

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4908215号
(P4908215)

(45) 発行日 平成24年4月4日 (2012. 4. 4)

(24) 登録日 平成24年1月20日 (2012. 1. 20)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/403 (2006. 01)

A 6 1 P 25/28 (2006. 01)

C O 7 D 209/88 (2006. 01)

C O 7 D 209/86 (2006. 01)

C O 7 D 209/80 (2006. 01)

A 6 1 K 31/403

A 6 1 P 25/28

C O 7 D 209/88

C O 7 D 209/86

C O 7 D 209/80

請求項の数 6 (全 74 頁)

(21) 出願番号	特願2006-526388 (P2006-526388)	(73) 特許権者	504058282
(86) (22) 出願日	平成16年9月13日 (2004. 9. 13)		エリクサー ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2007-505148 (P2007-505148A)		E L I X I R P H A R M A C E U T I C A L S , I N C .
(43) 公表日	平成19年3月8日 (2007. 3. 8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 オ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/029942		2 1 3 9 ケンブリッジ ワン ケンドール
(87) 国際公開番号	W02005/026112		スクウェア ビルディング 1 0 0 0
(87) 国際公開日	平成17年3月24日 (2005. 3. 24)		ーフィフス フロア
審査請求日	平成19年9月13日 (2007. 9. 13)	(74) 代理人	100073184
(31) 優先権主張番号	60/502, 811		弁理士 柳田 征史
(32) 優先日	平成15年9月12日 (2003. 9. 12)	(74) 代理人	100090468
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 佐久間 剛
(31) 優先権主張番号	60/531, 443		
(32) 優先日	平成15年12月19日 (2003. 12. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

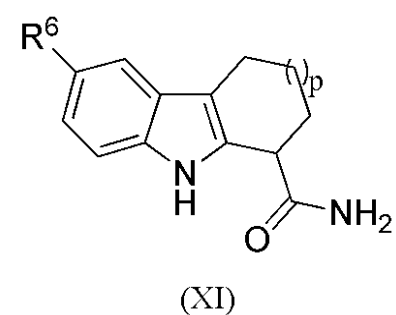
(54) 【発明の名称】 疾患の治療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリグルタミン凝集が介在する神経変性疾患を治療するための組成物であって、下記化学式 (XI) で表される化合物を含むことを特徴とする組成物。

【化 1】



(ここで、R⁶は、ハロゲン、C₁-C₆アルキル、C₁-C₆ハロアルキル、またはC₁-C₆ハロアルコキシであり；さらに

pは0、1または2である。)

【請求項 2】

R⁶は、ハロゲンまたはC₁-C₆アルキルであることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

R⁶は、クロロまたはメチルであることを特徴とする請求項1記載の組成物。

【請求項4】

前記化合物が、6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸アミドであることを特徴とする請求項1記載の組成物。

【請求項5】

前記神経変性疾患が、ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症（SBMAまたはケネディ病）、齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）、脊髄小脳性運動失調1（SCA1）、脊髄小脳性運動失調2（SCA2）、マシャード-ジョセフ病（MJD；SCA3）、脊髄小脳性運動失調6（SCA6）、脊髄小脳性運動失調7（SCA7）または脊髄小脳性運動失調12（SCA12）であることを特徴とする請求項1から4いずれか1項記載の組成物。

10

【請求項6】

前記神経変性疾患がハンチントン病であることを特徴とする請求項5記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2003年9月12日出願の米国特許出願第60/502,811号、2003年12月19日出願の米国特許出願第60/531,443号、および2004年4月7日出願の米国特許出願第60/560,509号に基づき、35 USC § 119(e)による優先権を主張し、参照によりこれら各特許の全内容を本明細書中に取り込む。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

Sir2タンパク質は、NADを補因子として使用する脱アセチル化酵素である（非特許文献1から5）。遺伝子のサイレンシングを伴う他の多くの脱アセチル化酵素とは異なり、Sir2は、トリコスタチンA（TSA）などのようなヒストン脱アセチル化阻害剤の影響を受けない（非特許文献1；非特許文献6；非特許文献3）。

【非特許文献1】イマイ（Imai）ら、2000

【非特許文献2】モアゼド（Moazed）、2001

【非特許文献3】スミス（Smith）ら、2000

30

【非特許文献4】タナー（Tanner）ら、2000

【非特許文献5】タニー（Tanny）およびモアゼド（Moazed）、2001

【非特許文献6】ランドリー（Landry）ら、2000a

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0003】

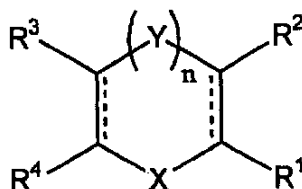
本発明は、置換複素環式化合物、そのような化合物を含有する組成物、ならびに、そのような化合物および組成物の使用法に関する。そのような化合物およびそれらを含有する組成物は、サーチュイン（sirtuin）（SIRT1など）に媒介される、また、脱アセチル化に媒介されるような疾病または疾病症状の治療に有用である。

40

【0004】

ひとつの側面から見ると、本発明は、対象体内の疾患（例えば、本明細書に記載している疾患など）の治療法または予防法に関する。そのような方法には、下記化学式（I）を有する化合物の有効量を対象に投与することを含み：

【化 1】



【 0 0 0 5】

ここで、 R^1 および R^2 は、それらが結合している炭素と共に、C5-C10シクロアルキル、C5-C10複素環、C5-C10シクロアルケニル、C5-C10ヘテロシクロアルケニル、C6-C10アリール、またはC6-C10ヘテロアリールを形成しており、それぞれ1-5 R^5 で必要に応じて置換されており；あるいは、 R^1 はH、S-アルキル、またはS-アリールであり、 R^2 はアミドアルキルであって、窒素原子はアルキル、アリールまたはアリールアルキルで置換されており、それらはさらにアルキル、ハロゲン、水酸基またはアルコキシル基で必要に応じて置換されており；

R^3 および R^4 は、それらが結合している炭素と共に、C5-C10シクロアルキル、C5-C10複素環、C5-C10シクロアルケニル、C5-C10ヘテロシクロアルケニル、C6-C10アリール、またはC6-C10ヘテロアリールを形成しており、それぞれ1-5 R^6 で必要に応じて置換されており；

R^5 および R^6 は、それぞれ別異に、ハロゲン、水酸基、C1-C10アルキル、C1-C6ハロアルキル、C1-C10アルコキシ、C1-C6ハロアルコキシ、C6-C10アリール、C5-C10ヘテロアリール、C7-C12アラルキル、C7-C12ヘテロアラルキル、C3-C8複素環、C2-C12アルケニル、C2-C12アルキニル、C5-C10シクロアルケニル、C5-C10ヘテロシクロアルケニル、カルボキシ、カルボキシレート、シアノ、ニトロ、アミノ、C1-C6アルキルアミノ、C1-C6ジアルキルアミノ、メルカプト、 SO_3H 、スルフェート、 $S(O)NH_2$ 、 $S(O)_2NH_2$ 、ホスフェート、C1-C4アルキレンジオキシ、オキソ、アシル、アミノカルボニル、C1-C6アルキルアミノカルボニル、C1-C6ジアルキルアミノカルボニル、C1-C10アルコキシカルボニル、C1-C10チオアルコキシカルボニル、ヒドラジノカルボニル、C1-C6アルキルヒドラジノカルボニル、C1-C6ジアルキルヒドラジノカルボニル、ヒドロキシアミノカルボニル、アルコキシアミノカルボニル；あるいは、 R^5 もしくは R^6 のうちのひとつと R^7 とが、4~6個の炭素、1~3個の窒素、0~2個の酸素および1~2個の硫黄を含む環状部位を形成しており、そのような部位はオキソもしくはC1-C6アルキルで必要に応じて置換されており；

Xは NR^7 、OまたはSであり；Yは $NR^{7'}$ 、OまたはSであり；

-----は追加の二重結合を表し；

R^7 および $R^{7'}$ は、それぞれ別異に、水素、C1-C6アルキル、C7-C12アリールアルキル、C7-C12ヘテロアリールアルキルであり；あるいは、 R^7 と、 R^5 もしくは R^6 のうちのひとつとが、4~6個の炭素、1~3個の窒素、0~2個の酸素および1~2個の硫黄を含む環状部位を形成しており、そのような部位はオキソもしくはC1-C6アルキルで必要に応じて置換されており；さらに、nは0または1である。

【 0 0 0 6】

実施態様には以下の条件のうちのひとつまたはそれ以上を含む場合がある。

【 0 0 0 7】

特定の実施態様においては、nは1である。

Xは NR^7 であり、Yは $NR^{7'}$ である。 R^7 および $R^{7'}$ はそれぞれ、例えば、水素または CH_3 である。 R^7 および $R^{7'}$ のうちのひとつは水素であり、他方は CH_3 である。

R^1 および R^2 はC5-C10シクロアルケニルを形成することができる。

R^1 および R^2 はC6-C10アリールを形成することができる。

R^1 および R^2 は、C5-C10シクロアルケニルを形成することができるが、それを R^5 で置換することができる、さらに R^3 および R^4 はC6-C10アリールを形成することができる、それを R^6 で置換することができる。

【0008】

特定の実施態様においては、シクロアルケニルの二重結合は R^1 に結合している炭素と R^2 に結合している炭素との間に存在する。C5-C10シクロアルケニル（例えば、C6またはC7シクロアルケニルなど）は R^5 で置換することができ、また、C6-C10アリールは R^6 で置換することができる。

R^6 は、ハロゲン（例えば、塩素または臭素など）、C1-C6アルキル、（例えば、 CH_3 など）、C1-C6ハロアルキル（例えば、 CF_3 など）、またはC1-C6ハロアルコキシ（例えば、 OCF_3 など）である。 R^5 は、例えば、アミノ置換基などの置換基で置換されたC1-C6ハロアルキル、または、アミノカルボニル（例えば、置換アミノカルボニル、例えば、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アルコキシカルボニルまたはその他の置換基で置換されたアミノカルボニルなど。各例において、置換基は、さらに他の置換基で置換することができる）である。

10

n は0の場合がある。

R^1 および R^2 はC5-C10シクロアルケニルを形成することができる。

R^1 および R^2 はC6-C10アリールを形成することができる。

X は NR^7 であり、 R^7 は例えば、水素または CH_3 である。

R^1 および R^2 はC5-C10シクロアルケニルを形成することができるが、それを R^5 で置換することができ、さらに、 R^3 および R^4 はC6-C10アリールを形成することができるが、それを R^6 で置換することができる。

20

【0009】

特定の実施態様においては、シクロアルケニルの二重結合は R^1 に結合している炭素と R^2 に結合している炭素との間に存在する。C5-C10シクロアルケニル（例えば、C6またはC7シクロアルケニルなど）は R^5 で置換することができ、また、C6-C10アリールは R^6 で置換することができる。

R^6 は、ハロゲン（例えば、塩素など）、C1-C6アルキル、（例えば、 CH_3 など）、C1-C6ハロアルキル（例えば、 CF_3 など）、またはC1-C6ハロアルコキシ（例えば、 OCF_3 など）である。 R^5 は、アミノカルボニルである。

n は0の場合がある。

R^1 および R^2 はC5-C10シクロアルケニルを形成することができる。

30

R^1 および R^2 はC6-C10アリールを形成することができる。

X は NR^7 であり、 R^7 は例えば、水素または CH_3 である。

R^1 および R^2 はC5-C10シクロアルケニルを形成することができるが、それを R^5 で置換することができ、さらに、 R^3 および R^4 はC6-C10アリールを形成することができるが、それを R^6 で置換することができる。

【0010】

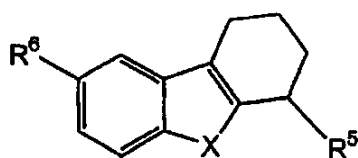
特定の実施態様においては、シクロアルケニルの二重結合は R^1 に結合している炭素と R^2 に結合している炭素との間に存在する。C5-C10シクロアルケニル（例えば、C6またはC7シクロアルケニルなど）は R^5 で置換することができ、また、C6-C10アリールは R^6 で置換することができる。

40

【0011】

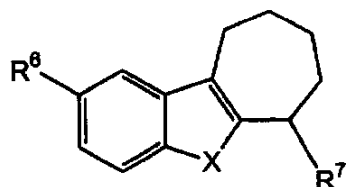
これらの化合物は、化学式(II)または化学式(III)を有する：

【化2】



(II)

10



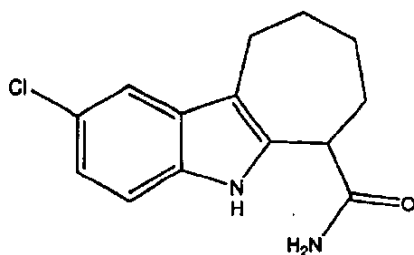
(III)

20

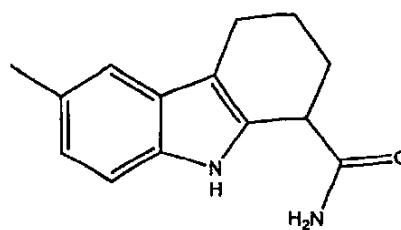
【0012】

R⁶は、ハロゲン（例えば、塩素または臭素など）、C1-C6アルキル、（例えば、CH₃など）、C1-C6ハロアルキル（例えば、CF₃など）、またはC1-C6ハロアルコキシ（例えば、OCF₃など）である。R⁵は、アミノカルボニルである。そのような化合物は、図1または化合物(IV)、(V)、(VI)もしくは(VII)から選択される化合物である。

【化3】

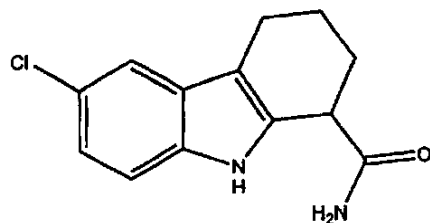


(IV)

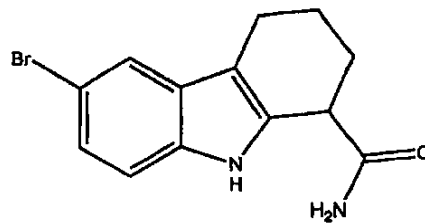


(V)

30



(VI)



(VII)

40

【0013】

いくつかの例においては、化合物は、ひとつの異性体のエナンチオマー過乗率が高い、化学式(VI)で表される化合物であり、主要異性体の旋光度は -14.1 (c=0.33, DCM中) である。いくつかの例においては、化学式(IV)、(V)または(VII)で表される化合物は、ひとつの異性体のエナンチオマー過乗率が高くなるように処理され、このとき、これ

50

らの主要異性体は、旋光度が -14.1 ($c = 0.33$, DCM中)である化学式(VI)の異性体に対応する。

【0014】

そのような化合物は、SIRT1に対する選択的阻害が、非SIRT1サーチュインに対するそれよりも、例えば、少なくとも1.5倍、2倍、5倍、または10倍強い。そのような化合物のSIRT1に対する K_i 値は、500nM、100nM、50nMまたは40nM以下である。

【0015】

いくつかの例においては、FoxO1またはFoxO3などのFOXO転写因子の活性を減弱させる。

【0016】

投与量は、疾患の少なくともひとつの症状を緩和するのに有効な量である。疾病または疾患としては、例えば、加齢関連疾患、老人性疾患、加齢関連感受性因子を有する疾患、新生物疾患、非腫瘍性疾患、神経性疾患、心血管疾患、代謝性疾患、皮膚疾患もしくは皮膚組織状態などが挙げられる。ひとつの実施態様においては、疾病または疾患は、神経変性疾患もしくは疾患であり、神経変性疾患は、少なくとも部分的には、ポリグルタミン凝集が介在しており、そのような疾患としては例えば、ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症(SBMAまたはケネディ病)、齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、脊髄小脳性運動失調1(SCA1)、脊髄小脳性運動失調2(SCA2)、マシャード-ジョセフ病(MJD; SCA3)、脊髄小脳性運動失調6(SCA6)、脊髄小脳性運動失調7(SCA7)、および脊髄小脳性運動失調12(SCA12)などが挙げられる。神経変性疾患としては、パーキンソン病またはアルツハイマー病などが挙げられる。

【0017】

疾病または疾患は、少なくとも部分的には、サーチュインに関連している、もしくは介在しており、例えば、疾病または疾患は、少なくとも部分的には、サーチュイン媒介脱アセチル化(例えば、サーチュイン活性過剰、または、脱アセチル化p53、FoxO1もしくはFoxO3のレベル過剰などが関連している、もしくは介在している。サーチュインとしてはSIRT1、例えば、ヒトSIRT1などである。

【0018】

疾病または疾患は癌である。投与量は、例えば、癌もしくは腫瘍細胞塊を縮小させる、転位のリスクを低減する、または、腫瘍細胞の増殖速度を抑制するのに有効な量である。投与量は、アポトーシスを調節する(例えば、増やすなど)のに有効な量である。

【0019】

疾病または疾患は、代謝性症候群または糖尿病(例えば、I型糖尿病またはII型糖尿病など)などのような代謝性疾患である。投与量は、例えば、インシュリン感受性を上昇させる、インシュリン分泌を増やすなど、またはブドウ糖レベルを下げるのに有効な量である。いくつかの例においては、疾病または疾患は、糖尿病性心疾患などのような代謝性疾患に関連がある。

【0020】

疾病または疾患は、肥満症または脂質代謝異常もしくは高脂血症などの脂肪関連疾患である。投与量は、例えば、対象の体重を減少させる、または対象の体重増加を阻止するのに有効な量である。

【0021】

疾病または疾患は、アルツハイマー病またはパーキンソン病などの神経性疾患である。投与量は、例えば、神経性疾患の症状のうちのひとつもしくはそれ以上を軽減するのに有効な量である。

【0022】

投与方法としては、化合物を1回以上、例えば、化合物を繰り返し投与するなどのような投与方法が含まれる。化合物は、1回もしくはそれ以上のボラス静注または連続静注を行うことによって投与できる。化合物は、外部から(例えば、注射、経口摂取、吸入など)または内部から(例えば、埋込デバイスなど)投与することができる。

【0023】

10

20

30

40

50

投与方法としては、化合物を局所に投与することが含まれる。

【0024】

投与量は、対象体内の少なくとも数個の細胞内でサーチュイン基質（ヒストンまたは転写因子（例えば、p53、FoxO1またはFoxO3など）のような核タンパク質など）のアセチル化を増加させるのに有効な量である。

【0025】

対象は、ヒトなどの哺乳類である。

【0026】

対象は、そのような治療または予防の必要性があると判断されたものである。

【0027】

投与方法としては、さらに、対象細胞内のサーチュイン活性を評価する、サーチュインをコードしている核酸内のヌクレオチド同一性を評価する、新生物細胞または新生物増殖（例えば、腫瘍など）に関して対象を評価する、生検などによって対象の細胞内の遺伝子組成もしくは遺伝子の発現を評価するなどによってそのような治療の必要性を判断することを含む。

10

【0028】

投与方法としては、さらに、対象を画像化する、対象の体内の腫瘍の大きさを測定する、対象の細胞内のサーチュイン活性を評価する、副作用（例えば、腎機能に対してなど）に関して対象を評価するなどのような対象のモニタリングを含む。

【0029】

20

別の側面から見ると、本発明は、サーチュインによって媒介される基質（FoxO転写因子など）の脱アセチル化を阻害する方法に関する。方法には、サーチュインを化学式（I）で表される化合物と接触させることを含む。阻害は、イン・ビトロ（in vitro）において、セルフリー培地中、細胞培養中で、または生物体内（例えば、哺乳類、好ましくはヒトなど）で生じる。

【0030】

さらに別の側面においては、本発明は、化合物の誘導体群を評価する方法に関し、そのような方法としては：a）化学式（I）で表される複数の化合物を含む化合物ライブラリーを作成し；さらに、b）ライブラリー由来の複数の化合物のそれぞれについて、i）サーチュインの機能性脱アセチル化ドメインを含むサーチュイン試験タンパク質に化合物を接触させ；さらに、ii）化合物の存在下において、化合物とサーチュイン試験タンパク質との間の相互作用を評価することを含む。

30

【0031】

実施態様は、以下の記載のひとつまたはそれ以上を含む。

【0032】

ひとつの実施態様においては、化合物とサーチュイン試験タンパク質との間の相互作用の評価には、サーチュイン試験タンパク質の酵素活性の評価を含む。

【0033】

ひとつの実施態様においては、化合物とサーチュイン試験タンパク質との間の相互作用の評価には、化合物とサーチュイン試験タンパク質との間の結合相互作用の評価を含む。

40

【0034】

方法には、評価結果に基づき、基質に対する脱アセチル化活性を調節する化合物を選択することを含む。基質は、アセチル化リジンアミノ酸、アセチル化転写因子（例えば、p53、FoxO1またはFoxO3など）もしくはそれらのアセチル化ペプチド、アセチル化ヒストンもしくはそれらのアセチル化ペプチドなどである。

【0035】

さらに、方法には、評価結果をふまえ、サーチュインが有する基質の脱アセチル化活性を調節する化合物を選択することを含む。

【0036】

方法には、評価結果をふまえ、サーチュインを調節する化合物を選択することを含む。

50

【0037】

ひとつの側面から見ると、本発明は、標的物質および化合物を含むコンジュゲートに関し、このとき、標的物質と化合物とは共有結合しており、該化合物は化学式(1)で表される。

【0038】

実施態様には以下のうちのひとつまたはそれ以上を含む。

【0039】

標的物質は、癌特異的抗原などの細胞表面タンパク質に対して特異的な抗体である。

【0040】

標的物質は合成ペプチドである。

10

【0041】

標的物質は、天然に存在するタンパク質のドメインである。

【0042】

別の側面から見ると、本発明は、本明細書に記載している化合物、および本明細書に記載している疾病の治療に関する使用指示書を含むキットに関する。該キットは、さらに、化合物の構造式を表した印刷物を含む。

【0043】

別の側面から見ると、本発明は、構造を分析または設計する方法に関し、次のような段階を含む：本明細書に記載している化合物（例えば、化学式(1)で表される化合物など）に対する画像または構造をコンピューターで作成し（好ましくは、三次元画像または構造）、第二の化合物（例えば、本明細書に記載している化学式(1)、NADなどとは別の化合物）あるいは、サーチチェーンなど（ヒトサーチチェーン、例えば、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6またはSIRT7など）の標的化合物、もしくはSIRT1以外のサーチチェーンなど（例えば、SIRT2またはSIRT3など）の標的外分子、または非サーチチェーンヒストン脱アセチル化酵素に対する画像または構造をコンピューターで作成し（好ましくは、三次元画像または構造）；第一および第二の化合物の構造を比較する（例えば、結合角度、分子間もしくは分子内距離、原子もしくは基の位置に関するパラメーターなど；例えば、作成した第一および第二の化合物と標的分子もしくは標的外分子との相互作用能または阻害能の予測値などを比較する）。

20

【0044】

好ましい実施態様においては、さらに、イン・ビトロ(in vitro)、イン・ビボ(in vivo)、またはコンピューター(in silico)で、標的分子または標的外分子を用いて構造の評価を行う。

30

【0045】

さらなる側面においては、本発明は、次のものを含むデータベースに関する：構造に関する、もしくは構造確認用の情報、イン・ビトロ(in vitro)、イン・ビボ(in vivo)もしくはコンピューター(in silico)などにおける活性に関する情報（少なくとも5、10、50または100記録）など。

【0046】

ひとつの側面から見ると、本発明は、複数の記録を含むデータベースに関し、それらの各記録は、a)本明細書に記載している構造（例えば、化学式(1)で表される構造など）を有する化合物に関する、もしくは構造確認用の情報；およびb)対象のパラメーター、新生物疾患もしくは神経変性疾患に関するパラメーター（対象パラメーターなど）に関する情報を含む。

40

【0047】

ひとつの側面から見ると、本発明は、化合物の評価法に関し、そのような方法には次のような段階を含む：化学式(1)で表される第一の化合物、または、構造に関する情報を含むデータ記録を用意し；化学式(1)で表される、もしくは化学式(1)以外の構造を有する第二の化合物、または、構造に関する情報を含むデータ記録を用意し；イン・ビトロ(in vitro)、イン・ビボ(in vivo)またはコンピューター(in silico)で、第一およ

50

び第二の化合物を評価し；第二の化合物の相互作用能（例えば、SIRT1などのサーチュインを阻害するなど）を第一の化合物のそれと比較し、それによって第二の化合物のSIRT1との相互作用能を評価する。

【0048】

他の側面から見ると、本発明は、本明細書に記載している任意の構造式を有する化合物および薬剤学的に許容されるキャリアーを含む組成物に関する。該組成物は、追加の治療剤、例えば、抗癌剤または神経変性疾患治療剤などを含む場合がある。さらに、本発明の範ちゅうには、上述の用途に使用される薬剤の製造にそのような組成物を使用することを含む。

【0049】

別の側面から見ると、本発明は、対象体内における癌などのような望まない細胞増殖（例えば、p53依存性癌またはp53非依存性癌など）によって特徴付けられる疾患の治療法または予防法に関する。そのような方法は、SIRT1アンタゴニストの投与を含む。例えば、SIRT1アンタゴニストは次のうちのひとつまたはそれ以上である：SIRT1のアンチセンス、RNAi、抗体、細胞内発現抗体（intrabody）、および本明細書に記載している方法に従って確認されたその他の化合物（例えば、SIRT1発現細胞内でアポトーシスを誘導する化合物など）。

【0050】

好ましい実施態様においては、該方法は、1種またはそれ以上の治療剤、例えば、治療剤もしくは望まない細胞増殖に対する処置剤などと組み合わせてSIRT1アンタゴニストを投与することを含む。治療剤の例としては、1種もしくはそれ以上の化学療法剤、放射性同位元素、細胞毒素などが挙げられる。化学療法剤の例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ブスルファン、シスプラチン、ドクソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミスラマイシン、クロラムブシル、ジェムシタピン（gemcitabine）、アクチノマイシン、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、プロマイシン、メイタンシノイド類ならびにそれらのアナログもしくはホモログなどが挙げられる。さらなる治療剤としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジンなど）、アルカリ化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、CC-1065、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチンなど）、アンスラサイクリン類（例えば、ダウノルピシン（旧称ダウノマイシン）およびドクソルピシンなど）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧称アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミスラマイシンおよびアントラマイシン（AMC）など）、および細胞分裂阻止剤（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、タキソールおよびメイタンシノイド類など）。放射性同位元素としては、線、線および/または線放出元素が挙げられる。放射性同位元素の例としては、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{90}Y および ^{117}Lu などが挙げられる。

【0051】

SIRT1アンタゴニストおよび治療剤は、同時または連続して投与することができる。

【0052】

本発明の範ちゅうにはパッケージ製品も含まれる。パッケージ製品は、容器、容器に入れられた上述の化合物のうちのひとつ、容器に添付し、かつ、本明細書に記載している疾患（例えば、癌または神経変性疾患など）、疾病、または疾病症状（本明細書に記載している任意の疾病症状を含む）を治療するための化合物の投与を指示する説明（例えば、ラベルまたは封入物など）を含む。

【0053】

治療対象は、哺乳類、好ましくはヒトである。対象は、非ヒト対象、例えば、動物モデルなどの場合もある。特定の実施態様においては、方法には対象の確認を含む。そのような治療を要する対象の確認は、対象自身もしくは医療従事者の判断により、また、主観的（例えば、意見など）および客観的（例えば、試験または診断法によって測定可能なもの）に行う。

【0054】

「哺乳類」という語には、生物体を含み、それらとしては、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ヤギおよびウマ、サル、イヌ、ネコ、ならびに好ましくはヒトを含む。

