は欠失している；Xaa₄はGlu、Gln又はAlaであり；Xaa₅はThr又はAlaであり；Phe₆はPhe又はその同類置換であり；Xaa₇はSerであり；Xaa₈はAsp若しくはAsn又はAsp及びGlu以外の何れかのアミノ酸であり；Xaa₉はLeuであり；Trp₁₀はTrp又はその同類置換であり；Xaa₁₁はLys又は正電荷を有するアミノ酸；Xaa₁₂はLeu、Lys又はAlaであり；Leu₁₃はLeu又はその同類置換であり；Xaa₁₄はPro又は欠失している；Xaa₁₅はGlu、Gln若しくはAla、若しくはAsp及びGlu以外の何れかのアミノ酸、又は欠失している；Xaa₁₆はAsn又は欠失している、ここで2、3、又は6個のアミノ酸で隔てられている少なくとも2つのアミノ酸の側鎖は内部架橋に置き換えられている）の少なくとも6個の連続アミノ酸を含む内部架橋されたポリペプ

40

50

チドを提供する。ある実施態様では、内部架橋されたペプチドは、X a a₁ が L e u 又は欠失している；X a a₂ が S e r 又は欠失している；X a a₃ が G l n 又は欠失している；X a a₄ が G l u であり；X a a₅ が T h r であり；P h e₆ が P h e であり；X a a₇ が S e r であり；X a a₈ が A s p であり；X a a₉ が L e u であり；T r p₁₀ が T r p であり；X a a₁₁ が L y s であり；X a a₁₂ が L e u であり；L e u₁₃ が L e u であり；X a a₁₄ が P r o 又は欠失している；X a a₁₅ が G l u 又は欠失している；X a a₁₆ が A s n 又は欠失している；ここで P h e₆、T r p₁₀、及び／又は L e u₁₃ の 1 つ、2 つ及び／又は 3 つは、ペプチド及び H D M X の結合面間の相互作用を変化させない同類アミノ酸置換で置換されていて；及び／又は P h e₆、T r p₁₀、及び／又は L e u₁₃ に対応する残基以外のアミノ酸は配列番号 1 又は配列番号 2 の配列と少なくとも 30 %（例えば、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、又は 100 %）同一である、を包含する。ある実施態様では、ペプチドは配列番号 10 のアミノ酸配列を含んでいる。ある実施態様では、内部架橋されたペプチドは表 1 に示したステーブル状の架橋から選ばれる内部架橋に置き換えられた側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸をを包含している。ある実施態様では、内部架橋されたペプチドは、表 1 に示したステーブル状の架橋から選ばれる内部架橋に置き換えられた側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸を包含している。ある実施態様では、内部架橋に置き換えられた側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸は表 1 から選ばれる 1 つ又はそれ以上のステーブル状の架橋を含んでいる。ある実施態様では、内部架橋に置き換えられた側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸は、表 1 に示した少なくとも 1 つのステーブル状の架橋及び少なくとも 1 つの縫合状の架橋 (stitch) を含んでいる。ある実施態様では、内部架橋に置き換えられた側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸は、X a a₇ と X a a₁₄ の間に位置している。ある実施態様では、内部架橋に置き換えられた側鎖を有する少なくとも 2 つのアミノ酸は、少なくとも 2 つのアミノ酸が 6 アミノ酸分離している 1 つ又はそれ以上のステーブル状の架橋を包含している。ある実施態様では、内部架橋は配列番号 2 ～ 21 に示した 1 つ又はそれ以上の位置に位置している。

【0021】

ある態様では、本開示は、本明細書で開示された 1 つ又はそれ以上の架橋されたペプチド（例えば、表 1 又は図 1 C に開示された 1 つ又はそれ以上のペプチド）を含有している医薬組成物を提供する。

【0022】

ある態様では、本開示は、本明細書で開示された 1 つ又はそれ以上の架橋されたペプチド（例えば、表 1 又は図 1 C に開示された 1 つ又はそれ以上のペプチド）及び 1 つ又はそれ以上の H D M 2 調節剤を含有している医薬組成物を提供する。ある実施態様では、1 つ又はそれ以上の H D M 2 調節剤は N u t l i n - 3 を包含する。

【0023】

別段の定義がない限り、本明細書で用いられる全ての技術及び科学用語は、本発明に関連する当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有している。方法及び材料は本発明で用いるために本明細書に記載されているほか；当該技術分野で公知の適切な方法及び材料も用いることができる。材料、方法、及び実施例は説明のためだけであって限定を意図していない。本明細書で述べられている全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベース登録、及びその他の引例はその全てが参照により本明細書に取り込まれている。矛盾する場合は、定義を含む、本明細書が支配する。

【0024】

本発明のその他の特徴及び利点は以下の詳細な説明、図面から、そして特許請求の範囲から明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1 A】図 1 A は、例示的なステーブル状に架橋された p 5 3 α 螺旋の構造を示す素描である。

10

20

30

40

50

【図1B】図1Bは、野生型 p 5 3（配列番号2）、SAH-p 5 3-8（配列番号10）、及びSAH-p 5 3-8_{F19A}（配列番号13）のアミノ酸配列の14～29番目のアミノ酸を示す。ペプチドの活性に不可欠なアミノ酸が囲いで示される。繋ぎ止めされたアミノ酸が*として示される。

【図1C】図1Cは、SAH-p 5 3-8及びその他の例示的なステーブル状に架橋されたp 5 3ペプチド（配列番号2～21）の配列及び物理的な特性を示す表である。

【図1D】図1Dは、ペプチドをステーブル状に架橋する例示的な方法を示す素描である。

【図1E】図1Eは、炭化水素によってステーブル状に架橋されたp 5 3ペプチドを作成するために用いることができるオレフィン鎖を含有している多種の非天然アミノ酸を示す。

【図1Fa-1Fd】図1Fa～1Fdは、i、i+3；i、i+4；及びi、i+7位にまたがる各種の単一のステーブル状の架橋を有する組成物、及び単一のステーブル状の架橋を有するp 5 3ペプチドのライブラリーを作成するための単一のステーブル状の架橋のスキニングを示す。

【図1Ga-1Gh】図1Ga～1Ghは、多数のステーブル状に架橋されたペプチドにおける各種のステーブル状の架橋の組成、及び多数のステーブル状に架橋されたp 5 3ペプチドのライブラリーを作成するためのステーブル状の架橋のスキニングを示す。

【図1Ha-1Hi】図1Ha～1Hiは、直列にステーブル状に架橋されたペプチドにおける各種ステーブル状の架橋の組成、及び直列にステーブル状に架橋されたp 5 3ペプチドのライブラリーを作成するためのステーブル状の架橋のスキニングを示す。

【図2A-2C】図2A～2Cは、蛍光偏光（A）で評価した組み換えHDMXとFITC標識化p 5 3ペプチド間の直接結合；及びSAH-p 5 3-8又はNutlin-3を用いるFITC-SAHP-53-8とHDM2（B）又はHDMX（C）の間の結合を妨害する競合結合アッセイを示す線グラフである。mpはミル偏光の単位である。データは少なくとも3回の独立した実験の平均結果プラス標準偏差を示す。

【図3】図3は、ウェスタンブロッティングで検出した、HDMX、HDM2、FITCペプチド又はアクチンのレベルを示す画像である。左側の画像はウェスタンブロッティングで検出された総タンパク質を示す。右側の画像は免疫沈降（IP）に続いて検出したタンパク質を示す。β-アクチンは負荷コントロールとして包含された。FITC標識化ペプチドはウェスタンブロッティングの蛍光スキャンによって検出した。

【図4A-4I】図4A～4Iは、SAH-p 5 3-8、Nutlin-3又はSAH-p 5 3-8_{F19A}に曝露した各種細胞株における細胞生存能を示す線グラフである。用いた細胞株は、HDM2、HDMX/MDM2若しくはMDMX（図4A～4E）又は欠失若しくは機能不全のp 5 3（図4F～4H）の異なる発現レベルを有する癌細胞株（例えば、骨肉腫、絨毛腫、結腸癌、上皮癌、乳癌）、及び非腫瘍コントロール（図4I）を包含した。細胞をCellTiter-Glo（登録商標、Promega）に曝露して、ATPで誘導された化学発光によって生存能を評価した。データは少なくとも3度実施した実験に対する平均値プラス標準偏差である。

【図5A-5B】図5A及び5Bは、SAH-p 5 3-8がp 5 3-HMDX複合体の形成を阻害することを示す画像である。（A）JEG-3細胞を賦形剤、20 μMのSAH-p 5 3-8、又は20 μMのNutlin-3に6時間曝露した。細胞抽出物（インプット）及び抗HDMX免疫沈降物（IP：HDMX）をSDS-PAGE及びウェスタンブロッティングに付した。画像は、ウェスタンブロッティングで検出したp 5 3、HDMX、及びHAUSPのレベルを示す。（B）JEG-3細胞を、10 μMのMG132の存在下、SAH-p 5 3-8の濃度を増大させて（すなわち、0～20 μMのSAH-p 5 3-8）で6時間処置した。細胞抽出物（インプット）及び抗HDMX免疫沈降物（IP：HDMX）をSDS-PAGE並びにp 5 3、HDMX、及びHAUSPについてのウェスタンブロッティングで分析した。インプットのレベルは総タンパク質を示し、そしてIPは免疫沈降に続き検出されたタンパク質レベルを示す。

10

20

30

40

50

【図5C-5E】図5C～5Eは、無傷細胞におけるp53-HMDX複合体の形成をSAH-p53-8は阻害するがNutlin-3は阻害しないことを示す画像及びそれ由来する棒グラフである。(C)ドキシサイクリン誘導性U2OS細胞を、Nutlin-3 (10 μ M)、SAH-p53-8 (10 μ M)、又は両方の存在下、ドキシサイクリンで処置するか又は処置しないで、HA-HDMX及びp53の誘導を免疫蛍光法で検出及び定量した。スケールバーは10ミクロンである。(D)インキュベートしたU2OS細胞を、Nutlin-3、SAH-p53-8、又は両方の存在下、ドキシサイクリンで処置するか又は処置せずに、次いでP-LISAで処理した。スケールバーは10ミクロンである。(E)P-LISAで検出されたp53-HDMX複合体の定量。データは平均値 $\pm$ s.d. * $p=0.0003$ 、** $p=0.0001$ 、ウェルチ補正を伴う対応のないt-検定。

10

【図6A】図6Aは、p53転写活性はSAH-p53-8によって再活性化されることを示す棒グラフである。JEG-3細胞を、賦形剤、20 μ MのSAH-p53-8 (20 μ M)、又は20 μ MのNutlin-3 (20 μ M)で処置した。転写の上方調節を定量的PCRで評価した。SAH-p53-8 (左棒)、Nutlin-3 (中棒)、及び賦形剤コントロール (右棒)の存在下でのHDM2、p21、及びMIC-1のmRNAレベルを示す。

【図6B】図6Bは、p53-依存性アポトーシスがSAH-p53-8によって再活性化されることを示す線グラフである。JEG-3細胞を、賦形剤、増大する濃度 (すなわち、0.3～10 μ MのSAH-p53-8)、又はNutlin-3で12時間処置した。細胞をカスパーゼ3/7-Glo (登録商標) 試薬に曝露し、そして発光前カスパーゼ3/7基質の開裂を検出することによりアポトーシスのレベルを評価した。

20

【図7A-7B】図7A及び7Bはそれぞれ、インビボにおいて、SAH-p53-8がHDMXが介在するp53の抑制を克服して腫瘍の生育を阻害することを示している、線グラフ及び棒グラフを示す。(A)JEG-3を異種移植したマウスの集団 ($n=7$) を、賦形剤 (D5W中5%のDMSO)、又は10mg/kgのSAH-p53-8を4日間毎日静脈内投与で導入、又はNutlin-3を4日間毎日静脈内投与で導入、の何れかで処置した。腫瘍体積を1、3、4、及び5日目にノギス測定で観察した (データの統計学的有意性は：3日目；SAH-p53-8対賦形剤 $p=0.032$ 、SAH-p53-8対Nutlin-3 $p=0.032$ 、Nutlin-3対賦形剤 $p=0.94$ ；4日目；SAH-p53-8対賦形剤 $p=0.008$ 、SAH-p53-8対Nutlin-3 $p=0.026$ 、Nutlin-3対賦形剤 $p=0.88$ ；5日目；SAH-p53-8対賦形剤 $p=0.017$ 、SAH-p53-8対Nutlin-3 $p=0.037$ 、Nutlin-3対賦形剤 $p=0.46$ である)。(B)腫瘍を切除し、RNAを単離して、p53転写標的HDM2、p21、及びMIC-1をqPCRで分析した。

30

【図8】図8は、p53-HMDX複合体の薬理的誘導がNutlin-3耐性癌細胞をHDMX阻害に対して敏感にすることを示す免疫プロットの画像である。MCF-7乳腺腺癌細胞を、賦形剤、Nutlin-3 (20 μ M)、又は5若しくは20 μ MのSAH-p53-8と組合せたNutlin-3 (20 μ M)に曝露した。細胞を10 μ MのMG-132に6時間曝露してHDMX-p53複合体形成を誘導した。細胞抽出物 (インプット-左側免疫プロット) 及び抗-HDMX免疫沈降物 (IP: HDMX-右側免疫プロット) をSDS-PAGE及びウェスタンブロッティングで分析した。p53及びHAUSPのレベルを示す。

40

【図9A-9B】図9A～9Bは、SAH-p53-8とNutlin-3が腫瘍細胞の生存能を減少させるように相乗的に作用することを示す棒グラフである。(A)MCF-7細胞を20 μ MのNutlin-3の存在下又は非存在下に、増大する濃度 (すなわち、5～20 μ M) のSAH-p53-8に曝露した。細胞生存能を24時間時点でCell Titer Glo (登録商標) で評価した。(B)MCF-7細胞を20 μ MのSAH-p53-8の存在下又は非存在下に、増大する濃度 (すなわち、5～20 μ M

50

）のNutlin-3に曝露して、細胞生存能を「（A）」のように評価した

【図10A-10D】図10A～10Dは、SAH-p53-8とNutlin-3が相乗作用をもたらすことを示す相乗効果のグラフである。MCF-7（A）、JEG-3（B）、SJSA-1（C）、及びSJSA-X（D）細胞を0.5～20μMのSAH-p53-8、Nutlin-3、又は等モル混合物で処置した。次いで、用量効果の相乗作用分析を実施してそれを示した。

【図10E-10G】図10E～10Gは、SAH-p53-8とNutlin-3がリンパ腫及びメラノーマにおいて相乗的な抗腫瘍活性を表わすことを示す相乗効果のグラフである。

【図11A-11E】図11A～11Eは、p53及びHDM2（A）、p53及びHDMX（C）、並びにp53、HDM2、及びHDMXを発現すると同定された癌に対する治療戦略を説明している素描である。（B）及び（D）は失敗するであろう治療戦略を示す。

【図12】図12は、HDMXと結合するSAH-p53-8によるp53の再活性化を説明している素描である。

【図13】図13は、ヒトp53のアミノ酸配列（配列番号1：Genbank Accession番号CAA42627（CAA42627.1）；gi：50637）を示す。

【0026】

各種図面中の同様な参照記号は同様な要素を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本開示は、とりわけ、ステープル状に架橋されたp53ペプチド、例えば、HDM2を標的にするために初めに開発されたステープル状に架橋されたp53ペプチドがHDMXと高い親和性で結合するという予想外の発見に基づいている。更に、ステープル状に架橋されたp53ペプチドは、それらがHDM2と結合するより25倍高い親和性でHDMXと結合する。従って、本開示は、ある特定の癌を治療するため又は治療法を開発するための新規な方法及び組成物（例えば、組成物の組合わせ）を提供する。

【0028】

治療に適している癌は、癌細胞がある程度のレベルの機能的p53を発現しているか、又は機能的p53発現を誘発できるものを包含している。例えば、機能的p53が発現されるが、HDMXによってp53のレベル又は活性が細胞中で低下する何れかの癌細胞、及び／又はHDMXが本明細書に開示されている組成物又は方法を用いて有利に治療できる何れかの癌細胞である。

【0029】

本明細書に開示されているように、p53活性は、癌細胞で、本明細書に開示されているある状況においてHDMX調節剤（例えば、図1Cに開示されているようなステープル状に架橋されたペプチド）を単独で、又は本明細書に開示されている別の状況においてHDMX調節剤をHDM2調節剤と組み合わせて用いて、増大できる。本明細書で示すように、p53活性のこのような増大はインビトロ及びインビボにおける癌細胞の生存能の減少又は死をもたらすことができる。従って、本明細書に開示された組成物及び方法は癌の治療に用いることができる。本明細書に開示された組成物及び方法においてHDMX調節剤及びHDM2調節剤として用いるのに適している薬剤は以下に開示されている。

【0030】

HDMX調節剤

本開示に包含されるHDMX調節剤は、細胞におけるp53の発現、レベル及び／又は活性を直接的に（例えば、結合して）、又は間接的に（例えば、HDMX発現及び／又は活性を調節する分子又は経路（例えば、ユビキチン化経路及びE3ユビキチンリガーゼのようなこの経路の要素を介して）、細胞におけるHDMXの発現（例えば、タンパク質又はmRNAの発現）及び／又はレベル（タンパク質レベル）を阻害することによって、細

10

20

30

40

50

胞における p 5 3 の発現、レベル及び／又は活性を増大する薬剤を包含する。

【0031】

ある実施態様では、HDMX 調節剤は、以下に開示される 1 つ又はそれ以上の薬剤を包含できる。例えば、HDMX 調節剤は、(1) HDMX と結合する 1 つ又はそれ以上の架橋されていないペプチド；(2) HDMX と結合する 1 つ又はそれ以上のステープル状に架橋された又は縫合状に架橋された p 5 3 ペプチド；(3) HDMX と結合する 1 つ又はそれ以上の小分子；(4) HDMX と結合する（例えば、特異的に結合する）1 つ又はそれ以上の抗体又は抗体の断片；(5) HDMX の発現を減少する 1 つ又はそれ以上の核酸分子（例えば、抑制性核酸分子（例えば、RNA i 又は siRNA））；(6) HDMX の発現及び／又は活性を減少する 1 つ又はそれ以上の医薬品；及び(7) HDMX の発現及び／又は活性を減少する 1 つ又はそれ以上の方法、並びに(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6) 及び／又は(7)の何れかの組み合わせ又は(1)と(2)、(3)、(4)、(5)、(6) 及び／又は(7)との何れかの組み合わせを包含できる。

10

【0032】

ある実施態様では、本明細書で開示されている方法及び組成物で用いられる HDMX 調節剤は：本明細書で開示されている HDM2 調節剤と同一ではない（例えば、HDMX 調節剤は HDM2 と結合せずに（例えば、実質的に結合しない）HDMX と特異的に結合する）。

【0033】

ある実施態様では、HDMX 調節剤は HDMX 及び HDM2 と結合できる。しかしながら、このような実施態様では、HDMX 阻害剤は一般に、HDM2 に対するより HDMX 対してより高い結合親和性を有している（例えば、HDMX 調節剤の結合親和性は、HDM2 に対してより、HDMX に対して、2、5、10、20、25、50、75、100、25、500、1000、2000、5000、10、000 倍又はそれ以上高い）。

20

【0034】

HDMX 調節ペプチド

ある実施態様では、HDMX 調節剤はペプチド（例えば、組み換え又は合成によって産生されたペプチド）である。上記のように、このようなペプチドは、例えば、本明細書に記載されているように HDMX と相互作用するペプチドであるならば、架橋されていなくても、ステープル状に架橋されていても又は縫合状に架橋されていてもよい。

30

【0035】

ある実施態様では、HDMX 調節タンパク質は野生型ヒト p 5 3 タンパク質又はアミノ酸配列（例えば、配列番号 1）の部分（複数を含む）に関連しているか又は同一であるアミノ酸配列を包含する（例えば、含む、からなる、又は本質的にからなる）ことができる。例えば、ペプチドは野生型 p 5 3 の 1 つ又はそれ以上のドメインを包含できる。このようなドメインは天然に連続していてもよい。あるいは、非天然連続 p 5 3 ドメインを組合せてもよい。ある例では、ペプチドは少なくとも 6 個（例えば、配列番号 1 の連続アミノ酸を、361、361 未満、300 未満、200 未満、100 未満、50 未満、25 未満、及び 20 未満を包含する、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 又はそれ以上）を包含できる。

40

【0036】

ある例では、配列番号 1 の部分（複数を含む）との同一性を有するペプチドは、p 5 3 の相互作用面（例えば、p 5 3 の転写促進ドメインの相互作用面）のアミノ酸に対応するアミノ酸に関して第 1 レベルの同一性を有して、相互作用面に対応しないアミノ酸に関して第 2 レベルの同一性を有している。例えば、p 5 3 の相互作用面（例えば、p 5 3 の転写促進ドメインの相互作用面）のアミノ酸に対応するアミノ酸は、保存されていても又は p 5 3 の相互作用面（例えば、p 5 3 の転写促進ドメインの相互作用面）に存在するアミノ酸の同類置換であってもよい。対照的に、相互作用面の外のアミノ酸は、配列番号 2 又は 22～23 内のペプチドの相互作用面の外のアミノ酸と少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくと

50

も約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は少なくとも約100%同一性を有することができる。或いは又は更に、相互作用面の外にあるアミノ酸は同類であろうとなかろうと、アミノ酸の置換及び／又は欠失を包含できる。例えば、相互作用面の外にあるアミノ酸は、同類であろうとなかろうと、1、2、3、4、5、6、7、8、10未満、5未満、4未満、3未満、又は2未満のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は付加を包含できる。従って、相互作用面の残基が配列番号2のそれと同一であるか又はその同類置換である限り、本明細書に開示されている何れかのペプチドのアミノ酸配列は変更することができる。

【0037】

本明細書のペプチドの「相互作用面」は、HDMXと相互作用する（例えば、特異的に相互作用する、或いは特異的に結合する）p53α螺旋のアミノ酸残基を包含する。p53転写促進ドメインの相互作用面に含まれているアミノ酸残基を包含する、p53の相互作用面内に含まれているアミノ酸残基は当該技術分野において公知である（例えば、Kussie et al., Science, 274(5289):948-953 (1996), and Joseph et al., Cell Cycle, 9(22):4560-4568 (2010)を参照されたい）。ある例では、Kussie et al., Science, 274(5289):948-953 (1996) 又はJoseph et al., Cell Cycle, 9(22):4560-4568 (2010)によって開示されたようなp53の相互作用面内のアミノ酸に対応する本明細書で開示されたペプチドのアミノ酸は、Kussie et al., Science, 274(5289):948-953 (1996), 及びJoseph et al., Cell Cycle, 9(22):4560-4568 (2010)によって開示されたアミノ酸と同一であるか又は同類置換であってよい。例えば、ある例では、本明細書に開示されているペプチドの相互作用面内のアミノ酸は、野生型p53（配列番号1）のPhe¹⁹、Trp²³、及びLeu²⁶に対応している。ある例では、これらの位置は以下の配列で下線が付されている：LSQETFSDLWKLLPEN（配列番号2）。本明細書に開示されているペプチド内に包含させるのに適している同類置換を以下に検討する。例えば、ある例では、「同類アミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基を類似する側鎖を有する他のアミノ酸残基と置き換える置換を包含できる。類似側鎖を有しているアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（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）非極性側鎖を有するアミノ酸（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-分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（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）を包含する。ある例では、本明細書に開示されているペプチド（例えば、配列番号1及び配列番号2～21）の相互作用面内のアミノ酸に関連して、同類アミノ酸置換は、ペプチドの疎水性相互作用面の構造を変えないアミノ酸置換である。例えば、同類アミノ酸置換はペプチドのHDMXとの結合を低下させない（実質的に低下させない）アミノ酸置換である。結合における何れかの減少を検出する方法は、同類アミノ酸置換後の結合親和性を比較することを包含し、ここで結合を低下させる（実質的に低下させる）何れのアミノ酸置換も同類アミノ酸置換ではない。ある実施態様では、実質的に低下した結合は、改変していないペプチドのHDMXとの結合より10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、又は100%低い結合を包含する。ペプチドとHDMXの間の相互作用を評価する方法は本明細書に開示されている。ペプチドの相互作用面を同定する方法は当該技術分野において公知である（例えば、Broglia et al., Protein sci., 14(10):2668-81, 2005; Hammond et al., J. Pharm. Sci., 98(1):4589-603, 2009; Ng and Yang, J. Phys. Chem. B., 111(50):13886-93, 2007; 及びBird et al., PNAS USA, 197:14093, 2010を参照されたい）。

【0038】

ある実施態様では、ペプチドは、p53（例えば、配列番号1）の転写促進ドメインに

対応する配列：X a a₁－X a a₂－X a a₃－X a a₄－X a a₅－P h e₆－X a a₇－X a a₈－X a a₉－T r p₁₀－X a a₁₁－X a a₁₂－L e u₁₃－X a a₁₄－X a a₁₅－X a a₁₆（配列番号 22）（ここで、X a a₁－X a a₅、X a a₇－X a a₉、及び X a a₁₁－X a a₁₆ のそれぞれ又は何れかは何れかのアミノ酸（例えば 20 個の天然アミノ酸の何れか）であるか又は欠失している）の少なくとも 6 個（例えば、7、8、9、10、11、12、13、14、又は 15 個）の連続アミノ酸を包含している（例えば、含有する、から成る、又は本質的にからなる）。

【0039】

ある実施態様では、

X a a₁ は、L e u 若しくは G l n であるか、又は欠失している；

10

X a a₂ は、S e r であるか、又は欠失している；

X a a₃ は、G l n であるか、又は欠失している；

X a a₄ は、G l u、G l n 又は A l a である；

X a a₅ は、T h r 又は A l a である；

P h e₆ は、P h e 又はその同類置換である；

X a a₇ は、S e r である；

X a a₈ は、A s p 若しくは A s n、又は A s p 及び G l u 以外のアミノ酸（好ましくは A s n）である；

X a a₉ は、L e u である；

T r p₁₀ は、T r p 又はその同類置換である；

20

X a a₁₁ は、L y s 又は正荷電したアミノ酸（好ましくは A r g）である；

X a a₁₂ は、L e u、L y s 又は A l a である；

L e u₁₃ は、L e u 又はその同類置換である；

X a a₁₄ は、P r o であるか、又は欠失している；

X a a₁₅ は、G l u、G l n 若しくは A l a、若しくは A s p 及び G l u 以外のアミノ酸（好ましくは G l n）であるか、又は欠失している；

X a a₁₆ は、A s n であるか、又は欠失している。

ここで、一つ又はそれ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は 16 個）の X a a₁－X a a₂－X a a₃－X a a₄－X a a₅－P h e₆－X a a₇－X a a₈－X a a₉－T r p₁₀－X a a₁₁－X a a₁₂－L e u₁₃－X a a₁₄－X a a₁₅－X a a₁₆ はペプチドの相互作用面を変えない同類アミノ酸置換に置き換えられており；及び／又は P h e₆、T r p₁₀、及び／又は L e u₁₃ に対応する残基以外のアミノ酸は配列番号 1 の配列と少なくとも 80 %（例えば、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %、又は 100 %）同一であり；及び／又は P h e₆、T r p₁₀、及び／又は L e u₁₃ に対応する残基以外のアミノ酸は 1 つ又はそれ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、10 未満、5 未満、4 未満、3 未満、又は 2 未満）の同類又は非同類の置換又は欠失を包含している。