【0055】

「治療する」または「治療した」という語は、治療、回復、緩和、軽減、変化、改善、改良、または疾患（例えば、感染症、疾病の症状または疾病に関する体質など）に影響を及ぼすことを目的として、本明細書に記載している化合物を対象に投与することをさす。

【0056】

上述の化合物の有効量は、約0.1mg/kg～約500mg/kgの範囲であり、あるいは、約1～50mg/kgである。有効量は、投与経路および他の薬物との共使用の可能性によって変化する。

【0057】

「ハロ」または「ハロゲン」という語は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素のうちの任意のラジカルをさす。

【0058】

「アルキル」という語は、指示された数の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖炭化水素鎖をさす。例えば、C1-C12アルキルは、炭素原子の数が1～12個である基をさす。「ハロアルキル」という語は、1個もしくはそれ以上の水素原子がハロゲンによって置換されているアルキルをさし、全ての水素がハロゲンによって置換されているアルキル部位（例えば、パーフルオロアルキルなど）を含む。「アリールアルキル」または「アラルキル」という語は、アルキル水素原子がアリール基によって置換されているアルキル部位をさす。アラルキルには、1個以上の水素原子がアリール基によって置換されている基を含む。「アリールアルキル」または「アラルキル」の例としては、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、9-フルオレニル、ベンズヒドリル、およびトリチル基などが挙げられる。

【0059】

「アルキレン」という語は、二価のアルキル、例えば、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ および $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2-$ などをさす。

【0060】

「アルケニル」という語は、2～12個の炭素原子からなり、ひとつもしくはそれ以上の二重結合を有する直鎖または分岐鎖炭化水素鎖をさす。アルケニル基の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：アリル、プロペニル、2-ブテニル、3-ヘキセニルおよび3-オクテニル基など。二重結合炭素のうちのひとつは、必要に応じて、アルケニル置換基の結合位置になり得る。「アルキニル」という語は、2～12個の炭素原子からなる直鎖または分岐鎖炭化水素をさし、ひとつもしくはそれ以上の三重結合を有することを特徴とする。アルキニル基の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：エチニル、プロパギルおよび3-ヘキシニルなど。三重結合炭素のうちのひとつは、必要に応じて、アルキニル置換基の結合位置になり得る。

【0061】

「アルキルアミノ」および「ジアルキルアミノ」という語は、それぞれ、 $-\text{NH}$ （アルキル）および $-\text{NH}$ （アルキル）₂ のラジカルをさす。「アラルキルアミノ」という語は、 $-\text{NH}$ （アラルキル）ラジカルをさす。アルキルアミノアルキルという語は、（アルキル） NH -アルキル-ラジカルをさし、ジアルキルアミノアルキルという語は、（アルキル）₂ N -アルキル-ラジカルをさす。「アルコキシ」という語は、 $-\text{O}$ -アルキルラジカルをさす。「

10

20

30

40

50

メルカプト」という語は、SHラジカルをさす。「チオアルコキシ」という語は、-S-アルキルラジカルをさす。チオアリールオキシという語は、-S-アリールラジカルをさす。

【0062】

「アリール」という語は、芳香族単環式、二環式または三環式炭化水素環構造をさし、このとき、置換可能な任意の環原子は、例えば、1個もしくはそれ以上の置換基によって置換することができる。アリール部位の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：フェニル、ナフチル、およびアントラセニルなど。

【0063】

本明細書において使用している「シクロアルキル」という語は、3～12個の炭素原子からなる飽和環式、二環式、三環式、または多環式炭化水素基を含む。1個もしくはそれ以上の置換基により、任意の環原子を置換することができる。シクロアルキル基は、融合環を含む場合がある。融合環とは、共通の炭素原子を共用している環である。シクロアルキル部位の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：シクロプロピル、シクロヘキシル、メチルシクロヘキシル、アダマンチルおよびノルボルニルなど。

【0064】

「複素環式」という語は、非芳香族性の3～10員環の単環式、8～12員環の二環式、または11～14員環の三環式環構造であって、単環式の場合は1～3個のヘテロ原子、二環式の場合は1～6個のヘテロ原子、三環式の場合には1～9個のヘテロ原子を有し、該ヘテロ原子は、0、NまたはSから選択される（例えば、単環式、二環式、三環式の場合、炭素原子、およびN、0もしくはSから選択される、1～3個、1～6個、1～9個のそれぞれのヘテロ原子から構成されている）。ヘテロ原子は、必要に応じて、複素環式置換基の結合位置になり得る。1個またはそれ以上の置換基により、環を構成している任意の原子を置換することができる。複素環式基は、融合環を有する場合がある。融合環とは、共通の炭素原子を共有している環である。複素環の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない；テトラヒドロフラン、ピロリジニル、ピペリジニル、モルフォリノ、ピロリニル、ピリミジニル、キノリニルおよびピロリジニルなど。

【0065】

「シクロアルケニル」という語は、5～12個の炭素原子、好ましくは5～8個の炭素原子からなり、部分的に不飽和であって非芳香性の環式、二環式、三環式、または多環式の炭化水素基をさす。不飽和炭素は、必要に応じて、シクロアルケニル置換基の結合位置になり得る。1個またはそれ以上の置換基により、環を構成している任意の原子を置換することができる。シクロアルケニル基は、融合環を有する場合がある。融合環とは、共通の炭素原子を共有している環である。シクロアルケニル部位の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない；シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニルまたはノルボルネニルなど。

【0066】

「ヘテロシクロアルケニル」という語は、部分的に飽和であって非芳香性の5～10個の原子からなる単環式、8～12個の原子からなる二環式、または11～14個の原子からなる三環式環構造であって、単環の場合には1～3個のヘテロ原子を、二環の場合には1～6個のヘテロ原子を、または、三環の場合には1～9個のヘテロ原子を含み、該ヘテロ原子は0、NまたはSから選択される（例えば、単環式、二環式、三環式の場合、炭素原子、およびN、0もしくはSから選択される、1～3個、1～6個、1～9個のそれぞれのヘテロ原子から構成されている）。不飽和炭素原子またはヘテロ原子は、必要に応じて、ヘテロシクロアルケニル置換基の結合位置になり得る。1個またはそれ以上の置換基により、環を構成している任意の原子を置換することができる。ヘテロシクロアルケニル基は、融合環を有する場合がある。融合環とは、共通の炭素原子を共有している環である。ヘテロシクロアルケニル部位の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない；テトラヒドロピリジニルおよびジヒドロピラニルなど。

【0067】

「ヘテロアリアル」という語は、芳香性の5～8個の原子からなる単環式、8～12個の原子からなる二環式、または11～14個の原子からなる三環式環構造であって、単環の場合には1～3個のヘテロ原子を、二環の場合には1～6個のヘテロ原子を、または、三環の場合には1～9個のヘテロ原子を含み、該ヘテロ原子はO、NまたはSから選択される（例えば、単環式、二環式、三環式の場合、炭素原子および、N、OもしくはSから選択される、1～3個、1～6個、1～9個のそれぞれのヘテロ原子から構成されている）。1個またはそれ以上の置換基により、環を構成している任意の原子を置換することができる。

【0068】

「オキシ」という語は酸素原子をさし、炭素に結合した場合にはカルボニル基を形成し、窒素に結合した場合にはN-オキシド基を形成し、硫黄に結合した場合にはスルホキシドもしくはスルホンを形成する。

10

【0069】

「アシル」という語は、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アリアルカルボニル、ヘテロ環式カルボニル、またはヘテロアリアルカルボニル置換基をさし、1個またはそれ以上の置換基により、それらの任意の原子をさらに置換することができる。

【0070】

「アミノカルボニル」、「アルコキシカルボニル」、「ヒドラジノカルボニル」およびヒドロキシアミノカルボニルという語は、それぞれ、 $-C(O)NH_2-$ 、 $-C(O)O$ （アルキル）、 $-C(O)NH_2NH_2$ および $-C(O)NH_2NH_2$ のラジカルをさす。

20

【0071】

「アミド」という語は、 $-NHC(O)-$ ラジカルをさし、このとき、Nが結合点である。

【0072】

「置換基」という語は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロ環、ヘテロシクロアルケニル、シクロアルケニル、アリアルまたはヘテロアリアル基の任意の原子上に「置換されている」基をさす。任意の原子を置換することができる。適切な置換基としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：アルキル（例えば、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、直鎖または分岐鎖アルキルなど）、シクロアルキル、ハロアルキル（例えば、 CF_3 などのようなパーフルオロアルキル）、アリアル、ヘテロアリアル、アラルキル、ヘテロアラルキル、ヘテロ環、アルケニル、アルキニル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルケニル、アルコキシ、ハロアルコキシ（例えば、 OCF_3 などのようなパーフルオロアルコキシ）、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、カルボキシレート、シアノ、ニトロ、アミノ、アルキルアミノ、 SO_3H 、スルフェート、ホスフェート、メチレンジオキシ（ $-O-CH_2-O-$ 、ここで、酸素は隣接する原子に結合している）、エチレンジオキシ、オキシ、チオキシ（例えば、 $C=S$ など）、イミノ（アルキル、アリアル、アラルキル）、 $S(O)_n$ アルキル（ここで、 n は0～2）、 $S(O)_n$ アリアル（ここで、 n は0～2）、 $S(O)_n$ ヘテロアリアル（ここで、 n は0～2）、 $S(O)_n$ ヘテロサイクリル（ここで、 n は0～2）、アミン（モノ-、ジ-、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、アリアル、ヘテロアリアル、およびそれらの組み合わせ）、エステル（アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、アリアル、ヘテロアリアル）、アミド（モノ-、ジ-、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、アリアル、ヘテロアリアル、およびそれらの組み合わせ）、スルホンアミド（モノ-、ジ-、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、アリアル、ヘテロアリアル、およびそれらの組み合わせ）など。ひとつの側面から見ると、官能基上の置換基は、独立した任意の単一置換基、または、上述の置換基の任意の組み合わせである。別の側面から見ると、上述の置換基のうちの任意のものをを用いて置換基自身を置換することができる。

30

40

【0073】

本発明のひとつまたはそれ以上の実施態様の詳細について、図面および以下の記述によって説明する。本発明のその他の特徴、目的、および長所については、請求項ならびに詳

50

細な説明および図面から明らかである。

【0074】

本明細書に引用している全ての参考文献は、印刷物、電子記号、コンピュータで読み取り可能な記憶メディアまたはその他の様式のものいずれも、その全体を参照として本明細書中に取り入れておく、そのような参考文献としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：抄録、記事、雑誌、刊行物、教科書、学術論文、インターネットウェブサイト、データベース、特許、特許出願および特許公開公報など。2003年9月12日に出願された米国特許出願第60/502,811号も、その全体を参照として取り入れておく。

【発明を実施するための最良の形態】

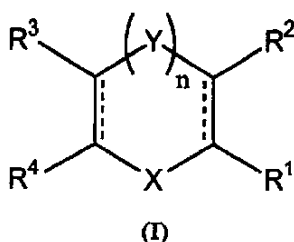
10

【0075】

化合物の構造

本発明の実施に使用することができる化合物は一般式(Ⅰ)で表され、環を構成している原子として、酸素、窒素またはイオウ原子をそれぞれ1もしくは2個含む(例えば、下記化学式(Ⅰ)のXおよびYなど)置換五員環または六員環コアを有する。

【化4】



20

【0076】

環を構成している任意の原子を置換することができる。例えば、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：置換または未置換のアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、複素口環、ヘテロシクロアルケニル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリールなど。五員環または六員環コアは飽和している(すなわち、二重結合を含まない)か、あるいは、部分的にもしくは十分に飽和している(すなわち、ひとつまたはそれ以上の二重結合を含む)。n=0の場合には、「X」は、酸素、硫黄または窒素であり、例えば、 NR^7 などで表される。置換基 R^7 としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：水素、アルキル(例えば、C1、C2、C3、C4アルキルなど)、 SO_2 (アリール)、アシル、または、カルバメートもしくは尿素基の一部を構成する環内の窒素など。n=1の場合には、Xは、 NR^7 、OまたはSであり；Yは、 $NR^{7'}$ 、OまたはSである。XおよびYは、ヘテロ原子の任意の組み合わせである(例えば、N、N；N、O；N、Sなど)。

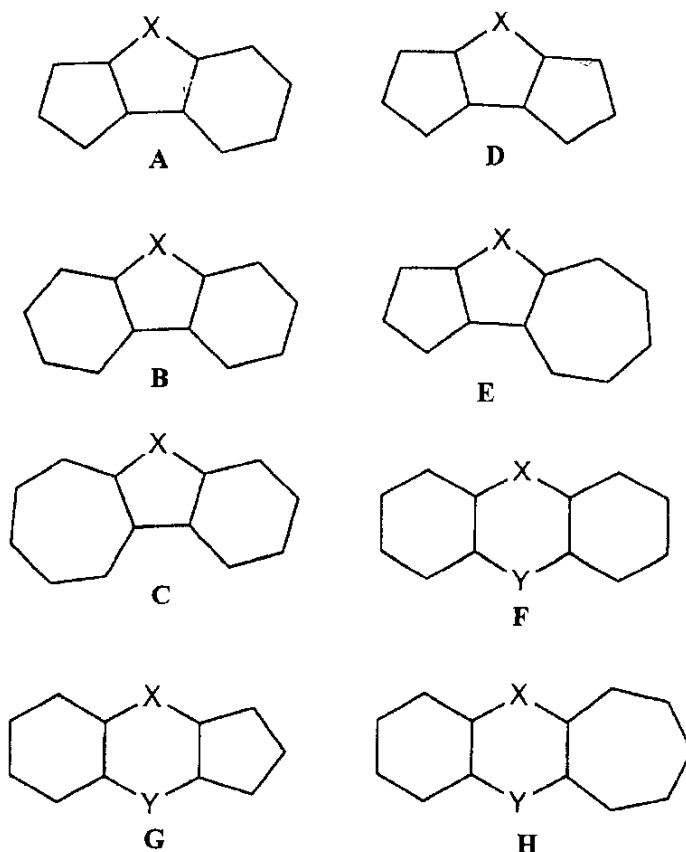
30

【0077】

化学式(Ⅰ)で表される化合物の好ましいサブセットは、五員環または六員環コアに融合している1個、または好ましくは2個の環を含み、例えば、 R^1 および R^2 は、それらが結合している炭素と共に、ならびに/または、 R^3 および R^4 は、それらが結合している炭素と共に、C5-C10シクロアルキル(例えば、C5、C6またはC7など)、C5-C10複素環(例えば、C5、C6またはC7など)、C5-C10シクロアルケニル(例えば、C5、C6またはC7など)、C5-C10ヘテロシクロアルケニル(例えば、C5、C6またはC7など)、C6-C10アリール(例えば、C6、C8またはC10など)、またはC6-C10ヘテロアリール(例えば、C5またはC6など)などを形成することができる。融合環の組み合わせには以下のうちのひとつまたはそれ以上が含まれるが、これらに限定されるわけではない：

40

【化5】



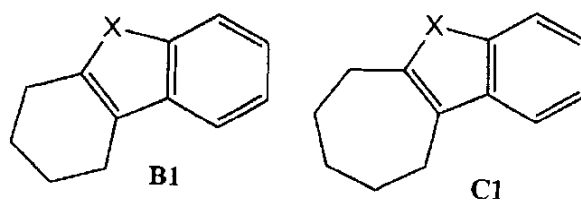
10

20

【0078】

好ましい組み合わせとしては、B（例えば、C6アリールとC6シクロアルケニルを有するもの（B1）など）およびC（C6アリールとC7シクロアルケニルを有するもの（C1）など）が挙げられる：

【化6】



30

【0079】

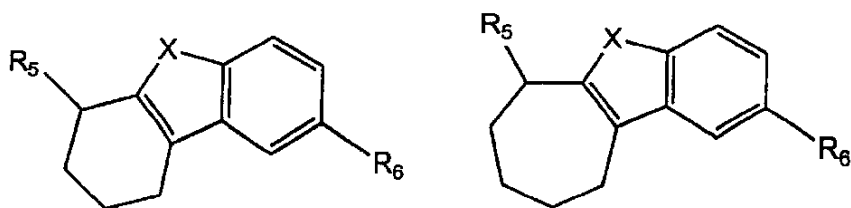
各融合環は、必要に応じて次のような置換基で置換されているが、これらに限定されるわけではない：ハロゲン、水酸基、C1-C10アルキル（C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10）、C1-C6ハロアルキル（C1、C2、C3、C4、C5、C6）、C1-C10アルコキシ（C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10）、C1-C6ハロアルコキシ（C1、C2、C3、C4、C5、C6）、C6-C10アリール（C6、C7、C8、C9、C10）、C5-C10ヘテロアリール（C5、C6、C7、C8、C9、C10）、C7-C12アラルキル（C7、C8、C9、C10、C11、C12）、C7-C12ヘテロアラルキル（C7、C8、C9、C10、C11、C12）、C3-C8複素環（C3、C4、C5、C6、C7、C8）、C2-C12アルケニル（C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12）、C5-C10シクロアルケニル（C5、C6、C7、C8、C9、C10）、C5-C10ヘテロシクロアルケニル（C5、C6、C7、C8、C9、C10）、カルボキシ、カルボキシレート、シアノ、ニトロ、アミノ、C1-C6アルキルアミノ（C1、C2、C3、C4、C5、C6）、C1-C6ジアルキルアミノ（C1、C2、C3、C4、C5、C6）、メルカプト、SO₃H、スルフェート、S(O)₂NH₂、S(O)₂NH₂、ホスフェート、C1-C4アルキレンジオキシ（C1、C2、C3、C4）、オキソ、アシル、アミノカルボニル、C1-C6アルキルアミ

40

50

ノカルボニル (C1、C2、C3、C4、C5、C6)、C1-C6ジアルキルアミノカルボニル (C1、C2、C3、C4、C5、C6)、C1-C10アルコシカルボニル (C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10)、C1-C10チオアルコシカルボニル (C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10)、ヒドラジノカルボニル、C1-C6アルキルヒドラジノカルボニル (C1、C2、C3、C4、C5、C6)、C1-C6ジアルキルヒドラジノカルボニル (C1、C2、C3、C4、C5、C6)、ヒドロキシアミノカルボニルなど。好ましい置換基としては、ハロゲン (例えば、フッ素、塩素、臭素など)、C1-C10アルキル (C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10)、C1-C6ハロアルキル (例えば、C1、C2、C3、C4、C5、C6、例えば、 CF_3 など)、C1-C6ハロアルコシ (例えば、C1、C2、C3、C4、C5、C6、例えば、 OCF_3 など) またはアミノカルボニルなどが挙げられる。2個の環が融合した環上の置換パターンについては所望に応じて選択することができ、例えば、一方の環を置換して他方はしない、あるいは、1~5個の置換基を用いて両方の環を置換する (置換基数は1、2、3、4、5個) こともできる。各環上の置換基数は同じでも異なってもよい。好ましい置換パターンを以下に示す：
【化7】

10



20

【0080】

特定の実施態様においては、nは0であり、Xは NR^7 であり、窒素置換基 R^7 は、融合環のうちの1個と環構造を形成することができ、そのような環構造は例えば、4~6個の炭素、1~3個の窒素、0~2個の酸素および0~2個の硫黄からなる。この環構造はオキソまたはC1-C6アルキルで必要に応じて置換することもできる。

【0081】

本発明に包含される置換基の組み合わせおよび誘導体は、安定な化合物が形成されるもののみである。本明細書において使用している「安定」という語は、工業製造ができる程度に十分な安定性を有し、本明細書に記載している目的に対して十分な期間有効であるように、化合物の集積性を維持していることをさす。

30

【0082】

例示化合物を以下の表1に示す：

【表 1 - 1】

表 1 : 例示化合物

化合物番号	化学名	p53-382 に対する SirtT1 の平均 IC50 値 (μM)
1	7-クロロ-1,2,3,4-テトラヒドロ-シクロペンタ [b] インドール-3-カルボン酸アミド	A
2	2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルボリン-3- カルボン酸アミド	C
3	6-ブロモ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-2-カルボン酸アミド	B

10

20

【表 1 - 2】

4	6-メチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸アミド	A
5	2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸アミド	B
6	2-クロロ-5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロ-シクロヘプタ [b] インドール-6-カルボン酸アミド	A
7	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸ヒドロキシアミド	C
8	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸アミド	A
9	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-2-カルボン酸アミド	C

10

20

30

40

【表 1 - 3】

10	1,2,3,4-テトラヒドロシクロペンタ [b] インドール-3-カルボン酸アミド	B
11	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸 (5-クロロ-ピリジン-2-yl) アミド	B
12	1,6-ジメチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸アミド	C
13	6-トリフルオロメトキシ-2,3,4,9-テトラヒドロ- 1H-カルバゾール-2-カルボン酸アミド	C
14	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸ジエチルアミド	D
15	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸カルバモイルメチル- アミド	D

10

20

30

40

【表 1 - 4】

16	8-カルバモイル-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H- カルバゾール-1-カルボン酸	D
17	6-メチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸	D
18	8-カルバモイル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸エチルエステル	D
19	[(6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボニル) アミノ]- 酢酸エチルエステル	D
20	9-ベンジル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸アミド	D
21	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸メチルエステル	D

10

20

30

40

【表 1 - 5】

22	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸	D
23	C-(6-メチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-yl) メチルアミン	D
24	6,9-ジメチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸アミド	D
25	7-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-シクロペンタ [b] インドール-3-カルボン酸アミド	D
26	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸エチルアミド	D
27	2-(1-ベンジル-3-メチルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-N-p-トリル-アセタミド	D

10

20

30

40

【表 1 - 6】

28	N-ベンジル-2-(1-メチル-3-フェニルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-アセタミド	D
29	N-(4-クロロフェニル)-2-(1-メチル-3-フェニルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-アセタミド	D
30	N-(3-ヒドロキシプロピル)-2-(1-メチル-3-フェニルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-アセタミド	D
31	2-(1-ベンジル-3-フェニルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-N-(3-ヒドロキシプロピル)-アセタミド	D
32	2-(1-ベンジル-3-メチルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-N-(4-メトキシフェニル)-アセタミド	D
33	2-(1-ベンジル-1H-インドール-2-yl)-N-(4-メトキシフェニル)-アセタミド	D

10

20

30

40

【表 1 - 7】

34	2-(1-メチル-3-メチルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-N-p-トリル-アセタミド	D
35	2-(1-ベンジル-3-メチルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-N-(2-クロロ-フェニル)-アセタミド	D
36	2-(1,5-ジメチル-3-メチルスルファニル-1H-インドール-2-yl)-N-(2-ヒドロキシ-エチル)-アセタミド	D
37	(6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-yl)-[4-(フラン-2-カルボニル)-ピペラジン-1-yl]-メタノン	D
38	2-(1-ベンジル-1H-インドール-2-yl)-N-(2-クロロ-フェニル)-アセタミド	D
39	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸エチルエステル	D

10

20

30

40

【表 1 - 8】

40	6-クロロ-9-メチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-4-カルボン酸エチルエステル	D
41	5,7-ジクロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸エチルエステル	D
42	7-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸エチルエステル	D
43	5,7-ジクロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-1-カルボン酸	D
44	6-クロロ-9-メチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-4-カルボン酸	D
45	6-クロロ-9-メチル-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H-カルバゾール-4-カルボン酸アミド	D

10

20

30

40

【表 1 - 9】

46	6-モルフォリン-4-yl-2,3,4,9-テトラヒドロ- 1H-カルバゾール-1-カルボン酸エチルエステル	D
47	6-モルフォリン-4-yl-2,3,4,9-テトラヒドロ- 1H-カルバゾール-1-カルボン酸アミド	D
48	6-ブromo-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸エチルエステル	D
49	6-フルオロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸エチルエステル	D
50	3-カルバモイル-1,3,4,9-テトラヒドロ-b- カルボリン-2-カルボン酸 tert-ブチルエステル	D
51	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸 (1-フェニル-エチル)-アミド	D

10

20

30

40

【表 1 - 10】

52	6-クロロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸 (1-フェニル-エチル)-アミド	D
53	7,8-ジフルオロ-2,3,4,9-テトラヒドロ-1H- カルバゾール-1-カルボン酸アミド	D

10

Aと記している活性を有する化合物は、 IC_{50} が $1.0\mu M$ 以下である。Bと記している活性を有する化合物は、 IC_{50} が $1.0\sim 10.0\mu M$ である。Cと記している活性を有する化合物は、 IC_{50} が $10.0\mu M$ 以上である。Dと記している化合物は本アッセイで試験を行っていない。

20

【0083】

本発明の実施に有用な化合物は、イン・ビトロ (in vitro) (細胞系および非細胞系) およびイン・ビボ (in vivo) 法で確認した。これらの方法の詳細については、実施例の項に記載している。

【0084】

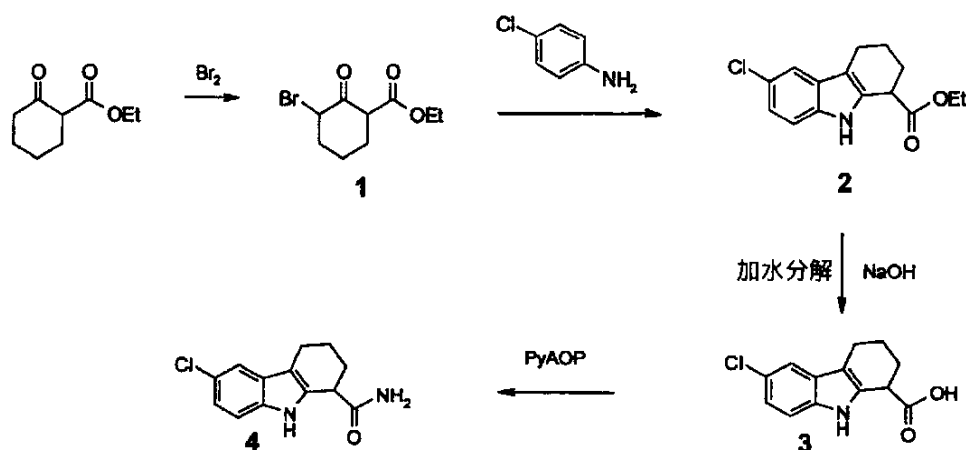
化合物の合成

本明細書に記載している化合物は、市販品 (例えば、アシネックス (Asinex) 社 (ロシア、モスクワ)、バイオネット (Bionet) 社 (イギリス、カーメルフォード)、ケムディヴ (ChemDiv) 社 (カリフォルニア州サンディエゴ)、コムジェネックス (Comgenex) 社 (ハンガリー、ブダペスト)、エナミン (Enamine) 社 (ウクライナ、キエフ)、IFラブ (IF Lab) 社 (ウクライナ)、インターバイオスクリーン (Interbioscreen) 社 (ロシア、モスクワ)、メイブリッジ (Maybridge) 社 (イギリス、ティンタジェル)、スペックス (Specs) 社 (オランダ)、ティムテック (Timtec) 社 (デラウェア州ニューアーク)、ヴィタス - Mラブ (Vitas-M Lab) 社、(ロシア、モスクワ) など)、または、市販の出発材料および試薬を用い、以下に示すような従来法によって合成したものである。例えば、例示化合物4は、以下の式1に示すように合成することができる。

30

【化 8】

スキーム 1



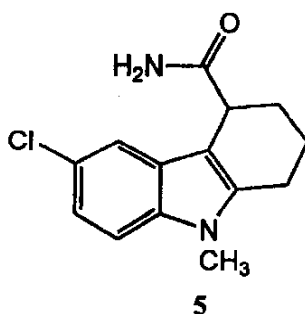
10

【0085】

ブロム化 - ケトエステル1を4 - クロロアニリンと縮合させ、続いて環化することによってインドール2を得た。エステルをサポニン化することにより、酸3を得た。最後に、PyAOPを用いてアミン化することにより、アミド4を得た。その他の方法も当該分野において既知であり、例えば、米国特許第3,859,304号、米国特許第3,769,298号、J. Am. Chem. Soc. 1974, 74, 5495などを参照。上記の合成法は、3,5 - ジクロロアニリン、3 - クロロアニリンおよび4 - ブロモアニリンなどのその他のアニリン類にも応用することができる。4 - クロロ - N - メチルアニリンなどのN - 置換アニリン類を用いて位置異性体5などを得ることができる。

20

【化 9】



30

【0086】

本明細書に記載している化合物は、反応混合物から分離することができ、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーまたは再結晶などの方法でさらに精製することができる。本明細書に記載している化学式を有する化合物のさらなる合成法については、通常の知識を有する当業者には自明である。さらに、多様な合成段階を別の順序または回数で行うことにより、所望する化合物が得られる。本明細書に記載している化合物の合成において有用な合成的化学転換および保護基法（保護および脱保護）については当該分野において既知であり、例えば、R. ラロック (Larock)、「総合有機転換 (Comprehensive Organic Transformations)」、VCH出版社 (VCH Publishers) (1989) ; T.W. グリーン (Greene) およびP.G.M. ヴッツ (Wuts)、「有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis) 第2版」、ジョン・ウィレー & サンズ (John Wiley & Sons)

40

50

社（1991）；L.フィーザー（Fieser）およびM.フィーザー（Fieser）、「フィーザーおよび有機合成におけるフィーザー試薬（Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis）」、ジョン・ウィレー＆サンズ（John Wiley & Sons）社（1994）；ならびに、L.パケット（Paquette）編「有機合成反応試薬事典（Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis）」、ジョン・ウィレー＆サンズ（John Wiley & Sons）社（1995）およびそれらの続版などの記載が挙げられる。

【0087】

本発明に従う化合物は、ひとつもしくはそれ以上の不斉中心を有し、従って、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一の鏡像異性体、別異のジアステレオ異性体およびジアステレオ混合物を生じる。これらの化合物のそのような全ての異性体は、明らかに本発明に含まれる。本発明に従う化合物は、結合（例えば、炭素-炭素結合など）または結合の回転を制限するような置換基（例えば、環または二重結合が存在することによって生じる制限など）を有する場合もある。従って、全てのシス/トランス、およびE/Z異性体は、明らかに本発明に含まれる。また、本発明に従う化合物は、複数の互変異性体としても表され、そのような場合には、本明細書に記載している化合物の全ての互変異性体は、単一の互変異性体としてのみ表し得る場合であっても、明らかに本発明に含まれる（例えば、環のアルキル化によって複数の部位がアルキル化した場合、そのような反応生成物は全て、明らかに本発明に含まれる）。そのような化合物の全ての異性体は、明らかに本発明に含まれる。本明細書に記載している化合物の全ての結晶型は、明らかに本発明に含まれる。

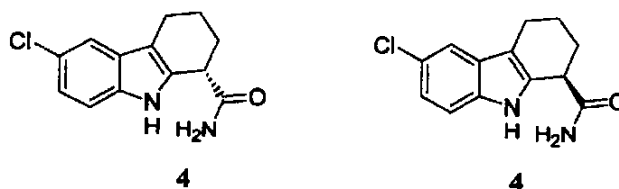
【0088】

立体異性体などの異性体の分離に有用な技術は当業者に既知であり、例えば、エリエル（Eliehl）,E.L.、ウィレン（Wilens）,S.H.、マNDER（Mander）,L.N.、「有機化合物の立体化学（Stereochemistry of Organic Compounds）」、ウィレー・インターサイエンス（Wiley Interscience）社（ニューヨーク）（1994）などに記載されている。例えば、化合物3または4は、キラル塩基（例えば、（+）または（-）-メチルベンジルアミンなど）を用いるなどしてジアステレオ塩を形成することにより、あるいは、キラルカラムを使用した高速液体クロマトグラフィーにより、エナンチオマー過剰率の高い（例えば、60%、70%、80%、85%、90%、99%またはそれ以上）分離が行える。

【0089】

例示のために化合物4のエナンチオマーを以下に示す。

【化10】



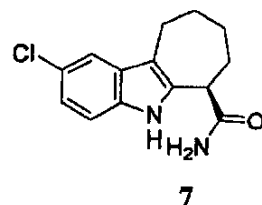
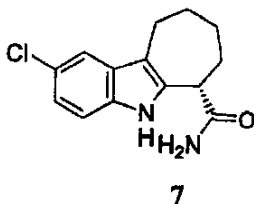
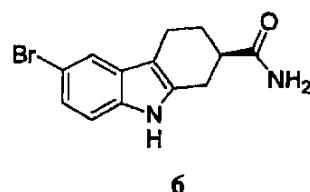
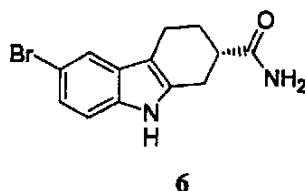
【0090】

いくつかの例においては、本明細書に記載している化合物のひとつの異性体（例えば、R異性体またはS異性体など）が高エナンチオマー過剰率で存在する状態で投与する。一般的には、旋光度が -14.1（ $c=0.33$, DCM中）である化合物4の異性体は、旋光度が +32.8（ $c=0.38$, DCM中）である異性体よりも、SirT1酵素に対する活性が大きい。従って、いくつかの例においては、旋光度が -14.1（ $c=0.33$, DCM）である異性体を高エナンチオマー過剰率で含む化合物4を対象に投与して疾患を治療することが有効である。

【0091】

化合物4のエナンチオマーは立体異性体の一例であり、例えば、以下の化合物6および7で示されるその他の立体異性体も本発明に包含される。

【化 1 1】



10

【0092】

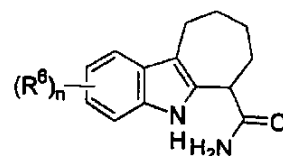
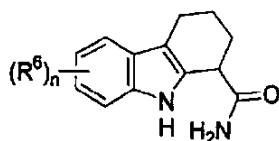
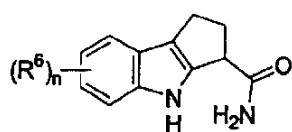
化学式4の化合物と同様に、いくつかの例においては、他のエナンチオマーよりもSirT1に対するアフィニティーが高い化合物6または7の異性体を対象に投与することが有効である。例えば、いくつかの例においては、旋光度が -14.1 ($c=0.33$, DCM中) である化合物4の異性体と同様の立体配置を有するアミドを含む化合物7を対象に投与することが有効である。

20

【0093】

いくつかの例においては、以下に示す構造のうちのひとつを有する化合物を投与することが有効であり、このとき、アミドの立体化学構造は、旋光度が -14.1 ($c=0.33$, DCM) である化合物4の異性体中のそれに相応する。

【化 1 2】



(nは0～4までの整数)

30

【0094】

本発明に従う化合物には、化合物自身、ならびに、それらの塩類、および可能であればプロドラッグも含まれる。例えば、塩は、陰イオンおよび本明細書に記載している化合物上の正の電荷を帯びた置換基（例えば、アミノなど）との間で形成することができる。適切な陰イオンとしては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、スルフェート、ニトレート、ホスフェート、シトレート、メタンスルホネート、トリフルオロアセタートおよびアセタートなどが挙げられる。同様に、塩は、陽イオンと本明細書に記載している化合物上の負の電荷を帯びた置換基（例えば、カルボキシレートなど）との間で形成することができる。適切な陽イオンとしては、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、アンモニウム陽イオン（テトラメチルアンモニウムイオンなど）などが挙げられる。プロドラッグの例としては、エステル類および薬剤学的に許容されるその他の誘導体類が挙げられ、患者に投与することにより、活性化合物を提供し得る。

40

【0095】

50

本発明に従う化合物は、適切な官能基を付加することによって変形し、選択された生物学的特性（例えば、特定の組織を標的にするなど）を高めることができる。そのような変形は当該分野において既知であり、例えば、与えられた生体区画（例えば、血液、リンパ系、中枢神経系など）への生物学的浸透を高める、経口利用率を高める、注射による投与ができるように溶解性を高める、代謝を変更する、および排出速度を変更するなどが挙げられる。

【0096】

別の実施態様においては、本明細書に記載している化合物は、化合物の誘導体調製および/または化学ライブラリーのためのコンビナトリアル化学技術に用いられる土台または骨格として使用することができる。化合物のそのような誘導体およびライブラリーは生物学的活性を有し、また、特定の活性を有する化合物の確認および設計に有用である。本明細書に記載している化合物の使用に適したコンビナトリアル技術は当該分野において既知であり、例えば、オブレクト（Obrecht）, D. およびヴィラルグロード（Villalgrado）, J. M., 「低分子化合物ライブラリーの固体支持コンビナトリアルおよびパラレル合成（Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries）」、ペルガモン・エルセヴィール・サイエンス（Pergamon-Elsevier Science Limited）社（1988）などに記載されており、「スプリットおよびプール」もしくは「パラレル」合成技術、固相および液相技術、ならびにエンコード技術などが含まれる（例えば、ツアルニック（Czarnik）, A.W., Curr.Opin.Chem.Bio., (1997)1,60などを参照）。従って、ひとつの実施態様は、誘導体または化学ライブラリーを作成するために本発明に記載されている化合物を使用する方法に関し、そのような方法は、1) 複数のウェルからなる本体を供し；2) 本発明に記載されている方法によって確認されたひとつまたはそれ以上の化合物を各ウェルに入れ；3) さらに、ひとつまたはそれ以上の化学物質を各ウェルに入れ；4) 各ウェルから得られたひとつまたはそれ以上の生成物を単離する、段階を含む。別の実施態様は、誘導体または化学ライブラリーを作成するために本発明に記載されている化合物を使用する方法に関し、そのような方法は、1) 本発明に記載されているひとつまたはそれ以上の化合物を固体支持体に結合させ；2) 本発明に記載されている方法によって確認され、固体支持体に結合しているひとつまたはそれ以上の化合物を追加の化学物質で処理し；4) 支持体から得られたひとつまたはそれ以上の生成物を単離する、段階を含む。上述の方法においては、本発明に記載されている化合物またはそれらの誘導体には、「タグ」もしくは認識票もしくはラベル部位を付加ならびに/または脱離することにより、所望する生成物またはそれらの中間体の追跡、確認、もしくは単離ができる。そのような部位は当該分野において既知である。上述の方法において使用される化学物質としては、例えば、溶媒、反応試薬、触媒、保護基および脱保護試薬などが挙げられる。そのような化学物質の例は、合成および保護基化学に関する様々な教科書および本明細書に引用している論文の中に記載されている。

【0097】

サーチイン類

サーチイン類は、遺伝子のサイレントインフォメーションレギュレーター（SIR）ファミリーの一員である。サーチイン類は、Pfamファミリー「SIR2」にヒットすると評価されたアミノ酸配列（PF02146）として定義されたSIR2ドメインを含むタンパク質である。このファミリーは、INTERPRO記述としてINTERPROデータベース内で引用されている（エントリーIPR0003000）。タンパク質配列内に「SIR2」ドメインが存在することを確認し、目的のポリペプチドもしくはタンパク質が特定のプロファイルを持っていることを判断するためには、デフォルトパラメーターを使用し、HMM類のPfamデータベース（例えば、Pfamデータベース、リリース9など）に対して、タンパク質のアミノ酸配列をサーチする（http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM_search）。SIR2ドメインは、PfamではPF02146、INTERPROではINTERPRO記述（エントリーIPR0003000）と指定されている。例えば、サーチプログラムのHMMERパッケージの一部として利用可能なhmmsfプログラムは、MILPAT0063に対するファミリー特異的デフォルトプログラムであり、ヒットを判断するためのデフ

オルト閾値の値は15である。別の方法としては、ヒットを判断するための閾値の値を下げることもできる（例えば、8ビットなど）。Pfamデータベースに関する記述は、「Pfamタンパク質データベース（The Pfam Protein Families Database）」、バイトマン（Bateman）,A.、バーニー（Birney）,E.、セルッティ（Cerrutti）,L.、ダービン（Durbin）,R.、エトウィラー（Etwiller）,L.、エディ（Eddy）,SR.、グリフィス - ジョーンズ（Griffiths-Jones）,S.、ハウ（Howe）,KL.、マーシャル（Marshall）,M.、ゾンハマー（Sonnhammer）,EL.、(2002)Nucleic Acids Research 30(1):276-280およびゾンハマー（Sonnhammer）ら、(1997)Proteins28(3):405-420に見出すことができ、HMM類に関する詳細な記述は、例えば、グリブスコフ（Gribskov）ら、(1990)Meth.Enzymol.183:146-159；グリブスコフ（Gribskov）ら、(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:4355-4358；クロー（Krogh）ら、(1994)J.Mol.Biol.,235:1501-1531およびストゥルツ（Stultz）ら、(1993)Protein Sci.,2:305-314などに見出すことができる。

10

【0098】

SIR2遺伝子ファミリーの構成員によってコードされているタンパク質は、250個のアミノ酸からなるコアドメイン中において、配列保存性が高い。このファミリー内の遺伝子で特性付けが詳しく行われているのは、出芽酵母（*S.cerevisiae*）のSIR2であり、この遺伝子は、出芽酵母の交配型を特定する情報、テロメアの位置効果および細胞の加齢に関する情報を含むサイレンシングHM遺伝子座に含まれている（グアレンテ（Guarente）、1999；ケバーレイン（Kaeberlein）ら、1999；ショア（Shore）、2000）。出芽酵母のSir2タンパク質はヒストン脱アセチル化酵素ファミリーに属する（グアレンテ（Guarente）による総説、2000；ショア（Shore）、2000）。Sir2タンパク質は、補因子としてNADを使うことができる脱アセチル化酵素である（イマイ（Imai）ら、2000；モアゼド（Moazed）、2001；スミス（Smith）ら、2000；タナー（Tanner）ら、2000；タニー（Tanny）およびモアゼド（Moazed）、2001）。遺伝子のサイレンシングに関与している多くの他の脱アセチル化酵素とは異なり、Sir2は、トリコスタチンA（TSA）などのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対して比較的感受性が低い（イマイ（Imai）ら、2000；ランドリー（Landry）ら、2000a；スミス（Smith）ら、2000）。哺乳類のSir2ホモログ（例えば、SIRT1など）は、NAD依存性の脱アセチル化活性を有する（イマイ（Imai）ら、2000；スミス（Smith）ら、2000）。

20

【0099】

哺乳類のサーチュイン類の例としては、SIRT1、SIRT2、およびSIRT3、例えば、ヒトのSIRT1、SIRT2、およびSIRT3などが挙げられる。本明細書に記載している化合物は、哺乳類のサーチュイン（例えば、SIRT1、SIRT2、およびSIRT3など）を、500nM、200nM、100nM、50nMまたは40nM以下の K_i 値で阻害する。例えば、本明細書に記載している化合物は、天然または人工的な基質（例えば、以下に記載しているような基質など）に対して、脱アセチル化活性を阻害する。

30

【0100】

SIRT1に対する天然と基質としては、ヒストン類、p53、ならびに、FoxO1およびFoxO3などのFoxO転写因子などが挙げられる。SIRT1タンパク質は、「SIRT1結合パートナー」と称されるその他多数のタンパク質に結合する。例えば、SIRT1は、p53に結合し、p53経路内で役割を果たす（例えば、p53のK370、K371、K372、K381および/もしくはK382、または、これらのリジンのうちの1個もしくはそれ以上を含むペプチドなど）。例えば、ペプチドは、アミノ酸数が5～15の間である。SIRT1タンパク質は、ヒストン類を脱アセチル化することもできる。例えば、ヒストンH3の9番もしくは14番のリジン、または、これらのリジンのうちの1個もしくはそれ以上を含む低分子ペプチドを脱アセチル化することができる。ヒストンの脱アセチル化により、局所クロマチン構造が変化し、そのことにより、その近傍の遺伝子の転写が制御される。SIRT1結合パートナーの多くは転写因子、例えば、特定のDNA部位を認識するタンパク質などである。例えば、SirT1はフォークヘッド（fork head）タンパク質（すなわち、FoxOタンパク質）を脱アセチル化し、抑制制御する。SIRT1とSIRT1結合パートナーとの間の相互作用により、SIRT1がゲノムの特定領域に送達され

40

50

、その結果、基質が局所的に現れる（例えば、ヒストン類および転写因子が特定領域に局在するなど）。

【0101】

SIRT2に対する天然の基質としては、 α -チューブリンなどのチューブリンが挙げられる。ノース（North）ら、Mol.Cell.2003, Feb; 11(2):437-444などを参照のこと。基質の例としては、 α -チューブリンの40番のリジンを含むペプチドなどが挙げられる。

【0102】

サーチュイン基質のさらなる例としては、チトクロームcおよびそれらのアセチル化ペプチドが挙げられる。

【0103】

本明細書においては、「SIRT1タンパク質」と「SIRT1ポリペプチド」とは相互に読み替えて用いることができ、250個のアミノ酸からなる保存性のSIRT1触媒ドメイン（配列番号1のアミノ酸番号258番～451番）に少なくとも25%一致するポリペプチドをさす。配列番号1は、ヒトSIRT1のアミノ酸配列を示すものである。好ましい実施態様においては、SIRT1ポリペプチドは、配列番号1または配列番号1のアミノ酸番号258番～451番に対する相同性が少なくとも30、40、50、60、70、80、85、90、95、99%である。別の実施態様においては、SIRT1ポリペプチドはフラグメントであり、例えば、NADおよび/もしくはNADのアナログの存在下において基質を脱アセチル化する、または、転写因子などの標的タンパク質に結合することができる、という機能のうちのひとつまたはそれ以上が可能なSIRT1のフラグメントである。そのような機能は、本明細書記載されている方法などによって評価することができる。別の実施態様においては、SIRT1ポリペプチドはSIRT1ポリペプチドの「全長」である。本明細書において使用している「全長」とは、天然に存在するSIRT1ポリペプチド（または本明細書に記載している他のタンパク質）の長さを少なくとも有するポリペプチドをさす。「全長」SIRT1ポリペプチドまたはそれらのフラグメントは、精製タグまたはその他の結合化合物（例えば、結合している蛍光団または補因子など）などのような他の配列をも含有する。「SIRT1ポリペプチド」という語は、天然に存在するSir1ファミリーに関して、1個もしくはそれ以上（例えば、1～10個など）の置換基を含む配列または変異体も含まれる。「SIRT1活性」という語は、SIRT1のひとつまたはそれ以上の活性をさし、例えば、基質（例えば、アミノ酸、ペプチドまたはタンパク質など）の脱アセチル化（例えば、NADおよび/もしくはNADアナログなどの補因子の存在下などの条件下における、転写因子（p53など）またはヒストンタンパク質の脱アセチル化など）、および標的（例えば、転写因子などの標的タンパク質など）への結合などが挙げられる。

【0104】

本明細書において記載しているように、タンパク質の「生物学的活性部位」または「機能性ドメイン」には、分子内または分子間相互作用などのような相互作用（例えば、結合または触媒性相互作用など）に関与する対象タンパク質のフラグメントを含む。分子間相互作用とは、特異結合相互作用または触媒性相互作用である（例えば、相互作用は一時的であり、共有結合が形成される、もしくは破壊されるなど）。分子間相互作用は、タンパク質と別のタンパク質との間、タンパク質と別の化合物との間、あるいは、タンパク質の第一の分子と第二の分子との間（例えば、二量体化相互作用など）に生じる。タンパク質の生物学的活性部位/機能性ドメインには、該タンパク質との相同性を十分に有するアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは、天然に存在する全長タンパク質よりはアミノ酸数が少なく、天然のタンパク質の活性のうちの少なくともひとつを呈するタンパク質のアミノ酸配列に由来するペプチドが含まれる。生物学的活性部位/機能性ドメインは、切断分析、位置指定突然変異誘発およびタンパク質分解を含む多様な技術によって確認することができる。適切な生化学的または生物学的（例えば、遺伝子など）アッセイにより、突然変異体またはタンパク質分解フラグメントの活性をアッセイすることができる。いくつかの実施態様においては、機能性ドメインは別異に折りたたまれている。一般的には、生物学的活性部位は、タンパク質（SIRT1など）の活性のうちの少なくともひとつを有するドメインまたはモチーフを含む。ドメインの例としては、SIRT1コア触媒性ドメインが挙げ

10

20

30

40

50

られる。タンパク質の生物学的活性部位 / 機能性ドメインは、例えば、アミノ酸数が10、25、50、100、200またはそれ以上であるポリペプチドである。タンパク質の生物学的活性部位 / 機能性ドメインは、SIRT1を調節する発現剤 (developing agent) に対する標的として使用することができる。

【 0 1 0 5 】

以下にSIR配列の例を示す：

>sp|Q96EB6|SIR1_ヒトNAD依存的脱アセチル化酵素サーチュイン1(EC 3.5.1.-) (hSIRT1) (hSIR2)
(SIR2様タンパク質1)-ホモサピエンス(ヒト)

MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEPLRKRPRRDGPGGLERSPGEPGGAAPERE
V
PAAARGCPGAAAAALWREAEEAAAAGGEQEAQATAAAGEGDNGPGLQGPSREPPLADN
L
YDEDDDDDEGESEEEEEAAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCESEDEEDRASHASSSDWTFR
P
RIGPYTFVQQHLMIGTDPRTILKDLLPETIPPFELDDMTLWQIVINILSEPPKRKKRKD
I
NTIEDAVKLLQECKKIIVLTGAGVSVSCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLPDPQAMFDI
E
YFRKDP RPFFKFAKEIYPGQFQPSLCHKFIALSDKEGKLLRNYTQNIDTLEQVAGIQRI
I
QCHGSFATASCLICKYKVDCEAVRGDIFNQVVPRCPRCPADEPLAIMKPEIVFFGENLP
E
QFHRAMKYDKDEVDLLIVIGSSSLKVRPVALIPSSIPHEVPQILINREPLPHLHFDVELL
G
DCDVIINELCHRLGGGEYAKLCCNPVKLSEITEKPPRTQKELAYLSELPTPLHVSEDSS
S
PERTSPPDSSVIVTLLDQAAKSNDLDVSESKGCMEEKPQEVQTSRNVESIAEQMENPD
L
KNVGSSTGEKNERTSVAGTVRKWCWPNRVAKEQISRRLDGNQYLFLPPNRYIFHGAEVYS
D
SEDDVLSSSSCGSNSDSGTCQSPSLEEPMEDESEIEEFYNGLEDEPDVPERAGGAGFGT
D
GDDQEAINAIAISVKQEVTDNMNYPNKS (配列番号1).

10

20

30

>sp|Q8IXJ6|SIR2_ヒトNAD依存的脱アセチル化酵素サーチュイン2(EC 3.5.1.-) (SIR2様) (SIR2様タンパク質2)-ヒモサピエンス(ヒト).

↓

MAEPDPSHFLETQAGKVQEAQDSDDSEGGGAAGGEADMDFLRNLFSTLSLGSQKERLL
D
ELTLEGVARYMQSERCRRVICLVGAGISTSAGIPDFRSPSTGLYDNLEKYHLPYPEAIF
E
ISYFKKHPEPFFALAKELYPGQFKPTICHYFMRLKDKGLLLRCTQNIIDTLERAGLE
Q
EDLVEAHGTFYTSHCVSASCRHEYPLSWMKEKIFSEVTPKCEDCQSLVKPDIVFFGESL
P
ARFFSCMQSDFLKVDLLVMGTSLQVQPFASLISKAPLSTPRLLINKEKAGQSDPFLGM
I
MGLGGGMDFDSKKAYRDVAWLGECDQGCLALAEELGWKKELEDLVRREHASIDAQSGAG
V
PNPSTSASPKKSPPPAKDEARTTEREKPO (配列番号2)

10

>sp|Q9NTG7|SIR3_ヒトNAD依存的脱アセチル化酵素サーチュイン3, ミトコンドリア前駆体(EC 3.5.1.-) (SIR2様タンパク質3)(hSIRT3)-ヒモサピエンス(ヒト).

MAFWGWRAAAALRLWGRVVERVEAGGGVGPFQACGCRLVLGGRDDVSAGLRGSHGARGE
P
LDPARPLQRPPEVPRAFRQQPRAAAPSFFSSIKGGRSISFSVGASSVVGSGGSSD
K
GKLSLQDVAELIRARACQRVVMVGAGISTPSGIPDFRSPGSGLYSNLQQYDLFPYPEAI
F
ELPFFFHNPKPFFFTLAKELYPGNYKPNVTHYFLRLLHDKGLLLRLYTONIDGLERVSGI
P
ASKLVEAHGTFASATCTVCQRPFPGEDIRADVMADRVPRCPVCTGVVKPDIVFFGEPLP
Q
RFLHVVDFPMADLLLILGTSLEVEPFASLTEAVRSSVPRLINRDLVGFLAWHPRSRD
V
AQLGDVVHGVESLVELLGWTEEMRDLVQRETGKLDGPDK (配列番号3)

20

30

>sp|Q9Y6E7|SIR4_ヒトNAD依存的脱アセチル化酵素サーチュイン4(EC 3.5.1.-) (SIR2様タンパク質4)-ヒモサピエンス(ヒト).

MKMSFALTFRSAKGRWIANPSQPCSKASIGLFVPASPPLDPEKVKELQRFITLSKRLV
M
TGAGISTESGIPDYRSEKVGLYARTDRRPIQHGDVFRSAPIRQRYWARNFVGWPQFSSH
Q
PNPAHWALSTWEKLGKLYWLVTQNVDAHHTKAGSRRLTELHGCMRVLCLDCGEQTPRG
V
LQERFQVLNPTWSAEAHGLAPDGDVFLSEEQVRSFQVPTCVQC GGHLKP DVVFFGDTVN
P
DKVDFVHKRVKEADSLLVVGSSLQVYSGYRFLTAWKKLP IAILNIGPTRSDDLACLK
L
NSRCGELLPLIDPC (配列番号4)

40

>sp|Q9NXA8|SIR5_ヒトNAD依存的脱アセチル化酵素サーチュイン5(EC 3.5.1.-) (SIR2様タンパク質5)-ホモサピエンス(ヒト).

MRPLQIVPSRLISQLYCGLKPPASTRNQICLKMARPSSSMADFRKFFAKAKHIVIISGA
G
VSAESGVPTFRGAGGYWRKWQAQDLATPLAFAHNPSRVWEFYHYRREVMGSKEPNAGHR
A
IAECETRLGKQGRRVVVITQNIDELHRKAGTKNLLIHGSLFKTRCTSCGVVAENYKSP
I
CPALSGKGAPEPGTQDASIPVEKLPRCEEAGCGGLLRPHVWVFGENLDPAILLEEVDREL
A
HCDLCLVVGTSVVYPAMFAPQVAARGVPVAEFNTETTPATNRFRFHFQGPCGTTLPE
A
LACHENETVS (配列番号5)

10

>sp|Q8N6T7|SIR6_ヒトNAD依存的脱アセチル化酵素サーチュイン6(EC 3.5.1.-) (SIR2様タンパク質6)-ホモサピエンス(ヒト).