30

ここでペプチドは任意に安定した α 螺旋二次構造を有するように適合されている。

【0040】

40

ある場合は、ペプチドは、配列：X a a₃－X a a₄－X a a₅－P h e₆－X a a₇－X a a₈－X a a₉－T r p₁₀－X a a₁₁－X a a₁₂－L e u₁₃（配列番号 23）を有する配列番号 22 の一部分を包含する（例えば、含有する、から成る、又は本質的にからなる）ことができる。

【0041】

ある実施態様では、上で示したように、本明細書のペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 の相互作用面に対応するアミノ酸（例えば、P h e₆、T r p₁₀、及び／又は L e u₁₃）以外のものを、殆ど制限なしに、変えることができる。例えば、相互作用面の外のアミノ酸は、配列番号 2 又は 22～23 内のペプチドの相互作用面の外のアミノ酸と少なくとも又は約 30 %、少なくとも又は約 40 %、少なくとも又は約 50 %、少なくとも

50

又は約 60%、少なくとも又は約 70%、少なくとも又は約 70%、少なくとも又は約 80%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 98%、少なくとも又は約 99%、少なくとも又は約 100%の同一性を有することができる。或いは又は更に、相互作用面の外のアミノ酸は、同類であろうとなかろうと、アミノ酸の置換及び／又は欠失を包含できる。例えば、相互作用面の外のアミノ酸は、1、2、3、4、5、6、7、8の、10未満、5未満、4未満、3未満、又は2未満のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は付加を、同類であろうとなかろうと、包含できる。従って、本明細書に開示されている何れのペプチドのアミノ酸配列も、相互作用面の残基が配列番号2のそれと同一であるか、又はその同類置換である限り、変えることができる。ある例では、ペプチドは、LSQETFSDLWKLLPEN（配列番号2）を包含する（例えば、含有する、から成る、又は本質的にからなる）ことができる。

10

【0042】

ある実施態様では、ペプチドは、Pazgier et al., PNAS, 106;4665-4670 (2009)（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）に開示されている1つ又はそれ以上のペプチドを包含する（例えば、含有する、から成る、又は本質的にからなる）ことができる。例えば、HDMX調節剤は、Pazgier et al., PNAS, 106;4665-4670 (2009)に開示されているペプチドTSFAEYWNLSP（PMIと称する（配列番号24））及びLTFEHYWAQLTS（pDIと称する（配列番号25））を包含できる。

【0043】

ある実施態様では、HDMX調節ペプチドは、1つ又はそれ以上の内部ペプチド架橋剤で架橋（例えば、ステーブル状に架橋又は縫合状に架橋）されている。「ペプチドをステーブル状に架橋する」とは、合成方法（Blackwell et al., J. Org. Chem., 66: 5291-5302, 2001; Angew et al., Chem. Int. Ed. 37:3281, 1994）に由来する造語であり、当該合成方法では、ポリペプチド鎖に存在する2つのオレフィン含有側鎖（例えば、架橋可能な側鎖）を、架橋された環を形成するための閉環メタセシス（RCM）反応を用いて共有結合する（例えば、「オレフィン含有側鎖を合わせてステーブル状に架橋する」）。本明細書で用いられる用語「ペプチドをステーブル状に架橋する」とは、ポリペプチド鎖に存在している、2つの二重結合含有側鎖、2つの三重結合含有側鎖、又は1つの二重結合含有側鎖と1つの三重結合含有側鎖を、このような反応を促進する各種の反応条件及び／又は触媒を用いて、連結して単一の「ステーブル状に架橋された」ペプチドを提供することを包含している。更に、本明細書で用いられる用語「ペプチドを縫合状に架橋する」とは、「縫合状に架橋された」（多数のステーブル状に架橋された）ポリペプチドをもたらず、単一ポリペプチド鎖における多重及び直列に（例えば、1つのアミノ酸が2つのアミノ酸と架橋されている）ステーブル状にペプチドを架橋する事象を示す。ペプチドをステーブル状に架橋することは、国際特許公開第WO200812176号及び同第WO2010/068684号公報に開示されており、両者は参照により本明細書に取り込まれている。

20

30

【0044】

全てが炭化水素の架橋を用いるペプチドのステーブル状の架橋化は、特に生理的に適切な条件下で、その元来の立体配座及び／又は二次構造を保持するのに役立つことが示されている（Schafmiester et al., J. Am. Chem. Soc., 122:5891-5892, 2000; Walensky et al., Science, 305:1466-1470, 2004）。

40

【0045】

全てが炭化水素の架橋によって本明細書のポリペプチドを α 螺旋二次構造を有するようにステーブル状に架橋化することは、ポリペプチドをその元来の α 螺旋構造に拘束することができる。拘束された二次構造は、例えば、ペプチドのタンパク分解開裂に対する耐性を増大し、ペプチドの疎水性を増大でき、ペプチドの標的細胞の膜内への優れた浸透を可能にでき（例えば、細胞飲作用のようなエネルギー依存性輸送メカニズムを介して）、対応する架橋されていない（例えば、「縫合状に架橋されていない（unstitched）」又は「ステーブル状に架橋されていない（unstapled）」）ペプチドと比べてペプチドの生物活

50

性の改善をもたらすことができる。このような拘束はアポトーシス誘発 B I D - B H 3 α 螺旋に適用されて、動物モデルにおいて縫合状に架橋されていないポリペプチドと比較して白血病の悪性腫瘍生育のより高い抑制をもたらした (Walensky et al., Science, 305:1466-1470, 2004; 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 5 0 6 8 9 0 号; 及び同第 2 0 0 6 / 0 0 0 8 8 4 8 号、これらはそれぞれ参照により本明細書に取り込まれている)。適切な架橋 (cross-links; これらは技術分野において繋ぎ止め (tethers) とも呼ばれている) は、本明細書及び米国特許公開第 2 0 0 5 / 0 2 5 0 6 8 0 号、国際特許出願第 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 5 8 5 7 5 号、米国特許出願第 1 2 / 8 6 4 , 3 7 5 号 (W O 2 0 0 9 / 1 0 8 2 6 1)、及び国際特許出願公開第 W O 2 0 1 0 / 1 4 8 3 3 5 号に記載されている。

10

【0046】

本明細書に開示されている架橋されたペプチドは、天然又は非天然のアミノ酸を包含し、(アミノ酸の側鎖が置換されている) 2つのアミノ酸の α 炭素の間に結合 (linkage) を有することができる。本明細書に開示されているペプチドを得る (例えば、合成する) ために、及び精製するために適している方法は当該技術分野において公知であり (例えば、Bird et. al., Methods in Enzymol., 446:369-386 (2008); Walensky et al., Science, 305:1466-1470 (2004); Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc., 122:5891-5892 (2000); 米国特許出願第 1 2 / 5 2 5 , 1 2 3 号 (2 0 1 0 年 3 月 1 8 日出願)、及び米国特許第 7 , 7 2 3 , 4 6 8 号 (2 0 1 0 年 5 月 2 5 日登録) を参照されたい、これらはそれぞれその全てが参照により本明細書に取り込まれている)、そして本明細書に記載されている (例えば、実施例 1 を参照されたい)。

20

【0047】

ある実施態様では、このような架橋された p 5 3 ペプチドは、架橋されていない又はコントロールのペプチド、例えば、同じアミノ酸配列を有している架橋されていないペプチドよりも H D M X に対してより高い親和性を示すことができる。ある実施態様では、架橋された p 5 3 ペプチドは、細胞膜を貫通でき、或いは架橋されていない又はコントロールのペプチド、例えば、同じアミノ酸配列を有している架橋されていないペプチドよりもより高い細胞透過性を有している。ある実施態様では、H D M X 調節剤は、Pazgier et al., PNAS, 106:4665-4670 (2009) に開示されているペプチドの 1 つ又はそれ以上の架橋された型を包含できる。例えば、H D M X 調節剤は、Pazgier et al., PNAS, 106:4665-4670 (2009) に開示されている T S F A E Y W N L L S P (P M I と称する (配列番号 2 4)) 又は L T F E H Y W A Q L T S (p D I と称する (配列番号 2 5)) のステープル状に架橋された又は縫合状に架橋された型を包含できる。ある例では、P M I は、F、W 及び最後の L が無傷のままで又は改変されずに残っている限り (例えば、T S F A E Y W N L L S P (配列番号 2 4) において下線を付けたアミノ酸が無傷のままで又は改変されずに残っている限り) 何れかの 2 つのアミノ酸の間を架橋 (例えば、内部架橋) を用いてステープル状に架橋することができる。ある例では、p D I は、F、W 及び最後の L 又は T が無傷のままで又は改変されずに残っている限り (例えば、L T F E H Y W A Q L T S (配列番号 2 5) 又は L T F E H Y W A Q L T S (配列番号 2 5) において下線を付けたアミノ酸が無傷のままで又は改変されずに残っている限り) 何れかの 2 つのアミノ酸の間を架橋 (例えば、内部架橋) を用いてステープル状に架橋することができる。

30

40

【0048】

配列番号 1 はヒト p 5 3 の配列である。ある例では、架橋されたペプチドは、配列: L e u S e r G l n G l u T h r P h e S e r A s p L e u T r p L y s L e u L e u P r o G l u A s n (配列番号 1 の 1 4 ~ 2 9 番目のアミノ酸 (配列番号 2)) を包含できる。架橋されたペプチドは、P h e S e r A s n L e u T r p A r g L e u L e u P r o G l n A s n (配列番号 2 6) 又は配列: G l n S e r G l n G l n T h r P h e S e r A s n L e u T r p A r g L e u L e u P r o G l n A s n (配列番号 2 7) も包含できる。配列の何れかにおいて、2、3、4 又は 6 アミノ酸分離している 2 つのアミノ酸の側鎖を結合基 (linking group) R₃ で置換

50

できる。

【0049】

ステープル状に架橋されたポリペプチドは以下のアミノ酸配列の全て又は一部（例えば、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個）を包含できる：

Xaa₁ Ser₂ Gln₃ Xaa₄ Thr₅ Phe₆ Xaa₇ Xaa₈ Leu₉ Trp₁₀ Xaa₁₁ Leu₁₂ Leu₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Asn₁₆（配列番号28）、ここで、Xaa₁、Xaa₄、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₁、Xaa₁₄、Xaa₁₅のそれぞれは何れかのアミノ酸（例えば、20個の天然アミノ酸）である。

【0050】

ある状況では：

Xaa₁は、Leu若しくはGln、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₄は、Glu若しくはGln、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₇は、Ser又は結合基R₃であり；

Xaa₈は、Asp若しくはAsp及びGlu以外の何れかのアミノ酸（好ましくはAsn；例えば、Xaa₈はAsp又はAsnであってよい）、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₁₁は、Lys若しくは正に荷電したアミノ酸（好ましくはArg）、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₁₄は、Pro、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₁₅は、Glu若しくはAsp及びGlu以外のアミノ酸（好ましくはGln）又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸である。

【0051】

ある実施態様では、ペプチドは配列番号28を含み、そこで

Xaa₁は、Leu若しくはGln、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₄は、Glu若しくはGln、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₇は、Ser、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₈は、Asp若しくはAsn、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₁₁は、Lys若しくはArg、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₁₄は、Pro、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸であり；

Xaa₁₅は、Glu若しくはGln、又は側鎖が結合基R₃で置換されているアミノ酸である。

【0052】

ステープル状に架橋されたペプチドにおいて、Glnで占められている何れかの位置も代わりにGluであってもよく、Gluで占められている何れかの位置も代わりにGlnであってもよい。同様に、Asnで占められている任意の位置は代わりにAspであってもよく、Aspで占められている何れかの位置も代わりにAsnであってもよい。Asn又はArg及びGln又はGluの選択はステープル状に架橋されたペプチドの所望の電荷によって決まる。

【0053】

ある場合では、ペプチドは、Gln₃ Xaa₄ Thr₅ Phe₆ Xaa₇ Xaa₈ Leu₉ Trp₁₀ Xaa₁₁ Leu₁₂ Leu₁₃（配列番号29）の一部を含んでいる。

【0054】

配列番号29内の、架橋できるアミノ酸の対は、これに限定されないが、5番目と12

10

20

30

40

50

番目のアミノ酸；4番目と11番目のアミノ酸；7番目と11番目のアミノ酸；及び7番目と14番目のアミノ酸を包含する。

【0055】

繋ぎ止め又は架橋は、螺旋の1回転又は2回転（すなわち、約3.4個又は7個のアミノ酸）の長さに渡って伸ばすことができる。従って、 i と $i+3$ ； i と $i+4$ ；又は i と $i+7$ に位置するアミノ酸は化学修飾及び架橋化のための理想的な候補である。従って、例えば、ペプチドが配列： $\cdots X a a_1$ 、 $X a a_2$ 、 $X a a_3$ 、 $X a a_4$ 、 $X a a_5$ 、 $X a a_6$ 、 $X a a_7$ 、 $X a a_8$ 、 $X a a_9 \cdots$ （ここで、「 $\cdots$ 」は追加アミノ酸の任意の存在を示す）を有している場合には、 $X a a_1$ と $X a a_4$ の間（例えば、 $i+3$ ）、又は $X a a_1$ と $X a a_5$ の間（例えば、 $i+4$ ）、又は $X a a_1$ と $X a a_8$ の間（例えば、 $i+7$ ）の架橋は、 $X a a_2$ と $X a a_5$ の間（例えば、 $i+3$ ）、又は $X a a_2$ と $X a a_6$ の間（例えば、 $i+4$ ）、又は $X a a_2$ と $X a a_9$ の間（例えば、 $i+7$ ）の架橋等のように有用である。ポリペプチドは、配列を更に安定化するため、或いはより長いポリペプチドの縫合状の架橋の安定化を促進するためにポリペプチド配列内に1つ以上の架橋を包含できる。ポリペプチドが、1つの部分に容易に合成するには長過ぎる場合は、ネイティブケミカルライゲーション（native chemical ligation）と呼ばれる技術によって独立して合成した架橋されているペプチドを結合することができる（Bang, et al., J. Am. Chem Soc. 126:1377）。

【0056】

或いはまたは更に、架橋されているペプチドは1つ又はそれ以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、3未満、又は2未満の）ステーブル状の架橋及び／又は縫合状の架橋を包含できる。

【0057】

内部架橋（例えば、ステーブル状の架橋及び／又は縫合状の架橋）を、ペプチドの結合又は相互作用の面におけるアミノ酸の構造関連性を保存する（例えば、ペプチドの結合界面を保存する）ためにペプチド内のアミノ酸上に位置づけることができる。例えば、 $i_1 \sim i_{16}$ の1つ又はそれ以上（表1を参照されたい）を少なくとも1個の他のアミノ酸とステーブル状に架橋又は縫合状に架橋させて、疎水性相互作用面においてアミノ酸の構造関連性を保存できる（例えば、Kussie et al., Science, 274(5289):948-953 (1996), and Joseph et al., Cell Cycle, 9(22):4560-4568 (2010)を参照されたい）。このような内部架橋は：1つ又はそれ以上のステーブル状の架橋；1つ又はそれ以上の縫合状の架橋；及び／又は1つ又はそれ以上のステーブル状の架橋の1つ又はそれ以上の縫合状の架橋との組み合わせを包含できる。上記のように、例示的な架橋されたペプチドは、配列番号2～21（図1Cを参照されたい）、及び／又は配列番号9（例えば、SAH-p53-8）に記載の配列を包含する。

【0058】

改変のためのアミノ酸の選択（例えば、内部架橋をサポートするための）はステーブル状の架橋スキニングによっても促進される。用語「ステーブル状の架橋スキニング」は、ステーブル状に架橋されたペプチドのライブラリーの合成を示し、それにより i と $i+3$ ； i と $i+4$ ；又は i と $i+7$ の単一及び複数のステーブル状の架橋又は縫合状の架橋の位置をペプチド配列の長さにそって順次位置づけ、全ての可能な位置をサンプリングして、ステーブル状に架橋された又は縫合状に架橋された構築物に対して望ましい又は最適な特性及び活性を同定する。架橋スキニング方法の例は図に説明されている。

【0059】

ある例では、本明細書の架橋されたペプチドは少なくとも2つの内部架橋された又はステーブル状に架橋されたアミノ酸を包含し、ここでは少なくとも2つのアミノ酸が2個（すなわち、 i 、 $i+3$ 、表1において□と示した）、3個（すなわち、 i 、 $i+4$ 、表1において○と示した）、又は6個（すなわち、 i 、 $i+7$ 、表1において▲として示した）のアミノ酸分離されている。内部架橋（例えば、ステーブル状の架橋をサポートするため

に少なくとも2個のアミノ酸が必要であるが、内部架橋されたアミノ酸の更なる対を、例えば、更なる内部架橋（例えば、ステーブル状の架橋）をサポートするために、ペプチドに包含させることができる。例えば、ペプチドは、1、2、3、4、5又はそれ以上のステーブル状の架橋を包含できる。

【0060】

或いはまたは更に、ペプチドは3つの内部架橋された又は縫合状に架橋されたアミノ酸を包含できる。ペプチドの縫合状の架橋は少なくとも3つの内部架橋されたアミノ酸を包含し、ここで3つのアミノ酸のうちの中央のアミノ酸（本明細書では核又は中心アミノ酸と表わして、表1で「i」と示した）はそれぞれの隣接改変アミノ酸と（ α 炭素の間に）内部架橋を形成する。核アミノ酸は2つの内部架橋されている側鎖を包含し、これは飽和でも不飽和でもよい。核アミノ酸に架橋されているアミノ酸は核アミノ酸から何れかの方向に2、3、又は6アミノ酸（例えば、 i 、 $i-3$ 、 i 、 $i-4$ 、 i 、 $i-7$ （表1で、それぞれ、■、●、及び▼と示す）、 i 、 $i+3$ 、 i 、 $i+4$ 、 i 、 $i+7$ （表1で、それぞれ、□、○、及び▲と示す）、ここで、「i」は核アミノ酸である）分離してもよい。核の両側にあるアミノ酸の数（例えば、核アミノ酸と核に架橋しているアミノ酸の間）は同一であっても異なってもよい。ある例では、縫合状の架橋は3、4、5個、又はそれ以上の内部架橋されているアミノ酸を包含できる。ある例では、ペプチドは1、2、3、4つ、又はそれ以上の縫合状の架橋を含有できる。

10

【0061】

ある実施態様では、本明細書のペプチドは少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、又は5つ）のステーブル状の架橋と少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、又は5つ）の縫合状の架橋との組み合わせを包含できる。

20

【0062】

ある実施態様では、繋ぎ止め、例えば、炭化水素によるステーブル状の架橋は螺旋以外の構造を安定化するために用いられる。このような場合は、繋ぎ止めの端部は i 、 $i+3$ 、 $i+4$ 、及び $i+7$ 以外の間隔で位置付けることができる。

【0063】

上に開示したように、本明細書のペプチドは、一緒になって内部（分子内）架橋を形成する少なくとも2つの改変アミノ酸を包含し、ここで少なくとも2つの改変アミノ酸は2個（すなわち、 i 、 $i+3$ 、表1で□と示す）、3個（すなわち、 i 、 $i+4$ 、表1で○と示す）、又は6個（すなわち、 i 、 $i+7$ 、表1で▲と示す）のアミノ酸分離されている。例えば、ペプチドは表1に説明されている1つ又はそれ以上の位置にある架橋されているアミノ酸を含有できる。

30

【0064】

【表 1】

表 1: 内部架橋可能な又は内部架橋された側鎖を有するアミノ酸の位置 (配列番号 23 内)

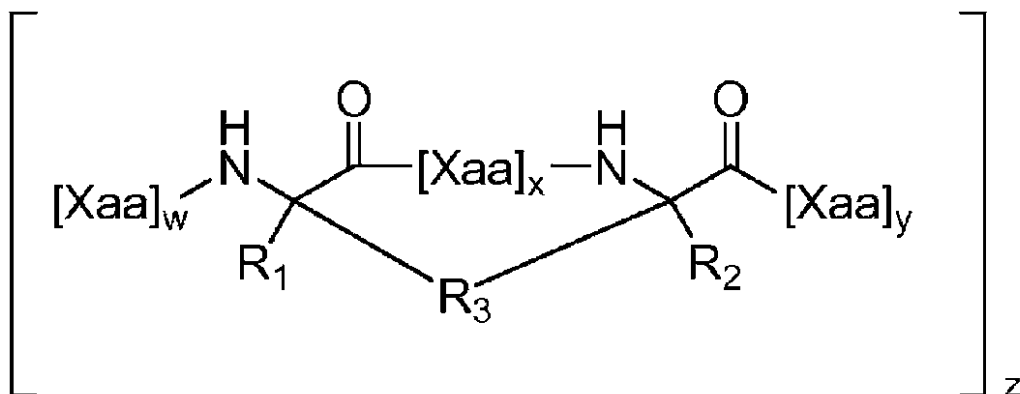
Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Xaa ₅	Phe ₆	Xaa ₇	Xaa ₈	Xaa ₉	Trp ₁₀	Xaa ₁₁	Xaa ₁₂	Leu ₁₃	Xaa ₁₄	Xaa ₁₅	Xaa ₁₆
i ₁			□	○			▲								
	i ₂			□	○			▲							
		i ₃			□	○			▲						
■			i ₄			□	○			▲					
●	■			i ₅	i ₆		□	○			▲				
	●	■				i ₇		□	○			▲			
▼		●	■				i ₈			□	○		▲		
	▼	▼		●	■			i ₉			□	○			▲
			▼		●	■			i ₁₀			□	○		
				▼		●	■			i ₁₁			□	○	
					▼		●	■			i ₁₂			□	○
					▼			●	■			i ₁₃			□
						▼			●	■			i ₁₄		
							▼			●	■			i ₁₅	
								▼			●	■			i ₁₆
									▼			●	■		
											▼		●		
												▼			
													▼		
														▼	

表中 “i” は アンカー ; □ は i+3; ○ は i+4; ▲ は i+7; ■ は i-3; ● は i-4; ▼ は i-7 である。

ある実施態様では、本発明は式（I）の改変ポリペプチド又はその薬学的に許容される塩を特徴とする。

【0066】

【化1】



10

式 (I)

【0067】

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

20

R_3 は、アルキレン、アルケニレン又はアルキニレン、或いは $[R_4' - K - R_4]_n$ であって、それぞれは0～6個の R_5 で置換されている。

R_4 及び R_4' は、独立して、アルキレン、アルケニレン又はアルキニレンである（例えば、それぞれは、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 又は C_{10} アルキレン、アルケニレン又はアルキニレンである）。

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

Kは、O、S、SO、 SO_2 、CO、 CO_2 、 $CONR_6$ 、又は

30

【0068】

【化2】



【0069】

、アジリジン、エプスルフィド、ジオール、又はアミノアルコールである。

40

R_6 は、H、アルキル、又は治療薬である。

nは、2、3、4又は6である。

xは、2～10の整数である。

w及びyは、独立して0～100の整数である。

zは、1～10の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）である。

。それぞれの Xaa は、独立してアミノ酸（例えば、20個の天然アミノ酸、又は何れかの天然又は非天然アミノ酸の1つ）である。

【0070】

ここで、このポリペプチドは、（a）配列番号1又は2の8個の連続アミノ酸内の、2

50

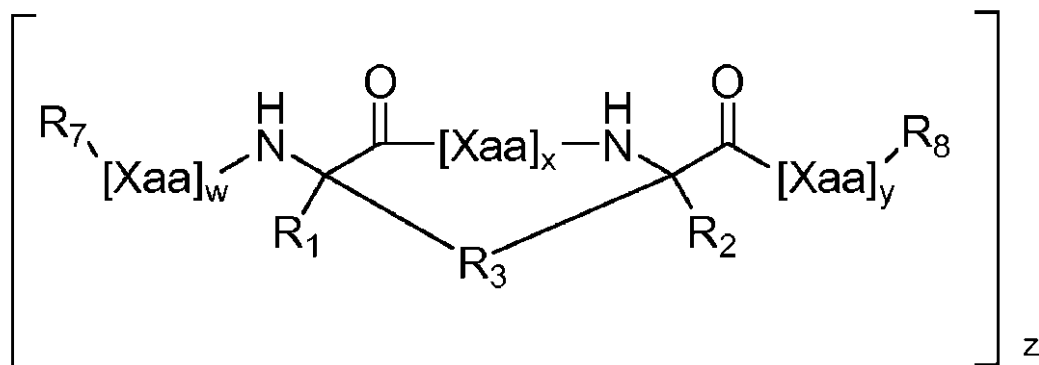
、3又は6個のアミノ酸分離されている少なくとも1対のアミノ酸の側鎖が、式(I)で示されているアミノ酸対の α 炭素と連結する、結合基、 R_3 によって置換されていること；及び(b)アミノ酸の第1対の α 炭素が式Iで示されている R_1 で置換されていて、アミノ酸の第2対の α 炭素が式Iで示されている R_2 で置換されていること以外は、配列番号1(ヒトp53)又はその変異体、配列番号2又はその変異体、又は本明細書に記載されているその他のポリペプチド配列の少なくとも8個の連続アミノ酸を含有している。

【0071】

別の態様では、本発明は式(II)の改変ポリペプチド、又はその薬学的に許容される塩を特徴としている。

【0072】

【化3】



式(II)

【0073】

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

R_3 は、アルキレン、アルケニレン又はアルキニレン、或いは $[R_4' - K - R_4]_n$ であって、それぞれは0～6個の R_5 で置換されている。

R_4 及び R_4' は、独立して、アルキレン、アルケニレン又はアルキニレンである(例えば、それぞれは、独立して、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 又は C_{10} アルキレン、アルケニレン又はアルキニレンである)。

R_5 は、ハロ、アルキル、 OR_6 、 NHR_6 、 $N(R_6)_2$ 、 SR_6 、 SOR_6 、 SO_2R_6 、 CO_2R_6 、 R_6 、蛍光部分、又は放射性同位元素である。

Kは、O、S、SO、 SO_2 、CO、 CO_2 、CONR₆、又は

【0074】

【化4】



【0075】

、アジリジン、エピスルフィド、ジオール、アミノアルコール、又はジアミンである。

R_6 は、H、アルキル、又は治療薬である。

nは、2、3、4、5又は6である。

xは、2～10の整数である。

w及びyは、独立して0～100の整数である。

zは、1～10の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）である。

それぞれのXaaは、独立してアミノ酸（例えば、20個の天然アミノ酸、又は何れかの天然又は非天然アミノ酸の1つ）である。

R₇は、PEG、tatタンパク質、親和性標識、標的部分、脂肪酸由来アシル基、ビオチン部分、蛍光プローブ（例えば、フルオレセイン又はローダミン）結合を介して、例えば、チオカルバメート又はカルバメート結合である。