MSVNYAAGLSPYADKGCGLPEIFDPPEELERKQVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTAS
G
IPDFRGPHGVWTEERGLAPKFDTTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSQNV DGLH
V
RSGFPRDKLAELHGNMFVEECAKCKTQYVRD TVVGT MGLKATGRLCTVAKARGLRACRG
E
LRDTILDWEDSLPDRDLALADEASRNADLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIV
N
LQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMKHLGLEIPAWDGPVRLERALPPLPRPPTPKLEP
K
EESPTRINGSIPAGPKQEPCAQHNHSEPA SPKRRERPTSPAPHRPPKRVKAKAVPS
(配列番号6)

20

>sp|Q9NRC8|SIR7_ヒトNAD依存的脱アセチル化酵素サーチュイン7(EC 3.5.1.-) (SIR2様タンパク質7)-ホモサピエンス(ヒト).

MAAGGLSRSEKAAERVRLREEQQRERLRQVSRILRKAASAEGRLLAESADLVT
E
LQGRSRRREGLKRRQEVCDDPEELRGKVRELASAVRNAKYLVVYTGAGISTAASIPDY
R
GPNGVWTLQKGRSVSAADLSEAEP TLTHMSITRLHEQKLQHVVSQNC DGLHLRSGLP
R
TAISELHGNMYIEVCTSCVPNREYVRVFDVTERTALHRHQTGRTCHKCGTQLRDTIVHF
G
ERGTLGQPLNWEAATEAASRADTILCLGSSLKVLKKYPRLWCMTKPPSRRPKLYIVNLQ
W
TPKDDWAALKLHGKCDVMRLLELMAELGLEIPAYSRWQDPIFSLATPLRAGEEGSHSRKS
L
CRSREEAPPGDRGAPLSSAPILGGWFGRGCTKRTKRKKVT (配列番号7)

30

【 0 1 0 6 】

40

本明細書に記載している例示化合物は、本明細書に記載している天然もしくは人工基質に対するSIRT1またはそれらの機能性ドメインの活性を少なくとも10、20、25、30、50、80、または90%阻害する。例えば、化合物のKi値は、500、20-、100または50nM以下である。

【 0 1 0 7 】

本明細書に記載している化合物は、サーチュインと転写因子とのコンプレックスをも調節し、例えば、コンプレックスの形成、崩壊および/もしくは安定性を促進または抑制する。サーチュイン-TFコンプレックスの例としては、Sir2-PCAF、Sir2-MyoD、Sir2-PCAF-MyoD、Sir2-p53、Sir2-FoxO1およびSir2-FoxO3などが挙げられる。本明細書に記載している化合物は、Sir2によって制御される遺伝子(例えば、フルコ(Fulco)ら、(2003)Mol.C

50

ell, 12:51-62の表1に記載されている遺伝子など)の発現の調節もする。

【0108】

イン・ビトロ (in vitro) アッセイ

いくつかの実施態様においては、SIRT1との相互作用(結合など)は、イン・ビトロ (in vitro) でアッセイすることができる。反応混合物には、NADおよび/またはNADアナログなどのようなSIRT1補因子を含む。

【0109】

別の実施態様においては、反応混合物には、転写因子など(例えば、p53、または、Fox O1もしくはFoxO3などのようなp53以外の転写因子など)のSIRT1結合パートナーを含み、イン・ビトロ (in vitro) アッセイなどで被験化合物をスクリーニングすることにより、SIRT1とSIRT1結合パートナー(例えば、転写因子など)との相互作用調節能を評価する。このような型のアッセイは、例えば、放射性同位元素または酵素のラベルを成分のうちのひとつにカップリングさせるなどして行うことができるが、このようなラベルは、コンプレックス中のラベル化合物の検出により、ラベルを付けた成分が他の成分に結合したことを判断できるようにするためのものである。成分は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C もしくは ^3H を用いて直接または間接的にラベルすることができ、放射性同位元素は、放射線放出の直接計数またはシンチレーション計数によって検出される。別の方法としては、成分を酵素ラベルすることもでき、そのような酵素の例としては、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼなどが挙げられ、酵素ラベルは、適切な基質が生成物へ転換することによって検出される。競合アッセイを用い、被験化合物と標的との間の物理的相互作用を評価することもできる。

【0110】

セルフリーアッセイには、実験条件下、標的タンパク質(例えば、SIRT1など)および被験化合物を含有する反応混合物の調製を含むが、そのような調製は、2つの成分が相互作用を起こして結合し、分離および/もしくは検出できるようなコンプレックスを形成するのに十分な条件下、十分な時間をかけて行う。

【0111】

2つの分子間の相互作用は、少なくともひとつの分子を蛍光ラベルした状態で蛍光アッセイを行うことによって検出することもできる。そのようなアッセイの一例としては、蛍光エネルギー転位(蛍光共鳴エネルギー転位用のFETまたはFRET)が挙げられる(例えば、ラコヴィクス(Lakowicz)ら、米国特許第5,631,169号; スタヴリアノポウロス(Stavrianopoulos)ら、米国特許第4,868,103号などを参照)。第一の「ドナー」分子上の蛍光団ラベルは、放出された蛍光エネルギーが第二の「アクセプター」分子上の蛍光ラベルによって吸収され、吸収したエネルギーによって該第二の分子が蛍光を発するように選択しなければならない。別の方法としては、「ドナー」タンパク質分子はトリプトファン残基由来の天然の蛍光エネルギーを利用することができる。「アクセプター」分子ラベルを「ドナー」のそれとを区別するために、波長の異なる光を放出するようにラベルを選択する。ラベル間のエネルギー転位効率は、分子間距離に関係があることから、分子間の空間的位置関係を評価することができる。分子間結合が生じている場合には、アッセイにおける「アクセプター」分子ラベルの蛍光放出は最大になるはずである。FET結合事象は、当該分野において既知の標準的な蛍光測定検出手段(例えば、蛍光光度計を使用するなど)によって簡便に測定することができる。

【0112】

蛍光アッセイの別の例としては、蛍光偏光(fluorescence polarization:FP)が挙げられる。FPにおいては、ラベルが必要なのはひとつの成分のみである。結合相互作用は、ラベルした成分の化合物の分子の大きさの変化によって検出する。大きさが変化することにより、溶液中の構成成分の回転速度が変化し、これがFPにおける変化として検出される。例えば、ナシール(Nasir)ら、(1999)Comb.Chem.HTS 2:177-190; ジェイムソン(Jameson)ら、(1995)Methods Enzymol.246:283; シータラ(Seethala)ら、(1998)Anal.Biochem.255:257などを参照のこと。蛍光偏光は、Tecan Polarion(商標)リーダーを用いるなど

してマルチウェルプレートを読み取ることによってモニターできる。例えば、パーカー (Parker) ら、(2000)Journal of Biomolecular Screening 5:77-88; およびシューマン (Shoeman) ら、(1999)38,16802-16809などを参照。

【0113】

別の実施態様においては、SIRT1タンパク質の標的分子への結合能の測定は、リアルタイム生体分子相互作用分析 (Biomolecular Interaction Analysis:BIA) を用いて行うことができる (例えば、ソランダー (Sjolander), S. およびアーバニツキー (Urbaniczky), C. (1991)Anal. Chem. 63:2338-2345; およびサボ (Szabo) ら、(1995)Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705などを参照)。「表面プラズモン共鳴」または「BIA」は、相互作用物質 (例えば、BIAコアなど) をラベルすることなく、生体特異的相互作用をリアルタイムで検出する。結合表面の質量変化 (結合事象の指標) は、表面付近の光の反射率の変化 (表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学的現象) として現れ、その結果、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として用いることができる検出可能なシグナルが発生する。

10

【0114】

ひとつの実施態様においては、SIRT1を固相上に固定する。固相上に固定されたSIRT1 / 試験化合物コンプレックスは、結合反応などの反応の最後に検出することができる。例えば、SIRT1を固相表面上に固定し、試験化合物は、本明細書に記載している検出可能なラベルを用い、直接または間接的にラベルする。

【0115】

SIRT1または抗SIRT1抗体を固定化し、タンパク質の一方または両者の非コンプレックス型からコンプレックス型を分離できるようにし、また、アッセイの自動化に適応させることが望ましい。試験化合物のSIRT1タンパク質への結合、または、候補化合物の存在下および不在下におけるSIRT1タンパク質と第二の構成成分との相互作用は、反応物を入れるのに適した任意の容器内で進行させることができる。そのような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管および微量遠心分離管などが挙げられる。ひとつの実施態様においては、融合タンパク質は、一方または両方のタンパク質をマトリックスに結合させるようなドメインを付加することによって得られる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ / SIRT1融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ / 標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ (シグマ・ケミカル (Sigma Chemical) 社、ミズーリ州セントルイス) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着させることができ、次に、被験化合物、または被験化合物と非吸着標的タンパク質もしくはSIRT1タンパク質との組み合わせを混合し、コンプレックス形成を誘導するような条件下 (例えば、塩およびpHに関する生理的条件など) で混合物をインキュベートした。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートを洗浄して結合していない任意の成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定化し、上述したような方法で直接または間接的にコンプレックスを検出した。別の方法としては、マトリックスからコンプレックスを解離させ、標準的な技術を用いてSIRT1の結合または活性のレベルを測定する。

20

30

【0116】

マトリックスにSIRT1タンパク質または標的分子を固定化するためのその他の技術としては、ビオチンとストレプトアビジンとのコンジュゲートを用いる方法がある。ビオチン化SIRT1タンパク質または標的分子は、当該分野において既知の技術 (例えば、ビオチン化キット、ピアス・ケミカル (Pierce Chemical) 社、イリノイ州ロックフィールド) を用いてビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製することができ、ストレプトアビジンで被覆した96ウェルプレート (ピアス・ケミカル (Pierce Chemical) 社) に固定化することができる。

40

【0117】

アッセイを行うことを目的として、成分を固定し、その上に被膜を施した表面に、固定していない成分を加えた。反応完了後、生成した任意のコンプレックスは固相表面上に固定化されて残存するような条件下、洗浄などによって未反応成分を除去した。固相表面上

50

に固定されているコンプレックスの検出は、多数の方法で行うことができる。固定していない成分に事前にラベルを付している場合には、表面上に固定されたラベルを検出することによってコンプレックスが形成されたことが示される。固定していない成分に事前にラベルを付していない場合には、間接的ラベルを用いて表面上に固定されたコンプレックスを検出することができ、例えば、固定された構成成分に特異的なラベル抗体を用い、そのような抗体は、続いて、ラベルした抗IgG抗体などを用いて直接または間接的にラベルすることができる。

【0118】

ひとつの実施態様においては、本アッセイはSIRT1タンパク質または標的分子と反応する抗体を用いて行うが、そのような抗体は、SIRT1タンパク質の標的分子への結合を干渉しない。そのような抗体を用いてプレートのウェルを誘導体化し、未結合の標的またはSIRT1タンパク質は抗体コンジュゲーションによってウェルに捕獲される。上述のGST固定コンプレックスに加えて、そのようなコンプレックスを検出する方法としては、SIRT1タンパク質もしくは標的分子と反応する抗体を用いて行うコンプレックスの免疫検出、ならびに、SIRT1タンパク質もしくは標的分子と関連のある酵素活性を検出することによって行う酵素免疫アッセイなどが挙げられる。

【0119】

別の方法としては、液相中でセルフリーアッセイを行うことができる。そのようなアッセイにおいては、多数の標準的な技術のうちの任意のものにより、未反応成分から反応生成物を分離する。そのような技術としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：遠心分画法（例えば、リヴァス（Rivas）, G. およびミントン（Minton）, A. P. (1993) Trends Biochem. Sci., 18: 284-287などを参照）；クロマトグラフィー（ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー）；電気泳動（例えば、アウスベル（Ausbel）, F. ら、編、「分子生物学における最新プロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）」、1999年、J. ウィレー（Wiley）社：ニューヨークなどを参照）；および免疫沈降法（例えば、アウスベル（Ausbel）, F. ら、編、「分子生物学における最新プロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）」、1999年、J. ウィレー（Wiley）社：ニューヨークなどを参照）。そのような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者においては既知である（例えば、ヘーガード（Heegaard）, N. H. (1998) J. Mol. Recognit., 11: 141-148、；ハーゲ（Hage）, D. S. およびトゥイード（Tweed）, S. A. (1997) J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 699: 499-525、などを参照）。さらに、本明細書において記載しているように、蛍光エネルギー転位もよく用いられており、溶液からコンプレックスをさらに精製することなく、結合を検出することができる。

【0120】

好ましい実施態様においては、アッセイは、SIRT1タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部位に、SIRT1と結合する既知化合物を接触させてアッセイ混合物を形成すること、アッセイ混合物を試験化合物と接触させ、試験化合物のSIRT1タンパク質との相互作用能を判断することを含み、ここで、試験化合物のSIRT1タンパク質との相互作用能を判断することは、既知の化合物と比較して、試験化合物がSIRT1もしくはそれらの生物学的に活性な部位と優先的に結合する、または、標的分子の活性を調節する能力を判断することを含む。

【0121】

アッセイ法の例としては、バイオモル（Biomol）社から市販されている発蛍光性の「Fluor-de-Lys」アッセイ原理に基づく、1536ウェルフォーマットのSirT1酵素アッセイが挙げられる（www.biomol.com/store/Product_Data_PDFs/ak500.pdf）。このアッセイにおいては、リジン性残基のε-アミノ機能の脱アセチル化を発蛍光段階と組み合わせしており、そのような段階は、ブロックされていないε-アミノ官能基依存性であり、蛍光性のアミノメチルクマリンを生成する。蛍光は、市販の肉眼リーダーで読み取ることができる。

【0122】

その他のアッセイ

本明細書に記載している化合物または化合物ライブラリーは、疾病もしくは疾患に対する以下のようなモデル系、または、本明細書に記載している疾病もしくは疾患のその他の既知のモデルのうちのひとつを用いて評価することもできる。

【0123】

筋萎縮症に対する試験化合物の効果を評価するためのモデルとしては、例えば、1) 神経除去 (大腿中央で右の坐骨神経を切断するなど) によって内側腓腹筋量が減少しているラット; 2) 固定 (右の足関節を90°に曲げて固定するなど) によって内側腓腹筋量が減少しているラット; 3) 後肢吊り下げによって内側腓腹筋量が減少しているラット (米国特出願2003-0129686を参照); 4); カケクチン性サイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1) で処理することによる骨格筋萎縮 (R.N. クーニー (Cooney)、S.R. キンボール (Kimball)、T.C. ヴァリー (Vary)、Shock, 7, 1-16 (1997)); 5) 糖質コルチコイドであるデキサメタゾンをを用いて処理することによる骨格筋萎縮 (A.L. ゴールドバーグ (Goldberg)、J. Biol. Chem. 244, 3223-3229 (1969)) などが挙げられる。モデル1、2および3は、神経活動を变化させることにより、および/または、筋肉に多様な角度をとらせるような外的負荷をかけることにより、筋萎縮を誘導している。モデル4および5は、これらのパラメーターのMSに直接影響を与えることなく萎縮を誘導している (実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)) (例えば、ガヴァーマン (Goverman) ら、Cell, 72: 551-560 (1993) による記載、および、霊長類モデルについては、ブロック (Brok) ら、Immunol. Rev., 183: 173-185 (2001) による総説など)。

10

【0124】

AMD (老人性黄斑変性) の動物モデルの例としては、滲出性 (湿性) 黄斑変性をシュミレートしたレーザー誘導マウスモデル (ボラ (Bora) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100: 2679-2684 (2003)); カテプシンDの突然変異型を発現し、AMDの「地図状萎縮」型に関連する特徴を呈するトランスジェニックマウス (ラコツィ (Rakoczy) ら、Am. J. Pathol., 161: 1515-1524 (2002)); および、網膜色素上皮内でVEGFを過剰発現し、CNVを呈するトランスジェニックマウス (シュウエジンガー (Schwesinger) ら、Am. J. Pathol., 158: 1161-1172 (2001)) などが挙げられる。

20

【0125】

パーキンソン病の動物モデルの例としては、ドーパミン作動性神経毒である1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) を用いた処理によってパーキンソン症状を発現させた霊長類 (例えば、米国特許出願20030055231号およびウィッチマン (Wichmann) ら、Ann. N.Y. Acad. Sci., 991: 199-213 (2003) などを参照); 6-ヒドロキシドーパミン障害性ラット (例えば、Lab. Anim. Sci., 49: 363-371 (1999) など); およびトランスジェニック無脊椎モデル (例えば、ラクソ (Lakso) ら、J. Neurochem., 86: 165-172 (2003) およびリンク (Link)、Mech. Ageing Dev., 122: 1639-1649 (2001) など) などが挙げられる。

30

【0126】

II型糖尿病の分子モデルの例としては、Nkx-2.2またはNkx-6.1が欠損しているトランスジェニックマウス (米国特許第6,127,598号); Zucker Diabetic Fatty fa/fa (ZDF) ラット (米国特許第6569832号); 自然に肥満を呈し、続いてII型糖尿病を発症する頻度が高いアカゲザル (ホッタ (Hotta) ら、Diabetes, 50: 1126-1133 (2001)); およびIGF-I受容体を持たない形質が優勢であり (KR-IGF-IR)、II型糖尿病様のインスリン抵抗性を示すトランスジェニックマウスなどが挙げられる。

40

【0127】

神経障害に関する動物および細胞モデルの例としては、マウス (米国特許出願5420112号) またはウサギ (オガワ (Ogawa) ら、Neurotoxicology, 21: 501-511 (2000)) におけるピンクリスチン誘導性の感覚運動性神経障害; 自律神経性神経障害実験用のストレプトゾトシン (STZ) 誘導性糖尿病ラット (シュミット (Schmidt) ら、Am. J. Pathol., 163: 21-28 (2003)); ならびに進行性運動神経障害 (pmn) マウス (マーティン (Martin) ら、Genomics, 75: 9-16 (2001)) などが挙げられる。

50

【0128】

構造活性相関および構造に基づく分子設計

構造活性相関 (SAR) および構造に基づく分子設計原理を利用してサーチチェーンと相互作用する化合物、例えば、サーチチェーンに拮抗する、もしくは作動する化合物を産成することもできる。SARsにより、少なくとも1種類の関連するアッセイにおいて、関連化合物の活性に関する情報が得られる。目的の化合物の構造的特徴と活性との間の相関が明らかになる。例えば、本明細書に記載している化合物に関連する化合物群に対してSARsを評価することにより、アゴニストの活性に必要な1種類もしくはそれ以上の構造的特徴を確認することができる。次にこれらの特徴を変化させた化合物ライブラリーを化学的に調製することができる。別の実施態様においては、相互作用することが予測される単一の化合物を調製し、イン・ビトロ (in vitro) またはイン・ビボ (in vivo) で評価する。

10

【0129】

構造に基づく分子設計には、サーチチェーンの機能性ドメインと化合物との物理的相互作用に関する構造モデルを規定することを含む。構造モデルから、化合物をどのように操作すれば、相互作用が強化されるのか、または、好ましくない相互作用が減弱されるのか、などについて示唆される。化合物のサーチチェーンとの相互作用は、結晶構造解析、NMRまたはコンピューターに基づくモデリング (例えば、ドッキング法など) などによって確認することができる。ユーイング (Ewing) ら、J. Comput. Aided Mol. Des., 2001, May; 15(5): 411-428などを参照。

【0130】

20

SARおよび構造に基づく分子設計法、ならびにその他の方法を用いてファーマコフォア (pharmacophore) を確認することができる。ファーマコフォアは、化学基の固有の三次元 (3D) 配置として定義される。そのような基を選択することは、生物学的活性に好ましい。薬剤学的に活性な分子は、有効性を発揮するためには、対象の体内のひとつもしくはそれ以上の分子構造と相互作用しなければならず、分子に所望される機能特性は、これらの相互作用に由来するものであり、各活性化合物は、このような相互作用が起こり得るような化学基の固有の配置を有する必要がある。一般に、デスクリプター中心 (descriptor center) と称される化学基は、(a) 原子または原子群; (b) 偽原子、例えば、環の中心もしくは分子構造の中心など; (c) ベクトル、例えば、原子対、孤立電子対方向、もしくは平面に対して垂直などによって表すことができる。一旦ファーマコフォアを作成すると、これを用いて化合物のデータベース (例えば、ファーマコフォアと互換性のある構造を有するものなど) を検索することができる。例えば、米国特許第6,343,257号; Y.C. マーティン (Martin)、*「薬物分子設計における3Dデータベース検索 (3D Database Searching in Drug Design)」*、J. Med. Chem., 35, 2145 (1992); A.C. グッド (Good) および J.S. マソン (Mason)、*「総説: 三次元構造データベース検索 (Three Dimensional Structure Database Searches)」*、Comp. Chem., 7, 67 (1996) などを参照。データベース検索照会とは、化学的特性の情報のみならず、正確な遺伝子情報にも基づいている。

30

【0131】

コンピューターに基づく手法は、データベース検索を利用して一致する鋳型を見出すことができ、Y.C. マーティン (Martin)、*「薬物分子設計における3Dデータベース検索 (3D Database Searching in Drug Design)」*、J. Med. Chem., 35, 2145 (1992) を参照として本明細書中に取り入れておく。化合物の2-Dおよび3-Dデータベースを検索するための既存の方法も用いることができる。レダリー・オブ・アメリカン・シアナミド (Lederle of American Cyanamid) 社 (ニューヨーク州パールリバー) は、分子形状検索、3D検索およびデータベースの傾向ベクトルを開発している。営利企業およびその他の研究グループも検索の可能性を提供している (MACSS-3D、モレキュラー・デザイン (Molecular Design) 社 (カリフォルニア州サンリアンドロ); CAVEAT、ラウリ (Lauri), G. ら、カリフォルニア大学 (カリフォルニア州バークレー); CHEM-X、ケミカル・デザイン (Chemical Design) 社 (ニュージャージー州マーワー) など)。これらの検索用のソフトウェアを用い、顕著な化学的および遺伝子的構造によって示される薬物候補化合物のデータベースを分析する

40

50

ことができる（例えば、標準薬物ファイル（ダーウェント・パブリケーションズ（Derwent Publications）社、英国、ロンドン）；ビールスタイン・データベース（Bielstein Database）（ビールスタイン・インフォメーション（Bielstein Information）、ドイツ、フランクフルトまたはシカゴ）；ケミカル・レジストリー・データベース（CAS、オハイオ州コロンバス）など）。

【0132】

化合物がファーマコフォアと一致することが確認されると、イン・ビトロ（in vitro）、イン・ビボ（in vivo）またはコンピューター（in silico）において活性（例えば、サ－チェーンまたはそれらのドメインに対する結合など）を試験する。

【0133】

ひとつの実施態様においては、アゴニストもしくはアゴニスト候補であるような化合物（例えば、Nature, 2003 Sep.11;425(6954):191-196に記載されている化合物など）を変形し、本明細書に記載している方法を用いるなどしてアンタゴニストを確認することができる。例えば、関連化合物のライブラリーを調製し、本明細書に記載されている任意のアクセシによってライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0134】

本発明に従う化合物の薬剤学的に許容される塩には、薬剤学的に許容される無機性および有機性の酸ならびに塩基から派生したものを含む。適切な酸塩類の例としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ビスルフェート、ブチレート、クエン酸塩、カンファレート、カンファスルホネート、ジグルコン酸、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ホルメート、フマル酸塩、グルコヘプタノエート、グリコレート、ヘミスルフェート、ヘプタノエート、ヘキサノエート、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクテート、マレエート、マロネート、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、ニトレート、パルモエート、ペクチネート、パースルフェート、3-フェニルプロピオン酸塩、ホスフェート、ピクリン酸塩、ピバレート、プロピオネート、サリチル酸塩、コハク酸塩、スルフェート、酒石酸塩、チオシアナート、トシレートおよびウンデカン酸塩などが挙げられる。シュウ酸などのその他の酸は、それ自身は薬剤学的に許容されないが、本発明に従う化合物および薬剤学的に許容されるそれらの酸塩類を得るための中間体として有用な塩類の調製に用いることができる。適切な塩基から誘導される塩類としては、アルカリ金属（ナトリウムなど）、アルカリ土類金属（マグネシウムなど）、アンモニウム塩およびN-（アルキル）₄⁺塩などが挙げられる。本発明は、本明細書に記載されている任意の塩基性窒素含有基の四級化をも包含する。そのような四級化により、水もしくは油に可溶性または分散性の生成物が得られる。本明細書に記載している任意の化学式で表される化合物の塩は、カルボキシル基のアミノ酸塩（例えば、L-アルギニン塩、-リジン塩、-ヒスチジン塩など）の様式である。

【0135】

本明細書に記載している化学式で表される化合物は、例えば、注射、静脈内、動脈内、皮下、腹膜内、筋肉内；または、経口、口腔内、経鼻、経粘膜、局所、眼用処方、あるいは吸入などにより、投与量としては、約0.5～約100mg/kg、別の表現では、1回あたり1mg～1000mgを4～120時間毎に、または特定の薬物の必要に応じて投与することができる。本明細書に記載している方法は、化合物または化合物の組成物の有効量を投与することにより、所望される、もしくは規定された効果を発揮することを含む。一般的には、本発明に従う薬剤学的組成物は、一日約1～約6回投与するか、または、連続輸液を行う。そのような投与法は、長期または救急治療として実施することができる。キャリアー材料と合わせて単一の投与様式に加工するための活性材料の量は、治療を受ける対象、および特定の投与方法に応じて変化する。典型的な処方は、約5～約95%（w/w）の活性化合物を含む。別の処方では、約20～約80%の活性化合物を含む。

【0136】

上に記載した値よりも低い、または高い投与量を必要とする場合もある。任意の特定の

10

20

30

40

50

患者に対する特定の投与量および治療法は多様な因子によって異なり、そのような因子としては、使用する特定の化合物の活性、年齢、体重、総合的な健康状態、性別、食事、投与時間、排出速度、薬物の組み合わせ、疾病、病状もしくは症状の重篤度および経過、疾病、病状もしくは症状に対する患者の素因、治療に当たっている医師の判断など。

【0137】

患者の病状が回復期にあるときには、必要があれば、維持投与量の本発明に従う化合物、組成物もしくは組み合わせを投与する。続いて、症状が所望するレベルまで緩和された場合には、症状に応じ、改善された状態を維持するレベルまで投与量もしくは投与回数またはそれらの両方を減らす。しかしながら、疾病症状の再燃に備えて、患者は長期間の断続的治療を要する。

10

【0138】

本明細書に記載している組成物には、本明細書に記載しているものを含む疾病もしくは疾病症状の緩和に有効な量の本明細書に記載している化学式で表される化合物、ならびに、あり得るならば追加の治療剤を含む。

【0139】

「薬剤学的に許容されるキャリアーまたはアジュバント」とは、本発明に従う化合物と共に患者に投与するキャリアーまたはアジュバントをさし、化合物の薬剤学的活性を破壊せず、治療量の化合物を送達するのに十分な量を投与した場合に、非毒性である。

【0140】

本発明に従う薬剤学的組成物に使用することができる薬剤学的に許容されるキャリアー、アジュバントまたはビヒクルとしては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：イオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、自己乳化性（self-emulsifying）薬物送達システム（SEDDS）（d-α-トコフェロールポリエチレングリコール1000コハク酸塩など）、薬剤投与剤型において使用される界面活性剤（Tween類またはその他の同様なポリマー性送達マトリックスなど）、血清タンパク質（ヒト血清アルブミンなど）、緩衝性物質（ホスフェート類など）、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸類の部分グリセリド混合物、水、塩類または電解質（硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩類、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウムなど）、ポリビニルピロリドン、セルロールに基づく物質、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、ポリアクリレート類、ワックス類、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー類および羊毛脂など。シクロデキストリン類、例えば、α-シクロデキストリン、あるいは、ヒドロキシアルキルシクロデキストリンなどのような化学的に変形された誘導体類（2-および3-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン類またはその他の可溶性誘導体類を含む）を用いることにより、本明細書に記載されている化学式を有する化合物の送達を促進することもできる。

20

30

【0141】

本発明に従う薬剤学的組成物は、経口、非経口、吸入スプレー、局所、経直腸、経鼻、口腔内、膈内、または埋込リザーバーによって投与することができるが、好ましくは、経口投与または注射による投与である。本発明に従う薬剤学的組成物は、従来から使用されている任意の非毒性かつ薬剤学的に許容されるキャリアー、アジュバントまたはビヒクルを含む場合がある。いくつかの場合においては、調製物のpHは、薬剤学的に許容される酸、塩基または緩衝液で調整し、調製された化合物またはその送達型の安定性を向上させる。本明細書において使用している非経口とは、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液内、胸骨内、鞘内、病変内および頭蓋内注射、あるいは輸液などが挙げられる。

40

【0142】

薬剤学的組成物は、例えば、注射可能な滅菌水性または油性の懸濁液などのような注射可能な滅菌調製物の様式にすることができる。この懸濁液は、適切な分散剤もしくは湿潤剤（例えば、Tween80など）ならびに懸濁化剤を用い、当該分野において既知の技術に従

50

って調製することができる。注射可能な滅菌調製物は、注射可能な滅菌溶液、または、非毒性非経口用希釈剤もしくは溶媒で調製した注射可能な滅菌懸濁液（例えば、1,3 - ブタンジオール溶液など）にすることもできる。使用可能な許容されるビヒクルおよび溶媒としては、マンニトール、水、リンゲル液および等張塩化ナトリウム溶液などが挙げられる。さらに、滅菌固定油も溶媒または懸濁化剤として従来から用いられている。このような目的を達成するためには、合成モノ - またはジ - グリセリド類を用いることができる。オレイン酸およびそのグリセリド誘導体類などの脂肪酸類も注射剤の調製に有用であり、それらとしては、天然の薬剂的に許容される油類（オリーブ油またはひまし油など）、特に、それらのポリオキシエチル化体が用いられる。これらの油溶液または懸濁液は、長鎖アルコール希釈剤もしくは分散剤、あるいは、カルボキシメチルセルロースもしくは同様の分散剤をも含有している場合があるが、それらは、エマルションまたは懸濁液などのような薬剤学的に許容される投与剤型の調製に汎用されている。薬剤学的に許容される固体、液体またはその他の投与剤型に汎用されているその他の一般的な界面活性剤（Tween類もしくはSpan類ならびに / またはその他の同様な乳化剤あるいは生物学的利用率向上剤など）も調製に使用することができる。

10

【0143】

本発明に従う薬剤学的組成物は、経口可能な任意の投与剤型で経口投与することができる、そのような剤型としては、カプセル、錠剤、エマルションおよび水性懸濁液、分散剤および溶液などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。経口用錠剤の場合には、汎用されるキャリアーとしては、乳糖およびコーンスターチが挙げられる。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤も添加される。カプセル型の経口投与剤においては、有用な希釈剤としては、乳糖および乾燥コーンスターチが挙げられる。水性懸濁液および / もしくはエマルションを経口投与する場合には、油相中に分散または溶解した活性成分を乳化剤および / もしくは懸濁剤と合わせる。所望するならば、ある種の甘味料および / もしくは香料および / もしくは着色剤を添加する。

20

【0144】

本発明に従う薬剤学的組成物は、直腸投与用の坐剤の形で投与することもできる。これらの組成物は、本発明に従う化合物を適切な非刺激性賦形剤と混合することによって調製できるが、そのような賦形剤は、室温では固体だが直腸温度では液体であるため、直腸内で溶解して活性成分を放出する。そのような材料としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：カカオ脂、蜜蝋およびポリエチレングリコール類など。

30

【0145】

本発明に従う薬剤学的組成物の局所投与は、所望する治療が、局所使用によってすぐに到達可能な領域または臓器に対するものである場合には有用である。皮膚への局所投与の場合には、キャリアーに懸濁、もしくは溶解させた活性成分を含有する適切な軟膏を用いて薬剤学的組成物を調製する。本発明に従う化合物の局所投与用キャリアーとしては、次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：鉱油、流動ワセリン（liquid petroleum）、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックスおよび水など。別の方法としては、適切な乳化剤を用いてキャリアー中に懸濁または溶解させた活性成分を含有する適切なローションまたはクリームを使用して薬剤学的組成物を調製する。適切なキャリアーとしては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：鉱油、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート60、セチルエステル類ワックス、セテアリルアルコール（cetearyl alcohol）、2 - オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水など。本発明に従う薬剤学的組成物は、直腸坐剤または適切な浣腸剤として、消化管下部に局所使用することができる。局所経皮パッチも本発明に含まれる。

40

【0146】

本発明に従う薬剤学的組成物は、経鼻エアロゾルまたは吸入によって投与することができる。そのような組成物は、製剤学分野において既知の技術によって調製することができ

50

、ベンジルアルコールもしくはその他の適切な保存剤、生物学的利用率を向上させるための吸収促進剤、フルオロカーボン類、ならびに／または、当該分野において既知のその他の可溶化剤もしくは分散剤を用い、生理食塩中の溶液として調製することができる。

【0147】

本明細書に記載している化学式で表される化合物を含む組成物および追加物質（例えば、治療剤など）は、埋込み可能なデバイスを用いて投与することができる。埋込み可能なデバイスおよび関連技術は当該分野において既知であり、本明細書に記載している化合物または組成物の連続的もしくは時間制御送達が可能である場合には、送達系として有用である。さらに、埋込み可能なデバイスによる送達系は、化合物または組成物送達の特異点の標的化（例えば、局所部位、臓器など）に有用である。ネグリン（Negrin）ら、*Biomaterials*, 22(6):563(2001)。別の送達法を含む時間制御技術も本発明に使用することができる。例えば、ポリマー技術、持続性技術およびカプセル封入化技術（例えば、ポリマー性、リポソーム性など）に基づく時間制御型製剤も、本明細書に記載している化合物および組成物の送達に使用することができる。

10

【0148】

本発明には、本明細書に記載している活性化学療法剤を送達するためのパッチも含まれる。パッチは、材料層（例えば、ポリマー、布、ガーゼ、包帯など）および本明細書に記載している化学式で表される化合物を含む。材料層の一面は、化合物または組成物の通過を防ぐために接着させている保護層を有する。パッチは、対象の特定位置にパッチを保持するための粘着剤を追有する場合がある。粘着剤は、天然または合成由来の成分を含有する組成物であり、対象の皮膚に接触させた場合に、一時的に皮膚に接着する。パッチは耐水性に加工することができる。粘着剤をパッチに付け、対象の皮膚に接触させることにより、比較的長時間パッチを保持することができる。粘着剤は、副次的に接触した場所にデバイスを保持するような粘着性または接着強度を有するが、積極的行為（例えば、はぎ取り、はがし、またはその他の故意による除去）によってデバイスまたは粘着剤自身にかけられた外圧に屈し、粘着接触が壊れる。粘着剤は圧力感受性であり、粘着剤もしくはデバイスに圧力をかける（例えば、押しつける、擦るなど）ことにより、皮膚に対して粘着剤の位置を定め、デバイスを皮膚に接着させることができる。

20

【0149】

本発明に従う組成物は、本明細書に記載している化学式で表される化合物の組み合わせ、ならびに、1種もしくはそれ以上の追加の治療剤または予防剤を含み、化合物および追加剤の含有量は、投与量に対して約1～100%、より好ましくは、単独療法において通常投与される投与量に対して約5～95%である。追加剤は、複数回投与法の一部として、本発明に従う化合物とは別に投与することができる。別の方法としては、ひとつの組成物中に、本発明に従う化合物と共に追加剤を混合し、単回投与の一部とすることができる。

30

【0150】

新生物疾患

本発明に従う化合物は、癌の治療に使用することができる。本明細書において使用しているように、「癌」、「過増殖性」、「悪性腫瘍」、および「新生物」は相互に読み替えて使用され、急速な増殖または新生物によって特徴付けられる、異常状態の細胞をさす。これらの語には、組織病理学的型または侵襲性の段階には関係なく、全ての型の癌性増殖もしくは腫瘍形成過程、転移性組織もしくは腫瘍形成細胞、組織もしくは臓器を含む。「病理性過増殖性」細胞は、悪性腫瘍増殖によって特徴付けられる疾病段階において生じる。

40

【0151】

「新生物」という語の一般的医学的意味は、「新しい細胞の増殖」をさし、これは、正常な増殖制御に対する応答性を消失した結果である（例えば、新生物形成性細胞増殖など）。「過形成」とは、異常に高速増殖する細胞をさす。しかしながら、本明細書において使用しているように、新生物と過形成とは相互に読み替えることができ、前後関係から明らかかなように、一般的には、細胞増殖速度が異常に速い細胞をさす。新生物および過形成

50

には「腫瘍」を含み、それらは良性、前悪性または悪性である。

【0152】

癌様疾患の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：充実性腫瘍、軟部組織腫瘍、および転移性病変など。充実性腫瘍の例としては、多様な臓器系（肺、乳房、リンパ、胃腸管（例えば、結腸など）、尿生殖器（例えば、腎細胞、尿路上皮細胞など）、咽頭、前立腺、卵巣など）の肉腫、腺癌および癌腫などの悪性腫瘍、ならびに、大多数の結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞性肺癌、小腸癌などのような悪性腫瘍を含む腺癌などが挙げられる。上述の癌の転移性病変も本明細書に記載している化合物を用いて治療または予防することができる。

【0153】

本発明に従う方法は、多様な臓器系（肺、乳房、リンパ、胃腸管（例えば、結腸など）、尿生殖器、前立腺、卵巣、咽頭など）の悪性腫瘍、ならびに、大多数の結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌、精巣癌、非小細胞性肺癌、小腸癌、食道癌などの悪性腫瘍を含む腺癌などの治療に有用である。治療可能な充実性腫瘍の例としては次のようなものが挙げられる：線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、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、滑膜肉腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫、脾臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫、子宮頸癌、精巣癌、肺癌、小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌、膀胱癌、上皮癌、グリオーム、アストロチトーム、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫など。

【0154】

「癌（カルシノーマ）」という語は当業者に既知であり、上皮または内分泌組織の悪性腫瘍であり、気管支系癌、胃腸管系癌、尿生殖器系癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌および黒色腫などが含まれる。カルシノーマの例としては、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭および首、結腸ならびに卵巣の組織から形成されるものが挙げられる。カルシノーマという語は、癌肉腫をも含み、例えば、カルシノーマ性および肉腫性組織を含む悪性腫瘍などが挙げられる。「腺癌（アデノカルシノーマ）」とは、腺様組織由来、または、内部の腫瘍細胞が認識可能な腺様構造を形成しているカルシノーマをさす。

【0155】

「肉腫（サルコーマ）」は、当業者において既知であり、間葉由来の悪性腫瘍をさす。

【0156】

本発明の方法を用いることにより、造血起源（例えば、骨髄、リンパ腺もしくは赤血球系統、またはそれらの前駆体細胞に由来するものなど）の増殖性/新生物細胞の増殖、を阻害することもできる。例えば、本発明は、次のような多様な骨髄性疾患の治療を包含するが、これらに限定されるわけではない：急性前骨髄性白血病（APML）、急性骨髄性白血病（AML）および慢性骨髄性白血病（CML）など（ヴァイクス（Vaickus）, L. による総説、(1991) Crit. Rev. in Oncol./Hematol., 11:267-297）。本発明の方法によって治療することができるリンパ性悪性腫瘍としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：急性リンパ芽球性白血病（ALL）（B細胞系ALLおよびT細胞系ALLを含む）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、毛様細胞性白血病（HLL）、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症（WM）など。悪性リンパ腫のさらなる型としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：非ホジキンリンパ腫およびその変形種、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、大顆粒リンパ球性白血病（LGL）およびホジキン病など。

【0157】

アルツハイマー病

アルツハイマー病（AD）は、複合神経変性疾患であり、ニューロンの不可逆的消失に至

10

20

30

40

50

り、少なくとも部分的にはタンパク質凝集が原因で引き起こされる症状を有する神経変性疾患の一例である。本明細書に記載している化合物を用いることにより、ADを呈している対象の症状のうちの少なくともひとつを緩和することができる。

【0158】

アルツハイマー病の臨床的特徴としては、記憶、判断、物理的環境への見当識および言語に関する進行性の障害が挙げられる。ADの神経病理学的特徴としては、領域特異的なニューロン消失、アミロイド斑および神経原線維濃縮体などが挙げられる。アミロイド斑は、
- アミロイド前駆体タンパク質 (APPとしても知られている) の分解生成物である
- アミロイドペプチド (A_β またはA₄₂としても知られている) を含む細胞外斑である。
神経原線維濃縮体は、異常に高リン酸化した微小管関連タンパク質tauの微細線維からなる不溶性の細胞内凝集体である。アミロイド斑および神経繊維濃縮体は、アポトーシスによる神経消失に至る二次的事象に関与している (クラーク (Clark) およびカーラウィッシュ (Karlavish), Ann. Intern. Med., 138(5):400-410(2003))。例えば、培養ニューロンにおいては、
- アミロイドはカスパーゼ-2依存性アポトーシスを誘導する (トロイ (Troy) ら, J. Neurosci., 20(4):1386-1392)。同様に、イン・ビボ (in vivo) においては、プラークが沈積することにより、近傍ニューロンのアポトーシスが誘発される。

10

【0159】

APP、プレセニリン-1およびプレセニリン-2をコードしている遺伝子内の突然変異は、ADの早期発症に関係があると考えられている (レンドン (Lendon) ら, JAMA, 227:825(1997))。これらのタンパク質における突然変異は、A_β を生成する細胞内経路を介して進行するAPPのタンパク質分解過程を促進することが示されている。A_β 過程の異常制御がアミロイド斑形成および該斑の関与しているニューロン損傷の主因である。

20

【0160】

遺伝子、生化学、生理学および認知分野を含む多様な領域を利用して対象のADを評価することができる。ADの症状および診断は医療従事者には既知である。ADのいくつかの症状および指標の例を以下に示す。ADとの関連が明らかにされているこれらの徴候およびその他の徴候に関する情報を「AD関連パラメーター」として使用することができる。AD関連パラメーターには、定性的または定量的情報が含まれる。定量的情報の例としては、ひとつもしくはそれ以上の次元の数値、例えば、タンパク質の濃度または断層撮影地図などが挙げられる。定性的情報としては、医師のコメントまたは二者択一 (「はい / 「いいえ」」) の評価などが挙げられる。AD関連パラメーターには、対象がADでない、または、ADに関する特定の指標を示さない (例えば、ADの特徴を示していないという認知試験の結果、または、ADに関連のない遺伝子のAPOE多型など) ことを示す情報も含まれる。

30

【0161】

進行性の認知障害がADの特徴である。この障害は、記憶、判断、意志決定、物理的環境への見当識および言語の衰えとして現れる (ヌスバウム (Nussbaum) およびエリス (Ellis), New Eng. J. Med., 348(14):1356-1364(2003))。その他の型の痴呆を除外することにより、ADの診断が下しやすくなる。

【0162】

AD患者では、ニューロンが死ぬことによって進行性の脳萎縮が生じる。画像法 (例えば、核磁気共鳴画像法またはコンピュータトモグラフィーなど) を用いることにより、脳および / もしくは脳萎縮におけるAD関連損傷を検出することができる。

40

【0163】

AD患者は、疾病病理から来る生化学的異常を示す。例えば、AD患者においては、脳脊髄液中のtauタンパク質のレベルが上昇している (アンドレアセン (Andreasen), N. ら, Arch. Neurol., 58:349-350(2001))。AD患者においては、CSF中のアミロイド A₄₂ (A₄₂) のレベルが低下している (ガラスコ (Galasko), D. ら, Arch. Neurol., 55:937-945(1998))。A₄₂ のレベルは、AD患者の血漿中では上昇している (アーテカイン - タナー (Ertekin-Taner), N. ら, Science, 290:2303-2304(2000))。対象由来のサンプル中の生化学的異常を検出する技術としては、当該分野における細胞学的、免疫学的、およびその他の生物

50

学的方法などが挙げられる。一般的な手引き書としては、例えば、サンプブック (Sambrook) およびラッセル (Russell)、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第3版、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (ニューヨーク) (2001)；アウスベル (Ausbel) ら、「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、グリーン・パブリッシング・アソシエーツおよびウィレー・インターサイエンス (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience) (ニューヨーク) (1989)；ハーロウ (Harlow), E. およびレーン (Lane), D.、「抗体：実験室マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)」、コールドスプリングハーバーラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (ニューヨーク州コールドスプリングハーバー)、ならびにそれらの改訂版などを参照。

10

【0164】

例えば、抗体、その他の免疫グロブリンおよびその他の特異的結合リガンドを用いることにより、ADに関連のあるタンパク質またはその他の抗原などの生体分子を検出することができる。例えば、ひとつもしくはそれ以上の特異抗体を用いてサンプルを探索することができる。ELISA類、蛍光に基づくアッセイ、ウェスタンブロットおよびタンパク質アレイなどの多様な様式が可能である。ポリペプチドアレイを作成する方法については、例えば、デ・ウィルド (De Wildt) ら、(2000) *Nature Biotech.*, 18:989-994；ルーキング (Lueking) ら、(1999) *Anal. Biochem.*, 270:103-111；ゲー (Ge), H. (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28, e3, I-VII；マクベース (McBeath), G. およびシュライバー (Schreiber), S.L., (2000) *Science*, 289:1760-1763、；および国際公開WO 99/51773A1などに記載されている。タンパク質は、質量分析、クロマトグラフィー、電気泳動、酵素相互作用を利用する、または、翻訳後修飾（例えば、リン酸化、ユビキチン化、グリコシル化、メチル化またはアセチル化など）を検出するプローブを利用することによっても分析することができる。

20

【0165】

手術、抽出、死後、またはその他のサンプル採取（例えば、血液、CSFなど）によって採取した対象由来の細胞において、核酸発現を検出することができる。ハイブリダイゼーションなどに基づく技術（例えば、ノーザン分析、RT-PCR、SAGEおよび核酸アレイなど）を用い、ひとつもしくはそれ以上の遺伝子の発現を評価することができる。核酸サンプルは、サンプル中の複数のmRNA種のプロファイリングに有用である。核酸アレイは、フォトリソグラフ法（例えば、米国特許第5,143,854号、第5,510,270号および第5,527,681号などを参照）、メカニカル法（例えば、米国特許第5,384,261号に記載されているようなディレクテッド・フロー法 (directed-flow methods) など）、ピン法（例えば、米国特許第5,288,514号など）およびビーズ技術（例えば、PCT US/93/04145など）などの多様な方法によって作成することができる。

30

【0166】

AD関連の代謝物は、酵素結合アッセイ、ラベルした前駆体の使用、および核磁気共鳴法 (NMR) などを含む多様な手段によって検出することができる。例えば、NMRを用いてサンプル中のホスフェート化合物の相対濃度（例えば、クレアチン濃度など）を測定することができる。その他の代謝パラメーター、例えば、酸化還元状態、イオン濃度 (Ca²⁺など)（例えば、イオン感受性染色などを利用）および膜電位（例えば、パッチクランプ技術などを利用）なども検出することができる。

40

【0167】

AD関連マーカーに関する情報は、コンピューター読み取り可能な様式で記録および/または保存することができる。一般的に、情報は、対象に関するレファレンスにリンクさせ、また、対象のサーチチェーンをコードしている遺伝子内の1個もしくはそれ以上のヌクレオチドの確認に関する情報と、直接または間接的に連携されている。

【0168】

ひとつの実施態様においては、ADの非ヒト動物モデル（例えば、マウスモデルなど）を用い、本明細書に記載している化合物、またはそのような化合物を用いた治療法を評価す

50

る。例えば、米国特許第6,509,515号には、学習および記憶試験にそのまま使用することができるひとつのそのような動物モデルが記載されている。そのような動物は、生後短期間、一般的には生後1年以内、好ましくは生後2～6ヶ月以内に、進行性の神経障害を発現するような濃度のアミロイド前駆体タンパク質（APP）を脳内で発現する。APPタンパク質配列は、胚期、好ましくは1細胞期、または、受精卵母細胞期であって、一般的には8細胞期より前の段階で、動物もしくは動物の先祖に導入する。次に、偽妊娠養母の体内で接合体または胚を発達させる。アミロイド前駆体タンパク質遺伝子は、脳の皮質辺縁系、ADなどの進行性神経疾患において著しく影響を受ける脳の領域において、アミロイド前駆体タンパク質が内因性過剰発現をし、進行性の神経疾患を発症するような状態で染色体に組み込まれるように、動物の胚に導入する。トランスジェニック動物におけるグリオーシスおよび臨床徴候は神経疾患を模している。神経性疾患の進行性側面は、探索行動および／もしくは運動行動の減弱、ならびに、2 - デオキシグルコースの取込み／利用の低下、および脳の皮質辺縁系における肥厚性グリオーシスによって特徴付けられる。さらに、数種類の加齢動物において観察されるのと同様の変化が観察される。その他の動物モデルについては、米国特許第5,387,742号；第5,877,399号；第6,358,752号および6,187,992にも記載されている。

10

【 0 1 6 9 】

パーキンソン病

パーキンソン病は、黒質内のドーパミン作動性ニューロンの神経変性を含み、運動機能を制御する黒質線状体ドーパミン系の変性を生じる。続いて、この疾病は運動機能障害を引き起こす（例えば、ロサリウス（Lotharius）ら、Nat.Rev.Neurosci.,3:932-942(2002)などを参照）。運動症状の例としては、次のようなものが挙げられる：無運動、前傾姿勢、歩行困難、姿勢不安定、カタレプシー、筋肉硬直および震顫など。非運動性症状の例としては、次のようなものが挙げられる：抑鬱、欲求の欠如、受動性、痴呆および胃腸障害など（ファーン（Fahn）,Ann.N.Y.Acad.Sci.,991:1-14(2003)、およびファイファー（Pfeiffer）,Lancet Neurol.,2:107-116(2003)などを参照）。パーキンソン病は、65～69才の人の0.5～1%、80歳以上の人の1～3%に発現している（例えば、ヌスバウム（Nussbaum）ら、N.Engl.J.Med.,348:1356-1364(2003)などを参照）。

20

【 0 1 7 0 】

本明細書に記載している化合物を用いることにより、パーキンソン病患者の症状のうち少なくともひとつを緩和することができる。

30

【 0 1 7 1 】

パーキンソン病の分子マーカーとしては、芳香族L - アミノ酸デカルボキシラーゼ（AAD C）の減少（米国特許出願20020172664などを参照）；黒質ニューロン内のドーパミン含量低下（ファーン（Fahn）,Ann.N.Y.Acad.Sci.,911:1-14(2003）；ロサリウス（Lotharius）ら、Nat.Rev.Neurosci.,3:392-342(2002)などを参照）などが挙げられる。いくつかのよく知られたケースにおいては、PDは、 α - サイヌクレイン（ α - synulein）およびパーキン（parkin）タンパク質をコードしているひとつの遺伝子内の突然変異に関連がある（リース（Riess）ら、J.Neurol.250(1):13-10(2003）；ヌスバウム（Nussbaum）ら、New Eng.J.Med.,348(14):1356-1364(2003)など）。ニューロン特異的C - 末端ユビキチンヒドロラーゼ遺伝子内のミスセンス突然変異もパーキンソン病と関連がある（例えば、ヌスバウム（Nussbaum）ら、New Eng.J.Med.,348(14):1356-1364(2003)など）。

40

【 0 1 7 2 】

本明細書に記載している化合物または化合物ライブラリーは、パーキンソン病の非ヒト動物モデルで評価することができる。パーキンソン病の動物モデルの例としては、ドーパミン作動性神経毒である1 - メチル - 4 - フェニル - 1,2,3,6 - テトラヒドロピリジン（MPTP）を用いて処置を施してパーキンソン病を発病させた霊長類（例えば、米国特許出願20030055231；ウィッチマン（Wichmann）ら、Ann.N.Y.Acad.Sci.,991:199-213(2003)などを参照）；6 - ヒドロキシドーパミン - 障害ラット（例えば、Lab.Anim.Sci.,49:363-371(1999)など）；およびトランスジェニック無脊椎動物モデル（例えば、ラクソ（Lakso）ら、

50

J.Neurochem.,86:165-172(2003); リンク (Link)、Mech.Ageing Dev.,122:1639-1649(2001)など)などが挙げられる。

【0173】

ポリグルタミン凝集の評価

ハンチンチンポリグルタミン凝集などのポリグルタミン凝集の評価には、多様なセルフリーアッセイ、細胞に基づくアッセイおよび生体アッセイが可能である。米国特許出願2003-0109476などにいくつかの例が記載されている。

【0174】

セルフリー、細胞に基づく、または生体などのアッセイには、少なくとも135個のポリグルタミンを有するポリグルタミン反復領域を含むレポータータンパク質を使用する。レポータータンパク質は、蛍光などによって簡便に検出できる。例えば、タンパク質は、蛍光団(フルオレセインイソチオシアナート(FITC)、アロフィコシアニン(APC)、R-フィコエリスリン(PE)、ペリジニクロロフィルタンパク質(PerCP)、Texas Red、Cy3、Cy5、Cy7など)、または、蛍光共鳴エネルギータンデム蛍光団(fluorescence resonance energy tandem fluorophore)(PerCP-Cy5.5、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas RedおよびAPC-Cy7など)とコンジュゲートさせる。別の実施例においては、タンパク質は「本質的に蛍光性」であるが、そのようなタンパク質は、アミノ酸配列によって全体がコードされており、かつ、補因子もしくは基質を要せずに蛍光を発することができる発色団を有する。例えば、タンパク質は緑色蛍光タンパク質(GFP)様発色団を有する。本明細書において使用している「GFP様発色団」とは、中心に α -ヘリックスを有する11-ストランド β -バレル構造をとっている本質的に蛍光性のタンパク質部位を意味し、このとき、中心の α -ヘリックスは、2個の芳香環およびその間の橋かけ構造を含む、コンジュゲートした α -共鳴系を有する。

【0175】

GFP様発色団は天然に存在するタンパク質から見出されたGFP様発色団から選択され、そのようなものとしては、A.victoria GFP(GenBankアクセッション番号AAA27721)、Renilla reniformis GFP、FP583(AF168419)(DsRed)、FP593(AF272711)、FP483(AF168420)、FP484(AF168424)、FP595(AF246709)、FP486(AF168421)、FP538(AF168423)およびFP506(AF168422)が挙げられ、天然タンパク質の必要量は、発色団の本質的な蛍光を維持するのに必要とされるだけの量である。蛍光に必要な最小限のドメインを決定する方法は当該分野において既知であり、リ(Li)ら、J.Biol.Chem.,272:28545-28549(1997)に記載されている。