R₈は、H、OH、NH₂、NHR_{8a}、NR_{8a}R_{8b}である。

【0076】

10

ここで、このポリペプチドは、(a) 配列番号1又は2の8個の連続アミノ酸内の、2、3又は6個のアミノ酸分離されている少なくとも1対のアミノ酸の側鎖が、式(I)で示されているアミノ酸対のα炭素と連結する、結合基、R₃によって置換されていること；及び(b) アミノ酸の第1対のα炭素が式I Iで示されているR₁で置換されていて、アミノ酸の第2対のα炭素が式I Iで示されているR₂で置換されていること以外は、配列番号1（ヒトp53）又はその変異体、配列番号2又はその変異体、又は本明細書に記載されているその他のポリペプチド配列の少なくとも8個の連続アミノ酸を含有している。

【0077】

式I又は式I Iの場合は、以下の実施態様に開示されている。

【0078】

20

x=2（すなわち、i+3連結）の場合は、R₃はC7アルキレン、アルケニレンであってよい。アルケニレンの場合は1つ又はそれ以上の二重結合を有してよい。x=6（すなわち、i+4連結）の場合は、R₃はC1、C12、又はC13アルキレン又はアルケニレンであってよい。アルケニレンの場合は1つ又はそれ以上の二重結合を有してよい。x=3（すなわち、i+4連結）の場合は、R₃はC8アルキレン又はアルケニレンであってよい。アルケニレンの場合は1つ又はそれ以上の二重結合を有してよい。

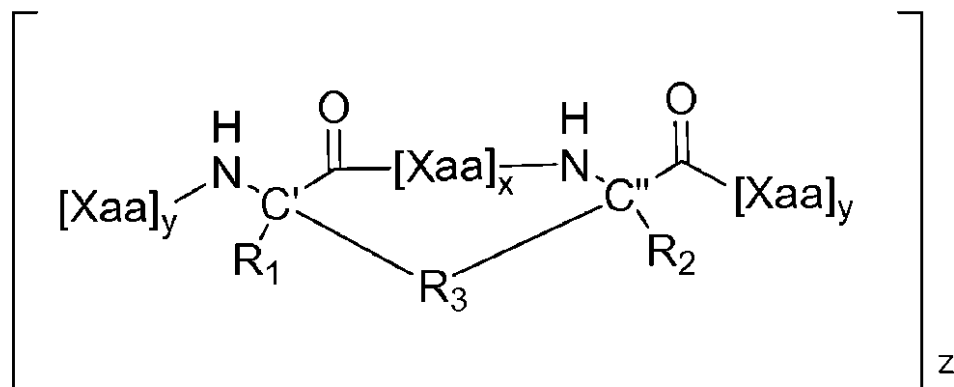
【0079】

ある特定の例では、2つのα、α二置換立体中心（α炭素）は、両方がR配置又はS配置（例えば、i、i+4架橋）にあるか、又は一方の立体中心がR配置で、他方がS配置（例えば、i、i+7架橋）にある。従って、式Iは次のように表わされる：

30

【0080】

【化5】



40

【0081】

ここで、例えば、xが3のときに、C'及びC''二置換立体中心は、両方がR配置にあるか、又は両方がS配置にあってよい。xが6のときは、C'二置換立体中心がR配置にあって、C''二置換立体中心がS配置にあるか、或いはC'二置換立体中心がS配置にあって、C''二置換立体中心がR配置にある。R₃二重結合はE又はZ立体化学配置にあってよい。直前に表わした式のC'及びC''に対応する、式I Iの炭素に対しても、同様な配

50

置が可能である。

【0082】

ある例では、 R_3 は $[R_4 - K - R_4']_n$ であり、そして R_4 及び R_4' は独立して、アルキレン、アルケニレン又はアルキニレンである（例えば、それぞれは独立して、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 又は C_1 のアルキレン、アルケニレン又はアルキニレンである）。

【0083】

ある例では、ポリペプチドは、架橋に置き換えられているアミノ酸側鎖に加えて、配列番号 1 又は 2 の何れかにおいて 1、2、3、4 又は 5 つのアミノ酸変化を有しているアミノ酸配列を包含する。

【0084】

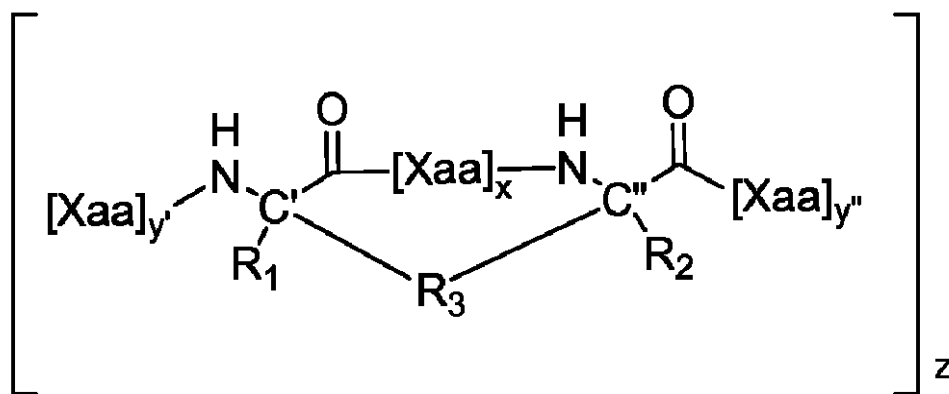
鎖は、アルキル、アルケニル、又はアルキニル部分（例えば、 C_5 、 C_8 又は C_{11} アルキル、 C_5 、 C_8 又は C_{11} アルケニル、又は C_5 、 C_8 又は C_{11} アルキニル）を包含できる。繋ぎ止めされたアミノ酸は（例えば、 $C_1 \sim C_3$ 又はメチルで） α 二置換されていてもよい。 $[Xaa]_y$ 及び $[Xaa]_w$ は、p 53 ポリペプチド（例えば、配列番号 1 又は 2 の何れか）の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25 又はそれ以上の連続アミノ酸（好ましくは、2 又は 5 連続アミノ酸）を独立して含有できるペプチドであって、 $[Xaa]_x$ は p 53 ペプチドのアミノ酸の 3 又は 6 連続アミノ酸を含有できるペプチドである。

【0085】

ペプチドは、p 53 ポリペプチドの、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50 のアミノ酸、或いは 20～50 の何れかの数のアミノ酸、又は列挙された何れか 2 つのアミノ酸数間の範囲のアミノ酸を含有できる。3 個又は 6 個のアミノ酸分離しているアミノ酸の 1 つ又はそれ以上の対が、例えば、 R_3 を介して、架橋を形成するアミノ酸置換に置き換わっていること以外は、アミノ酸は連続している。従って、少なくとも 2 つのアミノ酸は、繋ぎ止めされたアミノ酸又は繋ぎ止めされたアミノ酸置換に置き換ええる。従って、式 I を

【0086】

【化 6】



【0087】

と表わすと、 $[Xaa]_{y'}$ 、 $[Xaa]_x$ 及び $[Xaa]_{y''}$ はそれぞれ、同一又は異なった p 53 ペプチド由来の連続したポリペプチド配列を含有できる。

【0088】

ペプチドは、p 53 ポリペプチド（配列番号 1 又は 2）の 10（11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50 又はそれ以上）連続したアミノ酸を包含でき、ここで 3 個のアミノ酸（又は 6 個のアミノ酸）分離している 2 つのアミノ酸の α 炭素が R_3 を介して結合してい

て、2つの α 炭素のうちの1つが R_1 で置換されていて、他方が R_2 で置換されていて、それぞれがペプチド結合を介して更なるアミノ酸と結合している。

【0089】

ある例では、このポリペプチドはp53分解のドミナントネガティブ阻害剤として作用する。ある例では、このポリペプチドは蛍光部分、若しくは放射性同位元素、又は放射性同位元素をキレート化できる（例えば、Re、In又はYの放射性同位元素にキレート化されたメルカプトアセチルトリグリシン又は1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸(DOTA)）部分も包含する。ある例では、 R_1 及び R_2 がメチルであり； R_3 が、 C_8 アルキル、 C_{11} アルキル、 C_8 アルケニル、 C_{11} アルケニル、 C_8 アルキニル、又は C_{11} アルキニルであり；そしてxが2、3、又は6である。ある例では、このポリペプチドは、PEGリンカー、tatタンパク質、親和性標識、標的部分、脂肪酸由来アシル基、ビオチン部分、蛍光プローブ（例えば、フルオレセイン又はローダミン）、又は金属キレート基を包含する。

10

【0090】

このペプチドは1つ又はそれ以上の不斉中心を含有できるので、ラセミ体及びラセミ混合物、単一エナンチオマー、個々のジアステレオマー及びジアステレオマー混合物、並びに存在する何れかのオレフィンの幾何異性体（例えば、Z又はシス、及びE又はトランス）として生じる。これらの化合物のこのような全ての異性体は明確に本発明に包含される。化合物は複数の互変異性で表わすこともでき、そのような場合、本発明は、本明細書に記載されている化合物の全ての互変異性（例えば、平衡状態にある異性体（例えば、ケト-エノール）、ここでは複数部位におけるアルキル化が位置異性体を生じる可能性がある）、位置異性体、及び本明細書に記載されている化合物の酸化産物（本発明はこのような反応産物の全てを明確に包含する）を明確に包含する。このような化合物のこのような異性体形態の全ては全ての結晶形と同様に包含される。

20

【0091】

ペプチドは、 α 炭素と呼ばれている炭素に結合しているアミノ基とカルボキシル基の両方を含有しているアミノ酸も包含できる。水素及び側鎖も α 炭素に結合している。適切なアミノ酸は、これに限定されないが、ペプチド中に見出せる20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文字略語として知られている）のD及びL異性体の両方を、更に有機合成又はその他の代謝経路で製造された天然及び非天然アミノ酸も包含する。以下の表2は20の通常天然アミノ酸それぞれの側鎖の構造を提供する。この表において、各構造の右側にある「-」は α 炭素への結合である。

30

【0092】

【表 2】

表 2

アミノ酸	一文字 表記	三文字 表記	側鎖の構造
アラニン	A	Ala	CH ₃ -
アルギニン	R	Arg	HN=C(NH ₂)-NH-(CH ₂) ₃ -
アスパラギン	N	Asn	H ₂ N-C(O)-CH ₂ -
アスパラギン酸	D	Asp	HO(O)C-CH ₂ -
システイン	C	Cys	HS-CH ₂ -
グルタミン	Q	Gln	H ₂ N-C(O)-(CH ₂) ₂ -
グルタミン酸	E	Glu	HO(O)C-(CH ₂) ₂ -
グリシン	G	Gly	H-
ヒスチジン	H	His	N=CH-NH-CH=C-CH ₂ -
イソロイシン	I	Ile	CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-
ロイシン	L	Leu	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -
リジン	K	Lys	H ₂ N-(CH ₂) ₄ -
メチオニン	M	Met	CH ₃ -S-(CH ₂) ₂ -
フェニルアラニン	F	Phe	Phenyl-CH ₂ -
プロリン	P	Pro	-N-(CH ₂) ₃ -CH-
セリン	S	Ser	HO-CH ₂ -
スレオニン	T	Thr	CH ₃ -CH(OH)-
トリプトファン	W	Trp	Phenyl-NH-CH=C-CH ₂ -
チロシン	Y	Tyr	4-OH-Phenyl-CH ₂ -
バリン	V	Val	CH ₃ -CH(CH ₃)-

【0093】

「非必須」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型配列から（その活性を無効にすることも実質的に改変することなく）改変できる残基である。「必須」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型配列から改変した場合に、ポリペプチド活性の無効化又は実質的な無効化をもたらす残基である。

【0094】

ある実施態様では、本明細書で用いられる用語「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。通常、「必須」アミノ酸残基はα螺旋の相互作用面に見られる。

【0095】

次の記号は、分子構造の部分として用いられた場合に、単一結合又はトランス若しくはシス二重結合を示す。

【0096】

【化 7】



【0097】

用語「アミノ酸側鎖」は、アミノ酸の α 炭素に結合している部分を示す。例えば、アラニンのアミノ酸側鎖はメチルであり、フェニルアラニンのアミノ酸側鎖はフェニルメチルである、システインのアミノ酸側鎖はメチルチオールであり、アスパラギン酸のアミノ酸側鎖はカルボキシメチルであり、チロシンのアミノ酸側鎖は4-ヒドロキシフェニルメチルである等である。その他の非天然アミノ酸側鎖は、例えば天然のもの（例えば、アミノ酸代謝物）又は合成で作られたもの（例えば、 α 二置換アミノ酸）も包含される。

10

【0098】

用語「ポリペプチド」は、共有結合（例えば、アミド結合）で結合している、2個又はそれ以上の天然の又は合成のアミノ酸を包含する。本明細書に記載されているようなポリペプチドは、全長のタンパク質（例えば、十分に処理されたタンパク質）を、更により短いアミノ酸配列（例えば、天然のタンパク質の断片、又は合成ポリペプチドの断片）も包含する。

【0099】

用語「ハロ」は、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素の何れかの基を示す。用語「アルキル」は指定された数の炭素原子を含有している、直鎖であっても分岐鎖であってもよい炭化水素鎖を示す。例えば、 $C_1 \sim C_{10}$ は、この基が、その中に1～10個の炭素原子を（包括的に）有してもよいことを示している。数の指定がないとき、「アルキル」は、1～20個の炭素原子を（包括的に）その中に有している鎖（直鎖又は分岐鎖）である。用語「アルキレン」は2価のアルキル（すなわち、 $-R-$ ）を示す。

20

【0100】

用語「アルケニル」は、Z又はEの幾何学的配置において1つ又はそれ以上の炭素-炭素二重結合を有する、直鎖であっても分岐鎖であってもよい炭化水素鎖を示す。アルケニル部分は指定された数の炭素原子を含有している。例えば、 $C_2 \sim C_{10}$ は、この基が、その中に2～10個の炭素原子を（包括的に）有してもよいことを示している。用語「低級アルケニル」は、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル鎖を示す。数の指定がないとき、「アルケニル」は、2～20個の炭素原子を（包括的に）その中に有している鎖（直鎖又は分岐鎖）である。

30

【0101】

用語「アルキニル」は、1つ又はそれ以上の炭素-炭素三重結合を有している直鎖であっても分岐鎖であってもよい炭化水素鎖を示す。アルキニル部分は指定された数の炭素原子を含有している。例えば、 $C_2 \sim C_{10}$ は、この基が、その中に2～10個の炭素原子を（包括的に）有してもよいことを示している。用語「低級アルキニル」は、 $C_2 \sim C_8$ アルキニル鎖を示す。数の指定がないとき、「アルキニル」は、2～20個の炭素原子を（包括的に）その中に有している鎖（直鎖又は分岐鎖）である。

40

【0102】

用語「アリール」は炭素6個の単環式又は炭素10個の二環式芳香族環系であり、そこでは各環の0、1、2、3、4、又は5の原子は置換基で置換されていてもよい。アリール基の例は、フェニル、ナフチル等を包含する。用語「アリールアルキル」又は「アラルキル」は、アリールで置換されているアルキルを示す。用語「アリールアルコキシ」は、アリールで置換されているアルコキシを示す。

【0103】

本明細書で用いられている「シクロアルキル」は、3～12個の炭素、好ましくは3～8個の炭素、そしてより好ましくは3～6個の炭素を有している飽和又は部分的に不飽和

50

の環式炭化水素基を包含し、ここで、シクロアルキル基は更に任意に置換されていてもよい。好ましいシクロアルキル基は、これに限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロヘプタジエニル、シクロヘプタトリエニル、シクロオクチル、シクロオクテニル、シクロオクタジエニル、シクロオクタトリエニル、及びシクロオクチニルを包含する。

【0104】

用語「ヘテロアリアル」は、芳香族の5～8員の単環式、8～12員の二環式、又は11～14員の三環式の環系であって、単環式の場合は1～3個のヘテロ原子を、二環式の場合は1～6個のヘテロ原子を、又は三環式の場合は1～9個のヘテロ原子を有しており、当該ヘテロ原子はO、N、又はSから選ばれる（例えば、単環式、二環式、又は三環式のそれぞれの場合に、炭素原子と1～3個、1～6個又は1～9個のN、O、又はSヘテロ原子）。ここで、各環の0、1、2、3、又は4個の原子は置換基で置換されていてもよい。ヘテロアリアル基の例は、ピロリル、ピリジル、フリル又はフラニル、イミダゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリダジル、ピリミジル、チオフェニル、キノリニル、インドリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル等を包含する。用語「ヘテロアリアルアルキル」又は用語「ヘテロアラルキル」は、ヘテロアリアルで置換されたアルキルを示す。用語「ヘテロアリアルアルコキシ」はヘテロアリアルで置換されたアルコキシを示す。

10

【0105】

用語「ヘテロシクリル」は、非芳香族の5～8員の単環式、8～12員の二環式、又は11～14員の三環式の環系であって、単環式の場合は1～3個のヘテロ原子を、二環式の場合は1～6個のヘテロ原子を、又は三環式の場合は1～9個のヘテロ原子を有しており、当該ヘテロ原子はO、N、又はSから選ばれる（例えば、単環式、二環式、又は三環式のそれぞれの場合に、炭素原子と1～3個、1～6個又は1～9個のN、O、又はSヘテロ原子）。ここで、各環の0、1、2、3、又は4個の原子は置換基で置換されていてもよい。ヘテロシクリル基の例は、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル、アジリジニル、オキシリル、チイリル (thiiryl)、モルホリニル、テトラヒドロフラニル等を包含する。

20

【0106】

用語「置換基」は、アルキル、シクロアルキル、アリアル、ヘテロシクリル、又はヘテロアリアル基上でその基の何れかの原子と置き換えられている基を示す。適切な置換基は、これに限定されないが、ハロ、ヒドロキシ、メルカプト、オキソ、ニトロ、ハロアルキル、アルキル、アルカリル、アリアル、アラルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、アリアルオキシ、アミノ、アルコキシカルボニル、アミド、カルボキシ、アルカンシルホニル、アルキルカルボニル、アジド、及びシアノ基を包含する。

30

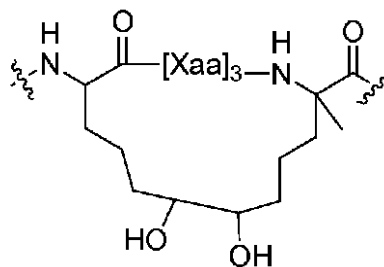
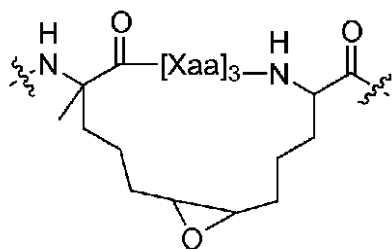
【0107】

ある例では、本明細書に記載されている炭化水素鎖（すなわち、架橋）を更に操作できる。一例では、炭化水素アルケニル鎖の二重結合（例えば、ルテニウム触媒による閉環メタセシス (RCM) を用いて合成したような）を酸化して（例えば、エポキシ化又はジヒドロキシル化によって）以下の化合物の1つを提供することができる。

40

【0108】

【化 8】



【0109】

10

エポキシド部分又は遊離のヒドロキシル部分の何れかを更に官能基化できる。例えば、エポキシドを求核試薬で処理することができて、これは例えば、タグ（例えば、放射性同位元素又は蛍光タグ）を取り付けるために、用いることができる更なる機能性をもたらす。タグは化合物を体内の所望の位置へ向かわせるために、又は体内の化合物の位置を追跡するために活用できる。或いは、更なる治療薬（例えば、ラパマイシン、ビンブラスチン、タキソール等のような抗癌剤）を官能基化した鎖に化学的に付加することができる。あるいはこのような誘導体化はポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端の、又はアミノ酸側鎖を介して、合成操作によって達成できる。他の薬剤、例えば、ポリペプチドの細胞内への侵入を促進する薬剤を官能基化した鎖に付加することができる。

【0110】

20

炭化水素鎖を記載してきたが、その他の鎖も想定される。例えば、鎖は1つ又はそれ以上のエーテル、チオエーテル、エステル、アミン、又はアミド部分を包含できる。ある場合は、天然アミノ酸の側鎖を鎖の中に組み込むことができる。例えば、鎖を、セリンのヒドロキシル、システインのチオール、リジンの一級アミン、アスパラギン酸又はグルタミン酸の酸、又はアスパラギン又はグルタミンのアミドのような官能基と結合させることができる。従って、2つの非天然アミノ酸を結合して作る鎖を用いるのではなくて、天然アミノ酸を用いて鎖を作ることが可能である。1つの非天然アミノ酸と天然アミノ酸を用いることも可能である。

【0111】

鎖の長さを変えることが更に想定される。例えば、 α 螺旋二次構造に、より高度の拘束をもたらすことが望ましい場合に、より短い鎖を用いることができ、一方、ある場合には、 α 螺旋二次構造に対してより小さい拘束が望ましいので、より長い鎖が望まれる。

【0112】

また、主に α 螺旋の単一面上にある鎖を提供するために、アミノ酸 i から $i+3$ 、 i から $i+4$ 、及び i から $i+7$ にまたがる鎖の例を記載してきたが、アミノ酸の数の任意の組合わせにまたがるように鎖を合成することができる。

【0113】

報告されているように、(Stewart et al, Nature Chem. Biol., 2010; Joseph et al, Cell Cycle, 2010 (上述)、ステーブル状の架橋自体が標的タンパク質結合部位の表面での結合相互作用に寄与して、標的親和性は保持しながら、親和性を増大するために用い

40

【0114】

ある例では、 α 二置換アミノ酸がポリペプチド中で α 螺旋二次構造の安定性を改善するために用いられる。しかしながら、 α 二置換アミノ酸を必要とせずに、モノ α 置換を用いる例（例えば、繋ぎ止めされたアミノ酸中で）も想定される。

【0115】

ある例では、p 53の（例えば、配列番号1の）相互作用面のPhe₆、Trp₁₀、Leu₁₃の1つ又はそれ以上（例えば、3つ全部）を、別のアミノ酸、例えば、Alaで置き換えて、ステーブル状に架橋された不活性なペプチドを作成することは有用であろう。このようなステーブル状に架橋された不活性なペプチドは、例えば、負のコントロー

50

ルとして有用である。

【0116】

ステーブル状に架橋されたポリペプチドは薬剤、毒素、ポリエチレングリコールの誘導体、第2ポリペプチド、炭水化物等を包含できる。ポリマー又はその他の物質がステーブル状に架橋されたポリペプチドに結合していることは実質的に均質である組成物にとって望ましい。

【0117】

ポリエチレングリコール (PEG) 分子の付加はポリペプチドの薬物動態及び薬力学的特性を改善できる。例えば、PEG化は腎クリアランスを低下させることができ、そしてより安定な血漿濃度をもたらすことができる。PEGは水溶性ポリマーであって、式：

$$\text{XO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Y}$$
 (式中の、 n は2~10, 000であり、 X はH又は末端修飾、例えば、 $C_1 \sim 4$ アルキルであり、そして Y はポリペプチドのアミン基へのアミド、カルバメート、又は尿素の結合 (これに限定されないが、リジンのイプシロンアミン、又はN-末端を包含している) である) のようにポリペプチドに結合するように表わすことができる。 Y は、チオール基 (これに限定されないが、システインのチオール基を包含する) へのマレイミド結合であってもよい。PEGをポリペプチドに直接又は間接的に結合する別の方法は当業者に公知である。PEGは線状でも分岐状でもよい。各種の官能基化した誘導体を含むPEGの各種形態が市販されている。

【0118】

主鎖に分解可能な結合を有しているPEGを用いることができる。例えば、PEGは、加水分解されるエステル結合を用いて製造できる。分解可能なPEG結合を有している複合体は、国際特許出願公開第WO99/34833号、同第WO99/14259号、及び米国特許第6,348,558号に記載されている。

【0119】

ある実施態様では、高分子ポリマー (例えば、PEG) を、仲介リンカーを介して本明細書に記載されている物質に付加する。ある実施態様では、リンカーはペプチド結合で結合している1~20個のアミノ酸から作られ、ここでアミノ酸は20個の天然アミノ酸から選ばれる。これらのアミノ酸の幾つかは、当業者によく理解されているように、グリコシル化されてもよい。別の実施態様では、1~20のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、及びリジンから選ばれる。別の実施態様では、リンカーはグリシン及びアラニンのような、立体障害を受けないアミノ酸から大部分が作られる。非ペプチドリリンカーも可能である。例えば、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})-$ (式中の n は2~20である) のようなアルキルリンカーを用いることができる。これらのアルキルリンカーは更に、低級アルキル ($C_1 \sim C_6$)、低級アシル、ハロゲン (例えば、Cl、Br)、CN、 NH_2 、フェニル等のような、立体障害のない基で置換されていてもよい。米国特許第5,446,090号には、二官能性PEGリンカー及びPEGリンカーのそれぞれの末端にペプチドを有している複合体の形成でのその使用が記載されている。

【0120】

別の実施態様において、ステーブル状に架橋されたペプチドを、例えば、細胞取り込みを促進するために又はインビボ安定性を増大するために改変することができる。例えば、ペプチド模倣体大環状分子をアシル化又はPEG化することは細胞の取り込みを促進し、生物学的利用能を増大し、血液循環を増大し、薬物動態を変え、免疫原性を減少し、及び/又は必要とする投与頻度を減少する。

【0121】

ある実施態様では、本明細書に開示されているステーブル状に架橋されたペプチドは (例えば、ステーブル状に架橋されていないペプチドと比較して) 増強された細胞膜貫通能力を有している。これらの同じペプチドは、ヒト血清タンパク質に対して1マイクロモル又はそれ以下の見掛け上の親和性も有しているか、或いは有するように改変できる。別の実施態様では、改良された架橋されているポリペプチドはヒト血清タンパク質に対して3

マイクロモル又はそれ以下の見掛け上の親和性を有している。別の実施態様では、改良された架橋されているポリペプチドはヒト血清タンパク質に対して10マイクロモル又はそれ以下の見掛け上の親和性を有している。別の実施態様では、改良された架橋ポリペプチドはヒト血清タンパク質に対して70マイクロモル又はそれ以下の見掛け上の親和性を有している。別の実施態様では、改良された架橋ポリペプチドはヒト血清タンパク質に対して1～700マイクロモルの見掛け上の親和性を有している。ある実施態様では、改良された架橋ポリペプチドは、全血において0.1～50%の推定遊離画分を有している。別の実施態様では、改良された架橋ポリペプチドは、全血において0.5～10%の推定遊離画分を有している。例えば、架橋されているポリペプチドの見掛け上の血清結合親和性 (K_d^*) が、1、3、10、70マイクロモル又はそれ以上になるように、ポリペプチドを選択することができる。別の実施態様では、架橋されているポリペプチドは、それがヒト血液において0.1～50%、又は0.15～10%の推定遊離画分を有するように選択される。何れかの特定のペプチドが血清タンパク質と結合する傾向を定量する方法は当該技術分野において公知である（例えば、米国特許出願公開第2010/021688号（2010年8月26日公開）を参照されたい）。

10

【0122】

ある実施態様では、改良された架橋されているポリペプチドは、全血において0.1～50%の推定遊離画分を有している。別の実施態様では、改良された架橋ポリペプチドは、全血において0.5～10%の推定遊離画分を有している。