【0176】

別の方法としては、GFP様発色団は、天然に見出されたものを変形したGFP様発色団から選択する。一般的には、そのような変形をすることにより、タンパク質配列の変化を伴う、または伴わない異種発現系における組換え産生を向上させ、天然のタンパク質の励起および/もしくは発光スペクトルを変更し、精製を容易にし、クローニングを容易にする、あるいは、そのような変形は研究における偶然の産物である。そのような変形GFP様発色団の作出法およびそれらの蛍光活性の試験法については、単独で、もしくはタンパク質融合の一部として、当該分野において既知である。そのような多様な変形発色団は現在市販されており、本発明に従う融合タンパク質にそのまま使用できる。例えば、EGFP(「増強GFP」)(コルマック(Cormack)ら、Gene,173:33-38(1996);米国特許第6,090,919号および5,804,387号)は、赤色にシフトしたヒトコドン最適化変異体であり、より明るい蛍光を発し、哺乳類細胞でより多く発現し、さらに、フローサイトメーターでの使用において励起スペクトルが最適になるように操作したものである。EGFPをGFP様蛍光団に結合させ、さらにポリグルタミン領域を有する融合タンパク質を形成することができる。プラスミド性およびウイルス性の多様なEGFPベクターが市販されている(クロンテック・ラブズ(Clontech Labs)社、アメリカ合衆国カリフォルニア州パロアルト)。その他の操作されたGFPタンパク質も既知である。例えば、ハイム(Heim)ら、Curr.Biol.,6:178-182(1996);コルマック(Cormack)ら、Gene,173:33-38(1996);BFP2、EYFP(「増強黄色蛍光タ

ンパク質」) ; EBFP ; オーモ (Ormo) ら、Science, 273:1392-1395(1996) ; ハイカル (Heikal) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:11996-12001(2000) ; ECFP (「増強シアン蛍光タンパク質」) (クロンテック・ラブズ (Clontech Labs) 社、アメリカ合衆国カリフォルニア州パロアルト) などを参照。GFP様発色団は、米国特許第6,124,128号 ; 第6,096,865号 ; 第6,090,919号 ; 第6,066,476号 ; 第6,054,321号 ; 第6,027,881号 ; 第5,968,750号 ; 第5,874,304号 ; 第5,804,387号 ; 第5,777,079号 ; 第5,741,668号および第5,625,048号の記載を含むその他の変形GFPからも集めることができる。

【0177】

ひとつの実施態様においては、少なくとも35個のポリグルタミンを有するポリグルタミン反復領域を含むレポータータンパク質を細胞に基づくアッセイに使用する。

【0178】

ひとつの実施態様においては、交互、反復コドンを含むHD遺伝子エクソン1によってコードされ、増強GFP (緑色蛍光タンパク質) に融合されているタンパク質を発現するように操作された構築体を有するPC12ニューロン細胞系を用いることができる。例えば、ボアド (Boado) ら、J. Pharmacol. and Experimental Therapeutics, 295(1):239-243(2000) およびカザンツェヴ (Kazantsev) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:11404-11409(1999) などを参照。この遺伝子が発現することにより、タンパク質凝集部位に共局在した緑色蛍光が現れる。HD遺伝子エクソン1 - GFP融合タンパク質遺伝子は、ムリストロン (muristerone) によって制御された誘導性プロモーターの調節下にある。特別な構築体は、約46個のグルタミンリピートを有する (CAAまたはCAGによってコードされている)。その他の構築体は、例えば、103個のグルタミンリピートを有する。PC12細胞は、5%のウマ血清 (加熱不活化)、2.5%のFBSおよび1%のPen-Strepを含むDMEM中で増殖させ、ZeocinおよびG418上において少数で維持した。細胞は、選択を行わず、培地中の密度が 5×10^5 個/mlとなるように24ウェルプレートに播種し、ポリ-L-リジンカバーガラスで覆った。一晩インキュベートした後、ムリストロンを添加してHD遺伝子エクソン1 - GFPの発現を誘導した。播種の前後、または誘導の前後などに、細胞を被験化合物と接触させた。ツァイス (Zeiss) 510LSM共焦点顕微鏡、ならびにコヒーレントクリプトン - アルゴンレーザーおよびヘリウム - ネオンレーザーを取り付けたツァイス (Zeiss) インバーテッド100M Axioskop上にデータを蓄積した。良好な画像を得るため、Lab-Tek IIチャンバードカバーガラスシステム内にサンプルを入れた。独立した各実験において (例えば、少なくとも3または7回の独立した実験において)、対物レンズの視野内のハンチンチン - GFP凝集体の数を計数した。

【0179】

サンプル評価のためのその他の例としては、アマシャム・バイオサイエンス (Amersham Biosciences) 社のIN Cell Analysis SystemおよびCellomics (商標) ArrayScan HS Systemなどのようなハイスループット装置が挙げられるが、そのような装置では、検出および定量される蛍光タグ付き部位の細胞レベル下での位置および濃度が統計的および動的に明らかにされる。米国特許第5,989,835号も参照のこと。

【0180】

その他の哺乳類細胞系の例としては、CHO細胞系および293細胞系などが挙げられる。例えば、HD遺伝子エクソン1・Q103-GFPをコードしている融合構築体であって、GFPに融合し、約103Qリピートを有するHD遺伝子エクソン1の集積コピーを有するCHO細胞は、核膜において、顕微鏡で検出可能な大きさのGFP凝集体を形成するが、CHO細胞内にHD遺伝子エクソン1 Q24-GFPをコードしている融合構築体の集積コピーを有するCHO細胞は、核膜において、検出可能な大きさの凝集体を形成しない。別の例においては、84個のCAGリピートを含むHD遺伝子エクソン1の集積コピーを有する293細胞を使用している。

【0181】

ハンチントン病に関しては、多数の動物モデル系が利用できる。例えば、ブルーレ (Brouillet) ら、Functional Neurology, 15(4):239-251(2000) ; オナ (Ona) ら、Nature, 399:263-267(1999) ; バイツ (Bates) ら、Hum. Mol. Genet., 6(10):1633-1637(1997) ; ハッソ

10

20

30

40

50

ン (Hasson) ら、J. of Neurochemistry, 78:694-703 ; およびルビンステイン (Rubinsztein) , D.C.、Trends in Genetics, 18(4):202-209 (HDに関する多様な動物および非ヒトモデルに関する総説) などを参照。

【0182】

ひとつの実施態様においては、動物はトランスジェニックマウスであり、例えば、少なくとも36個のグルタミンを有するヒトハンチンチンタンパク質、それらの一部、または、ヒトハンチンチンタンパク質もしくはそれらの一部を有する融合タンパク質を、少なくとも1個の細胞内で発現することができるが、このとき、グルタミンは、例えば、ポリグルタミン系をコードしているエクソン1のCAGリピートセグメント内のCAGリピート(あるいは、CAGリピート内の任意数がCAAである)によってコードされている。

10

【0183】

そのようなトランスジェニックマウス系統の一例としてR6/2系がある(マンギアリーニ (Mangiarini) ら、Cell, 87:493-506(1996))。R6/2マウスは、トランスジェニックハンチントン病マウスであり、内在性プロモーターの調節下において、ヒトHD遺伝子のエクソンのひとつを過剰発現する。R6/2ヒトHD遺伝子のエクソン1は、CAG/ポリグルタミンリピートの長さが伸長されている(CAGリピート数は平均150)。これらのマウスは、ヒトのハンチントン病に見られる多数の特徴を有し、進行性で最終的には致死性の神経性疾病を発病する。ハンチンチンのN末端部分が部分的に関与している異常な凝集体(HDエクソン1によってコードされている)が、R6/2マウスの細胞の細胞質および核において観察される(ダヴィーズ (Davies) ら、Cell, 90:537-548(1997))。例えば、トランスジェニック動物体内のヒトハンチンチンタンパク質は、少なくとも55、より好ましくは約150のCAGリピートを有する遺伝子によってコードされている。

20

【0184】

これらのトランスジェニック動物は、ハンチントン病様表現型を呈する。これらのトランスジェニックマウスは、体重増加の低下、寿命の短縮、ならびに、生後8~10週に現れる歩行異常、静止期震顫、後肢折りたたみ、および活動亢進によって特徴付けられる行動障害などの特徴を呈する(例えば、R6/2系統については、マンギアリーニ (Mangiarini) ら、Cell, 87:493-506(1996)を参照)。表現型は、運動低下に向かって悪化する。これらのトランスジェニックマウスの脳も神経化学的および組織学的異常を示しており、例えば、神経伝達物質受容体の変化(グルタミン性、ドーパミン性)、N-アセチルアスパルテートの濃度減少(ニューロン集積性の指標)、ならびに線条体および脳の大きさの減少などが挙げられる。従って、評価法としては、神経伝達物質レベル、神経伝達物質受容体レベル、脳の大きさおよび線条体の大きさに関するパラメーターの評価が挙げられる。さらに、ヒトハンチンチンタンパク質のトランスジェニック部分もしくは全長を含む異常な凝集体がこれらの動物(例えば、R6/2トランスジェニックマウス系統など)の脳組織内に存在する。例えば、マンギアリーニ (Mangiarini) ら、Cell, 87:493-506(1996); ダヴィーズ (Davies) ら、Cell, 90:537-548(1997); ブルーレ (Brouillet) ら、Functional Neurology, 15(4):239-251(2000)、およびチャ (Cha) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6480-6485(1998)などを参照。

30

【0185】

本明細書に記載している、または本明細書に記載しているライブラリー内に存在する化合物などの被験化合物の効果を動物モデルで試験することを目的として、動物の循環内に被験化合物を注射するなどして、濃度の異なる被験化合物をトランスジェニック動物に投与した。ひとつの実施態様においては、動物でハンチントン病様症状を評価した。例えば、マウスモデルについて、上述したようなハンチントン病様症状の進行をモニターし、被験化合物を用いた処置によって症状の減弱または遅延がもたされるか否かを判断する。別の実施態様においては、これらの動物体内におけるハンチンチンタンパク質凝集体の解離をモニターした。動物を屠殺し、脳の薄片を採取した。トランスジェニックヒトハンチンチンタンパク質、それらの一部、または、ヒトハンチンチンタンパク質を含む融合タンパク質もしくはそれらの一部を含む凝集体の存在に関して、脳の薄片を分析した。この分析

40

50

には、例えば、抗ハンチンチン抗体をもちいて脳組織の薄片を染色し、抗ハンチンチン抗体を認識するFITCをコンジュゲートさせた二次抗体を添加し、蛍光顕微鏡によってタンパク質凝集体を確認する（例えば、抗ハンチンチン抗体はマウス抗ヒト抗体であり、二次抗体はヒト抗体に対して特異的である）。別の方法としては、抗ハンチンチン抗体をFITCと直接コンジュゲートさせることができる。次に、ハンチンチンタンパク質凝集体のレベルを蛍光顕微鏡で確認する。

【0186】

ハンチントン病のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) モデルも利用できる（例えば、ステファン (Steffan) ら、*Nature*, 413:739-743(2001)；マーシュ (Marsh) ら、*Human Molecular Genetics*, 9:13-25(2000)などを参照）。例えば、トランスジェニックショウジョウバエは、遺伝子操作を行って、少なくとも36個のグルタミンを有するポリグルタミン領域などのヒトハンチンチンタンパク質、それらの一部（エクソン1など）、または、ヒトハンチンチンタンパク質を含む融合タンパク質もしくはそれらの一部を発現させるが、このとき、グルタミンは、例えば、CAGリピートによってコードされており、好ましくはリピート数は51以上であり、あるいは、CAGリピート内の任意数がCAAである。ポリグルタミン領域は、ポリQ系をコードしているエクソン1のCAGリピートセグメントによってコードされている。これらのトランスジェニックショウジョウバエの遺伝子操作を行い、ニューロン内（例えば、ショウジョウバエの眼内）において、ヒトハンチンチンタンパク質、それらの一部（エクソン1など）、または、ヒトハンチンチンタンパク質を含む融合タンパク質もしくはそれらの一部を発現させることもできる。

【0187】

被験化合物（例えば、濃度の異なる被験化合物など）または、本明細書に記載されている化合物は、例えば、化合物を含有する薬剤学的組成物を塗布する、または食餌の一部として与えるなどして、トランスジェニックショウジョウバエに投与することができる。化合物の投与は、ショウジョウバエの生活環の多様な段階で行うことができる。個体のモニターを行い、化合物を用いた処理によってハンチントン病様症状の減弱もしくは遅延、ハンチンチンタンパク質凝集体の解離、または、死亡率および／もしくは光受容体ニューロンの変性の減少が生じたか否かを判断する。

【0188】

ヒトハンチンチンタンパク質、それらの一部（エクソン1など）、または、ヒトハンチンチンタンパク質を含む融合タンパク質もしくはそれらの一部を発現することによって生じる神経変性は、ショウジョウバエの複眼で容易に観察されるが、ここで、複眼は、各個眼の光受容体ニューロンによって形成されている7個の可視棒状体（細胞下で光を集める構造体）が規則正しく台形に配置されて構成されている。ヒトハンチンチンタンパク質、それらの一部（エクソン1など）、または、ヒトハンチンチンタンパク質を含む融合タンパク質もしくはそれらの一部を発現することにより、棒状体の消失が進行する。従って、被験化合物を投与された個体は、神経変性に関して評価することができる。

【0189】

モアリー (Morely) ら (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:10417(2002)) は、ハンチントン病関連タンパク質の凝集を評価するための線虫 (*C. elegans* 系) について記載している。

【0190】

ハンチントン病の評価

本明細書に記載している化合物を用いることにより、対象のハンチントン病の症状のうちの少なくともひとつを緩和することができる。

【0191】

多様な方法を用いてハンチントン病の評価および／またはモニターをすることができる。この疾患に関する多様な臨床症状および徴候が知られている。ハンチントン病は、運動障害、精神医学上の困難および認識の変化を引き起こす。これらの症状の程度、発症年齢および発現は多岐にわたる。運動障害としては、舞蹈病と称される迅速、ランダム、ダンス様の動きが挙げられる。

【0192】

ハンチントン病を評価するためのひとつの方法としては、統一ハンチントン病評価スケール (Unified Huntington's disease Rating Scale: UNDRS) を使用する。もし、ハンチントン病の少なくともひとつの症状が緩和されるのであれば、個別の試験を単独または組み合わせで評価することもできる。UNDRSは、「運動障害 (Movement Disorders)」(11: 136-142(1996)) およびマーダー (Marder) ら、Neurology, 54: 452-458(2000) に記載されている。UNDRSは、ハンチントン病の重篤度を判断するものである。UNDRSは、運動、認識、行動、機能の複数の区分に別れている。ひとつの実施態様においては、単一の区分を用いて患者の評価を行う。各区分の多様な質問を合計することにより、これらのスコアを計算する。いくつかの区分 (舞蹈病および筋失調症など) では、各四肢、顔、頬口舌、および胴体の個別評価が含まれている。

10

【0193】

行動評価の例としては、次のようなものが挙げられる：眼球追従、サッカーボール開始、サッカーボール速度、訥語症、舌突出、指を打ち鳴らす能力 (finger tap ability)、手足の回内/回外、拳-手-掌連鎖、腕の硬直、動作緩慢、高度の筋失調症 (胴体、四肢先端)、高度の舞蹈病 (例えば、胴体、顔、および四肢先端など)、歩行、つぎ足歩行および後方突進など。例えば、1年以上の期間にわたる模範的な治療により、UNDRSのサブスケールである総合行動スコア4 (Total Motor Score 4) 変化する。

【0194】

糖尿病

本発明は、糖尿病の治療および予防法を提供する。糖尿病としては、インスリン依存性糖尿病およびインスリン非依存性糖尿病がある。例えば、方法としては、糖尿病を発病している、または発病の危険性がある対象に本明細書に記載している化合物を投与することなどが挙げられる。いくつかの例においては、耐糖能異常 (IGF) または空腹時高血糖を示していることにより、患者に糖尿病発病の危険性があると判断する。

20

【0195】

例えば、本明細書に記載している化合物は、糖新生の減少、血糖調節の改善 (すなわち、空腹時血糖を下げる)、またはインスリン感受性の正常化に対して治療上有効な量を対象に投与する。糖尿病または肥満に苦しんでいる患者に化合物を投与することができる。

【0196】

インスリン依存性糖尿病 (I型糖尿病) は自己免疫疾患であり、インスリン炎によって膵臓のJ細胞が破壊される。I型糖尿病の臨床症状発症時には、インスリン産生細胞の大多数が破壊され、インスリンを産生することができる細胞はわずか15~40%である (マククロッホ (McCulloch) ら、Diabetes, 40: 673-679(1991))。細胞損傷により、生涯にわたって毎日インスリン注射が必要になり、急性および慢性の合併症発生の危険性にさらされる。

30

【0197】

II型糖尿病は、グルコース恒常性異常を含む代謝性疾患であり、インスリン抵抗性、インスリン分泌不足、またはそれらの両方として現れるインスリン作用の欠如の結果としての高血糖によって特徴付けられる。II型糖尿病を発病している患者は、インスリン抵抗性および/もしくはインスリン分泌不足に関連する炭化水素、脂質およびタンパク質の代謝異常を増す。この疾患から、膵臓細胞の破壊、ついには完全なインスリン欠損に至る。インスリンが存在しなければ、血中のグルコース値は高いままである。高血糖の期間が長くなると、失明、腎不全、およびこれらの領域における血流の低下 (足および足首の切断に至る可能性あり) などの影響が現れる。患者がこのような重体に陥ることを防ぐためには、早期検出が重要である。糖尿病患者の大多数は、インシュリン非依存性の糖尿病 (現在ではII型糖尿病と称されている) である。

40

【0198】

本発明は、糖尿病関連、または糖尿病から誘発される障害、例えば、終末器官の損傷、糖尿病性軽症胃アトニー、糖尿病性末梢神経障害、心臓律動不全などを治療する方法をも

50

含む。

【0199】

II型糖尿病の分子モデルの例としては、つぎのようなものが挙げられる：Nkx-2.2またはNkx-6.1欠損トランスジェニックマウス；米国特許第6,127,598号；Zucker Diabetic Fatty fa/fa(ZDF)ラット（米国特許第6,569,832号）；偶発的に肥満を呈し、はっきりとしたII型糖尿病を発病する頻度が高いアカゲザル（ホッタ（Hotta）ら、Diabetes,50:1126-1133(2001)）；ならびに、II型糖尿病様インスリン抵抗を示し、IGF-I受容体（KR-IGF-IR）を持たないものが優性のトランスジェニックマウスなど。

【0200】

代謝性疾患

本発明は、本明細書に記載している化合物の有効量を対象に投与することを含む、代謝性疾患の治療法を提供する。

【0201】

シンドロームXなどのような代謝性疾患は、一人のヒトの中の一群の代謝性危険因子によって特徴付けられる。そのような因子としては、つぎのようなものが挙げられる：中心肥満（central obesity）（腹部の内部および周囲の過剰脂肪組織）；アテローム性異脂肪症（高トリグリセリドおよび低HDLコレステロールが主症状である血中脂肪疾患であり、動脈壁にフォスタープラーク（foster plaque）を形成する）；インスリン抵抗性またはグルコース耐性（身体がインスリンまたは血中の糖を適正に利用できない）；プロトロンビン状態（prothrombotic state）（例えば、血中のフィブリノーゲンまたはプラスミノーゲンアクチベーター阻害剤（-1）が高いなど）；血圧上昇（すなわち、高血圧）（130/85mmHg以上）ならびに前炎症状態（例えば、血中の高感受性C反応性タンパク質が上昇しているなど）など。

【0202】

この症状の潜在的原因は、体重過剰／肥満、身体的不活発および遺伝的因子である。代謝性疾患を有する人は、冠動脈性心疾患、動脈壁へのプラーク形成に伴うその他の疾患（例えば、卒中および末梢血管性疾患など）およびII型糖尿病発症の危険性が上がる。代謝性疾患は、身体がインスリンを効率的に利用できないインスリン耐性と称される一般的な代謝性障害と密接な関係がある。

【0203】

脂肪細胞関連疾患

本発明は、本明細書に記載している化合物を対象に投与することを含む、脂肪生成促進法を提供する。例えば、対象は、体重過少、脂肪含量低下、または、局所的（例えば、顔の皮膚などのような局所において）もしくは全身的に、さらに脂肪細胞を必要としている。

【0204】

本発明に従う化合物を用い、脂肪細胞（例えば、脂肪組織中の脂肪細胞、そのような脂肪細胞の分化など）を調節することもできる。例えば、本明細書に記載している化合物の有効量を投与することにより、正常または病気の状態における脂肪の蓄積を阻止することができる。脂肪細胞に関連のある疾患としては肥満が挙げられる。「肥満」とは、ボディマス指数が30以上である状態をさす。「体重超過」とは、ボディマス指数が25.0以上である状態をさす。ボディマス指数およびその他の定義は、「成人における体重超過および肥満の判定および評価ならびに治療に関するNIH臨床ガイドライン（NIH Clinical Guidelines on the Identification and Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults）」（1988）に従う。特に、肥満は、次の相でII型糖尿病を発症する可能性がある。臨床的には、これらの相は、グルコース耐性正常、グルコース耐性低下、高インスリン血症性糖尿病および低インスリン血症糖尿病と特徴付けられる。グルコース貯蔵に関するそのような進行性の障害は、基底血糖の上昇と相関している。

【0205】

脂肪細胞が関連しているその他の疾患の例としては、脂質代謝異常および高脂血症（高

10

20

30

40

50

トリグリセリド、高LDL、高脂肪酸を含む)などが挙げられる。

【0206】

肥満治療用モデルの例としては、2種類の基本動物モデル系がある。1)齧歯類に摂取カロリー60%が脂肪由来であるようなエサを与えて生じさせた食餌誘導性肥満(DIO)。この種類の食餌を12~16週間与えられた動物は、実質的に体重が増し(>50%増加)、過量の脂肪塊が蓄積し、高血糖症、高インスリン血症およびインスリン耐性になる。このモデルにおいては、給餌開始前、または肥満進行中の任意の時期に化合物の試験を行うことができる。2)db/db突然変異マウス(レプチン受容体偶発的突然変異体)。これらの動物は、DIO動物と同様の表現型を呈するが、様々な症状についてはより重篤である。動物は、DIOモデルと同様に扱うことができる。SirT1阻害活性の代理読出し(surrogate readout)に関しては、処置様式に従って同胞動物を屠殺し、肝臓、筋肉および白色脂肪組織などの多様な臓器内におけるFoxO1タンパク質のアセチル化の増加状態を生化学的に評価することができる。

10

【0207】

本明細書に記載している化合物を用いてAMDを治療することができる。黄斑部変性は、ブルー膜および網膜色素上皮の異常が関与している進行性の中心視消失によって特徴付けられる多様な疾病を含む(例えば、米国特許出願20030138798などを参照)。AMDは、52~64才の人口の1.2%、75歳以上の人口の20%に発症している(例えば、米国特許出願20030087889などを参照)。黄斑部変性にはふたつの型、すなわち、「萎縮」(「非滲出性」または「乾燥」型)および「滲出性」(「湿潤」型)がある。一般的でないAMD型は「萎縮」型であり、これは、死亡RPE細胞によって起こる(米国特許出願20030093064)。

20

【0208】

AMDの症状としては次のようなものが挙げられる:視野内の直線が波状に見える;本、雑誌および新聞の活字がかすんで見える;視界の中心に暗部もしくは空白がある、など(例えば、米国特許出願20030065020などを参照)。

【0209】

AMDの状態を評価するために用いられる分子マーカーの例としては、つぎのようなものが挙げられる:FBNLまたはFBNLタンパク質のアミノ酸配列をコードしている遺伝子の核酸配列:345Arg>Trpおよび362Arg>Gln(米国特許出願20030138798などを参照);顔料A2E、N-レチニル-N-レチニリデンエタノールアミンの増加、最終的には、チトクロームcの細胞質への放出を導く(米国特許出願20030050283);フィブリン-3、ビトロネクシン、-クリスタリンA2、-クリスタリンA3、-クリスタリンA4、-クリスタリンS、カルレチキュリン、14-3-3タンパク質、セロトランスフェリン、アルブミン、ケラチン、ピルビン酸カルボキシラーゼもしくはピリン2を含む、多様な黄斑部変性関連分子に対する自己抗体(例えば、米国特許出願20030017501などを参照);クラスチリン、C6もしくはC5b-9コンプレックスを含む補体経路分子の活性またはレベルの異常(例えば、米国特許出願20020015957などを参照);ならびに、網膜色素上皮(RPE)細胞のリソソーム内における色素リポフスチンの蓄積(スーター(Suter)ら、J.Biol.Chem.,275:39625-39630(2000))など。

30

【0210】

組織修復

本明細書に記載している化合物を用いて組織修復または組織状態の調節をすることができる。組織修復の実例としては、傷の治癒、やけど、潰瘍(糖尿病性潰瘍、例えば、糖尿病性足潰瘍など)、術創、ただれ、擦傷などが挙げられる。本発明に従う方法により、組織の症状のうちの少なくともひとつが改善する。例えば、本発明に従う方法は、本明細書に記載している化合物の有効量を、局所または全身に投与することを含む。

40

【0211】

化合物は、皮膚の疾病または疾患に用いることができる。

【0212】

骨格筋萎縮

50

筋萎縮には、多様な神経筋、代謝性、免疫学的および神経性の疾患ならびに疾病、さらに、飢餓、栄養欠乏、代謝ストレス、糖尿病、加齢、筋ジストロフィーまたはミオパシーなどが含まれる。筋萎縮は、加齢に伴って生じる。筋萎縮は筋肉の使用減少または不使用によっても起こる。症状としては、骨格筋組織量の減少が挙げられる。男性においては、50才から80才の間に、筋肉量は3分の1に減少する。

【0213】

筋萎縮の分子的特徴としては、ユビキチンリガーゼの促進、および筋原線維タンパク質の消失が挙げられる（フルノ（Furuno）ら、J.Biol.Chem., 265:8550-8557(1990)）。これらのタンパク質の崩壊後、例えば、アクチンおよびある種の筋肉のミオシンの固有構成成分である3-メチル-ヒスチジン産生を測定することができる（グッドマン（Goodman）、Biochem.J., 241:121-12(1987)；ロウエル（Lowell）ら、Metabolism, 35:1121-112(1986)；ステイン（Stein）およびシュルター（Schluter）、Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab., 272:E688-E696(1997)）。細胞損傷マーカーであるクレアチニンキナーゼの放出（ジャクソン（Jackson）ら、Neurology, 41:101-104(1991)）も指標になり得る。

10

【0214】

多発性硬化症

多発性硬化症（MS）は、巣状炎症および脳白質の自己免疫性変性によって特徴付けられる神経筋疾患である。白質が炎症を起こし、炎症に続いてミエリンの崩壊が生じる（「病変」の形成、これは、多様な免疫細胞、特に、T細胞リンパ球およびマクロファージの浸潤が指標になる。MSは、神経インパルス伝達を遅延させる、もしくは完全に阻止し、従って、身体機能を減弱もしくは消失させる。MS患者は、多段階のMS等級のうちのひとつに属する（例えば、再発-鎮静MS、一次進行性（primary progressive）MS、二次進行性（secondary progressive）MS、マールブルグ変異体MSなど）。）。

20

【0215】

症状としては、視覚障害（かすみ目もしくは二重焦点、赤緑のゆがみ、または、片目失明など）、四肢の筋肉の弱まり、協調および平衡障害、筋肉痙直、筋肉疲労、知覚異常、一時的な感覚異常（しびれ、刺痛もしくは「ピンおよび針」で突いたような感じ、さらに、最悪の場合には、部分的または完全な麻痺）などが挙げられる。MSに苦しむ人の約半数は、認識障害、例えば、集中力、注意力、記憶および/もしくは判断力低下なども経験している（例えば、米国特許出願20030130357および20030092089などを参照）。

30

【0216】

MSの分子マーカーとしては、多数の遺伝因子、例えば、コーカソイドのハプロタイプDRB*1501-DQA1*0102-DQB1*0602（米国特許出願20030113752）など、タンパク質チロシンホスファターゼ受容体-C型内の点突然変異（米国特許出願20030113752）、野生型SARG-1-タンパク質の不在、突然変異型SARG-1タンパク質の存在、または、野生型SARG-1をコードしている核酸の不在もしくは突然変異（例えば、米国特許出願20030113752などを参照）、脳脊髄液内のミエリン塩基性タンパク質自己抗体などのタンパク質指標（例えば、米国特許出願20030092089などを参照）などが挙げられる。