20

【0123】

ある実施態様では、HDMX調節剤は、米国特許出願公開第2010/0168388号（2010年7月1日公開）、同第2010/0216688号（2010年8月26日公開）、同第2010/0184628号（2010年7月22日公開）、同第2009/0047711号（2009年2月19日公開）、同第2009/0088533号（2009年4月2日公開）、同第2009/0326192号（2009年12月31日公開）、同第2009/0275519号（2009年11月5日公開）、同第2008/0262200号（2008年10月23日公開）、同第2010/022549号（2010年1月28日公開）、同第2010/0113466号（2010年5月6日公開）、同第2009/0069334号（2009年3月12日公開）（これらはそれぞれその全てが参照により本明細書に取り込まれている）の何れかの1つ又はそれ以上に開示されているステーブル状に架橋されたペプチドであってよく、又はステーブル状に架橋されたペプチドの改変体を包含できる。

30

【0124】

ある実施態様では、HDMX調節剤はステーブル状に架橋されたペプチドであってよく、又はステーブル状に架橋されたペプチド、例えば、アミノ及び／又はカルボキシ末端の改変体を包含できる。ある実施態様では、アミノ及び／又はカルボキシ末端の改変体は、これに限定されないが、例えば、N-末端ビオチン、N-末端Ac、N-末端Ac-ba1a、N-末端PEG、C-末端アミド、及び／又はC末端COOHを包含するアミノ及び／又はカルボキシ末端誘導体を包含できる。

40

【0125】

ある実施態様では、上記のように、HDMX調節剤はHDM2（例えば、GenBank（登録商標）Accession番号228952；GI228952）及び／又はHDM4（HDMXとも称する；GenBank（登録商標）Accession番号88702791；GI88702791）とも結合できる。このような場合は、HDMX調節剤のHDMXに対する親和性は、HDMX調節剤のHDM2又はHDM4に対する親和性より高くなる（例えば、実質的により高い、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、75、100、250、500、1000、又は2000倍高く、或いは2000倍以上高い）

50

。

【0126】

ある実施態様では、HDMX調節剤はHDM2及びHDMXの両方と結合できるが、HDMXの活性のみを阻害する（例えば、実質的に阻害する）。

【0127】

上記のように、本明細書に開示されている化合物の合成方法は当該技術分野において公知である。それでも、下記の例示的な方法を用いることができる。当然のことながら、所望の化合物を得るために順序又は順番を変えて各種工程を実施することができる。本明細書に記載されている化合物の合成に有用な、合成化学変換及び保護基方法（保護及び脱保護）は当該技術分野で公知であって、例えば、R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3d. Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); 及び L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)、並びにこれらの続刊に記載されているようなものを包含する。

10

【0128】

本発明のペプチドは、当業者に周知の化学合成法によって製造できる。例えば、Fields et al., Chapter 3 in Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, p. 77 を参照されたい。従って、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer モデル 430A 又は 431 上で、側鎖保護アミノ酸を用いる t-Boc 又は Fmoc 化学のいずれかにより保護された α -NH₂ を用いる固相合成の自動化したメリフィールド技術を用いてペプチドを合成できる。

20

【0129】

本明細書に記載されているペプチドを作成する 1 つの方法は固相ペプチド合成 (SPPS) を用いることである。C-末端アミノ酸は、リンカー分子によって酸不安定結合を介して架橋されているポリスチレン樹脂と結合している。この樹脂は合成に用いられる溶媒に不溶性であって、過剰な試薬及び副産物を比較的単純に且つ速く洗い流すようにする。N-末端は、酸に安定で塩基によって除去可能な、Fmoc 基で保護される。側鎖官能基の何れかを塩基に安定で酸に不安定な基で保護する。

30

【0130】

より長いペプチドは、ネイティブケミカルライゲーションを用いて個々の合成ペプチドを結合することによって作成できる。あるいは、より長い合成ペプチドを周知の組み換え DNA 技術によって合成できる。このような技術は、詳細なプロトコルを有する周知の標準マニュアルに提供されている。本発明のペプチドをコードする遺伝子を構築するために、好ましくは遺伝子が発現される生物に最適なコドンを用いて、アミノ酸配列を逆転写してアミノ酸配列をコードする核酸配列を得る。次に、典型的には、ペプチド及び所望により調節要素をコードするオリゴヌクレオチドを合成して、合成遺伝子を作成する。合成遺伝子を適切なクローニングベクターに挿入して宿主細胞にトランスフェクトする。次いで、選択された発現系及び宿主に適している適切な条件下でペプチドを発現する。ペプチドを精製して標準的な方法で特徴づける。

40

【0131】

ペプチドは、ハイスループットな、組合せ方法で、例えば、Advanced Chemtech から入手可能な、ハイスループットマルチチャンネル組合せシンセサイザーを用いて、作成できる。

【0132】

改変ポリペプチドにおいて、1 つ又はそれ以上の従来のペプチド結合は、体内でペプチドの安定性を増大できる異なる結合で置き換えた。ペプチド結合は：レトロインベルソ (retro-inverso) 結合 (C(O)-NH) ; 還元アミド結合 (NH-CH₂) ; チオメチレン結合 (S-CH₂ 又は CH₂-S) ; オキシメチレン結合 (O-CH₂ 又は CH₂-

50

O) ; エチレン結合 ($\text{CH}_2 - \text{CH}_2$) ; チオアミド結合 ($\text{C}(\text{S}) - \text{NH}$) ; トランス-オレフィン結合 ($\text{CH} = \text{CH}$) ; フッ素置換トランス-オレフィン結合 ($\text{CH} = \text{CH}$) ; ケトメチレン結合 ($\text{C}(\text{O}) - \text{CHR}$ 又は $\text{CHR} - \text{C}(\text{O})$ 、ここで R は H 又は CH_3 である) ; 及びフルオロケトメチレン結合 ($\text{C}(\text{O}) - \text{CFR}$ 又は $\text{CFR} - \text{C}(\text{O})$ 、ここで R は H 又は F 又は CH_3 である) で置換できる。

【0133】

ポリペプチドは更に、アセチル化、アミド化、ビオチニル化、シンナモイル化、ファルネシル化、フルオレセイン化、ホルミル化、ミリストイル化、パルミトイル化、リン酸化 (Ser、Tyr 又は Thr)、ステアロイル化、スクシニル化及びスルフル化によって改変できる。本発明のポリペプチドは、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) ; アルキル基 (例えば、C1 ~ C20 の直鎖又は分岐鎖アルキル基) ; 脂肪酸基 ; 及びこれらの組み合わせと共役することもできる。

【0134】

多種の長さのオレフィン側鎖を含有している α , α 二置換非天然アミノ酸を公知の方法 (Williams et al. J. Am. Chem. Soc., 113:9276, 1991; Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc., 122:5891, 2000; 及び Bird et al., Methods Enzymol., 446:369, 2008) で合成できる。i + 7 ステープル状の架橋に結合している i が用いられるペプチドでは (螺旋の 2 回転が安定化されている)、1 個の S5 アミノ酸及び 1 個の S8 アミノ酸が用いられるか、又は 1 個の S8 アミノ酸及び 1 個の S5 アミノ酸が用いられる。R8 は、開始キラル補助基が R-アルキル立体異性体をもたらす以外は、同様な経路を用いて合成される。また、8-ヨードオクテンが 5-ヨードペンテンの代わりに用いられる。阻害剤は、MBHA 樹脂上で固相ペプチド合成 (SPPS) を用いて固体支持体上で合成される。

【0135】

(オレフィンアミノ酸 Fmoc-S₅-OH、Fmoc-R₈-OH、Fmoc-R₈-OH、Fmoc-S₈-O 及び Fmoc-R₅-OH 以外の) Fmoc-保護 α アミノ酸、2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート (HCTU)、及び Rink Amid MBHA は、例えば、Novabiochem (San Diego, CA) から市販されている。ジメチルホルムアミド (DMF)、N-メチル-2-ピロリドン (NMP)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、トリフルオロ酢酸 (TFA)、1, 2-ジクロロエタン (DCE)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、及びピペリジンは、例えば、Sigma-Aldrich から市販されている。オレフィンアミノ酸合成は当該技術分野において報告されている (Williams et al., Org. Synth., 80:31, 2003)。

【0136】

ある実施態様では、ステープル状に架橋されたペプチドは以下の方法を用いて作成できる。ペプチドは、0.4 ~ 0.6 ミリモル/g 樹脂の濃度を負荷して、Rink アミド MBHA 樹脂上で、Fmoc 固相ペプチド化学を用いて手作業で合成できる。以下のプロトコルを用いた。

1. Fmoc 保護基を、NMP 中の 20% ピペリジンで 30 分間かけて除去した。
2. 樹脂を NMP で 5 回洗浄した。
3. その後の Fmoc-保護アミノ酸を Fmoc-AA (10 当量、架橋剤に対して 4 当量)、HCTU (9.9 当量、架橋剤に対して 3.9 当量)、及び DIEA (20 当量、架橋剤に対して 7.8 当量) を用いて 30 分間 (架橋剤に対して 60 分間) カップリングした。
4. 樹脂を NMP で 5 回洗浄した。
5. 工程 1 から繰り返す。

【0137】

全てのペプチドの N-末端を β アラニン残基で保護した。CD 実験は N-末端がアセチル化されているペプチドを活用する。アセチル化反応は上に概説した Fmoc 基の脱保護からなり、その後無水酢酸及び DIEA を用いて反応した。示したその他の実験は、N-

末端を蛍光標識化したペプチドを活用する。この目的を達成するために、脱保護したN-末端を有するペプチドを、DIEAの存在下に1晩、DMF中でフルオレセインイソチアネートに曝露した。

【0138】

閉環メタセシス反応は、使い捨てフリット反応器中の固体支持体上にあるままで、N-末端保護ペプチド上で実施できる。樹脂を、1, 2-ジクロロエタン又はジクロロメタン中のビス(トリシクロヘキシルホスフィン)ベンジリジニルテニウム(IV)ジクロライド(グルブスの第1世代触媒)の10 mM溶液に2時間曝露した。触媒付加及び2時間のメタセシス反応を1度繰り返した。樹脂に結合したペプチドをCH₂Cl₂で3回洗浄して窒素気流下で乾燥した。

10

【0139】

ペプチドは、試薬K(82.5%のTFA、5%のチオアニソール、5%のフェノール、5%の水、2.5%のエタンジチオール)又は95%のTEA、2.5%の水、2.5%のトリイソプロピルシランに曝露して樹脂から解離し、脱保護して、4℃でメチルtert-ブチルエーテルで沈殿させて凍結乾燥することができる。ペプチドは、例えば、HPLCを用いて、任意に凍結乾燥して、精製できる。

【0140】

ある実施態様では、ペプチドはステーブル状に架橋されていないペプチド混入物を実質的に含まないか、又は単離されている。ペプチドを精製する方法は、例えば、固相支持体上でペプチドを合成することを含んでいる。環化に続いて、固相支持体を単離して、DMSO、DMSO/ジクロロメタン混合液、又はDMSO/NMP混合液のような溶媒溶液中に懸濁する。DMSO/ジクロロメタン、又はDMSO/NMP混合物は約30%、40%、50%、又は60%のDMSOを含有できる。特定の実施態様では、50%/50%のDMSO/NMP溶液が用いられる。溶液を1、6、12又は24時間インキュベートして、続いて、樹脂を例えばジクロロメタン又はNMPで洗浄する。ある実施態様では、樹脂はNMPで洗浄する。溶液中での不活性ガスの攪拌及び泡立ても実施できる。

20

【0141】

本発明の架橋されたポリペプチドの特性を、例えば、以下に記載した方法を用いてアッセイすることができる。

【0142】

(α螺旋性を確認するアッセイ)

(例えば、50 mMのリン酸カリウム溶液(pH 7)、又は蒸留したH₂Oに、濃度が25~50 μMになるように)化合物を水溶液に溶解する。標準的な測定パラメーター(例えば、温度、20℃;波長、190~260 nm;ステップ分解能、0.5 nm;速度20 nm/秒;蓄積、10;応答、1秒;バンド幅、1 nm;路長、0.1 cm)を用いて分光偏光計(例えば、Jasco J-710)上で円偏光二色性(CD)スペクトルを得た。各ペプチドのα螺旋含量は、平均残渣楕円率を、モデル螺旋デカペプチドについて報告されている値(Yang et al., Methods Enzymol. 130:208 (1986))で割って算出した。

30

【0143】

(融点(T_m)を確認するアッセイ)

ペプチド模倣体大環状分子又は改変していないペプチドを蒸留したH₂Oに(例えば、50 μMの最終濃度に)溶解して、標準的なパラメータ(例えば、波長、222 nm;ステップ分解能、0.5 nm;速度、20 nm/秒;蓄積、10;応答、1秒;バンド幅、1 nm;温度上昇速度、1℃/分;路長、0.1 cm)を用いて分光偏光計(例えば、Jasco J-710)上で温度範囲(例えば、4~95℃)に渡る楕円率の変化を測定してT_mを決定した。

40

【0144】

(プロテアーゼ耐性アッセイ)

ペプチド骨格のアミド結合はプロテアーゼによる加水分解に敏感であるので、ペプチド化合物がインビボで迅速な分解を受けやすくする。しかしながら、ペプチド螺旋形成は典

50

型的にアミド骨格を隠し、それによって、これをタンパク質分解から防御できる。本発明のペプチド模倣体大環状分子は、対応する架橋されていないポリペプチドと比較した分解速度の変化を評価するために、インビトロのトリプシンタンパク質分解に付することができる。例えば、ペプチド模倣体大環状分子及び対応する架橋されていないポリペプチドをトリプシンアガロースとインキュベートして、遠心分離によって多様な時点で反応を止めて、次いでHPLC注入して、280nmにおける紫外線吸収によって残存基質を定量する。すなわち、ペプチド模倣体大環状分子及びペプチド模倣体前駆体(5mcg)をトリプシンアガロース(Pierce)(S/E. 約125)と0、10、20、90、及び180分間インキュベートする。反応を高速の卓上遠心分離器で止めて；単離した上澄液中の残存基質を280nmでHPLCベースのピーク検出によって定量する。一次速度則及び速度定数kを示すタンパク質分解反応を、 $\ln[S]$ 対時間のプロットから確認した。

10

【0145】

(エクスピボ安定性のアッセイ)

ペプチド模倣体大環状分子及び／又は対応する架橋されていないポリペプチドをそれぞれ、新鮮なマウス、ラット及び／又はヒトの血清(例えば、1~2mL)と37℃で、例えば、0、1、2、4、8、及び24時間インキュベートできる。異なった濃度の模倣体大環状分子の試料を血清と連続希釈して調製することができる。無傷化合物のレベルを確認するために、以下の手順を用いることができる。100μLの血清を2mLの遠心分離管に移した後、10μLの50%ギ酸及び500μLのアセトニトリルを加えて、4±2℃で10分間、14,000RPMで遠心分離する。次いで、上澄液を新鮮な管に移して、 N_2 < 10psi、37℃で、Turbovap上で濃縮する。試料を100μLの50:50アセトニトリル:水にもどして、LC-MS/MS分析に付す。エクスピボ安定性を試験する同じ又は類似の手法は公知であって、血清中の模倣体大環状分子の安定性を確認するために用いることができる。

20

【0146】

(インビトロ結合アッセイ)

ペプチド模倣体大環状分子及びペプチド模倣体前駆体の受容体タンパク質に対する結合及び親和性を評価するために、例えば、蛍光偏光アッセイ(FPA)を用いることができる。FPA技術は、偏光及び蛍光トレーサーを用いて、分子配向及び分子移動性を測定する。偏光で励起すると、高い見掛け分子量を有する分子に結合したFITCのような蛍光トレーサー(例えば、巨大タンパク質に結合したFITC標識化ペプチド)は、小分子に結合した蛍光トレーサー(例えば、溶液中で遊離しているFITC標識化ペプチド)と比較して、その低い速度の回転に起因して高レベルの偏光蛍光を発生させる。

30

【0147】

(ペプチド-タンパク質相互作用の拮抗剤を特徴づけるインビトロ置換アッセイ)

ペプチドと受容体タンパク質の間の相互作用に拮抗する化合物の結合及び親和性を評価するために、例えば、ペプチド模倣体前駆体の配列に由来する蛍光標識化ペプチド模倣体大環状分子を利用する蛍光偏光アッセイ(FPA)を用いる。FPA技術は、偏光及び蛍光トレーサーを用いて、分子配向及び分子移動性を測定する。偏光で励起すると、高い見掛け分子量を有する分子に結合したFITCのような蛍光トレーサー(例えば、巨大タンパク質に結合したFITC標識化ペプチド)は、小分子に結合した蛍光トレーサー(例えば、溶液中で遊離しているFITC標識化ペプチド)と比較して、その低い速度の回転に起因して高レベルの偏光蛍光を発生させる。蛍光標識化ペプチド模倣体大環状分子と受容体タンパク質の間の相互作用に拮抗する化合物は競合結合FPA実験で検出されるだろう。

40

【0148】

(無傷細胞における結合アッセイ)

ペプチド又は架橋されているポリペプチドの、無傷細胞におけるそれらの天然の受容体との結合を、例えば、本明細書に記載されているような、免疫沈降実験で測定することができる。

50

【0149】

(P-LISA及び免疫蛍光法)

無傷細胞におけるp53/HDMXの細胞内複合体を妨害するSAH-p53-8の能力を評価するために、P-LISAアッセイを適用した。ドキシサイクリン誘発性HA-HDMX構築物を発現するU2OS細胞(Wang et al., 2007)をカバースリップ上に播種してドキシサイクリンで24時間処置した。SAH-p53-8 (10 μ M)、エナンチオマーのNutlin-3 (10 μ M) (Roche)、又は両方の化合物を処置の最終8時間に添加した。細胞を3.7%のパラホルムアルデヒド中に固定し、PBS中で洗浄して、0.2%のトリトンX-100中で5分間透過処理した。次いで、カバースリップをPBS中の10%正常ヤギ血清(NGS)中で2時間ブロックした。P-LISAのために、HA.11 (BabCo, 1:500)及びFL393 (Santa Cruz, 1:1000)をPBS/EDTA/0.2%トリトンX-100/2%/NGS中に希釈して4℃で1晩インキュベートした。TBS/0.05%Tween-20で洗浄した後、近接ライゲーション *in situ* アッセイ(P-LISA)を、以下を除いて製造会社のプロトコル(Detection Kit 613, OLink BioScience)に従って実施した。ヤギ抗ウサギ(マイナス)及び抗マウス(プラス)P-LISAプローブを1:5ではなく1:10でNGS中に希釈した。カバースリップを顕微鏡スライドに設置し、そしてOpenLabソフトウェア(Improvision)及びZeiss Axioplan 2 顕微鏡を使用して画像を得た。核内フォーカス(処置当たり少なくとも100細胞)をBlobfinder ソフトウェア(Centre for Image Analysis, Uppsala University, Sweden)を用いて定量した。全ての曝露時間及び強度閾値はドキシサイクリン/Nutlin-3併用処置に基づいて設定して、各処置に対して一定に保った。観察された処置条件の間のフォーカス数の差異についての統計学的有意性を、ウェルチ補正と共に対応のないt-検定を用いて確認した。p53及びHDMXの標準的な免疫蛍光の画像化のために、上記の抗体を再び、但しPBS洗浄の後に用い、スライドを1 μ g/mlのHoechst を含有しているヤギ抗ウサギAF568 (1:1000)及びヤギ抗マウスAF488 (1:500) (Investrogen/Molecular Probes)とインキュベートした(1時間、室温)。OpenLabにおいて各Hoechst 画像から密度スライスを作成して、p53及びHDMXの両方の核強度を定量するマスクとして使用した。総強度を平均画素強度×核領域と定義して、核サイズの差に対して補正した。Microsoft Excel 及び Prism ソフトウェア(GraphPad)を用いてグラフ表示及び統計分析を実施した。

【0150】

(細胞透過性アッセイ)

ペプチド又は架橋されているポリペプチドの細胞透過性を測定するために、無傷細胞を蛍光標識化した架橋されているポリペプチド(10 μ M)と、無血清培地又はヒト血清を補完した培地中、37℃で4時間インキュベートし、培地で2回洗浄して、トリプシン(0.25%)と37℃で10分間インキュベートする。細胞を再度洗浄して、PBSに懸濁する。細胞蛍光を、例えば、FACSCalibur フローサイトメーター、又はCellomics' KineticScan.RTM. HCS Reader の何れかを用いて分析する。

(細胞有効性アッセイ)

ある特定の架橋されたポリペプチドの有効性を、例えば、ヒト又はマウス細胞集団に由来する各種の腫瘍形成性及び非腫瘍形成性の細胞株及び初代細胞を用いる、細胞に基づいた殺傷アッセイで確認する。細胞生存能を、例えば、架橋されているポリペプチド(0.5~50 μ M)と24~96時間培養して観察して、EC50<10 μ Mで殺傷するものを同定する。細胞生存能を測定するいくつかの標準的なアッセイは市販されていて、架橋されているポリペプチドの有効性を評価するために任意に用いられる。さらに、アネキシンV及びカスパーゼ活性化を測定するアッセイは、架橋されているポリペプチドがアポトーシス機構を活性化して細胞を殺傷するか否かを評価するために任意に用いられる。例えば、Cell Titer-Glo(登録商標)アッセイは、細胞間ATP濃度の機能として、細胞生存能を確認するために用いられる

【0151】

(インビボ安定性アッセイ)

架橋されているポリペプチドのインビボ安定性を調べるために、化合物を、例えば、0.1～50 mg/kgの範囲の濃度で、マウス及び／又はラットにIV、IP、PO又は吸入経路で投与して、注射後0分、5分、15分、30分、1時間、4時間、8時間及び24時間時点で血液試料を採取する。次いで、新鮮血清25 µL中の無傷化合物の濃度を上記のようにLC-MS/MSで測定する。

【0152】

(動物モデルにおけるインビボ有効性)

インビボにおける本発明の架橋されているポリペプチドの抗腫瘍形成活性を確認するために、化合物を、例えば、単独で(IP、IV、PO、吸入又は経鼻経路で)又は関連する化学療法剤(例えば、シクロホスファミド、ドクソルビシン、エトポシド)の準最適用量と併用して投与する。例えば、マウスにD-ルシフェリン(60 mg/kg)を注射して麻酔した動物を画像化(例えば、Xenogen In Vivo Imaging System, Caliper Life Sciences, Hopkinton, Mass.)することによって、白血病を観察できる。全身バイオルミネセンスをLiving Image Software (Caliper Life Sciences, Hopkinton, Mass.)によって光子移動(光子/sec)の積分で定量する。ペプチド模倣体大環状分子を単独で、又は関連化学療法剤の準最適用量との組み合わせを、例えば、白血病マウス(注射/実験1日目の10日後、14～16の範囲のバイオルミネセンスにおいて)に尾静脈又はIP経路によって、0.1 mg/kg～50 mg/kgの範囲の用量で7～21日間投与する。任意に、実験を通して1日おきにマウスを画像化して、実験期間中毎日生存を観察する。期間終了後のマウスを任意に実験の最後に解剖する。別の動物モデルは、安定にルシフェラーゼ発現する、ヒト濾胞性リンパ腫に由来する細胞株である、D_oNH2の、NOD-SCIDマウスへの移植である。別の動物モデルは、安定にルシフェラーゼを発現する、ヒト繊維肉瘤由来の細胞株である、Luc-JEG-3の、NOD-SCID-IL2R γ null (NSG)マウスへの移植である。これらのインビボ試験は任意に予備的薬物動態、薬力学及び毒物学的データを作成する。

【0153】

(臨床試験)

本発明の架橋されているポリペプチドの、ヒトの治療に対する適合性を確認するために、臨床試験を実施することができる。例えば、癌を有すると診断されて治療を必要としている患者を選択して、治療群と1つ又はそれ以上のコントロール群に分ける。ここで治療群には本発明の架橋されているポリペプチドを投与し、一方、コントロール群にはプラセボ又は公知の抗癌剤を投与する。本発明の架橋されているポリペプチドの治療安全性及び有効性は、生存時間及び生活の質のような因子に関する患者群の比較を実施して評価することができる。この実施例では、架橋されているポリペプチドで治療した患者群は、プラセボで治療した患者群と比較して改善された長期間の生存を示す。

【0154】

ある実施態様では、HDMX調節剤は、Reed et al., J. Biol. Chem., 285:10786-10796 (2010) (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)に開示されている1つ又はそれ以上の小分子を包含できる。例えば、HDMX調節剤は、Reed et al., J. Biol. Chem., 285:10786-10796 (2010)に開示されている小分子SJ-172550を包含できる。

【0155】

ある実施態様では、HDMX調節剤は、Harker et al., Bioorg. Med. Chem., 17:2038-2046 (2009) (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)に開示されている1つ又はそれ以上の3₁₄-螺旋 β -ペプチドを含有できる。例えば、HDMX調節剤は、Harker et al., Bioorg. Med. Chem., 17:2038-2046 (2009)に開示されている β ³-ペプチド β 53-12を包含できる。

【0156】

ある実施態様では、HDMX調節剤は、Hayashi et al., Bioorg. Med. Chem., 17:788

4-7893 (2009) (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) に開示されている1つ又はそれ以上のN-アシルポリアミン (N A P A s) を包含できる。例えば、H D M X 調節剤は、Hayashi et al., Bioorg. Med. Chem., 17:7884-7893 (2009) に開示されているN A P A 2 5 を包含できる。

【0157】

ある実施態様では、H D M X 調節剤は、Li et al., J. Am. Chem. Soc., 130:13546-13548 (2008) (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) に開示されている1つ又はそれ以上の改変スコルピオン毒素ミニチュアタンパク質を包含できる。例えば、H D M X 調節剤は、Li et al., J. Am. Chem. Soc., 130:13546-13548 (2008) に開示されているストップイン-1 (stoppin-1) を包含できる。

10

【0158】

ある実施態様では、H D M X 調節剤は、Hu et al., Cancer Res., 67:8810-8817 (2007); Kallen et al., J. Biol. Chem., 284:8812-8821 (2009) (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) に開示されている1つ又はそれ以上のチオレドキシン-共役ペプチドを包含できる。例えば、H D M X 調節剤は、Phan et al., J. Biol. Chem., 285:2174-2183 (2010) に開示されているp D I ペプチドを包含できる。

【0159】

ある実施態様では、H D M X 調節剤は、Markey, et al Oncogene, 1-10 (2008) (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) に開示されている1つ又はそれ以上のマイクロRNA (m i R N A) を包含できる。例えば、H D M X 調節剤は、Markey, et al Oncogene, 1-10 (2008) に開示されているm i R N A m i R - 3 4 a を包含できる。

20

【0160】

H D M 2 調節剤

本開示が網羅するH D M 2 調節剤は、細胞中のH D M 2 の活性 (例えば、E 3 ユビキチンリガーゼ活性)、発現 (例えば、タンパク質又はm R N A 発現) 及び／又はレベル (例えばタンパク質レベル) を直接 (例えば、H D M 2 に結合して) 又は間接的に (例えば、H D M 2 発現の及び／又は活性を制御する分子又は経路に作用して) 調節すること (例えば、阻害する) によって細胞内のp 5 3 の発現、レベル及び／又は活性を増大する何れかの物質を包含する。

30

【0161】

ある実施態様では、H D M 2 調節剤は、以下に開示されている1つ又はそれ以上の物質を包含できる。例えば、H D M 2 調節剤は：(1) H D M 2 と結合する1つ又はそれ以上のステーブル状に架橋されていないペプチド；(2) H D M 2 と結合する1つ又はそれ以上のステーブル状に架橋されているp 5 3 ペプチド；(3) H D M 2 と結合する1つ又はそれ以上の小分子；(4) H D M 2 と結合する (例えば特異的に結合する) 抗体又は抗体の断片；(5) H D M 2 の発現を減少させる1つ又はそれ以上の核酸分子 (例えば、抑制性核酸分子 (例えば、R N A i 又はs i R N A)) ；(6) H D M 2 の発現及び／又は活性を減少させる1つ又はそれ以上の医薬；及び(7) H D M 2 の発現及び／又は活性を減少させる1つ又はそれ以上の方法、並びに(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6) 及び／又は(7) の組合わせの何れかを包含できる。

40

【0162】

ある実施態様では、本明細書に開示されている方法及び組成物で用いられるH D M 2 調節剤は、本明細書に開示されているH D M X 調節剤とは同じではない (例えば、H D M 2 調節剤は、H D M X と結合 (例えば、実質的に結合) しないで特異的にH D M 2 と結合する)。

【0163】

ある実施態様では、H D M 2 調節剤はH D M 2 及びH D M X と結合できる。しかしながら、このような実施態様では、H D M X 阻害剤は一般に、H D M X に対するよりH D M 2 に対してより高い結合親和性を有している (例えば、H D M 2 調節剤の結合親和性はH D

50

M Xに対するよりH D M 2に対して2、5、10、20、25、50、75、100倍又はそれ以上である)。

【0164】

ある実施態様では、H D M 2調節剤はH D M 2及びH D M Xの両方と結合できるが、H D M 2の活性のみを阻害する(例えば、実質的に阻害する)。

【0165】

ある実施態様では、H D M 2調節剤は、ペプチド又はステープル状に架橋されているペプチドがH D M 2と結合するか及び／又はこれを調節する限り、本明細書に開示されている1つ又はそれ以上のペプチド又はステープル状に架橋されているペプチドを包含できる(物質がH D M 2の発現又は活性を調節できるか否かを評価する方法は当該技術分野において公知である(例えば、米国特許出願番号第12/525,123号(これは参照により本明細書に取り込まれている)を参照されたい))。

10

【0166】

ある実施態様では、本明細書に開示されている方法及び組成物で用いられるH D M 2調節剤は、本明細書に開示されている方法及び組成物で用いられるH D M X調節剤とは同じではない(例えば、H D M 2調節剤は、H D M Xと結合(例えば、実質的に結合)しないで特異的にH D M 2と結合する)か、又は本明細書に開示されている方法及び組成物で用いられるH D M X調節剤と同じであるが、H D M Xに対するよりH D M 2に対してより高い結合親和性を有している(例えば、H D M X調節剤の結合親和性はH D M Xに対するよりH D M 2に対して2、5、10、20、25、50、75、100倍又はそれ以上である)。

20

【0167】

ある実施態様では、H D M 2調節剤は架橋されているペプチドではない。ある実施態様では、H D M 2調節剤は図1Cに示す架橋されているペプチドではない。ある実施態様では、H D M 2調節剤はS A H-p 53-8ではない。

【0168】

ある実施態様では、H D M 2調節剤はN u t l i n-3 a (例えば、 $C_{30}H_{30}C_{12}N_4O_4$; 分子量: 581.4896 [g/mol] (二次元及び三次元構造は、ワールドワイドウェブアドレス、pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=216345に示されている) (F. Hoffmann-La Roche Ltd) (Arya et al., British J. Cancer, 103:186-195 (2010); Laurie et al. Nature, 444:61-66 (2006): N u t l i n-3はH D M 2及びH D M Xと結合するがH D M Xより高い親和性でH D M 2と結合するという報告を参照されたい)、例えば、市販のN u t l i n-3又はN u t l i n-3 aを包含できる。

30

【0169】

ある実施態様では、H D M 2調節剤は、Shangary et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. 105:3933-3938 (2008)、これは参照によりその全てが本明細書に取り込まれている)に開示される1つ又はそれ以上のスピロオキシンドールを包含できる。ある実施態様では、H D M 2調節剤は、Ding et al. (J. Am. Chem. Soc. 127:10130-10131 (2005)、これは参照によりその全てが本明細書に取り込まれている)に開示されるスピロオキシンドールを包含できる。

40

【0170】

ある実施態様では、H D M 2調節剤は、Grasberger et al. (J. Med. Chem. 48:909-912 (2005)、これは参照によりその全てが本明細書に取り込まれている)に開示される、1つ又はそれ以上のベンゾジアゼピンジオンを包含できる。

【0171】

ある実施態様では、H D M 2調節剤は、Yin et al. (Angew. Chem. Int. Ed. 44:2704-2707 (2005)、これは参照によりその全てが本明細書に取り込まれている)に開示される、1つ又はそれ以上のテルフェニルに基づく螺旋模倣体を包含できる。

【0172】

50

ある実施態様では、HDM2調節剤は、HDM2と結合する（例えば、特異的に結合する）抗体（例えば、モノクローナル又はポリクローナル抗体、或いはHDM2と結合する（例えば特異的に結合する）モノクローナル又はポリクローナル抗体の抗原結合断片）を包含できる。ある実施態様では、Anderson et al. (International J. Oncology, 31:545-555 (2007)、これは参照によりその全てが本明細書に取り込まれている）に開示されるモノクローナル抗体MDM2-F4-14を包含できる。

【0173】

ある実施態様では、HDM2調節剤は、Kritzer et al. (ChemBioChem, 7:29-31 (2006))、これは参照によりその全てが本明細書に取り込まれている）に開示される1つ又はそれ以上の「ミニチュアタンパク質」を包含できる。ある実施態様では、HDM2調節剤は、Kritzer et al. (ChemBioChem, 7:29-31 (2006))に開示されるミニチュアペプチド p53AD₁₅₋₃₁を包含できる。

【0174】

ある実施態様では、HDM2調節剤は、Pichiorri, et al (Cancer Cell, 18:367-381 (2010)、これは参照によりその全てが本明細書に取り込まれている）に開示される1つ又はそれ以上のマイクロRNA (miRNA)を包含できる。例えば、HDM2調節剤は、Pichiorri, et al (Cancer Cell, 18:367-381 (2010))に開示されるmiRNA miR-192を包含できる。

【0175】

p53の発現及び／又は活性を誘発する組成物及び／又は方法

上記のように、HDMX調節剤の何れかの組合わせ、又はHDM2調節剤と組合わせたHDMX調節剤は、p53の発現及び／又は活性を誘発する組成物及び／又は方法と組合わせて用いることができる。例示的なp53の発現及び／又は活性を誘発する組成物及び／又は方法は、これに限定されないが、イオン化放射；紫外線；エトポシド、アクチノマイシンD、ドクソルビシン、パクリタキセル、及びその他の化学療法剤のようなDNA損傷剤を包含できる。

【0176】

ある実施態様では、細胞中のp53活性は、活性なp53を細胞に導入する（例えばウイルス（例えば、レトロウイルス）及び／又はDNAの導入を用いて）ことによって増大できる。ある実施態様では、活性なp53は対象から得られる核酸配列から発現でき、及び／又は活性なp53は対象から得た単離されたタンパク質であってよく、任意にp53の細胞透過性を増強する部分と結合させることができる。ある実施態様では、p53の活性は、癌細胞（例えば、p53活性が減退している癌細胞）に的を絞った方法でp53のレトロウイルスによる再構築によって増大することができる。

【0177】

ある実施態様では、p53の発現及び／又は活性を誘発する組成物及び／又は方法は、本明細書に開示されている1つ又はそれ以上のHDM2阻害剤を包含できる。

【0178】

本明細書で用いられる用語「発現」は、タンパク質及び／又は核酸の発現及び／又はタンパク質活性を包含する。

【0179】

医薬組成物

ある実施態様では、本明細書に開示されている、医薬組成物を含んでいる組成物は：（1）1つ又はそれ以上のHDMX調節剤；及び／又は（2）1つ又はそれ以上のHDM2調節剤；及び／又は（3）p53の発現及び／又は活性を誘発する1つ又はそれ以上の組成物及び／又は方法を包含し、これは（1）～（3）の何れかの組合わせ、例えば、（1）と（2）及び／又は（3）（例えば、（1）と（2）、（1）と（3）、そして（1）と（2）と（3））の組合わせの何れかを包含している。

【0180】

更に、本明細書に開示されている方法はこれらの組成物の何れか、例えば、組成物又は

10

20

30

40

50

医薬組成物のような、の使用を包含する。

【0181】

本明細書で用いられるような、本明細書に記載されている式の化合物を包含している、本発明の組成物は、それらの薬学的に許容される誘導体又はプロドラッグを包含するように定義される。「薬学的に許容される誘導体又はプロドラッグ」は、レシピエントに投与すると、本発明の化合物を（直接的又は間接的に）もたらすことができる本明細書に開示されている化合物又は物質の、薬学的に許容される塩、エステル、エステルの塩、又は他の誘導体の何れかを意味する。特に好ましい誘導体及びプロドラッグは、このような化合物を哺乳動物に投与したときに化合物のバイオアベイラビリティを増大する（例えば、経口投与された化合物をより容易に血中に吸収されるようにすることによって、又は親化合物の生体区画（例えば、脳又はリンパ系）への送達を親種と比べて増強するものである。好ましいプロドラッグは、水溶性又は腸膜を介する能動輸送を増大させる基が本明細書に開示されている式の構造に付加している誘導体を包含する。

10

【0182】

本発明の化合物は選択的な生物特性を増強する適切な官能基を付加することによって改変できる。このような改変は当該技術分野において公知であって、所定の生体区画（例えば、血液、リンパ系、中枢神経系）内への生物学的浸透を増大し、経口アベイラビリティを増大し、注射による投与を可能にするために溶解性を増大し、代謝を変え、そして排泄速度を変えるものを包含する。

20

【0183】

本発明の化合物の薬学的に許容される塩は、薬学的に許容される無機及び有機の酸及び塩基から誘導されるものを包含する。適切な酸塩の例は、酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パルモ酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリフルオロメチルスルホン酸塩、及びウンデカン酸塩を包含する。適切な塩基に由来する塩は、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）、アンモニウム及びN-（アルキル）4+塩を包含する。本発明は本明細書に開示されている化合物の何れかの塩基性窒素含有基の四級化も想定している。水溶性又は脂溶性或いは分散性の生成物もこのような四級化で得られる。

30

【0184】

本明細書に開示されている式の化合物は、例えば、約0.001~100mg/体重kgの範囲の用量を用いて、又は特定薬剤の要求に従って、注射、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、又は皮下注射で；又は経口で、口腔内に、経鼻的に、経粘膜で、局所に、眼科製剤で、又は吸入によって投与されてよい。あるいは又は更に、本発明の化合物は食品医薬品局（Food and Drug Administration）が承認した何れかの方法、例えば、CDER Data Standards Manual, version number 004 (fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm で入手できる）に記載されているような、に従って投与できる。

40

【0185】

本明細書の方法は、所望の又は定められた効果を達成する化合物又は化合物組成物の有効量の投与を意図している。典型的には、本発明の医薬組成物は1日当たり約1~約6回或いは、連続輸液として投与される。このような投与は長期治療又は救急治療として利用できる。単回用量製剤を作成するために担体物質と混合できる活性成分の量は、治療される対象及び特定の投与方法によって変わる。典型的な製剤は約5%~約95%の活性化合物（W/W）を含有している。或いは、このような製剤は約20%~約80%の活性化合物を含有している。

【0186】

ある実施態様では、HDMX調節剤（例えば、p53のステーブル状に架橋されている

50

20

30

50

0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1又は1 0～2 0；0 . 0 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1又は1 0～3 0；0 . 0 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1～1 5、0 . 0 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1又は1 0～3 0；0 . 0 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1～1 0、0 . 0 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1又は1 0～3 0；又は0 . 0 0 0 0 1、0 . 0 0 0 1、0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1～5 m g / k g / 日の、例えば、静脈内投与を包含できる。

【0 1 8 8】

上で述べたものより低い又は高い用量を必要とするかもしれない。何れか特定の患者に対する特定の用量及び治療計画は、用いられる具体的な化合物の活性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食生活、投与の時間、排泄の速度、薬剤の組合わせ、病気、症状又は疾患の重症度及び経過、患者の病気、疾患又は症状に対する素質、及び治療医師の判断を含む各種因子によって決まるだろう。

【0 1 8 9】

患者の疾患の改善によって、所望により、本発明の化合物、組成物又は組合せの維持用量を投与してよい。続いて、投与の用量又は回数、或いはその両方を、症状に応じて改善された疾患が維持されるレベルまで減少させてよい。しかしながら、患者は病状の何らかの再発に基づき間欠的治療を必要とするかもしれない。

【0 1 9 0】

本発明の医薬組成物は、本明細書に記載されている式の化合物又はそれらの薬学的に許容される塩；例えば、モルフィン又はコデインを包含する追加の薬剤；及び薬学的に許容される担体、補助剤又は賦形剤の何れかを含有している。本発明の別の組成物は、本明細書に記載されている式の化合物又はそれらの薬学的に許容される塩；及び薬学的に許容される担体、補助剤又は賦形剤を含有している。本明細書で説明されている組成物は、疾患又は疾患の症状の調節を達成するのに有効な量の、本明細書で説明されている式の化合物の、更には存在するなら、追加の治療剤を含有している。

【0 1 9 1】

用語「薬学的に許容される担体又は補助剤」は、本発明の化合物と共に患者に投与でき、そして化合物の治療量を送達するのに十分な用量を投与したときにそれらの薬学的な活性を失わず、無毒性である担体又は補助剤を示す。

【0 1 9 2】

本発明の医薬組成物で用いられてよい薬学的に許容される担体、補助剤及び賦形剤は、これに限定されないが、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、d- α -トコフェロールポリエチレングリコール1 0 0 0 コハク酸エステルのような自己乳化送達系（SEDDS）、ツイーン又はその他の類似のポリマー送達マトリックスのような、医薬剤形で用いられる界面活性剤、ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質、リン酸塩のような緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩又は電解質（硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩のような）、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロック重合体、ポリエチレングリコール及び羊毛脂を包含する。 α -、 β -、及び γ -シクロデキストリンのようなシクロデキストリン類は本明細書に記載されている式の化合物の送達を増強するために有利に用いることもできる。

【0 1 9 3】

本発明の医薬組成物は、経口、非経口、吸入スプレーで、局所、経鼻、口腔内、腔内又は移植容器を介して、好ましくは経口投与又は注射投与で、投与できる。本発明の医薬組成物は何れかの通常の非毒性で薬学的に許容される担体、補助剤又は賦形剤を含有できる。ある場合は、製剤化した化合物又はその送達形態の安定性を向上させるために、製剤の

10

20

30

40

50

pHを薬学的に許容される酸、塩基又は緩衝剤で調節できる。本明細書で用いられる用語、非経口は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液嚢内投与、胸骨下、髄腔内、病巣内及び頭蓋内注射、又は点滴術を包含する。あるいは又は更に、本発明の医薬組成物は食品医薬品局（Food and Drug Administration）が承認した何れかの方法、例えば、CDER Data Standards Manual, version number 004 (fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm で入手できる）に記載されているような、に従って投与できる。

【0194】

医薬組成物は無菌注射製剤、例えば、無菌注射用の水性又は油性の懸濁液のような形態にできる。この懸濁液は、適切な分散又は湿潤剤（例えば、ツイーン80のような）及び懸濁剤を用いて当該技術分野で公知の技術に従って製剤化できる。無菌注射製剤は、非毒性で非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌の注射用溶液又は懸濁液、例えば1, 3-ブタンジオール溶液であってよい。許容される賦形剤及び溶媒のうちで利用できるものは、マンニトール、水、リンゲル溶液及び等張食塩溶液である。更に、無菌の固定油は溶媒又は懸濁化媒体として通常に用いられている。この目的のために、合成モノー又はジグリセリドを包含する、何れかの無刺激性固定油を用いることができる。オレイン酸及びそのグリセリド誘導体のような、脂肪酸は、オリーブ油又はひまし油のような、天然の薬学的に許容される油と同様に、特にそのポリオキシエチル化バージョンでは、注射用製剤において有用である。これらの油性溶液又は懸濁液は、長鎖アルコール希釈剤又は分散剤、又は乳剤及び／又は懸濁剤のような薬学的に許容される剤形の製剤化で通常用いられているカルボキシメチルセルロース又は同様な懸濁化剤も含有できる。ツイーン類又はスパン類のようなその他の通常用いられている界面活性剤及び／又は薬学的に許容される固体、液体又はその他の剤形の製造で通常用いられている同様な乳化剤又はバイオアベイラビリティの増強剤も製剤化の目的のために用いることができる。

【0195】

本発明の医薬組成物は、これに限定されないが、カプセル剤、錠剤、乳剤及び水性懸濁剤、分散液並びに溶液を包含する経口投与に許容される何れかの剤形で経口投与できる。経口使用のための錠剤の場合は、通常用いられる担体は乳糖及びコーンスターチを包含している。ステアリン酸マグネシウムのような、滑沢剤も一般的に添加される。カプセル形態で経口投与するために、有用な希釈剤は乳糖及び乾燥コーンスターチを包含している。水性懸濁剤及び／又は乳剤を経口投与する場合は、油層に懸濁又は溶解した活性成分を乳化及び／又は懸濁化剤と混合できる。所望により、ある特定の甘味及び／又は着香及び／又は着色剤を加えることができる。

【0196】

本発明の医薬組成物は直腸内投与用の坐剤の形態で投与することもできる。これらの製剤は本発明の化合物を、室温では固体であるが直腸温度では液体であるので直腸内で溶解して活性成分を放出する、適切な非刺激性賦形剤と混合することによって製造できる。このような物質は、これに限定されないが、ココアバター、蜜蝋及びポリエチレングリコールを包含する。

【0197】

本発明の医薬組成物は経鼻エアゾール又は吸入によって投与できる。このような組成物は、医薬製剤の技術分野で公知である技術に従って製造され、ベンジルアルコール又はその他の適切な保存剤、バイオアベイラビリティを増強する吸収促進剤、フッ化炭素、及び／又は当該技術分野で公知のその他の安定化又は分散化剤を用いて、生理食塩水の溶液として製造できる。

【0198】

本発明の組成物が本明細書に記載されている式の化合物と1つ又はそれ以上の追加の治療又は予防薬剤との組み合わせを含んでいるときは、本化合物及び追加薬剤の両方は、単独治療法で通常投与される用量の約1～100%、より好ましくは5～95%の用量レベルで存在させるべきである。追加薬剤は、本発明の化合物とは別に、多剤投与の一部として投与できる。或いはこれらの薬剤を、本発明の化合物と共に単一の組成物中に混合した

、単一剤形の一部とすることができる。

【0199】

本明細書で用いられる用語「有効量」及び「治療に有効な」は、その投与により意図した効果又は生理的な転帰がもたらされるという意味で有効である、ある期間（救急投与又は慢性投与、及び継続又は連続投与を包含する）用いられる、本明細書に記載されている1つ又はそれ以上の化合物又は医薬組成物の量又は濃度を示す。

【0200】

本発明で用いられる1つ又はそれ以上の化合物又は医薬組成物の有効量は、細胞中のp53濃度（例えば、タンパク質濃度）及び／又はp53活性（例えば、生物活性）の増大を促進する量を包含する。化合物の治療有効量は疾患の治療を必要としないが疾患の治療をもたらすだろう。

10

【0201】

ある実施態様では、本開示は、下記方法において本明細書中に開示されている1つ又はそれ以上の組成物（以下に「X」と示してある）の何れかを用いる方法を提供する：

【0202】

本明細書に開示されている1つ又はそれ以上の病気又は疾患（例えば、癌、以下の実施例で「Y」と示してある）の治療において薬剤として用いるための物質X。Yの治療のための薬剤の製造のための物質Xの使用；及びYの治療において使用するための物質X。

【0203】

治療方法／オーダーメイド治療

20

本開示は、癌の治療方法、例えば対象（例えば、ヒト対象）における癌を治療する方法を包含している。本明細書で用いられる「治療」は、病気又は疾患（例えば、癌）の1つ又はそれ以上の症状を改善するかあるいは有益に変える何れかの方法を意味する。本明細書で用いられているような、特定の疾患（例えば、癌）の症状の改善は、永続的又は一時的、持続的又は過渡的に関わらず、本発明の組成物及び方法による治療に起因する、あるいは治療に関連する、何らかの減少を示す。ある実施態様では、治療は、例えば、治療前の癌細胞の数（例えば、対象中の）に比べて癌細胞の数（例えば、対象中の）の減少；治療前の癌細胞（例えば、対象中の）の生存能（例えば、平均（average/mean）生存能）と比べた癌細胞（例えば、対象中の）の生存能（例えば、平均（average/mean）生存能）の減少；治療前の腫瘍サイズと比べた腫瘍サイズの低下；及び／又は治療前の対象の症状と比べた対象における1つ又はそれ以上の癌に関連する1つ又はそれ以上の症状の減少を促進するか又はもたらすことができる。

30

【0204】

ある実施態様では、方法は治療を必要としている対象（例えば、1つ又はそれ以上の癌に罹る危険性がある、癌を有している、又は癌に罹っている対象）を選択すること、及び（1）1つ又はそれ以上のHDMX調節剤；（2）1つ又はそれ以上のHDM2調節剤；及び（3）p53の発現及び／又は活性を誘発する1つ又はそれ以上の組成物及び又は方法：の1つ又はそれ以上の有効用量を対象に投与することを包含して、対象を治療するのに十分な条件下及び期間、（1）の（2）及び（3）との何れかの組み合わせ（例えば、（1）と（2）；（1）と（3）；及び（1）と（2）と（3））を包含する。このような方法は、治療の有効性を確認するために組成物の投与の間及び投与後に対象を観察又は評価すること、及び、必要により、有効性を向上させるために治療を調節すること（例えば、組成物を変えて、組成物の単回投与の用量を増量して、1日当りに投与される組成物の投与回数を増やして、及び／又は組成物を投与する日数を増やして）も包含している。

40

【0205】

ある実施態様では、方法は、癌を有する患者に対するオーダーメイド治療計画を開発することを包含できる。このような方法は、例えば、HDM2調節剤に対して感受性のある癌細胞を有している対象を同定すること、及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤で対象を治療すること；HDMX調節剤に対して感受性のある癌細胞を有している対象を同定す

50

ること、及び1つ又はそれ以上のHDMX調節剤で対象を治療すること；並びにHDM2調節剤及び／又はHDMX調節剤に耐性を示す癌細胞を有している対象を同定すること、及び1つ又はそれ以上のHDMX調節剤と1つ又はそれ以上のHDM2調節剤の相乗作用のある組合わせで対象を治療することを包含できる（図11及び12を参照されたい）。ある実施態様では、方法は、癌を有していると確認された患者に最も適している治療を確認すること（例えば、本明細書に開示される組成物を用いる治療に対する対象の1つ又はそれ以上の癌細胞の感受性を確認（例えば、インビトロで）することによって）、対象に対する治療計画を開発すること、及び治療計画に従って対象に組成物を任意に投与することを包含できる。これらの方法は、例えば、以下の方法を包含できる。

【0206】

(i) 癌を有する患者を選択すること；患者の癌における（例えば、対象から入手した（例えば、生検で入手した）癌細胞中の）p53の発現及び／又は活性を評価すること（例えば、検出すること）；及び、p53の発現及び／又は活性が検出されたら、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤の有効量を対象に投与することを包含しているオーダーメイド治療計画を対象に提供すること。ある実施態様では、方法は、対象を治療するのに十分な条件下で及び十分な期間、対象に1つ又はそれ以上のHDMX調節剤を投与することを包含している。

【0207】

(ii) 癌を有する患者を選択すること；対象から入手した（例えば、生検で得た癌細胞）試料（例えば、癌細胞）におけるp53-HDMX複合体の存在及び／又はレベルを検出すること；そして、p53-HDMX複合体が検出されたら、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤の有効量を対象に投与することを包含しているオーダーメイド治療計画を患者に提供すること。ある実施態様では、方法は、対象を治療するのに十分な条件下で及び十分な期間、対象に1つ又はそれ以上のHDMX調節剤を投与することを包含している。

【0208】

(iii) 癌を有する患者を選択すること；対象から入手した（例えば、生検で得た癌細胞）試料（例えば、癌細胞）におけるp53-HDMX複合体の存在及び／又はレベルを検出すること；そして、p53-HDMX複合体が検出されたら、対象を治療するのに十分な条件下で及び十分な期間、対象に1つ又はそれ以上のHDMX調節剤を投与すること；組成物の投与の間及び投与後に対象を観察又は評価して治療の有効性を確認すること；そして治療の有効性が低い場合は、1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を対象に投与すること。

【0209】

(iv) 癌を有する患者を選択すること；対象から入手した（例えば、生検で得た癌細胞）試料（例えば、癌細胞）におけるp53-HDMX複合体の存在及び／又は濃度を検出し、そして試料中のp53のレベルを評価してp53のレベル又は活性が（例えば、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤に接触させたときに減少した生存能を示す癌細胞におけるp53のレベル又は活性と比較して）低いかなんかを確認すること。ある実施態様では、p53のレベルをJeg-3及び／又はMCF-7細胞（複数を含む）中のp53のレベルと比較する。ある実施態様では、活性は本明細書に記載のように、HDMX-p53複合体の解離を滴定することによって評価でき、そしてp53-HDMX複合体が検出されてp53のレベルが低いときは、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤の有効量を対象に投与することを包含しているオーダーメイドの治療計画を対象に提供すること。ある実施態様では、方法は、p53の発現及び／又は活性を誘発する組成物及び／又は方法の有効量を投与することを更に含んでいる、オーダーメイド治療計画を対象に提供することも含んでいる。ある実施態様では、方法は、対象を治療するのに十分な条件下及び期間、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤、並びに、任意に対象に対してp53の発現及び／又は活性を誘発する組成物及び／又は方法を投与することを含有している。

【0210】

(v) 以前に1つ又はそれ以上のHDM2調節剤(例えば、Nutlin-3)を投与されたが、それらの癌細胞がHDM2調節剤(例えば、Nutlin-3)に耐性(例えば、部分的な耐性)を示した、癌を有する対象を選択すること；そして1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤、並びに任意に、p53の発現及び／又は活性を誘発する組成物及び／又は方法の有効量を投与することを包含するオーダーメイドの治療計画を対象に提供すること。ある実施態様では、方法は、対象を治療するのに十分な条件下及び期間、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤、並びに任意にp53の発現及び／又は活性を誘発する組成物を対象に投与することを包含している。及び／又は

【0211】

(vi) 以前に1つ又はそれ以上のHDMX調節剤(例えば、SAH-p53-8)を投与されたが、それらの癌細胞がHDMX調節剤に耐性(例えば、部分的な耐性)を示した癌を有する対象を選択すること；そして1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤、並びに任意に、p53の発現及び／又は活性を誘発する組成物の有効量を投与することを包含しているオーダーメイド治療計画を対象に提供すること。ある実施態様では、方法は、対象を治療するのに十分な条件下及び期間、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤、並びに任意にp53の発現及び／又は活性を誘発する組成物を対象に投与することを包含している。