【0217】

MSの細胞性および動物性モデルとしては、慢性MSに対するトランスジェニックマウスモデル（実験用自己免疫脳脊髄炎：EAE）（ガバーマン（Goverman）ら、Cell, 72:551-560(1993)によって記載されているものなど）、およびブロック（Brok）ら、Immunol.Rev., 183:173-185(2001)に総説されている霊長類モデルなどが挙げられる。

40

【0218】

筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルーゲーリック病）

本明細書に記載している化合物を用いてALSを緩和することができる。ALSとは、上位および下位運動ニューロンを含む疾患群をさす。ALSの発生率は、高齢者の間で実質的に高まっている。これらの疾患は、脊髄の下位運動ニューロンおよび大脳皮質の上位運動ニューロンの選択的かつ進行性の変性であって、その結果、運動ニューロンが死に至り、それらが制御している筋肉が弱り、衰えて麻痺を起こすような主要な病理学的異常によって特

50

徴付けられる。ALS疾患の例としては、古典的ALS（一般的に、下位および上位の運動ニューロンに影響を与える）、原発性側索硬化症（PLS：一般的に、上位運動ニューロンのみに影響を与える）、進行性球麻痺（PBPまたは球発症：一般的に、嚥下、咀嚼および発語困難で始まるALSのひとつの型）、進行性筋萎縮症（PMA：一般的に、下位運動ニューロンのみに影響を与える）もしくは家族性ALS（ALSの遺伝的型）、またはこれらの状態の組み合わせ（例えば、米国特許出願20020198236および米国特許出願20030130357などを参照）などが挙げられる。

【0219】

個人のALSの状態は、神経学的試験、またはMRI、FVC、MUNEなどのその他の方法によって評価することができる（例えば、米国特許出願20030130357などを参照）。症状としては、手、腕、脚の筋肉衰弱；嚥下もしくは呼吸困難；筋肉のひきつり（攣縮）およびこむら返り；ならびに手足の使用の減少などが挙げられる。本発明は、ALS症状のひとつもしくはそれ以上を緩和するのに有効な量のIGF-1/GH軸調節物質を（ALS症状を呈している、または発症のリスクを有する個人に）投与することを含む。

【0220】

個人のALS状態を評価するための方法としては、「興奮性アミノ酸トランスポータータイプ2（EAAT2）」タンパク質もしくは遺伝子；銅-亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ（SOD1）タンパク質もしくは遺伝子；ミトコンドリアのコンプレックスI活性、ポリアミン類（プトラセイン（putraceine）、スペルミンおよびスペルミジンなど）のレベル；オルニチンデカルボキシラーゼ活性；ならびに、推定GTPアーゼ制御因子をコードしている遺伝子（Nat. Genet., 29(2):166-173(2001)を参照）を評価することが挙げられる。

【0221】

ALS状態に対する化合物の効果を評価するための細胞および動物としては、改変SOD遺伝子を有するマウス（例えば、内在性プロモーターによって稼働するヒトG93A SOD突然変異のコピーを多数有するSOD1-G93Aトランスジェニックマウス、SOD1-G37Rトランスジェニックマウス（ウォン（Wong）ら、Neuron, 14(6):1105-1116(1995)）など）；SOD1-G85Rトランスジェニックマウス（ブルーイン（Bruijn）ら、Neuron, 18(2):327-338(1997)）；突然変異ヒトSOD1を発現する線虫（C.elegans系）（オエダ（Oeda）ら、Hum. Mol. Genet., 10:2013-2023(2001)）；ならびに、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）を発現するショウジョウバエの突然変異体（フィリップス（Phillips）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8574-8578(1995)；マッカーベ（McCabe）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8533-8534(1995)）などが挙げられる。

ニューロパシー

本明細書に記載している化合物を用いてニューロパシーを調節することができる。ニューロパシーには、全身性疾病、遺伝的条件、または、行動、知覚、感覚運動もしくは自律神経に影響を及ぼす毒物が原因で生じる中枢および/もしくは末梢神経機能不全が含まれる（例えば、米国特許出願20030013771などを参照）。

【0222】

症状は、神経損傷の原因および影響を受けている神経の特定の型によって異なる。例えば、行動ニューロパシーの症状としては、身体的作業を行う際のぎこちなさ、もしくは筋肉の衰退によるぎこちなさ、軽微な身体運動を行った後の疲労、直立もしくは歩行の困難、ならびに、神経筋反射の減弱もしくは欠如などが挙げられ（米国特許出願20030013771を参照）、自律神経性ニューロパシーの症状としては、便秘、心拍不整、および体位性低血圧反射の減弱（米国特許出願20030013771を参照）などが挙げられ、知覚ニューロパシーの症状としては、痛みおよびしびれ；手、脚もしくは足の刺すような痛み；接触に対する感覚過敏などが挙げられ、網膜障害の症状としては、かすみ、突然の失明、黒斑、および閃光などが挙げられる。

【0223】

ギラン-バレー症候群は、行動ニューロパシーのひとつの型であり、通常は、インフルエンザ様疾病もしくはその他の感染の2~3週間後に発症する。症状としては、上行性の衰

10

20

30

40

50

弱が挙げられるが、衰弱は下肢に始まり、上部に移行する。髄液内のタンパク質レベルが上昇するが、白血球数は増加しないという症状も呈する（米国特許出願20030083242）。

【0224】

その他の疾患

本明細書に記載している化合物による治療が有効なその他の疾患、およびそれらに対する定義としては、つぎのようなものが挙げられる：

「加齢関連疾患」または「加齢性疾患」とは、本発明の出願時に、100,000人以上から選択した集団において、30～40代の人と比較して、60歳以上の人における発生率が1.5倍以上である疾病または疾患である。好ましい集団は、アメリカ合衆国住民である。集団には、性別および/または民族による制限をかけることができる。

10

【0225】

「老人性疾患」とは、本発明の出願時に、100,000人以上から選択した集団において、70歳以上の人の少なくとも70%で発症している疾病または疾患である。ひとつの実施態様においては、老人性疾患は、癌または心肺疾患以外の疾患である。好ましい集団は、アメリカ合衆国住民である。集団には、性別および/または民族による制限をかけることができる。

【0226】

「加齢関連感受性因子」を有する疾患とは、原因は外在性であるが、本発明の出願時に、アメリカ合衆国住民において、30～40代の人と比較して60歳以上の人では、重篤度もしくは症状が実質的に悪化している疾病または疾患をさす。例えば、肺炎は病原菌によって起こるが、疾病の重篤度は、30～40代の人と比較して60歳以上の人では高い。

20

【0227】

「新生物疾患」は、自己増殖能もしくは複製能を有する細胞によって特徴付けられる（例えば、増殖性細胞増加によって特徴付けられる異常段階もしくは状態など）疾病または疾患である。「加齢関連新生物疾患」とは、加齢関連疾患でもある新生物疾患である。

【0228】

「非新生物（非腫瘍性）疾患」は、自己増殖能もしくは複製能を有する細胞によって特徴付けられない疾病または疾患である。「加齢関連非新生物疾患」とは、加齢関連疾患でもある非新生物疾患である。

【0229】

「神経学的疾患」とは、ニューロン細胞もしくはニューロン支持細胞（例えば、グリアまたは筋肉など）の異常または機能不全によって特徴付けられる疾病または疾患である。そのような疾病または疾患は、中枢および/または末梢神経系に影響を及ぼす。神経学的疾患の例としては、ニューロパシー、骨格筋萎縮、ならびに神経変性疾患（例えば、ポリグルタミン凝集が少なくとも部分的に原因である神経変性疾患、または、ポリグルタミン凝集が部分的に原因となっているもの以外の神経変性疾患など）などが挙げられる。神経変性疾患の例としては、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）およびパーキンソン病などが挙げられる。「加齢関連神経学的疾患」とは、加齢関連疾患でもある神経学的疾患である。

30

【0230】

「心血管疾患」とは、心臓、肺もしくは血管壁などの心血管系の異常または機能不全によって特徴付けられる疾病または疾患である。心血管疾患の例としては、心臓律動不整、慢性鬱血性心不全、虚血性卒中、冠動脈疾患、血圧上昇（すなわち、高血圧）、および心筋症などが挙げられる。「加齢関連心血管疾患」とは、加齢関連疾患でもある心血管疾患である。

40

【0231】

「代謝性疾患」とは、代謝の異常または機能不全によって特徴付けられる疾病または疾患である。代謝性疾患のひとつの分類は、グルコースまたはインスリン代謝に関する疾患である。「加齢関連代謝性疾患」とは、加齢関連疾患でもある代謝性疾患である。

【0232】

50

「皮膚疾患」とは、皮膚の異常または機能不全によって特徴付けられる疾病または疾患である。「皮膚科学的組織状態」とは、皮膚の機能および/もしくは外見（例えば、化粧映えなど）に關する皮膚および任意の下層組織（例えば、支持組織など）をさす。

【0233】

治療の実施に値する疾病または疾患の例としては、つぎのようなものが挙げられる：癌（例えば、乳癌、結腸直腸癌、CLL、CML、前立腺癌など）；骨格筋萎縮；成人発症糖尿病；糖尿病性ニューロパシー；ニューロパシー（例えば、感覚ニューロパシー、自律神経性ニューロパシー、行動ニューロパシー、網膜障害など）；肥満；骨再吸収；老人性黄斑変性；ALS；アルツハイマー病；ベル麻痺；粥状動脈硬化；心血管疾患（例えば、心臓律動不整、慢性鬱血性心不全、虚血性卒中、冠動脈疾患、血圧上昇（すなわち、高血圧）、および心筋症など）；慢性腎不全；II型糖尿病；潰瘍；白内障；老眼；糸球体腎炎；ギラン・バレー症候群；出血性卒中；短期および長期の記憶喪失；リウマチ様関節炎；炎症性腸疾患；多発性硬化症；SLE；クローン病；変形関節炎；パーキンソン病；肺炎；ならびに尿失禁など。さらに、タンパク質凝集（例えば、ポリグルタミン凝集以外のもの）が關与している多数の神経変性疾患もしくは疾患、またはタンパク質の折りたたみの過誤も加齢関連性である。疾病の症状および診断については、医療従事者において既知である。そのような疾病に対する治療を既に受けている患者（例えば、化学療法剤による治療を受けており、好中球減少症、萎縮、カヘキシー、腎障害、ニューロパシーなどを有する患者、または、選択的手術を受けた患者など）に対して本発明に従う化合物を投与することもできる。

10

20

【0234】

キット

本明細書に記載している化合物はキットに組み込むことができる。キットには、(a) 本明細書に記載している化合物（例えば、本明細書に記載している化合物を含む組成物など）、および、必要に応じて、(b) 情報に関する材料を含む。情報に関する材料とは、本明細書に記載している方法、および/または、該方法において本明細書に記載している化合物を使用することに関連する記述的、指示的、マーケティングまたはその他の材料である。

【0235】

情報に関する材料は、様式に制限はない。ひとつの実施態様においては、情報に関する材料は、化合物の生成、化合物の分子量、濃度、有効期限、バッチまたは製造側の情報などを含む。ひとつの実施態様においては、情報に関する材料は、化合物の投与方法である。

30

【0236】

ひとつの実施態様においては、情報に関する材料は、本明細書に記載されている方法に従い、適切な投与量、投与剤型もしくは投与様式（例えば、本明細書に記載している投与量、投与剤型または投与様式など）により、適切な方法で本明細書に記載している化合物を投与するための指示を含む。別の実施態様においては、情報に関する材料は、ヒト（例えば、本明細書に記載している疾患を発症する危険性があるヒトなど）などの適切な対象に対し、本明細書に記載している化合物を投与するための指示を含む。

【0237】

情報に関する材料は、様式に制限はない。多くの場合、指図書などの情報に関する材料は、印刷された文書、図、および/もしくは写真などの印刷物（例えば、ラベルまたは印刷された用紙など）として提供される。しかしながら、情報に関する材料は、その他の様式、例えば、ブライコ点字法、コンピューターでの読み取りが可能な材料、ビデオ録画または音声録音などで提供することもできる。別の実施態様においては、情報に関する材料は、連絡情報、例えば、物理的住所、e-メールアドレス、ウェブサイトもしくは電話番号などであり、このとき、キットの使用者は、本明細書に記載している化合物ならびに/または、本明細書に記載している使用方法に関する重要な情報を得ることができる。勿論、情報に関する材料は、様式を任意に組み合わせて提供することもできる。

40

【0238】

50

本明細書に記載している化合物に加えて、キットの組成物には、溶媒もしくは緩衝剤、安定剤、保存料、香料（例えば、苦みに対する拮抗剤または甘味料など）、芳香剤もしくはその他の化粧用原料、ならびに／または、本明細書に記載している状態もしくは疾患を治療するための第二の物質などのその他の原料を加えることができる。別の方法としては、その他の原料をキットに加えるが、本明細書に記載している化合物とは別異の組成物もしくは容器に加える。そのような実施態様においては、キットは、本明細書に記載している化合物とその他の原料とを混合するため、または、本明細書に記載している化合物をその他の原料と併用するための指示書を含む。

【0239】

本明細書に記載している化合物は、液体、乾燥物、または凍結乾燥物などの任意の様式で提供することができる。好ましくは、本明細書に記載している化合物は、実質的に純粋および／または滅菌状態である。本明細書に記載している化合物を液体溶液として提供する場合には、該液体溶液は、水溶液、特に、滅菌水溶液であることが好ましい。本明細書に記載している化合物を乾燥物として提供する場合には、一般的に、適切な溶媒を加えて再構成する。滅菌した水または緩衝液などの溶媒をキットに追加して提供することができる。

【0240】

キットは、本明細書に記載している化合物を含有する組成物を入れるための1個またはそれ以上の容器を含む。いくつかの実施態様においては、キットは、組成物および情報に関する材料を入れるための独立した容器、仕切または区画を有する。例えば、組成物をビン、バイアルもしくはシリンジに充填し、情報に関する材料はプラスチック製のカバーもしくは袋に入れる。別の実施態様においては、キットの別異の要素を単一、非区分の容器に入れる。例えば、情報に関する材料をラベル様式で貼り付けたビン、バイアルもしくはシリンジに組成物を充填する。いくつかの実施態様においては、キットは複数の個別容器（パックなど）からなっており、各容器には、本明細書に記載している化合物のひとつもしくはそれ以上の単位投与剤型（本明細書に記載している投与剤型など）が入っている。例えば、キットは、複数のシリンジ、アンプル、ホイル包装物もしくはプリスターパックからなっており、各容器には、本明細書に記載している化合物の単回単位投与量を含む。キットの容器は、気密性、耐水性（例えば、湿度の変化または蒸気を通さないなど）および／または遮光性である。

【0241】

キットは、組成物の投与に適したデバイス、例えば、シリンジ、吸入装置、ピペット、ピンセット、計量スプーン、スポイト（点眼瓶など）、スワブ（綿製スワブまたは木製スワブなど）、またはそのような任意の送達デバイスを追有する。好ましい実施態様においては、デバイスは、外科的挿入用パッケージなどの医療用埋込デバイスである。

【0242】

遺伝子情報

SIRT1遺伝子情報は、以下に記載しているような対象由来の遺伝子材料（DNAまたはRNAなど）を評価することによって得ることができる。遺伝情報とは、1個もしくはそれ以上のヌクレオチド位置における核酸配列に関する指摘をさす。例えば、遺伝子情報としては、特定の多型（1個またはそれ以上のヌクレオチド変異など）の存否に関する指摘が挙げられる。多型の例としては、一塩基多型（SNP）、制限酵素認識部位もしくは制限フラグメントの長さ、挿入、逆位、欠失、反復（トリヌクレオチド反復、レトロウイルス性反復など）などが挙げられる。

【0243】

SIRT1 SNPの例を表2に示す。

10

20

30

40

【表 2】

表 2 : SIRT1 の SNP の例

開始	終了	dbSNP rs#	局所遺伝子座	transID	ヘテロ数の平均	ヘテロ数の標準誤差	
69520160	69520160	<u>rs730821</u>				0	
69520607	69520607	<u>rs3084650</u>				0	
69530733	69530733	<u>rs4746715</u>				0	
69531621	69531621	<u>rs4745944</u>				0	
69535743	69535743	<u>rs3758391</u>	SIRT1 : 遺伝子座 ;		0.267438	0.153425	
69536360	69536360	<u>rs3740051</u>	SIRT1 : 遺伝子座 ;		0.424806	0.114325	
69536618	69536618	<u>rs932658</u>	SIRT1 : 遺伝子座 ;			0	10
69536736	69536736	<u>rs3740053</u>	SIRT1 : 遺伝子座 ;			0	
69536742	69536742	<u>rs2394443</u>	SIRT1 : 遺伝子座 ;			0	
69539733	69539733	<u>rs932657</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69540006	69540006	<u>rs737477</u>	SIRT1 : イントロン ;		0.118187	0.201473	
69540390	69540390	<u>rs911738</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69540762	69540762	<u>rs4351720</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69540970	69540970	<u>rs2236318</u>	SIRT1 : イントロン ;		0.222189	0.135429	
69541621	69541621	<u>rs2236319</u>	SIRT1 : イントロン ;		0.455538	0.102018	
69544136	69544136	<u>rs768471</u>	SIRT1 : イントロン ;		0	0.01	
69547213	69547213	<u>rs1885472</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69549191	69549191	<u>rs2894057</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69551326	69551326	<u>rs4746717</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69557788	69557788	<u>rs2224573</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	20
69558999	69558999	<u>rs2273773</u>	SIRT1 ;	NM_012238 ;	0.430062	0.135492	
69559302	69559302	<u>rs3818292</u>	SIRT1 : イントロン ;		0.456782	0.10598	
69564725	69564725	<u>rs1063111</u>	SIRT1 ;	NM_012238 ;		0	
69564728	69564728	<u>rs1063112</u>	SIRT1 ;	NM_012238 ;		0	
69564741	69564741	<u>rs1063113</u>	SIRT1 ;	NM_012238 ;		0	
69564744	69564744	<u>rs1063114</u>	SIRT1 ;	NM_012238 ;		0	
69565400	69565400	<u>rs3818291</u>	SIRT1 : イントロン ;		0.179039	0.132983	
69566230	69566237	<u>rs5785840</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69566318	69566318	<u>rs2394444</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69567559	69567559	<u>rs1467568</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69567728	69567728	<u>rs1966188</u>	SIRT1 : イントロン ;			0	
69568961	69568961	<u>rs2394445</u>	SIRT1 ;	NM_012238:UT R ;		0	30
69568962	69568962	<u>rs2394446</u>	SIRT1 ;	NM_012238:UT R ;		0	
69569231	69569231	<u>rs4746720</u>	SIRT1 ;	NM_012238:UT R ;		0	
69569461	69569461	<u>rs752578</u>	SIRT1 ;	NM_012238:UT R ;		0	
69570479	69570479	<u>rs2234975</u>	SIRT1 ;	NM_012238:UT R ;		0	
69570580	69570580	<u>rs1022764</u>	SIRT1 : 遺伝子座 ;			0	
69570983	69570983	<u>rs1570290</u>	SIRT1 : 遺伝子座 ;		0.0392	0.167405	
69572334	69572334	<u>rs2025162</u>				0	
69573968	69573968	<u>rs4141919</u>	DKFZP564G092 : 遺伝子座 ;			0	40
69574252	69574252	<u>rs14819</u>	DKFZP564G092 : 遺伝子座 ;			0	
69575032	69575032	<u>rs14840</u>	DKFZP564G092 : 遺伝子座 ;				

【 0 2 4 4 】

多様な方法で、遺伝子情報をデジタル記録または伝達することができる。代表例としては、1もしくはそれ以上のビット、または文字列などが挙げられる。例えば、2ビットを用いて複対立遺伝子 (biallelic) マーカーを記述することができる。ひとつの実施態様においては、第一のビットが第一の対立遺伝子 (例えば、劣性対立遺伝子など) の存在を示唆し、第二のビットが別の対立遺伝子 (例えば、優性対立遺伝子など) の存在を示唆する。

多対立遺伝子用マーカー（例えば、2以上の対立遺伝子が確認できるなど）には、追加のビット、ならびに他のエンコード様式（例えば、二進法、十六進法など、ASCIIまたはUnicodeなど）を使用することができる。いくつかの実施態様においては、遺伝子情報はハプロタイプ、例えば、同一染色体上の複数の多型などを記述している。しかしながら、多くの実施態様においては、遺伝子情報が導入されていない。

【0245】

本明細書に記載している化合物を投与するか否かに関する決定は、SIRT1に関する遺伝子情報に基づいて下すことができる。例えば、本明細書に記載している化合物の投与法には、SIRT1または別のサーチインに関する遺伝子情報を得るために対象由来の核酸を評価すること、ならびに、本明細書に記載している化合物を投与することを含む。

10

【0246】

データベース

本発明のさらなる特徴は、患者（本明細書に記載している疾患の治療を受けている患者など）に関するパラメーターを用い、本明細書に記載している化合物のうちのひとつもしくはそれ以上に関する情報に関連のある、または、確認のためのデータベースである。パラメーターは、血圧、体芯温度などの一般的なパラメーターであり、あるいは、本明細書に記載している特定の疾病もしくは疾患に関連したパラメーターである。

【実施例】

【0247】

以下のすべての実施例において、化合物は、表1の定義に対応している化合物をさす（すなわち、例示化合物）。

20

【0248】

実施例1：HeLaアポトーシスアッセイ

以下の例示化合物について、ロシュ・アプライド・サイエンス（Roche Applied Science）社から販売されているCell Death Detection ELISAプラスキットを用い、HeLa細胞アポトーシスアッセイに及ぼす影響を調べた。

【0249】

化合物	用量	平均	SD
8	0	1.12	0.15
8	0.5	1.23	0.04
8	2.5	1.85	0.24
8	10	2.11	0.25
8	25	2.27	0.20
5	0	0.92	0.07
5	0.5	1.00	0.08
5	2.5	0.97	0.11
5	10	1.07	0.02
5	25	0.91	0.07
レスベラトール	0	0.73	0.08
レスベラトール	0.5	0.83	0.05
レスベラトール	2.5	0.84	0.02
レスベラトール	10	1.01	0.07
レスベラトール	25	0.56	0.08
DMSO	0	0.72	0.09
DMSO	0.5	0.79	0.12
DMSO	2.5	0.91	0.13
DMSO	10	0.76	0.09
DMSO	25	1.18	0.20

10

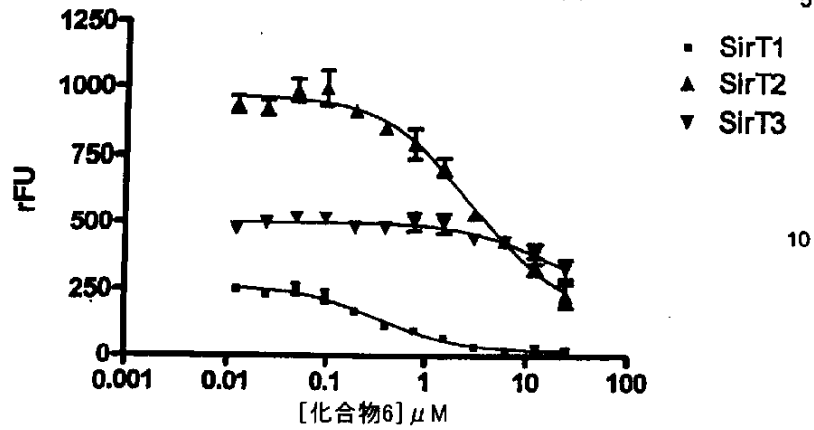
20

【 0 2 5 0 】

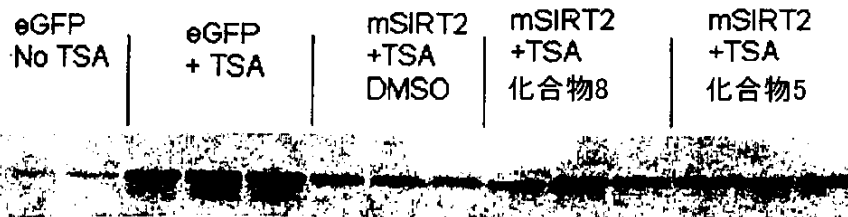
実施例 2

実施例2

p53 Fluor de Lys基質を用いて行った
化合物6によるSirT酵素の阻害



	SirT1	SirT2	SirT3
シグモイド用量反応(可変勾配)			
最良適合値			
BOTTOM	17.24	156.1	248.2
TOP	281.7	966.4	499.2
LOGEC50	-0.4290	0.4890	1.111
HILLSLOPE	-1.080	-0.9944	-1.146
EC50	0.3724	3.083	12.920



試薬リスト:

試薬の名称	供給形態	販売元	カタログ番号	貯法
1 ヒトSirtT1	2.5または3.5U/ μ l	Biomol	SE-239	-20C
2 Fluor de Lys基質	DMSO中50mM	Biomol	KI-104	-20C
3 Fluor de Lys発色剤	20倍濃度	Biomol	KI-105	-20C
4 NAD	固体	Sigma	N-1636	-20C
5 ニコチンアミド	固体	Calbiochem	481907	室温
6 Trizma-HCl	固体	Sigma	T-5941	室温
7 塩化ナトリウム	固体	Sigma	S-9888	室温
8 塩化マグネシウム	固体	Sigma	M-2393	室温
9 塩化カリウム	固体	Sigma	P-3911	室温
10 ポリオキシエチレン ソルビタンモノラウレート (Tween-20)	100%	Sigma	P-7949	室温
11 Fluor de Lys 脱アセチル化標準物質	DMSO中10mM	Biomol	KI-142	-20C

10

装置リスト:

機器の名称	機器の販売元	カタログ番号
1 蛍光プレートリーダー SynergyHT	BIO-TEK	SIAFR
2 Matrix Impact2 16チャンネルピペット	Apogent Discoveries	2069
3 37°Cのインキュベーター	VWR	1540

20

使い捨て器具のリスト:

使い捨て器具	販売元	カタログ番号
1 384白色少容量プレート	Greiner / Bellico	4507-84075
2 Matrix 16チャンネルピペット用のチップ	Apogent Discoveries	7421
3 25mlに小分けした試薬	Apogent Discoveries	8095
4 プレート密封用フィルム	Apogent Discoveries	4418

30

40

標準的な試薬調製:

調製する 試薬の名称	成分名	M.W.	成分量(水中)	成分の 最終濃度	貯法	
1 Tris-HCl, pH 8.0	Trizma-HCl HCl	157.6	157.6 g / L to pH 8.0	1 M pH 8.0	室温	
2 塩化ナトリウム	NaCl	58.44	292 g / L	5M	室温	
3 塩化マグネシウム	MgCl ₂	203.3	20.33 g / L	100mM	室温	
4 塩化カリウム	KCl	74.55	20.13 g / L	270mM	室温	10
5 ポリオキシ エチレンソル ビタンモノラウレート	Tween-20		1ml / 10ml	10%	室温	
6 NAD	NAD	717	0.0717g / ml	100mM	-20C	
7 ニコチンアミド	ニコチンアミド	122	0.0061g / ml	50mM	-20C	
8 アッセイ緩衝液	Tris-HCl, pH 8.0 NaCl KCl MgCl ₂ Tween-20		1Mストック溶液 /Lを25ml 5Mストック溶液 /Lを27.4ml 270mMストック溶液 /Lを10ml 100mMストック溶液 /Lを10ml 10%ストック溶液を 5ml	25mM 137mM 2.7mM 1mM 0.05%	4C	20
**使用直前に以下のストック溶液を調製する			以下はアッセイ緩衝液 で調整する			30
9 2倍濃度の基質	Fluor de Lys基質		6ul / ml	300uM	氷中	
	NAD		100mMストック溶液 /mlを20 μ l	2mM		
10 酵素混合物	BiomoçSirT1		**ロットの比活性に よって異なる。 例えば、3.5U / μ l 35.71 μ l/ml	0.125U / μ l (0.5U / ウェル)	氷中	40
11 発色 / 停止液	20倍濃度の発色剤濃縮液		50ul / ml	アッセイ緩衝液 中で1倍濃度	氷中	
	ニコチンアミド		50mMのストック溶液 /mlを20 μ l	1mM		