【0212】

方法(i)～(vi)は独立して又は共に及び何れの順番でも実施できることに注目すべきである。方法(i)～(vi)の何れも、組成物の投与の間及び投与後に対象を観察又は評価して治療の有効性を確認して、必要によって、有効性を向上させるために治療を調節すること(例えば、組成物を変えて、組成物の単回投与の用量を増やして、1日当りに投与される組成物の投与回数を増やして、及び／又は組成物を投与する日数を増やして)も包含できる。

【0213】

ある実施態様では、本明細書のHDMX調節組成物及び方法は、対象の治療において他の抗癌治療剤又は治療方法と組合わせて用いることができる。例えば、本明細書のHDMX調節組成物及び方法は、化学療法、放射線治療、及び抗体治療と組合わせて用いることができる。

【0214】

ある実施態様では、本開示は放射線誘発胃腸症候群を発症する危険のある対象を治療するための組成物及び方法を包含する(検討のために、例えば、Krisch et al., Science, 327:593-596(2010)を参照されたい)。電離放射線への急性曝露はGI症候群として知られている疾患を誘導する胃腸(GI)管に致命的な損傷を引き起こす。例えば、GI管の上皮細胞における、P53の過剰発現は急性電離放射線が引き起こす障害に対してGIを保護する(Krisch et al. (2001))。

【0215】

従って、ある実施態様では、本開示は放射線治療(例えば、電離放射線治療)を受ける予定になっている対象を選択すること及びこの対象のための治療計画を開発することを含んでいる。治療計画は、放射線(例えば、電離放射線)に曝露される前(例えば、直前、1日前、1日以上前、1週間前、1週間以上前)に1つ又はそれ以上のHDMX調節剤(例えば、SAH-p53-8)の有効用量及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤(例えば、Nutlin-3)の有効用量で対象を治療すること(例えば、投与すること)を包含できる。ある実施態様では、放射線(例えば、電離放射線)に曝露される前(例えば、直前、1日前、1日以上前、1週間前、1週間以上前)に、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤(例えば、SAH-p53-8)及び／又はHDM2調節剤(例えば、Nutlin-3)の単回用量又は複数回用量を用いて、対象を治療することができる。ある実施態様では、用量(複数も含む)は全身投与される。あるいは又は更に、用量(複数も含む)は局所的に(例えば、GIへ又はGIの上皮細胞へ局所的に)投与される。ある実

10

20

30

40

50

施態様では、治療は1つ又はそれ以上のHDMX調節剤（例えば、SAH-p53-8）の有効用量を含んでいる。ある実施態様では、治療は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤（例えば、Nutlin-3）の有効用量を含んでいる。ある実施態様では、治療は1つ又はそれ以上のHDMX調節剤（例えば、SAH-p53-8）及び1つ又はそれ以上のHDM2調節剤（例えば、Nutlin-3）の相乗効果をもたらす用量を含んでいる。方法は、投与の間及び投与後に対象を観察又は評価して治療の有効性を確認して、必要によって、例えば、更なる放射線治療の前に、治療の有効性を向上させるために治療を調節すること（例えば、組成物を変えて、組成物の単回投与の用量を増やして、1日当りに投与される組成物の投与回数を増やして、及び／又は組成物を投与する日数を増やして）も包含できる。これらの方法は放射線治療と組合わせた、1つ又はそれ以上のHDMX調節剤及び／又は1つ又はそれ以上のHDM2調節剤を対象に投与することも含んでいる。

10

【0216】

対象の選択

用語「対象」は本明細書を通して、本発明の方法による治療が提供される、動物、ヒト又は非ヒトを記載するために用いられる。

【0217】

本明細書で用いられる用語「癌」、「過剰増殖性」及び「腫瘍性」は、自立的増殖能を有する、すなわち、急速に増殖する細胞生育によって特徴付けられる異常な状態又は条件の細胞を示す。本明細書で述べられているように、本発明の方法は機能的p53を発現できる何れかの癌細胞を治療するために用いることができる。例えば、機能的p53が発現しているが、その細胞中のp53のレベル又は活性がHDMX及び／又はHDM2によって減少する癌細胞は何れも本明細書に開示されている組成物及び方法を用いて有益に治療することができる。野生型p53の活性は必要としていない。例えば、いくつかの機能を保持している突然変異p53を発現する細胞を有益に治療することができる。

20

【0218】

従って、本開示は：（1）癌を有する対象を同定すること；及び（2）対象の癌細胞が機能的p53をコードするか又は発現するかを確認すること；及び（3）対象の癌細胞が機能的p53を発現した場合は、本明細書に開示されている組成物及び方法を用いて対象を治療するか又は対象の治療法を開発することを包含できる。例えば、p53の機能は以下の癌の何れかで評価できる。

30

【0219】

ある場合は、対象又は対象由来の細胞は機能的なp53を発現することができる。このような機能的p53はいくつかのp53機能を有しているが、野生型p53と同様な機能レベルを有する必要はない。従って、機能的p53は幾らかの機能レベルを保持している突然変異p53を包含できる。ある場合は、機能的p53は野生型p53（例えば、同じ対象の非腫瘍性細胞内の野生型p53）の機能活性の1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又はそれ以上を有している。ある実施態様では、細胞は機能的p53を発現することができるが、機能的p53は検出不能である（例えば、細胞中で機能的p53は発現するが急速に劣化する）。このような細胞は、細胞が機能的p53をコードすることを検出することにより同定できる。このような方法は、例えば、DNAプローブを用いて及び／又は細胞又はそれに由来する試料中のp53 mRNAを検出することにより、実施できる。

40

【0220】

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、筋肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋腫瘍、横紋筋腫瘍、胃癌、食道癌、直腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、頭頸部癌、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、髓様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆道癌、絨毛癌、精上皮腫、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巢癌、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、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、

50

聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、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、又はカポジ肉腫を包含する。

【0221】

増殖性疾患の例は造血器腫瘍性疾患を包含する。本明細書で用いられる用語「造血器腫瘍性疾患」は、造血器の過形成／腫瘍性細胞、例えば、骨髄、リンパ又は赤血球系列から生じる細胞、又はその前駆細胞を含有している疾患を包含する。好ましくは、疾患は低分化型急性白血病、例えば、赤血球性白血病及び急性巨核芽球性白血病から生じる。更なる典型的な骨髄疾患は、これに限定されないが、急性前骨髄細胞性白血病（APML）、急性骨髄性白血病（AML）及び慢性骨髄性白血病（CML）を包含し（Vaickus (1991), Crit Rev. Oncol./Hematol. 11:267-97 に概説されている）；リンパ性腫瘍は、これに限定されないが、B系列ALL及びT系列ALLを包含する急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ芽球性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、毛様細胞白血病（HLL）及びワルデンシュトレームマクロフルブリン血症（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異型、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、大型顆粒球リンパ球白血病（LGF）、ホジキン病、並びにリード・シュテンベルグ病を包含する。

10

【0222】

乳腺の細胞増殖及び／又は分化疾患の例は、これに限定されないが、例えば、上皮過形成、硬化性腺症、及び小管乳頭腫を包含する、増殖性乳腺疾患；腫瘍、例えば、線維腺腫、葉状腫瘍、及び肉腫のような間質性腫瘍、並びに大管乳頭腫のような上皮腫瘍；非浸潤性乳管癌（パージェット病を含む）及び非浸潤性小葉癌を包含する非浸潤性腫瘍、並びに、これに限定されないが、浸潤性乳管癌、浸潤性小葉癌、髄様癌、膠様（粘液性）癌、管状腺癌、及び浸潤性乳頭癌を包含する浸潤性腫瘍を含んでいる乳腺の腫瘍、並びに混合型悪性腫瘍を包含する。男性乳腺の疾患は、これに限定されないが、女性化乳房及び腫瘍を包含する。

20

【0223】

肺の細胞増殖及び／又は分化疾患の例は、これに限定されないが、腫瘍随伴性症候群、細気管支肺胞腫瘍、及び気管支カルチノイドのような神経内分泌腫瘍、混合型腫瘍、及び転移性腫瘍を包含する気管支癌；炎症性胸水、非炎症性胸水、気胸、並びに単発性線維性腫瘍（胸膜線維腫）及び悪性中皮腫を包含する胸膜癌を包んでいる胸膜の病変を包含する。

30

【0224】

結腸の細胞増殖及び／又は分化疾患の例は、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、結腸直腸腫瘍、及びカルチノイド腫瘍を包含する。

【0225】

肝臓の細胞増殖及び／又は分化疾患の例は、これに限定されないが、結節性過形成、腺腫、並びに肝臓の原発性癌及び転移性腫瘍を含む悪性腫瘍を包含する。

【0226】

卵巣の細胞増殖及び／又は分化疾患の例は、これに限定されないが、体腔上皮の腫瘍、漿液腫瘍、粘液性腫瘍、内膜性腫瘍、透明細胞腺癌、嚢胞腺線維腫、ブレンナー腫瘍、表面上皮腫瘍のような卵巣癌；成熟（良性）奇形腫、単胚葉性奇形腫、未成熟悪性奇形腫、未分化胚細胞腫、卵胞囊腫瘍、絨毛腫瘍のような生殖細胞腫瘍；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（アンドロblastoma）、門細胞腫瘍（hill cell tumors）、及び性腺芽細胞腫のような性索間質腫瘍；及びクルケンベルグ腫瘍のような転移性腫瘍を包含する。

40

【0227】

癌を発症する危険性のある対象及び／又は癌を有している対象を同定する方法は、当該技術分野で公知である。例えば、癌を発症する危険性のある対象（例えば、癌を発症する

50

見込みが増大している対象)を同定する方法は当該技術分野で公知である(例えば、米国特許第7,611,870号及びJie Li et al., Nature, Identification of high-quality cancer prognostic markers and metastasis network modules (2010)を参照されたい)。癌を有している患者を同定する方法も当該技術分野で公知であって、自己評価、臨床評価(身体検査及び生検を含む)、検査室分析(例えば、バイオマーカー分析)、パパンニコロー検査(パップスメア)、及び画像化方法(例えば、マンモグラフィー、MRI、PET及び/又はCTスキャン及び血管造影)を含む。ある実施態様では、本明細書に開示されているp53-HMDXバイオマーカーを癌(例えば、HDMX調節剤による治療に感受性がある癌)を有している対象の同定に用いる。

【0228】

本明細書で用いられているように、p53活性は、これに限定されないが、例えば、p53転写活性(これは、例えば、p53の標的、例えばp53転写標的の、転写、mRNAレベル、タンパク質レベルをモニタリングすることによって評価できる)を包含できる。適切なp53転写標的は当該技術分野で公知であって、これに限定されないが、例えば、SFN、GADD45A、CRYZ、S100A2、BTG2、ODC1、TP53I3、TGFA、PCBP4、PLK2、CDC25C、CCNG1、IER3、TAP1、CDKN1A、EEF1A1、THBS2、ANLN、IGFBP3、EGFR、HGF、SERPINE1、MET、NOS3、TNFRSF10B、SCARA3、RRM2B、GML、DKK1、FAS、SCD、LRDD、CTSD、CD82、HSPA8、P53AIP1、SLC38A2、MDM2、HDM2、RB1、BDKRB2、MMP2、CX3CL1、SERPINB4、GDF15、BBC3、BAX、PCNA、TRPM2、及びP2RXL1)及び/又はp53機能活性(例えば、p53タンパク質-相互作用に基づく機能、例えば、細胞死(例えば、壊死及びアポトーシス)、及び細胞周期停止)を包含する。p53活性は、p53転写、mRNA、又はタンパク質レベルを確認することによっても評価できる。これらの例示的な方法のそれぞれを実施する方法は当該技術分野において周知である。

【0229】

キット

本明細書に記載されている化合物及び医薬組成物はキットで提供することができる。例えば、キットは、組成物及び癌を有する対象のためにオーダーメイドの治療方法を開発する方法を包含できる。ある実施態様では、これらのキットは、HDMXとの複合体中のp53のバイオマーカー(例えば、複合体及び/又はp53若しくはHDMXを免疫沈降するために必要な成分と特異的に結合して、免疫プロットティングでp53若しくはHDMXを検出する抗体)を検出するための組成物を包含できる(例えば、キットは、p53を免疫沈降させる第1抗体(例えば、抗p53抗体)及び免疫プロットティングでHDMXを検出する第2抗体(例えば、抗HDMX抗体)を包含できる;又はキットはHDMXを免疫沈降する第1抗体(例えば、抗HDMX抗体)及び免疫プロットティングで検出する第2抗体(例えば、抗p53抗体)を提供できる。ある実施態様では、キットは更に、(1)1つ又はそれ以上のHDMX調節剤(例えば、SAH-p53-8);及び/又は(2)1つ又はそれ以上のHDM2調節剤(例えば、Nutlin-3);及び/又は(3)p53の発現及び/又は活性を誘発する1つ又はそれ以上の組成物及び/又は方法を含し、(1)~(3)の何れかの組み合わせ、例えば、(1)と(2)及び/又は(3)の何れかの組み合わせ(例えば、(1)と(2)、(1)と(3)、及び(1)と(2)と(3))を包含している、対象に投与するための医薬組成物を含んでいる、組成物を更に包含できる。このような場合は、対象に投与するための組成物は対象に対してオーダーメイドすることができる。或いは、対象に投与する組成物はオーダーメイドされない。ある実施態様では、オーダーメイド治療方法を開発するための組成物及び方法と、対象に投与するための組成物は別々に独立したキットで提供される。

【0230】

キットは、組成物及び組成物を用いる方法に関する情報資料も包含できる。情報資料は

、本明細書に記載されている方法及び／又は本明細書に記載されている方法についての薬剤の使用に関する、記述的、取扱い説明、販促又はその他の資料であってよい。例えば、情報資料は、癌を有しているか、又は発症の危険性がある対象を治療するための化合物の使用に関連している。キットは、1つ又はそれ以上の化合物を細胞（培地中又はインビトロ）に投与するための及び／又は細胞を患者に投与するための、そして本明細書に記載されている方法の何れかの組合わせのための用具一式も包含できる。

【0231】

一実施態様では、情報資料は、ヒトを治療するために医薬組成物及び／又は細胞（複数を含む）を適切な方法で、例えば、適切な用量、剤形又は投与方法で（例えば、本明細書に記載されている用量、剤形又は投与方法）で投与するための使用説明書を包含できる。別の実施態様では、情報資料は、医薬組成物を適切な対象、例えば、ヒト、例えば、癌を有しているか、又は発症の危険性のあるヒトに投与するための使用説明書を包含できる。

【0232】

キットの情報資料はその形態に制限はない。多くの場合、情報資料（例えば、使用説明書）は、活字、図面、及び／又は写真のような印刷物で、ラベル又は印刷紙で、提供される。しかしながら、情報資料は、点字、コンピュータ読み込み可能な物質、録画、又は録音のような、別の形式で提供されてもよい。勿論、情報資料は形式の何れかの組合わせで提供されてもよい。

【0233】

化合物に加えて、キットの組成物は、溶媒又は緩衝液、安定化剤、保存剤及び／又は本明細書に記載されている病気又は疾患を治療するための第2の薬剤のような、その他の成分を包含できる。或いは、その他の成分をキットに包含してよいが、化合物とは異なった組成物又は容器中に包含してもよい。このような実施態様では、キットは、薬剤と他の成分を混合するための、又は1つ又はそれ以上の化合物をその他の成分と共に用いるための使用説明書を包含してもよい。

【0234】

キットは、医薬組成物のために1つ又はそれ以上の容器を包含できる。ある実施態様では、キットは組成物と情報資料を分ける容器、仕切り又は区画を収容できる。例えば、組成物はボトル、バイアル、又は注射器に収容することができ、そして情報資料はプラスチックの管又はパケット内に収容できる。別の実施態様では、キットの別々の構成要素を1つの分かれていない容器に収容できる。例えば、情報資料をラベル形態で付着させているボトル、バイアル又は注射器内に組成物を収容できる。ある実施態様では、キットは、それぞれが医薬組成物の単回投与剤形（例えば、本明細書に記載されている剤形）の1つ又はそれ以上を収容している複数の別々の容器（例えば、パック）を含んでいる。例えば、キットは、それぞれが医薬組成物の単回用量を収容している、複数の注射器、アンプル、ホイルパケット、又はブリスターパックを含むことができる。キットの容器は気密及び／又は防水性にすることができて、容器は特定用途用のラベルを貼ることができる。例えば、容器に聴覚障害を療するために用いるとラベル付けすることができる。

【0235】

上記のように、キットは、組成物の投与に適した器具（例えば、注射器、ピペット、鉗子、スポイト、綿棒、又は何れかのそのような送達器具を任意に包含している。

【実施例】

【0236】

本発明を以下の実施例で更に記載する。これは特許請求の範囲に記載されている本発明の範囲を限定しない。

【0237】

実施例1：ステープル状に架橋されたp53ペプチドの設計、合成、及び特徴づけ

SAH-p53化合物を設計するために、合成オレフィン誘導体を、HDM2との結合に必須の残基を回避する位置に置いた。i、i+7位に架かる炭化水素によるステープル状の架橋を、図1Aに示すように、オレフィンメタセシスで作成した。

【0238】

ペプチド合成、オレフィンメタセシス、F I T C誘導体化、逆相H P L C精製、及びアミノ酸分析を、既に報告されているように実施した。

【0239】

より詳細には、図1BにS A H-p 5 3-8と示される、S A H-5 8-8の配列は、これも図1BにW T p 5 3_{1 4-2 9}と示される、野生型p 5 3転写促進ドメインアミノ酸配列（配列番号1のアミノ酸1 4～2 9）の改変からもたらされた。すなわち、S 2 0とP 2 7位にあるアミノ酸を合成オレフィン残基に置換した。次いで、構造補強「炭化水素によるステーブル状の架橋をBird et al., (Methods Enzymol., 446:369-386 (2008))に記載されている方法に従って、オレフィンメタセシスにより作成した。この方法は参照により本明細書に取り込まれていて、図1Dに説明されている。H D M 2相互作用に必要な追加の残基もペプチドの溶解性及び取り込みを改善するためにBernal et al. (J. Am. Chem. Soc., 129:2456-2457 (2007))に記載されるようにして改変した。S A H-p 5 8-8及びS A H-p 5 3-8の設計及び合成に用いた方法はBernal et al. (J. Am. Chem. Soc., 129:2456-2457 (2007))に記載されていて、この開示は参照により本明細書に取り込まれている。

10

【0240】

コントロールペプチドであるS A H-p 5 3-8_{F 1 9}を、S A H-p 5 3-8のアミノ酸F 1 9（H D M 2相互作用に対する必須アミノ酸（Bottger et al., J. Mol. Biol., 269:744-756 (1997))）をアラニンで置換して作成した。S A H-p 5 3-8_{F 1 9}は、本明細書に記載されている生物学的実験に対するネガティブコントロールとして働く。

20

【0241】

これら及びその他のステーブル状に架橋されたp 5 3ペプチドの配列及びその他の特性は図1Cに示されている。これらのペプチドの特性を評価した。より詳細には、全てが炭化水素のi、i+7のステーブル状の架橋の導入の構造的な効果を評価するために、円偏光二色性（C D）実験を行ってα螺旋性を確認した。

【0242】

図1Cに示すように、野生型p 5 3ペプチドがp H 7. 0の水中で1 1%のα螺旋含量を示したのに対して、S A H-p 5 3-1～4は1 0～5 9%のα螺旋性を示した。S A H-p 5 3-4はタンパク分解安定性の向上も示した。また図1Cに示すように、S A H-p 5 3化合物は無傷J u r k a t T細胞に浸透できなかったのに対して、S A H-p 5 3-5～8は細胞に浸透して生理的なp Hで正に帯電した。従って、この正荷電は、細胞に浸透するペプチドの特性、又は要件であるかもしれない。

30

【0243】

S A H-p 5 3-5～8は、アスパラギン酸とグルタミン酸をアスパラギンとグルタミンで置き換えてペプチドの電荷を調節し、そしてp 5 3の核外輸送（L 1 4 Q）及び潜在的なユビキチン化（K 2 4 R）に関与すると既に報告されている選択アミノ酸を変異させた。これらの改変により、α螺旋含量の2～8. 5倍の増大を示し、H D M 2に対する高い結合親和性を保持し、そしてF A C S及び共焦点顕微鏡によって時間及び温度依存性の細胞取り込みを明らかにしたステーブル状に架橋されたペプチドがもたらされた。S A H-p 5 3ペプチドに曝露したR K O又はS J S A-1癌細胞を用いる細胞生存能アッセイにより、核外輸送及びユビキチン化部位の両方に点突然変異を含んでいる、S A H-p 5 3-8が構造的に安定で細胞浸透性で、そして細胞死を促進することが示された。

40

【0244】

実施例2：S A H-p 5 3-8はH D M X及びH D M 2と結合する

S A H-p 5 3-8のH D M Xとの相互作用を、全長H D M X及びF I T Cで標識化したステーブル状に架橋されたペプチド、W T-p 5 3_{1 4-2 9}、S A H-p 5 3-8、並びにS A H-p 5 3-8_{F 1 9 A}を用いる蛍光偏光を用いて評価した。

【0245】

先に報告されている（Bernal et al., J. Am. Chem. Soc., 129:2456-2457 (2007))よ

50

うにして組み換えHDM2を作成した。

【0246】

組み換えHDMXを作成するために、N-末端チオレドキシン、S、及びヘキサヒスチジンタグを有する全長HDMXをコードするプラスミド、及び組み換えTEVプロテアーゼ開裂部位（pET32-LICベクター、Novagen）を含有している大腸菌BL21（DE3）pLysSを、アンピシリン及びクロラムフェニコールを含有しているLuria-Bertani培地中でインキュベートして、0.1mMのイソプロピルβ-D-チオガラクトシドで誘発した。6時間後に3200rpmで20分間遠心分離して細胞を採取し、緩衝液A（20mM Tris、pH8.0、0.5MのNaCl）に懸濁して、超音波で溶解した。15,000rpmで30分間遠心分離して細胞残屑をペレット化して、上澄液をNi-NTAアガロース（Quiagen）と2時間培養した。樹脂を緩衝液Aで洗浄して5mM～500mM範囲のイミダゾールの濃度勾配で溶出した。溶出したタンパク質を含有している画分を濃縮して組み換えTEV S219Vプロテアーゼ（Kapust et al., Protein Eng., 14:993-1000 (2001)）で1晩4℃で処理した。反応液を2mLまで濃縮してG200カラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。タンパク質の純度をSDS-PAGEによって評価して、その同一性をMALDI-TOF質量分析により確認した。

【0247】

先に記載されている（Bernal et al., J. Am. Chem. Soc., 129:2456-2457 (2007); Pitter et al., Methods Enzymol., 446:387-408 (2008)）ようにしてFPアッセイを実施した。すなわち、ペプチドタンパク質相互作用の解離定数を、蛍光標識化ペプチド（25nM）を全長HDMX又はHDM₁₇₋₁₂₅（25pM～100nM）と培養して測定した。次いで、平衡状態で蛍光偏光をSpectraMax M5マイクロプレートリーダー（Molecular Devices）上で測定した。

【0248】

図2Aに示したように、FITC-SAH-p53-8はHDMXに対して強い親和性（ $KD = 2.3 \pm 0.2$ nM）を示した。このSAH-p53-8の親和性はHDM2に対するSAH-p53-8の親和性（Bernal et al., (J. Am. Chem. Soc., 129:2456-2457 (2007)）によって以前に報告された、 $KD = 55 \pm 11$ nM）を上回った。その一方、図2Aに示されるように、WT-p53₁₄₋₂₉及びSAH-p53-8_{F19A}は同じ用量範囲でHDMXとの相互作用を示さなかった。

【0249】

アセチルで覆われているSAH-p53-8のFITC-SAH-p53-8のHDM2及びHDMXとの高親和性複合体を破壊する能力を試験するために競合結合アッセイも実施した。

【0250】

FPアッセイは、FITC-ペプチド（25nM）をNutlin-3（EMD Chemicals）又は標識化していないSAH-p53-8の連続希釈と組合せたのちHDM2又はHDMXタンパク質（100nM）を添加すること以外は、実質的に上記のようにして（FPアッセイを）行った。FITC-ペプチド置換に対するIC50値は、Prismソフトウェア（GraphPad）を用いる非線形回帰分析で計算した。

【0251】

図2Bに示したように、SAH-p53-8と選択的HDM2阻害剤Nutlin-3の両方は、HDM2結合に対してFITC-SAH-p53-8と効果的に競合した（小分子と比べて比較的大きなステーブル状に架橋されたペプチドの相互作用面が、ある程度、このアッセイで何故SAH-p53-8がNutlin-3より有効であることを説明するだろう）。その一方、図2Cに示したように、SAH-p53-8だけがFITC-SAH-p53-8/HDMX相互作用を断ち切ることができた。

【0252】

これらのデータにより、SAH-p53-8はインビトロでHDM2及びHDMXの両

10

20

30

40

50

方を標的にして、そしてHDM2に対するよりもHDMXに対して25倍強い結合を示すことが明らかにされる。

【0253】

実施例3：SAH-p53-8は細胞内HDMX及びHDM2と結合する

SAH-p53-8の細胞内HDM2及びHDMXを標的にする能力を、HDMXも過剰発現するように遺伝子を組み換えたHDM2を過剰発現する骨肉腫細胞株である、SJSAX細胞(Wade et al., Cell Cycle, 7:1973-1982 (2008))において免疫沈降実験を行って評価した。

【0254】

すなわち、抗FITC破壊実験を以前に記載された(Pitter et al., Methods Enzymol., 446:387-408 (2008); Walensky et al., Mol. Cell., 24:199-210 (2006))ようにして、以下のように実施した。細胞(1.5×10^6)をFITC-SAHP53ペプチド($15 \mu\text{M}$)で処理して緩衝液B(0.1%のトリトンX-100、50mMのTris、pH7.4、150mMのNaCl、1mMのPMSF、EDTAを含まないプロテアーゼ阻害剤錠(Roche)、及び20単位/mLのベンゾナーゼヌクレアーゼ(EMD Chemicals))に溶解した。タンパク質をやぎ抗FITC抗体(AbCam)と共免疫沈降して、電気泳動タンパク質のウェスタン分析をマウス抗HDM2(IF2; EMD Chemicals)、ウサギ抗HDMX(BL1258; Bethyl Laboratories)、及び β -アクチン(Sigma)抗体を用いて実施した。Typhoon 8600 Imaging System(Molecular Dynamics)を用いてプロットの蛍光画像化を実施した。

【0255】

細胞を、賦形剤、FITC-SAHP53-8、又はFITC-SAHP53-8_{F19A}で12時間処理した。細胞溶解物中にFITC-SAHP53-8及びFITC-SAHP53-8_{F19A}の存在を確認するためにウェスタンブロッティングを用い、両方のSAHP53ペプチドが無傷SJSAX細胞に有効に透過することを確認した。次いで、細胞を溶解して、抗FITC破壊を実施した後HDM2及びHDMXウェスタン分析を実施した。図3に示したように、天然のHDM2及びHDMXはFITC-SAHP53-8と特異的に共免疫沈降したが、FITC-SAHP53_{F19A}とは共免疫沈降しなかった。

【0256】

これらのデータは、SAHP53-8が細胞内のHDM2及びHDMX標的の両方にアクセスできることを明らかにしてインビトロの知見を拡張する。

【0257】

実施例4：SAHP53-8はHDMX、HDM2、又はHDMXとHDM2の両方を過剰発現する癌細胞に対して細胞傷害性を示す

細胞生存能に対するSAHP53-8処置の影響を、異なったレベルのHDM2及び／又はHDMXを発現する固形腫瘍細胞のパネルを処置して評価した。使用のために選択した細胞は、HDM2及び／又はHDMXのレベルをp53の機能を減少する程度まで変えられる何種類かの癌を示す。例えば、用いた細胞株は、機能的HDM2が過剰発現されるがHDMXが存在していない(SJSA-1を参照されたい)；HDM2は存在していないが機能的HDMXが過剰発現している(JEG-3を参照されたい)；機能的HDM2及び機能的HDMXが両方過剰発現されている(SJSA-Xを参照されたい)；そしてHDM2とHDMXが発現されている(MCF-7を参照されたい)ヒト癌を表わす。細胞株は、野生型p53を発現するものも包含した。用いた細胞株は以下のものを包含した。

【0258】

SJSA-1、HDMXを発現しないHDM2過剰発現骨肉腫(すなわち、HDM2++／HDMX-細胞株)；

HDM2とHDMXの両方を過剰発現する組み換えSJSA-X誘導体(すなわち、HDM2++／HDMX++細胞株)；

10

20

30

40

50

HDM2を発現しない、HDMX過剰発現絨毛癌細胞株JEG-3（すなわち、HDM2-／HDMX++細胞株）；及び

HDM2を発現してHDMXを発現する乳癌及び結腸癌細胞株MCF-7及びHCT116（すなわち、HDM2+／HDMX+細胞株）（Bunz et al., 1999; Chen et al., 2007; Drukteinis et al., 2005; Kwok et al., 1994; Wade et al., 2008; Xia et al., 2008 を参照されたい）。本明細書に開示されている治療戦略におけるp53の重要性を評価するための、ドミナントネガティブp53-DDタンパク質を発現するSJS-A-DD細胞（Shaulian et al., Mol. Cell. Biol., 12:5581-5592 (1992) 及び Wade et al., Cell Cycle, 7:1973-1982 (2008)）、p53が欠けているHCT116細胞（Bunz et al., J. Clin. Invest., 104:263-269 (1999)）、及びR273Hp53突然変異を有するA431メラノーマ細胞（Kwok et al., Cancer Res., 54:2834-2836 (1994)）。最後に、WSI正常ヒト線維芽細胞を試験して、腫瘍細胞対非形質転換細胞における相対毒性を評価した。これらの細胞株の使用により、癌細胞中のHDM2又はHDMX或いはその両方を標的とする治療戦略の有効性又は効力の分析が可能になる。

【0259】

培養した細胞をウシ胎仔血清及びペニシリン／ストレプトマイシンを補完した適切な培地中で保持した（SJS-A-1、SJS-A-X、SJS-A-DD、A431（DMEM）；JEG-3、MCF-7、WS1（EMEM）；HCT116（McCoy's 5A））。生存能分析のために、 1×10^4 個の細胞を1晩96ウェルのプレートに播種し、PBS中で洗浄し、次いでOPTI-MEM（登録商標）中で24時間示した用量でステープル状に架橋されたp53ペプチド、Nutlin-3（EMD Chemicals）、又はその両方とインキュベートした。生存能を、CellTiter-Glo（登録商標）化学発光試薬を加えて製造会社（Promega）のプロトコルに従ってアッセイした。SpectraMax M5マイクロプレートリーダー（Molecular Devices）を用いて発光を測定した。データを賦形剤で処置したコントロールと正規化して、SAH-p53-8とNutlin-3の間の適切な相乗効果を、CalcuSynソフトウェアパッケージ（Chou, 2006）（Biosoft; Cambridge, UK）を用いて計算した。全ての生存能アッセイを少なくとも3回繰返し実施した。

【0260】

上記のように、培養した細胞を、Nutlin-3、SAH-p53-8、又はSAH-53-8_{F19A}点突然変異コントロールの連続希釈で処置した。図4Aに示したように、SJS-A-1細胞はNutlin-3による処置に対して非常に感受性があつたのに対して、SJS-A-X及びJEG-3細胞はNutlin-3に対して全くか殆ど反応を示さなかった（それぞれ、図4B及び4Cを参照されたい）。つまり、Nutlin-3は機能的HDM2を発現するがHDMXを発現しない細胞（すなわち、SJS-A-1）の細胞生存能を減少する；しかしながら、Nutlin-3は、HDM2を発現しないがHDMXを発現する細胞（すなわち、JEG-3）に有効ではなく、そしてNutlin-3の有効性はHDM2とHDMXの両方を発現する細胞（すなわち、SJS-A-X）で減少する。これらの観察はNutlin-3がHDM2を標的にするがHDMXを標的にしないという能力と一致する。

【0261】

図4D及び4Eに示したように、HDM2とHDMXを発現するが、何れのタンパク質も過剰に発現しない、MCF-7及びHCT116細胞もNutlin-3処置に対して多少は感受性があり、これらの細胞におけるHDM2とHDMXの同時発現と一致する。従って、これらのデータにより、HDM2が過剰発現又は発現されるとき、Nutlin-3は細胞生存能を減少させるが、単独で用いたときのNutlin-3の有効性は、HDMXも過剰に発現している細胞においては減少することが明らかにされる。

【0262】

対照的に、図4A～4Eに示したように、SAH-p53-8は、5つの細胞株全てにおいて細胞生存能の用量依存的な阻害をもたらした。この観察は、細胞が上昇した又は正

10

20

30

40

50

常のレベルでHDM2、HDMX、又は両方のタンパク質を発現するときに、SAH-p53-8はp53経路を再活性化できるということを裏付けている。

【0263】

注目すべきは、図2Bに示したように、インビトロでのNutlin-3と比べて、p53のトランス活性化螺旋をHDM2から移動するSAH-p53-8の能力は相対的に増大したにも関わらず、Nutlin-3はSJS-A細胞においてSAH-p53-8より細胞傷害性であることである（図4Aを参照されたい）。この明確な食い違いは恐らく（1）SAH-p53-8のHDM2と比べて優先的なHDMX結合活性によって、HDM2標的化に利用可能なSAH-p53-8の有効濃度が低下すること、及び（2）ステープル状に架橋されているペプチドに関する細胞取り込みメカニズム（すなわち、飲食細胞作用（Bernal et al., J. Am. Chem. Soc., 129:2456-2457 (2007); Walensky et al., Science, 305:1466-1470 (2004)）及び小分子（すなわち、拡散））の潜在的に異なる効率、に由来しているようだ。SAH-p53-8のHDM2よりもHDMXとの結合優先性を明らかにしている（図2Aを参照されたい）、本明細書に示したインビトロ結合データと一致して、SJS-A-X細胞はSJS-A-1細胞よりもSAH-p53-8に影響を受けやすかった（図4A及び4Bを参照されたい）。更に、HDMXを過剰に発現するJEG-3細胞はSAH-p53-8に対して最も感受性があったが、Nutlin-3に対して最も耐性があった（図4Cを参照されたい）。この知見を以下のメカニズム分析で検討する。

【0264】

SAH-p53-8の細胞傷害性は、野生型p53タンパク質の活性に特異的に依存していて、正常な線維芽細胞の生存能に有意に影響しないことが確認された（図4Iを参照されたい）。HCT116細胞からのp53の遺伝子欠失又はSJS-A-1細胞におけるp53のドミナントネガティブ形態の過剰発現は、両方の細胞型をNutlin-3及びSAH-p53-8に対して完全に非感受性にする（図4F及び4Gを参照されたい）。図4Hに示したように、不活性化されているp53の点突然変異を有している、A431メラノーマ細胞株は、同様に治療による効果がなかった。上記のように、SAH-p53-8は、Nutlin-3と同様に、正常ヒト線維芽細胞の生存能に対して影響を与えないことが明らかになった（図4Iを参照されたい）。

【0265】

特異性を更に測定すると、突然変異ペプチドSAH-p53-8_{F19A}は試験した細胞株全てにおいて不活性であることが観察された（図4A～4Iを参照されたい）。これらのデータはさらに、SAH-p53-8の抗腫瘍細胞活性がペプチド配列依存性であって、そのHDM2及びHDMXの細胞内標的化に由来していることを示している。

【0266】

実施例5：SAH-p53-8は、HDMXが介在するp53の隔離を阻止してp53の腫瘍抑制経路を再活性化する

免疫沈降の検討

Nutlin-3耐性細胞におけるSAH-p53-8の薬理学的効果がHDMX標的化に由来しているのか否かを確認するために、JEG-3細胞株（HDM2-／HDMX++細胞株）において免疫沈降の検討を実施した。

【0267】

HDMX免疫沈降実験のために、細胞（ 1.5×10^6 個）を指示された用量のSAH-p53-8単独又はNutlin-3（EMD Chemicals）単独のいずれかと、0.5 mLのOPTI-MEM（登録商標、Invitrogen）中、10 μ MのMG-132を用いて又は用いなくて6時間培養したこと以外は、実施例3に記載したようにして、細胞培養及び免疫沈降を実施した。PBS（2 $\times$ 1 mL）で洗浄した後、細胞を細胞緩衝液Bに溶解した。HDMXは、抗HDMX抗体（BL1258; Bethyl Laboratories）と免疫沈降して、p53（DO-1; EMD Chemicals 又は FL-393; Santa Cruz Biotechnology）、HDMX（MDMX-82; Abcam）及びHAUSP（抗-USP7, Bethyl Labs）、並びに Western

10

20

30

40

50

L i g h t n i n g 化学発光試薬 (PerkinElmer)を用いて、電気泳動されたタンパク質のウェスタン分析を行った。賦形剤、S A H - p 5 3 - 8、又はN u t l i n - 3で6時間処置した後、細胞抽出物を調製して抗H D M X破壊に付し、続いてp 5 3ウェスタン分析を行った。

【0268】

図5に示したように、J E G - 3は、しっかりとしたレベルのp 5 3タンパク質を有していることが分かり、H D M Xと共免疫沈降した(図5 Aを参照されたい)。S A H - p 5 3 - 8又はN u t l i n - 3の何れかで処置すると、p 5 3レベルの増大が観察された(図4 Aの「インプット」を参照されたい)が、S A H - p 5 3 - 8処置のみがJ E G - 3細胞の生存能に影響を与えた。

10

【0269】

S A H - p 5 3 - 8処置がH D M Xが介在するp 5 3の隔離を、特にp 5 3レベルがH D M 2阻害によって更に促進されているときに、阻害するか否かを試験するためにH D M X I Pを用いた。図5 A「I P : H D M X」に示したように、S A H - p 5 3 - 8は、p 5 3 - H D M X複合体の形成を効果的に阻害し、H D M Xによって少量のp 5 3が免疫沈降した。対照的に、p 5 3 - H D M X複合体は、N u t l i n - 3で処置した細胞内に、増加はしなかったが、保存された(図5 A「I P : H D M X」を参照されたい)。図5 Bに示したように、p 5 3レベルはプロテアソーム阻害剤M G - 1 3 2で細胞を処理することによって更に安定化された。更に、沈降したH D M X - p 5 3複合体の増大によって明らかにされたこの安定性の増大は、S A H - p 5 3 - 8での処理により用量依存的に減少した(図5 Bを参照されたい)。

20

【0270】

S A H - p 5 3 - 8が細胞状況においてp 5 3 / H D M X相互作用を妨害することを立証するために、近接ライゲーション i n s i t u 分析 (proximity ligation in situ assay)、すなわちP - L I S Aを用いて、細胞におけるp 5 3 - H D M X複合体形成及び薬理的解離を直接観察した(Soderberg et al., 2006)(図5 C ~ E)。ドキシサイクリン誘導性H A - H D M X構築物を含有しているU 2 O S骨肉腫細胞(Wang et al., 2007)をS A H - p 5 3 - 8、N u t l i n - 3、又は両方の存在下又は非存在下に、ドキシサイクリンで処理した。ドキシサイクリンのみの存在下で、H A - H D M Xは内因性p 5 3への結合を生じ、検出可能であるが低強度のP - L I S A病巣の形成をもたらした(図5 D、5 E)。ドキシサイクリンとN u t l i n - 3処置の組み合わせにより強いP - L I S Aシグナルが生じ、これはp 5 3 / H A - H D M X複合体の十分な形成を表わしている(図5 D、5 E)。S A H - p 5 3 - 8又はN u t l i n - 3の単剤に対する応答において同様なレベルのp 5 3が誘導された(図5 C)にもかかわらず、ドキシサイクリンでの処置によって生じたP - L I S AシグナルはS A H - p 5 3 - 8との併用処置によって阻害された(図5 D、5 E)。さらに、S A H - p 5 3 - 8をドキシサイクリン / N u t l i n - 3と組み合わせると、ドキシサイクリン / N u t l i n - 3の組み合わせ単独により生じたP - L I S Aシグナルを有意に減少した(図5 D、5 E)。

30

【0271】

まとめると、これらのデータは、N u t l i n - 3ではなく、S A H - p 5 3 - 8が、細胞内H D M Xを標的にするその能力に起因して、p 5 3 - H D M X複合体の形成を阻害することを裏付けている。

40

【0272】

定量的P C R及びアポトーシスの検討

S A H - p 5 3 - 8によるp 5 3 - H D M Xタンパク質複合体の薬理的破壊を、p 5 3腫瘍抑制経路の再活性化と関連付けるために、p 5 3転写活性を、q P C R分析を用いてp 5 3標的の転写活性を評価して、間接的に分析した。p 5 3活性も、アポトーシス活性を用いて間接的に、又はカスパーゼ- 3 / 7活性化アッセイを用いてアポトーシスを測定してより特異的に評価した。

【0273】

50

qPCRの検討を以下のように実施した。JEG-3細胞 (7.5×10^6 個) を6ウェルのプレートに播種して、賦形剤、又は $20 \mu\text{M}$ の SAH-p53-8 若しくは Nutlin-3 (EMD Chemicals) で処置し、そして 37°C で6時間インキュベートした。RNeasy Miniキット (Qiagen) を用いてRNA試料を作成した。Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて全てのRNAをcDNAに逆転写した。誘導されたcDNAを、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いるPRISM 7700システム上でのqRT-PCRによる相対転写レベルを測定するための基質として使用した。HDM2、p21、MIC-1及びUBBコントロールに特異的なプライマーを使用した。96ウェルの光学PCRプレート中で反応を3回繰返し行った。繰返し試験のそれぞれについて閾値サイクル (Ct) 値を自動的に計算して、処置及び未処置試料の両方についてUBBと比較した関心のある遺伝子の相対発現を、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 (Livak and Schmittgen, Methods, 25:402-408 (2001)) によって測定するために用いた。

【0274】

JEG-3細胞を賦形剤、Nutlin-3 ($20 \mu\text{M}$)、又はSAH-p53-8 ($20 \mu\text{M}$) で6時間 37°C で処置した後、RNAを単離し、逆転写して、HDM2、p21、及びMIC-1プライマーを用いて、誘導されたcDNA基質のqPCR分析を行った。図6Aに示したように、Nutlin-3は賦形剤に比べてp53転写標的の小幅な1.5~4倍の上方調節を誘発したのに対して、SAH-p53-8は同じ標的遺伝子に対して有意に高い (5~14倍の) mRNAレベルを誘発した。

【0275】

アポトーシスの検討を以下のように実施した。JEG-3細胞 (1×10^4) を96ウェルのプレートに1晩播種し、PBS中で洗浄し、次いで指定した用量のSAH-p53-8又はNutlin-3 (EMD Chemicals) とOPTI-MEM (登録商標) 中で12時間インキュベートした。カスパーゼ-3/7-Glo (登録商標) 化学発光試薬を製造会社 (Promega) のプロトコルに従って添加し、Spectramax M5マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて発光を測定してカスパーゼ-3/7活性をアッセイした。

【0276】

図6Bに示したように、SAH-p53-8処置は、カスパーゼ-3/7の用量反応性の活性を引き起こしたのに対して、Nutlin-3は殆ど効果がなかった。

【0277】

従って、Nutlin-3耐性JEG-3細胞におけるSAH-p53-8によるp53-HDMX複合体の標的とする破壊は、p53転写標的の上方調節、カスパーゼ-3/7活性化、及び腫瘍細胞生存能の減少と一致して起きる。

【0278】

実施例6：インビボにおけるp53経路の再活性化によるJEG-3腫瘍生育の抑制

SAH-p53-8がインビボでp53経路を調節してそれにより腫瘍の生育を阻害できるのか否かを確認するために、賦形剤、Nutlin-3、及びSAH-p53-8の活性をJEG-3ネズミ移植モデルで比較した。

【0279】

すなわち、NOD-SCID-IL2R γ null (NSG) マウス (Jackson Labs) の脇腹内に 10^7 個の細胞を皮下注射して、JEG-3移植を確立した。腫瘍が平均容量 100 mm^3 に達したときに、実験群 ($n=7$) を、賦形剤 (D5W中5%のDMSO)、SAH-p53-8 (10 mg/kg) 又はNutlin-3 (10 mg/kg) (EMD Chemicals) を1日1回4日間静脈内投与して処置した。1、3、4及び5日目に腫瘍サイズをノギスで測定した。5日目にマウスを安楽死させ、腫瘍を切除し、各腫瘍の一部を急速冷凍して、上記のように、qRT-PCR分析のためにRNAを単離した。各動物の残り部分をブアン固定液中で固定して、完全に解剖するために、the Dana-Farber/Harvard Cancer Center (DF/HCC) Rodent Histopathology Core に提出した。動物実験は、In

stitutional Animal Care and Use Committee of the Dana-Farber Cancer Institute に承認され、且つ規定されるガイドランス及び規制に従って実施した。

【0280】

図7Aに示したように、腫瘍生育速度はNutlin-3処置による影響を受けなかったが、SAH-p53-8は、5日間の評価期間を通して賦形剤及びNutlin-3と比べて全身腫瘍組織量の37～46%の低減を達成及び保持して、腫瘍生育を有意に抑制した。

【0281】

5日目に腫瘍を切除し、急速冷凍して、HDM2、p21、及びMIC-1プライマーセットを用いるqPCR分析のためにRNAを抽出した。培養したJEG-3細胞を用いて実施した対応するインビトロでの検討と同様に、SAH-p53-8は処置したマウスの腫瘍においてHDM2、p21、及びMIC-1の統計的に有意な転写活性を誘発した(図7Bを参照されたい)。SAH-p53-8で処理したマウスの組織学的検査では、培養WS1線維芽細胞を用いる細胞生存能アッセイにおけるSAH-p53-8の不活性と一致して、正常組織に対する化合物の明確な毒性は示されなかった(図4I)。

【0282】

これらのインビボデータは、HDMXが介在するp53の抑制及びNutlin-3耐性に関連して、p53経路を再活性化することにより腫瘍生育を機能的に抑制することを標的にするHDMXの薬理学的潜在力を強調するものである。

【0283】

実施例7：HDM2、HDMX、又は二重機能阻害剤を感受性癌細胞に適合させるための計画

基礎p53レベルが自然に上昇したとき、SAH-p53-8によるHDMXの標的化が腫瘍細胞の生存能の減少に最も効果的であったので、SAH-p53-8が介在するHDMXの阻害が細胞をNutlin-3が介在するp53を上方調節するように再感作できるか否かを試験するためにNutlin-3耐性細胞において相乗効果試験を実施した。

【0284】

高いHDMXを有している細胞において、Nutlin-3での処置によって誘発されるp53のプールを、p53-HDMX複合体中に隔離して、Nutlin-3活性を妨害することができる。従って、そのような細胞におけるSAH-p53-8によるHDMXの阻止は、HDMXが介在するp53の隔離を妨害してNutlin-3の活性を回復させることができると仮定した。乳腺腺癌細胞株MCF-7は、HDMXを過剰発現し(Danovi et al., Mol. Cell. Biol., 24:5835-5843 (2004))、そしてNutlin-3の処置に対して僅かに感受性があるだけである(Wade et al., Cell Cycle, 7:1973-1982 (2008))。図8に示したように、MCF-7細胞においてNutlin-3はp53レベルを上昇させることができるが、このp53の上昇はNutlin-3の細胞傷害性を制限する、阻害性p53-HMDX複合体の出現と同時に起きる。しかしながら、本明細書に示したように、Nutlin-3を用いることによって、MCF-7細胞は、HDMXとの複合体におけるp53の量の増大を明らかに示すJEG-3様状態に薬学的に変換される(図9～10を参照されたい)。より具体的には、組み合わせると、SAH-p53-8とNutlin-3は用量反応性的方法で互いに感作する(図9A～9Bを参照されたい)。図10Aに示したように、Chou (Pharmacol. Rev., 58:621-681 (2006))に記載されるCalcuSyn用量効果分析を用いて相乗効果が確認された。SAH-p53-8との併用処置において観察された細胞傷害性の増大は図9Aに示したそのp53-HMDX複合体形成の阻害と相関していて、MCF-7細胞における耐性の主要な要因であるHDMXを標的にするSAH-p53-8の更なる能力と一致している。更に、図10Bに示したように、内因性p53レベルは既に上昇しているので、Nutlin-3はJEG-3細胞においてSAH-p53-8と相乗作用しない。逆に、SJS-A-1細胞のように、HDMX及びp53の発現レベルが低くて、むしろHDM2発現によって細胞表現

10

20

30

40

50

型が操作されている場合は、SAH-p53-8との併用処置はNutlin-3に更なる利点をもたらさない（図10Cを参照されたい）。しかしながら、この同種細胞株へのHDMXの発現の誘導により、相乗効果の結果を完全に変化させて、Nutlin-3を単剤として効果がないものとして、SAH-p53-8に対する感受性を回復し、そしてNutlin-3をSAH-p53-8治療と組み合わせることの相乗効果を再確立する（図10Dを参照されたい）。SAH-p53-8とNutlin-3を組み合わせることによる相乗的抗腫瘍活性の更なる例がリンパ腫及びメラノーマ癌細胞についても示されている（図10E～G）

【0285】

これらの相乗効果分析により、癌におけるp53経路を再活性化するHDM2及びHDMX標的化剤を如何に適切に適用するかを決定するための機構的な枠組みが提供される。実際に、検出可能なp53-HDMX複合体の存在、治療効果を予測するための潜在的に価値のあるバイオマーカー、及び治療の薬力学的効果のモニタリングに反映されるように、p53レベルが自然に又は薬理学的に増大しているときに、HDMX標的化は最大に効果的である。

【0286】

本明細書に示したように、SAH-p53-8はインビトロ及びインビボでHDMXと高い親和性で結合する。この結合の結果として、SAH-p53-8はp53-HMDX相互作用を減少させ、それによって、例えば、インビトロ及びインビボの両方における（例えば、動物モデルにおいて）腫瘍細胞生存能の減少及びp53標的の転写の上方調節から明らかなように、p53経路を回復させる。

【0287】

本明細書に示したデータは、腫瘍細胞中のある特定のタンパク質のレベルを特徴づけることによって癌を治療するための治療戦略を開発又は改善できることをも明らかにしている。例えば、このような方法は、例えば、腫瘍細胞（例えば、対象における腫瘍細胞又は対象から得た腫瘍細胞（例えば、生検試料中の腫瘍細胞））中の機能的p53の発現（野生型p53発現及び突然変異p53が幾つかの機能（例えば、細胞を本明細書に開示されている1つ又はそれ以上の処置に曝露したときに癌細胞の生存能を減少させるのに十分なp53機能）を保持している限りは突然変異p53発現を包含する）並びにHDMX及び／又はHDM2の発現を確認すること、を包含している。このような方法は以下により詳細に記載されている。

【0288】

その他の実施態様

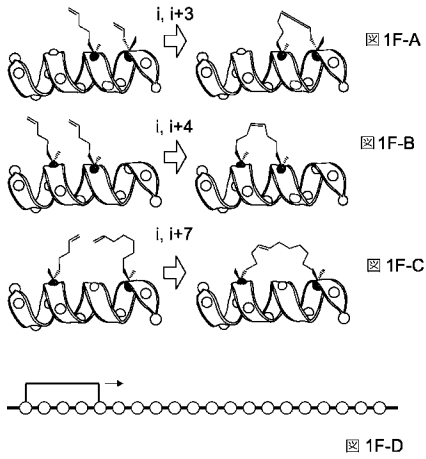
本発明はその詳細な説明と組み合わせて記載されているが、前記記載は添付した特許請求の範囲の範囲によって定義される本発明を説明することを意図して、本発明の範囲を限定することは意図していない。その他の態様、利点、及び改変は以下の特許請求の範囲の範囲内にある。

10

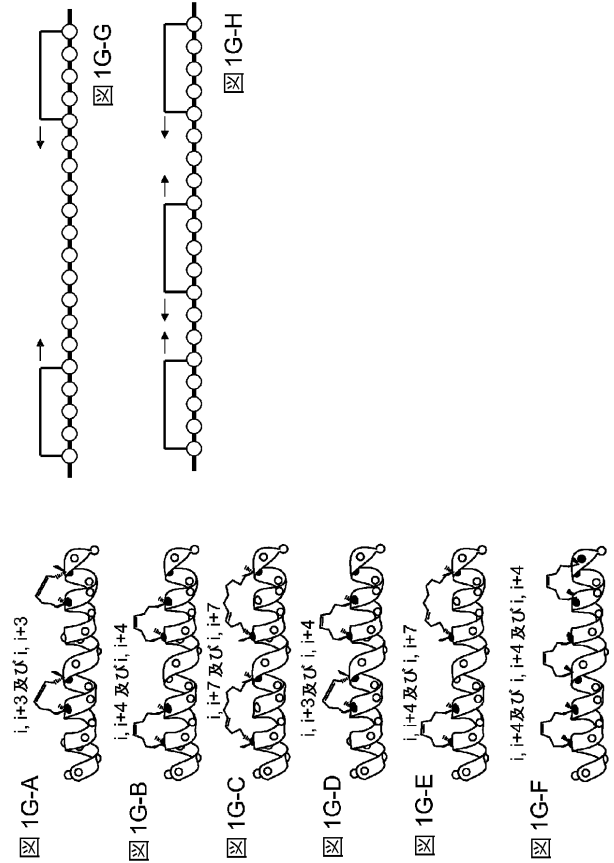
20

30

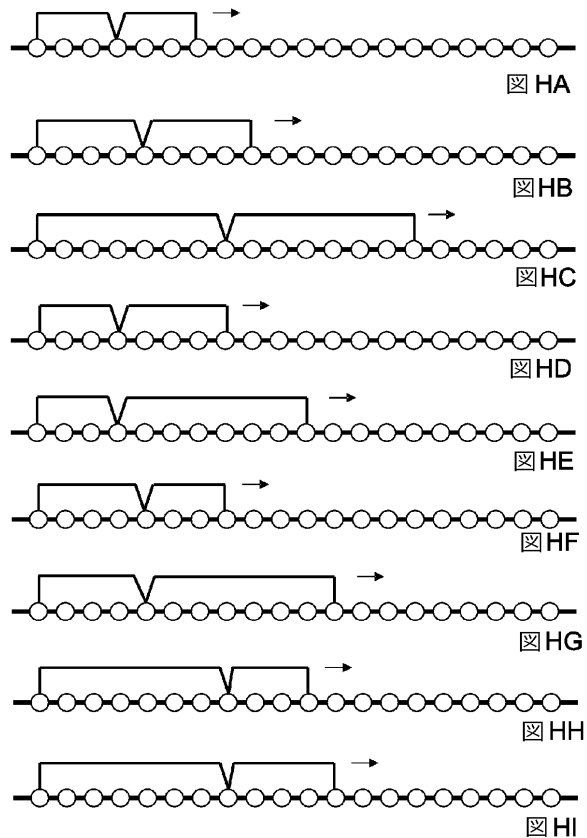
【図 1 - 5】



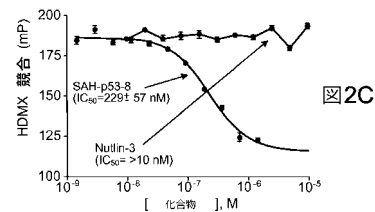
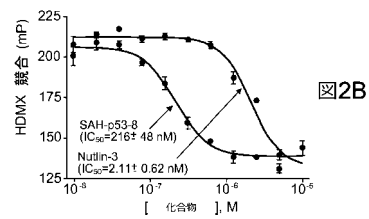
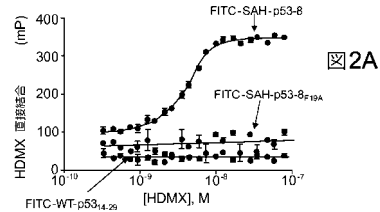
【図 1 - 6】