【 0 2 5 1 】

実施例 3

哺乳類の酵素が化合物8によって阻害されるか否かを確認することを目的として、グル
タチオン - S - トランスフェラーゼに融合させたヒトSIRT1を発現させることを意図した構

築体を用いて293T細胞をトランスフェクトし、細胞抽出物から迅速に精製できるようにした。細胞溶解後、グルタチオン-S-トランスフェラーゼビーズと共に細胞抽出物をインキュベートし、続いて溶解緩衝液で数回洗浄し、最終洗浄はSIRT1酵素アッセイ緩衝液で行った。ある濃度範囲の化合物8の存在下、Fluor-de-lysアッセイ（バイオモル（Biomol）社）に、GST-SIRT1が結合したビーズを加えた。図3aに示しているように、哺乳類SIRT1に対する化合物8のEC50値は、組換え微生物によって産生されたヒト酵素に関して得られたそれと同等であった。

【0252】

図3Bからわかるように、エトポシド処理後、化合物8は細胞内に侵入し、p53アセチル化（382番のリジンの位置）が増加した。図3Bに示す実験においては、SIRT1阻害剤である化合物8もしくはニコチンアミドの存在下または不在下、20 μ Mのエトポシド（DNA損傷剤）を用いてNCI-H460細胞を処理し、ウェスタンブロットによってアセチル化p53（382番のリジンの位置）の量を可視化した。化合物8は、DMSO単独の場合と比較して、p53アセチル化を顕著に増加させ、1 μ Mと10 μ Mの効果は同等であった。

【0253】

実施例4

化合物8のエナンチオマーについて試験を行ったが、このとき、ひとつのエナンチオマーがエナンチオマー混合物よりも強力であるか否かを判断することを目的として、各エナンチオマーの純度は、エナンチオマー過剰率90%以上にした。20 μ Mのエトポシドの存在下、化合物8(+)および8(-)を用い、6時間かけてNCI-H460細胞を処理し、次に、細胞を溶解し、Ab-6（オンコジーン・サイエンス（Oncogene Science）社）を用いてp53の免疫沈降を行った。p53のアセチル化リジン382を認識する抗体（セル・シグナリング（Cell Signaling）社）を用いて抽出物をプローブした。図4は、化合物8の活性および不活性エナンチオマーを示す。特に不活性なエナンチオマーである化合物8(+)は、エトポシドの存在下においてp53のアセチル化を促進しなかったが、化合物8(-)は、p53タンパク質のアセチル化および安定化を顕著に促進した。

【0254】

実施例5

以下の実験の結果（図5に示している）から、化合物のp53アセチル化促進能は、該化合物のイン・ビトロ（in vitro）におけるSIRT1阻害能と相関していることが示された。一連の構造類似化合物を1 μ Mの濃度で細胞に加えた。IC50が1 μ M未満でSIRT1を阻害した化合物のみがp53のアセチル化を促進し、IC50が1 μ M以上の化合物は促進しなかった。

【0255】

実施例6

図6に示した実験は、SIRT1活性依存性の酵母サイレンシングアッセイ（silencing assay）において、化合物8の不活性エナンチオマーである化合物8(+)は細胞増殖に影響を与えないが、活性エナンチオマーである化合物8(-)はSIRT1を阻害し、URA3を発現させることを示している（URA3は、5-フルオロウラシル存在下において増殖を阻止する）。テロメアにURAを有するSL8c株を酵母に基づくアッセイに使用し、化合物のスクリーニングを行った。-URA培地中で細胞を増殖させ、脱サイレンス化細胞を選択した。翌日、2%グルコース添加新鮮YPD培地で細胞を1:20に希釈し、5時間増殖させた。次に、SDおよびSD+0.1% 5 FOA培地を用い、OD=0.01になるように細胞を希釈した。10 μ lのSDおよびSD+0.1% 5 FOA培地を用い、化合物を段階希釈した。96ウェルプレートにピペットで140 μ lの細胞を入れ、30℃で18~24時間増殖させた。

【0256】

実施例7

さらなる細胞において、化合物8はSIRT1酵素を阻害した。20 μ Mのエトポシド（TOPO）存在下、化合物8を用いて細胞系U2OSおよびMCF7を6時間処理し、続いて細胞を溶解させ、アガロースビーズにコンジュゲートさせたp53 Ab-6を用いて免疫沈降を行った。サンプルはSDS-PAGEで分析し、p53のアセチル化リジン382を認識する抗体を用いてイムノブロット

を行った。図7に示す結果から、化合物8は、多様な細胞系において、p53アセチル化に対して同様の影響を与えることにより、SIRT1を阻害することが示された。

【0257】

実施例8

p53アセチル化に対する化合物8の影響がp53の機能に変化をもたらすか否かを評価することを目的として、DNA損傷後の細胞生存を測定した。SIRT1阻害剤の存在下もしくは不在下、多様な濃度のエトポシドを用いてNCI-H460細胞を損傷させた。図8に示すように、本アッセイにおいては、化合物8自身は、P53の機能を著しく変えはしなかった。

【0258】

実施例9

濃度の異なるエトポシドおよび1 μ Mの化合物8の存在下、96ウェルのサイトスタープレート (cytostar plate) に1ウェルあたり800個の密度で細胞を播種した。24時間間隔でチミジンの取込を測定した。図9に示すように、本実験は、エトポシドと同時に、エトポシド処理前および後に化合物を添加した各条件下において、NCI-H460細胞の増殖特性に対してエトポシドと化合物8との間に共同作用はなかったことを示している。

【0259】

実施例10

化合物8の存在下または不在下において、HEK293細胞を血清飢餓状態にし、続いて、細胞を溶解し、p27タンパク質に対するイムノブロット分析を行った。図10からわかるように、化合物8で細胞を処理することにより、細胞飢餓を介した細胞周期阻害因子p27に対する促進制御が解除された。この結果に対して提唱される説明としては、SIRT1を介した脱アセチル化により、FoxO1を介したp27の転写が不活化され、化合物8の添加によりこの効果が打ち消された。

【0260】

実施例11

GFP-hSIRT2イソ型1 (緑) を用いてHeLa細胞をトランスフェクトした。トランスフェクト36時間後、1 μ MのTSAならびにDMSOもしくは50 μ Mの化合物8のいずれかを加えた。翌朝細胞を固定し、透過性にし、アセチル化チューブリンを染色 (赤) した。DMSO処理した細胞においては、SIRT2を発現する細胞内にアセチル化チューブリンはほとんど存在せず、化合物8処理した細胞内では、チューブリンはより高度にアセチル化されており、このことから、SIRT2の影響が阻止されていることが示唆される。

【0261】

ウェスタン分析を用いて化合物の影響を観察することもできた。eGFP (対照) またはマウスSIRT2イソ型1 (mSIRT2) を用いて293T細胞をトランスフェクトした。TSAを添加してアセチル化チューブリンの量を増やし、同時に、DMSOもしくは以下に挙げている化合物を加えて10 μ Mにした。

【0262】

実験手順：

段階的記述

1. アッセイするウェル数に対して必要な基質を2倍濃度で調製する。5 μ l / ウェルが必要。
2. 試験ウェルに2倍濃度の基質5 μ lを分配する。
3. 試験ウェルに試験化合物1 μ lを分配する。正の対照ウェルに化合物溶媒 / 希釈剤1 μ lを分配する。50%阻害ウェルに1mMのニコチンアミド1 μ lを分配する。100%阻害ウェルに10mMのニコチンアミド1 μ lを分配する。
4. 負の対照ウェルにアッセイ緩衝液4 μ lを分配する (酵素対照なし)。
5. アッセイするウェル数に対して必要量の酵素を調製する。酵素混合液は4 μ l / ウェルが必要。
6. 試験ウェルおよび正の対照ウェルに酵素混合液4 μ lを分配する。
7. カバーを掛け、37 °Cで45分間インキュベートする。

8. 使用前30分以内に、アッセイするウェル数に対して必要量の1倍濃度の発色 / 停止試薬を調製する。

9. 全てのウェルに1倍濃度の発色 / 停止試薬10 μ lを分配する。

10. 室温で少なくとも15分間インキュベートする。

11. 蛍光プレートリーダーで読み取る。励起 = 350 ~ 380nm、発光 = 440 ~ 460nm

12. 基質中のFluor de Lysは、データ上の計算を行う前に、バックグラウンドとして差し引く必要がある固有の蛍光を有する。これらの値は、負の対照ウェルに見出すことができる。

【0263】

付記1: Fluor de Lys脱アセチル化標準物質を用いた標準曲線の作成

10

1. 標準物質の1 μ M希釈液を調製し、上述のアッセイに使用する脱アセチル化標準物質の濃度範囲を定める。1 μ M希釈液10 μ lを発色液10 μ lと混合し、アッセイでの読み取りと同一の波長および感度設定で読み取る。このAFU (任意蛍光単位) 概算値 / μ Mを用い、標準曲線内で試験する濃度範囲を定める。

2. アッセイ緩衝液を用い、所望する濃度範囲にわたってFluor de Lys脱アセチル化標準物質の一連の希釈液を調製する。

3. アッセイ緩衝液10 μ lを「ゼロ」ウェルに入れる。

4. 標準物質希釈液10 μ lをウェルに入れる。

5. 発色液10 μ lをウェルに入れ、室温で15分間インキュベートする。

6. 上記の波長でプレートを読み取る。

20

7. 蛍光シグナル (y) に対してFluor de Lys脱アセチル化標準物質の濃度 (x) をプロットし、AFU / μ Mとしての傾きを求める。

【0264】

発色反応阻害剤に対する試験用プロトコール

1. 標準曲線から、アッセイ中の正の対照と同等の蛍光シグナルを発する脱アセチル化標準物質の濃度を選び出す (例えば、5 μ M)。

2. 2倍濃度の脱アセチル化標準物質5 μ lを分配する (例えば、10 μ M)。

3. 化合物1 μ l、アッセイ緩衝液4 μ lを分配する。

4. 発色液10 μ lを分配する。

5. 室温で15分間 (またはスクリーニングと同等の時間) インキュベートし、スクリーニングと同一の設定で読み取る。

30

【0265】

本発明に関する多数の実施例を記載してきた。しかしながら、本発明の意図および範ちゅうを超えることなく多様な変形が可能であることは自明である。その他の実施態様については請求項に記載されている。

【図面の簡単な説明】

【0266】

【図1】代表化合物およびデータの表

【図2】SIRTの活性部位に結合している化合物8の取り得る方向性のうちのひとつを示したコンピューター作成モデル

40

【図3】図3aは、化合物8による哺乳類SirT1の阻害を示すグラフ。図3bは、エトポシドのみ、またはエトポシド + 化合物8で処理したNCI-H460細胞のウェスタンブロット

【図4】化合物8のエナンチオマー8(-)がp53アセチル化を促進することを示す棒グラフ

【図5】SirT触媒活性を阻害する化合物はp53アセチル化にも影響を及ぼすことを示すウェスタンブロット

【図6】化合物8のエナンチオマー8(-)は、エナンチオマー8(+)よりも酵母sir2に対する阻害が強いことを示すグラフ

【図7】U2 OS細胞およびMCF-7細胞内のSirT1に対する化合物8の阻害効果を示すゲルアッセイ

【図8】DNA損傷後の細胞生存に対する化合物8の効果を示すグラフ

50

【図 9】NCI-H460細胞の細胞生存に対する化合物8の効果を示すグラフ

【図 1 0】化合物8が、血清飢餓培地による細胞周期阻害剤p27の促進制御を止めることを示す棒グラフ

【 図 1 】

化合物番号	選択性				
	Sirt1	Sirt2	Sirt3	HDAC	NADase
8	0.038	3.96	27.6	>50	>50
4	0.357	5.99	>50	>50	104
5	0.639	14.44	>50	>50	17
15	>50	>50			23
16	>50	>50			

【 図 2 】

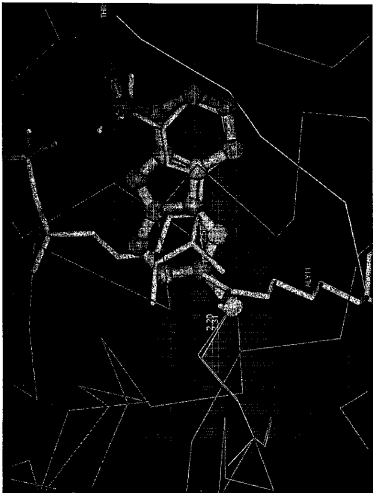
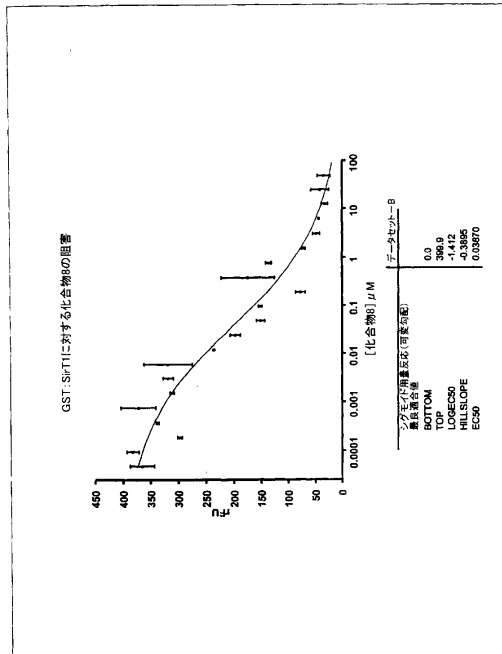
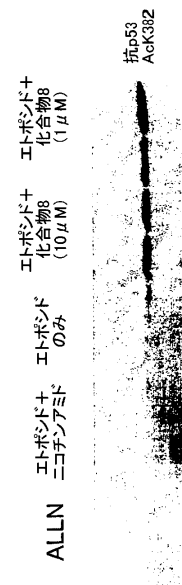


FIGURE 2

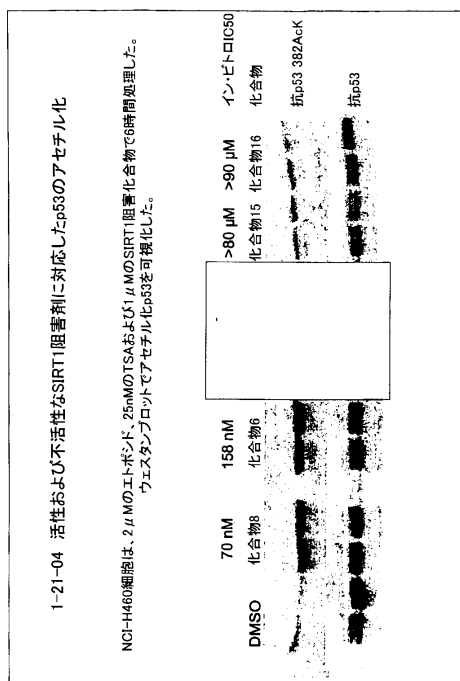
【図 3 A】



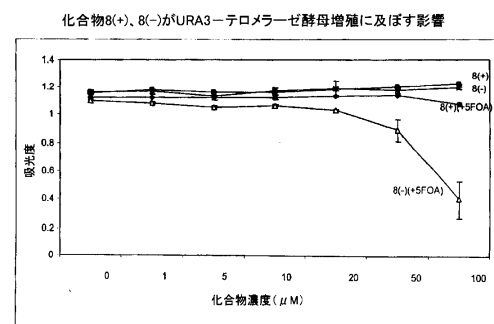
【図 3 B】



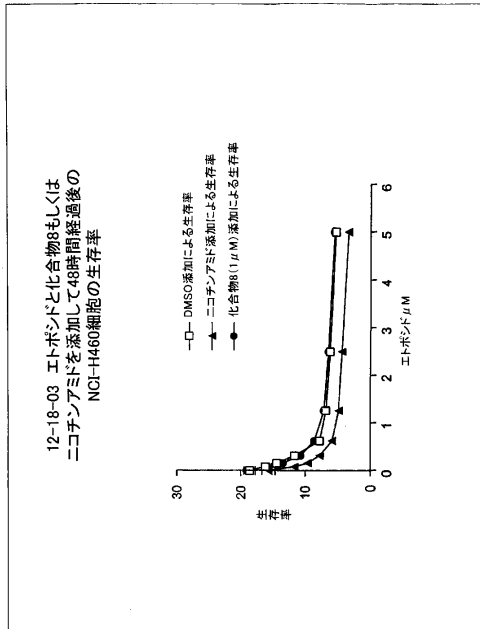
【図 5】



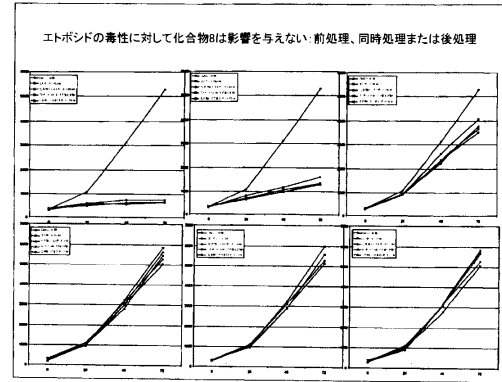
【図 6】



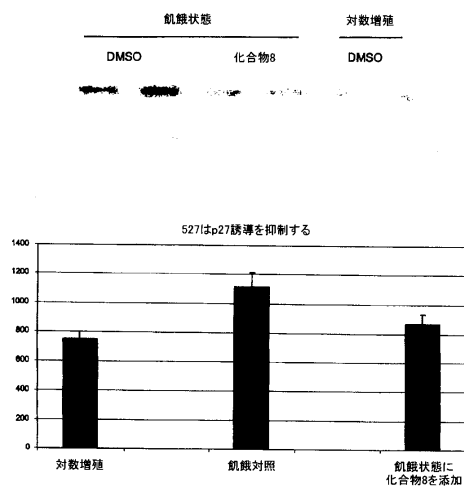
【図 8】



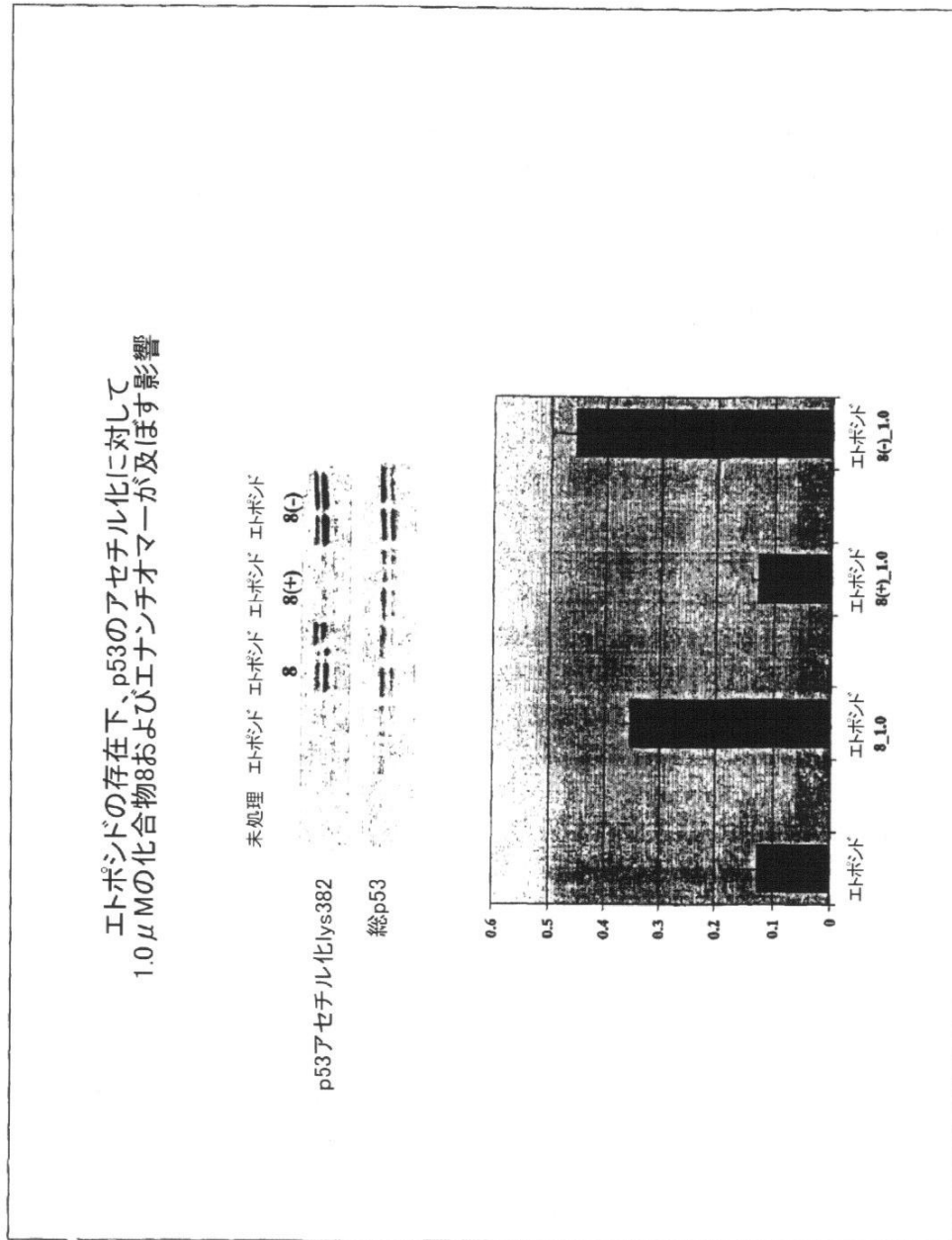
【図 9】



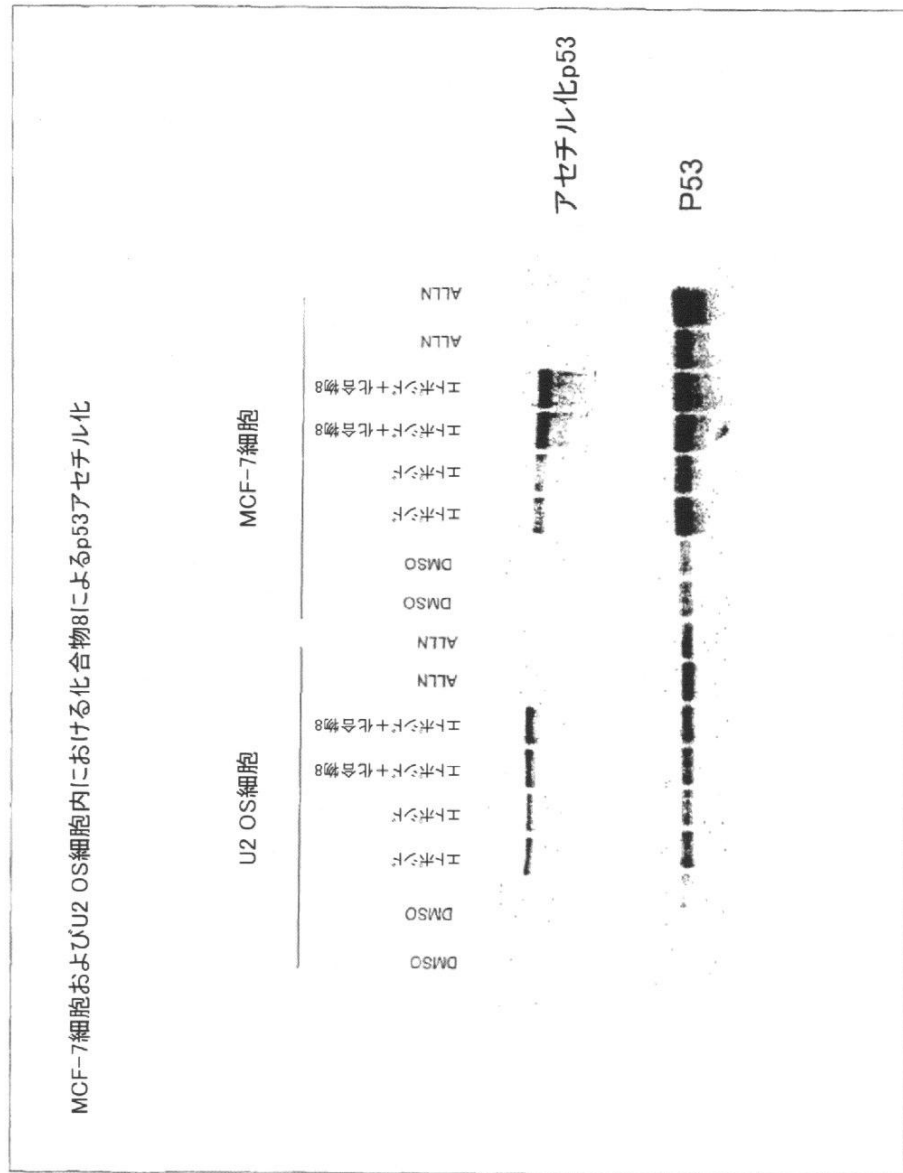
【図 10】



【図4】



【図7】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/560,509
 (32)優先日 平成16年4月7日(2004.4.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (72)発明者 ナッパー, アンドリュー
 アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19317 チャッツ フォード ランバーハースト ク
 ロース 910
- (72)発明者 ディステファノ, ピーター
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01772 サウスボロ マウント ヴィックリー ロー
 ド 80
- (72)発明者 ヒクソン, ジェフリー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01952 サリスバリー ベイカー ロード 2
- (72)発明者 マクドナー, トーマス
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01720 アクトン モホーク ドライヴ 48
- (72)発明者 ソロモン, ジョナサン エム
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02144 サマーヴィル ウィンスロー アヴェニュー
 47
- (72)発明者 フーバー, エル ジュリー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02458 ニュートン サリスバリー ロード 39
- (72)発明者 カーティス, ローリー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01702 フラミンガム セイヤー ストリート 9
- (72)発明者 トーマス, ラッセル ジェイ
 イタリア国 53041 シエナ アシャーノ ストラダ コムナーレ ディ サルテアーノ
 1
- (72)発明者 ボン, ジャン - フランソワ
 イギリス国 オーエックス14 1ピーエル オックスフォードシャー州 エイビンドン ラーク
 ヒル ロード 32

審査官 富永 保

- (56)参考文献 特開昭49-041367(JP, A)
 特開昭48-076865(JP, A)
 特表平10-503488(JP, A)
 国際公開第03/051837(WO, A1)
 国際公開第03/062392(WO, A1)
 特開昭50-069072(JP, A)
 米国特許第04009181(US, A)
 米国特許第03769298(US, A)
 英国特許第05830911(GB, B)
 VOPROSY BIOLOGICHESKOI, MEDITSINSKOI, I FARMATSEVTICHESKOI KHIMII, (2001), No.4, p.40-5
 J.Biological Chemistry, (2001), 276(42), p.38837-43

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D

A61K

CA/REGISTRY(STN)