【図 1 - 7】



【図 2】



【図3】

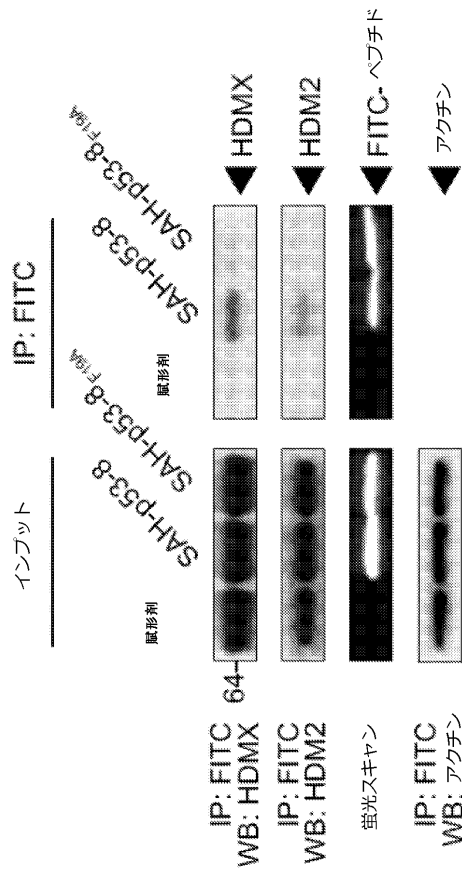


図3

【図4-1】

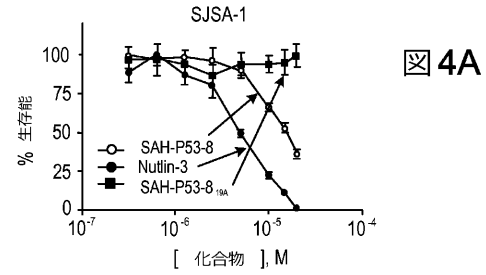


図4A

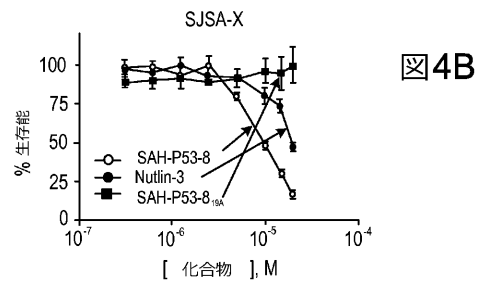


図4B

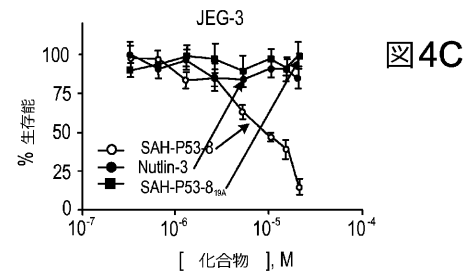


図4C

【図4-2】

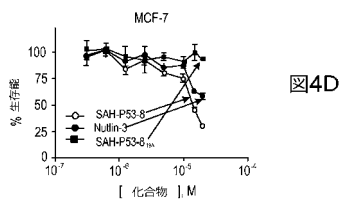


図4D

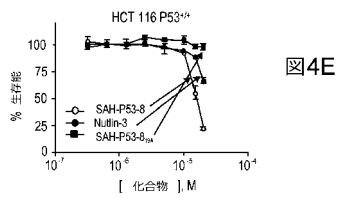


図4E

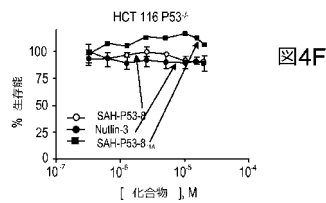


図4F

【図4-3】

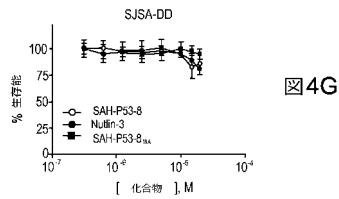


図4G

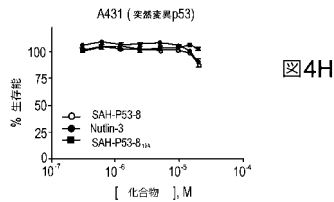


図4H

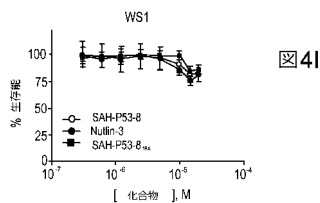


図4I

【図 5 - 1】

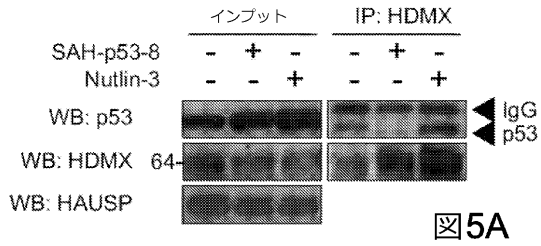


図5A

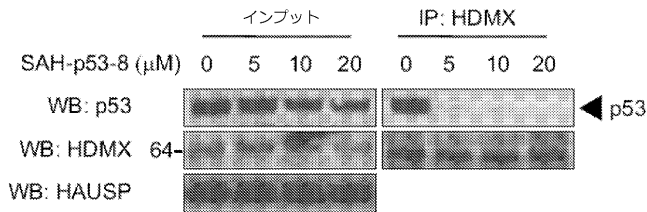
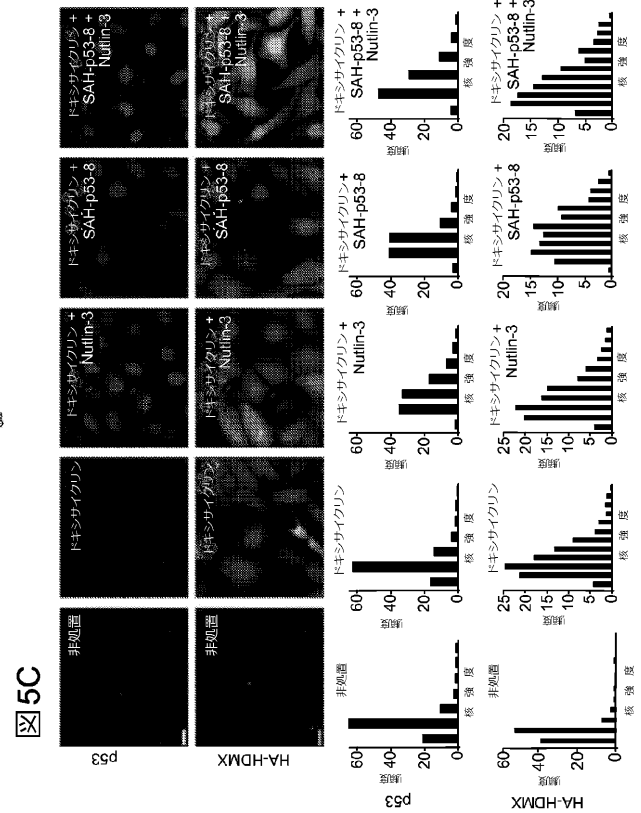


図5B

【図 5 - 2】



【図 5 - 3】

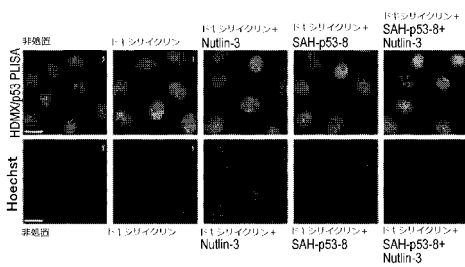


図5D

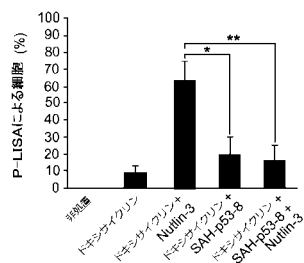


図5E

【図 6】

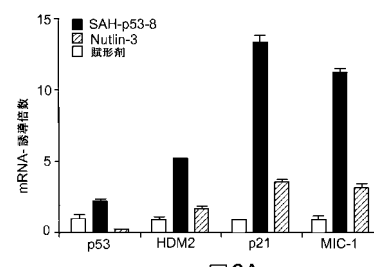


図6A

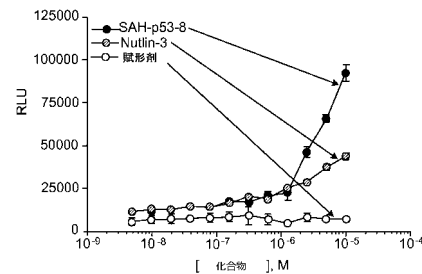


図6B

【図 7】

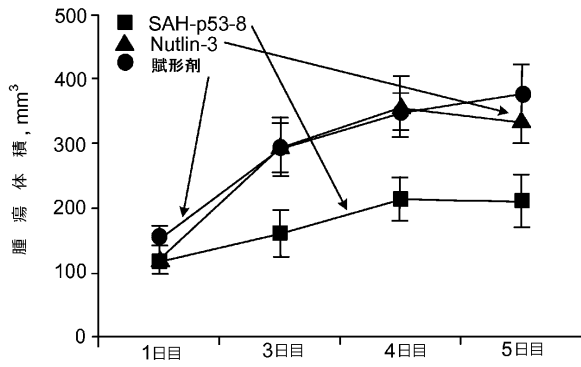


図 7A

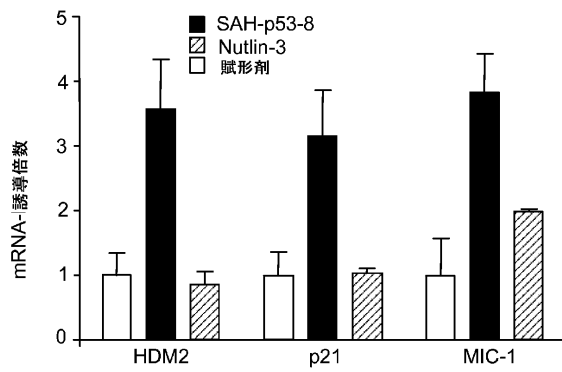


図 7B

【図 9】

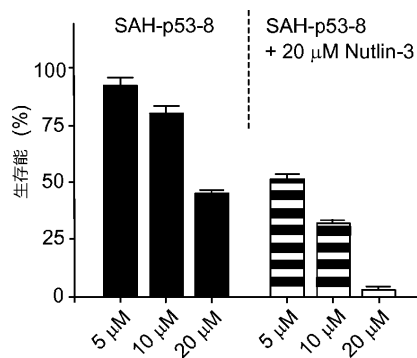


図 9A

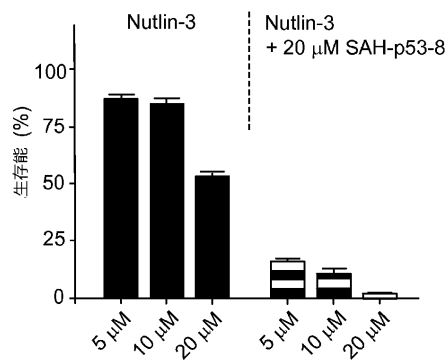
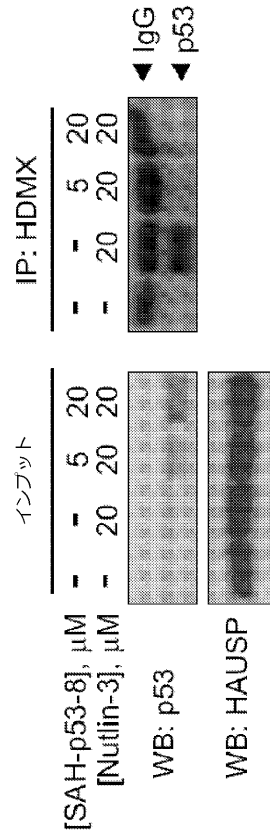


図 9B

【図 8】



8

【図 10 - 1】

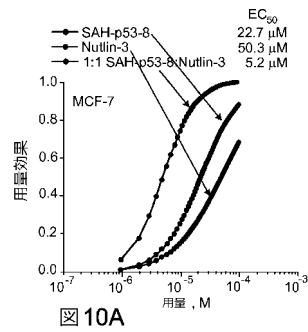


図 10A

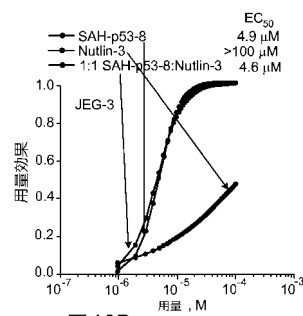


図 10B

【図 10-2】

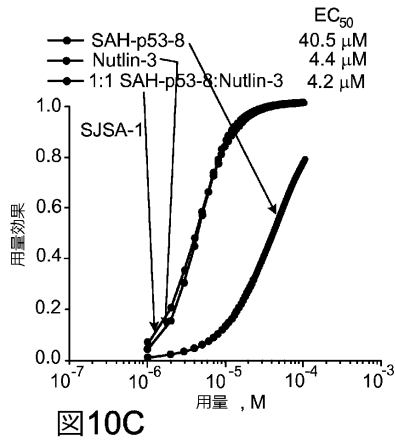


図 10C

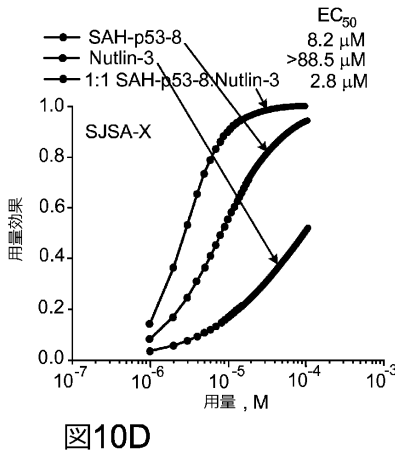


図 10D

【図 10-4】

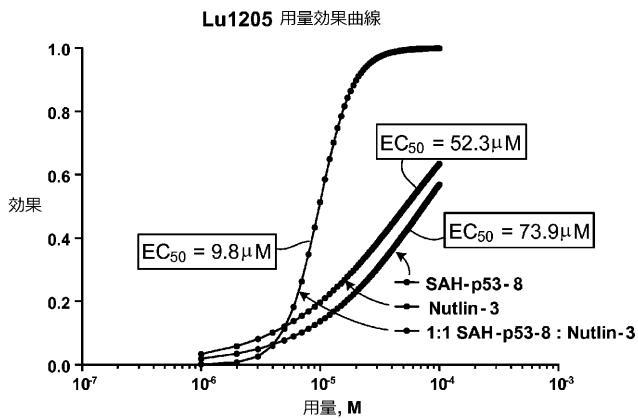


図 10G

【図 10-3】

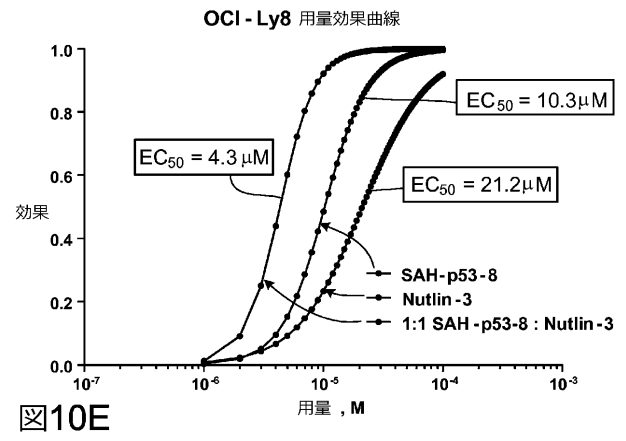


図 10E

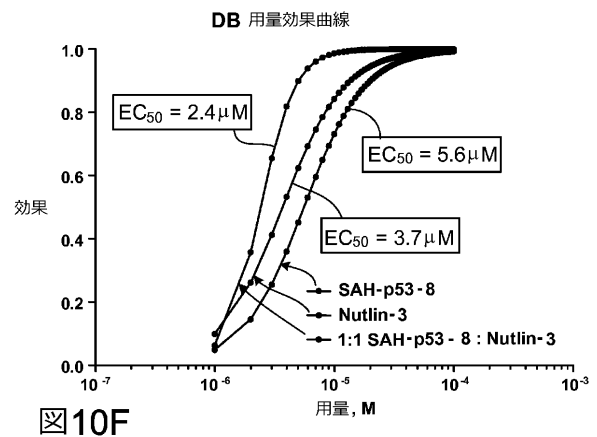
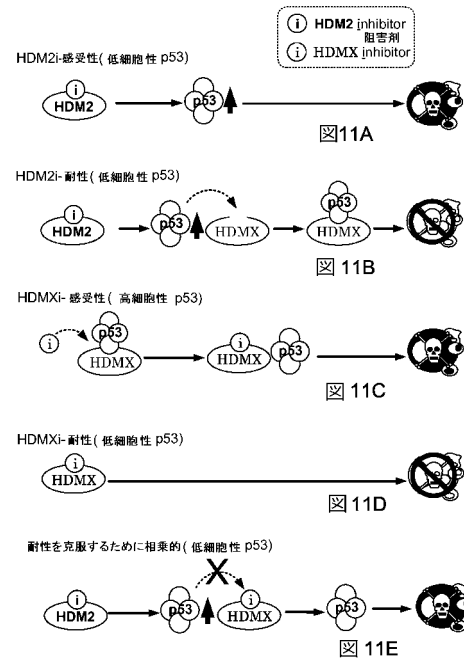


図 10F

【図 11】



【配列表】

【図 1 3】

1 meeqpsdpv epllsqetfs dlwklpenn vlspplsqam ddmlmldpddi eqwftedpqp
61 deaprmpeaa prvpapaap tpaapapaps wplssvpsq ktyqsgsygr lgflhsqtak
121 svctcyspal nkmcqlakt cpvqlwvdst ppgttrvram aiyksqmnt evvrrcpbbe
181 rcsdsdgnlap qhlirvegn lrveylddrn trfshvvvpy eppevsqdst tihynmcns
241 scmgmgnrrp phtitieds sngllgrnsf evrvacpgr drteeenlr kkgpehhelp
301 pgstkralpn ntssspqkk kpldgyftl qirgrazefm frelneael kdaqagkep9
361 gsrhshhlik skkgqstsrh kklmfkktegp dsd (配列番号:1)

13

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/60647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/10 (2012.01) USPC - 514/21.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/21.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 530/326 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google, Google Scholar: p53, Double minute 2 protein, Mdm2, hdm2, HDMX, SAH-p53-8, nutlin-3, MDM4,MDMX, HDMX GenCore 6.3: SEQ ID NO: 2, 22		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	Read, et al. Identification and characterization of the first small molecule inhibitor of MDMX. J Biol Chem. April 2010, 285(14):10786-96; Abstract, pg 10787, col 2, Fig. 1B	1, 6-14 ----- 2-5
Y	US 2010/0168388 A1 (Bernal, et al.) 01 July 2010 (01.07.2010) para [0077]-[0079], [0087], [0097], [0102], Fig 3 and 16-1, compound 15	2-5
A	US 2008/0280769 A1 (Doemling) 13 November 2008 (13.11.2008) ABSTRACT, para [0002], [0022]-[0027], [0032]-[0033], [0146]-[0149]	1-14
A	US 2010/0075949 A1 (Burdack, et al.) 25 March 2010 (25.03.2010) para [0002]-[0020], [0022]-[0028], [0146]-[0149]	1-14
A	Bernal, et al. Therapeutic reactivation of p53 through dual targeting of HDM2 and HDMX with a stapled p53 peptide. Molecular Cancer Therapeutics 2009, 8(12S):Abstract C174	1-14
A	WO 2008/106507 A2 (Chen, et al.) 04 September 2008 (04.09.2008)	1
A	Hu, et al. Efficient p53 activation and apoptosis by simultaneous disruption of binding to MDM2 and MDMX. Cancer Res. 2007, 67(18):8810-8817	1-14
X,P	Bernal, et al. A stapled p53 helix overcomes HDMX-mediated suppression of p53. Cancer Cell. 18 November 2010, 18(5):411-422	1-14
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June 2012 (30.06.2012)		Date of mailing of the international search report 10 JUL 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/80847

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore 6.3: SEQ ID NO: 2, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/60647

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Bernal, et al. Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. J Am Chem Soc. 2007, 129(9):2456-7	1-14
A	Toledo, et al. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. Int J Biochem Cell Biol. 2007, 39(7-8):1476-82	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/60647

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 57, 72-81
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: claims 1-14, drawn to a method for increasing p53 activity in a cell, the method comprising:
obtaining a cell that encodes or expresses p53 (e.g., functional p53);
determining whether HDMX is expressed in the cell; and
if HDMX is expressed, contacting the cell with a HDMX modulating agent, thereby increasing p53 activity in the cell.

Group II: claims 15-50, 55-56, 58-68, drawn to a method for increasing p53 activity in a cell by obtaining a cell in which p53 activity is not substantially increased upon treatment with a HDM2 modulating agent (e.g., Nutlin-3); and contacting the cell with a HDMX modulating agent, thereby increasing p53 activity in the cell.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/60847

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group III: claims 51-54, drawn to an isolated protein complex consisting of p53 and HDMX.

Group IV: claims 69-71, drawn to an internally cross-linked polypeptide comprising at least six contiguous amino acids of the amino acid sequence SEQ ID NO: 22.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I-III do not include the inventive concept of an internally cross-linked polypeptide comprising at least six contiguous amino acids of the amino acid sequence SEQ ID NO: 22, as required by Group IV.

The inventions of Groups I-II do not include the inventive concept of an isolated protein complex consisting of p53 and HDMX, as required by Group III.

The inventions of Group I do not include the inventive concept of a method for increasing p53 activity in a cell by obtaining a cell in which p53 activity is not substantially increased upon treatment with a HDM2 modulating agent (e.g., Nutlin-3); and contacting the cell with a HDMX modulating agent, thereby increasing p53 activity in the cell, as required by Group II.

In addition, a method of claim 1 does not represent a contribution over prior art as being anticipated by an article titled "Identification and characterization of the first small molecule inhibitor of MDMX" by Reed, et al. (J Biol Chem. April 2010, 285(14):10786-96) (hereinafter "Reed") that discloses a method for increasing p53 activity in a cell, the method comprising:

obtaining a cell that encodes or expresses p53 (e.g., functional p53) (Abstract, "[o]ne common mechanism for inactivation of the p53 pathway in tumors that express wild-type p53 is increased expression of MDM2 or MDMX. MDM2 and MDMX bind p53 and inhibit its function by distinct nonredundant mechanisms");

determining whether HDMX is expressed in the cell (pg 10787, col 2, "From these curves, the EC50 for p53 peptide-MDMX was 0.36 mM and that for p53 peptide-MDM2 was 0.23 mM (Fig. 1B)"; Fig 1B); and

if HDMX is expressed, contacting the cell with a HDMX modulating agent, thereby increasing p53 activity in the cell (Abstract, MDMX inhibitor SJ-172550, "This compound binds reversibly to MDMX and effectively kills retinoblastoma cells in which the expression of MDMX is amplified. ... This lead compound is a useful chemical scaffold for further optimization of MDMX inhibitors that may eventually be used to treat pediatric cancers and various adult tumors that overexpress MDMX or have similar genetic lesions. When combined with selective MDM2 inhibitors, SJ-172550 may also be useful for treating tumors that express wild-type p53" (Abstract), wherein MDMX is a synonym for HDMX, as evidenced by an IHO entry titled "MDM2 Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)" [Retrieved from the Internet 20 April 2012: <<http://www.ihop-net.org/UniPub/IHOP/gs90034.html>>].

Groups I-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)	
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	4/00	(2006.01)	C 0 7 K	4/00	
C 0 7 K	7/00	(2006.01)	C 0 7 K	7/00	
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A

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

(71)出願人 513116302

ザ ソーク インスティテュート フォー バイオロジカル スタディーズ, インテレクチュアル プロパティー アンド テクノロジー トランスファー
THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES, I
NTELLECTUAL PROPERTY AND TECHNOLOGY TRANSFER
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92186-5800 サンディエゴ, ピー. オー. ボックス 85800

(74)代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

(74)代理人 100182486

弁理士 中村 正展

(74)代理人 100189131

弁理士 佐伯 拓郎

(74)代理人 100147289

弁理士 佐伯 裕子

(74)代理人 100158872

弁理士 牛山 直子

(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 02459 ニュートン・センター コモンウェルス・アベニュー 811

(72)発明者 フェデリコ バナール

アメリカ合衆国 メリーランド州 20878 ゲイザースバーグ レイジー・ホロー・ウェイ 8

(72)発明者 ジェフリー ウォール

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92103 サンディエゴ アルゲロ・ストリート 4258

(72)発明者 マーク ウェード

イタリア共和国 イー34074 ゴリツィア モンファルコネ ヴィア・ジャコモ・レオパルディヌーメロ6

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ02 QQ42 QQ58 QR55

4B065	AA90X	BB19	CA24	CA44							
4C084	AA02	AA07	AA20	BA01	BA08	BA18	BA44	CA18	CA53	MA02	
	NA05	NA14	ZB261	ZC411	ZC751						
4H045	AA10	BA09	BA40	CA40	CA41	DA75	DA89	EA29	FA20	FA74	